

2m11.2823.1

Université de Montréal

**Effet d'une déficience en thiamine sur les cellules du système
nerveux: élaboration d'un modèle in vitro
de l'encéphalopathie de Wernicke**

Par

Pierre Pannunzio

Département de physiologie, Faculté de Médecine

Mémoire de maîtrise présenté à la Faculté des études supérieures
en vue de l'obtention du grade de
Maître en Science (M.Sc.)
en sciences neurologiques

Juin, 2000

© Pierre Pannunzio, 2000



W
4
W58
2000
v. 116

Université de Montréal
Faculté des études supérieures

Ce mémoire intitulé:

Effet d'une déficience en thiamine sur les cellules du système nerveux: élaboration d'un
modèle *in vitro* de l'encéphalopathie de Wernicke

présenté par:

Pierre Pannunzio

a été évalué par un jury composé des membres suivants:

Dr. Tomas A. Reader (Président rapporteur)

Dr. Roger F. Butterworth (Directeur de recherche)

Dr. Jane Montgomery (Membre du jury)

Mémoire de maîtrise accepté le:.....

Autorisation pour microfilmage du mémoire de maîtrise de Pierre Pannunzio,

contenant l'article :

Thiamine Deficiency Results in metabolic Acidosis and Mitochondrial Energy Failure in Cerebellar Granule Cells : An In Vitro Model for the Study of Cell Death Mechanisms in Wernicke's Encephalopathy.

dont les coauteurs sont:

Pierre Pannunzio (auteur):

Alan S. Hazell:

Marc Pannunzio:

K. V. Rama Rao:

Roger F. Butterworth:

Montréal, le 20 juin 2000.

Sommaire

L'encéphalopathie de Wernicke (EW) est un désordre neurologique attribuable à une déficience en thiamine. Chez les humains et dans les modèles animaux, la déficience en thiamine (DT) entraîne un compromis métabolique sévère de la fonction mitochondriale et résulte en mort neuronale sélective dans les structures diencephaliques et cérébelleuses. Afin d'examiner l'influence d'une DT sur la survie neuronale suite aux changements métaboliques qui en découlent, nous avons exposé des cultures primaires de cellules granulaires du cervelet (CGC) à un milieu de culture déficient en thiamine pour une durée de 7 jours en présence ou en absence de pyrithiamine (Py), un antagoniste central de la thiamine. L'exposition de ce type de cellules à un milieu déficient en thiamine pour une durée de 7 jours ne démontre aucun signe de mort cellulaire et n'a que des effets mineurs au niveau de l'intégrité biochimique. En contrepartie, un traitement des CGC avec 50 μ M Py se traduit par une diminution significative des esters de thiamine, une baisse des activités des enzymes thiamino-dépendantes, la déshydrogénase d' α -cétoglutarate et la transcétolase, une augmentation de la libération de lactate, une diminution de pH, et plus particulièrement chez les CGC, une baisse de 80% de l'activité mitochondriale accompagnée de la mort d'un nombre important de neurones (58%, $p < 0.001$).

Ce modèle expérimental de neurones en culture récapitule les changements métaboliques et mitochondriaux qui caractérisent une déficience en thiamine dans l'organisme intact et peut être très utile afin d'élucider les mécanismes impliqués dans la cascade de mort neuronale due à une déficience en thiamine.

C'est justement pourquoi nous nous sommes doté de ce modèle de culture cellulaire *in vitro* pour élucider si les mécanismes de mort cellulaire des CGC étaient liés aux effets néfastes des radicaux libres, ou à l'excitotoxicité glutamatergique ou tout simplement à une défaillance énergétique. Nous avons donc directement traité les CGC en présence de Py avec deux puissants antioxydants et nos résultats indiquent qu'en effet, l'ajout de 50 μ M d' α -tocophérol (vitamine E) ou de 100 μ M d'hydroxyanisole butylé (BHA) se traduit par une neuroprotection importante par rapport au groupe contrôle. Aucune protection n'est apparente suite à l'addition de MK-801 (10 μ M), un antagoniste des récepteurs à glutamate (sous-classe NMDA), ce qui nous mène à discréditer l'hypothèse d'excitotoxicité. Suite à des expériences complémentaires réalisées avec des astrocytes de type I en culture primaire, on a pu démontrer que le système de l'acide nitrique synthétase (NOS) joue potentiellement un rôle très important dans la physiopathologie de la déficience en thiamine dû directement à l'augmentation de l'activité de l'enzyme NOS et indirectement à l'augmentation de la capture de L-arginine, un substrat pour NOS.

L'ensemble des paramètres étudiés lors de ces études nous permettent de croire qu'en effet, les cultures cellulaires mentionnées ci-haut reflètent très étroitement la déficience en thiamine chez le rat tout en évitant les complications entraînées par les nombreux phénomènes concomitants dans un système *in vivo* si complexe.

Le but de ce mémoire de maîtrise est d'évaluer l'importance de la thiamine sur le métabolisme énergétique du cerveau par le biais de modèles simples et reproductibles de cultures primaires de neurones.

Table des matières

Sommaire	I
Table des matières.....	III
Liste des tableaux.....	IV
Liste des figures.....	VI
Listes des abréviations.....	VII
Dédicaces.....	VIII

CHAPITRE

1-Introduction	1
1.1 La découverte de la thiamine et son antimétabolite.....	2
1.2 Propriétés, besoins et sources de la thiamine.....	3
1.3 La structure chimique de la thiamine et de son antimétabolite, la pyrithiamine.....	4
2- Métabolisme de la thiamine.....	6
3- Rôle du TDP dans le fonctionnement des cellules nerveuses.....	8
3.1 Le complexe pyruvate déshydrogénase	10
3.2 Le complexe de l' α -cétoglutarate déshydrogénase.....	11
3.3 La transcétolase.....	11

4- L'encéphalopathie de Wernicke: Déficience thiaminique chez les humains....	13
5- Les modèles animaux et expérimentaux de la déficience en thiamine.....	15
6- Mécanismes de mort neuronale reliés à la déficience en thiamine.....	17
6.1 Neuropathologie.....	19
6.1.1 La lésion biochimique.....	20
6.1.2 Métabolisme énergétique cérébral.....	22
6.1.3 Acidose lactique.....	22
6.1.4 Excitotoxicité liée aux récepteurs NMDA.....	23
6.1.5 La barrière hémato-encéphalique.....	24
6.1.6 Les radicaux libres et le stress oxydatif.....	25
6.1.7 Apoptose ou nécrose?.....	27

CHAPITRE 2

Article: Thiamine Deficiency Results in Metabolic Acidosis and Energy Failure in Cerebellar Granule Cells : An In Vitro Model for the Study of Cell Death Mechanisms in Wernicke's Encephalopathy.

Pierre Pannunzio, Alan S. Hazell, Marc Pannunzio,
K. V. Rama Rao and Roger F. Butterworth
.....29

CHAPITRE 3

Conclusion.....49

Bibliographie.....60

Liste des tableaux

Tableau 1.	Comparaison des lésions neuroanatomiques retrouvées dans le syndrome de Wernicke-Korsakoff humain et le modèle de rat traité à la pyrithiamine et déficient en thiamine.....	16
------------	--	----

Liste des figures

CHAPITRE 1

Figure 1.1	Structure chimique de la thiamine.....	4
Figure 1.2	Structure chimique de la pyrithiamine.....	5
Figure 1.3	Métabolisme de la thiamine.....	8
Figure 1.4	Séquence glycolytique et le cycle de Krebs.....	9
Figure 1.5	Réaction effectuée par le complexe PDH.....	11
Figure 1.6	Réaction effectuée par le complexe α CGDH.....	11
Figure 1.7	Réactions effectuées par la TC.....	12

CHAPITRE 2

Figure 2.1	Light micrographs of rat cerebellar granule cells.....	37
Figure 2.2	Effects of thiamine deficiency on concentrations of thiamine and its phosphate esters in cultured CGCs.....	38
Figure 2.3	Effects of thiamine deficiency on thiamine-dependent enzyme activities in cultured CGCs.....	39
Figure 2.4	Effects of thiamine deficiency or pyrithiamine treatment on ATP content in CGCs	40
Figure 2.5	Effects of thiamine deficiency or pyrithiamine treatment on lactate release and pH in cultured CGCs.....	41
Figure 2.6	Effects of thiamine deficiency or pyrithiamine treatment on cell death in cultured CGCs.....	42
Figure 2.7	Effects of the antioxidants α -tocopherol and BHA and the NMDA receptor antagonist MK-801 on 50 μ M Py-mediated cell death.....	43

CHAPITRE 3

Figure 3	Cascade de mort cellulaire suite à une déficience en thiamine.....	56
----------	--	----

Liste des abréviations

ATP	Adénosine triphosphate
BHA	Hydroxyanisole butylé
BHE	Barrière hémato-encéphalique
CGC	Cellules granulaires du cervelet
CGDH	Cétoglutarate déhydrogénase
DT	Déficiencé thiaminique
EK	Encéphalopathie de Korsakoff
EW	Encéphalopathie de Wernicke
NMDA	N-méthyl-D-aspartate
NOS	Oxyde nitrique synthétase
PDH	Pyruvate déshydrogénase
Py	Pyriéthiamine
ROS	Radicaux oxygène réactifs
TC	Transcétolase
TDP	Thiamine diphosphate
TDPase	Thiamine pyrophosphokinase
TMP	Thiamine monophosphate
TTP	Thiamine triphosphate
Vit. E	α -tocophérol (vitamine E)
W-K	Wernicke-Korsakoff

À mes parents, Ida et Joseph

À mon frère, Marc

À Nathalie, ma bien-aimée

et

un GROS MERCI à Roger F. Butterworth, mon directeur de recherche
à mes collègues de travail, et tous les membres
du Centre de recherche de l'hôpital St-Luc

1-Introduction

Le cerveau est l'organe qui gère le comportement de l'homme dans son environnement. Il constitue le siège de la pensée ainsi que l'origine de la coordination de tous les aspects du corps humain. Il est principalement formé de deux populations de cellules : les neurones et les cellules gliales. Elles ont deux fonctions bien distinctes. Les neurones sont des cellules qui ont comme caractéristique principale la possibilité de communiquer entre elles. Elles reçoivent, intègrent et propagent des influx électriques ou chimiques qui servent de messages complexes dans le but d'obtenir une réponse très hautement spécialisée et raffinée de l'ensemble des autres organes du corps. Par contre, les astrocytes, une sous-population de cellules gliales, détiennent le rôle de réparation, de soutien et de régulation du pH, des balances ioniques et de recapture des métabolites post-réactionnel dans le voisinage immédiat des neurones. À tout moment donné, afin de communiquer, les cellules du cerveau performant d'innombrables interactions. Ces phénomènes sont à la base de l'activité du cerveau mais ils ne peuvent persister sans un apport énergétique continu et adéquat, c'est-à-dire des substrats oxydables, de l'oxygène et la présence de cofacteurs essentiels à la production d'ATP. Les cofacteurs dérivés de la thiamine jouent un rôle primordial dans le métabolisme énergétique du système nerveux. La thiamine est en effet une, sinon la, vitamine essentielle au fonctionnement du système nerveux. À travers les années son étude a été particulièrement intéressante car non seulement elle intervient dans le métabolisme énergétique des cellules mais également dans la synthèse des neurotransmetteurs ainsi que dans les phénomènes de perméabilité membranaire. Le sujet de cette thèse portera essentiellement

sur le rôle de la thiamine (ou son absence) et son impact sur le métabolisme énergétique oxydatif dans un modèle de cultures cellulaires.

1.1 La découverte de la thiamine et son antimétabolite

C'est vers 1887 que les premières observations d'une déficience en thiamine furent enregistrées. À l'époque on ignorait la causalité des troubles neurologiques jusqu'à ce qu'Eijkmann observa que des poulets nourris au riz poli développaient une polynévrite analogue aux symptômes présentés par les patients atteints du béribéri (Eijkman, 1897). Par la suite, il est devenu évident qu'un élément essentiel se trouvait dans l'enveloppe du riz car lorsque celle-ci était ingérée la maladie disparaissait. Cet élément fut isolé de la cuticule du riz en 1911 par Casimir Funk. Cette substance avait comme effet *miraculeux* de prévenir et de guérir rapidement le béribéri expérimental, et il fallait seulement en utiliser quelques milligrammes. Il lui donna le nom de vitamine. Pour lui, le mot vitamine signifiait : "Substance nutritive indispensable, dont l'organisme ne peut faire la synthèse, et qu'il doit recevoir par l'alimentation". Cette substance hydrosoluble fut ainsi appelée vitamine B (Funk, 1911). D'autres études furent entreprises afin de découvrir ce que contenait cette substance. La vitamine B₁ fut alors obtenue sous forme cristalline (chlorhydrate de vitamine B₁ : thiamine-HCl) pour la première fois par Jansen et Donath en 1927. On nomma alors cette substance *aneurine* et par la suite *thiamine*. Quelques années plus tard, en 1936, sa structure chimique fut déterminée et elle fut synthétisée par Williams et Cline. Cependant, ses propriétés exactes et son rôle demeuraient une énigme.

1.2 Propriétés, besoins et sources de la thiamine

Les besoins journaliers en thiamine ne peuvent être correctement satisfaits que par le biais d'un apport quotidien par voie exogène: l'alimentation. Elle ne peut être emmagasinée pour plus d'environ 27 jours dans l'organisme humain. Les besoins en thiamine ont été évalués entre 1.0-1.5 mg per diem et sont accrus chez la femme enceinte et celle qui allaite (Freeman, 1979). De plus, l'organisme ne peut en synthétiser. Seules les bactéries intestinales peuvent réaliser une synthèse partielle de thiamine, mais celle-ci a peu d'importance puisqu'elle est fabriquée en aval des lieux d'absorption lesquels sont situés principalement au niveau de l'intestin grêle proximal (Rose, 1981).

L'importance et le besoin de la vitamine B₁ viennent en fonction de la quantité de glucose ingéré par jour. Elle régule étroitement l'utilisation énergétique du glucose. Ce qui explique qu'une carence en thiamine entraîne rapidement des répercussions neurologiques sévères car le tissu nerveux possède un métabolisme presque exclusivement gluco-dépendant (Cooper et al., 1979 ; Hakim et al., 1981)

La vitamine B₁ est apportée presque exclusivement par l'alimentation, et elle se retrouve principalement dans le germe de blé, la levure de bière, les graines de céréales (riz, blé) et surtout la cuticule, les légumes verts et la viande. Les noix, le fromage cottage et les pommes de terre en contiennent également des quantités considérables. De nos jours, les produits céréaliers et le pain blanc sont enrichis de thiamine et constituent 30 à 40% de l'apport quotidien de cette vitamine (Thiessen, 1978).

1.3 La structure chimique de la thiamine et de son antimétabolite, la pyriéthiamine

Le nom de thiamine évoque d'emblée sa structure; elle porte une fonction soufrée (thia 4) et une fonction basique azotée (amine 3). La molécule de thiamine est constituée d'un noyau pyrimidique lié par un pont méthylène à un noyau thiazole. Le cycle pyrimidique est bisubstitué par un radical méthyle et une fonction amine primaire. Le thiazole possède un ammonium quaternaire en plus d'un atome de soufre et, est également bisubstitué par un groupement β -hydroxy-ethyl et par un radical méthyle (Lehninger, 1981). Mentionnons également que le pont méthylène, partie fragile de la molécule, explique sa thermolabilité. Son site actif est le carbone en position deux du noyau thiazole (Lehninger, 1981).

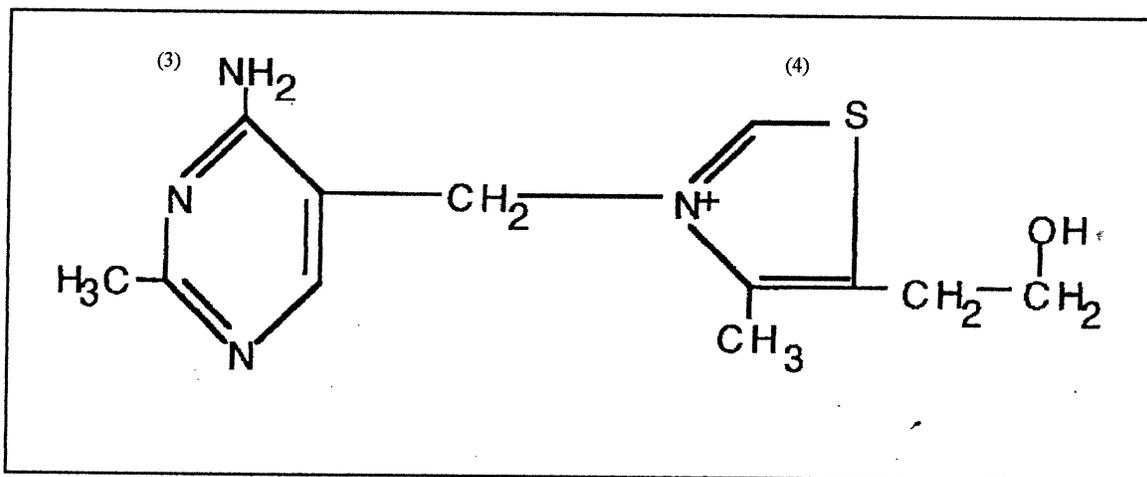


Figure 1.1 Structure chimique de la thiamine

La thiamine se présente habituellement sous forme d'un sel appelé chlorhydrate de thiamine lequel a l'apparence de cristaux blancs. Elle fait partie des vitamines hydrosolubles, en plus d'être sensible à l'oxydation. C'est une molécule basique et estérifiable sur sa fonction alcool primaire. Cette estérification par un processus de

phosphorylation donne lieu à la forme active de la thiamine appelée co-carboxylase ou thiamine diphosphate (TDP) ou encore thiamine pyrophosphate (TPP). Le TDP est sensible au changement de pH (Gubler, 1961).

L'activité de la thiamine semble très spécifique puisque des altérations de la molécule, même si elle sont mineures, vont créer des substances inactives voir même des antagonistes pour l'organisme. C'est en effet ce qui advient de la pyrithiamine (Py), un analogue structural de synthèse de la thiamine où le groupement thiazole a été remplacé par un cycle pyridine (Gubler, 1961).

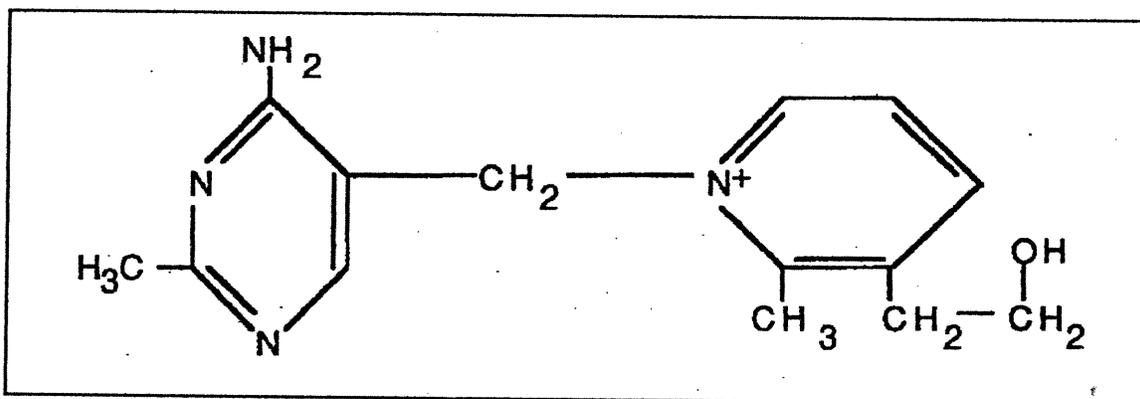


Figure 1.2 Structure chimique de la pyrithiamine.

