

Université de Montréal

**Stress oxydatif cérébrovasculaire et rupture de la barrière hémato-
encéphalique dans le syndrome de Wernicke-Korsakoff expérimental**

par

Élizabeth Beauchesne

Programme de Sciences biomédicales

Faculté de médecine

Thèse présentée à la Faculté des études supérieures et postdoctorales
en vue de l'obtention du grade de Philosophiæ Doctor (Ph.D.)
en sciences biomédicales

Mars 2010

© Élizabeth Beauchesne, 2010

Université de Montréal
Faculté des études supérieures et postdoctorales

Cette thèse intitulée:

Stress oxydatif cérébrovasculaire et rupture de la barrière hémato-encéphalique
dans le syndrome de Wernicke-Korsakoff expérimental

présentée par :

Élizabeth Beauchesne

a été évaluée par un jury composé des personnes suivantes :

Dr Jean-François Giguère, président-rapporteur

Dr Roger F. Butterworth, directeur de recherche

Dr Alan S. Hazell, co-directeur

Dr Jane Montgomery, membre du jury

Dr Peter Dodd, examinateur externe

Dr Pierre Haddad, représentant du doyen de la FESP

Résumé

Le syndrome de Wernicke-Korsakoff (SWK) est un désordre neuropsychiatrique causé par la déficience en thiamine (DT). Dans la DT expérimentale comme dans le SWK, on observe une mort neuronale et des hémorragies dans certaines régions précises du diencephale et du tronc cérébral. Les lésions diencephaliques du SWK sont particulièrement sévères et entraînent souvent des séquelles amnésiques permanentes.

Le lien entre la dysfonction métabolique induite par la DT et la mort neuronale n'est pas connu. Des rapports précédents ont démontré que la perméabilité de la barrière hémato-encéphalique (BHE) était altérée et ce, précédant l'apparition du dommage neuronal, suggérant un rôle critique de la dysfonction vasculaire. Les jonctions serrées (JS) interendothéliales, la base anatomique de la BHE, constituent un réseau moléculaire incluant l'occludin et les zonula occludens (ZO). Cette thèse démontre une perte d'expression et une altération de la morphologie de ces protéines en relation avec la dysfonction de la BHE dans le thalamus de souris déficientes en thiamine, fournissant une explication pour la présence d'hémorragies.

Le stress oxydatif peut entraîner des dommages directs aux protéines des JS et interférer avec leurs mécanismes de régulation. De plus, l'oxyde nitrique (NO) peut induire la métalloprotéinase matricielle-9 (MMP-9) impliquée dans la dégradation de ces protéines. L'endothélium vasculaire cérébral (EVC) semble être une source importante de NO dans la DT, l'expression de l'oxyde nitrique synthase endothéliale (eNOS) étant sélectivement induite dans les régions vulnérables. Le NO peut réagir avec les espèces réactives oxygénées et former du peroxy-nitrite, entraînant un stress oxydatif/nitrosatif endothélial. Les résultats présentés démontrent que la délétion du gène de eNOS prévient le stress oxydatif/nitrosatif cérébrovasculaire, l'extravasation des immunoglobulines G (IgGs) et l'altération de l'occludin et des ZO dans le thalamus de souris déficientes en thiamine. De plus, cette délétion prévient l'induction de l'expression de MMP-9 dans l'EVC. Des résultats similaires ont été obtenus avec l'antioxydant *N*-acétylcystéine (NAC).

Les mécanismes précis par lesquels les espèces réactives altèrent les protéines des JS sont inconnus. Caveolin-1, une composante majeure du caveolæ de l'EVC, est impliquée dans la régulation de l'expression des protéines des JS, et celle-ci est modulée par le stress oxydatif/nitrosatif; l'altération de l'expression de caveolin-1 a été récemment associée à la rupture de la BHE. Les résultats présentés démontrent que l'expression de caveolin-1 est sélectivement altérée dans l'EVC du thalamus de souris déficientes en thiamine, coïncidant avec la rupture de la BHE, et démontrent que la normalisation de l'expression de caveolin-1 par le NAC est associée avec l'atténuation du dommage à la BHE.

Pris ensemble, ces résultats démontrent un rôle central du stress oxydatif/nitrosatif cérébrovasculaire, particulièrement celui provenant de eNOS, dans l'altération des JS de la BHE via des dommages directs et via l'induction de MMP-9 et de caveolin-1. Cette rupture de la BHE contribue par conséquent à la mort neuronale dans le thalamus, puisque la prévention des altérations cérébrovasculaires par la délétion du gène de eNOS et le NAC atténue significativement la mort neuronale. L'administration précoce d'antioxydants en combinaison avec la thiamine devrait donc être une considération importante pour le traitement du SWK.

Mots-clés : syndrome de Wernicke-Korsakoff, déficience en thiamine, barrière hémato-encéphalique, occludin, zonula occludens, oxyde nitrique synthase endothéliale, stress oxydatif/nitrosatif, métalloprotéinase matricielle-9, caveolin-1, mort neuronale.

Abstract

Wernicke-Korsakoff syndrome (WKS) is a neuropsychiatric disorder caused by thiamine deficiency (TD). In experimental TD as in WKS, neuronal cell death and hemorrhages are observed in specific diencephalic and brainstem areas. Diencephalic lesions in WKS are especially severe and often lead to permanent amnesic symptoms.

The link between TD-induced metabolic dysfunction and neuronal cell death is unknown. Previous reports have shown that blood-brain barrier (BBB) permeability was impaired and that this occurred prior to the onset of neuronal damage, suggesting a critical role for vascular dysfunction. Interendothelial tight junctions (TJs), the anatomical basis of the BBB, constitute a molecular network comprising occludin and zonula occludens (ZO)s. This thesis shows a loss of expression and alterations in the morphology of these proteins in relation to BBB dysfunction in the thalamus of thiamine-deficient mice, providing an explanation for the presence of hemorrhages.

Oxidative stress can lead to direct oxidative damage to TJ proteins and interfere with their regulation mechanisms. Also, nitric oxide (NO) can induce matrix metalloproteinase-9 (MMP-9) involved in the degradation of these proteins. Cerebral vascular endothelium (CVE) seems to be an important source of NO in TD, since endothelial nitric oxide synthase (eNOS) expression is selectively induced in vulnerable areas. NO can react with reactive oxygen species and form peroxynitrite, leading to endothelial oxidative/nitrosative stress. Results have show that eNOS gene deletion prevents cerebrovascular oxidative/nitrosative stress, immunoglobulins G (IgGs) extravasation and occludin and ZO)s alterations in the thalamus of thiamine-deficient mice. Also, eNOS gene deletion prevents the induction of MMP-9 in CVE. Similar results have been obtained with the antioxidant *N*-acetylcysteine (NAC).

Precise mechanisms by which reactive species alter TJ proteins are unknown. Caveolin-1, a major component of CVE caveolæ, is involved in the regulation of TJ protein expression, and is modulated by oxidative/nitrosative stress; alteration in caveolin-1 expression has been recently associated with BBB breakdown. The present results show

that caveolin-1 expression is selectively altered in CVE of the thalamus of thiamine-deficient mice, and show that normalization of caveolin-1 expression by NAC is associated with the attenuation of BBB damage.

Taken together, these results demonstrate a central role for cerebrovascular oxidative/nitrosative stress, especially coming from eNOS, in BBB TJ protein alterations via direct damage and via induction of MMP-9 and caveolin-1. As a result, BBB breakdown contributes to neuronal cell death in the thalamus, since prevention of cerebrovascular alterations by eNOS gene deletion and NAC significantly attenuates neuronal cell death. Early administration of antioxidants combined with thiamine should therefore be an important consideration for the treatment of WKS.

Keywords : Wernicke-Korsakoff syndrome, thiamine deficiency, blood-brain barrier, occludin, zonula occludens, endothelial nitric oxide synthase, oxidative/nitrosative stress, matrix metalloproteinase-9, caveolin-1, neuronal cell death.

Table des matières

Résumé.....	iii
Abstract.....	v
Liste des figures.....	xi
Liste des tableaux.....	xiv
Liste des abréviations.....	xv
Dédicace.....	xix
Remerciements.....	xx
Chapitre I. INTRODUCTION.....	1
I.1. Le syndrome de Wernicke-Korsakoff.....	2
I.1.1. Historique et définition.....	2
I.1.2. Étiologie.....	2
I.1.3. Prévalence et facteurs de risque.....	3
I.1.3.1. Alcoolisme chronique et autres facteurs.....	3
I.1.4. Symptômes neurologiques et psychiatriques.....	4
I.1.4.1. Troubles oculaires, ataxie et confusion.....	4
I.1.4.2. Psychose de Korsakoff.....	4
I.1.5. Diagnostic, traitement et pronostic.....	4
I.1.6. Neuropathologie du syndrome de Wernicke-Korsakoff.....	6
I.1.6.1. Pathologie aiguë (<i>active</i>).....	6
I.1.6.2. Pathologie chronique (<i>inactive</i>).....	7
I.1.6.3. Dégénérescence cérébelleuse.....	7
I.1.6.4. Corrélations anatomo-cliniques.....	8
I.1.7. Syndrome de Wernicke-Korsakoff expérimental.....	8
I.2. Pathogenèse du syndrome de Wernicke-Korsakoff.....	9
I.2.1. Thiamine.....	9

I.2.2. Déficience en thiamine et vulnérabilité cérébrale sélective.....	12
I.2.3. Dysfonction métabolique.....	12
I.2.4. Mécanismes responsables des lésions histologiques	14
I.2.4.1. Défaillance énergétique et acidose lactique.....	14
I.2.4.2. Mécanismes excitotoxiques	14
I.2.4.3. Rupture de la barrière hémato-encéphalique	15
I.2.4.4. Stress oxydatif	15
I.2.4.5. Activation de la microglie.....	15
I.2.4.6. Inflammation.....	16
I.2.4.7. Dysfonction astrocytaire.....	17
I.2.4.8. Autres mécanismes	17
I.2.4.8.1. Accumulation de peptides amyloïdes- β	17
I.3. Rupture de la barrière hémato-encéphalique dans la déficience en thiamine...	18
I.3.1. La barrière hémato-encéphalique.....	18
I.3.1.1. Jonctions serrées	20
I.3.1.1.1. Occludin et claudins.....	21
I.3.1.1.2. Zonula occludens	21
I.3.2. Régulation des jonctions serrées de la BHE	22
I.3.2.1. Rôle des astrocytes, de la lame basale et des péricytes	22
I.3.2.2. Rôle du calcium	23
I.3.2.3. Phosphorylation des protéines des jonctions serrées	24
I.3.3. Intégrité de la BHE dans la déficience en thiamine.....	25
I.3.3.1. Importance des changements vasculaires dans le syndrome de Wernicke-Korsakoff humain et expérimental.....	25
I.3.3.2. Intégrité des jonctions serrées de la BHE dans la déficience en thiamine...	30
I.4. Mécanismes possibles de rupture de la BHE dans la déficience en thiamine	31
I.4.1. Défaillance énergétique	31
I.4.1.1. Défaillance énergétique neuronale et fluctuations hémodynamiques.....	31
I.4.1.2. Défaillance énergétique endothéliale.....	31

I.4.2. Excitotoxicité endothéliale	32
I.4.3. Dysfonction astrocytaire	32
I.4.4. Stress oxydatif/nitrosatif	33
I.4.4.1. Généralités	33
I.4.4.1.1. Source et rôle des espèces réactives en physiologie	33
I.4.4.1.1.1. Espèces réactives oxygénées	33
I.4.4.1.1.2. Oxyde nitrique et oxyde nitrique synthase	34
I.4.4.1.2. Défense antioxydante cérébrale	35
I.4.4.1.3. Dommages oxydatifs/nitrosatifs en condition pathologique	36
I.4.4.1.3.1. Peroxydation lipidique et oxydation de l'ADN	38
I.4.4.1.3.2. Nitration et nitrosylation des protéines	38
I.4.4.1.3.3. Perturbation de la signalisation cellulaire	39
I.4.4.2. Stress oxydatif/nitrosatif dans la déficience en thiamine	39
I.4.4.2.1. Rôle de eNOS et importance du stress oxydatif/nitrosatif cérébrovasculaire	40
I.4.4.3. Effets des espèces réactives sur l'intégrité de la BHE	41
I.4.4.3.1. Effets directs des espèces réactives sur l'intégrité de la BHE	41
I.4.4.3.1.1. Dommages oxydatifs/nitrosatifs	41
I.4.4.3.1.2. Altération de la régulation des protéines des JS	42
I.4.4.3.2. Effets indirects des espèces réactives sur l'intégrité de la BHE	42
I.4.5. Métalloprotéinases matricielles	42
I.4.6. Activation de la microglie et inflammation	44
I.4.7. Dysfonction du caveolæ et de caveolin-1	45
I.4.7.1. Caveolæ et caveolin-1 en condition physiologique	45
I.4.7.2. Rôle de caveolin-1 en pathologie	47
I.5. Hypothèse	49
Chapitre II. RÉSULTATS : PRÉSENTATION DES ARTICLES	51

