



HAL
open science

Rôle de la vitamine A dans le maintien de l'intégrité du striatum et de la voie nigro-striée dans le contexte de la maladie de Parkinson

Anaïs Marie

► **To cite this version:**

Anaïs Marie. Rôle de la vitamine A dans le maintien de l'intégrité du striatum et de la voie nigro-striée dans le contexte de la maladie de Parkinson. Neurosciences. Université de Bordeaux, 2022. Français. NNT : 2022BORD0017 . tel-04011146

HAL Id: tel-04011146

<https://theses.hal.science/tel-04011146v1>

Submitted on 2 Mar 2023

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.

THÈSE PRÉSENTÉE
POUR OBTENIR LE GRADE DE
**DOCTEUR DE
L'UNIVERSITÉ DE BORDEAUX**

ÉCOLE DOCTORALE DES SCIENCES DE LA VIE ET DE LA SANTÉ
SPÉCIALITÉ : **NEUROSCIENCES**

Par

Anaïs MARIE

Rôle de la vitamine A dans le maintien de l'intégrité du striatum et de
la voie nigro-striée dans le contexte de la maladie de Parkinson

Sous la direction du Dr. Clémentine BOSCH-BOUJU

Soutenue le 27 janvier 2022

Membres du jury :

Pr. Agnès NADJAR , Professeur, Université de Bordeaux	Présidente
Dr. Sébastien CARNICELLA , Chargé de recherche, Université de Grenoble	Rapporteur
Pr. Wojciech KREZEL , Directeur recherche, Université de Strasbourg	Rapporteur
Dr. Catherine FEART , Chargé de recherche, Université de Bordeaux	Examinatrice
Pr. Emmanuel MOYSE , Professeur, Université de Tours	Examineur
Dr. Clémentine BOSCH-BOUJU , Maître de conférences, Université de Bordeaux	Directrice de thèse

Remerciements

Tout d'abord, je tiens à remercier l'ensemble des membres du jury d'avoir accepté d'évaluer ces travaux de thèse. Je remercie le Dr. Wojciech Krezel et le Dr. Sébastien Carnicella d'avoir accepté d'être les rapporteurs de cette thèse, le Pr. Emmanuel Moysé et le Dr. Catherine Féart, en leur qualité d'examineur, ainsi que le Pr. Agnès Nadjar qui me fait l'honneur de présider ce jury.

Je tiens à remercier mon encadrante de thèse, le Dr. Clémentine Bosch-Bouju sans qui cette thèse n'aurait tout simplement pas pu voir le jour. Merci pour ton encadrement ces trois dernières années, de m'avoir donné les moyens de réaliser les différents travaux, de participer à des congrès, et de m'avoir fait découvrir le monde de la recherche. Et bien entendu merci pour ton aide précieuse dans la rédaction de ce manuscrit et des différentes communications et ta disponibilité. La thèse est une expérience intense mais je ne regrette pas d'y avoir participé !

Je remercie le Dr. Sophie Layé pour m'avoir accueillie au sein de Nutrineuro, ainsi que le Pr. Véronique Pallet pour ce stage d'été au début duquel je n'aurais jamais imaginé soutenir une thèse 4 ans après.

Un grand merci au Dr Essi Biyong, qui avant d'être docteur a été une super thésarde, merci de m'avoir aussi bien encadrée durant ce stage de M2, pour ta patience et tes encouragements.

Merci à l'ensemble des membres du laboratoire, au Dr. Sylvie Vancassel pour ton aide en HPLC et aux chercheurs pour vos conseils et la touche de sarcasme, qui, je crois, fait partie du job, avec une petite dédicace à l'équipe food-circus.

Merci aux ITAs et ingénieurs extra avec qui j'ai eu la chance de travailler, en particulier Serge Alfos, mon premier mentor en qPCR et toujours disponible pour répondre à mes nombreuses questions. Merci à Véronique De Smedt-Peyrusse pour les WB certes, mais aussi pour nos discussions et tes paroles réconfortantes. Merci à Céline Ducroix-Crepy et Jean-Christophe Helbling, toujours présents même quand je débarque toutes les 5 min dans leur bureau avec une question. Sans vous je ne saurais même pas me servir d'une pipette (si tant est que ce soit le cas). Merci à la super équipe du secrétariat, Flavie Blondel, Marie-Pierre Manain et une dédicace spéciale pour Isabelle Moreau, pour ton soutien, ta bonne humeur et tes petites attentions au quotidien.

Et je considère que je n'aurais pas pu survivre à la thèse sans la super team étudiante de Nutrineuro, alors un ENORME merci !! Merci à mes deux supers stagiaires pour votre aide, Julien Leroy et Morgane Darricau, vous m'avez aussi aidée à grandir et comprendre

qu'encadrer quelqu'un c'est un métier ! Merci à Camille pour m'avoir accompagnée et soutenue pour le meilleur et pour le pire dans notre ascension du Kilimandjaro, à Mathilde mon démon au cœur d'ange et ma partenaire, à Fanny pour ton énergie et nos aventures, à Maud pour nos longues discussions formant un savant mélange de psychanalyse et de fous rires, à John pour ton don à me redonner le sourire et m'aider à relativiser et merci à Roman et Hugo, désolée j'aurais du vous croire quand vous nous avez mises en garde au début de la thèse, du coup Anna je te souhaite bon courage ! Je n'oublie pas Stéphane et Pierre, nos Nutrineuros de cœur.

Je voudrais remercier la fit girl team bordelaise (Cécile et Clémence), je ne sais pas si on est des fit girls mais vous êtes des nanas en or. Merci aux copains de la fac, Charles dont l'appartement est devenu l'annexe des escaliers du sheitan, Maxime le seul capable d'endurer une colocation avec moi, Pag de dédramatiser mes crises de râlage et de me pardonner mes nombreux retards (pas merci de m'avoir dégôtée du rhum !), Coco mon binôme jusqu'au M2, le génie le plus humble et gentil que je connaisse (ps : brûle le pull à fourrure), Margot ma partenaire de galère/râlage de thèse, toi et moi on aura déjoué les pronostiques, Couly pour nos discussions sans fin sur les quais, Fédé, le plus stylé de mes copains, Julio d'avoir su m'écouter quand j'en avais besoin. Merci à Chloé, Solène, Laetie et Maëva (je vais être gentille et ne pas mettre vos surnoms en ligne), de me supporter depuis tant d'années et de toujours répondre présentes, pour les leçons de vie et de m'avoir aidée à grandir et gérer mon sale caractère ! Merci Laetie pour ton soutien sans faille, tu m'as redonné du courage et la force de continuer. Merci à la famille Biau pour votre bonne humeur et votre accueil, et en particulier Clément (doudou) sans qui ces deux dernières années auraient manqué de saveur, merci d'être là, pour tes encouragements et surtout de m'avoir supportée et su gérer mes crises de nerfs, en espérant continuer notre chemin ensemble.

Bien entendu je tiens à remercier ma famille du fond du cœur. Merci à ma grand-mère pour tes encouragements, tes conseils et d'être toujours là pour moi et à pépère, ton calme face à la tempête me manque. Merci à mes grands-parents maternels, en espérant que de là où vous êtes, vous êtes fiers de moi. Merci à mon Papy pour les échappées en Normandie et le bol d'air marin lors de nos virées en mer. Merci à mes cousins Thomas et Vincent et ma marraine, grâce à vous je me suis sentie chez moi à Bordeaux. Un grand merci tata d'Amérique pour ton aide plus que précieuse durant cette thèse, de m'aider à prendre du recul et à tata Catherine pour tes paroles encourageantes en espérant vous voir bientôt.

Merci à mon petit frère, le nain, pour me redonner le sourire quand j'en ai besoin, me faire découvrir de nouvelles choses, de m'avoir préparé un séjour 5 étoiles à Copenhague et j'en passe. Je suis fière de toi, et je suis certaine que tu réussiras tes « vacances » avec panache.

Attention mes royalties vont augmenter maintenant 😊

Enfin, merci à mon papa de toujours répondre présent même quand je prends mon ton pointu,

de m'aider à grandir tout en me protégeant, de toujours chercher mon bonheur (et aussi merci pour les bons petits plats !). Merci à ma maman, la première lectrice de ce manuscrit et le meilleur soutien dont on puisse rêver. Tu as été à mes côtés littéralement tout au long de mes études, sans toi je n'aurais pas fait de thèse. Merci pour ces heures incalculables passées au téléphone, à m'écouter, me rassurer et m'houspiller quand c'est nécessaire, tu m'aides à prendre confiance en moi tout en me poussant à me dépasser.

Je dédie cette thèse à mes parents, sans qui je ne serais pas la jeune femme accomplie d'aujourd'hui. Avec tout mon amour.

Publications

Marie, A., Darricau, M., Touyarot, K., Parr-Brownlie, L.C., and Bosch-Bouju, C. (2021). Role and Mechanism of Vitamin A Metabolism in the Pathophysiology of Parkinson's Disease. *J. Park. Dis.* 11, 949–970. (**Voir Annexe**)

Marie, A., Leroy, J., Darricau, M., Alfos, S., De Smedt-Peyrusse, V., Richard, E., Vancassel, S., Bosch-Bouju, C. (2022) Preventive vitamin A supplementation improves striatal function in 6-hydroxydopamine hemiparkinsonian rats. *Front. Nutr.* 9,811-843.

Marie, A., Darricau, M., Helbling, J-C., Alfos, S., Foury, A., Richard, E., Bosch-Bouju, C. Non-developmental modulation of striatal signaling by dietary vitamin A in adult rats. *En préparation pour soumission.*

Dumetz, F., Ginieis, R., Bure, C., **Marie, A.**, Alfos, S., Pallet, V., and Bosch-Bouju, C. (2020). Neuronal morphology and synaptic plasticity in the hippocampus of vitamin A deficient rats. *Nutr. Neurosci.* 1–12.

Dumetz, F., Buré, C., Alfos, S., Bonneu, M., Richard, E., Touyarot, K., **Marie, A.**, Schmitter, J.-M., Bosch-Bouju, C., and Pallet, V. (2020). Normalization of hippocampal retinoic acid level corrects age-related memory deficits in rats. *Neurobiol. Aging* 85, 1–10.

Communications

Liste des communications affichées :

Marie A, Darricau M, Goimier A, Helbling J-C, Alfos S, Desmedt-Peyrusse V, Pallet V, Vancassel S, Bosch-Bouju C. Vitamin A: A key micronutrient for Parkinson's disease? *FASEB, Etats-Unis, Juin 2021*. Obtention du premier prix pour ce poster.

Marie A, Leroy J, Darricau M, Goimier A, Helbling J-C, Alfos S, Desmedt-Peyrusse V, Pallet V, Vancassel S, Bosch-Bouju C. Vitamin A: A key micronutrient for Parkinson's disease? *NeuroFrance, Strasbourg, Mai 2021*.

Marie A, Leroy J, Darricau M, Pallet V, Vancassel S, Bosch-Bouju C. Implication of vitamin A in survival of dopaminergic neurons in a rat model of Parkinson's disease. *NeuroFrance, Marseille, Mai 2019*.

Marie A, Leroy J, Darricau M, Pallet V, Vancassel S, Bosch-Bouju C. Implication of vitamin A in survival of dopaminergic neurons in a rat model of Parkinson's disease. *IBAGS, Biarritz, Avril 2019*.

Liste des communications orales :

Présentation : Vitamin A: a key micronutrient for Parkinson's disease? *Doctoral Research Award Day, Bordeaux, Juin 2021*

1er prix flash présentation : How can dietary vitamin A delay the progression of Parkinson's disease? *Journée scientifique de l'école doctorale ED SVS, Bordeaux, Mai 2019*.

Présentation : Implication of vitamin A in neuroprotection of dopaminergic neurons in a rat model of Parkinson's disease. *NutriNeuro's Day, Bordeaux, Février 2019*.

Présentation : A role for vitamin A in Parkinson's disease? *NutriNeuro's Day, Bordeaux, Février 2020*.

Présentation : Vitamin A: a key micronutrient for Parkinson's disease? *NutriNeuro's Day, Bordeaux, Mars 2021*.

RÉSUMÉ

La maladie de Parkinson (MP) est une maladie neurodégénérative multifactorielle caractérisée par la dégénérescence des neurones dopaminergiques de la substance noire *pars compacta* (SNc) conduisant à l'apparition de symptômes moteurs. Les projections dopaminergiques de la SNc sur le striatum constituent la voie nigro-striée dont l'activité au sein des ganglions de la base est nécessaire pour le contrôle du mouvement volontaire. Plusieurs études cliniques et pré-cliniques suggèrent une implication de la vitamine A et de sa signalisation médiée par son métabolite actif, l'acide rétinoïque (AR), dans le développement et le maintien de l'intégrité de la voie nigro-striée. Cependant au cours du vieillissement, ou en cas d'apport alimentaire insuffisant, on observe un affaiblissement de la signalisation des rétinoïdes pouvant contribuer à l'étiologie de la MP. Les traitements actuels de la MP ne préviennent pas la neurodégénérescence et sont associés à de sérieux effets secondaires à long-terme, soulignant la nécessité de développer des stratégies alternatives.

C'est dans ce contexte que s'inscrit cette thèse, dont l'objectif principal était de mieux comprendre l'implication de la signalisation des rétinoïdes dans l'homéostasie fonctionnelle de la voie nigro-striée à l'âge adulte et de déterminer le potentiel effet bénéfique d'une supplémentation nutritionnelle en vitamine A pour ralentir la progression de la MP.

Les résultats obtenus dans une première étude chez le rat adulte modélisant la MP par une injection intrastriatale de 6-hydroxydopamine (6-OHDA) révèlent un effet bénéfique d'une supplémentation nutritionnelle en vitamine A sur la fonction striatale et une amélioration des déficits moteurs induits par la 6-OHDA. Cependant les analyses ne révèlent pas d'effet majeur de l'apport alimentaire en vitamine A sur le système dopaminergique. Par ailleurs, l'impact de la biodisponibilité en vitamine A sur la neuromodulation du striatum à l'âge adulte a été étudié chez le rat avec des régimes à différentes teneurs en vitamine A (régimes sub-déficient, suffisant et enrichi). Ainsi, la réalisation d'une sub-carence en vitamine A initiée à l'âge adulte a constitué une approche innovante pour modéliser une altération de la signalisation des rétinoïdes en s'affranchissant de l'impact développemental de la carence. Les résultats de cette deuxième étude révèlent l'implication de la signalisation des rétinoïdes dans le maintien de l'intégrité du système cholinergique et de l'architecture du striatum à l'âge adulte. Ils suggèrent également une sensibilité différente du système dopaminergique à la vitamine A entre l'âge adulte et la période développementale.

En conclusion, ce travail de thèse démontre l'importance de la signalisation des rétinoïdes pour maintenir l'activité physiologique du striatum et de la voie nigro-striée à l'âge adulte. Dans l'optique d'une médecine personnalisée, une supplémentation nutritionnelle en vitamine A pourrait contribuer à améliorer la prise en charge des patients et la prévention de la MP.

Mots clés : vitamine A, nutrition, voie nigro-striée, dopamine, maladie Parkinson, neuromodulation, âge adulte

ABSTRACT

Parkinson's disease (PD) is a multifactorial neurodegenerative disease characterized by the degeneration of dopaminergic neurons from the substantia nigra *pars compacta* (SNc) leading to the development of motor symptoms. Projections of dopaminergic neurons from the SNc to the striatum constitute the nigro-striatal pathway whose activity in the basal ganglia network is essential for the control of voluntary movement. Several clinical and preclinical studies suggest an involvement of vitamin A and its signaling pathway mediated by its active metabolite, retinoic acid (RA), in the development and maintenance of the integrity of the nigro-striatal pathway. However, with aging or deficient dietary intake, a collapse of retinoid signaling is observed, which may contribute to the etiology of PD. Current treatments for PD do not prevent neurodegeneration and are associated to severe long-term side effects, highlighting the need to develop alternative therapeutics.

In that context, the general objective of this thesis was to further understand the involvement of retinoid signaling in the functional homeostasis of the nigro-striatal pathway in adulthood, and to determine the potential benefit of vitamin A nutritional supplementation to delay the progression of PD.

Results of a first study in an adult rat model of PD with intrastriatal injection of 6-hydroxydopamine (6-OHDA) have revealed a beneficial effect of nutritional vitamin A supplementation on striatal function and an improvement of 6-OHDA-induced motor deficits. However, analyses did not reveal a strong effect of dietary vitamin A intake on the dopaminergic system. Furthermore, the impact of vitamin A bioavailability on striatal neuromodulation in adult rats has been investigated with diets containing different amount of vitamin A (sub-deficient, sufficient or enriched). Here, vitamin A sub-deficiency initiated in adulthood constituted an original approach to model alteration of retinoid signaling excluding developmental effects. Results reveal an involvement of retinoid signaling in the maintenance of the integrity of cholinergic system and the architecture of the striatum in adulthood. Additionally, results suggest a differential sensitivity of the dopaminergic system to vitamin A signaling between adulthood and the developmental period.

In conclusion, this thesis work demonstrates the importance of retinoid signaling to maintain physiological activity of the striatum and the nigro-striatal pathway in adulthood. As part of personalized medicine, nutritional supplementation with vitamin A could improve the management of patients and the prevention of PD.

Key words: vitamin A, nutrition, nigro-striatal pathway, dopamine, Parkinson's disease, neuromodulation, adulthood

SOMMAIRE

Table des illustrations	4
Liste des tableaux.....	5
Liste des abréviations	6
INTRODUCTION	9
CHAPITRE 1. La vitamine A : métabolisme et signalisation des rétinoïdes.....	13
I. Origine biochimique et aspects nutritionnels de la vitamine A	13
1. La vitamine A et la grande famille des rétinoïdes.....	13
2. Les sources de vitamine A.....	14
3. Recommandations nutritionnelles et données de consommation en vitamine A	15
4. Carence et hypervitaminose A : prévalence et conséquences.....	16
II. Le métabolisme de la vitamine A	20
1. Absorption intestinale de la vitamine A et sa métabolisation en rétinol.....	20
2. Transport et métabolisme hépatique du rétinol	23
3. Métabolisme cellulaire du rétinol en acide rétinoïque.....	25
4. Les récepteurs nucléaires de l'acide rétinoïque.....	27
III. Quelques rôles physiologiques de l'AR au niveau cérébral.....	29
1. Métabolisation et signalisation des rétinoïdes dans le cerveau.....	29
2. L'AR est nécessaire au fonctionnement cérébral normal.....	30
3. Implication de la vitamine A dans l'axe intestin-cerveau	32
IV. Altérations du métabolisme de la vitamine A	34
1. Altération du métabolisme de la vitamine A au cours du vieillissement et intérêt d'une supplémentation nutritionnelle pour y remédier.....	34
2. Autres facteurs contribuant à l'altération du métabolisme de la vitamine A	37
CHAPITRE 2. La maladie de Parkinson et l'implication de la voie nigro-striée	41
I. L'implication de la voie nigro-striée dans le contrôle du mouvement volontaire	41
1. Les ganglions de la base : implication de la boucle motrice dans le contrôle du mouvement volontaire	41
2. Caractérisation de la voie nigro-striée	43
3. Implication de la voie nigro-striée dans le contrôle du mouvement volontaire	49
4. Métabolisme de la dopamine, le neurotransmetteur clé de la voie nigro-striée.....	54
II. Contexte et définition clinique de la maladie de Parkinson	57
1. La maladie de Parkinson en quelques chiffres	57

2. Diagnostic et symptômes cliniques de la MP	59
III. Dégénérescence des neurones dopaminergiques dans la maladie de parkinson.....	61
1. Causes possibles de la dégénérescence dopaminergique	61
IV. Les facteurs de risques de la MP	67
1. Facteurs génétiques	67
2. Facteurs environnementaux	68
3. Facteurs métaboliques.....	70
V. Traitements et pistes thérapeutiques de la MP	72
1. Les traitements actuels de la MP	72
2. Les pistes thérapeutiques pour prévenir le développement de la MP	74
CHAPITRE 3. Les liens entre signalisation de la vitamine A et maladie de Parkinson	79
I. L'importance de la signalisation des rétinoïdes dans le maintien de la voie nigro-striée ...	79
1. L'expression des rétinoïdes dans la voie nigro-striée	79
2. Le rôle des rétinoïdes dans le développement et le maintien de la voie nigro-striée.....	80
II. Les conséquences d'une altération de la signalisation des rétinoïdes dans la pathogénèse et la physiopathologie de la MP	81
1. Les études cliniques	81
2. Les études pré-cliniques.....	84
III. Le rôle pivot d'ALDH1A1 dans le système dopaminergique nigro-strié	91
HYPOTHÈSES & OBJECTIFS	95
DÉMARCHE EXPÉRIMENTALE	101
I. Description des modèles animaux	101
II. Modélisation pharmacologique de la MP chez le rat	101
1. Choix du modèle animal de la MP	101
2. Caractérisation du modèle 6-OHDA utilisé	105
III. Caractérisation des régimes en vitamine A	107
1. Choix des régimes en vitamine A.....	107
2. Le modèle de carence nutritionnelle en vitamine A	109
IV. Choix des tests comportementaux	111
1. Le test du rotarod.....	111
2. Le step test.....	112
3. Le test du cylindre	112
4. Evaluation de l'activité locomotrice dans des cages d'actimétrie	113
V. Analyses post-mortem	113

1. Utilisation des tissus.....	113
2. Analyses immunohistochimiques du striatum et de la SNc.....	114
VI. Analyses statistiques	116
RÉSULTATS.....	119
Étude 1 : Effet d'une supplémentation nutritionnelle préventive en vitamine A dans un modèle de la MP chez le rat.....	121
Étude 2 : Impact d'une carence nutritionnelle en vitamine A sur le système dopaminergique nigro-strié de rats à l'âge adulte.	144
DISCUSSION GÉNÉRALE	183
I. Synthèse des principaux résultats	184
II. Modulation nutritionnelle de la biodisponibilité en vitamine A	185
1. Comment évaluer au mieux la biodisponibilité de la vitamine A chez l'Homme ?.....	185
2. Etude de la vitamine A : choix des modèles nutritionnels	186
III. Vitamine A et physiopathologie de la maladie de Parkinson	191
1. Effet de la supplémentation en vitamine A dans un modèle animal de la MP	191
2. Effet de la carence en vitamine A sur le comportement moteur	193
IV. Effet de la vitamine A sur la neuromodulation du striatum à l'âge adulte.....	195
1. Implication de la vitamine A <i>via</i> le système dopaminergique nigro-strié à l'âge adulte .	195
2. Implication de la vitamine A <i>via</i> les striosomes et l'acétylcholine à l'âge adulte	200
V. Conclusion et perspectives : Etudes possibles chez l'Homme	203
RÉFÉRENCES	205
Annexe	244

Table des illustrations

Figure 1 : Structure chimique des principaux rétinoïdes de première génération et de leurs précurseurs	14
Figure 2 : Représentation de l'effet d'hormèse de l'acide rétinoïque	19
Figure 3 : Schéma récapitulatif des facteurs influençant le statut en vitamine A	20
Figure 4 : Métabolisme de la vitamine A préformée : de l'alimentation à ses tissus cibles	22
Figure 5 : Métabolisme cellulaire du rétinol en acide rétinoïque	27
Figure 6 : Voies d'action de la vitamine A dans le maintien de l'intégrité du système nerveux central	32
Figure 7 : Vieillesse en santé vs pathologique : implication de la signalisation des rétinoïdes	37
Figure 8 : Schéma représentant les facteurs influençant le métabolisme de la vitamine A	38
Figure 9 : Schéma des boucles principales des ganglions de la base	43
Figure 10 : Organisation des microcircuits du striatum et de ses sous-types neuronaux	45
Figure 11 : Régionalisation spatiale du striatum	46
Figure 12 : Régionalisation structurelle du striatum : Striosomes et matrices	48
Figure 13 : Schéma simplifié de la modulation cholinergique des MSNs du striatum	53
Figure 14 : Métabolisme de la dopamine	55
Figure 15 : Voies de dégradation de la dopamine	57
Figure 16 : Interconnexions entre neurones DA, systèmes nerveux et progression de la MP	60
Figure 17 : Schéma représentant l'hypothèse des catécholaldéhydes	66
Figure 18 : Schéma représentant les facteurs influençant l'étiologie de la MP	70
Figure 19 : Schéma récapitulatif des mécanismes sur lesquels la nutrition peut influencer pour lutter contre la neurodégénérescence	76
Figure 20 : Représentation schématique du double rôle d'ALDH1A1 dans le maintien de l'intégrité de la voie nigro-striée	97
Figure 21 : Mécanismes neurotoxiques d'action de la 6-OHDA	104
Figure 22 : Effet d'une carence totale en vitamine A initiée au sevrage sur le poids et le comportement moteur des rats	111
Figure 23 : Exemple de régionalisation du striatum sous image J	116
Figure 24 : Injection de vecteurs viraux AAV9-CMVie/SynP-GFP-WPRE dans la SNc de rats	192
Figure 25 : Schéma de l'interaction entre la voie des rétinoïdes et la voie de la dopamine médiée par ALDH1A1	197
Figure 26 : Schéma de l'hypothèse alternative de l'implication de ALDH1A1 dans la signalisation de la voie nigro-striée à l'âge adulte	199
Figure 27 : Hypothèse d'implication de la signalisation des rétinoïdes dans l'étiologie de la MP	202

Liste des tableaux

Tableau 1 : Teneur en vitamine A (ER/100g) par aliments en fonction de son origine et son mode de conservation.	16
Tableau 2 : Synthèse des principales études cliniques qui ont directement ou indirectement étudié la relation entre la vitamine A et la maladie de Parkinson	83
Tableau 3 : Synthèse des principales études pré-cliniques portant sur l'effet d'une altération de la signalisation des rétinoïdes (VAD, KO récepteurs et ALDH1A1) sur l'intégrité de la voie nigro-striée. 86	
Tableau 4 : Synthèse des principales études pré-cliniques portant sur l'effet d'un renforcement de la signalisation des rétinoïdes (supplémentation nutritionnelle, injections d'AR et de ses dérivés, agonistes des récepteurs) sur l'intégrité de la voie nigro-strié	90
Tableau 5 : Tableau résumant les caractéristiques essentielles des principaux modèles de la MP présents dans la littérature	102
Tableau 6 : Composition des régimes sub-carencé (0.4 UI), suffisant (5 UI) et enrichi en vitamine A (20 UI) .	109
Tableau 7 : Tableau récapitulatif des doses d'apport nutritionnel en vitamine A présentes dans la littérature.....	190

Liste des abréviations

3-MT	3-methoxytyramine
AADC	Aromatique Aminoacid Décarboxylase
ABCA1	ATP-binding cassette A1
ABCB1	ATP-binding cassette B1
ACh	Neurotransmetteur Acétylcholine
AChE	Enzyme Acétylcholinestérase
ADH	Alcool déshydrogénase
ALDH	Aldéhyde-déshydrogénase
ApoE	Apolipoprotéine E
AR	Acide Rétinoïque-tout- <i>trans</i>
ATV	Aire Tegmentale Ventrale
BCO1	β -carotène oxygénase 1
BH4	Tétrahydrobioptérine
ChAT	Choline Acetyltransferase
CM	Chylomicrons
COMT	Catéchol-O Methyltransferase
CRABP1	Cellular Retinoic Acid Binding-Protein type 1
CRABP2	Cellular Retinoic Acid Binding-Protein type 2
CRBPI	Cellular Retinol Binding Protein type I
CRBPII	Cellular Retinol Binding Protein type II
CYP26	Cytochrome P450, famille 26
D1R	Dopamine Récepteur sous type 1
D2R	Dopamine Récepteur sous type 2
DA	Dopamine/Dopaminergique
DAT	Transporteur de la Dopamine
DHA	Acide Docosahexaénoïque
DLS	Striatum Dorso-Latéral
DMS	Striatum Dorso-médial
DOPAC	3,4-dihydroxyphenyl-acetic Acid
DOPAL	3,4-dihydroxyphenyl-acetaldehyde
DOPET	3,4-dihydroxyphenyl-ethanol
ER	Equivalent Rétinol
GABA	acide γ -aminobutyrique
Glu	Glutamate
GPe	Globus Pallidus externe
GPi	Globus Pallidus interne
H ₂ O ₂	Peroxyde d'hydrogène
HVA	Homovanilic Acid
Ig	Immunoglobuline
ILC	Cellules lymphoïdes innées

IL	Interleukine
IPS	cellules souches pluripotentes induites
KO	Knock-Out
L-DOPA	L-Dihydroxyphenylalanine
LpL	Lipoprotéine Lipase
LRAT	Lecithin:Retinol Acyl Transferase
LTD	Dépression à long terme
LTP	Potentialisation à long terme
MAO	Monoamine Oxydase (A ou B)
MOR1	μ Opiode Récepteur
MP	Maladie de Parkinson
MSNs	Medium-sized Spiny Neurons
NOS	Oxyde Nitrique Synthase
NST	Noyau Sous-Thalamique
NURR1	Nuclear receptor related 1
PITX3	Paired Like Homeodomain 3
PPAR γ	Récepteur Activé par les Proliférateurs de Peroxysomes
RAR	Retinoic Acid Receptor
RARE	Retinoic Acid Response Element
RBP4	Retinol Binding Protein 4
RBPR2	Retinol Binding Protein Receptor 2
REHs	Rétinols-Esters-Hydrolases
ROLDH	Rétinol-déshydrogénase
ROS	Espèces réactives de l'oxygène
RXR	Retinoid X Receptor
SAA	Protéine sérique amyloïde
SNC	Système nerveux central
SNC	Substance Noire <i>pars compacta</i>
SNr	Substance Noire réticulée
SOD	Superoxyde Dismutase
SR-B1	Récepteur Scavenger class B type 1
STRA6	Stimulated by Retinoic Acid gene 6
TH	Tyrosine Hydroxylase
TTR	Transthyretin
VAD	Vitamin A Deficiency
ZSV	Zone Sous-Ventriculaire

INTRODUCTION

Préambule

La présente thèse concerne l'implication de la signalisation des rétinoïdes dans la voie nigro-striée et les fonctions motrices associées, étudiée dans le contexte de la maladie de Parkinson.

La première partie de la thèse est une introduction générale divisée en 3 chapitres. Le premier chapitre s'intéresse à la vitamine A et ses dérivés, les rétinoïdes. Nous détaillerons les mécanismes permettant son assimilation par l'organisme et la mise en place de sa signalisation. Nous nous concentrerons ensuite sur son rôle au niveau cérébral et les conséquences d'une altération de sa signalisation. Dans le deuxième chapitre de l'introduction nous étudierons la voie nigro-striée au sein des ganglions de la base et son implication dans le contrôle du mouvement volontaire. Nous nous attarderons particulièrement sur les 2 structures clé de la voie nigro-striée, le striatum et la substance noire *pars compacta*, ainsi que la signalisation dopaminergique au sein de cette voie. Puis nous décrirons dans une troisième partie la pathophysiologie de la Maladie de Parkinson, cette maladie étant caractérisée par une altération de la signalisation dopaminergique nigro-striée. Enfin, dans le troisième chapitre, nous dresserons l'état des connaissances concernant l'implication de la vitamine A dans l'étiologie de la maladie de Parkinson. Cette dernière partie nous amènera à la formulation des hypothèses et des objectifs de cette thèse et à la démarche expérimentale mise en place pour y répondre.

La deuxième partie de la thèse présente les résultats obtenus rédigés sous forme d'articles scientifiques en anglais. La partie résultat est divisée en 2 études, répondant chacune à un objectif de cette thèse. La première étude concerne l'impact d'une supplémentation nutritionnelle préventive en vitamine A dans un modèle animal de la maladie de Parkinson. La deuxième étude concerne l'impact d'une carence nutritionnelle en vitamine A sur le système dopaminergique nigro-strié de rat à l'âge adulte.

La troisième partie de la thèse est une discussion générale qui reprend les conclusions générales de chaque étude et présente les perspectives à plus ou moins long terme de ce projet de thèse.

CHAPITRE 1. La vitamine A : métabolisme et signalisation des rétinoïdes

I. Origine biochimique et aspects nutritionnels de la vitamine A

1. La vitamine A et la grande famille des rétinoïdes

La vitamine A (ou rétinol) est un micronutriment liposoluble, dont les dérivés métaboliques, naturels ou leurs analogues synthétiques, sont regroupés dans la famille des rétinoïdes. Le rétinol-*tout-trans* (communément appelé rétinol ou vitamine A) est le rétinoïde majoritaire dans l'organisme (Carazo et al., 2021; Chakrabarti et al., 2016). Les rétinoïdes naturels présents dans l'organisme sont formés à partir du rétinol sous l'action de différentes enzymes (**Figure 1**) et présentent une analogie structurale au rétinol. Ils comportent tous une chaîne latérale composée de 4 unités isopréniques (hydrocarbure de 5 atomes de carbone ramifié à doubles liaisons conférant un caractère hydrophobe) avec une série de doubles liaisons conjuguées qui peuvent exister en configuration *cis* ou *trans*. Cette chaîne latérale peut également porter différentes fonctions (alcool, aldéhyde ou acide) contribuant, avec la conformation *cis* ou *trans*, à la spécificité d'activité de chaque rétinoïde (Asson-Batres and Rochette-Egly, 2016; Chakrabarti et al., 2016). L'action de la vitamine A dans l'organisme est médiée par les dérivés métaboliques du rétinol. L'acide rétinoïque-*tout-trans* est le métabolite actif majoritaire de la vitamine A (Al Tanoury et al., 2013; D'Ambrosio et al., 2011) et est impliqué dans la régulation transcriptionnelle de nombreux gènes tout au long de la vie (Stoney and McCaffery, 2016). Outre l'acide rétinoïque-*tout-trans*, d'autres rétinoïdes naturels sont également connus pour leur rôle physiologique essentiel à l'organisme et leurs propriétés thérapeutiques (Ferreira et al., 2020). En effet le 11-*cis*-rétinal est connu pour son rôle majeur dans la vision (Carazo et al., 2021; Saari, 2016) et le 9-*cis*-acide rétinoïque a été approuvé par la FDA dans le traitement topic des sarcomes de Kaposi (Baumann et al., 2005). Au niveau de la peau le 13-*cis*-acide rétinoïque est le principal composant du Roaccutane[®], utilisé dans les traitements contre l'acné sévère (Jick et al., 2000). Des analogues synthétiques de ces rétinoïdes naturels sont également à l'étude dans des essais cliniques pour différents types de cancer (Altucci et al., 2007; Bushue and Wan, 2010).

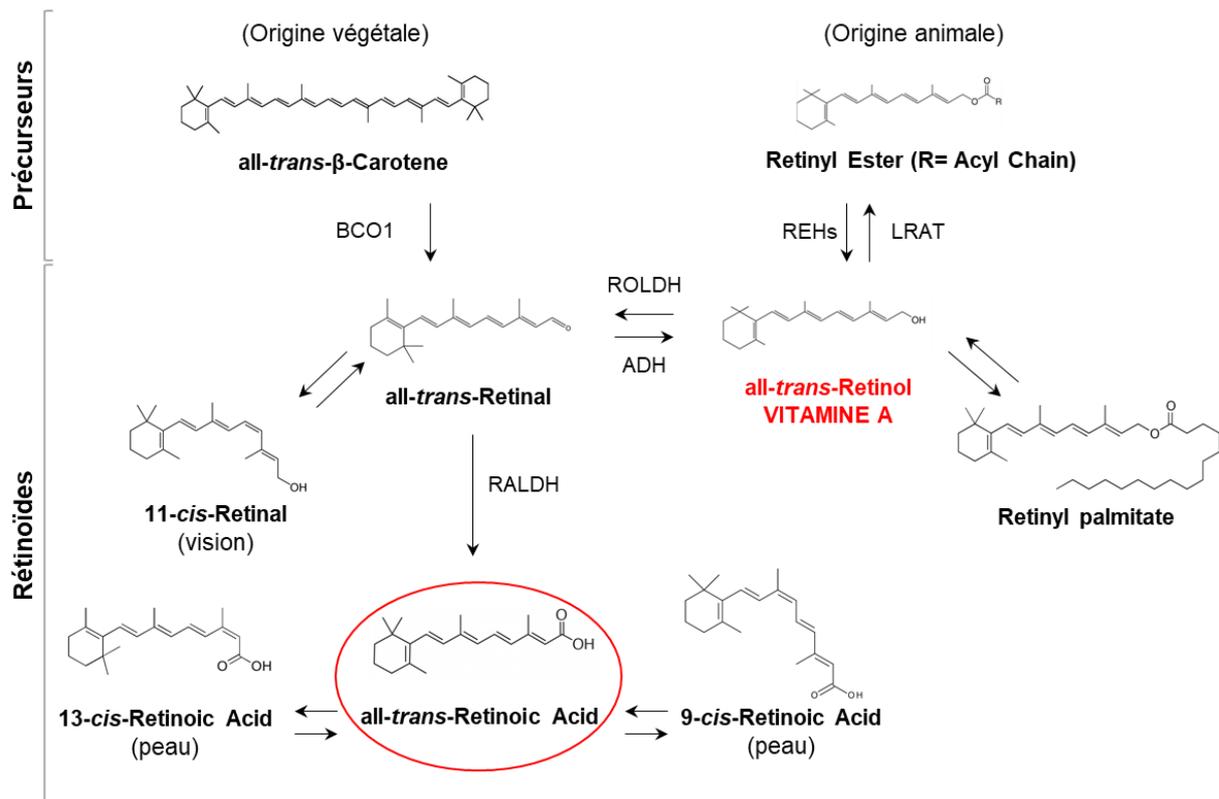


Figure 1 : Structure chimique des principaux rétinoïdes de première génération et de leurs précurseurs.

Abréviations : ADH, Alcool Deshydrogenase ; BCO1, Beta-Carotene Oxygenase 1 ; LRAT, Lecithine Retinol Acyl Transferase ; RALDH, Retinaldehyde Déshydrogénase ; REH, Retinyl Ester Hydrolase ; ROLDH, Retinol Déshydrogénase. Note : « Retinal » est l'autre nom du rétinaldéhyde. (Adapté de O'Byrne and Blaner, 2013).

2. Les sources de vitamine A

La vitamine A ne peut être synthétisée *de novo* dans le règne animal et doit être apportée par voie alimentaire directement ou sous forme de précurseurs. Ainsi, les produits alimentaires d'origine animale contiennent la vitamine A sous forme d'esters de rétinol, également appelés vitamine A préformée. Tandis que les produits d'origine végétale (fruits et légumes de couleur jaune, rouge ou orange principalement) contiennent des précurseurs de la vitamine A, appelés provitamine A. Le terme provitamine A renvoie aux caroténoïdes précurseurs de la vitamine A, dont le β -cryptoxanthin, l' α -carotène et le β -carotène, qui sont les précurseurs majeurs de la vitamine A dans l'alimentation (Reboul, 2019; Weber and Grune, 2012). A ce jour plus de 600 caroténoïdes ont été identifiés dans la nature. Parmi eux, seuls 40 sont retrouvés dans l'alimentation humaine et 20 sont présents dans le sang et les tissus humains (Reboul, 2019).

3. Recommandations nutritionnelles et données de consommation en vitamine A

La quantité de vitamine A consommée peut être donnée en unité internationale (UI), avec 1 UI correspondant à 0.3 µg de rétinol, ou en équivalent rétinol (ER), 1 ER correspondant à 1 µg de rétinol. L'ER est préférentiellement utilisé par les comités internationaux, puisque cette unité permet de mieux appréhender la diversité des sources de vitamine A (animales / végétales) et la variabilité de leur biodisponibilité dans l'organisme. L'ER permet de prendre en compte le rendement de conversion des précurseurs, c'est à dire la fraction du nutriment ingéré qui est absorbée et convertie en métabolite actif, qui varie entre la vitamine A préformée et les provitamines A (van Lieshout et al., 2018) (**Tableau 1**). Par exemple on estime qu'il faut 12 µg de β-carotène pour obtenir 1 µg de rétinol (1 ER), le β-carotène étant à la fois la provitamine A la plus abondante dans les aliments d'origine végétale et la plus efficace en terme de rendement (Borel and Desmarchelier, 2017). L'ER est classiquement utilisé par les différentes autorités de santé dans le monde pour donner leurs recommandations d'apport nutritionnel en vitamine A (Blomhoff and Blomhoff, 2006; Borel and Desmarchelier, 2017). Les recommandations nutritionnelles en vitamine A sont disparates et varient d'un pays industrialisé à l'autre. Les taux recommandés varient de 700 ER/jour (au Royaume-Uni) à 1000 ER/jour (Allemagne, Autriche, Suisse) pour les hommes et de 600 ER/jour (Royaume-Uni) à 900 ER/jour (Allemagne, Autriche, Suisse) pour les femmes (Pfeiffer et al., 2013; Weber and Grune, 2012).

En France les recommandations nutritionnelles en vitamine A sont de 750 ER/jour pour les hommes adultes et de 650 ER/jour pour les femmes adultes (Agence nationale de sécurité sanitaire de l'alimentation, de l'environnement et du travail (Anses), 2005). Ces recommandations varient en fonction de l'âge, et sont plus faibles pour les enfants et les personnes de plus de 75 ans en Europe. A l'inverse, compte tenu de l'importance de la vitamine A dans l'embryogénèse et le développement (Bailey et al., 2019), les recommandations nutritionnelles en vitamine A pour les femmes enceintes et allaitantes sont un peu plus élevées (Agence nationale de sécurité sanitaire de l'alimentation, de l'environnement et du travail (Anses), 2005).

La disparité des recommandations entre les pays peut être expliquée d'une part par les régimes alimentaires et les habitudes de consommation qui diffèrent d'une population à l'autre. La comparaison de 11 études cliniques réalisées dans 8 pays industrialisés, portant sur les habitudes de consommation en vitamine A, a montré que la vitamine A préformée (esters de rétinol) représentait 65 % du total de vitamine A consommée, tandis que les provitamines A des caroténoïdes ne représentait que 35% des apports (Weber and Grune, 2012). A l'inverse, dans les pays en voie de développement, où l'accès aux produits d'origine animale est plus difficile qu'en occident, la majorité des apports en vitamine A sont sous forme de provitamine

A (Harrison, 2012; Miller et al., 2002).

Par ailleurs, il est difficile d'estimer avec précision la quantité de rétinol effectivement absorbée et métabolisée par l'organisme à partir des apports alimentaires (Van Loo-Bouwman et al., 2010). En effet l'efficacité d'absorption de la vitamine A dépend de ses précurseurs, elle est meilleure pour la vitamine A préformée (80-90 %) que pour les provitamines A (50-60 %) (Pallet and Enderlin, 2011). L'efficacité d'absorption dépend également de la matrice alimentaire (meilleure absorption en présence de lipides) et des procédés de préparation des aliments (sous forme de jus, cuits ou crus...) (Weber and Grune, 2012) (**Tableau 1**). Par exemple l'absorption du β -carotène incorporé dans une matrice huileuse est 9 fois supérieure à celle du β -carotène provenant de fruits ou de légumes crus (Van Loo-Bouwman et al., 2010). Il est donc primordial, dans le cadre d'une supplémentation nutritionnelle en vitamine A, de prendre en compte l'origine mais également le procédé, le conditionnement et le mode d'administration de la vitamine A.

Sources Animales (Esters de rétinol)	ER/100g	Sources végétales (β -carotène)	ER/100g
Huile de foie de morue	30 000	Carottes surgelées crues	1 067
Foie de morue cru	5 100	Jus de carotte	875
Foie de volaille cru	20 400	Carottes cuites	744
Pâté de foie de porc	8 800	Poivrons rouges cuits	590
Jaune d'œuf	904	Epinards surgelés crus	586
Beurre	780	Jus d'orange frais	2,75

Tableau 1 : Teneur en vitamine A (ER/100g) par aliment en fonction de son origine et son mode de conservation.

1 ER = 1 μ g de rétinol = 12 μ g de β -carotène = 3,33 UI

Abréviations : ER, Equivalent Rétinol ; UI, Unité Internationale. (Sources Agence nationale de sécurité sanitaire de l'alimentation, de l'environnement et du travail, 2019).

4. Carence et hypervitaminose A : prévalence et conséquences

Au-delà des limites des recommandations d'apport en vitamine A, on peut voir apparaître, lorsqu'elles ne sont pas respectées, une carence en vitamine A, ou à l'inverse, plus rarement, une hypervitaminose A.

a. La carence en Vitamine A

La carence en vitamine A est l'une des trois carences nutritionnelles les plus répandues à travers le monde (Napoli, 2017). Sa prévalence est significativement augmentée dans les pays en voie de développement (Harrison, 2012) pour lesquels l'accès à des aliments riches en

vitamine A est plus difficile (Miller et al., 2002). La carence en vitamine A est diagnostiquée lorsque la concentration sérique de rétinol est inférieure à 0,52 $\mu\text{mol/L}$ (contre 2 $\mu\text{mol/L}$ en conditions normales (Li et al., 2014a; Pallet and Enderlin, 2011)), ou inférieure à 5-20 $\mu\text{g/g}$ dans le foie (Carazo et al., 2021).

On estime que la carence nutritionnelle en vitamine A affecterait plus de 100 millions d'enfants chaque année (Harrison, 2012) dont 25 0000 décès (World Health Organization, 2009) et 19 million de femmes enceintes (World Health Organization, 2011). La carence en vitamine A induit entre autres des déficits de croissance et une défaillance du système immunitaire associée à une augmentation de la sévérité des infections présentes dans les pays en voie de développement (colite, paludisme) conduisant à un risque de mortalité accru chez les enfants (Wiseman et al., 2017). On observe également chez les personnes déficientes en vitamine A une augmentation du nombre de cas de xérophtalmie (problèmes de vision) et des lésions cutanées (Napoli, 2017; Wiseman et al., 2017). Heureusement, la carence nutritionnelle en vitamine A connaît un recul significatif dans ces pays depuis plus de 30 ans (Stevens et al., 2015) grâce notamment à la mise en place de stratégie de supplémentation nutritionnelle (Borel et al., 2015).

Par ailleurs des cas de carence en vitamine A sont également observés dans les pays développés malgré un accès facilité aux produits d'origine animale et végétale, comparés aux pays en développement. La population des pays développés consomme majoritairement un régime occidental (c'est à dire avec une importante proportion de produits raffinés et transformés, de graisses saturées et de viande rouge, au détriment des fruits et légumes frais), entraînant le développement de carences puisque les recommandations nutritionnelles ne sont pas respectées (Borel and Desmarchelier, 2017; Cordain et al., 2005). A titre d'exemple, les apports en vitamine A de 50 à 75 % de la population des Etats-Unis, du Royaume Uni et des Pays Bas, entre 19 et 50 ans, sont en dessous des taux recommandés pour ces pays (Troesch et al., 2012).

De plus, si les conséquences de la carence nutritionnelle en vitamine A ont fait l'objet de nombreuses études de santé publique dans les pays en voie de développement, elles peuvent être sous-estimées dans la population occidentale. Suite à son absorption la vitamine A peut être stockée dans l'organisme, essentiellement dans le foie et le tissu adipeux. Le stockage de la vitamine A par l'organisme permet de prévenir l'apparition de symptômes cliniques, comme ceux cités précédemment, sur le court terme, en cas d'apport insuffisant en vitamine A (le déficit d'apport étant beaucoup plus drastique dans les pays en développement) (Carazo et al., 2021; Li et al., 2014a). Néanmoins, compte tenu de l'implication de la vitamine A et de ses dérivés métaboliques dans de nombreux processus homéostatiques de l'organisme (p.ex. régulation transcriptionnelle, système immunitaire, fonctionnement cérébral), un déficit chronique d'apport en vitamine A peut avoir des conséquences délétères sur le long terme.

Enfin, outre la carence nutritionnelle, des maladies métaboliques comme la maladie de Crohn, la cirrhose du foie, ou une insuffisance pancréatique peuvent également induire une carence en vitamine A (Carazo et al., 2021).

b. L'hypervitaminose A

La prévalence de la carence nutritionnelle en vitamine A est nettement supérieure à celle des cas d'intoxication induite par les rétinoïdes. On considère qu'un patient est en hypervitaminose A lorsque la concentration sérique en rétinol est supérieure à 2.09 $\mu\text{mol/L}$ (Carazo et al., 2021). L'hypervitaminose peut être due à une augmentation soutenue de la consommation de vitamine A (aliments + compléments alimentaires) et induire l'apparition d'érythèmes cutanés, une hypertriglycéridémie et des douleurs abdominales. Cependant, la concentration en rétinol plasmatique est très finement régulée par l'organisme, notamment lorsqu'il provient de sources alimentaires, et les symptômes induits par cette hypervitaminose, sont le plus souvent transitoires et disparaissent dès l'arrêt de la supplémentation nutritionnelle (Carazo et al., 2021). L'intoxication aux rétinoïdes est plus communément induite suite à l'administration de rétinoïdes à des fins thérapeutiques (médicaments oraux et crème à usage topique) (Moise et al., 2007). Chez l'adulte il a été montré que cette toxicité pouvait apparaître avec une dose aiguë de 500 mg rétinol/j (ce qui correspond à 1 650 000 UI) et une toxicité chronique a été observée avec une ingestion de 10 mg/jour (ce qui correspond à 33 000 UI/jour) durant plusieurs mois (Beltrán-de-Miguel et al., 2015; Carazo et al., 2021). Ces valeurs seuil étant largement diminuées pour les patients souffrant de problèmes rénaux ou en cas de consommation excessive d'alcool (Clugston and Blaner, 2012). Outre les problèmes intestinaux et cutanés observés suite à une intoxication aux rétinoïdes, l'utilisation du roaccutane®, dont le composé principal est le 13-*cis*-Acide rétinoïque, a été associée à une augmentation du risque de dépression (Jick et al., 2000). Néanmoins, cette association entre roaccutane® et dépression reste controversée (Jacobs et al., 2001; Wysowski et al., 2001). Par ailleurs, une supplémentation (nutritionnelle ou pharmacologique) en vitamine A doit-être particulièrement encadrée chez les femmes enceintes, compte tenu du rôle tératogène des rétinoïdes (en cas d'hypervitaminose comme de carence) et en particulier de l'acide rétinoïque et de ses analogues (Allen and Haskell, 2002; Jick et al., 2000).

Cependant, les effets bénéfiques de traitements pharmacologiques utilisant des doses élevées de rétinol ont été observés lorsque les valeurs seuil sont respectées. Il a été montré qu'une supplémentation en vitamine A avec 15 UI/jour pendant 12 ans pour traiter la rétinite pigmentaire était bien tolérée par les patients (Moise et al., 2007). De plus, des « méga doses » aiguës de vitamine A, à 200 000 UI, sont utilisées en complément du traitement contre la rougeole et la xérophtalmie chez les enfants (Huiming et al., 2005).

Enfin, les sources alimentaires de vitamine A (vitamine A préformée ou provitamine A) sont mieux régulées par l'organisme que les sources pharmacologiques (métabolites naturels p.ex. acide rétinoïque-tout-*trans*, 13-*cis*-Acide rétinoïque ; ou synthétiques p.ex. analogues des récepteurs) (Napoli, 2020). Le risque de toxicité semble donc être moins élevé dans le cas d'une supplémentation nutritionnelle en vitamine A comparée à un traitement pharmacologique (Moise et al., 2007). Par ailleurs il a été montré que l'acide rétinoïque a un effet d'hormèse sur l'organisme (**Figure 2**) (Napoli, 2020). C'est-à-dire que l'administration d'acide rétinoïque, ou de vitamine A, stimule les capacités d'adaptation de l'organisme et a un effet bénéfique en conditions physiologiques, ou pathologique, mais qu'au-delà d'une certaine dose ces effets deviennent délétères (**Figure 2**). La balance bénéfice/risque d'une supplémentation en vitamine A est donc avant tout une question de dosage, et le risque d'intoxication aux rétinoïdes peut être modulé en fonction de la forme de vitamine A administrée, de sa dose, de sa durée mais également des facteurs métaboliques et environnementaux (troubles intestinaux, hépatiques, grossesse, altération du métabolisme de la vitamine A).

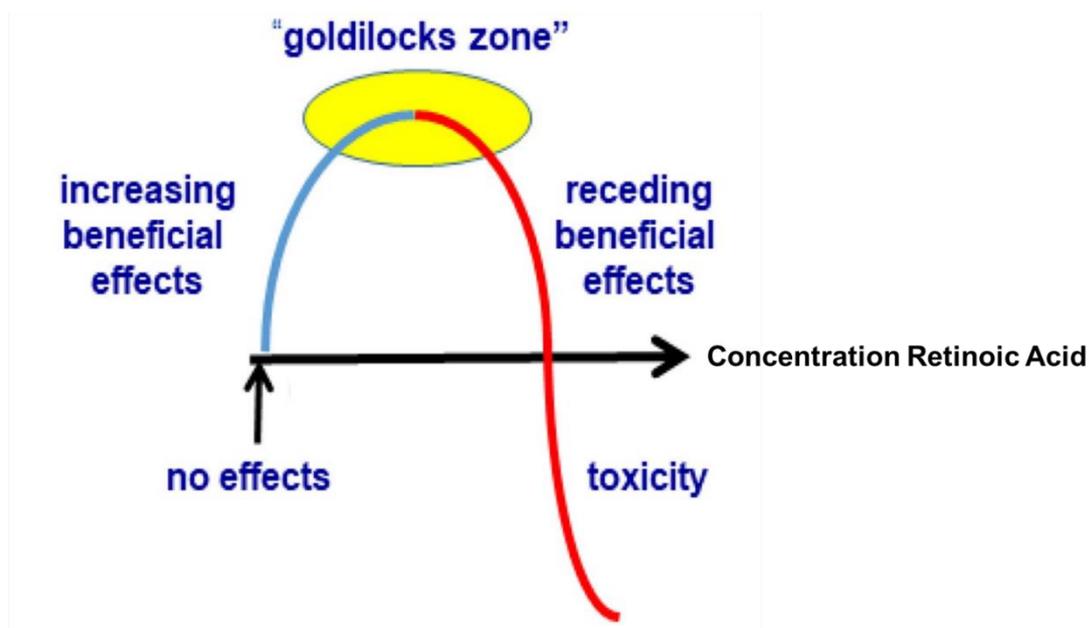


Figure 2 : Représentation de l'effet d'hormèse de l'acide rétinoïque.

La « goldilocks zone » correspond à la concentration optimum en acide rétinoïque. (source (Napoli, 2020).

En conclusion, le maintien à un niveau suffisant du statut en vitamine A des individus met en jeu 3 grands facteurs : la quantité d'apport en vitamine A, son origine, et l'efficacité de son absorption par l'organisme. Chacun de ces facteurs pouvant être modulé par des facteurs métaboliques et environnementaux. Un déséquilibre du statut en vitamine A conduit à l'apparition d'effets délétères pour l'organisme, que ce soit en cas de déficit en vitamine A (carence) ou d'excès (hypervitaminose) (**Figure 3**). Néanmoins la prévalence des cas de carence en vitamine A est plus importante que celle des cas d'hypervitaminose. La carence en vitamine A est classiquement induite suite à un défaut d'apport nutritionnel, mais elle peut également être la conséquence d'une altération de l'absorption ou du métabolisme de la vitamine A, ce sur quoi nous reviendrons plus loin dans le manuscrit.

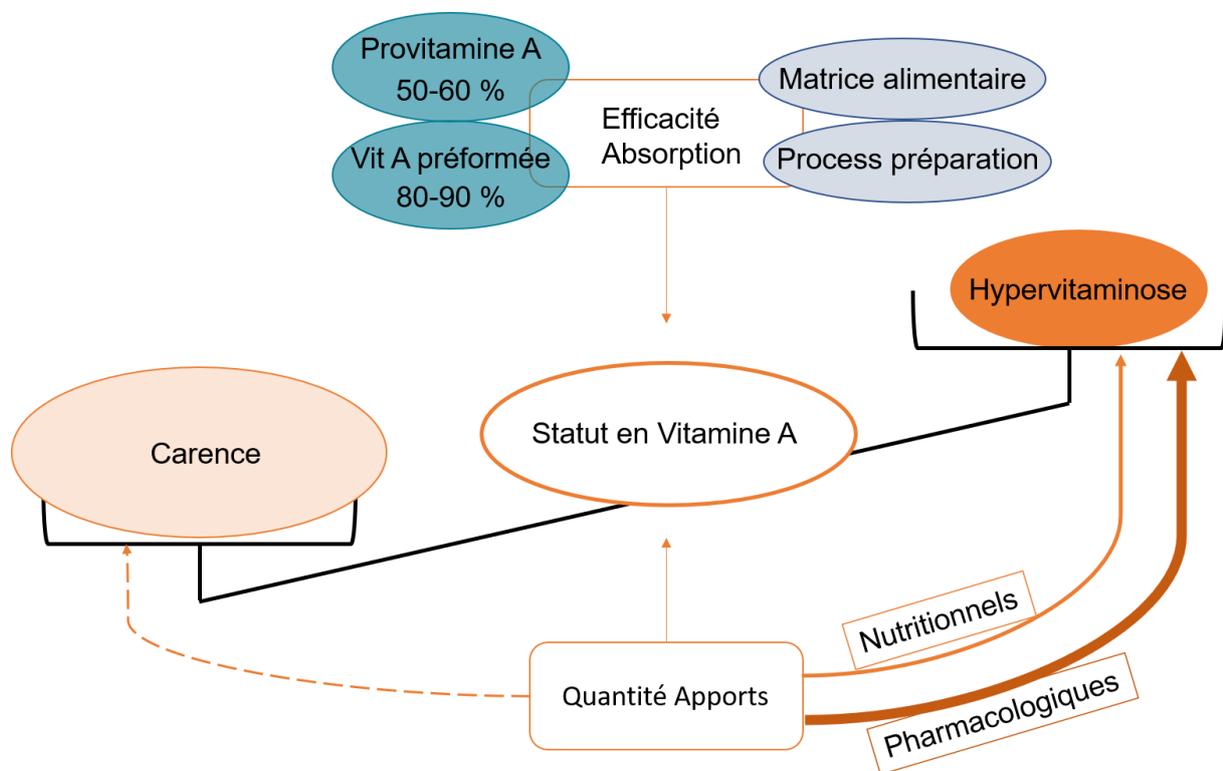


Figure 3 : Schéma récapitulatif des facteurs influençant le statut en vitamine A.

II. Le métabolisme de la vitamine A

1. Absorption intestinale de la vitamine A et sa métabolisation en rétinol

La majorité de la vitamine A étant obtenue par voie alimentaire (ce qui est également le cas dans notre étude) nous nous concentrerons sur cette voie dans la suite de ce chapitre. Néanmoins, il est à noter que d'autres voies peuvent être utilisées, intramusculaire ou topique, dans le cas d'une administration thérapeutique notamment. Dans ce cas, le profil

pharmacocinétique d'absorption et de métabolisation de la vitamine A dépendra du mode d'administration et de la forme de vitamine A (e.g. rétinol ou ses métabolites, naturels ou synthétiques).

Comme dit précédemment, l'efficacité d'absorption de la vitamine A varie entre la vitamine A préformée (80-90 %) et les provitamines A (50-60 %), chacune subissant des étapes de métabolisation différentes avant leur entrée dans les entérocytes (cellules épithéliales de l'intestin).

Concernant les esters de rétinol provenant des sources animales, ils entrent après ingestion dans la lumière intestinale où ils subissent une première étape de dé-estérification en rétinol libre par différentes Rétinols-Esters-Hydrolases (REHs) (Carazo et al., 2021). Le rétinol libre ainsi produit peut ensuite être assimilé par les cellules épithéliales de l'intestin (entérocytes) selon soit un transport actif saturable mettant en jeu le récepteur RBPR2 (Asson-Batres and Rochette-Egly, 2016; Reboul, 2013) soit un transport passif, pour lesquels les protéines impliquées sont encore méconnues (Borel and Desmarchelier, 2017) (**Figure 4**). Lorsque les concentrations en rétinol dans la lumière intestinale sont supérieures à 10 μM , le transporteur est saturé et un mécanisme de transport passif par diffusion prend le relais (D'Ambrosio et al., 2011; Harrison, 2012). L'entrée du rétinol dans les entérocytes est donc finement régulée et dépend des besoins de l'organisme. Après son entrée, le rétinol libre présent dans les entérocytes se lie spécifiquement à la protéine de liaison cellulaire du rétinol de type II (CRBP II). La CRBP II transporte le rétinol libre jusqu'à l'enzyme Lecithin:Retinol Acyl Transférase (LRAT) pour qu'il soit réestérifié avec des acides gras à longues chaînes, le plus souvent du palmitate (Napoli, 2017). La protéine CRBP existe sous deux isoformes, I et II. La CRBP II est essentiellement exprimée au niveau de l'intestin tandis que la CRBP I est ubiquitaire dans l'organisme (Napoli, 2016). A noter que le rétinol présent dans les entérocytes peut également être converti en acide rétinoïque (Lobo et al., 2010) (**Figure 4**).

L'efficacité d'absorption des esters de rétinol dépend du contenu lipidique du repas (plus il y a de lipides meilleure sera l'absorption) (Borel and Desmarchelier, 2017). Cette propriété est due au caractère lipophile de la vitamine A, qui suit donc une voie de transport commune à celle du cholestérol et des lipides, et ce du tractus gastro-intestinale jusqu'aux entérocytes (Reboul, 2013). L'absorption des esters de rétinol est également favorisée par les sels biliaires, qui contribuent à l'émulsion des micronutriments liposolubles provenant de l'alimentation et à la formation de micelles mixtes avant d'être pris en charge par les REHs (Blomhoff and Blomhoff, 2006; Reboul, 2013).

Concernant les provitamines A provenant des sources végétales, elles subissent, suite à leur ingestion, différentes étapes de métabolisation avant d'être converties en esters de rétinol par la LRAT dans les cellules épithéliales de l'intestin. L'absorption des provitamines A dans les

entérocytes met en jeu des récepteurs et des enzymes différentes de celles utilisées par la vitamine A préformée. Néanmoins, nous ne détaillerons pas ces processus complexes dans ce manuscrit, compte tenu du fait que la vitamine A utilisée durant la thèse était exclusivement apportée par l'alimentation sous forme d'esters de rétinol et plus précisément de rétinyl palmitate.

La vitamine A provenant de sources animales comme végétales se retrouve donc au niveau des entérocytes sous forme de rétinol estérifié, qui est la forme majoritaire de stockage du rétinol dans l'organisme, et dont 70-80 % est sous forme de rétinyl palmitate (Li et al., 2014b) (**Figure 4**).

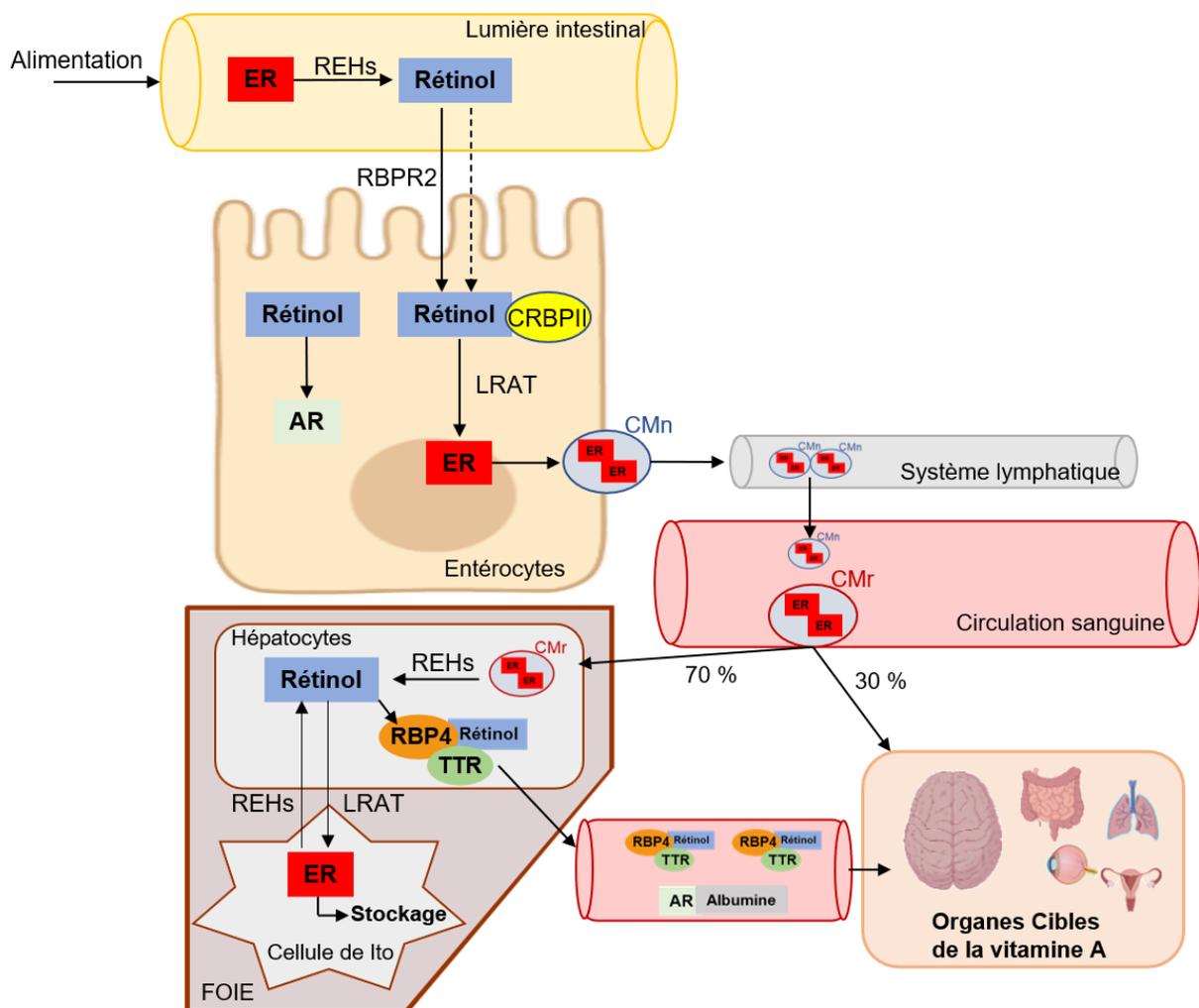


Figure 4 : Métabolisme de la vitamine A préformée : de l'alimentation à ses tissus cibles.

Abréviations : AR, Acide Rétinoïque ; CMn, Chylomicrons naissants ; CMr, Chylomicrons restants ; CRBP2, Cellular Retinol Binding Protein II ; ER, Esters de rétinol ; LRAT, Lecithine Retinol Acyl Transferase ; RBP4, Retinol Binding Protein 4 ; RBPR2, Retinol Binding Protein Receptor 2 ; REH, Retinyl Ester Hydrolase ; TTR, Transthyretin. Note : les flèches en pointillés représentent le transport passif.

2. Transport et métabolisme hépatique du rétinol

Les esters de rétinol présents dans les entérocytes sont ensuite assemblés avec d'autres lipides alimentaires pour former les chylomicrons (CM) naissants. Les CM sont des lipoprotéines spécialisées dans le transport des lipides à travers l'organisme. Leur formation, et donc le transport des esters de rétinol dans la circulation, est grandement dépendante de la concentration en lipides alimentaires présents (Harrison, 2005). Ces chylomicrons naissants sont ensuite envoyés dans le système lymphatique, puis dans la circulation sanguine où ils sont hydrolysés par l'enzyme triglycéride lipoprotéine lipase (LpL) et acquièrent l'apolipoprotéine E (apoE) formant ainsi les chylomicrons dits restants (D'Ambrosio et al., 2011) (**Figure 4**). Les esters de rétinol présents dans les chylomicrons restants sont ensuite captés par le foie pour être stockés ou envoyés à leurs tissus cibles *via* la circulation sanguine. Au niveau du foie, 2 types cellulaires sont majoritairement impliqués dans le stockage et le métabolisme du rétinol ; les hépatocytes (cellules parenchymateuses), qui représentent deux tiers des cellules hépatiques mais ne contiennent que 10-20 % du rétinol total présent dans le foie, et les cellules étoilées (ou cellules de Ito, cellules non parenchymateuses) qui contiennent environ 90 % du stock de rétinol hépatique (D'Ambrosio et al., 2011; Li et al., 2014b). Après leur entrée dans les hépatocytes, les esters de rétinol présents dans les chylomicrons sont hydrolysés, formant du rétinol libre (ou rétinol-tout-*trans*). Le rétinol libre peut alors, soit être envoyé dans les cellules étoilées du foie, où il est réestérifié par la LRAT (Asson-Batres and Rochette-Egly, 2016), et stocké sous forme d'esters de rétinol, soit s'associer à sa protéine de liaison, la Retinol Binding Protein 4 (RBP4) et ainsi être transporté vers ses tissus cible *via* la circulation sanguine (D'Ambrosio et al., 2011) (**Figure 4**). Avant son entrée dans la circulation sanguine, le complexe rétinol-RBP4 s'associe avec la protéine de transport de l'hormone thyroïdienne, la Transthyretin (TTR), qui stabilise le complexe et empêche sa dégradation par les reins (Carazo et al., 2021; Li et al., 2014b). La RBPR2 exprimée dans le foie facilite la liaison du rétinol à la RBP4, et son expression, sous contrôle de l'acide rétinoïque et du rétinol, est inversement corrélée à la quantité de rétinol stocké dans le foie (Alapatt et al., 2013).

Au total, 90 % du rétinol présent dans l'organisme sont stockés sous forme estérifiée dans les cellules étoilées du foie et sont libérés dans la circulation sanguine pour rejoindre leurs tissus cibles en fonction des besoins de l'organisme (Alapatt et al., 2013; D'Ambrosio et al., 2011). Le rétinol estérifié présent dans les gouttelettes lipidiques des cellules étoilées est dé-estérifié par des REHs et retourne dans les hépatocytes pour se lier à la RBP4 (D'Ambrosio et al., 2011). La concentration plasmatique de rétinol (lié à la RBP4) est finement régulée et maintenue à 2 μM chez l'Homme en conditions physiologiques et environ 1 μM chez la souris (Li et al., 2014b; O'Byrne and Blaner, 2013). Cependant les mécanismes exacts permettant la

mobilisation des stocks hépatiques de vitamine A en fonction des besoins des tissus cibles sont encore méconnus. La LRAT et la CRBPI sembleraient nécessaires au stockage des esters de rétinol (D'Ambrosio et al., 2011) et l'expression de la RBP4 dans les hépatocytes est corrélée au statut en vitamine A chez l'animal (c'est à dire qu'elle est augmentée en cas de régime déficient en vitamine A) (D'Ambrosio et al., 2011). Il a été montré que la RBP4 est nécessaire à la mobilisation, mais pas à la formation, des stocks hépatiques de vitamine A (Quadro, 1999). Il est à noter que, bien que le foie soit l'organe de stockage majoritaire de la vitamine A, le rétinol peut, dans une moindre mesure, également être stocké au niveau des adipocytes (Li et al., 2014b)..

Par ailleurs des études ont montré que seuls 70% des chylomicrons contenant les esters de rétinoïls atteindraient les hépatocytes, les 30 % restants resteraient dans la circulation sanguine pour atteindre directement leurs tissus cibles où ils seraient hydrolysés par la LpL donnant le rétinol libre (D'Ambrosio et al., 2011; Li et al., 2014b) (**Figure 4**). D'autres études suggèrent que ces 30 % proviendraient des entérocytes directement sous forme de rétinol libre (non estérifié et non associé aux chylomicrons) (Blomhoff and Blomhoff, 2006; Harrison, 2005; Reboul, 2013). Cette voie alternative de transport du rétinol vers ces tissus cibles serait particulièrement importante pour maintenir le statut en vitamine A en conditions pathologiques. En effet, la déficience en vitamine A observée chez des patients atteints d' abetalipoprotéïnémie (défaut d'assemblage et de sécrétions des CM) est en partie reversée suite à une supplémentation en rétinol (Granot and Kohen, 2018; Linton et al., 1993). Par ailleurs, pour soutenir cette hypothèse, il a été montré que la concentration plasmatique en ester de rétinol à la suite d'un repas est directement dépendante de la quantité de vitamine A consommée (Li et al., 2014b). Enfin, outre le rétinol libre lié à la RBP4 et les esters de rétinol, on retrouve également de l'acide rétinoïque et son analogue le 13-*cis*-acide rétinoïque dans la circulation sanguine (Blomhoff and Blomhoff, 2006), et leurs concentrations augmentent significativement suite à un repas riche en vitamine A (Hartmann et al., 2005).

L'acide rétinoïque circulant peut provenir des hépatocytes et des entérocytes qui possèdent tous deux la machinerie cellulaire pour métaboliser le rétinol libre (Li et al., 2014b). Cependant, même si l'acide rétinoïque possède une forte affinité pour les protéines plasmatiques comme l'albumine, les mécanismes et les protéines permettant la sortie de l'acide rétinoïque du foie et de l'intestin vers la circulation sanguine sont encore méconnus.(Carazo et al., 2021; D'Ambrosio et al., 2011) (**Figure 4**). Néanmoins, ces observations suggèrent une troisième voie de transport des rétinoïdes du foie à leurs tissus cible (Dumetz et al., 2020a, 2020b).

3. Métabolisme cellulaire du rétinol en acide rétinoïque

Le complexe rétinol-RBP4-TTR présent dans la circulation sanguine se fixe au récepteur Stimulated by Retinoic Acid gene 6 (STRA6) qui est exprimé à la surface des cellules cibles de la vitamine A, et permet l'entrée du rétinol libre dans la cellule (D'Ambrosio et al., 2011) (**Figure 5**). STRA6 est exprimé dans un grand nombre d'organes nécessitant l'action de la vitamine A, comme les yeux, les poumons, et le cerveau. Au niveau du foie et de l'intestin c'est son homologue qui est exprimé, RBPR2 (Asson-Batres and Rochette-Egly, 2016). STRA6 est impliqué dans l'adressage du complexe rétinol-RBP4 à ses tissus cibles et son expression est sous contrôle de l'acide rétinoïque (Alapatt et al., 2013; Asson-Batres and Rochette-Egly, 2016). En d'autres termes, l'expression de STRA6 à la surface d'un tissu, comme le cerveau, signifie que ce dernier est un organe cible de la vitamine A.

Dans ses cellules cibles le rétinol subira 2 déshydrogénations successives avant d'être métabolisé en acide rétinoïque, le métabolite actif majoritaire de la vitamine A dans l'organisme. Dans la suite de ce manuscrit l'abréviation « AR » fera systématiquement référence à l'acide rétinoïque-*tout-trans*.

Après son entrée dans la cellule, le rétinol est pris en charge par sa protéine de liaison cellulaire, CRBPI, qui l'adresse à la rétinol-déshydrogénase (ROLDH) permettant sa métabolisation en rétinaldéhyde (ou rétinol). Le rétinaldéhyde est ensuite déshydrogéné par une aldéhyde-déshydrogénase (ALDH) formant l'acide rétinoïque (AR) (**Figure 5**). Cette deuxième déshydrogénation est irréversible contrairement à la première (Pallet and Enderlin, 2011). Les aldéhyde-déshydrogénases (aussi appelées rétinolaldéhydes-déshydrogénases (RALDH)) majoritaires dans la métabolisation de l'AR appartiennent à la famille 1A, et notamment les isoformes ALDH1A1 et ALDH1A2 (Arnold et al., 2015; Napoli, 2020). L'isoforme ALDH1A2 est particulièrement impliquée dans la biosynthèse de l'AR durant l'embryogenèse, tandis que l'isoforme ALDH1A1 est d'avantage impliquée dans la synthèse d'AR à l'âge adulte (Asson-Batres and Rochette-Egly, 2016). Par ailleurs il a été montré que l'AR régulait sa propre formation en modulant l'activité de ses enzymes de synthèse (Elizondo et al., 2000).

La formation de l'AR étant irréversible, il ne peut être réduit en rétinol ou rétinol et il ne peut pas être stocké dans l'organisme (Carazo et al., 2021), il doit donc être soit utilisé soit dégradé. L'AR formé est pris en charge par ses protéines de liaison cellulaires, les cellular retinoic acid binding proteins (CRABPs). Il en existe plusieurs types au sein des cellules, principalement CRABP1, CRABP2 et FABP5 (commun aux acides gras).

Les CRABPs transloquent l'AR au noyau où il se lie à ses récepteurs nucléaires et agit comme facteur de transcription pour moduler l'activité de nombreux gènes cibles (Blomhoff and Blomhoff, 2006; Carazo et al., 2021) (**Figure 5**). A l'inverse, lorsque la quantité d'AR présente

dans le noyau est suffisante pour les besoins de la cellule, l'excédent d'AR est transporté par les CRABPs vers sa voie de catabolisme cytoplasmique où l'AR est dégradé par des cytochromes P450, famille 26 (CYP26) (Asson-Batres and Rochette-Egly, 2016; Topletz et al., 2012) (**Figure 5**). Elles existent sous 3 isoformes, CYP26A1, CYP26B1 et CYP26C1 et catabolisent l'AR en différentes formes hydrolysées (4-OH-AR, 4-oxo-AR et 18-OH-AR) qui seront ensuite excrétées et éliminées *via* les urines par les reins ou *via* la bile dans le foie (Carazo et al., 2021). CYP26A1 et CYP26B1 ont une affinité plus forte pour l'AR, tandis que CYP26C1 utilise préférentiellement le 9-cis-acide rétinoïque comme substrat (Asson-Batres and Rochette-Egly, 2016; Topletz et al., 2012). Par ailleurs il a été mis en évidence que l'expression des CYP26 est sous contrôle de l'AR (Asson-Batres and Rochette-Egly, 2016; Topletz et al., 2012), qui exerce ainsi un rétrocontrôle négatif sur sa propre formation et contribue au maintien de l'homéostasie de la vitamine A.

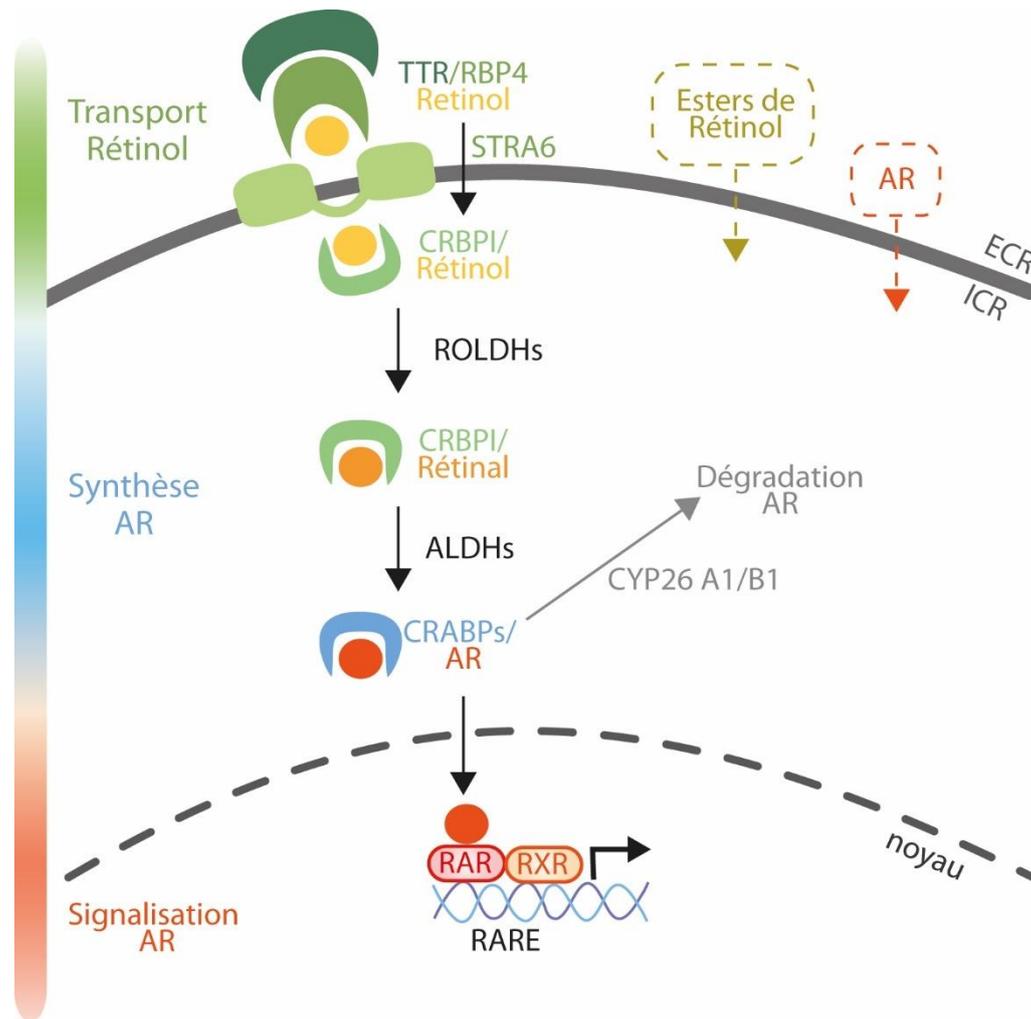


Figure 5 : Métabolisme cellulaire du rétinol en acide rétinoïque.

Abréviations : AR, Acide Rétinoïque ; ALDHs, Aldéhydes-déshydrogénases ; CRABPs, Cellular Retinoic Acid Binding-Proteins ; CRBPI, Cellular Retinol Binding Protein I ; CYP26, Cytochrome P450, famille 26 ; RBP4, Retinol Binding Protein 4 ; ROLDHs, Rétinol-déshydrogénases ; TTR, Transthyretin. (Adapté de (Marie et al., 2021)).

4. Les récepteurs nucléaires de l'acide rétinoïque

L'acide rétinoïque et ses isomères agissent dans leurs cellules cibles *via* des récepteurs nucléaires, respectivement le récepteur de l'acide rétinoïque (RAR) et le récepteur X rétinoïde (RXR), existant chacun sous trois conformations différentes, les isoformes α , β et γ (Piskunov et al., 2014). Les isoformes des récepteurs des rétinoïdes diffèrent notamment au niveau de leur territoire d'expression, y compris dans le cerveau (Krezel et al., 1999). Le récepteur RAR est 10 fois plus sensible à l'AR que le récepteur RXR. Le récepteur RXR quant à lui se lie avec une plus forte affinité à l'isoforme 9-cis-13,14-didehydro rétinoinique de l'AR (constante de dissociation à l'équilibre $K_d = 11,7$ nM) (Chen et al., 1994; Heyman et al., 1992; Rühl et al., 2018). Ces récepteurs sont des facteurs de transcription inductibles par leur ligand. En

l'absence d'AR, RAR est lié à des complexes de corépresseurs, empêchant son activité transcriptionnelle (Iskakova et al., 2015). Lorsque l'AR se fixe à la place du corépresseur, il induit un changement de conformation de son récepteur et le recrutement de différents coactivateurs, contribuant à l'augmentation de l'activité transcriptionnelle (Iskakova et al., 2015; Lane and Bailey, 2005). RAR agit en formant un hétérodimère avec RXR. Le complexe AR-RAR-RXR activé par la liaison de l'acide rétinoïque se lie à l'ADN au niveau de l'élément de réponse de l'AR (RARE), situé sur le promoteur de gènes cibles et module leur expression, soit en l'activant, soit en la réprimant (Al Tanoury et al., 2013) (**Figure 5**). La voie de signalisation décrite ci-dessus correspond à la voie canonique d'action de l'AR, majoritairement décrite dans la littérature. Néanmoins les études sur la signalisation des rétinoïdes se poursuivent et suggèrent des mécanismes d'action et de régulation plus complexes.

A l'inverse du récepteur RAR, le récepteur RXR peut s'homodimériser (RXR-RXR) ou former un hétérodimère avec de nombreux autres récepteurs nucléaires, comme le récepteur de l'hormone thyroïdienne (RXR-TR), celui de la vitamine D3 (RXR-VDR) et celui de la prolifération des peroxysomes (RXR-PPAR) (Iskakova et al., 2015). Cependant la formation d'un hétérodimère entre RXR et un autre récepteur nucléaire ne signifie pas forcément que RXR contribuera à la modulation de l'activité transcriptionnelle du gène cible, il peut simplement permettre la liaison du complexe à l'ADN (Saeed et al., 2017). Par ailleurs RXR peut se lier à d'autres ligands que la vitamine A, comme l'acide docosahexaénoïque (DHA) (Krężel et al., 2019; Kurlandsky et al., 1995), notamment étudié pour son potentiel effet neuroprotecteur et pour induire la survie des neurones dopaminergiques (Dyall, 2015; Lauritzen, 2000). La multiplicité d'interactions de RXR avec d'autres récepteurs nucléaires illustre la diversité d'interaction de l'acide rétinoïque avec d'autres voies de régulation hormonales.

De plus l'AR peut activer un autre récepteur nucléaire, le récepteur gamma activé par les proliférateurs de peroxysomes (PPAR γ) (Lane and Bailey, 2005). Ce récepteur est notamment impliqué dans le stockage des acides gras et le métabolisme du glucose, montrant une fois de plus l'interaction entre le métabolisme des lipides et celui de la vitamine A. La liaison de l'acide rétinoïque à RAR ou PPAR γ dépend de la protéine de liaison qui transporte l'AR jusqu'au noyau. CRABP2 délivre l'AR aux récepteurs RAR tandis que FABP5 le transporte à PPAR γ (Asson-Batres and Rochette-Egly, 2016; Iskakova et al., 2015).

Enfin, L'AR possède également un mode d'action non génomique (Al Tanoury et al., 2013; Blomhoff and Blomhoff, 2006). L'AR peut activer de façon transitoire et rapide une cascade de kinase, dont la voie MAPK, mettant en évidence l'implication de la vitamine A dans la prolifération cellulaire (Al Tanoury et al., 2013; Piskunov et al., 2014). Au niveau cérébral, ce

mode d'action non génomique de l'AR a été mis en évidence dans la signalisation synaptique en contribuant notamment à la synthèse locale de protéines dendritiques, permettant le maintien de l'homéostasie de la plasticité synaptique (Chen et al., 2014).

Au final, l'AR, et par extension la vitamine A, agissent directement ou indirectement sur la régulation transcriptionnelle de plus de 500 gènes (D'Ambrosio et al., 2011), mettant en évidence son rôle crucial du stade embryonnaire à l'âge adulte et l'importance du maintien de son homéostasie. L'AR contribue au maintien de cette régulation fine en agissant soit directement sur les gènes de son métabolisme contenant une séquence RARE, comme CRBPI et CRABP2 (transport cellulaire) ALDH1A1, ALDH1A2 (synthèse d'AR) et LRAT (pour le stockage du rétinol), soit indirectement sur STRA6 et RBPR2 (adressage du rétinol aux cellules cibles).

III. Quelques rôles physiologiques de l'AR au niveau cérébral

1. Métabolisation et signalisation des rétinoïdes dans le cerveau

L'acide rétinoïque, de même que les enzymes et protéines impliquées dans son métabolisme sont largement exprimées dans le cerveau, et participent à plusieurs niveaux au maintien de l'activité cérébrale. L'AR a la capacité de passer la barrière hémato-encéphalique (BHE), de même que le rétinol lié à la RBP4, et contribue également à son développement (Mizee et al., 2013). Par ailleurs il a été montré qu'en conditions physiologiques 90% de l'AR cérébral provient du « pool » plasmatique circulant (Kurlandsky et al., 1995), et que la majorité de l'acide rétinoïque parvenant au cerveau était en conformation tout-*trans* (Le Doze et al., 2000). Cependant le cerveau adulte possède toute la machinerie nécessaire au métabolisme de l'AR, et c'est même au niveau cérébral que la synthèse de l'acide rétinoïque est la plus efficace en comparaison des autres organes et tissus cibles de la vitamine A (Werner and Deluca, 2002). Néanmoins, la distribution des protéines participant à son transport, les enzymes permettant sa synthèse et son catabolisme ainsi que les RAR et RXR, varient d'une structure à l'autre dans le système nerveux central adulte. (Lane and Bailey, 2005; Maden, 2007). En effet il a été montré que l'ALDH1A2 était particulièrement exprimée au niveau des méninges adjacentes à l'hippocampe chez la souris, de même que CRBPI et CRABP1 (Lane and Bailey, 2005; Zetterstrom et al., 1994), tandis que la substance noire compacte exprime l'ALDH1A1, en plus de l'ALDH1A2. L'ALDH1A3 est quant à elle retrouvée au niveau du bulbe olfactif (Maden, 2007). Les isoformes des RAR et RXR sont également exprimée de façon différentielle entre les structures cérébrales (Krezel et al., 1999; Zetterström et al., 1997).

Les récepteurs des rétinoïdes, ainsi que les enzymes de synthèse de l'AR, sont également fortement exprimés dans le striatum, la structure d'entrée des ganglions de la base. La signalisation des rétinoïdes au sein de cette structure sera détaillée dans le **Chapitre 3**.

2. L'AR est nécessaire au fonctionnement cérébral normal

Le rôle de la vitamine A a d'abord été essentiellement étudié pour son implication dans la reproduction, l'embryogénèse et le développement post-natal, de par l'action morphogénique de l'acide rétinoïque et son rôle dans la différenciation, la prolifération et la mort cellulaire (Clagett-Dame and Knutson, 2011; Duester, 2008). Plus récemment, son importance dans le développement du système nerveux central (SNC) et le maintien de son intégrité à l'âge adulte ont été mis en évidence (Maden, 2007). La signalisation médiée par l'AR contribue aux mécanismes de plasticité neuronale, incluant la neurogénèse, qui permettent au cerveau de s'adapter en remodelant son réseau neuronal (Jacobs et al., 2006; McCaffery et al., 2006) (**Figure 6**). Cette plasticité neuronale a été particulièrement étudiée au niveau de l'hippocampe où la vitamine A participe au maintien de la potentialisation à long terme (LTP) et la dépression à long terme (LTD), deux processus qui contribuent à la plasticité synaptique et sous-tendent les mécanismes de mémoire et d'apprentissage (Lane and Bailey, 2005). En effet des altérations de la LTP et de la LTD ont été montrées chez des souris knock-out (KO) pour les récepteurs RAR β ou doubles mutants RAR β /RXR γ (Chen et al., 2014; Chiang et al., 1998). Cependant RAR β n'est pas exprimé au niveau de l'hippocampe, ces résultats montrent donc l'importance de la signalisation indirecte de la vitamine A. Ces altérations de plasticité synaptique ont également été observées chez des souris adultes soumises à un régime carencé en vitamine A (Misner et al., 2001). Ces résultats sont en cohérence avec les travaux montrant que la carence en vitamine A conduit à une diminution de l'expression des récepteurs RAR β , RXR β et RXR γ dans le cerveau entier des rats (Enderlin et al., 2000; Etchamendy et al., 2003; Husson et al., 2004).

Néanmoins une supplémentation en vitamine A chez des souris préalablement carencées permet de restaurer la plasticité synaptique au niveau de l'hippocampe (Misner et al., 2001), de même que l'expression des récepteurs suite à l'administration d'AR (Etchamendy et al., 2003). De plus, des travaux au laboratoire, auxquels j'ai participé, ont montré qu'une carence en vitamine A induit des altérations morphologiques et synaptiques au niveau des neurones pyramidaux de l'hippocampe, et que ces altérations pouvaient être en partie reversées par une supplémentation nutritionnelle modérée en vitamine A chez le rat (Dumetz et al., 2020a). Ces altérations mécanistiques se traduisent par des altérations comportementales dans les tâches d'apprentissage et d'évaluation de la mémoire (Cocco et al., 2002; Etchamendy et al.,

2003; Nomoto et al., 2012; Wietrych, 2005). L'ensemble de ces études illustre l'importance de la vitamine A dans le maintien de l'intégrité de l'hippocampe et les capacités mnésiques associées, une altération ou une diminution de cette signalisation induisant des effets délétères. Par ailleurs, la plasticité neuronale est également essentielle au développement du système olfactif (Shearer et al., 2012). Or il a été montré qu'une déficience en vitamine A chez le rat conduisait au développement d'une anosmie, et un effet similaire a été montré chez des souris mutantes pour le récepteur RAR α (Maden, 2007).

Outre la plasticité synaptique, l'AR joue également un rôle important dans la neurogénèse à l'âge adulte (**Figure 6**). Ce phénomène correspond à la formation et à la prolifération de nouveaux neurones, à partir de cellules souches neurales, qui deviennent fonctionnels et s'intègrent aux neurones préexistants. La neurogénèse adulte a particulièrement été étudiée au niveau du gyrus denté de l'hippocampe et de la zone sous-ventriculaire (ZSV) des ventricules latéraux (Lane and Bailey, 2005; Ming and Song, 2011). L'AR stimule la capacité de différenciation des cellules progénitrices multipotentes, présentes dans ces deux zones cérébrales, en neurones et contribue à la maturation neuronale en induisant l'expression de facteurs neurotrophiques (Takahashi et al., 1999). De plus, une carence en vitamine A chez des rats et des souris adultes a révélé une altération de la neurogénèse hippocampique et une diminution de l'arborisation dendritique des neurones pyramidaux de l'hippocampe, qui peuvent être reversées par une supplémentation en AR ou en vitamine A (Bonhomme et al., 2014a, 2014b; Bonnet et al., 2008; Dumetz et al., 2020b). Enfin l'action de l'AR est également étudiée dans la neurogénèse réparatrice suite à un traumatisme ou dans le cadre de la neurodégénérescence. L'administration *in vivo* et *in vitro* de nanoparticules contenant de l'AR au niveau de la ZSV induit une augmentation de la neurogénèse, ouvrant de nouvelles pistes dans le traitement des maladies neurodégénératives (Maia et al., 2011; Santos et al., 2012). L'importance de la signalisation des rétinoïdes dans le maintien de la voie nigro striée et la différenciation des neurones du striatum a également été mise en évidence et sera développée ultérieurement (voir **Chapitre 3**).

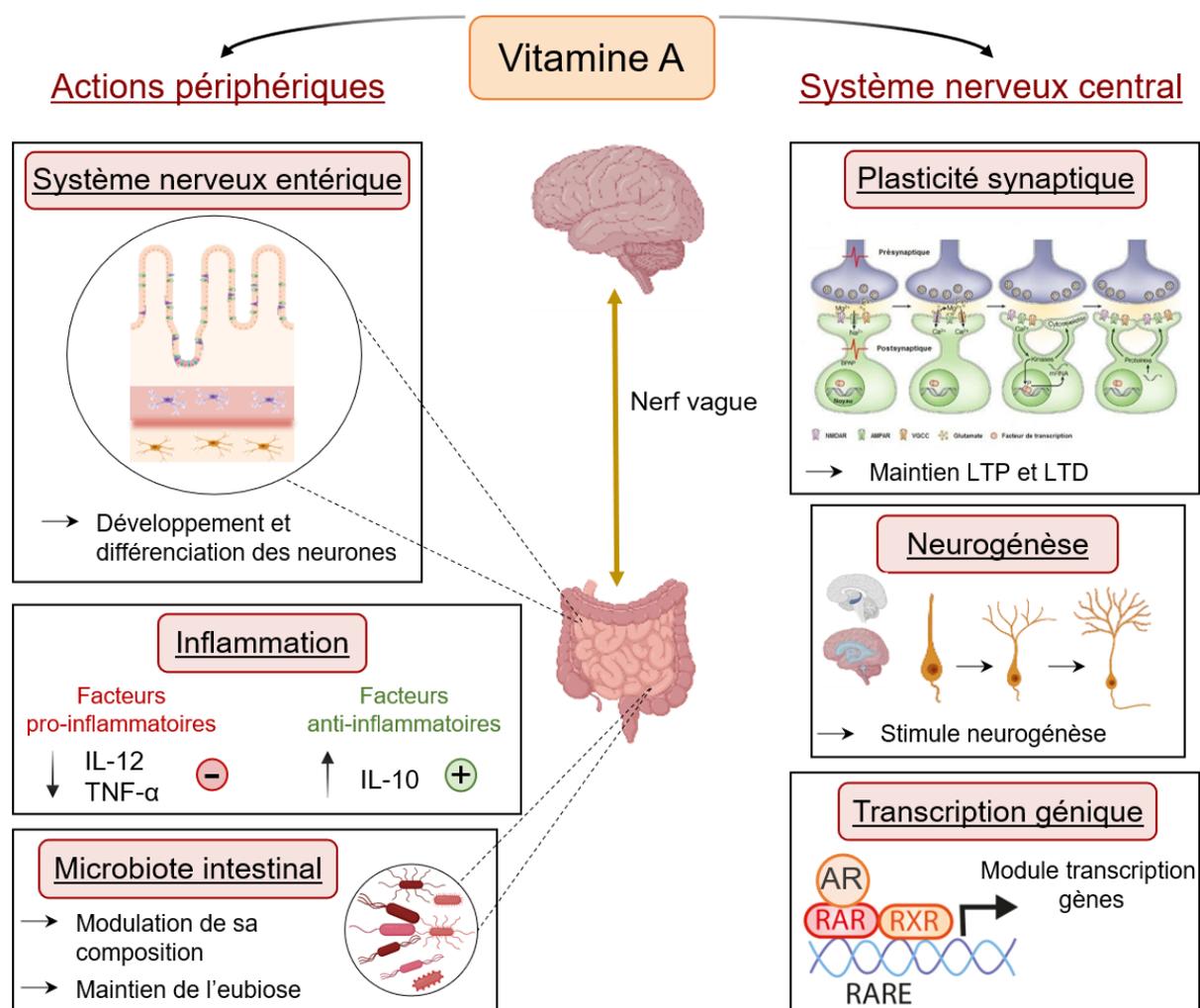


Figure 6 : Voies d'action de la vitamine A dans le maintien de l'intégrité du système nerveux central.

Abréviations : AR, Acide Rétinoïque ; LTD, Dépression à Long Terme ; LTP, Potentialisation à Long Terme. (Adapté de (Marie et al., 2021), figure plasticité synaptique source (Villain, 2017)).

3. Implication de la vitamine A dans l'axe intestin-cerveau

Il est maintenant établi que l'intégrité du microbiote intestinal est intrinsèquement liée à l'intégrité des fonctions physiologiques, comportementales et cognitives du cerveau. En effet il existe une communication bidirectionnelle entre le cerveau et l'intestin *via* le nerf vague, mettant en jeu non seulement le microbiote intestinal et le système nerveux central, mais également le système nerveux entérique (SNE) et le système immunitaire (Morais et al., 2021; Wang and Wang, 2016). Le fonctionnement de cette communication bidirectionnelle est particulièrement étudié dans le cadres des maladies neurodégénératives, pour lesquelles il a été montré qu'une dysbiose du microbiote intestinal pouvait contribuer à leur l'étiologie, comme la maladie de Parkinson (Mulak, 2015; Quigley, 2017). Le pouvoir anti-oxydant de la vitamine A et son implication dans l'homéostasie du système immunitaire ainsi que l'eubiose

(équilibre) du microbiote intestinal en font un acteur important dans le maintien de l'intégrité des fonctions cérébrales via cet axe intestin-cerveau (Honarbakhsh et al., 2021; Huang et al., 2018b; Oliveira et al., 2018; Zhang et al., 2019).

Le système nerveux entérique correspond au système nerveux autonome du tractus gastro-intestinal. De même que pour le système nerveux central, l'AR joue également un rôle dans le développement et la différenciation des neurones du système nerveux entérique (Sato and Heuckeroth, 2008) (**Figure 6**). De plus, une altération de la signalisation de l'AR, médiée par une déficience en vitamine A chez le rat ou un KO des différentes isoformes d'ALDH1, induit une diminution du nombre de neurones myentériques du système nerveux entérique et une diminution de la motilité (déplacement des aliments) du tractus gastro-intestinal (Tan et al., 2021; Wright-Jin et al., 2013).

Le microbiote correspond à l'ensemble des microorganismes présents dans un organisme vivant. Il en existe plusieurs, le microbiote intestinal étant le plus important et le plus diversifié. La vitamine A contribue au maintien de l'eubiose (équilibre) de la composition du microbiote intestinal (**Figure 6**). Chez des souris, il a été montré qu'une déficience en vitamine A altère la diversité des bactéries présentes dans le microbiote intestinal, leur barrière intestinale et conduit à une dysbiose des matières fécales (Honarbakhsh et al., 2021; Tian et al., 2018; Zhou et al., 2020).

Le microbiote et l'immunité sont interdépendants, puisque le microbiote contribue au rôle de barrière de la muqueuse intestinale qui limite l'entrée des agents pathogènes dans l'organisme. L'inflammation est un aspect important de la réponse immunitaire, en permettant d'éliminer les pathogènes et de promouvoir la réparation tissulaire. Or des études ont montré que la signalisation médiée par l'AR pouvait induire la production de cytokines anti-inflammatoires, dont l'interleukine 10 (IL-10), par les lymphocytes T, pour contrôler l'inflammation et maintenir l'homéostasie du tissu (Oliveira et al., 2018). A l'inverse les traitements à l'acide rétinoïques, inhibent la production de cytokines pro-inflammatoires, comme l'interleukine 12 (IL-12) et TNF- α lors de l'activation des macrophages par les lipopolysaccharides (LPS) (Oliveira et al., 2018). De plus il a été montré *in vitro*, que l'apport d'acide rétinoïque pouvait réduire l'inflammation de la muqueuse du colon provenant de patients atteints de colite ulcéreuse en modulant la voie de signalisation NF κ B et ainsi réduire l'expression de d'oxide nitrique et du facteur TNF α (Huang et al., 2018b; Oliveira et al., 2018).

En conséquence, en contribuant au maintien de l'intégrité du microbiote intestinal et à l'efficacité de la réponse inflammatoire, la vitamine A contribue à préserver l'intégrité du système nerveux central (**Figure 6**). En effet, un lien bidirectionnel existe entre les maladies inflammatoire chroniques du système digestif (comme la maladie de Crohn) et la mise en place de la neuroinflammation associée à la neurodégénérescence (Quigley, 2017; Rolli-

Derkinderen et al., 2020).

Ces travaux, dont la liste n'est pas exhaustive, démontrent le rôle crucial de la signalisation de la vitamine A dans les fonctions physiologiques de l'organisme et l'importance de maintenir son homéostasie.

IV. Altérations du métabolisme de la vitamine A

1. Altération du métabolisme de la vitamine A au cours du vieillissement et intérêt d'une supplémentation nutritionnelle pour y remédier

Le vieillissement est un processus physiologique, inévitable et irréversible. Il peut être défini comme l'ensemble des modifications que subit l'organisme au cours du temps conduisant à une altération de l'autorégulation, de la régénération et à des changements structurels et fonctionnels des tissus et organes (Dziechciaż and Filip, 2014). Le métabolisme de la vitamine A n'échappe pas à ce processus, comme montré par des études chez l'Homme, mettant en évidence un affaiblissement de la signalisation des rétinoïdes avec l'âge. Ces études ont montré une diminution de l'expression du récepteur RAR γ (Feart et al., 2005) et du récepteur RXR β (Brtko et al., 2007) dans les cellules mononuclées du sang chez des sujets âgés sains (≥ 61 ans) comparé à des sujets d'âge moyen (22-57 ans). De plus, une supplémentation avec de l'acide rétinoïque-13-*cis* contribuerait à normaliser l'expression des récepteurs de la vitamine A (Brtko et al., 2007). D'autres études ont également montré une diminution de la concentration sérique de RBP4 (Kocelak et al., 2018; Lee et al., 2013). Cependant cette diminution n'est pas retrouvée dans l'étude de Feart *et al.*, 2005, et pourrait être imputée aux dysfonctionnements rénaux qui apparaissent généralement avec l'âge et altèreraient l'élimination de la RBP4 (Kocelak et al., 2018). Ces études n'ont pas mis en évidence de diminution de la concentration plasmatique de rétinol (Feart et al., 2005; Gardner et al., 1997), celui-ci étant le marqueur le plus couramment utilisé pour mesurer le statut en vitamine A des individus (Borel and Desmarchelier, 2017). Cependant, les patients recrutés pour ces études étaient des sujets âgés sains (c'est à dire ne présentant pas de maladies ou d'altérations comportementales). Or dans des études cliniques mesurant le statut en vitamine A de sujets âgés présentant des déficits cognitifs, on observe que la concentration en rétinol plasmatique est corrélée à la fonction cognitive (Huang et al., 2018a; Rinaldi et al., 2003; Zeng et al., 2017). Une diminution de la concentration en rétinol plasmatique pourrait donc être un bon marqueur du développement de troubles cognitifs.