La pyrithiamine est un antagoniste de la thiamine ne possédant pas d'activité vitaminique en soi. Cette caractéristique lui vaut le nom d'antimétabolite (Gubler, 1961).

La pyrithiamine est un inhibiteur compétitif de la thiamine. La pyrithiamine inhibe le transport de la thiamine par le tissu des mammifères au niveau de l'intestin de rat (Rindi et Ventura, 1967) et également au niveau de la barrière hémato-encéphalique (BHE) en affectant principalement la composante du processus de transport actif (Greenwood et Pratt, 1985), laquelle est saturable à de faibles concentrations de thiamine.

Donc, la Py traverse la BHE et peut s'accumuler rapidement dans le cerveau (Gubler, 1976 ; Dreyfus, 1982). Cette accumulation de la Py provoque une diminution de la thiamine cérébrale disponible en affectant la forme TDP (Rindi et Perri, 1961). De plus, des études effectuées avec des tranches de cerveau, ont démontré que la Py inhiberait la capture de la thiamine (Nose et al., 1976). Elle peut aussi déplacer la thiamine des préparations de tissus nerveux (Cooper, 1968). Rindi et al. (1961) et Johnson et al. (1965) ont rapporté que la Py était également un inhibiteur puissant de la thiamine pyrophosphokinase, l'enzyme qui catalyse la synthèse de la TDP à partir de la thiamine. Finalement, la Py a pour but d'accélérer les changements biochimiques dus à une déficience thiaminique.

2. Métabolisme de la thiamine

En 1931, Sir Rudolph Peters utilisait le modèle de déficience en thiamine du pigeon carencé dans ses laboratoires à Oxford. Les symptômes étaient très spécifiques et faciles à reconnaître. L'animal adopte un comportement caractérisé par le repliement de la tête vers l'arrière, posture appelée opisthotonos. Si l'animal n'est pas traité avec de la thiamine, le syndrome évolue vers des lésions irréversibles du système nerveux, aboutissant à la mort en quelques jours. Au stade de l'opisthotonos, une injection massive de thiamine élimine complètement les symptômes et produit une guérison en 30 minutes environ. Cette observation conduisit Peters (1936) à formuler le concept de "lésion biochimique" dans la mesure où aucune modification morphologique des tissus cérébraux, avant et après traitement à la thiamine, n'était constatée. D'autres travaux du même groupe, qui ultimement permirent de proposer un rôle pour la thiamine dans le

métabolisme énergétique du système nerveux, démontrèrent une consommation d'oxygène diminuée dans des homogénats de cerveaux de pigeons déficients comparés au groupe contrôle. Cette diminution était réversible après l'ajout de thiamine aux homogénats (Gavrilescu et Peters, 1931). Lorsque Lohmann et Schuster (1937) démontrèrent que le diphosphate de thiamine (TDP, cocarboxylase) était le cofacteur de la décarboxylation oxydative du pyruvate, le mécanisme d'action de la thiamine dans le métabolisme cellulaire semblait être résolu.

En ce qui concerne le TDP, il provient de la phosphorylation de la thiamine. Peu importe que la thiamine arrive dans l'organisme sous forme d'ingestion alimentaire ou par administration, elle est rapidement phosphorylée par une enzyme, la thiamine pyrophosphokinase (TDPase), en présence d'ATP pour donner la thiamine diphosphate (TDP). Cette réaction de phosphorylation se produit dans plusieurs tissus incluant le cerveau, mais elle s'effectue majoritairement dans la cellule hépatique (Meunier et al., 1988). La TDP peut ensuite être convertie en thiamine triphosphate (TTP) en présence d'ATP par une enzyme, la phosphotransférase (P-transférase). Chacune des formes de thiamine phosphorylée, appelées esters de la thiamine (TTP, TDP, TMP), peut être à son tour déphosphorylée par une phosphatase. Les différentes séquences de phosphorylations et de déphosphorylations impliquées dans le métabolisme de la thiamine sont présentées à la figure 1.3.

Donc, ayant trouvé le TDP responsable, il était normal de croire que les symptômes observés lors de la déficience en thiamine résulteraient d'une perturbation du métabolisme oxydatif des cellules nerveuses. Heureusement, l'accroissement des connaissances dans le domaine de la chimie du cerveau n'a pas seulement mis en cause le

cofacteur TDP avec le complexe de la déshydrogénase du pyruvate (PDH), mais également la déshydrogénase de l' α -cétoglutarate (CGDH) dans le cycle de Krebs et la transcétoylase (TC) dans la voie des pentoses-phosphates, qui eux aussi nécessitent le cofacteur TDP. Par ailleurs, outre le TDP, les cellules nerveuses, comme la plupart des autres types cellulaires, contiennent également de la thiamine (non phosphorylée), de la TMP et de la TTP.

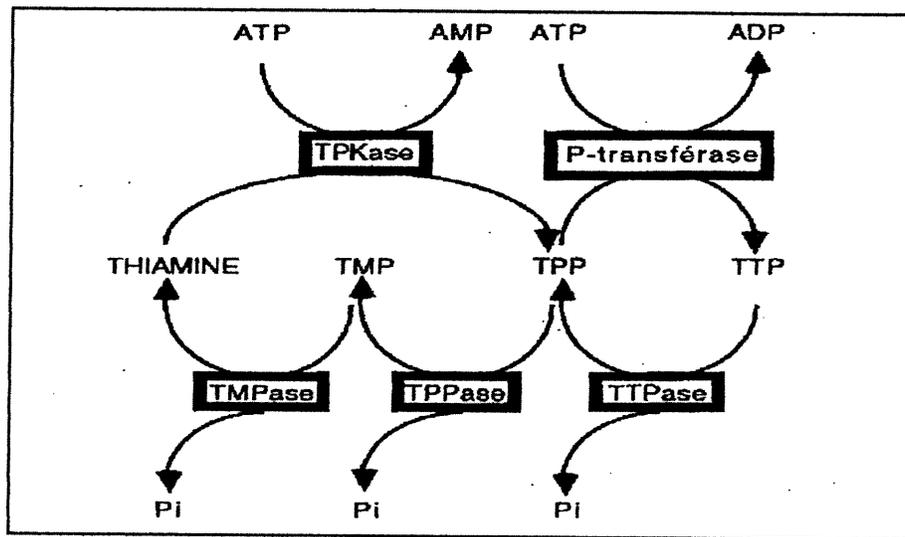


Figure 1.3 Métabolisme de la thiamine. Les abréviations sont : TMP, TPP, TTP ; thiamine mono, di-, triphosphate. TMPase, TPPase, TTPase ; thiamine mono-, di-, triphosphatase. P-transférase ; phosphotransférase. TPKase ; thiamine pyrophosphokinase. AMP, ADP, ATP ; adénosine 5'-mono-, di- et triphosphate. Pi ; phosphate inorganique.

3. Rôle du TDP dans le fonctionnement des cellules nerveuses

Le rôle principal de la thiamine dans le système nerveux central serait celui de cofacteur enzymatique, sous la forme TDP. Un cofacteur se définit comme étant un facteur qui exerce une action conjointement avec d'autres. Dans ce cas, le TDP est une des composantes essentielles d'un complexe enzymatique afin d'obtenir la structure tertiaire fonctionnelle. En effet, le TDP joue un rôle important dans le métabolisme oxydatif des cellules nerveuses. Selon le métabolisme énergétique d'une cellule nerveuse,

le glucose est pratiquement le seul substrat exogène consommé en raison de la barrière hémato-encéphalique. La figure 1.4 schématise le métabolisme énergétique d'une cellule nerveuse.

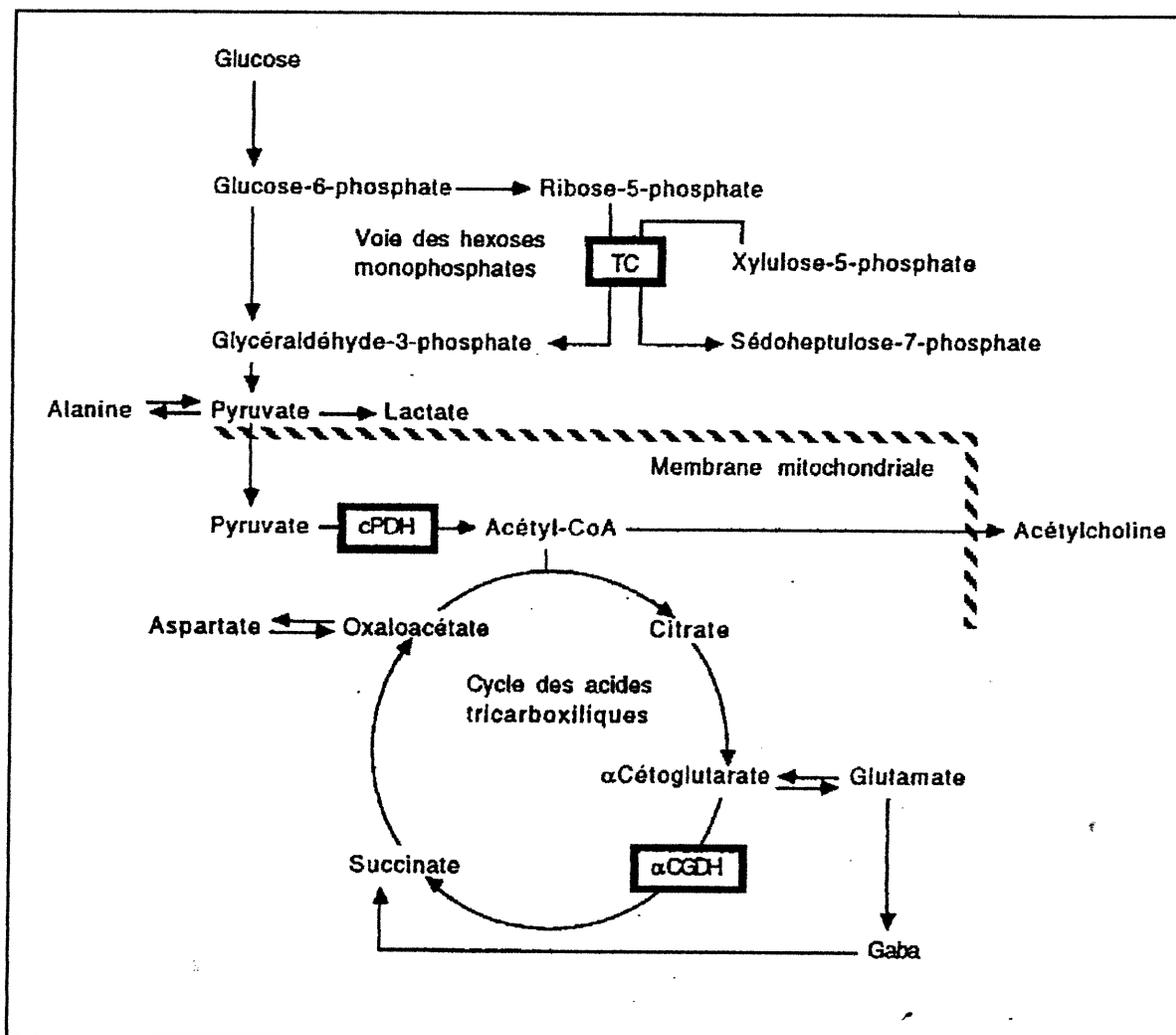


Figure-1.4 Séquence glycolytique et le cycle de Krebs. Implications des enzymes thiamino-dépendantes. TC : transcétolase, cPDH : complexe pyruvate déshydrogénase, αCGDH : complexe α-cétoglutarate déshydrogénase dans le SNC. (Modifié d'après Butterworth, 1993)

Suivant la séquence glycolytique, le glucose est oxydé en pyruvate avant de pénétrer la mitochondrie. Dans le cerveau, seulement 5-10% du pyruvate est transformé en lactate dans des conditions normales de respiration aérobie (Fox et al., 1988). Une faible proportion du pyruvate peut être transaminée de manière réversible en alanine. Au

cours de la glycolyse, deux molécules d'ATP sont produites par molécule de glucose dégradée, mais cette voie est largement insuffisante pour couvrir les besoins énergétiques du cerveau. La majeure partie du pyruvate entre dans les mitochondries où il est oxydé en CO_2 et H_2O avec production de 15 molécules d'ATP. La première étape est catalysée par la PDH et nécessite l'intervention du cofacteur TDP. L'acétylCoA formé entre alors dans le cycle de Krebs. [L'acétylCoA est également le précurseur d'un important neurotransmetteur : l'acétylcholine (Ach)]. La seconde étape enzymatique impliquant le TDP comme cofacteur est celle du complexe de l' α -cétoglutarate déshydrogénase (CGDH). Dans le cycle de Krebs, l' α -cétoglutarate est aussi transformé en succinylCoA (décarboxylation oxydative), mais il peut aussi être rapidement transaminé en glutamate. Et finalement, le troisième enzyme qui requiert le cofacteur TDP est la transcétolase (TC), impliqué dans la voie des hexoses monophosphates. Environ 2% du glucose entre dans la voie des pentoses-phosphates (Gaitonde et al., 1983). L'importance de ce cycle vient du fait qu'il s'agit de la principale source de NADPH, nécessaire à la synthèse des acides gras, et une source de pentoses, indispensables dans la composition des nucléotides.

3.1 Le complexe pyruvate déshydrogénase

Le complexe pyruvate déshydrogénase (cPDH) est un système multienzymatique qui catalyse la décarboxylation oxydative du pyruvate en acétyl-CoA et CO_2 . C'est un processus mitochondrial, complexe, irréversible dans tous les tissus animaux et constitue une étape obligatoire pour faire entrer les glucides dans le cycle de Krebs (TCA)

(Lehninger, 1981). Le mécanisme permettant la décarboxylation oxydative du pyruvate se résume par la réaction globale suivante :

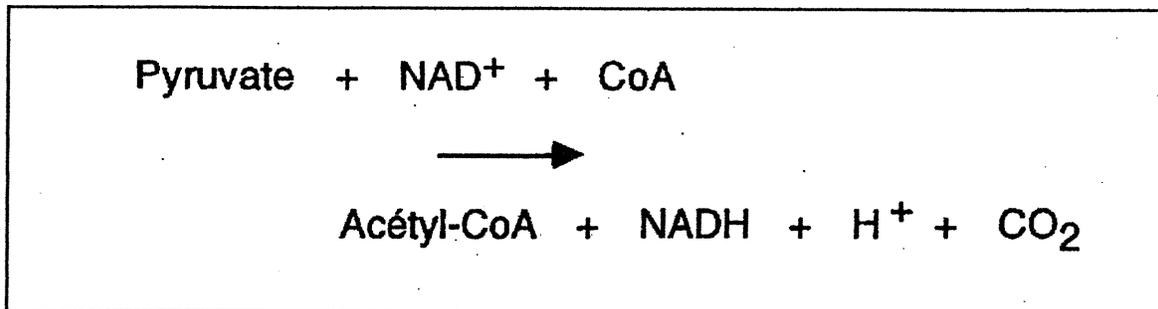


Figure 1.5 Réaction effectuée par le cPDH

3.2 Le complexe de l' α -cétoglutarate déshydrogénase

L'oxydation de l' α -cétoglutarate en succinate est une réaction irréversible dans les cellules animales. Elle est réalisée par le complexe α -cétoglutarate déshydrogénase (α CGDH). Le mécanisme permettant l'oxydation de l' α -cétoglutarate est analogue à celui qui oxyde le pyruvate en acétyl-CoA et CO_2 . La réaction se résume comme suit.

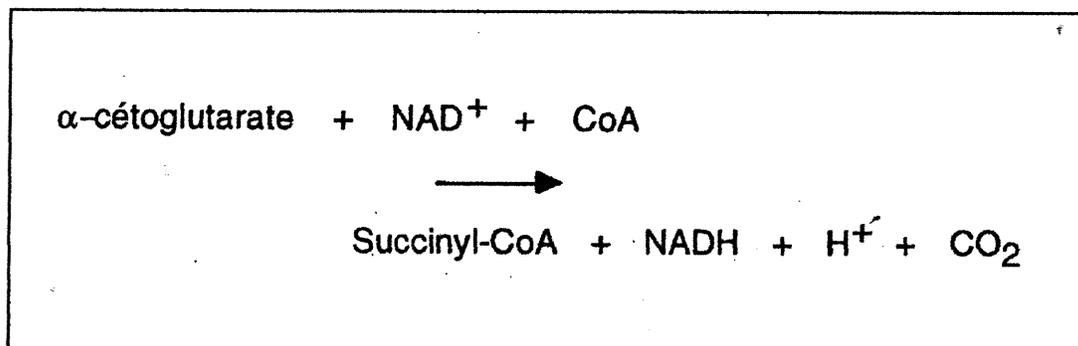


Figure 1.6 Réaction effectuée par le complexe α CGDH.

3.3 La Transcétolase

La transcétolase (TC) est une enzyme un peu particulière car elle fait partie de la voie des pentoses phosphates ou "shunt" des hexoses monophosphates. Cette voie ne

constitue pas la voie principale d'oxydation du glucose par le cerveau. Elle possède deux fonctions. La première est de créer une capacité de réduction sous forme de NADPH dans le cytoplasme extramitochondrial et la deuxième est la formation des pentoses, en particulier le ribose 5-phosphate. Ce dernier sera utilisé pour la synthèse des nucléotides et des acides nucléiques. La TC participe à deux réactions réversibles et cytoplasmiques démontrées ci-dessous. Elles permettent tous les deux une entrée dans la séquence glycolytique (Lehninger, 1981).

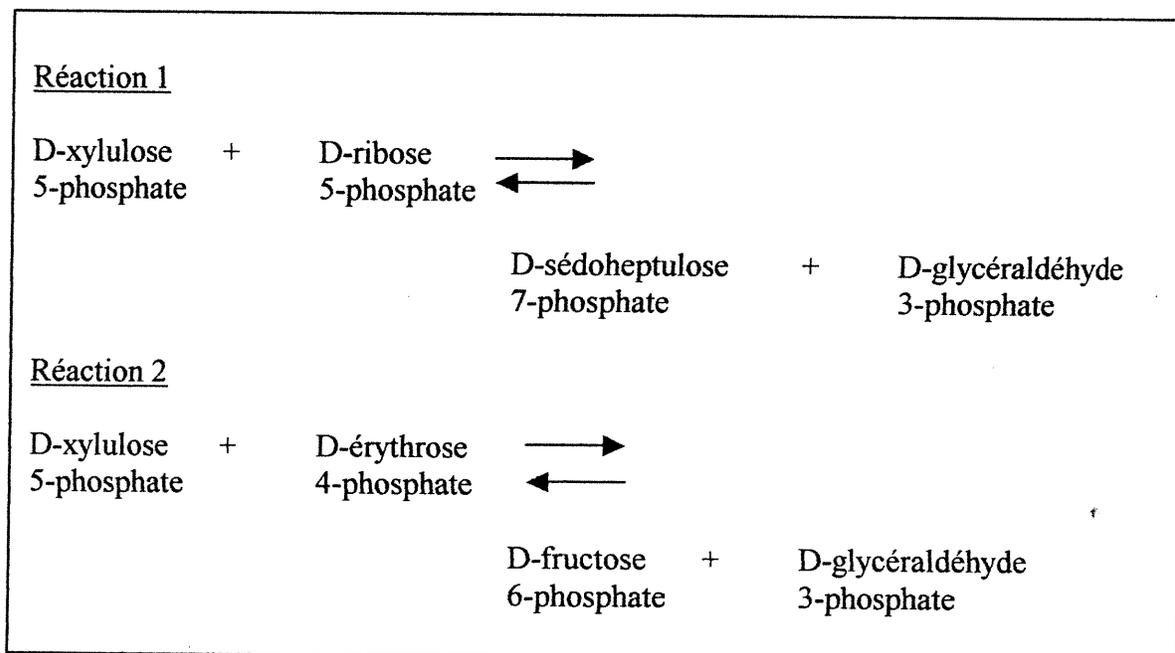


Figure 1.7 Réactions effectuées par la TC.