II.1. Premier article : Altered expression of tight junction proteins and matrix metalloproteinases in thiamine-deficient mouse brain.....	52
II.2. Deuxième article : eNOS gene deletion restores blood-brain barrier integrity and attenuates neurodegeneration in the thiamine-deficient mouse brain.....	78
II.3. Troisième article : Up-regulation of caveolin-1 and blood-brain barrier breakdown are attenuated by <i>N</i> -acetylcysteine in thiamine deficiency.....	105
Chapitre III. DISCUSSION	136
III.1 Intégrité moléculaire des jonctions serrées de la BHE dans la déficience en thiamine	137
III.2. Mécanismes de rupture de la BHE dans la déficience en thiamine	139
III.2.1. Rôle des métalloprotéinases matricielles	139
III.2.2. Rôle de eNOS et du stress oxydatif/nitrosatif.....	141
III.2.3. Rôle de caveolin-1	150
III.2.4. Autres mécanismes possibles.....	154
III.2.4.1. Rôle de la microglie et de l'inflammation.....	154
III.2.4.2. Rôle des astrocytes.....	157
III.3. Relation entre la rupture de la BHE et la mort neuronale dans la déficience en thiamine	158
Chapitre IV. CONCLUSION ET PERSPECTIVES	161
IV.1 Conclusion	162
IV.2. Perspectives.....	164
Chapitre V. BIBLIOGRAPHIE	172

Liste des figures

Introduction

Figure 1 : Cas d'encéphalopathie de Wernicke aigu présentant des lésions hémorragiques au niveau des corps mamillaires et de la portion médiane du thalamus.....	6
Figure 2 : Structure de la thiamine et de ses esters de phosphate.....	10
Figure 3 : Enzymes thiamino-dépendantes TK, PDH et α -KGDH.....	11
Figure 4 : A) Unité neurovasculaire. B) Schéma simplifié du complexe moléculaire des jonctions serrées et adhérentes de la BHE.....	20
Figure 5 : A) Microhémorragie typique du SWK aigu. B) Modélisation 3D des changements vasculaires lors du SWK aigu.....	28
Figure 6 : Interaction entre les principales espèces réactives oxygénées et nitrées lors du dommage oxydatif/nitrosatif.....	37
Figure 7 : Structure du caveolæ et de caveolin.....	45

Premier article

Figure 1: Region-selective hemorrhagic and necrotic lesions in the thiamine-deficient mouse brain.....	64
Figure 2. Region-selective IgG extravasation in the thiamine-deficient mouse brain.....	65
Figure 3. Region-selective loss of occludin protein expression in the thiamine-deficient mouse brain.....	66
Figure 4. Region-selective loss of zonula occludens-1 and -2 protein expression in the thiamine-deficient mouse brain.....	67
Figure 5. Absence of changes in tight junction proteins gene expression in the thalamus of thiamine-deficient mice.....	68
Figure 6. Alterations in the morphology of tight junction proteins in the thalamus of thiamine-deficient mice.....	69

Figure 7. Region-selective MMP-9 up-regulation in the thiamine-deficient mouse brain.....	70
---	----

Deuxième article

Figure 1. Attenuation of neuronal cell death in the medial thalamus of eNOS ^{-/-} thiamine-deficient mice.....	91
Figure 2. Prevention of oxidative/nitrosative stress in thalamic vessels of eNOS ^{-/-} thiamine-deficient mice.....	92
Figure 3. Prevention of IgG extravasation in the medial thalamus of eNOS ^{-/-} thiamine-deficient mice.....	93
Figure 4. Attenuation of occludin alterations in medial thalamus of eNOS ^{-/-} thiamine-deficient mice.....	94
Figure 5. Prevention of loss of zonula occludens-1 and 2 expression in medial thalamus of eNOS ^{-/-} thiamine-deficient mice.....	95
Figure 6. Prevention of matrix metalloproteinase-9 up-regulation in medial thalamus of eNOS ^{-/-} thiamine-deficient mice.....	96

Troisième article

Figure 1. Focal up-regulation of caveolin-1 in the thalamus of thiamine-deficient mice.....	119
Figure 2. Prevention of the increase in caveolin-1 gene expression in the thalamus of NAC-treated thiamine-deficient mice.....	120
Figure 3. Prevention of the increase in caveolin-1 protein levels in the thalamus of NAC-treated thiamine-deficient mice.....	121
Figure 4. Attenuation of oxidative stress by NAC in the thalamus of thiamine-deficient mice.....	122
Figure 5. Attenuation of BBB breakdown in the thalamus of NAC-treated thiamine-deficient mice.....	123
Figure 6. Prevention of MMP-9 induction in the thalamus of NAC-treated thiamine-deficient mice.....	124

Discussion

Figure 8. Expression de MMP-9 dans les cellules inflammatoires périvasculaires dans le thalamus de souris déficientes en thiamine.....	140
Figure 9. Effet de la délétion du gène de eNOS sur l'expression génique de Nox-2 (gp91phox) dans le thalamus de souris déficientes en thiamine.....	145
Figure 10. Génération de ROS par l' α -KGDH.....	149
Figure 11. Interrelation possible entre le stress oxydatif/nitrosatif, caveolin-1, la voie Ras-MAPKs et les protéines des jonctions serrées dans la déficience en thiamine.....	152
Figure 12. Effet de la délétion du gène de eNOS sur l'activation de la microglie (immunoréactivité à ED-1) dans le thalamus de souris déficientes en thiamine.....	155
Figure 13. Effet de la délétion du gène de eNOS sur l'expression génique de IL-1 β dans le thalamus de souris déficientes en thiamine.....	156
Figure 14. Relation temporelle entre les altérations vasculaires et neuronales dans la déficience en thiamine.....	160

Conclusion et perspectives

Figure 15. Rôle de eNOS et du stress oxydatif/nitrosatif cérébrovasculaire dans la rupture de la barrière hémato-encéphalique lors de la déficience en thiamine.....	163
Figure 16. Neuroprotection par le NAC dans le thalamus de souris déficientes en thiamine.....	168

Liste des tableaux

Tableau I :	Critères actuels de détection de la déficience en thiamine et du SWK...5
Tableau II :	Évolution de la vision sur l'importance des anomalies cérébrovasculaires dans la pathogenèse du SWK humain et expérimental..... 26

Liste des abréviations

$\cdot\text{NO}_2$:	radical nitro
$\cdot\text{OH}$:	radical hydroxyle
ADN:	acide désoxyribonucléique
AGPI :	acide gras polyinsaturé
AP-1:	<i>activated protein-1</i>
APP :	protéine précurseur de l'amyloïde
AQP4:	aquaporin-4
ARE :	élément de réponse antioxydante
ARNm :	acide ribonucléique messenger
ATP :	adénosine triphosphate
A β :	amyloïde- β
bFGF:	<i>b fibroblast growth factor</i>
BHE :	barrière hémato-encéphalique
Ca ²⁺ :	calcium
CaMK:	Ca ²⁺ / calmoduline kinase
CEC:	cellule endothéliale cérébrale
CO ₂ :	dioxyde de carbone
DT :	déficiences en thiamine
eNOS :	oxyde nitrique synthase endothéliale
ERK:	<i>extracellular signal-regulated kinase</i>
ESAM:	<i>endothelial cell-selective adhesion molecule</i>
EVC:	endothélium vasculaire cérébral
Fe ²⁺ :	fer ferreux
Fe ³⁺ :	fer ferrique
GABA :	acide gamma-aminobutyrique
GDNF:	<i>glial-derived neurotrophic factor</i>
GFAP:	<i>glial fibrillary acidic protein</i>
GLAST:	<i>glutamate-aspartate transporter</i>

GLT-1:	<i>glutamate transporter-1</i>
GLUT-1:	<i>glucose transporter-1</i>
GMPc :	guanosine-3', 5'-monophosphate cyclique
GPx :	glutathion peroxydase
GR :	glutathion réductase
GSH:	glutathion réduit
GSSG:	glutathion disulfide oxydé
GTP :	guanosine triphosphate
H ₂ O ₂ :	peroxyde d'hydrogène
HNE :	4-hydroxy-2-nonenal
HO:	hème oxygénase
ICAM :	molécule d'adhésion intercellulaire
IgG :	immunoglobuline G
IL-1 β :	interleukine-1 beta
iNOS :	oxyde nitrique synthase inductible
IRM:	imagerie par résonance magnétique
JA:	jonction adhérente
JAM:	<i>junctional adhesion molecule</i>
JS:	jonction serrée
K ⁺ :	potassium
L-DOPA:	3,4-dihydroxyphenylalanine
LO [•] :	radical alcooxyle lipidique
LOO [•] :	radical hydroperoxyle lipidique
MAGUK:	<i>membrane-associated guanylate kinase</i>
MAPK:	<i>mitogen-activated protein kinase</i>
ME:	microscopie électronique
MMP :	métalloprotéinase matricielle
Na ⁺ :	sodium
Na ⁺ -K ⁺ -ATPase:	sodium-potassium ATPase
NAC:	<i>N</i> -acétylcystéine
NADPH :	nicotinamide adénine dinucléotide phosphate réduit

NFκB:	facteur nucléaire kappa B
NMDA :	N-méthyl-D-aspartate
nNOS :	oxyde nitrique synthase neuronale
NO :	oxyde nitrique
NOS :	oxyde nitrique synthase
Nox :	NADPH oxydase
Nrf2:	<i>nuclear factor E2-related factor</i>
n-tyr:	3-nitrotyrosine
O ₂ :	oxygène
O ₂ ^{•-} :	anion superoxyde
OCA :	dégénérescence cérébelleuse alcoolique
ONOO ⁻ :	anion peroxydinitrite
ONOOH :	acide peroxydinitreux
PCR :	<i>polymerase chain reaction</i>
PDH:	pyruvate déshydrogénase
PECAM-1:	<i>platelet endothelial cell adhesion molecule-1</i>
PGDF-B:	<i>platelet-derived growth factor-B</i>
PGDF-β:	<i>PGDF receptor β</i>
PI3K:	<i>phosphatidylinositol-3-kinase</i>
PKA:	protéine kinase A
PKC:	protéine kinase C
PP2A:	protéine phosphatase 2A
PP2Ac:	sous-unité catalytique de la PP2A
PT :	pyrithiamine
PTK:	protéine tyrosine kinase
RNOS:	espèces réactives oxygénées et nitrées
RNS :	espèces réactives nitrées
ROS :	espèces réactives oxygénées
RSH :	thiol réduit
SIDA :	syndrome d'immunodéficience acquise
siRNA	ARN interférants

SNO :	<i>S</i> -nitrosocystéine
SOD :	superoxyde dismutase
Sp1:	<i>Specificity Protein 1</i>
SWK :	syndrome de Wernicke-Korsakoff
TDP :	thiamine diphosphate
TGF- β :	<i>transforming growth factor-β</i>
TIMP:	<i>tissue inhibitor of metalloproteinase</i>
TK:	transcétolase
TMP:	thiamine monophosphate
TNF- α :	facteur de nécrose tumorale- α
TPKase :	thiamine pyrophosphokinase
TPP :	thiamine pyrophosphate
TTP:	thiamine triphosphate
VE-cadherin:	<i>vascular endothelial cadherin</i>
ZO :	zonula occludens
α -KGDH :	α -cétoglutarate déshydrogénase

À la mémoire de mon père, Serge

Remerciements

Je voudrais d'abord et avant tout remercier et rendre tout l'honneur et la gloire qui est due à mon Créateur, à qui je dois la vie, toutes mes capacités et mon succès. Celui qui tient ma vie entre ses mains a non seulement permis que je puisse survivre à une noyade et à de graves complications cérébrales en juillet 1986, mais a de plus préservé l'intégrité de mon cerveau et m'a en plus donné les capacités intellectuelles pour me rendre jusqu'au doctorat et, ironiquement, dans le domaine des neurosciences! *C'est de Lui, par Lui et pour Lui que sont toutes choses. À lui soit la gloire dans tous les siècles!* (La Bible, Romains 11:36)

Un gros merci et un au revoir chaleureux à toute l'équipe de l'Unité de Recherche en Sciences Neurologiques de l'hôpital Saint-Luc, spécialement à ma collègue et amie Chantal pour son écoute et ses encouragements continus; sans elle je ne sais pas comment j'aurais pu passer au-travers de l'année 2009; merci ma chère Chantal! xxx. Merci à mes directeurs Roger Butterworth et Alan Hazell pour leurs encouragements, la qualité de leur formation et pour m'avoir permis de me rendre où je suis et d'explorer librement mes idées. Merci à Jane Montgomery pour son accueil dans le laboratoire, et à Paul Desjardins pour son accompagnement et son calme rassurant. Merci à Juliette pour son aide administrative.

Merci à ma mère Lise, ma sœur Kim, mes frères Jonathan, Yan et Dave et à toute ma famille pour votre présence dans ma vie; je vous aime tous très fort. Une pensée particulière pour mon père Serge, qui serait tellement fier de sa fille; tu me manques papa..... Merci à Richard qui me supporte et que j'aime comme un père! Merci à ma coloc Julie, qui m'a patiemment supportée lors de mes vagues d'émotions, et à Émilie et Audrey pour vos rires qui m'ont fait oublier la pression de mon travail. Merci à Caroline, Bakoa, Christine, Geneviève, Alté et tous les autres, pour votre amitié précieuse et vos encouragements.

Merci au département de Sciences biomédicales et à la Faculté des Études Supérieures et Postdoctorales de l'Université de Montréal pour leur soutien financier. Merci au Centre de Recherche du CHUM et aux sociétés de recherche ISN (*International Society for Neurochemistry*) et SFRBM (*Society for Free Radical Biology and Medicine*) pour leur reconnaissance de mes travaux de recherche.