Ces observations chez l'Homme sont renforcées par des études sur modèles animaux,

principalement conduites à Bordeaux depuis les années 2000. L'effet de l'âge sur la signalisation des rétinoïdes a été étudié sur des modèles de rongeurs (souris et rats) âgés (\geq 21 mois), comparés à des modèles jeunes (3 mois) ou d'âge moyen (4-6 mois). Ces études ont montré une diminution, avec l'âge, de l'expression des récepteurs RAR β , RXR β et RXR γ au niveau cérébral (Enderlin et al., 1997a, 1997b; Etchamendy et al., 2001; Feart et al., 2005). On observe également que l'expression de ces récepteurs, et en particulier de RAR β , est normalisée chez les animaux âgés, en comparaisons des animaux jeunes et adultes, lorsqu'ils reçoivent un traitement aigu à l'AR (1 à 4 jours avant l'euthanasie) (Enderlin et al., 1997a, 1997b; Feart et al., 2005) ou chronique (25 jours) (Etchamendy et al., 2001). Une autre étude a regardé l'effet d'une supplémentation nutritionnelle préventive en vitamine A sur des souris à partir de 2 mois, et a montré que cette supplémentation préventive permettait de prévenir la diminution d'expression de RAR β dans l'hippocampe observée à 23 mois chez les animaux âgés non supplémentés, mais également de prévenir les déficits mnésiques liés à l'âge (Mingaud et al., 2008). Par ailleurs les effets bénéfiques de la supplémentation nutritionnelle en vitamine A sur l'altération de mémoire spatiale liée à l'âge sont également retrouvés chez des rats âgés (12-13 mois) supplémentés pendant 4 mois (Touyarot et al., 2013) ou même seulement 4 semaines (Dumetz et al., 2020b).

De plus il semblerait que la supplémentation nutritionnelle en vitamine A soit plus efficace qu'une supplémentation en AR (injections sous-cutanées) sur le long terme ; Dans l'étude de Mingaud *et al.*, 2008, la préservation de l'expression de RAR β dans l'hippocampe ainsi que la mémoire de travail sont plus importantes en cas de supplémentation nutritionnelle comparée à un traitement à l'AR (pendant 3 semaines) ou à une combinaison de la supplémentation nutritionnelle et du traitement à l'AR. Il ne semblerait donc pas y avoir d'effet synergique entre la supplémentation nutritionnelle préventive en vitamine A et un traitement à l'AR plus tardif.

Des études menées chez des rats âgés permettent de mieux comprendre les mécanismes impliqués dans l'altération de la signalisation de la vitamine A avec l'âge. Ces études décrivent une diminution de la concentration sérique de rétinol (Dumetz et al., 2020b; Touyarot et al., 2013) et d'AR (Dumetz et al., 2020b) avec l'âge. Cette diminution est retrouvée au niveau de l'hippocampe des rats âgés, mais à l'inverse on observe une augmentation des taux de rétinol et d'AR dans le foie des rats âgés (16 mois), comparés aux animaux jeunes (3 mois) (Dumetz et al., 2020b). Ces résultats suggèrent qu'avec l'âge, le foie maintient sa capacité à stocker la vitamine A mais que les mécanismes permettant son adressage et son utilisation au niveau cérébral semblent être affectés, entraînant une augmentation des stocks hépatiques de rétinol et d'AR et une diminution des taux hippocampiques. Cette hypothèse est soutenue par l'étude de (Dawson et al., 2000) qui montre que l'activité de la LRAT (qui permet l'estérification du rétinol en esters de rétinol pour son stockage) augmente lors d'une supplémentation

nutritionnelle en vitamine A, mais qu'elle n'est pas altérée chez des rats âgés de 20 mois comparés à des rats de 8 mois. De plus l'étude de Wołoszynowska-Fraser *et al.*, 2021 montre que l'expression de STRA6 (entrée du rétinol dans les cellules) est diminuée dans l'hippocampe de rats âgés (24 mois) alors qu'en parallèle l'expression CYP26B1 (catabolisme de l'AR) est augmentée.

Au niveau hippocampique des rats âgés il y a donc une diminution de l'apport en rétinol et en parallèle une augmentation du catabolisme de son métabolite l'AR. En outre, Wołoszynowska-Fraser *et al.*, 2021, ont également montré que les troubles mnésiques des rats âgés étaient associés à une augmentation de l'expression de ALDH1 dans l'hippocampe et une augmentation des taux de RBP4 circulant, laissant suggérer la mise en place d'un mécanisme compensatoire par l'organisme pour augmenter la synthèse d'AR au niveau de l'hippocampe avec l'âge, et ainsi pallier aux déficits mnésiques associés. Les résultats de l'étude de Dumetz *et al.*, 2020b soutiennent cette hypothèse en montrant que la supplémentation nutritionnelle en vitamine A des rats âgés augmente les taux de rétinol et d'AR dans l'hippocampe et améliore la mémoire spatiale.

Par ailleurs, les effets de l'âge sur la signalisation des rétinoïdes peuvent être modélisés par des carences nutritionnelles en vitamine A (Lane and Bailey, 2005). Une déprivation nutritionnelle en vitamine A chez des souris induit une diminution de l'expression des récepteurs RAR β , RXR β et RXR γ dans le cerveau (Enderlin *et al.*, 2000; Etchamendy *et al.*, 2003) ainsi qu'une diminution de la concentration de rétinol plasmatique (Bonhomme *et al.*, 2014b) et hépatique (Enderlin *et al.*, 2000). Une supplémentation nutritionnelle (Bonhomme *et al.*, 2019) ou un traitement à l'AR (Enderlin *et al.*, 2000) tend à normaliser l'expression de ces récepteurs chez l'animal âgé. Il est à noter que la supplémentation en vitamine A chez les contrôles jeunes (Enderlin *et al.*, 1997b) ou les animaux sous régime contrôle (Bonhomme *et al.*, 2019) n'induit pas d'augmentation d'expression des récepteurs de l'AR, soulignant la régulation fine du métabolisme de la vitamine A par l'organisme en conditions physiologiques.

En conclusion ces études soutiennent l'hypothèse d'un affaïssement de la voie de signalisation des rétinoïdes au cours du vieillissement. De plus, la supplémentation nutritionnelle en vitamine A semble être une piste prometteuse pour y remédier et ainsi éviter les altérations cérébrales associées.

2. Autres facteurs contribuant à l'altération du métabolisme de la vitamine A

Le vieillissement est un processus multifactoriel qui peut être plus ou moins amplifié d'un individu à l'autre par différents facteurs tel que la variabilité génétique interindividuelle ou encore l'environnement (Khan et al., 2017). Ces différents facteurs vont contribuer à orienter le vieillissement vers un processus physiologique, aussi appelée vieillissements en santé (c'est à dire sans développer de maladie) ou vers un processus pathologique (**Figure 7**). Parmi ces facteurs, certains mettent en jeu une altération du métabolisme de la vitamine A et par conséquent une accélération de l'affaissement de la signalisation des rétinoïdes (**Figure 7**).

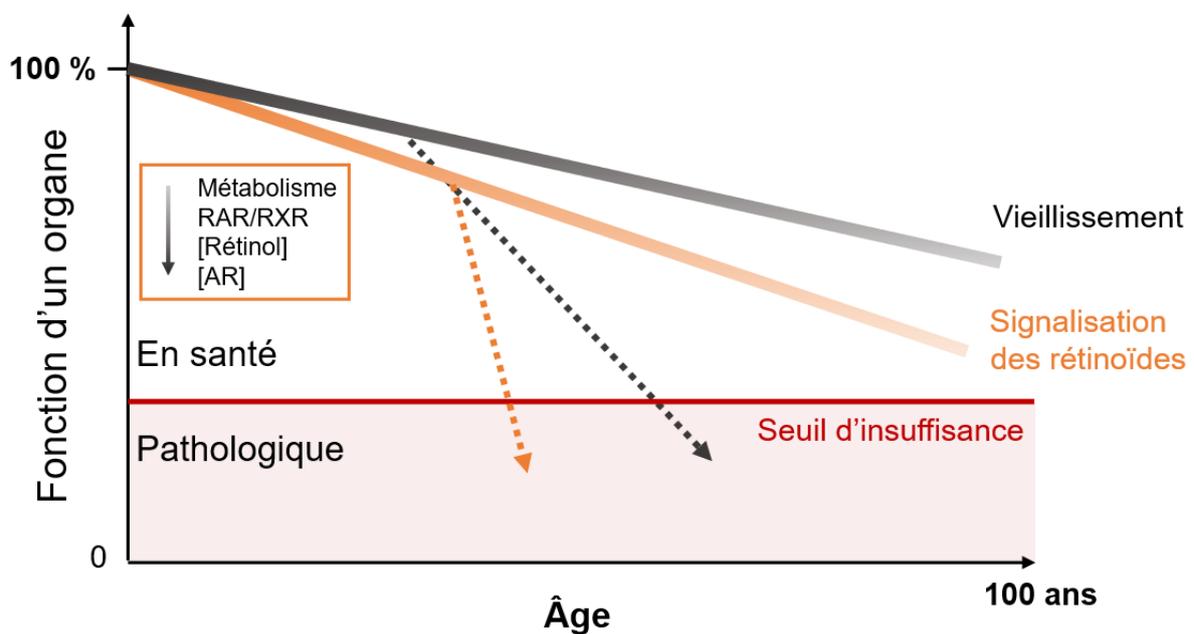


Figure 7 : Vieillesse en santé vs pathologique : implication de la signalisation des rétinoïdes. Abréviations : AR, Acide Rétinoïque ; RAR, Retinoic Acid Receptor ; RXR, Retinoid X Receptor. Inspiré de l'hypothèse de JP. Bouchon, 1984 « 1+2+3 ou comment tenter d'être efficace en gériatrie ».

a. Polymorphisme génétique

Des études de génome entier ont mis en évidence un polymorphisme nucléotidique associé aux concentrations plasmatique de rétinol et de β -carotène, ainsi qu'à la biodisponibilité du β -carotène (Borel and Desmarchelier, 2017; Borel et al., 2015). Ces variations génétiques pourraient expliquer, du moins en partie, les variations inter-individuelles du statut en vitamine A et de sa biodisponibilité. Ce polymorphisme génétique concerne notamment la transthyretin (TTR), impliquée dans le transport du rétinol plasmatique et qui est également étudiée comme un potentiel biomarqueur de la maladie de Parkinson (Alberio et al., 2013; Argüelles et al.,

2010). Les P-glycoprotéines ATP-binding cassette A1 (ABCA1) et ATP-binding cassette B1 (ABCB1), qui contribuent à l'entrée du β -carotène dans les muqueuses intestinales, sont également affectées par ce polymorphisme génétique (Borel and Desmarchelier, 2017) et leur polymorphisme a été mis en évidence comme un facteur de risque dans la maladie de Parkinson (Li et al., 2014c; Narayan et al., 2015; Ya and Lu, 2017).

Nous voyons ici une première piste indiquant que le polymorphisme génétique altérant le métabolisme de la vitamine A pourrait contribuer à l'étiologie de la maladie de Parkinson (**Figure 8**).

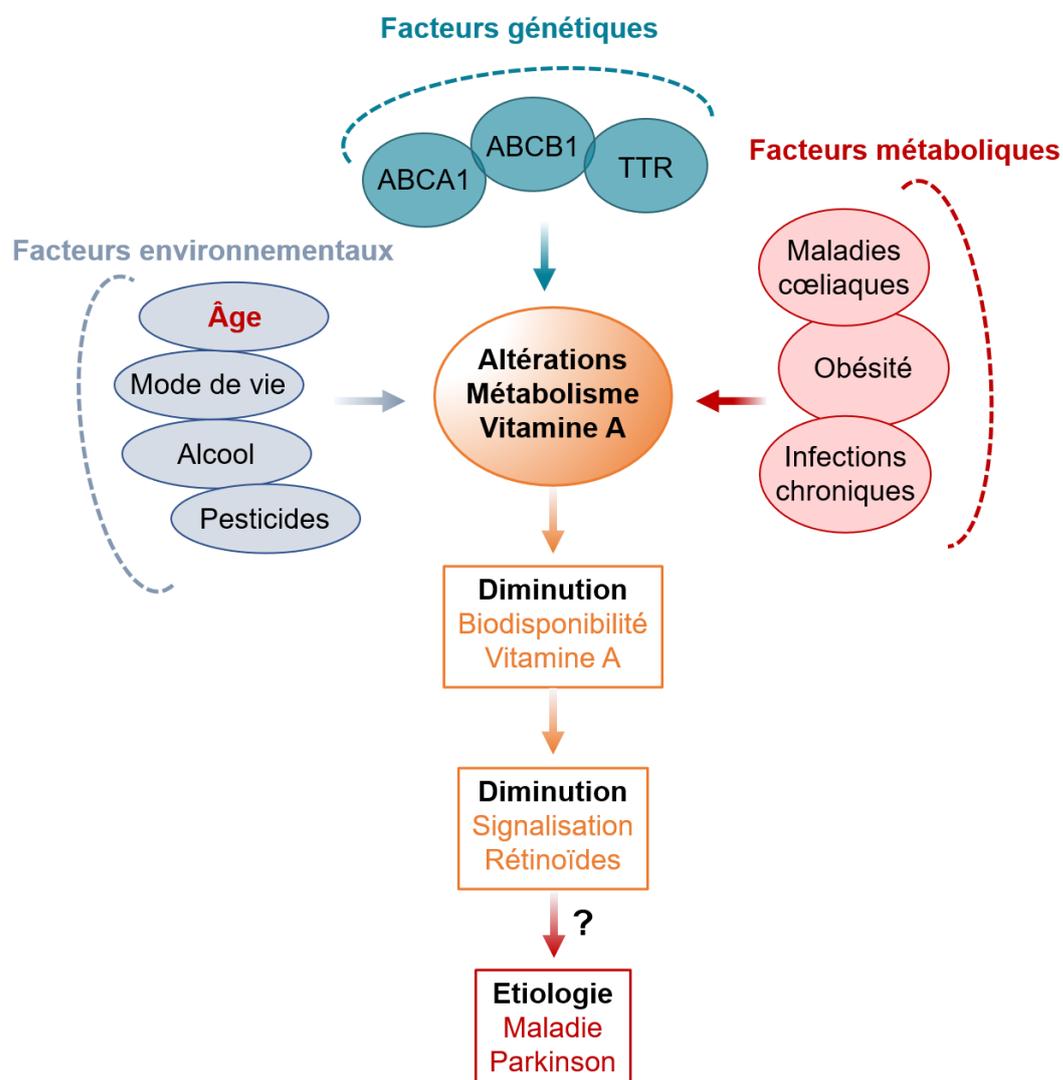


Figure 8 : Schéma représentant les facteurs influençant le métabolisme de la vitamine A

Abréviations : ABCA1, ATP-Binding Cassette A1 ; ABCB1, ATP-Binding Cassette B1 ; TTR, Transthyretin.

b. Facteurs environnementaux

Outre les facteurs génétiques, des facteurs environnementaux contribuent également à la diminution de la signalisation de la vitamine A (**Figure 8**). En premier lieu, ces facteurs environnementaux concernent le style de vie et les habitudes de consommation alimentaire des individus, qui vont influencer sur la quantité d'apport en vitamine A et leur forme (p.ex. régime riche en viande ou à l'inverse végétarien, prise de compléments alimentaires) (Carazo et al., 2021). L'association entre la consommation d'alcool et l'altération de la signalisation des rétinoïdes a également été clairement établie (Clugston and Blaner, 2012). La voie oxydative du métabolisme de l'éthanol chez l'Homme nécessite l'action de l'ADH (alcool déshydrogénase). Or l'ADH permet également l'oxydation du rétinol en rétinaldéhyde (l'étape précédant la formation d'AR) (Molotkov and Duester, 2002). Il y a donc une compétition entre métabolisme de la vitamine A et métabolisme de l'alcool. De plus la consommation d'alcool induit un changement d'activité des différentes isoformes de l'ALDH1 (Leo et al., 1989) et des isoformes de CYP26 (catabolisme vitamine A) (Kane et al., 2010). Ces différentes interactions entre le métabolisme de la vitamine A et celui de l'éthanol pourraient expliquer la diminution des stocks hépatiques de rétinol et d'AR associée à la consommation d'alcool chez la souris, (Clugston and Blaner, 2012). Parmi les facteurs environnementaux impactant le métabolisme de la vitamine A, on peut également mentionner certains pesticides, comme la bénomyl et la roténone, qui agissent en inhibant l'ALDH et qui sont reconnus comme facteurs de risque pour la maladie de Parkinson (Casida et al., 2014; Fitzmaurice et al., 2014).

c. Facteurs métaboliques

Enfin, on peut distinguer les facteurs métaboliques des facteurs environnementaux dans les mécanismes contribuant à l'altération de la signalisation médiée par la vitamine A (**Figure 8**). Parmi ces facteurs métaboliques, on peut citer les maladies cœliaques, ou toute autre maladie métabolique perturbant l'absorption intestinale des nutriments et celles impactant le transport des lipides (Riabroy and Tanumihardjo, 2014; Tanumihardjo et al., 2016). Par ailleurs, l'obésité est associée à une déficience en vitamine A (Viroonudomphol et al., 2003). En effet, il a été montré que la biodisponibilité de la vitamine A est diminuée suite à un régime obésogène chez la souris, la vitamine A étant retenue dans le tissu adipeux (Blaner, 2019; Trasino et al., 2015). De plus, compte tenu de l'importance de l'AR dans le système immunitaire, les infections chroniques peuvent également contribuer à une déficience en vitamine A (Wiseman et al., 2017) en mobilisant une partie du stock total de vitamine A dans l'organisme (Luo et al., 2009).

En conclusion, la vitamine A est impliquée dans de nombreux processus physiologiques de l'organisme, en particulier au niveau cérébral où une altération de la signalisation des rétinoïdes est associée à des troubles cognitifs et comportementaux. Ainsi le maintien de l'homéostasie de la signalisation médiée par les rétinoïdes est essentiel au fonctionnement normal du cerveau. Or il a été montré que la biodisponibilité des rétinoïdes diminue au cours du vieillissement, l'âge étant également le premier facteur de risque des maladies neurodégénératives. Par ailleurs, cette diminution de la signalisation des rétinoïdes est renforcée par des facteurs génétiques, environnementaux et métaboliques, impactant le métabolisme de la vitamine A et dont certains sont communs aux facteurs de risque de la maladie de Parkinson. Ainsi, on peut supposer qu'une altération du métabolisme de la vitamine A et de sa signalisation contribue à orienter le vieillissement vers un processus pathologique et le développement de maladies neurodégénératives, dont la maladie de Parkinson (**Figure 8**).

La maladie de Parkinson est communément appelée la maladie du mouvement. Or il a été montré que des rats carencés en vitamine A présentent des altérations motrices similaires à celles observées dans les modèles animaux de la maladie (Carta et al., 2006). Par ailleurs, les structures cérébrales associées à l'étiologie de la maladie de Parkinson, le striatum et la substance noire compacte, sont particulièrement sensibles à la signalisation des rétinoïdes (Krezel et al., 1999; McCaffery and Drager, 1994). Ces observations renforcent l'hypothèse d'une association entre une altération de la signalisation des rétinoïdes et le développement de la maladie de Parkinson.

CHAPITRE 2. La maladie de Parkinson et l'implication de la voie nigro-striée

I. L'implication de la voie nigro-striée dans le contrôle du mouvement volontaire

1. Les ganglions de la base : implication de la boucle motrice dans le contrôle du mouvement volontaire

Avant de parler de la maladie de Parkinson, décrivons le réseau de structures cérébrales dans lequel la voie nigro-striée participe au contrôle du mouvement volontaire.

Les ganglions de la base correspondent à un ensemble de noyaux sous-corticaux situés à la base du cerveau, d'où leur nom, et permettent notamment de sélectionner l'action à effectuer pour avoir un comportement dirigé vers un but (Obeso et al., 2008). La boucle motrice des ganglions de la base comprend plusieurs noyaux, le striatum, la substance noire *pars reticulata* (SNr), le globus pallidus, séparé en deux segments, interne (GPi) et externe (GPe) et le noyau sous-thalamique (NST) (Groenewegen, 2003). Ces structures s'intègrent dans une boucle « cortico-striato-thalamo-cortical » impliquée dans le contrôle du mouvement volontaire. A noter que le striatum peut également être divisé en striatum dorsal et striatum ventral, la partie ventrale correspondant au noyau accumbens (associé aux tubercules olfactifs et aux ilots de Calleja chez le rongeur) (Durieux et al., 2012). Néanmoins dans le reste du manuscrit le terme « striatum » fera référence au striatum dorsal.

Il y a 2 grands types de signalisation dans le système des ganglions de la base, une signalisation glutamatergique excitatrice, médiée par le glutamate (Glu), et une signalisation inhibitrice GABAergique, médiée par l'acide γ -aminobutyrique GABA). Mis à part le NST, qui est une structure glutamatergique, les autres structures des ganglions de la bases (striatum, GPe, GPi, SNr) sont constitués de neurones GABAergiques dont les projections exercent un effet inhibiteur sur leurs structures cibles (Lanciego et al., 2012).

L'ensemble des aires corticales projette sur le striatum, qui constitue la principale structure d'entrée de l'information de la boucle motrice des ganglions de la base, tandis que le GPi et la SNr correspondent aux structures de sortie (Dudman and Krakauer, 2016). Le NST est, quant à lui, à la fois une structure d'entrée (reçoit les afférences du cortex), et une structure relais du striatum. Le striatum reçoit également des afférences excitatrices du thalamus. Le striatum projette quant à lui par ses afférences inhibitrices vers la SNr et le GPi, ou alors vers le GPe, ce qui constitue respectivement la voie directe et la voie indirecte (**Figure 9**). Au sein de la voie indirecte, le GPe reçoit les afférences du striatum et projette sur le NST avant d'atteindre

le GPi et la SNr. Il existe une troisième voie au sein des ganglions de la base, la voie hyperdirecte, formée par les projections du cortex vers le NST, et du NST vers la SNr (**Figure 9**). En sortie des ganglions de la base, la principale cible de ces structures est le thalamus. Lorsqu'il est activé, le thalamus envoie des projections glutamatergiques excitatrices au cortex, et ainsi le cortex moteur initie le mouvement. La voie directe et la voie indirecte ont des effets opposés sur le thalamus et donc sur l'initiation du mouvement. De façon simplifiée, dans la voie directe les projections GABAergiques du striatum vers le GPi et la SNr permettent la levée de l'inhibition exercée par ces structures sur le thalamus. On considère donc que la voie directe est activatrice du mouvement. Dans la voie indirecte, les projections GABAergiques du striatum inhibent le GPe, entraînant la désinhibition du NST. Les projections excitatrices glutamatergiques du NST vont activer les neurones du GPi et de la SNr et ainsi maintenir l'inhibition exercée par ces structures sur le thalamus. La voie indirecte est donc inhibitrice du mouvement (Calabresi, 2014; Groenewegen, 2003; Lanciego et al., 2012; Redgrave et al., 2010) (**Figure 9**). La voie hyperdirecte est également inhibitrice du mouvement, le NST relaye les entrées corticales en excitant les structures de sortie des ganglions de la base et ainsi inhibe le thalamus (Maurice et al., 1998; Nambu et al., 2002). Le contrôle de l'activité du thalamus est donc médié par une séquence inhibition / désinhibition / inhibition puisque le GPi et la SNr inhibent en continu le thalamus *via* leurs projections GABAergiques qui ont une activité tonique élevée. A l'échelle de la commande motrice, c'est la voie directe qui 'permet' le mouvement, par la désinhibition du thalamus, tandis que l'activation des voies hyperdirecte et indirecte permet d'encadrer et de raffiner la séquence temporelle d'activation de la voie directe, en renforçant l'inhibition du thalamus.

La boucle motrice décrite ci-dessus est largement modulée par la substance noire *pars compacta* (SNc). La SNc est un noyau modulateur dopaminergique des ganglions de la base et innerve massivement les autres noyaux en particulier le striatum qui est une structure dite dopamino-sensible (**Figure 9**). L'innervation du striatum par la SNc constitue la voie nigro-striée et joue un rôle indispensable dans la régulation du contrôle du mouvement volontaire par les ganglions de la base, puisque les perturbations de cette voie entraînent des troubles moteurs importants (Redgrave et al., 2010).

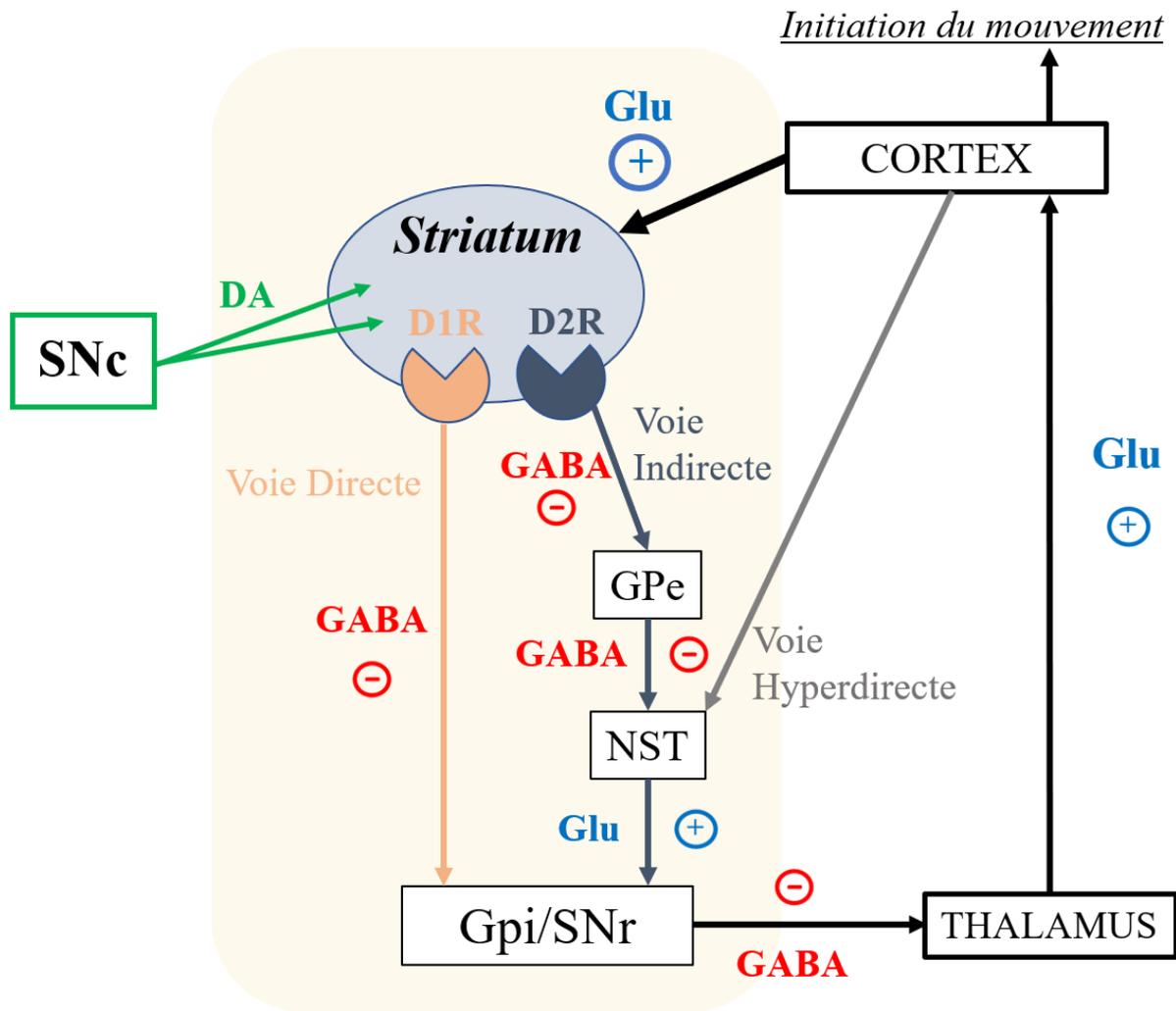


Figure 9 : Schéma des boucles principales des ganglions de la base

Abréviations : DA, Dopamine ; D1R, Récepteur D1 à la Dopamine ; D2R, Récepteur D2 à la Dopamine ; GABA, acide γ -aminobutyrique ; Glu, Glutamate ; GPe, Globus Pallidus externe ; GPi, Globus Pallidus interne ; NST, Noyau Sous-Thalamique ; SNc, Substance Noire *pars compacta* ; SNr, Substance Noire *pars reticulata*.

2. Caractérisation de la voie nigro-striée

a. La substance noire *pars compacta* (SNc)

La SNc est essentiellement constituée de neurones dopaminergiques, qui produisent de la dopamine (DA), un neuromodulateur. Le corps cellulaire de ces neurones est présent dans la SNc, et leurs extrémités axonales, ainsi que les synapses, projettent entre autres sur le striatum (Obeso et al., 2017).

Les neurones dopaminergiques présents dans le système nerveux central ont initialement été ségrégués selon leur localisation anatomique et les structures sur lesquelles ils projettent. Ils

ont ainsi été divisés en 3 groupes, les neurones A10, présents au niveau de l'aire tegmentale ventrale (ATV), les neurones A9, présents dans la SNc et participant à la signalisation de la voie nigro-striée, et les neurones A8 au niveau de la zone rétro-orbitaire (Lanciego et al., 2012; Obeso et al., 2008). Cependant, des études d'expression génique ont montré qu'il existait différentes sous-population de neurones dopaminergiques présents dans un ou plusieurs de ces clusters (Poulin et al., 2014, 2018). Ces différents sous-types de neurones dopaminergiques expriment des protéines différentes pouvant leur conférer des propriétés fonctionnelles distinctes. Les différences de réseau et fonction de ces sous-populations sont encore mal connues car leur étude est en plein essor. Cette hétérogénéité des neurones dopaminergiques pourrait contribuer à la diversité d'action du système dopaminergique et sera évoquée plus loin dans la thèse.

b. Le striatum

Le striatum doit son nom aux nombreux faisceaux de fibres qui le traverse et lui confère une apparence striée (Lanciego et al., 2012).

Le striatum contient en majorité des neurones de projections appelés neurones épineux moyens (MSNs pour medium sized-spiny neurons en anglais), du fait de leur arborisation dendritique très dense en épines dendritiques (synapses glutamatergiques) (Deutch et al., 2007). Les MSNs sont des neurones inhibiteurs GABAergiques, ils sont donc capables de libérer le neurotransmetteur GABA et ainsi inhiber leurs neurones GABAergiques cibles (Deutch et al., 2007). L'activité des MSNs est modulée par les afférences dopaminergiques de la SNc par l'intermédiaire des récepteurs à la dopamine qu'ils expriment. Les MSNs du striatum peuvent exprimer les récepteurs à la dopamine de type D1 (D1R) ou de type D2 (D2R). Une faible proportion de MSNs peut co-exprimer ces deux types de récepteurs (Humphries and Prescott, 2010; Ren et al., 2017). Les MSNs représentent 90 % de la population neuronale totale du striatum, cela explique pourquoi le striatum est une structure dopamino-sensible (Deutch et al., 2007).

Le deuxième type de neurones exprimés dans le striatum sont les interneurones qui représentent environ 10 % de la population neuronale totale du striatum. Les interneurones peuvent être divisés en plusieurs catégories ; les interneurones cholinergiques utilisant l'acétylcholine comme neurotransmetteur, aussi connus sous le nom de neurones à activité tonique (TAN), et les interneurones GABAergiques qui sont de plusieurs types. Les interneurones GABAergiques expriment des protéines de liaison au calcium, soit la parvalbumine (neurones PV) soit la calretinine (neurones FSI pour fast-spiking interneurons). Il existe un troisième phénotype d'interneurone GABAergiques qui sont capables de synthétiser l'oxide nitrique. L'ensemble de ces interneurones forme un microcircuit avec les

MSNs dans le striatum et contribue à moduler l'activité des MSNs (Lanciego et al., 2012) (**Figure 10**).

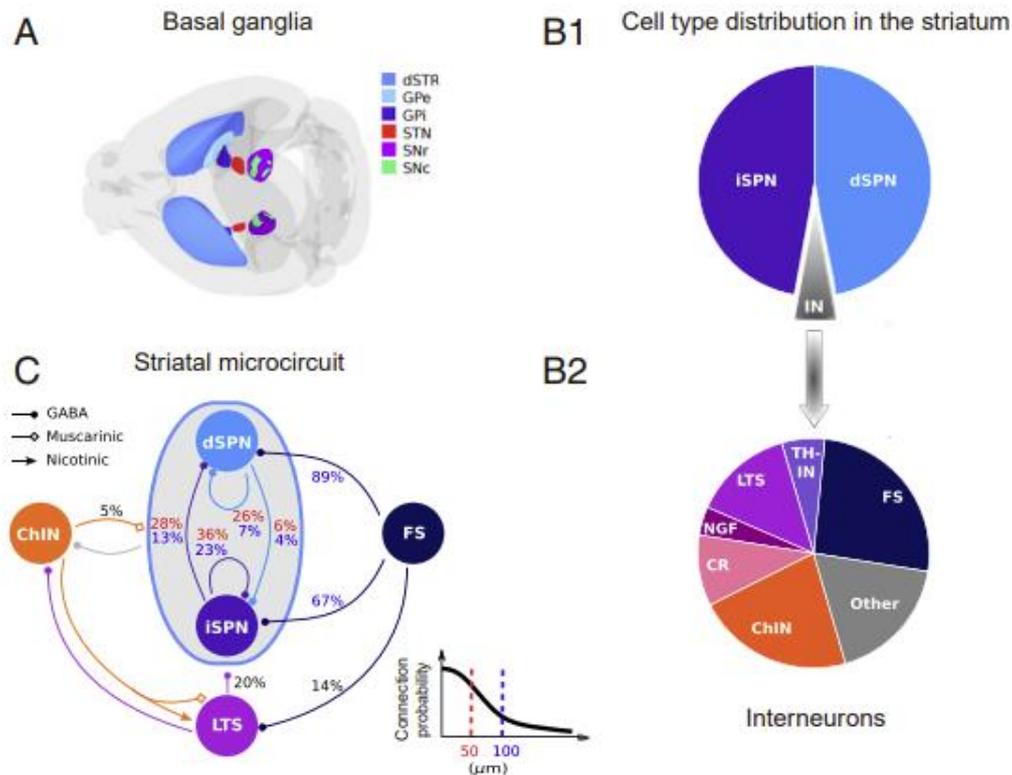


Figure 10 : Organisation des microcircuits du striatum et de ses sous-types neuronaux

(A) Vue dorsale d'un cerveau de souris illustrant les noyaux des ganglions de la base. dSTR, striatum dorsal ; GPe, Globus Pallidus Externe ; GPI, Globus Pallidus Interne ; STN, Noyau Sous-Thalamique ; SNr, Substance Noire *pars reticula* ; SNC, Substance Noire *pars compacta*. (B1) Représentation de la proportion de neurones du striatum chez la souris. SPN, neurones épineux moyens (ou MSNs) (90 %). Les SPNs sont divisés selon les structures sur lesquelles ils projettent dans les ganglions de la base, les dSPN pour la voie directe, les iSPN pour la voie indirecte. IN, Interneurones du striatum (10 %), incluant les interneurones cholinergiques et les interneurones GABAergiques. (B2) Représentation de la proportion de sous types d'interneurones du striatum. FS, Fast-spiking interneurones GABAergiques exprimant la parvalbumine (neurones PV) ; LTS, Low-threshold spiking interneurones GABAergiques ; CR interneurones GABAergiques exprimant la calretinine ; TH-IN, interneurones GABAergiques exprimant la Tyrosine Hydroxylase ; ChIN, Interneurones Cholinergiques. (C) Schéma de la connectivité dans le striatum dorsal, impliquant les SPNs de la voie directe et les SPNs de la voie indirecte, ainsi que les interneurones FS, LTS et ChIN. Les probabilités de connexions au sein et entre les sous-types neuronaux sont indiquées par des flèches respectives. Les chiffres en rouge correspondent aux probabilités de connexion entre 2 neurones dont les somas se trouvent à une distance de 50 µm, tandis que les chiffres en bleu correspondent aux probabilités de connexion à 100 µm. Source : (Hjorth et al., 2020).

Il est généralement admis que le nombre de neurones MSNs exprimant D1R (D1 MSNs) ou exprimant D2R (D2 MSNs) est relativement homogène dans l'ensemble du striatum (Durieux et al., 2012; Ren et al., 2017). Cependant le striatum n'est pas une structure uniforme et outre une division en striatum dorsal et striatum ventral, le striatum dorsal peut lui-même être subdivisé selon l'axe latéral-médial en striatum dorsolatéral (DLS) et striatum dorsomédial (DMS) (Durieux et al., 2012; Voorn et al., 2004) (**Figure 11**). De plus le striatum dorsal est également divisible en 3 régions selon l'axe rostro-caudal (ou antéro postérieur chez les quadrupèdes) (Favier et al., 2017; Martin et al., 2019; Ren et al., 2017) (**Figure 11**). Ces régionalisations anatomiques sont en lien avec la régionalisation fonctionnelle du striatum (Martin et al., 2019). En effet, les différentes régions ne reçoivent pas les mêmes afférences excitatrices (cortex et thalamus), induisant des schémas d'activation des D1 et D2 MSNs différents (Durieux et al., 2012; Lu et al., 2021).

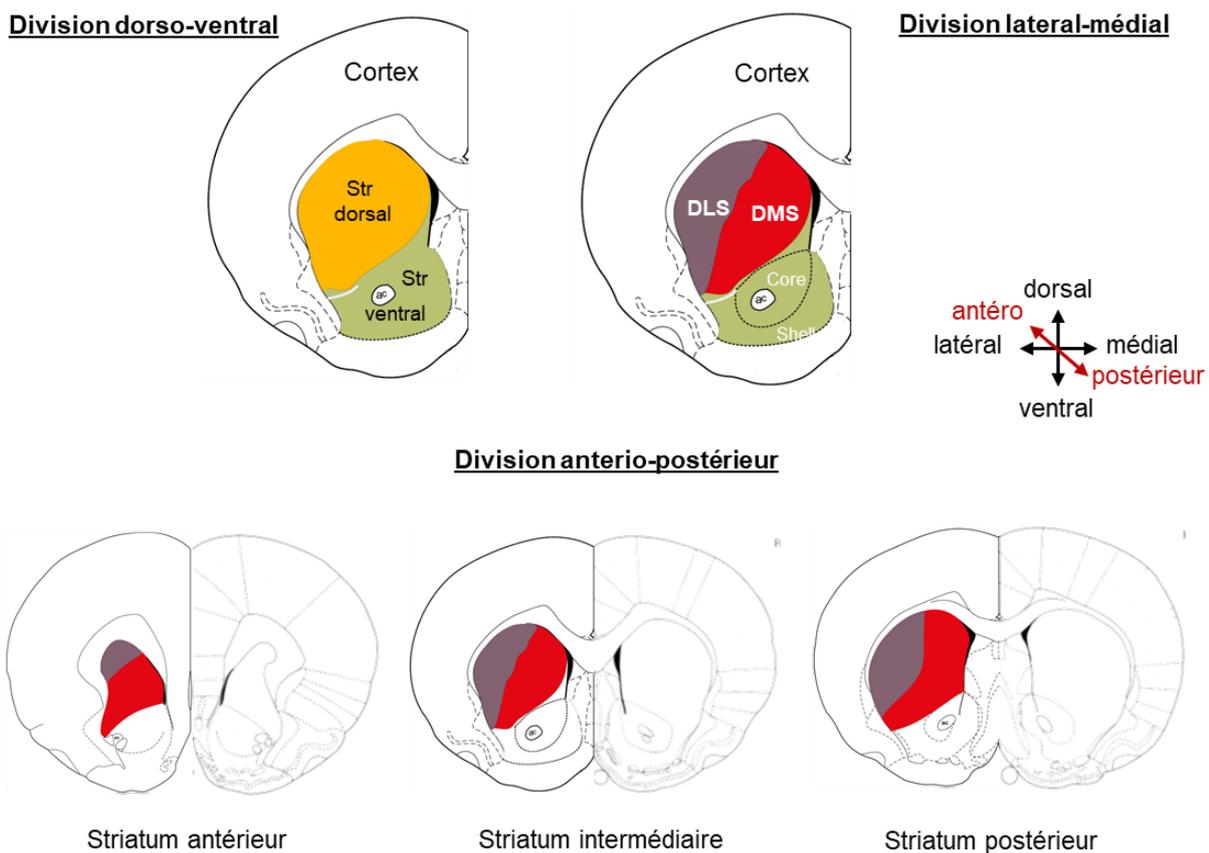


Figure 11 : Régionalisation spatiale du striatum

Les illustrations représentent des coupes coronales de cerveau de rat d'après Paxinos and Watson, 2007. Les 3 niveaux de striatum selon l'axe antéro-postérieur sont désignés comme antérieur (bregma : +2.2), intermédiaire (bregma : +1.6) et postérieur (bregma : +0.7) d'après Favier et al., 2017.

Abréviations : AC, Commissure Antérieure ; DLS, Striatum Dorsolatéral ; DMS, Striatum Dorsomédial ; Str, Striatum (Inspiré de : Favier et al., 2017; Humphries and Prescott, 2010). Note : le striatum ventral est lui aussi sub-divisé en 2 parties, le core et le shell.

c. Régionalisation structurelle du striatum : Les striosomes et la matrice

Outre les divisions fonctionnelles et anatomiques, le striatum peut être subdivisé en 2 compartiments, les striosomes et la matrice (Märtin et al., 2019). Cette régionalisation peut notamment être mise en évidence par la visualisation de l'expression de l'enzyme acétylcholinestérase (AChE), l'enzyme qui assure l'hydrolyse de l'acétylcholine (ACh). Le marquage immuno-histochimique du striatum met en évidence plusieurs zones, ou tâches, avec une faible expression de l'AChE, ces zones correspondant aux striosomes ; et à l'inverse des zones exprimant fortement l'AChE, qui correspondent à la matrice (Lanciego et al., 2012; SgROI and Tonini, 2018). Par ailleurs le récepteur couplé aux protéines G, μ opioïde (MOR1), est considéré comme un marqueur des striosomes dans le striatum, puisqu'il est uniquement exprimé dans les striosomes et absent dans la matrice (Brimblecombe and Cragg, 2017; Lanciego et al., 2012) (**Figure 12**). Les striosomes représentent 10-15 % du volume total du striatum (Brimblecombe and Cragg, 2017; SgROI and Tonini, 2018). Les striosomes sont intégrés dans la matrice environnante pour former une structure labyrinthique (**Figure 12**). Par ailleurs il a été montré que les niveaux de DA sont plus élevés dans la matrice que dans les striosomes alors qu'il y a d'avantage d'afférences dopaminergiques de la SNc vers les striosomes que vers la matrice (Brimblecombe and Cragg, 2017).

Plusieurs hypothèses impliquant les protéines exprimées de façon différentielle entre les 2 compartiments ont été évoquées pour expliquer cette hétérogénéité des taux de dopamine entre les striosomes et la matrice. Les striosomes sont enrichis en enképhaline, en calrétinine, en substance P et en D1R. A l'inverse la matrice contient majoritairement de la parvalbumine, le D2R et l'enzyme choline acetyltransferase (ChAT), qui est l'enzyme permettant la synthèse d'acétylcholine (Brimblecombe and Cragg, 2017; Lanciego et al., 2012). Ces divergences entre les striosomes et la matrice sous-tendent l'hypothèse d'un rôle différent dans la régulation fonctionnelle du striatum. Les MSNs et les interneurons présents dans chaque compartiment peuvent interagir entre eux et échanger des informations, néanmoins leurs afférences et leurs territoires de projections semblent distincts (Brimblecombe and Cragg, 2017; Gerfen, 1992; SgROI and Tonini, 2018). Les afférences glutamatergiques provenant des aires sensori-motrices et associatives du cortex cérébral innervent principalement la matrice, tandis que les aires limbiques du cortex innervent essentiellement les striosomes, faisant des striosomes des sous-territoires limbiques au sein du striatum sensori-moteur (**Figure 12**). Concernant les projections de ces deux compartiments, les MSNs présents dans les striosomes sont les seuls neurones du striatum à projeter sur les neurones dopaminergiques de la SNc ; la SNc projetant ses afférences dopaminergiques en retour sur l'ensemble du striatum (striosomes et matrice) (Crittenden and Graybiel, 2011a; Gerfen, 1992; Lanciego et al., 2012; SgROI and Tonini, 2018) (**Figure 12**). Ainsi, l'organisation du striatum en striosomes

et matrice est dépendante à la fois des afférences corticales, des efférences du striatum, et des marqueurs neurochimiques qui les composent (Gerfen, 1992).

Par ailleurs nous avons vu que le récepteur des opioïdes MOR1, était particulièrement exprimé au niveau des striosomes, or la signalisation médiée par les opioïdes est impliquée dans la neurotransmission et la plasticité du striatum (Brimblecombe and Cragg, 2017; Tajima and Fukuda, 2013). De manière intéressante, l'expression des récepteurs aux opioïdes est diminuée dans le striatum des patients parkinsoniens et dans des modèles animaux de la maladie de Parkinson (SgROI and Tonini, 2018). Ces observations renforcent l'hypothèse d'un rôle prédominant de ces compartiments dans le maintien de l'intégrité fonctionnelle du striatum. Néanmoins le rôle exact des striosomes et leurs mécanismes d'actions sont encore mal connus, autant en conditions physiologiques que pathologiques. Ceci est notamment dû à la difficulté méthodologique d'étudier séparément les striosomes et la matrice. Depuis quelques années, le développement de modèles de souris transgéniques a permis un nouvel essor pour la recherche sur les striosomes, ce qui va permettre d'augmenter les connaissances sur ce sujet dans les années à venir (Cai et al., 2014; Crittenden et al., 2016, 2017).

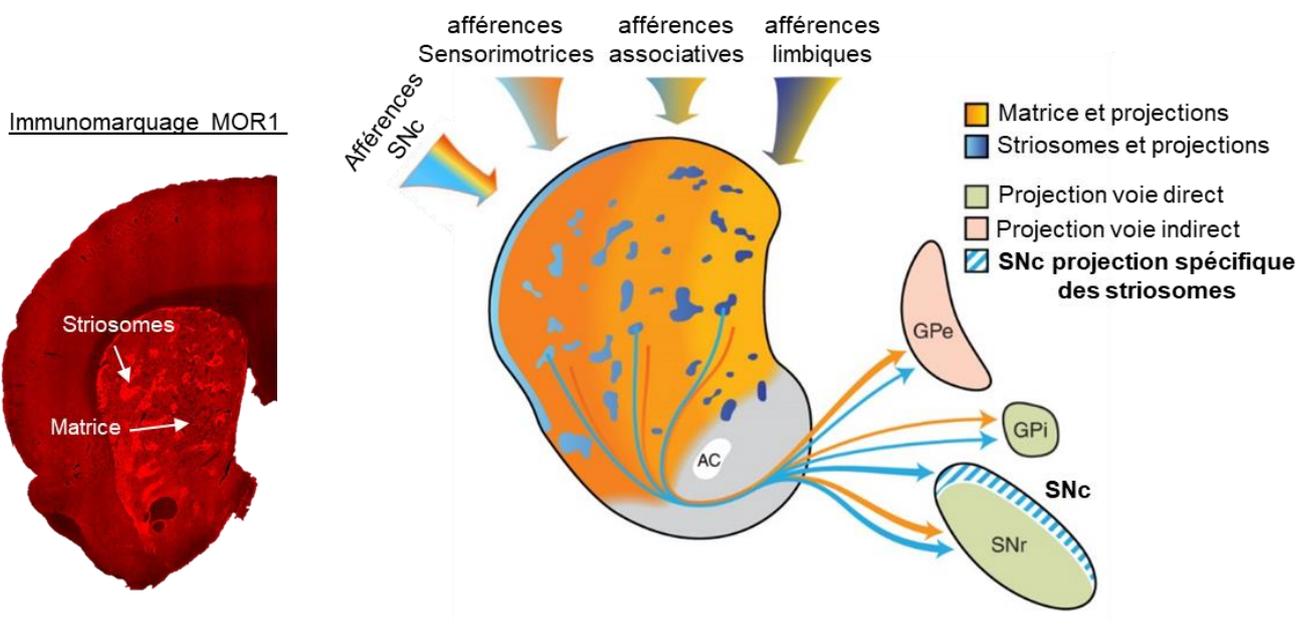


Figure 12 : Régionalisation structurelle du striatum : Striosomes et matrices

A gauche, immunomarquage avec MOR1 sur une coupe coronale de cerveau de rat (réalisée au laboratoire). A droite, schéma des afférences et territoires de projections des striosomes et de la matrice. Abréviations : AC, Commissure Antérieure ; GPe, Globus Pallidus externe ; GPi, Globus Pallidus interne ; SNc, Substance Noire *pars compacta* ; SNr, Substance Noire *pars reticula* (Adapté de (Crittenden and Graybiel, 2011a).

3. Implication de la voie nigro-striée dans le contrôle du mouvement volontaire

a. Implication de la voie nigro-striée via la signalisation dopaminergique

Outre le type de récepteur à la dopamine qu'ils expriment, les MSNs du striatum se distinguent par les structures sur lesquelles ils projettent dans les ganglions de la base ; les D1 MSNs sont à l'origine de la voie directe, tandis que les D2 MSNs sont à l'origine de la voie indirecte. Nous avons vu précédemment que l'initiation du mouvement était le résultat d'une séquence inhibition/désinhibition des différents noyaux des ganglions de la base, initiée par les projections inhibitrices du striatum sur les structures de sortie (dans le cadre des voies directe et indirecte).

Or, comme dit précédemment, l'excitabilité des D1 et D2 MSNs est modulée par la DA. Les récepteurs de la DA sont des récepteurs couplés aux protéines G (GPCR) induisant une cascade de signalisation différente selon le type de protéine G qu'ils activent ; protéine Gq activatrice ou protéine Gi inhibitrice (Ericsson et al., 2013). Les récepteurs de type D1 (« D1-like receptors », comprenant les sous-types D1 à D5) sont couplés à des protéines Gq qui lorsqu'ils sont activés par la liaison de la DA, activent l'adénylate cyclase augmentant ainsi l'activité de son second messenger l'adénosine monophosphate cyclique (AMPc), ce qui produit un effet activateur sur les MSNs exprimant D1. A l'inverse, les récepteurs de la DA de type D2 (« D2-like receptor, comprenant les sous-types D2 et D3) sont couplés à des protéines Gi, la liaison de la DA entraînant une inhibition de l'activité de l'AMPc et par conséquent un effet inhibiteur sur les D2 MSNs (Ericsson et al., 2013).

Ainsi, les afférences dopaminergiques de la SNc ont un effet activateur sur les D1 MSNs (voie directe) et un effet inhibiteur sur les D2 MSNs (voie indirecte) (Ericsson et al., 2013). Cet effet dichotomique des projections dopaminergiques sur les MSNs du striatum est à l'origine de l'équilibre entre voie directe et voie indirecte permettant la régulation fine du contrôle du mouvement volontaire par les ganglions de la base (Groenewegen, 2003; Redgrave et al., 2010). Par conséquent la perte de neurones dopaminergiques et de leurs projections sur le striatum conduit à un déséquilibre, avec une hyperactivité de la voie indirecte (inhibition du mouvement), et une hypoactivité de la voie directe (initiation du mouvement), renforcée par une affinité plus forte de la DA pour le D2R vis-à-vis du D1R. Il est couramment admis que ce déséquilibre est à la base des bradykinésies observées dans la maladie de Parkinson (Calabresi, 2014; Hunger et al., 2019; Obeso et al., 2008).

Les arborisations axonales des projections dopaminergiques nigrostriatales sont extrêmement denses. Il a été montré chez le rat que un axone dopaminergique innerve environ 75 000 MSNs dans le striatum, et que 1 MSN est innervé par 100 à 200 neurones dopaminergiques

de la SNc (Lanciego et al., 2012). Cette profusion de contacts synaptiques entre la SNc et le striatum peut expliquer que les symptômes moteurs de la maladie de Parkinson n'apparaissent qu'à partir de 60-70 % de perte des neurones DA de la SNc, ce qui correspond à une déplétion d'environ 80% des afférences dopaminergiques dans le striatum (Raza et al., 2019).

Ainsi, même si le rôle clé de la DA dans le contrôle du mouvement volontaire, et plus largement dans l'étiologie de la maladie de Parkinson est établi, la DA n'est pas le seul neuromodulateur impliqué dans la fonction striatale et l'équilibre entre voie directe et voie indirecte. Il y a notamment la noradrénaline, la sérotonine, les opioïdes, les neuropeptides et l'acétylcholine. La littérature montre que la vitamine A module également l'acétylcholine dans le striatum, c'est pourquoi nous allons nous concentrer sur ce neuromodulateur.

b. Modulation de la signalisation dopaminergique par l'acétylcholine

La régulation fine de l'activité des ganglions de la base est médiée principalement par 2 neuromodulateurs, la DA dont nous venons de parler, et l'ACh. Les interneurons cholinergiques du striatum et les afférences dopaminergiques de la SNc interagissent dans un équilibre dynamique pour moduler les voies directe et indirecte des ganglions de la base (Ztaou and Amalric, 2019) (**Figure 13**). Les interneurons cholinergiques projettent dans l'ensemble du striatum, expliquant la concentration élevée de marqueurs cholinergiques, AChAT et AChE dans cette structure (Ztaou and Amalric, 2019).

L'ACh présente dans le striatum provient essentiellement des interneurons cholinergiques du striatum cités précédemment, mais également des projections cholinergiques du noyau pédoculopontin (NPP) (Iarkov et al., 2020). Le NPP est un noyau du tronc cérébral dont les neurones cholinergiques projettent sur le NST et le striatum, et qui est inhibé en retour par les projections GABAergiques des noyaux de sortie des ganglions de la base, le GPi et la SNr (Takakusaki et al., 2003). Le NPP est impliqué dans la fonction locomotrice et le tonus postural, et on observe une dégénérescence des neurones cholinergiques de cette structure dans le cerveau de patients parkinsoniens (Chastan et al., 2009; Karachi et al., 2010). Par ailleurs, de façon concomitante à la perte des neurones DA dans la maladie de Parkinson, on observe également une diminution de l'activité de ChAT (enzyme de synthèse de l'ACh) (Lange et al., 1993; Rizzi and Tan, 2017). Ces observations illustrent l'importance de la signalisation cholinergique, en interaction avec la signalisation dopaminergique, dans le contrôle du mouvement volontaire médié par les ganglions de la base.

L'action de l'ACh est médiée par 2 types de récepteurs, les récepteurs nicotiques, et les récepteurs muscariniques (**Figure 13**). Les récepteurs nicotiques sont, des canaux

cationiques constitués de plusieurs sous unités α et β et induisant une réponse excitatrice rapide. Ces récepteurs sont essentiellement situés au niveau des terminaisons présynaptiques des neurones glutamatergiques et des neurones dopaminergiques et leur activation contribue à la libération de neurotransmetteurs et de neuromodulateurs par ces neurones (Rizzi and Tan, 2017). Les récepteurs muscariniques sont quant à eux des récepteurs couplés aux protéines G (tout comme les récepteurs de la DA) et sont classés en 2 catégories ; les récepteurs muscariniques de type M1 couplés à une protéine Gq (comme le récepteur D1R) induisant une réponse excitatrice, et les récepteurs muscariniques de type M2, couplés à une protéine Gi (comme le récepteur D2R) induisant une diminution de l'excitabilité des neurones à la surface desquels ils sont exprimés (Rizzi and Tan, 2017).

L'ACh joue donc à la fois le rôle de modulateur de la libération de DA par les neurones dopaminergiques, et le rôle de modulateur de l'activité des D1 MSNs et des D2 MSNs, permettant ainsi un niveau de régulation supplémentaire sur l'activation de la voie directe et de la voie indirecte des ganglions de la base médiée par la dopamine.

De façon simplifiée, suite à leur liaison à l'ACh les récepteurs nicotiques situés au niveau des terminaisons axonales des neurones dopaminergiques augmentent l'excitabilité de ces neurones et la libération de DA au niveau du striatum (Exley and Cragg, 2008) (**Figure 13**). En parallèle la DA contrôle la libération de ACh via ses récepteurs D1R et D2R exprimés par les interneurones cholinergiques. L'ensemble des interneurones cholinergiques expriment le D2R (inhibiteur) mais seule une faible proportion exprime le D1R (activateur). Ainsi la libération de DA induite par l'ACh au niveau pré-synaptique va induire l'inhibition de la libération d'ACh en retour, *via* l'activation des D2R, formant une première boucle de rétrocontrôle entre la DA et l'ACh (Exley and Cragg, 2008; Threlfell et al., 2012).

Concernant la régulation des voies directe et indirecte, les MSNs expriment à leur surface les récepteurs muscariniques de l'ACh, en plus des récepteurs dopaminergiques (**Figure 13**). Les D1 MSNs (voie directe) sont activés par l'action de la DA sur ses D1R et inhibés par l'action de l'ACh sur ses récepteurs muscariniques de type M2. A l'inverse, les D2 MSNs (voie indirecte) sont inhibés par l'action de la DA sur ses D2R et activés par l'action de l'ACh sur ses récepteurs muscariniques de type M1 (Oldenburg and Ding, 2011; Shimohama and Kawamata, 2018; Ztaou and Amalric, 2019). L'ACh exerce donc un effet opposé à celui de la DA sur l'activité des D1 MSNs et des D2 MSNs, formant une deuxième boucle de rétrocontrôle entre la DA et l'ACh (Kaneko et al., 2000).

Par conséquent, une diminution de la libération de DA, dans le cas de la maladie de parkinson notamment, perturbe cet équilibre de régulation dynamique entre les 2 neuromodulateurs.

La déplétion en dopamine du striatum induit une augmentation de l'excitabilité des interneurones cholinergiques (suite à la perte de l'effet inhibiteur du D2R) et une augmentation

de la libération d'ACh contribuant au dérèglement de la balance entre voies directe et indirecte et à l'apparition des troubles moteurs qui en découlent (Ztaou and Amalric, 2019).

Ainsi, l'ACh fait partie intégrante de la physiologie des ganglions de la base *via* son interaction avec la DA dans le striatum. Ces observations mettent en avant l'importance de la microcircuiterie du striatum dans la régulation fine du mouvement volontaire par les ganglions de la base.

Les mécanismes cités ci-dessus sont une version simplifiée du contrôle réciproque entre l'ACh et la DA, compte tenu de la diversité des sous-types de récepteurs muscariniques et nicotiques, et leur expression au niveau des terminaisons glutamatergiques et des interneurons cholinergiques et GABAergiques, suggérant des mécanismes plus complexes de régulation de l'activité du striatum dans les ganglions de la base (Shimohama and Kawamata, 2018; Ztaou and Amalric, 2019) (**Figure 13**).

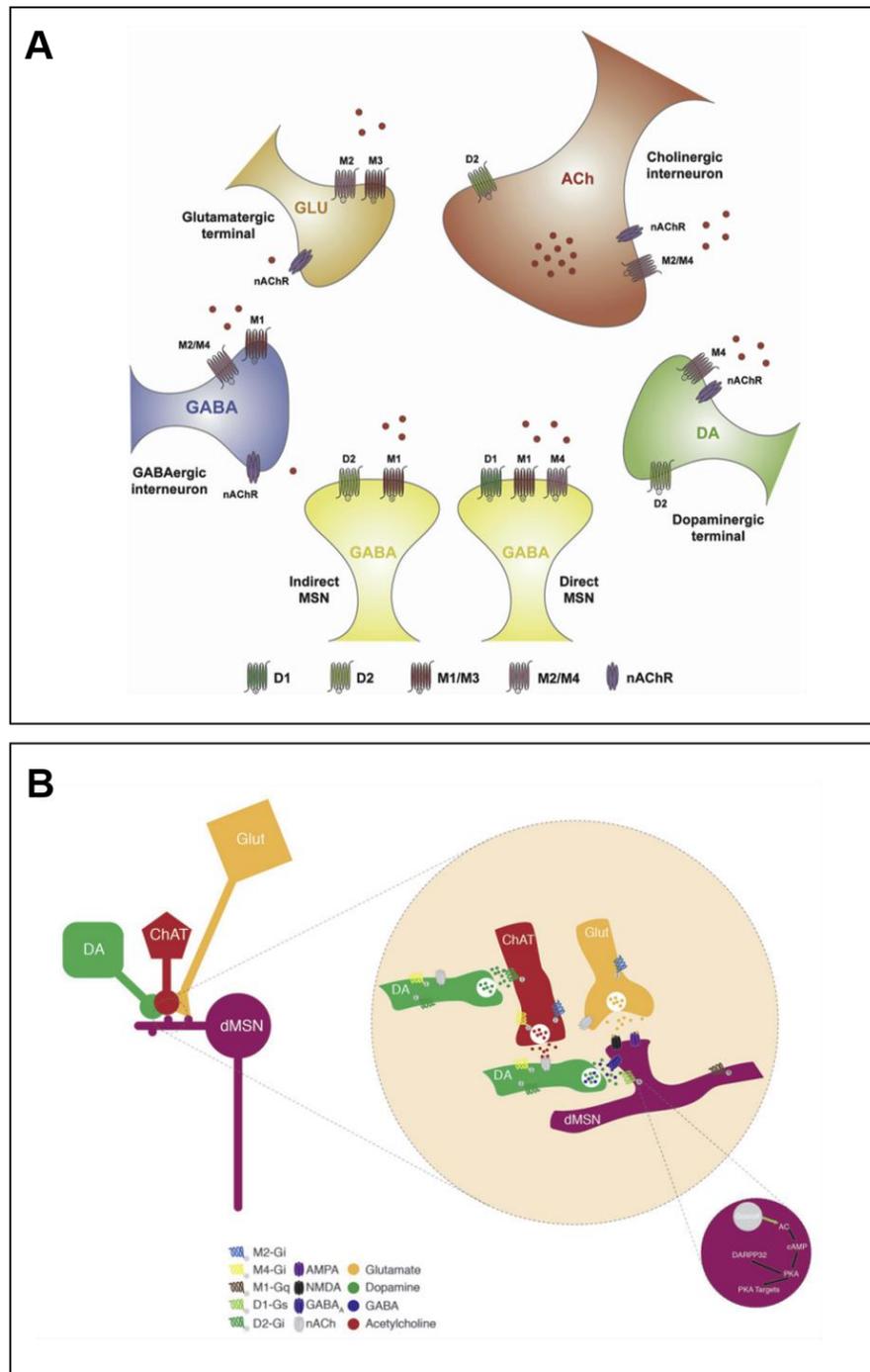


Figure 13 : Schéma simplifié de la modulation cholinergique des MSNs du striatum

(A) Modulation cholinergique de la microcircuiterie du striatum. Représentation simplifiée de l'interaction entre les différents types de neurones du striatum. L'illustration représente la distribution différentielle des récepteurs muscariniques (mAChR : M2/M4 sont inhibiteurs, M1/M3 sont activateurs) des récepteurs nicotiniens (nAChR) et des récepteurs dopaminergiques (D1 activateur, et D2 inhibiteur) dans le striatum. Abréviations : ACh, acétylcholine ; DA, dopamine ; GABA, Gamma-aminobutyric acid ; Glu, glutamate ; MSN, neurones épineux moyens. Source : Ztaou and Amalric, 2019. (B) La transmission, par les MSNs du striatum, des afférences glutamatergiques aux autres structures des ganglions de la base est modulée par la DA et l'ACh. Les afférences dopaminergiques sont modulées par l'ACh via les nAChR présynaptiques. Ce contrôle cholinergique est lui-même modulé par la DA via les D2R présynaptiques. Source : Rizzi and Tan, 2017

4. Métabolisme de la dopamine, le neurotransmetteur clé de la voie nigro-striée

a. Métabolisme de la dopamine

La DA est une monoamine appartenant à la famille des catécholamines, synthétisée à partir de la L-tyrosine. La L-tyrosine (noté « tyrosine » par la suite) est un acide aminé non essentiel, c'est-à-dire qu'il peut être synthétisé *de novo* par l'organisme à partir de la phénylalanine, mais est également apportée par l'alimentation (Hase et al., 2015; Vermeiren et al., 2020). La tyrosine est métabolisée en L-Dihydroxyphenylalanine (L-DOPA), le précurseur de la DA, par l'enzyme tyrosine hydroxylase (TH). Cette hydrolyse est régulée par la protéine tétrahydrobioptérine (BH4) qui agit comme un co-facteur de la TH (Meiser et al., 2013) (**Figure 14**). La conversion de la tyrosine en L-DOPA est l'étape limitante de la synthèse de DA (Juárez Olguín et al., 2016). Au niveau du striatum, la TH est majoritairement localisée au niveau des terminaisons axonales des neurones dopaminergiques provenant de la SNc (Carlsson et al., 2007). L'immunomarquage de la TH reflète les niveaux de DA dans le striatum et est utilisé pour identifier les neurones dopaminergiques dans la SNc (Carlsson et al., 2007; Kunzler et al., 2019). La L-Dopa est ensuite décarboxylée en DA par l'enzyme aromatique aminoacide décarboxylase (AADC), aussi appelée DOPA-décarboxylase (Meiser et al., 2013) (**Figure 14**). L'AADC est retrouvée majoritairement au niveau du striatum, dans les fibres dopaminergiques, mais également dans les fibres sérotoninergiques, les neurones striataux et les cellules gliales (Carlsson et al., 2007). La biosynthèse de la DA est donc réalisée en 2 étapes. Elle peut avoir lieu en périphérie et au niveau cérébral, puisque le tyrosine et la L-Dopa peuvent passer la BHE, ce qui n'est pas le cas de la DA (Goldstein, 2020; Juárez Olguín et al., 2016; Meiser et al., 2013) (**Figure 14**).

Les niveaux de DA intracellulaire et sa dynamique doivent-être finement régulés par l'organisme, un excès de DA, ou à l'inverse un défaut, entraînent une altération des fonctions motrices et émotionnelles régulées par ce neuromédiateur (Carlsson et al., 2007; Meiser et al., 2013; Obeso et al., 2008). La TH est régulée au niveau transcriptionnel et post transcriptionnel par des modifications covalentes ou des changements d'interaction protéine-protéine. Les catécholamines synthétisées *via* la TH peuvent entrer en compétition avec la BH4 pour se fixer à la TH et ainsi inhiber son activité (Meiser et al., 2013). Outre un turnover rapide de l'activité de la TH médié par des mécanismes de phosphorylation/déphosphorylation, la DA exerce un rétrocontrôle négatif sur sa propre synthèse. De plus la DA régule l'activité de l'AADC, de faibles taux de DA activent l'AADC tandis que des taux élevés l'inhibe (Meiser et al., 2013) (**Figure 14**).

Outre cette auto-régulation de la synthèse de DA, son expression est également régulée au

niveau synaptique. Lors de l'excitation des neurones dopaminergiques, leurs vésicules synaptiques libèrent la DA au niveau de la fente synaptique, qui interagit avec ses récepteurs post-synaptiques et ses auto-récepteurs (D2R) (Juárez Olguín et al., 2016). La DA ainsi libérée peut être soit recyclée (système de recapture) par les transporteurs de la DA (DAT) et stockée au niveau des vésicules synaptiques, soit dégradée (au niveau de la synapse ou des cellules gliales) (Meiser et al., 2013) (**Figure 14**).

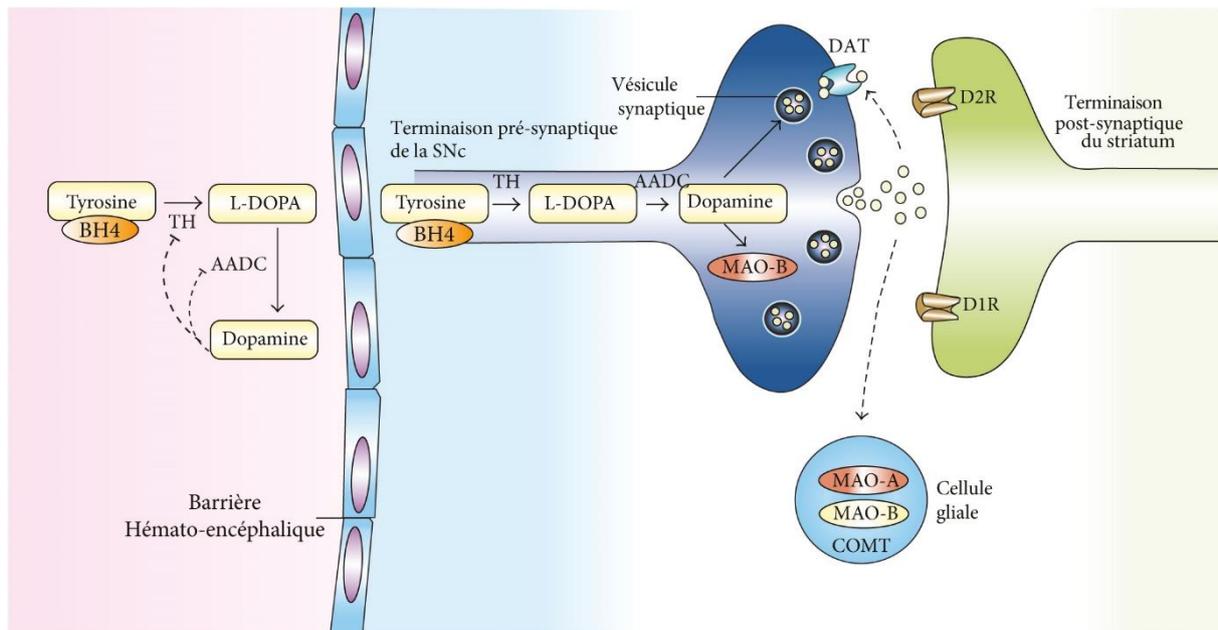


Figure 14 : Métabolisme de la dopamine

Abréviations : AADC, Aromatique Aminoacid Décarboxylase ; BH4, tétrahydrobioptérine ; COMT, Catéchol-O méthyltransférase ; DAT, Transporteur de la Dopamine ; D1R, Récepteur D1 à la Dopamine ; D2R, Récepteur D2 à la Dopamine ; L-DOPA, L-Dihydroxyphenylalanine ; MAO-A, Monoamine Oxydase A ; MAO-B, Monoamine Oxydase B ; TH, Tyrosine Hydroxylase ; SNc, Substance Noire *pars compacta* (Adapté de Juárez Olguín et al., 2016).

b. Voies de dégradation de la dopamine

La DA recaptée au niveau des synapses est transportée jusqu'au soma avant d'être dégradée par les monoamines oxydases (MAO). Il en existe 2 sortes, MAO-A et MAO-B, codées par 2 gènes différents. Elles sont localisées sur la membrane externe des mitochondries. Dans le cerveau, la MAO-A est essentiellement présente au niveau des astrocytes et des cellules gliales, tandis que la MAO-B est retrouvée dans les neurones cathécolaminergiques, tels que les neurones dopaminergiques de la SNc (Juárez Olguín et al., 2016). La déamination oxydative de la DA par les MAO produit du peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) et l'espèce réactive 3,4-dihydroxyphenyl-acétaldéhyde (DOPAL). Cet aldéhyde peut ensuite être oxydé en 3,4-

dihydroxyphenyl-acetic Acid (DOPAC) par une enzyme ALDH (également enzyme de synthèse de l'AR), ou alors être réduite en 3,4-dihydroxyphenyl-ethanol (DOPET) par une ADH (Juárez Olguín et al., 2016; Meiser et al., 2013) (**Figure 15**). Néanmoins en condition normale, c'est la voie de dégradation en DOPAC qui est privilégiée comparée à la formation de DOPET (Meiser et al., 2013). Le DOPAC est ensuite dégradé par la catéchol-O methyltransferase (COMT) donnant l'homovanilic acid (HVA) ; le produit final de dégradation de la DA. L'HVA est ensuite évacué du cerveau par le liquide céphalorachidien puis est éliminé par les urines (Juárez Olguín et al., 2016; Meiser et al., 2013) (**Figure 15**). Néanmoins, la COMT est présente dans les cellules gliales du système nerveux central, mais n'est pas détectée dans les neurones dopaminergiques de la SNc (Juárez Olguín et al., 2016). Cette étape finale de dégradation de la DA est donc réalisée en dehors des neurones dopaminergiques. Par ailleurs, lorsque la DA est absorbée par les cellules gliales entourant la fente synaptique, elle peut être dégradée directement par la COMT en 3-methoxytyramine (3-MT), puis par les MAO en HVA. Cette troisième voie de dégradation de la DA n'est mise en jeu que dans les cellules gliales du système nerveux central, le foie ou les reins, là où est exprimée la COMT (Meiser et al., 2013).

Maintenant que nous avons décrit les ganglions de la base, la voie nigro-striée et le métabolisme de la dopamine, nous allons décrire la physiopathologie de la maladie de Parkinson, en se focalisant sur la dégénérescence des neurones dopaminergiques.

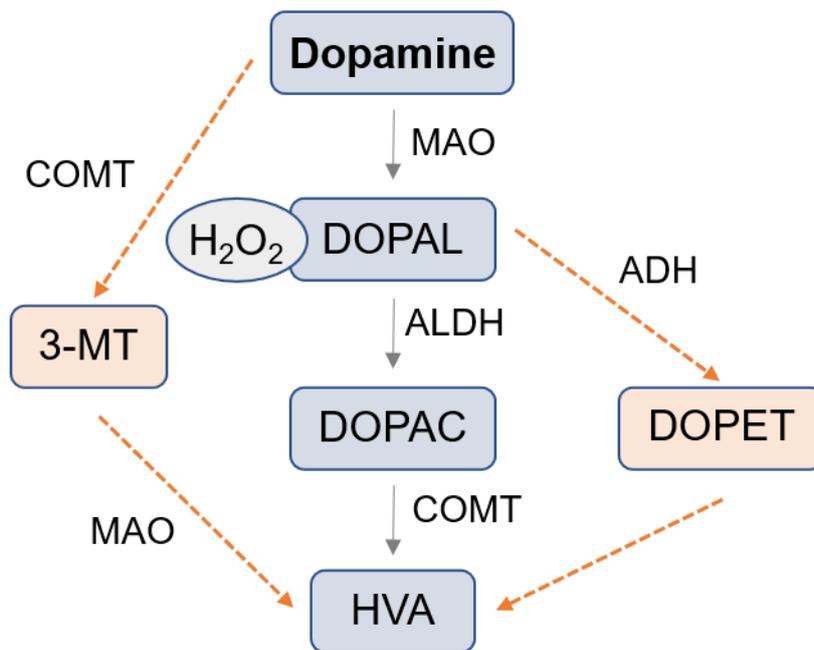


Figure 15 : Voies de dégradation de la dopamine

Les encadrés bleus et les flèches pleines représentent la voie de dégradation principale, les encadrés orange et les flèches en pointillés les voies annexes. Abréviations : ADH, Alcool Déshydrogénase ; ALDH, Aldéhyde-déshydrogénase ; COMT, Catéchol-O méthyltransférase ; DOPAC, 3,4-dihydroxyphenyl-acetic Acid ; DOPAL, 3,4-dihydroxyphenyl-acetaldehyde ; DOPET, 3,4-dihydroxyphenyl-ethanol ; HVA, Homovanilic Acid ; MAO, Monoamine Oxydase ; 3-MT, 3-methoxytyramine ; H₂O₂, peroxyde d'hydrogène.

II. Contexte et définition clinique de la maladie de Parkinson

1. La maladie de Parkinson en quelques chiffres

La maladie de Parkinson (MP) est une maladie neurodégénérative. Il existe des formes familiales ou héréditaires, causées par des mutations génétiques, et des formes sporadiques ou idiopathiques dont on ne connaît pas les causes exactes (Obeso et al., 2017). En 2020, le nombre de patients diagnostiqués avec la maladie de Parkinson a été estimé à plus de 9 millions à travers le monde (Maserejian et al., 2020) contre environ 6 millions en 2016 (Feigin et al., 2019), un chiffre qui a doublé au cours de ces 20 dernières années, en faisant la maladie neurologique avec la plus forte prévalence (c'est à dire le nombre de cas d'une maladie dans une population donnée à un moment donné) (Feigin et al., 2019; Santé publique France, 2018). En France, fin 2015 sa prévalence était estimée à 160 000 avec une incidence (c'est à dire le nombre de nouveaux cas issus d'une population donnée pendant une période donnée)

de 25 000 nouveaux cas par an (Santé publique France, 2018). Cette augmentation du nombre de patients parkinsoniens concerne essentiellement les formes idiopathiques de la maladie, les formes familiales ne représentant que 5-10 % des cas de Parkinson (Simon et al., 2020; Tysnes and Storstein, 2017). Dans la suite de ce manuscrit on s'intéressera essentiellement aux formes sporadiques de la MP.

La MP est caractérisée sur le plan clinique par des symptômes moteurs et non moteurs qui dégradent la qualité de vie des patients, aussi bien sur le plan personnel que professionnel (Varma et al., 2021). Les altérations motrices et cognitives inhérentes à l'évolution de la maladie entraînent une augmentation du risque de dépendance des patients, nécessitant une prise en charge globale (Raza et al., 2019). A ce jour, la MP est incurable, elle est inscrite sur la liste des affections de longue durée (ALD) et est donc prise en charge à 100 % par l'assurance maladie en France. Ainsi, le coût total de la prise en charge des patients parkinsoniens pour le régime général de l'assurance maladie est élevé (Lajugie et al., 2005). Par conséquent, l'augmentation de sa prévalence, sa gravité, associée à un impact majeur sur la qualité de vie des patients et des aidants, et son coût, font de cette maladie un enjeu socio-économique majeur.

Comme pour les autres maladies neurodégénératives, l'âge est le 1^{er} facteur de risque de la MP (Cacabelos, 2017; Collier et al., 2017). Elle touche environ 1 % des plus de 65 ans et 4-5 % des plus de 80 ans, avec un âge de diagnostic moyen à 50 ans (Opara et al., 2017; Vermeiren et al., 2020) (**Figure 16**). Les hommes sont 2 fois plus touchés que les femmes, bien que les femmes présentent une progression plus rapide de la maladie (Cerri et al., 2019; Jurado-Coronel et al., 2018). L'augmentation de la prévalence de la MP pourrait donc être en partie expliquée par le vieillissement général de la population, mais également par l'émergence de nouveaux outils diagnostiques (Tysnes and Storstein, 2017). Cependant le diagnostic de la MP reste difficile, notamment en raison de l'existence d'une phase prodromale et présymptomatique de la maladie qui entraîne généralement un retard au diagnostic, une sous-évaluation de l'incidence et une mauvaise prise en charge des patients (Reich and Savitt, 2019) (**Figure 16**). De par la diversité de ses symptômes, la MP est mieux décrite par le terme de syndrome parkinsonien. De plus, certains symptômes peuvent être causés par d'autres maladies (p.ex. la dégénérescence corticobasale et la maladie à corps de Lewy) ou par des infections médicamenteuses, entre autres (Alvarez et al., 2007), complexifiant encore le diagnostic de cette maladie.

2. Diagnostic et symptômes cliniques de la MP

Le diagnostic de la MP est clinique, il se base sur l'anamnèse (c'est à dire récit des antécédents médicaux), un diagnostic différentiel pour écarter les autres syndromes parkinsoniens, et la présence de symptômes cliniques caractéristiques (Armstrong and Okun, 2020; Zeuner and Berg, 2019). En effet, il n'existe pas à ce jour de biomarqueurs satisfaisants de la MP permettant de prédire son apparition ou de suivre son évolution (Alvarez et al., 2007; Miller and O'Callaghan, 2015) (**Figure 16**). Sur le plan clinique, la maladie est caractérisée par une triade de symptômes moteurs, ou symptômes cardinaux, comprenant une bradykinésie, des tremblements au repos et une rigidité musculaire (Obeso et al., 2017; Tysnes and Storstein, 2017) (**Figure 16**). La présence d'une bradykinésie associée à au moins un des trois symptômes cités précédemment est essentielle au diagnostic (Armstrong and Okun, 2020; Tysnes and Storstein, 2017). La bradykinésie correspond à un ralentissement de l'exécution du mouvement sans perte de la force musculaire, et est associée à une akinésie (c'est à dire une perte de l'initiation du mouvement) et une hypokinésie (c'est à dire une diminution de l'amplitude du mouvement) (Reich and Savitt, 2019). La sévérité des symptômes de la MP est définie selon quatre stades, allant du stade 1 avec une faible gêne dans la vie quotidienne et des signe unilatéraux, au stade 4 où le patient perd son autonomie et n'est plus capable de se déplacer (**Figure 16**). Pour estimer l'évolution de la maladie, l'échelle d'évaluation UPDRS (Unified Parkinson's Disease Rating Scale) est la plus communément utilisée (Chen et al., 2021; Raza et al., 2019). Par ailleurs, la MP est également caractérisée par des symptômes non moteurs, qui sont le plus souvent des symptômes prodromaux, puisqu'ils apparaissent en moyenne 10 ans avant les symptômes moteurs (Chaudhuri and Martinez-Martin, 2008; Chen et al., 2021; Gaenslen et al., 2011; Gonera et al., 1997). Parmi ces symptômes, les plus fréquents sont des troubles de l'olfaction, la constipation, des altérations du sommeil paradoxal ainsi que des symptômes dépressifs et d'anxiété (Armstrong and Okun, 2020; Obeso et al., 2017; Reich and Savitt, 2019) (**Figure 16**). Ils impactent autant, voire d'avantage, la qualité de vie des patients parkinsoniens, d'autant plus que les traitements actuels (L-DOPA et agonistes dopaminergiques) ne permettent pas de palier à ces symptômes (Chaudhuri and Martinez-Martin, 2008; Jurado-Coronel et al., 2018).

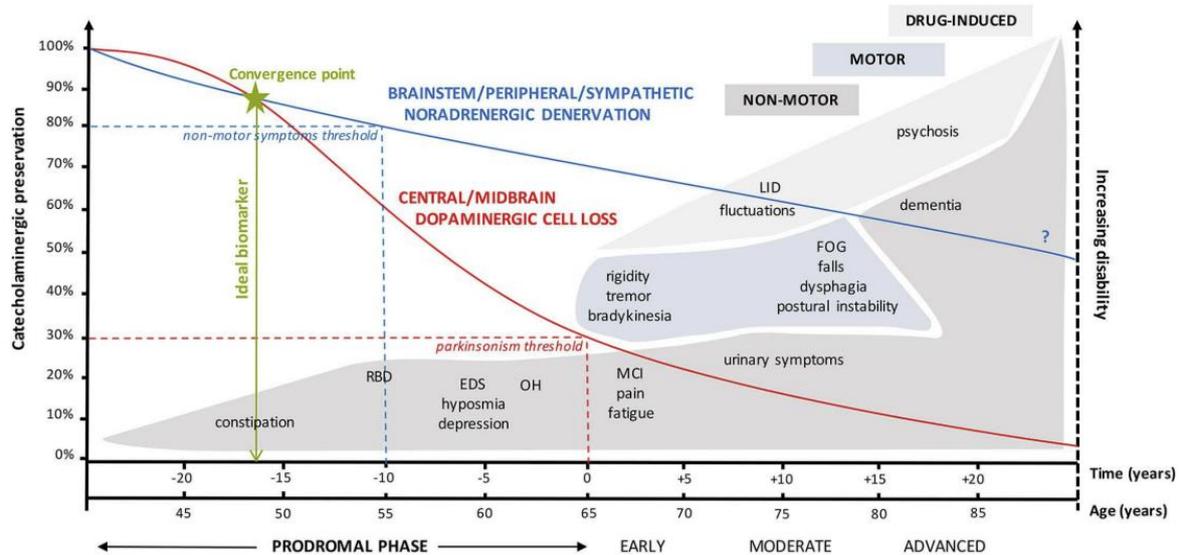


Figure 16 : Interconnections entre neurones DA, systèmes nerveux et progression de la MP

Représentation graphique des interconnexions complexes entre la perte des neurones dopaminergiques, les atteintes du système nerveux central et périphérique et la progression des symptômes moteurs et non moteurs durant les phases de la MP.

Outre la perte de DA associée aux symptômes moteurs de la MP, la dégénérescence des neurones catécholaminergiques induit également une perte drastique de noradrélanine (noradrénergique denervation) en particulier au niveau du cœur. Cette déficience du système sympathique noradrénergique est fortement corrélée à la perte des neurones DA de la SNc et est associée à l'apparition de différents symptômes prodromaux de la MP : choc neurogénique (OH), qui est la conséquence d'une altération du système nerveux sympathique et le tonus des vaisseaux sanguins ; des troubles cognitifs modérés (MCI) ; des altération du sommeil (RBD sleep behavior disorder) ; une hypersomnie (EDS excessive daytime sleepiness) ; une perte de l'odorat et une fatigue excessive (non représentés sur le graphique). Autres abréviations : FOG, freezing of gait (correspond à la difficulté d'initier le mouvement) ; LID, dyskinésies induites par la L-dopa. Note : Les symptômes « drug-induced » correspondent aux symptômes induits par la prise de médicaments antiparkinsoniens. Source : (Vermeiren et al., 2020).

Dans la suite de ce manuscrit nous traiterons essentiellement de la neurodégénérescence et des aspects moteurs de la MP.

III. Dégénérescence des neurones dopaminergiques dans la maladie de parkinson

1. Causes possibles de la dégénérescence dopaminergique

La principale caractéristique physiopathologique de la MP est la dégénérescence des neurones dopaminergiques de la SNc. Bien qu'on en connaisse les conséquences, les cascades de mécanismes qui conduisent à cette mort neuronale restent à définir.

a. L'agrégation d' α -synucléine et l'hypothèse de Braak dans l'étiologie de la MP

Le dépôt d'agrégats cytoplasmiques, formés par la protéine α -synucléine, et appelés corps de Lewy (LBs) sont une caractéristique histopathologique majeure de la MP (Horsager et al., 2020). La protéine α -synucléine est une petite (14 kDa) protéine neuronale, particulièrement présente au niveau des synapses, qui a la possibilité d'être transloquée au niveau nucléaire (Burré et al., 2018; Ghosh et al., 2017). Son rôle n'est pas encore bien défini, mais elle semble être impliquée dans la plasticité synaptique et la libération de neurotransmetteurs au niveau de la fente synaptique, et contribue à la neurotransmission dopaminergique. En effet l' α -synucléine participe à la régulation de la synthèse de DA en inhibant la TH, mais également DAT, limitant ainsi la recapture de la DA présente dans la fente synaptique (Ghosh et al., 2017; Wersinger and Sidhu, 2003). Il a également été montré que l' α -synucléine est une protéine capable de se lier aux lipides, notamment l'AR (Davidi et al., 2020). *In vivo*, la protéine α -synucléine existe en équilibre sous deux conformations, une forme dépliée soluble, et une forme partiellement repliée permettant sa liaison aux membranes. De par sa composition en acides aminés, les monomères d' α -synucléine peuvent s'agréger entre eux lorsque la protéine subit une dénaturation partielle. Ces agrégats protéiques peuvent ensuite s'oligomériser de façon ordonnée en formant des filaments d' α -synucléine qui s'organisent en structures parallèles, appelées proto-fibrilles. Ces proto-fibrilles s'agrègent et forment des fibrilles de type amyloïde d' α -synucléine, qui elles sont insolubles (Burré et al., 2018; Uchihara and Giasson, 2016). Dans le cas de la MP, et plus largement des maladies à corps de Lewy et les synucléinopathies, il y a un déséquilibre de ces deux formes en faveur de l'agrégation de l' α -synucléine conduisant à la formation des LBs observés dans le cerveau des patients parkinsoniens (Van Den Berge et al., 2019).

Le lien entre les LBs et la mort des neurones dopaminergiques a été mis en évidence avec la découverte des mutations du gène SNCA codant pour l' α -synucléine, notamment la mutation A53T, dont la présence conduit à elle seule au développement de la MP (Bourdenx et al., 2015a). Outre l'effet délétère de sa forme agrégée, des études ont montré une corrélation

entre l'augmentation de la quantité d' α -synucléine et la sévérité des symptômes cliniques (Bourdenx et al., 2015a). La toxicité des oligomères d' α -synucléine viendrait de leur capacité accrue de liaison aux membranes, perturbant leur perméabilité et permettant ainsi l'entrée d'organites qui contribuent à une augmentation du stress oxydatif dans les neurones dopaminergiques. Cependant des études *in vitro* et *in vivo* récentes suggèrent que les oligomères d' α -synucléine formés aux débuts de l'agrégation auraient un potentiel neurotoxique plus élevés que les fibrilles amyloïdes, le dernier stade de l'agrégation protéique (Ghosh et al., 2017). Ces études sous-tendent l'hypothèse d'une propagation de type prion des agrégats d'alpha synucléine ; c.-à.d. les fibrilles d' α -synucléine pourraient rentrer dans les cellules adjacentes et induire l'agrégation de l' α -synucléine présente dans cette cellule sous forme de fibrilles (Bourdenx et al., 2015a; Ghosh et al., 2017; Van Den Berge et al., 2019). Ce mode de transmission est en accord avec l'hypothèse formulée par Heiko Braak en 2003, selon laquelle la propagation de la maladie de Parkinson suivrait une progression caudo-rostrale corrélée à la progression des agrégats d' α -synucléine (Braak et al., 2003). Selon l'hypothèse de Braak la progression de la MP serait divisée en 5 stades, les inclusions cytoplasmiques d' α -synucléine débuteraient dans les bulbes olfactifs ou le noyau dorsal du nerf vague, passeraient par l'intestin, avant d'atteindre les neurones dopaminergiques de la SNc au 3e stade. La découverte, par imagerie *in vivo*, d'atteinte du système nerveux sympathique et parasympathique chez des patients présentant des syndromes prodromaux de la MP sans atteinte majeure de la SNc soutient cette hypothèse (Van Den Berge et al., 2019). Néanmoins cette hypothèse reste controversée et bien que l'on reconnaisse l'existence d'une voie de communication entre le système intestinal et le cerveau par le nerf vague pour la propagation de l' α -synucléine, il n'y a pas de certitude concernant son origine, est-ce que le point de départ est le cerveau ou bien l'intestin ? Il est possible que le pattern de propagation varie d'un patient à l'autre (Arotcarena et al., 2020; Horsager et al., 2020).

Plusieurs systèmes de dégradation protéolytiques sont impliqués dans la dégradation de l' α -synucléine. Parmi eux, le système ubiquitine-protéasome, qui contribue à la dégradation des formes solubles d' α -synucléine et la voie d'autophagie lysosomale qui dégrade les oligomères d' α -synucléine par l'intermédiaire d'hydrolases présentes dans les lysosomes (Rocha et al., 2018). Un dysfonctionnement du système lysosomal favorise l'accumulation d'agrégats d' α -synucléine augmentant ainsi la dégradation des neurones dopaminergiques. Il a été montré qu'une mutation du gène GBA1 codant pour l'hydrolase lysosomale β -glucocerebrosidase (GCCase) augmente de 7 % la probabilité de développer la MP (Sidransky et al., 2009). Par ailleurs, comme dit précédemment, l'accumulation d' α -synucléine induit une dégradation des membranes, incluant celles des lysosomes, favorisant ainsi son accumulation et la mort des neurones dopaminergiques (Ghosh et al., 2017).

b. Le rôle du stress oxydatif dans la dégénérescence des neurones dopaminergiques :
L'hypothèse des catécholaldéhydes

Plusieurs hypothèses ont été formulées pour expliquer les causes de la dégénérescence des neurones dopaminergiques, mais toutes mettent en avant l'augmentation de stress oxydatif. Par exemple pour l' α -synucléine, ce n'est pas la formation de fibrilles en tant que tel qui est délétère mais ses conséquences (p.ex. altération de la fonction mitochondriale, de la recapture de la DA, de l'intégrité des membranes dont celle des lysosomes) qui conduisent toutes à un stress oxydatif important pour la cellule.

Le stress oxydatif est défini comme un déséquilibre entre les niveaux d'espèces réactives de l'oxygène (ROS), aussi appelées radicaux libres, et la capacité de l'organisme à les éliminer (détoxification de l'organisme), ce qui conduit à des dommages morphologiques et fonctionnels des cellules et finalement à leur mort (Dias et al., 2013). Il existe de nombreuses voies de production des ROS, soit de façon directe par l'interaction d'espèces redox et d'espèces de l'oxygène, soit de façon indirecte impliquant l'activation d'enzymes telles que l'oxyde nitrique synthase (NOS) et la NADPH oxydase. Les ROS les plus connues sont le superoxyde anion radical (O_2^{2-}), le radical hydroxyl ($HO\cdot$) et le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2). L' H_2O_2 est notamment produit par la membrane mitochondriale et par les peroxysomes, les peroxysomes prenant en charge à la fois la synthèse et la dégradation de l' H_2O_2 (Dias et al., 2013).

Le métabolisme oxydatif de la mitochondrie pour produire de l'énergie est l'un des plus gros producteurs de ROS de l'organisme, toute mutation, ou facteur impactant son fonctionnement risque de conduire à une augmentation de la production de ROS et donc du stress oxydatif (Islam, 2017). La production d'adénosine triphosphate (ATP) par la chaîne respiratoire mitochondriale, constituée de 4 complexes (complexe I, II, III et IV) et sa phosphorylation oxydative représente la première source d'énergie pour la cellule (Subramaniam and Chesselet, 2013). Depuis de nombreuses années, un dysfonctionnement de la chaîne mitochondriale, en particulier du complexe I, est associé à une augmentation du risque de développer la MP ; un défaut de l'activité du complexe I étant détecté dans le striatum de patients parkinsoniens (Mizuno et al., 1989). Par ailleurs, plusieurs gènes dont les mutations sont responsables des formes familiales de la MP sont associés à des dysfonctionnements mitochondriaux (**voir partie IV**) (Subramaniam and Chesselet, 2013). La dynamique mitochondriale, incluant la fusion mitochondriale, la fission, le transport des électrons dans sa chaîne respiratoire, et la mitophagie, est essentielle à la survie de la cellule. L'accumulation d' α -synucléine perturbe cette dynamique mitochondriale (Bose and Beal, 2016). L' α -

synucléine possède une séquence d'adressage mitochondrial et son accumulation au niveau de la membrane externe des mitochondries, ou dans la matrice, perturbe l'intégrité de ces membranes, les mécanismes de fusion ainsi que le fonctionnement des complexes mitochondriaux, induisant une augmentation de la production de ROS (Rocha et al., 2018). Enfin, la mitochondrie est également essentielle au maintien de l'intégrité du système lysosomal, cité précédemment (Rocha et al., 2018). Un dysfonctionnement mitochondrial induit donc non seulement une augmentation de la production de ROS, mais favorise également l'accumulation et l'agrégation d' α -synucléine ; l'ensemble favorisant la mort des neurones dopaminergiques et le développement de la MP.

Le cerveau consomme environ 20 % des ressources de l'organisme en oxygène et en glucose pour son fonctionnement normal, ce qui l'expose tout particulièrement aux conséquences du métabolisme oxydatif de l'énergie par la chaîne mitochondriale (Meiser et al., 2013). La forte activité des neurones DA dans le cerveau les rend particulièrement vulnérables à ce stress oxydatif induit lors de la production d'énergie. Par ailleurs avec l'âge on observe une diminution des protéines antioxydantes endogènes, telles que la superoxyde dismutase (SOD), la catalase (CAT), la glutathione (GSH) et la glutathione peroxydase (GPx), conduisant à une diminution des capacités de détoxification de l'organisme (Collier et al., 2017; Islam, 2017). Dans ce contexte les neurones dopaminergiques de la SNc sont donc plus sensibles aux ROS présentes naturellement, ce qui conforte l'âge comme premier facteur de risque de la MP (Cacabelos, 2017; Collier et al., 2017; Dias et al., 2013).

Enfin, une autre source de production des ROS dans le cerveau est le métabolisme de la dopamine. Outre l'agrégation d' α -synucléine, un des acteurs principaux de la perte des neurones dopaminergiques serait le métabolisme de la DA lui-même. En effet, la DA a la capacité de s'auto-oxyder en formant des quinones (molécules instables), ce qui libère des ROS et augmente le stress oxydatif dans les neurones dopaminergiques (Juárez Olguín et al., 2016) (**Figure 17**). Par ailleurs la DA oxydée ainsi produite (DA-Quinone) peut non seulement interagir avec la protéine α -synucléine, l'oxyder et ainsi favoriser son agrégation, mais également inhiber les complexes I et II de la chaîne mitochondriale de façon dose dépendante, favorisant ainsi la mort des neurones dopaminergiques (Goldstein, 2020; Subramaniam and Chesselet, 2013) (**Figure 17**). Ces phénomènes renforcent la nécessité de contrôler les taux de DA par l'organisme.

Cependant le métabolisme oxydatif de la DA médié par les MAO au niveau de la membrane des mitochondries génère lui aussi des ROS, sous la forme d' H_2O_2 , et du DOPAL. Le DOPAL est toxique pour les neurones dopaminergiques, il réagit avec l' H_2O_2 produit lors de sa synthèse et induit une peroxydation lipidique qui modifie la perméabilité de la membrane

mitochondriale (Goldstein, 2020) (**Figure 17**). De plus, la peroxydation lipidique induite par le DOPAL conduit à la production de 4-hydroxy nonenal, une molécule qui inhibe l'activité de l'ALDH, l'enzyme responsable de la dégradation du DOPAL en DOPAC (et de la synthèse d'AR). Le DOPAL stimule donc sa propre formation, ce qui représente un premier cercle vicieux contribuant à la mort des neurones dopaminergiques (Wey et al., 2012) (**Figure 17**). De plus, le DOPAL est également capable d'interagir avec la protéine α -synucléine et de promouvoir son oligomérisation ; l'oxydation de l' α -synucléine modifie sa structure, ce qui favorise son agrégation (**Figure 17**). Les agrégats d' α -synucléine perturbant la recapture de la DA au niveau des vésicules synaptiques, la DA est préférentiellement dégradée au niveau cytoplasmique par les MAO, produisant ainsi plus de DOPAL ; Il y a donc là un deuxième cercle vicieux (Burke et al., 2008) (**Figure 17**). Ces observations constituent l'hypothèse des catécholaldéhydes pour expliquer la mort des neurones dopaminergiques (Casida et al., 2014; Fitzmaurice et al., 2013; Goldstein, 2020) (**Figure 17**) : la dégradation de la DA, en créant des ROS, serait elle-même impliquée dans la mort neuronale. Cette hypothèse est renforcée par l'étude sur modèle animaux de l'effet de l'injection de DOPAL dans la SNc de rats qui conduit à une diminution du nombre de neurones TH+ et des altérations comportementales (Panneton et al., 2010).

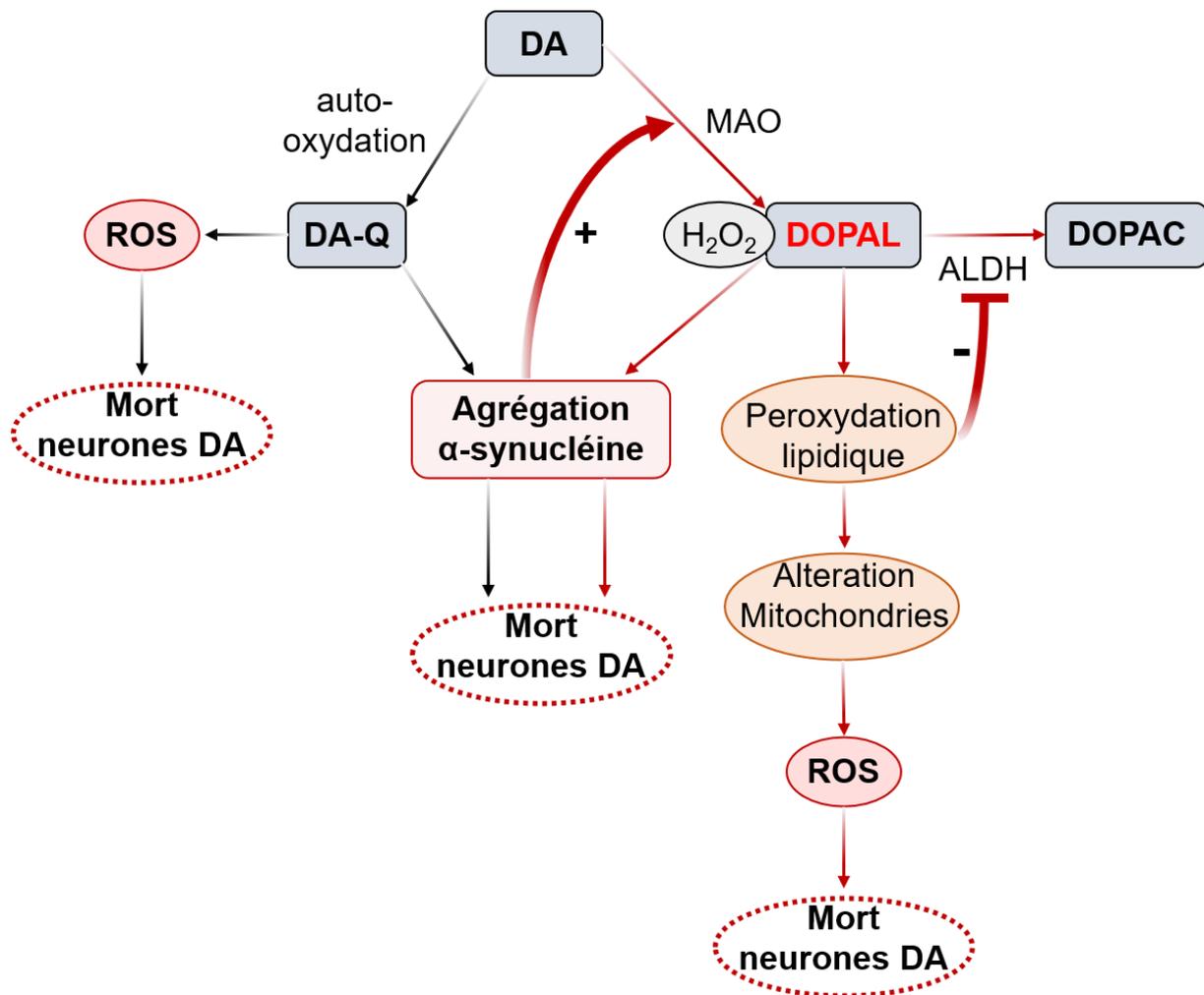


Figure 17 : Schéma représentant l'hypothèse des catécholaldéhydes

Les flèches en noires correspondent à la mort des neurones DA suite à l'auto-oxydation de la DA, les flèches en rouges correspondent à la mort des neurones induite par la production de DOPAL. Les flèches rouges plus épaisses correspondent aux mécanismes mis en jeu par le DOPAL pour stimuler sa propre formation et son accumulation toxique pour les neurones DA. Abréviations : ALDH, Aldéhyde-déshydrogénase ; DOPAC, 3,4-dihydroxyphenyl-acetic Acid ; DOPAL, 3,4-dihydroxyphenyl-acetaldehyde ; DA, Dopamine ; DA-Q, Dopamine-Quinone ; MAO, Monoamine Oxydase ; ROS, Espèces Réactives de l'Oxygène ; H₂O₂, peroxyde d'hydrogène.