Les trois points discutés ci-haut, font preuve de l'importance cruciale de maintenir un niveau adéquat de thiamine à défaut de se retrouver en présence de troubles majeurs du système oxydatif énergétique.

4. L'encéphalopathie de Wernicke : Déficience thiaminique chez les humains

L'encéphalopathie de Wernicke (EW) est un désordre neuropsychiatrique attribuable à une déficience en thiamine (DT) que l'on rencontre communément chez des personnes qui souffrent d'alcoolisme chronique, de malnutrition dû à des troubles gastro-intestinaux ou chez des patients atteints du SIDA (Butterworth, 1989, 1991; Victor et al. 1989). Ce désordre est caractérisé par des symptômes tels que l'ataxie, des troubles de la mémoire et le nystagmus. L'évaluation histopathologique du cerveau de patients EW démontre une perte neuronale sévère, une gliose résultant de la prolifération des astrocytes réactionnels et des cellules du système immunitaire ainsi que de dommages vasculaires dans des régions focales du cerveau qui incluent les corps mammillaires, le thalamus et les régions périventriculaires (Kril, 1996; Troncoso et al. 1981). La dégénérescence du cervelet, marquée par une perte des cellules Purkinje et d'un rétrécissement du cortex cérébelleux ainsi que des zones moléculaires et granulaires est aussi identifiée lors d'une DT (Collins et al. 1970; Philips et al. 1987, 1990).

À ce point, il serait important de distinguer les trois syndromes que l'on retrouve suite à différents degrés de déficience en thiamine, soit le béribéri, l'encéphalopathie de Wernicke ou celle de Korsakoff. Le béribéri est la manifestation d'une carence chronique en thiamine strictement d'origine alimentaire qui évolue avec des complications cardiovasculaires et/ou un syndrome neurologique avec les symptômes mentionnés ci-haut. Le béribéri demeure un problème majeur dans les pays pauvres, mais a pratiquement disparu dans le monde occidental. Quant à l'encéphalopathie de Wernicke et du syndrome de Korsakoff, ils sont dus à une déficience en thiamine généralement consécutive à une consommation élevée et chronique d'alcool, bien que d'autres causes

non alcooliques en sont aussi responsables. Les cas d'EW dits non alcoolique incluent des cas causés par des vomissements répétés lors de traitements de chimiothérapie et des désordres nutritifs suite à des carcinomes intestinaux, ou se manifestent chez des personnes âgées qui ne maintiennent pas un statut nutritionnel adéquat. C'est le genre d'affectation neurologique découlant d'un manque de thiamine que l'on retrouve en Amérique (McEntee et al., 1990). L'EW peut aussi être précipitée chez un patient (que l'on ignore être) déficient en thiamine, qu'on admet à l'hôpital et auquel on administre de routine du glucose. En effet, cet apport massif en glucose épuise les dernières réserves de thiamine essentielles dans le cycle de Krebs, ce qui peut conduire directement vers le coma dû à un affaissement du système énergétique, à moins que de la thiamine ne soit injectée aussitôt l'apparition d'une dégradation du statut neurologique. C'est pourquoi, aujourd'hui, dans la plupart des cas d'urgence, on administre de la thiamine conjointement à l'administration de glucose. Donc, dans le cas de l'encéphalopathie de Wernicke, qui est considérée comme la phase aiguë de la maladie, les symptômes cliniques ressemblent à ceux observés dans le bériberi (ophtalmoplégie, confusion, ataxie, Victor et al., 1989). Cependant, il y a une atteinte plus marquée du système nerveux central, notamment avec de la confusion et des hallucinations. Ces symptômes sont réversibles suite à une injection massive de thiamine. En ce qui concerne le syndrome de Korsakoff (EK), la phase chronique d'une DT, il est caractérisé par des lésions irréversibles dans le thalamus et les corps mamillaires accompagné par une psychose sévère caractérisée par une amnésie antérograde, de la désorientation et un penchant continu à fabuler. Ces séquelles ne sont pas atténuées par un apport massif de thiamine. En résumé, on peut dire que le syndrome de Wernicke-Korsakoff (W-K) peut se présenter sous deux phases, l'une

aigüe (EW) et l'autre chronique (EK). La première peut être diagnostiquée par une combinaison d'un ou plusieurs des signes cliniques de la triade comprenant des troubles ophtalmologiques, de l'ataxie et un état de confusion global. Après traitement thiaminique, l'état de confusion globale s'estompe laissant place à la psychose de Korsakoff se caractérisant par des troubles de la mémoire antérograde et rétrograde. L'encéphalopathie de W-K caractérise les patients atteints de l'ensemble des symptômes mentionnés ci-haut.

Il n'y a aucun doute que ces atteintes du système nerveux central soient provoquées par une déficience thiaminique. Des expériences comme celles de Tallaksen et al. (1993) qui démontrent des niveaux anormalement bas de thiamine dans le sang et le liquide céphalo-rachidien de patients atteints, et comme celles de Butterworth et al. (1993) qui démontrent une baisse de l'activité des enzymes thiamino-dépendantes dans des cerveaux autopsiés, confirment en effet que la déficience en thiamine a des répercussions néfastes sur le système nerveux central. Finalement, le bériberi et le syndrome de Wernicke-Korsakoff sont considérés comme les manifestations graves d'une déficience en thiamine.

5. Les modèles animaux et expérimentaux de la déficience en thiamine

Nous avons préalablement discuté du modèle du pigeon carencé en thiamine qui a permis à Peters d'avancer l'hypothèse de lésion biochimique. Aujourd'hui nous utilisons d'avantage le modèle animal du rat traité à la pyrithiamine pour étudier l'encéphalopathie de Wernicke. Ce modèle reproduit les lésions neuropathologiques retrouvées chez

l'humain. De plus, il permet de prévoir dans le temps, l'apparition des signes cliniques chez l'animal (Troncoso et al., 1981).

Les lésions neuroanatomiques du cerveau démontrent des altérations et des pertes neuronales, une prolifération gliale (gliose) et des hémorragies (Collins, 1967). Voici (ci-bas) un tableau comparant les lésions neuroanatomiques suite à une déficience en thiamine chez l'humain et le rat.

Syndrome de Wernicke-Korsakoff Chez l'humain	Rat traité à la pyrithiamine et déficient en thiamine
Thalamus Noyau dorsal médian Noyau pulvinar	Thalamus Noyau dorsal médian Noyau pulvinar
Corps mamillaires	Corps mamillaires
Hypothalamus	Hypothalamus
Mésencéphale Matière grise périaqueductale Culliculi inférieur et supérieur	Mésencéphale Matière grise périaqueductale Culliculi inférieur et supérieur
Plancher du IV^e ventricule Noyau dorsal moteur vague Noyau vestibulaire	Plancher du IV^e ventricule Noyau dorsal moteur vague Noyau vestibulaire
Cervelet Cortex du vermis supérieur Partie antérieure du lobe antérieur	Cervelet Cortex du vermis supérieur Partie antérieure du lobe antérieur
	Olives inférieures

Tableau 1. Comparaison des lésions neuroanatomiques retrouvées dans le syndrome de Wernicke-Korsakoff humain et le modèle de rat traité à la pyrithiamine et déficient en thiamine.

Évidemment il y a des changements biochimiques interactifs poussants les neurones à mourir uniquement dans certaines régions très spécifiques et simultanément

provoquant une gliose réactionnelle qui est manifestée par les astrocytes dans ces mêmes régions. Plusieurs études ont été focalisées sur les astrocytes en culture, mais, à notre connaissance, aucune étude ne portait sur ce qui se produit dans des cultures primaires neuronales, jusqu'à ce que nous présentions les études faisant l'objet de ce mémoire. Le but de mes travaux était de caractériser un modèle *in vitro* de déficience en thiamine dans une culture primaire de neurones (biochimie et neuropathologie) et de le comparer au modèle connu de déficience en thiamine chez les astrocytes. Les avantages de cette étude seront mis en évidence par le fait même d'étudier séparément les deux types cellulaires (qui normalement interagissent) et leurs paramètres biochimiques et pathophysiologiques afin de mieux comprendre la progression des lésions neuroanatomiques parfois irréversibles chez l'humain et dans le modèle animal du rat.

6. Mécanismes de mort neuronale reliés à la déficience en thiamine.

La dernière décennie nous fait preuve d'importantes découvertes sur la compréhension des mécanismes pathophysiologiques reliant la déficience en thiamine aux lésions cérébrales sélectives de l'EW. En voici un bref résumé qui sera plus amplement détaillé dans cette section: Chez le modèle du rat utilisé pour caractériser les mécanismes de mort cellulaire, il est convenu que les résultats pointent vers une déficience enzymatique (baisse de l'activité de l' α CGDH) qui résulte en acidose lactique focale, un ralentissement du métabolisme énergétique cérébral et une perturbation de la dépolarisation neuronale due à l'augmentation de la libération du glutamate dans les régions vulnérables du cerveau. Il a été proposé que cette dépolarisation peut mener à une excitotoxicité couplée aux récepteurs NMDA ainsi qu'à une augmentation de

l'expression des gènes nommés "immediate-early genes", tels *c-fos* et *c-jun*, qui sont impliqués dans la cascade de mort cellulaire apoptique. D'autres mécanismes possiblement impliqués dans la mort cellulaire lors d'une DT incluent les radicaux libres et des altérations de la BHE. Cependant, des expériences additionnelles sont requises afin d'identifier le site initial d'où origine la première manifestation de détresse d'une cellule lors d'une DT. Ces informations nous permettraient de comprendre pourquoi certaines régions du cerveau sont plus susceptibles à une mort cellulaire que d'autres lors d'une DT. Des études de DT induite par la Py (modèle animal de l'EW) ont jusqu'à présent failli de mettre en cause directement des paramètres tels la baisse des esters de thiamine (Héroux et Butterworth, 1995), les variations des enzymes thiamino-dépendantes (Butterworth and Héroux, 1989; Gibson et al. 1984) et des changements aux niveaux des récepteurs cellulaires (Rao et al., 1995; Peterson et al., 1995; Mousseau et al. 1996) à la source de la nature sélective des changements histologiques qui se produisent dans cette maladie. Au fil des ans, la variabilité encourue dans les procédures expérimentales afin de produire un état de DT parmi différents groupes de chercheurs à travers le monde a certes contribué à plusieurs différences dans les nombreux modèles de DT, compliquant davantage les efforts pour identifier la séquence d'évènements qui se produisent lors de l'évolution d'une DT. C'est en grande partie pourquoi nous avons choisi de travailler sur un modèle simple de neurones en culture primaire soumis à une DT. Nous sommes directement en présence de cellules affectées létalement par la DT, la reproductibilité est constante en plus de ne pas se soucier de la complexité d'un modèle animal. Nous allons maintenant décrire plus en détail les mécanismes de mort neuronale que l'on retrouve dans les modèles de DT.

6.1 Neuropathologie

Dans une série d'études à grande échelle, Victor et ses collaborateurs rapportent que l'étude des cerveaux de patients diagnostiqués avec l'EW démontre des changements neuropathologiques qui incluent un grossissement des ventricules latéraux et du troisième ventricule et des lésions histologiques dans les régions subventriculaires du thalamus (Victor et al., 1989). Dans la plupart des cas, les corps mamillaires comportaient des lésions considérables. On remarque des lésions au niveau du cervelet et au niveau du thalamus, où le noyau dorsal médian fut presque toujours touché. En général, se sont les régions en périphérie et en proximité du système ventriculaire qui présentent les plus grands signes de lésions histologiques. La perte de neurones était l'anomalie la plus évidente dans les structures du thalamus et du vermis cérébelleux. De plus, l'on constate un rétrécissement du cerveau lors de l'EW (Harper and Kril, 1991; Kril et al., 1997). Dans les régions affectées, on observe souvent un gonflement des astrocytes, une diminution des fibres myélinisées et une zone de perte de cellules nerveuses accompagnée d'une microglie réactive et d'une astroglie réactive.

Les altérations dans la morphologie des cellules gliales représentent les signes les plus précoces de changement histologiques lors d'une DT (Collins, 1967; Robertson et al., 1968). Ces changements précoces suggèrent des modifications métaboliques pouvant jouer un rôle important dans la pathologie de cette maladie.

Une étude de Torvik (1985), démontre que la nature des lésions neuropathologiques chez les patients atteints de l'EW, varie selon la région du cerveau. Plus particulièrement, il démontra que les lésions des corps mamillaires et les structures

paraventriculaires étaient différents à celles que l'on voit dans le thalamus et les olives inférieures. Cette étude fut la première à suggérer l'implication de différents types de lésions structurelles qui surviennent lors de l'EW, et laisse présager l'implication de plus d'un mécanisme de mort neuronale.

6.1.1 La lésion biochimique

Dans la cellule, trois systèmes enzymatiques majeurs requièrent de la thiamine sous la forme de TDP pour une activation fonctionnelle. Ceux-ci sont le complexe de la pyruvate déshydrogénase (PDH), le complexe de l' α -cétoglutarate déshydrogénase (CGDH) et la transcétolase (TC). Les études de Peters (1936) nous ont démontré qu'une injection de thiamine après la manifestation de troubles neurologiques dus à une DT, était suffisante pour éliminer l'accumulation de lactate (causée par le manque d'oxydation du pyruvate) et enrayer les signes neurologiques tel l'opisthotonos. Cette réversibilité des anomalies métaboliques résulta en concept de "lésions biochimiques". D'autres études plus récentes ont établi que la base de ces lésions résidait plus probablement dans la diminution de l'activité de l' α -CGDH dans le cerveau suite à une administration de Py chez les rats (Gibson et al., 1984; Butterworth et al., 1986). Puisque l'activité *in vitro* de cette enzyme est similaire aux valeurs estimées pour le flux *in vivo* des molécules ayant trois carbones provenant du glucose (Gibson et al., 1984), il est probable que la baisse de l'activité de l' α -CGDH cérébrale est responsable pour la chute de l'oxydation du glucose et du pyruvate qui survient lors d'une DT. De plus, une diminution de l'activité de l' α -CGDH est associé avec une augmentation des niveaux d'alanine dans le cerveau (Gibson et al., 1984; Butterworth et Héroux, 1989) et de lactate (McCandless, 1982; Hakim 1984),

ce qui suggère fortement que le flux de pyruvate dans le cycle tricarboxylique (TCA) est réduit. L'activité de l' α -CGDH est considérablement réduite dans plusieurs régions du cerveau qui ultimement développent des lésions histologiques (Gibson et al., 1984; Butterworth et al., 1986; Butterworth et Héroux, 1989). La diminution de l'activité de l' α -CGDH est associée avec une diminution réversible de la concentration des acides aminés neuroactifs glutamate, aspartate et GABA, ce qui suggère que ces acides aminés jouent un rôle significatif dans le développement de la lésion biochimique.

Le niveau de l'activité enzymatique du PDH demeure inchangé lors d'une DT (Gibson et al., 1984; Butterworth et al., 1985; Elnageh et Gaitonde, 1988), mais ce n'est pas le cas de l'activité de la TC qui diminue beaucoup dans les régions vulnérables ainsi que celles non-vulnérables lors d'une DT (McCandless et Schenker, 1968; McCandless et al., 1976; Gibson et al., 1984; Giguère et Butterworth, 1987). Cette enzyme est impliquée dans la voie des pentoses phosphates, une voie importante qui fournit des sucres riboses pour la synthèse d'acides nucléiques ainsi que des acides gras pour l'entretien de l'intégrité des membranes phospholipidiques. Malgré la baisse de l'activité de l'enzyme TC lors d'une DT, l'activité globale de la voie des pentoses phosphates ne semble pas être affectée (McCandless et al., 1976). Ceci signifie que cette voie constitue une grande réserve métabolique.

De façon générale, les preuves disponibles suggèrent que l'altération de l'activité du PDH ainsi que celle de la TC ne joueraient vraisemblablement pas un rôle majeur dans la réversibilité des symptômes neurologiques suivant une DT. À l'opposé, une réduction prolongée de l'activité de la TC peut engendrer une déficience d'acides nucléiques, une

perte de l'intégrité membranaire des cellules et une démyélination, toutes des caractéristiques de l'EW.

6.1.2 Métabolisme énergétique cérébral.

Plusieurs études ont démontré que la vulnérabilité cérébrale en DT est associée à une réduction des niveaux d'ATP de façon sélective dans les régions susceptibles aux lésions histologiques (Aikawa et al., 1984). En effet, comme l' α CGDH est une enzyme limitante du taux de production d'ATP dans le cycle tricarboxylique (TCA), des diminutions focales régionales de son activité (Gibson et al., 1984; Butterworth et al., 1986; Butterworth and Héroux, 1989) vont vraisemblablement résulter en une diminution de production d'énergie, conséquemment une réduction du contenu d'ATP dans les régions vulnérables du cerveau lors d'une DT. Une réduction prolongée des niveaux d'ATP résulte dans une mort cellulaire nécrotique. Ceci représente un important facteur à étudier afin de déterminer le taux de survie des cellules dans certaines régions du cerveau lors de la progression de l'EW.

6.1.3 Acidose lactique

L'accumulation d'acide lactique dans le cerveau d'animaux déficients en thiamine est un phénomène très bien documenté depuis plusieurs années (Kinnersley et Peters, 1930; McCandless et Schinker, 1968). En présence d'une DT, il a été démontré que l'augmentation de lactate (et l'acidose qui s'en suit) est localisée dans les régions qui développent subséquemment des lésions histologiques (McCandless, 1982; Hakim, 1984). L'acidose lactique mène à une acidification cellulaire et tissulaire *in vivo* et

contribue majoritairement au développement de lésions cérébrales hypoxiques et ischémiques (Myers, 1979; Yoshida et al., 1985). De plus, l'acidose extracellulaire et intracellulaire est associée à l'œdème cellulaire (Myers, 1979; Kalimo et al., 1981), une caractéristique neuropathologique de la DT qui est particulièrement évidente chez les cellules gliales (Collins, 1967; Robertson et al., 1968; Watanabe et al., 1978). Des expériences du chercheur Hakim (1984) suggèrent que l'accumulation de lactate et la baisse de pH qui s'en suit dans les régions sélectives et vulnérables du cerveau, soit l'un des mécanismes de mort neuronale que l'on retrouve en DT.