Chapitre I
INTRODUCTION

I.1. Le syndrome de Wernicke-Korsakoff

I.1.1. Historique et définition

L'encéphalopathie de Wernicke fut initialement décrite par le neurologue allemand Carl Wernicke lorsque ce dernier observa des symptômes oculo-moteurs, une ataxie et des changements mentaux chez deux patients alcooliques ainsi qu'une patiente souffrant de vomissements persistants. À l'autopsie, il nota des lésions similaires dans les trois cas, soit la présence de nombreuses hémorragies disposées de façon symétrique dans la matière grise autour des troisième et quatrième ventricules et de l'aqueduc de Sylvius. Wernicke considéra que ces changements représentaient un syndrome inflammatoire aigu qu'il nomma *Polioencephalitis hemorrhagica superioris* (Wernicke, 1881). Six ans plus tard, le psychiatre russe Sergei S. Korsakoff décrivit un syndrome amnésique unique fréquemment observé chez les alcooliques. Selon lui, ce désordre mental était causé par une toxine; il le désigna donc sous le terme de *Cerebropathia psychica toxæmica* (Korsakoff, 1887). Ce ne fut que plus tard que l'on découvrit le lien serré entre ces deux désordres, après que plusieurs neuropathologistes aient noté la similarité entre les lésions cérébrales observées chez les patients (Gudden, 1896; Gamper, 1928; Kant, 1932). Une étude approfondie de 245 cas confirma par la suite que les pathologies de Wernicke et de Korsakoff représentent en fait deux facettes du même processus pathologique (Victor *et al.*, 1989), d'où la définition actuelle du syndrome de Wernicke-Korsakoff (SWK), un syndrome neuropsychiatrique complexe comprenant à la fois les manifestations du syndrome de Wernicke et du syndrome amnésique de Korsakoff.

I.1.2. Étiologie

L'étiologie nutritionnelle de ce désordre ne fut reconnue qu'à la fin des années 1930s, coïncidant avec la découverte des *vitamines* (Funk, 1911). La similarité entre les lésions cérébrales observées chez des animaux déficients en thiamine (vitamine B₁) et les lésions de type Wernicke (Prickett, 1934; Alexander, 1940), ainsi que l'effet thérapeutique

de la thiamine chez les patients SWK (Bowman *et al.*, 1939) démontra le rôle clé de la déficience en thiamine dans l'étiologie de ce désordre.

I.1.3. Prévalence et facteurs de risque

Plusieurs études post-mortem à l'échelle internationale ont indiqué une prévalence du SWK se situant entre 1.7% et 2.8%. L'âge des patients est en général distribué entre 30 et 70 ans, la plus forte incidence se trouvant dans la cinquième et la sixième décennie. Les hommes semblent plus susceptibles que les femmes (Victor *et al.*, 1989).

I.1.3.1. Alcoolisme chronique et autres facteurs

La plupart des cas sont observés chez les alcooliques chroniques, raison pour laquelle le SWK est classé parmi les désordres alcoolo-nutritionnels (Harper, 1979). La prévalence est d'environ 15% parmi la population alcoolique (Torvik *et al.*, 1982). L'alcool entraîne le développement d'une carence en thiamine de plusieurs manières : L'alcoolisme est d'abord souvent associé à la malnutrition (Victor *et al.*, 1989); De plus, l'éthanol entraîne une diminution de l'absorption intestinale de la thiamine (Thomson *et al.*, 1970; Hoyumpa *et al.*, 1978) ainsi qu'une perte de ses réserves hépatiques, souvent en association avec la cirrhose hépatique (Somogyi *et al.*, 1980); Aussi, l'éthanol entraîne directement une dégradation de la thiamine dans le foie et le cerveau via l'induction de l'enzyme thiaminase (Laforenza *et al.*, 1990); En plus, l'éthanol entraîne une inhibition directe de la thiamine pyrophosphokinase dans le cerveau, une enzyme responsable de la phosphorylation (activation) de la thiamine (Rindi *et al.*, 1986).

Mis à part l'alcoolisme chronique, des cas de SWK ont été rapportés dans une panoplie d'autres scénarios cliniques étant tous directement ou non liés à un état nutritionnel sévèrement altéré, tels que l'hyperemesis gravidarum (Spruill & Kuller, 2002), l'anorexia nervosa (Winston *et al.*, 2000), la nutrition parentérale prolongée (Harper, 1980), la dialyse chronique (Hung *et al.*, 2001), les carcinomes gastro-intestinaux (Vonderahe, 1941), la défaillance hépatique chronique (Butterworth, 2008), le by-pass gastrique (Salas-Salvado *et al.*, 2000) et le SIDA (Soffer *et al.*, 1989; Butterworth *et al.*, 1991).

I.1.4. Symptômes neurologiques et psychiatriques

I.1.4.1. Troubles oculaires, ataxie et confusion

La description classique des symptômes par Wernicke consiste en une triade composée de troubles oculaires, ataxie et confusion mentale. Toutefois, cette triade classique n'est présente que chez le tiers des patients. La confusion est le symptôme le plus commun lors de l'hospitalisation, suivie de l'ataxie et des signes oculaires. Les principales anomalies oculaires consistent en l'ophtalmoplégie et le nystagmus, ce dernier étant le plus fréquent. La forme la plus fréquente d'ataxie est une ataxie de démarche et de posture, presque toujours combinée à une parésie vestibulaire dans la phase aiguë de la maladie. L'*état confusionnel global* est le dérangement de la fonction mentale le plus caractéristique lors du stade initial de la maladie, et est caractérisé par plusieurs éléments tels que fatigue profonde, apathie, altération de la conscience et de la réceptivité, profonde désorientation spatio-temporelle, confusion, inattention, difficulté de concentration et dérangement de la perception et de la mémoire. Les patients sont en général indifférents à leur environnement et même à leur propre condition (Victor *et al.*, 1989).

I.1.4.2. Psychose de Korsakoff

Si non traité rapidement, l'état confusionnel global évoluera vers un syndrome amnésique-affabulatoire désigné sous le terme de *psychose de Korsakoff*. La psychose de Korsakoff est un désordre de la mémoire hautement distinctif. Dans la grande majorité des cas, ce syndrome est reconnu après que les symptômes de l'état confusionnel global aient commencé à disparaître. L'état amnésique chronique comprend une amnésie rétrograde couplée à une amnésie antérograde. Les patients sont en général apathétiques, et on observe parfois des signes d'affabulation (Victor *et al.*, 1989).

I.1.5. Diagnostic, traitement et pronostic

Un problème majeur est que seulement environ 20% des cas de SWK sont diagnostiqués *ante-mortem* (Harper, 1983). Il est possible que la forme chronique de la maladie se développe suite à plusieurs épisodes sous-cliniques d'encéphalopathie,

expliquant l'absence fréquente de la fameuse triade de symptômes (Harper, 1979). Le diagnostic précoce demeurant principalement basé sur l'observation clinique, cette triade classique a été modifiée pour faire place à de nouveaux critères de diagnostic (Tableau I, colonne de droite). Une étude rétrospective a démontrée que suivant cette modification, le diagnostic du SWK peut être effectué avec un degré élevé de spécificité et de sensibilité (Caine *et al.*, 1997). De plus, plusieurs études ayant démontré que d'autres signes cliniques importants peuvent apparaître avant que les signes classiques n'apparaissent, de nouveaux critères ont aussi été établis pour l'identification précoce des patients déficients en thiamine (Tableau I, colonne de gauche).

Tableau I. Critères actuels de détection de la déficience en thiamine et du SWK

(Adapté de Thomson *et al.*, 2008)

Signes précoces de déficience en thiamine	Critères de diagnostic du SWK (minimum 2)
Perte d'appétit	Déficiences alimentaires
Nausée/vomissements	Anormalités oculo-motrices
Fatigue, faiblesse, apathie	Dysfonction cérébelleuse (ataxie)
Étourdissements, dipopie (vision double)	État mental altéré ou trouble modéré de la mémoire
Insomnie, anxiété, difficulté de concentration	
Perte de mémoire	

Le traitement du SWK se résume en l'administration parentérale quotidienne de 50 à 100 mg de thiamine hydrochloride pour quelques jours, suivie d'un traitement oral (Victor *et al.*, 1989). Toutefois, la dose requise chez les alcooliques pourrait être beaucoup plus élevée, soit de 500 mg à 1 g par jour (Thomson *et al.*, 2002). La réponse des patients consiste généralement en un renversement rapide des symptômes oculaires et une réponse plus lente et souvent incomplète de l'ataxie. L'état confusionnel global semble toujours réversible; à l'opposé, le syndrome amnésique ne l'est que dans 21% des cas, laissant la majorité des patients qui survivent avec des séquelles permanentes (Victor *et al.*, 1989).

I.1.6. Neuropathologie du syndrome de Wernicke-Korsakoff

Le SWK est un désordre particulier qui affecte sélectivement certaines régions du diencephale, du tronc cérébral et du cervelet, alors que les autres structures cérébrales sont relativement épargnées (Harper & Butterworth, 1997). La distribution topographique et la nature des lésions étant différentes selon que le syndrome se présente sous forme aiguë ou chronique, on distingue deux types de pathologie, soit la pathologie *active* (aiguë) et la pathologie *inactive* (chronique). Certains patients présentent parfois une pathologie active surimposée à une pathologie inactive (Kril, 1996).

I.1.6.1. Pathologie aiguë (*active*)

La pathologie active est caractérisée par une distribution extensive des lésions bilatérales et symétriques en bordure des troisième et quatrième ventricules et de l'aqueduc. Les régions touchées incluent le thalamus, les corps mamillaires de l'hypothalamus, la région périaqueducale, le colliculus inférieur, les noyaux vestibulaires du pont et l'olive inférieure (Torvik, 1987). Plusieurs patients meurent au stade aigu de l'encéphalopathie, ceci pouvant être expliqué par la sévérité des lésions au niveau du tronc cérébral, site de centres autonomiques vitaux (Victor *et al.*, 1989). Au niveau microscopique, le neuropile et les neurones sont relativement préservés à ce stade. On décrit plutôt cette pathologie en tant que pathologie *vaso-gliale*, puisque les vaisseaux sanguins sont proéminents, et on observe la présence d'hémorragies parfois visibles macroscopiquement sous forme de pétéchies. Le parenchyme démontre un aspect spongieux, suggérant la présence d'œdème vasogénique. Au niveau glial, on observe une altération de la morphologie des astrocytes ainsi qu'une prolifération microgliale (Torvik, 1985).

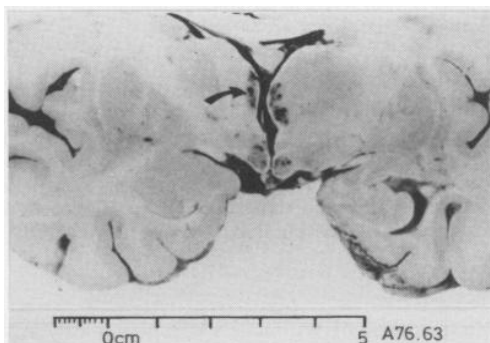


Figure 1. Cas d'encéphalopathie de Wernicke aigu présentant des lésions hémorragiques (flèche) au niveau des corps mamillaires et de la portion médiane du thalamus. Avec permission, de (Harper, 1983)
© BMJ Publishing Group Ltd.

I.1.6.2. Pathologie chronique (*inactive*)

La pathologie inactive est la manifestation la plus commune chez les alcooliques chroniques et celle-ci présente une distribution plus restreinte des lésions que la pathologie aiguë; les lésions bilatérales et symétriques sont souvent limitées aux régions diencephaliques dont les corps mamillaires et le thalamus médian. L'olive inférieure et le colliculus inférieur sont aussi parfois affectés (Torvik, 1987). Les corps mamillaires sont toujours affectés et démontrent une atrophie considérable, une caractéristique d'ailleurs fréquemment utilisée en neuroimagerie pour le diagnostic du SWK (Sullivan *et al.*, 1999). Contrairement à la pathologie active, la pathologie inactive ne présente pas d'hémorragies et les cellules endothéliales apparaissent normales, mais on observe la présence de macrophages hémosidéreux, indice d'hémorragies précoces. Bien que plus restreintes dans leur distribution, les lésions observées sont plus sévères et touchent les neurones et/ou le neuropile. Le type et la sévérité des lésions histologiques varient grandement d'une région à une autre. En général, le neuropile est le principal élément affecté, alors que les neurones ne sont que faiblement atteints. Par contre, le thalamus et l'olive inférieure font exception à cette règle, avec un schéma complètement renversé, les neurones étant sévèrement atteints et le neuropile étant relativement préservé. Le thalamus présente une atteinte particulièrement sévère, soit une perte neuronale quasi complète, particulièrement dans le noyau dorso-médian. Une gliose réactionnelle, principalement de type astrocytaire, accompagne les zones nécrotiques. Curieusement, une fine zone sous-épendymale est typiquement épargnée. La démarcation entre les zones épargnées et les zones affectées est très clairement délimitée (Torvik, 1985; Kril, 1996; Harper & Butterworth, 1997).