En conclusion il est donc primordial de maintenir l'homéostasie des neurones dopaminergiques en limitant le stress oxydatif et en maintenant les taux de DA intracellulaire à un niveau contrôlé. Ce qui est encore mal compris est la variabilité au sein des neurones dopaminergiques : pourquoi certains dégénèrent-ils bien avant les autres ?

IV. Les facteurs de risques de la MP

1. Facteurs génétiques

La première mutation génétique causant la MP a été identifiée en 1997 dans le gène SNCA, codant pour l' α -synucléine. Actuellement, 27 gènes ont été identifiés comme porteurs de mutations, à transmission dominante ou récessive, à l'origine des formes familiales de la MP (Lunati et al., 2018). Parmi eux, les plus connus sont le gène LRRK2, qui code pour une protéine essentielle à l'homéostasie des cellules nerveuses, les gènes PARKIN et PINK1, impliqués dans le fonctionnement des mitochondries, et plus récemment DNAJC6, qui joue un rôle dans la transmission synaptique (Kim and Alcalay, 2017; Lunati et al., 2018).

Durant les 20 dernières années, l'identification croissante de gènes impliqués dans l'étiologie de la MP a renforcé l'idée de facteurs génétiques prédisposants à la dégénérescence des neurones dopaminergiques.

Ces découvertes ont été grandement facilitées par l'amélioration des moyens de séquençage du génome et des exomes des individus. Les études de génome entier ont mis en évidence plus de 100 polymorphismes génétiques associés à la maladie de Parkinson, mais parmi eux seul une quarantaine de variants ont été décrits comme augmentant réellement le risque de développer la MP (Nalls et al., 2019). Parmi ces gènes on peut citer les gènes codant pour la SOD (protéine anti-oxydante). Une étude clinique examinant le polymorphisme de ce gène chez 356 patients parkinsoniens comparés à 370 cas sains, a montré qu'un polymorphisme nucléotidique dans les gènes codant pour SOD1 et SOD2 était associé à une augmentation du risque de développer la MP (Chunlei Liu et al., 2019). Ces résultats sont cohérents avec l'implication de cette protéine dans l'élimination des ROS. Des variants du gène GBA (Glucocerebrosidase), dont la mutation altère le stockage lysosomal, et du gène KAT8 (lysine acetyltransferase 8), impliqués dans le processus d'autophagie, ont également été mis en évidence (Billingsley et al., 2018; Delamarre and Meissner, 2017), montrant une fois de plus le rôle du stress oxydatif dans l'étiologie de cette maladie.

Les gènes impliqués dans le développement et la différenciation des neurones dopaminergiques ont également été étudiés. Parmi eux les gènes codant pour les facteurs de transcription PITX3 (Paired Like Homeodomain 3) et le récepteur nucléaire orphelin NURR1 (Nuclear receptor related 1, aussi connu sous le nom de NR4A2) ont été particulièrement étudiés. Ils jouent un rôle primordial dans le développement mais également la survie à l'âge adulte des neurones dopaminergiques, notamment en régulant l'activité de la TH, DAT et AADC (Dong et al., 2016; Hegarty et al., 2013; Le et al., 2015). De plus ils agissent en coopération, PITX3 permettant l'activation de NURR1 (Li et al., 2009). Une diminution de leur expression a été observée dans le cerveau, non seulement de patients parkinsoniens, en

particulier dans les neurones dopaminergiques restants et contenant des LBs, mais également dans des modèles animaux de la MP (Jankovic et al., 2005; Li et al., 2009). Enfin, plusieurs variants génétiques dans les gènes codants pour ces facteurs de transcription ont été associés à une prédisposition pour le développement de la MP (Fuchs et al., 2009; Lou and Liao, 2012). Un polymorphisme génétique du gène codant pour ALDH1A1 (synthèse d'AR) est également un facteur de risque de la MP et sera détaillé plus loin (**Chapitre 3**).

Contrairement aux mutations des gènes impliqués dans le développement des formes familiales de la MP, un seul variant génétique, identifié comme facteur de risque ne suffit pas pour développer la maladie. Néanmoins, il existe des interactions complexes entre l'exposition environnementale, les habitudes et la génétique. A titre d'exemple, il a été montré que la présence du variant Rep1 du gène de l' α -synucléine chez les patients ayant subi des traumatismes crâniens multiplie par 2 le risque de développer la MP chez ces patients comparés à ceux ne présentant pas ce variant (Goldman et al., 2012; Jafari et al., 2013). L'association d'un facteur de risque environnemental et d'une ou plusieurs prédispositions génétiques augmente de manière synergique le risque de développer la MP.

2. Facteurs environnementaux

Les maladies neurodégénératives sont particulièrement sensibles aux facteurs environnementaux et aux modes de vie, puisque comme leur nom l'indique, ce sont des maladies évolutives.

Le facteur de risque environnemental le plus connu et le plus étudié pour la MP est l'exposition aux pesticides (**Figure 18**). Ainsi un mode de vie rural, une activité professionnelle dans le domaine de l'agriculture et la consommation d'eau de puits, ont été associés à une augmentation de cas de MP dans ces population (Obeso et al., 2017). En France particulièrement, il a été montré que l'incidence de la MP était plus élevée chez les agriculteurs (Ascherio and Schwarzschild, 2016; Santé publique France, 2018). Parmi les pesticides connus on retrouve la roténone (qui inhibe aussi l'ALDH), un analogue de la neurotoxine MPTP (1-méthyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine) et le diethyldithiocarbamate (DDC), qui induisent une augmentation de l'agrégation d' α -synucléine (Bourdenx et al., 2015a; Goldman, 2014) et un dysfonctionnement de la chaîne mitochondriale (Subramaniam and Chesselet, 2013). L'oligomérisation de l' α -synucléine est également induite en cas d'exposition aux métaux lourds, notamment le plomb, le fer, le mercure et le zinc qui constituent donc des facteurs de risques pour la MP (**Figure 18**). De plus il a été montré un changement d'expression des ions ferriques au niveau de la SNc de patients parkinsoniens, avec une augmentation de l'expression de l'ion Fe^{3+} (Bourdenx et al., 2015a; Gorell et al., 1999; Uversky et al., 2001).

En parallèle de l'exposition aux pesticides, d'autres agents chimiques présents dans notre quotidien ont été associés au risque de développer une MP. Parmi eux on retrouve les solvants chlorés, présents dans les produits de nettoyage à sec et les textiles contenant de la viscose, ainsi que les biphényles polychlorés, utilisés comme réfrigérants et lubrifiants (Furlong et al., 2015; Goldman, 2014) (**Figure 18**). Malheureusement, même si beaucoup de ces molécules ont été bannies de la composition des produits aujourd'hui, ces solvants restent présents dans les nappes phréatiques et le sol.

Il est à noter que certaines habitudes de consommation, comme celles de nicotine et de caféine, agissent comme des facteurs protecteurs contre le développement de la MP. Cet effet protecteur est dose dépendant, et est médié par un effet antagoniste de ces substances sur le récepteur A2 de l'adénosine. Ce dernier forme des hétérodimères avec les D2R et inhibe sa signalisation (Goldman, 2014). Par ailleurs, la pratique d'activité physique et la consommation de certains régimes alimentaires (régimes méditerranéens, riche en fruits et en légumes) permettent de ralentir la progression des symptômes moteurs (Obeso et al., 2017; Włodarek, 2019) (**Figure 18**).

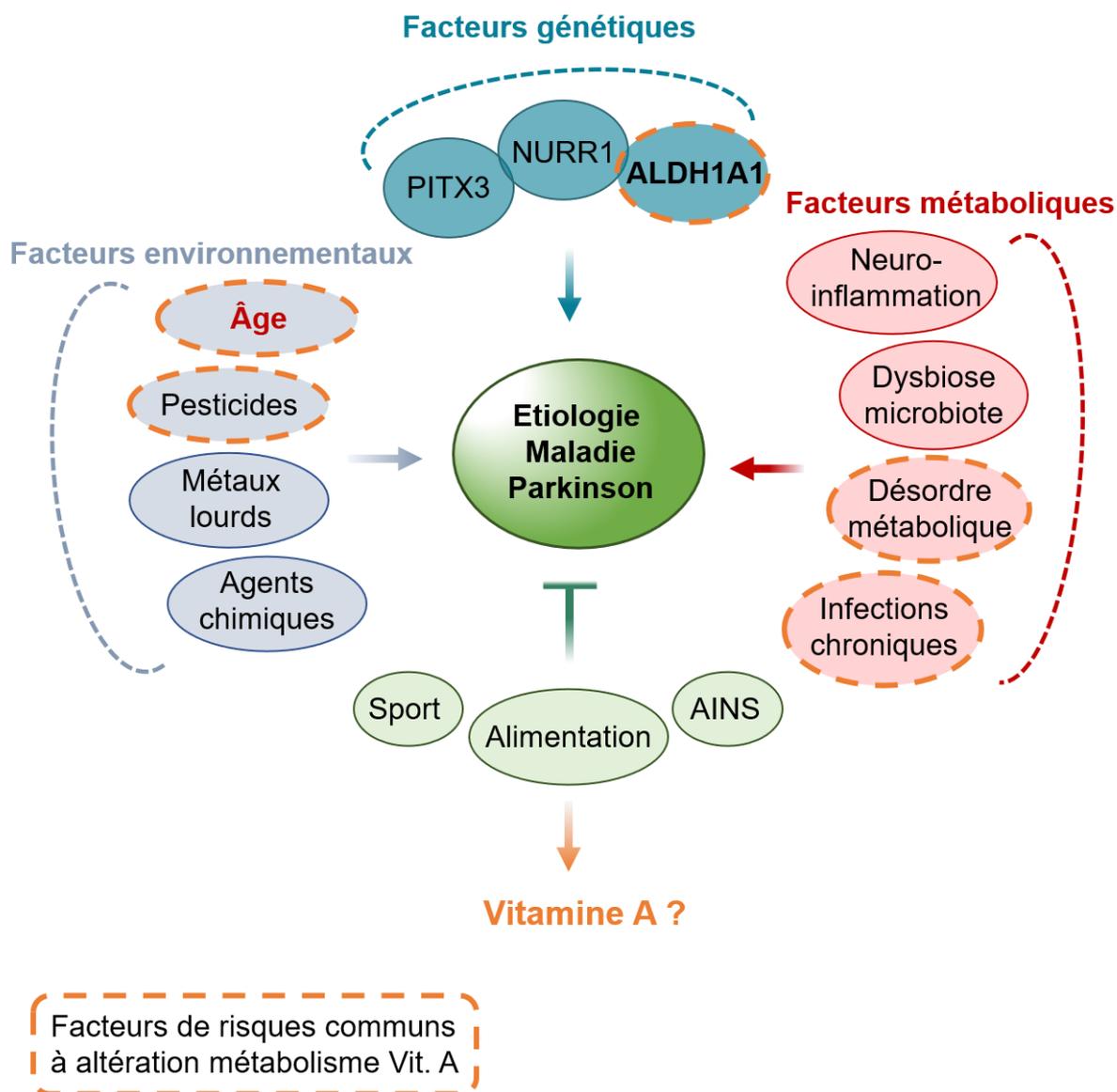


Figure 18 : Schéma représentant les facteurs influençant l'étiologie de la MP

Les flèches représentent les facteurs de risque, la barre les facteurs protecteurs. Abréviations : AINS, anti-inflammatoires non stéroïdiens ; ALDH1A1, aldéhyde-déshydrogénases 1 sous-type A1, NURR1, Nuclear receptor related 1, PITX3, Paired Like Homeodomain 3 ; Vit.A, vitamine A.

3. Facteurs métaboliques

Comme pour les facteurs de risques de l'altération du métabolisme de la vitamine A (**Chapitre 1**) on peut identifier des facteurs de risques métaboliques des facteurs environnementaux favorisant le développement de la MP.

La neuroinflammation est à la fois une conséquence de la mort des neurones mais peut également y contribuer (Ransohoff, 2016) (**Figure 18**). La neuroinflammation apparaît aux

stades précoces du développement de la MP, et est notamment caractérisée par des modifications morphologiques des cellules gliales, incluant les astrocytes et les microglies (Ransohoff, 2016). Les microglies sont des cellules phagocytaires du système immunitaire du cerveau, qui s'activent lorsque le système immunitaire est mis en jeu. La microglie a un rôle neuroprotecteur, *via* l'élimination des substance endogènes et exogènes ainsi que la production de GSH et de glutathione peroxydase pour le catabolisme du H₂O₂ (Kieburz and Wunderle, 2013). Cependant son activation induit également la production de cytokines, de ROS et de NOS, induisant une augmentation du stress oxydatif (Dias et al., 2013). Cet effet est d'autant plus prononcé au niveau de la SNc, qu'elle contient d'avantage de cellules microgliales comparée aux autres structures du système nerveux central (Whitton, 2007). La production de ces cytokines contribue au maintien de l'activation des microglies et à l'activation du système immunitaire (Goldman, 2014). L'autopsie de cerveaux de patients parkinsoniens a mis en évidence une augmentation des taux de microglies activées et de lymphocytes T, ainsi que des marqueurs pro-inflammatoires comme IL-2, IL-1 β et TNF α (Dias et al., 2013; Whitton, 2007). Par ailleurs les inflammasomes, un complexe protéique du système immunitaire constitué en réponse à des signaux inflammatoires, sont particulièrement présents dans les cellules microgliales. Il a été montré que leur activation, médiée par la protéine NLRP3 (NLR family, pyrin domain containing 3) contribue au développement de la MP chez l'Homme, et l'inhibition de NLRP3 dans des modèles animaux de la MP a montré des effets bénéfiques et une diminution de la sécrétion d'IL-1 β (Han et al., 2019). Compte tenu de l'interaction entre le système immunitaire et le système nerveux central, une inflammation chronique ou toute autre altération du système immunitaire (tel que les cancers) constitue un facteur de risque de développer la MP (Ascherio and Schwarzschild, 2016) (**Figure 18**). A l'inverse la consommation d'anti-inflammatoires non stéroïdiens (comme l'ibuprofène[®]) est considérée comme un facteur protecteur contre le développement de la MP (Delamarre and Meissner, 2017; Kieburz and Wunderle, 2013) (**Figure 18**).

Plusieurs facteurs de risques de la MP, tels que le stress oxydatif, le mode de vie, les infections, sont communs aux facteurs entraînant une dysbiose du microbiote intestinal. Ces observations, associées à la communication bi-directionnelle entre le système nerveux central et le système nerveux entérique renforcent l'hypothèse d'un lien de causalité entre une altération du microbiote et la probabilité de développer la MP (Lorente-Picón and Laguna, 2021; Rolli-Derkinderen et al., 2020) (**Figure 18**). Par ailleurs, il a été montré chez des souris surexprimant l' α -synucléine, que le transplant de microbiote provenant de patients parkinsoniens augmente les déficits moteurs chez ces souris comparé à la greffe de microbiote provenant de patients sains (Lorente-Picón and Laguna, 2021). L'injection intrastriatale de 6-

hydroxydopamine, utilisée pour modéliser la MP, a montré que le métabolisme hépatique pouvait également être affecté, avec un dysfonctionnement mitochondrial et une augmentation de la production de ROS et de cytokines pro-inflammatoires dans le foie 8 semaines après l'injection (Vairetti et al., 2012). Outre l'état inflammatoire de l'intestin, des désordres métaboliques (p.ex. le diabète, l'obésité, l'hypercholestérolémie) contribuent également à la progression de la MP (Ascherio and Schwarzschild, 2016; Delamarre and Meissner, 2017; Goldman, 2014) (**Figure 18**).

Ces exemples non exhaustifs des facteurs de risques mettent en évidence l'origine multifactorielle de la MP et l'importance d'identifier ces facteurs de risques pour agir en amont de la dégénérescence des neurones dopaminergiques et prévenir le développement de la maladie.

V. Traitements et pistes thérapeutiques de la MP

1. Les traitements actuels de la MP

Les traitements pharmacologiques actuels pour traiter les symptômes moteurs de la MP consistent en l'administration d'agonistes de la DA, de ses précurseurs ou d'inhibiteurs de son catabolisme. Le plus couramment utilisé est l'administration orale de L-DOPA, le précurseur de la DA, associé à la carbidopa, un inhibiteur de l'AADC, l'enzyme de conversion de la L-DOPA en DA (Armstrong and Okun, 2020; Obeso et al., 2017). A l'inverse de la L-DOPA, la carbidopa ne peut pas passer la BHE, elle permet donc de limiter le catabolisme de la L-DOPA en périphérie et favorise sa conversion en DA au niveau du système nerveux central (Reich and Savitt, 2019). A l'initiation du traitement, la L-DOPA est administrée 3 fois par jour, mais avec le temps il est nécessaire d'augmenter les doses et leurs fréquences, conduisant à l'apparition progressive de troubles intestinaux, psychotiques et de dyskinésies (c.-à.-d. mouvements involontaires et désordonnés) (Armstrong and Okun, 2020; Reich and Savitt, 2019). Les dyskinésies empêchent la réalisation de tâches simples du quotidien et sont particulièrement délétères pour la qualité de vie des patients et des aidants. Des agonistes dopaminergiques ont également été développés, comme l'aripiprazole[®], un agoniste partiel du D2R (et du récepteur sérotoninergique 5-HT1a, rôle antipsychotique) et l'apomorphine[®], stimulant les récepteurs D1R et D2R. Néanmoins, ces agonistes dopaminergiques ont une efficacité moindre que la L-DOPA sur les symptômes moteurs. Ils sont généralement utilisés avant, ou en complément de l'administration de L-DOPA pour retarder l'apparition des dyskinésies associées. Le troisième type de molécules utilisées sont les antagonistes des

MAO, pour limiter la dégradation de la DA endogène restante ou de celle synthétisée à partir de la L-DOPA pharmacologique. Cependant, en limitant la dégradation de la DA ils favorisent son auto-oxydation et le déséquilibre de signalisation dans les ganglions de la base, contribuant également sur le long terme à la dégénérescence des neurones dopaminergiques et une aggravation des symptômes moteurs après une courte période d'amélioration (Armstrong and Okun, 2020; Connolly and Lang, 2014; Reich and Savitt, 2019). Le traitement par stimulation cérébrale profonde du NST ou du GPi médiée par l'implant d'électrodes peut être proposé aux patients pour lesquels les traitements pharmacologiques n'ont pas d'effets probants. Cependant ce traitement qui ne concerne que 5-10 % des patients parkinsoniens, nécessite une chirurgie lourde et n'est pas toujours efficace (Reich and Savitt, 2019).

Bien que des progrès aient été faits dans la formulation de ces médicaments pour permettre une délivrance des molécules plus prolongée, aucun ne permet de mimer la libération finement contrôlée de DA au niveau cérébrale en conditions physiologiques. En effet l'administration de doses élevées d'agonistes ou de précurseurs dopaminergiques contourne les systèmes d'autorégulation des taux de DA intracellulaire cités précédemment (voir **partie II.**). De plus, l'administration sporadique de doses élevées de DA perturbe la plasticité synaptique et la signalisation médiée par les structures des ganglions de la base et induit des adaptations qui peuvent être délétères. On observe notamment une diminution de la répression médiée par le GPi et la SNr sur le thalamus et donc une augmentation des projections excitatrices vers le cortex, qui expliqueraient les dyskinésies observées (Obeso et al., 2008).

Par ailleurs la L-DOPA absorbée consécutivement à la prise de médicaments par voie orale ne pénètre pas uniquement dans les neurones dopaminergiques de la SNc, elle est également retrouvée au niveau des neurones sérotoninergiques, ce qui favorise l'apparition des troubles psychotiques observés lors des traitements anti-parkinsoniens. Pour pallier à cet effet, une piste prometteuse est l'administration des molécules encapsulées dans des vésicules extracellulaires comme des nanoparticules avec un système d'adressage spécifique leur permettant de passer la BHE et d'être délivrée uniquement à l'endroit voulu (Vermeiren et al., 2020). Cependant, la temporalité et la dynamique de libération de la DA ne sont pas non plus contrôlées par ces nanoparticules.

L'un des principaux enjeux dans l'application de ces traitements est donc de définir à quel moment de la maladie les mettre en place. Malgré les nombreux travaux de recherche, la MP reste à ce jour incurable, les traitements précités sont seulement symptomatiques puisqu'ils ne préviennent pas la dégénérescence des neurones dopaminergiques, et contribuent sur le long-terme à une aggravation des symptômes.

2. Les pistes thérapeutiques pour prévenir le développement de la MP

Les traitements cités ci-dessus ne sont mis en place qu'à l'apparition des symptômes moteurs de la MP, c.-à.d. quand 2/3 des neurones dopaminergiques ont déjà dégénéré. Par conséquent ils ne permettent ni de prévenir la neurodégénérescence, et donc le ralentissement de la progression de la maladie, ni de la guérir ; ils sont donc assimilables à des traitements palliatifs. C'est pourquoi il est primordial de trouver des stratégies permettant de ralentir, si ce n'est prévenir, cette neurodégénérescence et ainsi améliorer la qualité de vie des patients sur le long-terme.

a. La recherche sur cellules souches

Dans ce contexte, la recherche sur la transplantation de cellules souches pluripotentes induites (IPS) semble une piste prometteuse pour restaurer la fonction du striatum médiée par la signalisation dopaminergique. Sous l'action de neuroprogéniteurs, les cellules IPS peuvent être différenciées en neurones dopaminergiques (Stoddard-Bennett and Reijo Pera, 2019). Outre un aspect thérapeutique, l'utilisation de ces cellules permettrait également de mieux comprendre l'étiologie de la MP et l'implication des facteurs de risques génétiques identifiés. En effet, les cellules IPS sont obtenues par reprogrammation génétique de cellules adultes différenciées. Les lignées de cellules IPS peuvent donc être établies avec des facteurs de risques génétiques, pour en étudier les conséquences sur l'induction de la neurodégénérescence, et la réaction aux traitements de ces différentes sous-population génétiques (Parmar et al., 2020; Stoddard-Bennett and Reijo Pera, 2019; Zhang et al., 2017). Par ailleurs, les cellules de carcinome embryonnaire sont des cellules pluripotentes également utilisées pour l'étude de la différenciation cellulaire. Or il a été montré *in vitro* que l'administration d'AR promeut la différenciation de ces cellules en neurones MSNs et que le récepteur RAR α contribue à la différenciation des neurones dopaminergiques fonctionnels (Podleśny-Drabiniok et al., 2017). La vitamine A pourrait donc être un auxiliaire utile dans les traitements de la maladie de parkinson par transplantation de cellules souches neurales.

b. Identification de biomarqueurs prédictifs

Afin de pouvoir agir sur la neurodégénérescence et prévenir son apparition, il est nécessaire d'identifier les personnes présentant un risque plus élevé de développer la MP. L'identification des facteurs de risques génétiques y contribue mais ne permet pas de prédire l'apparition de la maladie avec certitude. De même, l'imagerie cérébrale pour identifier précocement la

dégénérescence dopaminergique ou l'accumulation de LBs est difficilement applicable à l'ensemble de la population. L'identification de biomarqueurs fiables pour prédire et suivre le développement de la MP permettrait chez ces patients à risque de mettre en place des stratégies thérapeutiques ciblées pour agir sur les facteurs de risques environnementaux modifiables et ainsi limiter, ou du moins ralentir, la dégénérescence des neurones dopaminergiques. De nombreuses études cliniques sont en cours pour identifier les candidats éventuels. Plusieurs ont été identifiés comme potentiels, tels que le dosage d' α -synucléine dans le liquide cébrospinal, les marqueurs de l'inflammation, le dosage d'acide urique, mais aucun à ce jour n'a démontré une précision diagnostique suffisante pour distinguer les patients parkinsoniens des sujets sains (Li and Le, 2020; Lotankar et al., 2017; Miller and O'Callaghan, 2015; Parnetti et al., 2019) ;

Etant donné l'origine multifactorielle de la MP, il pourrait être judicieux de regarder un ensemble de biomarqueurs prédictifs plutôt qu'un seul isolé (Li and Le, 2020). Nous verrons par la suite comment les marqueurs du métabolisme de la vitamine A pourraient contribuer à cet ensemble de biomarqueurs prédictifs (Voir **Chapitre 3.**).

c. La nutrition

Enfin, la nutrition est également étudiée comme un facteur modifiable potentiel pour ralentir la progression de la maladie (**Figure 19**). L'implication de la nutrition est renforcée par l'observation de carences en coenzyme Q10, qui participe au fonctionnement de la chaîne mitochondriale, en vitamine B1 et en lithium chez les patients parkinsoniens ainsi que l'augmentation des cas de dénutrition chez ces patients consécutifs à l'apparition des symptômes et des traitements (Desport et al., 2017; Mischley, 2017). De plus, la communication bi-directionnelle entre le système nerveux central et le système nerveux entérique laisse envisager une possibilité thérapeutique compte tenu qu'il peut être plus facile d'agir sur l'homéostasie du microbiote intestinal que sur celle du cerveau (Lorente-Picón and Laguna, 2021) (**Figure 19**).

En ce sens, l'administration de probiotiques (c'est à dire les microorganismes vivants, bactéries ou levures) et de prébiotiques (c'est à dire les nutriments consommés par les probiotiques pour leur développement) semble avoir un effet bénéfique, et peu de risque d'effets délétères. Une étude montre que des souris injectées avec du MPTP consécutivement à une supplémentation préventive en probiotiques, ont un meilleur taux de survie des neurones dopaminergiques ainsi qu'une diminution de la réactivité astrogliale et de l'activité de MAO-B (Srivastav et al., 2019) (**Figure 19**). D'autres études ont montré des effets similaires sur des modèles MPTP de la MP et *in vitro*, et des études cliniques sont également en cours (Lorente-Picón and Laguna, 2021).

Par ailleurs il a été montré qu'un régime alimentaire méditerranéen (c'est à dire enrichi en fruits et légumes, poissons, produits non raffinés) et une augmentation de la consommation d'Omega 3 sont associés à une diminution de l'incidence de la MP et un ralentissement de sa progression (Boulos et al., 2019; Lorente-Picón and Laguna, 2021).

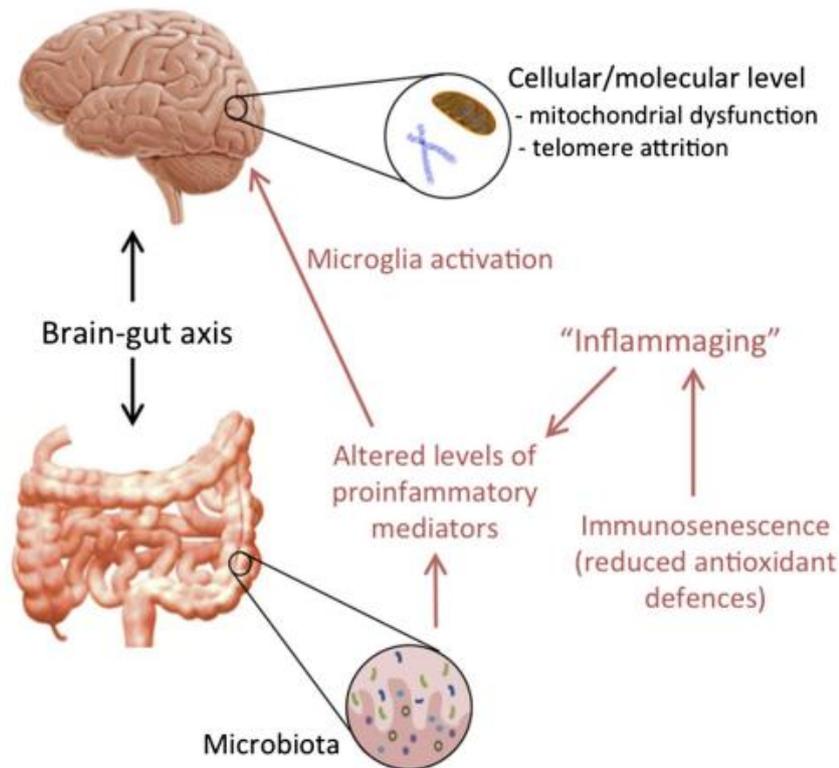


Figure 19 : Schéma récapitulatif des mécanismes sur lesquels la nutrition peut influencer pour lutter contre la neurodégénérescence

A travers l'axe intestin-cerveau, dont la communication s'effectue par le nerf vague, la nutrition et l'administration de prébiotiques/probiotiques peuvent limiter l'inflammation inhérente à l'âge et à une dysbiose du microbiote et ainsi limiter l'activation microgliale et les dysfonctionnements mitochondriaux au niveau cérébral. Source : Erro et al., 2018

Pour évaluer l'influence d'un nutriment sur l'étiologie de la maladie, il existe de nombreux types d'études cliniques ; étude de cohorte prospective, étude cas témoins, étude corrélationnelle et d'autres. Chaque étude a ses avantages et ses limites, les conclusions de ce type d'étude pouvant être influencées par le type de questionnaire donné aux patients pour mesurer la quantité ingérée du nutriment évalué par exemple. De plus on étudie souvent l'effet d'un seul nutriment par étude, sans prendre en compte sa biodisponibilité dans l'organisme ou son interaction avec l'environnement ou d'autres nutriments. Ces différents paramètres peuvent expliquer la présence de résultats contradictoires d'une étude à l'autre et l'absence d'association statistique (Boulos et al., 2019).

Néanmoins parmi les pistes nutritionnelles envisagées, la vitamine A a montré des effets bénéfiques potentiels dans plusieurs études pour prévenir le développement de la MP.

Dans le chapitre suivant, nous détaillerons les mécanismes par lesquels la vitamine A peut influencer sur l'étiologie de la MP et ainsi souligner l'importance de maintenir la signalisation des rétinoïdes à un niveau suffisant.

CHAPITRE 3. Les liens entre signalisation de la vitamine A et maladie de Parkinson

I. L'importance de la signalisation des rétinoïdes dans le maintien de la voie nigro-striée

1. L'expression des rétinoïdes dans la voie nigro-striée

De multiples travaux montrent que l'AR contribue à la régulation et au fonctionnement de la voie nigro-striée. Cependant, les enzymes impliquées dans la synthèse des rétinoïdes et leurs métabolites sont distribuées de façon hétérogène dans la voie nigro-striée.

Les enzymes de production de l'AR, dont ALDH1A1, sont majoritairement exprimées dans le soma et les terminaisons synaptiques des neurones dopaminergiques de la SNc (McCaffery and Drager, 1994; Zetterström et al., 1999). Plus précisément, seuls certains neurones dopaminergiques de la SNc expriment cette enzyme, ce qui fait de l'ALDH1A1 un marqueur de cette sous-population neuronale (Poulin et al., 2018). Nous développerons le rôle de cette sous-population de neurones dopaminergiques ALDH1A1⁺ ultérieurement (voir **partie 3.**). La présence d'ALDH1A1 dans le striatum s'explique essentiellement par les afférences dopaminergiques de ces neurones de la SNc exprimant ALDH1A1 (Pan et al., 2019a). Bien que ce soit la SNc qui exprime majoritairement l'enzyme de synthèse de l'AR, il a été montré que la plus grande concentration d'AR cérébral est retrouvée au niveau du striatum (Kane et al., 2005).

En dehors des neurones dopaminergiques, c'est l'isotype ALDH1A2 qui est majoritairement exprimé au niveau cérébral (Goodman et al., 2012). Les récepteurs des rétinoïdes quant à eux sont essentiellement exprimés dans le striatum, en particulier les isoformes RAR β et RXR γ (Krezel et al., 1999; Zetterström et al., 1999).

Il existe une distribution différentielle entre les transcrits des récepteurs et l'expression de leurs protéines. Par exemple il a été montré que le récepteur RAR β était exprimé, bien que faiblement, au niveau de la SNc sans que son transcrit soit détectable dans cette structure. Le même phénomène est observé dans d'autres structures du système nerveux central (Krezel et al., 1999). Concernant les protéines de transport de l'AR, CRABP 1 et 2 sont exprimées dans le striatum mais seul CRABP 1 est détectée au niveau de la SNc (Zetterström et al., 1999). Ces expressions différentielles des récepteurs, de l'ALDH1A1 et de l'AR entre le striatum et la SNc illustrent l'action paracrine de l'AR, de la SNc vers le striatum, l'AR jouant le rôle de messenger trans-synaptique (Pan et al., 2019a).

2. Le rôle des rétinoïdes dans le développement et le maintien de la voie nigro-striée

L'expression robuste des rétinoïdes dans le striatum et la SNc suggère leur implication dans la régulation de ces structures et la signalisation des ganglions de la base.

La signalisation médiée par l'AR dans le striatum contrôle la différenciation des différentes populations de neurones striataux GABAergiques. Des études utilisant des souris transgéniques ont montré que l'expression de RAR β était nécessaire pour la différenciation des neurones D1 MSNs (Podlešny-Drabiniok et al., 2017; Rataj-Baniowska et al., 2015). De plus, la maturation des MSNs nécessite la signalisation de la protéine DARPP-32, dont l'activation est sous le contrôle de l'AR (Pedrini et al., 2008). Par ailleurs la signalisation de l'AR est également impliquée dans la différenciation terminale des neurones dopaminergiques de la SNc. Notamment, l'activité de NURR1 pour la différenciation des neurones dopaminergiques nécessite son hétérodimérisation avec les RXR (Dong et al., 2016; Zetterström et al., 1997). Cette hétérodimérisation NURR1-RXR permet également de prévenir la dégénérescence des neurones dopaminergiques, comme démontré avec un agoniste de ces hétérodimères chez des souris injectées avec du MPTP, et sur des modèles génétiques *in vitro* de la MP (Spathis et al., 2017). De plus, des souris KO pour NURR1 ont une diminution de l'expression de la TH dans le striatum, et on observe une perte d'expression pour l'enzyme ALDH1A2 et du D2R dans les neurones dopaminergiques de la SNc chez ces souris (Zetterström et al., 1997).

Par ailleurs, il a été montré que le D2R possède une séquence RARE (élément de réponse de l'AR dans l'ADN de ses gènes cibles) dans son promoteur et que les récepteurs D1R et D2R de la dopamine sont sous contrôle de l'AR (Lane and Bailey, 2005; Samad et al., 1997a; Sodja et al., 2002). L'expression des enzymes impliquées dans la synthèse de la DA, TH et AADC, est également modulée par l'AR (Berrard et al., 1993; Cervini et al., 1994; Kobayashi et al., 1994).

La signalisation médiée par les rétinoïdes semble donc nécessaire à la mise en place et à la fonctionnalité du système dopaminergique dans la voie nigro-striée, l'expression des enzymes et des protéines impliquées dans les voies respectives étant interdépendante.

II. Les conséquences d'une altération de la signalisation des rétinoïdes dans la pathogénèse et la physiopathologie de la MP

1. Les études cliniques

Plusieurs études cliniques et épidémiologiques ont évalué l'association entre la vitamine A (c'est à dire les rétinoïdes et les caroténoïdes) et la MP. Parmi les études analysant la quantité d'apports nutritionnels en vitamine A et le risque de développer la MP, une seule a montré une association positive entre la consommation de β -carotène et une diminution de l'incidence de la MP (Yang et al., 2017). Les autres études, cas-contrôles ou prospectives, n'ont pas conclu sur un lien significatif entre la consommation de rétinol ou de β -carotène et le risque de développer la MP (Anderson et al., 1999; Johnson, 1999; Paganini-Hill, 2001; Zhang et al., 2002) (**Tableau 2**). Cependant, dans ces études, la quantité de vitamine A apportée est mesurée à partir de questionnaires sur les habitudes alimentaires. Or nous avons montré précédemment que l'apport réel en vitamine A dépendait grandement de la forme du précurseur et de la matrice alimentaire par laquelle elle était absorbée (voir **Chapitre 1.**). Ainsi, il se peut que la quantité de vitamine A ingérée soit sous-estimée (ou surestimée) chez les patients et ne soit pas comparable d'une étude à l'autre. De plus la revue de Takeda et al., 2014, qui reprend l'ensemble des études cliniques sur l'association entre vitamine A et MP de 1990 à 2013, conclut que la conception de la majorité de ces études cliniques ne permet pas de conclure sur une association ou non entre les deux paramètres.

D'autres études se sont intéressées au statut en vitamine A des patients atteints de la MP. L'étude cas-contrôles de Kim et al., 2017 a montré une diminution des taux de β -carotène dans le sang des patients parkinsoniens, mais pas d'effet sur les taux de rétinol, comparé aux cas contrôles. Les autres études cliniques ayant mesuré les taux de caroténoïdes et de rétinol plasmatique n'ont pas observé de différence significative entre les patients parkinsoniens et les cas contrôles (Foy, 1999; Jiménez-Jiménez et al., 1993) (**Tableau 2**). Les taux de rétinol plasmatique sont corrélés à l'apport nutritionnel en vitamine A et augmentent suite à un repas riche en vitamine A (Li et al., 2014a). Néanmoins, la concentration de rétinol plasmatique est finement régulée par l'organisme et revient rapidement à la normale ($2 \mu\text{M}$) suite à la prise alimentaire. Ainsi la concentration plasmatique de rétinol n'apparaît pas comme un indicateur fiable du statut en vitamine A et de la signalisation de l'AR. La mesure de la concentration en AR sanguin et dans le liquide cébrospinal pourrait être un indicateur plus pertinent (Royal et al., 2002). Pourtant, la mesure de l'AR sanguin n'est pas ou peu réalisée chez l'Homme. En effet de par leur structure, les rétinoïdes et en particulier l'AR et ses isoformes, sont instables en présence d'oxydants, de lumière ou de chaleur excessive (Das et al., 2014). Ceci rend difficile l'extraction de l'AR circulant et les méthodes utilisées pour son dosage.

L'ALDH1A1 a été suggéré comme un potentiel biomarqueur périphérique pour prédire le risque de développer la MP. Il a été montré que la concentration plasmatique d'ALDH1A1 était significativement diminuée chez les patients parkinsoniens comparés aux cas contrôles (Grünblatt et al., 2010) (**Tableau 2**). De plus, il a également été montré que l'expression d'ALDH1A1 était diminuée dans les neurones dopaminergiques de la SNc chez les patients parkinsoniens comparés aux cas contrôles (Galter et al., 2003; Grünblatt, 2018; Liu et al., 2014) (**Tableau 2**).

Les résultats de ces études sont donc controversés mais laissent néanmoins supposer une implication de la signalisation des rétinoïdes, en particulier de l'AR et son enzyme de synthèse ALDH1A1, dans la physiopathologie de la MP.

Design	Indicateur quantifié	Taille de l'échantillon	Méthode	Effet sur la SNC	Résultats principaux	Etude
Etude cas-contrôles	Mesure des taux de rétinol et caroténoïdes plasmatiques	61 MP sporadiques, 61 cas contrôles	Sang total collecté		Pas d'association entre les taux plasmatiques de β -carotène/rétinol et le risque de développer la MP	Jimenez-Jimenez et al., 1993
Etude cas-contrôles	Facteurs nutritionnels dans MP	103 MP sporadiques, 103 cas contrôles	Questionnaire sur les habitudes alimentaires		Pas d'association trouvée entre la consommation d'aliments contenant de la vitamine A et la MP	Anderson et al., 1999
Etude cas-contrôles	Facteurs nutritionnels dans MP	144 MP sporadiques, 432 cas contrôles	Questionnaire sur les habitudes alimentaires		Pas d'association trouvée entre la consommation d'aliments contenant de la vitamine A et la MP	Johnson et al., 1999
Etude cas-contrôles	Diminution de l'expression d'ALDH1A1 dans les neurones DA	13 MP sporadiques, 14 cas contrôles	Coups cérébrales de SNC	ALDH1A1 \searrow	L'expression de l'ARNm de ALDH1A1 est spécifiquement diminuée dans la SNC des patients parkinsoniens	Galter et al., 2003
Etude cas-contrôles	ALDH1A1 utilisée comme biomarqueur périphérique de la MP	22 MP sporadiques, 33 cas contrôles	Sang total collecté		ALDH1A1 comme biomarqueur potentiel avec une bonne spécificité et sensibilité pour prédire le risque de développer MP	Grünblatt et al., 2010
Etude cas-contrôles	Diminution de l'expression d'ALDH1A1 dans les neurones DA	10 MP sporadiques, 9 cas contrôles	Coups cérébrales de SNC	ALDH1A1 \searrow neurones DA \searrow	La localisation des neurones DA ALDH1A1 positifs et négatifs dans la SNC humaine diffère entre les cas de MP et les cas témoins. Une diminution de l'ALDH1A1 peut rendre les neurones DA plus enclins à la dégénérescence.	Liu et al., 2014
Etude cas-contrôles	Mesure des taux de rétinol et caroténoïdes plasmatiques	104 MP sporadiques, 52 cas contrôles	Sang veineux collecté		Le taux de β -carotène (mais pas de rétinol) est diminué pour les patient MP comparé aux contrôles. Il est également plus bas chez les MP jeunes comparés aux MP à un stade avancé. Effet de l'âge et de la progression de la MP	Kim et al., 2017
Etude cas-contrôles	Mesure des taux de rétinol et caroténoïdes plasmatiques	41 MP sporadiques, 41 cas contrôles	Sang total collecté		Pas de changements significatifs des taux de rétinol et caroténoïdes plasmatiques chez les patients MP comparé aux contrôles	Foy et al., 1999
Etude prospective	Facteurs de risques pour MP	13 979 personnes au départ, avec 395 développent MP, 2 320 cas contrôles 17 ans après	Questionnaire sur les habitudes alimentaires		Pas d'association entre la consommation de la vitamine A et le développement de la MP	Paganini-Hill et al., 2001
Etude prospective	Association apports nutritionnels en vitamines anti-oxydantes et risque MP	371 développent MP sur une cohorte de 124 221 personnes	Questionnaire sur les habitudes alimentaires		La consommation de doses élevées de caroténoïdes ne semble pas diminuer le risque de développer la MP	Zhang et al., 2002
Etude prospective	Association entre apports nutritionnels en vitamines anti-oxydantes et risque MP	1 329 développent MP sur une cohorte de 84 774 personnes	Questionnaire sur les habitudes alimentaires		La consommation de β -carotène est associée à une diminution du risque de développer la MP	Yang et al., 2017
Etude cas-contrôles	Diminution de l'expression d'ALDH1A1 dans les neurones DA	8 MP sporadiques, 12 cas contrôles	Coups cérébrales de SNC	ALDH1A1 \searrow neurones DA \searrow	Diminution du nombre de neurones ALDH1A1+ chez MP comparés à contrôle	Grünblatt, 2018

Tableau 2 : Synthèse des principales études cliniques qui ont directement ou indirectement étudié la relation entre la vitamine A et la maladie de Parkinson

Abréviations : MP, Maladie de Parkinson ; SNC, substance noire compacte (adapté de Marie et al., 2021).

2. Les études pré-cliniques

Les études pré-cliniques analysant le rôle de la vitamine A dans la pathogenèse de la MP ont été réalisées par diverses manipulations de la vitamine A et de ses voies de signalisation : supplémentation ou carence nutritionnelle, souris KO pour les récepteurs, traitements pharmacologiques avec des agonistes/antagonistes naturels ou synthétiques des rétinoïdes, *in vivo* ou *in vitro*.

a. Etudes pré-cliniques portant sur l'effet d'une altération de la signalisation des rétinoïdes sur l'intégrité de la voie nigro-striée

- *Implication de la vitamine A via le système dopaminergique*

La première preuve de l'implication des rétinoïdes dans la physiologie de la voie nigro-striée est l'effet d'une délétion des récepteurs RAR et RXR ou d'une inhibition de ces récepteurs chez la souris (**Tableau 3**). L'étude de Krezel et al., 1998 a montré que des souris avec un double KO constitutif pour les récepteurs RAR β -RXR γ ou RAR β -RXR β présentaient des déficits locomoteurs dans le test de l'open field et le test du rotarod (**Tableau 3**). Par ailleurs les simples mutants RAR β ou RXR γ présentent un déficit dans le test du rotarod mais pas dans l'open field, tandis que les fonctions motrices du simple mutant RXR β ne sont altérées ni dans un test ni dans l'autre. Ces résultats suggèrent que l'hétérodimère RAR β -RXR γ représente l'unité fonctionnelle impliquée dans le contrôle de la locomotion, et que RXR β et RXR γ sont fonctionnellement redondant (Krezel et al., 1998). De plus il a également été montré que le double KO RAR β -RXR γ induisait une diminution de l'expression des D1R et D2R dans le striatum ventral et le striatum dorso-médial, sans effet pour les simples mutants (Krezel et al., 1998). De façon similaire, l'administration d'un antagoniste du RAR β à des souris adultes pendant 4 semaines induit une diminution de l'expression de D1R et de la TH dans le striatum, mais sans effet de cette diminution d'expression de la TH sur les taux de DA mesurés par HPLC (Kitaoka et al., 2011) (**Tableau 3**). L'administration de drogues, comme les antagonistes des récepteurs de l'AR, permet d'observer l'implication de la signalisation des rétinoïdes à l'âge adulte chez ces animaux, contrairement aux KO constitutifs qui affectent également la période développementale de l'animal et donc la mise en place du système dopaminergique. Le récepteur RXR γ est également impliqué dans la régulation de l'activité du D1R, puisque des souris avec un KO constitutif pour le récepteur RXR γ présentent un défaut de la réponse cataleptique suite à l'administration de différents antagonistes de la DA (Saga et al., 1999) (**Tableau 3**). Ces résultats mettent en avant le rôle de la signalisation des rétinoïdes, *via* les récepteurs RAR β et RXR γ , dans la signalisation dopaminergique de la voie nigro-striée.

Outre le rôle des récepteurs, des études se sont également intéressées à l'effet d'une carence nutritionnelle en vitamine A, et donc à une diminution globale de la signalisation des rétinoïdes sur la pathogénèse et la pathophysiologie de la MP (**Tableau 3**).

Des rats carencés en vitamine A (VAD, Vitamin A Deficiency) pendant 6 mois, à partir de la période post-natale, présentent des troubles moteurs dans le test du rotarod, semblables à ceux que l'on peut observer chez des animaux modèles de la MP (Carta et al., 2006) (**Tableau 3**). Les rats VAD présentent également une réponse comportementale différente de celle des animaux sous régime contrôle, suite à l'injection d'agoniste du D1R et d'antagoniste du D2R, sans pour autant voir de changement dans l'expression de ces récepteurs au niveau striatal (Carta et al., 2006). L'altération motrice est également retrouvée chez des souris de 9 semaines carencées en vitamine A par l'alimentation pendant 1 mois (Kitaoka et al., 2007) (**Tableau 3**). Les souris VAD présentent une diminution des taux de DOPAC, le métabolite de la DA produit suite à la dégradation du DOPAL, mais sans différence pour les taux de DA (Kitaoka et al., 2007). Les souris VAD présentent donc une altération du catabolisme de la DA. L'ensemble de ces études illustre l'importance de la signalisation des rétinoïdes médiée par ses récepteurs, en particulier RAR β et RXR γ , pour l'intégrité de la fonction motrice chez les rats et les souris. Concernant la signalisation dopaminergique, l'implication de la vitamine A semble plus subtile et d'autres mécanismes pourraient être mis en jeu pour expliquer les déficits moteurs observés chez les animaux déficients en vitamine A.

Modèle	Tests comportement	Comportement moteur*	Protéines Striatum*	Survie neurones SNC*	α -synucléine agrégation*	Étude
Rats VAD	rotarod, activité motrice	↘↘	D1R, D2R, TH, DA/DOPAC = ChAT ↘↘			Carta et al., 2006
Rats VAD	enregistrement EEG, activité motrice, open field	↘	DA et 5HT = DOPAC ↘			Kitaoka et al., 2007
Souris KO RXR γ	Réponse cataleptique agoniste DA	↘	↘ ChaT			Saga et al., 1999
Souris KO RAR β	open field et activité redressement en réponse agoniste DA	Locomotion ↗ redressement ↘	MOR1, TH, DARP-32 (post-natal) ↘			Liao et al., 2008
Souris KO RAR/RXR	rotarod, open field	↘↘	D1R; D2R ↘↘			Krezel et al., 1998
Antagoniste RAR β souris	enregistrement EEG	↘ période d'éveil	DOPAC et HVA = TH, D1R ↘ ratio HVA/DA ↘			Kitaoka et al., 2011
KO aldh1a1 chez souris A53T	rotarod, open field	↘	↗ α -synucléine	↘	↗	Liu et al., 2014
souris KO aldh1a1/aldh1a2	rotarod, open field, actimétrie, Y-maze	↘↘	DA, DOPAC, DOPAC/DA ↘ DOPAL ↗	↘		Wey et al., 2012
souris KO aldh1a1			baseline DA ↗ libération DA ↘ DOPAC ↘	↗ neurones TH ⁺		Anderson et al., 2012
souris KO constitutif et conditionnel aldh1a1	open field, activité redressement	Locomotion = redressement ↘	↘ MOR1 (post natal et adulte)			Pan et al., 2019
souris KO conditionnel aldh1a1	rotarod, open field	↘↘ apprentissage et vigueur mouvement				Wu et al., 2019

* comparé au groupe contrôle

Tableau 3 : Synthèse des principales études pré-cliniques portant sur l'effet d'une altération de la signalisation des rétinoides (VAD, KO récepteurs et ALDH1A1) sur l'intégrité de la voie nigro-striée
Abréviations : EEG, Electroencéphalogramme ; VAD, Vitamin A deficiency (adapté de Marie et al., 2021).

- *Implication de la vitamine A via l'acétylcholine et les striosomes*

Les antagonistes des récepteurs muscariniques de l'ACh ont été les premiers traitements utilisés contre les symptômes de la MP, avant la découverte de la L-DOPA (Fahn, 1989). Ces observations ont conduit à l'hypothèse que les deux systèmes, cholinergique et dopaminergique, doivent fonctionner en équilibre pour permettre une régulation optimale du mouvement volontaire par le striatum (Ztaou and Amalric, 2019). Plusieurs études suggèrent que la signalisation des rétinoides pourrait contribuer à l'homéostasie de régulation des deux systèmes en régulant l'activité des marqueurs cholinergiques.

Une diminution significative de la libération d'ACh au niveau de l'hippocampe en réponse à l'injection de scopolamine (anticholinergique) est observée chez des rats de 3 semaines

carencés en vitamine A pendant 12 semaines (Cocco et al., 2002). Les rats carencés en vitamine A dans l'étude de Carta et al., 2006, présentent également une diminution forte de 30 % des taux d'ACh dans le striatum. Cette diminution des taux d'ACh dans le striatum pourrait être expliquée par une diminution de l'activité de l'acétylcholine transférase (ChAT), l'enzyme de synthèse de l'ACh, qui est sous contrôle de l'AR (Berse and Blusztajn, 1995; Diebler et al., 1998). Cette hypothèse est cohérente avec la diminution de l'expression de ChAT observée au niveau des interneurons cholinergiques du striatum de souris KO pour le récepteur RXR γ (Saga et al., 1999) (**Tableau 3**). La diminution de l'expression de ChAT est également retrouvée dans la partie antérieure du cerveau de rats de 4 semaines carencés en vitamine A pendant 6 mois (Corcoran et al., 2004). A l'inverse, il a été montré *in vitro* que des traitements avec différentes isoformes de l'AR (AR-all-*trans*, AR-9-*cis* et AR-13-*cis*), sur des neurones cholinergiques de souris, induisaient une augmentation de l'activité de la ChAT et de l'expression de son ARNm, se traduisant par une augmentation intracellulaires des taux d'ACh (Pedersen et al., 2002). Ces résultats confirment que l'expression et l'activité de la ChAT sont sous contrôle de la signalisation des rétinoïdes médiée par l'AR et ses récepteurs. De plus, l'étude de Carta et al., 2006, suggère que les effets moteurs observés chez les rats carencés en vitamine A pourraient être dus à un dysfonctionnement des interneurons cholinergiques du striatum. Ainsi il est possible que les effets de la carence en vitamine A à l'âge adulte ne soient pas uniquement médiés par la signalisation dopaminergique de la voie nigro-striée, mais également par le système cholinergique.

Comme dit précédemment, l'ACh est également un marqueur du compartiment matriciel du striatum (voir **Chapitre 2.**) (Lanciego et al., 2012; Sgroi and Tonini, 2018). En ce sens, l'étude de l'implication de la signalisation des rétinoïdes dans l'intégrité des compartiments striataux pourrait apporter des informations complémentaires sur le rôle de la vitamine A dans l'homéostasie de signalisation de la voie nigro-striée et les fonctions motrices associées.

L'homéostasie des compartiments striataux (striosomes et matrice), est également régulée par la signalisation des rétinoïdes. Un KO constitutif du RAR β chez des souris induit une diminution significative de la surface occupée par les striosomes, marqués par MOR1, dans le striatum antérieur de ces souris (Liao et al., 2008) (**Tableau 3**). La délétion de RAR β a un effet moins drastique sur la formation des striosomes, reflétée par l'immunomarquage avec MOR1, au niveau de la partie postérieure du striatum. Ces résultats sont cohérents avec l'étude de Miyamoto et al., 2018, qui étudie la diversité des striosomes au sein du striatum selon les marqueurs neurochimiques qu'ils contiennent. Cette étude a révélé 5 types de population de striosomes, ayant chacune un territoire d'expression défini le long de l'axe rostro-caudal. Les striosomes exprimant MOR1 sont localisés au niveau de la partie antérieure du striatum, tandis que ceux contenant la substance P sont localisés au niveau de la partie postérieure ; les

striosomes contenant de l'enképhaline sont quant à eux retrouvés au niveau du striatum ventral (Miyamoto et al., 2018). Par ailleurs la délétion de RAR β durant la période développementale induit également une diminution de la taille du striatum chez les nouveau-nés comparés aux contrôlés ainsi qu'une diminution de l'expression de TH et DARPP-32, en plus de celle de MOR1 (Liao et al., 2008) (**Tableau 3**). Ainsi un défaut de signalisation des rétinoïdes, médiée par le récepteur RAR β , durant le développement induit une altération de la cyto-architecture du striatum associée à une atrophie du striatum et un défaut d'expression des protéines impliquées dans la maturation des MSNs (DARPP-32) et la signalisation dopaminergique (TH).

Concernant l'implication de la signalisation des rétinoïdes dans la compartimentation du striatum à l'âge adulte, l'ALDH1A1 est nécessaire au maintien de l'expression post-synaptique de MOR1 et son activité dans le striatum à l'âge adulte (Pan et al., 2019a; Sgobio et al., 2017) (**Tableau 3**). La perte d'expression d'ALDH1A1 résultant de la dégénérescence des neurones dopaminergiques ALDH1A1⁺ de la SNc pourrait donc expliquer la diminution d'expression de MOR1 dans le cerveau de patients parkinsoniens (Pan et al., 2019a; Sgobio and Tonini, 2018). En effet, l'ALDH1A1 dans le striatum provient essentiellement des afférences dopaminergiques de la SNc (Pan et al., 2019a). Le rôle de MOR1 dans la contribution à l'étiologie de la MP reste à définir. La diminution de son expression dans le cerveau des patients parkinsoniens laisse supposer une altération de la signalisation inhibitrice sur le D1R médiée par ce récepteur couplé aux protéines G, conduisant à un déséquilibre de la signalisation dans les ganglions de la base et à l'apparition des symptômes moteurs (Pan et al., 2019a). Cependant, les études montrent des effets contradictoires suite à l'inhibition ou à l'activation de MOR1 dans le striatum d'animaux modélisant la MP. L'injection d'antagoniste de MOR1 augmente la sévérité des dyskinésies induites par le traitement à la L-DOPA dans certaines études, et les réduisent dans d'autres (Bezard et al., 2020).

En conclusion de ces études pré-cliniques, un défaut de signalisation des rétinoïdes pendant le développement est associé à l'apparition de troubles moteurs similaires à ceux observés chez les animaux modélisant la MP. Ces altérations motrices pourraient être expliquées par une dérégulation du système dopaminergique et du système cholinergique en réponse à une diminution de la signalisation médiée par la vitamine A.

b. Etudes pré-cliniques portant sur l'effet d'un renforcement de la signalisation des rétinoïdes sur l'intégrité de la voie nigro-striée dans des modèles de la MP

A l'inverse des études portant sur un déficit en rétinoïdes, d'autres études ont regardé l'effet d'une augmentation de la signalisation des rétinoïdes dans des modèles animaux de la MP (**Tableau 4**). L'injection d'AR encapsulé dans des nanoparticules au niveau du striatum diminue la dégénérescence des neurones dopaminergiques de la SNc induite par l'injection de MPTP chez des souris de 3 mois (Esteves et al., 2015). L'injection des nanoparticules d'AR induit également une augmentation de l'expression de TH et de NURR1 dans le striatum des souris injectées au MPTP âgées de 3 mois et de 26 mois (Esteves et al., 2015) (**Tableau 4**). Un effet similaire sur la survie des neurones dopaminergiques de la SNc est retrouvé chez des animaux modélisant la MP, par une injection de 6-OHDA ou de métamphétamine, injectées préalablement avec l'isoforme 9-*cis* de l'AR (Reiner et al., 2014; Yin et al., 2012a) (**Tableau 4**). De plus, l'injection intra-cérébro-ventriculaire (i.c.v.) d'AR 9-*cis* permet de diminuer les déficits moteurs relatifs à la modélisation de la MP, et d'augmenter l'expression de la TH dans la SNc et le striatum de ces animaux (Reiner et al., 2014; Yin et al., 2012a). *In vitro*, la présence d'agonistes des RXR permet également d'augmenter la survie des neurones dopaminergiques dans des cultures primaires de cellules traitées à la 6-OHDA (Friling et al., 2009) (**Tableau 4**). L'effet d'agonistes des RAR/RXR (agoniste des récepteurs ou injections pharmacologiques de rétinoïdes) sur la préservation de la voie nigro-striée et les comportements moteurs associés est donc clairement établi dans la littérature.

Cependant, une seule étude a regardé l'effet d'une supplémentation nutritionnelle en vitamine A dans un modèle de la MP induit par l'injection de 6-OHDA dans la SNc de rats (Kunzler et al., 2019) (**Tableau 4**). Dans cette étude, les animaux ont été supplémentés en rétinol pendant 4 semaines avant l'injection de 6-OHDA. Cette étude n'a pas montré de réel effet de la supplémentation en vitamine A sur les déficits moteurs induits par la 6-OHDA. Cependant cette étude montre plusieurs points faibles, comme par exemple l'effet de l'injection sur la dégénérescence dopaminergique et la déplétion en dopamine du striatum qui n'est pas significative. Cette seule étude n'est donc pas suffisante pour conclure.

Modèle MP	Supplémentation	<i>in vitro</i> / <i>in vivo</i>	Tests comportement	Comportement moteur*	Survie neurones SNc*	Protéines SNc*	Protéines Striatum*	α-synucléine*	Étude
α-synucléine	Vitamine A et β-carotène	<i>in vitro</i>						⊃ Agrégation α-synucléine	Ono & Yamada, 2006
Souris A53T	Surexpression RXR ; supplémentation AR 9- <i>cis</i>	<i>in vitro</i>						⌈ oligomères α-synucléine	Yakunin et al., 2012
6-OHDA sur cellules primaires de souris	Agonistes RXR	<i>in vitro</i>			↗				Friling et al., 2009
Souris MPTP	Injection AR dans le striatum	<i>in vivo</i>			↗↗	TH, Pitx3, NURR1 ↗↗	TH, NURR1 (souris âgées) ↗↗		Esteves et al., 2015
Rats 6-OHDA	Vitamine A (alimentation)	<i>in vivo</i>	Rotarod	No effect	No effect	TH =	TH =		Kunzler et al., 2019
Rats 6-OHDA	AR 9- <i>cis</i> (i.c.v.)	les deux	Test rotation	↗	↗↗	TH ↗↗	DA libération et catabolisme ↗↗		Yin et al., 2012
Souris MPTP; 6-OHDA; AAV α-synucléine	NURR1:RXRα agoniste	les deux	Rotarod	↗↗	↗↗	TH, DA ↗↗	TH ↗↗		Spathis et al., 2017
Injection Métamphét. chez rats	AR 9- <i>cis</i> (i.c.v.)	les deux	Activité motrice	↗	↗↗		TH ↗		Reiner et al., 2014

* Comparé au modèle sans supplémentation

Tableau 4 : Synthèse des principales études pré-cliniques portant sur l'effet d'un renforcement de la signalisation des rétinoïdes (supplémentation nutritionnelle, injections d'AR et de ses dérivés, agonistes des récepteurs) sur l'intégrité de la voie nigro-strié

Abréviations : AAV, adenos-associated virus ; i.c.v., injection intra cérébro ventriculaire (adapté de Marie et al., 2021).

En conclusion, ces études précliniques illustrent l'implication des dérivés de la vitamine A et leurs récepteurs dans l'homéostasie des neurones dopaminergiques de la SNc et la régulation de la signalisation dopaminergique nécessaires au contrôle du mouvement volontaire dans les ganglions de la base. Cependant, l'implication directe du métabolisme de la vitamine A dans la pathogénèse de la MP n'a pas encore été établie. Parmi les hypothèses avancées, celle du rôle pivot de l'ALDH1A1 a retenu notre attention tout au long de cette thèse.

III. Le rôle pivot d'ALDH1A1 dans le système dopaminergique nigro-strié

Plusieurs études convergent vers l'hypothèse que l'action de la vitamine A dans la voie nigro-striée implique spécifiquement l'enzyme ALDH1A1 au niveau des neurones dopaminergiques de la SNc.

Premièrement, comme indiqué précédemment, il a été montré qu'une altération de l'expression d'ALDH1A1 chez l'Homme représentait un facteur de risque pour la MP (Liu et al., 2014). Plusieurs études révèlent que le polymorphisme génétique du gène codant pour ALDH1A1 est associé à une augmentation du risque de développer la MP (Fan et al., 2021; Salas-Leal et al., 2019). Par ailleurs, outre son rôle comme facteur de risque, la variabilité génétique de ALDH1A1 a été incorporée à un algorithme mathématique, compilant la variabilité de plusieurs gènes identifiés comme facteur de risque de la MP, pour prédire le développement et la progression de la MP (Rabey et al., 2020).

Deuxièmement, une étude utilisant des souris présentant des doubles KO constitutifs pour ALDH1A1 et ALDH2 a montré que ces souris présentaient des déficits moteurs dans le test du rotarod, dont la sévérité augmente avec l'âge des souris. Les altérations motrices induites par le double KO sont réduites suite à l'injection de L-DOPA, montrant le lien avec la transmission dopaminergique (Wey et al., 2012) (**Tableau 3**). La double délétion d'ALDH1A1 et d'ALDH2 induit également une diminution de la survie des neurones dopaminergiques de la SNc dans l'étude de Wey et al., 2012. Cependant un résultat opposé a été observé chez des souris simple KO constitutif pour ALDH1A1, avec une augmentation de l'expression de TH dans les neurones dopaminergiques et une absence d'altération motrice chez ces souris (Anderson et al., 2011). Ces résultats suggèrent un rôle compensatoire de ALDH2 chez la souris pour la survie des neurones dopaminergiques et la fonction motrice sous contrôle de la signalisation dopaminergique. Néanmoins, les 2 études montrent une altération du métabolisme de la DA et de sa libération (Anderson et al., 2011; Wey et al., 2012). Plus récemment, l'étude de Wu et al., 2019 a mis en évidence le rôle spécifique de la sous-population de neurones dopaminergiques exprimant ALDH1A1 au niveau de la SNc dans les altérations motrices citées ci-dessus. Ils ont montré que l'ablation génétique (c'est à dire KO conditionnel, inductible à l'âge adulte dans des régions spécifiques par l'injection de virus AAV, système Cre-Lox) de cette sous-population de neurones dopaminergiques dans la SNc induisait de sévères déficits d'apprentissage moteur dans le test du rotarod et une diminution de la vitesse de marche dans l'open field. Un traitement à la L-DOPA permet d'augmenter la vitesse de marche mais pas la capacité d'apprentissage du mouvement, étudiée par la répétition du test du rotarod. Cette étude montre le rôle essentiel de cette sous-population de

neurones dopaminergiques exprimant ALDH1A1 dans l'apprentissage moteur.

Une autre étude a mis en évidence l'importance des neurones ALDH1A1⁺ dans la vigueur du mouvement lors de l'apprentissage moteur, en utilisant là aussi des KO conditionnels de ALDH1A1 dans la SNc (Carmichael et al., 2021). La vigueur d'un mouvement est définie comme le résultat de plusieurs paramètres prenant en compte la vitesse, l'amplitude, la durée et le nombre de répétition d'un mouvement (Dudman and Krakauer, 2016).

Les territoires de projection des neurones dopaminergiques ALDH1A1⁺ ont également été étudiés. Les afférences dopaminergiques de ces neurones ALDH1A1⁺ projettent majoritairement sur le striatum antérieur et intermédiaire au niveau de la partie dorsolatérale. Cependant, seule une petite partie de ces projections innerve les striosomes (Poulin et al., 2014; Sgobio et al., 2017; Wu et al., 2019). Compte tenu de la forte expression d'ALDH1A1 dans ces compartiments et du rôle de l'enzyme de synthèse de l'AR dans le maintien de l'intégrité de ces compartiments à l'âge adulte, on peut supposer l'existence d'une synthèse locale d'ALDH1A1 au niveau des striosomes. A l'inverse, la majorité des projections reçues par les neurones dopaminergiques ALDH1A1⁺ de la SNc proviennent des striosomes (Carmichael et al., 2021; Sgobio et al., 2017; Wu et al., 2019). Ces données suggèrent une innervation partiellement réciproque des neurones ALDH1A1⁺ de la SNc et des striosomes du striatum (Wu et al., 2019).

Troisièmement, il a été montré que les neurones dopaminergiques exprimant ALDH1A1 sont plus susceptibles de dégénérer dans la MP (Damier et al., 1999; Liu et al., 2014; Poulin et al., 2018). Les données obtenues à partir de cerveaux de patients parkinsoniens suggèrent une diminution de l'expression du gène codant pour ALDH1A1 et une dégénérescence précoce des neurones ALDH1A1⁺ par rapport aux autres neurones dopaminergiques (Cai et al., 2014; Liu et al., 2014). Cette sous-population ALDH1A1⁺ représente 63 % du nombre total de neurones dopaminergiques de la SNc chez la souris (Wu et al., 2019). Lorsque l'on s'intéresse aux sous-territoires de la SNc, on remarque que 95 % des neurones dopaminergiques présents dans la partie ventrale de la SNc sont ALDH1A1⁺, or c'est la partie de la SNc où la dégénérescence des neurones dopaminergiques est la plus importante dans la MP (Cai et al., 2014; Kordower et al., 2013; Liu et al., 2014). De plus cette distribution topographique des neurones dopaminergiques ALDH1A1⁺ est conservée entre la souris et l'Homme (Liu et al., 2014).

Ces observations amènent à se questionner sur le rôle d'ALDH1A1 ; est-ce un marqueur de neurodégénérescence ou un marqueur de neuroprotection ? Il semblerait que ALDH1A1 soit un marqueur de neuroprotection, puisqu'il a été montré que chez l'Homme les neurones dopaminergiques perdaient l'expression de ALDH1A1 avant de dégénérer (Cai et al., 2014; Galter et al., 2003; Grünblatt, 2018; Liu et al., 2014). Pour confirmer cette hypothèse, l'étude

de Liu et al., 2014, a utilisé des souris mutantes A53T, modélisant la MP *via* une surexpression de la protéine α -synucléine. Ils ont montré que les neurones ALDH1A1⁺ de la SNc étaient plus résistants face à la neurodégénérescence induite par l' α -synucléine, ce résultat ayant été confirmé *in vitro* avec une surexpression d'ALDH1A1. De plus ils ont montré qu'un KO constitutif d'ALDH1A1 chez ces souris A53T induisait une augmentation de l'agrégation d' α -synucléine, probablement médié par une accumulation de DOPAL en l'absence d'ALDH1A1 (**Tableau 3**).

L'hypothèse des catécholaldéhydes citée précédemment (Voir **Chapitre 2.**) permettrait d'expliquer cette prédisposition à la dégénérescence des neurones dopaminergiques perdant l'expression de ALDH1A1. Pour rappel, le DOPAL est toxique pour les neurones dopaminergiques puisqu'il induit une augmentation du stress oxydatif et favorise l'agrégation de la protéine α -synucléine (Burke et al., 2008; Goldstein, 2020). Le DOPAL peut être dégradé en DOPAC par les enzymes ALDH, dont le sous-type ALDH1A1 (Marchitti et al., 2007). La perte d'expression de ALDH1A1 favoriserait donc la mort des neurones dopaminergiques *via* une accumulation de DOPAL (Goldstein, 2020; Goldstein et al., 2014; Panneton et al., 2010). Cette hypothèse est en accord avec l'augmentation des taux de DOPAL dans le striatum de souris constitutivement KO pour ALDH1A1 et ALDH2, associée à une augmentation de la mort des neurones dopaminergiques (Wey et al., 2012).

Par ailleurs il a été montré, de façon empirique, qu'une inhibition d'ALDH1A1 suite à une intoxication au disulfiram (molécule du médicament Antabuse® pour le traitement de l'alcoolisme) a conduit à l'apparition de symptômes parkinsoniens chez ces patients (Charles et al., 2006). L'activité des enzymes ALDHs peut également être inhibée par certains pesticides, comme la roténone et le bénomyl (Casida et al., 2014; Fitzmaurice et al., 2014; Leiphon and Picklo, 2007). La roténone ayant été identifiée comme un facteur de risque de la MP, ces études soulignent le rôle crucial des enzymes ALDHs dans la survie des neurones dopaminergiques (Bourdenx et al., 2015b; Goldman, 2014).

Bien que l'on ait mis en évidence l'importance de l'activité d'ALDH1A1 dans l'homéostasie du système dopaminergique nigro-strié et par extension son rôle dans la signalisation des ganglions de la base, l'origine de la perte d'expression d'ALDH1A1 pour cette sous-population de neurones dopaminergiques reste inconnue.

En conclusion, on observe une diminution inhérente à l'âge du nombre de neurones dopaminergiques de la SNc, cette dégénérescence étant accélérée dans le cadre de la MP (Fearnley and Lees, 1991) conduisant à un déséquilibre entre la voie directe et la voie indirecte dans les ganglions de la base et *in fine* à l'apparition des symptômes moteurs caractéristiques de la MP. L'ensemble des études cliniques citées précédemment suggère que la vitamine A,

par l'intermédiaire de son métabolite actif, l'AR, et de ses récepteurs RAR et RXR, pourrait jouer un rôle protecteur dans l'étiologie de la MP. Plus précisément, la signalisation des rétinoïdes pourrait contribuer au maintien de l'équilibre dynamique entre la signalisation cholinergique et dopaminergique au sein de la voie nigro-striée, nécessaire au contrôle du mouvement volontaire. L'expression de l'enzyme de synthèse de l'AR, ALDH1A1, semble également jouer un rôle crucial dans la préservation des neurones dopaminergiques de la SNc et la signalisation bi-directionnelle entre la SNc et le compartiment striosomal du striatum. Si le lien entre l'altération, ou le renforcement, de la signalisation des rétinoïdes et le système dopaminergique nigro-strié semble clairement établi, il est moins évident en ce qui concerne les interventions nutritionnelles. Par ailleurs, l'altération de la signalisation des rétinoïdes dans ces études est principalement initiée dès la période développementale (KO constitutif des récepteurs, carence post-natale). Ainsi, des études complémentaires sont nécessaires pour comprendre l'implication de cette altération sur l'intégrité de la voie nigro-striée à l'âge adulte.

HYPOTHÈSES & OBJECTIFS

La vitamine A est apportée à l'organisme exclusivement par voie alimentaire, et agit par l'intermédiaire de son métabolite actif, l'AR. La signalisation des rétinoïdes, médiée par la fixation de l'AR sur ses récepteurs nucléaires RAR et RXR, contribue notamment à la mise en place et à la fonctionnalité du système dopaminergique nigro-strié, système qui est altéré dans la MP. Bien que les origines de la MP restent mal connues, son développement est attribué à une perte progressive des neurones dopaminergiques de la SNc dont les projections innervant le striatum forment la voie nigro-striée. Selon le dogme actuel, la perte de transmission dopaminergique au sein de la voie nigro-striée conduit à un déséquilibre entre les voies directe et indirecte des ganglions de la base et *in fine* à l'apparition des symptômes moteurs caractéristiques de la MP.

Si l'âge reste le facteur de risque majeur dans le développement de la maladie, la MP est une maladie multifactorielle impliquant des interactions entre un polymorphisme génétique prédisposant et des facteurs environnementaux et métaboliques. L'ensemble des hypothèses évoquées pour expliquer la dégénérescence des neurones dopaminergiques converge vers une augmentation du stress oxydatif auquel les neurones dopaminergiques sont particulièrement sensibles de par leur forte activité.

Compte tenu de son implication dans l'intégrité du striatum et de la voie nigro-striée, une altération de la signalisation des rétinoïdes pourrait constituer un facteur de risque important et contribuer à l'étiologie de la MP.

Les données obtenues chez l'Homme et l'animal indiquent un affaïssement de la voie de signalisation des rétinoïdes au cours du vieillissement (Feart et al., 2005; van der Loo et al., 2004). Des études menées chez le rat âgé suggèrent que cette diminution de la signalisation des rétinoïdes avec l'âge serait due à une altération du métabolisme hépatique de la vitamine A, conduisant à une diminution de la biodisponibilité de l'AR au niveau cérébral (Dawson et al., 2000; Dumetz et al., 2020c; Touyarot et al., 2013). Une supplémentation nutritionnelle en vitamine A semble être une piste prometteuse pour contrebalancer l'altération du métabolisme de la vitamine A liée à l'âge et ainsi maintenir l'homéostasie de la signalisation des rétinoïdes dans le cerveau (Dumetz et al., 2020c; Mingaud et al., 2008; Touyarot et al., 2013).

Outre l'âge, d'autres facteurs interviennent dans l'altération de la signalisation des rétinoïdes. Parmi ces facteurs, certains sont communs aux facteurs de risques de la MP, suggérant une fois encore l'hypothèse d'un lien entre l'altération du métabolisme de la vitamine A et le développement de la MP. Cette hypothèse est renforcée par différentes études pré-cliniques

montrant qu'une altération de la signalisation des rétinoïdes est associée à l'apparition de troubles moteurs similaires à ceux observés chez les animaux modélisant la MP (Carta et al., 2006; Krezel et al., 1998; Liao et al., 2008; Wey et al., 2012).

Parmi les mécanismes possibles par lesquels la signalisation de l'AR favorise la survie des neurones dopaminergiques, l'enzyme de synthèse de l'AR, ALDH1A1, semble jouer un rôle prépondérant. L'ALDH1A1 contribuerait notamment à la survie des neurones dopaminergiques en dégradant le DOPAL, un métabolite de la dégradation de la DA, dont l'accumulation est toxique pour les neurones dopaminergiques.

L'expression d'ALDH1A1 est modulée directement par l'AR, via sa séquence RARE située dans son promoteur, et indirectement par le facteur de transcription PITX3, dont l'expression est diminuée dans le cerveau de patients parkinsoniens (Elizondo et al., 2000; Jacobs et al., 2007; Jankovic et al., 2005). Plus précisément, l'AR active l'expression de PITX3 et ce facteur de transcription module l'expression d'ALDH1A1 (Jacobs et al., 2007; Smidt, 2017) (**Figure 20**). Cette régulation de PITX3 par l'AR a été montrée chez des souris injectées au MPTP, pour lesquelles l'injection d'AR dans le striatum augmente l'expression de PITX3 dans la SNC et prévient la mort des neurones dopaminergiques induite par l'injection de MPTP (Esteves et al., 2015).

Ainsi, nous formulons l'hypothèse qu'une diminution du métabolisme de la vitamine A, au cours du vieillissement ou induite par des facteurs génétiques et/ou environnementaux, entraîne une diminution de la synthèse d'AR par l'ALDH1A1.

La diminution de la synthèse d'AR contribuerait de surcroît à la diminution d'expression d'ALDH1A1 par manque d'activation de PITX3, cette boucle formant un premier cercle vicieux favorisant la perte d'expression d'ALDH1A1 (**Figure 20**).

Cette diminution de l'expression d'ALDH1A1 conduirait à une diminution de la dégradation du DOPAL en DOPAC, favorisant son accumulation. De plus, il est connu que le DOPAL exerce un rétrocontrôle négatif sur les enzymes responsables de sa dégradation, dont ALDH1A1 (Wey et al., 2012). Cette accumulation de DOPAL conduirait donc à un deuxième cercle vicieux favorisant son accumulation en induisant la perte d'expression d'ALDH1A1.

Nous savons que lorsqu'il n'est pas dégradé, le DOPAL s'accumule dans les terminaisons pré-synaptiques des neurones dopaminergiques qui projettent sur le striatum (Goldstein, 2020). Cette accumulation de DOPAL est toxique pour les neurones dopaminergiques en induisant une augmentation du stress oxydatif et l'agrégation de la protéine α -synucléine (Goldstein, 2020).

Au vu de ces données nous supposons que la perte d'expression d'ALDH1A1 participe *in fine* à une augmentation de la mort des neurones dopaminergiques. Cette hypothèse pourrait expliquer la vulnérabilité à la dégénérescence de la sous-population de neurones dopaminergiques présente dans la SNc, qui perd l'expression d'ALDH1A1 durant le développement de la MP (Liu et al., 2014).

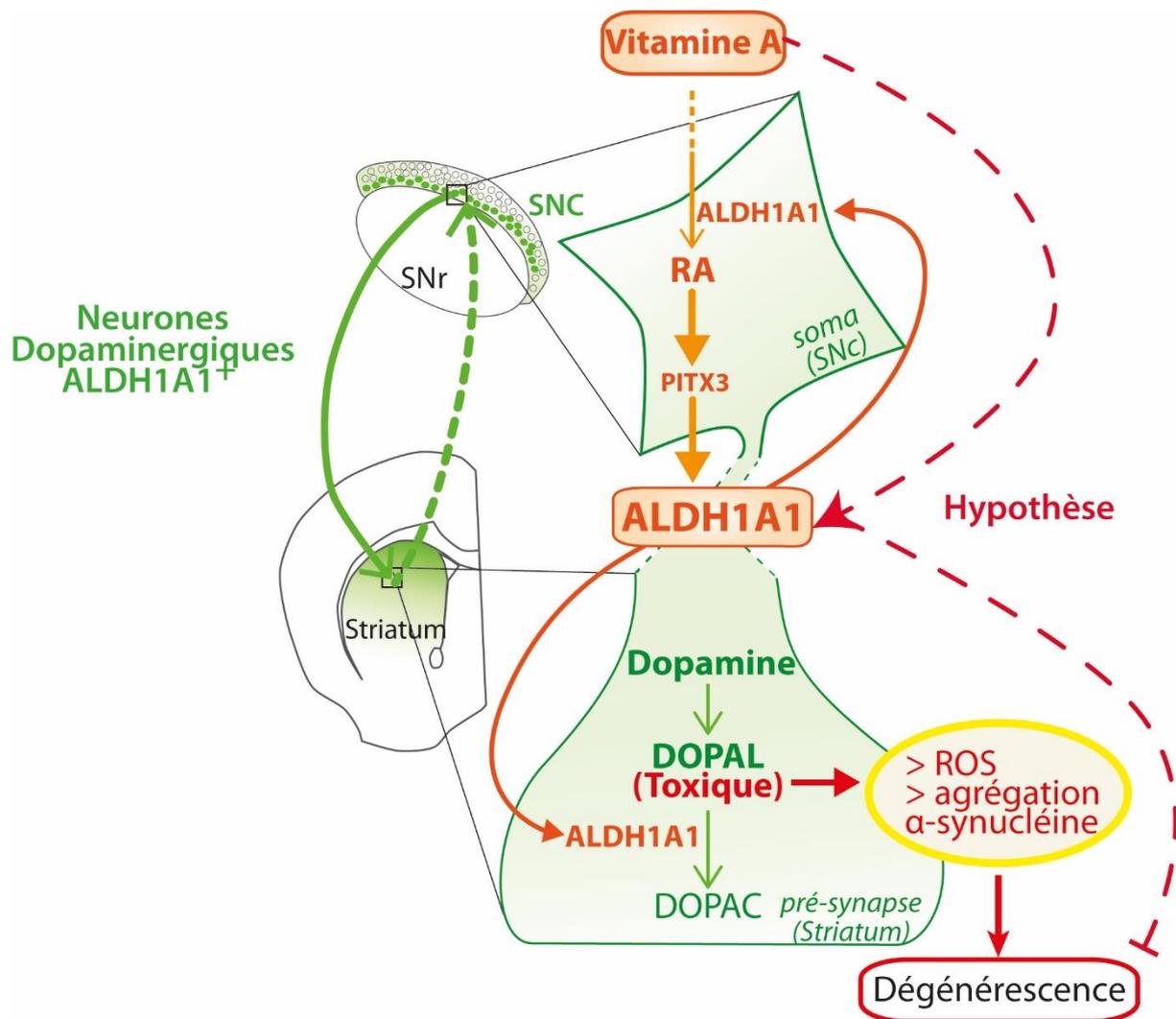


Figure 20 : Représentation schématique du double rôle d'ALDH1A1 dans le maintien de l'intégrité de la voie nigro-striée

ALDH1A1 permet la synthèse d'AR d'une part, et la dégradation du DOPAL en DOPAC d'autre part. (Adapté de Marie et al., 2021)

A partir de l'ensemble de ces données, nous avons formulé l'hypothèse générale qu'une altération du métabolisme de la vitamine A pourrait-être responsable de la perte d'expression d'ALDH1A1, et par extension être impliquée dans la pathogénèse de la MP. A l'inverse nous supposons qu'une supplémentation nutritionnelle en vitamine A permettrait de préserver l'homéostasie de signalisation des rétinoïdes en maintenant à un niveau suffisant la biodisponibilité de l'AR au niveau cérébral, préservant ainsi la signalisation dopaminergique nigro-striée.

Pour répondre à cette hypothèse, nous avons défini deux objectifs principaux au cours de cette thèse.

Objectif 1 : Evaluer l'impact d'une supplémentation nutritionnelle préventive en vitamine A dans un modèle de la MP chez le rat.

La première partie de ces travaux de thèse a été consacrée à la validation de notre hypothèse d'un potentiel effet bénéfique induit par une supplémentation nutritionnelle dans un modèle mécanistique de la MP. Pour cela nous avons modélisé la MP par une injection unilatérale dans le striatum de rats de 6-hydroxydopamine (6-OHDA) une toxine qui détruit sélectivement les neurones dopaminergiques. Les rats de 180-200g ont été soumis à un régime contrôle ou enrichi en vitamine A pendant 5 semaines avant la lésion, et les régimes ont été poursuivis 3 semaines après l'injection. Trois semaines après la lésion nous avons évalué les troubles moteurs induits par la 6-OHDA et l'effet protecteur de la vitamine A avec différents tests moteurs. L'effet de la supplémentation en vitamine A sur l'intégrité du système dopaminergique nigro-strié et l'expression d'ALDH1A1 ont été évalués par immunohistochimie et western-blot.

Les résultats de cette première étude sont décrits dans **Étude 1**.

Objectif 2 : Comprendre l'impact d'une carence nutritionnelle en vitamine A sur le système dopaminergique nigro-strié de rats à l'âge adulte.

La deuxième partie des travaux de cette thèse a été consacrée à évaluer l'effet dose-dépendant d'un apport nutritionnel en vitamine A sur l'intégrité du système nigro-strié de rats. Les rats ont été soumis à trois régime différents, un régime sub-carencé en vitamine A, un régime dit 'suffisant' et un régime enrichi en vitamine A. Cette étude a été réalisée chez des rats adultes pour une durée totale de 26 semaines. Un quatrième groupe expérimental sub-carencé durant 20 semaines puis sous régime enrichi pendant 6 semaines a été réalisé afin de voir si les effets de la carence pouvaient être reversés. Différents tests comportementaux

classiquement utilisés dans les modèles animaux de la MP ont été réalisés de façon hebdomadaire à partir de la troisième semaine de régime afin d'étudier l'impact des régimes sur le comportement moteur des rats. Les effets des différentes doses de vitamine A sur le métabolisme et la signalisation de la vitamine A dans le foie et le striatum ont été mesurés par qPCR. L'intégrité du système dopaminergique nigro-strié et l'expression d'ALDH1A1 ont été évalués par immunohistochimie dans la SNc et le striatum.

Les résultats de cette deuxième étude sont décrits dans **Étude 2**.

Ainsi, l'objectif général de cette thèse est de mieux caractériser les mécanismes d'action de la vitamine A dans le maintien de l'intégrité du système nigro-strié dans le contexte de la MP. L'originalité de ces travaux de recherche repose sur l'approche nutritionnelle pour évaluer l'effet d'un déficit ou d'un renforcement de la signalisation des rétinoïdes sur le système nigro-strié de rats adultes et les fonctions motrices associées. Par ailleurs une approche nutritionnelle est aisée à mettre en œuvre chez les patients et permet une approche préventive contre le développement de la maladie. A long terme, ce travail pourrait amener à reconsidérer à la hausse les besoins en vitamine A des personnes de 50 ans et plus.

DÉMARCHE EXPÉRIMENTALE

Au cours de cette thèse nous avons choisi de travailler chez le rat pour réaliser nos différentes approches expérimentales. Les tests comportementaux et analyses post-mortem effectués pour le modèle de la MP (**Étude 1**) et le modèle nutritionnel (**Étude 2**) sont décrits en détail dans les articles présentés dans la partie résultats de ce manuscrit. Dans cette partie démarche expérimentale nous nous focaliserons sur le choix des modèles expérimentaux puisque c'est une question fondamentale pour les études pré-cliniques en biomédical.

I. Description des modèles animaux

L'ensemble des expérimentations animales de cette thèse a été conduit sur des rats mâles afin de raffiner le nombre d'animaux utilisés. Les territoires d'expression des récepteurs RAR et RXR au niveau cérébral varient entre les rats mâles et femelles, de même que les effets de la carence en vitamine A sur les taux de rétinol dans le cerveau (Arfaoui et al., 2009, 2013). Une étude comparative entre mâles et femelles constitue donc un projet à part entière et nécessite au préalable la caractérisation des mécanismes d'action de la vitamine A sur la voie nigro-striée.

Concernant le choix de la souche de rat, nous avons utilisé des rats Wistar pour le modèle de la MP, tandis que l'étude nutritionnelle a été réalisée sur des rats Sprague-Dawley, chacune des souches étant non-consanguine. La souche Wistar est la souche utilisée au laboratoire par d'autres équipes et est classiquement retrouvée dans la littérature pour modéliser la MP par injection de 6-OHDA. Néanmoins durant cette thèse, en discutant notamment avec d'autres équipes travaillant sur des modèles de la MP, nous avons compris que la souche Sprague-Dawley pouvait-être plus adaptée pour l'étude de la fonction motrice, ce qui explique la différence de souche entre les deux études.

II. Modélisation pharmacologique de la MP chez le rat

1. Choix du modèle animal de la MP

Pour modéliser la MP chez l'animal, on distingue 2 grands types de modèles, les modèles par injection de neurotoxines et les modèles génétiques, chacun présentant des spécificités. Le choix va dépendre de la question posée (pour revue, voir : Blesa and Przedborski, 2014; Kin et al., 2019; Salari and Bagheri, 2019) (**Tableau 5**).

	Animal model	Motor behavior	SNc neuron loss	Striatal DA loss	Lewy body/Syn pathology	
Toxin-based	MPTP Mice	Reduced locomotion, bradykinesia	↑↑↑	↑↑↑	NO	
	MPTP Monkeys	Reduced locomotion, altered behavior, tremor, and rigidity	↑↑↑	↑↑↑	NO	
	6-OHDA rat	Reduced locomotion, altered behavior	↑↑↑	↑↑↑	NO	
	Rotenone	Reduced locomotion	↑↑	↑↑↑	YES	
	Paraquat/maneb	Reduced locomotion	↑↑	↑↑↑	YES	
	MET/MDMA	Reduced locomotion	↑↑	↑↑↑	NO	
Genetic mutations*	α-Synuclein	Altered behavior, reduced or increased motor activity	↑ Not consistent	↑	↑ (in old animals)	
	LRKK2	Mild behavioral alteration	NO	NO	NO	
	PINK1	No obvious alterations or reduced locomotion	NO	NO	NO	
	PARKIN	No obvious locomotion or reduced locomotion	NO	↑	NO	
	DJ-1	Decreased locomotor activity	NO	NO	NO	
	ATP13A2	Late onset sensorimotor deficits	NO	NO	NO	
	Others	SHH	Reduced locomotion	↑↑	↑↑	NO
		Nurr1	Reduced locomotion	↑↑	↑↑	NO
Engrailed 1		Reduced locomotion	↑↑	↑	NO	
Pitx3		Reduced locomotion	↑↑↑	↑↑↑	NO	
C-Rel-NFKB		Gait, bradykinesia, rigidity	↑↑	↑↑	YES	
MitoPark		Reduced locomotion, tremor, and rigidity	↑↑	↑↑	YES	
Atg7		Late onset locomotor deficits	↑↑	↑↑	YES	
VMAT2		Reduced locomotion and altered behavior	↑↑	↑↑	YES	

↑↑↑, Severe loss; ↑↑, Moderate loss; ↑, Mild loss.

Tableau 5 : Tableau résumant les caractéristiques essentielles des principaux modèles de la MP présents dans la littérature

Source : Blesa and Przedborski, 2014

- *Modèles génétiques*

Les modèles génétiques sont essentiellement réalisés chez la souris, par manipulation génétique de lignée (KO ou mutation d'un gène), ou par injection de vecteurs viraux permettant la surexpression d'une protéine. Les plus connus consistent en une mutation des gènes impliqués dans les formes familiales de la MP. Parmi eux on peut citer le modèle A53T qui induit une surexpression de la protéine α-synucléine, mais seulement une faible neurodégénérescence dans la voie nigro-striée et dont les effets moteurs associés sont variables d'une étude à l'autre (Blesa and Przedborski, 2014). L'injection par virus AAV d'α-synucléine humaine mutée dans la SNc semble mieux mimer la dégénérescence progressive des neurones dopaminergiques et est associée à des déficits moteurs et des inclusions cytoplasmiques d'α-synucléine (Bourdenx et al., 2015b; Dehay and Fernagut, 2016; Van der Perren et al., 2014). Néanmoins l'observation des altérations comportementales nécessite d'attendre plusieurs semaines, voire plusieurs mois après l'injection en fonction du type d'AAV utilisé (Blesa and Przedborski, 2014; Bourdenx et al., 2015b) (**Tableau 5**). Ainsi, les modèles

généétiques ou utilisant les vecteurs viraux permettent de mieux mimer la physiopathologie de la MP et son développement progressif que les modèles par injection de toxine. Toutefois ils nécessitent un délai plus long pour observer des altérations du système dopaminergique nigro-strié et des fonctions motrices associées. Compte-tenu du fait que notre premier objectif était de valider notre hypothèse nous avons choisi un modèle plus mécanistique de la MP par l'injection de toxine, dont la mise en place et la génération de résultats sont plus rapides.

- *Modèles par injection de toxine*

Les modèles utilisant l'injection de neurotoxine sont les plus utilisés pour étudier l'effet du traitement sur la dégénérescence de la voie dopaminergique nigro-striée (Blesa and Przedborski, 2014). Parmi ces modèles, l'injection de 6-hydroxydopamine (6-OHDA) et l'intoxication au 1-méthyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP) sont les plus étudiés dans la littérature et induisent tous deux une sévère déléition des neurones dopaminergiques de la SNc.

Le rôle du MPTP dans le développement de la MP a été initialement mis en évidence chez des toxicomanes consommant de la drogue contaminée au MPTP et développant de sévères dyskinésies. Suite à son injection, le MPTP passe la BHE et est convertit en sa forme active, le MPP+, par la MAO-B au niveau des cellules gliales. Le MPP+ est ensuite stocké dans les neurones dopaminergiques, *via* le transporteur de la DA (DAT), où il inhibe le complexe I de la chaîne mitochondriale, induisant une augmentation du stress oxydatif et la mort des neurones dopaminergiques (Goldstein et al., 2014; Salari and Bagheri, 2019). L'intérêt du MPTP est sa capacité à passer la BHE, permettant son administration par voie systémique. Néanmoins l'intoxication au MPTP induit peu d'effet sur le comportement moteur des animaux, cet effet pouvant être réversible en cas d'injection aiguë, induisant un biais dans l'expérimentation pour l'étude des fonctions motrices (Kin et al., 2019; Salari and Bagheri, 2019).

Contrairement au MPTP, la 6-OHDA ne passe pas la BHE et doit être injectée en intracérébral (les différents sites d'injection sont détaillés dans la partie suivante). La 6-OHDA possède une structure similaire à celle de la dopamine et de la norépinéphrine et possède donc une forte affinité pour les transporteurs des catécholamines, qui suite à son injection la transporte jusqu'aux neurones catécholaminergiques, dont les neurones dopaminergiques de la SNc (Salari and Bagheri, 2019). En parallèle de l'injection cérébrale de 6-OHDA, une injection intrapéritonéale de désipramine (un inhibiteur de la recapture de la noradrénaline capable de passer la BHE) permet de protéger les neurones noradrénergiques de la dégénérescence induite par la 6-OHDA (Simola et al., 2007) (**Figure 21**). La neurodégénérescence induite par

la 6-OHDA est principalement due à une augmentation massive du stress oxydatif induit par cette toxine. Suite à son incorporation dans les neurones dopaminergiques, la 6-OHDA subit une auto-oxydation rapide non enzymatique entraînant la production de ROS dont l' H_2O_2 et des quinones (Kin et al., 2019) (**Figure 21**). D'autres études suggèrent qu'elle induirait également une inhibition du complexe I de la chaîne mitochondriale (Blandini et al., 2008) (**Figure 21**). La neurodégénérescence provoquée par l'injection de 6-OHDA est associée à des déficits moteurs, dont la sévérité varie en fonction du ou des sites d'injections et de la dose de toxine (Blandini et al., 2008; Blesa and Przedborski, 2014). L'injection de 6-OHDA ne permet pas de reproduire toutes les caractéristiques de la MP, comme l'accumulation d' α -synucléine, mais ses effets sur le système nigro-strié sont reproductibles d'une étude à l'autre, ce qui en fait un modèle de choix pour étudier l'effet d'un traitement sur la dégénérescence nigro-striée et le comportement moteur associé (Blandini et al., 2008; Salari and Bagheri, 2019).

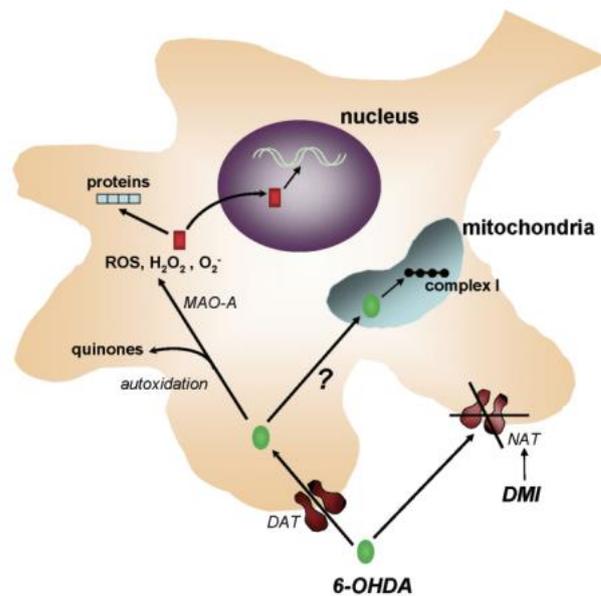


Figure 21 : Mécanismes neurotoxiques d'action de la 6-OHDA

Abréviations : DAT, transporteur de la dopamine ; DMI, Désipramine ; MAO-A, Monoamine oxydase A ; NAT, transporteur de la noradrénaline ; ROS, espèces réactives de l'oxygène. Source : Simola et al., 2007.

L'exposition aux pesticides étant reconnue comme un facteur de risque de la MP, certains d'entre eux, comme la roténone, sont également utilisés pour modéliser la MP. Tout comme le MPTP, la roténone a la capacité de passer la BHE, et son administration chronique par injection intra-péritonéale induit une dégénérescence de la voie dopaminergique nigro-striée associée à des inclusions intracytoplasmiques similaires aux corps de Lewy (Blesa and Przedborski, 2014). Cependant ce modèle présente plusieurs inconvénients incluant un fort taux de mortalité suite à l'administration de roténone et induit une variabilité phénotypique ainsi que des altérations non spécifiques ciblant également les systèmes sérotoninergique et noradrénergique, le rendant peu reproductible (Kin et al., 2019; Salari and Bagheri, 2019). De plus, la roténone étant connue pour induire une inhibition des ALDHs, son utilisation aurait donc introduit un biais dans notre étude pour évaluer l'expression d'ALDH1A1 (Casida et al., 2014).

Au regard de ces informations, et afin de pouvoir évaluer l'impact préventif d'un régime enrichi en vitamine A sur la dégénérescence nigro-striée et le comportement moteur associé, nous avons choisi de modéliser la MP par des injections de 6-OHDA.

En ce qui concerne les modèles rongeurs, l'injection de 6-OHDA est, d'après la littérature (Iancu et al., 2005; Salari and Bagheri, 2019), principalement effectuée chez le rat chez qui l'injection stéréotaxique de toxine est plus facilement réalisable que chez la souris. Par ailleurs le step test et le test du cylindre, utilisés durant cette thèse pour évaluer le comportement moteur sont plus difficilement réalisables chez la souris (comptage du nombre de pas plus difficile). De plus, la modulation nutritionnelle de la vitamine A est plus pertinente chez le rat que chez la souris, car le métabolisme du rat est plus sensible aux taux de rétinol que la souris. Pour l'ensemble de ces raisons nous avons choisi de réaliser les modèles expérimentaux de cette thèse chez le rat plutôt que la souris.

2. Caractérisation du modèle 6-OHDA utilisé

- *Le modèle 6-OHDA*

L'injection de 6-OHDA peut classiquement être réalisée à 3 endroits différents dans le cerveau ; le striatum, la SNc et le faisceau des fibres de la SNc au striatum (MFB pour « medial forebrain bundle), la structure choisie dépend du résultat recherché. Une injection dans la SNc ou le MFB induit une lésion rapide et massive des neurones dopaminergiques de la SNc, associée à de sévères déficits moteurs (Kin et al., 2019). L'injection intrastriatale de 6-OHDA induit une détérioration rapide des terminaisons axonales dopaminergiques dans le striatum,

suivie d'une dégénérescence rétrograde des neurones dopaminergiques de la SNc, un peu plus lente comparée à l'injection dans le MFB ou la SNc (Blandini et al., 2008; Kin et al., 2019). La réduction du nombre de neurones dopaminergiques est également moins importante avec l'injection intrastriatale, pour laquelle on observe une déplétion d'environ 50-70 % du nombre total de neurones dopaminergiques de la SNc (Blandini et al., 2008). L'injection de 6-OHDA est classiquement réalisée en unilatéral, l'hémisphère contralatéral servant de contrôle interne des effets de l'injection (les effets de l'injection sont restreints à l'hémisphère injecté). Par ailleurs, une injection bilatérale est associée à un fort taux de mortalité à la suite de la procédure, surtout pour les injections qui ciblent la SNc ou le MFB (Blandini et al., 2008). Suite à l'injection unilatérale dans le striatum, on observe une atteinte motrice claire et rapide des membres contralatéraux de l'hémisphère injecté, la sévérité de ces atteintes pouvant être mesurées dans différents tests comme le rotarod et le step test (Blandini et al., 2008). Cependant, les effets moteurs des injections dans le striatum sont très dépendants des coordonnées et du volume de la zone lésée, puisque le striatum a une régionalisation fonctionnelle forte (voir **Chapitre 2.**).

- *Caractéristiques du modèle 6-OHDA de notre étude*

Dans le cadre de notre étude nous avons choisi de réaliser une injection unilatérale intrastriatale permettant une dégénérescence rétrograde des afférences dopaminergiques. La délétion partielle de la population de neurones dopaminergiques obtenue permet également de mieux appréhender la régulation fine sur les fonctions motrices, médiée par la vitamine A.

Afin de s'affranchir d'un potentiel biais induit par le choix de l'hémisphère injecté, les animaux ont été lésés de façon randomisée entre l'hémisphère gauche et l'hémisphère droit. L'analyse des résultats comportementaux et biochimiques n'a pas montré d'effet de l'hémisphère injecté sur l'efficacité de la lésion et l'altération comportementale, ce qui est cohérent avec les résultats de l'étude de Marin et al., 2015.

L'étude de Kirik et al., 1998, a montré que les altérations motrices induites par l'injection unilatérale de 6-OHDA dans le striatum étaient plus importantes lorsqu'une même dose de toxine était répartie entre différents sites d'injections dans l'hémisphère. Ainsi nous avons choisi de réaliser 2 sites d'injections par hémisphère lésé.

Le choix des coordonnées des sites d'injections, de la dose de 6-OHDA injectée et de la vitesse d'injection a été basé sur les études de Kirik et al., 1998; Lundblad et al., 2002; Su et al., 2017.

Ainsi pour modéliser la MP, nous avons réalisé des injections stéréotaxiques unilatérales dans le striatum de rats Wistar, âgés de 11 semaines (en accord avec les données de la littérature). Nous avons réalisé 2 injections par hémisphère, de 3.5 µL chacune (7 µL/hémisphère au total) à la concentration de 2 µg/µL de 6-OHDA (14 µg/hémisphère au total) et à la vitesse de 1.5 µL/min. Les animaux contrôles ont été injectés dans les mêmes conditions, avec une solution saline à 0.9 %, utilisée pour diluer la 6-OHDA, et additionnée de 0.05 % d'acide ascorbique pour limiter l'oxydation de la 6-OHDA avant son injection. Les injections ont été réalisées aux coordonnées suivantes (données vis-à-vis du bregma selon l'atlas de Paxinos and Watson, 2007) : anteroposterior (AP) +1.2 et +0.2 mm; mediolateral (ML), ± 3.0-3.8 mm; dorsoventral (DV) -5 mm.

La mise au point des injections de 6-OHDA et des tests comportementaux utilisés a été réalisée sur une cohorte préalable à celle générée pour les résultats de l'étude 1. L'efficacité de la lésion sur la dégénérescence dopaminergique a été évaluée pour chaque animal, par immunomarquage anti-TH ou western-blot dans le striatum (voir résultats Partie 1).

La perte des terminaisons dopaminergiques dans le striatum suite à une injection intrastriatale unilatérale de 6-OHDA augmente de façon linéaire à partir de 24h après l'injection, et atteint son maximum environ 3 semaines après la lésion. La perte des neurones dopaminergiques de la SNc est initiée plus tardivement, environ 2 semaines après l'injection et est la plus effective 4 semaines après la lésion (Blandini et al., 2008). Afin de mieux appréhender l'effet de l'injection de 6-OHDA sur le comportement moteur et le potentiel effet bénéfique de la prévention nutritionnelle en vitamine A nous avons réalisé les tests comportementaux 3 semaines après la lésion (résultats, voir **Étude 1**).

III. Caractérisation des régimes en vitamine A

1. Choix des régimes en vitamine A

Les régimes en vitamine A utilisés au cours de cette thèse ont été développés et caractérisés au laboratoire, et sont fabriqués par l'équipe régimes à façon (RAF, UE 1298) du centre de recherche INRAE à Jouy-en-Josas. Ces régimes sont isocaloriques et équilibrés, ils contiennent les macronutriments et micronutriments nécessaires au bon fonctionnement de l'organisme des animaux (**Tableau 6**). La vitamine A présente dans ces régimes est sous forme de rétinyl palmitate, qui est pour rappel la forme majoritaire de stockage des esters de rétinol dans le foie (Li et al., 2014b). Les régimes utilisés dans les 2 études de cette thèse diffèrent uniquement par leur concentration en vitamine A, c'est à dire 0.4 UI, 5 UI ou 20 UI/g d'aliments, correspondant respectivement à un régime sub-carencé, un régime suffisant et un régime enrichi en vitamine A. Les raisons concernant le choix d'un régime sub-carencé en

vitamine A à 0.4 UI/g d'aliments et l'âge des animaux pour l'initiation de la carence sont détaillées dans la partie suivante.