6.1.4 Excitotoxicité liée aux récepteurs NMDA

Plusieurs études démontrent aussi une implication du glutamate comme étant responsable pour certaines lésions lors d'une DT. Les niveaux de glutamate cérébral sont réduits chez les animaux déficients en thiamine (Gubler et al., 1974; Butterworth, 1982) et plus particulièrement dans les régions vulnérables à la DT (Butterworth et Héroux, 1989). Ces résultats concordent avec des études antérieures qui démontrent une réduction dans la conversion du glucose [^{14}C] en glutamate dans les animaux déficients en thiamine (Gaitonde et al., 1975) ainsi qu'une réduction de la libération du glutamate (calcium dépendante) lors d'études effectuées sur des tranches de cerveaux provenant d'animaux DT (Lê et al., 1991). De plus, il a été démontré que l'étendue de mort cellulaire peut être réduite dans les régions du cerveau vulnérable à une DT suite à un traitement impliquant le MK-801, un antagoniste non-compétitif des récepteurs NMDA (Langlais et Mair, 1990; Todd et Butterworth, 1998a). Par le fait même, une augmentation des concentrations de glutamate extracellulaire a été notée dans les régions vulnérables à la

DT (Hazell et al, 1993), un résultat qui correspond très bien aux mécanismes d'excitotoxicité glutamatergique. C'est-à-dire qu'une augmentation de la concentration du glutamate extracellulaire peut engendrer un influx incontrôlé de Ca^{2+} , produisant une excitotoxicité en déclenchant une cascade de mort neuronale, (Olney et al., 1971; Schanne et al., 1979; Farber et al., 1981).

6.1.5 La barrière hémato-encéphalique

L'hypothèse d'une implication de la détérioration de la BHE lors d'une DT causant des lésions au cerveau fut émise il y a déjà cinquante ans par un chercheur du nom de Scholz (1949). Plus récemment, des études immunohistochimiques sur le model animal de la DT démontrent qu'en effet il y a une perturbation de la BHE laissant passer des grosses molécules telle celle de l'albumine, ce qui dans des conditions normales ne se produit jamais (Harata et Iwasaki, 1995; Caligasan et al., 1995a). De plus, on retrouve des lésions hémorragiques dans les régions vulnérables à la DT (Vortmeyer et Colmant, 1998; Caligasan et al., 1995a) suggérant un affaissement de l'intégrité des parois des vaisseaux capillaires lors d'une DT. Des résultats similaires ont été démontrés chez les humains souffrant d'EW (Schroth et al., 1991).

Deux hypothèses ont été fournies par différents groupes de chercheurs tentant d'expliquer la cause de la perturbation de la BHE lors d'une DT. La première hypothèse implique une perturbation de nature mécanique, où la BHE, et les jonctions entre les cellules qui la composent, sont soumises à un stress, un étirement créant des ouvertures, lors de l'œdème cérébral que l'on retrouve dans l'EW, permettant alors le passage de molécules potentiellement nocives pour les neurones. Cette hypothèse, bien que fondée,

est peu probable en ce qui a trait à la causalité initiale de la dégénérescence de la BHE puisque l'œdème cérébral est plutôt une conséquence qu'une cause de la DT. (Calingasan et al., 1995a; Manz et Robertson, 1972; Joô, 1971).

La deuxième hypothèse soutient une perturbation de la BHE d'ordre chimique. Calingasan et al. (1996) ont démontré la présence de protéines précurseurs à l'amyloïde (APP) dans plusieurs régions vulnérables à la DT. Des études récentes indiquent que le peptide β de l'amyloïde ($A\beta$), un fragment de l'APP, augmente la fluidité membranaire d'un neurone et la peroxydation des lipides (Avdulov et al., 1997). De telles altérations dans l'environnement lipidique de la membrane peuvent contribuer aux changements que l'on retrouve dans la BHE lors d'une DT. L'effet de l' $A\beta$ est réversible suite à un traitement avec des antioxydants (Blanc et al., 1997).

Des études antérieures ont aussi démontré que l' $A\beta$ peut être un facteur déterminant dans les lésions excitotoxiques (Koh et al., 1990; Mattson et al., 1992) et il est capable d'induire l'apoptose (Forloni et al., 1993; Loo et al., 1993). Ces résultats suggèrent que ce peptide joue un rôle important dans l'augmentation de la perméabilité de la BHE et joue probablement un rôle dans la pathophysiologie de la mort neuronale lors d'une DT.

6.1.6 Les radicaux libres et le stress oxydatif

Le stress oxydatif peut être défini comme une rupture de l'équilibre entre agents oxydants et agents anti-oxydants (Farber, 1994). Les principaux agents oxydants produits dans l'organisme sont l'ion superoxyde ($\bullet O_2^-$), l'ion oxyde nitrique ($\bullet NO^-$), qui réagissent ensemble pour former le peroxyde d'azote ($ONOO^-$), le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) et le

radical hydroxyl (OH). Le radical oxygène peut être produit par la cellule elle-même, notamment dans le SNC à travers l'activité des mitochondries (cytochromes P450) et des oxydases cellulaires, comme la xanthine oxydase. Il est transformé en H_2O_2 par la superoxyde dismutase (SOD). Le H_2O_2 peut à son tour être transformé spontanément en radical hydroxyl OH, le plus réactif, et donc le plus toxique des agents oxydants produit par la cellule. Une augmentation des radicaux libres peut mener à la peroxidation des lipides, des dommages à l'ADN et à l'inactivation d'enzymes.

Récemment, Langlais et al. (1997) démontrèrent la présence de radicaux oxygène dans le thalamus d'animaux rendus déficients en thiamine.

Malgré que l'origine de la production excessive de radicaux libres ne soit pas encore connue lors d'une DT, il existe plusieurs causes possibles telles l'augmentation extracellulaire de la concentration de glutamate, l'activation de récepteurs NMDA, la dégénérescence de la BHE et la prolifération de la microglie et des astrocytes.

Todd et Butterworth (1998b) démontrèrent, par des études immunohistochimiques, la présence de microglie réactive chez le rat déficient en thiamine. Cette microglie réactive peut contribuer à l'augmentation de la production de radicaux libres. La microglie réactive est aussi une manifestation neuropathologique que l'on voit chez l'humain atteint de l'EW (Victor et al., 1989). Parallèlement, l'oxyde nitrique (NO) a la capacité d'altérer la BHE (Au et al., 1985). Puisque les cellules astrocytaires sont des sources importantes de NO (Murphy et al., 1990) et que les radicaux libres sont capables d'altérer la BHE (Chan et al., 1984), ce radical oxygène est soupçonné de jouer un rôle majeur dans la neuropathologie de la DT. De plus, il a été démontré par Todd et Butterworth (1989c) qu'un traitement au deprenyl, un antioxydant,

résulte en une augmentation de la survie neuronale chez des rats déficients en thiamine. Ceci supporte davantage le fait que les radicaux libres, incluant NO, jouent possiblement un rôle dans la pathogénèse des lésions cérébrales induites par la DT.

6.1.7 Apoptose ou nécrose?

Plusieurs études révèlent que les phénomènes de mort cellulaire par apoptose et nécrose se produisent tous les deux lors d'une DT. Il a été démontré par Matsushima et al. (1997) que le thalamus subit une épisode de mort cellulaire apoptotique mais que les autres régions dégénèrent plutôt par nécrose. De plus, il a été pour la première fois démontré que l'expression des gènes *c-fos*, *c-jun*, *fos-B* et *NGFI-A*, mieux connus sous le nom de "immediate-early genes" (IEGs), était grandement augmentée et localisée dans certaines régions vulnérables du cerveau lors d'une DT, et ce, avant l'apparition de lésions nécrotiques (Hazell et al., 1998). Les IEGs encodent des facteurs transcriptionnels qui sont induits suite à une dépolarisation de la cellule, ce que l'on observe en DT, et qui sont impliqués dans le contrôle des gènes qui dirigent l'apoptose et la mort cellulaire par excitotoxicité (Bartel et al., 1989; Colotta et al., 1992). De plus amples études sont nécessaires afin de déterminer l'implication du phénomène d'apoptose versus celui de la nécrose en tant que mécanisme de mort cellulaire que l'on retrouve en DT.

CHAPITRE 2

Article

**Thiamine Deficiency Results in Metabolic Acidosis and Energy Failure in
Cerebellar Granule Cells : An In Vitro Model for the Study of Cell Death
Mechanisms in Wernicke's Encephalopathy.**

[J. Neurosci. Res. (2000). Sous Presse]

**THIAMINE DEFICIENCY RESULTS IN METABOLIC ACIDOSIS
AND ENERGY FAILURE IN CEREBELLAR GRANULE CELLS: AN
IN VITRO MODEL FOR THE STUDY OF CELL DEATH
MECHANISMS IN WERNICKE'S ENCEPHALOPATHY**

Pierre Pannunzio, Alan S. Hazell, Marc Pannunzio, K.V. Rama Rao
and Roger F. Butterworth,

Neuroscience Research Unit, Hôpital Saint-Luc (Université de Montréal),
Montreal, Qué., Canada H2X 3J4

Running title: Neuronal cell death in thiamine deficiency

Address for reprints and correspondence:

Roger F. Butterworth, Ph.D., D.Sc.
Director, Neuroscience Research unit
Hôpital Saint-Luc,
1058 Saint-Denis Street
Montréal, Québec
H2X 3J4 Canada

Tél.; (514) 281-2444 ext. 5740
Fax.; (514) 281-2492
e-mail; butterwr@medclin.umontreal.ca

Grant information: This study was supported by a grant from the Medical Research
Council of Canada (MT9156).

Abstract

Thiamine deficiency (TD) in both humans and experimental animals results in severe compromise of mitochondrial function and leads to selective neuronal cell death in diencephalic and cerebellar structures. In order to further examine the influence of TD on neuronal survival in relation to metabolic changes, primary cultures of rat cerebellar granule cells were exposed to thiamine-deficient medium for up to 7 days in the absence or presence of the central thiamine antagonist pyriethamine. Exposure of cells for 7 days to thiamine-deficient medium alone resulted in no detectable cell death. On the other hand, 50 μ M pyriethamine treatment led to reductions of thiamine phosphate esters, decreased activities of the thiamine-dependent enzymes, α -ketoglutarate dehydrogenase and transketolase, a 2-fold increase in lactate release ($p < 0.001$), a lowering of pH and significant (58%, $p < 0.001$) cell death. DNA fragmentation studies did not reveal evidence of apoptotic cell death. Addition of 50 μ M α -tocopherol (vitamin E) or 100 μ M of butylated hydroxyanisole (BHA) to Py treated cells resulted in significant neuroprotection. On the other hand, addition of 10 μ M of MK-801, a NMDA receptor antagonist, was not neuroprotective. These results suggest that reactive oxygen species (ROS) play a major role in thiamine deficiency-induced neuronal cell death. Since this experimental model recapitulates the metabolic and mitochondrial changes characteristic of thiamine deficiency in the intact animal, it could be useful in the elucidation of mechanisms involved in the neuronal cell death cascade due to thiamine deficiency.

Introduction

Thiamine deficiency (TD) in humans leads to Wernicke encephalopathy (WE), a neuropsychiatric disorder commonly encountered in chronic alcoholism and in patients with impaired nutrition associated with gastrointestinal disease or AIDS (Butterworth, 1991; Victor et al. 1989). Histopathologic evaluation of brain tissue from WE patients reveals neuronal loss, gliosis and vascular damage in focal regions of the brain that include the mammillary bodies, inferior olive, thalamus and other periventricular regions (Kril, 1996; Troncoso et al. 1981). Cerebellar degeneration associated with a loss of Purkinje cells as well as a shrinkage of the cerebellar cortex and the molecular and granule cell layers have also been reported in TD (Collins et al., 1970; Phillips et al., 1987, 1990). In addition, Positron Emission Tomography (PET) studies reveal reduced cerebellar glucose utilization (Gilman et al., 1990) which may be a consequence of severe metabolic compromise of energy metabolism in thiamine deficiency (Aikawa et al., 1984).

The use of pyrithiamine (Py) to induce experimental thiamine deficiency in the rat provides a reliable model which reproduces both the metabolic and pathologic characteristics of WE (Héroux and Butterworth, 1992). Py is a potent inhibitor of thiamine pyrophosphokinase (Rindi et al., 1961; Johnson et al., 1965) and thus inhibits the synthesis of TDP, which acts as a cofactor for several enzymes involved in cerebral energy metabolism.

The present study was undertaken to characterise the metabolic changes responsible for the cerebellar degeneration in TD. Use was made of rat cerebellar granule cells (CGCs) in primary culture. The influence of TD on the functional integrity and

energy metabolism of CGCs was investigated following exposure to thiamine-deficient media with or without added pyriethiamine. The findings indicate that the latter treatment leads to profound metabolic changes resulting in compromised cellular energy metabolism, oxidative cell damage and necrosis.

Materials and Methods

Primary cultures of cerebellar granule cells

CGCs were prepared from 7-day-old Sprague-Dawley rats as previously described (Gallo et al., 1987, Thangnipon et al., 1983). Briefly, cerebella were mechanically chopped into 0.5-mm cubes and cells were dissociated by trypsinization. The dissociated cells were plated onto 35-mm dishes precoated with poly-L-lysine at a density of $\approx 1.5 \times 10^6$ cells/dish and cultured in 2 ml of Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) containing 10% fetal calf serum, 2 mM glutamine and 25 mM KCl. The medium was changed 20 h later with addition of cytosine arabinoside (20 μ M) to arrest the growth of non-neuronal cells. The cultures were allowed to develop for 6 days before commencing treatment. Cells were subsequently treated with thiamine-deficient DMEM (GIBCO Life Technologies, Gaithersburg, MD, U.S.A.), containing 5% FCS, 2 mM glutamine and 25 mM KCl, to which 50 μ M Py or 8 mg/L thiamine (as control medium) was added.

Thiamine and thiamine esters analysis via HPLC

Thiamine and its phosphates were measured essentially as described by Bettendorf et al. (1986), with minor modifications. CGCs were harvested in 400 μ l ice-

cold potassium phosphate buffer 50 mM, pH 7.4 and sonicated. Protein content was determined by the method of Lowry et al. (1951). Homogenates were then deproteinized with 75 μ l of cold TCA (50%) and centrifuged at 12,500 rpm for 20 min at 4°C. The supernatant was extracted twice with five volumes of water-saturated diethyl ether. The solvent delivery system for HPLC (Waters Co., U.S.A., model 501) was equipped with an automatic sampler (Varian 9090). Eighty microliters of the supernatant was derivatized by mixing 30 μ l of alkaline ferricyanide solution (4.3mM potassium ferricyanide in 15% sodium hydroxide) prior to injection on the column (PRP-1; 150 mm x 4.1mm I.D., 5 μ m; Hamilton, Reno, Nv, U.S.A.). Standard curves for thiamine and its esters were generated using external standards prepared in the same extraction solutions as the cell extracts. Peak area measurements were computed using the Baseline 810 program (H eroux and Butterworth, 1995).

Measurement of α -ketoglutarate dehydrogenase Activity

The activity of α -ketoglutarate dehydrogenase (KGDH) was measured spectrophotometrically at 25°C by measuring the rate of increase of absorbance due to NADH at 340 nm (Lai et al. 1986). Cells were harvested in homogenizing buffer: 20 mM MOPS containing 0.2 mM mercaptoethanol, 5 mM MgCl₂, 0.1 mM CaCl₂, 1g/L Triton X-100, 1 g/L Lubrol-Px and the pH was adjusted to 7.2 with Tris. The reaction mixture contained: 0.2 mM thiamine diphosphate (TDP), 2 mM NAD⁺, 0.2 mM CoA, 1 mM MgCl₂, 0.3 mM DTT, 0.1% Triton X-100, 10 mM α -ketoglutarate, 130 mM HEPES-Tris, pH 7.4. The reaction was initiated by the addition of CoA and the rate of increase of absorbance was monitored for 6 min.

Measurement of transketolase

Transketolase (TK) activity was measured according to the method of Giguère and Butterworth (1987) with minor modifications. Cultures were harvested in 100 µl of cold potassium phosphate buffer (50 mM), pH 7.4 and were sonicated. To 25 µl of the homogenate was added 15 µl of ribose-5-phosphate (10 mM) and the mixture was incubated at 37°C for 30 min. The reaction was stopped by adding 20 µl of cold TCA (20%) and samples were then centrifuged at 2,500rpm for 15 min. To 50 µl of the supernatant was added 0.5 ml H₂SO₄ (50%) and the mixture boiled for 4 min. Addition of 15 µl of cysteine (3%) was followed 15h later by measurement of sedoheptulose 7-phosphate levels, obtained from the difference in absorbance at 540 nm and 510 nm using a standard curve. Protein content was measured by the method of Lowry et al. (1951).

Measurement of Pyruvate Dehydrogenase

The activity of pyruvate dehydrogenase (PDH) was assayed spectrophotometrically at 25°C by measuring the rate of réduction of INT (iodonitrotetrazolium violet) by NADH at 500 nm (Elnageh and Gaintonde, 1988). Cells were harvested in homogenising buffer: 20 mM MOPS containing 0.2 mM mercaptoethanol, 5 mM MgCl₂, 0.1 mM CaCl₂, 1 g/L Triton X-100, 1 g/L Lubrol-Px and the pH was adjusted to 7.2 with Tris. The reaction mixture contained: 0.2 mM TDP, 2.5 mM NAD, 0.1 mM CoA, 1 mM MgCl₂, 0.1 mM oxalate, 1mg/ml BSA, 0.6 mM INT, 5 mM pyruvate, 7 U of lipoamide dehydrogenase, 0.2 % Triton X-100, 0.5 mM EDTA

and 50 mM Tris-HCl, pH 7.4. The reaction was initiated by the addition of pyruvate and the rate of increase in absorbance was monitored for 10 minutes.

Measurement of Lactate and pH

Lactate was measured using a commercial lactate determination kit (Sigma, St-Louis, U.S.A.). Media samples (200 μ l) from different cell treatment groups were deproteinized with 400 μ l of trichloroacetic acid (10%) and were centrifuged at 1500 x g for 10min. The supernatant was then assayed for lactate content by measuring spectrophotometrically the change in absorbance at 340 nm due to the conversion of lactate and NAD to pyruvate and NADH by lactate dehydrogenase. The remainder of the media was used to determine pH.

Measurement of ATP levels

CGCs exposed to TD or control media were initially frozen in liquid nitrogen and stored at -80°C . Cells were immediately transferred to tubes containing a final concentration of 7 % perchloric acid following harvesting in ice-cold 0.1 M NaOH containing 1 mM EDTA. Samples were centrifuged at 5000g, 4°C for 15 min. The supernatants were neutralized with 3 M K_2CO_3 and centrifuged again. Resulting supernatants were assayed for ATP content by spectrofluorometry at 340 nm as described by Lowry and Passonneau (1972).

DNA fragmentation assay

Total genomic DNA was isolated from cultured cells and the extent of DNA fragmentation was analysed by agarose gel electrophoresis as previously described (Hockenbery et al., 1990). After treatment with RNase A (50 µg/ml) and proteinase K (0.1 mg/ml) at 37°C for 30 min, soluble DNA was subjected to electrophoresis in a 1.2% agarose gel and visualised by ethidium bromide staining.