I.1.6.3. Dégénérescence cérébelleuse

La dégénérescence cérébelleuse, fréquemment rencontrée chez les patients alcooliques avec SWK, consiste généralement en une atrophie du lobe antérieur du cervelet, impliquant une perte des cellules de Purkinje dans la portion supérieure du vermis. Cette perte neuronale est accompagnée d'une prolifération des astrocytes de Bergmann. Puisque la dégénérescence cérébelleuse du SWK est similaire cliniquement et pathologiquement à la *dégénérescence cérébelleuse alcoolique (OCA)*, et qu'un rôle direct de l'éthanol n'a

jamais été démontré dans la pathogenèse de l'OCA, il a été suggéré que ces deux désordres représentent en fait le même processus pathologique, soit d'étiologie nutritionnelle (Victor *et al.*, 1989).

I.1.6.4. Corrélations anatomo-cliniques

On a attribué l'ophtalmoplégie aux lésions des noyaux du troisième (oculo-moteur) et sixième nerfs crâniens de la région périaqueducale, et le nystagmus aux lésions des noyaux vestibulaires du pont. De plus, les lésions des noyaux vestibulaires pourraient expliquer la parésie vestibulaire. L'absence de destruction significative des neurones dans ces noyaux explique probablement le renversement rapide des troubles oculaires et vestibulaires suite au traitement avec la thiamine; ces symptômes seraient dus à une *lésion biochimique* plutôt que structurelle (voir la section I.2.3). La perte des cellules de Purkinje dans la portion antéro-supérieure du cervelet, quant à elle, serait responsable de l'ataxie persistante du tronc en phase chronique du SWK (Victor *et al.*, 1989).

Les lésions à la base des changements mentaux sont plus difficiles à identifier, principalement en raison de notre manque de compréhension de ces fonctions (Kril, 1996). La plupart des auteurs s'entendent sur le fait que les lésions diencephaliques sont impliquées dans le syndrome amnésique, aussi il a été suggéré que les lésions sévères des noyaux dorso-médians du thalamus soient en cause, plutôt que les lésions des corps mamillaires, tel que suggéré précédemment (Victor *et al.*, 1989). Plus récemment, les noyaux antérieurs du thalamus ont été suggérés comme jouant un rôle important (Harding *et al.*, 2000). Il est possible que ce soit la combinaison des lésions de ces deux noyaux qui soit en cause (Kril, 1996). Néanmoins, il est clair que la sévérité des lésions diencephaliques lors du SWK chronique est à l'origine de l'irréversibilité des symptômes amnésiques suite au traitement avec la thiamine (Victor *et al.*, 1989).

I.1.7. Syndrome de Wernicke-Korsakoff expérimental

La majorité des modèles animaux de déficience en thiamine (DT) ne résultent pas en une atteinte du système nerveux périphérique, mais plutôt en une atteinte du système

nerveux central (Heroux & Butterworth, 1992). La DT peut être induite expérimentalement par une diète déficiente en thiamine et/ou par l'administration de pyrithiamine, un antagoniste central de la thiamine. Chez les rongeurs, la seule utilisation d'une diète déficiente en thiamine mène à des symptômes neurologiques en quelques semaines (modèle chronique). Ces symptômes incluent l'ataxie, le nystagmus et la perte du réflexe de redressement et sont précédés par une perte de poids, des anomalies cardiaques et un œdème. Les dommages neuropathologiques sont limités aux noyaux vestibulaires et au cervelet. Le scénario clinique dans son ensemble est similaire au béribéri aigu (humide) chez l'humain, mais pas exactement au SWK (Butterworth, 1986). L'administration de pyrithiamine combinée à la diète déficiente en thiamine accélère la perte des réserves de thiamine et la progression de l'encéphalopathie (modèle « aigu » durant de 11 à 14 jours chez les rongeurs). Ce dernier modèle utilisé chez la souris (Watanabe, 1978) et le rat (Troncoso *et al.*, 1981) reproduit plus rapidement et fidèlement la nature et l'étendue des lésions neuropathologiques du SWK chez l'humain (Heroux & Butterworth, 1992).

I.2. Pathogenèse du syndrome de Wernicke-Korsakoff

Bien qu'il soit maintenant connu qu'une anomalie du métabolisme de la thiamine soit la cause du SKW, les mécanismes entraînant des changements neuropathologiques lors de la DT ne sont pas complètement élucidés. Voici d'abord quelques considérations de base concernant la thiamine et ses fonctions dans le système nerveux.

I.2.1. Thiamine

La thiamine, ou vitamine B₁, est une vitamine hydrosoluble essentielle; les besoins alimentaires quotidiens sont évalués à 1,0-1,5 mg par jour. On en retrouve dans les céréales à grains entiers, les noix, les légumineuses, les fruits et légumes, les produits laitiers, les viandes et le poisson. La molécule de thiamine est composée d'un noyau pyrimidique et un noyau thiazole, reliés par un groupement méthyle. On retrouve la thiamine sous forme libre ou sous la forme de trois différents esters de phosphate comprenant la thiamine mono- (TMP), di- (TDP) et triphosphate (TTP; figure 2). Le taux de capture de la thiamine par la barrière hémato-encéphalique est de l'ordre de 0,3 µg/h/g de tissu cérébral, un taux environ

équivalent à celui calculé pour son turnover cérébral (Rindi *et al.*, 1980), ce qui suggère que le transport de la thiamine soit juste suffisant pour rencontrer les besoins cérébraux, et ce qui indique le besoin d'un apport continu en thiamine (Greenwood *et al.*, 1982).

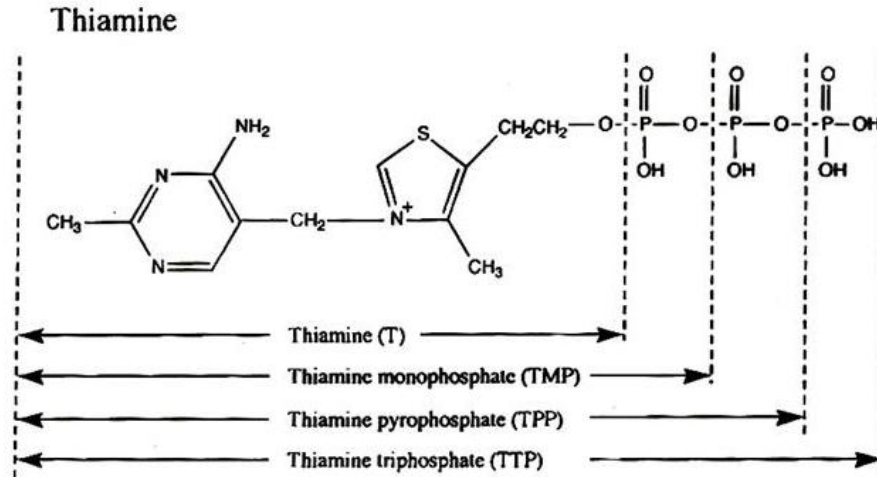


Figure 2. Structure de la thiamine et de ses esters de phosphate

Avec permission, de (Harata & Iwasaki, 1996) © Springer

Chez le rat, le TMP représente moins de 10% du pool cérébral de thiamine (Rindi & deGiusseppe, 1961). À ce jour, aucune fonction cérébrale n'a été attribuée au TMP, sinon de maintenir le pool cérébral de thiamine (Patrini *et al.*, 1988).

Le rôle principal de la thiamine est celui de coenzyme sous la forme de TDP (ou thiamine pyrophosphate, TPP). La thiamine libre est phosphorylée en TDP à partir de l'ATP par la thiamine pyrophosphokinase (TPKase). Chez le rat, le TDP constitue environ 80% du pool cérébral (Rindi & deGiusseppe, 1961). Il y a trois principales enzymes dépendantes du TDP dans le système nerveux central et celles-ci sont impliquées dans le métabolisme du glucose, soit la transcétolase (TK), la pyruvate déshydrogénase (PDH) et l' α -cétoglutarate déshydrogénase (α -KGDH), telles que représentées à la figure 3 suivante.

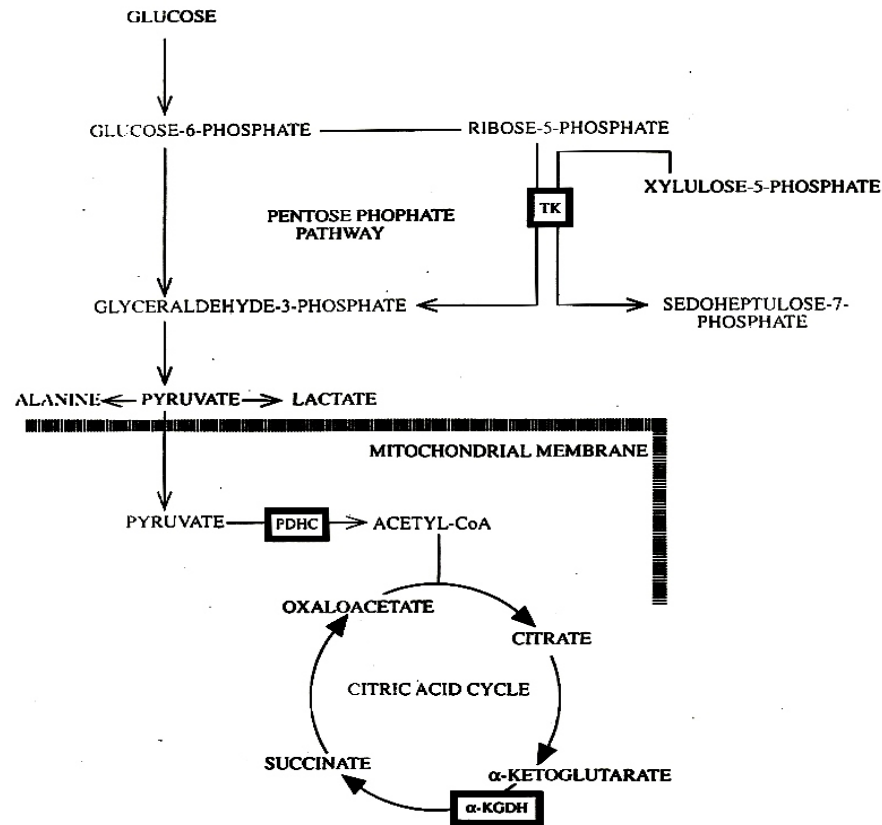


Figure 3. Enzymes thiamino-dépendantes TK, PDH et α -KGDH

Avec permission, de (Leong & Butterworth, 1996) © Springer

Le TDP joue donc un rôle essentiel dans le métabolisme oxydatif cérébral. Le cerveau ayant une demande énergétique et un taux de métabolisme oxydatif considérablement plus élevé que les autres organes (Siegel *et al.*, 1989), il n'est pas difficile de comprendre pourquoi celui-ci est particulièrement vulnérable à la DT. La pyrithiamine, un antagoniste du métabolisme de la thiamine, est concentrée dans le tissu cérébral (Rindi & Perri, 1961) et celle-ci exerce une action inhibitrice au niveau de la TPKase (tout comme l'éthanol), entraînant une diminution des réserves de TDP dans le cerveau. Chez le rat, des symptômes neurologiques commencent à apparaître lorsque les réserves cérébrales de TDP tombent en-dessous de 15% des valeurs normales (Héroux & Butterworth, 1995).

Le TTP représente environ 10% du pool de thiamine cérébral (Rindi & deGiusseppe, 1961). Celui-ci semble impliqué dans l'excitabilité membranaire et la conduction nerveuse. En effet, le TTP exercerait un rôle modulateur sur la perméabilité des canaux sodium et des canaux chlore à large conductance, en occupant un site fixe sur le canal. On pense que la régulation de l'ouverture de ces canaux se ferait via la déphosphorylation du TTP suite à l'impulsion nerveuse (Itokawa & Cooper, 1970; Itokawa, 1995; Bettendorff & Wins, 2009). Toutefois, le rôle du TTP dans la pathogenèse du SWK expérimental demeure encore nébuleux à ce jour.

I.2.2. Déficience en thiamine et vulnérabilité cérébrale sélective

Une des caractéristiques neuropathologiques majeures du SWK est la prédilection pour certaines structures cérébrales. Pourquoi certaines régions spécifiques du cerveau seraient plus vulnérables à la DT? Cela ne peut pas être expliqué par la présence d'une sélectivité régionale au niveau de la perte des réserves des esters de la thiamine, puisque l'on a démontré que cette dernière était équivalente dans les régions cérébrales vulnérables et non-vulnérables (Héroux & Butterworth, 1995). Toutefois, Rindi *et al.* ont démontré que le turnover de la thiamine était plus élevé dans des structures comme le pont, le mésencéphale et le thalamus (régions vulnérables à la déficience en thiamine), comparativement à d'autres structures comme le cortex cérébral (région relativement non vulnérable), suggérant des besoins plus élevés en thiamine (Rindi *et al.*, 1980). En effet, certaines régions cérébrales comme le thalamus sont métaboliquement plus actives que d'autres, et requièrent donc un apport plus élevé en TDP (Siegel *et al.*, 1989). Ainsi, la réduction généralisée des niveaux de thiamine semble affecter plus particulièrement les régions ayant des besoins plus élevés en thiamine, ce qui pourrait expliquer la dysfonction métabolique spécifique à ces régions, tel que discuté dans la section suivante (Héroux & Butterworth, 1995).