Plusieurs études, notamment celles menées à Bordeaux, ont montré qu'un régime contenant 5 UI/g d'aliments de rétinol était suffisant pour couvrir les besoins en vitamine A de l'organisme, chez le rat et la souris (Bonhomme et al., 2014b; Carta et al., 2006; Enderlin et al., 2000; Etchamendy et al., 2003; Mingaud et al., 2008). Différentes doses et durées de supplémentation nutritionnelle en vitamine A ont été testées dans la littérature. Les études de Mingaud et al., 2008; Touyarot et al., 2013, utilisent une supplémentation à 45 UI/g d'aliments tandis que les études de Bonhomme et al., 2014b; Dumetz et al., 2020a, 2020b, utilisent une supplémentation à 20 UI/g d'aliments. L'ensemble de ces études a montré un effet bénéfique de la supplémentation en vitamine A sur les déficits mnésiques induits par l'âge ou une carence en vitamine A. Par ailleurs les études de Bonhomme et al., 2014b et Dumetz et al., 2020a, 2020b ont montré que seulement 4 semaines de supplémentation (contre 4 mois dans l'étude de Touyarot et al., 2013) suffisaient pour améliorer les fonctions cognitives chez le rongeur âgé ou carencé en vitamine A. Les 4 semaines de supplémentation à 20 UI/g d'aliments sont également suffisantes pour normaliser les niveaux de rétinol plasmatique, d'AR dans l'hippocampe, ainsi que le niveau d'expression des enzymes hépatiques du métabolisme de la vitamine A (Dumetz et al., 2020c).

A partir de ces données de la littérature nous avons choisi d'utiliser une supplémentation nutritionnelle en vitamine A modérée, à 20 UI/g d'aliments, afin de limiter le risque éventuel d'intoxication aux rétinoïdes. En effet, en vue d'une étude chez l'Homme, il est intéressant de rechercher la plus faible dose à laquelle la supplémentation induit un effet. La supplémentation est ainsi plus facile à mettre en place et moins susceptible d'engendrer des effets délétères. D'après la littérature existante, nous avons choisi dans le modèle 6-OHDA de la MP, une supplémentation nutritionnelle préventive en vitamine A de 5 semaines avant la lésion, avec une poursuite du régime pendant les 3 semaines post-lésion.

Description	Quantité (en %)
Cellulose	2
Caséine chlorhydrique	18
Composé minéral 102	4
Composé vitaminique 102 sans vitamine A	1
Vitamine A	0.4 UI, 5UI ou 20UI /g d'aliment
DL Méthionine	0,1
Amidon de maïs	45
Sucre semoule	24.9
Huile d'arachide	2,5
Huile de colza	2,5

Tableau 6 : Composition des régimes sub-carencé (0.4 UI), suffisant (5 UI) et enrichi en vitamine A (20 UI)

Abréviation : UI, Unité internationale ; 1 UI = 0.3 µg de rétinol

2. Le modèle de carence nutritionnelle en vitamine A

Plusieurs études ont montré que la carence nutritionnelle en vitamine A était plus difficile à induire chez la souris que chez le rat (Etchamendy et al., 2003; Lane and Bailey, 2005; McCaffery et al., 2003). En effet dans l'étude de Etchamendy et al., 2003, il faut attendre 39 semaines de carence chez la souris pour observer des déficits de mémoire spatiale, contre 14 semaines chez le rat dans l'étude de (Bonhomme et al., 2014b). Cette variabilité inter-espèce peut être expliquée par le fait que les souris naissent avec un stock hépatique de vitamine A suffisant pour couvrir les besoins de l'organisme tout au long de leur vie (McCaffery et al., 2003). Ces observations constituent un argument fort, qui nous a poussé à choisir le modèle rat plutôt que souris pour nos études.

Le modèle de carence nutritionnelle en vitamine A permet de mimer une altération de la signalisation des rétinoïdes, induite par l'âge chez l'Homme (Enderlin et al., 2000; Etchamendy et al., 2003). Compte tenu des stocks hépatiques en vitamine A qui se forment tout au long de la vie, plus on avance dans le développement de l'animal et plus la carence nutritionnelle est difficile à induire. En effet, les stocks hépatiques sont mobilisés en fonction des besoins de l'organisme et en cas de déficit d'apport en vitamine A (Alapatt et al., 2013; D'Ambrosio et al., 2011). Ces observations pourraient expliquer pourquoi la majorité des carences nutritionnelles en vitamine A réalisées dans la littérature sont initiées durant la période développementale du

rat ou de la souris (Carta et al., 2006; Dumetz et al., 2020a; Enderlin et al., 2000; Etchamendy et al., 2003). Néanmoins il a été montré que ces carences développementales (à partir du sevrage ou plus tôt dans la gestation) induisaient des déficits de prise de poids chez les animaux carencés comparés aux animaux sous régime contrôle, assimilables à des déficits de croissance (Bonhomme et al., 2014b; Cocco et al., 2002; Dumetz et al., 2020a).

Afin de s'affranchir de la période développementale et d'étudier l'implication de la signalisation des rétinoïdes sur l'homéostasie du système dopaminergique nigro-strié à l'âge adulte, nous avons fait le choix d'initier la carence nutritionnelle chez des rats de 180-200g (environ 6 semaines), soit au début de l'âge adulte.

Des études préalablement menées au laboratoire ont montré qu'une carence nutritionnelle totale en vitamine A (0 UI/g) à partir du sevrage (rats de 60 g maximum) induisait des déficits moteurs sévères à partir de 13 semaines de carence, allant jusqu'à une paralysie du train arrière (**Figure 22**). Afin de pouvoir évaluer les performances motrices des animaux durant les 6 mois de l'étude nutritionnelle, nous avons choisi de réaliser une sub-carence en vitamine A avec un régime contenant 0,4 UI/g d'aliments (résultats, voir **Étude 2**).

Pour pouvoir mesurer l'effet d'une diminution de la signalisation des rétinoïdes sur le système nigro-strié de rats adultes sur le long terme nous avons maintenu la déprivation en vitamine A durant 6 mois. L'effet de la sub-carence sur le statut en vitamine A des animaux a été évalué par des dosages plasmatiques de rétinol à 7 et 16 semaines de régime (résultats, voir **Étude 2**). L'effet bénéfique d'une supplémentation nutritionnelle en vitamine A avec 20 UI/g d'aliments pour reverser les déficits mnésiques induits par l'âge (Dumetz et al., 2020c) ou par 10 semaines de carence chez le rat (Bonhomme et al., 2014b) a été observé dès 4 semaines de supplémentation. Etant donné que la déprivation en vitamine A chez nos animaux était 2 fois plus longue et que nous ne connaissions pas les effets qu'elle induirait au niveau moléculaire sur le système nigro-strié, les animaux ont été maintenus sous régime enrichi en vitamine A pendant 6 semaines (résultats, voir **Étude 2**)

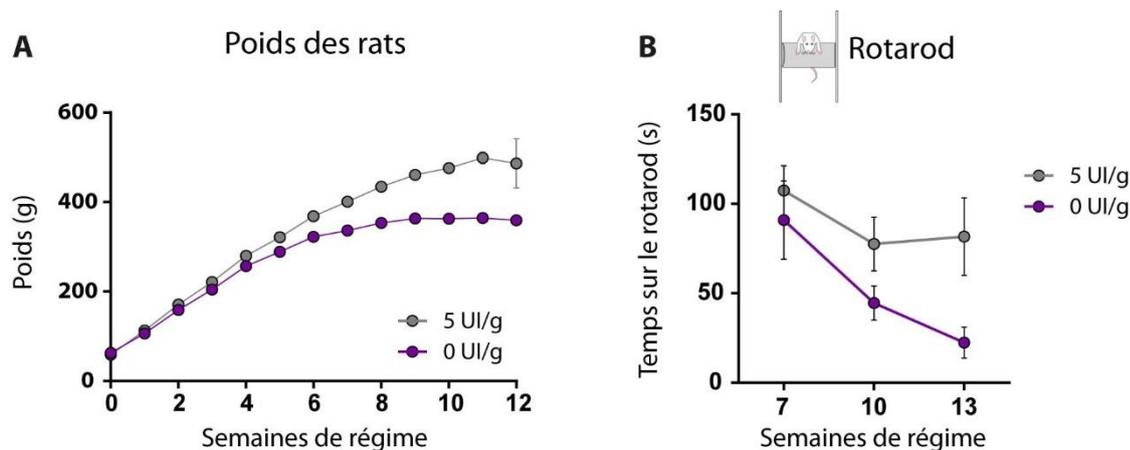


Figure 22 : Effet d'une carence totale en vitamine A initiée au sevrage sur le poids et le comportement moteur des rats.

Etude réalisée au laboratoire, où des rats sevrés ont été soumis à un régime carencé en vitamine A (0 UI/g d'aliments) ou suffisant (5 UI/g d'aliments) pendant 13 semaines. La carence totale en vitamine A initiée pendant la période développementale induit une diminution du poids des rats à partir de la 7^e semaine de régime (A) ainsi que des déficits moteurs évalués par le test du rotarod dès la 13^e semaine (B).

IV. Choix des tests comportementaux

L'objectif de ces tests comportementaux était d'évaluer le comportement moteur des rats en réponse à l'injection de 6-OHDA et des différents régimes en vitamine A. Le test du rotarod, le step test et le test du cylindre sont classiquement utilisés dans les modèles de la MP pour évaluer l'effet de la dégénérescence dopaminergique et des différents traitements sur l'activité locomotrice des animaux. Ces tests ont également été utilisés dans l'étude nutritionnelle afin d'évaluer le rôle de la vitamine A dans l'intégrité fonctionnelle de la voie nigro-striée et les comportements moteurs associés.

1. Le test du rotarod

Dans le test du rotarod on mesure la capacité de l'animal à maintenir son équilibre sur un axe rotatif. Le rat est placé sur un axe rotatif à vitesse croissante (5-45 rpm) et l'on mesure le temps de latence avant la chute du rat ; plus le rat tombe vite, plus sa coordination motrice est altérée (Carter et al., 2001). Afin d'évaluer uniquement les aptitudes motrices du rat, les animaux sont préalablement entraînés (avant l'injection pour le modèle MP ; à 3 semaines de régime pour le modèle nutritionnel), à vitesse constante, avant l'initiation du premier test. Cependant, le

test du rotarod a été réalisé plusieurs fois dans les 2 études de cette thèse, ce qui a vraisemblablement induit un apprentissage moteur chez les animaux. Comme discuté ensuite dans les résultats et la discussion, cet apprentissage a pu masquer certains déficits moteurs chez les animaux.

2. Le step test

Le step test permet également d'évaluer la capacité du rat à maintenir son équilibre et à initier un mouvement. Le rat est maintenu par l'expérimentateur de façon à ce que seule une de ses deux pattes avant repose sur la paillasse. L'expérimentateur induit un mouvement latéral, vers la gauche ou vers la droite, de façon à déséquilibrer le rat qui doit en retour déplacer sa patte avant pour maintenir son équilibre. Le rat est manipulé plusieurs jours consécutifs avant l'initiation du premier test pour le familiariser à la procédure et limiter son anxiété (Kirik et al., 1998). Les rats avec des altérations de la voie nigro-striée n'initient pas le mouvement de leur patte antérieure pour maintenir leur équilibre (Schallert et al., 1979). Ce test est classiquement utilisé dans les modèles 6-OHDA avec une injection unilatérale de toxine, pour étudier le nombre de pas fait par la patte contralatérale de l'hémisphère injecté (Kirik et al., 1998). Dans le modèle nutritionnel le step test est utilisé pour mesurer l'équilibre postural du rat et sa capacité à initier un mouvement en réponse à un déséquilibre induit par l'expérimentateur (Fleming, 2004; Ijomone et al., 2014).

3. Le test du cylindre

Le test du cylindre évalue l'initiation d'un mouvement volontaire par le rat pour explorer un nouvel environnement en réponse à son instinct naturel (Su et al., 2017). Les animaux sont placés dans un cylindre vertical en plexiglas pendant 3 minutes. L'instinct explorateur des rats les pousse à se redresser sur leurs pattes arrière pour explorer les parois du cylindre. A l'aide d'un enregistrement vidéo, l'expérimentateur compte le nombre d'appuis fait avec chaque patte avant par le rat sur la paroi du cylindre. Dans le cas d'une lésion unilatérale à la 6-OHDA, le rat continue à avoir une activité de redressement pour explorer le cylindre, mais le nombre de pas fait par la patte contralatérale de l'hémisphère injecté est significativement diminué (Winkler et al., 2000). Contrairement au test du rotarod et au step test, dans le test du cylindre le rat n'est pas contraint par l'expérimentateur à initier un mouvement, on évalue donc l'initiation d'un mouvement volontaire par l'animal. Le mouvement volontaire est contrôlé implicitement par la motivation à produire un mouvement, laquelle est modulée par les neurones dopaminergiques de la voie nigro-striée (Dudman and Krakauer, 2016). Ainsi, une diminution du nombre d'appuis dans le test du cylindre laisse suggérer une diminution de la

motivation de l'animal à initier un mouvement.

4. Evaluation de l'activité locomotrice dans des cages d'actimétrie

Ce test n'a été réalisé que pour le modèle nutritionnel. A la fin des 6 mois de régime en vitamine A, l'activité locomotrice spontanée des rats a été enregistrée pendant 24h dans des cages d'actimétrie. L'enregistrement sur 24h permet de prendre en compte l'activité des animaux pendant la phase nocturne (18h-6h) et pendant la phase diurne (6h-18h), correspondant respectivement à la phase d'activité et la phase de repos des rats. Les cages sont équipées de cellules photovoltaïques déclenchées lors du passage des animaux. L'activité locomotrice des rats correspond à l'activité horizontale dans la cage et a été enregistrée par ordinateur (Bonhomme et al., 2019). Néanmoins, ce test comportemental n'a pas apporté d'information complémentaire sur un potentiel effet des régimes en vitamine A sur l'activité locomotrice des rats. C'est pourquoi ces résultats ne seront pas montrés dans la suite du manuscrit.

V. Analyses post-mortem

1. Utilisation des tissus

Un des objectifs de cette thèse était d'optimiser l'information apportée par chaque animal et de limiter ainsi le nombre d'animaux utilisés sans perdre en puissance statistique, notamment au niveau des analyses biochimiques.

- *Euthanasie et utilisation des cerveaux*

L'expression des récepteurs RAR et RXR peut être modulée en fonction des phases du rythme-circadien des animaux (Navigatore-Fonzo et al., 2013). Ainsi l'ensemble des rats ont été euthanasiés le matin.

Pour les animaux modélisant la MP, la méthode utilisée pour récupérer les tissus diffère en fonction du type d'analyse post-mortem effectuée sur les cerveaux. En effet, pour ces animaux nous ne pouvons pas diviser les cerveaux en 2 parties, l'hémisphère controlatéral à la lésion servant de contrôle interne de l'injection ; nous avons donc utilisé une partie des animaux pour les analyses biochimiques (WB et HPLC) et l'autre partie pour les analyses immunohistochimiques sur les cerveaux. Les animaux utilisés dans les analyses biochimiques ont été anesthésiés avec de l'isoflurane puis décapités, tandis que pour les animaux utilisés en immunohistochimie on a réalisé une perfusion intracardiaque au paraformaldéhyde (PFA),

pour fixer les tissus, avant la décapitation (voir **Étude 1**).

Pour les animaux de l'étude nutritionnelle, l'hémisphère droit de chaque animal a été utilisé pour les analyses par RT-qPCR, tandis que l'hémisphère gauche a été utilisé pour les analyses immunohistochimiques. Les perfusions intracardiaques au PFA, ne permettent pas de réaliser des analyses de qPCR sur les tissus par la suite. Les animaux ont donc été perfusés avec du PBS puis post-fixés avec du PFA pour l'hémisphère gauche ; l'hémisphère droit étant immédiatement congelé dans de l'isopentane puis conservé à -80°C (voir **Étude 2**).

- *Optimisation des tissus pour les analyses biochimiques*

Pour mieux comprendre l'impact des régimes sur le système dopaminergique nigro-strié dans le modèle de la MP, nous avons analysé la fonctionnalité du système dopaminergique par chromatographie en phase liquide à haute performance (HPLC) et par western-blot (WB). Les protocoles d'extraction préexistants au laboratoire permettaient soit l'analyse des monoamines par HPLC, soit le dosage des protéines par WB. Or ces protocoles nécessitaient des tampons d'extraction incompatibles entre les deux techniques d'extraction. Durant cette thèse, nous avons donc mis au point un protocole permettant d'extraire à partir d'un même tissu les monoamines d'une part et les protéines d'autre part.

2. Analyses immunohistochimiques du striatum et de la SNc

Comme nous l'avons vu précédemment, le striatum et la SNc ne sont pas des structures uniformes. Afin d'appréhender cette complexité anatomique, nous avons dans un premier temps imagé le striatum et la SNc sur 3 niveaux selon l'axe rostro-caudal, en accord avec l'étude de Favier et al., 2017. Les 3 niveaux sont définis comme : antérieur (bregma striatum : +2.2, SNc : -5.2), intermédiaire (bregma striatum : +1.6, SNc : -5.3) et postérieur (bregma striatum : +0.7, SNc : -5.8).

Le striatum entier a été imagé au grossissement 20X en utilisant un microscope à champ large (Hamamatsu Nanozoomer 2.0 HT). Pour imagier la SNc nous avons utilisé un microscope confocal au grossissement 40X afin de pouvoir visualiser les neurones dopaminergiques et analyser les co-marquages. Pour obtenir une image de l'intégralité de la SNc au 40X nous avons réalisé des mosaïques d'images. Les paramètres d'acquisition, tel que la puissance du laser et le gain de l'image sont restés constants pour un marquage donné entre chaque animal. Les différents marquages réalisés dans les 2 études ont été mis au point au laboratoire durant la thèse. Etant donné que la TH et l'ALDH1A1 présents dans le striatum proviennent des fibres dopaminergiques de la SNc, nous avons quantifié l'intensité de fluorescence dans le striatum pour ces marquages, tandis que pour la SNc nous avons réalisé un comptage des neurones

dopaminergiques positifs pour l'un ou les deux marquages. Le marquage TH est classiquement utilisé pour identifier les neurones dopaminergiques dans la SNc et les fibres dopaminergiques dans le striatum (Spathis et al., 2017).

Les images numériques obtenues pour le striatum et la SNc ont été analysées à l'aide du logiciel Image J. Afin d'automatiser la tâche et de limiter le biais induit par l'analyse d'une coupe à l'autre, nous avons semi-automatisé l'analyse en réalisant des macros sur Image J. L'utilisation des macros Image J dans le striatum a permis de définir de manière reproductible la partie lésée par l'injection de 6-OHDA, correspondant à une absence de marquage TH, et ainsi de définir une partie lésée et une partie non lésée pour chaque animal injecté avec la 6-OHDA. Cette régionalisation de l'analyse nous a permis d'étudier s'il y avait une différence d'expression du marquage TH ou ALDH1A1 au niveau du site d'injection, induit par la supplémentation préventive en vitamine A. Nous n'avons pas observé de différence statistique du marquage entre les deux groupes nutritionnels, de même que nous n'avons pas observé d'effet compensateur au niveau de l'hémisphère non-injecté (résultats non montrés).

Concernant le marquage TH et ALDH1A1 dans le striatum des rats de **l'étude 2** (modèles nutritionnels) nous avons voulu explorer un peu plus les sous-territoires du striatum. Comme dit précédemment, outre une division selon l'axe rostro-caudal, les territoires anatomo-fonctionnels du striatum peuvent également être divisés en striatum dorsolatéral (DLS) et striatum dorsomédial (DMS) (Durieux et al., 2012; Voorn et al., 2004). De plus, les études existantes chez la souris montrent clairement que le marquage ALDH1A1 n'est pas homogène dans le striatum.

En utilisant une macro image J, nous avons régionalisé le striatum en 6 parties, pour les 3 niveaux de coupe (antérieur, intermédiaire, et postérieur) et pour chaque animal de l'étude 2 (**Figure 23**). Brièvement, en utilisant le marquage TH et l'outil « freehand » dans Image J, nous avons défini la zone correspondant au striatum entier pour chaque coupe. Les coordonnées x,y de cette zone ont ensuite été intégrées à la macro qui a divisé le striatum en 6 régions d'intérêt (ROI). Ces ROIs sont intégrées au ROI manager et sauvegardées. Etant donné que nous avons réalisé un double marquage TH-ALDH1A1 sur les coupes de striatum, les coordonnées de ces régions sont transposables entre le marquage TH et le marquage ALDH1A1 ; nous avons donc quantifié l'intensité de fluorescence pour chaque région, pour le marquage TH et pour le marquage ALDH1A1. Néanmoins, cette régionalisation du striatum n'a pas apporté d'information complémentaire sur un potentiel effet des régimes en vitamine A sur l'expression de TH et d'ALDH1A1 dans cette structure. C'est pourquoi ces résultats ne seront pas montrés dans la suite du manuscrit.

Niveau antérieur du striatum

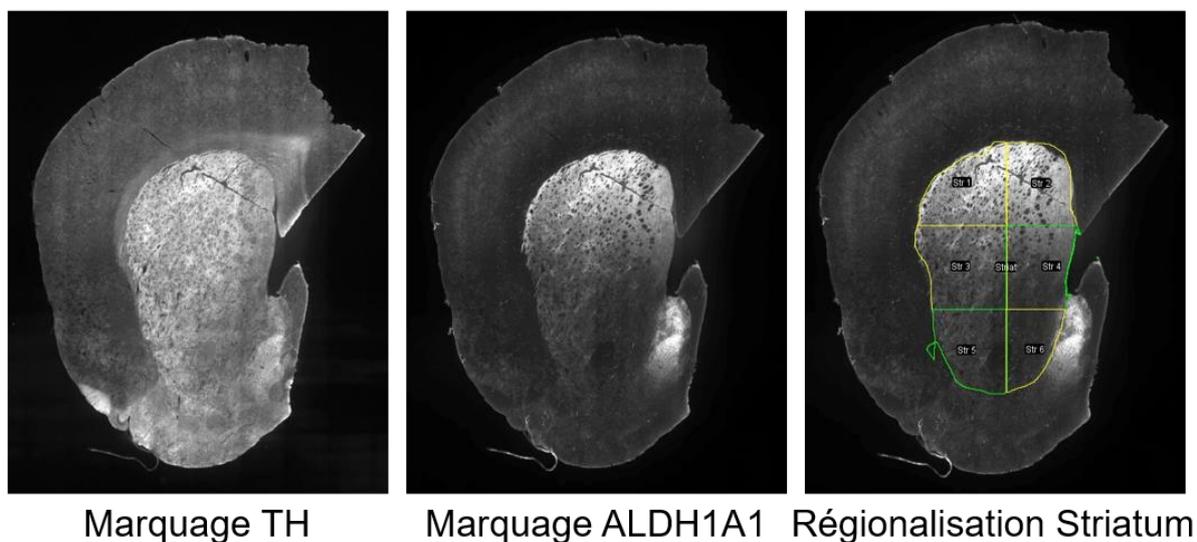


Figure 23 : Exemple de régionalisation du striatum sous image J

Abréviations : ALDH1A1, aldéhyde-déshydrogénases 1 sous-type A1 ; TH, Tyrosine hydroxylase.

VI. Analyses statistiques

L'ensemble des analyses statistiques a été réalisé avec le logiciel GraphPad prism 7.0.

Pour les analyses des résultats de **l'étude 1** sur le modèle de la MP nous avons considéré qu'il y avait 2 facteurs, un facteur injection et un facteur régime. Nous avons donc réalisé des ANOVA à deux facteurs. Une analyse ANOVA à trois facteurs a été réalisée pour évaluer l'évolution du poids des animaux et les résultats du test du rotarod afin de pouvoir intégrer le facteur temps (version 8.0 de GraphPad Prism). Une analyse post hoc, utilisant la méthode « two-stage-step-up of Benjamini » a été réalisée dans le cas d'une interaction significative entre les 2 ou les 3 facteurs. Les détails des analyses statistiques sont résumés par un tableau dans **l'étude 1**.

Pour l'analyse des résultats de **l'étude 2** sur les modèles nutritionnels, nous avons considéré qu'il n'y avait qu'un seul facteur, le facteur régime. En effet, nous avons considéré les 3 régimes en vitamine A utilisés (0, 5 et 20 UI/g d'aliments) comme un continuum, avec des doses progressives de vitamine A. Etant donné le petit nombre d'animaux par groupe (n = 8), l'ensemble des analyses a été fait avec des tests non-paramétriques. Pour la première partie de l'étude, nous avons comparé l'effet du régime entre trois groupes expérimentaux (0, 5 et 20 UI/g d'aliments), en utilisant le test de Kruskal-Wallis. Une analyse ANOVA à deux facteurs, en mesure répétée a été réalisée pour analyser l'évolution du poids des animaux, le dosage

plasmatique de rétinol et les résultats du step test afin de prendre en compte le facteur temps. Une analyse post hoc, utilisant la méthode « two-stage-step-up of Benjamini » a été réalisée dans le cas d'une interaction significative entre les groupes expérimentaux ou les 2 facteurs. Afin d'évaluer l'effet du gradient de vitamine A sur le comportement moteur, le métabolisme hépatique de la vitamine A, ainsi que la signalisation des rétinoïdes et le système dopaminergique dans le striatum, nous avons réalisé une analyse par composante principale (sparse PCA, R Studio). Cette analyse nous a permis d'identifier 20 variables, réparties en 2 composantes principales et expliquant au mieux la variabilité entre les animaux. Nous avons ensuite sélectionné ces 20 variables pour réaliser une analyse corrélative, représentée par une matrice de corrélation.

Dans la deuxième partie de l'étude, nous avons comparé l'effet d'un régime enrichi en vitamine A à l'effet d'un régime de sub-carence par immunohistochimie ainsi que sur l'expression des gènes d'intérêt dans le striatum en utilisant des tests de Mann-whitney (t-test non apparié et non paramétrique).

Enfin, pour étudier la potentielle réversibilité de l'effet de la sub-carence nous avons étudié des rats sub-carencés pendant 20 semaines (0.4 UI) puis resupplémentés (20 UI) pendant 6 semaines. Ce groupe expérimental (0.4/20 UI) a été comparé avec les résultats obtenus pour le groupe sub-carencé et le groupe enrichi en vitamine A. Pour cela, les résultats du groupe 0.4/20 UI (x_{resup}) ont été normalisés aux deux autres groupes avec une normalisation de type 'min to max', le 'min' correspondant à la médiane des résultats du groupe sub-carencé (m_{car}) pour chaque paramètre, et le 'max' à la médiane des résultats du groupe enrichi (m_{sup}) pour chaque paramètre :

$$y_{resup} = \frac{(x_{resup} - m_{car})}{(m_{sup} - m_{car})}$$

Les résultats normalisés (y_{resup}) ont été analysés en comparaison des médianes des groupes sub-carencés et enrichis séparément, par une analyse de t-test. Si les valeurs sont significativement différentes de la médiane du groupe carencé et de la médiane du groupe enrichi cela indique que les effets de la carence ne sont pas complètement réversibles par les 6 semaines de supplémentation en vitamine A. A l'inverse, si les valeurs normalisées ne sont pas significativement différentes de la médiane du groupe enrichi alors les 6 semaines de supplémentation en vitamine A ont été suffisantes pour reverser les effets de la carence sur ce paramètre.

Les détails des analyses statistiques sont résumés par un tableau dans **l'étude 2**.

RÉSULTATS

Étude 1 : Effet d'une supplémentation nutritionnelle préventive en vitamine A dans un modèle de la MP chez le rat.

*Article publié dans **Frontiers in Nutrition**, Special Issue "Nutritional Approaches for Prevention and Treatment of Neurodegenerative Diseases"*

L'objectif de cette première étude était de déterminer l'effet d'une supplémentation nutritionnelle en vitamine A sur les déficits moteurs et l'altération de la voie dopaminergique nigro-striée induits par une injection de 6-OHDA dans le striatum de rats adultes. Pour cela, les rats ont été soumis à un régime suffisant (5 UI/g d'aliments) ou enrichi (20 UI/g d'aliments) en vitamine A pendant 5 semaines avant la lésion. Trois semaines après la lésion, le comportement moteur des rats a été évalué dans le test du rotarod, le step test et le test du cylindre. Des analyses post-mortem ont permis d'évaluer le rôle préventif de la supplémentation en vitamine A sur le métabolisme de la DA et sa signalisation médiée par le récepteur D2 au sein du striatum *via* des dosages par HPLC et western blot respectivement. L'implication d'ALDH1A1 dans la voie nigro-striée chez les animaux modélisant la MP a été étudiée par immunohistochimie. Une amélioration des déficits moteurs induits par la 6-OHDA a été observée dans le test du cylindre chez les animaux supplémentés en vitamine A, mais sans effet du régime dans le test du rotarod et le step test. De façon surprenante en comparaison des données de la littérature, la supplémentation en vitamine A n'induit pas d'effet sur le métabolisme de la DA. Les analyses immunohistochimiques ne révèlent pas non plus d'effet significatif du régime enrichi en vitamine A sur l'expression d'ALDH1A1 au sein de la voie nigro-striée et la survie des neurones dopaminergiques. Ainsi, l'amélioration motrice observée dans le test du cylindre pourrait-être expliquée par l'augmentation des niveaux protéiques de D2R et de RXR γ en réponse à la supplémentation en vitamine A observée dans le striatum des rats injectés à la 6-OHDA.

Cette étude représente une première étape de caractérisation de l'implication de la vitamine A dans l'intégrité de la voie nigro-striée chez le rat adulte dans un contexte pathologique.



Preventive Vitamin A Supplementation Improves Striatal Function in 6-Hydroxydopamine Hemiparkinsonian Rats

Anaïs Marie¹, Julien Leroy¹, Morgane Darricau^{1,2†}, Serge Alfos¹, Veronique De Smedt-Peyrusse¹, Emmanuel Richard³, Sylvie Vancassel¹ and Clementine Bosch-Bouju^{1*}

¹ Institut National de Recherche pour l'Agriculture, l'Alimentation et l'Environnement (INRAE), Institut Polytechnique de Bordeaux (INP), NutriNeuro, University of Bordeaux, Bordeaux, France, ² Institut des Maladies Neurodégénératives, University of Bordeaux, Bordeaux, France, ³ Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale (INSERM), Centre Hospital-Universitaire (CHU) Bordeaux, University of Bordeaux, Bordeaux, France

OPEN ACCESS

Edited by:

Gorazd Drevenšek,
University of Primorska, Slovenia

Reviewed by:

Sung Ung Kang,
Johns Hopkins University,
United States
Alexander Hawlitschka,
University Hospital Rostock, Germany

*Correspondence:

Clementine Bosch-Bouju
clementine.bosch-bouju@inrae.fr

† Present address:

Morgane Darricau,
Institut des Maladies
Neurodégénératives, University of
Bordeaux, Bordeaux, France

Specialty section:

This article was submitted to
Nutrition and Brain Health,
a section of the journal
Frontiers in Nutrition

Received: 09 November 2021

Accepted: 05 January 2022

Published: 01 February 2022

Citation:

Marie A, Leroy J, Darricau M, Alfos S, De Smedt-Peyrusse V, Richard E, Vancassel S and Bosch-Bouju C (2022) Preventive Vitamin A Supplementation Improves Striatal Function in 6-Hydroxydopamine Hemiparkinsonian Rats. *Front. Nutr.* 9:811843. doi: 10.3389/fnut.2022.811843

Background: The mechanisms leading to a loss of dopaminergic (DA) neurons from the substantia nigra *pars compacta* (SNc) in Parkinson's disease (PD) have multifactorial origins. In this context, nutrition is currently investigated as a modifiable environmental factor for the prevention of PD. In particular, initial studies revealed the deleterious consequences of vitamin A signaling failure on dopamine-related motor behaviors. However, the potential of vitamin A supplementation itself to prevent neurodegeneration has not been established yet.

Objective: The hypothesis tested in this study is that preventive vitamin A supplementation can protect DA neurons in a rat model of PD.

Methods: The impact of a 5-week preventive supplementation with vitamin A (20 IU/g of diet) was measured on motor and neurobiological alterations induced by 6-hydroxydopamine (6-OHDA) unilateral injections in the striatum of rats. Rotarod, step test and cylinder tests were performed up to 3 weeks after the lesion. Post-mortem analyses (retinol and monoamines dosages, western blots, immunofluorescence) were performed to investigate neurobiological processes.

Results: Vitamin A supplementation improved voluntary movements in the cylinder test. In 6-OHDA lesioned rats, a marked decrease of dopamine levels in striatum homogenates was measured. Tyrosine hydroxylase labeling in the SNc and in the striatum was significantly decreased by 6-OHDA injection, without effect of vitamin A. By contrast, vitamin A supplementation increased striatal expression of D2 and RXR receptors in the striatum of 6-OHDA lesioned rats.

Conclusions: Vitamin A supplementation partially alleviates motor alterations and improved striatal function, revealing a possible beneficial preventive approach for PD.

Keywords: vitamin A, dopamine, Parkinson's disease, 6-hydroxydopamine (6-OHDA), aldehyde dehydrogenase ALDH1A1, substantia nigra *pars compacta* (SNc), striatum

INTRODUCTION

Parkinson's disease (PD) is a neurodegenerative disease with multifactorial origins that involves interactions between genetic and environmental factors (1, 2). PD mainly results from the degeneration of dopamine (DA) neurons from the substantia nigra *pars compacta* (SNc) innervating the striatum (3). PD is characterized by disabling motor symptoms, such as akinesia, bradykinesia and tremor at rest, but these motor symptoms generally appear when a large proportion of DA neurons have already degenerated (4). In this context, nutrition has recently attracted attention as a potent modifiable environmental factor for the prevention of neurodegeneration in PD (5, 6).

Vitamin A (retinol) is a lipophilic vitamin that is critical for brain development and function along life (7). Vitamin A acts through its active metabolite, retinoic acid, that binds to nuclear receptors and modulate gene transcription (8). Supporting the relevance of vitamin A for PD, vitamin A-deficient rats display motor alterations (9) and conversely, DA neurons degeneration in mouse and rat PD models is prevented by pharmacological administration of retinoic acid or derivatives (10–13). Further supporting an implication of vitamin A signaling in PD is the observation that the sub-population of DA SNc neurons that is more prone to degenerate expresses the enzyme aldehyde dehydrogenase 1 subtype A1 (ALDH1A1) (8, 14–16), the synthesis enzyme of retinoic acid. Interestingly, mice lacking ALDH1A1 enzyme or ALDH1A1⁺ neurons, exhibit motor impairments along with alterations of DA metabolism (17, 18). This evidence highlights a role for vitamin A signaling in dopamine-related motor behaviors. However, the relevance of vitamin A nutritional supplementation for the prevention of PD, which can be easier to implement in humans compared to synthetic retinoids, has been overlooked.

Here, we hypothesized that preventive vitamin A supplementation can protect DA neurons, especially those expressing ALDH1A1 enzyme. We modeled DA fibers degeneration in rats with unilateral 6-hydroxydopamine (6-OHDA) lesion in the striatum (19). We investigated the impact of preventive vitamin A supplementation with dietary vitamin A (20 IU/g of diet) for 5 weeks before 6-OHDA or sham lesion. Motor behaviors were analyzed 1 to 3 weeks after the lesion. Post-mortem analyses were performed to study retinoid metabolism and DA transmission, with a focus on ALDH1A1⁺ DA neurons. This work shows that vitamin A supplementation in 6-OHDA rats improves striatal function, with a mild protective effect measured on ALDH1A1⁺ DA neurons.

Abbreviations: 6-OHDA, 6-hydroxydopamine; TH, tyrosine hydroxylase; ALDH1A1, aldehyde dehydrogenase 1 subtype A1; SNc, substantia nigra *pars compacta*; PD, Parkinson's disease; DA, dopamine; RXR, retinoid X receptor; RAR, retinoic acid receptor; D2R, dopamine D2 receptor; IBA1, Ionized calcium binding adapter molecule 1; DOPAC, dihydroxyphenylacetic acid; HVA, homovanillic acid; GAPDH, glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase; HPLC, high performance liquid chromatography; Ctrl, control; PBS, phosphate buffer saline.

MATERIALS AND METHODS

Animals and Diet

Animals experiments were performed according to criteria of the European Communities Council Directive (2010/63/UE) and the French National Committee (authorization 16476-2018052314372190). All efforts were made to reduce the number of animals used and to minimize their suffering. A total of 66 male Wistar rats (Janvier Labs, France) was used (6-weeks old, 180–200g). Rats were housed 2 per cage and maintained in enriched and controlled environment (22°C ± 2°C, 40% of humidity), with a 12-h light/dark cycle (light on at 7 a.m.) with *ad libitum* access to water and food. Upon their arrival, rats were randomly allocated to two groups with different diet. One group received a diet with sufficient amount of retinol (5 IU retinol/g, INRAE, Jouy-en-Josas, 1 IU = 0.3 µg retinol), the second group received a similar diet but supplemented with vitamin A, with 20 IU retinol/g (INRAE, Jouy-en-Josas). The two diets differed only by the amount of retinol (retinyl acetate). Rats were weighted weekly and no body weight difference existed between the two groups at experiment onset. Animals were handled daily throughout the duration of the experiment.

Surgery

After 5 weeks of dietary treatment (5 or 20 IU/g of diet), rats were subjected to unilateral stereotaxic injections in the striatum. Animals in both groups were randomly assigned to sham (0.9% saline containing 0.05 % of ascorbic acid, ref 95210 Sigma, St.Louis, MO, USA) or 6-hydroxydopamine (6-OHDA, 2 µg/µl in 0.9% saline and 0.05% of ascorbic acid solution, Sigma, St.Louis, MO, USA) injections. 6-OHDA is a neurotoxic dopaminergic analog carried out via monoamines transporters which allows the selective loss of catecholaminergic neurons, including dopaminergic and noradrenergic neurons (20). Unilateral injections in the striatum consisted in 2 injections of 3.5 µl each (7 µl/hemisphere in total). Briefly, Animals received carprofen (5 mg/kg, i.p, CARPROX VET®, Virbac, France) for analgesia and desipramine (15 mg/kg, i.p, ref D3900, Sigma, St.Louis, MO, USA) to protect noradrenergic neurons from 6-OHDA injection. Then, rats were placed on a stereotaxic apparatus (RWD life science) under body-temperature control and constant isoflurane anesthesia (3.5 % for induction, 1.5–2 % for maintenance, in 0.2% in air at 400 ml/min). The injected hemisphere (right or left striatum) was assigned randomly for each rat and the following coordinates for the 2 injection sites were chosen (19, 21): anteroposterior from bregma (AP) +1.2 and +0.2 mm; mediolateral (ML), ± 3.0–3.8 mm; dorsoventral (DV) –5 mm. Delivery rate for injections was 1.5 µl/min (10 µl 36G nanofil syringe, World Precision Instruments, USA, and ultra-micro pump UMP3, World Precision Instruments, USA) and the syringe was left in place for 5 min after each injection before slow removal. At the end of the injections, animals were sutured and lidocaine gel (Xylocaine ® 2 % Gel, AstraZeneca, UK) was applied on the sutures. Animals were kept on a heating pad until recovery and they were monitored twice a day for 4 days following the surgery.

Behavioral Tests

Stepping Test

In order to quantify the akinesia of the contralateral forepaw induced by 6-OHDA injection, we performed stepping test as previously described (19, 22). For this test, animals were habituated for two consecutive days, three days before the first test. Briefly, rats were held by a trained experimenter over a 90 cm-long bench and only one forepaw was placed on the bench. Rats were slowly moved along the bench (right to left and reverse) and the number of adjusted steps made by each paw on the bench was counted. The procedure was performed 3 times for each paw, on both directions. The stepping test was performed twice, the first test occurring before 6-OHDA (or sham) injection (named “pre-test” thereafter), and 3 weeks after for the second test. The result for each paw is the average of 3 consecutive trials. Results are presented as the percentage of steps made by the paw contralateral to the injected hemisphere (named “lesioned paw” thereafter) compared to the total number of steps. To assess the effect of 6-OHDA injection, the result of the test 3 weeks after the injection is normalized to pre-test.

Cylinder Test

Spontaneous forelimb use was tested in the cylinder test. In a clear plexiglass cylinder (diameter: 16 cm; height: 31 cm), we quantify the number of touches made by the rat with each forepaw on the cylinder wall while rearing during 3 min-sessions (23). The cylinder test was made at only one time point, 3 weeks after stereotaxic surgery. Results are presented as the percentage of touches made by the lesioned paw, compared to the total number of touches.

Rotarod Test

Motor coordination and balance of rats were tested with rotarod test (Rota-Rod ENV-578(R), MedAssociates) as previously described (24). Briefly, rats were placed on a rotative axis and their latency to fall was measured. Each session had a maximum duration of 5 min. Three days before the first test, training sessions were performed on three consecutive days, with two sessions per day at constant speed (day 1 at 12 rpm, day 2 at 10 rpm, day 3 morning at 12 rpm and day 3 afternoon 14 rpm). For test sessions, the rotative axis followed a linear acceleration from 5 to 45 rpm. Test sessions were performed 1 week before, and 1, 2 and 3 weeks after striatal unilateral injections. Data are presented as latency to fall (s) for each animal, as automatically registered by the apparatus.

Sample Collection

Three weeks after stereotaxic injections, animals were euthanized following 2 different procedures. On one side, 36 rats were deeply anesthetized with isoflurane (5 %) and decapitated. Blood was collected from the trunk and brain was immediately frozen in isopentane and stored at -80°C . The liver was also collected and stored at -80°C for retinol assay. On the other side, 30 rats were euthanized with intraperitoneal injection of hexagon (150 mg/Kg)/lidocaine (230 mg/Kg). Blood was collected *via* an intracardiac puncture and then rats were transcatheterially perfused with paraformaldehyde (PFA) 4% solution in order to fix brain

tissues. Brains were quickly extracted, post-fixed in PFA 4% for 24 h and plunged in 30 % sucrose solution for 48 h before storage at -80°C . All Blood samples were centrifuged (10 min, $10\,000 \times g$, 4°C) and plasma was stored at -80°C until used.

Retinol Assays

Retinol was measured in liver extracts (the storage organ of vitamin A), that have been homogenized in sodium phosphate-EDTA (0.05 M, pH 7.8) buffer, and in the plasma. Retinol was extracted with a solution of tocopherol acetate (1.057 mmol/L, T3376, Sigma St.Louis, MO, USA) used as internal standard, added with a solution of hexane and butyl-hydroxy-toluene (20 mg/mL, ref B1378, Sigma St.Louis, MO, USA). Homogenates were centrifuged (2 min, 20°C , $16,000 \times g$) and the supernatant containing retinol was recovered and evaporated under nitrogen. Following evaporation, residues were treated with methanol and assayed by high performance liquid chromatography (HPLC) as previously described (25). Two vitamin A calibration standard (Chromsystems 34004) were processed in parallel with samples. Results are given in $\mu\text{mol/g}$ for the liver and in $\mu\text{mol/L}$ for the plasma.

Monoamines Measures

HPLC analyses were performed on 1 mm-punches of the striatum from brains frozen in isopentane and then stored at -80°C . To do so, 200 μm -coronal brain sections were performed using a cryostat tissue slicer (Leica Biosystems, Germany). According to rat brain atlas (21), punches of the striatum were taken between 2.20 and -1.20 -mm from bregma. Punches were immediately stored at -80°C .

As previously described (26) monoamines were extracted from striatum punches using a TissuLyser system (Qiagen, Courtaboeuf, France) in extraction buffer containing 12 mM perchloric acid, 56 μM EDTA, 0.26 mM sodium disulfite and 3 mM octanesulfonic acid. One part of the supernatant (containing proteins) was frozen at -80°C for subsequent western-blot analysis, the other part (300 μL) was used for measure of monoamines content. Total protein level for each sample was quantified using bicinchoninic acid (BCA) assay, in order to normalize HPLC results.

The monoamines of interest, DA and its main metabolites, dihydroxyphenylacetic acid (DOPAC) and homovanillic acid (HVA) were identified using HPLC coupled with an electrochemical detector as previously described (26). Results for the lesioned side were normalized to the control side for each animal.

Western Blot

Expression levels of proteins (RXR, D2R and ALDH1A1) were measured by western-blot in striatum punches. Briefly, 10 μg of proteins with 2 μL of NaOH 1 M were added to loading buffer to basify the extraction medium used for monoamines extraction. Proteins samples were loaded on 12 % sodium polyacrylamide-dodecyl sulfate gel and then transferred to nitrocellulose membranes. Membranes were saturated with a solution of PBS-tween (0.1%, TWEEN®20, P1379, Sigma St.Louis, MO, USA) milk (5%) and incubated overnight at

TABLE 1 | Reagents and resources used for western blot experimentation.

	Antibodies	Host species	Dilution	Reference
Primary	ALDH1A1	Rabbit	1:2000	HPA002123, Sigma
Secondary	Anti-rabbit IgG-HRP conjugated	Donkey	1:5000	711-035-152, Jackson ImmunoResearch
Primary	RXR γ	Rabbit	1:1500	ab53162, Sigma
Secondary	Anti-rabbit IgG-HRP conjugated	Donkey	1:5000	711-035-152, Jackson ImmunoResearch
Primary	D2R	Rabbit	1:2000	AB5084P, Merck
Secondary	Anti-rabbit IgG-HRP conjugated	Donkey	1:5000	711-035-152, Jackson ImmunoResearch
Primary	GAPDH	Rabbit	1:15 000	D16H11, Cell Signaling
Secondary	Anti-rabbit IgG-HRP conjugated	Donkey	1:20 000	711-035-152, Jackson ImmunoResearch
Primary	α -tubuline	Mouse	1:10 000	T5168, Sigma
Secondary	Anti-mouse IgG-HRP conjugated	Donkey	1:10 000	715-035-151, Jackson ImmunoResearch

TABLE 2 | Reagents and resources used for immunostaining experimentation.

	Antibodies	Host species	Dilution	Blocking solution	Reference
Primary	TH	Mouse	1:1000	3% bovine serum albumine,	mab 318, Merck
Secondary	Anti-mouse IgG-Alexa 488	Donkey	1:1000	0.3% Triton X-100, PBS	ab150105, Abcam
Primary	ALDH1A1	Rabbit	1:1000	3% bovine serum albumine,	HPA002123, Sigma
Secondary	Anti-rabbit IgG-Alexa 568	Donkey	1:1000	0.3% Triton X-100, PBS	ab175470, Abcam
Primary	IBA1	Rabbit	1:500	10% normal donkey serum,	019-19741, Fujifilm
Secondary	Anti-rabbit IgG-Alexa 488	Goat	1:1000	0.5% Triton X-100, PBS	A11008, Invitrogen

4°C with different primary antibodies (Table 1). After 1 h-incubation with secondary antibody solution (Table 1) coupled to horseradish peroxidase (HRP), chemiluminescence has been detected with peroxidase revealing solution (SuperSignal West Dura, ThermoFisher, Waltham, MA, USA) and were revealed using ChemiDoc MP (Biorad, Hercules, CA, USA). Signal intensity was quantified and normalized on GAPDH (Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase) or α -tubuline protein expression for each sample. Results are given in % of the lesioned side, normalized to the control side.

Immunofluorescence Staining

Coronal sections of 40- μ m thickness were made using a cryostat tissue slicer (Leica Biosystems, Germany) from brains post-fixed in PFA and stored at -80°C. According to (27), we selected 3 levels of interest for striatum and SNc. The 3 levels were designated as anterior (bregma striatum: +2.2, SNC: -5.2), intermediate (bregma striatum: +1.6, SNC: -5.3) and posterior (bregma striatum: +0.7, SNC: -5.8). Sections were processed for simple or double-fluorescent immunohistochemistry. After washes with PBS, sections were blocked with appropriate blocking solution depending on primary antibodies (Table 2) for 1 h at room temperature. Sections were then incubated with primary antibodies diluted in blocking solution, overnight at 4°C. The next day, sections were washed with blocking solution [or PBS for IBA1 (Ionized calcium binding adapter molecule 1) labeling] and incubated with the secondary antibody conjugated to a fluorochrome for 2 h at room temperature, protected from light. Sections were washed with PBS and then mounted in mounting medium with DAPI (sc-359850, CliniSciences, France).

Image Analysis

All striatum sections were scanned using a widefield microscope (Hamamatsu Nanozoomer 2.0 HT) with 20X (20X, NA 0.75) objective to visualize the whole striatum. SNc sections were scanned using a laser scanning confocal microscope (Leica DM5500 TCS SPE) with 40X oil-immersion objective to visualize dopaminergic neurons in the tissue. Setting parameters for acquisition, such as laser power or photomultipliers gain, were kept constant between all animals for a given labeling. Digital images obtained were processed with Image J software. In order to limit analysis bias, we used semi-automated quantification with macros on Image J.

For the striatum, image of each brain section was divided in two parts, the lesioned side, corresponding to the injected hemisphere (with 6-OHDA or saline solution) and the control side. Each side has been analyzed. For TH and ALDH1A1 staining in the striatum, we quantified the intensity of staining. We assigned green color to TH-associated fluorescence channel and magenta color to ALDH1A1-associated fluorescence channel. From TH channel, we selected the striatum from the whole brain section using the “wand” set tool in Image J, which defines the region of interest (ROI). Area and staining intensity for TH and ALDH1A1 were measured based on this ROI.

For IBA1 labeling, only the lesioned side was analyzed. We assigned green color to IBA1-associated fluorescence and we first delimited the striatum using the “freehand” set tool in image J. Then we defined parameters for “subtract background” and “rolling” that we applied to all brain sections analyzed. These tools allowed us to better isolate activated microglia labeled by IBA1 and count them afterwards. To select each activated microglia, we used the tool “process find maxima” and “analyze

TABLE 3 | Summary of statistical analysis.

Figure 2	Statistical test	n	Outcome measure	6-OHDA effect		Vitamin A effect		Time effect		
Figure 2A: Body weight	3-way ANOVA	16–18	Body weight (g)	$F_{(1,62)} = 0.2926$	$p = 0.591$	$F_{(1,62)} = 0,0802$	$p = 0.778$	$F_{(1,494,92.65)} = 3.778$	$p < 0.001^{***}$	
				6-OHDA effect		Vitamin A effect		Interaction	post-hoc test	
Figure 2B: liver retinol level	2-way ANOVA	7–9	Retinol level ($\mu\text{mol/g}$)	$F_{(1,29)} = 0.6026$	$p = 0.443$	$F_{(1,29)} = 15,19$	$p < 0.001^{***}$	$F_{(1,29)} = 0,03328$	$p = 0.856$	
Figure 2C: Plasma retinol level	2-way ANOVA	8–9	Retinol level ($\mu\text{mol/l}$)	$F_{(1,31)} = 4.661$	$p = 0.038^*$	$F_{(1,31)} = 2,687$	$p = 0.111$	$F_{(1,31)} = 0,9726$	$p = 0.331$	
Figure 2D: RXR γ expression	2-way ANOVA	5–8	RXR γ /GAPDH (AU)	$F_{(1,23)} = 0.3524$	$p = 0.558$	$F_{(1,23)} = 7,447$	$p = 0.012^*$	$F_{(1,23)} = 0,03963$	$p = 0.843$	
Figure 3				6-OHDA effect		Vitamin A effect		Interaction		
Figure 3A: Step test - Pre-test	2-way ANOVA	16–18	Total # steps	$F_{(1,62)} = 0.1438$	$p = 0.706$	$F_{(1,62)} = 0.0255$	$p = 0.874$	$F_{(1,62)} = 0.6536$	$p = 0.422$	
Figure 3A: Step test	2-way ANOVA	16–18	step test score	$F_{(1,62)} = 15.21$	$p < 0.001^{***}$	$F_{(1,62)} = 0.5599$	$p = 0.457$	$F_{(1,62)} = 0.2593$	$p = 0.612$	
Figure 3B: Cylinder test number total of steps	2-way ANOVA	16–18	Total # touches	$F_{(1,62)} = 4.704$	$p = 0.033^*$	$F_{(1,62)} = 0,05835$	$p = 0.809$	$F_{(1,62)} = 0,07746$	$p = 0.781$	
Figure 3B: Cylinder test	2-way ANOVA	16–18	Touches (% ctrl paw)	$F_{(1,62)} = 27.83$	$p < 0.001^{***}$	$F_{(1,62)} = 0,8238$	$p = 0.367$	$F_{(1,62)} = 7,439$	$p = 0.008^{**}$	5 IU sham vs 5 IU 6-OHDA $p < 0.001$; 20 IU sham vs 5 IU 6-OHDA $p = 0.006$; 20 IU 6-OHDA vs 5 IU 6-OHDA $p = 0.007$
Figure 3C: Rotarod week–1	2-way ANOVA	16–18	Time on rotarod (s)	$F_{(1,62)} = 0.1225$	$p = 0.727$	$F_{(1,62)} = 0,0441$	$p = 0.834$	$F_{(1,62)} = 0,04134$	$p = 0.839$	
				6-OHDA effect		Vitamin A effect		Time effect		
Figure 3C: Rotarod	3-way ANOVA	16–18	Time on rotarod (s)	$F_{(1,62)} = 3.687$	$p = 0.059^{\#}$	$F_{(1,62)} = 0.01228$	$p = 0.912$	$F_{(1,938,120.2)} = 1.860$	$p = 0.161$	
Figure 4				6-OHDA effect		Vitamin A effect		Interaction	PostHoc test	
Figure 4A: DA	2-way ANOVA	6–9	DA Level (% ctrl side)	$F_{(1,28)} = 57.82$	$p < 0.001^{***}$	$F_{(1,28)} = 0,141$	$p = 0.710$	$F_{(1,28)} = 0,5414$	$p = 0.468$	
Figure 4B: DOPAC	2-way ANOVA	6–9	DOPAC Level (% ctrl side)	$F_{(1,28)} = 17.9$	$p < 0.001^{***}$	$F_{(1,28)} = 0,6695$	$p = 0.420$	$F_{(1,28)} = 0,03669$	$p = 0.849$	
Figure 4C: HVA	2-way ANOVA	6–9	HVA Level (% ctrl side)	$F_{(1,28)} = 30.74$	$p < 0.001^{***}$	$F_{(1,28)} = 0,7256$	$p = 0.401$	$F_{(1,28)} = 0,4844$	$p = 0.492$	
Figure 4D: DA/DOPAC	2-way ANOVA	7–9	Ratio	$F_{(1,29)} = 7.079$	$p = 0.012^*$	$F_{(1,29)} = 0,3332$	$p = 0.568$	$F_{(1,29)} = 1,024$	$p = 0.319$	
Figure 4E: DA/HVA	2-way ANOVA	7–9	Ratio	$F_{(1,29)} = 4.185$	$p = 0.050^*$	$F_{(1,29)} = 0,2515$	$p = 0.619$	$F_{(1,29)} = 0,02674$	$p = 0.871$	
Figure 5				6-OHDA effect		Vitamin A effect		Interaction	post-hoc test	

(Continued)

TABLE 3 | Continued

Figure 5B: TH intermediate striatum	2-way ANOVA	6–7	TH Intensity (%ctrl side)	$F_{(1,23)} = 207.2$	$p < 0.001^{***}$	$F_{(1,23)} = 0,02812$	$p = 0.868$	$F_{(1,23)} = 3,779$	$p = 0.064^{\#}$	5 IU sham vs. 5 IU 6-OHDA $p < 0.001$; 20 IU sham vs. 20 IU 6-OHDA $p < 0.001$; 5 IU sham vs. 20 IU 6-OHDA $p < 0.001$; 20 IU sham vs. 5 IU 6-OHDA $p < 0.001$
Figure 5C: TH posterior striatum	2-way ANOVA	5–8	TH Intensity (%ctrl side)	$F_{(1,22)} = 210.5$	$p < 0.001^{***}$	$F_{(1,22)} = 1,224$	$p = 0.280$	$F_{(1,22)} = 5,718$	$p = 0.025^*$	5 IU sham vs. 20 IU sham $p = 0.031$; 5 IU sham vs. 5 IU 6-OHDA $p < 0.001$; 20 IU sham vs. 20 IU 6-OHDA $p < 0.001$; 5 IU sham vs. 20 IU 6-OHDA $p < 0.001$; 20 IU sham vs. 5 IU 6-OHDA $p < 0.001$
Figure 5E: TH intermediate SNc	2-way ANOVA	6–9	# TH neurons	$F_{(1,25)} = 17.66$	$p < 0.001^{***}$	$F_{(1,25)} = 0,1169$	$p = 0.735$	$F_{(1,25)} = 0,2052$	$p = 0.654$	
Figure 5F: TH posterior SNc	2-way ANOVA	6–8	# TH neurons	$F_{(1,24)} = 5.407$	$p = 0.028^*$	$F_{(1,24)} = 0,2853$	$p = 0.598$	$F_{(1,24)} = 0,5264$	$p = 0.475$	
Figure 6	Statistical test	n	Outcome measure	6-OHDA effect		Vitamin A effect		Interaction		post-hoc test
Figure 6: D2R expression	2-way ANOVA	8–9	D2R/ α -tubuline	$F_{(1,29)} = 8.001$	$p = 0.008^{**}$	$F_{(1,29)} = 2,031$	$p = 0.164$	$F_{(1,29)} = 6,87$	$p = 0.013^*$	5 IU sham vs. 5 IU 6-OHDA $p < 0.001$; 20 IU sham vs. 5 IU 6-OHDA $p = 0.006$; 5 IU 6-OHDA vs. 20 IU 6-OHDA $p = 0.007$
Figure 7				6-OHDA effect		Vitamin A effect		Interaction		post-hoc test
Figure 7B: ALDH1A1 intermediate SNc	2-way ANOVA	6–9	# ALDH1A1 neurons	$F_{(1,25)} = 26.38$	$p < 0.001^{***}$	$F_{(1,25)} = 3,186$	$p = 0.086^{\#}$	$F_{(1,25)} = 0,4866$	$p = 0.491$	5 IU sham vs. 20 IU sham $p = 0.09^{\#}$; 5 IU sham vs. 5 IU 6-OHDA $p = 0.006$; 20 IU sham vs. 20 IU 6-OHDA $p < 0.001$; 5 IU sham vs. 20 IU 6-OHDA $p = 0.019$; 20 IU sham vs. 5 IU 6-OHDA $p < 0.001$
Figure 7C: ALDH1A1 posterior SNc	2-way ANOVA	6–8	# ALDH1A1 neurons	$F_{(1,24)} = 13.25$	$p = 0.001^{**}$	$F_{(1,24)} = 1,248$	$p = 0.275$	$F_{(1,24)} = 0,7636$	$p = 0.390$	
Figure 7E: Merge intermediate SNc	2-way ANOVA	5–9	% ALDH1A1 neurons	$F_{(1,24)} = 5.675$	$p = 0.025^*$	$F_{(1,24)} = 1,247$	$p = 0.275$	$F_{(1,24)} = 0,1778$	$p = 0.677$	
Figure 7F: Merge posterior SNc	2-way ANOVA	6–8	% ALDH1A1 neurons	$F_{(1,24)} = 11.09$	$p = 0.002^{**}$	$F_{(1,24)} = 1,921$	$p = 0.178$	$F_{(1,24)} = 0,0028$	$p = 0.958$	

(Continued)

TABLE 3 | Continued

Figure 8		6-OHDA effect	Vitamin A effect	Interaction	post-hoc test
Figure 8A: ALDH1A1 expression	2-way ANOVA	8-9 ALDH1A1/ GAPDH (AU) F (1,23) = 19.28	F (1,23) = 0.05594 p = 0.814	F (1,23) = 0.3644 p = 0.550	
Figure 8C: ALDH1A1 intermediate striatum	2-way ANOVA	6-7 ALDH1A1 Intensity (AU) F (1,23) = 58.71	F (1,23) = 0.6587 p = 0.425	F (1,23) = 1.466 p = 0.238	
Figure 8D: ALDH1A1 posterior striatum	2-way ANOVA	5-8 ALDH1A1 Intensity (AU) F (1,22) = 87.44	F (1,22) = 3.488 p = 0.075 #	F (1,22) = 2.146 p = 0.157	5 IU sham vs. 20 IU sham p = 0.039 5 IU sham vs. 5 IU 6-OHDA p < 0.001 20 IU sham vs. 20 IU 6-OHDA p < 0.001 5 IU sham vs. 20 IU 6-OHDA p < 0.001 20 IU sham vs. 5 IU 6-OHDA p < 0.001

Statistical significance was assessed as #p < 0.09, *p < 0.05, **p < 0.01, ***p < 0.001.

particles” with common thresholds for all cuts. Finally, we measured the area of the striatum previously delimited and we used the function “count” to determine the number of IBA1 positive microglia in the striatum. Results are expressed in number of IBA1⁺/ striatum area (mm²) which correspond to a density of activated microglia. We also quantified the total intensity of staining for IBA1 in the striatum contralateral to the lesion, using the ROI previously defined for the counting.

For SNc, final images of the whole SNc correspond to a mosaic of several images taken individually at 40X. Both sides of SNc, lesioned and control, were imaged and analyzed. For TH and ALDH1A1 labeled in SNc, we quantified the number of positive neurons. Similar to the striatum, we assigned green color for TH staining and magenta color for ALDH1A1 staining. The silver color on figures corresponds to the merge of both colors and indicates TH and ALDH1A1 positive neurons. From TH channel, we isolated neurons from the background with a median filter and applied a threshold with common parameters for all cuts. Then, we selected labeled neurons with the tool “analyze particles” and we used the function “count” to determine the number of TH positive neurons in the SNc. The process was repeated for ALDH1A1 and merge channels, in order to determine the number of TH+ALDH1A1 positive neurons. Note that all ALDH1A1 positive neurons were also TH positive neurons.

These analyses were carried out for the anterior, intermediate and posterior level of striatum and SNc. For the striatum, results of the lesioned side are expressed as normalized to the staining intensity of the control side.

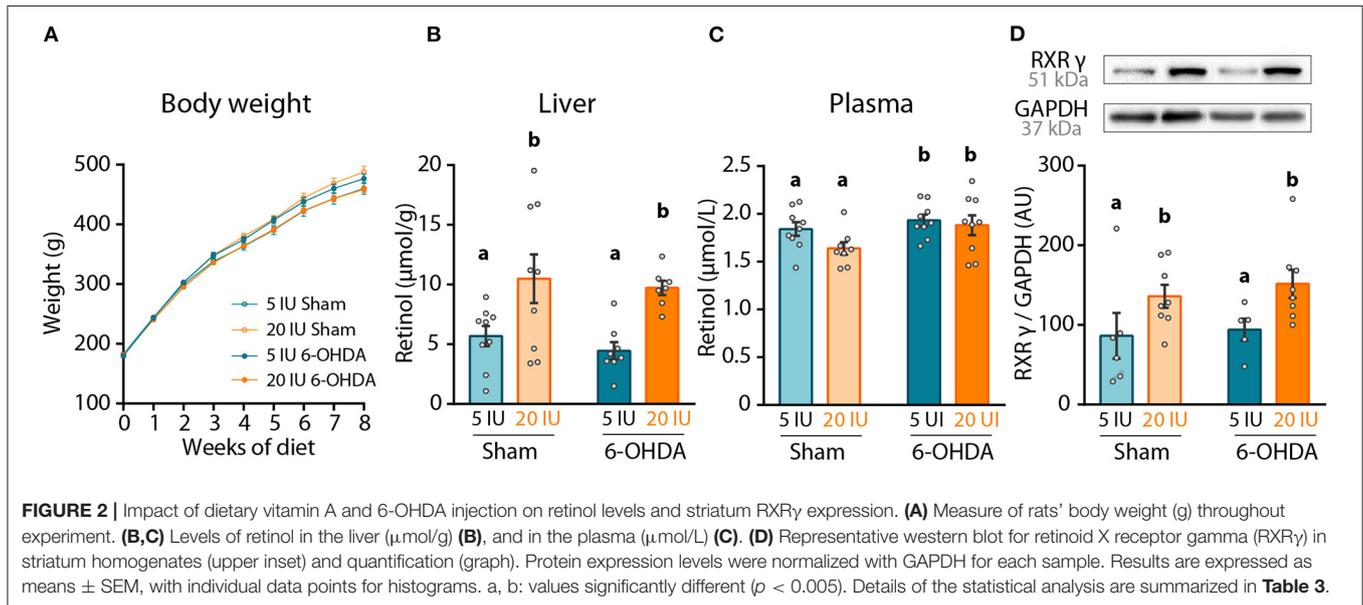
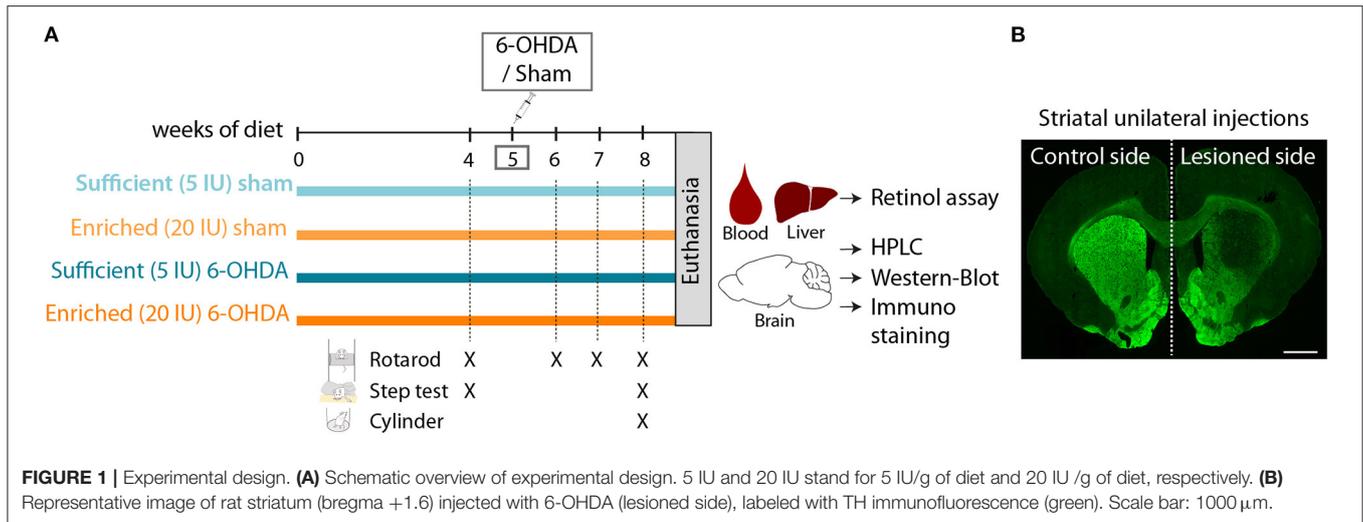
Statistical Analysis

Data were analyzed using GraphPad prism 7.0 and 9.2.0 (Graphpad software). Two-way ANOVA were used when the effects of 2 factors (factors “vitamin A diet” and “6-OHDA injection”) were tested. Three-way ANOVA (mixed-effects model) were performed for repeated data across time points (factors “diet”, “6-OHDA” and “time”). In case of significant interaction for 2-way and 3-way ANOVAs (p ≤ 0.06), a post-hoc test was performed based on the two-stage step-up method of Benjamini. All data are presented as means ± SEM. Details of the statistical analysis are summarized in Table 3. Statistical significance in statistics tables is expressed as *p < 0.05, **p < 0.01, ***p < 0.001. The significance on the figure is expressed with letter a, b, c and d, which differed from each other. The notation ab indicates that the experimental group does not differ from either group with notation a or notation b.

RESULTS

Impact of 6-OHDA Injection and Dietary Vitamin A on Retinol Levels

Adult male rats were subjected to 5 weeks of dietary treatment, either sufficient diet (5 IU retinol/g of diet, referred to as 5 IU thereafter) or supplemented diet (20 IU retinol/g of diet, referred to as 20 IU thereafter). Rats then received a sham or 6-OHDA unilateral injection in the striatum, leading to 4 experimental groups (Figure 1). Dietary treatments were continued for 3



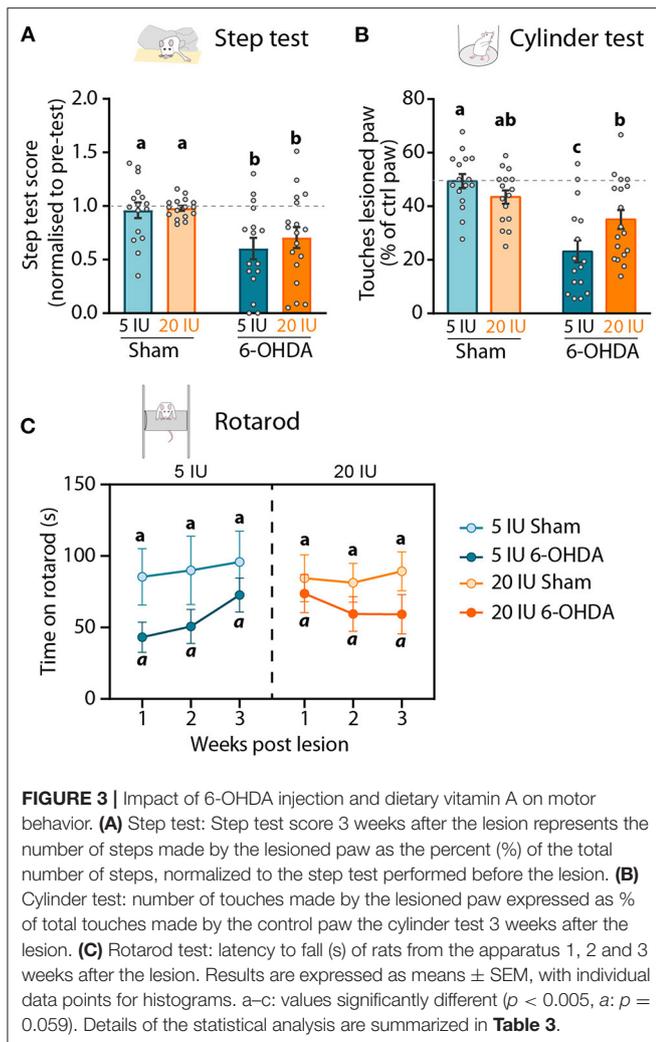
additional weeks during which, behavioral tests were performed. Body weight curves were not different between the 4 groups (6-OHDA effect $p = 0.591$; diet effect: $p = 0.778$), indicating that dietary treatment and intrastriatal injections had no effect on body weight (Figure 2A).

The effect of dietary treatment was first assessed on retinol levels, both in the plasma and the liver. Vitamin A supplemented diet almost doubled retinol levels in the liver ($p < 0.001$), but did not alter retinol levels in the plasma ($p = 0.111$) (Figures 2B,C). These results confirm the impact of dietary vitamin A treatment on retinol metabolism. Of note, 6-OHDA injection slightly but yet significantly increased retinol levels in the plasma ($p = 0.038$), but not in the liver ($p = 0.443$).

In the brain, the best proxy for retinoid signaling is the measure of retinoids receptors, since their expression is directly

controlled by retinoic acid levels (28, 29). Thus, we quantified in the striatum the expression of retinoid X receptor (RXR γ), an isoform highly expressed in this structure (30). Vitamin A enriched diet significantly increased RXR γ expression in both sham and 6-OHDA-injected rats ($p = 0.012$) (Figure 2D). Of note, 6-OHDA injection did not modify expression of RXR γ in the striatum ($p = 0.558$).

Additionally, we quantified microglia in the striatum, as reflected by IBA1 staining, since 6-OHDA and dietary vitamin A can act on neuro-inflammatory processes (8, 31). In our conditions, quantification of the number of IBA1⁺ cells, as well as total IBA1 intensity in the striatum did not reveal any significant effect of 6-OHDA or vitamin A supplementation (Supplementary Figure 1).



Altogether these results validate the positive impact of 8-week dietary vitamin A supplementation on retinol function at the periphery and in the striatum.

Impact of 6-OHDA Injection and Dietary Vitamin A on Motor Behavior

The effect of preventive vitamin A supplementation and 6-OHDA injection on motor behavior was measured with three classical tests: the stepping test, the cylinder test and the rotarod test.

The stepping test was used to validate the impact of unilateral injection of 6-OHDA on the mobility of the paw contralateral to the lesion. The stepping test training and the first stepping session were performed before the unilateral injection, and the number of steps made by both paws was not different between groups (**Table 3**). Three weeks after 6-OHDA injection, the number of steps made by the paw contralateral to the lesion (named 'lesioned paw' thereafter) was reduced by half compared to sham rats (6-OHDA effect: $p < 0.001$) (**Figure 3A**). No significant effect of vitamin A supplementation was observed.

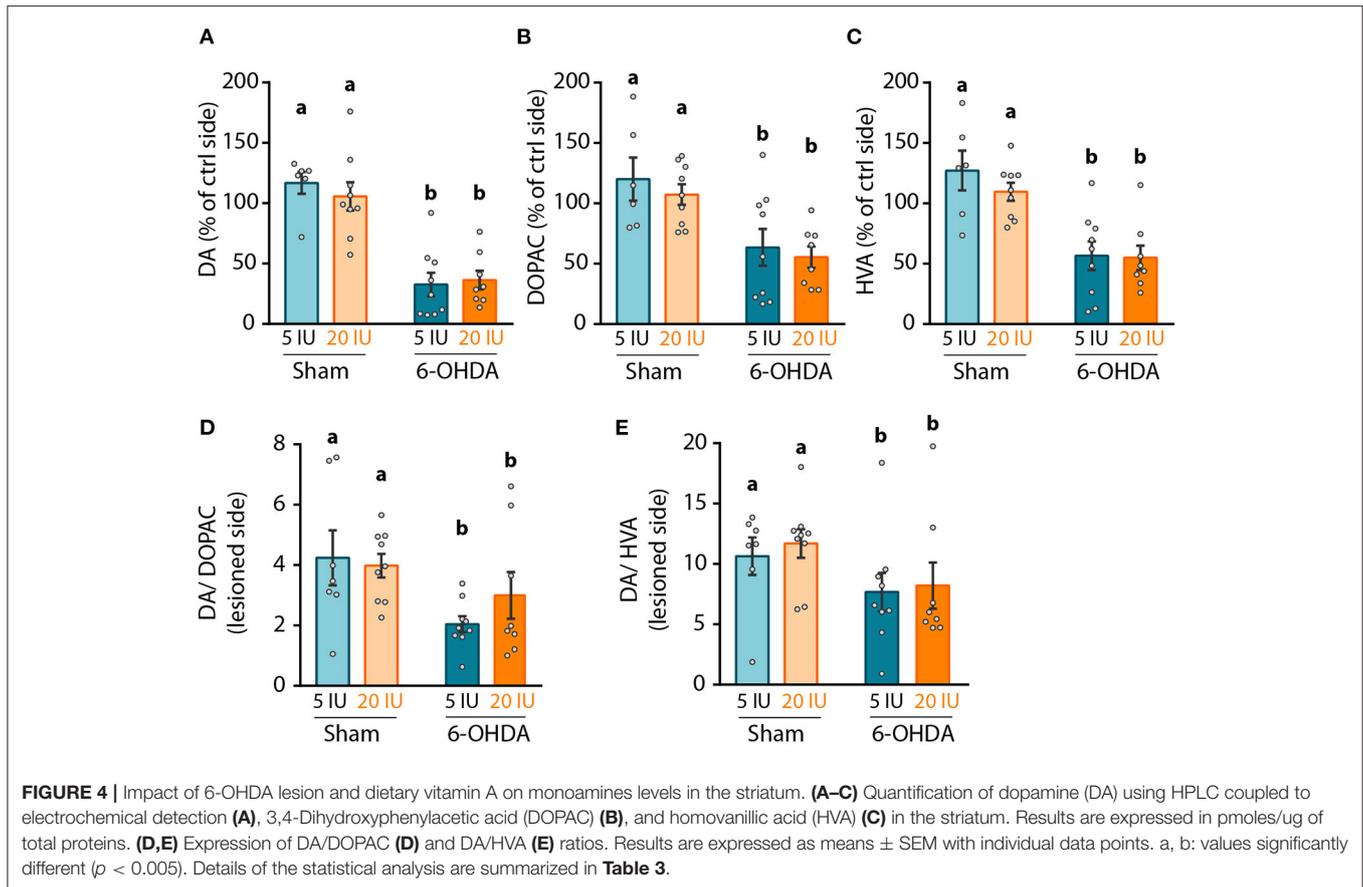
In the cylinder test, rats were freely moving and the number of touches made by each paw on the wall of the cylinder while rearing was quantified. This test was used to measure forelimb akinesia. In order to avoid habituation, this test was performed only once, 3 weeks after the lesion. In total, sham rats made significantly more paw touches than 6-OHDA lesioned rats (6-OHDA effect: $p = 0.033$). Under sufficient diet, 6-OHDA rats used significantly less their lesioned paw, compared to sham rats (5 IU sham vs. 5 IU 6-OHDA: $p < 0.001$). By contrast, the use of the lesion paw in vitamin A supplemented rats was not significantly different between sham and 6-OHDA rats (20 IU sham vs. 20 IU 6-OHDA: $p = 0.072$) (**Figure 3B**). Proportion of touches made with the lesioned paw was significantly higher for 6-OHDA rats under vitamin A supplementation, compared to 6-OHDA rats without supplementation (5 IU 6-OHDA vs. 20 IU 6-OHDA: $p = 0.007$).

In the rotarod test, we measured the latency to fall of rats placed on an accelerating rotative axis (4–40 rpm). The rotarod training and the first test were performed before the lesion, in order to ensure the absence of initial difference between groups (**Table 3**). Rotarod tests were then performed 1, 2 and 3 weeks after the lesion. In sham rats under sufficient or enriched diet, latency to fall remained stable across sessions (**Figure 3C**). In 6-OHDA rats, the 3-way ANOVA analysis revealed a strong tendency for shorter latency to fall, compared to sham rats ($p = 0.059$). Despite statistical analysis did not reveal significant effect, we observed that the impact of the lesion was not stable across time, and differ between 6-OHDA rats under sufficient or supplemented diet. In 6-OHDA rats under sufficient diet, latency to fall was more affected 1 week after the lesion that 3 weeks later. Conversely, in 6-OHDA rats with supplemented diet, latency to fall was close to sham rats 1 week after the lesion, but was shorter at 2 and 3 weeks after the lesion.

Taken together, these results reveal that beneficial effect of vitamin A supplementation on motor impairments induced by unilateral 6-OHDA injection in the striatum is only observable in the cylinder test.

Impact of 6-OHDA Lesion and Dietary Vitamin A on Dopamine Transmission in the Nigro-Striatal Pathway

We then focused on the integrity of the DA system, in order to investigate the mechanisms by which vitamin A supplementation improved motor function. First, we measured the levels of DA and metabolites in striatal homogenates. Since no difference was observed in the contralateral side of the lesion between groups, results were normalized to the contralateral side. As expected, 6-OHDA lesion significantly reduced DA levels in the lesioned hemisphere ($p < 0.001$) compared to sham rats. Similar results were observed for two major degradation products of DA, namely 3,4-Dihydroxyphenylacetic acid (DOPAC) ($p < 0.001$) and homovanillic acid (HVA) ($p < 0.001$) (**Figures 4A–C**). Similarly, DA/DOPAC and DA/HVA ratios were significantly reduced by 6-OHDA lesion ($p = 0.012$ and $p = 0.05$ respectively) (**Figures 4D,E**), suggesting increased metabolism of DA. However, no effect of vitamin A



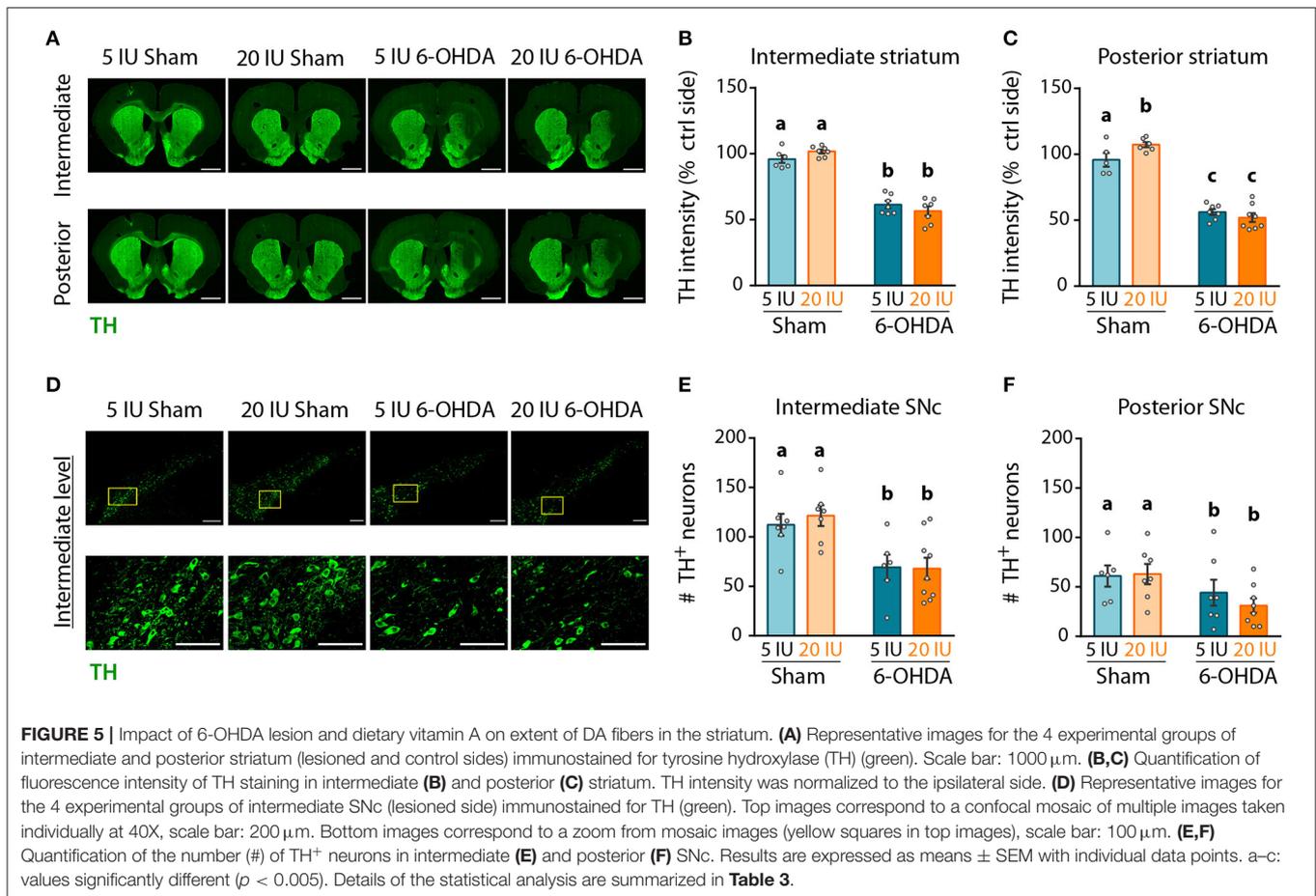
supplementation was detected on monoamines measurements (**Figures 4A–E**).

Next, we quantified the intensity of the TH signal as a proxy for the density of DA fibers in the striatum by immunofluorescence, and the number of TH⁺ neurons in the SNc. Analyses were performed on three antero-posterior levels for the striatum and the SNc: anterior (bregma striatum: +2.2, SNC: -5.2); intermediate (bregma striatum: +1.6, SNC: -5.3); and posterior (bregma striatum: +0.7, SNC: -5.8). The anterior levels are presented in **Supplementary Figures 2–4**. In the striatum (**Figure 5A**, **Supplementary Figures 2A,B**), TH intensity was clearly reduced at the injection site, in 6-OHDA rats but not in sham rats, for both intermediate (5 IU sham vs. 5 IU 6-OHDA: $p < 0.001$; 20 IU sham vs. 20 IU 6-OHDA: $p < 0.001$) (**Figure 5B**), and posterior (5 IU sham vs. 5 IU 6-OHDA: $p < 0.001$; 20 IU sham vs. 20 IU 6-OHDA: $p < 0.001$) (**Figure 5C**) levels. This is in accordance with measurements of DA in the striatum (**Figure 4**). Of note, TH intensity in the posterior striatum was increased by vitamin A supplementation in sham rats, but not in 6-OHDA rats (5 IU sham vs 20 IU sham: $p = 0.031$). In the SNc (**Figure 5D**, **Supplementary Figures 2A,C**), the number of positive neurons significantly decreased in rats injected with 6-OHDA, in both intermediate ($p < 0.001$) (**Figure 5E**) and posterior ($p = 0.028$) (**Figure 5F**) levels, with no difference between dietary groups.

Finally, dopamine D2 receptor (D2R) expression was measured in the striatum by western blot, since its expression is under the control of retinoic acid (32). We found that 6-OHDA injection significantly reduced D2R protein level in the striatum (**Figure 6**). However, this effect was not observed in 6-OHDA rats under supplemented diet, for which D2R expression levels were similar to sham rats (5 IU sham vs. 5 IU 6-OHDA: $p < 0.001$; 20 IU sham vs. 20 IU 6-OHDA: $p = 0.882$) (**Figure 6**). This suggests that increased retinoid signaling induced by vitamin A supplementation (**Figure 2**) prevented the decrease in striatal D2R expression in 6-OHDA rats. Of note, the decrease of D2R expression observed in 6-OHDA rats under sufficient diet is not usual, since studies have mainly found increased binding of D2R (33) or no change in D2R expression (34, 35). This discrepancy may be due to technical reasons, such as protein quantification vs. binding assays, or the conditions of the lesion.

Impact of Vitamin A Supplementation on ALDH1A1⁺ Dopaminergic Neurons

Analysis of global DA transmission in the nigro-striatal pathway did not reveal a clear effect of vitamin A supplementation, in comparison to motor improvement. This may be due to a specific impact of vitamin A on the sub-population of DA neurons expressing ALDH1A1. To test whether ALDH1A1⁺ DA neurons were specifically protected by vitamin A supplementation, we quantified the number of ALDH1A1⁺ DA neurons in



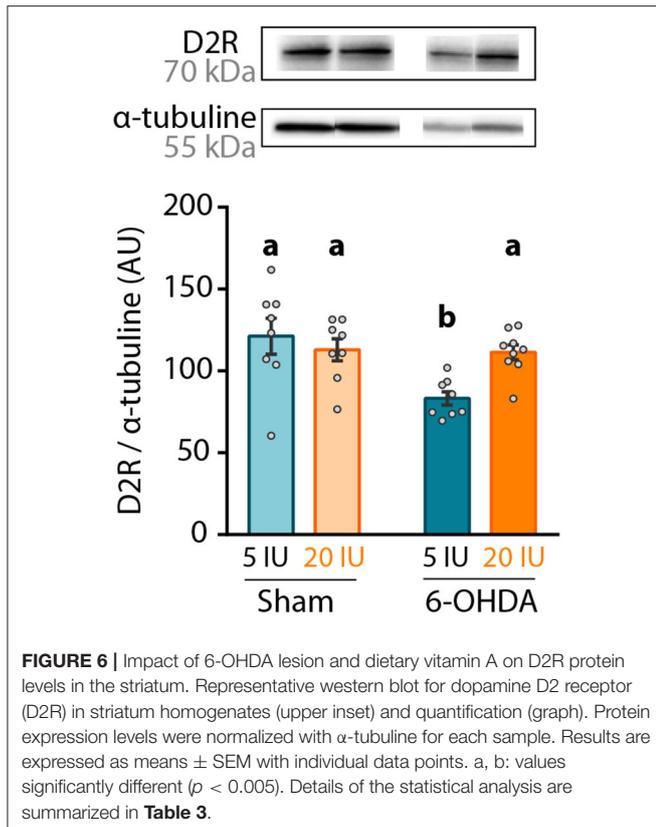
the anterior, intermediate and posterior SNc (**Figure 7A**, **Supplementary Figure 3**). Analysis revealed that 6-OHDA lesion significantly decreased the number of ALDH1A1⁺ neurons in intermediate ($p < 0.001$) (**Figure 7B**) and posterior SNc ($p = 0.001$) (**Figure 7C**). Of note, we generally observed a tendency for more ALDH1A1⁺ neurons with vitamin A supplementation, in both sham and 6-OHDA rats. However, statistics only revealed a trend ($p = 0.086$) for the intermediate level of the SNc (**Figure 7B**).

Since ALDH1A1⁺ neurons are also TH⁺ neurons, we quantified the proportion of TH⁺ neurons that expressed ALDH1A1 (**Figure 7D**), in order to identify this sub-population of DA neurons. In sham rats fed with sufficient diet, the proportion of TH⁺ neurons that expressed ALDH1A1 was 36, 36, and 20%, for the anterior, intermediate and posterior levels of the SNc, respectively. These proportions are smaller than previous reports in the literature, with about 70% in mice as in humans (15, 16, 18). This difference may be due to the rat model, as well as the analysis methods. Proportions of ALDH1A1⁺ DA neurons were significantly reduced by 6-OHDA lesion, at every level of the SNc (**Figures 7E,F**, **Supplementary Figure 3**) (8E: $p = 0.025$; 8F: $p = 0.002$). Of note, a trend for a higher proportion

of TH⁺ neurons expressing ALDH1A1 was observed in vitamin A supplemented rats.

Lastly, we quantified ALDH1A1 expression in the striatum by western-blot, as a reflect of the amount of DA afferents from ALDH1A1⁺ DA neurons. As for ALDH1A1⁺ neurons in SNc, 6-OHDA injection significantly reduced ALDH1A1 levels in the striatum compared to sham-injected rats ($p < 0.001$) (**Figure 8A**). However, no effect of vitamin A supplementation was observed.

We refined the analysis with ALDH1A1 staining, in the anterior, intermediate and posterior parts of the striatum (**Figure 8B**, **Supplementary Figure 4**). Confirming western blot measurements, 6-OHDA lesion significantly reduced ALDH1A1 staining in the striatum, at the anterior ($p = 0.033$, **Supplementary Figure 4B**), intermediate ($p < 0.001$, **Figure 8C**) and posterior ($p < 0.001$, **Figure 8D**) levels. Vitamin A supplementation induced no effect on ALDH1A1 staining in the striatum of 6-OHDA rats. By contrast, sham rats supplemented with vitamin A showed increased ALDH1A1 staining in the posterior striatum, compared to sham rats fed sufficient diet (5 IU sham vs. 20 IU sham: $p = 0.039$).



DISCUSSION

In this study, we examined the impact of preventive vitamin A supplementation in a PD rat model on motor behavior and dopamine transmission with the initial hypothesis that vitamin A would protect ALDH1A1⁺ DA neurons.

First of all, when one is studying vitamin A supplementation, the levels of vitamin A intake have to be precisely controlled since chronic high doses of vitamin A can lead to oxidative stress and toxicity for the liver (8, 36, 37). In rats, common levels for sufficient retinol intakes range between 5 and 8 IU/g of diet, while vitamin A supplementation ranges from 20 to ~50 IU/g (31, 38, 39). In the current study, we used a dose at the bottom range of supplementation, with 20 IU/g of diet, which corresponds to ~600 IU/day or 180 μ g retinol/day. This level of vitamin A supplementation is considered as comparable to therapeutic doses used in humans (40, 41). However, the toxicity of this dose is unclear. Indeed, oxidative stress has been observed (40, 41), but other reports showed no deleterious effect on behavior and inflammatory status (31, 38). In our conditions, vitamin A supplementation (20 IU/g of diet) for 8 weeks was sufficient to increase retinol in the liver, the storage organ for retinol, but we did not identify any adverse effect of vitamin A supplementation, as illustrated by measures of body weight, motor function and DA transmission. Thus, we

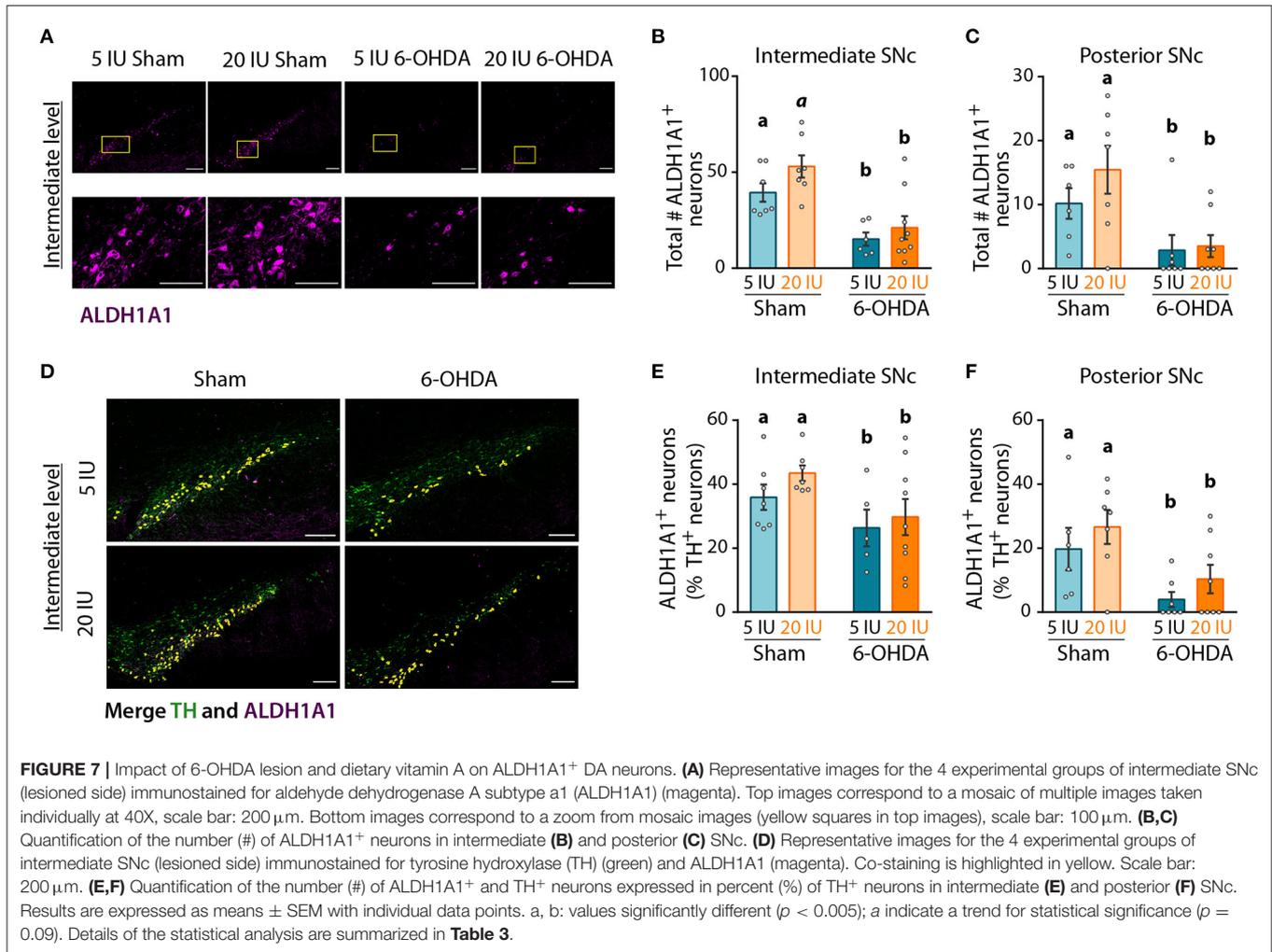
conclude that in our conditions, vitamin A supplementation was adequate.

Second, we explored the impact of 6-OHDA lesion and vitamin A supplementation on motor function using 3 complementary motor tests (23, 42). We did not observe strong effect of 6-OHDA and vitamin A supplementation in the rotarod test, and only an effect of the injection in the step test. In both tests, the animal was forced to move to maintain its equilibrium. By contrast, our data revealed positive effects of vitamin A supplementation in the cylinder test, where the animals were free to make voluntary movements, in accordance with their natural instinct of exploration (43). Voluntary movements are controlled by the implicit motivation of producing movement, which is modulated by nigrostriatal DA neurons (16, 44). Yet, motor motivation is reduced in PD patients, as measured by reduced vigor of movement (45, 46). Here, our data suggests that vitamin A supplementation in 6-OHDA lesioned rats has a beneficial impact on motor function through the improvement of motivation for voluntary movements.

In order to identify neurobiological mechanisms by which vitamin A supplementation improved motor function in 6-OHDA lesion rats, we focused our analyses on ALDH1A1 expressing DA neurons. These neurons constitute the subpopulation of DA neurons that are preferentially degenerating in PD patients (15, 16), and their role in motor learning and motor vigor has been recently revealed in mice (18). Intriguingly, these neurons lose their ability to express ALDH1A1 before degenerating, suggesting that ALDH1A1 enzyme may have a protective effect for these neurons (15, 47). Yet, ALDH1A1 expression is controlled by retinoic acid, the active metabolite of vitamin A, therefore, we initially hypothesized that vitamin A intake was able to modulate ALDH1A1 expression in SNc neurons.

In humans, ALDH1A1 is also an enzyme that raises interest, since it has been identified as a potential biomarker for PD (15, 48–50). Indeed, mRNA levels of ALDH1A1 in peripheral blood are significantly decreased in PD patients compare to control cases (50). Moreover, clinical studies showed that the genetic variability of *ALDH1A1* is a good predictive factor for PD diagnosis and the progress rate of the disease (51–53). Yet, if vitamin A is necessary for ALDH1A1 expression, a decreased vitamin A bioavailability may constitute a risk factor for the disease. However, no clear link has been established yet in PD patients between vitamin A function, ALDH1A1 expression and PD symptoms (8).

Here, we show that in sham rats, vitamin A supplementation tended to increase the number of ALDH1A1⁺ DA neurons in the SNc, which leads to a significant increase of ALDH1A1 fibers in the posterior striatum. This supports the fact that dietary vitamin A supplementation can sustain ALDH1A1 expression in DA neurons. However, this increase of ALDH1A1⁺ neurons and fibers in the striatum with vitamin A supplementation was not significant in 6-OHDA rats. This may be explained by the delay after the lesion chosen here. Indeed, it is possible that protection of ALDH1A1⁺ neurons with vitamin A supplementation was effective after the lesion but not maintained in time. In addition,

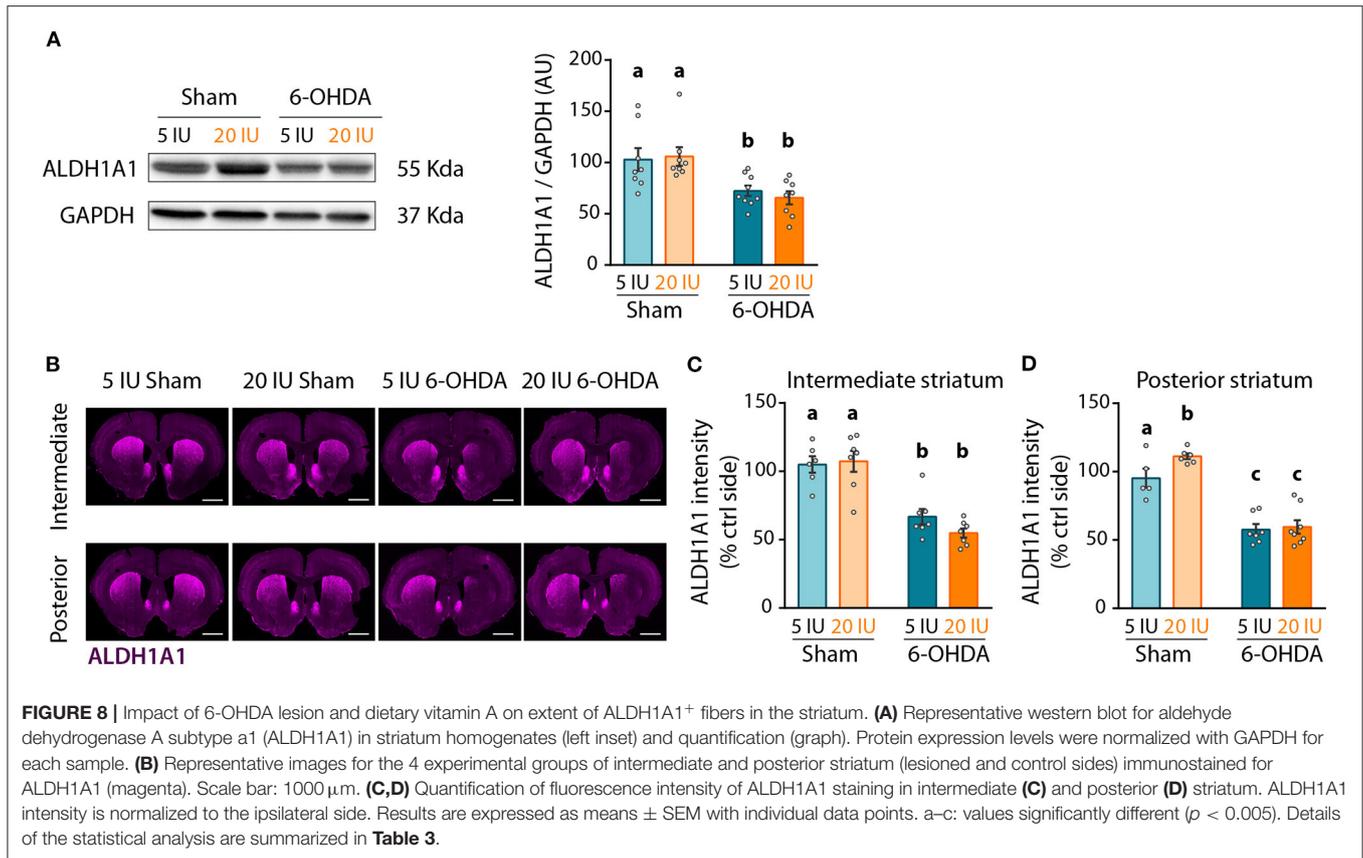


we used a mild supplementation (20 IU/g of diet), therefore, a higher vitamin A intake, still in therapeutic range (e.g. 40 IU/g of diet) may exhibit more pronounced effects on 6-OHDA-induced motor and neurobiological alterations. Furthermore, ALDH1A1⁺ DA neurons are distributed in certain territories of the SNc and ALDH1A1⁺ fibers are preferentially innervating striosomes compartments of the striatum (16, 54–56). Therefore, a more detailed analysis of ALDH1A1⁺ DA neurons, accounting for these sub-territories may reveal a more specific impact of vitamin A on ALDH1A1⁺ neurons.

Finally, this work revealed that the stronger improvement induced by vitamin A supplementation in 6-OHDA rats in addition to voluntary movement, concerned RXR γ and D2R expression in the striatum. RXR γ is a sub-type of RXR; its expression is directly controlled by retinoic acid levels and its most potent endogenous ligand is 9-cis-dihydro retinoic acid (57). The striatum is the brain structure containing the highest levels of RXR γ (58), indicating its crucial role for striatum function. Through dimerization with other nuclear receptors, such as RAR β or Nur77, RXR γ has

an important function for the development of the striatum and the nigro-striatal pathway (59–61), and for dopamine transmission at adult age (62). As a consequence, mice lacking RAR β and/or RXR γ exhibit strong motor impairments along with alteration of DA transmission, analog to PD mice models (58). Of note, RXR γ controls the expression of D2R in the striatum (32, 63). Here, our data shows that increased retinol level in the liver is reflected in the striatum by the increased expression of RXR γ . Consequently, D2R expression is also significantly increased in 6-OHDA rats under vitamin A supplementation, compared to 6-OHDA rats under sufficient diet. This increase in D2R expression may explain improved motor function in 6-OHDA rats under vitamin A supplementation. For future studies, a deeper analysis of retinoid and dopamine receptors may help to better understand the role of retinoid signaling in improving striatal function with vitamin A supplementation.