Determination of cell viability

Cytotoxicity and neuroprotection were quantified by measuring lactate dehydrogenase release. Media samples were collected and cells were lysed in 0.1M potassium phosphate buffer containing 0.5 % Triton-X 100. LDH activity was measured by monitoring the decrease in absorbance at 340 nm due to the conversion of pyruvate and NADH to lactate and NAD⁺ (Koh et al., 1987). For the neuroprotection study, 50 µM α-tocopherol (vitamin E) (ICN, Costa Mesa, CA, U.S.A), 100 µM butylated hydroxyanisole (BHA) (Sigma, St-Louis, MO, U.S.A.), or 10 µM MK-801 (RBI, Natick, MA, U.S.A.) was added at the start of the Py treatment, as previously described (Ciani et al., 1986), and LDH release was measured 7 days later. Cells were also examined for morphology at the light microscope level.

Statistical analysis

Data are expressed as mean ± S.E.M. values. Differences between TD or Py treated groups and controls were compared using one-way ANOVA (Student-Newman-Keuls multiple comparisons test). A *P* value <0.05 was considered significant.

Results

General Observations

Under the culture conditions employed in this study, at least 95% of cells were determined to be CGCs based on morphological criteria as previously reported (Thangnipon et al., 1983). Treatment of cultures with TD media with or without addition of Py resulted in a differential response; Py treatment led to altered cellular morphology (Fig. 2.1) including shrinkage of the cell body and a severe loss of neurites compared to cells exposed to control or TD media in the absence of Py.

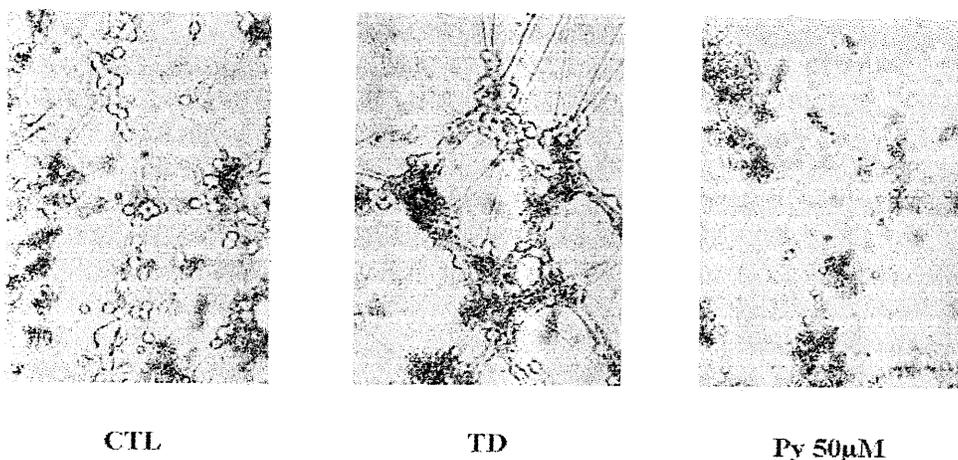


Figure 2.1 Light micrographs of rat cerebellar granule neurons cultured for 7 days in control media containing thiamine (CTL), thiamine deficient media (TD) or thiamine deficient media containing 50 μ M PY (Py). Note the loss of neuritis and shrinkage of cells in C compared to A or B. Representative seeding. Magnification: 400 X.

Effects of Thiamine Deficiency on Thiamine and its Esters

Progression of thiamine deficiency resulted in changes in the levels of intracellular thiamine and thiamine esters as shown in Figure 2.2. However, there were notable differences in the rate of decrease of thiamine and its esters during thiamine deficiency. Exposure of CGCs to TD medium resulted in a 97% decrease of thiamine

within 1 day (Fig. 2.2A). CGCs treated with Py resulted in a less dramatic decrease in thiamine content (63%). Intracellular content of thiamine diphosphate (TDP) declined significantly after 1 day (43%) following Py treatment (Fig. 2.2B). Treatment with TD and Py for up to 7 days caused significant further decreases in TDP levels. When CGCs were exposed to Py, thiamine monophosphate (TMP) levels were increased up to 4-fold after 7 days (Fig. 2.2C) while TMP levels in the other treatment groups remained unchanged.

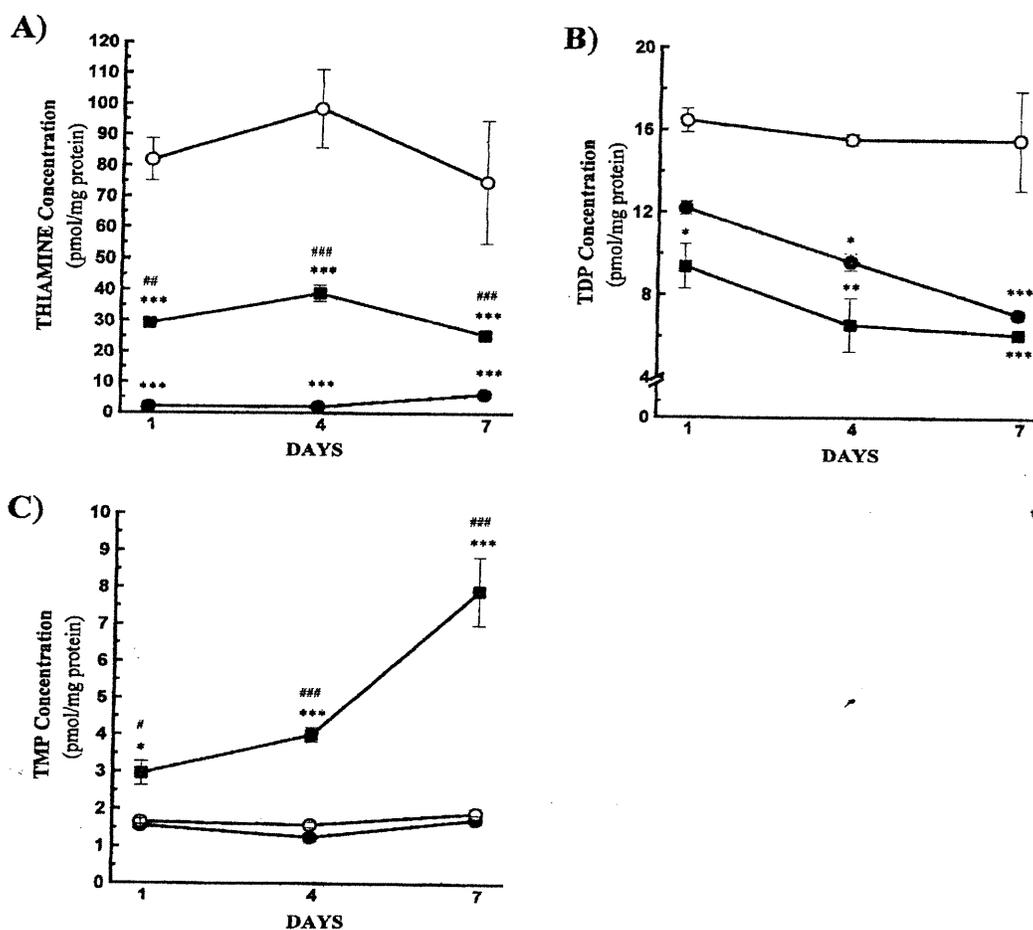


Figure 2.2 Effects of thiamine deficiency on concentrations of thiamine and its phosphate esters in cultured CGCs. Intracellular concentrations of thiamine (A), TDP (B) and TMP (C) in CGCs in relation to treatment conditions and days of exposure. Results represent the mean \pm S.E.M. of 3 separate experiments each performed in duplicate. ○ : CTL, ● : TD, ■ : 50 μ M Py. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ and *** $P < 0.001$ vs control for the same time point. # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$ and ### $P < 0.001$ vs TD for the same time point (ANOVA followed by Student-Newman-Keuls test).

Effects of Thiamine Deficiency on Thiamine-Dependent Enzyme Activities

Exposure of cultured CGCs to TD conditions supplemented with Py resulted in a significant decrease in TK activity at days 4 and 7 ($p < 0.001$, Fig. 2.3A). Exposure to TD media alone did not lead to reductions in TK activity compared to controls. On the other hand, treatment of CGCs with Py resulted in an 80% reduction in KGDH activity after 7 days of Py treatment (Fig. 2.3B). In cells treated with TD media alone, no reduction in KGDH activity was observed at day 7. No reductions in PDH activity were observed in TD or Py treatment groups over the 7 day period of exposure (results not shown).

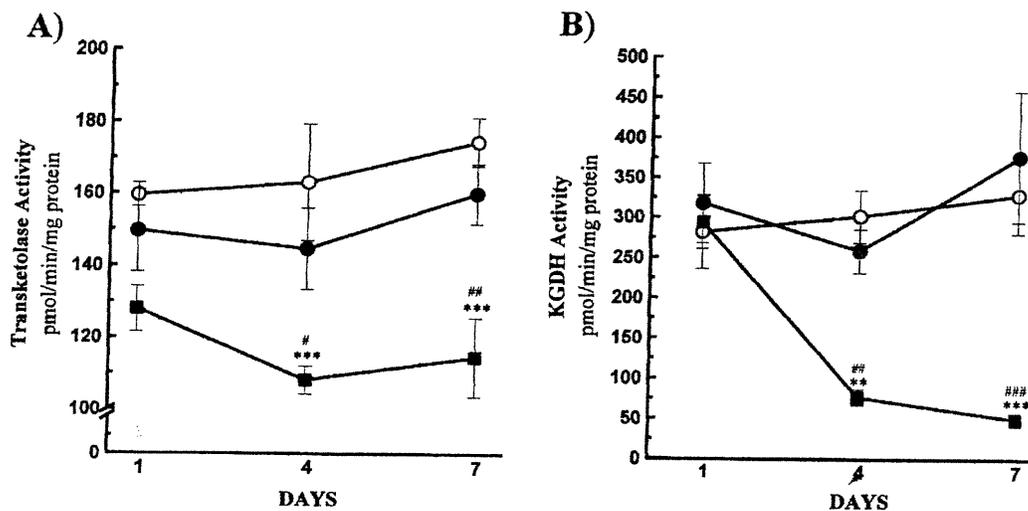


Figure 2.3 Effects of thiamine deficiency on thiamine-dependent enzyme activities in cultured CGCs. TK (A) and KGDH (B) activities in CGCs in relation to treatment conditions and days of exposure. Data points represent mean \pm S.E.M. from 3 separate experiments each performed in triplicate. ○ : CTL, ● : TD, ■ : 50 μ M Py. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ vs. control for the same time point, # $P < 0.05$ and ## $P < 0.01$ and ### $P < 0.001$ vs. TD for the same time point. (ANOVA followed by Student-Newman-Keuls test).

Effects of Thiamine Deficiency on ATP Levels

Treatment with TD media alone did not affect ATP levels. However, exposure of CGCs to TD medium and Py resulted in reduced ATP levels (to 65% and 32% of controls at days 4 and day 7 respectively) (Fig. 2.4).

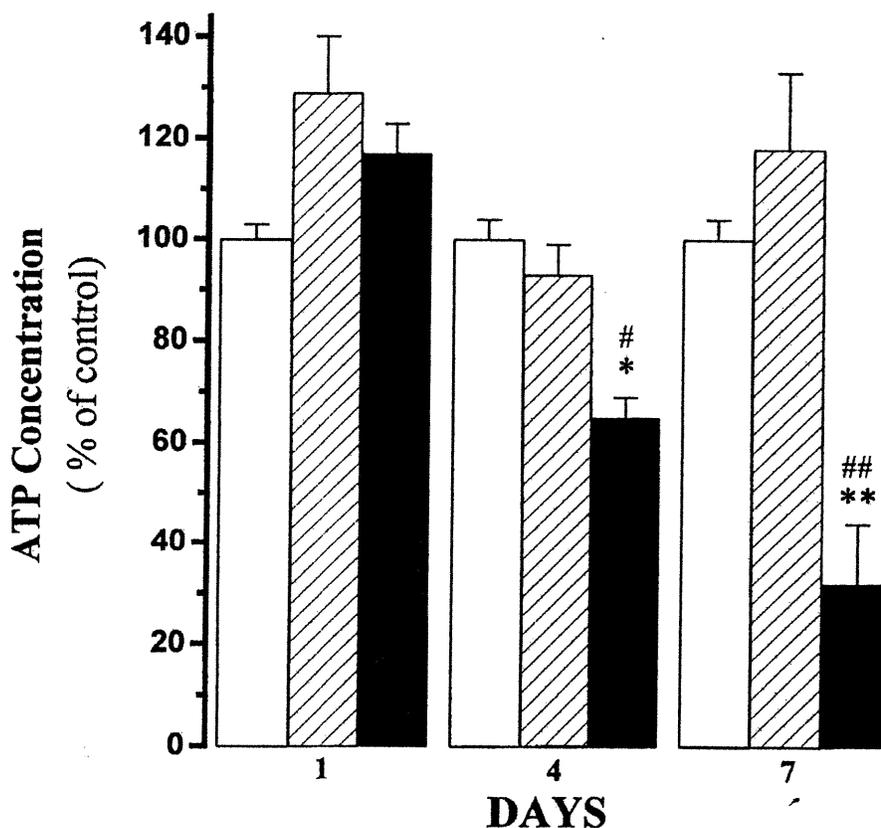


Figure 2.4 Effects of thiamine deficiency or pyriethamine treatment on ATP content in CGCs. Cells were exposed to TD medium with or without the addition of 50 µM Py for 7 days. Results show the means \pm S.E.M. of 3 separate experiments each performed in duplicate. \square : CTL, \square (hatched) : TD, \blacksquare : 50µM Py. * $P < 0.05$, ** $P < 0.001$ vs control for the same time point, # $P < 0.05$, ## $P < 0.001$ vs TD for the same time point (ANOVA followed by Student-Newman-Keuls test).

Effects of Thiamine Deficiency on Lactate Release and pH

CGCs exposed to TD media alone for 7 days showed no changes in lactate release compared to cells exposed to control media (Fig. 2.5 A). On the other hand, CGCs exposed to Py exhibited a 100% and 112% increase in lactate efflux relative to control values at days 4 and 7 respectively. Furthermore, pH decreased steadily in CGCs treated with Py in parallel with the increased lactate release (Fig. 2.5 B).

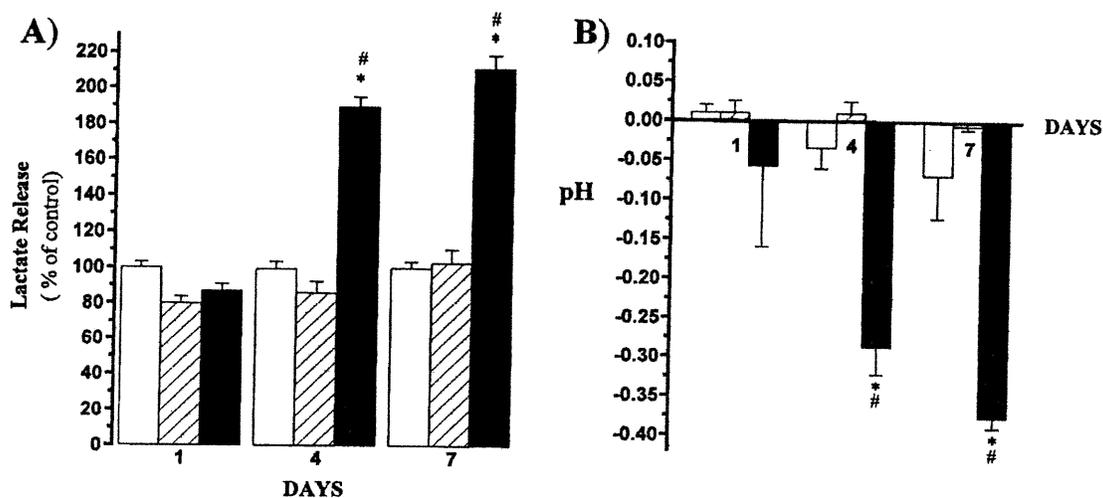


Figure 2.5 Effects of thiamine deficiency or pyrithiamine treatment on A) lactate release and B) changes in pH, in cultured CGCs. Cells were exposed to TD medium with or without the addition of 50 μ M Py, and treated for 7 days. Results show the means \pm S.E.M. of 3 separate experiments each performed in triplicate. □ : CTL, ▨ : TD, ■ : 50 μ M Py. * $P < 0.001$ vs control for the same time point, # $P < 0.001$ vs TD for the same time point (ANOVA followed by Student-Newman-Keuls test).

Effects of Py Treatment on Cell Viability

After 4 days of Py treatment, cell death was increased to 27% compared to controls (5%) (Fig. 2.6). Cell death further increased after 7 days of exposure to Py (64%), i.e.: to a similar extent as cells exposed to low (5 mM) potassium concentrations. Exposure to TD medium alone did not result in significant cell death compared to

controls. An examination of the DNA fragmentation profile using agarose gel electrophoresis showed no evidence of DNA laddering which would have been suggestive of apoptotic cell death mechanisms. (data not shown).

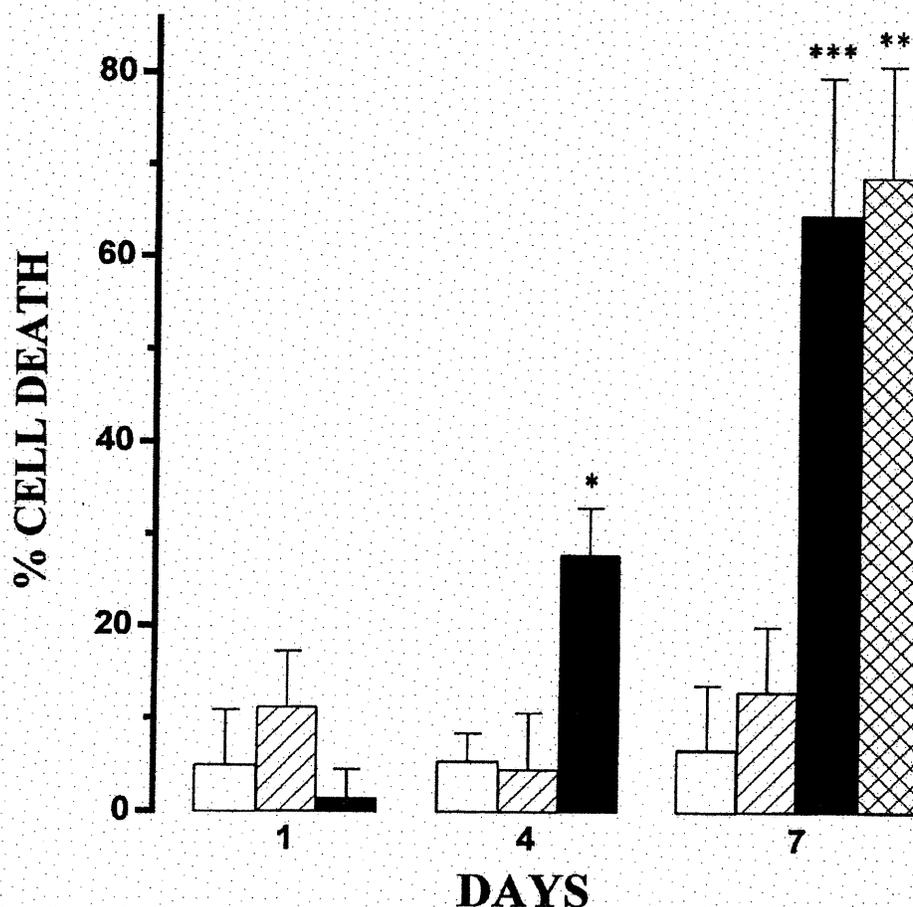


Figure 2.6 Effects of thiamine deficiency or pyrithiamine treatment on cell death in cultured CGCs. Cells were exposed to thiamine-deficient conditions in the absence (TD) or presence of 50 μM Py for 1, 4 and 7 days. Results are expressed in % cell death reflecting the % LDH release. Results show the means ± S.E.M. of 4 separate experiments each performed in triplicate. □ : CTL, ▨ : TD, ■ : 50 μM Py and ▩ : Minus K⁺. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ and *** $P < 0.001$ vs control (CTL) for the same time point (ANOVA followed by Student-Newman-Keuls test).