I.2.3. Dysfonction métabolique

Tel que mentionné plus tôt, l'on pense que la réversibilité des symptômes neurologiques suite au traitement avec la thiamine serait liée à l'absence de changements

neuropathologiques significatifs dans les régions correspondantes. Cela indique plutôt la présence d'une lésion fonctionnelle, désignée sous le terme de *lésion biochimique* par Peters, qui démontra une association entre ces symptômes neurologiques et une accumulation de lactate dans le tronc cérébral de pigeons déficients en thiamine (Peters, 1936). Initialement, ce dernier croyait que la base de cette lésion consistait en une réduction réversible de l'activité de la PDH (Peters, 1936). Toutefois, on démontra l'absence de déficit au niveau de l'activité de la PDH dans le cerveau de rats déficients en thiamine (Butterworth *et al.*, 1985). D'autre part, l'altération de l'activité de la TK ne semble pas liée aux changements neurologiques associés à la DT (Butterworth, 1993). En contraste, on démontra une réduction sévère de l'activité de l' α -KGDH dans les régions vulnérables à la DT, comparativement aux régions non vulnérables où l'on ne trouva qu'une modeste réduction. On démontra aussi que cette réduction précédait l'apparition des symptômes neurologiques, et que l'activité de l' α -KGDH revenait rapidement à la normale suite au renversement de ces symptômes par la thiamine. Bien plus, le déficit le plus élevé (100%) fut trouvé dans les noyaux vestibulaires du pont, une région associée au nystagmus et aux troubles d'équilibre dans le SKW (Butterworth *et al.*, 1986). La lésion biochimique responsable des symptômes neurologiques réversibles dans la DT serait donc expliquée par une altération réversible de l'activité de l' α -KGDH (Butterworth, 1993).

Puisque l' α -KGDH est un enzyme limitant du cycle de l'acide citrique (Gibson *et al.*, 1984), une diminution de son activité entraîne une réduction des intermédiaires du cycle au-delà l'étape de l' α -cétoglutarate ainsi qu'une diminution subséquente de l'entrée du pyruvate dans le cycle, entraînant une accumulation de lactate (Kinnorsley & Peters, 1930; McCandless, 1982; Navarro *et al.*, 2005), une diminution de la synthèse des neurotransmetteurs glutamate (Gaitonde *et al.*, 1975; Butterworth & Héroux, 1989) et GABA (Héroux & Butterworth, 1988) accompagnés d'une dépression de la respiration mitochondriale (Parker *et al.*, 1984) et d'une défaillance énergétique (baisse des niveaux d'ATP et de phosphocréatine) dans les régions vulnérables à la DT et ce, précédant l'apparition des symptômes neurologiques (Aikawa *et al.*, 1984).

I.2.4. Mécanismes responsables des lésions histologiques

Tel que mentionné plus tôt, ce ne sont pas tous les symptômes du SWK qui sont renversés par la thiamine; le déficit amnésique, par exemple, ne l'est que rarement, cela ayant été attribué aux lésions permanentes au niveau du diencéphale, notamment du thalamus (Victor *et al.*, 1989). Il est à noter que l'activité de l' α -KGDH n'est pas non plus normalisée dans cette région suite à l'administration de thiamine, reflétant possiblement la mort neuronale (Butterworth & Heroux, 1989). Le thalamus est une région particulièrement sévèrement affectée par la DT, avec une perte neuronale accrue dans sa portion médiane, en plus des lésions hémorragiques et œdémateuses (Troncoso *et al.*, 1981). Plusieurs mécanismes pathophysiologiques ont été proposés pour tenter de déterminer la cause de ces lésions histologiques. Les sections qui suivent résument les principales hypothèses.

I.2.4.1. Défaillance énergétique et acidose lactique

Tout d'abord, un déficit sévère et prolongé de l'activité de l' α -KGDH peut résulter en une accumulation critique du lactate ainsi qu'en un déficit énergétique sévère, deux mécanismes pouvant être liés à l'apparition de dommages histologiques irréversibles dans le cerveau déficient en thiamine. Une telle baisse d'ATP pourrait entraîner une dysfonction des pompes $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPases}$ ainsi qu'un déséquilibre du transport d'électrolytes et d'eau pouvant expliquer la présence de lésions œdémateuses (Aikawa *et al.*, 1984). Une accumulation excessive de lactate engendre une acidose lactique, telle que démontrée par Hakim (Hakim, 1984). Cela peut compromettre la fonction cellulaire et pourrait être associé au développement de l'œdème cytotoxique (Myers, 1979).

I.2.4.2. Mécanismes excitotoxiques

L'apparence ultrastructurale du thalamus dans la DT est similaire à celle observée lors de lésions nécrotiques excitotoxiques (Armstrong-James *et al.*, 1988), et le traitement avec le MK-801, un antagoniste non compétitif du récepteur N-méthyl-D-aspartate (NMDA), entraîne une neuroprotection dans le thalamus de rats déficients en thiamine, ce qui démontre un rôle de l'excitotoxicité au glutamate dans la pathogenèse de la mort

neuronale (Langlais & Mair, 1990), processus dans lequel l'accumulation intracellulaire de calcium semble jouer un rôle important (Munozos *et al.*, 1993; Hazell *et al.*, 1998). La concentration extracellulaire du glutamate est en effet à la hausse spécifiquement dans le thalamus, en contraste avec le cortex frontal (Hazell *et al.*, 1993). Cette élévation extracellulaire des niveaux de glutamate est associée avec la dysfonction des transporteurs astrocytaires du glutamate GLT-1 et GLAST (Hazell *et al.*, 2001). Toutefois, il faut mentionner que l'effet neuroprotecteur du MK-801 est présent seulement à un stade avancé de l'encéphalopathie; il est donc probable que l'excitotoxicité soit un phénomène plus tardif et donc que d'autres mécanismes soient responsables de l'initiation de la mort neuronale dans la DT (Todd & Butterworth, 1999b).

I.2.4.3. Rupture de la barrière hémato-encéphalique

L'intégrité de la barrière hémato-encéphalique (BHE), structure essentielle au bon fonctionnement du cerveau, est sévèrement atteinte dans les régions vulnérables à la DT. Bien plus, la rupture de la BHE précède l'apparition des lésions histologiques majeures chez le rat (Calingasan *et al.*, 1995a) et la souris (Harata & Iwasaki, 1995) déficients en thiamine; celle-ci pourrait donc jouer un rôle important dans la pathogenèse de ces lésions. La rupture de la BHE est le principal sujet de la présente étude et sera donc approfondi ultérieurement dans le présent ouvrage.

I.2.4.4. Stress oxydatif

Le stress oxydatif joue un rôle important dans la pathogenèse des lésions cérébrales dans la DT et est un mécanisme de dommage central dans le cadre de la présente thèse; ce sujet sera couvert en détail à la section I.4.4. du présent ouvrage.

I.2.4.5. Activation de la microglie

L'activation de la microglie est une caractéristique typique du SWK humain et expérimental; le modèle expérimental a démontré que cette dernière est un phénomène précoce dans la progression de l'encéphalopathie, et qu'elle est confinée aux régions cérébrales vulnérables, suggérant un rôle important dans la pathogenèse des lésions

histologiques dans la DT (Todd & Butterworth, 1999a). L'activation de la microglie est le résultat d'une séquence bien établie d'événements incluant la prolifération cellulaire, le recrutement au site de l'insulte ainsi que des modifications morphologiques, immunophénotypiques et fonctionnelles (Gehrmann *et al.*, 1995). Celle-ci peut survenir suite à diverses insultes métaboliques, et il a été suggéré que les neurones métaboliquement altérés puissent initier l'activation microgliale par des voies de signalisation intercellulaires (Gehrmann *et al.*, 1992). Une fois activée, la microglie relâche plusieurs substances cytotoxiques incluant des espèces réactives (Banati *et al.*, 1993), des cytokines pro-inflammatoires (Hanisch, 2002) ainsi que de larges quantités de glutamate (Piani *et al.*, 1991). La microglie pourrait donc contribuer au développement de l'excitotoxicité au glutamate dans la DT, en plus d'entraîner des dommages oxydatifs et inflammatoires. Toutefois, la microglie pourrait aussi exercer une action cytoprotectrice via la relâche de substances telles que des molécules antioxydantes, tel que discuté plus loin. Le rôle de la microglie dans la DT reste donc à être clarifié.

I.2.4.6. Inflammation

L'activation de la microglie est en soi un bon indice de la présence d'un processus inflammatoire dans le cerveau déficient en thiamine; celle-ci peut en effet libérer des cytokines pro-inflammatoires telles que l'interleukin-1 β (Il-1 β) et le facteur de nécrose tumorale- α (TNF- α). Ces deux cytokines sont effectivement relâchées dans la DT, autant dans les régions vulnérables que non vulnérables (Karuppagounder *et al.*, 2007). De plus, on a démontré que le groupe des gènes inflammatoires (précisément des cytokines, des chémokines et des interférons) représente le plus large groupe de transcrits dont la régulation est à la hausse dans les régions vulnérables à la DT (Vemuganti *et al.*, 2006). On a aussi démontré une expression à la hausse de la molécule d'adhésion intercellulaire-1 (ICAM-1) dans l'endothélium vasculaire cérébral, ainsi que la présence de cellules positives à la myéloperoxydase, indice de la présence de neutrophiles, dans le thalamus de souris déficientes en thiamine, suggérant une infiltration de cellules inflammatoires périphériques dans le parenchyme cérébral (Calingasan *et al.*, 2000). Il est à noter que l'inflammation est très intimement liée au stress oxydatif, puisque l'expression de plusieurs

gènes inflammatoires est induite par le facteur de transcription nucléaire κ B (NF κ B), lui-même activé par certains radicaux libres (Li & Stark, 2002). On a d'ailleurs observé une hausse d'immunoréactivité pour NF κ B dans le thalamus de souris déficientes en thiamine (Calingasan & Gibson, 2000). Tous ces résultats suggèrent fortement la présence d'un processus inflammatoire actif dans la pathogenèse de la DT.

I.2.4.7. Dysfonction astrocytaire

Les astrocytes sont les premières cellules démontrant des changements morphologiques dans le SWK humain et expérimental; en effet, ceux-ci sont typiquement caractérisés par un œdème cytotoxique (Collins, 1967). Les astrocytes jouent un rôle majeur dans la régulation de la composition du milieu extracellulaire cérébral, incluant la régulation des niveaux extracellulaires de K^+ et de neurotransmetteurs (Siegel *et al.*, 1989). En plus de l'altération des transporteurs de glutamate GLT-1 et GLAST, plusieurs autres composantes astrocytaires sont affectées, dont la protéine du cytosquelette GFAP (Hazell, 2009). On a démontré en culture que le taux de métabolisme oxydatif des astrocytes est similaire à celui des neurones (Hertz & Peng, 1992) et plus récemment, que les astrocytes possédaient la machinerie enzymatique nécessaire au métabolisme oxydatif (Lovatt *et al.*, 2007). Il est donc possible que la DT entraîne une altération du métabolisme énergétique astrocytaire. Une telle baisse d'ATP dans les astrocytes pourrait expliquer la présence d'œdème ainsi que la dysfonction des transporteurs du glutamate, ces derniers étant dépendants du gradient transmembranaire de Na^+ et de K^+ (Siegel *et al.*, 1989). La dysfonction astrocytaire pourrait donc jouer un rôle majeur dans l'initiation d'un processus excitotoxique et œdémateux dans la DT. Par ailleurs, les astrocytes étant spécialement impliqués dans la défense antioxydante du cerveau et dans la régulation de la perméabilité de la BHE, leur dysfonction pourrait fort probablement contribuer au stress oxydatif et à l'altération de l'intégrité de la BHE dans la DT, ce qui sera discuté plus loin. La dysfonction astrocytaire et ses conséquences dans la DT restent à être élucidées.

I.2.4.8. Autres mécanismes

I.2.4.8.1. Accumulation de peptides amyloïdes- β

Calingasan *et al.* ont initialement rapporté une hausse d'expression de la protéine précurseur de l'amyloïde (APP) dans plusieurs structures cérébrales vulnérables à la DT (Calingasan *et al.*, 1995b). Plus récemment, on a rapporté une augmentation de l'activité de la β -secretase ainsi que du fragment de l'APP, le peptide amyloïde- β (A β) (Zhang *et al.*, 2009). Le peptide A β pourrait jouer un rôle important dans l'excitotoxicité (Mattson *et al.*, 1992), et peut induire l'apoptose (Loo *et al.*, 1993). De plus, ce peptide entraîne une augmentation de la fluidité membranaire et de la peroxydation lipidique (Avdulov *et al.*, 1997), et on a récemment démontré que l'A β_{1-40} entraînant directement une augmentation de la production d'espèces réactives dans la DT, et que l'accumulation du peptide A β était elle-même induite par le stress oxydatif (Zhang *et al.*, 2009). Le peptide A β pourrait donc contribuer à la mort neuronale dans la DT via divers mécanismes; des études futures sont donc nécessaires concernant le rôle de ce peptide dans la pathogenèse de la DT.

En conclusion, il y a plusieurs mécanismes possibles pour expliquer la pathogenèse des lésions histologiques associées à la DT et au SWK chez l'humain, et il est fort probable que ce soit une combinaison de mécanismes qui soit en cause. Le présent ouvrage se concentre toutefois principalement sur le rôle de la rupture de la BHE.

I.3. Rupture de la barrière hémato-encéphalique dans la déficience en thiamine

Beaucoup d'emphase est mise sur la mort neuronale dans la DT. Toutefois, d'importantes lésions vasculaires et une dysfonction précoce de la BHE sont aussi caractéristiques de l'encéphalopathie liée à la DT. Voici d'abord quelques concepts de base concernant la structure, la fonction et la régulation de la BHE dans le cerveau sain.