In conclusion, our study revealed beneficial impact of vitamin A supplementation on striatal function, with improved voluntary movements, increased expression of RXR γ and



D2R in the striatum, and a trend for more ALDH1A1⁺ DA neurons and fibers. A more sustained supplementation (amount and/or duration) with a more degenerative rat model, such as expression of human alpha-synuclein in SNc (64) may help to better understand the role of dietary vitamin A in the survival of DA neurons in the context of PD. In addition, this work may trigger future research to investigate the beneficial effect of preventive vitamin A supplementation in patients, particularly for those with low vitamin A metabolism.

DATA AVAILABILITY STATEMENT

The raw data supporting the conclusions of this article will be made available by the authors, without undue reservation.

ETHICS STATEMENT

The animal study was reviewed and approved by Comité d'éthique de Bordeaux - CEEA 50.

AUTHOR CONTRIBUTIONS

CB-B: conceptualization and project administration. CB-B and SV: funding and supervision of staff. AM, JL, MD, SA, VS-P,

ER, SV, and CB-B: experiments. AM and CB-B: statistical analyses and writing—original draft. AM: visualization. FD, RG, CB, AM, SA, CB-B, and VP: writing—review and editing. All authors contributed to the article and approved the submitted version.

FUNDING

This work was supported by France Parkinson. PhD fellowship for AM was provided by French Ministry. The Bordeaux Imaging Center is supported by the French National Research Agency (ANR-10-INBS-04). The Bioprot Platform of the Neurocampus facilities at the University of Bordeaux is funded by the LABEX BRAIN (ANR-10-LABX-43).

ACKNOWLEDGMENTS

The microscopy was done in the Bordeaux Imaging Center, a service unit of the CNRS-INSERM and Bordeaux University, member of the national infrastructure France BioImaging. The help of Fabrice Cordelieres, Sébastien Marais, Christel Poujol, Magali Mondin, and Jérémie Teillon is acknowledged. We thank the Bioprot Platform of the Neurocampus facilities at the University of Bordeaux with the help of Yann Rufin for western-blot. The authors thank Carole Carcenac and

Dr. Sébastien Carnicella for their expertise and advices on histological analyses, as well as Dr. Pierre Trifilieff for helpful advices on the manuscript. Anaïs Goimier and the staff from NutriNeuro animal facility and office are acknowledged.

SUPPLEMENTARY MATERIAL

The Supplementary Material for this article can be found online at: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fnut.2022.811843/full#supplementary-material>

REFERENCES

- Chen H. The changing landscape of parkinson epidemiologic research. *J Park Dis.* (2018) 8:1–12. doi: 10.3233/JPD-171238
- Chen Y, Sun X, Lin Y, Zhang Z, Gao Y, Wu IXY. Non-genetic risk factors for Parkinson's disease: an overview of 46 systematic reviews. *J Park Dis.* (2021) 11:919–35. doi: 10.3233/JPD-202521
- Gupta A, Dawson VL, Dawson TM. What causes cell death in Parkinson's disease? *Ann Neurol.* (2009) 64:S3–S15. doi: 10.1002/ana.21573
- von Linstow CU, DeLano-Taylor M, Kordower JH, Brundin P. Does developmental variability in the number of midbrain dopamine neurons affect individual risk for sporadic Parkinson's disease? *J Park Dis.* (2020) 10:405–11. doi: 10.3233/JPD-191877
- Boulos C, Yaghi N, El Hayeck R, Heraoui GN, Fakhoury-Sayegh N. Nutritional risk factors, microbiota and Parkinson's disease: what is the current evidence? *Nutrients.* (2019) 11:1896. doi: 10.3390/nu11081896
- Mischley LK, Lau RC, Bennett RD. Role of diet and nutritional supplements in Parkinson's disease progression. *Oxid Med Cell Longev.* (2017) 2017:1–9. doi: 10.1155/2017/6405278
- Shearer KD, Stoney PN, Morgan PJ, McCaffery PJ. A vitamin for the brain. *Trends Neurosci.* (2012) 35:733–41. doi: 10.1016/j.tins.2012.08.005
- Marie A, Darricau M, Touyarot K, Parr-Brownlie LC, Bosch-Bouju C. Role and mechanism of vitamin A metabolism in the pathophysiology of Parkinson's disease. *J Park Dis.* (2021) 11:949–70. doi: 10.3233/JPD-212671
- Carta M, Stancampiano R, Tronci E, Collu M, Usiello A, Morelli M, et al. Vitamin A deficiency induces motor impairments and striatal cholinergic dysfunction in rats. *Neuroscience.* (2006) 139:1163–72. doi: 10.1016/j.neuroscience.2006.01.027
- Friling S, Bergsland M, Kjellander S. Activation of Retinoid X Receptor increases dopamine cell survival in models for Parkinson's disease. *BMC Neurosci.* (2009) 10:146. doi: 10.1186/1471-2202-10-146
- Yin L-H, Shen H, Diaz-Ruiz O, Bäckman CM, Bae E, Yu S-J, et al. Early post-treatment with 9-cis retinoic acid reduces neurodegeneration of dopaminergic neurons in a rat model of Parkinson's disease. *BMC Neurosci.* (2012) 13:120. doi: 10.1186/1471-2202-13-120
- Esteves M, Cristóvão AC, Saraiva T, Rocha SM, Baltazar G, Ferreira L, et al. Retinoic acid-loaded polymeric nanoparticles induce neuroprotection in a mouse model for Parkinson's disease. *Front Aging Neurosci.* (2015) 7:20. doi: 10.3389/fnagi.2015.00020
- Spathis AD, Asvos X, Ziavra D, Karampelas T, Topouzis S, Cournia Z, et al. Nurr1:RXR α heterodimer activation as monotherapy for Parkinson's disease. *Proc Natl Acad Sci.* (2017) 114:3999–4004. doi: 10.1073/pnas.1616874114
- Damier P, Hirsch EC, Agid Y, Graybiel AM. The substantia nigra of the human brain II Patterns of loss of dopamine-containing neurons in Parkinson's disease. *Brain J Neurol.* (1999) 122:1437–48. doi: 10.1093/brain/122.8.1437
- Liu G, Yu J, Ding J, Xie C, Sun L, Rudenko I, et al. Aldehyde dehydrogenase 1 defines and protects a nigrostriatal dopaminergic neuron subpopulation. *J Clin Invest.* (2014) 124:3032–46. doi: 10.1172/JCI72176
- Carmichael K, Evans RC, Lopez E, Sun L, Kumar M, Ding J, et al. Function and regulation of ALDH1A1-positive nigrostriatal dopaminergic neurons in motor control and Parkinson's disease. *Front Neural Circuits.* (2021) 15:644776. doi: 10.3389/fncir.2021.644776
- Wey MC-Y, Fernandez E, Martinez PA, Sullivan P, Goldstein DS, Strong R. Neurodegeneration and motor dysfunction in mice lacking cytosolic and mitochondrial aldehyde dehydrogenases: implications for Parkinson's disease. *PLoS ONE.* (2019) 7:e31522. doi: 10.1371/journal.pone.0031522
- Wu J, Kung J, Dong J, Chang L, Xie C, Habib A, et al. Distinct connectivity and functionality of aldehyde dehydrogenase 1a1-positive nigrostriatal dopaminergic neurons in motor learning. *Cell Rep.* (2012) 28:1167–81.e7. doi: 10.1016/j.celrep.2019.06.095
- Decressac M, Mattsson B, Björklund A. Comparison of the behavioural and histological characteristics of the 6-OHDA and α -synuclein rat models of Parkinson's disease. *Exp Neurol.* (2012) 235:306–15. doi: 10.1016/j.expneurol.2012.02.012
- Hernandez-Baltazar D, Zavala-Flores LM, Villanueva-Olivo A. The 6-hydroxydopamine model and parkinsonian pathophysiology: Novel findings in an older model. *Neurol Engl Ed.* (2017) 32:533–9. doi: 10.1016/j.nrleng.2015.06.019
- Paxinos G, Watson C. *The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates.* Ed 6. London: Elsevier. (2007)
- Olsson M, Nikkiah G, Bentlage C, Björklund A. Forelimb akinesia in the rat Parkinson model: differential effects of dopamine agonists and nigral transplants as assessed by a new stepping test. *J Neurosci.* (1995) 15:3863–75. doi: 10.1523/JNEUROSCI.15-05-03863.1995
- Winkler C, Kirik D, Björklund A, Dunnett SB. Chapter 11 Transplantation in the rat model of Parkinson's disease: ectopic versus homotopic graft placement. In: *Progress in Brain Research Elsevier*, (2000). p. 233–265. doi: 10.1016/S0079-6123(00)27012-X
- Sarukhani M, Haghdoost-Yazdi H, Sarbazi Golezari A, Babayan-Tazekhand A, Dargahi T, Rastgoo N. Evaluation of the antiparkinsonism and neuroprotective effects of hydrogen sulfide in acute 6-hydroxydopamine-induced animal model of Parkinson's disease: behavioral, histological and biochemical studies. *Neurol Res.* (2018) 40:525–33. doi: 10.1080/01616412.2017.1390903
- Biesalski HK, Ehrenthal W, Gross M, Hafner G, Harth O. Rapid determination of retinol (vitamin A) in serum by high pressure liquid chromatography (HPLC). *Int J Vitam Nutr Res Int Z Vitam- Ernährungsforschung J Int Vitaminol Nutr.* (1983) 53:130–7.
- Monchaux De Oliveira C, Pourtau L, Vancassel S, Pouchieu C, Capuron L, Gaudout D, et al. Saffron extract-induced improvement of depressive-like behavior in mice is associated with modulation of monoaminergic neurotransmission. *Nutrients.* (2021) 13:904. doi: 10.3390/nu13030904
- Favier M, Carcenac C, Drui G, Vachez Y, Boulet S, Savasta M, et al. Implication of dorsostriatal D3 receptors in motivational processes: a potential target for neuropsychiatric symptoms in Parkinson's disease. *Sci Rep.* (2017) 7:41589. doi: 10.1038/srep41589
- Etchamendy N, Enderlin V, Marighetto A, Pallet V, Higuieret P, Jaffard R. Vitamin A deficiency and relational memory deficit in adult mice: relationships with changes in brain retinoid signalling. *Behav Brain Res.* (2003) 145:37–49. doi: 10.1016/S0166-4328(03)00099-8
- Husson M, Enderlin V, Alfos S, Boucheron C, Pallet V, Higuieret P. Expression of neurogranin and neuromodulin is affected in the striatum of vitamin A-deprived rats. *Mol Brain Res.* (2004) 123:7–17. doi: 10.1016/j.molbrainres.2003.12.012
- Krezel W, Kastner P, Chambon P. Differential expression of retinoid receptors in the adult mouse central nervous system. *Neuroscience.* (1999) 89:1291–300. doi: 10.1016/S0306-4522(98)00342-X
- Kunzler A, Ribeiro CT, Gasparotto J, Petiz LL, da Rosa Silva HT, da Silva JD, et al. The effects of retinol oral supplementation in 6-hydroxydopamine dopaminergic denervation model in Wistar rats. *Neurochem Int.* (2019) 125:25–34. doi: 10.1016/j.neuint.2019.02.002
- Samad TA, Krezel W, Chambon P, Borrelli E. Regulation of dopaminergic pathways by retinoids: Activation of the D2 receptor promoter by members of the retinoic acid receptor-retinoid X receptor family. *Proc Natl Acad Sci USA.* (1997) 6. doi: 10.1073/pnas.94.26.14349
- Mann T, Zilles K, Dikow H, Hellfritsch A, Cremer M, Piel M, et al. Dopamine, noradrenaline and serotonin receptor densities in the striatum of hemiparkinsonian rats following botulinum neurotoxin-A injection. *Neuroscience.* (2018) 374:187–204. doi: 10.1016/j.neuroscience.2018.01.053

34. Martres MP, Sokoloff P, Giros B, Schwartz JC. Effects of dopaminergic transmission interruption on the d₂ receptor isoforms in various cerebral tissues. *J Neurochem.* (1992) 58:673–9. doi: 10.1111/j.1471-4159.1992.tb09770.x
35. Mishra A, Singh S, Tiwari V, Chaturvedi S, Wahajuddin M, Shukla S. Dopamine receptor activation mitigates mitochondrial dysfunction and oxidative stress to enhance dopaminergic neurogenesis in 6-OHDA lesioned rats: a role of Wnt signalling. *Neurochem Int.* (2019) 129:104463. doi: 10.1016/j.neuint.2019.104463
36. Jick SS, Kremers HM, Vasilakis-Scaramozza C. Isotretinoin use and risk of depression, psychotic symptoms, suicide, and attempted suicide. *Arch Dermatol.* (2000) 136:1231–6. doi: 10.1001/archderm.136.10.1231
37. Klamt F, Roberto de Oliveira M, Moreira JCF. Retinol induces permeability transition and cytochrome c release from rat liver mitochondria. *Biochim Biophys Acta BBA - Gen Subj.* (2005) 1726:14–20. doi: 10.1016/j.bbagen.2005.07.016
38. Touyrot K, Bonhomme D, Roux P, Alfos S, Lafenêtre P, Richard E, et al. mid-life vitamin A supplementation prevents age-related spatial memory deficits and hippocampal neurogenesis alterations through CRABP-I. *PLoS ONE.* (2013) 8:e72101. doi: 10.1371/journal.pone.0072101
39. Létondor A, Buaud B, Vaysse C, Richard E, Layé S, Pallet V, et al. EPA/DHA and vitamin A supplementation improves spatial memory and alleviates the age-related decrease in hippocampal RXR γ and kinase expression in rats. *Front Aging Neurosci.* (2016) 8:103. doi: 10.3389/fnagi.2016.00103
40. de Oliveira MR, Moreira JCF. Acute and chronic vitamin A supplementation at therapeutic doses induces oxidative stress in submitochondrial particles isolated from cerebral cortex and cerebellum of adult rats. *Toxicol Lett.* (2007) 173:145–50. doi: 10.1016/j.toxlet.2007.07.002
41. de Oliveira MR, Oliveira MWS, Behr GA, Hoff MLM, da Rocha RF, Moreira JCF. Evaluation of the effects of vitamin A supplementation on adult rat substantia nigra and striatum redox and bioenergetic states: Mitochondrial impairment, increased 3-nitrotyrosine and α -synuclein, but decreased D2 receptor contents. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry.* (2009) 33:353–62. doi: 10.1016/j.pnpbp.2008.12.020
42. Carter R, Morton J, Dunnet S. Motor coordination and balance in rodents. *Curr Protoc Neurosci.* (2001) 8:8–12.
43. Su R, Zhen J, Wang W, Zhang J, Zheng Y, Wang X. Time-course behavioral features are correlated with Parkinson's disease-associated pathology in a 6-hydroxydopamine hemiparkinsonian rat model. *Mol Med Rep.* (2017) 17:3356–63. doi: 10.3892/mmr.2017.8277
44. Dudman JT, Krakauer JW. The basal ganglia: from motor commands to the control of vigor. *Curr Opin Neurobiol.* (2016) 37:158–66. doi: 10.1016/j.conb.2016.02.005
45. Mazzoni P, Hristova A, Krakauer JW. Why Don't We Move Faster? *Parkinson's Disease, Movement Vigor, and Implicit Motivation J Neurosci.* (2007) 27:7105–16. doi: 10.1523/JNEUROSCI.0264-07.2007
46. Colón-Semenza C, Fulford D, Ellis T. Effort-Based Decision-Making for Exercise in People with Parkinson's Disease. *J Park Dis.* (2021) 11:725–35. doi: 10.3233/JPD-202353
47. Cai H, Liu G, Sun L, Ding J. Aldehyde Dehydrogenase 1 making molecular inroads into the differential vulnerability of nigrostriatal dopaminergic neuron subtypes in Parkinson's disease. *Transl Neurodegener.* (2014) 3:27. doi: 10.1186/2047-9158-3-27
48. Galter D, Buervenich S, Carmine A, Anvret M, Olson L. ALDH1 mRNA: presence in human dopamine neurons and decreases in substantia nigra in Parkinson's disease and in the ventral tegmental area in schizophrenia. *Neurobiol Dis.* (2003) 14:637–47. doi: 10.1016/j.nbd.2003.09.001
49. Grünblatt E, Zehetmayer S, Jacob CP, Müller T, Jost WH, Riederer P. Pilot study: peripheral biomarkers for diagnosing sporadic Parkinson's disease. *J Neural Transm Vienna Austria.* (2010) 117:1387–93. doi: 10.1007/s00702-010-0509-1
50. Fan H-H, Guo Q, Zheng J, Lian Y-Z, Huang S-S, Sun Y, et al. ALDH1A1 Genetic Variations May Modulate Risk of Parkinson's Disease in Han Chinese Population. *Front Neurosci.* (2021) 15:620929. doi: 10.3389/fnins.2021.620929
51. Molochnikov L, Rabey JM, Dobronevsky E, Bonuccelli U, Ceravolo R, Frosini D, et al. A molecular signature in blood identifies early Parkinson's disease. *Mol Neurodegener.* (2012) 7:26. doi: 10.1186/1750-1326-7-26
52. Salas-Leal AC, Sandoval-Carrillo A, Romero-Gutiérrez E, Castellanos-Juárez FX, Méndez-Hernández EM, La Llave-León O, et al. rs3764435 Associated With Parkinson's Disease in Mexican Mestizos: Case-Control Study Reveals Protective Effects Against Disease Development and Cognitive Impairment. *Front Neurol.* (2019) 10:1066. doi: 10.3389/fneur.2019.01066
53. Rabey JM, Yarden J, Dotan N, Mechlovich D, Riederer P, Youdim MBH. Creation of a gene expression classifier for predicting Parkinson's disease rate of progression. *J Neural Transm.* (2020) 127:755–62. doi: 10.1007/s00702-020-02194-y
54. Sgobio C, Wu J, Zheng W, Chen X, Pan J, Salinas AG, et al. Aldehyde dehydrogenase 1-positive nigrostriatal dopaminergic fibers exhibit distinct projection pattern and dopamine release dynamics at mouse dorsal striatum. *Sci Rep.* (2017) 7:5283. doi: 10.1038/s41598-017-05598-1
55. Poulin J-F, Caronia G, Hofer C, Cui Q, Helm B, Ramakrishnan C, et al. Mapping projections of molecularly defined dopamine neuron subtypes using intersectional genetic approaches. *Nat Neurosci.* (2018) 21:1260–71. doi: 10.1038/s41593-018-0203-4
56. Pan J, Yu J, Sun L, Xie C, Chang L, Wu J, et al. ALDH1A1 regulates postsynaptic μ -opioid receptor expression in dorsal striatal projection neurons and mitigates dyskinesia through transsynaptic retinoic acid signaling. *Sci Rep.* (2019) 9:3602. doi: 10.1038/s41598-019-40326-x
57. Rühl R, Krezel W, de Lera AR. 9-Cis-13,14-dihydroretinoic acid, a new endogenous mammalian ligand of retinoid X receptor and the active ligand of a potential new vitamin A category: vitamin A5. *Nutr Rev.* (2018) 76:929–41. doi: 10.1093/nutrit/nuy057
58. Krezel W, Ghyselinck N, Samad TA, Dupé V, Kastner P, Borrelli E, et al. Impaired locomotion and dopamine signaling in retinoid receptor mutant mice. *Science.* (1998) 279:863–7. doi: 10.1126/science.279.352.863
59. Rataj-Baniowska M, Niewiadomska-Cimicka A, Paschaki M, Szyszka-Niagolov M, Carramolino L, Torres M, et al. Retinoic acid receptor β controls development of striatonigral projection neurons through FGF-dependent and meis1-dependent mechanisms. *J Neurosci Off J Soc Neurosci.* (2015) 35:14467–75. doi: 10.1523/JNEUROSCI.1278-15.2015
60. Niewiadomska-Cimicka A, Krzyzosiak A, Ye T, Podleśny-Drabiniok A, Dembélé D, Dollé P, et al. Genome-wide analysis of RAR β transcriptional targets in mouse striatum links retinoic acid signaling with Huntington's disease and other neurodegenerative disorders. *Mol Neurobiol.* (2017) 54:3859–78. doi: 10.1007/s12035-016-0010-4
61. Podleśny-Drabiniok A, Sobska J, de Lera AR, Golembiowska K, Kamińska K, Dollé P, et al. Distinct retinoic acid receptor (RAR) isotypes control differentiation of embryonal carcinoma cells to dopaminergic or striatopallidal medium spiny neurons. *Sci Rep.* (2017) 7:13671. doi: 10.1038/s41598-017-13826-x
62. Lévesque D, Rouillard C. Nur77 and retinoid X receptors: crucial factors in dopamine-related neuroadaptation. *Trends Neurosci.* (2007) 30:22–30. doi: 10.1016/j.tins.2006.11.006
63. Krzyzosiak A, Szyszka-Niagolov M, Wietrzyk M, Gobaille S, Muramatsu S, Krezel W. Retinoid x receptor gamma control of affective behaviors involves dopaminergic signaling in mice. *Neuron.* (2010) 66:908–20. doi: 10.1016/j.neuron.2010.05.004
64. Bourdenx M, Dovero S, Engeln M, Bido S, Bastide MF, Dutheil N, et al. Lack of additive role of ageing in nigrostriatal neurodegeneration triggered by α -synuclein overexpression. *Acta Neuropathol Commun.* (2015) 3:46. doi: 10.1186/s40478-015-0222-2

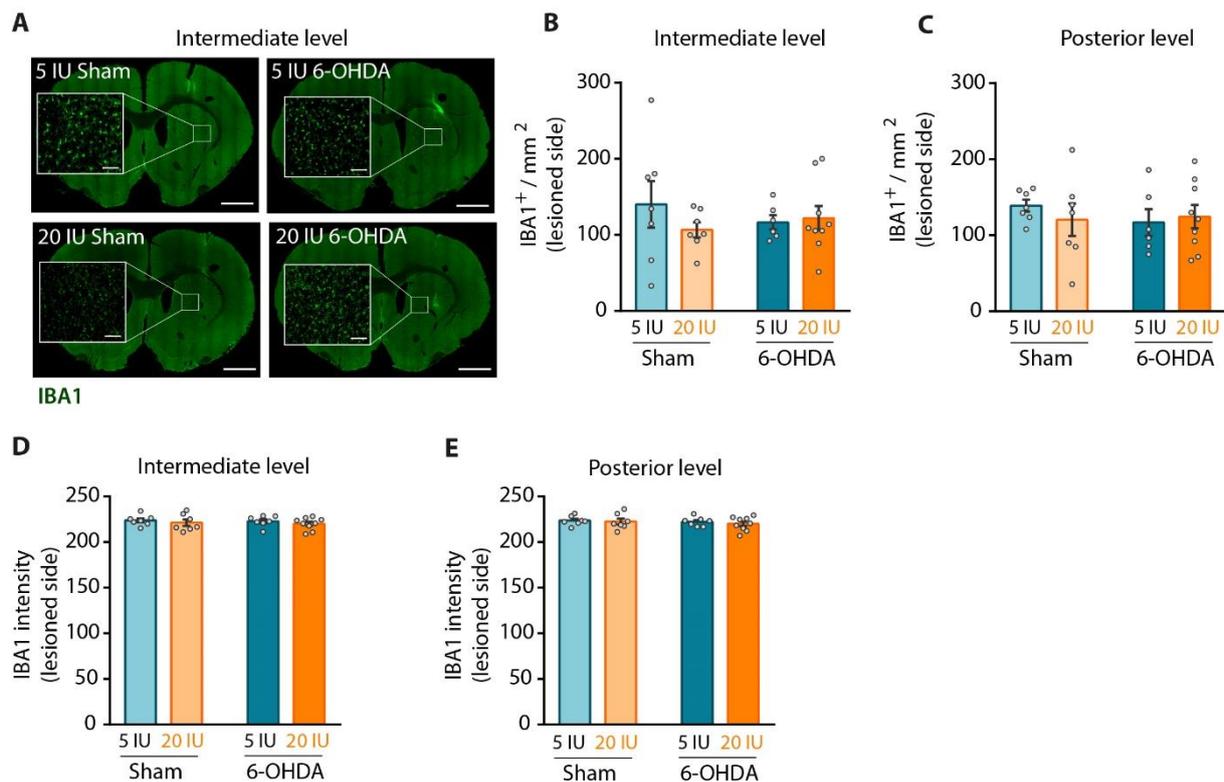
Conflict of Interest: The authors declare that the research was conducted in the absence of any commercial or financial relationships that could be construed as a potential conflict of interest.

Publisher's Note: All claims expressed in this article are solely those of the authors and do not necessarily represent those of their affiliated organizations, or those of the publisher, the editors and the reviewers. Any product that may be evaluated in this article, or claim that may be made by its manufacturer, is not guaranteed or endorsed by the publisher.

Copyright © 2022 Marie, Leroy, Darricau, Alfos, De Smedt-Peyrusse, Richard, Vancassel and Bosch-Bouju. 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) and the copyright owner(s) 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.

SUPPLEMENTAL MATERIALS

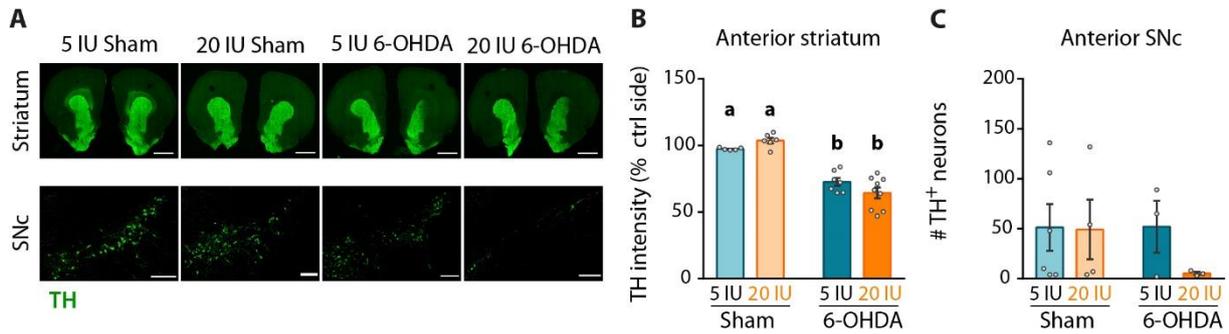
Supp. Fig. 1



Supp. Fig. 1. Impact of 6-OHDA lesion and dietary vitamin A on activated microglia in the striatum

(A) Representative immunofluorescence images of intermediate striatum labelled with Ionized calcium binding adapter molecule 1 (IBA1) (green) for the 4 experimental groups. The square shows a zoom on IBA1⁺ cells in the striatum. Scale bar: 1000 μ m for whole striatum and 25 μ m for zoom images. (B, C) Quantification of density of IBA1⁺ cells/area (mm²) in intermediate striatum (B) and posterior striatum (C). (D, E) Quantification of fluorescence intensity of IBA1 staining in intermediate striatum (D) and posterior striatum (E). The fluorescence intensity is ranging from 0 to 255. Results are expressed as means \pm SEM with individual data points. No significant difference was found. Details of the statistical analysis are summarised in (Supp. Table. 1).

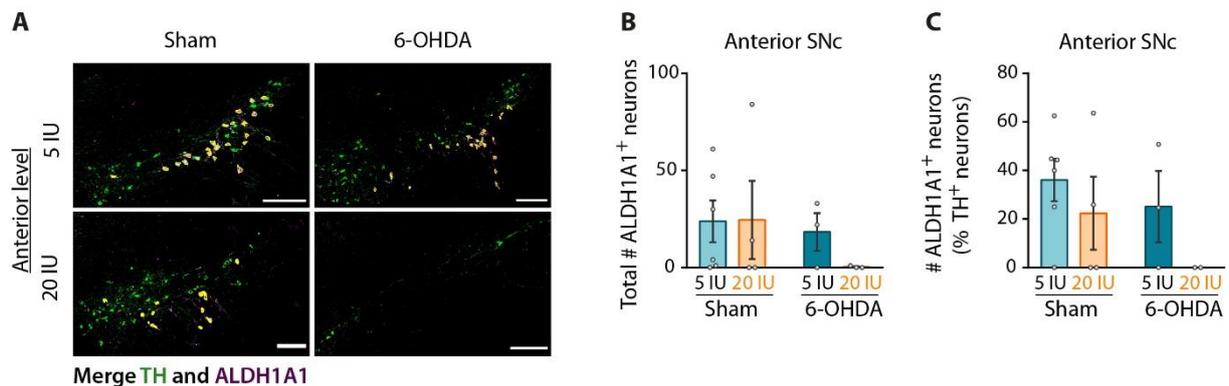
Supp. Fig. 2



Supp. Fig. 2. Extent on DA fibres in the anterior striatum and DA neurons in the anterior SNc

(A) Representative immunofluorescence images, for the 4 experimental groups, of anterior striatum (lesioned side on the right) and SNc (lesioned side only) immunostained for tyrosine hydroxylase (TH) (green). The scale bar corresponds to 1000 μ m for striatum images and 200 μ m for SNc images. (B) Quantification of fluorescence intensity of TH staining in anterior striatum. TH intensity is expressed as percentage (%) of the ipsilateral side. (C) Quantification of number (#) of TH⁺ neurons in anterior SNc. Results are expressed as means \pm SEM with individual data points for histogram. a-b: values significantly different. Details of the statistical analysis are summarized in (Supp. Table. 1).

Supp. Fig. 3

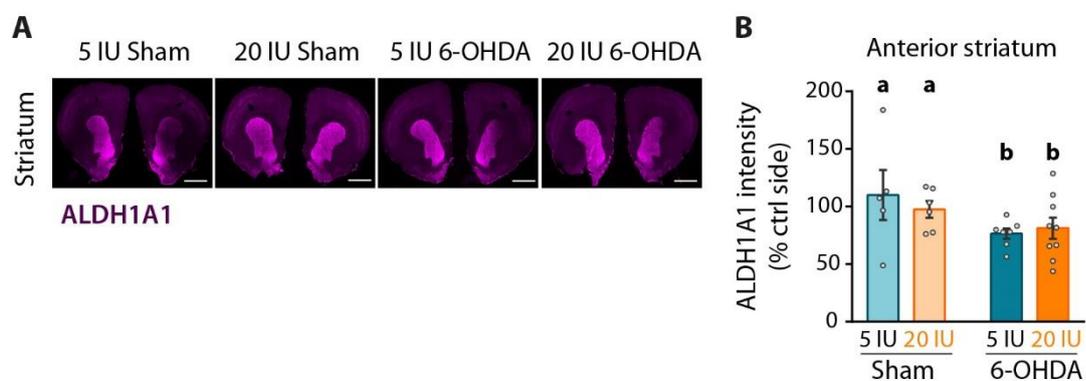


Supp. Fig. 3. Immunostaining of ALDH1A1 positive dopaminergic neurons in anterior SNc

(A) Representative immunofluorescence images, for the 4 experimental groups, of anterior SNc (lesioned side) immunostained tyrosine hydroxylase (TH) (green) and aldehyde dehydrogenase A

subtype $\alpha 1$ (ALDH1A1) (magenta). Co-staining is highlighted in yellow. Scale bar: 200 μm . (B) Quantification of number (#) of ALDH1A1⁺ neurons in anterior SNc. (C) Quantification of number of ALDH1A1⁺ and TH⁺ neurons expressed in percent (%) of TH⁺ neurons in anterior SNc. Results are expressed as means \pm SEM with individual data points for histogram. No significant differences have been found. Details of the statistical analysis are summarized in (**Supp. Table. 1**).

Supp. Fig. 4



Supp. Fig. 4. Immunostaining of ALDH1A1 in the anterior striatum

(A) Representative immunofluorescence images, for the 4 experimental groups, of anterior striatum (lesioned and control side) immunostained for ALDH1A1 (magenta). The scale bar corresponds to 1000 μm . (B) Quantification of fluorescence intensity of ALDH1A1 staining in anterior striatum. ALDH1A1 intensity is expressed as percentage (%) of the ipsilateral side. Results are expressed as means \pm SEM with individual data points for histogram. a-b: values significantly different. Details of the statistical analysis are summarized in (**Supp. Table. 1**).

Data						
Supplemental Figure 1	Statistical test	n	Outcome measure	6-OHDA effect	Vitamin A effect	Interaction
Supp. Fig. 1.B: IBA1 intermediate striatum	2-way ANOVA	6-9	# IBA1 cells / mm ²	F (1, 25) = 0.04925 p=0.826	F (1, 25) = 0.5553 p=0.463	F (1, 25) = 1.055 p=0.314
Supp. Fig. 1.C: IBA1 posterior striatum	2-way ANOVA	6-9	# IBA1 cells / mm ²	F (1, 25) = 0.3089 p=0.583	F (1, 25) = 0.113 p=0.739	F (1, 25) = 0.6378 p=0.432
Supp. Fig. 1.D: IBA1 intermediate striatum	2-way ANOVA	6-9	Intensity	F (1, 26) = 0.1542 p=0.697	F (1, 26) = 1.053 p=0.314	F (1, 26) = 0.00165 p=0.967
Supp. Fig. 1.E: IBA1 posterior striatum	2-way ANOVA	6-9	Intensity	F (1, 26) = 0.605 p=0.443	F (1, 26) = 0.4112 p=0.527	F (1, 26) = 0.06398 p=0.802
Supplemental Figure 2				6-OHDA effect	Vitamin A effect	Interaction
Supp. Fig.2B: TH anterior striatum	2-way ANOVA	5-9	Intensity	F (1, 23) = 90.78 p<0.001 ***	F (1, 23) = 0.07866 p=0.7816	F (1, 23) = 4.705 p=0.040 *
Supp. Fig.2C: TH anterior SNc	2-way ANOVA	3-6	Number of neurons	F (1, 12) = 0.666 p=0.430	F (1, 12) = 0.8462 p=0.375	F (1, 12) = 0.7077 p=0.416
Supplemental Figure 3				6-OHDA effect	Vitamin A effect	Interaction
Supp. Fig.3B: ALDH1A1 anterior striatum	Two way ANOVA	3-6	Number of neurons	F (1, 12) = 1.101 p=0.314	F (1, 12) = 0.3758 p=0.551	F (1, 12) = 0.4359 p=0.521
Supp. Fig.3C: Merge anterior SNc	Two way ANOVA		Number of neurons	F (1, 12) = 0.7789 p=0.394	F (1, 12) = 1.216 p=0.291	F (1, 12) = 0.0001683 p=0.989
Supplemental Figure 4				6-OHDA effect	Vitamin A effect	Interaction
Supp. Fig.4B: ALDH1A1 anterior striatum	Two way ANOVA	5-9	Number of neurons	F (1, 23) = 5.092 p=0.033 *	F (1, 23) = 0.1182 p=0.734	F (1, 23) = 0.6147 p=0.441

Supp. Table 1. Summary of statistical analysis

Statistical significance was assessed as #p < 0.09, *p < 0.05, **p < 0.01, ***p < 0.001.

Étude 2 : Impact d'une carence nutritionnelle en vitamine A sur le système dopaminergique nigro-strié de rats à l'âge adulte.

Article en préparation

Au regard des résultats intéressants de la première étude, montrant un effet modulateur de l'apport alimentaire en vitamine A sur la voie nigro-striée, nous avons décidé de poursuivre la caractérisation des mécanismes sous-jacents. L'objectif de cette seconde étude visait à évaluer l'impact d'une diminution de la biodisponibilité en vitamine A sur l'intégrité du striatum et de la voie nigro-striée à l'âge adulte. Dans ce but, des rats adultes (180-200g) ont été soumis à différentes doses de régimes en vitamine A, 0.4 IU/g, 5 IU/g et 20 IU/g, correspondant respectivement à un apport sub-déficient, suffisant et enrichi en vitamine A. Cette étude nutritionnelle a été conduite pendant 6 mois afin d'évaluer l'effet chronique d'une modulation de la signalisation des rétinoïdes, médiée par l'apport alimentaire en vitamine A, au niveau du striatum. Les résultats obtenus pour les dosages plasmatiques et hépatiques de rétinol ainsi que l'étude de l'expression des gènes du métabolisme de la vitamine A nous ont permis de valider l'utilisation de la sub-carence à 0.4 UI/g comme modèle de déprivation en vitamine A à l'âge adulte en s'affranchissant des effets développementaux de la carence. De manière intéressante, les données obtenues par qPCR et immunohistochimie tendent à confirmer les résultats obtenus dans l'étude 1 et suggèrent une différence de sensibilité du système dopaminergique nigro-strié vis-à-vis d'une altération de la signalisation des rétinoïdes entre l'âge adulte et la période développementale chez le rat. Ces données surprenantes nous ont amenées à étudier d'autres systèmes impliqués dans la neuromodulation du striatum. Les résultats obtenus suggèrent une implication indirecte de la vitamine A dans l'activité nigro-striée médiée par le système cholinergique et la compartimentation structurelle du striatum (striosomes). Enfin, l'étude de la réversibilité des déficits induits par la sub-carence montre qu'une supplémentation nutritionnelle de 6 semaines à 20 UI/g d'aliments ne permet pas de normaliser l'expression de l'ensemble des gènes impactés par la carence, mettant en avant la nécessité d'un apport suffisant en vitamine A tout au long de la vie.

Ainsi, cette deuxième étude apporte de nouveaux éléments de compréhension des mécanismes qui sous-tendent l'implication de la vitamine A dans le maintien de l'intégrité du striatum et de la voie nigro-striée à l'âge adulte.

Non-developmental modulation of striatal signaling by dietary vitamin A in adult rats

Anaïs MARIE^a, Morgane DARRICAU^a, Jean-Christophe HELBLING^a, Serge ALFOS^a, Aline FOURY^a, Emmanuel RICHARD^b, Clementine BOSCH-BOUJU ^{a*}

^a Univ. Bordeaux, INRAE, Bordeaux INP, NutriNeuro, UMR 1286, F-33000, Bordeaux, France

^b Univ. Bordeaux, INSERM, U1035, CHU Bordeaux, F-33000, Bordeaux, France

* Corresponding author: Clementine Bosch-Bouju (clementine.bosch-bouju@inrae.fr)

Abstract

The striatum is a brain structure involved in the control of voluntary movement that is highly enriched in retinoic acid, the active metabolite of vitamin A, and retinoids receptors. The activity of the striatum is also tightly modulated by dopaminergic and cholinergic systems. Initial studies revealed vitamin A signaling failure was deleterious for dopaminergic and cholinergic transmissions when initiated during development. However, the involvement of retinoid signaling in the neuromodulation of the striatum and the maintenance of its integrity in adulthood has not been established yet.

In the present study, we investigated the impact of vitamin A bioavailability on the appropriate functionality of the striatum in adult rats using a nutritional approach. Six-week-old rats were fed with specific diets, either sub-deficient, sufficient or enriched in vitamin A (0.4; 5 and 20 IU/g of diet respectively) during 26-week. Assessment of retinol levels, in the plasma and the liver, and hepatic vitamin A metabolism validated sub-deficiency realized with 0.4 IU/g at adulthood as a rat model of non-developmental nutritional vitamin A deprivation. The integrity of the striatal function was assessed with immunofluorescence and qPCR analyses. Results suggest a differential sensitivity of the dopaminergic system between adulthood and earlier developmental periods. Additionally, this study revealed a decrease of retinoid signaling in the striatum associated to a dysfunction of the cholinergic system, induced by 26-week vitamin A sub-deficiency. Lastly, the reversibility of impairment induced by vitamin A sub-deficiency at adulthood was assessed. A 6-week vitamin A enriched diet in sub-deficient rats allows only a partial rescue of deficits induced by vitamin A deprivation, strengthening the necessity of maintaining adequate vitamin A intakes along life.

Taken together these results demonstrated the importance of retinoid signaling in the functional neuromodulation of the striatum at adulthood in rats and support the beneficial effect of nutritional supplementation with vitamin A.

Key words: Vitamin A; dietary treatment; nutrition; striatum; acetylcholine; ALDH1A1; dopamine; SNc; adulthood

1. Introduction

Vitamin A (retinol), is an essential micronutrient that requires to be provided through the diet (Reboul, 2013) or pharmacological supplements. Vitamin A with its endogenous metabolites and synthetic analogues belong to the family of retinoids (Carazo et al., 2021). Retinoid signaling, mediated by the active metabolite of vitamin A, all-trans-retinoic acid (RA), is essential for development and maintenance of the central nervous system throughout life (Blomhoff and Blomhoff, 2006; Maden, 2007; McCaffery et al., 2006; Shearer et al., 2012). RA acts by binding to its heterodimeric nuclear receptor. The activated receptors then bind to the nuclear RA response element (RARE) and act as a transcription factor to modulate the expression of targeted genes (Al Tanoury et al., 2013; Iskakova et al., 2015; Lane and Bailey, 2005). The retinoids receptors, namely retinoic acid receptor (RAR) and retinoid X receptor (RXR), each exist in three isoforms, alpha, beta and gamma, that are encoded by different genes and present different tissue expression patterns, including the striatum in the brain (Krezel et al., 1999; Piskunov et al., 2014; Zetterström et al., 1999). Mice knockout for some isoforms of retinoid receptors exhibit a significant impairment in forward locomotion and motor coordination, suggesting an involvement of retinoids signaling in the control of voluntary movement (Krezel et al., 1998).

Striatum is part of the basal ganglia network that is involved in the control of voluntary movement, and the regulation of its function is dependent on dopamine (DA) (Dudman and Krakauer, 2016). Striatum is the main input structure of the basal ganglia and it receives DA inputs from the substantia nigra pars compacta (SNc), which constitute the nigro-striatal pathway (Redgrave et al., 2010). Supporting the relevance of vitamin A for the nigro-striatal pathway, the striatum is a retinoid-metabolizing region, highly enriched in RA and retinoids receptors isoforms RAR β and RXR γ (Kane et al., 2005; Krezel et al., 1999; Zetterström et al., 1999). Furthermore, RA synthesis enzyme ALDH1A1, aldehyde dehydrogenase 1 subtype A1, is specifically expressed in a sub-population of dopaminergic neurons from the SNc (Wu et al., 2019, Poulin et al., 2018). Mice knockout for ALDH1A1 exhibit motor impairment in the rotarod and the open field tests as well as a degeneration of DA neurons (Liu et al., 2014; Wey et al., 2012; Wu et al., 2019). In addition to these constitutive alterations of vitamin A pathway, studies using vitamin A-deficient (VAD) rats and mice through dietary manipulations, showed similar motor impairments (Carta et al., 2006; Kitaoka et al., 2007). Moreover, VAD rats also present a decrease in acetylcholine release in the striatum (Carta et al., 2006). Both cholinergic and dopaminergic signaling are necessary for the effective neuromodulation of the striatum to allow the precise control of voluntary movement (Carta et al., 2006; Cocco et al., 2002; Ztaou and Amalric, 2019). Altogether, these results suggest an important role for vitamin A and retinoids signaling, in the integrity and signalization of the nigro-striatal pathway. If the importance of

vitamin A in the homeostasis of basal ganglia motor function is commonly assumed, the molecular mechanisms underlying these effects remain unclear (Lane and Bailey, 2005; Podleśny-Drabiniok et al., 2017; Zetterström et al., 1997).

The vitamin A metabolism becomes disrupted with aging, including decreased RA signaling in the brain (Dumetz et al., 2020a; Enderlin et al., 1997a; Etchamendy et al., 2001; Pallet et al., 1997). This age-related decrease of retinoid signaling coincides with impairments in memory performance similar to that observed in VAD rats (Cocco et al., 2002; Dumetz et al., 2020b; Etchamendy et al., 2003). Interestingly, nutritional vitamin A supplementation can prevent this age-related cognitive decline in rodents, and improves RA signaling pathways in the hippocampus (Dumetz et al., 2020a; Mingaud et al., 2008; Touyarot et al., 2013). The beneficial effects of vitamin A supplementation on the nigro-striatal pathway and dopaminergic-related behavior, have mainly been investigated using retinoids derivatives, such as injection of RA and its isoform 9-cis RA, or by manipulating retinoid signaling with administration of RXR agonists (Esteves et al., 2015; Friling et al., 2009; Reiner et al., 2014; Yin et al., 2012). However, the potential benefit of vitamin A using a nutritional, diet-based approach, has not been investigated.

Additionally, the majority of studies evaluating the effect of an alteration of retinoid signaling on motor behavior were initiated during the developmental period (i.e., constitutive knockout or vitamin A deficiency from gestation / weaning). Beyond the developmental effect, it is necessary to determine whether altered vitamin A signaling in adulthood results in similar effects. Given the importance of vitamin A in striatum-related motor behavior, we investigated the involvement of retinoid signaling in the neuromodulation (DA and Ach) of the striatum and the maintenance of its integrity in adult rats with specific diets, either sub-deficient, sufficient or enriched in vitamin A, starting at 6 weeks of age.

In the present study, we assessed the impact of gradual doses of nutritional vitamin A intake on body weight, plasma retinol level and postural stability of rats over a 26-week feeding period. Post-mortem analyses were performed to study the impact of dietary treatments on retinoid metabolism and signaling in the liver, the storage organ of vitamin A, and in the striatum. The integrity of striatal function was assessed through qPCR and immunofluorescence analyses of the dopaminergic and cholinergic systems, since enzymes expression implicated in both systems are controlled by RA (Berrard et al., 1993; Berse and Blusztajn, 1995; Samad et al., 1997; Sodja et al., 2002). Finally, we investigated the reversibility of retinoids signaling impairment incurred by vitamin A deficiency with a 6-week

nutritional supplementation with vitamin A.

Our results show that retinoid signaling is required for effective function of the striatum and the nigro-striatal pathway at adulthood and that moderate vitamin A supplementation contributes to maintain striatal signaling homeostasis in adult rats.

2. Material and Methods

2.1. Animals and diet

Six-week-old (weight 180-200 g) Sprague dawley male rats were obtained from Janvier Labs (France). Animals were housed in pairs with a 12-h light/dark cycle (light on at 7 a.m.) in enriched and controlled environment (22 °C ± 2°C, 40 % of humidity). Upon their arrival, the batch of 32 rats were randomly divided into four experimental groups of 8 rats. The first group received a diet with a retinol content considered sufficient to cover an adult animal body's need (5 IU retinol/g of diet, INRAE, Jouy-en-Josas, 1 IU = 0.3 µg retinol), the second group received an enriched diet with vitamin A (20 IU retinol/g of diet, INRAE, Jouy-en-Josas). The two last groups received a diet with retinol-deficient content (0.4 IU retinol/g of diet, INRAE, Jouy-en-Josas). At week 20, one of these two groups under deficient diet was switched to an enriched diet for 6 additional weeks. Rats had ad libitum access to water and customs diets, which were isocaloric and differed only by the amount of retinol provided under the form of retinyl palmitate. Rats were weighted weekly and no body weight difference existed between the four groups at experiment onset. The whole experiments were performed according to criteria of the European Communities Council Directive (2010/63/UE) and the French National Committee (authorisation 16476-2018052314372190). All efforts were made to reduce the number of animals used and to minimize their suffering.

2.2. Step test

Postural stability of rats was assessed with the step test from week-4 of the diet until the end of the 26-week feeding period (Ijomone et al., 2014). The test was performed every two or three weeks. Animals were habituated to the restraint for two consecutive days, three days before the first test was performed. Rats were hold, by a trained experimenter, in a way to

count the number of adjusting steps made by the rat with each forelimb in response to experimenter-induced lateral movement. Rats were slowly moved over a 90 cm-long bench (right to left and reverse). The procedure was performed 3 times for each paw, on both directions. For analysis we used the average number of steps in 3 trials for both forelimbs. Results are presented as the percentage of total number of adjusting steps made by the rat in the first test for each experimental group.

2.3. Sample collection

In order to assess the effect of dietary treatment, blood was collected from the tip of the rat's tail at 7 and 16 weeks of diet. A cut at the end of the tail was made, in the least innervated part, which heals quickly following the procedure. Following the 26-week feeding period, all animals were euthanized for subsequent analyses. Rats were euthanized with intraperitoneal injection of hexagon (150 mg/Kg)/lidocaine (230 mg/Kg). Blood was collected via an intracardiac puncture and then rats were transcardially perfused with a solution of phosphate buffer saline (PBS) in order to remove blood from tissues. After decapitation, brains were quickly extracted and divided into 2 parts. The right hemisphere was immediately frozen in isopentane and stored at -80 °C. The left hemisphere was post-fixed in paraformaldehyde 4 % for 24 h and plunged in 30 % sucrose solution for 48h before storage at -80 °C. Samples of liver were also collected and stored at -80 °C for retinol assay and RT-qPCR analysis. All Blood samples were centrifuged (10 min, 10 000 x g, 4 °C) and plasma were collected and stored at -80 °C until used.

2.4. Retinol assays

Serum and liver retinol levels were determined by high performance liquid chromatography (HPLC) as previously described (Biesalski et al., 1983). Liver is the storage organ for vitamin A in the body. Liver extracts were homogenized in sodium phosphate-EDTA (0.05 M, pH 7.8) buffer. Briefly, 100 µL of liver homogenates or plasma were added to 150 µL of tocopherol acetate (1.057 mmol/L, T3376, Sigma St.Louis, MO, USA) solution, used as internal standard. After addition of 600 µL of hexane and butyl-hydroxy-toluene solution (20 mg/mL, ref B1378, Sigma St.Louis, MO, USA), 200 µL of homogenates were centrifuged (2 min, 20 °C, 16,000 x g) and the supernatant containing retinol was recovered and evaporated under nitrogen. The resulting residues containing retinol were treated with methanol before HPLC analysis. Two vitamin A calibration standards (Chromsystems 34004) were processed in parallel with samples. Results are given in µmol/g and µmol/L for the liver and plasma samples respectively.

2.5. Real-Time quantitative Polymerase Chain Reaction (RT-qPCR)

The expressions of the different genes of interest in the striatum and in the liver were evaluated by RT-qPCR. Samples of striatum were obtained from 1 mm-punches performed in the right hemisphere of brain frozen in isopentane and stored at -80 °C at the time of euthanasia. To do so, 200 µm-coronal brain sections were performed using a cryostat tissue slicer (Leica Biosystems, Germany). According to rat brain atlas (Paxinos and Watson, 2007), punches of the striatum were taken between 2.20 and -1.20-mm from bregma and immediately stored at -80 °C for subsequent RT-qPCR.

Prior to the qPCR, total RNA was extracted from aliquots of the liver stored at -80 °C and punches of striatum using TRIzol® reagent (Invitrogen, Fisher Scientific, France) as previously described (Dumetz et al., 2020a). The purity and quantity of RNAs obtained were measured by using Nanodrop One (Life technologies, France), and their quality was assessed using the RNA 6000 Nano LabChip kit in combination with the 2100 Bioanalyzer (Agilent Technologies, France). Next, 500 ng of RNA from the striatum and 1 µg of RNA from the liver, were reverse-transcribed into complementary DNA using the enzyme ImProm-II reverse transcriptase (ref A3802, Promega, France) in a final volume of 20 µL. Then, the RT-qPCR was performed in duplicate for each sample, with 10 ng of cDNA in a final volume of 10 µL, deposited in 384-well plates, and using the LightCycler 480 II system (Roche Diagnostics, Meylan, France). Genes amplification was performed using SYBR Green I Master kit (ref RR420L, TAKARA BIO Europe, France) and appropriate primers. The forward and reverse primer sequences used to amplify genes of interest are summarized in (**Table 1.**). Data were analyzed using the comparative threshold cycle method performed with the Light-cycler 480 1.5 version software. Results were normalized with 2 house-keeping gene, B2-microglobulin (B2M) and Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) (**Table 1.**) and expressed as relative expression of mRNA.

Gene	Sequence Forward primer (5'- 3')	Sequence reverse primer (5'- 3')
AADC	CAGCTATGCTTGCGGACATG	AGCCCAGGAGAAGCCAATG
AChE	AGTATCTTCCGGTTTTCTTCGT	TGCAGGTCTTGAAAATCTCCAGTA
ALDH1A1	TGGCCTTCACGGGATCAA	GCTTTTTCTGCAGCTTCCTT
ChAT	TCCCAGAAGCCTAAGAATGCA	TCCCTTGGCAGCTATGTGAGA
CRABP2	TGTGGATGGGAGACCCTGTAA	CGCACACCATTTTTGTTTTCACT
CYP26 a1	AAGCGCAGGAAATACGGCTTC	AAGATGCGCCGCACATTATCC
CYP26 b1	ACTCCATTGGCGACATCCA	GGTAGCTCTCGAGTGCCTCATG
D1R	GCCCCGAGGCTCCATCT	ACGGCATGAGGGATCAGGTA
D2R	TTATCATGAAGTCTAATGGGAGTTTTCC	CTTGACAGCATCTCCATTTCCA
LRAT	ACCTTCTGAGTGCCTTCCTTG	AGTGTACGCGACCCATTTTACC
MAOA	GCTGGAGAACGAGCAGCTAGA	TCCTTCTTCGCGACTTTTTCC
MOR1	CATGCTATCGGGCTCCAAAG	CAGCACCATCCGGGTGAT
NLRP3	GTGCGTGGGACTGAAGCAT	GACAACACGCAGATGTGAGACA
NOS 1	CAACTATAGACTCACCCGTCCTT	GCCAATTTCTTAAAGCCGATAGC
NOS 3	GACCGATTACACGACATTGAGATC	CCGGTAGAGATGGTCCAGTTG
P2RX7	CACCATCAAGTGGATCTTGCA	GCTTGTGCTCATCAAAGCA
RAR β	AGTGGGCATGTCCAAAGAGTCT	TCTGTGCACTCCTGCTTTGAA
RBP4	TCCAGCGAGGAAACGATGAC	TGCAGAGCGAAGGTGTGCGTA
REH	TGAAGTTCTGGGCCAACTTTGC	TGGCACCAATCTGCAAATACCC
RXR γ	TTGGAGGACCAGGTCATTCTG	AGAAGGAGGCAATCAGCAATTC
SOD 1	CCATCATTGGCCGTAATATGG	TCCACCTTTGCCCAAGTCA
SOD 2	GCCAAGGGAGATGTTACAACTCA	CCCCGCCATTGAACTTCA
STRA6	TCTACACTCCAGAGCCAGGATTC	CAGGGTGGCCGAGATCAC
B2M	GCGTGGGAGGAGCATCAG	TGTGCTGTAGGCCCAACAGA
GAPDH	GCGTGGGAGGAGCATCAG	TGTGCTGTAGGCCCAACAGA

Table 1. Sequences of primers used in qPCR

2.6. Immunofluorescence staining

Right hemispheres of frozen brain post-fixed in 4 %-paraformaldehyde were used to cut 40- μ m thick coronal sections using a cryostat tissue slicer (Leica Biosystems, Germany). According to (Favier et al., 2017), we targeted 3 levels of interest for striatum and SNC, designated as anterior (bregma striatum: +2.2, SNC: -5.2), intermediate (bregma striatum: +1.6, SNC: -5.3) and posterior (bregma striatum: +0.7, SNC: -5.8). Sections were processed for double-fluorescent immunohistochemistry targeting tyrosine hydroxylase (TH) and ALDH1A1. Sections were washed with PBS and then blocked in a 3 % bovine serum albumin, 0;3 % Triton X-100, PBS solution for 1 h at room temperature. The sections were then incubated with primary antibodies diluted in blocking solution over night at 4 °C, as follows: mouse anti-TH (1:1 000; ref mab 318, Merck) and rabbit anti-ALDH1A1 (1:1 000; ref HPA002123, Sigma). The next day, sections were washed three times with blocking solution and incubated for 2 h at room temperature with secondary antibodies conjugated to a fluorochrome diluted in blocking solution as follows: donkey anti-mouse IgG-Alexa 488 (1:1 000; ref ab150105, Abcam) and donkey anti-rabbit IgG-Alexa 568 (1:1 000; ref ab175470, Abcam). From the incubation with secondary antibodies until the end of the experiment,

sections were protected from light. Finally, sections were washed one time with blocking solution and then three times with PBS before being mounted in mounting medium with DAPI (ref sc-359850, CliniSciences, France).

2.7. Image analysis

Immunofluorescence staining and image acquisition were performed on half-brain sections (right hemisphere). All striatum sections were scanned using a widefield microscope (Hamamatsu Nanozoomer 2.0 HT) with 20X (20X, NA 0.75) objective to visualize the whole half striatum. SNc sections were scanned using a laser scanning confocal microscope (Leica DM5500 TCS SPE) with 40X oil-immersion objective to visualize dopaminergic neurons in the tissue. Setting parameters for acquisition, such as laser power or photomultipliers gain, were kept constant between all animals for a given labelling. Digital images obtained were processed with Image J software. In order to limit analysis bias, we used semi-automated quantification with macros on Image J.

For TH and ALDH1A1 staining in the striatum, intensity of staining was quantified. Green and magenta fluorescence channels were assigned to TH and ALDH1A1 associated signals respectively. From TH channel, we selected the region corresponding to the whole striatum using the “wand” set tool in Image J, which defines the region of interest (ROI). Area and staining intensity for TH and ALDH1A1 were measured based on this ROI.

For SNc, final images of the whole half SNc correspond to a mosaic of several images taken individually at 40X. For TH and ALDH1A1 labelled in SNc, we quantified the number of positive neurons. Similar to the striatum, we assigned green color for TH staining and magenta color for ALDH1A1 staining. The silver color on figures corresponds to the merge of both colors and indicates TH and ALDH1A1 positive neurons (TH+ and ALDH1A1+). From TH channel, we isolated neurons from the background with a median filter and applied a threshold with common parameters for all cuts. Then, we selected labelled neurons with the tool “analyze particles” and we used the function “count” to determine the number of TH positive neurons in the SNc. The process was repeated for ALDH1A1 and merge channels, in order to determine the number of TH+/ALDH1A1+ neurons. Note that all ALDH1A1+ neurons were also TH+ neurons.

These analyses were carried out for the anterior, intermediate and posterior level of striatum and SNc.

2.8. Statistical analysis

Statistical analyses were performed with GraphPad prism 7.0 (Graphpad software) and details are summarized in (**Table 2**). Results were analyzed with non-parametric tests and are presented as means \pm SEM. In order to assess the time effect, Two-way ANOVA repeated measure were used to analyze results in plasma retinol assay, step test and body weight growth. The effect of the three dietary treatments was assessed with Krustal-Wallis test. A post hoc test was performed, based on the two-stage step-up method of Benjamini, in case of significant interaction ($p < 0.05$). When we compared only two experimental groups we performed Mann-Whitney tests. In order to assess the reversibility of deficiency, results obtained in the fourth experimental group (0.4/20 IU) were normalized with a 'min to max' normalization. In this calculation, 'min' was the median of the sub-deficient group (0.4 IU) and 'max' the median of the enriched group (20 IU) for each parameter evaluated. Normalized results were analyzed with one-sample t-test to compare mean of value with a theoretical mean (1 or 0).

To assess the effect of gradual dose of dietary vitamin A intake on vitamin A metabolism, retinoid signaling and the integrity of nigro-striatal pathway we performed a correlative analysis with R studio. First, we determined the number of principal components by plotting the eigenvalues against the number of dimensions (fviz eig function). This analysis indicated that the first two principal components explained 18.9 % and 10.9 % of data variability, respectively. Then, a sparse principal component analysis (sPCA) was performed, which identified 20 variables of interest to explain variability between animals (spca function). With these 20 variables, a correlative analysis was performed (cor.mtest function) and illustrated by a correlation matrix (corrplot function). The individual correlation between plasma retinol level at 26 week and liver retinol level were analyzed with linear regression. Statistical significance in statistics tables is expressed as * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$. The significance on the figure is expressed with letter a, b and c, which differed from each other.

3. Results

3.1. Characterization of the nutritional model with vitamin A diets

Adult male rats were subjected to three different dose of dietary vitamin A, leading to 3 experimental groups, which correspond to an enriched diet (20 IU retinol/g of diet, referred to as 20 IU thereafter), a sufficient diet (5 IU retinol/g of diet, referred to as 5 IU thereafter) or a sub-deficient diet (0.4 IU retinol/g of diet, referred to as 0.4 IU thereafter). In order to assess the long-term effect of vitamin A deprivation or, conversely, of vitamin A supplementation, the nutritional model was carried out for 26 weeks from adult age (**Fig. 1A**).

We first evaluated the effect of diets on body weight. Rats were weighted weekly and different dietary treatment did not induce body weight difference (diet effect: $p=0.813$) (**Fig. 1B**). Each experimental groups exhibit a weight gain of about 400 % at the end of the experiment, compared to experiment onset ($p=0,697$) (**Fig.1C**). Therefore, 26 weeks of nutritional vitamin A sub-deficiency, as well as vitamin A supplementation, did not induce growth deficit compared to rats fed with vitamin A sufficient diet.

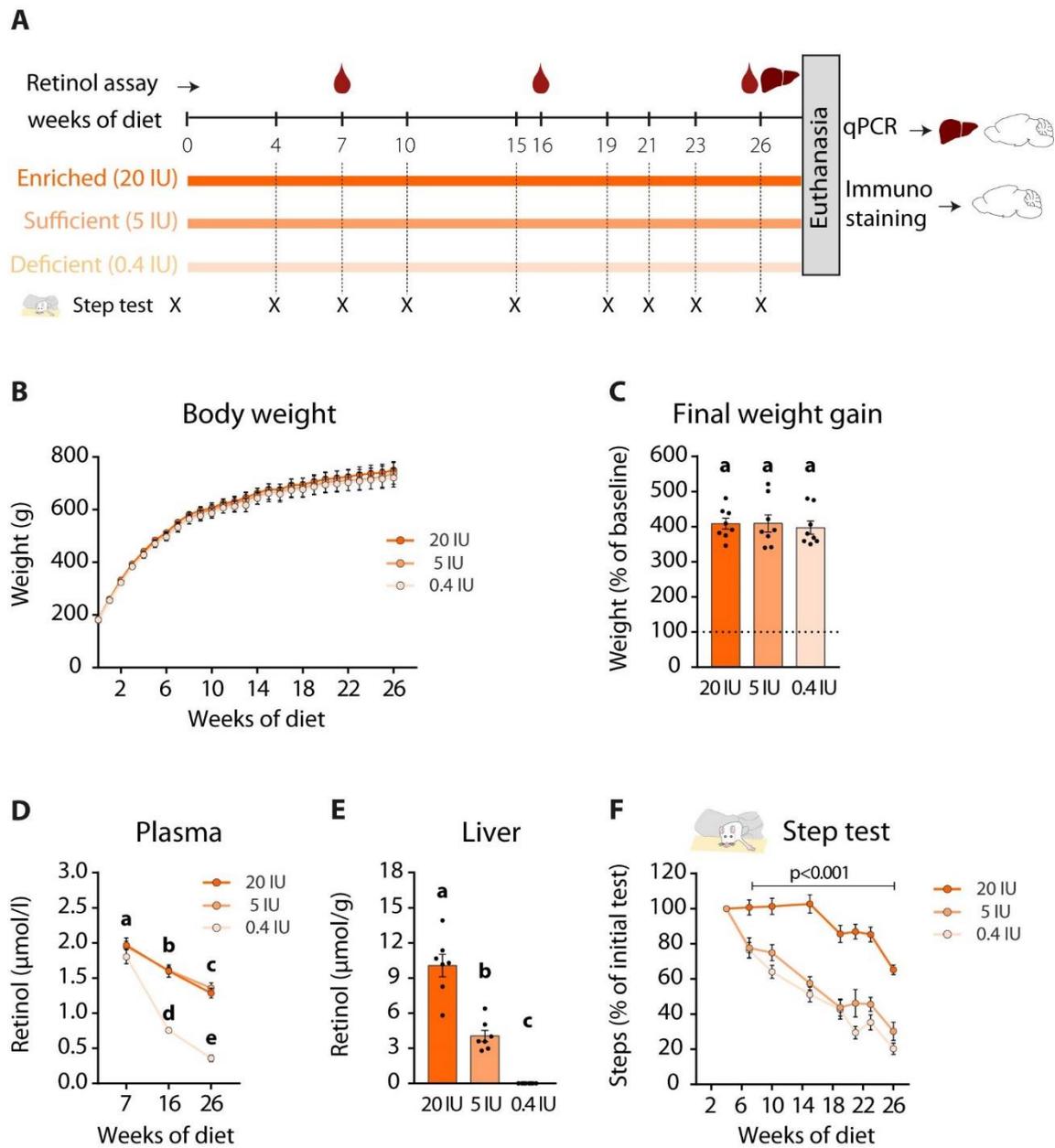


Fig.1. Characterization of the nutritional model with vitamin A diets

(A) Schematic overview of experimental design. 0.4 IU, 5 IU and 20 IU stand for 0.4 IU/g of diet, 5 IU/g of diet and 20 IU /g of diet, respectively. (B, C) Evolution of rats' body weight (g) throughout experiment (B), and final weight expressed in percent (%) of weight at experiment onset (C). (D, E) Levels of retinol in the plasma ($\mu\text{mol/L}$) (D) and in the liver ($\mu\text{mol/g}$) (E). (F) Step test: the number of steps made by both forelimb paw as the percent (%) of steps performed at 4-week of diet. Results are expressed as means \pm SEM with individual data points. a, b and c: values significantly different ($p < 0.005$). Details of the statistical analysis are summarized in (Table. 2).

Then, we evaluated the effect of diets on vitamin A status through plasma and liver retinol

assay. In physiological conditions, the concentration of plasma retinol is highly regulated by the body and maintained at 2 $\mu\text{mol/l}$ in rodents (Pallet and Enderlin, 2011). In order to define the efficiency of nutritional vitamin A deprivation on vitamin A status of rats, we performed retinol assay at 7 and 16 weeks of dietary treatment, and at the end of 26-week feeding period. Retinol level in the plasma of 0.4 IU rat was significantly lower from week 16 of dietary treatment compared to sufficient rats ($p < 0.001$) and supplemented rats ($p < 0.001$) and was almost divided by 3 after 26 weeks of deprivation (5 IU vs 0.4 IU $p < 0.001$ and 20 IU vs 0.4 IU $p < 0.001$) (**Fig. 1D**). Plasma retinol levels of supplemented and sufficient rats were not statistically different at each time point but decreased significantly over the 26-week feeding period (time effect: $p < 0.001$). In the liver, the storage organ of vitamin A, retinol level of 0.4 IU rats was drastically decreased compared to sufficient ($p = 0.019$) and supplemented rats ($p < 0.001$). Of note, vitamin A enriched diet significantly increased retinol level in the liver compared to sufficient rats ($p = 0.047$) (**Fig. 1E**). These results confirm the impact of dietary vitamin A treatment on retinol metabolism and allowed us to validate the sub-deficiency as model of nutritional deprivation with vitamin A in rats.

Additionally, we measured the effect of dietary vitamin A treatment on postural stability with the step test, as a measure of the functional impact of dietary treatment on motor ability. The first stepping session was performed from 4-week of diet and corresponds to the stepping baseline. Results are expressed in percent of this baseline for each group. The number of adjusting steps significantly decreased with time for the 3 experimental groups (time effect: $p < 0.001$) (**Fig. 1F**). However, the decrease in number of adjusting steps was significantly lower for supplemented rats compared to 0.4 IU rats (week 7-26 $p < 0.001$) as well as sufficient rats (week 7-26 $p < 0.001$). Furthermore, the number of adjusting steps was not significantly different between 0.4 IU and sufficient rats excepted at 21 weeks of diet ($p = 0.007$).

Altogether these results validate a dose-dependent effect over time of dietary vitamin A intake on vitamin A status and consequences on motor function.

3.2. Impact of dietary vitamin A on liver retinol metabolism

In order to further characterize the metabolic impact of vitamin A diets, we measured the mRNA expression level of genes coding for proteins involved in retinol metabolism in the liver (**illustrated in Fig. 2**). In particular, we focused our analysis on retinyl ester hydrolase (REH) and the retinol binding protein 4 (RBP4), both involved in the mobilization of hepatic retinol storage to its target tissues, lecithin:retinol acyltransferase (LRAT), the enzyme responsible for storage of retinol in the form of retinyl ester (esterification), and cytochrome P26a1 (CYP26a1), the enzyme implicated in the degradation of RA. The mRNA expression of REH and RBP4 in the liver does not seem to be impacted by dietary vitamin A treatment ($p = 0.474$ and $p = 0.517$

respectively) (**Fig. 2A, B**). By contrast the gene expression of LRAT was strongly decreased in 0.4 IU rats compared to sufficient ($p < 0.001$) and supplemented rats ($p = 0.003$) (**Fig. 2C**).

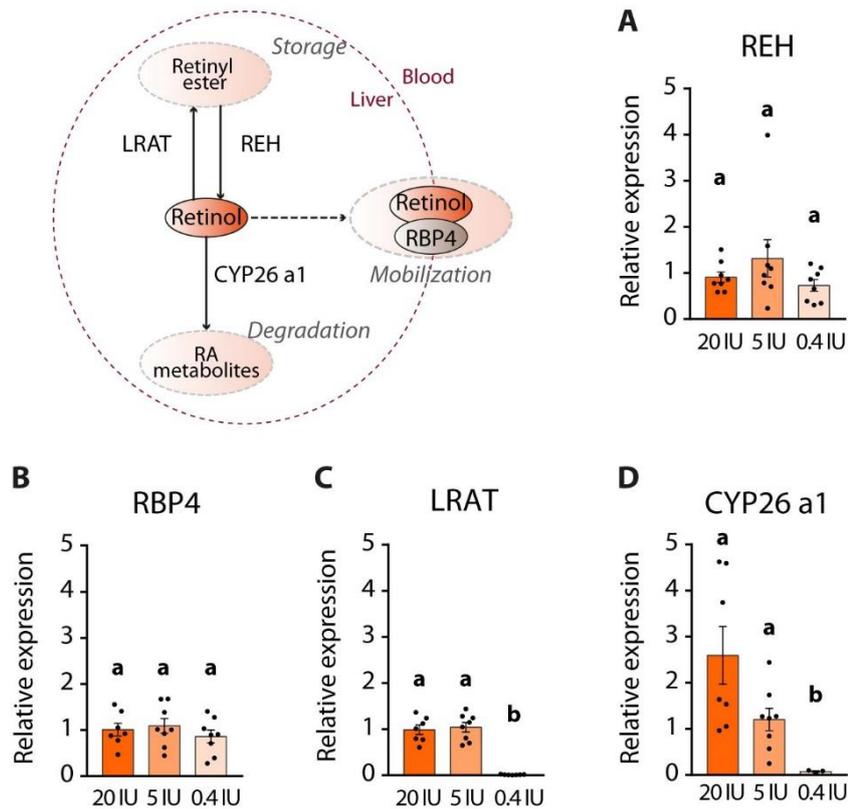


Fig.2. Impact of dietary vitamin A on liver retinol metabolism

The illustration (top left) shows vitamin A metabolism in the liver. (**A-D**) mRNA relative expression of genes coding for REH (A), RBP4 (B), LRAT (C) and CYP26 a1 (D). Results are expressed as means \pm SEM with individual data points. a-b: values significantly different ($p < 0.005$). Details of the statistical analysis are summarized in (**Table. 2**). Abbreviations: RA, retinoic acid; REH, retinyl ester hydrolase; RBP4, retinol binding protein 4; LRAT, lecithin:retinol acyltransferase; CYP26a1, cytochrome P26a1.

Moreover, a significant decrease of mRNA expression for CYP26a1 in the liver of 0.4 IU rats was observed compared to sufficient ($p = 0.044$) and supplemented rats ($p = 0.002$) (**Fig. 2D**). These results demonstrate a clear decrease of liver retinol storage and catabolism of RA, the active metabolite of vitamin A, in rats with nutritional vitamin A sub-deficiency. This regulatory mechanism may help in maintaining vitamin A bioavailability for its target organs, such as brain.

3.3. Correlative analysis between vitamin A metabolism and striatal neuromodulation

In order to investigate the molecular consequences of dietary vitamin A in the striatum, several RT-qPCR were conducted, targeting gene transcripts of proteins involved in retinol metabolism and signaling, and in dopamine and acetylcholine neuromodulation in the striatum. First, a correlative analysis was performed with data from rats with the three diets (0.4; 5 and 20 IU) to identify potential links between gradual doses of vitamin A, retinoid signaling and striatal neuromodulation. A sparse principal component analysis (sPCA) and representation clearly showed a segregation of animals based on dose of vitamin A in the diet (**Fig. 3A**). From the 20 most relevant variables to explain variability given by sPCA analysis, we performed a correlation matrix analysis and represented it as a correlogram (**Fig. 3B**). The correlogram showed several significant associations between the expression of genes coding for proteins involved in striatal neuromodulation and retinoid signaling pathway. A major result from this correlogram is that liver retinol level correlates with more variables than plasma retinol level measured at the end of the 26-week feeding period (**Fig. 3B**). Indeed, the individual correlation between liver retinol level and plasma retinol level revealed a moderate correlation ($R^2 = 0.508$, $p < 0.001$) and we observe that experimental groups are better segregated by retinol assay in the liver (**Fig. 3C**).

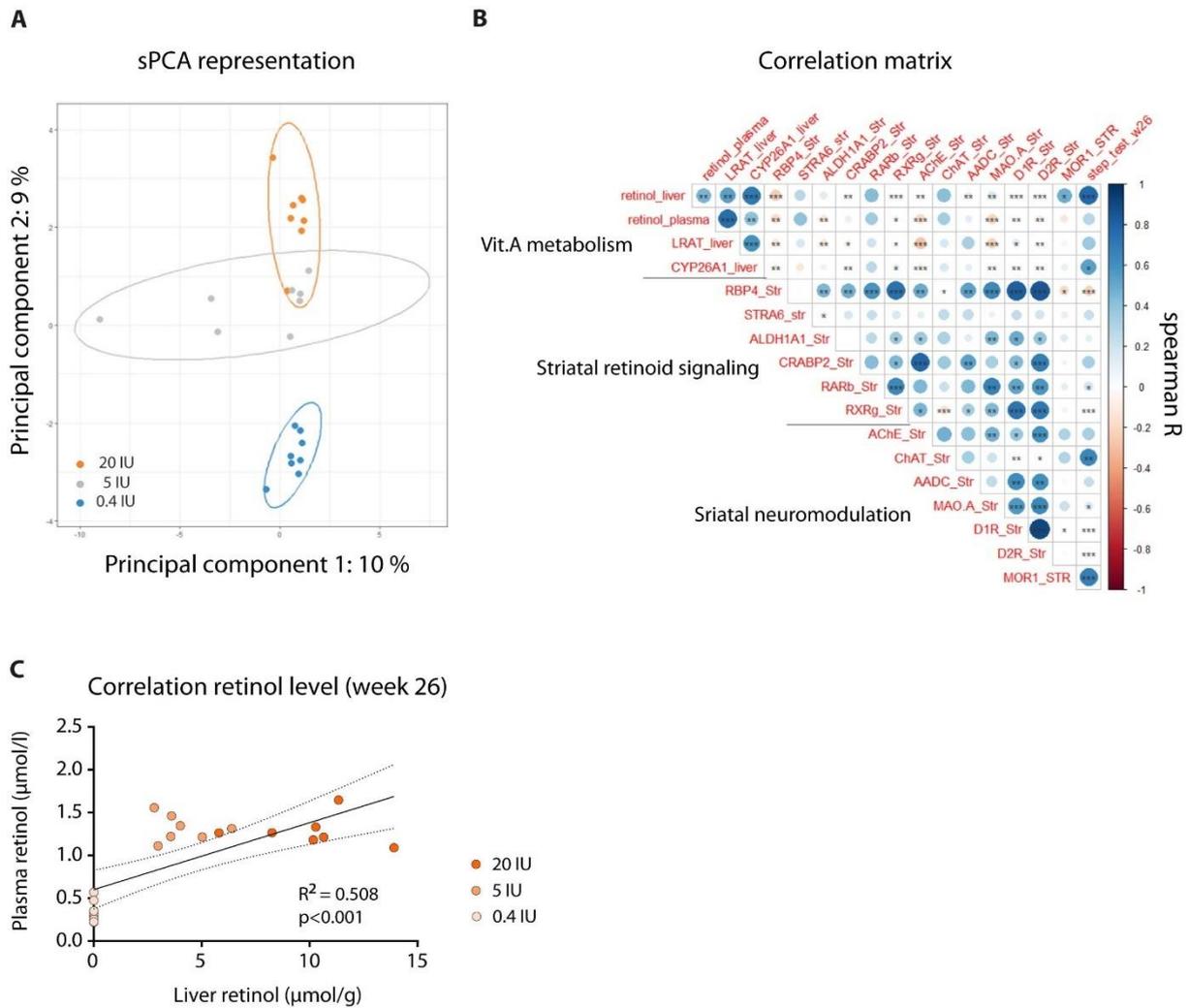


Fig.3. Correlative analysis between vitamin A metabolism and striatal neuromodulation
(A) Representation of the sparse principal component analysis (sPCA). **(B)** Correlogram representing results of the correlation matrix analysis. The value of spearman R for each correlation is represented by the intensity of the color and the size of the circle. Statistical significance: * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$. **(C)** Individual correlation between liver retinol level ($\mu\text{mol/g}$) and plasma retinol level ($\mu\text{mol/l}$).

3.4. Impact of high versus low dose of dietary vitamin A on retinol metabolism in the striatum

Following the correlative analysis, we directly compared between 0.4 IU and 20 IU groups mRNA expression of genes coding for vitamin A metabolism proteins in the striatum, which contains all the cellular machinery necessary for the metabolism of retinol into RA (**illustrated Fig.4**). Vitamin A sub-deficiency significantly decreased the gene expression for Stimulated by Retinoic Acid gene 6 (STRA6) ($p < 0.001$) (**Fig. 4A**), confirming a decrease of retinol entry in the brain of 0.4 IU rats compared to supplemented rats. However, in contrast expression

observed in the liver, we did not observe a dietary effect on catabolism pathway, mediated by CYP26b1 in the striatum ($p>0.999$) (**Fig. 4B**).

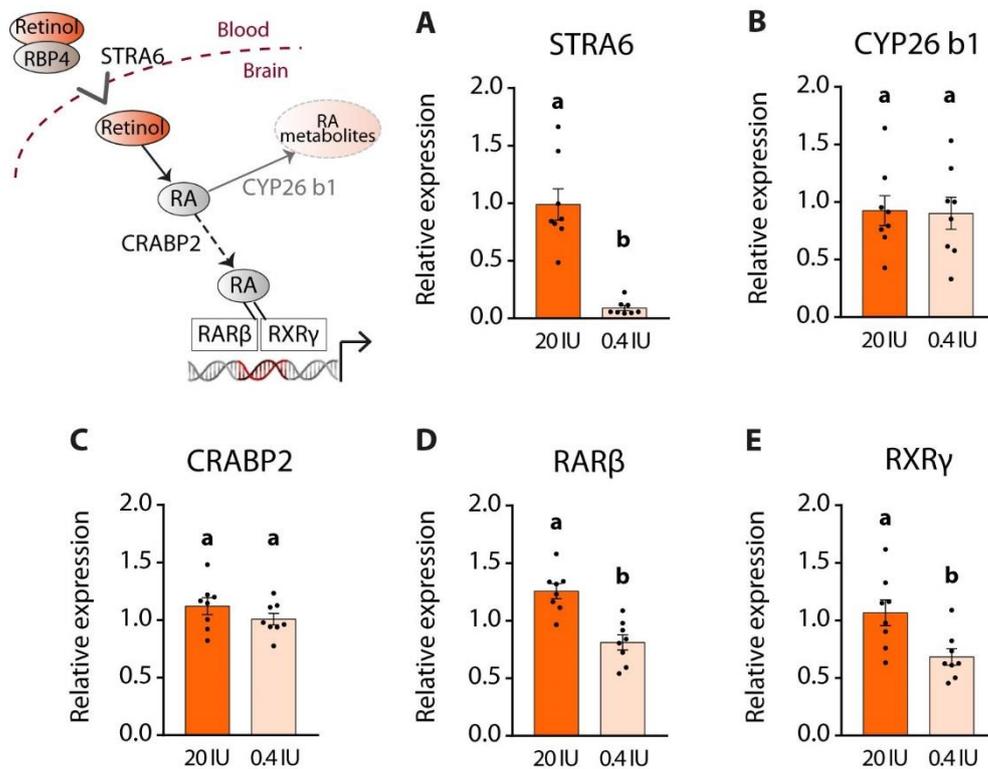


Fig.4. Impact of high vs. low dose of dietary vitamin A on retinol metabolism in the striatum

The illustration (top left) shows vitamin A signaling in the brain. (**A-E**) mRNA relative expression of genes coding for STRA6 (A), CYP26 b1 (B), CRABP2 (C), RARβ (D) and RXRγ (E). Results are expressed as means \pm SEM with individual data points. a-b: values significantly different ($p<0.005$). Details of the statistical analysis are summarized in (**Table. 2**). Abbreviations: RA, retinoic acid; STRA6, stimulated by retinoic acid gene 6; CYP26 b1, cytochrome P26b1; CRABP2, cellular retinoic acid binding protein 2; RARβ, retinoic acid receptor isoform β; RXRγ, Retinoid X receptor isoform γ.

After its synthesis from retinol, RA is transferred to the nuclei of cells by the Cellular Retinoic Acid Binding Protein 2 (CRABP2) and binds to its nuclear receptor (RAR and RXR) to modulate gene transcription (Blomhoff and Blomhoff, 2006; Marie et al., 2021). In particular, RARβ and RXRγ are the 2 isoforms of retinoids receptors highly expressed in the striatum (Krezel et al., 1998). Expressions of retinoid receptors, as well as CRABP2, are directly controlled by RA levels, and therefore reflect the homeostasis of retinoids signaling in the brain (Asson-Batres and Rochette-Egly, 2016; Etchamendy et al., 2003; Husson et al., 2004). Here, the gene expression coding for CRABP2 was not affected by different dose of vitamin A in the diet ($p=0.278$) (**Fig.4C**), while the mRNA expression of RARβ and RXRγ was significantly decreased in 0.4 IU rats compared to supplemented rats ($p<0.001$ and $p=0.007$ respectively)

(Fig. 4D, E).

Taken together, these results reveal an impairment in retinol addressing to the striatum for 0.4 IU rats, leading to a decrease of RAR β and RXR γ mRNA expression.

3.5. Impact of vitamin A deficiency on neuromodulation in the striatum

Then, in order to study the impact of dietary vitamin A intake levels on striatal neuromodulation, we measured mRNA expression of genes coding for proteins implicated in the dopaminergic pathway, whose signaling is necessary for appropriate functionality of the striatum in basal ganglia network (Calabresi, 2014; Hunger et al., 2019).

The mRNA expression of the L-dopa to DA-converting enzyme, Aromatic L-amino acid decarboxylase (AADC), was not statistically different in the striatum of 0.4 IU rats compared to those supplemented with vitamin A ($p=0.083$) (Fig. 5A). Likewise, vitamin A signaling is not directly involved in the degradation of DA since we did not observe any difference in mRNA expression level of Monoamine Oxidase A (MAOA) between groups ($p=0.328$) (Fig. 5B). We also quantified the mRNA expression of dopamine receptors, D1R and D2R, since their expression are under control of RA (Samad et al., 1997; Sodja et al., 2002). However, in our conditions, the mRNA expression of D1R and D2R in the striatum was not significantly impacted by dietary vitamin A treatment ($p=0.505$ and $p=0.083$ respectively) (Fig. 5C, D). This suggest that dopaminergic system in the striatum is less sensitive to vitamin A deficiency at adulthood compared to earlier developmental periods (Fig. 4).

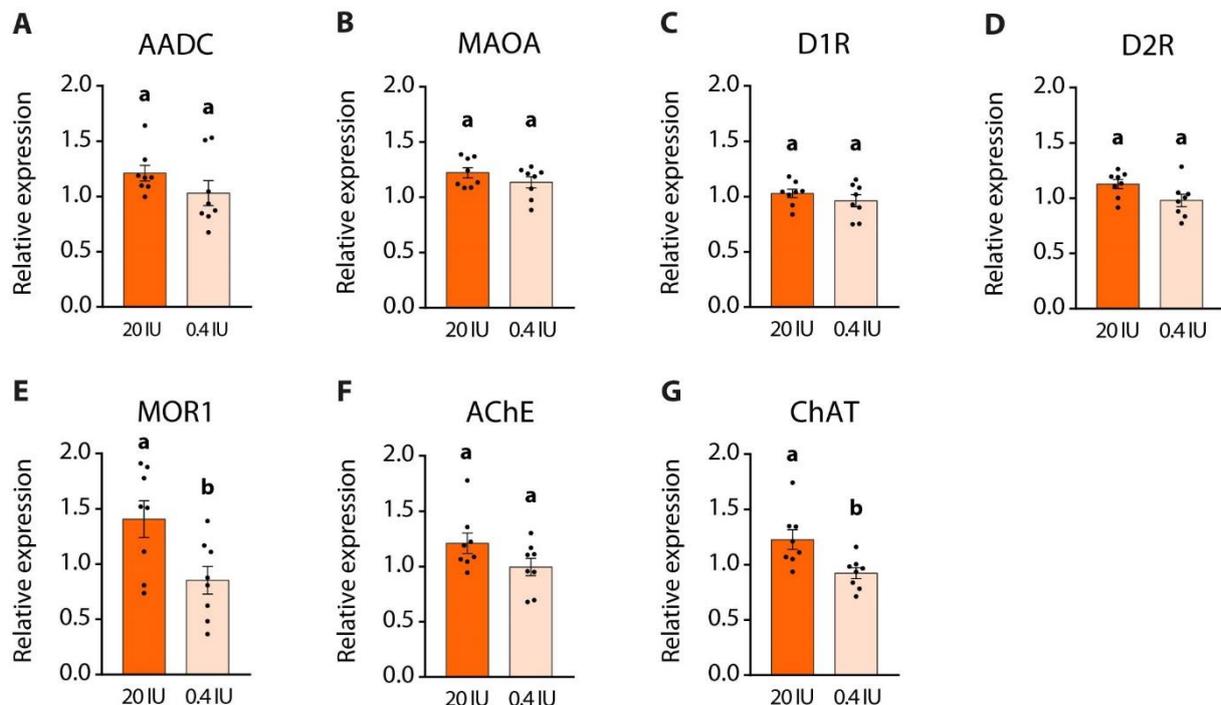


Fig.5. Impact of vitamin A deficiency on neuromodulation in the striatum

(A-G) mRNA relative expression of genes coding for AADC (A), MAOA (B), D1R (C), D2R (D), MOR1 (E), AChE (F) and ChAT (G). Results are expressed as means \pm SEM with individual data points. a-b: values significantly different ($p < 0.005$). Details of the statistical analysis are summarized in **(Table. 2)**. Abbreviations: AADC, aromatic l-amino acid decarboxylase; MAOA, monoamine oxidase A; D1R, dopamine receptor subtype 1; D2R, dopamine receptor subtype 2; MOR1, μ -opioid receptor; AChE, acetylcholinesterase; ChAT, choline acetyltransferase.

Previous studies suggested that acetylcholine, as well as striosomes and matrices sub-territories of the striatum can be modulated by vitamin A signaling (Carta et al., 2006; Sgobio et al., 2017). Therefore, we analyzed gene expression of proteins related to acetylcholine and striosomes. Striosomes compartments in the anterior striatum are particularly enriched in μ -opioid receptor (MOR1), used as a marker for these sub-territories (Lanciego et al., 2012; Miyamoto et al., 2018), for which we observed a decrease of gene expression in 0.4 IU rats compared to rats supplemented with vitamin A ($p = 0.030$) **(Fig. 5E)**. Conversely, matrix compartment of the striatum highly expressed the degradation enzyme of the neurotransmitter acetylcholine, acetylcholinesterase (AChE) (Brimblecombe and Cragg, 2017). The gene expression level of AChE did not statistically differ between both groups ($p = 0.234$) **(Fig. 5E)**, meanwhile the mRNA expression of Choline acetyltransferase (ChAT), the enzyme responsible for the synthesis of acetylcholine, is significantly reduced in VAD rats compared to supplemented rats ($p = 0.007$) **(Fig. 5G)**.

Overall, these results confirm a deleterious impact of altered retinoids signaling on the neuromodulation in the striatum, specifically through dysfunction of striatal acetylcholine synthesis and alteration of striosomes.

As a control, we measured the expression level of genes coding for proteins implicated in neuroinflammation and oxidative stress associate since the antioxidant power of vitamin A and its involvement on neuroinflammatory processes (Marie et al., 2021). In our conditions, results did not reveal a significant effect of dietary vitamin A treatment on mRNA expression of protein linked to neuroinflammation in the striatum such as the purinergic P2X7 receptor (P2X7R) and NLRP3 inflammasome ($p = 0.1692$ and $p = 0.7984$ respectively) **(Sup Fig. 1A, B)**. By contrast, vitamin A sub-deficiency altered the balance between oxidants and antioxidants at the striatal level. Indeed, mRNA expression of neuronal nitric oxide synthase (NOS 1) was significantly decreased in VAD rats ($p = 0.009$), but mRNA expression of superoxide dismutase 1 (SOD 1) tent to be increased by vitamin A deficiency compared to supplemented rats ($p = 0.078$) **(Sup Fig. 1C, E)**. However, this effect of dietary vitamin A was not observed for isoforms NOS3 and SOD 2 in the striatum ($p = 0.458$ and $p = 0.645$ respectively) **(Sup Fig. 1D, F)**.

3.6. Impact of vitamin A deficiency on integrity of the nigro-striatal pathway

The next question was to determine if the decrease of vitamin A signaling observed in the striatum of VAD rats was accompanied by an alteration of the nigro-striatal pathway. Implication of retinoids signaling in the integrity of nigro-striatal pathway is notably highlighted by the existence of a sub-population of dopaminergic neurons expressing ALDH1A1, the synthesis enzyme of RA (Carmichael et al., 2021; Liu et al., 2014). For this purpose, we first quantified, by immunofluorescence, the number of TH⁺ and ALDH1A1⁺ neurons in the SNc, as well as TH and ALDH1A1 staining in the striatum (**Fig. 6**). TH is commonly used as a marker of dopaminergic neurons in the SNc and DA fibers in the striatum, and of note, all ALDH1A1⁺ neurons are also TH⁺ neurons.

Analyses of immunofluorescence were performed on three antero-posterior levels for the striatum and the SNc: anterior (bregma striatum: +2.2, SNC: -5.2); intermediate (bregma striatum: +1.6, SNC: -5.3); and posterior (bregma striatum: +0.7, SNC: -5.8). In the SNc, the number of TH⁺ neurons, as well as ALDH1A1⁺ neurons, did not differ statistically between both groups in each level (**Table 2**) (**Fig.6A, B**). However, the tiny proportion of ALDH1A1⁺ neurons revealed by the analysis in these 8-months-old rats suggested an age-related effect. Indeed, when we compared these results to those obtained from a previous study with 4-month-old rats under enriched diet (20 IU; Marie et al., in revision), we observed a clear reduction in the number of TH⁺ and ALDH1A1⁺ neurons for each level in older rats, compared to young rats (**Fig.6B**). This suggests a disappearance with age of TH⁺ neurons, especially those expressing ALDH1A1, which is in accordance with previous studies (Liu et al., 2014; Cai et al., 2014). By contrast, RT-qPCR analysis revealed that the gene coding for ALDH1A1 was still express in the whole SNc of 8-months-old rats, without any effect of dietary treatment ($p=0.612$) (**Fig. 6C**).

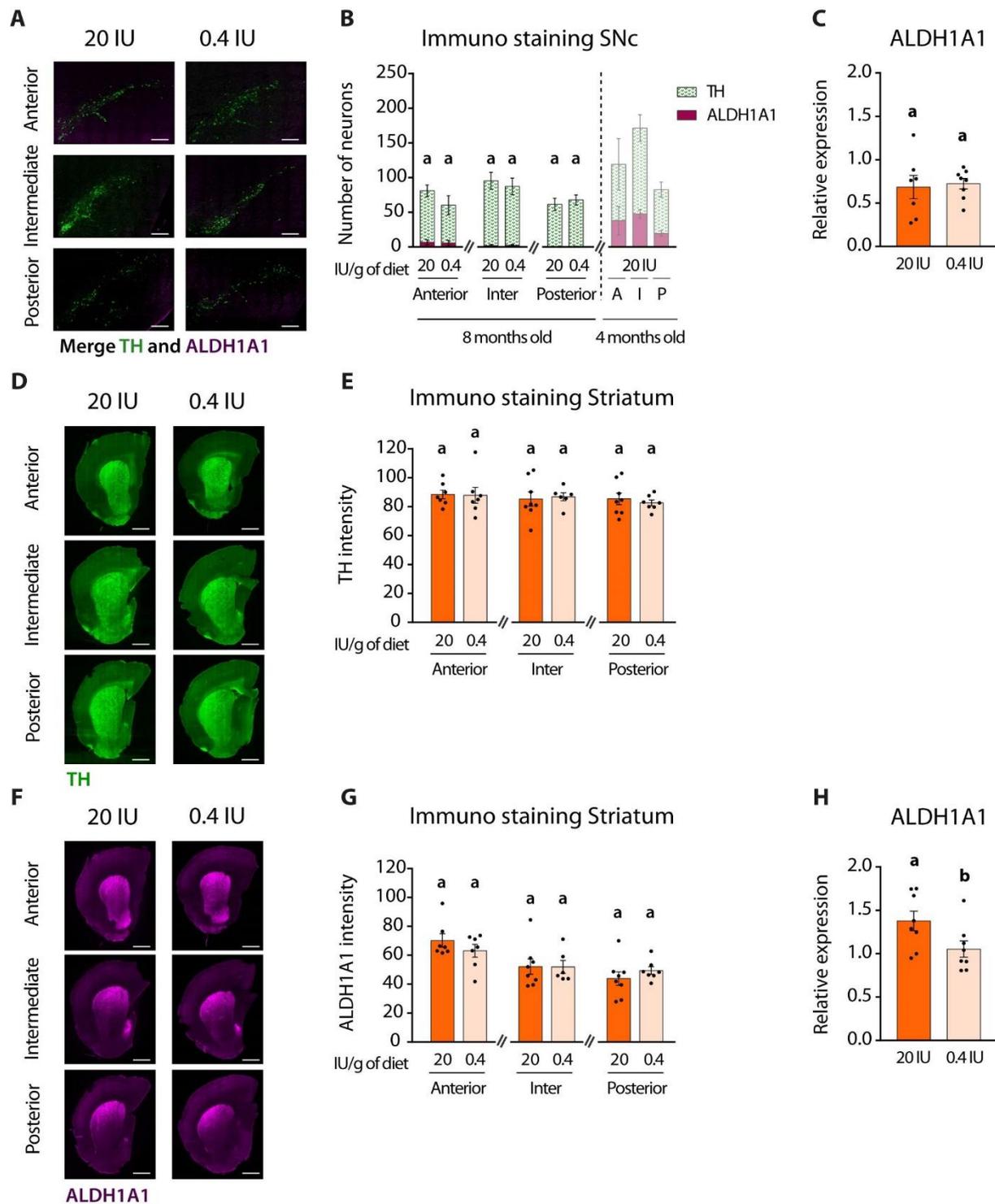


Fig.6. Impact of vitamin A deficiency on integrity of the nigro-striatal pathway

(A) Representative images for 0.4 IU and 20 IU groups of anterior, intermediate and posterior SNc (right hemisphere) immunostained for tyrosine hydroxylase (TH) (green) and aldehyde dehydrogenase A subtype a1 (ALDH1A1) (magenta). Scale bar: 200 μ m. (B) Quantification of the number of ALDH1A1⁺ and TH⁺ neurons in the present study (8 months old rats) and a previous study (20 IU; 4 months old rats wistar, Marie et al., 2022) for three analyzed levels of SNc. (C) mRNA relative expression of genes coding for ALDH1A1 in the SNc. (D) Representative images for 0.4 IU and 20 IU groups of anterior,

intermediate and posterior striatum (right hemisphere) immunostained for TH (green). Scale bar: 1000 μm . (E) Quantification of fluorescence intensity of TH staining for three analyzed levels of striatum. (F) Representative images for 0.4 IU and 20 IU groups of anterior, intermediate and posterior striatum (right hemisphere) immunostained for ALDH1A1 (magenta). Scale bar: 1000 μm . (G) Quantification of fluorescence intensity of ALDH1A1 staining for three analyzed levels of striatum. (H) mRNA relative expression of genes coding for ALDH1A1 in the striatum. Results are expressed as means \pm SEM with individual data points. a-b: values significantly different ($p < 0.005$). Details of the statistical analysis are summarized in (Table. 2).

Quantification of TH intensity in the striatum revealed results similar to SNc analysis (Fig. 6D). Indeed, vitamin A sub-deficiency did not modify TH staining in the three analyzed levels of the striatum (Anterior $p = 0.804$; Intermediate $p = 0.754$; Posterior $p = 0.694$) (Fig. 6E). Lastly, ALDH1A1 intensity in the striatum was quantified, as a reflect of the amount of DA afferents from ALDH1A1⁺ DA neurons. Surprisingly, in spite of the tiny proportion of ALDH1A1⁺ neurons detected in the SNc, ALDH1A1 was still observed in the striatum (Fig. 6F), without any effect of dietary treatment (Anterior $p = 0.804$; Intermediate $p = 0.662$; Posterior $p = 0.231$) (Fig. 6G). By contrast, gene expression of ALDH1A1 in the whole striatum revealed that vitamin A sub-deficiency significantly reduced mRNA expression of ALDH1A1 compared to supplemented rats ($p = 0.028$) (Fig. 6H). This suggest that mRNA expression of ALDH1A1 is more sensitive to dietary treatment in the striatum than in the SNc. Moreover, these puzzling results suggest an uncoupling between mRNA expression and protein synthesis for ALDH1A1 with age, with more mRNA in the soma of DA neurons and more ALDH1A1 proteins at the synapse. ALDH1A1 Moreover, these results show that vitamin A enrichment at 20 IU is not sufficient to sustain ALDH1A1 expression in DA neurons.

3.7. Reversibility of nutritional vitamin A deficiency

Finally, we investigated the reversibility of nutritional vitamin A deficiency previously observed on vitamin A status, motor behavior, liver vitamin A metabolism and mRNAs expression in the striatum. To that, a fourth experimental group of rats was fed a sub-deficient diet for 20 weeks followed by an enriched diet for the last 6 weeks of the experiment. Results obtained for the analyzed parameters were normalized with the median of both 0.4 and 20 IU groups (min to max normalization), in order to evaluate the efficiency of the enriched diet for 6 weeks. This analysis revealed that plasma retinol level is completely rescued with 6 weeks of enriched diet, while liver retinol is only partially recovered (Table 2) (Fig. 7A). Motor function measured with the stepping test was also significantly improved by enriched diet, even though the deficit was not totally reversed (Table 2) (Fig. 7A, Sup Fig. 2). In the liver, the mRNA expression level of LRAT and CYP26 a1 were both improved by enriched diet, however, the mRNA expression

level of CYP26 a1 remained statistically different from the results obtained in the enriched group (**Table 2**) (**Fig. 7B**).

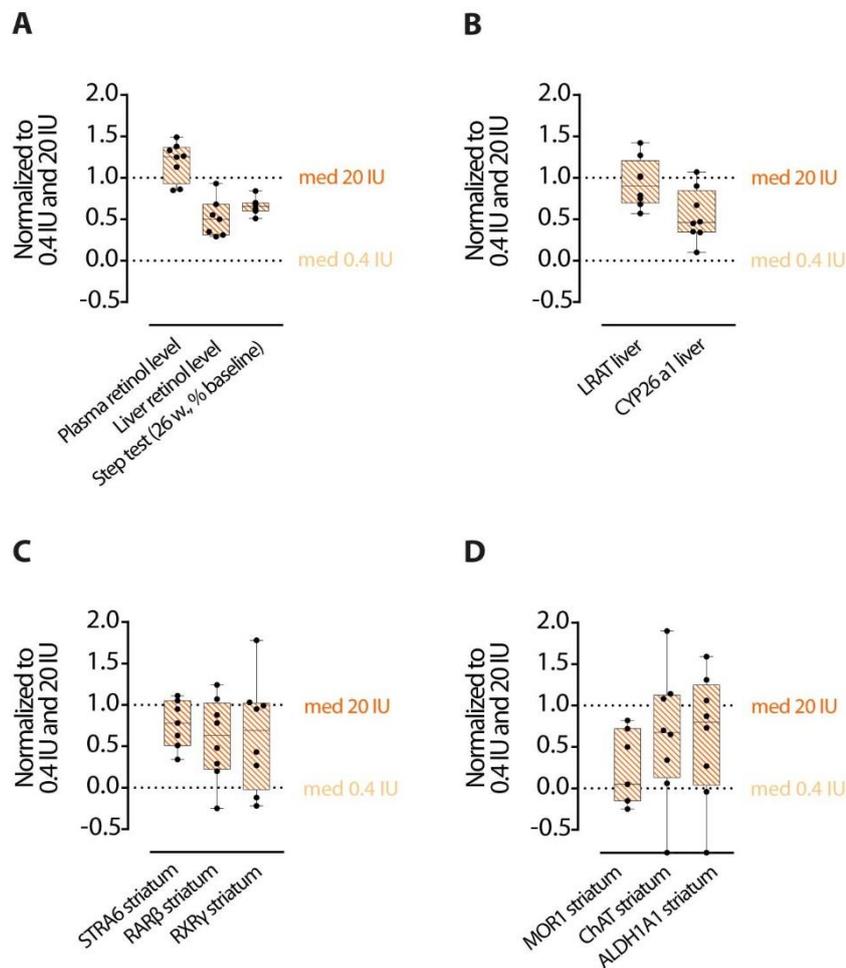


Fig.7. Reversibility of nutritional vitamin A deficiency

(**A-D**) Normalized values for variables measured in rats fed with sub-deficient diet for 20 weeks and enriched diet for 6 weeks. (**A**) Plasma and liver retinol liver, and step test score at 26 weeks. (**B**) mRNA relative expression of genes coding for LRAT and CYP26a1 in the liver. (**C**) mRNA relative expression of genes coding for STRA6, RAR β and RXR γ in the striatum. (**D**) mRNA relative expression of genes coding for MOR1, ChAT and ALDH1A1 in the striatum. Results are normalized to median values of sub-deficient rats (med 0.4 IU, dotted lines at 0) and enriched rats (med 20 IU, dotted lines at 1). Results are expressed as box & whiskers plot with individual data points (black dots), median (black line), 25th-75th percentile (box) and min-max values (whiskers).

In the striatum, the normalized results of mRNA expression level of STRA6, as well as RAR β and RXR γ were not statistically different from 20 IU group, suggesting that the 6 weeks of enriched diet was enough to rescue impaired retinoids signaling induced by vitamin A sub-deficiency (**Table 2**) (**Fig. 7C**). Finally, we investigated the effect of the 6 weeks of enriched

diet following 20 weeks of sub-deficient diet on mRNA expression of MOR1, ChAT and ALDH1A1. Results showed that mRNA expression level of ChAT and ALDH1A1 are rescue after 6 weeks of enriched diet, while the normalized results of mRNA expression of MOR1 is not statistically different from 0.4 IU group (**Table 2**) (**Fig. 7D**).

4. Discussion

In this study, we examined the impact of a gradual dose of dietary vitamin A on the striatal neuromodulation and the integrity of the nigro-striatal pathway at adulthood in rats. In order to assess the effect of chronic vitamin A deficiency, or conversely, of an enrichment with vitamin A, dietary treatments were conducted during 26 weeks. Several conclusions can be drawn from this study. First, measure of retinol in the liver appears as a better proxy of vitamin A status than retinol in the plasma. Second, nutritional vitamin A supplementation at adulthood exhibit some benefits to preserve striatal function. Third, vitamin A deficiency at adulthood does not lead to the same functional consequences than developmental alteration of vitamin A signaling. Finally, aging induces strong disturbances in the sub-cellular expression and localization of ALDH1A1 in DA neurons that are not compensated with the enriched diet used in this study. These main results are further discussed below.