Effects of Neuroprotective agents on Cell Viability

Exposure of CGCs to Py in the presence of the antioxidants, vitamin E and BHA (a synthetic antioxidant which counteracts lipid peroxidation), resulted in a significant

75% neuroprotection compared to cells treated with Py alone (Fig. 2.7). On the other hand, MK-801, an NMDA receptor antagonist, offered no neuroprotective effect on Py treated CGCs.

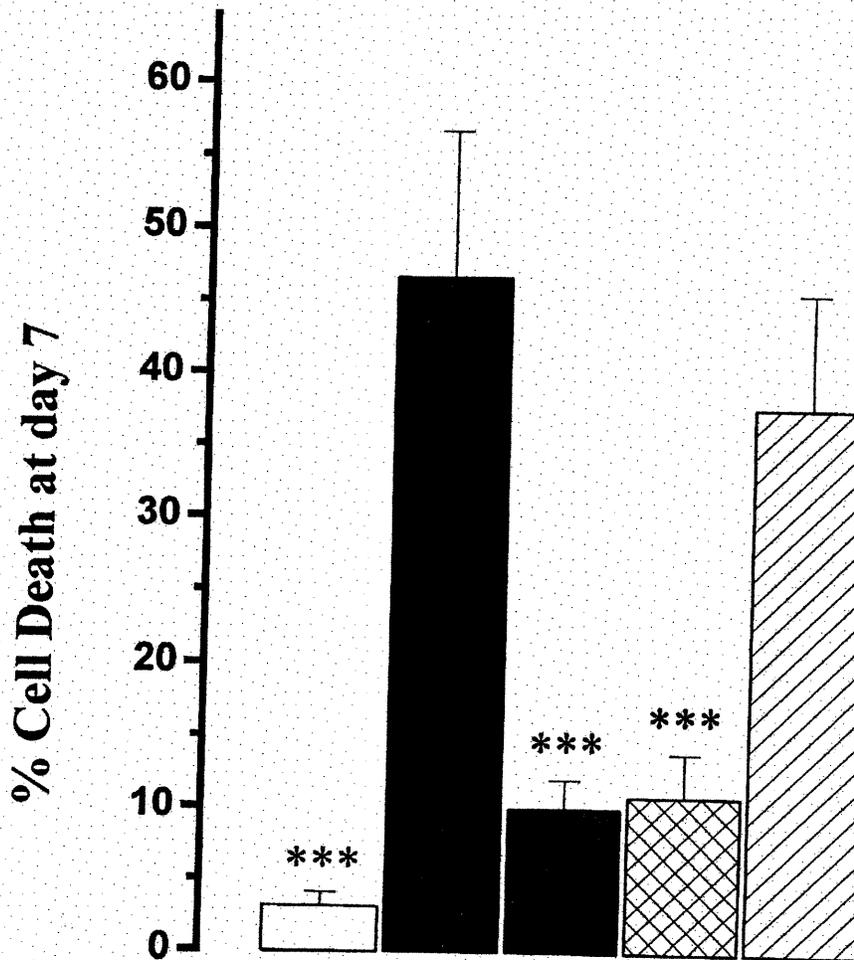


Figure 2.7 Effects of the antioxidants α -tocopherol and BHA and the NMDA receptor antagonist MK-801 on 50 μ M Py-mediated cell death. Antioxidants were added at the start of the Py treatment. NMDA treatment served as a positive control for excitotoxic cell death. Results are expressed as % LDH release. Results show the means \pm S.E.M. of 2 separate experiments each performed in triplicate. \square : CTL, \blacksquare : 50 μ M Py, \boxtimes : 50 μ M α -tocopherol, \boxdot : 100 μ M BHA, \boxminus : 10 μ M MK-801. *** $P < 0.001$ vs Py 50 μ M (ANOVA followed by Student-Newman-Keuls test).

Discussion

Results of the present study show that primary cultures of CGCs provide a simple and effective model for the investigation of the biochemical and pathophysiological processes involved in cell death due to compromised oxidative metabolism. This is the first report of the effects of thiamine deficiency on the function and viability of cultured cerebellar neurones; previous studies had been restricted to the effects of thiamine deficiency on neuroblastoma cells (Bettendorff et al. 1995; Park et al. 1999).

Exposure of CGCs to 50 μ M Py for 7 days resulted in significant cell death. Py treatment of this magnitude is as lethal to CGCs as a low potassium concentration (5 mM). Indeed, a previous study demonstrated that 25 mM concentrations of potassium, together with thiamine, are essential for long-term survival of CGCs (Thangnipon, et al. 1983).

Py is a central thiamine antagonist that inhibits the activity of thiamine pyrophosphokinase (Johnson et al., 1965), the enzyme responsible for the synthesis of TDP, the biologically active cofactor form of thiamine. Consistent with this mechanism, the present findings revealed a large decrease in intracellular thiamine and TDP content as early as one day after exposure of CGCs to Py. These findings are also consistent with those of Rindi et al. (1961) who reported that an accumulation of Py in rat tissues resulted in decreased brain concentrations of TDP. Levels of thiamine remained higher in Py-treated CGCs than in cells exposed to a TD media alone. This effect is likely due to the inhibition of thiamine pyrophosphokinase by Py resulting in less phosphorylation of thiamine to TDP in the cells. These considerations could also explain the significantly lower levels of TDP observed in Py-treated cells compared to those exposed to TD

medium alone. The gradual and sustained increase of TMP in CGCs treated with Py could, in turn, be explained by the dephosphorylation of TTP and TDP by the enzymes TTPase and TDPase on which Py has no effect. On the other hand, the absence of early changes in TMP levels in CGCs exposed to TD media alone, despite the large decreases in intracellular TDP content, suggests that the initial large decrease in TDP levels is due to decreased activity of thiamine pyrophosphokinase rather than a dephosphorylation event.

Exposure of cultured CGCs to TD medium in the presence of Py resulted in decreased activities of the TDP-dependent enzymes TK and KGDH. The decrease in TK activity (35%) was not as great as the decrease in KGDH (80%) after 7 days of Py treatment. PDH activity in different treatment groups remained unchanged throughout the time course, which is consistent with previous reports (Elnageh and Gaitonde, 1988; Butterworth, 1986).

TD media had no effect on KGDH and TK activities as well as ATP despite causing a decrease in the levels of TDP, a cofactor for these enzymes. Treatment with Py (in TD media) resulted in a greater lowering of TDP levels than TD media alone, so it is possible that a threshold exists for normal activities of the two enzymes that is dependent on the level of TDP. In the presence of TD media only, TDP levels may be insufficiently reduced to cause an effect on the activities of the two enzymes. The selective reductions in thiamine-dependent enzyme activities in the presence of Py, as well as the absence of changes in enzyme activity in TD media only, may also involve differences in cofactor-apoenzyme binding characteristics and/or differences in enzyme turnover times. Although levels of TMP increased greatly with Py treatment, and because the

monophosphate ester has no known role in cell metabolism or function, it is unlikely that changes in TMP contribute to the effects of Py on the enzyme activities and thus ATP levels.

Recently, it has been shown by Park et al. (1999) that reactive oxygen species (ROS) inhibit KGDH. In the present study, reduced KGDH activity following exposure to Py resulted in increased lactate production. Lactate is known to induce ROS production (Tombaugh and Sapolski, 1993) and, as such, could have a potential inhibitory effect on KGDH.

Since KGDH is a rate-limiting enzyme of the tricarboxylic acid cycle, a sustained reduction of its activity due to TD would be expected to lead to decreased ATP synthesis, with a consequent depletion of cellular energy metabolism, ultimately leading to cell death (Parker et al., 1984). Results of the present study support this mechanism by demonstrating a marked decrease of ATP levels in Py-treated CGCs, concomitant with the decreased KGDH activities. These findings are consistent with those of Aikawa et al. (1984) in which a loss of high energy phosphates was reported in brain tissue from the pyriethamine-treated rat.

As consistently reported in previous studies in the rat, another indication of impending energy failure in TD is the accumulation of lactate (Kinnersley and Peters, 1930; McCandless and Schenker, 1968). In the present study, the accumulation of lactate was apparent after 4 days of Py treatment (i.e. coincident with decreased activity of KGDH). Consistent with the rise of lactate in these cells, cellular pH was decreased. It was previously suggested that lactic acidosis could be the cause of neuronal cell death in TD in the pyriethamine-treated rat (Hakim, 1984).

Addition of α -tocopherol or BHA to Py-treated CGCs led to a 75% reduction in cell death. These compounds are established potent antioxidants, having an ability to sequester reactive oxygen species (ROS). As demonstrated by Ciani et al. (1996), α -tocopherol together with BHA and MK-801, protected cultured CGCs against glutamate excitotoxicity which gives rise to ROS. However, in the present study, MK-801 did not protect against Py-induced cell death, indicating that NMDA receptor-mediated excitotoxicity is not involved in the pathogenesis of CGC death due to exposure to TD.

In conclusion, cultured CGCs afford an effective preparation with which to study the effects of thiamine deficiency on neuronal cell metabolism and survival. Treatment of these cells with Py recapitulates the metabolic brain dysfunction characteristics of the effects of TD in the intact animal. The CGC preparation may therefore be useful in the further elucidation of the mechanisms involved in the neuronal cell death cascade due to thiamine deficiency.

CHAPITRE 3

Conclusion

Conclusion

Il a été exposé dans le présent mémoire une nouvelle approche, simple et efficace, pour étudier l'étiologie des phénomènes pathophysiologiques d'une déficience en thiamine. Il était important d'analyser le comportement d'une population de cellules neuronales en culture primaire soumise à une déficience en thiamine, et d'analyser le plus de paramètres nous permettant de faire un lien avec le modèle du rat de DT qui est déjà bien caractérisé (Troncoso et al., 1981). Ce nouveau modèle d'une DT sur les CGC permet une étude directe des phénomènes biochimiques et pathophysiologiques des effets d'une DT sur le métabolisme et la survie neuronale. En effet, nous avons étudié plusieurs paramètres tels les concentrations des esters de thiamine, l'activité des enzymes thiamino-dépendantes, le métabolisme énergétique (ATP), l'acidose lactique, la mort neuronale et l'implication des radicaux libres et des antioxydants, qui nous ont permis de tracer un bon portrait des événements qui perturbent l'homéostasie cérébrale lors d'une DT. Selon les résultats fournis dans la section précédente, il est encourageant d'envisager de futures expériences afin de déceler les mécanismes de mort cellulaire découlants d'une DT en se basant sur ce modèle de CGC en culture primaire. À ce stade, il serait important de récapituler tous les événements et les résultats qui nous permettent de croire qu'effectivement la culture de CGC déficiente en thiamine suit étroitement les lignes directrices d'une DT que l'on retrouve parmi d'autres modèles.

En premier lieu, l'utilisation d'un modèle de neurones en culture primaire (les CGC) fait suite à l'absence de données scientifiques sur les phénomènes d'une DT sur de telles cellules. Seul Bettendorf et al. (1991) en a fait l'utilisation afin d'étudier la concentration de thiamine et de ses dérivées. Jusqu'à présent, l'étude d'une DT sur des

neurones était dirigée sur des cultures de neuroblastomes, lignée de cellules éternelle. Nous voulions étudier les paramètres d'une DT sur des cellules post-mytotique, ayant un réseau de communication fonctionnel avec un statut énergétique stable. C'est-à-dire que nous voulions une préparation cellulaire qui ressemble le plus étroitement possible à l'environnement cellulaire du cerveau. C'est pourquoi nous avons choisi les CGC, car elles offrent des paramètres stables ainsi qu'un excellent taux de reproductibilité d'une expérience à l'autre. Nous n'avons pas utilisé de cultures cellulaires mixtes, par exemple, une co-culture de neurones et d'astrocytes, car nous étions intéressés uniquement au comportement des neurones lors d'une DT. Cependant, nous envisageons de répéter toutes les expériences présentées dans ce mémoire, sur une co-culture de neurones et d'astrocytes car ces derniers jouent également un rôle important dans la pathophysiologie de la DT. Ce projet, malgré que plus complexe à étudier, reflète déjà mieux l'environnement du cerveau.

La molécule d'importance visée par ce mémoire est, la thiamine. La façon la plus précise de mesurer ses niveaux est, de tout évidence, par la méthode de chromatographie liquide de haute performance (HPLC). Cette technique a été mise au point par Bettendorf et al. (1986). C'est en utilisant cette méthode que nous avons confirmé qu'effectivement il y avait une diminution de thiamine et de TDP (la forme active de la thiamine) par rapport au temps, suite à une exposition à un milieu nutritif déficient en thiamine. Afin de précipiter les changements biochimiques découlant d'une TD, nous nous sommes servi de la pyrithiamine, qui agit comme antimétabolite de la thiamine. Son utilisation a démontré une baisse encore plus prononcée des niveaux intracellulaires de TDP par rapport au temps d'exposition dans un milieu déficient en thiamine. Cette importante baisse des

niveaux de TDP est accompagnée par une augmentation significative de mort cellulaire. Plusieurs indications démontrent que cette mort cellulaire provient d'une défaillance du système énergétique oxydatif qui requiert un statut thiaminique adéquat. En effet, Hakim et al. (1981) démontrèrent qu'une diminution du statut thiaminique avait comme conséquence directe une baisse de l'utilisation du glucose par le cerveau. Parallèlement à cette diminution graduelle de la concentration de thiamine cérébrale, l'utilisation du glucose diminua plus rapidement dans les régions susceptibles de développer des lésions histologiques que l'on retrouve dans les stades avancés d'une DT comparativement aux régions qui ne sont pas affectées. Cette diminution de l'utilisation du glucose est, entre autre, le résultat de la diminution de l'activité de l'enzyme thiamino-dépendant, α -cétoglutarate déshydrogénase (Gibson et al. 1989). Butterworth et al. (1986) postulèrent aussi qu'une diminution de l'activité de l' α CGDH pouvait expliquer certains résultats qui démontrèrent des changements du métabolisme énergétique dans certaines régions spécifiques du cerveau. La baisse dans l'activité de l' α -cétoglutarate déshydrogénase, qui est une enzyme limitante du cycle de Krebs, démontre une perturbation de ce cycle. Le cycle de Krebs est le "moteur" qui produit le plus d'ATP dans une cellule. Toute perturbation ralentissant l'efficacité de ce cycle, compromet la stabilité énergétique d'une cellule. En effet, le ralentissement de l'enzyme α CGDH conduit à un manque énergétique, qui est compensé par une respiration anaérobie se traduisant par une augmentation de production de lactate. L'augmentation de la production de lactate est due à l'accumulation de pyruvate car ce dernier ne poursuit pas son cheminement dans le cycle de Krebs. Une telle situation, ressemble étroitement à un état ischémique qui se traduit par une acidose cérébrale (Hakim et al 1989). L'accumulation de lactate a, à elle

seule, un effet néfaste en acidifiant l'environnement immédiat des cellules qui le libèrent. Hakim (1984) postule que la diminution de pH peut être une des causes principales de mort cellulaire lors d'une déficience en thiamine (voir figure 3). De plus, il a démontré que les régions atteintes lors d'une DT ont un pH plus acide que les régions épargnées. Il a aussi démontré qu'une injection de thiamine dans les stades avancés d'une DT peut rétablir le pH à des niveaux normaux chez le modèle animal du rat. Ceci est en partie dû au rétablissement de l'activité de l' α CGDH qui permet ensuite au cycle de Krebs de fonctionner normalement. Une autre indication d'insuffisance énergétique provient des résultats démontrant une baisse de l'activité de l'enzyme transcétolase. Ceci a comme conséquence de réduire l'activité du "shunt" des hexoses monophosphates ainsi que diminuer la capacité de réduction sous forme de NADPH dans le cytoplasme cellulaire. Dans notre étude, la confirmation d'insuffisance énergétique provient de la mesure directe des niveaux d'ATP. Dans ce cas, nous avons enregistré une baisse de l'indicateur du statut énergétique (ATP) dans les cellules traitées à la Py dans un milieu DT. Ce résultat concorde avec les résultats de Parker et al. (1984) qui démontrèrent aussi des anomalies dans la synthèse d'ATP lors d'une DT. Cette perturbation du statut énergétique (diminution de la disponibilité d'ATP) a des conséquences néfastes sur l'excitabilité des neurones dans les régions vulnérables à une DT. En effet, un des rôles les plus importants pour l'ATP est, entre-autres, de servir comme source d'énergie pour les pompes sodique-potassiques Na^+/K^+ qui contrôlent très étroitement la repolarisation des neurones suite à un potentiel d'action. Une diminution d'ATP signifie une perturbation de l'excitabilité des neurones et possiblement un affaissement du réseau de communication de ces neurones. La recapture de certains acides aminés neuroactifs est aussi perturbée par un

manque d'ATP. Hazell et al. (1993) démontrèrent une augmentation significative des niveaux de glutamate extracellulaire dans les régions vulnérables chez les rats déficients en thiamine. Ces résultats suggèrent que le glutamate joue un rôle important dans le développement des lésions du système nerveux central lors d'une DT. L'absence d'une augmentation des concentrations de glutamate dans les régions non-vulnérables à une DT, suggère que le mécanisme d'excitotoxicité relié au glutamate pourrait être responsable de la vulnérabilité sélective des régions cérébrales lors d'une DT. L'augmentation de glutamate a pour effet de stimuler les récepteurs à glutamate NMDA. Lorsque ces récepteurs sont surstimulés, la concentration de calcium intracellulaire augmente, ce qui déclenche une cascade d'événements menant à la mort cellulaire par apoptose. Ce phénomène a été démontré lors d'une DT par Hazell et al. (1998) où ils ont alors constaté que les gènes *c-fos* et *c-jun*, appelés *immediate-early genes* (IEGs), étaient impliqués dans la cascade de mort cellulaire programmée. Conséquemment, l'augmentation de glutamate extracellulaire accroît la dépolarisation qui en retour résulte en excitotoxicité relié aux récepteurs NMDA (Hazell et al 1998). Une autre étude soutenant la théorie d'excitotoxicité glutamatergique menant à la mort cellulaire programmée fut celle de Langlais et al. (1990). En utilisant un antagoniste (MK-801) aux récepteurs NMDA, il réussit à atténuer la gravité des dommages cellulaires et à diminuer le nombre et l'ampleur des lésions hémorragiques que l'on perçoit autrement dans les régions vulnérables à une DT. Plus récemment, de nouvelles études démontrèrent que d'autres mécanismes, tels l'implication des radicaux libres ainsi qu'une dégénérescence de la barrière hémato-encéphalique sont impliqués dans la pathogénèse de la déficience de la thiamine. Lors d'un déficit énergétique cellulaire, il y a une augmentation de la

production de radicaux libres car les échanges finaux d'électrons au niveau de la mitochondrie sont perturbés. En effet, Langlais et al. (1997) démontrèrent une augmentation significative de la concentration des ROS (reactive oxygen species) dans le thalamus lors des stades tardifs d'une DT chez le modèle animal du rat. Ces résultats suggèrent qu'une production accrue des ROS survient particulièrement dans les stades avancés d'une DT, et peut grandement contribuer aux lésions structurelles décrites chez le modèle de W-K. Dans une série d'études que nous n'avons pas présentée dans l'article scientifique de la section précédente, nous avons directement mesuré une augmentation importante des ROS et une augmentation de l'acide nitrique synthétase (NOS) lors d'une DT dans notre modèle de CGCs. Une fois de plus, nos résultats appuient ceux de d'autres groupes de chercheurs, ce qui nous laisse croire qu'effectivement, les ROS détiennent un pouvoir d'infliger beaucoup de dommages à une cellule lors d'une DT. Une augmentation des radicaux libres peut mener à la peroxidation des lipides, des dommages à l'ADN et à l'inactivation d'enzymes. Parallèlement, Blass et al. (1991) et Gibson et al. (1999) démontrèrent que dans des cerveaux autopsiés de patients souffrants de la maladie d'Alzheimer*, il y avait également une réduction de l'activité de l'enzyme α -cétoglutarate, une altération du métabolisme glutamatergique suivi d'une augmentation d'une production de radicaux libres qui résulta en une mort neuronale sélective. Tout récemment, il a été démontré par Park et al. (1999) que les radicaux libres peuvent davantage réduire l'activité de l'enzyme α -cétoglutarate déshydrogénase ce qui a pour effet d'altérer encore plus la séquence de respiration oxydative sans compter les dommages intrinsèques qu'ils confèrent à la cellule. Deux autres publications récentes

* Veuillez noter qu'il y a plusieurs similarités entre les changements pathophysiologiques que l'on retrouve lors d'une DT / W-K et ceux que l'on retrouve dans la maladie d'Alzheimer. Cependant ces similarités ne feront pas l'objet de discussion approfondie dans ce mémoire.