I.3.1. La barrière hémato-encéphalique

La BHE est une barrière sélective formée par les cellules endothéliales cérébrales, limitant et régulant les échanges moléculaires entre le plasma et le parenchyme cérébral. La BHE exerce un important contrôle sur la composition du microenvironnement immédiat des cellules cérébrales et veille à produire un milieu extracellulaire stable et optimal pour la

fonction neuronale (Zlokovic, 2008). Contrairement à la plupart des tissus endothéliaux, l'endothélium vasculaire cérébral (EVC) est dépourvu de fenestrations et possède des jonctions serrées très étanches conférant une résistance électrique transendothéliale de plus de 1000 ohm.cm^2 (Bazzoni & Dejana, 2004) et donc une très faible perméabilité paracellulaire limitant même le passage d'ions comme le Na^+ et le K^+ (Butt *et al.*, 1990). Seules les molécules gazeuses comme l' O_2 et le CO_2 et les petites molécules lipophiles peuvent traverser aisément l'EVC par diffusion libre (Pardridge, 2007).

En plus de la barrière paracellulaire formée par les jonctions serrées, l'EVC comporte plusieurs systèmes formant une barrière transcellulaire empêchant l'entrée de neurotoxines dans le cerveau. Cette barrière comporte d'abord un système de transporteurs hautement sélectifs permettant l'entrée dans le cerveau de nutriments comme le glucose, les acides aminés essentiels et les vitamines, et forçant la sortie de molécules comme le glutamate. Les échanges ioniques sont aussi étroitement régulés notamment par la $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPase}$, permettant ainsi de stabiliser la composition ionique du milieu extracellulaire cérébral (Zlokovic, 2008). Le degré d'endocytose/transcytose (pinocytose), permettant le transfert de larges molécules hydrophiles comme les peptides et les protéines, est de son côté beaucoup moins élevé que celui de l'endothélium périphérique (Abbott *et al.*, 2006). De plus, les P-glycoprotéines (*multidrug resistance transporters*) sont abondamment exprimées dans l'EVC, entraînant l'exclusion rapide de toxines lipophiliques naturelles et synthétiques. La BHE comporte aussi une *barrière enzymatique*, c'est-à-dire la présence dans l'EVC d'un cocktail d'enzymes comme la DOPA décarboxylase, la monoamine oxydase et la γ -glutamyl transpeptidase entraînant la dégradation de substances comme le L-DOPA, les catécholamines et les composés toxiques liés au glutathion, respectivement (Zlokovic, 2008).

Le site anatomique de la BHE est situé au niveau de l'EVC, mais d'autres composants cellulaires associés contribuent à la structure et à la fonction de la BHE. L'EVC est en effet entouré d'une lame basale et de péricytes, et ce mur vasculaire est en contact étroit avec les terminaisons astrocytaires recouvrant plus de 95% de la surface des vaisseaux sanguins (figure 4A) (Kandel *et al.*, 1991). Les vaisseaux sanguins (endothélium,

muscle lisse vasculaire, péricytes), les astrocytes et les neurones forment ainsi une unité fonctionnelle désignée sous le terme d'*unité neurovasculaire* (figure 4A). Il a été estimé qu'environ chaque neurone du cerveau possède son propre capillaire (Zlokovic, 2008). Ce *couplage neurovasculaire* est essentiel au bon fonctionnement du cerveau, permettant d'ajuster le flot sanguin cérébral à l'activité neuronale. Les astrocytes jouent un rôle central dans la coordination de ce couplage (Koehler *et al.*, 2008), possiblement via la propagation d'un signal calcique (Straub & Nelson, 2007). Plus récemment, on a suggéré que ce couplage « neurones-vaisseaux » puisse aussi jouer un rôle dans la régulation de la perméabilité de la BHE, notamment via la régulation du transporteur endothélial de glucose GLUT-1, le terme *couplage neuro-barrière* ayant été proposé pour désigner cette fonction (Leybaert, 2005). D'autres ont également proposé que ce couplage « neurones-BHE » puisse inclure la régulation des jonctions serrées; cette dernière hypothèse étant plausible puisque les astrocytes semblent jouer un rôle important dans la régulation de ces jonctions (Abbott *et al.*, 2006).

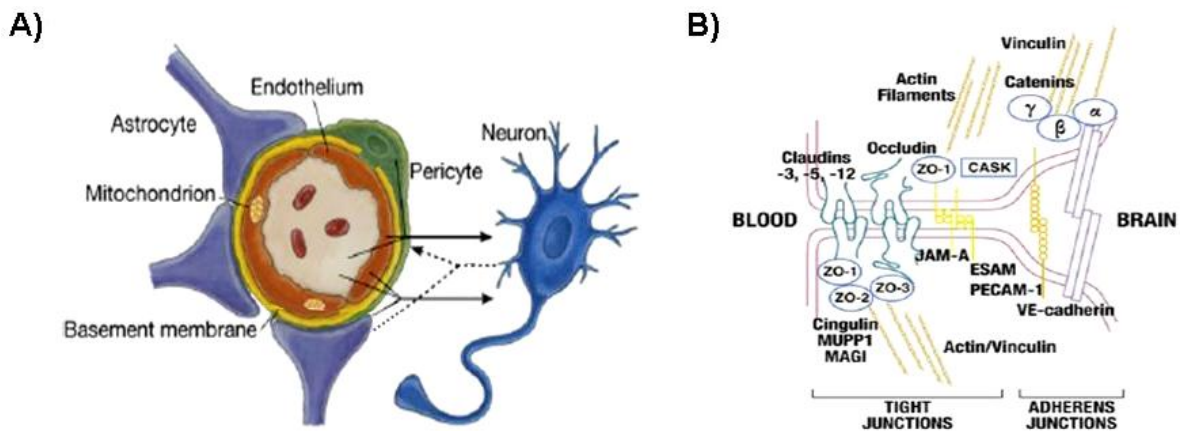


Figure 4. A) Unité neurovasculaire. B) Schéma simplifié du complexe moléculaire des jonctions serrées et adhérentes de la BHE. Adapté, avec permission, de (Zlokovic, 2008) © Elsevier

I.3.1.1. Jonctions serrées

Initialement découvertes dans l'épithélium par microscopie électronique (Farquhar & Palade, 1963), les jonctions serrées (JS) constituent un réseau de protéines complexe situé du côté basolatéral de la membrane plasmique scellant les cellules endothéliales

adjacentes ensemble. L'identification des protéines des JS est très récente et les principales sont l'occludin, les claudins et les zonula occludens (ZO, figure 4B).

1.3.1.1.1. Occludin et claudins

L'occludin est la première protéine transmembranaire des JS découverte (Furuse *et al.*, 1993). Celle-ci est abondamment exprimée dans les JS de l'EVC et y joue un rôle clé. En effet, on a démontré que la délétion de son domaine N-terminal (Bamforth *et al.*, 1999) et C-terminal (Balda *et al.*, 1996) entraînait une altération de la morphologie des JS ainsi qu'une augmentation de la perméabilité paracellulaire. L'occludin joue donc un rôle critique dans le maintien de l'assemblage des protéines des JS et dans la fonction de la barrière. Les claudins, pour leur part, sont une famille de protéines transmembranaires de plus de vingt membres dont trois (claudin-3, -5 et -12) sont localisés à la BHE. Les claudins forment les brins des JS à partir d'interactions homophiliques au niveau de leurs boucles extracellulaires, et ces molécules sont responsables de l'établissement de la forte résistance transendothéliale et la propriété de barrière de la BHE (Zlokovic, 2008).

1.3.1.1.2. Zonula occludens

Les zonula occludens-1, -2 et -3 (ZO-1, -2 et -3) sont des protéines sous-membranaires membres de la famille des MAGUKs (*membrane associated guanylate kinases*). Ces dernières sont associées aux JS et présentent de multiples interactions protéines-protéines. En effet, leur domaine PDZ lie spécifiquement le domaine C-terminal cytosolique des protéines transmembranaires occludin et claudins, tandis que leur domaine C-terminal lie le cytosquelette d'actine ainsi que les protéines liées à l'actine; les ZOs exercent donc un rôle d'échafaudage dans l'organisation structurale du complexe des JS. Bien plus, les ZOs semblent être impliquées dans la régulation des JS puisqu'elles interagissent avec des molécules de signalisation (Gonzalez-Mariscal *et al.*, 2000).

D'autres éléments tels que le cytosquelette d'actine exercent un rôle important dans l'établissement et le maintien des JS. En effet, la désorganisation du cytosquelette d'actine chez les souris déficientes pour le gène de la dystrophine (protéine de liaison de l'actine)

est associée à l'altération de la localisation sous-cellulaire des protéines jonctionnelles dans l'endothélium (Nico *et al.*, 2003). Les molécules d'adhésion telles que la famille des molécules d'adhésion jonctionnelles JAM et la molécule nouvellement découverte ESAM (*endothelial cell-selective adhesion molecule*), quant à elles, appartiennent à la superfamille des immunoglobulines et médient des interactions homophiliques et hétérophiliques dans la région des JS. On pense que ces molécules seraient impliquées dans l'organisation structurelle des JS (Zlokovic, 2008). Les jonctions adhérentes (JA), pour leur part, sont typiquement entremêlées aux JS. La protéine membranaire VE-cadherin est liée au cytosquelette via les caténines, ces dernières étant cruciales pour le fonctionnement des JA (Bazzoni & Dejana, 2004). On a proposé un rôle pour ces molécules dans l'organisation du cytosquelette d'actine via l'interaction avec des molécules de signalisation. Une autre molécule des JA, PECAM-1, semble jouer un rôle important dans la migration de leucocytes au-travers de l'EVC. Toutefois, le rôle des protéines des JA dans la fonction de la BHE est un champ d'étude relativement inexploré (Zlokovic, 2008) (figure 4B).

I.3.2. Régulation des jonctions serrées de la BHE

Le concept de barrière suggère une structure relativement fixe, toutefois il est maintenant reconnu que plusieurs caractéristiques du phénotype de la BHE sont sujettes à la modulation (Abbott, 2005), bien que la signification physiologique de l'ouverture des JS ne soit pas claire, cela étant surtout associé à la rupture de la BHE en condition pathologique. Des modèles *in vitro* de BHE ont été établis dans le but d'étudier les mécanismes régulateurs des JS, mais ceux-ci demeurent encore non complètement élucidés. Voici les principaux mécanismes ayant été postulés.

I.3.2.1. Rôle des astrocytes, de la lame basale et des péricytes

Les astrocytes sont reconnus pour exercer un rôle au niveau de la différenciation des cellules endothéliales cérébrales (CECs) et de la formation de la BHE. En effet, les CECs perdent leur propriété de barrière lorsque cultivées en l'absence d'astrocytes (Rubin *et al.*, 1991). Celles-ci présentent à l'inverse une augmentation de la complexité de leurs JS lorsque traitées avec un médium dérivé d'astrocytes, démontrant donc que les astrocytes

exercent leur action d'induction de la BHE via la sécrétion de facteurs humoraux, plutôt que via un contact physique avec l'EVC (Wolburg *et al.*, 1994). Les facteurs identifiés incluent les facteurs de croissance GDNF (*glial cell line-derived neurotrophic factor*), TGF- β (*transforming growth factor β*) et bFGF (*basic fibroblast growth factor*), ces derniers induisant des aspects du phénotype de la BHE *in vitro* (Abbott *et al.*, 2006).

La lame basale de l'EVC jouerait aussi un rôle important au niveau de la BHE. En effet, les CECs développent un réseau complexe de JS lorsque cultivées sur une matrice extracellulaire (Arthur *et al.*, 1987). La protéine agrin de la lame basale, une protéoglycane héparine sulfate liant l' α -dystroglycane, est décrite comme une protéine importante pour l'intégrité de la BHE (Barber & Lieth, 1997), et semble exercer un rôle au niveau de la différenciation et de la fonction des terminaisons astrocytaires à la BHE. De plus, le collagène-IV de la lame basale influencerait directement l'expression de l'occludin (Savettieri *et al.*, 2000).

La concentration des péricytes est particulièrement élevée dans le cerveau, et ces derniers encerclent de 30 à 70% du mur des capillaires sanguins (Allt & Lawrenson, 2001). En plus de leur fonction clé au niveau de la régulation du flot sanguin (Peppiatt *et al.*, 2006), les péricytes communiquent avec l'EVC au travers de jonctions de type *gap*, et ceux-ci relâcheraient une large quantité de facteurs de croissance et de molécules angiogéniques telles que le TGF- β et le PGDF-B (*platelet-derived growth factor-B*). L'ablation du PDGF- β , le récepteur endothélial du PGDF-B, résulte en des souris présentant des microhémorragies cérébrales (Bjarnegard *et al.*, 2004). On a démontré *in vitro* que les péricytes contribuent à la modulation de la perméabilité de la BHE (Ramsauer *et al.*, 2002; Nakagawa *et al.*, 2007).