First, this study investigated vitamin A deficiency with a new model, starting in the young adult rat, with a sub-deficient diet (0.4 IU/g). Nutritional vitamin A deficiency is particularly challenging to induce in rodents, given the hepatic stocks of retinol that are formed during embryogenesis and that persist throughout life (Lane and Bailey, 2005; McCaffery et al., 2003). Previous studies have investigated the effect of vitamin A deficiency model performed with 0 IU/g of diet (Carta et al., 2006; Kitaoka et al., 2007). However, a total VAD carried out on young rats (50 to 100 g), for a shorter time than the present study (i.e., 12-14 weeks), disturbs body weight curve and is associated with growth deficits (Bonhomme et al., 2014; Cocco et al., 2002; Dumetz et al., 2020b). In our conditions, the initiation of vitamin A sub-deficiency in 6-week-old rats (180-200 g) with a subsequent dose of 0.4 IU/g did not induce body weight deficit all along the feeding period, compared to sufficient or enriched rats. Yet, the drastic decrease in plasma retinol levels from week 16 confirmed the deficiency in vitamin A bioavailability, similar to results obtained in previous studies with total deficiency (Husson et al., 2003). Taken together, these results validate the sub-deficiency realized with 0.4 IU/g at adulthood in rats as a model of non-developmental nutritional vitamin A deprivation. In addition, our results show that retinol assay in the liver seems to be more sensitive to reflect levels of nutritional vitamin A intake. Yet, vitamin A status is commonly assessed through the assay of plasma retinol level (Feart et al., 2005; Gardner et al., 1997). Here, the results suggest that the decrease of retinoid signaling

associated to vitamin A deficiency could be underestimated when plasma retinol is used as a biomarker of vitamin A status in human.

Furthermore, the significant decrease of plasma retinol over the 26-week feeding period observed in sufficient and supplemented rats highlight a collapse of retinoid pathway with age, as found in humans (Brtko et al., 2007; Feart et al., 2005; Koceřak et al., 2018; Lee et al., 2013) and aged rats (Dumetz et al., 2020a; Touyarot et al., 2013). Moreover, the decrease of gene expression for LRAT and CYP26a1 in the liver, as well as RAR β and RXR γ in the brain of VAD rats is in accordance with results observed in previous studies in aged rats and mice (Dumetz et al., 2020a; Enderlin et al., 1997a, 1997b; Etchamendy et al., 2001; Mingaud et al., 2008). Thus, 26-week of vitamin A sub-deficiency could be a good model to mimic at adulthood the alteration of vitamin A metabolism associated to an alteration of retinoid signaling mediated by RAR β and RXR γ , observed in aged rats (Lane and Bailey, 2005).

Second, exploration of the sensitivity of neuromodulation in the striatum to adult vitamin A sub-deficiency revealed subtle effects, compared to developmental alteration of vitamin A signaling. In particular, mice constitutively knock-out for RAR β and RXR γ from gestation exhibit strong decrease in the expression of D1R and D2R proteins and their transcripts in the striatum at adult age (Krezel et al., 1998). By contrast, vitamin A sub-deficiency at adulthood did not significantly alter the dopaminergic system in the striatum. Constitutive knock-out induce an alteration of retinoid signaling from the developmental period in mice, thus we can presume that dopaminergic signaling in the striatum is more robust in adulthood in front of a decrease of retinoid signaling mediated by vitamin A deficiency. This suggests that vitamin A signaling for the dopaminergic system in the striatum is especially required for the development of the nigro-striatal pathway, but that the system can adapt with a minimal activity of retinoid signaling at adulthood. A total VAD at adulthood or longer sub-deficiency may help to deepen the understanding of the dependency of the nigro-striatal pathway to retinoid signaling.

In contrast, the present study reveals that the striatal cholinergic system is more sensitive to vitamin A deprivation at adulthood in rats than the dopaminergic system. The decrease of gene expression for ChAT, the synthesis enzyme of Ach, is coherent with the decrease of ChAT expression, measured by immunohistochemistry, in the striatum of mice constitutively knock-out for RXR γ (Saga et al., 1999). In addition, the study of Carta et al., 2006, showed an alteration of striatal content in 24-week VAD rats associated to a strong impairment of motor behavior assessed by the rotarod test. Thus, the decrease of gene expression for RXR γ in the striatum following 26 weeks of vitamin A sub-deficient diet in adult rats may lead to the decrease of gene expression for ChAT and contribute to the impairment of postural stability observed in the step test. Overall, these results reveal the importance of retinoid signaling to maintain the

homeostasis of cholinergic system in the striatum of rats at adulthood, and by extension its involvement in the effective functioning of the striatum. Indeed, dopaminergic afferents from the SNc and cholinergic signaling interact in a dynamic crosstalk in the striatum (Shimohama and Kawamata, 2018; Ztaou and Amalric, 2019).

Third, we investigated the effect of dietary vitamin A intake on the sub-population of DA neurons in the SNc that express ALDH1A1 (Poulin et al., 2018). The loss of ALDH1A1 expression in these neurons makes them more prone to degenerate and the link between ALDH1A1⁺ neurons and motor function has been recently revealed in mice (Carmichael et al., 2021; Liu et al., 2014; Wu et al., 2019). These DA neurons ALDH1A1⁺ innervate striosomal compartments in the striatum and striosome neurons can project back on ALDH1A1⁺ DA neurons (Carmichael et al., 2021; Miyamoto et al., 2018; Poulin et al., 2014; Sgobio et al., 2017; Wu et al., 2019). In our study, we observed a drastic age-related reduction in the number of ALDH1A1⁺ dopaminergic neurons in the SNc of 8-month-old rats compared to younger rats, which confirm the vulnerability of these neurons to degenerate. However, this reduction of ALDH1A1⁺ DA neurons was not accompanied by a reduction of ALDH1A1⁺ fibers in the striatum. In addition, ALDH1A1 gene expression was not reduced in the SNc but was reduced in the striatum. These puzzling results suggest that with age, ALDH1A1 protein is preferentially addressed and translated at the synapse, in the striatum. This increase of ALDH1A1 at the synapse may be necessary to support RA synthesis and signaling in the striatum, as RA can act tran-synaptically to stimulate expression of proteins such as MOR1 in striatal neurons (Pan et al., 2019; Sgobio et al., 2017). Further studies, with a specific deletion of ALDH1A1 in the striosomes, may help to better understand the role of dietary vitamin A in the survival of ALDH1A1⁺ DA neurons.

Finally, we assessed the reversibility of impairment induced by vitamin A deficiency at adulthood, with 6-week of enriched diet with vitamin A. The partial rescue of liver retinol level and CYP26a1 gene expression induced by the 6-week of supplementation confirm the high sensitivity of liver storage to assess vitamin A status compared to plasma retinol assay for which levels of retinol were comparable to those observed in the group enriched with vitamin A. In the striatum, the 6-week vitamin A supplementation was sufficient to normalize retinoid signaling mediated by RAR β and RXR γ in the striatum, as well as the gene expression of ChAT, and may explain the improvement observed in the step test at the end of the 6-week of supplementation. However, the 6-week of enriched diet did not restore MOR1 expression, and induced only a partial improvement of ALDH1A1 gene expression in the striatum. In order to prevent a potential risk of hypervitaminosis, we used a mild supplementation with vitamin A

(20 IU/g of diet). Nevertheless, a higher vitamin A intake, with a subsequent dose of 70 IU/g, in the middle range of dose used in previous studies for supplementation (Dawson et al., 2000; Létondor et al., 2016; Touyarot et al., 2013; Yamamoto et al., 2000) may exhibit more pronounced effect on MOR1 and ALDH1A1 gene expression in the striatum.

In conclusion, our study demonstrated the importance of retinoid signaling in the functional neuromodulation of the striatum at adulthood in rats. An alteration of liver vitamin A metabolism and retinoid signaling in the brain, induced by a nutritional sub-deficiency with vitamin A, lead to a striatal cholinergic dysfunction and a decrease of MOR1 gene expression in the striatum. The relative reversibility of deficits induced by vitamin A deprivation strengthens the necessity of maintaining adequate vitamin A intakes, and the identification of reliable biomarkers to assess the vitamin A status of individuals. Our results support a beneficial role of a mild nutritional supplementation with vitamin A to prevent aged-related collapse of retinoid pathway and potential nigro-striatal alteration associated. Nutritional approach is easier to implement in human than pharmacological administration and reduces the risk of side effects (Clark et al., 2020; Moise et al., 2007; Napoli, 2020; Penniston and Tanumihardjo, 2018). Given the importance of nigro-striatal pathway degeneration in the development of Parkinson's disease, nutritional supplementation with vitamin A may represent a potential therapeutic strategy to delay the progression of the disease.

Figure 1						
	Statistical test	n	Outcome measure	Diet effect	Time effect	Interaction
Figure 1B: Body weight	Two way ANOVA RMI	8	Body weight	F (3, 28) = 0.3161 p=0.813	F (26, 728) = 7.49 5 p<0.001 ***	F (78, 728) = 0.218 p<0.999
Figure 1C: Frital weight gain	Kruskal-Wallis test	8	Body weight % of week 1	p=0.897	PostHoc test	Interaction
Figure 1D: Plasma retinol level	Two way ANOVA RMI	5-7	Retinol level	F (2, 18) = 51.59 p<0.001 ***	F (2, 32) = 159 p<0.001 ***	F (4, 32) = 17.09 p<0.001 ***
Figure 1E: Liver retinol level	Kruskal-Wallis test	7-8	Retinol level	p<0.001 ***	20 IU vs 5 IU p=0.047 20 IU vs 0.4 IU p<0.001 5 IU vs 0.4 IU p=0.019	Interaction
Figure 1F: Step test	Two way ANOVA RMI	8	Steps	F (2, 21) = 60.65 p<0.001 ***	F (7, 147) = 87.14 p<0.001 ***	F (14, 147) = 7.303 p<0.001 ***
Figure 2						
Figure 2A: REH liver expression	Kruskal-Wallis test	8	Relative quantity	p=0.474	PostHoc test	
Figure 2B: RBP4 liver expression	Kruskal-Wallis test	7-8	Relative quantity	p=0.517		
Figure 2C: URAT liver expression	Kruskal-Wallis test	7-8	Relative quantity	p<0.001 ***	20 IU vs 0.4 IU p=0.003 5 IU vs 0.4 IU p<0.001	
Figure 2D: CYP26 a1 expression	Kruskal-Wallis test	3-8	Relative quantity	p=0.004 *	20 IU vs 0.4 IU p=0.002 5 IU vs 0.4 IU p=0.044	
Figure 3 Correlative Analysis						
Figure 3C: Retinol level plasma vs liver	Linear Regression	22-24	Correlation	R ² = 0.508	F (1, 20) = 20.65 p<0.001 ***	
Figure 3C PostHoc test						
20 IU vs 0.4 IU p<0.001 week 7-26 20						
5 IU vs 0.4 IU p<0.001 week 7-26 5						
IU vs 0.4 IU p=0.007 week 21						

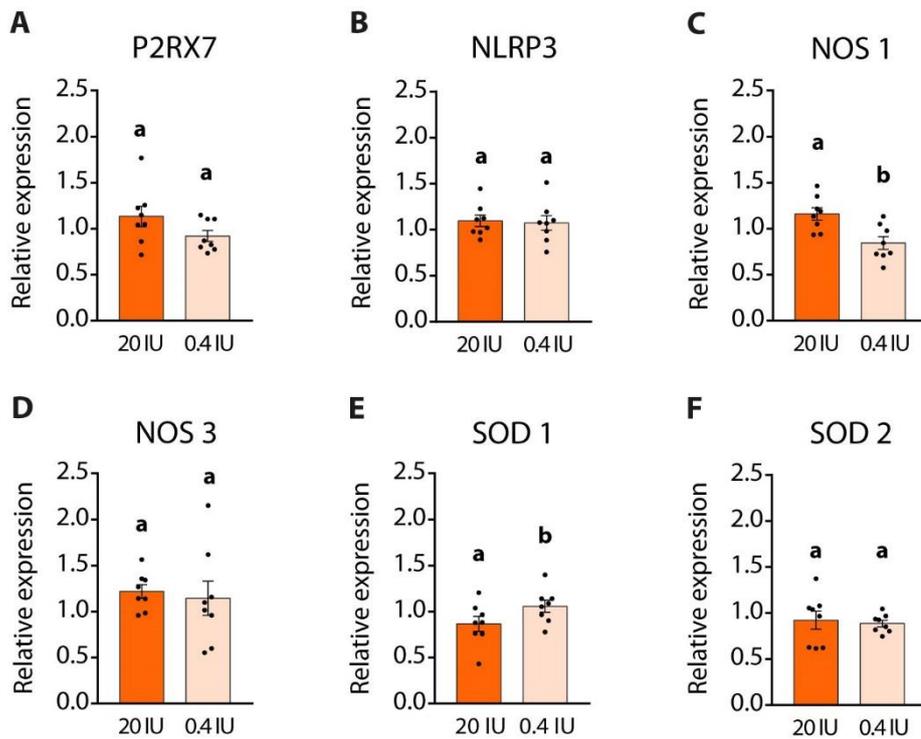
Figure 4				Diet effect 20 IU vs 0.4 IU			
Figure 4A: STRA6 Striatum expression	Mann-Whitney test	8	Relative quantity	p<0.001 ***			
Figure 4B: CRABP2 Striatum expression	Mann-Whitney test	8	Relative quantity	p=0.278			
Figure 4C: CYP26 b1 Striatum expression	Mann-Whitney test	8	Relative quantity	P>0.999			
Figure 4D: RARβ Striatum expression	Mann-Whitney test	8	Relative quantity	p<0.001 ***			
Figure 4E: RXRγ Striatum expression	Mann-Whitney test	8	Relative quantity	p=0.007 **			
Figure 5				Diet effect 20 IU vs 0.4 IU			
Figure 5A: AADC Striatum expression	Mann-Whitney test	8	Relative quantity	p=0.083 #			
Figure 5B: MAOA Striatum expression	Mann-Whitney test	8	Relative quantity	p=0.328			
Figure 5C: D1R Striatum expression	Mann-Whitney test	8	Relative quantity	p=0.505			
Figure 5D: D2R Striatum expression	Mann-Whitney test	8	Relative quantity	p=0.083 #			
Figure 5E: MOR1 Striatum expression	Mann-Whitney test	8	Relative quantity	p=0.030 *			
Figure 5F: AChE Striatum expression	Mann-Whitney test	8	Relative quantity	p=0.234			
Figure 5G: ChAT Striatum expression	Mann-Whitney test	8	Relative quantity	p=0.007 **			
Figure 6				Diet effect 20 IU vs 0.4 IU			
Figure 6B: TH anterior SNc	Mann-Whitney test	6-8	Number of neurons	p=0.282			
Figure 6B: TH intermediate SNc	Mann-Whitney test	7-8	Number of neurons	p=0.892			
Figure 6B: TH posterior SNc	Mann-Whitney test	7-8	Number of neurons	p=0.591			
Figure 6B: ALDH1A1 anterior SNc	Mann-Whitney test	6-8	Number of neurons	p=0.976			
Figure 6B: ALDH1A1 intermediate SNc	Mann-Whitney test	7-8	Number of neurons	p=0.517			
Figure 6B: ALDH1A1 posterior SNc	Mann-Whitney test	7-8	Number of neurons	p=0.466			
Figure 6C: ALDH1A1 whole SNc expression	Mann-Whitney test	7-8	Relative quantity	p=0.612			
Figure 6E: TH anterior Striatum	Mann-Whitney test	7	Intensity	p=0.804			
Figure 6E: TH intermediate Striatum	Mann-Whitney test	6-8	Intensity	p=0.754			
Figure 6E: TH posterior Striatum	Mann-Whitney test	7-8	Intensity	p=0.694			
Figure 6G: ALDH1A1 anterior Striatum	Mann-Whitney test	7	Intensity	p=0.804			
Figure 6G: ALDH1A1 intermediate Striatum	Mann-Whitney test	6-8	Intensity	p=0.662			
Figure 6G: ALDH1A1 posterior Striatum	Mann-Whitney test	7-8	Intensity	p=0.231			
Figure 6H: ALDH1A1 whole Striatum expression	Mann-Whitney test	8	Relative quantity	p=0.028 *			
Figure 7				Replenishment effect vs 0.4 IU Replenishment effect vs 20 IU			
Figure 7A: Plasma retinol level	One-sample t test	8	Retinol level	t=14.45 df=7	p<0.001 ***	t=2.345 df=7	p=0.051
Figure 7A: Liver retinol level	One-sample t test	7	Retinol level	t=5.901 df=6	p=0.001 **	t=5.542 df=6	p=0.001 **
Figure 7A: Step test expression	One-sample t test	8	Steps	t=19.2 df=7	p<0.001 ***	t=10.11 df=7	p<0.001 ***
Figure 7B: LRAT liver expression	One-sample t test	8	Relative quantity	t=8.967 df=7	p<0.001 ***	t=0.5851 df=7	p=0.576
Figure 7B: Cyp26a1 liver expression	One-sample t test	8	Relative quantity	t=4.829 df=7	p=0.001 **	t=4.052 df=7	p=0.004 **
Figure 7C: STRA6 striatum expression	One-sample t test	7	Relative quantity	t=7.041 df=6	p<0.001 ***	t=2.137 df=6	p=0.076
Figure 7C: RARβ Striatum expression	One-sample t test	8	Relative quantity	t=3.333 df=7	p=0.012 *	t=2.352 df=7	p=0.050
Figure 7C: RXRγ Striatum expression	One-sample t test	8	Relative quantity	t=2.685 df=7	p=0.031 *	t=1.519 df=7	p=0.172
Figure 7D: MOR1 striatum expression	One-sample t test	7	Relative quantity	t=1.295 df=6	p=0.242	t=4.592 df=6	p=0.003 **
Figure 7D: ChAT striatum expression	One-sample t test	8	Relative quantity	t=2.368 df=7	p=0.049 *	t=1.282 df=7	p=0.240
Figure 7D: ALDH1A1 striatum expression	One-sample t test	8	Relative quantity	t=2.411 df=7	p=0.046 *	t=1.364 df=7	p=0.214

Table 2. Summary of statistical analysis

Statistical significance was assessed as #p < 0.09, *p < 0.05, **p < 0.01, ***p < 0.001.

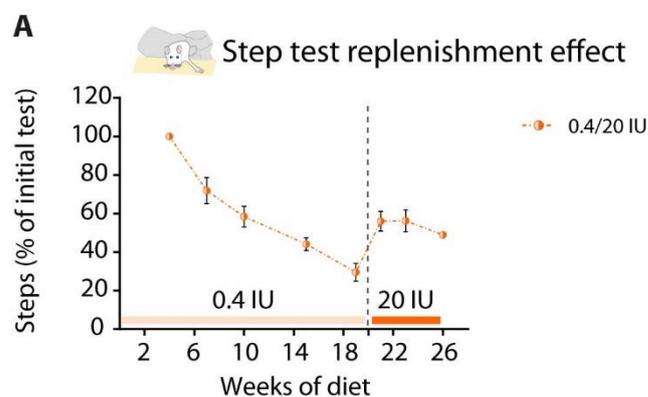
ABBREVIATIONS: RA, retinoic acid; VAD, vitamin A deficient; TH, tyrosine hydroxylase; ALDH1A1, aldehyde dehydrogenase 1 subtype A1; SNc, substantia nigra pars compacta; DA, dopamine; RXR, retinoid X receptor; RAR, retinoic acid receptor; D1R: dopamine D2 receptor; D2R, dopamine D2 receptor; GAPDH, glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase; HPLC, high performance liquid chromatography; PBS, phosphate buffer saline; sPCA, sparse principal component analysis; RT-qPCR, Real-Time quantitative Polymerase Chain Reaction.

Supplementary Information



Supp. Fig. 1. Impact of vitamin A intake on neuroinflammation and oxidative stress

(A-F) mRNA relative expression of genes coding for P2RX7 (A), NLRP3 (B), NOS 1 (C), NOS (D), SOD 1 (E), SOD 2 (F). Results are expressed as means \pm SEM with individual data points. a-b: values significantly different ($p < 0.005$). Details of the statistical analysis are summarized in (Supp.Table. 1). Abbreviations: P2RX7, purinergic P2X7 receptor; NLRP3, NLR family pyrin domain containing 3; NOS 1, nitric oxide synthase neuronal; NOS 3, nitric oxide synthase endothelial; SOD1, superoxide dismutase 1; SOD2, superoxide dismutase 2.



Supp. Fig. 2. Reversibility of impairment induced by sub-deficiency in the step-test

Assessment of the reversibility of nutritional vitamin A deficiency in the step test. Rats was fed a sub-deficient diet for 20 weeks followed by an enriched diet for the last 6 weeks of the experiment (0.4/20 IU). Measure of the number of steps made by both forelimb paw as the percent (%) of steps performed at 4-week of diet.

Data				
Supplemental Figure 1	Statistical test	n	Outcome measure	Diet effect 20 IU vs 0.4 IU
Supp. Fig.1A: P2RX7 Striatum expression	Mann-Whitney test	8	Realtive quantity	p=0.1692
Supp. Fig.1B: NLRP3 Striatum expression	Mann-Whitney test	8	Realtive quantity	p=0.7984
Supp. Fig.1C: NOS 1 Striatum expression	Mann-Whitney test	8	Realtive quantity	p=0.009 **
Supp. Fig.1D: NOS 3 Striatum expression	Mann-Whitney test	8	Realtive quantity	p=0.458
Supp. Fig.1E: SOD 1 Striatum expression	Mann-Whitney test	8	Realtive quantity	p=0.078 #
Supp. Fig.1F: SOD 2 Striatum expression	Mann-Whitney test	8	Realtive quantity	p=0.645

Supp. Table. 1 Summary of statistical analysis for supplemental data

Statistical significance was assessed as #p < 0.09, *p < 0.05, **p < 0.01, ***p < 0.001.

References

- Al Tanoury, Z., Piskunov, A., and Rochette-Egly, C. (2013). Vitamin A and retinoid signaling: genomic and nongenomic effects. *Journal of Lipid Research* 54, 1761–1775.
- Asson-Batres, M.A., and Rochette-Egly, C. (2016). *The Biochemistry of Retinoid Signaling II: The Physiology of Vitamin A - Uptake, Transport, Metabolism and Signaling* (Dordrecht: Springer Netherlands).
- Berrard, S., Faucon Biguet, N., Houhou, L., Lamouroux, A., and Mallet, J. (1993). Retinoic acid induces cholinergic differentiation of cultured newborn rat sympathetic neurons. *J Neurosci Res* 35, 382–389.
- Berse, B., and Blusztajn, J.K. (1995). Coordinated up-regulation of choline acetyltransferase and vesicular acetylcholine transporter gene expression by the retinoic acid receptor alpha, cAMP, and leukemia inhibitory factor/ciliary neurotrophic factor signaling pathways in a murine septal cell line. *J Biol Chem* 270, 22101–22104.
- 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.
- Blomhoff, R., and Blomhoff, H.K. (2006). Overview of retinoid metabolism and function. *J. Neurobiol.* 66, 606–630.
- Bonhomme, D., Minni, A.M., 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.
- Brimblecombe, K.R., and Cragg, S.J. (2017). The Striosome and Matrix Compartments of the Striatum: A Path through the Labyrinth from Neurochemistry toward Function. *ACS Chem. Neurosci.* 8, 235–242.
- Brtko, J., Rock, E., Nezbedova, P., Krizanova, O., Dvorcakova, M., Minet-Quinard, R., Farges, M.-C., Ribalta, J., Winklhofer-Roob, B.M., and Vasson, M.-P. (2007). Age-related change in the retinoid X receptor beta gene expression in peripheral blood mononuclear cells of healthy volunteers: Effect of 13-cis retinoic acid supplementation. *Mechanisms of Ageing and Development* 128, 594–600.
- Calabresi, P. (2014). Direct and indirect pathways of basal ganglia: a critical reappraisal. *Nature Neuroscience* 17, 9.
- Carazo, A., Macáková, K., Matoušová, K., Krčmová, L.K., Protti, M., and Mladěnka, P. (2021). Vitamin A Update: Forms, Sources, Kinetics, Detection, Function, Deficiency, Therapeutic Use and Toxicity. *Nutrients* 13, 1703.
- Carmichael, K., Evans, R.C., Lopez, E., Sun, L., Kumar, M., Ding, J., Khaliq, Z.M., and Cai, H. (2021). Function and Regulation of ALDH1A1-Positive Nigrostriatal Dopaminergic Neurons in Motor Control and Parkinson's Disease. *Front. Neural Circuits* 15, 644776.

- Carta, M., Stancampiano, R., Tronci, E., Collu, M., Usiello, A., Morelli, M., and Fadda, F. (2006). Vitamin A deficiency induces motor impairments and striatal cholinergic dysfunction in rats. *Neuroscience* 139, 1163–1172.
- Clark, J.N., Whiting, A., and McCaffery, P. (2020). Retinoic acid receptor-targeted drugs in neurodegenerative disease. *Expert Opinion on Drug Metabolism & Toxicology* 16, 1097–1108.
- Cocco, S., Diaz, G., Stancampiano, R., Diana, A., Carta, M., Curreli, R., Sarais, L., and Fadda, F. (2002). Vitamin A deficiency produces spatial learning and memory impairment in rats. *Neuroscience* 115, 475–482.
- Dawson, H.D., Yamamoto, Y., Zolfaghari, R., Rosales, F.J., Dietz, J., Shimada, T., Li, N., and Ross, A.C. (2000). Regulation of Hepatic Vitamin A Storage in a Rat Model of Controlled Vitamin A Status during Aging. *The Journal of Nutrition* 130, 1280–1286.
- Dumetz, F., Buré, C., Alfos, S., Bonneu, M., Richard, E., Touyarot, K., Marie, A., Schmitter, J.-M., Bosch-Bouju, C., and Pallet, V. (2020a). Normalization of hippocampal retinoic acid level corrects age-related memory deficits in rats. *Neurobiology of Aging* 85, 1–10.
- Dumetz, F., Ginieis, R., Bure, C., Marie, A., Alfos, S., Pallet, V., and Bosch-Bouju, C. (2020b). Neuronal morphology and synaptic plasticity in the hippocampus of vitamin A deficient rats. *Nutritional Neuroscience* 1–12.
- Enderlin, V., Pallet, V., Alfos, S., Dargelos, E., Jaffard, R., Garcin, H., and Higuieret, P. (1997a). Age-related decreases in mRNA for brain nuclear receptors and target genes are reversed by retinoic acid treatment. *Neurosci. Lett.* 229, 125–129.
- Enderlin, V., Alfos, S., Pallet, V., Garcin, H., Azaïs-Braesco, V., Jaffard, R., and Higuieret, P. (1997b). Aging decreases the abundance of retinoic acid (RAR) and triiodothyronine (TR) nuclear receptor mRNA in rat brain: effect of the administration of retinoids. *FEBS Letters* 412, 629–632.
- Esteves, M., Cristóvão, A.C., Saraiva, T., Rocha, S.M., Baltazar, G., Ferreira, L., and Bernardino, L. (2015). Retinoic acid-loaded polymeric nanoparticles induce neuroprotection in a mouse model for Parkinson's disease. *Front Aging Neurosci* 7, 20.
- Etchamendy, N., Enderlin, V., Marighetto, A., Vouimba, R.M., Pallet, V., Jaffard, R., and 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.
- 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.
- Favier, M., Carcenac, C., Drui, G., Vachez, Y., Boulet, S., Savasta, M., and Carnicella, S. (2017). Implication of dorsostriatal D3 receptors in motivational processes: a potential target for neuropsychiatric symptoms in Parkinson's disease. *Sci Rep* 7, 41589.
- Feart, C., Pallet, V., Boucheron, C., Higuieret, D., Alfos, S., Letenneur, L., Dartigues, J.F., and Higuieret, P. (2005). Aging affects the retinoic acid and the triiodothyronine nuclear receptor mRNA expression in human peripheral blood mononuclear cells. *Eur. J. Endocrinol.* 152, 449–458.
- Friling, S., Bergsland, M., and Kjellander, S. (2009). Activation of Retinoid X Receptor increases dopamine cell survival in models for Parkinson's disease. *BMC Neurosci* 10, 146.

- Gardner, E.M., Bernstein, E.D., Dorfman, M., Abrutyn, E., and Murasko, D.M. (1997). The age-associated decline in immune function of healthy individuals is not related to changes in plasma concentrations of beta-carotene, retinol, alpha-tocopherol or zinc. *Mech Ageing Dev* 94, 55–69.
- Hunger, L., Kumar, A., and Schmidt, R. (2019). Abundance compensates kinetics: Similar effect of dopamine signals on D1 and D2 receptor populations.
- Husson, M., Enderlin, V., Alfos, S., Féart, C., Higuieret, P., and 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., and Higuieret, P. (2004). Expression of neurogranin and neuromodulin is affected in the striatum of vitamin A-deprived rats. *Molecular Brain Research* 123, 7–17.
- Ijomone, O.M., Olaibi, O.K., Biose, I.J., Mba, C., Umoren, K.E., and Nwoha, P.U. (2014). Performance of motor associated behavioural tests following chronic nicotine administration. *ANS* 21.
- Iskakova, M., Karbyshev, M., Piskunov, A., and Rochette-Egly, C. (2015). Nuclear and extranuclear effects of vitamin A. *Can. J. Physiol. Pharmacol.* 93, 1065–1075.
- Kane, M.A., Chen, N., Sparks, S., and Napoli, J.L. (2005). Quantification of endogenous retinoic acid in limited biological samples by LC/MS/MS. *Biochem. J.* 388, 363–369.
- Kitaoka, K., Hattori, A., Chikahisa, S., Miyamoto, K., Nakaya, Y., and Sei, H. (2007). Vitamin A deficiency induces a decrease in EEG delta power during sleep in mice. *Brain Research* 1150, 121–130.
- Kocelak, P., Owczarek, A., Bożentowicz-Wikarek, M., Brzozowska, A., Mossakowska, M., Grodzicki, T., Więcek, A., Chudek, J., and Olszanecka-Glinianowicz, M. (2018). Plasma concentration of Retinol Binding Protein 4 (RBP4) in relation to nutritional status and kidney function in older population of PolSenior Study. *Advances in Medical Sciences* 63, 323–328.
- Krezel, W., Ghyselinck, N., Samad, T.A., Dupé, V., Kastner, P., Borrelli, E., and Chambon, P. (1998). Impaired locomotion and dopamine signaling in retinoid receptor mutant mice. *Science* 279, 863–867.
- Krezel, W., Kastner, P., and Chambon, P. (1999). Differential expression of retinoid receptors in the adult mouse central nervous system. *Neuroscience* 89, 1291–1300.
- Lanciego, J.L., Luquin, N., and Obeso, J.A. (2012). Functional Neuroanatomy of the Basal Ganglia. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine* 2, a009621–a009621.
- Lane, M.A., and Bailey, S.J. (2005). Role of retinoid signalling in the adult brain. *Prog. Neurobiol.* 75, 275–293.
- Lee, E.S., Yoo, J.S., Lim, J.S., Yadav, D., Cho, E.J., Choi, Y.S., Kim, H.M., and Chung, C.H. (2013). Differences in Adipokine and Hepatokine Levels among Non-diabetic Population Classified by Age and Sex. 3, 6.
- Létondor, A., Baud, B., Vaysse, C., Richard, E., Layé, S., Pallet, V., and Alfos, S. (2016). EPA/DHA and Vitamin A Supplementation Improves Spatial Memory and Alleviates the Age-

related Decrease in Hippocampal RXR γ and Kinase Expression in Rats. *Front Aging Neurosci* 8, 103.

Liu, G., Yu, J., Ding, J., Xie, C., Sun, L., Rudenko, I., Zheng, W., Sastry, N., Luo, J., Rudow, G., et al. (2014). Aldehyde dehydrogenase 1 defines and protects a nigrostriatal dopaminergic neuron subpopulation. *J. Clin. Invest.* 124, 3032–3046.

Maden, M. (2007). Retinoic acid in the development, regeneration and maintenance of the nervous system. *Nat. Rev. Neurosci.* 8, 755–765.

Marie, A., Darricau, M., Touyarot, K., Parr-Brownlie, L.C., and Bosch-Bouju, C. (2021). Role and Mechanism of Vitamin A Metabolism in the Pathophysiology of Parkinson's Disease. *JPD* 11, 949–970.

McCaffery, P., Zhang, J., and Crandall, J.E. (2006). Retinoic acid signaling and function in the adult hippocampus. *J. Neurobiol.* 66, 780–791.

McCaffery, P.J., Adams, J., Maden, M., and 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.

Mingaud, F., Mormede, C., Etchamendy, N., Mons, N., Niedergang, B., Wietrych, M., Pallet, V., Jaffard, R., Krezel, W., Higuere, P., 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.

Miyamoto, Y., Katayama, S., Shigematsu, N., Nishi, A., and Fukuda, T. (2018). Striosome-based map of the mouse striatum that is conformable to both cortical afferent topography and uneven distributions of dopamine D1 and D2 receptor-expressing cells. *Brain Struct Funct* 223, 4275–4291.

Moise, A.R., Noy, N., Palczewski, K., and Blaner, W.S. (2007). Delivery of Retinoid-Based Therapies To Target Tissues. *Biochemistry* 46, 4449–4458.

Napoli, J.L. (2020). Post-natal all-trans-retinoic acid biosynthesis. In *Methods in Enzymology*, (Elsevier), pp. 27–54.

Pallet, V., and Enderlin, V. (2011). Vitamine A et vieillissement cérébral. *OCL* 18, 68–75.

Pallet, V., Azaïs-Braesco, V., Enderlin, V., Grolier, P., Noël-Suberville, C., Garcin, H., and Higuere, 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.

Pan, J., Yu, J., Sun, L., Xie, C., Chang, L., Wu, J., Hawes, S., Saez-Atienzar, S., Zheng, W., Kung, J., et al. (2019). ALDH1A1 regulates postsynaptic μ -opioid receptor expression in dorsal striatal projection neurons and mitigates dyskinesia through transsynaptic retinoic acid signaling. *Sci Rep* 9, 3602.

Penniston, K.L., and Tanumihardjo, S.A. (2018). The acute and chronic toxic effects of vitamin A1–4. *VITAMIN A* 11.

Piskunov, A., Al Tanoury, Z., and Rochette-Egly, C. (2014). Nuclear and Extra-Nuclear Effects of Retinoid Acid Receptors: How They Are Interconnected. In *The Biochemistry of Retinoic Acid Receptors I: Structure, Activation, and Function at the Molecular Level*, M.A. Asson-Batres, and C. Rochette-Egly, eds. (Dordrecht: Springer Netherlands), pp. 103–127.

- Podleśny-Drabiniok, A., Sobska, J., de Lera, A.R., Gołombiowska, K., Kamińska, K., Dollé, P., Cebrat, M., and Krężel, W. (2017). Distinct retinoic acid receptor (RAR) isoforms control differentiation of embryonal carcinoma cells to dopaminergic or striatopallidal medium spiny neurons. *Sci Rep* 7, 13671.
- Poulin, J.-F., Zou, J., Drouin-Ouellet, J., Kim, K.-Y.A., Cicchetti, F., and Awatramani, R.B. (2014). Defining midbrain dopaminergic neuron diversity by single-cell gene expression profiling. *Cell Rep* 9, 930–943.
- Reboul, E. (2013). Absorption of Vitamin A and Carotenoids by the Enterocyte: Focus on Transport Proteins. *Nutrients* 5, 3563–3581.
- Reiner, D.J., Yu, S.-J., Shen, H., He, Y., Bae, E., and Wang, Y. (2014). 9-Cis retinoic acid protects against methamphetamine-induced neurotoxicity in nigrostriatal dopamine neurons. *Neurotox Res* 25, 248–261.
- Saga, Y., Kobayashi, M., Ohta, H., Murai, N., Nakai, N., Oshima, M., and Taketo, M.M. (1999). Impaired extrapyramidal function caused by the targeted disruption of Retinoid X receptor RXR γ 1 isoform: RXR γ 1 knockout mice. *Genes to Cells* 4, 219–228.
- Samad, T.A., Krezel, W., Chambon, P., and Borrelli, E. (1997). Regulation of dopaminergic pathways by retinoids: Activation of the D2 receptor promoter by members of the retinoic acid receptor–retinoid X receptor family. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 6.
- Sgobio, C., Wu, J., Zheng, W., Chen, X., Pan, J., Salinas, A.G., Davis, M.I., Lovinger, D.M., and Cai, H. (2017). Aldehyde dehydrogenase 1–positive nigrostriatal dopaminergic fibers exhibit distinct projection pattern and dopamine release dynamics at mouse dorsal striatum. *Sci Rep* 7, 5283.
- Shearer, K.D., Stoney, P.N., Morgan, P.J., and McCaffery, P.J. (2012). A vitamin for the brain. *Trends Neurosci.* 35, 733–741.
- Shimohama, S., and Kawamata, J. (2018). Roles of Nicotinic Acetylcholine Receptors in the Pathology and Treatment of Alzheimer’s and Parkinson’s Diseases. In *Nicotinic Acetylcholine Receptor Signaling in Neuroprotection*, A. Akaike, S. Shimohama, and Y. Misu, eds. (Singapore: Springer), p.
- Sodja, C., Fang, H., Dasgupta, T., Ribocco, M., Walker, P.R., and Sikorska, M. (2002). Identification of functional dopamine receptors in human teratocarcinoma NT2 cells. *Brain Res Mol Brain Res* 99, 83–91.
- Touyarot, K., Bonhomme, D., Roux, P., Alfos, S., Lafenêtre, P., Richard, E., Higuieret, P., and 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.
- Wey, M.C.-Y., Fernandez, E., Martinez, P.A., Sullivan, P., Goldstein, D.S., and Strong, R. (2012). Neurodegeneration and motor dysfunction in mice lacking cytosolic and mitochondrial aldehyde dehydrogenases: implications for Parkinson’s disease. *PLoS ONE* 7, e31522.
- Wu, J., Kung, J., Dong, J., Chang, L., Xie, C., Habib, A., Hawes, S., Yang, N., Chen, V., Liu, Z., et al. (2019). Distinct Connectivity and Functionality of Aldehyde Dehydrogenase 1a1-Positive Nigrostriatal Dopaminergic Neurons in Motor Learning. *Cell Reports* 28, 1167-1181.e7.

Yamamoto, Y., Zolfaghari, R., and Catharine Ross, A. (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.

Yin, L.-H., Shen, H., Diaz-Ruiz, O., Bäckman, C.M., Bae, E., Yu, S.-J., and Wang, Y. (2012). Early post-treatment with 9-cis retinoic acid reduces neurodegeneration of dopaminergic neurons in a rat model of Parkinson's disease. *BMC Neurosci* *13*, 120.

Zetterström, R.H., Solomin, L., Jansson, L., Hoffer, B.J., Olson, L., and Perlmann, T. (1997). Dopamine neuron agenesis in *Nurr1*-deficient mice. *Science* *276*, 248–250.

Zetterström, R.H., Lindqvist, E., De Urquiza, A.M., Tomac, A., Eriksson, U., Perlmann, T., and Olson, L. (1999). Role of retinoids in the CNS: differential expression of retinoid binding proteins and receptors and evidence for presence of retinoic acid: Role of retinoids in the CNS. *European Journal of Neuroscience* *11*, 407–416.

Ztaou, S., and Amalric, M. (2019). Contribution of cholinergic interneurons to striatal pathophysiology in Parkinson's disease. *Neurochemistry International* *126*, 1–10.

DISCUSSION GÉNÉRALE

Les causes exactes conduisant à la perte accélérée des neurones dopaminergiques et à la mise en place de la MP restent à ce jour inconnues (Obeso et al., 2017). Ainsi on décrit la MP comme une maladie aux origines multifactorielles, dont le développement est favorisé par l'association de prédispositions génétiques et de différents facteurs de risques environnementaux et métaboliques (Ascherio and Schwarzschild, 2016; Goldman, 2014). Dans ce contexte, un affaiblissement de la signalisation des rétinoïdes, dû à des prédispositions génétiques, ou survenant au cours du vieillissement ou en cas d'apport alimentaire insuffisant en vitamine A, pourrait contribuer à l'étiologie de la MP. Les traitements pharmacologiques actuels de la MP ciblent essentiellement le système dopaminergique nigro-strié, afin de limiter les effets de la neurodégénérescence dopaminergique sur le contrôle du mouvement volontaire (Connolly and Lang, 2014; Reich and Savitt, 2019). Néanmoins, ces traitements sont seulement symptomatiques et associés à l'apparition d'effets secondaires qui peuvent être plus invalidants sur le long terme que les symptômes moteurs de la maladie (Armstrong and Okun, 2020). C'est pourquoi il est primordial de trouver des stratégies thérapeutiques permettant de ralentir, si ce n'est prévenir, cette neurodégénérescence et ainsi améliorer la qualité de vie des patients et de leur entourage sur le long-terme. Parmi les pistes étudiées, la nutrition représente un facteur modifiable potentiel pour ralentir la progression de la maladie (Boulos et al., 2019; Lorente-Picón and Laguna, 2021). Une supplémentation nutritionnelle est également plus facile à mettre en œuvre chez les patients comparée à l'administration de traitements médicamenteux. C'est dans ce contexte que s'inscrit cette thèse dont l'objectif principal était de mieux comprendre l'implication de la signalisation des rétinoïdes dans l'homéostasie fonctionnelle de la voie nigro-striée à l'âge adulte et de déterminer le potentiel effet bénéfique d'une supplémentation nutritionnelle en vitamine A pour ralentir la progression de la MP.

I. Synthèse des principaux résultats

L'objectif premier de cette thèse était de tester l'hypothèse d'un effet bénéfique induit par un régime enrichi en vitamine A préventif chez un modèle rat de la MP par une injection intrastriatale de 6-OHDA (**Étude 1**). Les résultats obtenus ont montré une amélioration de certains comportements moteurs en réponse à l'injection de 6-OHDA chez les rats préalablement supplémentés en vitamine A. De plus, les résultats révèlent que 8 semaines de supplémentation en vitamine A avec 20 UI/g d'aliments sont suffisantes pour augmenter la concentration hépatique de rétinol et l'expression des récepteurs RAR β et RXR γ dans le striatum. Néanmoins, les différentes analyses biochimique et immunohistochimiques réalisées post-mortem ont révélé un effet modéré de la supplémentation en vitamine A sur le système dopaminergique des rats.

Afin de mieux comprendre le rôle de la signalisation des rétinoïdes dans l'homéostasie et la fonction de la voie nigro-striée à l'âge adulte, le deuxième objectif de cette thèse était de caractériser l'impact d'un affaissement de la voie de signalisation des rétinoïdes, induit par une carence nutritionnelle en vitamine A, sur le système nigro-strié de rats adultes (**Étude 2**). Cette deuxième étude nous a permis de valider l'utilisation d'une sub-carence en vitamine A pour modéliser une déprivation chronique en vitamine A à l'âge adulte chez le rat. Par ailleurs, les résultats de cette étude tendent à confirmer l'effet modéré de l'apport alimentaire en vitamine A sur le système dopaminergique nigro-strié à l'âge adulte. L'analyse par qPCR de l'expression des gènes codant pour les différentes protéines impliquées dans la neuromodulation du striatum nous a conduit vers de nouvelles hypothèses impliquant cette fois-ci la signalisation cholinergique et les sous-territoires du striatum. Ainsi, la signalisation rétinoïde impacte par ce biais l'intégrité fonctionnelle du striatum et son rôle dans le contrôle du mouvement volontaire au sein des ganglions de la base (Crittenden and Graybiel, 2011b; Ztaou and Amalric, 2019). Enfin, l'étude de la réversibilité des déficits induits par 20 semaines de carence en vitamine A montre qu'une supplémentation nutritionnelle de 6 semaines à 20 UI/g d'aliments ne permet pas de normaliser l'expression de l'ensemble des gènes impactés par la carence, mettant en avant la nécessité d'un apport suffisant en vitamine A tout au long de la vie.

L'ensemble des données obtenues au cours de ces 2 études confirme l'implication de la signalisation des rétinoïdes dans le maintien de l'intégrité du striatum et de la voie nigro-striée à l'âge adulte. Une supplémentation nutritionnelle en vitamine A au-delà de celle utilisée dans nos études pourrait permettre de maintenir à un niveau suffisant la signalisation des rétinoïdes au sein de la voie nigro-striée et contribuerait ainsi à limiter le risque de développer la MP.

II. Modulation nutritionnelle de la biodisponibilité en vitamine A

1. Comment évaluer au mieux la biodisponibilité de la vitamine A chez l'Homme ?

La vitamine A présente dans les régimes utilisés au cours de cette thèse est sous forme de rétinyl palmitate, qui est la forme de stockage majoritaire du rétinol chez l'Homme, mais également l'ester de rétinol le plus abondant naturellement dans le cerveau et le foie des rats (Li et al., 2014b; Nasri et al., 2002). C'est donc a priori la meilleure forme à utiliser pour maximiser l'efficacité de la supplémentation.

L'effet des différents régimes en vitamine A a tout d'abord été étudié *via* le statut en vitamine A des animaux. Nous avons montré que le dosage hépatique du taux de rétinol est plus sensible que le dosage plasmatique vis-à-vis des différentes doses d'apport alimentaire en vitamine A, aussi bien sur 8 semaines de régime que dans le modèle chronique de 26 semaines. Le dosage plasmatique de rétinol étant moins invasif que le dosage hépatique (nécessite une biopsie) il est classiquement utilisé pour déterminer le statut en vitamine A chez l'Homme et ainsi diagnostiquer un état de carence ou à l'inverse d'hypervitaminose A (Borel and Desmarchelier, 2017; Feart et al., 2005; Gardner et al., 1997). Cependant, plusieurs études remettent en cause son utilisation et sa pertinence comme marqueur biologique du statut en vitamine A, du fait de sa concentration homéostatique finement régulée par l'organisme (Olsen et al., 2018; Penniston and Tanumihardjo, 2018; Tanumihardjo et al., 2016). De plus, l'analyse corrélative réalisée dans l'étude 2 de cette thèse a montré que les taux plasmatiques de rétinol ne corrèlent que modérément avec les taux hépatiques. L'étude de (Olsen et al., 2018) montre que le dosage sérique d'ester de rétinol est plus finement corrélé au stock hépatique total de vitamine A chez l'Homme et pourrait donc représenter un biomarqueur plus sensible pour évaluer le statut en vitamine A des individus.

Outre le foie, le cerveau est également capable de stocker la vitamine A sous forme d'ester de rétinol et de les hydrolyser en rétinol libre puis en métabolite actif pour son utilisation (Arfaoui et al., 2009; Nasri et al., 2002). De plus, ces stocks de rétinol cérébral sont plus sensibles à une carence en vitamine A induite chez le rat pendant 3 mois avec 0 UI/g d'aliments comparés aux stocks hépatiques. Ainsi l'absence de carence déterminée par un dosage plasmatique, ou hépatique de rétinol libre ou estérifié, ne permet pas d'écarter une carence préalable en vitamine A au niveau cérébral. Ces observations renforcent l'importance d'un apport en vitamine A suffisant tout au long de la vie.

Au regard de l'ensemble de ces données, il semblerait plus pertinent d'évaluer le statut en vitamine A *via* un ensemble de biomarqueurs plutôt qu'un seul isolé. En ce sens, le dosage combiné des esters de rétinol, du rétinol libre et de l'AR, représentant les 3 formes majoritaires de vitamine A dans la circulation sanguine, permettrait une évaluation plus globale de la

biodisponibilité de la vitamine A pour les organes cibles. Le dosage des récepteurs des rétinoïdes dans les cellules mononuclées du sang et celui du taux sérique de RBP4 semblent également plus sensible à la diminution de la signalisation des rétinoïdes au cours du vieillissement que le dosage plasmatique de rétinol et pourraient être utilisés comme biomarqueur prédictif d'un affaiblissement de la signalisation rétinoïde (Feart et al., 2005; Kocełak et al., 2018). Enfin, les résultats obtenus chez le rat dans l'étude de (Dumetz et al., 2020c), laissent suggérer qu'un dosage cérébral de la concentration d'AR, dans le liquide cérébro-spinal par exemple, permettrait un meilleur reflet de l'activité de la voie de l'AR au cours du vieillissement. Néanmoins des études complémentaires sont nécessaires pour justifier de l'emploi de cette méthode invasive chez l'Homme.

2. Etude de la vitamine A : choix des modèles nutritionnels

- *Validation des modèles nutritionnels utilisés durant la thèse*

L'un des objectifs de cette thèse était de parvenir à mettre en place une déprivation en vitamine A à l'âge adulte et ainsi s'affranchir des effets de la carence lors de la période développementale (Bonhomme et al., 2014a; Cocco et al., 2002; Dumetz et al., 2020a). De plus, afin de pouvoir évaluer le comportement moteur des rats tout au long des 6 mois de l'expérience nous avons choisi de réaliser une sub-carence en vitamine A avec 0,4 UI/g d'aliments plutôt qu'une carence totale à 0 UI/g d'aliments, bien que la carence totale soit plus communément utilisée dans les données de la littérature pour épuiser rapidement les stocks hépatiques de rétinol (Bonhomme et al., 2014a; Carta et al., 2006; Cocco et al., 2002; Dumetz et al., 2020a). Les résultats observés dans le dosage plasmatique et hépatique de rétinol sont en accord avec ceux de l'étude de (Husson et al., 2003), montrant une diminution significative, des taux de rétinol chez les rats carencés en vitamine A dès le sevrage avec 0 UI/g d'aliments, pendant 10 semaines, comparé au groupe contrôle avec 5 UI/g d'aliments. La diminution des taux de rétinol plasmatique est également retrouvée dans un modèle de sub-carence, induit chez le rat dès le sevrage et poursuivi jusqu'à 22 mois avec 1,2 UI/g d'aliments (Dawson et al., 1999). A la fin des 22 mois de carence marginale à 1,2 UI/g d'aliments les rats ne présentaient pas de signe caractéristiques de la carence en vitamine A telle que la xérophtalmie, ou l'apparition d'un plateau dans la prise de poids (Dawson et al., 1999). Néanmoins on observe une différence significative de la prise de poids chez les rats carencés en vitamine A comparés aux rats sous régime suffisant (13,3 UI/g d'aliments) dans l'étude de Dawson et al., 1999. Cet effet de la carence sur la courbe de poids n'est pas présent dans notre étude, lorsque nous initions la carence à 6 semaines chez les rats avec pourtant une dose plus faible en vitamine A. Concernant les effets de la déprivation en vitamine A sur la

vision, l'étude de Carta et al., 2006 n'a également pas montré d'effet de la carence à 0 UI/g d'aliments, initiée au sevrage et pendant 24 semaines, sur la vision de jour chez les rats ni de cécité, évaluée dans une pièce illuminée par un test d'évitement d'obstacles dans l'open field. L'ensemble de ces données nous permet de valider la sub-carence en vitamine A à 0,4 UI/g d'aliments comme modèle de déprivation en vitamine A initiée à l'âge adulte.

De plus, on observe dans notre modèle nutritionnel chronique une diminution au cours du temps des taux plasmatique de rétinol, similaire à celle observée dans l'étude de Dawson et al., 1999. Cette diminution est présente dans une moindre mesure pour les animaux sous régime suffisant ou enrichi en vitamine A, et ce pour notre étude autant que pour l'étude de Dawson et al., 1999. Ces résultats sont en faveur d'une supplémentation nutritionnelle en vitamine A pour prévenir l'affaissement de la signalisation des rétinoïdes liée à l'âge (Bonhomme et al., 2019; Lane and Bailey, 2005).

Plusieurs études précliniques menées chez le rat et la souris ont montré que la dose d'apport nutritionnel en vitamine A module l'expression des récepteurs des rétinoïdes au niveau cérébral (Enderlin et al., 2000; Etchamendy et al., 2003; Mingaud et al., 2008). Nous avons montré qu'une supplémentation à 20 UI/g d'aliments pendant 8 semaines est suffisante pour augmenter l'expression protéique des récepteurs RAR β et RXR γ dans le striatum comparé au groupe sous régime suffisant à 5 UI/g d'aliments. De même au niveau transcriptomique, la supplémentation chronique en vitamine A induit une augmentation de l'expression des ARNm codants pour RAR β et RXR γ dans le striatum comparé aux animaux sous régime carencé à 0.4 UI/g d'aliments. Ces résultats sont cohérents avec ceux observés dans la littérature, avec une supplémentation nutritionnelle (Bonhomme et al., 2019) ou un traitement chronique à l'AR (Enderlin et al., 2000), et nous permettent de valider l'impact de nos modèles nutritionnels sur la signalisation des rétinoïdes, médiée par les récepteurs RAR β et RXR γ au niveau striatal. Concernant le métabolisme hépatique du rétinol, l'expression des ARNm codants pour CYP26a1 et LRAT sont toutes deux modulées par les doses d'apport alimentaire en vitamine A. Néanmoins, on observe une sensibilité accrue de l'expression de l'ARNm codant pour CYP26a1 vis-à-vis des taux de rétinol hépatique, ce qui est en accord avec les résultats précédemment observés dans l'étude de (Yamamoto et al., 2000).

- *Supplémentation nutritionnelle vs traitements avec des rétinoïdes de synthèse*

L'étude de Yamamoto et al., 2000 a comparé les effets d'une injection aigue d'AR en i.p. à 100 mg/kg de poids corporel à une supplémentation nutritionnelle chronique en vitamine A avec 166 UI/g d'aliments et n'a pas montré de différence significative entre les 2 traitements sur la modulation de l'expression de l'ARNm codant pour CYP26a1 au niveau du foie. Par

ailleurs, dans l'étude de (Mingaud et al., 2008), on observe une meilleure restauration de l'expression de RAR β dans le striatum de souris âgées de 23 mois suite à une supplémentation nutritionnelle en vitamine A (avec 45 UI/g d'aliments) comparé à des injections sous-cutanées d'AR (à la dose de 150 μ g/Kg de poids corporel/jour pendant 3 semaines). Il n'y a également pas d'effet synergique observé entre la supplémentation nutritionnelle en vitamine A et un traitement à l'AR sur l'expression de RAR β dans le striatum de ces souris âgées (Mingaud et al., 2008). Aux vues de ces données, une supplémentation nutritionnelle semble donc induire des effets similaires à ceux induits par un traitement à l'AR sur le métabolisme hépatique de la vitamine A et la signalisation des rétinoïdes médiée par ses récepteurs au niveau du striatum. De plus la supplémentation nutritionnelle à l'avantage de présenter moins de risques de toxicité comparé à un traitement à l'AR, étant donné que les apports de vitamine A alimentaire sont mieux régulés par l'organisme que l'apport direct de ses métabolites (Moise et al., 2007; Napoli, 2020).

- *Choix de la dose de supplémentation en vitamine A*

La dose de supplémentation en vitamine A utilisée au cours de cette thèse (20 UI/g d'aliments) est considérée comme suffisante pour améliorer les fonctions cognitives ainsi que les niveaux de rétinol plasmatique et d'AR au niveau cérébral, altérés au cours du vieillissement (Bonhomme et al., 2014b; Dumetz et al., 2020c). Une supplémentation nutritionnelle à 20 UI/g d'aliments correspond à un apport d'environ 600 UI/ jour ou 180 μ g de rétinol/jour lorsque l'on rapporte cette dose de supplémentation en vitamine A à la consommation alimentaire des rats dans l'étude 1. Cette dose a également été choisie pour limiter le risque de toxicité consécutif à une hypervitaminose A (de Oliveira and Moreira, 2007; de Oliveira et al., 2009). Néanmoins, lorsque l'on compare la dose utilisée dans le régime enrichi en vitamine A, ainsi que celle du régime suffisant (5 UI/g d'aliments) à la diversité de celles utilisées dans la littérature on remarque qu'elles se situent dans la fourchette basse des apports alimentaires en vitamine A testés (**Tableau 7**). Le risque de toxicité hépatique induit par une supplémentation nutritionnelle en vitamine A a été évalué en détail dans l'étude de Dawson et al., 1999 utilisant une supplémentation à 166 UI/g d'aliments, soit 8 fois la dose utilisée dans les études réalisées au cours de cette thèse, sur une durée 23 mois chez le rat. Les rats supplémentés en vitamine A ne présentent pas d'augmentation plasmatique du ratio alanine/aspartate ou du taux d'aminotransférase, ni d'hypoalbuminémie, caractéristiques de dommages hépatiques. Il semblerait donc que la dose de 20 UI/g soit largement en dessous d'une dose présentant un risque de toxicité. Ainsi, il serait intéressant de tester l'effet d'une supplémentation nutritionnelle avec des doses plus élevées de vitamine A, comme 70 UI/g d'aliments, pour étudier si une dose plus importante permettrait de restaurer complètement l'expression des

ARNm codants pour ALDH1A1 et MOR1 dans le striatum ainsi que la concentration hépatique de rétinol. Par ailleurs les résultats obtenus dans le step test de l'étude 2 ne montrent pas de différence significative du nombre de pas au cours du temps entre les animaux sous régime suffisant et ceux sous régime carencé, ce qui laisse supposer que la dose de 5 UI/g d'aliments n'est peut-être pas suffisante pour couvrir tous les besoins de l'organisme et maintenir l'homéostasie de signalisation des rétinoïdes avec l'âge.

Une dose de 70 UI/g d'aliments resterait en dessous des seuils de toxicité chronique définis chez l'Homme à 25 000 UI/ jour pendant plus de 6 ans ou 100 000 UI/jour pendant 6 mois (Penniston and Tanumihardjo, 2018). On peut également supposer que cette dose permettrait de prévenir l'hypertriglycéridémie observée chez les rats supplémentés avec 166 UI/g d'aliments dans l'étude de Dawson et al., 1999. Cependant, les études de toxicité sont difficilement transposables entre l'Homme et l'animal, et des analyses de toxicité hépatique et d'inflammation seraient nécessaires pour valider l'utilisation chronique de cette nouvelle dose de supplémentation en vitamine A chez le rat. A plus long-terme, une autre piste de supplémentation en vitamine A serait l'administration orale de rétinol ou de rétinyl palmitate encapsulé. L'encapsulation des vitamines liposolubles permet de limiter leur oxydation et ainsi augmenter leur potentiel physiologique, même si elle ne permet pas de contrôler l'adressage (Gomes et al., 2021; Gonnet et al., 2010).

Animal	Dose vit.A régime suffisant *	Dose vit.A supplémentation *	Durée supplémentation	Étude
Rats Wistar, 10 sem-16 mois	5 UI/g	20 UI/g	3-4 sem	Dumetz et al., 2020a, 2020b
Rats Wistar, sevrés	5 UI/g	20 UI/g	4 sem	Bonhomme et al., 2019
Rats Wistar, 13 mois	5 UI/g	45 UI/g	5 mois	Touyarot et al., 2013
Rats Wistar, 13 mois	5 UI/g	45 UI/g	21 sem	Létondort et al., 2016
Rats Wistar, 3 mois	15 UI/g	-	-	Arfaoui et al., 2013
Rats wistar, 10 sem-24 mois	8 UI/g	Traitement AR	24 h avant sacrifice	Enderlin et al., 1997b
Souris C57 BL/6, 5-12 mois	5 UI/g	45 UI/g	toute la vie	Mingaud et al., 2008
Rats Sprague Dawley, 7 sem	6.5 UI/g	-	-	Chen et al., 2019
Rats Wistar, sevrés	5 UI/g	Traitement AR	4 jours	Husson et al., 2003
Rats Lewis, sevrés	13.3 UI/g	166 UI/g	3-22 mois	Dawson et al., 1999
Rats Lewis, sevrés	13.3 UI/g	166 UI/g	3-22 mois	Yamamoto et al., 2000
Rats Lewis, sevrés	13.3 UI/g	83.2 UI/g	3-22 mois	Dawson et al., 2000
Rats F1 (F344xBN), 6-35 mois	25 UI/g	-	-	van der Loo et al., 2004
Rats Long-Evans, 6-24 mois	30 UI/g	-	-	Wołoszynowska-Fraser et al., 2021

* Les doses de vitamine A sont donnée en UI/g d'aliments, 1 UI = 0.3 µg de rétinol

Tableau 7 : Tableau récapitulatif des doses d'apport nutritionnel en vitamine A présentes dans la littérature

La liste est non exhaustive et ne présente que les études utilisant un apport en vitamine A par l'alimentation. Les supplémentations en vitamine A utilisant des gavages (vitamine A en solution huileuse) ne sont pas répertoriées car il n'est pas possible de convertir l'apport en rétinol entre ce mode de supplémentation et un apport nutritionnel. Seules les études de Dawson et al., 1999 et 2000 et Yamamoto et al., 2000, ont indiqué la forme de vitamine A présente dans les régimes (rétinyl palmitate). Abréviations : sem, semaines ; vit.A, vitamine A.

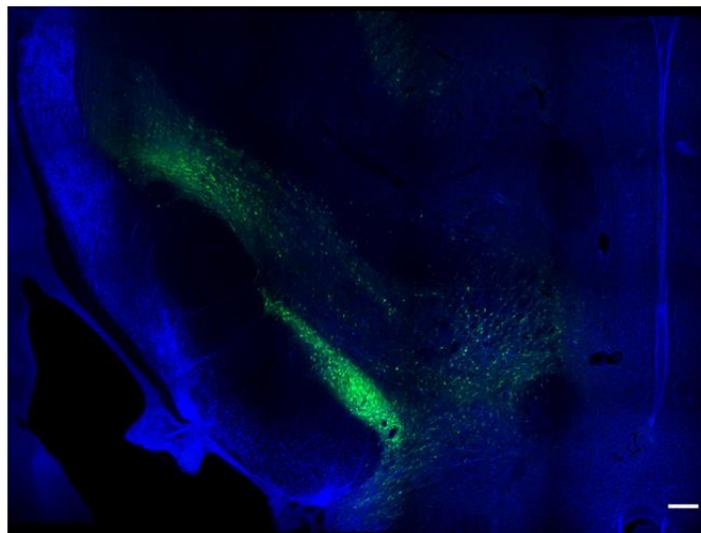
III. Vitamine A et physiopathologie de la maladie de Parkinson

1. Effet de la supplémentation en vitamine A dans un modèle animal de la MP

Plusieurs études pré-cliniques ont mis en avant l'effet bénéfique de traitements aux rétinoïdes (injection i.c.v. d'AR-9-*cis* ou injection i.p. d'agoniste de l'hétérodimère Nurr1:RXR α) sur le comportement moteur dans des modèles animaux de la MP (Reiner et al., 2014; Spathis et al., 2017; Yin et al., 2012b). Cependant les résultats obtenus dans l'étude 1 de cette thèse n'ont révélé qu'un effet modéré de la supplémentation nutritionnelle préventive en vitamine A sur le comportement moteur en réponse à l'injection striatale unilatérale de 6-OHDA. Il est à noter que les améliorations motrices retrouvées dans les études pré-cliniques citées ci-dessus sont associées à une augmentation de la survie des neurones dopaminergiques de la SNc et de leurs projections dans le striatum. Cet effet sur la survie des neurones dopaminergiques n'est pas retrouvé dans nos conditions, chez les animaux supplémentés en vitamine A et injecté avec la 6-OHDA. L'augmentation de la survie des neurones dopaminergiques dans les études de Yin et al., 2012, et Reiner et al., 2014, pourrait être médiée par une augmentation de la signalisation du récepteur RXR γ , qui se lie préférentiellement à l'isoforme 9-*cis* de l'AR et dont la transcription est directement régulée par les niveaux d'AR (Rühl et al., 2018). On peut supposer que la dose de vitamine A apportée par notre supplémentation nutritionnelle, bien que suffisante pour induire une augmentation de la synthèse protéique de RXR γ dans le striatum, ne permette pas d'induire une augmentation de la synthèse d'AR au niveau cérébral comparable à celle induite par une injection i.c.v. d'AR-9-*cis*. Une dose plus élevée de supplémentation nutritionnelle en vitamine A pourrait induire des effets plus probants sur la survie des neurones dopaminergiques et l'intensité de marquage TH dans le striatum que ceux observés dans nos analyses immunohistochimiques.

D'autre part, les études citées plus haut n'utilisent pas toutes le modèle de rat 6-OHDA, puisque certaines sont réalisées chez des souris MPTP. Dans notre étude, il est possible que l'injection intra-striatale de 6-OHDA ait induit une dégénérescence dopaminergique et un déficit moteur trop rapides et prononcés pour être contrecarré par une supplémentation nutritionnelle. Ainsi, nous avons réfléchi à l'utilisation d'un modèle plus récent et plus dégénératif, celui de l'injection de vecteurs viraux dans la SNc pour induire la surexpression et l'agrégation progressive de l' α -synucléine humaine. D'après la caractérisation faite dans la littérature (Bourdenx et al., 2015a), ce modèle permettrait de mieux appréhender les effets d'une supplémentation en vitamine A sur la dégénérescence des neurones dopaminergiques et la mise en place des altérations motrices associées. Le modèle d'injection AAV- α synucléine pourrait également être utilisé en association avec une carence en vitamine A pour déterminer si une altération de la signalisation des rétinoïdes accélère la dégénérescence

dopaminergique. Par ailleurs les résultats de différentes études pré-cliniques suggèrent l'existence d'une interaction entre la protéine α -synucléine et la vitamine A. En effet, outre les CRABP, la protéine α -synucléine pourrait également servir de transporteur à l'AR pour sa translocation au niveau nucléaire et sa liaison aux récepteurs RAR et RXR (Davidi et al., 2020). Or la translocation de l' α -synucléine au niveau nucléaire pourrait avoir un effet bénéfique sur la survie des neurones dopaminergiques en diminuant le stress oxydatif induit par cette protéine (Ghosh et al., 2017). De plus, la vitamine A permettrait d'inhiber la formation de fibrilles d' α -synucléine et de déstabiliser les fibrilles préformées (Ono and Yamada, 2007). Cependant un effet opposé sur l'oligomérisation d' α -synucléine, médiée par l'activation de l'hétérodimère RXR-PPAR γ , a été montré chez des souris A53T, modèles de la MP (Yakunin et al., 2012). Ainsi des études complémentaires sont nécessaires pour conclure sur l'implication de la vitamine A dans l'agrégation d' α -synucléine, renforçant l'intérêt d'utiliser le modèle d'injection AAV- α synucléine. C'est pourquoi nous avons initié la mise en place de ce modèle au cours de cette thèse (**Figure 24**), mais ce projet a dû être abandonné en raison de la crise sanitaire et de la fermeture totale du laboratoire.



Immunofluorescence : GFP DAPI

Figure 24 : Injection de vecteurs viraux AAV9-CMVie/SynP-GFP-WPRE dans la SNc de rats.

La comparaison des spécificités motrices évaluées dans les différents tests comportementaux utilisés suggère une implication de la vitamine A dans la motivation à initier le mouvement. En effet, dans le test du rotarod et le step test, le rat est contraint au mouvement, par l'appareil ou l'expérimentateur, pour maintenir son équilibre, tandis que dans le test du cylindre le rat est

libre d'initier le mouvement pour explorer un nouvel environnement, conformément à son instinct naturel (Su et al., 2017). La réalisation de tests moteurs plus sensibles pour évaluer l'initiation et la réalisation du mouvement, comme le test du pellet ou le test de l'escalier, permettrait de confirmer cette hypothèse (Klein and Dunnett, 2012; Whishaw et al., 2008). Il est à noter que l'absence d'effet significatif de l'injection de 6-OHDA dans le test du rotarod pourrait être imputable à la variabilité inhérente à ce test moteur. En effet plusieurs études utilisent la moyenne des résultats obtenus dans 2 ou 3 essais consécutifs comme résultat final pour évaluer la coordination motrice des animaux modélisant la MP par injection de 6-OHDA (Iancu et al., 2005; Kunzler et al., 2019; Li et al., 2017).

2. Effet de la carence en vitamine A sur le comportement moteur

Le comportement moteur des rats a également été évalué dans l'étude nutritionnelle afin de déterminer l'effet d'une carence en vitamine A induite à l'âge adulte sur la fonction motrice. Outre le step test, pour lequel on observe un effet bénéfique du régime enrichi en vitamine A, nous avons également étudié le comportement moteur des rats dans le test du rotarod, le test du cylindre et un test d'actimétrie. Le test du rotarod a été réalisé toutes les 2 semaines à partir de la 3^e semaine de régime, mais a été arrêté en cours d'expérimentation (à 19 semaines de régime). En effet, le test n'était plus adapté aux animaux qui étaient devenus trop corpulents pour le dispositif (dès la 9^e semaine de régime) et qui se laissaient facilement tomber, car c'était le choix de facilité pour eux. Ce phénomène a été observé quel que soit le groupe expérimental, ne permettant pas de conclure sur une altération motrice éventuelle. Si on compare ce résultat à la littérature, les rats de notre étude à 9 semaines de régime étaient âgés de 4 mois et pesaient en moyenne 600 g, soit 1,5 fois plus que les rats du même âge carencés en vitamine A dans l'étude de (Cocco et al., 2002). Par ailleurs le test du rotarod effectué à 24 semaines de régime déficient en vitamine A dans l'étude de Carta et al., 2006 est réalisé à la vitesse constante de 6 rpm (rotation par minute), tandis que dans nos conditions le rotarod est réalisé à vitesse croissante de 5 à 45 rpm. Le test du rotarod ne semble donc pas approprié, dans nos conditions, pour mesurer l'effet d'une carence en vitamine A induite à l'âge adulte sur le comportement moteur. De plus, la répétition du test du rotarod constitue également un apprentissage moteur pour les animaux (Sommer et al., 2014; Wu et al., 2019), ce qui peut masquer ou compenser des déficits moteurs qui se développent au cours de la carence. En particulier, le rôle des neurones dopaminergiques ALDH1A1⁺ de la SNc dans l'apprentissage moteur a récemment été mis en évidence ((Wu et al., 2019)). Dans l'étude de (Wu et al., 2019), une ablation génétique chez des souris adultes de ces neurones exprimant ALDH1A1 induit un déficit d'apprentissage des aptitudes motrices chez ces souris, évalué par la répétition du test du rotarod sur 6 jours consécutifs. En effet, lorsque l'entraînement au test

du rotarod est réalisé avant la perte des neurones ALDH1A1⁺, les souris ne présentent pas d'altération des performances motrices, alors que les performances sont altérées s'il n'y a pas eu d'entraînement préalable dans le rotarod (Wu et al., 2019). Dans notre étude, les tests dans le rotarod se sont déroulés depuis le début de la carence, il est donc possible que cet apprentissage nous ait empêché de voir un effet de la carence sur les aptitudes motrices des rats dans ce test.

Par ailleurs, le test du cylindre, réalisé toutes les 3 semaines à partir de la 5^e semaine de régime, n'a pas révélé d'effet des différents régimes en vitamine A sur l'initiation du mouvement. L'étude de la fonction locomotrice, mesurée dans des cages d'actimétrie sur 24 h, ne révèle pas non plus d'effet probant de la sub-carence ou de la supplémentation en vitamine A sur le comportement moteur. Ainsi, l'initiation de la carence en vitamine A à l'âge adulte ne semble pas impacter significativement le comportement moteur des rats, contrairement à ce qui est observé lorsque l'altération des rétinoïdes (carence ou manipulations génétiques) est initiée dès la période développementale (Carta et al., 2006; Krezel et al., 1998; Liao et al., 2008; Saga et al., 1999).

Les résultats observés dans le test du cylindre pour le modèle MP laissent supposer un effet plus nuancé de la vitamine A sur le comportement moteur chez le rat adulte. En ce sens, une collaboration avec le Dr Nicolas Mallet, à l'IMN (Bordeaux), a été réalisée à la fin de cette thèse afin d'évaluer l'effet d'une carence en vitamine A à 0.4 UI/g d'aliments dans un test de conditionnement opérant. Brièvement, la tâche motrice consiste à demander aux rats d'appuyer sur un levier en réponse à un stimulus auditif pour obtenir une récompense liquide sucrée, les rats ayant été préalablement déprivés en eau afin d'augmenter leur motivation pour appuyer sur le levier. Ce paradigme comportemental permet donc de prendre en compte le paramètre motivationnel à initier le mouvement. Les résultats de cette étude sont actuellement en cours d'analyse et aideront à donner une direction pour la poursuite de ces travaux de thèse.

L'ensemble de nos données comportementales suggère donc un effet différentiel de la vitamine A sur le comportement moteur entre la période développementale et l'âge adulte. Le comportement moteur à l'âge adulte semble être moins sensible à une altération de la signalisation des rétinoïdes, mimées dans nos conditions par une carence nutritionnelle en vitamine A. Pour tester cette hypothèse, il serait par exemple intéressant de comparer l'effet d'un KO conditionnel des récepteurs RAR β et RXR γ dans le striatum des animaux, induit de façon post-natale, au moment du sevrage (3 semaines) ou à l'âge adulte (6-7 semaines).

IV. Effet de la vitamine A sur la neuromodulation du striatum à l'âge adulte

1. Implication de la vitamine A *via* le système dopaminergique nigro-strié à l'âge adulte

- *Vitamine A et récepteurs dopaminergiques D1 et D2*

Etant donné l'importance de la signalisation dopaminergique dans le contrôle du mouvement volontaire et son altération dans la MP (Lanciego et al., 2012; Raza et al., 2019), nous nous sommes concentrées dans un premier temps sur l'effet des régimes en vitamine A sur le système dopaminergique nigro-strié. Cependant, les différentes analyses biochimiques réalisées post-mortem (western-blot, HPLC, qPCR et immunohistochimie) n'ont pas révélé d'effet majeur ni de la carence, ni de la supplémentation en vitamine A dans le modèle MP. Cette absence d'effet fort peut s'expliquer par les conditions initiales que nous avons choisies, avec une carence non-développementale, une supplémentation trop modérée ou encore un modèle MP trop drastique. En ce sens, ce travail de thèse permet de mieux cerner les conditions dans lesquelles la signalisation rétinoyde est (ou n'est pas) importante pour le fonctionnement de la voie nigro-striée.

Néanmoins, nos études ont permis de révéler certaines protéines particulièrement sensibles à la vitamine A. Ainsi, la supplémentation préventive en vitamine A chez les rats injectés à la 6-OHDA a permis de normaliser l'expression protéique du D2R dans le striatum au niveau des animaux contrôles. De plus, l'analyse par qPCR de l'expression de l'ARNm codant pour D2R indique que la carence en vitamine A tend à diminuer son expression dans le striatum comparé aux animaux sous régime supplémenté, sans effet des régimes sur l'expression du gène codant pour D1R. Bien que la transcription des gènes codants pour D1R et D2R soient tous deux sous contrôle de l'AR, il semblerait que l'expression du D2R soit donc plus sensible au niveau d'apport alimentaire de vitamine A à l'âge adulte (Samad et al., 1997b; Sodja et al., 2002). L'étude de Carta et al., 2006 n'a pas montré d'effet de la carence en vitamine A à 0 UI/g sur l'expression des transcrits pour D1R et D2R évaluée au niveau du striatum antérieur, intermédiaire et postérieur. Cependant la régionalisation du striatum selon l'axe latéral-médial, dans l'étude de Krezel et al., 1998, indique un effet différentiel des doubles KO RAR β -RXR γ dans la régulation de l'expression des transcrits pour les D1R et D2R, mesurée par hybridation *in situ*. La perte de la signalisation médiée par RAR β -RXR γ induit une diminution plus importante de l'expression des ARNm codants pour D1R et D2R au niveau de la partie ventrale du striatum, sans effet significatif au niveau de la partie dorsale. Dans nos études, la réalisation d'une hybridation *in situ* pour évaluer au niveau spatial l'expression des ARNm codants pour D1R et D2R permettrait d'évaluer plus finement l'effet de la diminution de l'expression des

ARNm codants pour RAR β et RXR γ dans le striatum d'animaux carencés en vitamine A à l'âge adulte et ainsi comparer à l'étude de Krezel et al., 1998, où les KO pour les récepteurs sont constitutifs.

- *Vitamine A et ALDH1A1*

L'étude de l'implication de la vitamine A et de sa signalisation dans l'intégrité du système dopaminergique nous a amenées à nous intéresser plus particulièrement à l'enzyme ALDH1A1, cette enzyme étant commune à la voie de signalisation dopaminergique et à celle des rétinoïdes (Goldstein, 2020; Marie et al., 2021; Wey et al., 2012) (**Figure 25**). Notre hypothèse de départ était qu'une supplémentation nutritionnelle en vitamine A permettrait d'augmenter l'expression d'ALDH1A1, sa transcription étant sous contrôle de l'AR, et contribuerait ainsi à augmenter la survie des neurones dopaminergiques de la SNc (Jacobs et al., 2007; Smidt, 2017) (**Figure 25**). L'ALDH1A1 contribue à limiter la dégénérescence des neurones dopaminergiques en dégradant le DOPAL, ce qui limite également l'agrégation d' α -synucléine (Burke et al., 2008; Goldstein, 2020; Wey et al., 2012).

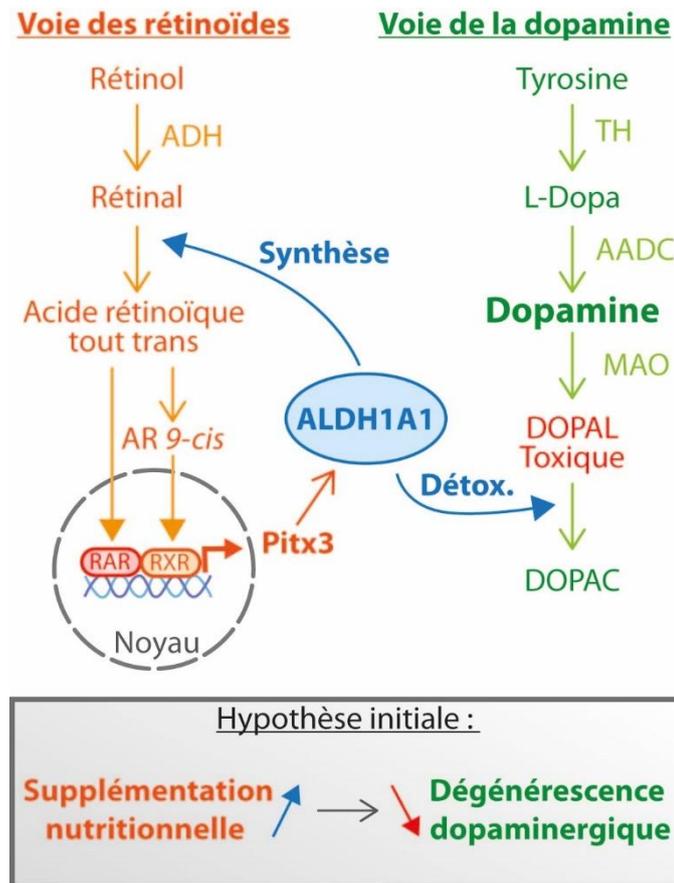


Figure 25 : Schéma de l'interaction entre la voie des rétinoïdes et la voie de la dopamine médiée par ALDH1A1

Dans l'étude 1, l'analyse immunohistochimique des neurones dopaminergiques de la SNc, (marquage anti-TH et anti-ALDH1A1), n'a pas révélé d'effet significatif de la supplémentation préventive en vitamine A sur la survie globale des neurones dopaminergiques, ni sur la survie de la sous-population de neurones dopaminergiques ALDH1A1⁺, en réponse à l'injection de 6-OHDA. Nous avons conclu de cette analyse que la supplémentation en vitamine A utilisée, même si elle augmente le métabolisme des rétinoïdes, n'était pas assez soutenue pour permettre le maintien de ALDH1A1 et son pouvoir détoxifiant.

Lors de l'analyse immunohistochimique des neurones dopaminergiques de la SNc pour l'étude 2, nous avons d'abord été surprises par le très faible nombre de neurones ALDH1A1⁺ présents dans la SNc des rats âgés de 8 mois, et ce quel que soit le groupe expérimental étudié. Afin d'écartier tout biais expérimental, nous avons reproduit cette analyse en y ajoutant des rats de même souche mais plus jeunes (3 mois). Nous avons alors réalisé que les rats de 8 mois avaient une perte conséquente de neurones ALDH1A1⁺, en comparaison des rats plus jeunes.

Cette observation suggère un effet de l'âge sur la vulnérabilité de cette sous-population de neurones dopaminergiques. De plus, le nombre de neurones TH⁺ est également diminué chez les rats de 8 mois, quelque-soit le régime, ce qui suggère que la sous-population des neurones TH⁺/ALDH1A1⁺ est drastiquement diminuée chez les rats plus âgés. Cependant, l'absence d'effet du régime sur ce phénomène permet de poser 2 hypothèses : soit la supplémentation choisie n'est pas suffisante pour observer un effet protecteur, soit l'enzyme ALDH1A1 n'est pas suffisamment contrôlée par la signalisation rétinoyde pour que le régime puisse avoir une action protectrice sur son expression. D'un point de vue moléculaire, on peut supposer d'après la littérature (Liu et al., 2014, Caï et al., 2014), que la diminution d'ALDH1A1 dans le corps cellulaire des neurones dopaminergiques a favorisé leur dégénérescence, par accumulation de DOPAL toxique (Wey et al., 2012). L'étude de cette sous-population à différents âges et temps de régime permettrait de mieux explorer ces mécanismes et de déterminer un potentiel effet bénéfique de la vitamine A sur la dégénérescence liée à l'âge de ces neurones.

Au-delà de la diminution drastique du marquage ALDH1A1 dans la SNc des rats de 8 mois, nous avons observé d'autres résultats surprenants pour ALDH1A1 au sein de la voie nigro-striée. En effet chez ces mêmes animaux, le marquage immunohistochimique ALDH1A1 dans le striatum (fibres de la voie nigro-striée) n'est pas altéré. De plus, l'analyse de l'expression génique d'ALDH1A1 par qPCR révèle une diminution significative induite par la carence en vitamine A dans le striatum mais pas dans la SNc. La présence d'ARNm codant pour ALDH1A1 dans le striatum indique une synthèse locale de cette enzyme (Hafner et al., 2019), vraisemblablement au niveau des synapses dopaminergiques, puisque ces neurones sont les seuls à exprimer cette enzyme. Au regard de l'ensemble de ces données inattendues, nous avons formulé une nouvelle hypothèse concernant l'implication d'ALDH1A1 dans la signalisation de la voie nigro-striée à l'âge adulte :

Avec l'âge, la protéine ALDH1A1 serait préférentiellement adressée à la synapse dans le striatum, diminuant sa présence au soma (**Figure 26**). Cette hypothèse permettrait d'expliquer la diminution du marquage ALDH1A1 dans la SNc chez les rats âgés de 8 mois, et le maintien concomitant de l'intensité de marquage ALDH1A1 dans le striatum. Ainsi l'ARNm d'ALDH1A1 présent dans le striatum et analysé par qPCR dans notre étude proviendrait en réalité des synapses entre les neurones dopaminergiques et les MSNs dans le striatum et servirait à soutenir la synthèse de l'enzyme. Or dans les neurones dopaminergiques, le double rôle d'ALDH1A1 semble être ségrégué anatomiquement : la dégradation du DOPAL par l'ALDH1A1 se ferait plutôt au niveau du soma, puisque c'est au soma que la dopamine est dégradée (Meiser et al., 2013) ; tandis que l'ALDH1A1 à la synapse dans le striatum permettrait la synthèse d'AR. En effet, l'AR à la synapse dopaminergique dans le striatum agirait comme un messenger trans-synaptique pour stimuler la synthèse de certaines protéines,

comme MOR1 ou D2R dans les MSNs (Pan et al., 2019) (**Figure 26**). Ainsi, le maintien avec l'âge d'ALDH1A1 dans le striatum pourrait-être nécessaire à la synthèse et la signalisation de l'AR dans le striatum. Un adressage préférentiel de l'enzyme ALDH1A1 à la synapse dans le striatum favoriserait donc son utilisation pour la synthèse d'AR, au détriment de son action détoxifiante pour métaboliser le DOPAL, conduisant à terme à la fragilisation des neurones dopaminergiques.

L'isolation des synaptosomes et la réalisation d'une analyse protéomique (Luquet et al., 2017; Michaelis et al., 2017; Sialana et al., 2018) permettrait de vérifier cette hypothèse et de mieux comprendre le rôle d'ALDH1A1 dans la neuromodulation du striatum. Outre son expression et sa synthèse protéique, il serait également pertinent de regarder si les régimes en vitamine A modulent l'activité enzymatique d'ALDH1A1 et par extension la synthèse d'AR à la synapse dopaminergique dans le striatum.

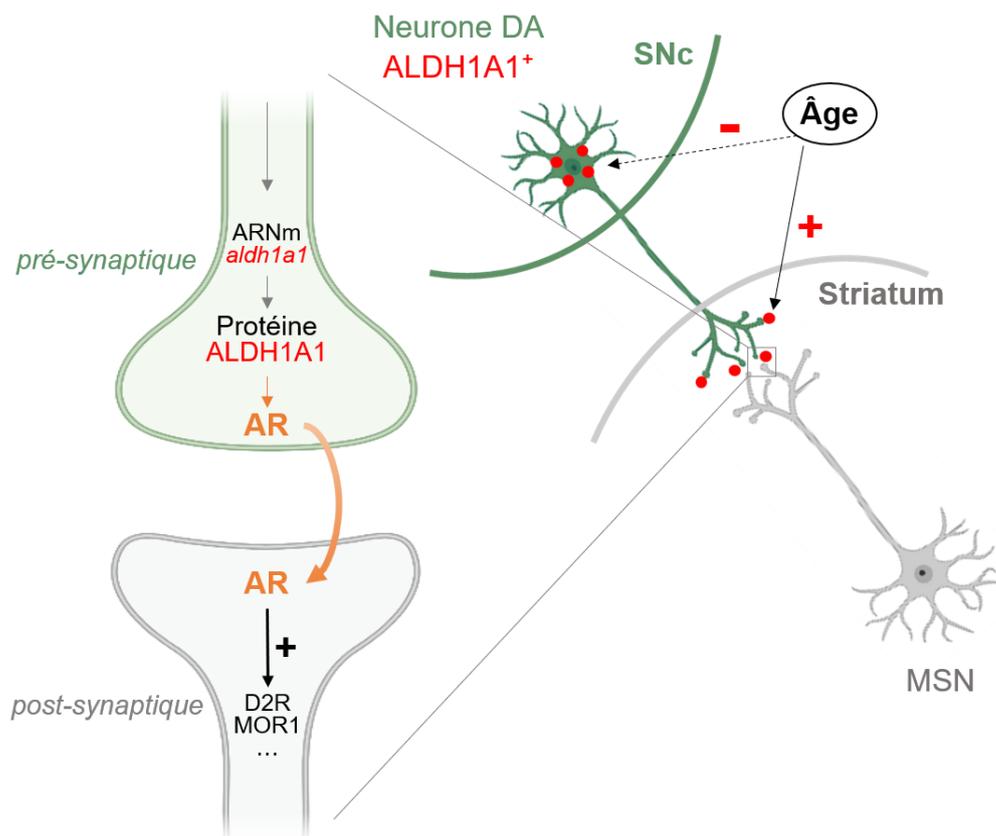


Figure 26 : Schéma de l'hypothèse alternative de l'implication de ALDH1A1 dans la signalisation de la voie nigro-striée à l'âge adulte

2. Implication de la vitamine A *via* les striosomes et l'acétylcholine à l'âge adulte

- *Vitamine A et acétylcholine*

Enfin, les données de la littérature concernant l'implication d'ALDH1A1 dans le maintien de l'homéostasie de la voie nigro-striée nous ont également amenées vers de nouvelles hypothèses, impliquant la signalisation cholinergique et la compartimentation structurelle du striatum. Ces données suggèrent un effet de la signalisation des rétinoïdes dans la neuromodulation du striatum à l'âge adulte plus complexe à appréhender que celui initialement envisagé pour le système dopaminergique.

L'acétylcholine (ACh), provenant notamment des interneurons cholinergiques du striatum, joue le rôle de neuromodulateur de la signalisation dopaminergique dans le striatum (Exley and Cragg, 2008; Shimohama and Kawamata, 2018; Ztaou and Amalric, 2019). En effet, une altération de la signalisation cholinergique contribue à une dérégulation de l'équilibre entre la voie directe et la voie indirecte médiée par le striatum et à l'apparition de troubles moteurs (Ztaou and Amalric, 2019). Nous avons montré dans l'étude 2, que la sub-carence initiée à l'âge adulte chez le rat induit une diminution de l'expression de l'ARNm codant pour l'enzyme de synthèse de l'ACh (ChAT). Ces résultats sont en accord avec ceux précédemment observés dans la littérature qui suggèrent une diminution de la signalisation cholinergique au sein du striatum en réponse à une altération développementale de la signalisation des rétinoïdes (Carta et al., 2006; Cocco et al., 2002) (**Figure 27**). Ainsi le système cholinergique semble être plus vulnérable à une altération de la signalisation des rétinoïdes à l'âge adulte que le système dopaminergique.

Plusieurs études *in vitro* ont également montré une augmentation de l'expression de l'ARNm de ChAT et de son activité dans des cellules murines cholinergiques (cellules SN56) en réponse à un traitement à l'AR (Berse and Blusztajn, 1995; Jankowska et al., 1997; Szutowicz et al., 1999). L'AR régule également de manière différentielle l'expression des sous-types de récepteurs nicotiques de l'ACh dans les cellules SN56 *in vitro* (Nilbratt et al., 2007). Cependant, à notre connaissance, aucune étude *in vivo* n'a évalué l'effet d'un apport alimentaire de vitamine A sur la signalisation cholinergique médiée par les récepteurs nicotiques et muscariniques de l'ACh dans le striatum. A court terme, il serait donc intéressant d'évaluer les niveaux d'expression de ces récepteurs, par qPCR et western-blot, dans le striatum des rats carencés et supplémentés de l'étude 2.

- *Vitamine A et striosomes*

Le rôle prépondérant d'ALDH1A1 dans le maintien de l'expression striatale de MOR1 à l'âge adulte suggère une implication potentielle de la vitamine A dans la cytoarchitecture du striatum à l'âge adulte (Pan et al., 2019b; Sgobio et al., 2017). La diminution de l'expression des ARNm codants pour MOR1 et ALDH1A1 dans le striatum de nos animaux carencés en vitamine A tend à confirmer cette hypothèse. Par ailleurs, un KO constitutif de RAR β chez des souris induit une diminution significative de la surface occupée par les striosomes (marquage MOR1), dans le striatum antérieur de ces souris (Liao et al., 2008). Ainsi, la diminution de l'expression de MOR1 chez nos animaux pourrait également être imputable à la diminution de l'expression striatale de RAR β induite par la carence à l'âge adulte (**Figure 27**). Au regard de ces données, il serait intéressant d'étudier par immunohistochimie l'expression striatale de MOR1 chez les rats carencés en vitamine A, afin de déterminer si une diminution de la signalisation en vitamine A altère l'intégrité structurelle des striosomes à l'âge adulte. Il serait également intéressant de regarder d'autres neuromarqueurs des striosomes, tel que Nur77 qui est un récepteur nucléaire orphelin capable de se dimériser avec RXR, afin de voir si la vitamine A agit sur l'ensemble des populations striosomales, ou seulement sur les striosomes contenant MOR1 (Crittenden and Graybiel, 2011b; Miyamoto et al., 2018). Enfin, compte tenu du rôle de la vitamine A dans la synthèse d'ACh évoqué précédemment, il serait pertinent de réaliser un immunomarquage anti-AChE, l'enzyme de dégradation de l'ACh également utilisée comme marqueur du compartiment matriciel dans le striatum (Lanciego et al., 2012; Sgroi and Tonini, 2018).

- *La vitamine A constituerait-elle un lien entre ALDH1A1, striosomes et acétylcholine ?*

L'ALDH1A1 exprimée au niveau des striosomes est communément attribuée aux projections dopaminergiques des neurones ALDH1A1⁺ de la SNc (Pan et al., 2019b; Sgobio et al., 2017). En retour, les MSNs présents dans les striosomes projettent sur cette sous-population de neurones dopaminergiques (Carmichael et al., 2021; Wu et al., 2019) (**Figure 27**). Ces données suggèrent une innervation partiellement réciproque des neurones ALDH1A1⁺ de la SNc et des striosomes du striatum (Wu et al., 2019). La diminution de l'expression de MOR1 observée dans le cerveau des patients parkinsoniens laisse suggérer la mise en place d'une altération des projections du compartiment striosomal sur les neurones ALDH1A1⁺ de la SNc au cours du développement de la MP. Une altération de la signalisation des rétinoïdes favoriserait la perte d'expression de MOR1 dans le striatum contribuant ainsi à l'étiologie de la MP (**Figure 27**). Cette possibilité d'association pathologique entre affaiblissement de la signalisation rétinoïdes, perte d'ALDH1A1, diminution d'expression de MOR1 et baisse de

transmission cholinergique est représentée **figure 27**.

Finalement, les études menées au cours de cette thèse convergent vers l'idée que la vitamine A à l'âge adulte est importante pour la fonctionnalité du striatum *via* son métabolite actif l'AR, particulièrement au niveau des interactions entre neurones dopaminergiques ALDH1A1⁺, neurones cholinergiques et territoires striosomaux. Ceci ouvre de nouvelles perspectives d'études pré-cliniques qui seront poursuivies au laboratoire.

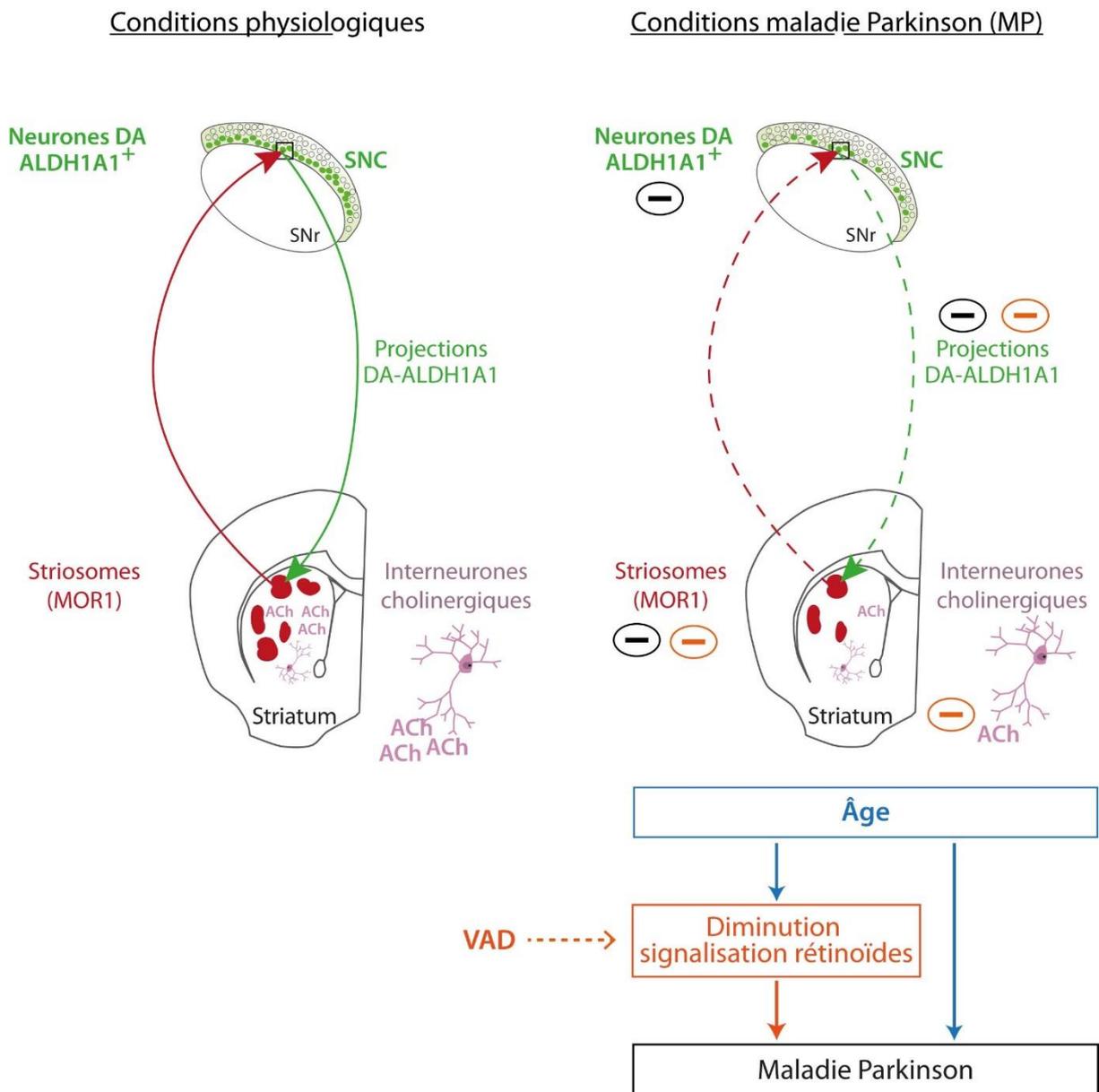


Figure 27 : Hypothèse d'implication de la signalisation des rétinoides dans l'étiologie de la MP

V. Conclusion et perspectives : Etudes possibles chez l'Homme

Les travaux réalisés durant cette thèse nous ont permis de mieux appréhender l'implication de la vitamine A dans l'intégrité de la voie nigro-striée chez le rat adulte et d'initier la caractérisation des mécanismes sous-jacents. Ces études mettent en évidence l'importance d'un apport alimentaire en vitamine A suffisant pour maintenir l'homéostasie du métabolisme hépatique de la vitamine A et la signalisation striatale des rétinoïdes, via les récepteurs RAR β et RXR γ , à l'âge adulte. Les travaux de cette thèse ont également permis de caractériser un modèle de sub-carence en vitamine A à l'âge adulte chez le rat en s'affranchissant de l'impact développemental d'une altération de la signalisation des rétinoïdes sur le système dopaminergique et le comportement moteur. Les résultats de ces travaux suggèrent une sensibilité différentielle du système dopaminergique nigro-strié de rat vis-à-vis d'une altération de la signalisation des rétinoïdes entre la période développementale et l'âge adulte, ce qui n'était pas clairement établi dans la littérature jusqu'à présent. A l'inverse, la signalisation des rétinoïdes semble nécessaire au maintien de l'intégrité du système cholinergique et de l'expression de MOR1 tout au long de la vie. De par l'implication de l'ACh et de MOR1 dans la neuromodulation effective du striatum, le maintien de la signalisation des rétinoïdes serait donc nécessaire à la fonctionnalité de la voie nigro-striée à l'âge adulte de manière indirecte (Crittenden and Graybiel, 2011b; Ztaou and Amalric, 2019). Ces données obtenues chez l'animal renforcent les résultats obtenus dans les études cliniques montrant qu'une altération de la signalisation des rétinoïdes pourrait contribuer au développement de la MP (Kim et al., 2017b; Yang et al., 2017). De plus la présence de différents facteurs environnementaux, métaboliques et génétiques contribue à une variabilité interindividuelle de l'affaiblissement de la voie de signalisation des rétinoïdes au cours du vieillissement ; certains de ces facteurs étant communs aux facteurs de risque de développer la MP (Borel and Desmarchelier, 2017; Clugston and Blamer, 2012; Kocelak et al., 2018; Tanumihardjo et al., 2016).

Sur la base de ces résultats, il serait désormais intéressant de développer des études chez l'Homme permettant d'étudier le métabolisme de la vitamine A et la signalisation des rétinoïdes dans le contexte de la MP. Une première étude épidémiologique pourrait être réalisée en utilisant les données obtenues dans le cadre du projet Parkinson's Progression Markers initiative (PPMI), initié par la fondation Michael J. Fox pour le développement de biomarqueurs prédictifs de la MP. Cette étude clinique longitudinale inclut des patients sains, et à différents stades de la MP. La banque de données cliniques obtenues pourrait être utilisée pour étudier la transcriptomique des gènes impliqués dans le métabolisme de la vitamine A chez les patients parkinsoniens et identifier des biomarqueurs prédictifs d'une altération de la

signalisation des rétinoïdes chez ces patients. L'objectif serait de mettre en place une médecine personnalisée avec une supplémentation nutritionnelle en vitamine A chez les patients présentant un profil transcriptomique à risque. Une deuxième étude réalisée sur des cerveaux post-mortem de patients sains ou parkinsoniens permettrait d'étudier plus en détails l'état de la signalisation des rétinoïdes, par hybridation *in situ*, chez ces patients. Par ailleurs, les travaux de cette thèse soutiennent également la nécessité de développer des biomarqueurs plus sensibles pour évaluer le statut en vitamine A chez l'Homme, comme la mesure des esters de rétinol plasmatique (Olsen et al., 2018), ou un profil plus complet de la biodisponibilité de la vitamine A par la mesure de plusieurs transcrits dans le sang. En conclusion ce travail pourrait amener à reconsidérer à la hausse les besoins en vitamine A des personnes de 50 ans et plus, et soutenir l'intérêt d'une approche nutritionnelle impliquant la vitamine A dans la prévention de la MP.

RÉFÉRENCES

A

- Agence nationale de sécurité sanitaire de l'alimentation, de l'environnement et du travail (2019). Vitamine A & caroténoïdes provitaminiques | Anses.
- Agence nationale de sécurité sanitaire de l'alimentation, de l'environnement et du travail (ANSES) (2005). Les références nutritionnelles en vitamines et minéraux | Anses.
- Al Tanoury, Z., Piskunov, A., and Rochette-Egly, C. (2013). Vitamin A and retinoid signaling: genomic and nongenomic effects. *J. Lipid Res.* *54*, 1761–1775.
- Alapatt, P., Guo, F., Komanetsky, S.M., Wang, S., Cai, J., Sargsyan, A., Rodríguez Díaz, E., Bacon, B.T., Aryal, P., and Graham, T.E. (2013). Liver Retinol Transporter and Receptor for Serum Retinol-binding Protein (RBP4). *J. Biol. Chem.* *288*, 1250–1265.
- Alberio, T., Bucci, E.M., Natale, M., Bonino, D., Di Giovanni, M., Bottacchi, E., and Fasano, M. (2013). Parkinson's disease plasma biomarkers: An automated literature analysis followed by experimental validation. *J. Proteomics* *90*, 107–114.
- Allen, L.H., and Haskell, M. (2002). Estimating the Potential for Vitamin A Toxicity in Women and Young Children. *J. Nutr.* *132*, 2907S-2919S.
- Altucci, L., Leibowitz, M.D., Ogilvie, K.M., de Lera, A.R., and Gronemeyer, H. (2007). RAR and RXR modulation in cancer and metabolic disease. *Nat. Rev. Drug Discov.* *6*, 793–810.
- Alvarez, M., Evidente, V.G., and Driver-Dunckley, E. (2007). Differentiating Parkinson's Disease from Other Parkinsonian Disorders. *Semin. Neurol.* *27*, 356–362.
- Anderson, C., Checkoway, H., Franklin, G.M., Beresford, S., Smith-Weller, T., and Swanson, P.D. (1999). Dietary factors in Parkinson's disease: The role of food groups and specific foods. *Mov. Disord.* *14*, 7.
- Anderson, D.W., Schray, R.C., Duester, G., and Schneider, J.S. (2011). Functional significance of aldehyde dehydrogenase ALDH1A1 to the nigrostriatal dopamine system. *Brain Res.* *1408*, 81–87.