(Calingasan et al. 1998, 1999), décrivant le rôle de la microglie et son implication au stress oxydatif face aux neurones, permettent de plus en plus de croire qu'effectivement le stress oxydatif joue un rôle de premier plan lors de la dégénération neuronale due à une DT. Ces résultats démontrèrent une spécificité régionale, temporelle et cellulaire entre l'expression des tous premiers indicateurs de stress oxydatif et de la mort cellulaire qui s'en suit. Un de ces premiers indicateurs, c'est-à-dire un changement que l'on voit à un stade précoce d'une DT, est l'atteinte des cellules endothéliales formant les vaisseaux sanguins et la détérioration de la barrière hémato-encéphalique (Calingasan et al. 1995). La DT entraîne une perturbation du métabolisme oxydatif ce qui semble affecter les cellules endothéliales à un stade très précoce dans les régions vulnérables. Ces cellules expriment alors eNOS (endothelial nitric oxide synthase) qui contribue à la production de radicaux libres et à la dégénération des cellules avoisinantes (Calingasan et al. 2000). Nos dernières expériences ont été ciblées sur l'implication des radicaux libres lors d'une DT. Afin de bloquer les effets dévastateurs des radicaux libres, nous avons utilisé des antioxydants puissants tel que l' α -tocophérol (vitamine E) et l'hydroxyanisole butylé (BHA). De façon inattendue, l'addition d'antioxydants à des CGC exposées à la Py dans un milieu DT, résulta en une neuroprotection significative par rapport au groupe contrôle. Pour approfondir l'étude des bienfaits des antioxydants sur la DT dans un proche avenir, il faudra d'abord, du point de vue des antioxydants, répéter les mesures des paramètres qui ont été examinés au cours des expériences explicitées dans cette thèse afin d'aboutir à une meilleure compréhension des phénomènes impliqués.

Au cours de cette étude, nous nous sommes intéressés aux propriétés neurobiologiques d'une vitamine essentielle pour le bon fonctionnement des cellules nerveuses : la thiamine. Son rôle principal se révèle sous la forme de TDP comme étant un cofacteur essentiel dans le métabolisme oxydatif des cellules. Selon les résultats que nous avons obtenus, nous pouvons conclure que l'utilisation des CGC en culture primaire

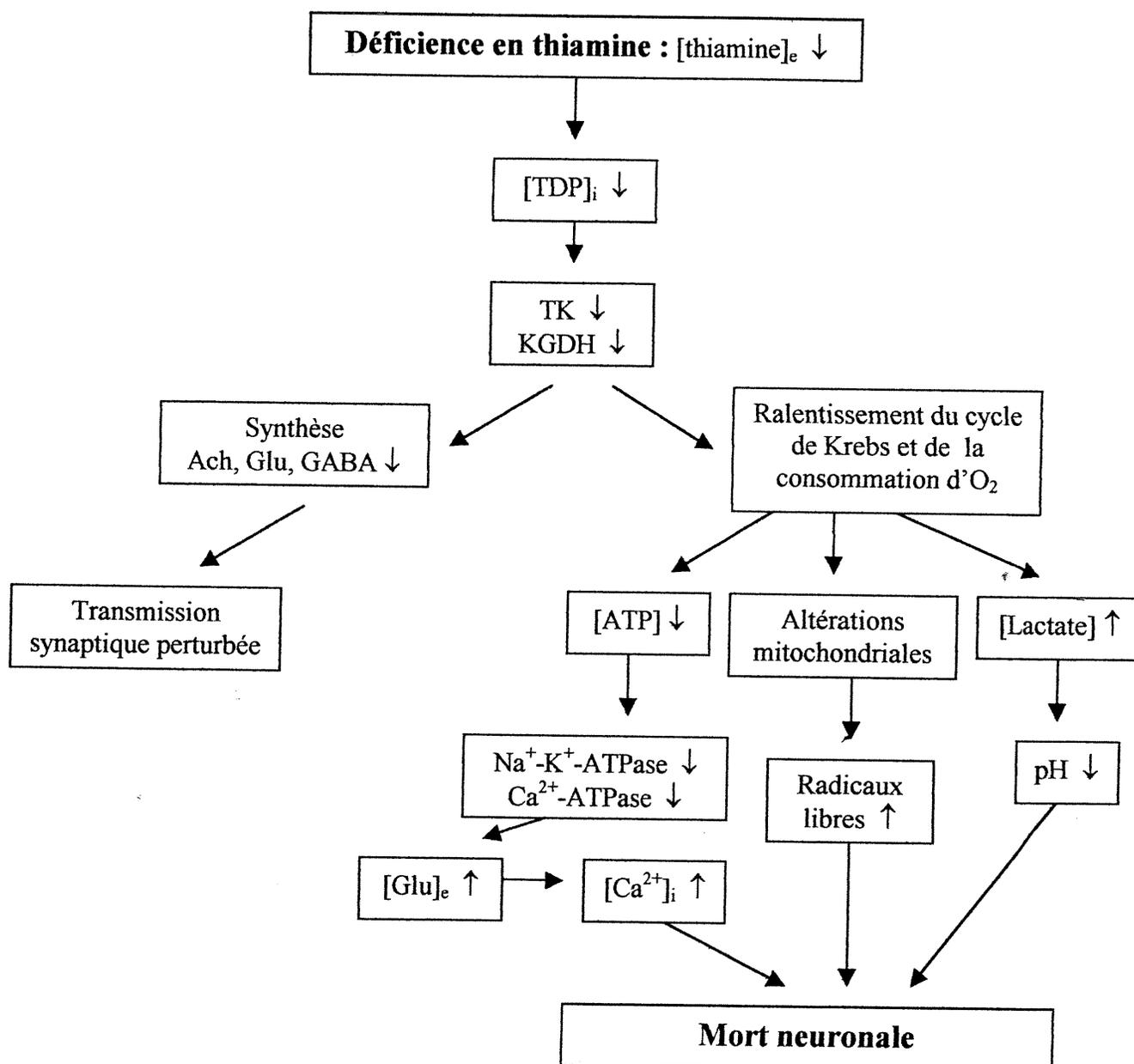


Figure 3. Cascade de mort neuronale suite à une déficiencia en thiamine

est un bon véhicule afin d'étudier la DT. Par ce modèle, nous pouvons résumer le rôle du TDP et les mécanismes plausibles par lesquels la DT aboutit à la mort cellulaire. L'ensemble de ces mécanismes est décrit à la figure 3.

Les deux enzymes utilisant le TDP comme cofacteur, la TC ainsi que la CGDH, occupent des positions stratégiques dans le métabolisme énergétique et la synthèse de neurotransmetteurs (Fig. 1.4). Il n'est donc pas surprenant que la DT, et en particulier la déficience du TDP, produisent chez l'homme des pathologies graves et dans certains cas létales, en l'absence de traitement supplétif. C'est le cas de l'encéphalopathie de Wernicke. Traditionnellement, le modèle animal a été exploité dans des études de l'impact de la déficience en thiamine sur le comportement et fonctionnement du cerveau. Cependant, les neurones produisent et sécrètent des neurotransmetteurs par lesquels ils communiquent entre eux ainsi qu'avec les tissus périphériques. Le comportement et toutes les fonctions cognitives résultent de l'intégration de l'activité de milliards de neurones. Dans le modèle animal, il est donc difficile de retracer l'origine de la lésion biochimique, car au moins trois facteurs interviennent .

1) Premièrement il y a un déficit de la synthèse des neurotransmetteurs, ce qui entraîne une perte de mémoire et des modifications comportementales (Barclay et al., 1981). 2) Deuxièmement, l'augmentation de glutamate extracellulaire pourrait être responsable de phénomènes d'excitotoxicité (Hazell et al., 1993). 3) Finalement, l'implication exacte des cellules avoisinantes, tels les astrocytes ou la microglie, demeure encore énigmatique (Langlais 1995). Afin de ne pas être soumis à de telles contraintes, nous avons développé un modèle de DT sur des cellules neuronales en culture primaire. Donc, notre modèle n'est pas sujet aux variations comportementales que l'on retrouve

chez l'animal. Il échappe à l'hypothèse d'excitotoxicité glutamatergique car la concentration extracellulaire serait trop éloignée du seuil cytotoxique (dilution dans le milieu nutritif) et il n'est pas influencé par d'autres types cellulaires car nos cultures sont presque pures (> 95%). À l'intérieur de sept jours, avec l'aide de la pyriéthiamine pour précipiter la DT, nous arrivons à produire des perturbations biochimiques sévères ainsi qu'une mort cellulaire substantielle, ce qui écourte de près de six jours le temps nécessaire pour atteindre le stade symptomatique de DT dans le modèle animal du rat. Malgré l'étude détaillée des paramètres de DT qui ont été analysés dans notre modèle de CGC en culture primaire, certains autres aspects méritent d'être investigués. Parmi ceux-ci figure la réversibilité des dommages biochimiques engendrés par un traitement à la Py sur des CGC déficientes en thiamine. (Est-ce qu'une injection de thiamine suffit pour renverser les symptômes et pour permettre une récupération des propriétés biochimiques, comme dans le modèle animal ? À quel moment doit-on suppléer par la thiamine afin de découvrir le seuil de survie neuronale?). Un autre aspect repose sur le degré d'importance des radicaux libres générés lors d'une DT et leur contribution à la mort cellulaire. (D'où proviennent ces radicaux libres, comment affectent-ils les paramètres d'une DT et participent-ils à une suite d'évènements faisant partie d'une cascade de mort cellulaire ?). Tels sont les exemples de questions qui demeurent encore sans réponses. Notre modèle pourra sans doute contribuer à résoudre certaines de ces questions. Tout en demeurant optimiste face aux possibilités qu'offre notre modèle, prudence s'impose lorsqu'on extrapole des résultats obtenus avec des cellules en culture à un organisme vivant.

En conclusion, l'élaboration d'un modèle de CGC en culture primaire offre une préparation efficace nous permettant d'étudier les effets d'une DT sur le métabolisme et la fonction neuronale. Le traitement de ces cellules avec de la Py récapitule les dysfonctions métaboliques et mitochondriales caractéristiques de la DT chez l'organisme intact. Cette préparation *in vitro* peut désormais être utile afin d'élucider les mécanismes impliqués dans la cascade de mort neuronale causée par une déficience en thiamine.

Bibliographie

- Aikawa, H., Watanabe, I.S., Furuse, T., Iwasaki, Y., Satoyoshi, E., Sumi, T., Moroji, T. 1984. Low energy levels in thiamine-deficient encephalopathy. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* 43: 276-287.
- Au, A.M., Chan, P.H., Fishman, R.A. 1985. Stimulation of phospholipase A2 activity by oxygen-derived free radicals in isolated brain capillaries. *J. Cell Biochem.* 27: 449-453.
- Avdulov, N.A., Chochina, S.V., Igbavboa, U., O'Hare, E.O. Schroeder, F., Cleary, J.P., Wood, W.G. 1997. Amyloid β -peptides increase annular and bulk fluidity and induce lipid peroxidation in brain synaptic plasma membranes. *Neurochem.* 68: 2086-2091.
- Barclay, L.L., Gibson, G.E., Blass, J.P. 1981. Impairment of behavior and acetylcholine metabolism in thiamine deficiency. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 217: 537-543.
- Bartel, D.P., Sheng, M., Lau, L.F., Greenberg, M.E. 1989. Growth factors and membrane depolarization activate distinct programs of early response gene expression: dissociation of *fos* and *jun* induction. *Genes Dev.* 3: 304-313.
- Bettendorf, L., Granfils, C., De Rycker, C., Schoffeniels, E. 1986. Determination of thiamine and its phosphate esters in human blood serum at femtomole levels. *J. Chromatogr.* 328: 297-302.
- Bettendorff, L., Sluse, F., Goessens, G., Wins, P., Grisar, T. 1995. Thiamine deficiency-induced partial necrosis and mitochondrial uncoupling in neuroblastoma cells are rapidly reversed by addition of thiamine. *J. Neurochem.* 65(5): 2178-84.
- Blanc, E.M., Toborek, M., Mark, R.J., Henning, B., Mattson, M.P. 1997. Amyloid β -peptide induces cell monolayer albumin permeability, impairs glucose transport, and induces apoptosis in vascular endothelial cells. *J. Neurochem.* 68: 1870-1881.
- Blass, J.P., Gibson, G.E. 1991. The role of oxidative abnormalities in the pathophysiology of Alzheimer's disease. *Rev. Neurol.* 147 (6-7): 513-25.
- Butterworth, R.F. 1982. Neurotransmitter function in thiamine-deficiency encephalopathy. *Neurochem. Int.* 4: 449-464.
- Butterworth, R.F. 1986. Cerebral Thiamine-dependent enzyme changes in experimental Wernicke's encephalopathy. *Metab. Brain Dis.* 1: 165-175.
- Butterworth, R.F. 1993. Pathophysiological mechanisms responsible for the reversible (thiamine-responsive) and irreversible (thiamine non-responsive) neurological symptoms of Wernicke's encephalopathy. *Drug. Alcohol. Rev.* 12: 315-322.

- Butterworth, R.F., Giguère, J.F., Besnard, A.M. 1985. Activities of the thiamine-dependent enzymes in two experimental models of thiamine-deficiency encephalopathy. 1. The pyruvate dehydrogenase complex. *Neurochem. Res.* 10: 1417-1428.
- Butterworth, R.F., Giguère, J.F., Besnard, A.M. 1986. Activities of the thiamine-dependent enzymes in two experimental models of thiamine-deficiency encephalopathy. 2. Alpha-Ketoglutarate dehydrogenase. *Neurochem. Res.* 11: 567-77.
- Butterworth, R.F., Héroux, M. 1989. Effect of pyriithiamine treatment and subsequent thiamine rehabilitation on regional cerebral amino acids and thiamine-dependent enzymes. *J. Neurochem.* 52: 1079-1084
- Butterworth, R.F., Gaudreau, C., Vincelette, J., Bourgault, A.M., Lamothe, F., Nutini, A.M. 1991. Thiamine deficiency and Wernicke's encephalopathy in AIDS. *Metab. Brain Dis.* 6: 207-212.
- Butterworth, R.F., Krill, J.J., Harper, C.G. 1993. Thiamine-dependent enzyme changes in the brains of alcoholics: Relationship to the Wernicke-Korsakoff syndrome. *Alcohol. Clin. Exp. Res.* 17: 1084-1088.
- Calingasan, N.Y., Baker, H., Sheu, K.F., Gibson, G.E. 1995a. Blood-brain barrier abnormalities in vulnerable brain regions during thiamine deficiency. *Exp. Neurol.* 134 (1): 64-72.
- Calingasan, N.Y., Gandy, S.E., Baker, H., Sheu, K.F., Kim, K-S., Wisniewski, H.M., and Gibson, G.E. 1995b. Accumulation of amyloid precursor protein-like immunoreactivity in rat brain in response to thiamine deficiency. *Brain Res.* 677: 50-60.
- Calingasan, N.Y., Park, L.C., Calo, L.L., Trifiletti, R.R., Gandy, S.E., Gibson, G.E. 1998. Induction of nitric oxide synthase and microglial responses precede selective cell death induced by chronic impairment of oxidative metabolism. *Am. J. Pathol.* 153(2):599-610.
- Calingasan, N.Y., Chun, W.J., Park, L.C., Uchida, K., Gibson, G.E. 1999. Oxidative stress is associated with region-specific neuronal death during thiamine deficiency. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* 58 (9): 946-58.
- Calingasan, N.Y., Huang, P.L., Chun, H.S., Fabian, A., Gibson, G.E. 2000. Vascular factors are critical in selective neuronal loss in an animal model of impaired oxidative metabolism. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* 59 (3): 207-17.
- Chan, P.H., Schmidley, J.W., Fishman, R.A., Longar, S.M. 1984. Brain injury, edema, and vascular permeability changes induced by oxygen-derived free radicals. *Neurology.* 34: 315-320.
- Ciani, E., Grøneng, L., Voltattorni, M., Rolseth, V., Contestabile, A., Paulsen, R. 1996. Inhibition of free radical production or free radical scavenging protects from the

- excitotoxic cell death mediated by glutamate in cultures of cerebellar granule neurons. *Brain Res.* 728: 1-6.
- Collins, G.H. 1967. Glial cell changes in the brain stem of thiamine-deficient rats. *Am. J. Pathol.* 50: 791-814.
- Collins, G.H., Converse, W.K. 1970. Cerebellar degeneration in thiamine-deficient rats. *Am. J. Pathol.* 58(2): 219-233.
- Colotta, F., Polentarutti, N., Sironi, N., Mantovani, A. 1992. Expression of *c-fos* and *c-jun* protooncogenes in programmed cell death induced by growth factor deprivation in lymphoid cell lines. *J. Biol. Chem.* 267: 18278-18283.
- Cooper, J.R. 1968. The role of thiamine in nervous tissue: The mechanism of action of pyriothiamine. *Biochim. Biophys. Acta.* 156: 368-373
- Cooper, J.R., Pincus, J.H. 1979. The role of thiamine in the nervous tissue. *Neurochem. Res.* 4: 223-239.
- Dreyfus, P.M. 1982. Medical and neurological aspects of thiamin: An introduction. Thiamin: Twenty years of progress, H.Z. Sable, C.J. Gubler. *Annals of the New York Academy of Sciences.* 378: 365-376.
- Eijkman, C. 1897. Eine Beriberiähnliche Krankheit der Hühner. *Virchow's Arch. Pathol. Anat.* 148: 523.
- Elnageh, K.M., Gaintonde, M.K. 1988. Effects of a deficiency of thiamine on brain pyruvate dehydrogenase: enzyme assay by three different methods. *J. Neurochem.* 51:1482-1489.
- Farber, J.L. 1994. Mechanisms of cell injury by activated oxygen species. *Environment Health Perspect* 1994. 102 (suppl 2): 17-23.
- Farber, J.L., Chien, K.R., Mittnacht, R.B. 1981. The pathogenesis of irreversible cell injury in ischemia. *Am. J. Pathol.* 102: 271-281.
- Forloni, G., Chiesa, R., Smioldo, S., Verga, L., Salmona, M., Tagliavini, F., Angeretti, N. 1993. Apoptosis mediated neurotoxicity induced by chronic application of β amyloid fragment 25-35. *Neuroreport* 4: 523-526.
- Fox, P.T., Raichle, M.E., Mintun, M.A., Dence, C. 1988. Nonoxidative glucose consumption during focal physiologic neural activity. *Science* 241: 462-464.
- Freeman, R.M. 1979. Rational use of vitamins in practice. Quick reference to clinical nutrition: A guide for physicians, Halpern, S.L. J.B. Lippincott Company, Toronto, 115-122.