I.3.2.2. Rôle du calcium

Le calcium est un important modulateur de la fonction de la BHE; celui-ci peut en effet maintenir l'intégrité des JS via l'activation de la protéine kinase A (PKA). Inversement, le calcium pourrait aussi altérer l'intégrité de la BHE via l'activation de kinases telles que la PKC, entraînant la phosphorylation des protéines du cytosquelette

et/ou des protéines des JS, la contraction du cytosquelette d'actine et l'ouverture des JS. Néanmoins, le mécanisme d'action par lequel le calcium exerce son rôle modulateur au niveau des JS demeure encore hypothétique pour l'instant (Brown & Davis, 2002). L'EVC possède plusieurs récepteurs causant une entrée de Ca^{2+} lorsqu'activés (Brown *et al.*, 2008), et cette signalisation calcique est considérée comme un mécanisme par lequel les cellules de l'unité neurovasculaire modulent la perméabilité de la BHE, une forme de *couplage neuro-barrière* (Paemeleire & Leybaert, 2000; Abbott *et al.*, 2006).

I.3.2.3. Phosphorylation des protéines des jonctions serrées

Le concept des protéines des JS en tant que cibles de voies de signalisation est un concept relativement nouveau, et beaucoup de travail reste à être entrepris afin d'élucider les mécanismes précis de régulation de ces protéines. Toutefois, la phosphorylation de ces protéines, notamment de l'occludin (Feldman *et al.*, 2005) et des ZO (Gonzalez-Mariscal *et al.*, 2000), semble jouer un rôle clé.

Le domaine C-terminal de l'occludin est hautement phosphorylé, et la phosphorylation des résidus sérine/thréonine de ce domaine a été associée à l'assemblage des JS et à la fortification de la BHE (Sakakibara *et al.*, 1997; Wong, 1997). À l'inverse, la déphosphorylation de ces résidus est associée à l'altération des JS et à la dysfonction de la BHE (Clarke *et al.*, 2000; Morgan *et al.*, 2007). Toutefois, l'identité des kinases et des phosphatases impliquées n'est pas encore bien connue. La PKC est la kinase la plus étudiée, et l'activation de cette dernière est associée à la déphosphorylation des résidus sérine/thréonine de l'occludin et à l'augmentation de la perméabilité des JS (Tai *et al.*, 1996; Clarke *et al.*, 2000; Andreeva *et al.*, 2006). Ces résultats indiquent une action indirecte de la PKC sur l'occludin possiblement médiée par l'activation d'une sérine/thréonine phosphatase, encore inconnue à ce jour. Toutefois, la protéine phosphatase 2A (PP2A) est clairement impliquée dans la déphosphorylation des résidus sérine/thréonine de l'occludin et le désassemblage des JS (Nunbhakdi-Craig *et al.*, 2002) et pourrait donc être impliquée dans l'action de la PKC; cela reste à être démontré. Par ailleurs, on a démontré que la PKC entraînait la rupture des JS via l'activation de la voie des Ras-MAPKs (Verin *et al.*, 2000; Wang *et al.*, 2004), une voie associée à l'altération du

cytosquelette, de l'occludin et des JS via notamment l'activation du facteur ERK (Park *et al.*, 1999; Chen *et al.*, 2000; Garcia *et al.*, 2001; Krizbai *et al.*, 2005). Toutefois, le mécanisme par lequel les MAPKs altèrent l'occludin n'est pas connu et pourrait impliquer d'autres médiateurs. Une autre kinase, la phosphatidylinositol-3-kinase (PI3K), interagit avec le domaine C-terminal de l'occludin (Nusrat *et al.*, 2000a) et a été associée à la régulation de cette dernière en condition de stress (Sheth *et al.*, 2003). Comparativement aux résidus sérine/thréonine, la phosphorylation des résidus tyrosine de l'occludin semble avoir un effet contraire et plutôt entraîner un désassemblage des JS (Staddon *et al.*, 1995; Wachtel *et al.*, 1999). Cette phosphorylation réduit l'affinité de l'occludin pour les ZO (Kale *et al.*, 2003), et on a rapporté que cette modification pouvait constituer un signal pour l'activation des métalloprotéinases matricielles, protéases impliquées dans la dégradation des composantes de la BHE (Lohmann *et al.*, 2004). Toutefois, les kinases responsables de la phosphorylation des résidus tyrosines de l'occludin sont inconnues.

De façon similaire, les ZO semblent être une cible de phosphorylation et donc importantes dans la régulation des JS. En effet, la phosphorylation des résidus tyrosine et sérine/thréonine des ZO semble contrôler leur interaction avec les autres molécules des JS, et est associée à la diminution de la résistance transendothéliale. En particulier, la ZO-2 lie différents isoformes de la PKC; toutefois le rôle de la PKC dans la régulation des ZO demeure controversé (Gonzalez-Mariscal *et al.*, 2000).

I.3.3. Intégrité de la BHE dans la déficience en thiamine

La notion d'origine vasculaire des désordres cérébraux est un concept pathologique connu depuis relativement longtemps mais s'étant développé surtout au courant de la dernière décennie, en parallèle avec la découverte des protéines des JS (Zlokovic, 2008).

I.3.3.1. Importance des changements vasculaires dans le syndrome de Wernicke-Korsakoff humain et expérimental

En ce qui a trait au SWK, le point de l'importance des changements vasculaires a été intensément débattu, et quelques questions demeurent encore à ce jour. Les principaux

auteurs de ce débat et leurs arguments sont présentés dans le tableau II suivant, démontrant l'évolution de ce concept au courant du dernier siècle.

Tableau II. Évolution de la vision sur l'importance des anomalies cérébrovasculaires dans la pathogenèse du SWK humain (H) et expérimental (E)

Auteur(s)	H/E	Observations/Commentaires
Alexander, 1940	E (pigeon)	Anomalités vasculaires proéminentes et hémorragies sont pointées comme premiers changements de l'encéphalopathie; Postule une propriété <i>anti-angiodégénérative</i> pour la vitamine B ₁
Scholz, 1949	H	Propose que la rupture de la BHE soit la cause du SWK
Pentschew & Garro, 1966; Pentschew, 1970	H	Définissent le SWK en tant que désordre métabolique chronique affectant premièrement la BHE (pathologie <i>dysorique</i>)
Victor, 1971, 1989	H	Propose que les changements vasculaires soient de nature secondaire; Les hémorragies infrequentes ne sont pas considérées comme un changement pathologique fondamental; Dénote l'absence d'évidences d'une rupture de la BHE
Robertson & Manz, 1971, 1972	E (rat)	(Edème astrocytaire cytotoxique précède l'œdème vasogénique et l'augmentation de la perméabilité de la BHE; Rupture de la BHE considérée secondaire (réaction) aux changements du parenchyme
Watanabe <i>et al.</i> , 1981a,b	E (souris)	Lésions de nature œdémateuses et hémorragiques
Troncoso <i>et al.</i> , 1981	E (rat)	Lésions hémorragiques extensives, changements vasculaires et œdème vasogénique en phase précoce de l'encéphalopathie
Harper, 1983	H	Pathologie aigue caractérisée par des changements vasculaires
Schroth <i>et al.</i> , 1991	H	Rupture sélective de la BHE démontrée par IRM
Okeda <i>et al.</i> , 1995; Chen <i>et al.</i> , 1997	H E (rat)	Certains changements vasculaires sont typiquement de nature primaire (<i>dysoriques</i>) et donc des changements pathologiques essentiels; Proposent un dommage métabolique endothélial initial
Harata & Iwasaki, 1995; Calingasan <i>et al.</i> , 1995	E (souris) E (rat)	Démontrent une rupture précoce et sélective de la BHE, précédant les symptômes neurologiques et les lésions histologiques

IRM : Imagerie par résonance magnétique

Alexander, un des premiers auteurs à décrire la nature des lésions neuropathologiques induites par la DT, nota la présence d'hémorragies et de lésions vasculaires proéminentes. Selon lui, « l'angio-dégénérescence et la déformation du lit

vasculaire est le premier changement du SWK », ce qui l'amena à postuler que la vitamine B₁ possédait une propriété *anti-angiodégénérative* (Alexander, 1940). Cela poussa par la suite d'autres auteurs comme Scholz à proposer une dysfonction potentielle de la BHE, ce dernier ayant noté une infiltration de plasma dans le parenchyme cérébral de patients SWK (Scholz, 1949). Vingt ans plus tard, Pentschew déclara que le SWK constituait « le protagoniste d'un nouveau groupe de désordres cérébraux », soit les désordres à caractère *dysorique*, qu'il décrivit en tant que « nouveau principe pathologique ». Selon lui, la défaillance énergétique chronique interférerait avec la perméabilité de l'EVC de façon hautement sélective, causant des changements vasculaires *dysoriques* caractérisés par la dilatation des capillaires, dans les cas moins sévères, en combinaison avec l'œdème endothélial, les transsudations séreuses, l'hémorragie, la prolifération gliale et la formation de cavités, dans les cas plus sévères. Les neurones, quant à eux, seraient morphologiquement intacts à ce stade initial du processus pathologique. Toutefois, Pentschew ne put expliquer pourquoi les CECs seraient plus vulnérables que les neurones à ce type d'insulte métabolique (Pentschew & Garro, 1966; Pentschew, 1970).

L'idée que l'EVC puisse représenter le premier site de dommage pathologique dans le SWK fut contestée par d'autres auteurs de la même période. L'étude des changements morphologiques ultrastructurels chez des rats déficients en thiamine au moyen de la microscopie électronique (ME) par Robertson et Manz démontra la présence d'un œdème cytotoxique astrocytaire en phase précoce de l'encéphalopathie, précédant l'œdème vasogénique et l'augmentation de la perméabilité de la BHE à l'albumine. Ces derniers en conclurent que la dysfonction de la BHE était un phénomène secondaire au dommage initial du parenchyme cérébral, constituant une réaction aux dommages nécrotiques initiaux du parenchyme, bien que ces derniers n'aient pas étudié la relation temporelle entre ces deux paramètres (Robertson & Manz, 1971). Victor, dans la première édition de son fameux ouvrage sur le SWK, exprima un point de vue similaire en affirmant que « les changements vasculaires sont considérés secondaires aux changements du tissu et non primaires de nature ». Ce dernier ajouta que « les hémorragies sont infrequentes [environ 10% des cas] et ne sont donc pas un changement pathologique fondamental ». De plus, ce dernier souligna l'absence d'évidence pour une rupture de la BHE dans le SWK (Victor *et*

al., 1971), une évidence qui ne fut amenée que plus tard par Schroth, qui démontra une rupture sélective de la BHE dans les régions périventriculaires et périaqueductales de patients SWK au moyen de l'IRM (Schroth *et al.*, 1991). Il est important de noter que la majorité des cas étudiés par Victor présentait une pathologie chronique non caractérisée principalement par des lésions vasculaires; par contre cette pathologie est néanmoins caractérisée par la présence de macrophages hémosidéreux, indiquant la présence d'hémorragies précoces (Harper, 1983; Victor *et al.*, 1989).

Le modèle de DT induite par la pyrithiamine (PT), développé au tournant des années 1980s, s'est avéré reproduire fidèlement les changements pathologiques du SWK aigu chez la souris (Watanabe, 1978; Watanabe *et al.*, 1981b) et le rat (Troncoso *et al.*, 1981), une pathologie caractérisée par des « changements vasculaires et périvasculaires » et par l'absence relative de nécrose du parenchyme à ce stade de l'encéphalopathie. Les changements vasculaires incluent l'œdème vasogénique, l'hypertrophie endothéliale et l'extravasation d'érythrocytes dans l'espace périvasculaire s'étendant parfois dans le parenchyme pour former des microhémorragies en forme de « balle » (figure 5A) (Harper, 1983).

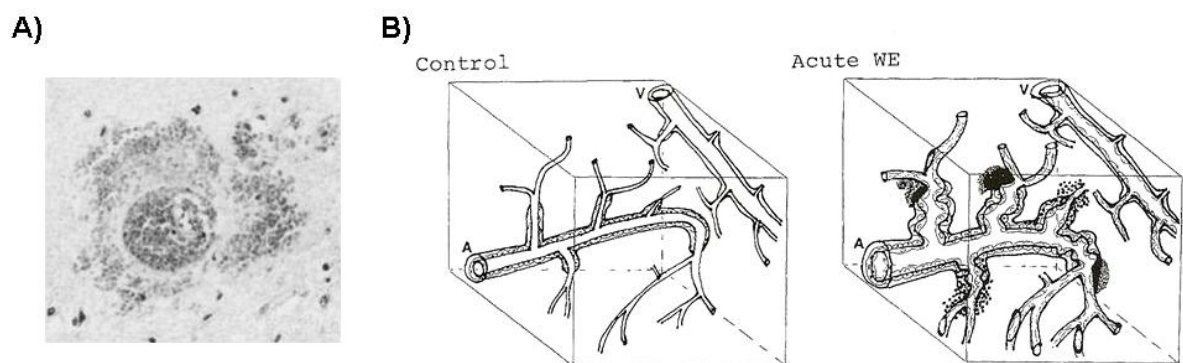


Figure 5. A) Microhémorragie typique du SWK aigu. Avec permission, de (Harper, 1983) © BMJ Publishing Group Ltd. **B) Modélisation 3D des changements vasculaires lors du SWK aigu.** Adapté, avec permission, de (Okeda *et al.*, 1995) © Springer

Okeda et collègues poussèrent plus loin la caractérisation des changements vasculaires par la reconstruction en trois dimensions de 200 sections en série provenant de

cerveaux de patients atteints du SWK aigu, permettant la modélisation des changements observés (Okeda *et al.*, 1995) (figure 5B). Les changements consistent principalement en:

- 1) L'hypertrophie endothéliale et la vasodilatation de presque tous les vaisseaux, cette dernière étant particulièrement sévère dans les artéioles et les petites artères, qui démontrent une ondulation;
- 2) Dégénérescence de la lame basale (zones noires de la figure 5B);
- 3) Hémorragies au niveau des capillaires et des artéioles spécifiquement du côté artériel (points sur la figure 5B)

Le même groupe observa aussi le même type de changements vasculaires chez des rats déficients en thiamine (Chen *et al.*, 1997). Selon ces derniers, de tels changements vasculaires, spécialement une distribution des lésions hémorragiques du côté artériel, correspondent à des changements *dysoriques* qui ne peuvent être attribués à une réaction aux changements du parenchyme, contrairement à ce qui a été énoncé précédemment par Victor. Ces changements sont donc considérés par ceux-ci en tant que lésion pathologique essentielle au SWK, au même titre que les lésions du parenchyme. Selon eux, le dommage vasculaire résulterait directement d'une dysfonction métabolique induite par la DT, possiblement endothéliale, ce qui expliquerait les changements dysoriques, hypothèse similaire à celle proposée par Pentschew trente ans plus tôt (Pentschew & Garro, 1966).