- Arfaoui, A., Nasri, I., Boulbaroud, S., Ouichou, A., and 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, M.V.T., 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. Anat. Anz. Off. Organ Anat. Ges.* *195*, 111–121.
- Argüelles, S., Venero, J.L., García-Rodríguez, S., Tomas-Camardiel, M., Ayala, A., Cano, J., and Machado, A. (2010). Use of haptoglobin and transthyretin as potential biomarkers for the preclinical diagnosis of Parkinson's disease. *Neurochem. Int.* *57*, 227–234.
- Armstrong, M.J., and Okun, M.S. (2020). Diagnosis and Treatment of Parkinson Disease: A Review. *JAMA* *323*, 548.
- Arnold, S.L.M., Kent, T., Hogarth, C.A., Griswold, M.D., Amory, J.K., and Isoherranen, N. (2015). Pharmacological inhibition of ALDH1A in mice decreases all-trans retinoic acid concentrations in a tissue specific manner. *Biochem. Pharmacol.* *95*, 177–192.
- Arotcarena, M.-L., Dovero, S., Prigent, A., Bourdenx, M., Camus, S., Porras, G., Thiolat, M.-L., Tasselli, M., Aubert, P., Kruse, N., et al. (2020). Bidirectional gut-to-brain and brain-to-gut propagation of synucleinopathy in non-human primates. *Brain* *143*, 1462–1475.
- Ascherio, A., and Schwarzschild, M.A. (2016). The epidemiology of Parkinson's disease: risk factors and prevention. *Lancet Neurol.* *15*, 1257–1272.
- Asson-Batres, M.A., and Rochette-Egly, C. (2016). *The Biochemistry of Retinoid Signaling II: The Physiology of Vitamin A - Uptake, Transport, Metabolism and Signaling* (Dordrecht: Springer Netherlands).

B

-
- Bailey, R.L., Pac, S.G., Fulgoni, V.L., Reidy, K.C., and Catalano, P.M. (2019). Estimation of Total Usual Dietary Intakes of Pregnant Women in the United States. *JAMA Netw. Open* *2*, e195967.
- Baumann, L., Vujevich, J., Halem, M., Martin, L.K., Kerdel, F., Lazarus, M., Pacheco, H., Black, L., and Bryde, J. (2005). Open-label pilot study of alitretinoin gel 0.1% in the treatment of photoaging. *Cutis* *76*, 69–73.

- Beltrán-de-Miguel, B., Estévez-Santiago, R., and Olmedilla-Alonso, B. (2015). Assessment of dietary vitamin A intake (retinol, α -carotene, β -carotene, β -cryptoxanthin) and its sources in the National Survey of Dietary Intake in Spain (2009–2010). *Int. J. Food Sci. Nutr.* *66*, 706–712.
- Berrard, S., Faucon Biguet, N., Houhou, L., Lamouroux, A., and Mallet, J. (1993). Retinoic acid induces cholinergic differentiation of cultured newborn rat sympathetic neurons. *J. Neurosci. Res.* *35*, 382–389.
- Berse, B., and Blusztajn, J.K. (1995). Coordinated up-regulation of choline acetyltransferase and vesicular acetylcholine transporter gene expression by the retinoic acid receptor alpha, cAMP, and leukemia inhibitory factor/ciliary neurotrophic factor signaling pathways in a murine septal cell line. *J. Biol. Chem.* *270*, 22101–22104.
- Bezard, E., Li, Q., Hulme, H., Fridjonsdottir, E., Nilsson, A., Pioli, E., Andren, P.E., and Crossman, A.R. (2020). μ Opioid Receptor Agonism for L-DOPA-Induced Dyskinesia in Parkinson's Disease. *J. Neurosci.* *40*, 6812–6819.
- Billingsley, K.J., Bandres-Ciga, S., Saez-Atienzar, S., and Singleton, A.B. (2018). Genetic risk factors in Parkinson's disease. *Cell Tissue Res.* *373*, 9–20.
- Blandini, F., Armentero, M.-T., and Martignoni, E. (2008). The 6-hydroxydopamine model: News from the past. *Parkinsonism Relat. Disord.* *14*, S124–S129.
- Blaner, W.S. (2019). Vitamin A signaling and homeostasis in obesity, diabetes, and metabolic disorders. *Pharmacol. Ther.* *197*, 153–178.
- Blesa, J., and Przedborski, S. (2014). Parkinson's disease: animal models and dopaminergic cell vulnerability. *Front. Neuroanat.* *8*, 155.
- Blomhoff, R., and Blomhoff, H.K. (2006). Overview of retinoid metabolism and function. *J. Neurobiol.* *66*, 606–630.
- Bonhomme, D., Pallet, V., Dominguez, G., Servant, L., Henkous, N., Lafenêtre, P., Higuieret, P., Béracocheá, D., and Touyarot, K. (2014a). Retinoic acid modulates intrahippocampal levels of corticosterone in middle-aged mice: consequences on hippocampal plasticity and contextual memory. *Front. Aging Neurosci.* *6*, 6.
- Bonhomme, D., Minni, A.M., Alfos, S., Roux, P., Richard, E., Higuieret, P., Moisan, M.-P., Pallet, V., and Touyarot, K. (2014b). Vitamin A status regulates glucocorticoid

- availability in Wistar rats: consequences on cognitive functions and hippocampal neurogenesis? *Front. Behav. Neurosci.* *8*.
- Bonhomme, D., Alfons, S., Webster, S.P., Wolff, M., Pallet, V., and Touyarot, K. (2019). Vitamin A deficiency impairs contextual fear memory in rats: Abnormalities in the glucocorticoid pathway. *J. Neuroendocrinol.* *31*.
- Bonnet, E., Touyarot, K., Alfons, 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.
- Borel, P., and Desmarchelier, C. (2017). Genetic Variations Associated with Vitamin A Status and Vitamin A Bioavailability. *Nutrients* *9*, 246.
- Borel, P., Desmarchelier, C., Nowicki, M., and Bott, R. (2015). A Combination of Single-Nucleotide Polymorphisms Is Associated with Interindividual Variability in Dietary β -Carotene Bioavailability in Healthy Men. *J. Nutr.* *145*, 1740–1747.
- Bose, A., and Beal, M.F. (2016). Mitochondrial dysfunction in Parkinson's disease. *J. Neurochem.* *139*, 216–231.
- Boulos, C., Yaghi, N., El Hayeck, R., Heraoui, G.N., and Fakhoury-Sayegh, N. (2019). Nutritional Risk Factors, Microbiota and Parkinson's Disease: What Is the Current Evidence? *Nutrients* *11*, 1896.
- Bourdenx, M., Dehay, B., and Bezard, E. (2015a). Modélisation expérimentale de l'agrégation et de la propagation de l' α -synucléine dans les synucléinopathies. *Bull. Académie Natl. Médecine* *199*, 797–808.
- Bourdenx, M., Dovero, S., Engeln, M., Bido, S., Bastide, M.F., Dutheil, N., Vollenweider, I., Baud, L., Piron, C., Grouthier, V., et al. (2015b). Lack of additive role of ageing in nigrostriatal neurodegeneration triggered by α -synuclein overexpression. *Acta Neuropathol. Commun.* *3*, 46.
- Braak, H., Del Tredici, K., Rüb, U., de Vos, R.A.I., Jansen Steur, E.N.H., and Braak, E. (2003). Staging of brain pathology related to sporadic Parkinson's disease. *Neurobiol. Aging* *24*, 197–211.
- Brimblecombe, K.R., and Cragg, S.J. (2017). The Striosome and Matrix Compartments of the Striatum: A Path through the Labyrinth from Neurochemistry toward Function. *ACS Chem. Neurosci.* *8*, 235–242.

- Brtko, J., Rock, E., Nezbedova, P., Krizanova, O., Dvorcakova, M., Minet-Quinard, R., Farges, M.-C., Ribalta, J., Winklhofer-Roob, B.M., and Vasson, M.-P. (2007). Age-related change in the retinoid X receptor beta gene expression in peripheral blood mononuclear cells of healthy volunteers: Effect of 13-cis retinoic acid supplementation. *Mech. Ageing Dev.* *128*, 594–600.
- Burke, W.J., Kumar, V.B., Pandey, N., Panneton, W.M., Gan, Q., Franko, M.W., O'Dell, M., Li, S.W., Pan, Y., Chung, H.D., et al. (2008). Aggregation of alpha-synuclein by DOPAL, the monoamine oxidase metabolite of dopamine. *Acta Neuropathol. (Berl.)* *115*, 193–203.
- Burré, J., Sharma, M., and Südhof, T.C. (2018). Cell Biology and Pathophysiology of α -Synuclein. *Cold Spring Harb. Perspect. Med.* *8*, a024091.
- Bushue, N., and Wan, Y.-J.Y. (2010). Retinoid pathway and cancer therapeutics. *Adv. Drug Deliv. Rev.* *62*, 1285–1298.

C

- Cacabelos, R. (2017). Parkinson's Disease: From Pathogenesis to Pharmacogenomics. *Int. J. Mol. Sci.* *18*, E551.
- Cai, H., Liu, G., Sun, L., and Ding, J. (2014). Aldehyde Dehydrogenase 1 making molecular inroads into the differential vulnerability of nigrostriatal dopaminergic neuron subtypes in Parkinson's disease. *Transl. Neurodegener.* *3*, 27.
- Calabresi, P. (2014). Direct and indirect pathways of basal ganglia: a critical reappraisal. *Nat. Neurosci.* *17*, 9.
- Carazo, A., Macáková, K., Matoušová, K., Krčmová, L.K., Protti, M., and Mladěnka, P. (2021). Vitamin A Update: Forms, Sources, Kinetics, Detection, Function, Deficiency, Therapeutic Use and Toxicity. *Nutrients* *13*, 1703.
- Carlsson, T., Bjorklund, T., and Kirik, D. (2007). Restoration of the Striatal Dopamine Synthesis for Parkinsons Disease:Viral Vector-Mediated Enzyme Replacement Strategy. *Curr. Gene Ther.* *7*, 109–120.
- Carmichael, K., Evans, R.C., Lopez, E., Sun, L., Kumar, M., Ding, J., Khaliq, Z.M., and Cai, H. (2021). Function and Regulation of ALDH1A1-Positive Nigrostriatal Dopaminergic Neurons in Motor Control and Parkinson's Disease. *Front. Neural Circuits* *15*, 644776.

- Carta, M., Stancampiano, R., Tronci, E., Collu, M., Usiello, A., Morelli, M., and Fadda, F. (2006). Vitamin A deficiency induces motor impairments and striatal cholinergic dysfunction in rats. *Neuroscience* 139, 1163–1172.
- Carter, R., Morton, J., and Dunnet, S. (2001). Motor coordination and balance in rodents. *Curr Protoc Neurosci.* 2001 Aug;Chapter 8:Unit 8.12. doi: 10.1002/0471142301.ns0812s15. PMID: 18428540. p.
- Casida, J.E., Ford, B., Jinsmaa, Y., Sullivan, P., Cooney, A., and Goldstein, D.S. (2014). Benomyl, Aldehyde Dehydrogenase, DOPAL, and the Catecholaldehyde Hypothesis for the Pathogenesis of Parkinson's Disease. *Chem. Res. Toxicol.* 27, 1359–1361.
- Cerri, S., Mus, L., and Blandini, F. (2019). Parkinson's Disease in Women and Men: What's the Difference? *J. Park. Dis.* 9, 501–515.
- Cervini, R., Berrard, S., Bejanin, S., and Mallet, J. (1994). Regulation by CDF/LIF and retinoic acid of multiple ChAT mRNAs produced from distinct promoters. *Neuroreport* 5, 1346–1348.
- Chakrabarti, M., McDonald, A.J., Will Reed, J., Moss, M.A., Das, B.C., and Ray, S.K. (2016). Molecular Signaling Mechanisms of Natural and Synthetic Retinoids for Inhibition of Pathogenesis in Alzheimer's Disease. *J. Alzheimers Dis. JAD* 50, 335–352.
- Charles, V., Boulvin, S., Haven, F., and Gille, M. (2006). [Wernicke's encephalopathy associated with chronic disulfiram intoxication]. *Rev. Neurol. (Paris)* 162, 1252–1256.
- Chastan, N., Do, M.C., Bonneville, F., Torny, F., Bloch, F., Westby, G.W.M., Dormont, D., Agid, Y., and Welter, M.-L. (2009). Gait and balance disorders in Parkinson's disease: impaired active braking of the fall of centre of gravity. *Mov. Disord. Off. J. Mov. Disord. Soc.* 24, 188–195.
- Chaudhuri, K.R., and Martinez-Martin, P. (2008). Quantitation of non-motor symptoms in Parkinson's disease. *Eur. J. Neurol.* 15, 2–8.
- Chen, L., Lau, A.G., and Sarti, F. (2014). Synaptic retinoic acid signaling and homeostatic synaptic plasticity. *Neuropharmacology* 78, 3–12.
- Chen, Y.-C., Chen, R.-S., Weng, Y.-H., Huang, Y.-Z., Chen, C.C., Hung, J., and Lin, Y.-Y. (2021). The severity progression of non-motor symptoms in Parkinson's disease: a 6-year longitudinal study in Taiwanese patients. *Sci. Rep.* 11, 14781.

- Chen, Z.P., Shemshedini, L., Durand, B., Noy, N., Chambon, P., and Gronemeyer, H. (1994). Pure and functionally homogeneous recombinant retinoid X receptor. *J. Biol. Chem.* *269*, 25770–25776.
- Chiang, M.Y., Misner, D., Kempermann, G., Schikorski, T., Giguère, V., Sucov, H.M., Gage, F.H., Stevens, C.F., and Evans, R.M. (1998). An essential role for retinoid receptors RARbeta and RXRgamma in long-term potentiation and depression. *Neuron* *21*, 1353–1361.
- chunlei Liu, Fang, J., and Liu, W. (2019). Superoxide dismutase coding of gene polymorphisms associated with susceptibility to Parkinson’s disease. *J. Integr. Neurosci.* *18*, 299.
- Clagett-Dame, M., and Knutson, D. (2011). Vitamin A in Reproduction and Development. *Nutrients* *3*, 385–428.
- Clugston, R.D., and Blaner, W.S. (2012). The Adverse Effects of Alcohol on Vitamin A Metabolism. *Nutrients* *4*, 356–371.
- Cocco, S., Diaz, G., Stancampiano, R., Diana, A., Carta, M., Curreli, R., Sarais, L., and Fadda, F. (2002). Vitamin A deficiency produces spatial learning and memory impairment in rats. *Neuroscience* *115*, 475–482.
- Collier, T.J., Kanaan, N.M., and Kordower, J.H. (2017). Aging and Parkinson’s disease: Different sides of the same coin?: Aging and PD. *Mov. Disord.* *32*, 983–990.
- Connolly, B.S., and Lang, A.E. (2014). Pharmacological Treatment of Parkinson Disease: A Review. *JAMA* *311*, 1670.
- Corcoran, J.P.T., So, P.L., and 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.
- Cordain, L., Eaton, S.B., Sebastian, A., Mann, N., Lindeberg, S., Watkins, B.A., O’Keefe, J.H., and Brand-Miller, J. (2005). Origins and evolution of the Western diet: health implications for the 21st century. *Am. J. Clin. Nutr.* *81*, 341–354.
- Crittenden, J.R., and Graybiel, A.M. (2011a). Basal Ganglia Disorders Associated with Imbalances in the Striatal Striosome and Matrix Compartments. *Front. Neuroanat.* *5*.
- Crittenden, J.R., and Graybiel, A.M. (2011b). Basal Ganglia Disorders Associated with Imbalances in the Striatal Striosome and Matrix Compartments. *Front. Neuroanat.* *5*.

Crittenden, J.R., Tillberg, P.W., Riad, M.H., Shima, Y., Gerfen, C.R., Curry, J., Housman, D.E., Nelson, S.B., Boyden, E.S., and Graybiel, A.M. (2016). Striosome–dendron bouquets highlight a unique striatonigral circuit targeting dopamine-containing neurons. *Proc. Natl. Acad. Sci.* *113*, 11318–11323.

Crittenden, J.R., Lacey, C.J., Weng, F.-J., Garrison, C.E., Gibson, D.J., Lin, Y., and Graybiel, A.M. (2017). Striatal Cholinergic Interneurons Modulate Spike-Timing in Striosomes and Matrix by an Amphetamine-Sensitive Mechanism. *Front. Neuroanat.* *11*.

D

D'Ambrosio, D.N., Clugston, R.D., and Blaner, W.S. (2011). Vitamin A Metabolism: An Update. *Nutrients* *3*, 63–103.

Damier, P., Hirsch, E.C., Agid, Y., and Graybiel, A.M. (1999). The substantia nigra of the human brain. II. Patterns of loss of dopamine-containing neurons in Parkinson's disease. *Brain J. Neurol.* *122 (Pt 8)*, 1437–1448.

Das, B.C., Thapa, P., Karki, R., Das, S., Mahapatra, S., Liu, T.-C., Torregroza, I., Wallace, D.P., Kambhampati, S., Van Veldhuizen, P., et al. (2014). Retinoic acid signaling pathways in development and diseases. *Bioorg. Med. Chem.* *22*, 673–683.

Davidi, D., Schechter, M., Elhadi, S.A., Matatov, A., Nathanson, L., and Sharon, R. (2020). α -Synuclein Translocates to the Nucleus to Activate Retinoic-Acid-Dependent Gene Transcription. *IScience* *23*, 100910.

Dawson, H.D., Li, N.-Q., DeCicco, K.L., Nibert, J.A., and Ross, A.C. (1999). Chronic Marginal Vitamin A Status Reduces Natural Killer Cell Number and Function in Aging Lewis Rats. *J. Nutr.* *129*, 1510–1517.

Dawson, H.D., Yamamoto, Y., Zolfaghari, R., Rosales, F.J., Dietz, J., Shimada, T., Li, N., and Ross, A.C. (2000). Regulation of Hepatic Vitamin A Storage in a Rat Model of Controlled Vitamin A Status during Aging. *J. Nutr.* *130*, 1280–1286.

Dehay, B., and Fernagut, P.-O. (2016). Alpha-synuclein-based models of Parkinson's disease. *Rev. Neurol. (Paris)* *172*, 371–378.

Delamarre, A., and Meissner, W.G. (2017). Epidemiology, environmental risk factors and genetics of Parkinson's disease. *Presse Médicale* *46*, 175–181.

- Desport, J.-C., Jésus, P., Fayemendy, P., Torny, F., Couratier, P., Sourisseau, H., and Bonhommo, S. (2017). Prise en charge de la dénutrition et de l'excès de poids. *20*, 6.
- Deutch, A.Y., Colbran, R.J., and Winder, D.J. (2007). Striatal plasticity and medium spiny neuron dendritic remodeling in parkinsonism. *Parkinsonism Relat. Disord.* *13*, S251–S258.
- Dias, V., Junn, E., and Mouradian, M.M. (2013). The Role of Oxidative Stress in Parkinson's Disease. *J. Park. Dis.* *3*, 461–491.
- Diebler, M.F., Tomasi, M., Meunier, F.M., Israël, M., and Dolezal, V. (1998). Influence of retinoic acid and of cyclic AMP on the expression of choline acetyltransferase and of vesicular acetylcholine transporter in NG108-15 cells. *J. Physiol. Paris* *92*, 379–384.
- Dong, J., Li, S., Mo, J.-L., Cai, H.-B., and Le, W.-D. (2016). Nurr1-Based Therapies for Parkinson's Disease. *CNS Neurosci. Ther.* *22*, 351–359.
- Dudman, J.T., and Krakauer, J.W. (2016). The basal ganglia: from motor commands to the control of vigor. *Curr. Opin. Neurobiol.* *37*, 158–166.
- Duester, G. (2008). Retinoic Acid Synthesis and Signaling during Early Organogenesis. *Cell* *134*, 921–931.
- Dumetz, F., Ginieis, R., Bure, C., Marie, A., Alfos, S., Pallet, V., and Bosch-Bouju, C. (2020a). Neuronal morphology and synaptic plasticity in the hippocampus of vitamin A deficient rats. *Nutr. Neurosci.* 1–12.
- Dumetz, F., Buré, C., Alfos, S., Bonneu, M., Richard, E., Touyarot, K., Marie, A., Schmitter, J.-M., Bosch-Bouju, C., and Pallet, V. (2020b). Normalization of hippocampal retinoic acid level corrects age-related memory deficits in rats. *Neurobiol. Aging*.
- Dumetz, F., Buré, C., Alfos, S., Bonneu, M., Richard, E., Touyarot, K., Marie, A., Schmitter, J.-M., Bosch-Bouju, C., and Pallet, V. (2020c). Normalization of hippocampal retinoic acid level corrects age-related memory deficits in rats. *Neurobiol. Aging* *85*, 1–10.
- Durieux, P.F., Schiffmann, S.N., and de Kerchove d'Exaerde, A. (2012). Differential regulation of motor control and response to dopaminergic drugs by D1R and D2R neurons in distinct dorsal striatum subregions: Dorsal striatum D1R- and D2R-neuron motor functions. *EMBO J.* *31*, 640–653.

Dyall, S.C. (2015). Long-chain omega-3 fatty acids and the brain: a review of the independent and shared effects of EPA, DPA and DHA. *Front. Aging Neurosci.* 7.

Dziechciaż, M., and Filip, R. (2014). Biological psychological and social determinants of old age: Bio-psycho-social aspects of human aging. *Ann. Agric. Environ. Med.* 21, 4.

E

Elizondo, G., Corchero, J., Sterneck, E., and Gonzalez, F.J. (2000). Feedback Inhibition of the Retinaldehyde Dehydrogenase Gene *ALDH1* by Retinoic Acid through Retinoic Acid Receptor α and CCAAT/Enhancer-binding Protein β . *J. Biol. Chem.* 275, 39747–39753.

Enderlin, V., Pallet, V., Alfos, S., Dargelos, E., Jaffard, R., Garcin, H., and Higuieret, P. (1997a). Age-related decreases in mRNA for brain nuclear receptors and target genes are reversed by retinoic acid treatment. *Neurosci. Lett.* 229, 125–129.

Enderlin, V., Alfos, S., Pallet, V., Garcin, H., Azaïs-Braesco, V., Jaffard, R., and Higuieret, P. (1997b). Aging decreases the abundance of retinoic acid (RAR) and triiodothyronine (TR) nuclear receptor mRNA in rat brain: effect of the administration of retinoids. *FEBS Lett.* 412, 629–632.

Enderlin, V., Higuieret, D., Alfos, S., Husson, M., Jaffard, R., Higuieret, P., and Pallet, V. (2000). Vitamin A Deficiency Decreases the Expression of RAR β and RXR β/γ in Adult Mouse Brain: Effect of RA Administration. *Nutr. Neurosci.* 3, 173–181.

Ericsson, J., Stephenson-Jones, M., Pérez-Fernández, J., Robertson, B., Silberberg, G., and Grillner, S. (2013). Dopamine differentially modulates the excitability of striatal neurons of the direct and indirect pathways in lamprey. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 33, 8045–8054.

Erro, R., Brigo, F., Tamburin, S., Zamboni, M., Antonini, A., and Tinazzi, M. (2018). Nutritional habits, risk, and progression of Parkinson disease. *J. Neurol.* 265, 12–23.

Esteves, M., Cristóvão, A.C., Saraiva, T., Rocha, S.M., Baltazar, G., Ferreira, L., and Bernardino, L. (2015). Retinoic acid-loaded polymeric nanoparticles induce neuroprotection in a mouse model for Parkinson's disease. *Front. Aging Neurosci.* 7, 20.

Etchamendy, N., Enderlin, V., Marighetto, A., Vouimba, R.M., Pallet, V., Jaffard, R., and Higuieret, P. (2001). Alleviation of a selective age-related relational memory deficit in

mice by pharmacologically induced normalization of brain retinoid signaling. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* *21*, 6423–6429.

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.

Exley, R., and Cragg, S.J. (2008). Presynaptic nicotinic receptors: a dynamic and diverse cholinergic filter of striatal dopamine neurotransmission: Presynaptic nAChRs filter dopamine release. *Br. J. Pharmacol.* *153*, S283–S297.

F

Fahn, S. (1989). The history of parkinsonism. *Mov. Disord.* *4*, S2–S10.

Fan, H.-H., Guo, Q., Zheng, J., Lian, Y.-Z., Huang, S.-S., Sun, Y., Zou, M., Zhu, J.-H., and Zhang, X. (2021). ALDH1A1 Genetic Variations May Modulate Risk of Parkinson's Disease in Han Chinese Population. *Front. Neurosci.* *15*, 620929.

Favier, M., Carcenac, C., Drui, G., Vachez, Y., Boulet, S., Savasta, M., and Carnicella, S. (2017). Implication of dorsostriatal D3 receptors in motivational processes: a potential target for neuropsychiatric symptoms in Parkinson's disease. *Sci. Rep.* *7*, 41589.

Fearnley, J.M., and Lees, A.J. (1991). Ageing and Parkinson's disease: substantia nigra regional selectivity. *Brain J. Neurol.* *114* (Pt 5), 2283–2301.

Feart, C., Pallet, V., Boucheron, C., Higuieret, D., Alfos, S., Letenneur, L., Dartigues, J.F., and Higuieret, P. (2005). Aging affects the retinoic acid and the triiodothyronine nuclear receptor mRNA expression in human peripheral blood mononuclear cells. *Eur. J. Endocrinol.* *152*, 449–458.

Feigin, V.L., Nichols, E., Alam, T., Bannick, M.S., Beghi, E., Blake, N., Culpepper, W.J., Dorsey, E.R., Elbaz, A., Ellenbogen, R.G., et al. (2019). Global, regional, and national burden of neurological disorders, 1990–2016: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2016. *Lancet Neurol.* *18*, 459–480.

Ferreira, R., Napoli, J., Enver, T., Bernardino, L., and Ferreira, L. (2020). Advances and challenges in retinoid delivery systems in regenerative and therapeutic medicine. *Nat. Commun.* *11*, 4265.

- Fitzmaurice, A.G., Rhodes, S.L., Lulla, A., Murphy, N.P., Lam, H.A., O'Donnell, K.C., Barnhill, L., Casida, J.E., Cockburn, M., Sagasti, A., et al. (2013). Aldehyde dehydrogenase inhibition as a pathogenic mechanism in Parkinson disease. *Proc. Natl. Acad. Sci.* *110*, 636–641.
- Fitzmaurice, A.G., Rhodes, S.L., Cockburn, M., Ritz, B., and Bronstein, J.M. (2014). Aldehyde dehydrogenase variation enhances effect of pesticides associated with Parkinson disease. *Neurology* *82*, 419–426.
- Fleming, S. (2004). Behavioral and immunohistochemical effects of chronic intravenous and subcutaneous infusions of varying doses of rotenone. *Exp. Neurol.* *187*, 418–429.
- Foy, C.J. (1999). Plasma chain-breaking antioxidants in Alzheimer's disease, vascular dementia and Parkinson's disease. *QJM* *92*, 39–45.
- Friling, S., Bergsland, M., and Kjellander, S. (2009). Activation of Retinoid X Receptor increases dopamine cell survival in models for Parkinson's disease. *BMC Neurosci.* *10*, 146.
- Fuchs, J., Mueller, J.C., Lichtner, P., Schulte, C., Munz, M., Berg, D., Wüllner, U., Illig, T., Sharma, M., and Gasser, T. (2009). The transcription factor PITX3 is associated with sporadic Parkinson's disease. *Neurobiol. Aging* *30*, 731–738.
- Furlong, M., Tanner, C.M., Goldman, S.M., Bhudhikanok, G.S., Blair, A., Chade, A., Comyns, K., Hoppin, J.A., Kasten, M., Korell, M., et al. (2015). Protective glove use and hygiene habits modify the associations of specific pesticides with Parkinson's disease. *Environ. Int.* *75*, 144–150.

G

-
- Gaenslen, A., Swid, I., Liepelt-Scarfone, I., Godau, J., and Berg, D. (2011). The Patients' Perception of Prodromal Symptoms Before the Initial Diagnosis of Parkinson's Disease. *Mov. Disord.* *26*, 653–658.
- Galter, D., Buervenich, S., Carmine, A., Anvret, M., and Olson, L. (2003). ALDH1 mRNA: presence in human dopamine neurons and decreases in substantia nigra in Parkinson's disease and in the ventral tegmental area in schizophrenia. *Neurobiol. Dis.* *14*, 637–647.
- Gardner, E.M., Bernstein, E.D., Dorfman, M., Abrutyn, E., and Murasko, D.M. (1997). The age-associated decline in immune function of healthy individuals is not related to

- changes in plasma concentrations of beta-carotene, retinol, alpha-tocopherol or zinc. *Mech. Ageing Dev.* *94*, 55–69.
- Gerfen, C.R. (1992). Theneostriatalmosaic:multipleleve aof compartmental organization. *15*, 7.
- Ghosh, D., Mehra, S., Sahay, S., Singh, P.K., and Maji, S.K. (2017). α -synuclein aggregation and its modulation. *Int. J. Biol. Macromol.* *100*, 37–54.
- Goldman, S.M. (2014). Environmental Toxins and Parkinson's Disease. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* *54*, 141–164.
- Goldman, S.M., Kamel, F., Ross, G.W., Jewell, S.A., Bhudhikanok, G.S., Umbach, D., Marras, C., Hauser, R.A., Jankovic, J., Factor, S.A., et al. (2012). Head injury, alpha-synuclein Rep1, and Parkinson's disease. *Ann. Neurol.* *71*, 40–48.
- Goldstein, D.S. (2020). The catecholaldehyde hypothesis: where MAO fits in. *J. Neural Transm.* *127*, 169–177.
- Goldstein, D.S., Kopin, I.J., and Sharabi, Y. (2014). Catecholamine autotoxicity. Implications for pharmacology and therapeutics of Parkinson disease and related disorders. *Pharmacol. Ther.* *144*, 268–282.
- Gomes, C. de C., Passos, T.S., and Morais, A.H.A. (2021). Vitamin A Status Improvement in Obesity: Findings and Perspectives Using Encapsulation Techniques. *Nutrients* *13*, 1921.
- Gonera, E.G., van't Hof, M., Berger, H.J., van Weel, C., and Horstink, M.W. (1997). Symptoms and duration of the prodromal phase in Parkinson's disease. *Mov. Disord. Off. J. Mov. Disord. Soc.* *12*, 871–876.
- Gonnet, M., Lethuaut, L., and Boury, F. (2010). New trends in encapsulation of liposoluble vitamins. *J. Controlled Release* *146*, 276–290.
- Goodman, T., Crandall, J.E., Nanescu, S.E., Quadro, L., Shearer, K., Ross, A., and McCaffery, P. (2012). Patterning of retinoic acid signaling and cell proliferation in the hippocampus. *Hippocampus* *22*, 2171–2183.
- Gorell, J.M., Johnson, C.C., Rybicki, B.A., Peterson, E.L., Kortsha, G.X., Brown, G.G., and Richardson, R.J. (1999). Occupational exposure to manganese, copper, lead, iron, mercury and zinc and the risk of Parkinson's disease. *Neurotoxicology* *20*, 239–247.

- Granot, E., and Kohen, R. (2018). Oxidative stress in abetalipoproteinemia patients receiving long-term vitamin E and vitamin A supplementation. *1,2. 5.*
- Groenewegen, H.J. (2003). The Basal Ganglia and Motor Control. *Neural Plast. 10*, 107–120.
- Grünblatt, E. (2018). Differential Alterations in Metabolism and Proteolysis-Related Proteins in Human Parkinson's Disease Substantia Nigra. *Neurotox Res 9.*
- Grünblatt, E., Zehetmayer, S., Jacob, C.P., Müller, T., Jost, W.H., and Riederer, P. (2010). Pilot study: peripheral biomarkers for diagnosing sporadic Parkinson's disease. *J. Neural Transm. Vienna Austria 1996 117*, 1387–1393.

H

- Hafner, A.-S., Donlin-Asp, P.G., Leitch, B., Herzog, E., and Schuman, E.M. (2019). Local protein synthesis is a ubiquitous feature of neuronal pre- and postsynaptic compartments. *Science 364*, eaau3644.
- Han, X., Sun, S., Sun, Y., Song, Q., Zhu, J., Song, N., Chen, M., Sun, T., Xia, M., Ding, J., et al. (2019). Small molecule-driven NLRP3 inflammation inhibition via interplay between ubiquitination and autophagy: implications for Parkinson disease. *Autophagy 15*, 1860–1881.
- Harrison, E.H. (2005). Mechanisms of digestion and absorption of dietary vitamin A. *20.*
- Harrison, E.H. (2012). Mechanisms involved in the intestinal absorption of dietary vitamin A and provitamin A carotenoids. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Mol. Cell Biol. Lipids 1821*, 70–77.
- Hartmann, S., Brørs, O., Bock, J., Blomhoff, R., Bausch, J., Wiegand, U.-W., Hartmann, D., and Hornig, D.H. (2005). Exposure to Retinyl Esters, Retinol, and Retinoic Acids in Non-Pregnant Women following Increasing Single and Repeated Oral Doses of Vitamin A. *Ann. Nutr. Metab. 49*, 155–164.
- Hase, A., Jung, S.E., and aan het Rot, M. (2015). Behavioral and cognitive effects of tyrosine intake in healthy human adults. *Pharmacol. Biochem. Behav. 133*, 1–6.
- Hegarty, S.V., Sullivan, A.M., and O'Keefe, G.W. (2013). Midbrain dopaminergic neurons: a review of the molecular circuitry that regulates their development. *Dev. Biol. 379*, 123–138.

- Heyman, R.A., Mangelsdorf, D.J., Dyck, J.A., Stein, R.B., Eichele, G., Evans, R.M., and Thaller, C. (1992). 9-cis retinoic acid is a high affinity ligand for the retinoid X receptor. *Cell* 68, 397–406.
- Hjorth, J.J.J., Kozlov, A., Carannante, I., Frost Nylén, J., Lindroos, R., Johansson, Y., Tokarska, A., Dorst, M.C., Suryanarayana, S.M., Silberberg, G., et al. (2020). The microcircuits of striatum in silico. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 117, 9554–9565.
- Honarbaksh, M., Ericsson, A., Zhong, G., Isoherranen, N., Zhu, C., Bromberg, Y., Van Buiten, C., Malta, K., Joseph, L., Sampath, H., et al. (2021). Impact of vitamin A transport and storage on intestinal retinoid homeostasis and functions. *J. Lipid Res.* 62, 100046.
- Horsager, J., Andersen, K.B., Knudsen, K., Skjærbæk, C., Fedorova, T.D., Okkels, N., Schaeffer, E., Bonkat, S.K., Geday, J., Otto, M., et al. (2020). Brain-first versus body-first Parkinson’s disease: a multimodal imaging case-control study. *Brain* 143, 3077–3088.
- Huang, X., Zhang, H., Zhen, J., Dong, S., Guo, Y., Van Halm-Lutterodt, N., and Yuan, L. (2018a). Diminished circulating retinol and elevated α -TOH/retinol ratio predict an increased risk of cognitive decline in aging Chinese adults, especially in subjects with ApoE2 or ApoE4 genotype. *Aging* 10, 4066–4083.
- Huang, Z., Liu, Y., Qi, G., Brand, D., and Zheng, S. (2018b). Role of Vitamin A in the Immune System. *J. Clin. Med.* 7, 258.
- Huiming, Y., Chaomin, W., and Meng, M. (2005). Vitamin A for treating measles in children. In *Cochrane Database of Systematic Reviews*, The Cochrane Collaboration, ed. (Chichester, UK: John Wiley & Sons, Ltd), p. CD001479.pub2.
- Humphries, M.D., and Prescott, T.J. (2010). The ventral basal ganglia, a selection mechanism at the crossroads of space, strategy, and reward. *Prog. Neurobiol.* 90, 385–417.
- Hunger, L., Kumar, A., and Schmidt, R. (2019). Abundance compensates kinetics: Similar effect of dopamine signals on D1 and D2 receptor populations.
- Husson, M., Enderlin, V., Alfos, S., Féart, C., Higuieret, P., and 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., and Higuieret, P. (2004). Expression of neurogranin and neuromodulin is affected in the striatum of vitamin A-deprived rats. *Mol. Brain Res.* *123*, 7–17.

I

Iancu, R., Mohapel, P., Brundin, P., and Paul, G. (2005). Behavioral characterization of a unilateral 6-OHDA-lesion model of Parkinson's disease in mice. *Behav. Brain Res.* *162*, 1–10.

Iarkov, A., Barreto, G.E., Grizzell, J.A., and Echeverria, V. (2020). Strategies for the Treatment of Parkinson's Disease: Beyond Dopamine. *Front. Aging Neurosci.* *12*, 4.

Ijomone, O.M., Olaibi, O.K., Biose, I.J., Mba, C., Umoren, K.E., and Nwoha, P.U. (2014). Performance of motor associated behavioural tests following chronic nicotine administration. *Ann. Neurosci.* *21*.

Iskakova, M., Karbyshev, M., Piskunov, A., and Rochette-Egly, C. (2015). Nuclear and extranuclear effects of vitamin A. *Can. J. Physiol. Pharmacol.* *93*, 1065–1075.

Islam, Md.T. (2017). Oxidative stress and mitochondrial dysfunction-linked neurodegenerative disorders. *Neurol. Res.* *39*, 73–82.

J

Jacobs, D.G., Deutsch, N.L., and Brewer, M. (2001). Suicide, depression, and isotretinoin: Is there a causal link? *J. Am. Acad. Dermatol.* *45*, S168–S175.

Jacobs, F.M.J., Smits, S.M., Noorlander, C.W., von Oerthel, L., van der Linden, A.J.A., Burbach, J.P.H., and Smidt, M.P. (2007). Retinoic acid counteracts developmental defects in the substantia nigra caused by Pitx3 deficiency. *Dev. Camb. Engl.* *134*, 2673–2684.

Jacobs, S., Lie, D.C., DeCicco, K.L., Shi, Y., DeLuca, L.M., Gage, F.H., and Evans, R.M. (2006). Retinoic acid is required early during adult neurogenesis in the dentate gyrus. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *103*, 3902–3907.

Jafari, S., Etminan, M., Aminzadeh, F., and Samii, A. (2013). Head injury and risk of Parkinson disease: A systematic review and meta-analysis: Head Injury and Risk of Parkinson Disease. *Mov. Disord.* *28*, 1222–1229.

- Jankovic, J., Chen, S., and Le, W.D. (2005). The role of Nurr1 in the development of dopaminergic neurons and Parkinson's disease. *Prog. Neurobiol.* 77, 128–138.
- Jankowska, A., Blusztajn, J.K., and Szutowicz, A. (1997). Activities of enzymes of acetyl-CoA and acetylcholine metabolism in SN56 hybrid cholinergic cell line differentiated by dibutyryl cyclic AMP and all-trans retinoic acid. *Folia Neuropathol.* 35, 247–249.
- Jick, S.S., Kremers, H.M., and Vasilakis-Scaramozza, C. (2000). Isotretinoin Use and Risk of Depression, Psychotic Symptoms, Suicide, and Attempted Suicide. *Arch. Dermatol.* 136.
- Jiménez-Jiménez, F.J., Molina, J.A., Fernández-Calle, P., Vázquez, A., Cabrera-Valdivia, F., Catalán, M.J., García-Albea, E., Bermejo, F., and Codoceo, R. (1993). Serum levels of beta-carotene and other carotenoids in Parkinson's disease. *Neurosci. Lett.* 157, 103–106.
- Johnson, C. (1999). Adult nutrient intake as a risk factor for Parkinson's disease. *Int. J. Epidemiol.* 28, 1102–1109.
- Juárez Olguín, H., Calderón Guzmán, D., Hernández García, E., and Barragán Mejía, G. (2016). The Role of Dopamine and Its Dysfunction as a Consequence of Oxidative Stress. *Oxid. Med. Cell. Longev.* 2016, 1–13.
- Jurado-Coronel, J.C., Cabezas, R., Ávila Rodríguez, M.F., Echeverria, V., García-Segura, L.M., and Barreto, G.E. (2018). Sex differences in Parkinson's disease: Features on clinical symptoms, treatment outcome, sexual hormones and genetics. *Front. Neuroendocrinol.* 50, 18–30.

K

-
- Kane, M.A., Chen, N., Sparks, S., and Napoli, J.L. (2005). Quantification of endogenous retinoic acid in limited biological samples by LC/MS/MS. *Biochem. J.* 388, 363–369.
- Kane, M.A., Folias, A.E., Wang, C., and Napoli, J.L. (2010). Ethanol elevates physiological all-trans-retinoic acid levels in select loci through altering retinoid metabolism in multiple loci: a potential mechanism of ethanol toxicity. *FASEB J. Off. Publ. Fed. Am. Soc. Exp. Biol.* 24, 823–832.
- Kaneko, K., Hikida, T., Watanabe, D., Ichinose, H., Ichinose, T., Kreitman, Robert.J., Pastan, I., and Nakanishi, S. (2000). Synaptic integration mediated by striatal cholinergic interneurons in basal ganglia function. *Science* 289.

- Karachi, C., Grabli, D., Bernard, F.A., Tandé, D., Wattiez, N., Belaid, H., Bardinet, E., Prigent, A., Nothacker, H.-P., Hunot, S., et al. (2010). Cholinergic mesencephalic neurons are involved in gait and postural disorders in Parkinson disease. *J. Clin. Invest.* *120*, 2745–2754.
- Khan, S.S., Singer, B.D., and Vaughan, D.E. (2017). Molecular and physiological manifestations and measurement of aging in humans. *Aging Cell* *16*, 624–633.
- Kiebertz, K., and Wunderle, K.B. (2013). Parkinson's disease: Evidence for environmental risk factors: Evidence for Environmental Risk Factors. *Mov. Disord.* *28*, 8–13.
- Kim, C., and Alcalay, R. (2017). Genetic Forms of Parkinson's Disease. *Semin. Neurol.* *37*, 135–146.
- Kim, J.H., Hwang, J., Shim, E., Chung, E.-J., Jang, S.H., and Koh, S.-B. (2017a). Association of serum carotenoid, retinol, and tocopherol concentrations with the progression of Parkinson's Disease. *Nutr. Res. Pract.* *11*, 114.
- Kim, J.H., Hwang, J., Shim, E., Chung, E.-J., Jang, S.H., and Koh, S.-B. (2017b). Association of serum carotenoid, retinol, and tocopherol concentrations with the progression of Parkinson's Disease. *Nutr. Res. Pract.* *11*, 114.
- Kin, K., Yasuhara, T., Kameda, M., and Date, I. (2019). Animal Models for Parkinson's Disease Research: Trends in the 2000s. *Int. J. Mol. Sci.* *20*, E5402.
- Kirik, D., Rosenblad, C., and Björklund, A. (1998). Characterization of Behavioral and Neurodegenerative Changes Following Partial Lesions of the Nigrostriatal Dopamine System Induced by Intrastratial 6-Hydroxydopamine in the Rat. *Exp. Neurol.* *152*, 259–277.
- Kitaoka, K., Hattori, A., Chikahisa, S., Miyamoto, K., Nakaya, Y., and Sei, H. (2007). Vitamin A deficiency induces a decrease in EEG delta power during sleep in mice. *Brain Res.* *1150*, 121–130.
- Kitaoka, K., Shimizu, M., Shimizu, N., Chikahisa, S., Nakagomi, M., Shudo, K., Yoshizaki, K., and Sei, H. (2011). Retinoic acid receptor antagonist LE540 attenuates wakefulness via the dopamine D1 receptor in mice. *Brain Res.* *1423*, 10–16.
- Klein, A., and Dunnett, S.B. (2012). Analysis of skilled forelimb movement in rats: the single pellet reaching test and staircase test. *Curr. Protoc. Neurosci.* *Chapter 8*, Unit8.28.

- Kobayashi, M., Matsuoka, I., and Kurihara, K. (1994). Cholinergic differentiation of cultured sympathetic neurons induced by retinoic acid. Induction of choline acetyltransferase-mRNA and suppression of tyrosine hydroxylase-mRNA levels. *FEBS Lett.* *337*, 259–264.
- Koceleńak, P., Owczarek, A., Bożentowicz-Wikarek, M., Brzozowska, A., Mossakowska, M., Grodzicki, T., Więcek, A., Chudek, J., and Olszanecka-Glinianowicz, M. (2018). Plasma concentration of Retinol Binding Protein 4 (RBP4) in relation to nutritional status and kidney function in older population of PolSenior Study. *Adv. Med. Sci.* *63*, 323–328.
- Kordower, J.H., Olanow, C.W., Dodiya, H.B., Chu, Y., Beach, T.G., Adler, C.H., Halliday, G.M., and Bartus, R.T. (2013). Disease duration and the integrity of the nigrostriatal system in Parkinson’s disease. *Brain J. Neurol.* *136*, 2419–2431.
- Krezel, W., Ghyselinck, N., Samad, T.A., Dupé, V., Kastner, P., Borrelli, E., and Chambon, P. (1998). Impaired locomotion and dopamine signaling in retinoid receptor mutant mice. *Science* *279*, 863–867.
- Krezel, W., Kastner, P., and Chambon, P. (1999). Differential expression of retinoid receptors in the adult mouse central nervous system. *Neuroscience* *89*, 1291–1300.
- Kreżel, W., Rühl, R., and de Lera, A.R. (2019). Alternative retinoid X receptor (RXR) ligands. *Mol. Cell. Endocrinol.* *491*, 110436.
- Kunzler, A., Ribeiro, C.T., Gasparotto, J., Petiz, L.L., da Rosa Silva, H.T., da Silva, J.D., Bortolin, R., de Souza, P.O., Barreto, F., Espitia-Perez, P., et al. (2019). The effects of retinol oral supplementation in 6-hydroxydopamine dopaminergic denervation model in Wistar rats. *Neurochem. Int.* *125*, 25–34.
- Kurlandsky, S.B., Gamble, M.V., Ramakrishnan, R., and Blaner, W.S. (1995). Plasma delivery of retinoic acid to tissues in the rat. *J. Biol. Chem.* *270*, 17850–17857.

L

-
- Lajugie, D., Bertin, N., Chantelou, M., Vallier, N., Weill, A., Fender, P., and Allemand, H. (2005). Prévalence de la maladie de Parkinson et coût pour l’Assurance maladie en 2000 en France métropolitaine. *Rev Med Mal.* 2005362113-122 36.
- Lanciego, J.L., Luquin, N., and Obeso, J.A. (2012). Functional Neuroanatomy of the Basal Ganglia. *Cold Spring Harb. Perspect. Med.* *2*, a009621–a009621.

- Lane, M.A., and Bailey, S.J. (2005). Role of retinoid signalling in the adult brain. *Prog. Neurobiol.* *75*, 275–293.
- Lange, K.W., Wells, F.R., Jenner, P., and Marsden, C.D. (1993). Altered muscarinic and nicotinic receptor densities in cortical and subcortical brain regions in Parkinson's disease. *J. Neurochem.* *60*, 197–203.
- Lauritzen, I. (2000). Polyunsaturated fatty acids are potent neuroprotectors. *EMBO J.* *19*, 1784–1793.
- Le, W., Zhang, L., Xie, W., Li, S., and Dani, J.A. (2015). Pitx3 deficiency produces decreased dopamine signaling and induces motor deficits in Pitx3(−/−) mice. *Neurobiol. Aging* *36*, 3314–3320.
- Le Doze, F., Debruyne, D., Albessard, F., Barre, L., and Defer, G.L. (2000). Pharmacokinetics of all-trans retinoic acid, 13-cis retinoic acid, and fenretinide in plasma and brain of Rat. *Drug Metab. Dispos. Biol. Fate Chem.* *28*, 205–208.
- Lee, E.S., Yoo, J.S., Lim, J.S., Yadav, D., Cho, E.J., Choi, Y.S., Kim, H.M., and Chung, C.H. (2013). Differences in Adipokine and Hepatokine Levels among Non-diabetic Population Classified by Age and Sex. *3*, 6.
- Leiphon, L.J., and Picklo, M.J. (2007). Inhibition of aldehyde detoxification in CNS mitochondria by fungicides. *Neurotoxicology* *28*, 143–149.
- Leo, M.A., Kim, C.I., Lowe, N., and Lieber, C.S. (1989). Increased hepatic retinal dehydrogenase activity after phenobarbital and ethanol administration. *Biochem. Pharmacol.* *38*, 97–103.
- Li, T., and Le, W. (2020). Biomarkers for Parkinson's Disease: How Good Are They? *Neurosci. Bull.* *36*, 183–194.
- Li, J., Dani, J.A., and Le, W. (2009). The Role of Transcription Factor Pitx3 in Dopamine Neuron Development and Parkinson's Disease. *Curr. Top. Med. Chem.* *9*, 855–859.
- Li, S.-Y., Wang, Y.-L., Liu, W.-W., Lyu, D.-J., Wang, F., Mao, C.-J., Yang, Y.-P., Hu, L.-F., and Liu, C.-F. (2017). Long-term Levodopa Treatment Accelerates the Circadian Rhythm Dysfunction in a 6-hydroxydopamine Rat Model of Parkinson's Disease. *Chin. Med. J. (Engl.)* *130*, 1085–1092.

- Li, Y., Wongsiriroj, N., and Blaner, W.S. (2014a). The multifaceted nature of retinoid transport and metabolism. *HepatoBiliary Surg. Nutr.* 3, 14.
- Li, Y., Wongsiriroj, N., and Blaner, W.S. (2014b). The multifaceted nature of retinoid transport and metabolism. *Hepatobiliary Surg. Nutr.* 3, 126–139.
- Li, Y., Li, Y., Pang, S., Huang, W., Zhang, A., Hawley, R.G., and Yan, B. (2014c). Novel and functional ABCB1 gene variant in sporadic Parkinson's disease. *Neurosci. Lett.* 566, 61–66.
- Liao, W.-L., Tsai, H.-C., Wang, H.-F., Chang, J., Lu, K.-M., Wu, H.-L., Lee, Y.-C., Tsai, T.-F., Takahashi, H., Wagner, M., et al. (2008). Modular patterning of structure and function of the striatum by retinoid receptor signaling. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 105, 6765–6770.
- van Lieshout, M., West, C.E., and van Breemen, R.B. (2018). Isotopic tracer techniques for studying the bioavailability and bioefficacy of dietary carotenoids, particularly α -carotene, in humans: a review 1–3. 17.
- Linton, M., Farese, R., and Young, G. (1993). Familial hypobetalipoproteinemia. *J. Lipid Res.* 34, 21.
- Liu, G., Yu, J., Ding, J., Xie, C., Sun, L., Rudenko, I., Zheng, W., Sastry, N., Luo, J., Rudow, G., et al. (2014). Aldehyde dehydrogenase 1 defines and protects a nigrostriatal dopaminergic neuron subpopulation. *J. Clin. Invest.* 124, 3032–3046.
- Lobo, G.P., Hessel, S., Eichinger, A., Noy, N., Moise, A.R., Wyss, A., Palczewski, K., and Von Lintig, J. (2010). ISX is a retinoic acid-sensitive gatekeeper that controls intestinal β , β -carotene absorption and vitamin A production. *FASEB J.* 24, 1656–1666.
- van der Loo, B., Labugger, R., Aebischer, C.P., Bachschmid, M., Spitzer, V., Kilo, J., Altwegg, L., Ullrich, V., and Lüscher, T.F. (2004). Age-related changes of vitamin A status. *J. Cardiovasc. Pharmacol.* 43, 26–30.
- Lorente-Picón, M., and Laguna, A. (2021). New Avenues for Parkinson's Disease Therapeutics: Disease-Modifying Strategies Based on the Gut Microbiota. *Biomolecules* 11, 433.
- Lotankar, S., Prabhavalkar, K.S., and Bhatt, L.K. (2017). Biomarkers for Parkinson's Disease: Recent Advancement. *Neurosci. Bull.* 33, 585–597.

- Lou, X., and Liao, W. (2012). Association of Nurr1 gene mutations with Parkinson's disease in the Han population living in the Hubei province of China. *Neural Regen. Res.* 7, 1791–1796.
- Lu, J., Cheng, Y., Xie, X., Woodson, K., Bonifacio, J., Disney, E., Barbee, B., Wang, X., Zaidi, M., and Wang, J. (2021). Whole-Brain Mapping of Direct Inputs to Dopamine D1 and D2 Receptor-Expressing Medium Spiny Neurons in the Posterior Dorsomedial Striatum. *Eneuro* 8, ENEURO.0348-20.2020.
- Lunati, A., Lesage, S., and Brice, A. (2018). The genetic landscape of Parkinson's disease. *Rev. Neurol. (Paris)* 174, 628–643.
- Lundblad, M., Andersson, M., Winkler, C., Kirik, D., Wierup, N., and Cenci, M.A. (2002). Pharmacological validation of behavioural measures of akinesia and dyskinesia in a rat model of Parkinson's disease: Akinesia and dyskinesia models in rats. *Eur. J. Neurosci.* 15, 120–132.
- Luo, T., Wagner, E., and Dräger, U.C. (2009). Integrating retinoic acid signaling with brain function. *Dev. Psychol.* 45, 139–150.
- Luquet, E., Biesemann, C., Munier, A., and Herzog, E. (2017). Purification of Synaptosome Populations Using Fluorescence-Activated Synaptosome Sorting. *Methods Mol. Biol. Clifton NJ* 1538, 121–134.

M

-
- Maden, M. (2007). Retinoic acid in the development, regeneration and maintenance of the nervous system. *Nat. Rev. Neurosci.* 8, 755–765.
- Maia, J., Santos, T., Aday, S., Agasse, F., Cortes, L., Malva, J.O., Bernardino, L., and Ferreira, L. (2011). Controlling the Neuronal Differentiation of Stem Cells by the Intracellular Delivery of Retinoic Acid-Loaded Nanoparticles. *ACS Nano* 5, 97–106.
- Marchitti, S.A., Deitrich, R.A., and Vasiliou, V. (2007). Neurotoxicity and Metabolism of the Catecholamine-Derived 3,4-Dihydroxyphenylacetaldehyde and 3,4-Dihydroxyphenylglycolaldehyde: The Role of Aldehyde Dehydrogenase. *Pharmacol. Rev.* 59, 125–150.
- Marie, A., Darricau, M., Touyarot, K., Parr-Brownlie, L.C., and Bosch-Bouju, C. (2021). Role and Mechanism of Vitamin A Metabolism in the Pathophysiology of Parkinson's Disease. *J. Park. Dis.* 11, 949–970.

- Marin, C., Bonastre, M., Mengod, G., Cortés, R., and Rodríguez-Oroz, M.C. (2015). From unilateral to bilateral parkinsonism: Effects of lateralization on dyskinesias and associated molecular mechanisms. *Neuropharmacology* 97, 365–375.
- Märtn, A., Calvigioni, D., Tzortzi, O., Fuzik, J., Wärnberg, E., and Meletis, K. (2019). A Spatiomolecular Map of the Striatum. *Cell Rep.* 29, 4320-4333.e5.
- Maserejian, N., Vinikoor-Imler, L., and Dilley, A. (2020). Estimation of the 2020 Global Population of Parkinson’s Disease (PD).
- Maurice, N., Deniau, J.M., Glowinski, J., and Thierry, A.M. (1998). Relationships between the prefrontal cortex and the basal ganglia in the rat: physiology of the corticosubthalamic circuits. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 18, 9539–9546.
- McCaffery, P., and Drager, U.C. (1994). High levels of a retinoic acid-generating dehydrogenase in the meso-telencephalic dopamine system. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 91, 7772–7776.
- McCaffery, P., Zhang, J., and Crandall, J.E. (2006). Retinoic acid signaling and function in the adult hippocampus. *J. Neurobiol.* 66, 780–791.
- McCaffery, P.J., Adams, J., Maden, M., and 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.
- Meiser, J., Weindl, D., and Hiller, K. (2013). Complexity of dopamine metabolism. *Cell Commun. Signal.* 11, 34.
- Michaelis, M.L., Jiang, L., and Michaelis, E.K. (2017). Isolation of Synaptosomes, Synaptic Plasma Membranes, and Synaptic Junctional Complexes. *Methods Mol. Biol. Clifton NJ* 1538, 107–119.
- Miller, D.B., and O’Callaghan, J.P. (2015). Biomarkers of Parkinson’s disease: Present and future. *Metabolism* 64, S40–S46.
- Miller, M., Humphrey, J., Johnson, E., Marinda, E., Brookmeyer, R., and Katz, J. (2002). Why Do Children Become Vitamin A Deficient? *J. Nutr.* 132, 2867S-2880S.
- Ming, G., and Song, H. (2011). Adult Neurogenesis in the Mammalian Brain: Significant Answers and Significant Questions. *Neuron* 70, 687–702.

- Mingaud, F., Mormede, C., Etchamendy, N., Mons, N., Niedergang, B., Wietrych, M., Pallet, V., Jaffard, R., Krezel, W., Higuieret, P., 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. Off. J. Soc. Neurosci.* 28, 279–291.
- Mischley, L.K. (2017). Nutrition and Nonmotor Symptoms of Parkinson’s Disease. In *International Review of Neurobiology*, (Elsevier), pp. 1143–1161.
- Misner, D.L., Jacobs, S., Shimizu, Y., de Urquiza, A.M., Solomin, L., Perlmann, T., De Luca, L.M., Stevens, C.F., and Evans, R.M. (2001). Vitamin A deprivation results in reversible loss of hippocampal long-term synaptic plasticity. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 98, 11714–11719.
- Miyamoto, Y., Katayama, S., Shigematsu, N., Nishi, A., and Fukuda, T. (2018). Striosome-based map of the mouse striatum that is conformable to both cortical afferent topography and uneven distributions of dopamine D1 and D2 receptor-expressing cells. *Brain Struct. Funct.* 223, 4275–4291.
- Mizee, M.R., Wooldrik, D., Lakeman, K.A.M., van het Hof, B., Drexhage, J.A.R., Geerts, D., Bugiani, M., Aronica, E., Mebius, R.E., Prat, A., et al. (2013). Retinoic Acid Induces Blood-Brain Barrier Development. *J. Neurosci.* 33, 1660–1671.
- Mizuno, Y., Ohta, S., Tanaka, M., Takamiya, S., Suzuki, K., Sato, T., Oya, H., Ozawa, T., and Kagawa, Y. (1989). Deficiencies in complex I subunits of the respiratory chain in Parkinson’s disease. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 163, 1450–1455.
- Moise, A.R., Noy, N., Palczewski, K., and Blaner, W.S. (2007). Delivery of Retinoid-Based Therapies To Target Tissues. *Biochemistry* 46, 4449–4458.
- Molotkov, A., and Duester, G. (2002). Retinol/ethanol drug interaction during acute alcohol intoxication in mice involves inhibition of retinol metabolism to retinoic acid by alcohol dehydrogenase. *J. Biol. Chem.* 277, 22553–22557.
- Morais, L.H., Schreiber, H.L., and Mazmanian, S.K. (2021). The gut microbiota–brain axis in behaviour and brain disorders. *Nat. Rev. Microbiol.* 19, 241–255.
- Mulak, A. (2015). Brain-gut-microbiota axis in Parkinson’s disease. *World J. Gastroenterol.* 21, 10609.

N

- Nalls, M.A., Blauwendraat, C., Vallerga, C.L., Heilbron, K., Bandres-Ciga, S., Chang, D., Tan, M., Kia, D.A., Noyce, A.J., Xue, A., et al. (2019). Identification of novel risk loci, causal insights, and heritable risk for Parkinson's disease: a meta-analysis of genome-wide association studies. *Lancet Neurol.* *18*, 1091–1102.
- Nambu, A., Tokuno, H., and Takada, M. (2002). Functional significance of the cortico-subthalamo-pallidal “hyperdirect” pathway. *Neurosci. Res.* *43*, 111–117.
- Napoli, J.L. (2016). Functions of Intracellular Retinoid Binding-Proteins. In *The Biochemistry of Retinoid Signaling II*, M.A. Asson-Batres, and C. Rochette-Egly, eds. (Dordrecht: Springer Netherlands), pp. 21–76.
- Napoli, J.L. (2017). Cellular retinoid binding-proteins, CRBP, CRABP, FABP5: Effects on retinoid metabolism, function and related diseases. *Pharmacol. Ther.* *173*, 19–33.
- Napoli, J.L. (2020). Post-natal all-trans-retinoic acid biosynthesis. In *Methods in Enzymology*, (Elsevier), pp. 27–54.
- Narayan, S., Sinsheimer, J.S., Paul, K.C., Liew, Z., Cockburn, M., Bronstein, J.M., and Ritz, B. (2015). Genetic variability in ABCB1, occupational pesticide exposure, and Parkinson's disease. *Environ. Res.* *143*, 98–106.
- Nasri, I., Bouhali, B.E., Mesfiou, A., Hessni, A.E., Ghissassi, M.E., and Ouichou, A. (2002). Impact de la carence en vitamine A sur les niveaux en rétinoïdes du cerveau de rat. *2*, 11.
- Navigatore-Fonzo, L.S., Golini, R.L., Ponce, I.T., Delgado, S.M., Plateo-Pignatari, M.G., Gimenez, M.S., and Anzulovich, A.C. (2013). Retinoic acid receptors move in time with the clock in the hippocampus. Effect of a vitamin-A-deficient diet. *J. Nutr. Biochem.* *24*, 859–867.
- Nilbratt, M., Friberg, L., Mousavi, M., Marutle, A., and Nordberg, A. (2007). Retinoic acid and nerve growth factor induce differential regulation of nicotinic acetylcholine receptor subunit expression in SN56 cells. *J. Neurosci. Res.* *85*, 504–514.
- Nomoto, M., Takeda, Y., Uchida, S., Mitsuda, K., Enomoto, H., Saito, K., Choi, T., Watabe, A.M., Kobayashi, S., Masushige, S., et al. (2012). Dysfunction of the RAR/RXR signaling pathway in the forebrain impairs hippocampal memory and synaptic plasticity. *Mol. Brain* *5*, 8.

O

-
- Obeso, J.A., Rodriguez-Oroz, M.C., Benitez-Temino, B., Blesa, F.J., Guridi, J., Marin, C., and Rodriguez, M. (2008). Functional organization of the basal ganglia: Therapeutic implications for Parkinson's disease. *Mov. Disord.* 23, 12.
- Obeso, J.A., Stamelou, M., Goetz, C.G., Poewe, W., Lang, A.E., Weintraub, D., Burn, D., Halliday, G.M., Bezard, E., Przedborski, S., et al. (2017). Past, present, and future of Parkinson's disease: A special essay on the 200th Anniversary of the Shaking Palsy: The Shaking Palsy: Past, Present and Future. *Mov. Disord.* 32, 1264–1310.
- O'Byrne, S.M., and Blaner, W.S. (2013). Retinol and retinyl esters: biochemistry and physiology. *J. Lipid Res.* 54, 1731–1743.
- Oldenburg, I.A., and Ding, J.B. (2011). Cholinergic modulation of synaptic integration and dendritic excitability in the striatum. *Curr. Opin. Neurobiol.* 21, 425–432.
- Oliveira, L. de M., Teixeira, F.M.E., and Sato, M.N. (2018). Impact of Retinoic Acid on Immune Cells and Inflammatory Diseases. *Mediators Inflamm.* 2018, 1–17.
- de Oliveira, M.R., and Moreira, J.C.F. (2007). Acute and chronic vitamin A supplementation at therapeutic doses induces oxidative stress in submitochondrial particles isolated from cerebral cortex and cerebellum of adult rats. *Toxicol. Lett.* 173, 145–150.
- de Oliveira, M.R., Oliveira, M.W.S., Behr, G.A., Hoff, M.L.M., da Rocha, R.F., and Moreira, J.C.F. (2009). Evaluation of the effects of vitamin A supplementation on adult rat substantia nigra and striatum redox and bioenergetic states: Mitochondrial impairment, increased 3-nitrotyrosine and α -synuclein, but decreased D2 receptor contents. *Prog. Neuropsychopharmacol. Biol. Psychiatry* 33, 353–362.
- Olsen, K., Suri, D.J., Davis, C., Sheftel, J., Nishimoto, K., Yamaoka, Y., Toya, Y., Welham, N.V., and Tanumihardjo, S.A. (2018). Serum retinyl esters are positively correlated with analyzed total liver vitamin A reserves collected from US adults at time of death. *Am. J. Clin. Nutr.* 108, 997–1005.
- Opara, J.A., Małeckki, A., Małeckka, E., and Socha, T. (2017). Motor assessment in Parkinson's disease. *Ann. Agric. Environ. Med.* 24, 5.

P

-
- Paganini-Hill, A. (2001). Risk Factors for Parkinson's Disease: The Leisure World Cohort Study. *Neuroepidemiology* 20, 118–124.
- Pallet, V., and Enderlin, V. (2011). Vitamine A et vieillissement cérébral. *Ol. Corps Gras Lipides* 18, 68–75.
- Pan, J., Yu, J., Sun, L., Xie, C., Chang, L., Wu, J., Hawes, S., Saez-Atienzar, S., Zheng, W., Kung, J., et al. (2019a). ALDH1A1 regulates postsynaptic μ -opioid receptor expression in dorsal striatal projection neurons and mitigates dyskinesia through transsynaptic retinoic acid signaling. *Sci. Rep.* 9, 3602.
- Pan, J., Yu, J., Sun, L., Xie, C., Chang, L., Wu, J., Hawes, S., Saez-Atienzar, S., Zheng, W., Kung, J., et al. (2019b). ALDH1A1 regulates postsynaptic μ -opioid receptor expression in dorsal striatal projection neurons and mitigates dyskinesia through transsynaptic retinoic acid signaling. *Sci. Rep.* 9, 3602.
- Panneton, W.M., Kumar, V.B., Gan, Q., Burke, W.J., and Galvin, J.E. (2010). The Neurotoxicity of DOPAL: Behavioral and Stereological Evidence for Its Role in Parkinson Disease Pathogenesis. *PLoS ONE* 5, e15251.
- Parmar, M., Grealish, S., and Henchcliffe, C. (2020). The future of stem cell therapies for Parkinson disease. *Nat. Rev. Neurosci.* 21, 103–115.
- Parnetti, L., Gaetani, L., Eusebi, P., Paciotti, S., Hansson, O., El-Agnaf, O., Mollenhauer, B., Blennow, K., and Calabresi, P. (2019). CSF and blood biomarkers for Parkinson's disease. *Lancet Neurol.* 18, 573–586.
- Paxinos, G., and Watson, C. (2007). *The rat brain in stereotaxic coordinates*, Ed 6. London: Elsevier.
- Pedersen, W.A., Berse, B., Schüler, U., Wainer, B.H., and Blusztajn, J.K. (2002). All-trans- and 9-cis-Retinoic Acid Enhance the Cholinergic Properties of a Murine Septal Cell Line: Evidence that the Effects Are Mediated by Activation of Retinoic Acid Receptor- α . *J. Neurochem.* 65, 50–58.
- Pedrini, S., Bogush, A., and Ehrlich, M.E. (2008). Phosphatidylinositide 3-kinase and protein kinase C zeta mediate retinoic acid induction of DARPP-32 in medium size spiny neurons in vitro. *J. Neurochem.* 106, 917–924.

- Penniston, K.L., and Tanumihardjo, S.A. (2018). The acute and chronic toxic effects of vitamin A1–4. *Vitam. A* 11.
- Pfeiffer, C.M., Sternberg, M.R., Schleicher, R.L., Haynes, B.M.H., Rybak, M.E., and Pirkle, J.L. (2013). The CDC’s Second National Report on Biochemical Indicators of Diet and Nutrition in the U.S. Population Is a Valuable Tool for Researchers and Policy Makers. *J. Nutr.* 143, 938S-947S.
- Piskunov, A., Al Tanoury, Z., and Rochette-Egly, C. (2014). Nuclear and Extra-Nuclear Effects of Retinoid Acid Receptors: How They Are Interconnected. In *The Biochemistry of Retinoic Acid Receptors I: Structure, Activation, and Function at the Molecular Level*, M.A. Asson-Batres, and C. Rochette-Egly, eds. (Dordrecht: Springer Netherlands), pp. 103–127.
- Podleśny-Drabiniok, A., Sobska, J., de Lera, A.R., Gołombiowska, K., Kamińska, K., Dollé, P., Cebrat, M., and Krężel, W. (2017). Distinct retinoic acid receptor (RAR) isoforms control differentiation of embryonal carcinoma cells to dopaminergic or striatopallidal medium spiny neurons. *Sci. Rep.* 7, 13671.
- Poulin, J.-F., Zou, J., Drouin-Ouellet, J., Kim, K.-Y.A., Cicchetti, F., and Awatramani, R.B. (2014). Defining midbrain dopaminergic neuron diversity by single-cell gene expression profiling. *Cell Rep.* 9, 930–943.
- Poulin, J.-F., Caronia, G., Hofer, C., Cui, Q., Helm, B., Ramakrishnan, C., Chan, C.S., Dombeck, D.A., Deisseroth, K., and Awatramani, R. (2018). Mapping projections of molecularly defined dopamine neuron subtypes using intersectional genetic approaches. *Nat. Neurosci.* 21, 1260–1271.

Q

-
- Quadro, L. (1999). Impaired retinal function and vitamin A availability in mice lacking retinol-binding protein. *EMBO J.* 18, 4633–4644.
- Quigley, E.M.M. (2017). Microbiota-Brain-Gut Axis and Neurodegenerative Diseases. *Curr. Neurol. Neurosci. Rep.* 17, 94.

R

- Rabey, J.M., Yarden, J., Dotan, N., Mechlovich, D., Riederer, P., and Youdim, M.B.H. (2020). Creation of a gene expression classifier for predicting Parkinson's disease rate of progression. *J. Neural Transm.* *127*, 755–762.
- Ransohoff, R.M. (2016). How neuroinflammation contributes to neurodegeneration. *Science* *353*, 777–783.
- Rataj-Baniowska, M., Niewiadomska-Cimicka, A., Paschaki, M., Szyszka-Niagolov, M., Carramolino, L., Torres, M., Dolle, P., and Kr zel, W. (2015). Retinoic Acid Receptor Controls Development of Striatonigral Projection Neurons through FGF-Dependent and Meis1-Dependent Mechanisms. *J. Neurosci.* *35*, 14467–14475.
- Raza, C., Anjum, R., and Shakeel, N. ul A. (2019). Parkinson's disease: Mechanisms, translational models and management strategies. *Life Sci.* *226*, 77–90.
- Reboul, E. (2013). Absorption of Vitamin A and Carotenoids by the Enterocyte: Focus on Transport Proteins. *Nutrients* *5*, 3563–3581.
- Reboul, E. (2019). Mechanisms of Carotenoid Intestinal Absorption: Where Do We Stand? *Nutrients* *11*, E838.
- Redgrave, P., Rodriguez, M., Smith, Y., Rodriguez-Oroz, M.C., Lehericy, S., Bergman, H., Agid, Y., DeLong, M.R., and Obeso, J.A. (2010). Goal-directed and habitual control in the basal ganglia: implications for Parkinson's disease. *Nat. Rev. Neurosci.* *11*, 760–772.
- Reich, S.G., and Savitt, J.M. (2019). Parkinson's Disease. *Med. Clin. North Am.* *103*, 337–350.
- Reiner, D.J., Yu, S.-J., Shen, H., He, Y., Bae, E., and Wang, Y. (2014). 9-Cis retinoic acid protects against methamphetamine-induced neurotoxicity in nigrostriatal dopamine neurons. *Neurotox. Res.* *25*, 248–261.
- Ren, K., Guo, B., Dai, C., Yao, H., Sun, T., Liu, X., Bai, Z., Wang, W., and Wu, S. (2017). Striatal Distribution and Cytoarchitecture of Dopamine Receptor Subtype 1 and 2: Evidence from Double-Labeling Transgenic Mice. *Front. Neural Circuits* *11*, 57.
- Riabroy, N., and Tanumihardjo, S.A. (2014). Oral Doses of α -Retinyl Ester Track Chylomicron Uptake and Distribution of Vitamin A in a Male Piglet Model for Newborn Infants. *J. Nutr.* *144*, 1188–1195.

- Rinaldi, P., Polidori, M.C., Metastasio, A., Mariani, E., Mattioli, P., Cherubini, A., Catani, M., Cecchetti, R., Senin, U., and Mecocci, P. (2003). Plasma antioxidants are similarly depleted in mild cognitive impairment and in Alzheimer's disease. *Neurobiol. Aging* 24, 915–919.
- Rizzi, G., and Tan, K.R. (2017). Dopamine and Acetylcholine, a Circuit Point of View in Parkinson's Disease. *Front. Neural Circuits* 11, 110.
- Rocha, E.M., De Miranda, B., and Sanders, L.H. (2018). Alpha-synuclein: Pathology, mitochondrial dysfunction and neuroinflammation in Parkinson's disease. *Neurobiol. Dis.* 109, 249–257.
- Rolli-Derkinderen, M., Leclair-Visonneau, L., Bourreille, A., Coron, E., Neunlist, M., and Derkinderen, P. (2020). Is Parkinson's disease a chronic low-grade inflammatory bowel disease? *J. Neurol.* 267, 2207–2213.
- Royal, W., Gartner, S., and Gajewski, C.D. (2002). Retinol measurements and retinoid receptor gene expression in patients with multiple sclerosis. *Mult. Scler. J.* 8, 452–458.
- Rühl, R., De Iera, A.R., and Krezel, W. (2018). An Endogenous Mammalian Retinoid X Receptor Ligand, At Last! *ChemMedChem* 11, 1027–1037.

S

- Saari, J.C. (2016). Vitamin A and Vision. In *The Biochemistry of Retinoid Signaling II*, M.A. Asson-Batres, and C. Rochette-Egly, eds. (Dordrecht: Springer Netherlands), pp. 231–259.
- Saeed, A., Hoekstra, M., Hoeke, M.O., Heegsma, J., and Faber, K.N. (2017). The interrelationship between bile acid and vitamin A homeostasis. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Mol. Cell Biol. Lipids* 1862, 496–512.
- Saga, Y., Kobayashi, M., Ohta, H., Murai, N., Nakai, N., Oshima, M., and Taketo, M.M. (1999). Impaired extrapyramidal function caused by the targeted disruption of Retinoid X receptor RXR γ 1 isoform: RXR γ 1 knockout mice. *Genes Cells* 4, 219–228.
- Salari, S., and Bagheri, M. (2019). In vivo, in vitro and pharmacologic models of Parkinson's disease. *Physiol. Res.* 17–24.
- Salas-Leal, A.C., Sandoval-Carrillo, A., Romero-Gutiérrez, E., Castellanos-Juárez, F.X., Méndez-Hernández, E.M., La Llave-León, O., Quiñones-Canales, G., Arias-Carrión,

- O., and Salas-Pacheco, J.M. (2019). rs3764435 Associated With Parkinson's Disease in Mexican Mestizos: Case-Control Study Reveals Protective Effects Against Disease Development and Cognitive Impairment. *Front. Neurol.* *10*, 1066.
- Samad, T.A., Krezel, W., Chambon, P., and Borrelli, E. (1997a). Regulation of dopaminergic pathways by retinoids: Activation of the D2 receptor promoter by members of the retinoic acid receptor–retinoid X receptor family. *Proc Natl Acad Sci USA* *6*.
- Samad, T.A., Krezel, W., Chambon, P., and Borrelli, E. (1997b). Regulation of dopaminergic pathways by retinoids: Activation of the D2 receptor promoter by members of the retinoic acid receptor-retinoid X receptor family. *Proc. Natl. Acad. Sci.* *94*, 14349–14354.
- Santé publique France (2018). Épidémiologie de la maladie de Parkinson, données nationales.
- Santos, T., Ferreira, R., Maia, J., Agasse, F., Xapelli, S., Cortes, L., Bragança, J., Malva, J.O., Ferreira, L., and Bernardino, L. (2012). Polymeric Nanoparticles to Control the Differentiation of Neural Stem Cells in the Subventricular Zone of the Brain. *ACS Nano* *6*, 10463–10474.
- Sato, Y., and Heuckeroth, R.O. (2008). Retinoic acid regulates murine enteric nervous system precursor proliferation, enhances neuronal precursor differentiation, and reduces neurite growth in vitro. *Dev. Biol.* *320*, 185–198.
- Schallert, T., De Ryck, M., Wishaw, I.Q., Ramirez, V.D., and Teitelbaum, P. (1979). Excessive bracing reactions and their control by atropine and L-DOPA in an animal analog of Parkinsonism. *Exp. Neurol.* *64*, 33–43.
- Sgobio, C., Wu, J., Zheng, W., Chen, X., Pan, J., Salinas, A.G., Davis, M.I., Lovinger, D.M., and Cai, H. (2017). Aldehyde dehydrogenase 1–positive nigrostriatal dopaminergic fibers exhibit distinct projection pattern and dopamine release dynamics at mouse dorsal striatum. *Sci. Rep.* *7*, 5283.
- Sgroi, S., and Tonini, R. (2018). Opioidergic Modulation of Striatal Circuits, Implications in Parkinson's Disease and Levodopa Induced Dyskinesia. *Front. Neurol.* *9*, 524.
- Shearer, K.D., Stoney, P.N., Morgan, P.J., and McCaffery, P.J. (2012). A vitamin for the brain. *Trends Neurosci.* *35*, 733–741.
- Shimohama, S., and Kawamata, J. (2018). Roles of Nicotinic Acetylcholine Receptors in the Pathology and Treatment of Alzheimer's and Parkinson's Diseases. In *Nicotinic*

- Acetylcholine Receptor Signaling in Neuroprotection, A. Akaike, S. Shimohama, and Y. Misu, eds. (Singapore: Springer), p.
- Sialana, F.J., Wang, A.-L., Fazari, B., Kristofova, M., Smidak, R., Trossbach, S.V., Korth, C., Huston, J.P., de Souza Silva, M.A., and Lubec, G. (2018). Quantitative Proteomics of Synaptosomal Fractions in a Rat Overexpressing Human DISC1 Gene Indicates Profound Synaptic Dysregulation in the Dorsal Striatum. *Front. Mol. Neurosci.* *11*, 26.
- Sidransky, E., Samaddar, T., and Tayebi, N. (2009). Mutations in GBA are associated with familial Parkinson disease susceptibility and age at onset. *Neurology* *73*, 1424–1425, author reply 1425-1426.
- Simola, N., Morelli, M., and Carta, A.R. (2007). The 6-Hydroxydopamine model of parkinson's disease. *Neurotox. Res.* *11*, 151–167.
- Simon, D.K., Tanner, C.M., and Brundin, P. (2020). Parkinson Disease Epidemiology, Pathology, Genetics, and Pathophysiology. *Clin. Geriatr. Med.* *36*, 1–12.
- Smidt, M.P. (2017). Molecular Programming of Mesodiencephalic Dopaminergic Neuronal Subsets. *Front. Neuroanat.* *11*, 59.
- Sodja, C., Fang, H., Dasgupta, T., Ribocco, M., Walker, P.R., and Sikorska, M. (2002). Identification of functional dopamine receptors in human teratocarcinoma NT2 cells. *Brain Res. Mol. Brain Res.* *99*, 83–91.
- Sommer, W.H., Costa, R.M., and Hansson, A.C. (2014). Dopamine systems adaptation during acquisition and consolidation of a skill. *Front. Integr. Neurosci.* *8*, 87.
- Spathis, A.D., Asvos, X., Ziavra, D., Karampelas, T., Topouzis, S., Cournia, Z., Qing, X., Alexakos, P., Smits, L.M., Dalla, C., et al. (2017). Nurr1:RXR α heterodimer activation as monotherapy for Parkinson's disease. *Proc. Natl. Acad. Sci.* *114*, 3999–4004.
- Srivastav, S., Neupane, S., Bhurtel, S., Katila, N., Maharjan, S., Choi, H., Hong, J.T., and Choi, D.-Y. (2019). Probiotics mixture increases butyrate, and subsequently rescues the nigral dopaminergic neurons from MPTP and rotenone-induced neurotoxicity. *J. Nutr. Biochem.* *69*, 73–86.
- Stevens, G.A., Bennett, J.E., Hennocq, Q., Lu, Y., De-Regil, L.M., Rogers, L., Danaei, G., Li, G., White, R.A., Flaxman, S.R., et al. (2015). Trends and mortality effects of vitamin A deficiency in children in 138 low-income and middle-income countries between 1991

and 2013: a pooled analysis of population-based surveys. *Lancet Glob. Health* 3, e528–e536.

Stoddard-Bennett, T., and Reijo Pera, R. (2019). Treatment of Parkinson's Disease through Personalized Medicine and Induced Pluripotent Stem Cells. *Cells* 8, 26.

Stoney, P.N., and McCaffery, P. (2016). A Vitamin on the Mind: New Discoveries on Control of the Brain by Vitamin A. *World Rev. Nutr. Diet.* 115, 98–108.

Su, R., Zhen, J., Wang, W., Zhang, J., Zheng, Y., and Wang, X. (2017). Time-course behavioral features are correlated with Parkinson's disease-associated pathology in a 6-hydroxydopamine hemiparkinsonian rat model. *Mol. Med. Rep.*

Subramaniam, S.R., and Chesselet, M.-F. (2013). Mitochondrial dysfunction and oxidative stress in Parkinson's disease. *Prog. Neurobiol.* 106–107, 17–32.

Szutowicz, A., Jankowska, A., Blusztajn, J.K., and Tomaszewicz, M. (1999). Acetylcholine and acetyl-CoA metabolism in differentiating SN56 septal cell line. *J. Neurosci. Res.* 57, 131–136.

T

Tajima, K., and Fukuda, T. (2013). Region-specific diversity of striosomes in the mouse striatum revealed by the differential immunoreactivities for mu-opioid receptor, substance P, and enkephalin. *Neuroscience* 241, 215–228.

Takahashi, J., Palmer, T.D., and Gage, F.H. (1999). Retinoic acid and neurotrophins collaborate to regulate neurogenesis in adult-derived neural stem cell cultures. *J. Neurobiol.* 38, 65–81.

Takakusaki, K., Habaguchi, T., Ohtinata-Sugimoto, J., Saitoh, K., and Sakamoto, T. (2003). Basal ganglia efferents to the brainstem centers controlling postural muscle tone and locomotion: a new concept for understanding motor disorders in basal ganglia dysfunction. *Neuroscience* 119, 293–308.

Takeda, A., Nyssen, O.P., Syed, A., Jansen, E., Bueno-de-Mesquita, B., and Gallo, V. (2014). Vitamin A and carotenoids and the risk of Parkinson's disease: a systematic review and meta-analysis. *Neuroepidemiology* 42, 25–38.

- Tan, M., Yang, T., Liu, H., Xiao, L., Li, C., Zhu, J., Chen, J., and Li, T. (2021). Maternal vitamin A deficiency impairs cholinergic and nitrenergic neurons, leading to gastrointestinal dysfunction in rat offspring via RAR β . *Life Sci.* *264*, 118688.
- Tanumihardjo, S.A., Russell, R.M., Stephensen, C.B., Gannon, B.M., Craft, N.E., Haskell, M.J., Lietz, G., Schulze, K., and Raiten, D.J. (2016). Biomarkers of Nutrition for Development (BOND)—Vitamin A Review. *J. Nutr.* *146*, 1816S-1848S.
- Threlfell, S., Lalic, T., Platt, N.J., Jennings, K.A., Deisseroth, K., and Cragg, S.J. (2012). Striatal Dopamine Release Is Triggered by Synchronized Activity in Cholinergic Interneurons. *Neuron* *75*, 58–64.
- Tian, Y., Nichols, R.G., Cai, J., Patterson, A.D., and Cantorna, M.T. (2018). Vitamin A deficiency in mice alters host and gut microbial metabolism leading to altered energy homeostasis. *J. Nutr. Biochem.* *54*, 28–34.
- Topletz, A.R., Thatcher, J.E., Zelter, A., Lutz, J.D., Tay, S., Nelson, W.L., and Isoherranen, N. (2012). Comparison of the function and expression of CYP26A1 and CYP26B1, the two retinoic acid hydroxylases. *Biochem. Pharmacol.* *83*, 149–163.
- Touyarot, K., Bonhomme, D., Roux, P., Alfos, S., Lafenêtre, P., Richard, E., Higuieret, P., and 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.
- Trasino, S.E., Tang, X.-H., Jessurun, J., and Gudas, L.J. (2015). Obesity Leads to Tissue, but not Serum Vitamin A Deficiency. *Sci. Rep.* *5*, 15893.
- Troesch, B., Hoeft, B., McBurney, M., Eggersdorfer, M., and Weber, P. (2012). Dietary surveys indicate vitamin intakes below recommendations are common in representative Western countries. *Br. J. Nutr.* *108*, 692–698.
- Tysnes, O.-B., and Storstein, A. (2017). Epidemiology of Parkinson’s disease. *J. Neural Transm.* *124*, 901–905.

U

-
- Uchihara, T., and Giasson, B.I. (2016). Propagation of alpha-synuclein pathology: hypotheses, discoveries, and yet unresolved questions from experimental and human brain studies. *Acta Neuropathol. (Berl.)* *131*, 49–73.

Uversky, V.N., Li, J., and Fink, A.L. (2001). Metal-triggered structural transformations, aggregation, and fibrillation of human alpha-synuclein. A possible molecular link between Parkinson's disease and heavy metal exposure. *J. Biol. Chem.* 276, 44284–44296.

V

Vairetti, M., Ferrigno, A., Rizzo, V., Ambrosi, G., Bianchi, A., Richelmi, P., Blandini, F., and Armentero, M.-T. (2012). Impaired hepatic function and central dopaminergic denervation in a rodent model of Parkinson's disease: A self-perpetuating crosstalk? *Biochim. Biophys. Acta BBA - Mol. Basis Dis.* 1822, 176–184.

Van Den Berge, N., Ferreira, N., Gram, H., Mikkelsen, T.W., Alstrup, A.K.O., Casadei, N., Tsung-Pin, P., Riess, O., Nyengaard, J.R., Tamgüney, G., et al. (2019). Evidence for bidirectional and trans-synaptic parasympathetic and sympathetic propagation of alpha-synuclein in rats. *Acta Neuropathol. (Berl.)* 138, 535–550.

Van der Perren, A., Van den Haute, C., and Baekelandt, V. (2014). Viral Vector-Based Models of Parkinson's Disease. In *Behavioral Neurobiology of Huntington's Disease and Parkinson's Disease*, H.H.P. Nguyen, and M.A. Cenci, eds. (Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg), pp. 271–301.

Van Loo-Bouwman, C.A., Naber, T.H.J., van Breemen, R.B., Zhu, D., Dicke, H., Siebelink, E., Hulshof, P.J.M., Russel, F.G.M., Schaafsma, G., and West, C.E. (2010). Vitamin A equivalency and apparent absorption of β -carotene in ileostomy subjects using a dual-isotope dilution technique. *Br. J. Nutr.* 103, 1836–1843.

Varma, P., Narayan, L., Alty, J., Painter, V., and Padmakumar, C. (2021). An Innovative Personalised Management Program for Older Adults with Parkinson's Disease: New Concepts and Future Directions. *J. Pers. Med.* 11, 43.

Vermeiren, Y., Hirschberg, Y., Mertens, I., and De Deyn, P.P. (2020). Biofluid Markers for Prodromal Parkinson's Disease: Evidence From a Catecholaminergic Perspective. *Front. Neurol.* 11, 595.

Villain, N. (2017). Rôle de la plasticité comportementale dans l'adaptation aux variations nutritionnelles chez un primate malgache.

Viroonudomphol, D., Pongpaew, P., Tungtrongchitr, R., Changbumrung, S., Tungtrongchitr, A., Phonrat, B., Vudhivai, N., and Schelp, F.P. (2003). The relationships between

anthropometric measurements, serum vitamin A and E concentrations and lipid profiles in overweight and obese subjects. *Asia Pac. J. Clin. Nutr.* 12, 73–79.

Voorn, P., Vanderschuren, L.J.M.J., Groenewegen, H.J., Robbins, T.W., and Pennartz, C.M.A. (2004). Putting a spin on the dorsal–ventral divide of the striatum. *Trends Neurosci.* 27, 468–474.

W

Wang, H.-X., and Wang, Y.-P. (2016). Gut Microbiota-brain Axis. *Chin. Med. J. (Engl.)* 129, 2373–2380.

Weber, D., and Grune, T. (2012). The contribution of β -carotene to vitamin A supply of humans. *Mol. Nutr. Food Res.* 56, 251–258.

Werner, E.A., and Deluca, H.F. (2002). Retinoic acid is detected at relatively high levels in the CNS of adult rats. *Am. J. Physiol.-Endocrinol. Metab.* 282, E672–E678.

Wersinger, C., and Sidhu, A. (2003). Attenuation of dopamine transporter activity by alpha-synuclein. *Neurosci. Lett.* 340, 189–192.

Wey, M.C.-Y., Fernandez, E., Martinez, P.A., Sullivan, P., Goldstein, D.S., and Strong, R. (2012). Neurodegeneration and motor dysfunction in mice lacking cytosolic and mitochondrial aldehyde dehydrogenases: implications for Parkinson's disease. *PLoS One* 7, e31522.

Whishaw, I.Q., Whishaw, P., and Gorny, B. (2008). The structure of skilled forelimb reaching in the rat: a movement rating scale. *J. Vis. Exp. JoVE* 816.

Whitton, P.S. (2007). Inflammation as a causative factor in the aetiology of Parkinson's disease. *Br. J. Pharmacol.* 150, 963–976.

Wietrych, M. (2005). Working memory deficits in retinoid X receptor -deficient mice. *Learn. Mem.* 12, 318–326.

Winkler, C., Kirik, D., Björklund, A., and Dunnett, S.B. (2000). Chapter 11 Transplantation in the rat model of Parkinson's disease: ectopic versus homotopic graft placement. In *Progress in Brain Research*, (Elsevier), pp. 233–265.

Wiseman, E.M., Bar-El Dadon, S., and Reifen, R. (2017). The vicious cycle of vitamin a deficiency: A review. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* 57, 3703–3714.

- Włodarek, D. (2019). Role of Ketogenic Diets in Neurodegenerative Diseases (Alzheimer's Disease and Parkinson's Disease). *Nutrients* *11*, 169.
- Wołoszynowska-Fraser, M.U., Rossi, S.L., Long, J.M., McCaffery, P.J., and Rapp, P.R. (2021). Differential Retinoic Acid Signaling in the Hippocampus of Aged Rats with and without Memory Impairment. *ENeuro* *8*, ENEURO.0120-21.2021.
- World Health Organization (2009). Vitamin A deficiency.
- World Health Organization (2011). Directive : supplémentation en vitamine A pendant la grossesse pour réduire le risque de transmission du VIH de la mère à l'enfant. Guidel. Vitam. Suppl. Pregnancy Reducing Risk Mother--Child Transm. HIV.
- Wright-Jin, E.C., Grider, J.R., Duester, G., and Heuckeroth, R.O. (2013). Retinaldehyde dehydrogenase enzymes regulate colon enteric nervous system structure and function. *Dev. Biol.* *381*, 28–37.
- Wu, J., Kung, J., Dong, J., Chang, L., Xie, C., Habib, A., Hawes, S., Yang, N., Chen, V., Liu, Z., et al. (2019). Distinct Connectivity and Functionality of Aldehyde Dehydrogenase 1a1-Positive Nigrostriatal Dopaminergic Neurons in Motor Learning. *Cell Rep.* *28*, 1167-1181.e7.
- Wysowski, D.K., Pitts, M., and Beitz, J. (2001). An analysis of reports of depression and suicide in patients treated with isotretinoin. *J. Am. Acad. Dermatol.* *45*, 515–519.

Y

-
- Ya, L., and Lu, Z. (2017). Differences in ABCA1 R219K Polymorphisms and Serum Indexes in Alzheimer and Parkinson Diseases in Northern China. *Med. Sci. Monit.* *23*, 4591–4600.
- Yakunin, E., Loeb, V., Kisos, H., Biala, Y., Yehuda, S., Yaari, Y., Selkoe, D.J., and Sharon, R. (2012). α -Synuclein Neuropathology is Controlled by Nuclear Hormone Receptors and Enhanced by Docosahexaenoic Acid in A Mouse Model for Parkinson's Disease: NHR Controls α -Syn Neuropathology. *Brain Pathol.* *22*, 280–294.
- Yamamoto, Y., Zolfaghari, R., and Catharine Ross, A. (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, F., Wolk, A., Håkansson, N., Pedersen, N.L., and Wirdefeldt, K. (2017). Dietary antioxidants and risk of Parkinson's disease in two population-based cohorts: Antioxidants and Parkinson's Disease. *Mov. Disord.* 32, 1631–1636.
- Yin, L.-H., Shen, H., Diaz-Ruiz, O., Bäckman, C.M., Bae, E., Yu, S.-J., and Wang, Y. (2012a). Early post-treatment with 9-cis retinoic acid reduces neurodegeneration of dopaminergic neurons in a rat model of Parkinson's disease. *BMC Neurosci.* 13, 120.
- Yin, L.-H., Shen, H., Diaz-Ruiz, O., Bäckman, C.M., Bae, E., Yu, S.-J., and Wang, Y. (2012b). Early post-treatment with 9-cis retinoic acid reduces neurodegeneration of dopaminergic neurons in a rat model of Parkinson's disease. *BMC Neurosci.* 13, 120.

Z

-
- Zeng, J., Chen, L., Wang, Z., Chen, Q., Fan, Z., Jiang, H., Wu, Y., Ren, L., Chen, J., Li, T., et al. (2017). Marginal vitamin A deficiency facilitates Alzheimer's pathogenesis. *Acta Neuropathol. (Berl.)* 133, 967–982.
- Zetterstrom, R.H., Simon, A., Giacobini, M.M.J., Eriksson, U., and Olson, L. (1994). Localization of cellular retinoid-binding proteins suggests specific roles for retinoids in the adult central nervous system. *Neuroscience* 62, 899–918.
- Zetterström, R.H., Solomin, L., Jansson, L., Hoffer, B.J., Olson, L., and Perlmann, T. (1997). Dopamine neuron agenesis in *Nurr1*-deficient mice. *Science* 276, 248–250.
- Zetterström, R.H., Lindqvist, E., De Urquiza, A.M., Tomac, A., Eriksson, U., Perlmann, T., and Olson, L. (1999). Role of retinoids in the CNS: differential expression of retinoid binding proteins and receptors and evidence for presence of retinoic acid: Role of retinoids in the CNS. *Eur. J. Neurosci.* 11, 407–416.
- Zeuner, K.E., and Berg, D. (2019). 'Atypical' Parkinson's disease – sporadic. In *International Review of Neurobiology*, (Elsevier), pp. 195–206.
- Zhang, L., Wang, X., Cueto, R., Effi, C., Zhang, Y., Tan, H., Qin, X., Ji, Y., Yang, X., and Wang, H. (2019). Biochemical basis and metabolic interplay of redox regulation. *Redox Biol.* 26, 101284.
- Zhang, Q., Chen, W., Tan, S., and Lin, T. (2017). Stem Cells for Modeling and Therapy of Parkinson's Disease. *Hum. Gene Ther.* 28, 85–98.

- Zhang, S.M., Hernan, M.A., Chen, H., Spiegelman, D., Willett, W.C., and Ascherio, A. (2002). Intakes of vitamins E and C, carotenoids, vitamin supplements, and PD risk. *Neurology* 59, 1161–1169.
- Zhou, Y., Zhou, J., Zhang, Y., Tang, J., Sun, B., Xu, W., Wang, X., Chen, Y., and Sun, Z. (2020). Changes in Intestinal Microbiota Are Associated with Islet Function in a Mouse Model of Dietary Vitamin A Deficiency. *J. Diabetes Res.* 2020, 2354108.
- Ztaou, S., and Amalric, M. (2019). Contribution of cholinergic interneurons to striatal pathophysiology in Parkinson’s disease. *Neurochem. Int.* 126, 1–10.

Annexe

Review

Role and Mechanism of Vitamin A Metabolism in the Pathophysiology of Parkinson's Disease

Anaïs Marie^a, Morgane Darricau^{a,b,1}, Katia Touyarot^{a,2},
Louise C. Parr-Brownlie^{c,d,3} and Clémentine Bosch-Bouju^{a,4,*}

^aUniversity Bordeaux, INRAE, Bordeaux INP, NutriNeuro, UMR 1286, Bordeaux, France

^bUniversity Bordeaux, Institut des Maladies Neurodégénératives, UMR 5293, Bordeaux, France

^cDepartment of Anatomy, Brain Health Research Centre, University of Otago, Dunedin, New Zealand

^dBrain Research New Zealand (Center of Research Excellence), Dunedin, New Zealand

Accepted 12 May 2021

Pre-press 5 June 2021

Abstract. Evidence shows that altered retinoic acid signaling may contribute to the pathogenesis and pathophysiology of Parkinson's disease (PD). Retinoic acid is the bioactive derivative of the lipophilic vitamin A. Vitamin A is involved in several important homeostatic processes, such as cell differentiation, antioxidant activity, inflammation and neuronal plasticity. The role of vitamin A and its derivatives in the pathogenesis and pathophysiology of neurodegenerative diseases, and their potential as therapeutics, has drawn attention for more than 10 years. However, the literature sits in disparate fields. Vitamin A could act at the crossroad of multiple environmental and genetic factors of PD. The purpose of this review is to outline what is known about the role of vitamin A metabolism in the pathogenesis and pathophysiology of PD. We examine key biological systems and mechanisms that are under the control of vitamin A and its derivatives, which are (or could be) exploited for therapeutic potential in PD: the survival of dopaminergic neurons, oxidative stress, neuroinflammation, circadian rhythms, homeostasis of the enteric nervous system, and hormonal systems. We focus on the pivotal role of ALDH1A1, an enzyme expressed by dopaminergic neurons for the detoxification of these neurons, which is under the control of retinoic acid. By providing an integrated summary, this review will guide future studies on the potential role of vitamin A in the management of symptoms, health and wellbeing for PD patients.

Keywords: Neuroinflammation, vitamin A, retinoic acid, ALDH1A1, oxidative stress, RAR RXR receptors

INTRODUCTION

Even though pharmacological treatments exist to control motor symptoms in Parkinson's disease (PD),

patients often require more holistic care in order to improve their daily quality of life and wellbeing. As such, nutrition becomes increasingly a focus for patients, medical teams and caregivers. In addition to influencing the daily management of the disease, nutrition is a potential disease-modifying factor that can either slow down the course of neurodegeneration when it is optimized, or worsen it when inadequate. Therefore, it is critical to understand what is suitable for parkinsonian patients in terms of food habits, diet, and nutrients to maximize health and wellbeing. So far, there is no consensus

¹ORCID: 0000-0002-6663-3156

²ORCID: 0000-0003-4310-4152

³ORCID: 0000-0002-3001-7669

⁴ORCID: 0000-0001-8869-768X

*Correspondence to: Clémentine Bosch-Bouju, Univ. Bordeaux, INRAE, Bordeaux INP, NutriNeuro, UMR 1286, F-33000, Bordeaux, France. Tel.: +335 5757 9235; E-mail: cbosch@enscbp.fr.

for an ideal diet or crucial ingredient. However, in recent years, researchers and clinicians have focused attention on candidate nutrients, such as omega-3 polyunsaturated fatty acids or vitamins. Widespread evidence, mainly in the preclinical literature, suggests that altered vitamin A signaling may contribute to the pathophysiology of PD. However, no clear consensus has been made on the underlying mechanisms.

Vitamin A is a lipophilic molecule that is exclusively provided by food. Vitamin A is the unique precursor of retinoic acid (RA), a molecule that modulates gene transcription through its binding to nuclear receptors [1]. Through its derivatives, vitamin A is involved in many important homeostatic processes in the organism, such as cell differentiation, antioxidant power, inflammation and neuronal plasticity. The role of vitamin A derivatives in the pathophysiology of neurodegenerative diseases, and their potential as therapeutics, has been carefully studied for more than 10 years, especially for Alzheimer's disease, and to a lesser extent PD [2–8]. However, the literature sits in disparate fields, does not focus on the importance of vitamin A metabolism, and has not been concisely summarized with the view of maximizing PD patient wellbeing.

The purpose of this review is to outline what is known about the role of vitamin A metabolism in the pathogenesis and pathophysiology of PD. We examine key biological systems and mechanisms that are under the control of vitamin A and its bioactive derivative, RA, which are (or could be) exploited for therapeutic potential in PD: the survival of dopaminergic neurons in the substantia nigra *pars compacta* (SNc), oxidative stress, and function of immune, enteric nervous, and hormonal systems. By providing an integrated summary, this review will guide future studies on the potential role of vitamin A in the management of symptoms, health and wellbeing for PD patients.

CLINICAL AND PRECLINICAL EVIDENCE FOR A ROLE OF VITAMIN A IN THE PATHOGENESIS AND PATHOPHYSIOLOGY OF PD

Metabolism and function of vitamin A

Vitamin A (retinol) is a fat-soluble vitamin that is essential for the organism. Vitamin A is found in foods derived from animals (meat, milk, eggs) in the form of retinol esters, or in vegetable sources in the

form of carotenoids that are metabolized to retinol by intestinal enzymes [9, 10]. The bioactive metabolites of vitamin A form the group of retinoid compounds or retinoids (Fig. 1). The main active metabolite is all-*trans* RA, called RA in this review, but other isomers also display biological activity, such as 9-*cis* or 13-*cis*-RA [9] (Fig. 1). RA acts through nuclear receptors of the steroid receptor family, namely RA receptors (RAR), which can exist in 3 different subtypes: RAR- α , RAR- β and RAR- γ [3]. The receptor subtypes differ mainly by their different locations in the body, and particularly in different brain areas [11]. RAR act as heterodimers with retinoid-X receptor (RXR) to bind DNA on RA response element (RARE) sequences located in promoter regions to activate (or repress) gene expression. RXRs also exist in 3 isoforms, RXR- α , RXR- β and RXR- γ and they function as a heterodimer partner for many other nuclear receptors [12], such as thyroid hormone receptor. The signaling of RXR is very complex and not yet fully understood. Of note, multiple ligands have been found for RXR, including retinoids, but the endogenous ligand that is most likely to activate RXR is 9-*cis*-dihydro RA (9CDHRA) [13]. Furthermore, RXR can also function without ligands in some cases [12–14].

Through its nuclear receptors (more often RAR-RXR heterodimers), RA controls the transcription of hundreds of genes, belonging to various gene pathways, including dopamine signaling and plasticity [3, 15]. Throughout life, RA is involved in cell growth, differentiation and cell death: during development, the action of RA is crucial since it is involved in the patterning of tissues, especially in the central nervous system [1, 5]; at adult age, RA continues to be involved in the maintenance and homeostasis of cells [16], and controls inflammatory responses, hormone actions, reproduction and vision [16]. The endocrine system is also tightly related to the retinoid system because RXR forms heterodimers (sometimes in an obligatory role) for some hormone nuclear receptors, such as thyroid or vitamin D receptors [17].