- Funk, C. 1911. On the chemical nature of the substance which cure polyneuritis in birds induced by a diet of polished rice. *J. Physiol. (London)* 43: 395-400.
- Gaitonde, M.D., Fayein, N.A., Johnson, A.L. 1975. Decreased metabolism *in vivo* of glucose into amino acids of the brain of thiamine-deficient rats after treatment with pyriithiamine. *J. Neurochem.* 24: 1215-1223.
- Gaitonde, M.K., Evison, E., Evans, G.M. 1983. The rate of utilization of glucose via hexosemonophosphate shunt in brain. *J. Neurochem.* 41: 1253-1260.
- Gallo, V., Kingsbury, A., Balázs, R., Jørgensen, O.S. 1987. The role of depolarization in the survival and differentiation of cerebellar granule cells in culture. *J. Neurosci.* 7: 2203-2213.
- Gavrilescu, N., Peters, R.A. 1931. Biochemical lesions in vitamin B deficiency. *Biochem. J.* 25: 1397-1409.
- Gibson, G.E., Ksiezak-Reding, H., Sheu, K.F., Mykytin, V., Blass, J.P. 1984. Correlation of enzymatic, metabolic and behavioural deficits in thiamine deficiency and its reversal. *Neurochem. Res.* 12: 305-310.
- Gibson, G., Nielsen, P., Mykytyn, V., Carlson, K., Blass, J. 1989. Regionally selective alterations in enzymatic activities and metabolic fluxes during thiamin deficiency. *Neurochem. Res.* 14: 17-24.
- Gibson, G.E., Park, L.C., Zhang, H., Sorbi, S., Calingasan, N.Y. 1999. Oxidative stress and a key metabolic enzyme in Alzheimer brains, cultured cells, and an animal model of chronic oxidative deficits. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 893: 79-94.
- Giguère, J.F., Butterworth, R.F. 1987. Activities of thiamine dependent enzymes in two experimental models of thiamine deficiency encephalopathy: 3. Transketolase. *Neurochem. Res.* 12: 305-310.
- Gilman, S., Adams, K., Koeppe, R.A., Berent, S., Kluin, K.J., Modell, J.G. 1990. Cerebellar and frontal hypometabolism in alcohol cerebellar degeneration studied with positron emission tomography. *Ann. Neurol.* 28: 775-785.
- Greenwood, J., Pratt, O.E. 1985. Comparison of the effects of some thiamine analogues upon transport across the blood-brain barrier of the rat. *J. Physiol.* 369: 79-91.
- Gubler, C.J. 1961. Studies on the physiological role of thiamine: The effects of thiamine deficiency and thiamine antagonist on the oxidation of α -ketoacids by rat tissues. *J. Biol.Chem.* 236: 3112-3120.

- Gubler, C.J., Adams, B.L., Hammond, B., Yuan, E.C., Guo, S.M., Bennion, M. 1974. Effect of thiamine deprivation and thiamine antagonists on the level of γ -aminobutyric acid and on 2-oxoglutarate metabolism in rat brain. *J. Neurochem.* 22: 831-836.
- Gubler, C.J. 1976. Biochemical changes in the thiamine deficiencies. Thiamine, C.J. Gubler, M. Fujiwara, P.M. Dreyfus. John Wiley and Sons. New York. 121-141.
- Hakim, A.M., Pappius, H.M. 1981. The effect of thiamine deficiency on cerebral glucose utilization. *Ann. Neurol.* 9: 334-9.
- Hakim, A.M. 1984. The induction and the reversibility of cerebral acidosis in thiamine deficiency. *Ann. Neurol.* 16: 673-679.
- Hakim, A.M., Shoubridge, E.A. 1989. Cerebral acidosis in focal ischemia. *Cerebrovasc. Brain. Metab. Rev.* 1: 115-32.
- Harata, N. and Iwasaki, Y. 1995. Evidence of early blood-brain barrier breakdown in experimental thiamine deficiency in the mouse. *Metab. Brain. Dis.* 10: 565-576.
- Harper, C., Kril, J. 1991. If you drink your brain will shrink. Neurophatological considerations. *Alcohol Alcohol. (Suppl.)* 1: 375-380.
- Hazell, A.S., Butterworth, R.F., Hakim, A.M. 1993. Cerebral vulnerability is associated with selective increase in extracellular glutamate concentration in experimental thiamine deficiency. *J. Neurochem.* 61: 1155-8
- Hazell, A.S., Todd, K.G., Butterworth, R.F. 1998. Mechanisms of neuronal cell death in Wernicke's encephalopathy. *Metab. Brain Dis.* 13: 97-122.
- Hazell, A.S., McGahan, L., Tetzlaff, W., Bedard, A.M., Robertson, G.S., Nakabeppu, Y., Hakim, A.M. 1998. Immediate-early gene expression in the brain of the thiamine-deficient rat. *J. Mol. Neurosci.* 10: 1-15.
- Héroux, M., Butterworth, R.F. 1992. Animal models of the Wernicke-Korsakoff syndrome. In: *Animal Models of Neurological Disease. Neuromethods vol. 22.* New York: Humana Press, p. 95-131.
- Héroux, M., Butterworth, R.F. 1995. Regional alterations of thiamine phosphate esters and of thiamine diphosphate-dependent enzymes in relation to function in experimental Wernicke's encephalopathy. *Neurochem. Res.* 20: 87-93.
- Hockenbery, D., Nunez, G., Milliman, C., Schreiber, R.D., Korsmeyer, S.J. 1990. Bcl-2 is an inner mitochondrial membrane protein that blocks programmed cell death. *Nature* 348: 334-336

- Jansen, B.C.P., Donath, W.F. 1926. On the isolation of antiberiberi vitamin. Proc. Kon. Ned. Akad. Wet. 29: 1390
- Johnson, L.R., Gubler, C.J. 1965. Studies with thiamine pyrophosphokinase from rat brain. Fed. Proc. 24: 481.
- Joó, F. 1971. Increased production of coated vesicles in the brain capillaries during enhanced permeability of the blood-brain barrier. Br. J. Exp. Pathol. 52: 646-649.
- Kalimo, H. Rehncrona, S., Söderfeldt, B., Olsson, Y., Siesjö, B.K. 1981. Brain lactic acidosis and ischemic cell damage: 2. Histopathology. J. Cereb. Blood Flow Metab. 1: 313-327.
- Kinnersley, H.W., Peters, R.A. 1930. Brain localization of lactic acidosis in avitaminosis B₁ and its relation to the origin of symptoms. Biochem. J. 24: 711-722.
- Koh, J.Y., Choi, D.W. 1987. Quantitative determination of glutamate mediated cortical neuronal injury in cell culture by lactate dehydrogenase efflux assay. J. Neurosci, Methods 20: 83-90.
- Koh, J.Y., Yang, L.L., Cotman, C.W. 1990. β -Amyloid protein increases the vulnerability of cultured cortical neurons to excitotoxic damage. Brain res. 533: 315-320.
- Kril, J.J. 1996. Neuropathology of thiamine deficiency disorders. Metab. Brain Dis. 11: 9-17.
- Kril, J., Halliday, G.M., Svoboda, M.D., Cartwright, H. 1997. The cerebral cortex is damaged in chronic alcoholics. Neuroscience. 79: 983-998.
- Lai, James C.K., Cooper, Arthur J.L. 1986. Brain α -ketoglutarate dehydrogenase complex: Kinetic properties, regional distribution and effects of inhibitors. J. Neurochem. 47: 1376-1386.
- Langlais, P.J., Mair, R.G. 1990. Protective effect of the glutamate antagonist MK-801 on pyriethiamine-induced lesions and amino acid changes in rat brain. J. Neurosci. 10:1664-74
- Langlais, P.J. 1995. Pathogenesis of diencephalic lesions in an experimental model of wernicke's encephalopathy. Metab. Brain Dis. 10 (1): 31-44.
- Langlais, P.J., Anderson, G., Guo, S.X., Bondy, S.C. 1997. Increased free radical production during thiamine deficiency. Metab. Brain Dis. 12 (2): 137-43.
- Lê, O., Héroux, M., Butterworth, R.F. 1991. Pyriethiamine-induced thiamine deficiency results in decreased Ca²⁺-dependent release of glutamate from rat hippocampal slices. Met. Brain. Dis. 6: 125-132.

- Lehninger, A.L. 1981. *Biochimie*. Flammarion Médecine-Sciences. Paris. 335. 437-469.
- Lohmann, K., Schuster, P. 1937. Untersuchungen über die Cocarboxylase. *Biochem. Z.* 294: 188.
- Loo, D.T., Copani, A., Pike, C.J., Whittemore, E.R., Walencewicz, A.J., Cotman, C.W. 1993. Apoptosis is induced by beta-amyloid in cultured central nervous system neurons. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 90: 7951-7955.
- Lowry, O.H., Passonneau, J.V. 1972. *A Flexible System of Enzymatic Analysis*. New York: Academic Press.
- Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L., Randall, R.J. 1951. Protein measurement with Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 193: 265-275.
- Manz, H.J. and Robertson, D.M. 1972. Vascular permeability to horseradish peroxidase in brainstem lesions of thiamine deficient rats. *Am. J. Pathol.* 66: 565-576.
- Mattson, M.P., Cheng, B., Davis, D., Bryant, K., Lieberburg, I., Rydel, R.E. 1992. β -Amyloid peptide destabilized calcium homeostasis and render human cortical neurons vulnerable to excitotoxicity. *J. Neurosci.* 12: 376-389.
- Matsushima, K., MacManus, P., Hakim, A.M. 1997. Apoptosis is restricted to the thalamus in thiamine deficient rats. *NeuroReport.* 8: 867-870.
- McCandless, D.W. 1982. Energy metabolism in the lateral vestibular nucleus in pyridoxamine-induced thiamine deficiency. *Ann. NY Acad. Sci.* 378: 355-364.
- McCandless, D.W., Schenker, S. 1968. Encephalopathy of thiamine deficiency: Studies of intracerebral mechanisms. *J. Clin. Invest.* 47: 2268-2280.
- McCandless, D.W., Curley, A.D., Cassidy, C.E. 1976. Thiamine deficiency and the pentose phosphate cycle in rats: Intracerebral mechanisms. *J. Nutr.* 106: 1144-1151.
- McEntee, W.J., Mair, R.G. 1990. The Korsakoff syndrome: A neurochemical perspective. *Trends Neurosci.* 13 : 340-344.
- Meunier, P., Minaire, Y., Lambert, R. 1988. *La digestion*, 2^e édition, SIMEP. Paris. 115.
- Mousseau, D.D., Rao, V.L.R., Butterworth, R.F. 1996. Alterations in serotonin parameters in brain of thiamine-deficient rats are evident prior to the appearance of neurological symptoms. *J. Neurochem.* 67: 1113-1123.
- Murphy, S., Minor, R.L., Welk, G., Harrison, D.G. 1990. Evidence for an astrocyte-derived vasorelaxing factor with properties similar to nitric oxide. *J. Neurochem.* 55: 349-351.

- Myers, R.E. 1979. Lactic acid accumulation as cause of brain edema and cerebral necrosis resulting from oxygen deprivation. In Korobkin, R. and Guilleminault, G. (eds.), *Advances in Perinatal Neurology*, Spectrum, New York, pp. 85-114.
- Nose, Y., Iwashima, A., Nishino, H. 1976. Thiamine uptake by rat brain slices. Thiamine, C.J. Gubler, M. Fujiwara, P.M. Dreyfus. John Wiley and Sons. New York. 157-168.
- Olney, J.W., Oi Lan, H., Rhee, V. 1971. Cytotoxic effects of acidic and sulfur containing amino acids on the infant mouse central nervous system. *Exp. Brain Res.* 14: 61-76.
- Park, L.C., Zang, H., Sheu, K-F.R., Calingasan, N.Y., Krystal, B.S., Lindsay, J.G., Gibson, G.E. 1999. Metabolic impairment induces oxidative stress, compromises inflammatory responses, and inactivates a Key mitochondrial enzyme in microglia. *J. Neurochem.* 72: 1948-1958.
- Parker, W.D.Jr., Haas, R., Stumpf, D.A., Parks, J., Eguren, L.A., Jackson, C. 1984. Brain mitochondrial metabolism in experimental thiamine deficiency. *Neurology* 34: 1477-1481.
- Peters, R.A. 1936. The biochemical lesions in vitamin B1 deficiency: Application of modern biochemical analysis in its diagnosis. *Lancet* 1: 1161-1164.
- Peterson, C., Héroux, M., Lavoie, J., Butterworth, R.F. 1995. Loss of [³H]Kainate and of NMDA-displaceable [³H]glutamate binding sites in brain in thiamine deficiency: results of a quantitative autoradiographic study. *Neurochem. Res.* 20: 1155-1160.
- Phillips, S.C., Harper, C.G., Krill, J.J. 1987. A quantitative histological study of the cerebellar vermis in alcoholic patients. *Brain* 110: 301-314.
- Phillips, S.C., Harper, C.G., Krill, J.J. 1990. The contribution of Wernicke's encephalopathy to alcohol-related cerebellar damage. *Aust. Drug Alcohol Rev.* 9: 53-60.
- Rao, V.L.R., Mousseau, D.D., Butterworth, R.F. 1995. A quantitative autoradiographic study of muscarinic cholinergic receptor subtypes in the brains of pyridoxamine-treated rats. *Neurochem. Res.* 20: 907-914.
- Rindi, G., Perry, V. 1961. Uptake of pyridoxamine by tissue of rats. *Biochem. J.* 80: 214-216.
- Rindi, G., Ventura, U. 1967. Phosphorylation and uphill intestinal transport of thiamine, in vitro. *Experientia.* 23: 175-176.
- Robertson, D.M., Wasan, S.M., Skinner, D.B. 1968. Ultrastructural features of early brainstem lesions of thiamine-deficient rats. *Am. J. Pathol.* 52: 1081-1097.

- Rose, R.C. 1981. Intestinal absorption of water-soluble vitamins. Physiology of the Gastrointestinal Tract, Johnson, L.R. Raven Press, New York. 1231-1242.
- Schanne, F.A.X., Kane, A.B., Young, E.E., Farber, J.L. 1979. Calcium dependence of toxic cell death: a final common pathway. Science. 206: 701-702.
- Scholz, W. 1949. Histologische und topische Veränderungen und vulnerabilitätsverhältnisse menschlichen Gehirn bei Sauerstoffmangel, Odem und plasmatischen Infiltrationen. I. Problemstellung und feingewebliche Situation. Arch. Psychiat. Nervenkr. 181: 621-665.
- Schroth, G. Wichmann, W., Valavanis, A. 1991. Blood-brain barrier disruption in acute wernicke encephalopathy: MR findings. J. Comp. Assist. Tomog. 15: 1059-1061.
- Scudiero, D.A., Shoemaker, R.H., Paul, K.D., Monks, A., Tierney, S., Nofziger, T.H., Currens, M.J., Seniff, D., Boyd, M.R. 1988. Evaluation of a soluble tetrazolium/formazan assay for cell growth and drug sensitivity in culture using human and other tumor cell lines. Cancer Res. 48(17): 4827-33.
- Tallaksen, C.M.E., Bell, H., Karlsen, J. 1993. Thiamin and thiamin phosphate ester deficiency assessed by high performance liquid chromatography in four clinical cases of Wernicke encephalopathy. Alcohol. Clin. Exp. Res. 17 : 712-716.
- Thangnipon, W., Kingsbury, A., Webb, M., Balázs, R. 1983. Observations on rat cerebellar cells *in vitro*: Influence of substratum, potassium concentration and relationship between neurons and astrocytes. Dev. Brain Res. 11: 177-189.
- Thiessen, I. 1978. The role of thiamine in research with animals and in humans. J. Orthomol. Psychiat. 7 : 107-113.
- Todd, K.G. and Butterworth, R.F. 1998a. Evaluation of the role of NMDA-mediated excitotoxicity in the selective neuronal loss in experimental Wernicke encephalopathy. Exp. Neurol. 149: 130-138.
- Todd, K.G. and Butterworth, R.F. 1998b. Microglial activation: the initial cellular response in experimental thiamine deficiency. J. Neurochem. (Suppl.) 70: S64.
- Todd, K.G. and Butterworth, R.F. 1998c. Increased neuronal cell survival after L-deprenyl treatment in experimental thiamine deficiency. J. Neurosci. Res. 52: 240-246.
- Tombaugh, G.C., Sapolski, R.M. 1993. Evolving concepts about the role of acidosis in ischemic neuropathology. J. Neurochem. 61: 793-803.
- Torvik, A. 1985. Two types of brain lesions in Wernicke's encephalopathy. Neuropath. Appl. Neurobiol. 11: 179-190.

Troncoso, J.C., Johnston, M.V., Hess, K.M., Griffin, J.W., Price, D.L. 1981. Model of Wernicke's encephalopathy. *Arch. Neurol.* 38: 350-354.

Victor, M., Adams, R.D., Collins, G.H. 1989. *The Wernicke-Korsakoff syndrome and related neurological disorders due to alcoholism and malnutrition*. Philadelphia: 2nd Ed. F.A. Davis Co.

Watanabe, I. 1978. Pyridoxamine-induced acute thiamine-deficient encephalopathy in mouse. *Exp. Mol. Pathol.* 28: 381-394.

Williams, R.R., Cline, J.K. 1936. Synthesis of vitamin B1. *J. Am. Chem. Soc.* 58: 1504-1505.

Yoshida, S., Busto, R., Martinez, E., Scheinberg, P., Ginsberg, M.D. 1985. Regional brain energy metabolism after complete versus incomplete ischemia in the rat in the absence of severe lactic acidosis. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* 5: 490-501.