Vitamin A and RA are stored in liver cells, and are released on demand to act at target organs, such as the brain. Vitamin A is transformed into retinaldehyde by retinol dehydrogenase (RDH) enzymes, and retinaldehyde is further transformed in RA by retinaldehyde dehydrogenase (RALDH) enzymes [5, 10] (Fig. 2). Due to their lipophilic nature, retinoids are carried by specific proteins in the blood (retinol binding proteins, RBP) and in cells (cellular retinol

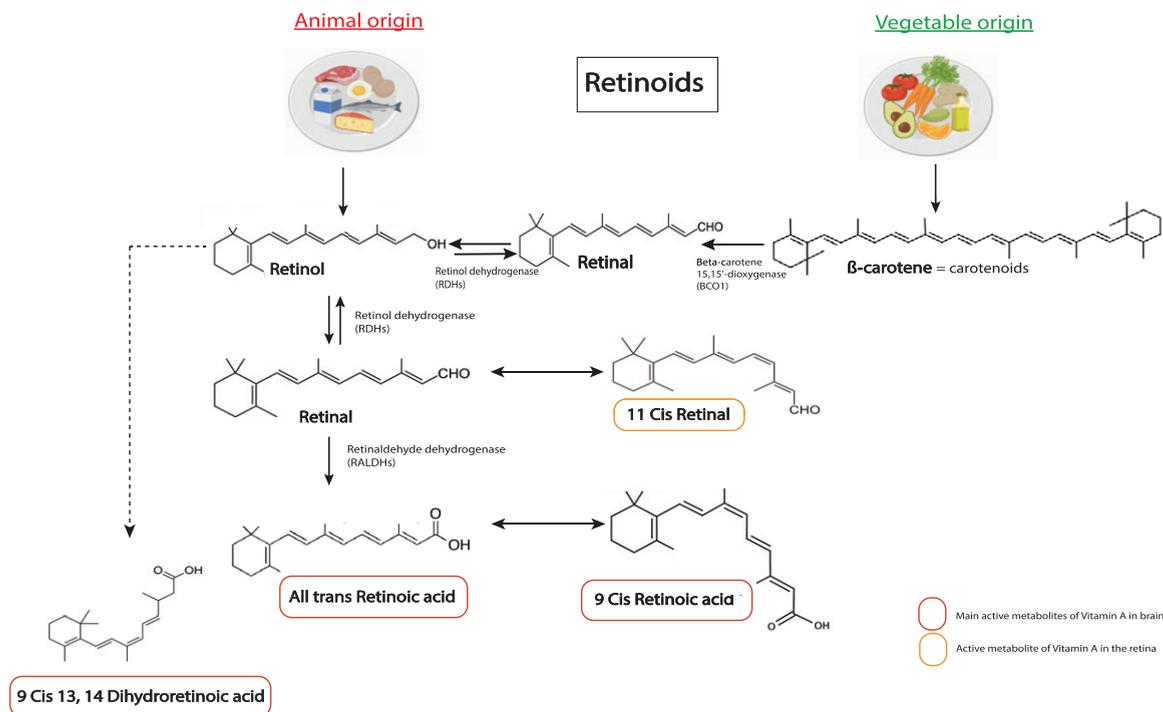


Fig. 1. Chemical structures of the main retinoids metabolized in the body. Retinol (vitamin A) is directly provided by animal sources. Carotenoids, such as β -carotene, are precursors of retinol from vegetable sources that can be converted into retinol by the organism. Retinol is metabolized into retinal by enzymes of the RDHs family, which can also be converted back to retinol. Retinal can be metabolized into 11 cis retinal. A key bioactive metabolite produced from retinal is RA (*all trans* retinoic acid), which is irreversibly metabolized by a RALDH protein (ALDH1A1 belongs to RALDHs). RA can be metabolized in 11-Cis Retinal, which is an active metabolite in the retina, and in 9-cis RA, another key active metabolite for the brain. Alternatively, retinol can be transformed in 9CDHRA, an endogenous RXR ligand. RDHs, retinol dehydrogenases; RALDHs, retinaldehydes dehydrogenases.

binding proteins, CRBP, and cellular retinoic acid binding proteins, CRABP) to be taken to, and have action, at other organs (Fig. 2). Intriguingly, extracellular carriers (RBP) and the transmembrane transporter (STRA6 is stimulated by retinoic acid 6) have been identified for retinol, but not for RA, yet RA is clearly present in the blood [18]. In addition, STRA6 is not present on every cell, suggesting passive diffusion or another transporter, not yet identified, play a role [19].

In the brain, all the machinery for retinoid metabolism/catabolism, receptors and transport are present, with a specific distribution of these proteins depending on the brain structure and cell type [5, 10, 11, 20, 21] (Fig. 2). Remarkably in the hippocampus, RA has been reported to be synthesized by the meninges whereas RA has action at hippocampal neurons [20]. In the dopaminergic nigro-striatal pathway, it is likely that RA synthesis and RA action are also unevenly distributed: the enzymes for produc-

tion of RA are concentrated in SNc dopaminergic neurons [3, 21, 22], whereas RA receptors are mostly expressed in striatal neurons [11]. This is in line with the paracrine action of RA that has been described [1, 23], and recent data show that RA can act as a retrograde signaling molecule in this pathway [24]. In addition, RA signaling has been involved in the patterning of a specific dopaminergic nigrostriatal pathway [25]. Of note, a recent study reports that alpha-synuclein is a RA-carrier protein that regulates transcriptional activity of retinoids [26]. This evidence is in line with increasing literature showing that alpha-synuclein is a lipid-binding protein [27]. Yet, alpha-synuclein aggregates have been found to be expressed trans-synaptically in humans with Lewy-bodies dementia [28]. Thus, alpha-synuclein could be an extracellular carrier of RA in the nigrostriatal pathway, but this has not been fully proven yet (Fig. 2). In the study [26], RA triggers the translocation of alpha-synuclein in the nucleus in SH-SY5Y.

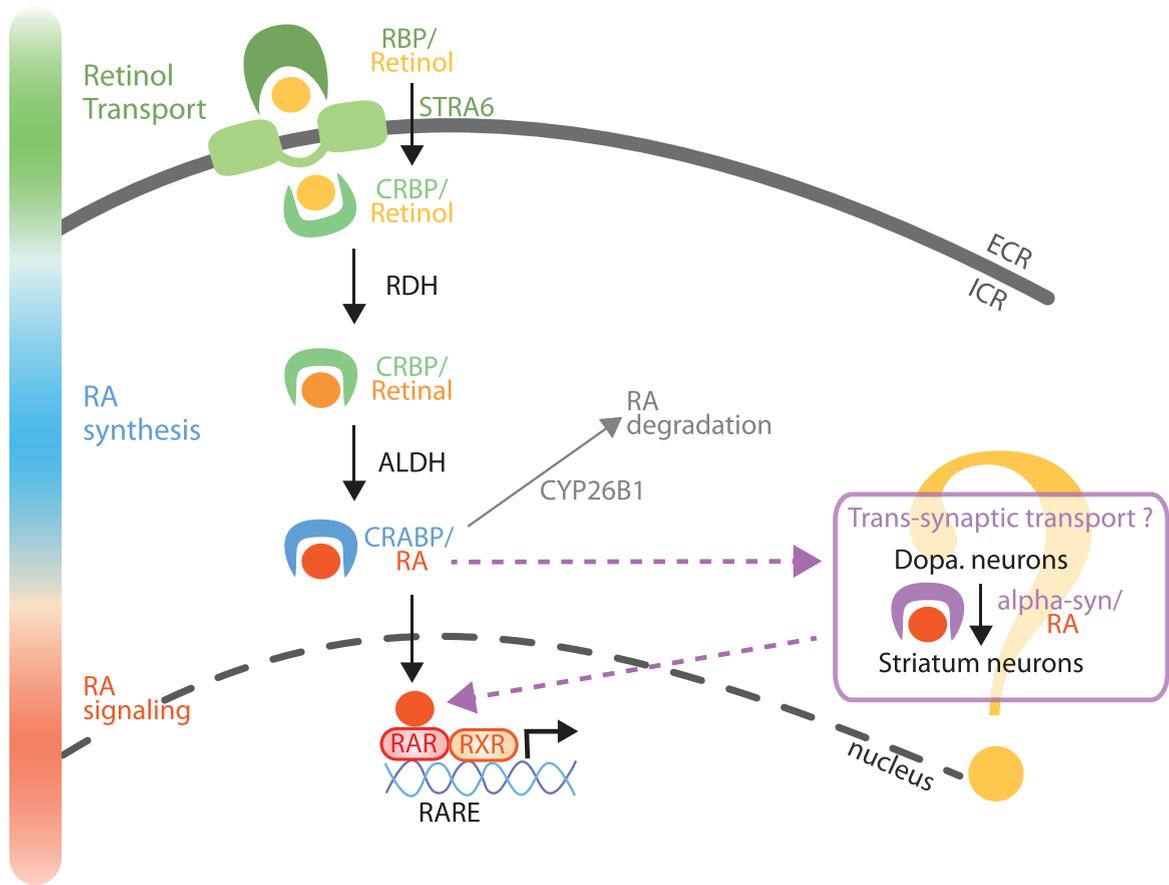


Fig. 2. Model of RA metabolism and signaling in the nigro-striatal pathway. Retinol (vitamin A) is transported in the extracellular fluids by RBP, and internalized into the cells by STRA6. Retinol can also diffuse across the plasma membrane or through other transporters, not yet identified. Retinol is then bound to CRBP and metabolized into retinal by enzymes of the RDHs family. Retinal is further metabolized into RA by a RALDH protein (notably ALDH1A1 in a sub-population of SNc neurons). RA is then transported to the nucleus bound to CRABP protein. In the nucleus, RA binds to RA receptors (RARs), which activate the control of gene expression by RAR/RXR dimers on genes with a RARE sequence in their promoter. Furthermore, as a trans-synaptic factor, RA can travel trans-synaptically from SNc neurons to striatum neurons [24]. From the literature, it is possible that alpha-synuclein may serve as a cargo protein for the trans-synaptic transport of RA [26]. Finally, RA can be degraded by the Cyp26B1 enzyme. RBP, retinol binding proteins; STRA6, transporter stimulated by retinoic acid 6; CRBP, cellular retinol binding protein; CRABP, cellular retinoic acid binding protein; RDHs, retinol dehydrogenases; RALDHs, retinaldehyde dehydrogenases family (including ALDH1A1); RARE, retinoic acid receptor response element.

Here, we postulate that a lack of RA could impede nuclear translocation of alpha-synuclein, thus favoring accumulation and aggregation. The balance of RA's therapeutic and pathogenic roles needs to be elucidated.

As for other target organs, retinoid signaling is important for brain function throughout life. During development, retinoid signaling is a determinant for neuronal development, maturation and differentiation [1]. In particular, RA signaling is involved in the neurogenesis and differentiation of striatal neurons [24, 29–32]. Studies with transgenic mice demonstrate that RAR β was necessary for the differentiation of D1⁺ medium size spiny neurons of the striatum [29],

as well as the formation of striosomes [32]. Other studies show that ALDH1A1 was necessary for the expression of μ opioid receptors (highly expressed in striosomes) [24] while RALDH3 induced the GABAergic phenotype of striatal neurons through the synthesis of RA [31]. An *in vitro* study also showed that DARPP-32, a marker of medium size spiny neurons, was induced by RA [30]. The late phase of dopaminergic neuron differentiation is also linked to proteins involved in RA signaling, such as ALDH1A1 or NURR1 (an orphan nuclear receptor expressed in dopaminergic neurons that dimerizes with RXR) [33–36]. Interestingly, a recent study with embryonic carcinoma tissue showed that differentiation of cells

can follow striatal or dopaminergic fates, depending on the RAR subtypes that are activated [37].

In the adult brain, retinoid signaling is involved in synaptic plasticity [3, 5, 38]. On the one hand, vitamin A deficiency or dysfunction in RAR/RXR signaling (transgenic RXR^{-/-} and/or RAR^{-/-} mice) alters long term plasticity in the hippocampus [20, 39–42]. On the other hand, RA controls synaptic scaling, an essential mechanism that allows homeostatic synaptic plasticity [38]. When a neuronal network is deprived of excitatory activity, the strength of synapses is increased in order to compensate for this low activity, which is called synaptic scaling. RA is a major actor of synaptic scaling, through various processes depending on the system studied, such as externalization of AMPA receptors or internalization of GABA_A receptors [43–49]. Of note, these mechanisms can involve non-genomic action of RA and their receptors by stimulating local dendritic protein synthesis [38, 45, 50]. These mechanisms have been described in cell cultures or in the hippocampus, but rarely in the basal ganglia. One recent study showed that RA regulates levels of AMPA receptors in cultured nucleus accumbens neurons [51].

With aging, retinoid signaling remains necessary for brain function, however, aging processes and senescence eventually reduces vitamin A function and efficacy. Indeed, data show that the liver reduces its ability to release vitamin A and RA with age, which can lead to decreased bioavailability for target organs, especially the brain [18, 52, 53]. This leads to reduced neurogenesis and reduced dendritic tree arborization for pyramidal neurons in the hippocampus [18, 54]. Thus, the decreased bioavailability of vitamin A with age could contribute to age-related cognitive decline, and the development of neurodegenerative processes that underlie Alzheimer's disease and PD. Interestingly, increasing dietary vitamin A intake can prevent the decrease of vitamin A bioavailability [18, 53, 54]. Indeed, nutritional studies show that dietary vitamin A is stored in the liver and a proportion of vitamin A is directly transported to the brain through the portal vein system [55–57]. A recent study showed that this 'secondary pathway' for vitamin A absorption is particularly dedicated to the brain [57]. Moreover, vitamin A supplementation increases the amount of vitamin A absorption through this pathway, favoring brain supply and 'escaping' or by-passing liver storage [57]. Therefore, vitamin A supplementation may be a therapeutic lever to improve bioavailability of vitamin A, and thus retinoid signaling, in the brain.

Vitamin A and PD: Clinical studies

Epidemiological and clinical studies investigating the link between vitamin A or retinoids/carotenoids and PD have not shown a clear effect (Table 1). Original studies, meta-analyses and reviews have mainly found an absence of link between the disease and the dietary intake [58–66]. More recent studies found an association between low dietary intake of β -carotene, or low levels of blood α -carotene, β -carotene and lycopene with the progression of PD [67, 68]. These studies are based on nutritional intake or retinol blood levels, and therefore they do not provide information about the vitamin A status of patients, i.e., the bioavailability of vitamin A and RA for target organs, such as the brain. The level of retinol in the blood is correlated to nutritional intake, but is also tightly controlled by homeostatic processes to maintain a constant value around 2 μ g/ml [52]. Thus, the retinol level in the blood is not a reliable marker of vitamin A and RA functionality. More relevant measures would be gene expression of RA receptors (RAR/RXR) or retinol level in the cerebral spinal fluid [69]. Measuring RA concentration in the blood or the cerebral spinal fluid would also be more informative, but it is highly challenging due to its biochemical instability [70].

Of note, ALDH1A1, a synthetic enzyme for RA, has been described as a biomarker for PD, since its reduced expression has been found in the blood and brain of PD patients [71–73] (see below).

Vitamin A and PD: Preclinical studies

Despite the lack of association between dietary vitamin A and PD in humans, important links have been established between the pathophysiology of the disease and proteins involved in the metabolism of vitamin A and retinoids. Preclinical evidence for vitamin A's role in the pathogenesis of PD has been established by various manipulations of vitamin A and its pathways: dietary supplementation, dietary deficiency, knock-out mice for retinoid receptors, treatments with vitamin A derivatives *in vivo* or *in vitro*.

First, evidence came from the discovery that the development and fate of the nigro-striatal pathway is under the control of nuclear receptors from the retinoid receptor family, namely RAR, RXR and Nurr1 [8, 34, 36, 74, 75]. Of note, the striatum is the brain structure that expresses the most RAR β and RXR γ [11] and expression of D1 and D2 recep-

Table 1

Summary of the main clinical studies that have directly or indirectly investigated the relationship between vitamin A and Parkinson's disease

Design	Factors quantified	sample size	Method	SNc changes*	Main outcome(s)	Study
Cased-control study	Dietary factors in PD	103 sporadic PD, 103 control cases	Food frequency questionnaire		No association between consumption of vitamin A-containing foods and PD.	[58]
Cased-control study	Serum levels of retinoids in a PD case-control study	61 sporadic PD, 61 control cases	Whole blood collected		No association between carotenoids / retinoids serum levels and PD.	[62]
Cased-control study	Dietary factors in PD	144 sporadic PD, 432 control cases	Food frequency questionnaire		No association between consumption of vitamin A-containing foods and PD.	[63]
Cased-control study	Serum levels of retinoids in a PD case-control study	104 sporadic PD, 52 control cases	Venous blood collected		Serum level of β -carotene (but not retinol) is lower for PD patients compared to control, and is also lower in early PD group than in advanced PD group.	[67]
Cased-control study	Reduction of ALDH1A1 expression in DA neurons	13 sporadic PD, 14 control cases	Brain SNc sections	ALDH1A1 \searrow	ALDH1 mRNA is specifically and markedly down-regulated in DA neurons of SNc in PD.	[71]
Cased-control study	ALDH1A1 as a peripheral biomarker for diagnosing sporadic PD	22 sporadic PD, 33 control cases	Whole blood collected		ALDH1A1 is a biomarker with high sensitivity and specificity to identify the risk of developing PD.	[72]
Cased-control study	Reduction of ALDH1A1 expression in DA neurons	10 sporadic PD, 9 control cases	Brain SNc sections	ALDH1A1 \searrow DA neurons \searrow	The clustering of ALDH1A1-positive and -negative DA neurons in human SNc is different between PD and control cases. A reduction of ALDH1A1 may render DA neurons more prone to degenerate.	[73]
Cased-control study	Serum levels of retinoids in a PD case-control study	41 sporadic PD, 41 control cases	Whole blood collected		No significant changes of retinoids and carotenoids serum levels in PD patients.	[207]
Prospective study	Risk factors for PD	13,979 people at start; 395 incident PD and 2,320 control cases, 17 years later	Food frequency questionnaire		No significant association between vitamin A intake and PD.	[64]
Prospective study	Link between dietary antioxidant vitamins and risk of PD	371 incident PD in 124,221 population cohort	Food frequency questionnaire		High intakes of carotenoids do not appear to reduce the risk of PD.	[66]
Prospective study	Link between dietary antioxidant vitamins and risk of PD	1,329 incident PD in 84,774 population cohort	Food frequency questionnaire		Dietary intake of β -carotene is associated with a lower risk of PD.	[68]

*compared to control cases.

Table 2

Summary of the main studies relating the impact of vitamin A pathway alterations (dietary intake, receptors or ALDH1A1) in Parkinson's disease rodent models. VAD, vitamin A deficient; D1R, dopamine D1 receptor; D2R, dopamine D2 receptor; TH, tyrosine hydroxylase; DA, dopamine; DOPAC, 3,4-dihydroxyphenylacetic acid; 5HT, serotonin; HVA, homovanillic acid; A53T mice, transgenic mice that overexpress human α -synuclein with a PD-associated mutation (A53T)

Model	Behavioral tests	Motor behavior*	Striatal changes*	Survival of SNc neurons*	α -synuclein aggregation*	Study
A53T/aldh1a1 KO mice	Rotarod, open field	↘	↗ α -synuclein	↘	↗	[73]
RAR/RXR KO mice	Rotarod, open field	↘↘	D1R; D2R ↘↘			[76]
VAD rats	Rotarod, motor activity	↘↘	D1R, D2R, TH, DA/DOPAC = ChAT ↘↘			[84]
VAD rats	EEG recording, motor activity, open field	↘	DA and 5HT = DOPAC ↘			[85]
RAR β antagonist in mice	EEG recording	↘ wake periods	DOPAC and HVA = TH, D1R ↘ ratio HVA/DA ↘			[113]
aldh1a1 KO mice			baseline DA ↗ evoked DA ↘ DOPAC ↘	More TH ⁺ neurons		[133]
aldh1a1/aldh2 KO mice	Rotarod, open field, actimetry, gait, Y-maze	↘↘	DA, DOPAC, DOPAC/DA ↘ DOPAL ↗	↘		[134]

*compared to control group.

tors in the striatum is under the control of retinoid receptors [74, 76]. Furthermore, Nurr1 is an orphan nuclear receptor expressed in dopaminergic neurons that dimerize with RXR and has been linked to PD [75]. In mutant mice lacking RAR/RXR or Nurr1, dopaminergic neuron development was altered and associated with motor impairments in adult age [8, 36, 76]. These early observations indicate that retinoid receptors are involved in the development of the nigro-striatal pathway, with consequences on motor function, and it has been postulated that retinoids could be involved in the pathogenesis of PD (Table 2).

Later, important results have been obtained with the ligand of these receptors, namely RA or synthetic derivatives (Table 3). Injection of nanoparticles loaded with RA powerfully reduces dopamine neuron degeneration in the SNc in a mouse model of PD [77]. Similarly, pre-treatment with 9-cis RA reduces midbrain dopamine neuron loss in a rat model of PD [78], as well as neurotoxicity induced by methamphetamine [79]. Furthermore, protection of midbrain dopamine neurons is afforded by exogenous ligand activation of retinoid-related receptors (Nurr1-RXR heterodimers) [80, 81]. In particular, chronic *in vivo* injections of Nurr1:RXR α heterodimer activators in mouse models of PD reduce motor impairments,

increase TH⁺ neurons in the SNc and TH⁺ terminals in the striatum [80]. Vitamin A has also been shown, *in vitro*, to destabilize aggregates of α -synuclein [82], although a contrary result has been reported [83].

Beyond the use of retinoid derivatives, some studies have directly investigated the role of dietary vitamin A in the pathogenesis and pathophysiology of PD (Tables 2 and 3). Vitamin A deficient rats have motor impairments similar to those observed in rat models of PD or in mice lacking retinoid receptors [84]. Another study reported that vitamin A deficiency impaired dopaminergic transmission [85]. Furthermore, the only study that has investigated the impact of dietary vitamin A supplementation showed that vitamin A administration for 4 weeks before the 6-OHDA lesion in the SNc improved movement deficits in 6-OHDA rats [86]. While the behavioural improvement was small, the effect on neuronal survival was not clear. Therefore, more studies are needed with vitamin A supplementation in animal models.

From these preclinical studies, it is clear that vitamin A derivatives and their receptors are involved in the homeostasis of SNc dopaminergic neurons. However, direct involvement of vitamin A metabolism in the pathogenesis of PD has not been established.

Table 3

Summary of the main studies relating the impact of vitamin A pathway enhancement (dietary intake, vitamin A derivatives, or receptors ligands) in Parkinson's disease rodent models

PD model	Supplementation	<i>in vitro/in vivo</i>	Behavioral tests	Motor behavior*	Survival of SNc neurons*	SNc proteins changes*	Striatal proteins changes*	α -synuclein*	Neuroinfla.*	Ox. stress*	Study
Mice MPTP; 6-OHDA; AAV α -synuclein	NURR1:RXR α activator	Both	Rotarod	↗↗	↗↗	TH, DA ↗↗	TH ↗↗				[75]
MPTP mice	RA in striatum	<i>in vivo</i>			↗↗	TH, Pitx3, NURR1 ↗↗	TH, NURR1 (old mice) ↗↗				[77]
6-OHDA rats	9-cis RA (icv)	Both	Rotational test	↗	↗↗	TH ↗↗	DA release & clearance ↗↗				[78]
Metamphet. in rats	9-cis RA (icv)	Both	Motor activity	↗	↗↗		TH ↗				[79]
6-OHDA on mouse primary cultures	RXR agonists	<i>in vitro</i>			↗						[81]
α -synuclein	Vitamin A and β -carotene	<i>in vitro</i>						↘ α -synuclein fibrils			[82]
A53T mice	DHA; RXR over expression; 9-CIS RA	<i>in vitro</i>						↗ oligomers			[83]
6-OHDA rats	vit. A	<i>in vivo</i>	Rotarod	No effect	No effect	TH =	TH =		Iba-1 ↘ GFAP ↗	TNF- α , Il-1 β ↘	[86]

*compared to PD model without supplementation.

VITAMIN A AND DERIVATIVES FOR THE PROTECTION OF DOPAMINERGIC NEURONS IN THE BRAIN

Antioxidant power of vitamin A

Oxidative stress is defined as 'an imbalance between the oxidants and antioxidants in favor of the oxidants, leading to a disruption of redox signaling and control and/or molecular damage' [87, 88] and is a factor for neuronal degeneration in PD [89]. In this context, oxidative stress refers mainly to the formation of free radicals, reactive oxygen species (ROS) that are overproduced by complex I and II of mitochondria in dopaminergic neurons [90]. These free radicals are toxic for cells due to their reactivity and ability to damage biochemical elements. In physiological conditions, the balance between oxidants and antioxidants is maintained by enzymatic antioxidants and non-enzymatic oxidants, and retinoids are part of the antioxidant system [88]. In parkinsonism, accumulation of excessive free radicals in dopaminergic neurons underlies dysfunction of mitochondrial complex I [90, 91]. The origin of this dysfunction is not known and likely to be multiple. Yet, some features of midbrain dopaminergic neurons are thought to favor oxidative stress: (i) their highly branched unmyelinated axons have high bioenergetic demands [92], (ii) pacemaker activity of these neurons (2–10 Hz) produces a constant relatively high level of intracellular calcium level and thus causes a continuous bioenergetic burden for calcium buffering [93, 93], and (iii) metabolism of dopamine creates ROS metabolites that interfere with the function of mitochondrial complex I [90, 93]. Of note, dopamine-3,4-dihydroxyphenylacetaldehyde (DOPAL) is a highly reactive metabolite of dopamine that exacerbates α -synuclein aggregation [94]. These features are not exhaustive and other pro-oxidant factors in dopaminergic neurons, such as metals, do exist (for review, see [89]). Together, multiple sources of free radical production are proposed to explain the vulnerability of midbrain dopaminergic neurons to degenerate in PD.

Retinoids and carotenoids are antioxidants due to their ability to inhibit peroxidation, scavenge free radicals and maintain the balance between oxidants and antioxidants [91, 95–98]. However, studies indicate that high doses of vitamin A supplementation can conversely induce an imbalance between oxidants and pro-oxidants, in favor of oxidants [99–101]. Most

of the data concerning the antioxidant role of vitamin A and associated retinoids have been collected from the heart or liver, but data have rarely explored the antioxidant (or pro-oxidant) role of vitamin A in the neurodegeneration of dopaminergic neurons. Indeed, the role of antioxidants in the progression of PD has been investigated for other vitamins, such as vitamin E or vitamin C [91], but not directly for vitamin A or other retinoids. Therefore, the role of dietary vitamin A on oxidative stress in PD remains to be explicitly studied.

The neuroinflammation action of vitamin A

Neuroinflammation is a common feature of neurodegenerative diseases. Even though the role of neuroinflammation in the pathophysiology of these diseases is established [102], involvement of neuroinflammation in their pathogenesis is not yet demonstrated. However, reducing neuroinflammation is generally a way to curtail disease progression and several pharmacological agents have been tested to address this gap in understanding.

In this context, it is logical to investigate the potential anti-inflammatory role of vitamin A in PD. Indeed, vitamin A is involved in the development, maturation and differentiation of immune organs and cells [103]. Moreover, vitamin A has the propensity to reduce pro-inflammatory factors and enhance anti-inflammatory factors, in the periphery as well as in the brain [104, 105]. Specific to neuroinflammation, *in vitro* studies demonstrate that application of RA to astrocytes or microglial cells reduces inflammatory responses induced by lipopolysaccharide (LPS), a bacterial endotoxin [106, 107]. Related to PD, a study clearly demonstrated that pharmacological stimulation of RAR *in vitro* and *in vivo* reduces neurodegeneration of midbrain dopaminergic neurons induced by an immune challenge. A more recent study observed a protective effect of dietary vitamin A in a rat model of PD by reducing pro-inflammatory factors (TNF- α , IL-1 β , Iba-1), which was accompanied with an increase in GFAP staining, suggesting increased astrocytic reactivity [86].

The role of retinoids in dampening neuroinflammation appears an important mechanism to impede neurodegeneration in PD. However, given the limited number of preclinical studies, more research is needed to better understand the underlying mechanisms.

In PD, the classical scheme of neuroinflammation indicates that pro-inflammatory factors are produced

by activated microglia and astrocytes. In addition, pro-inflammatory factors released by peripheral macrophages can penetrate brain tissue because the blood-brain barrier becomes leaky [108]. It is likely that these pro-inflammatory factors contribute to oxidative stress in dopaminergic neurons, which further activate neuroinflammatory processes [60, 102, 108, 109].

Related to neuroinflammation and oxidative stress, studies exploring the role of vitamin A metabolism in the control of circadian rhythms and sleep deserve attention. A main prodromal symptom observed in PD is sleep disorder [110] and it is also observed in rat models of PD [111]. These sleep disorders are mainly a lack of REM sleep, but can also exhibit other forms of sleep deficits. Retinoid signaling is involved in sleep wave rhythms, as demonstrated in mice with RAR KO mice [112], vitamin A deficiency [85] or pharmacological inhibitors [113]. Importantly, these studies also highlight that reduced vitamin A function induced changes in sleep wave rhythms that were associated with alterations in striato-nigral dopaminergic transmission [85, 113].

In addition, circadian rhythms are also altered in PD, which could contribute (even initiate) to the vicious cycle between neuroinflammation and oxidative stress [114]. Multiple evidence shows that vitamin A, through RA and RAR/RXR receptors, controls the gene of the circadian oscillator [115].

Vitamin A and neurogenesis

Under physiological conditions, neurogenesis happens in restricted regions of the adult mammalian brain such as the subgranular zone of hippocampal dentate gyrus and the subventricular zone (SVZ) of lateral ventricles, two areas that neural stem cells develop [116]. Neurogenic niches are endogenous sources for new neurons that can be used for brain repair strategies [117]. It has been demonstrated that RA is necessary for adult hippocampal neurogenesis [3, 118]. Indeed, nutritional vitamin A deficiency induced spatial memory deficits and adult hippocampal neurogenesis alterations, that are corrected by RA treatment or vitamin A supplementation in rodents [119, 120].

In rodent models of PD, due to the proximity of the SVZ with the striatum (and thus dopaminergic afferences), stem cells from this area can be recruited following a lesion. Some studies have established the potential therapeutic benefit of neurotrophic factors and proposed them as suitable

candidates for stimulating neurogenesis after induction of neurodegeneration [121]. Among these neurotrophic factors, CDNF (cerebral dopamine neurotrophic factor) is the most promising treatment for PD due to its selective effects on dopaminergic neurons. Thus, it has been shown that intra-SVZ administration of CDNF enhances the proliferation and migration of neural stem cells toward the 6-hydroxydopamine (6-OHDA)-lesioned striatum accompanied by improvement of motor dysfunctions in parkinsonian rats [122].

In this context, vitamin A and RA are also promising molecules to enhance the generation and long-term survival of SVZ-derived neurons after PD lesions. Indeed, RA is a potent mitogen for SVZ neuroblasts, and is required for their migration to the olfactory bulb [123]. More recently, the manipulation of endogenous stem cell populations from the SVZ created an opportunity to induce neurogenesis and influence brain regenerative capacities in the adult brain. Herein, new approaches demonstrated the ability of RA loaded-nanoparticles to induce neurogenesis exclusively after being internalized by SVZ stem cells both *in vivo* and *in vitro* [124–126]. Similarly, combined RA treatment with environmental enrichment enhanced the generation and long-term survival of SVZ-derived striatal neurons after stroke [127].

These data indicate that recruiting endogenous SVZ neural stem cells toward striatal regions exhibiting retrograde degeneration of dopaminergic afferents in PD brains by stimulating retinoid signaling could be a way to slow down the neurodegeneration of nigrostriatal dopaminergic neurons, and to allow functional recovery. Retinoids could also be used as a molecular factor to improve the durability of cell grafts that are currently developed to promote cell repair [4, 128]. In this later case, retinoid signaling could be envisaged as a treatment strategy.

Pivotal role for ALDH1A1

Beside the potential role for vitamin A to control neuroinflammation and oxidative stress, vitamin A's action may also be specific to dopaminergic neurons by controlling the retinaldehyde dehydrogenase 1 (ALDH1A1) enzyme.

As mentioned above, RA in the adult brain controls homeostasis of dopaminergic neurons and dopaminergic transmission by controlling the expression of tyrosine hydroxylase, D2-like receptors, and the RA synthetic enzyme, ALDH1A1 [3]. ALDH1A1 is a

retinaldehyde dehydrogenase enzyme that is part of the aldehyde dehydrogenase superfamily of enzymes whose main function is to synthesize RA from retinal [129] (Figs. 1 and 2). These enzymes form a vast family that has multiple functions, such as acetaldehyde detoxification [129]. It exists as 3 isotypes of RALDH: RALDH1 (ALDH1A1), RALDH2 and RALDH3. ALDH1A1 is coded by the gene *Aldh1a1* but the enzyme has multiple names in the literature: Ald1a1, RALDH1, ALDH1, Ahd2. Excluding dopaminergic neurons, RALDH2 is the main isotype expressed in the brain [130]. Dopaminergic neurons are unique in the brain because they are the only ones to express the ALDH1A1 isotype in the adult brain [21]. Specifically, only a subset of midbrain dopaminergic neurons in the SNc and ventral tegmental area express this enzyme [131], making ALDH1A1 a marker for this subpopulation. This dopaminergic subpopulation is interconnected with striatal neurons and mice lacking these neurons display motor impairments [132]. Mice lacking the ALDH1A1 enzyme also display motor impairments and alterations in dopamine release [132–134], consistent with associated motor deficits and reduced levels of ALDH1A1 reported from clinical studies [71–73] (Table 1). Remarkably, ALDH1A1^{-/-} mice also display a lack of mu opioid receptors MOR1 expression in striosomes compartments [24, 25].

In addition to these preclinical data brought by ALDH1A1^{-/-} mice, it appears that ALDH1A1 labelled neurons correspond to the dopaminergic subpopulation that is the most vulnerable to degeneration in PD [135, 136]. Specifically, data obtained from humans and rodent models of PD indicate that neurons that degenerate early are those that express the gene *Aldh1a1* coding for ALDH1A1 [73, 131, 137].

This raises the question of why ALDH1A1 expressing neurons are more vulnerable in PD? Is ALDH1A1 a marker for neuroprotection or neurodegeneration? ALDH1A1 is neuroprotective, because these dopaminergic neurons stop expressing ALDH1A1 before degenerating [71, 73, 137]. Importantly, these observations are not only based on animal studies, since a reduction of ALDH1A1⁺ neurons has also been observed in the SNc of patients with PD [137]. Therefore, the scenario envisaged is that ALDH1A1⁺ neurons stop expressing ALDH1A1 (for unknown reasons, discussed later), which triggers their degeneration. In support with this, accumulating data show that ALDH1A1, beyond synthesizing RA, plays an essential detoxifying role. Indeed, ALDH1A1 has the ability to degrade

DOPAL, a highly oxidizing dopamine metabolite that induces oxidative stress and aggregation of α -synuclein proteins [94]. Thus, DOPAL could be a major contributor to dopaminergic neuron loss in PD, whereas ALDH1A1 would preserve dopamine neurons by degrading DOPAL [73, 94, 137, 138]. This potential mechanism is consistent with the 'catecholaldehyde hypothesis' [139–141].

In support of the catecholaldehyde hypothesis, unintentional over-inhibition of ALDH1A in humans has produced patients with parkinsonism symptoms, following disulfiram (used as Antabuse® for the treatment of alcoholism) intoxication [142, 143]. Furthermore, the toxicity of some pesticides, such as benomyl or rotenone, is due to the inhibition of aldehyde dehydrogenase enzymes [138, 144–146]. However, in these articles, the ALDHs that are studied are mostly mitochondrial ones and ALDH1A1 is not investigated. Still, pesticide exposure is a known cause of PD and these studies highlight the crucial role of ALDH enzymes in the survival of dopaminergic neurons.

Beyond this pharmacological/exogenous inhibition of ALDH1A1, we do not know why and how dopaminergic neurons stop expressing ALDH1A1 in parkinsonian patients. Nevertheless, ALDH1A1 expression is controlled by retinoid signaling. Knowing that ALDH1A1 expression may be an important prodromal biomarker for PD [73, 137], we propose the novel hypothesis that vitamin A metabolism is involved in PD pathogenesis. Indeed, ALDH1A1 expression is modulated by RA levels. More precisely, RA stimulates the expression of PITX3, a transcription factor that controls expression of ALDH1A1 [77, 147, 148]. Mice deficient for PITX3 exhibit strong dopamine loss in the SNc [149–151] and exhibit motor symptoms that are similar to animals with neurotoxic lesions [152, 153], which can be reversed by RA administration [147].

In support of our hypothesis that vitamin A metabolism is involved in PD pathogenesis, we recently showed that aging in rats is accompanied by a decreased bioavailability of RA in the brain [18]. Since aging is the greatest risk factor for PD, the collapse of retinoid signaling in the brain could be a contributing factor in a vicious cycle leading to degeneration of ALDH1A1 + dopaminergic neurons in the SNc. This proposed mechanism is presented in Fig. 3. Multiple, disparate evidence supports our hypothesis. However, the real association between vitamin A status, RA bioavailability and dopaminergic neuron loss in PD remains to be demonstrated.

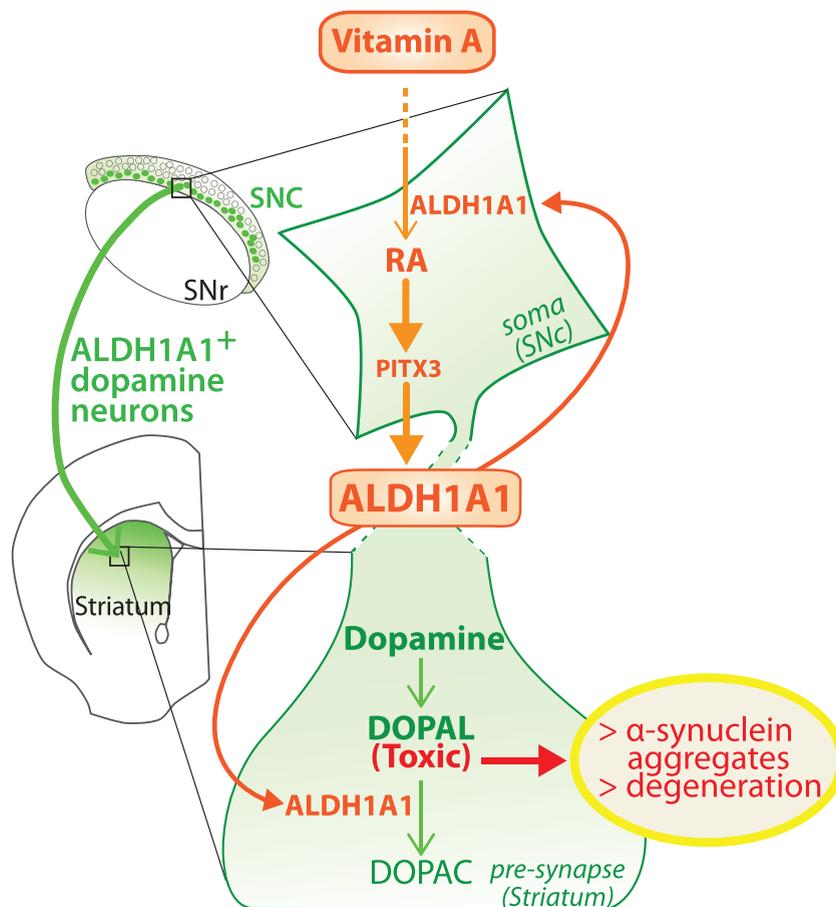


Fig. 3. Model of the dual role played by ALDH1A1 in the nigro-striatal pathway. ALDH1A1 is involved in the metabolic pathway of RA because it synthesizes RA from retinal. In parallel, ALDH1A1 is involved in catabolic pathway of dopamine because it degrades DOPAL to DOPAC. Considering that RA controls the expression of ALDH1A1 through PITX3, the model proposes that ALDH1A1 expression is controlled by vitamin A bioavailability. SNc, substantia nigra pars compacta; SNr, substantia nigra pars reticulata.

This proposed mechanism also raises further questions about the subpopulation of dopaminergic neurons that do not express ALDH1A1. Do dopamine neurons without ALDH1A1 produce DOPAL? If yes, what are the enzymes responsible for DOPAL degradation in these neurons? What enzyme isoforms are expressed? Furthermore, data indicate that ALDH1A1 determines the GABAergic nature of neurons from the SNc [31, 154], which is in contrast (but not necessarily in contradiction) with data indicating that RA is involved in the development of dopaminergic pathways [8, 34, 36, 74, 75].

In conclusion, data support the theory that ALDH1A1 is a pivotal enzyme for understanding the role of vitamin A in the neurodegeneration of dopaminergic neurons, but further investigations are needed to confirm and strengthen these data.

PERIPHERAL ACTIONS OF VITAMIN A IN PD

The enteric nervous system (ENS)

The ENS is the autonomous nervous system of the gastrointestinal (GI) tract and it is connected to autonomous and central nervous systems by the vagus nerve. ENS neurons are remarkable in their diversity, and they are highly organized [155]. In particular, the ENS is rich in dopaminergic neurons.

GI dysfunctions, such as constipation or slowed gastric emptying, are symptoms frequently observed in PD, which can appear years before motor symptoms [156, 157]. These prodromal symptoms are thought to be related to altered ENS function. Since Lewy bodies and alpha-synuclein aggregates have

been found in the ENS and dorsal motor nucleus of the vagus nerve in PD patients, the disease may originate from enteric alpha-synucleopathy and reach midbrain dopamine neurons through the dorsal motor nucleus of the vagus nerve [158]. These mechanisms may involve dopaminergic neurons and/or epithelial cells that produce dopamine, for the same reasons outlined earlier for CNS dopaminergic neurons. Since proposing this hypothesis in 2003, numerous preclinical and clinical studies have been conducted [159–164]. In rodents, alpha-synuclein transport from the GI to the midbrain and associated motor impairments have recently been demonstrated [157, 164, 165]. In humans, some evidence highlights the link between GI dysfunction, synucleopathy in the ENS and severity of PD symptoms [157, 164]. However, this evidence has also been rebutted by other studies [166–169]. Therefore, the precise role of ENS synucleopathy in the pathophysiology of PD is still under debate.

In this context, we wonder whether vitamin A can protect ENS neurons via similar mechanisms proposed for midbrain dopaminergic neurons. RA plays a critical role in the development and differentiation of ENS neurons [170]. As for central dopaminergic neurons, we could extrapolate that factors involved in the development of ENS neurons are also critical for their survival at adult age. In addition, vitamin A deficiency in rats reduces the number of cholinergic and nitrergic neurons in the ENS, which is associated with altered colon motility [171]. Interestingly, reduced colon contractility has also been found in RALDH KO mice [172]. However, the impact of vitamin A deficiency on ENS dopaminergic neurons does not appear to have been investigated. From these data, we can *postulate* that vitamin A metabolism is important for survival of ENS dopaminergic neurons, and may protect from their degeneration, but more research is needed.

The gut microbiome

Gut microbiota composition has recently become a focus for PD researchers [173–176]. A key study in 2016 demonstrated that human gut microbiota from Parkinson's patients worsens motor symptoms in a mouse model of PD [177]. Furthermore, a two-year follow-up study revealed that low counts of specific bacteria such as *Bifidobacterium* (Actinobacterium phylum) and *B. fragilis* (Bacteroidetes phylum) at the beginning of the study was associated with much worse symptoms of the disease two years later [178].

However, there is still a lack of preclinical and clinical data explaining the links between impoverished gut microbiome and progression of PD [179, 180].

Vitamin A deficiency may alter gut microbiota. In mice, vitamin A deficiency reduces bacteria from the Bacteroidetes phylum (to whom *B. fragilis* belongs to), which altered energy homeostasis of the animal overall, and resulted in glucose and insulin intolerance [181, 182]. Young rats from vitamin A deficient mothers also displayed a dysbiosis of colonic mucosal microbiota, in particular with reduced members of the Bacteroidetes phylum [183]. Another study revealed that retinol, but not other retinoids such as RA or beta-carotene, inhibits growth of *B. vulgatus* [184]. As a consequence, vitamin A deficiency in mice increases the growth of *B. vulgatus*, but the consequence of this imbalance was not evaluated. Conversely, RA is needed for *Bifidobacterium* growth [185].

Thus, two observations may converge; vitamin A likely modulates gut microbiota composition, and PD is associated with specific microbiota modifications. However, the lack of studies about microbiota related to PD, as well as related to vitamin A is too significant to draw any hypothesis about the mechanisms linking vitamin A dysfunction to microbiota changes in PD.

Link between vitamin A and other hormones through RXR dimerization

Finally, vitamin A may influence the development of PD pathophysiology indirectly via hormonal systems. Indeed, RXRs have a particular role because they are dimer partners (sometimes obligatory) for multiple nuclear receptors, such as thyroid receptor (TR), Nurr1, Nur77 or vitamin D receptor (VDR). Thus, retinoids (9CDHRA in particular) through their binding to RXRs are at a crossroad between multiple hormonal pathways, and vitamin A is considered a hormone [186]. Furthermore, expression of RXRs themselves are controlled by retinoids, therefore, vitamin A status can regulate the function of RXRs [187, 188]. In the context of PD, the bioavailability of vitamin A can thus have an impact on hormonal systems, which affect symptom progression, health and wellbeing, but this interaction could be easily overlooked.

The case of thyroid hormones

Thyroid receptors (TRs) are nuclear hormone receptors for which heterodimerization with RXR is obligatory. More precisely, RXR modulates the

action of TR with the outcome dependent on the ligands of both receptors [17]. Vitamin A deficiency is associated with altered thyroid function, while hypothyroidism is associated to decreased RAR in humans [189]. RA modulates the expression of proteins involved in thyrocyte function and can stimulate their differentiation [189]. Vitamin A and thyroid metabolisms are thus intricately linked even though underlying mechanisms are not fully understood. With aging, levels of both RARs and TRs are decreased as shown in rats and humans [53, 190–193]. However, studies diverge on RA's ability to restore TR mRNA levels in aged rats [53, 190–192]. Furthermore, thyroid hormones stimulate metabolism and can increase the production of ROS by mitochondria [194]. Thus, thyroid dysfunction may be involved in idiopathic PD pathophysiology through oxidative stress. In a preclinical study, increased levels of T3 have been found in 6-OHDA lesioned rats suggesting that central dopaminergic denervation can act on thyroid levels at the periphery, possibly through dysfunction

of hypothalamic-pituitary axis [195]. In patients, thyroid hormone function has been poorly documented so far and results are mitigated. One study indicated that subclinical hypothyroidism was more frequent in PD patients [196]. Another study indicated an association between the severity of motor symptoms and level of free circulating thyroid hormones (fT3) [197]. However, hypothyroidism did not differ significantly between parkinsonian patients and controls in a third study [198]. Therefore, due to the lack of studies the interaction between vitamin A and thyroid function in the pathophysiology of PD has not been established. Further investigations should be conducted, particularly in patients with idiopathic origin, who are over 60 years of age at the time of diagnosis, an age where the thyroid function can be impaired by aging processes.

The case of vitamin D

Vitamin D is renowned for its roles in immune function and maintaining bone density (through the control of calcium serum levels). As for TRs, expres-

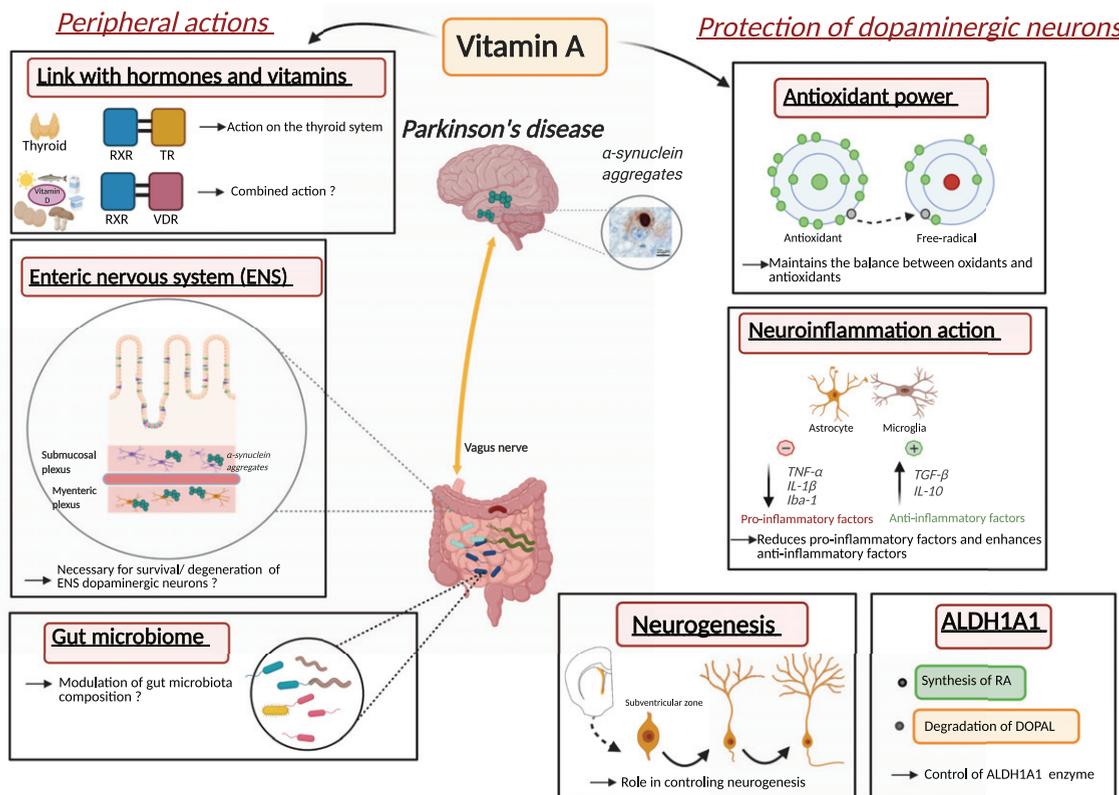


Fig. 4. Proposed roles and mechanisms of vitamin A metabolism in the pathophysiology of Parkinson's disease. Inset with α-synuclein aggregates from [110].

sion of vitamin D nuclear receptors (VDRs) is controlled by RA, and RXR is an obligatory heterodimer for VDRs [199]. A correlation between vitamin D levels and PD has been observed, but vitamin D supplementation has not significantly reduced disease status [200–202]. The SNc and the striatum are two structures highly enriched for VDR and 1 α -hydroxylase, the enzyme that synthesizes the active form of vitamin D [203]. Pre-clinical data show that vitamin D protects dopaminergic neurons from oxidative stress [199, 203–206]. *In vitro*, low (but not high) doses of the active form of vitamin D protects dopaminergic neurons (primary mesencephalic cultures) from toxins [204]. *In vivo*, treatment with the active form of vitamin D 1 week before 6-OHDA lesion in rats increases motor activity, dopamine content in the striatum and number of TH⁺ neurons [205, 206]. These studies suggest that the positive effect of vitamin D is mediated by its antioxidant effect. Thus, beyond the interactions that may exist between vitamins A and D in the immune system, these two vitamins may act synergistically in the brain. However, the combined action of vitamins D and A on the survival of dopaminergic neurons in PD, notably through their partner nuclear receptors, has not been investigated. Yet, this constitutes an interesting avenue with easily translatable therapeutic outcome.

CONCLUSION

This review explored multiple mechanisms that vitamin A metabolism may contribute to PD pathogenesis and PD pathophysiology. Indeed, altered vitamin A metabolism and bioavailability is likely to contribute to oxidative stress, neuroinflammation, dopaminergic cell death, disturbance in biological rhythms and endocrine homeostasis (Fig. 4). Thus, vitamin A, as a nutritional factor may be at the crossroad of multiple environmental and genetic factors of PD. Still, the central underlying role that decreased vitamin A metabolism may have in PD has been largely ignored. This may be due to the lack of adapted methods for quantifying vitamin A metabolism and bioavailability in humans.

From our overview, we propose that vitamin A metabolism may be involved in the pathogenesis and pathophysiology of PD in multiple ways (Fig. 4). Of note, other possible ways have not been discussed here, such as the potential role of retinoids in autophagy. At this stage, the most promising way

by which vitamin A metabolism may influence PD pathogenesis and treatment is through the impact of vitamin A on ALDH1A1 expression and neuroinflammation. A first step is to understand the role of ALDH1A1 in controlling dopaminergic cell survival, within the schema of the catecholaldehyde hypothesis. However, other mechanisms of vitamin A metabolism are likely relevant including oxidative stress, neurogenesis in the SVZ, ENS function and microbiota, thyroid hormone and vitamin D function, but more data are needed to fully understand the role of individual or combined mechanisms.

Finally, it is important to keep in mind that pharmacological treatments with retinoids have been studied for a long time and these drugs have to be used in precise conditions to preclude side effects [7]. In this framework, targeting vitamin A, and not RA and its receptors, may be a more conservative strategy since vitamin A supplementation increases bioavailability for the brain, and is better managed by organisms than derivatives, with fewer side effects. Together, a better understanding of the role played by vitamin A metabolism in PD could open the way for new approaches to dampen symptoms and improve health and wellbeing for PD patients.

ACKNOWLEDGMENTS

This work was supported by funding from France Parkinson, Health Research Council (17–284) and Brain Research New Zealand

CONFLICT OF INTEREST

The authors have no conflict of interest to report.

REFERENCES

- [1] Maden M (2007) Retinoic acid in the development, regeneration and maintenance of the nervous system. *Nat Rev Neurosci* **8**, 755-765.
- [2] Goodman AB (2006) Retinoid receptors, transporters, and metabolizers as therapeutic targets in late onset Alzheimer disease. *J Cell Physiol* **209**, 598-603.
- [3] Lane MA, Bailey SJ (2005) Role of retinoid signalling in the adult brain. *Prog Neurobiol* **75**, 275-293.
- [4] Puttagunta R, Di Giovanni S (2011) Retinoic acid signaling in axonal regeneration. *Front Mol Neurosci* **4**, 59.
- [5] Shearer KD, Stoney PN, Morgan PJ, McCaffery PJ (2012) A vitamin for the brain. *Trends Neurosci* **35**, 733-741.
- [6] Sodhi RK, Singh N (2014) Retinoids as potential targets for Alzheimer's disease. *Pharmacol Biochem Behav* **120**, 117-123.
- [7] Clark JN, Whiting A, McCaffery P (2020) Retinoic acid receptor-targeted drugs in neurodegenerative disease. *Expert Opin Drug Metab Toxicol* **16**, 1097-1108.

- [8] Eichele G (1997) Retinoids: From hindbrain patterning to Parkinson disease. *Trends Genet* **13**, 343-345.
- [9] Asson-Batres MA, Rochette-Egly C, eds. (2016) *The Biochemistry of Retinoid Signaling II: The Physiology of Vitamin A - Uptake, Transport, Metabolism and Signaling*, Springer Netherlands, Dordrecht.
- [10] Sauvant P, Feart C, Sauvant J, Pallet V (2015) Vitamin A and cognitive impairment. In *Diet and Nutrition in Dementia and Cognitive Decline*, Elsevier, pp. 623-635.
- [11] Krężel W, Kastner P, Chambon P (1999) Differential expression of retinoid receptors in the adult mouse central nervous system. *Neuroscience* **89**, 1291-1300.
- [12] Krężel W, Rühl R, de Lera AR (2019) Alternative retinoid X receptor (RXR) ligands. *Mol Cell Endocrinol* **491**, 110436.
- [13] Rühl R, Krężel W, de Lera AR (2018) 9-Cis-13,14-dihydroretinoic acid, a new endogenous mammalian ligand of retinoid X receptor and the active ligand of a potential new vitamin A category: Vitamin A5. *Nutr Rev* **76**, 929-941.
- [14] Kojetin DJ, Matta-Camacho E, Hughes TS, Srinivasan S, Nwachukwu JC, Cavett V, Nowak J, Chalmers MJ, Marciano DP, Kamenecka TM, Shulman AI, Rance M, Griffin PR, Bruning JB, Nettles KW (2015) Structural mechanism for signal transduction in RXR nuclear receptor heterodimers. *Nat Commun* **6**, 8013.
- [15] Niewiadomska-Cimicka A, Krzyżosiak A, Ye T, Podleśny-Drabiniok A, Dembélé D, Dollé P, Krężel W (2017) Genome-wide analysis of RAR β transcriptional targets in mouse striatum links retinoic acid signaling with Huntington's disease and other neurodegenerative disorders. *Mol Neurobiol* **54**, 3859-3878.
- [16] Blomhoff R, Blomhoff HK (2006) Overview of retinoid metabolism and function. *J Neurobiol* **66**, 606-630.
- [17] Li D, Yamada T, Wang F, Vulin AI, Samuels HH (2004) Novel roles of retinoid X receptor (RXR) and RXR ligand in dynamically modulating the activity of the thyroid hormone receptor/RXR heterodimer. *J Biol Chem* **279**, 7427-7437.
- [18] Dumetz F, Buré C, Alfons S, Bonneu M, Richard E, Touyarot K, Marie A, Schmitter J-M, Bosch-Bouju C, Pallet V (2020) Normalization of hippocampal retinoic acid level corrects age-related memory deficits in rats. *Neurobiol Aging* **85**, 1-10.
- [19] Noy N (2016) Vitamin A transport and cell signaling by the retinol-binding protein receptor STRA6. In *The Biochemistry of Retinoid Signaling II: The Physiology of Vitamin A - Uptake, Transport, Metabolism and Signaling*, Asson-Batres MA, Rochette-Egly C, eds. Springer Netherlands, Dordrecht, pp. 77-93.
- [20] McCaffery P, Zhang J, Crandall JE (2006) Retinoic acid signaling and function in the adult hippocampus. *J Neurobiol* **66**, 780-791.
- [21] 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.
- [22] Zetterström RH, Lindqvist E, Mata de Urquiza A, Tomac A, Eriksson U, Perlmann T, Olson L (1999) Role of retinoids in the CNS: Differential expression of retinoid binding proteins and receptors and evidence for presence of retinoic acid. *Eur J Neurosci* **11**, 407-416.
- [23] Ferreira R, Napoli J, Enver T, Bernardino L, Ferreira L (2020) Advances and challenges in retinoid delivery systems in regenerative and therapeutic medicine. *Nat Commun* **11**, 4265.
- [24] Pan J, Yu J, Sun L, Xie C, Chang L, Wu J, Hawes S, Saez-Atienzar S, Zheng W, Kung J, Ding J, Le W, Chen S, Cai H (2019) ALDH1A1 regulates postsynaptic μ -opioid receptor expression in dorsal striatal projection neurons and mitigates dyskinesia through transsynaptic retinoic acid signaling. *Sci Rep* **9**, 3602.
- [25] Sgobio C, Wu J, Zheng W, Chen X, Pan J, Salinas AG, Davis MI, Lovinger DM, Cai H (2017) Aldehyde dehydrogenase 1-positive nigrostriatal dopaminergic fibers exhibit distinct projection pattern and dopamine release dynamics at mouse dorsal striatum. *Sci Rep* **7**, 5283.
- [26] Davidi D, Schechter M, Elhadi SA, Matatov A, Nathanson L, Sharon R (2020) α -Synuclein Translocates to the Nucleus to Activate Retinoic-Acid-Dependent Gene Transcription. *iScience* **23**, 100910.
- [27] Bozelli JC, Kamski-Hennekam E, Melacini G, Epand RM (2021) α -Synuclein and neuronal membranes: Conformational flexibilities in health and disease. *Chem Phys Lipids* **235**, 105034.
- [28] Colom-Cadena M, Pegueroles J, Herrmann AG, Henstridge CM, Muñoz L, Querol-Vilaseca M, Martín-Paniello CS, Luque-Cabecerans J, Clarimon J, Belbin O, Núñez-Llaves R, Blesa R, Smith C, McKenzie C-A, Frosch MP, Roe A, Fortea J, Andilla J, Loza-Alvarez P, Gelpi E, Hyman BT, Spires-Jones TL, Lleó A (2017) Synaptic phosphorylated α -synuclein in dementia with Lewy bodies. *Brain* **140**, 3204-3214.
- [29] Rataj-Baniowska M, Niewiadomska-Cimicka A, Paschaki M, Szyszka-Niagolov M, Carramolino L, Torres M, Dollé P, Krężel W (2015) Retinoic acid receptor β controls development of striatonigral projection neurons through FGF-dependent and Meis1-dependent mechanisms. *J Neurosci* **35**, 14467-14475.
- [30] Pedrini S, Bogush A, Ehrlich ME (2008) Phosphatidylinositol 3-kinase and protein kinase C zeta mediate retinoic acid induction of DARPP-32 in medium size spiny neurons *in vitro*. *J Neurochem* **106**, 917-924.
- [31] Chatzi C, Brade T, Duester G (2011) Retinoic acid functions as a key GABAergic differentiation signal in the basal ganglia. *PLoS Biol* **9**, e1000609.
- [32] Liao W-L, Tsai H-C, Wang H-F, Chang J, Lu K-M, Wu H-L, Lee Y-C, Tsai T-F, Takahashi H, Wagner M, Ghyselinck NB, Chambon P, Liu F-C (2008) Modular patterning of structure and function of the striatum by retinoid receptor signaling. *Proc Natl Acad Sci U S A* **105**, 6765-6770.
- [33] Cardoso T, Lévesque M (2020) Toward generating subtype-specific mesencephalic dopaminergic neurons *in vitro*. *Front Cell Dev Biol* **8**, 443.
- [34] Hegarty SV, Sullivan AM, O'Keefe GW (2013) Midbrain dopaminergic neurons: A review of the molecular circuitry that regulates their development. *Dev Biol* **379**, 123-138.
- [35] Wallén Å, Zetterström RH, Solomin L, Arvidsson M, Olson L, Perlmann T (1999) Fate of mesencephalic AHD2-expressing dopamine progenitor cells in Nurr1 mutant mice. *Exp Cell Res* **253**, 737-746.
- [36] Zetterström RH, Solomin L, Jansson L, Hoffer BJ, Olson L, Perlmann T (1997) Dopamine neuron agenesis in Nurr1-deficient mice. *Science* **276**, 248-250.
- [37] Podleśny-Drabiniok A, Sobska J, de Lera AR, Golembiowska K, Kamińska K, Dollé P, Cebrat M, Krężel W (2017) Distinct retinoic acid receptor (RAR)

- isotypes control differentiation of embryonal carcinoma cells to dopaminergic or striatopallidal medium spiny neurons. *Sci Rep* **7**, 13671.
- [38] Chen L, Lau AG, Sarti F (2014) Synaptic retinoic acid signaling and homeostatic synaptic plasticity. *Neuropharmacology* **78**, 3-12.
- [39] Chiang MY, Misner D, Kempermann G, Schikorski T, Giguère 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.
- [40] 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.
- [41] Nomoto M, Takeda Y, Uchida S, Mitsuda K, Enomoto H, Saito K, Choi T, Watabe AM, Kobayashi S, Masushige S, Manabe T, Kida S (2012) Dysfunction of the RAR/RXR signaling pathway in the forebrain impairs hippocampal memory and synaptic plasticity. *Mol Brain* **5**, 8.
- [42] Dumetz F, Giniès R, Buré C, Marie A, Alfos S, Pallet V, Bosch-Bouju C (2020) Neuronal morphology and synaptic plasticity in the hippocampus of vitamin A deficient rats. *Nutr Neurosci*, doi: 10.1080/1028415X.2020.1809877
- [43] Aoto J, Nam CI, Poon MM, Ting P, Chen L (2008) Synaptic signaling by all-trans retinoic acid in homeostatic synaptic plasticity. *Neuron* **60**, 308-320.
- [44] Wang H-L, Zhang Z, Hintze M, Chen L (2011) Decrease in calcium concentration triggers neuronal retinoic acid synthesis during homeostatic synaptic plasticity. *J Neurosci* **31**, 17764-17771.
- [45] Sarti F, Zhang Z, Schroeder J, Chen L (2013) Rapid suppression of inhibitory synaptic transmission by retinoic acid. *J Neurosci* **33**, 11440-11450.
- [46] Arendt KL, Zhang Y, Jurado S, Malenka RC, Südhof TC, Chen L (2015) Retinoic acid and LTP recruit postsynaptic AMPA receptors using distinct SNARE-dependent mechanisms. *Neuron* **86**, 442-456.
- [47] Arendt KL, Zhang Z, Ganesan S, Hintze M, Shin MM, Tang Y, Cho A, Graef IA, Chen L (2015) Calcineurin mediates homeostatic synaptic plasticity by regulating retinoic acid synthesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* **112**, E5744-E5752.
- [48] Hsu Y-T, Li J, Wu D, Südhof TC, Chen L (2019) Synaptic retinoic acid receptor signaling mediates mTOR-dependent metaplasticity that controls hippocampal learning. *Proc Natl Acad Sci U S A* **116**, 7113-7122.
- [49] Yee AX, Chen L (2016) Differential regulation of spontaneous and evoked inhibitory synaptic transmission in somatosensory cortex by retinoic acid. *Synapse* **70**, 445-452.
- [50] 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.
- [51] Loweth JA, Reimers JM, Caccamise A, Stefanik MT, Woo KKY, Chauhan NM, Werner CT, Wolf ME (2019) mGlu1 tonically regulates levels of calcium-permeable AMPA receptors in cultured nucleus accumbens neurons through retinoic acid signaling and protein translation. *Eur J Neurosci* **50**, 2590-2601.
- [52] Féart C, Siewe A, Samieri C, Peuchant E, Helmer C, Alfos S, Pallet V, Barberger-Gateau P (2010) Plasma retinol and association with socio-demographic and dietary characteristics of free-living older persons: The Bordeaux sample of the three-city study. *Int J Vitam Nutr Res* **80**, 32-44.
- [53] Féart C, Mingaud F, Enderlin V, Husson M, Alfos S, Higuieret P, Pallet V (2005) Differential effect of retinoic acid and triiodothyronine on the age-related hypoxpression of neurogranin in rat. *Neurobiol Aging* **26**, 729-738.
- [54] Bonhomme D, Pallet V, Dominguez G, Servant L, Henkous N, Lafenêtre P, Higuieret P, Béracochéa D, 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.
- [55] Goodman DS, Huang HS, Shiratori T (1965) Tissue distribution and metabolism of newly absorbed vitamin A in the rat. *J Lipid Res* **6**, 390-396.
- [56] Harrison EH (2005) Mechanisms of digestion and absorption of dietary vitamin A. *Annu Rev Nutr* **25**, 87-103.
- [57] Hodges JK, Tan L, Green MH, Ross AC (2016) Vitamin A supplementation increases the uptake of chylomicron retinyl esters into the brain of neonatal rats raised under vitamin A-marginal conditions. *J Nutr* **146**, 1677-1683.
- [58] Anderson C, Checkoway H, Franklin GM, Beresford S, Smith-Weller T, Swanson PD (1999) Dietary factors in Parkinson's disease: The role of food groups and specific foods. *Mov Disord* **14**, 21-27.
- [59] Boulos C, Yaghi N, El Hayeck R, Heraoui GN, Fakhoury-Sayegh N (2019) Nutritional risk factors, microbiota and Parkinson's disease: What is the current evidence? *Nutrients* **11**, 1896.
- [60] Ciulla M, Marinelli L, Cacciatori I, Stefano AD (2019) Role of dietary supplements in the management of Parkinson's disease. *Biomolecules* **9**, 271.
- [61] Erro R, Brigo F, Tamburin S, Zamboni M, Antonini A, Tinazzi M (2018) Nutritional habits, risk, and progression of Parkinson disease. *J Neurol* **265**, 12-23.
- [62] Jiménez-Jiménez FJ, Molina JA, Fernández-Calle P, Vázquez A, Cabrera-Valdivia F, Catalán MJ, García-Albea E, Bermejo F, Codoceo R (1993) Serum levels of beta-carotene and other carotenoids in Parkinson's disease. *Neurosci Lett* **157**, 103-106.
- [63] Johnson CC, Gorell JM, Rybicki BA, Sanders K, Peterson EL (1999) Adult nutrient intake as a risk factor for Parkinson's disease. *Int J Epidemiol* **28**, 1102-1109.
- [64] Paganini-Hill A (2001) Risk factors for parkinson's disease: The leisure world cohort study. *Neuroepidemiology* **20**, 118-124.
- [65] Takeda A, Nyssen OP, Syed A, Jansen E, Bueno-de-Mesquita B, Gallo V (2014) Vitamin A and carotenoids and the risk of Parkinson's disease: A systematic review and meta-analysis. *Neuroepidemiology* **42**, 25-38.
- [66] Zhang SM, Hernán MA, Chen H, Spiegelman D, Willett WC, Ascherio A (2002) Intakes of vitamins E and C, carotenoids, vitamin supplements, and PD risk. *Neurology* **59**, 1161-1169.
- [67] Kim JH, Hwang J, Shim E, Chung E-J, Jang SH, Koh S-B (2017) Association of serum carotenoid, retinol, and tocopherol concentrations with the progression of Parkinson's Disease. *Nutr Res Pract* **11**, 114.
- [68] Yang F, Wolk A, Håkansson N, Pedersen NL, Wirdefeldt K (2017) Dietary antioxidants and risk of Parkinson's disease in two population-based cohorts. *Mov Disord* **32**, 1631-1636.

- [69] Royal W, Gartner S, Gajewski CD (2002) Retinol measurements and retinoid receptor gene expression in patients with multiple sclerosis. *Mult Scler J* **8**, 452-458.
- [70] Kane MA, Napoli JL (2010) Quantification of endogenous retinoids. *Methods Mol Biol* **652**, 1-54.
- [71] Galter D, Buervenich S, Carmine A, Anvret M, Olson L (2003) ALDH1 mRNA: Presence in human dopamine neurons and decreases in substantia nigra in Parkinson's disease and in the ventral tegmental area in schizophrenia. *Neurobiol Dis* **14**, 637-647.
- [72] Grünblatt E, Zehetmayer S, Jacob CP, Müller T, Jost WH, Riederer P (2010) Pilot study: Peripheral biomarkers for diagnosing sporadic Parkinson's disease. *J Neural Transm* **117**, 1387-1393.
- [73] Liu G, Yu J, Ding J, Xie C, Sun L, Rudenko I, Zheng W, Sastry N, Luo J, Rudow G, Troncoso JC, Cai H (2014) Aldehyde dehydrogenase 1 defines and protects a nigrostriatal dopaminergic neuron subpopulation. *J Clin Invest* **124**, 3032-3046.
- [74] Samad TA, Krezel W, Chambon P, Borrelli E (1997) Regulation of dopaminergic pathways by retinoids: Activation of the D2 receptor promoter by members of the retinoic acid receptor-retinoid X receptor family. *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**, 14349-14354.
- [75] Spathis AD, Asvos X, Ziavra D, Karampelas T, Topouzis S, Cournia Z, Qing X, Alexakos P, Smits LM, Dalla C, Rideout HJ, Schwamborn JC, Tamvakopoulos C, Fokas D, Vassilatis DK (2017) Nurr1:RXR α heterodimer activation as monotherapy for Parkinson's disease. *Proc Natl Acad Sci U S A* **114**, 3999-4004.
- [76] Krezel W, Ghyselinck N, Samad TA, Dupé V, Kastner P, Borrelli E, Chambon P (1998) Impaired locomotion and dopamine signaling in retinoid receptor mutant mice. *Science* **279**, 863-867.
- [77] Esteves M, Cristóvão AC, Saraiva T, Rocha SM, Baltazar G, Ferreira L, Bernardino L (2015) Retinoic acid-loaded polymeric nanoparticles induce neuroprotection in a mouse model for Parkinson's disease. *Front Aging Neurosci* **7**, 20.
- [78] Yin L-H, Shen H, Diaz-Ruiz O, Bäckman CM, Bae E, Yu S-J, Wang Y (2012) Early post-treatment with 9-cis retinoic acid reduces neurodegeneration of dopaminergic neurons in a rat model of Parkinson's disease. *BMC Neurosci* **13**, 120.
- [79] Reiner DJ, Yu S-J, Shen H, He Y, Bae E, Wang Y (2014) 9-Cis retinoic acid protects against methamphetamine-induced neurotoxicity in nigrostriatal dopamine neurons. *Neurotox Res* **25**, 248-261.
- [80] Spathis AD, Asvos X, Ziavra D, Karampelas T, Topouzis S, Cournia Z, Qing X, Alexakos P, Smits LM, Dalla C, Rideout HJ, Schwamborn JC, Tamvakopoulos C, Fokas D, Vassilatis DK (2017) Nurr1:RXR α heterodimer activation as monotherapy for Parkinson's disease. *Proc Natl Acad Sci U S A* **114**, 3999-4004.
- [81] Friling S, Bergsland M, Kjellander S (2009) Activation of Retinoid X Receptor increases dopamine cell survival in models for Parkinson's disease. *BMC Neurosci* **10**, 146.
- [82] Ono K, Yamada M (2007) Vitamin A potently destabilizes preformed alpha-synuclein fibrils *in vitro*: Implications for Lewy body diseases. *Neurobiol Dis* **25**, 446-454.
- [83] Yakunin E, Loeb V, Kisos H, Biala Y, Yehuda S, Yaari Y, Selkoe DJ, Sharon R (2012) α -Synuclein neuropathology is controlled by nuclear hormone receptors and enhanced by docosahexaenoic acid in a mouse model for Parkinson's disease: NHR controls α -Syn neuropathology. *Brain Pathol* **22**, 280-294.
- [84] Carta M, Stancampiano R, Tronci E, Collu M, Usiello A, Morelli M, Fadda F (2006) Vitamin A deficiency induces motor impairments and striatal cholinergic dysfunction in rats. *Neuroscience* **139**, 1163-1172.
- [85] Kitaoka K, Hattori A, Chikahisa S, Miyamoto K, Nakaya Y, Sei H (2007) Vitamin A deficiency induces a decrease in EEG delta power during sleep in mice. *Brain Res* **1150**, 121-130.
- [86] Kunzler A, Ribeiro CT, Gasparotto J, Petiz LL, da Rosa Silva HT, da Silva JD, Bortolin R, de Souza PO, Barreto F, Espitia-Perez P, Schnorr CE, Somensi N, Moreira JCF, Gelain DP (2019) The effects of retinol oral supplementation in 6-hydroxydopamine dopaminergic denervation model in Wistar rats. *Neurochem Int* **125**, 25-34.
- [87] Sies H (2015) Oxidative stress: A concept in redox biology and medicine. *Redox Biol* **4**, 180-183.
- [88] Zhang L, Wang X, Cueto R, Effi C, Zhang Y, Tan H, Qin X, Ji Y, Yang X, Wang H (2019) Biochemical basis and metabolic interplay of redox regulation. *Redox Biol* **26**, 101284.
- [89] Chang K-H, Chen C-M (2020) The role of oxidative stress in Parkinson's disease. *Antioxidants (Basel)* **9**, 597.
- [90] Michel PP, Hirsch EC, Hunot S (2016) Understanding dopaminergic cell death pathways in Parkinson disease. *Neuron* **90**, 675-691.
- [91] Sutachan JJ, Casas Z, Albarracin SL, Stab BR, Samudio I, Gonzalez J, Morales L, Barreto GE (2012) Cellular and molecular mechanisms of antioxidants in Parkinson's disease. *Nutr Neurosci* **15**, 120-126.
- [92] Surmeier DJ, Schumacker PT, Guzman JD, Ilijic E, Yang B, Zampese E (2017) Calcium and Parkinson's disease. *Biochem Biophys Res Commun* **483**, 1013-1019.
- [93] Guzman JN, Sanchez-Padilla J, Wokosin D, Kondapalli J, Ilijic E, Schumacker PT, Surmeier DJ (2010) Oxidant stress evoked by pacemaking in dopaminergic neurons is attenuated by DJ-1. *Nature* **468**, 696-700.
- [94] Burke WJ, Kumar VB, Pandey N, Panneton WM, Gan Q, Franko MW, O'Dell M, Li SW, Pan Y, Chung HD, Galvin JE (2008) Aggregation of alpha-synuclein by DOPAL, the monoamine oxidase metabolite of dopamine. *Acta Neuropathol (Berl)* **115**, 193-203.
- [95] Cha J-H, Yu Q-M, Seo J-S (2016) Vitamin A supplementation modifies the antioxidant system in rats. *Nutr Res Pract* **10**, 26-32.
- [96] Chang K-H, Cheng M-L, Chiang M-C, Chen C-M (2018) Lipophilic antioxidants in neurodegenerative diseases. *Clin Chim Acta* **485**, 79-87.
- [97] Palace VP, Khaper N, Qin Q, Singal PK (1999) Antioxidant potentials of vitamin A and carotenoids and their relevance to heart disease. *Free Radic Biol Med* **26**, 746-761.
- [98] Tao L, Huang K, Wang J, Xue Y, Zhou Y, He F, Shen Y, Wang J, Gu X, Ji K, Qian L, Guo X (2019) Retinol palmitate protects against myocardial ischemia/reperfusion injury via reducing oxidative stress and inhibiting apoptosis. *Am J Transl Res* **11**, 1510-1520.
- [99] de Oliveira MR (2015) Vitamin A and retinoids as mitochondrial toxicants. *Oxid Med Cell Longev* **2015**, 140267.
- [100] de Oliveira MR, Oliveira MWS, Behr GA, Hoff MLM, da Rocha RF, Moreira JCF (2009) Evaluation of the effects of vitamin A supplementation on adult rat substantia nigra and striatum redox and bioenergetic states: Mitochondrial impairment, increased 3-nitrotyrosine

- and alpha-synuclein, but decreased D2 receptor contents. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* **33**, 353-362.
- [101] Pasquali MAB, Gelain DP, Oliveira MR, Behr GA, Motta LL, Rocha RF, Klamt F, Moreira JCF (2009) Vitamin A supplementation induces oxidative stress and decreases the immunoccontent of catalase and superoxide dismutase in rat lungs. *Exp Lung Res* **35**, 427-438.
- [102] Nolan YM, Sullivan AM, Toulouse A (2013) Parkinson's disease in the nuclear age of neuroinflammation. *Trends Mol Med* **19**, 187-196.
- [103] Huang Z, Liu Y, Qi G, Brand D, Zheng SG (2018) Role of vitamin A in the immune system. *J Clin Med* **7**, 258.
- [104] Katsuki H, Kurimoto E, Takemori S, Kurauchi Y, Hisatsune A, Isohama Y, Izumi Y, Kume T, Shudo K, Akaike A (2009) Retinoic acid receptor stimulation protects midbrain dopaminergic neurons from inflammatory degeneration via BDNF-mediated signaling. *J Neurochem* **110**, 707-718.
- [105] Mohammadzadeh Honarvar N, Saedisomeolia A, Abdolahi M, Shayeganrad A, Taheri Sangsari G, Hassanzadeh Rad B, Muench G (2017) Molecular anti-inflammatory mechanisms of retinoids and carotenoids in Alzheimer's disease: A review of current evidence. *J Mol Neurosci* **61**, 289-304.
- [106] Choi W-H, Ji K-A, Jeon S-B, Yang M-S, Kim H, Min K-J, Shong M, Jou I, Joe E-H (2005) Anti-inflammatory roles of retinoic acid in rat brain astrocytes: Suppression of interferon-gamma-induced JAK/STAT phosphorylation. *Biochem Biophys Res Commun* **329**, 125-131.
- [107] van Neerven S, Nemes A, Imholz P, Regen T, Denecke B, Johann S, Beyer C, Hanisch U-K, Mey J (2010) Inflammatory cytokine release of astrocytes *in vitro* is reduced by all-trans retinoic acid. *J Neuroimmunol* **229**, 169-179.
- [108] Fuzzati-Armentero MT, Cerri S, Blandini F (2019) Peripheral-central neuroimmune crosstalk in Parkinson's disease: What do patients and animal models tell us? *Front Neurol* **10**, 232.
- [109] Wang Q, Liu Y, Zhou J (2015) Neuroinflammation in Parkinson's disease and its potential as therapeutic target. *Transl Neurodegener* **4**, 19.
- [110] Obeso JA, Stamelou M, Goetz CG, Poewe W, Lang AE, Weintraub D, Burn D, Halliday GM, Bezard E, Przedborski S, Lehericy S, Brooks DJ, Rothwell JC, Hallett M, DeLong MR, Marras C, Tanner CM, Ross GW, Langston JW, Klein C, Bonifati V, Jankovic J, Lozano AM, Deuschl G, Bergman H, Tolosa E, Rodriguez-Violante M, Fahn S, Postuma RB, Berg D, Marek K, Standaert DG, Surmeier DJ, Olanow CW, Kordower JH, Calabresi P, Schapira AHV, Stoessl AJ (2017) Past, present, and future of Parkinson's disease: A special essay on the 200th Anniversary of the Shaking Palsy: The Shaking Palsy: Past, Present and Future. *Mov Disord* **32**, 1264-1310.
- [111] Requejo C, López-de-Ipiña K, Ruiz-Ortega JÁ, Fernández E, Calvo PM, Morera-Herreras T, Miguez C, Cardona-Grifoll L, Cepeda H, Ugedo L, Lafuente JV (2020) Changes in day/night activity in the 6-OHDA-induced experimental model of Parkinson's disease: Exploring prodromal biomarkers. *Front Neurosci* **14**, 590029.
- [112] Maret S (2005) Retinoic acid signaling affects cortical synchrony during sleep. *Science* **310**, 111-113.
- [113] Kitaoka K, Shimizu M, Shimizu N, Chikahisa S, Nakagomi M, Shudo K, Yoshizaki K, Séi H (2011) Retinoic acid receptor antagonist LE540 attenuates wakefulness via the dopamine D1 receptor in mice. *Brain Res* **1423**, 10-16.
- [114] Vallée A, Lecarpentier Y, Guillevin R, Vallée J-N (2020) Circadian rhythms, neuroinflammation and oxidative stress in the story of Parkinson's disease. *Cells* **9**, 314.
- [115] Ransom J, Morgan PJ, McCaffery PJ, Stoney PN (2014) The rhythm of retinoids in the brain. *J Neurochem* **129**, 366-376.
- [116] Ming G-L, Song H (2011) Adult neurogenesis in the mammalian brain: Significant answers and significant questions. *Neuron* **70**, 687-702.
- [117] Fon D, Zhou K, Ercole F, Fehr F, Marchesan S, Minter MR, Crack PJ, Finkelstein DI, Forsythe JS (2014) Nanofibrous scaffolds releasing a small molecule BDNF-mimetic for the re-direction of endogenous neuroblast migration in the brain. *Biomaterials* **35**, 2692-2712.
- [118] 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.
- [119] Bonhomme D, Minni AM, Alfos S, Roux P, Richard E, Higuere P, Moisan M-P, Pallet V, Touyarot K (2014) Vitamin A status regulates glucocorticoid availability in Wistar rats: Consequences on cognitive functions and hippocampal neurogenesis? *Front Behav Neurosci* **8**, 20.
- [120] 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.
- [121] Nasrolahi A, Mahmoudi J, Akbarzadeh A, Karimipour M, Sadigh-Eteghad S, Salehi R, Farhoudi M (2018) Neurotrophic factors hold promise for the future of Parkinson's disease treatment: Is there a light at the end of the tunnel? *Rev Neurosci* **29**, 475-489.
- [122] Nasrolahi A, Mahmoudi J, Karimipour M, Akbarzadeh A, Sadigh-Eteghad S, Salehi R, Farajdokht F, Farhoudi M (2019) Effect of cerebral dopamine neurotrophic factor on endogenous neural progenitor cell migration in a rat model of Parkinson's disease. *EXCLI J* **18**, 139-153.
- [123] Wang T-W, Zhang H, Parent JM (2005) Retinoic acid regulates postnatal neurogenesis in the murine subventricular zone-olfactory bulb pathway. *Development* **132**, 2721-2732.
- [124] Maia J, Santos T, Aday S, Agasse F, Cortes L, Malva JO, Bernardino L, Ferreira L (2011) Controlling the neuronal differentiation of stem cells by the intracellular delivery of retinoic acid-loaded nanoparticles. *ACS Nano* **5**, 97-106.
- [125] Santos T, Ferreira R, Quartin E, Boto C, Saraiva C, Bragança J, Peça J, Rodrigues C, Ferreira L, Bernardino L (2017) Blue light potentiates neurogenesis induced by retinoic acid-loaded responsive nanoparticles. *Acta Biomater* **59**, 293-302.
- [126] Santos T, Ferreira R, Maia J, Agasse F, Xapelli S, Cortes L, Bragança J, Malva JO, Ferreira L, Bernardino L (2012) Polymeric nanoparticles to control the differentiation of neural stem cells in the subventricular zone of the brain. *ACS Nano* **6**, 10463-10474.
- [127] Plane JM, Whitney JT, Schallert T, Parent JM (2008) Retinoic acid and environmental enrichment alter subventricular zone and striatal neurogenesis after stroke. *Exp Neurol* **214**, 125-134.
- [128] Gaillard A, Jaber M (2011) Rewiring the brain with cell transplantation in Parkinson's disease. *Trends Neurosci* **34**, 124-133.

- [129] Koppaka V, Thompson DC, Chen Y, Ellermann M, Nicolaou KC, Juvonen RO, Petersen D, Deitrich RA, Hurley TD, Vasilioi V (2012) Aldehyde dehydrogenase inhibitors: A comprehensive review of the pharmacology, mechanism of action, substrate specificity, and clinical application. *Pharmacol Rev* **64**, 520-539.
- [130] Goodman T, Crandall JE, Nanesco 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.
- [131] Poulin J-F, Caronia G, Hofer C, Cui Q, Helm B, Ramakrishnan C, Chan CS, Dombek DA, Deisseroth K, Awatramani R (2018) Mapping projections of molecularly defined dopamine neuron subtypes using intersectional genetic approaches. *Nat Neurosci* **21**, 1260-1271.
- [132] Wu J, Kung J, Dong J, Chang L, Xie C, Habib A, Hawes S, Yang N, Chen V, Liu Z, Evans R, Liang B, Sun L, Ding J, Yu J, Saez-Atienzar S, Tang B, Khaliq Z, Lin D-T, Le W, Cai H (2019) Distinct connectivity and functionality of aldehyde dehydrogenase 1a1-positive nigrostriatal dopaminergic neurons in motor learning. *Cell Rep* **28**, 1167-1181.e7.
- [133] Anderson DW, Schray RC, Duester G, Schneider JS (2011) Functional significance of aldehyde dehydrogenase ALDH1A1 to the nigrostriatal dopamine system. *Brain Res* **1408**, 81-87.
- [134] Wey MC-Y, Fernandez E, Martinez PA, Sullivan P, Goldstein DS, Strong R (2012) Neurodegeneration and motor dysfunction in mice lacking cytosolic and mitochondrial aldehyde dehydrogenases: Implications for Parkinson's disease. *PLoS One* **7**, e31522.
- [135] Damier P, Hirsch EC, Agid Y, Graybiel AM (1999) The substantia nigra of the human brain. II. Patterns of loss of dopamine-containing neurons in Parkinson's disease. *Brain* **122** (Pt 8), 1437-1448.
- [136] Fearnley JM, Lees AJ (1991) Ageing and Parkinson's disease: Substantia nigra regional selectivity. *Brain* **114** (Pt 5), 2283-2301.
- [137] Cai H, Liu G, Sun L, Ding J (2014) Aldehyde Dehydrogenase 1 making molecular inroads into the differential vulnerability of nigrostriatal dopaminergic neuron subtypes in Parkinson's disease. *Transl Neurodegener* **3**, 27.
- [138] Fitzmaurice AG, Rhodes SL, Lulla A, Murphy NP, Lam HA, O'Donnell KC, Barnhill L, Casida JE, Cockburn M, Sagasti A, Stahl MC, Maidment NT, Ritz B, Bronstein JM (2013) Aldehyde dehydrogenase inhibition as a pathogenic mechanism in Parkinson disease. *Proc Natl Acad Sci U S A* **110**, 636-641.
- [139] Goldstein DS (2020) The catecholaldehyde hypothesis: Where MAO fits in. *J Neural Transm* **127**, 169-177.
- [140] Goldstein DS, Kopin IJ, Sharabi Y (2014) Catecholamine autotoxicity. Implications for pharmacology and therapeutics of Parkinson disease and related disorders. *Pharmacol Ther* **144**, 268-282.
- [141] Panneton WM, Kumar VB, Gan Q, Burke WJ, Galvin JE (2010) The neurotoxicity of DOPAL: Behavioral and stereological evidence for its role in Parkinson disease pathogenesis. *PLoS One* **5**, e15251.
- [142] Charles V, Boulvin S, Haven F, Gille M (2006) [Wernicke's encephalopathy associated with chronic disulfiram intoxication]. *Rev Neurol (Paris)* **162**, 1252-1256.
- [143] Laplane D, Attal N, Sauron B, de Billy A, Dubois B (1992) Lesions of basal ganglia due to disulfiram neurotoxicity. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* **55**, 925-929.
- [144] Casida JE, Ford B, Jinsmaa Y, Sullivan P, Cooney A, Goldstein DS (2014) Benomyl, aldehyde dehydrogenase, DOPAL, and the catecholaldehyde hypothesis for the pathogenesis of Parkinson's disease. *Chem Res Toxicol* **27**, 1359-1361.
- [145] Fitzmaurice AG, Rhodes SL, Cockburn M, Ritz B, Bronstein JM (2014) Aldehyde dehydrogenase variation enhances effect of pesticides associated with Parkinson disease. *Neurology* **82**, 419-426.
- [146] Leiphon LJ, Picklo MJ (2007) Inhibition of aldehyde detoxification in CNS mitochondria by fungicides. *Neurotoxicology* **28**, 143-149.
- [147] Jacobs FMJ, Smits SM, Noorlander CW, von Oertel L, van der Linden AJA, Burbach JPH, Smid MP (2007) Retinoic acid counteracts developmental defects in the substantia nigra caused by Pitx3 deficiency. *Development* **134**, 2673-2684.
- [148] Smid MP (2017) Molecular programming of mesodiencephalic dopaminergic neuronal subsets. *Front Neuroanat* **11**, 59.
- [149] Hwang D (2003) Selective loss of dopaminergic neurons in the substantia nigra of Pitx3-deficient aphakia mice. *Mol Brain Res* **114**, 123-131.
- [150] Suarez LM, Alberquilla S, García-Montes JR, Moratalla R (2018) Differential synaptic remodeling by dopamine in direct and indirect striatal projection neurons in Pitx3^{-/-} mice, a genetic model of Parkinson's disease. *J Neurosci* **38**, 3619-3630.
- [151] van den Munkhof P (2003) Pitx3 is required for motor activity and for survival of a subset of midbrain dopaminergic neurons. *Development* **130**, 2535-2542.
- [152] Le W, Zhang L, Xie W, Li S, Dani JA (2015) Pitx3 deficiency produces decreased dopamine signaling and induces motor deficits in Pitx3(-/-) mice. *Neurobiol Aging* **36**, 3314-3320.
- [153] Li J, Dani JA, Le W (2009) The role of transcription factor Pitx3 in dopamine neuron development and Parkinson's disease. *Curr Top Med Chem* **9**, 855-859.
- [154] Kim J-I, Ganesan S, Luo SX, Wu Y-W, Park E, Huang EJ, Chen L, Ding JB (2015) Aldehyde dehydrogenase 1a1 mediates a GABA synthesis pathway in midbrain dopaminergic neurons. *Science* **350**, 102-106.
- [155] Furness JB (2006) The organisation of the autonomic nervous system: Peripheral connections. *Auton Neurosci* **130**, 1-5.
- [156] Cersosimo MG, Benarroch EE (2012) Pathological correlates of gastrointestinal dysfunction in Parkinson's disease. *Neurobiol Dis* **46**, 559-564.
- [157] Smith LM, Parr-Brownlie LC (2019) A neuroscience perspective of the gut theory of Parkinson's disease. *Eur J Neurosci* **49**, 817-823.
- [158] Braak H, Rüb U, Gai WP, Del Tredici K (2003) Idiopathic Parkinson's disease: Possible routes by which vulnerable neuronal types may be subject to neuroinvasion by an unknown pathogen. *J Neural Transm* **110**, 517-536.
- [159] Braak H, de Vos RAI, Bohl J, Del Tredici K (2006) Gastric alpha-synuclein immunoreactive inclusions in Meissner's and Auerbach's plexuses in cases staged for Parkinson's disease-related brain pathology. *Neurosci Lett* **396**, 67-72.
- [160] Holmqvist S, Chutna O, Bousset L, Aldrin-Kirk P, Li W, Björklund T, Wang Z-Y, Roybon L, Melki R, Li J-Y (2014) Direct evidence of Parkinson pathology spread from the gastrointestinal tract to the brain in rats. *Acta Neuropathol (Berl)* **128**, 805-820.

- [161] Fasano A, Visanji NP, Liu LWC, Lang AE, Pfeiffer RF (2015) Gastrointestinal dysfunction in Parkinson's disease. *Lancet Neurol* **14**, 625-639.
- [162] Shannon KM, Keshavarzian A, Mutlu E, Dodiya HB, Daian D, Jaglin JA, Kordower JH (2012) Alpha-synuclein in colonic submucosa in early untreated Parkinson's disease. *Mov Disord* **27**, 709-715.
- [163] Derkinderen P, Rouaud T, Lebouvier T, Bruley des Varannes S, Neunlist M, De Giorgio R (2011) Parkinson disease: The enteric nervous system spills its guts. *Neurology* **77**, 1761-1767.
- [164] Lionnet A, Leclair-Visonneau L, Neunlist M, Murayama S, Takao M, Adler CH, Derkinderen P, Beach TG (2018) Does Parkinson's disease start in the gut? *Acta Neuropathol (Berl)* **135**, 1-12.
- [165] Perez-Pardo P, Kliet T, Dodiya HB, Broersen LM, Garssen J, Keshavarzian A, Kraneveld AD (2017) The gut-brain axis in Parkinson's disease: Possibilities for food-based therapies. *Eur J Pharmacol* **817**, 86-95.
- [166] Borghammer P, Van Den Berge N (2019) Brain-first versus gut-first Parkinson's disease: A hypothesis. *J Parkinsons Dis* **9**, S281-S295.
- [167] Desmet A-S, Cirillo C, Tack J, Vandenberghe W, Vanden Berghe P (2017) Live calcium and mitochondrial imaging in the enteric nervous system of Parkinson patients and controls. *eLife* **6**, e26850.
- [168] Visanji NP, Marras C, Hazrati L-N, Liu LWC, Lang AE (2014) Alimentary, my dear Watson? The challenges of enteric α -synuclein as a Parkinson's disease biomarker. *Mov Disord* **29**, 444-450.
- [169] Ruffmann C, Parkkinen L (2016) Gut feelings about α -synuclein in gastrointestinal biopsies: Biomarker in the making? *Mov Disord* **31**, 193-202.
- [170] Sato Y, Heuckeroth RO (2008) Retinoic acid regulates murine enteric nervous system precursor proliferation, enhances neuronal precursor differentiation, and reduces neurite growth *in vitro*. *Dev Biol* **320**, 185-198.
- [171] Tan M, Yang T, Liu H, Xiao L, Li C, Zhu J, Chen J, Li T (2021) Maternal vitamin A deficiency impairs cholinergic and nitrergic neurons, leading to gastrointestinal dysfunction in rat offspring via RAR β . *Life Sci* **264**, 118688.
- [172] Wright-Jin EC, Grider JR, Duester G, Heuckeroth RO (2013) Retinaldehyde dehydrogenase enzymes regulate colon enteric nervous system structure and function. *Dev Biol* **381**, 28-37.
- [173] Hasegawa S, Goto S, Tsuji H, Okuno T, Asahara T, Nomoto K, Shibata A, Fujisawa Y, Minato T, Okamoto A, Ohno K, Hirayama M (2015) Intestinal dysbiosis and lowered serum lipopolysaccharide-binding protein in Parkinson's disease. *PLoS One* **10**, e0142164.
- [174] Keshavarzian A, Green SJ, Engen PA, Voigt RM, Naqib A, Forsyth CB, Mutlu E, Shannon KM (2015) Colonic bacterial composition in Parkinson's disease. *Mov Disord* **30**, 1351-1360.
- [175] Scheperjans F, Aho V, Pereira PAB, Koskinen K, Paulin L, Pekkonen E, Haapaniemi E, Kaakkola S, Eerola-Rautio J, Pohja M, Kinnunen E, Murros K, Auvinen P (2015) Gut microbiota are related to Parkinson's disease and clinical phenotype. *Mov Disord* **30**, 350-358.
- [176] Unger MM, Spiegel J, Dillmann K-U, Grundmann D, Philippeit H, Bürmann J, Faßbender K, Schwierz A, Schäfer K-H (2016) Short chain fatty acids and gut microbiota differ between patients with Parkinson's disease and age-matched controls. *Parkinsonism Relat Disord* **32**, 66-72.
- [177] Sampson TR, Debelius JW, Thron T, Janssen S, Shastri GG, Ilhan ZE, Challis C, Schretter CE, Rocha S, Gradinaru V, Chesselet M-F, Keshavarzian A, Shannon KM, Krajmalnik-Brown R, Wittung-Stafshede P, Knight R, Mazmanian SK (2016) Gut microbiota regulate motor deficits and neuroinflammation in a model of Parkinson's disease. *Cell* **167**, 1469-1480.e12.
- [178] Minato T, Maeda T, Fujisawa Y, Tsuji H, Nomoto K, Ohno K, Hirayama M (2017) Progression of Parkinson's disease is associated with gut dysbiosis: Two-year follow-up study. *PLoS One* **12**, e0187307.
- [179] Yang D, Zhao D, Ali Shah SZ, Wu W, Lai M, Zhang X, Li J, Guan Z, Zhao H, Li W, Gao H, Zhou X, Yang L (2019) The role of the gut microbiota in the pathogenesis of Parkinson's disease. *Front Neurol* **10**, 1155.
- [180] Jackson A, Forsyth CB, Shaikh M, Voigt RM, Engen PA, Ramirez V, Keshavarzian A (2019) Diet in Parkinson's disease: Critical role for the microbiome. *Front Neurol* **10**, 1245.
- [181] Zhou Y, Zhou J, Zhang Y, Tang J, Sun B, Xu W, Wang X, Chen Y, Sun Z (2020) Changes in intestinal microbiota are associated with islet function in a mouse model of dietary vitamin A deficiency. *J Diabetes Res* **2020**, 2354108.
- [182] Tian Y, Nichols RG, Cai J, Patterson AD, Cantorna MT (2018) Vitamin A deficiency in mice alters host and gut microbial metabolism leading to altered energy homeostasis. *J Nutr Biochem* **54**, 28-34.
- [183] Sun W, Chen J (2020) Vitamin A deficiency in the early-life periods alters a diversity of the colonic mucosal microbiota in rats. *Front Nutr* **7**, 14.
- [184] Hibberd MC, Wu M, Rodionov DA, Li X, Cheng J, Griffin NW, Barratt MJ, Giannone RJ, Hettich RL, Osterman AL, Gordon JI (2017) The effects of micronutrient deficiencies on bacterial species from the human gut microbiota. *Sci Transl Med* **9**, eaal4069.
- [185] Konieczna P, Ferstl R, Ziegler M, Frei R, Nehrbass D, Lauener RP, Akdis CA, O'Mahony L (2013) Immunomodulation by Bifidobacterium infantis 35624 in the murine lamina propria requires retinoic acid-dependent and independent mechanisms. *PLoS One* **8**, e62617.
- [186] Reichrath J, Lehmann B, Carlberg C, Varani J, Zouboulis C (2007) Vitamins as hormones. *Horm Metab Res* **39**, 71-84.
- [187] Enderlin V, Higuieret D, Alfos S, Husson M, Jaffard R, Higuieret P, Pallet V (2000) Vitamin A deficiency decreases the expression of RAR β and RXR β/γ in adult mouse brain: Effect of RA administration. *Nutr Neurosci* **3**, 173-181.
- [188] Pallet V, Azais-Braesco V, Enderlin V, Grolier P, Noël-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.
- [189] Brossaud J, Pallet V, Corcuff J-B (2017) Vitamin A, endocrine tissues and hormones: Interplay and interactions. *Endocr Connect* **6**, R121-R130.
- [190] Enderlin V, Pallet V, Alfos S, Dargelos E, Jaffard R, Garcin H, Higuieret P (1997) Age-related decreases in mRNA for brain nuclear receptors and target genes are reversed by retinoic acid treatment. *Neurosci Lett* **229**, 125-129.
- [191] Husson M, Enderlin V, Alfos S, Boucheron C, Pallet V, Higuieret P (2004) Expression of neurogranin and neuro-modulin is affected in the striatum of vitamin A-deprived rats. *Mol Brain Res* **123**, 7-17.

- [192] Enderlin V, Alfos S, Pallet V, Garcin H, Azais-Braesco V, Jaffard R, Higuieret P (1997) Aging decreases the abundance of retinoic acid (RAR) and triiodothyronine (TR) nuclear receptor mRNA in rat brain: Effect of the administration of retinoids. *FEBS Lett* **412**, 629-632.
- [193] Feart C, Pallet V, Boucheron C, Higuieret D, Alfos S, Letenneur L, Dartigues JF, Higuieret P (2005) Aging affects the retinoic acid and the triiodothyronine nuclear receptor mRNA expression in human peripheral blood mononuclear cells. *Eur J Endocrinol* **152**, 449-458.
- [194] Villanueva I, Alva-Sánchez C, Pacheco-Rosado J (2013) The role of thyroid hormones as inducers of oxidative stress and neurodegeneration. *Oxid Med Cell Longev* **2013**, 15.
- [195] Vairetti M, Ferrigno A, Rizzo V, Ambrosi G, Bianchi A, Richelmi P, Blandini F, Armentero M-T (2012) Impaired hepatic function and central dopaminergic denervation in a rodent model of Parkinson's disease: A self-perpetuating crosstalk? *Biochim Biophys Acta* **1822**, 176-184.
- [196] Tandeter H, Levy A, Gutman G, Shvartzman P (2001) Subclinical thyroid disease in patients with Parkinson's disease. *Arch Gerontol Geriatr* **33**, 295-300.
- [197] Umehara T, Matsuno H, Toyoda C, Oka H (2015) Thyroid hormone level is associated with motor symptoms in de novo Parkinson's disease. *J Neurol* **262**, 1762-1768.
- [198] Munhoz RP, Teive HAG, Troiano AR, Hauck PR, Herdoiza Leiva MHB, Graff H, Werneck LC (2004) Parkinson's disease and thyroid dysfunction. *Parkinsonism Relat Disord* **10**, 381-383.
- [199] Fernandes de Abreu DA, Eyles D, Féron F (2009) Vitamin D, a neuro-immunomodulator: Implications for neurodegenerative and autoimmune diseases. *Psychoneuroendocrinology* **34 Suppl 1**, S265-277.
- [200] Zhou Z, Zhou R, Zhang Z, Li K (2019) The association between vitamin D status, vitamin D supplementation, sunlight exposure, and Parkinson's disease: A systematic review and meta-analysis. *Med Sci Monit Int Med J Exp Clin Res* **25**, 666-674.
- [201] Rimmelzwaan LM, van Schoor NM, Lips P, Berendse HW, Eekhoff EMW (2016) Systematic review of the relationship between vitamin D and Parkinson's disease. *J Parkinsons Dis* **6**, 29-37.
- [202] Sleeman I, Aspray T, Lawson R, Coleman S, Duncan G, Khoo TK, Schoenmakers I, Rochester L, Burn D, Yarnall A (2017) The role of vitamin D in disease progression in early Parkinson's disease. *J Parkinsons Dis* **7**, 669-675.
- [203] Eyles DW, Smith S, Kinobe R, Hewison M, McGrath JJ (2005) Distribution of the vitamin D receptor and 1 α -hydroxylase in human brain. *J Chem Neuroanat* **29**, 21-30.
- [204] Shinpo K, Kikuchi S, Sasaki H, Moriwaka F, Tashiro K (2000) Effect of 1,25-dihydroxyvitamin D(3) on cultured mesencephalic dopaminergic neurons to the combined toxicity caused by L-buthionine sulfoximine and 1-methyl-4-phenylpyridine. *J Neurosci Res* **62**, 374-382.
- [205] Smith MP, Fletcher-Turner A, Yurek DM, Cass WA (2006) Calcitriol protection against dopamine loss induced by intracerebroventricular administration of 6-hydroxydopamine. *Neurochem Res* **31**, 533-539.
- [206] Wang JY, Wu JN, Cherng TL, Hoffer BJ, Chen HH, Borlongan CV, Wang Y (2001) Vitamin D(3) attenuates 6-hydroxydopamine-induced neurotoxicity in rats. *Brain Res* **904**, 67-75.
- [207] Foy CJ, Passmore AP, Vahidassr MD, Young IS, Lawson JT (1999) Plasma chain-breaking antioxidants in Alzheimer's disease, vascular dementia and Parkinson's disease. *QJM* **92**, 39-45.