L'évidence définitive de lésions vasculaires précoces dans la pathogenèse de la DT fut amenée par Harata & Iwasaki en 1995, qui analysèrent la relation temporelle et spatiale entre les lésions vasculaires et les lésions du parenchyme chez la souris. Ces derniers démontrèrent une augmentation significative de la perméabilité de la BHE pour l'albumine chez tous les animaux au stade présymptomatique de l'encéphalopathie, et ce précédant l'apparition de lésions histologiques dans le parenchyme. Bien plus, la perméabilité à l'albumine fut corrélée de façon très serrée avec la perte subséquente du tissu, suggérant un rôle critique de la rupture de la BHE dans l'initiation du dommage nécrotique dans la DT (Harata & Iwasaki, 1995). On obtint des résultats semblables chez le rat, où l'on démontra

une extravasation précoce d'immunoglobulines G dans les régions vulnérables à la DT, précédant l'apparition des hémorragies et de la mort neuronale (Calingasan *et al.*, 1995a).

Aujourd'hui, le SWK humain et expérimental est maintenant considéré en tant que désordre *vaso-gliol* primaire culminant éventuellement en la perte des neurones et/ou du neuropile. Cela suggère que la rupture de la BHE puisse induire les changements du parenchyme. La dysfonction de la BHE peut en effet entraîner l'entrée dans le cerveau de substances plasmatiques neurotoxiques dont les catécholamines, le glutamate, le calcium, l'albumine et les IgGs, ces derniers étant retrouvés dans le neuropile et le corps des neurones des régions destinées à la mort neuronale (Calingasan *et al.*, 1995a). Bien plus, la dysfonction de la BHE peut aussi réduire le transport de nutriments et l'excrétion de déchets métaboliques; le transport de la thiamine elle-même pourrait être compromis, entraînant une exacerbation de la dysfonction métabolique cérébrale, tel que proposé dans le passé (Sharma & Quastel, 1965; Greenwood *et al.*, 1982). La relation causale entre la rupture de la BHE et la neurodégénérescence dans la DT reste à être démontrée; néanmoins il est clair que l'EVC semble particulièrement vulnérable à ce type d'insulte métabolique.

I.3.3.2. Intégrité des jonctions serrées de la BHE dans la déficience en thiamine

Une question majeure demeure non répondue par rapport à l'intégrité de la BHE dans la DT. En effet, bien que les études précédentes aient clairement démontré une dysfonction de la BHE indiquée par l'extravasation d'albumine, d'IgGs et même d'érythrocytes dans le cerveau déficient en thiamine, la question de l'intégrité structurelle des JS demeure encore ambiguë, puisque les études ultrastructurelles de ME s'étant penchées sur cette question n'ont pas pu démontrer un défaut d'intégrité de ces dernières (Manz & Robertson, 1972; Watanabe *et al.*, 1981a; Calingasan *et al.*, 1995a). Ces études ayant démontré une augmentation de la présence de profils vésiculaires dans l'EVC, la pinocytose fut proposée en tant que mécanisme responsable des fuites d'albumine et d'IgGs dans le cerveau déficient en thiamine (Calingasan *et al.*, 1995a). Toutefois, cette hypothèse n'explique pas l'extravasation des érythrocytes et les hémorragies. Une analyse de plus près de l'intégrité des JS et des protéines des JS est donc nécessaire dans le but d'élucider les mécanismes responsables de ces fuites dans le cerveau déficient en thiamine.

I.4. Mécanismes possibles de rupture de la BHE dans la déficience en thiamine

Bien que la vulnérabilité accrue de la BHE à l'insulte métabolique causée par la DT soit maintenant reconnue, les mécanismes biochimiques et moléculaires à la base de cette vulnérabilité demeurent relativement inconnus à ce jour. Voici quelques possibilités, dont certaines faisant l'objet de la présente thèse.

I.4.1. Défaillance énergétique

I.4.1.1. Défaillance énergétique neuronale et fluctuations hémodynamiques

La vulnérabilité particulière des CECs à la dysfonction métabolique induite par la DT peut sembler paradoxale, les neurones étant généralement considérés comme les cellules les plus vulnérables du cerveau à toute forme d'insulte métabolique, étant donné leur grande demande énergétique (Siegel *et al.*, 1989). Pourtant, dans la DT, le neurone semble plus résistant que l'EVC et les astrocytes à l'insulte métabolique chronique. Toutefois, l'absence de changements morphologiques au niveau des neurones en phase précoce de l'encéphalopathie ne signifie pas nécessairement l'absence d'altérations fonctionnelles. Tel que discuté plus tôt, la fonction vasculaire est intimement liée à la fonction neuronale; une dysfonction métabolique neuronale induite par la DT pourrait donc fort probablement contribuer à la dysfonction vasculaire via entre autres des fluctuations hémodynamiques chroniques entraînant des changements dysoriques du côté artériel (Chen *et al.*, 1997). On observe d'ailleurs une période précoce d'hyperperfusion dans les régions vulnérables de rats déficients en thiamine (Hakim, 1986), en accord avec la vasodilatation (Chen *et al.*, 1997). Cette vasodilatation pourrait être expliquée par l'induction précoce de eNOS, ce dernier étant impliqué dans le couplage neurovasculaire (Toda *et al.*, 2009).

I.4.1.2. Défaillance énergétique endothéliale

Les mécanismes présentés précédemment sont basés sur la présence d'un dommage métabolique neuronal. Toutefois, l'EVC pourrait également être un site d'insulte

métabolique dans la DT, entraînant des dommages vasculaires directs non nécessairement causés par une influence neuronale ou astrocytaire. Bien que cette dernière hypothèse soit controversée (Ham & Karska-Wysocki, 2005), Romero *et al.* ont démontré que le traitement de CECs avec la pyrithiamine menait à une accumulation de lactate, suggérant un effet direct de la DT sur le métabolisme énergétique endothélial. Bien plus, cette perturbation métabolique coïncide avec une hausse de perméabilité de la BHE, ce qui suggère un lien entre la dysfonction métabolique endothéliale et la rupture de la BHE dans la DT (Romero *et al.*, 1997). Une telle défaillance énergétique dans l'EVC pourrait évidemment entraîner une dysfonction des mécanismes de transport actif ainsi qu'une perte d'activité de la $\text{Na}^+ - \text{K}^+ - \text{ATPase}$ entraînant un déséquilibre ionique, ce qui pourrait expliquer l'hypertrophie (œdème) endothéliale observée chez les rats déficients en thiamine (Chen *et al.*, 1997). Du côté des JS, une déplétion en ATP a été associée à l'altération des ZO (Tsukamoto & Nigan, 1997) et de l'occludin (Gopalakrishnan *et al.*, 1998), bien que les mécanismes responsables de ces altérations ne soient pas clairs.

I.4.2. Excitotoxicité endothéliale

L'excitotoxicité neuronale a été bien décrite dans la DT; toutefois les CECs possédant elles aussi des récepteurs de glutamate (Krizbai *et al.*, 1998), suggérant également une toxicité possible du glutamate dans l'EVC. L'hyperactivité des récepteurs endothéliaux de glutamate entraîne l'accumulation de Ca^{2+} dans le cytosol (Krizbai *et al.*, 1998) altérant la BHE selon des mécanismes décrits précédemment. L'élévation des niveaux de Ca^{2+} dans l'EVC a d'ailleurs été corrélée avec la diminution de la résistance transendothéliale (Easton & Abbott, 2002). On a démontré que la rupture de la BHE pouvait représenter une conséquence directe de l'excitotoxicité (Chen *et al.*, 1999). Le rôle du glutamate dans la dysfonction endothéliale dans la DT reste toutefois à être démontré.

I.4.3. Dysfonction astrocytaire

Puisque l'œdème cytotoxique astrocytaire a été démontré comme étant le premier changement morphologique associé à la DT (Collins, 1967) et que les astrocytes sont impliqués dans la fonction de la BHE (Abbott *et al.*, 2006), il est possible que ce soit une

dysfonction astrocytaire initiale qui soit responsable de la dysfonction de la BHE (Harata & Iwasaki, 1996). Toutefois, la relation temporelle entre les lésions astrocytaires et endothéliales n'est pas encore pas tout-à-fait claire dans la DT, cette question demeurant controversée (Langlais *et al.*, 1997; Gibson *et al.*, 1997). De plus, l'étude de Romero *et al.* suggère une action directe de la DT sur l'EVC, indépendante de l'influence astrocytaire (Romero *et al.*, 1997). Des études futures sont nécessaires afin de clarifier le rôle des astrocytes dans l'induction du dommage à la BHE dans la DT.

I.4.4. Stress oxydatif/nitrosatif

Depuis que Chan *et al.* démontrèrent initialement que la génération d'espèces réactives oxygénées entraînait l'œdème vasogénique et l'extravasation de bleu Evans (colorant lié à l'albumine) dans le cerveau (Chan *et al.*, 1984), une multitude d'études se sont penchées sur le sujet et l'on reconnaît maintenant que le stress oxydatif/nitrosatif est un médiateur important de dommage à la BHE en condition pathologique (Heo *et al.*, 2005; Pun *et al.*, 2009). Voici d'abord quelques notions de base sur le stress oxydatif/nitrosatif, le principal mécanisme de dommage à la BHE proposé dans cette thèse.

I.4.4.1. Généralités

Le stress oxydatif est défini comme un déséquilibre entre la production de radicaux libres (ou espèces réactives) et la défense antioxydante de l'organisme. Les radicaux libres peuvent être classifiés en deux catégories, soit les espèces réactives oxygénées (ROS) ou nitrées (RNS).

I.4.4.1.1. Source et rôle des espèces réactives en physiologie

I.4.4.1.1.1. Espèces réactives oxygénées

Dans le cerveau sain, les ROS ne sont produits qu'en faible quantité et constituent les sous-produits de divers processus physiologiques tels que la respiration mitochondriale, l'activité de l'enzyme de synthèse de l'oxyde nitrique (NOS), de la monoamine oxydase et de la NADPH oxydase (Nox) (Siegel *et al.*, 1989). Ces ROS n'altèrent pas le statut redox

de la cellule (Droge, 2002) et semblent impliqués dans de multiples voies de signalisation cellulaire (Brown & Griendling, 2009).

I.4.4.1.1.2. Oxyde nitrique et oxyde nitrique synthase

L'oxyde nitrique (NO ou NO) possède plusieurs fonctions importantes dans le cerveau; ce dernier est un second messenger exerçant principalement son action via la production de GMPc. Le NO est synthétisé par l'enzyme NOS via l'oxydation de l'arginine et du nicotinamide adénine dinucléotide phosphate réduit (NADPH) (Siegel *et al.*, 1989). Il existe trois principaux isoformes de NOS dans le cerveau, soit NOS neuronal (nNOS, NOS 1), inductible (iNOS, NOS 2) et endothélial (eNOS, NOS 3) (Guix *et al.*, 2005). L'enzyme nNOS est retrouvée principalement dans les neurones et est exprimée de façon constitutive. Celle-ci, tout comme eNOS, est dépendante du Ca²⁺-CaMK pour son activation, et génère de faibles quantités de NO ne durant que quelques minutes. Le NO de nNOS agit en tant que neuromodulateur. L'enzyme eNOS, pour sa part, est exprimée principalement dans l'endothélium, le NO y exerçant un rôle vasodilatateur. Au niveau sous-cellulaire, eNOS est localisée dans le caveolæ, et sa liaison avec la protéine caveolin-1 inhibe son activité en prévenant la liaison de la Ca²⁺-CaMK (Garcia-Cardena *et al.*, 1997). L'activation de eNOS est dépendante de la phosphorylation par la PI3K, ce qui entraîne la dissociation de caveolin-1 et permet l'accès de la CaMK. L'expression génique de eNOS est aussi régulée par la PI3K, entraînant ultimement l'activation du facteur de transcription Sp1. L'enzyme iNOS, quant à elle, est exprimée dans les macrophages, les astrocytes et la microglie, et diffère des autres isoformes de NOS en ce qu'elle est Ca²⁺-indépendante; sa régulation dépend plutôt de la synthèse *de novo*, celle-ci étant induite par un stimulus immunologique ou pro-inflammatoire. De plus, iNOS produit de larges quantités de NO durant plusieurs heures ou jours; ce NO joue un rôle dans l'immunité en tant qu'agent antimicrobien et en entraînant l'adhésion des leucocytes dans les vaisseaux (Guix *et al.*, 2005).

Les espèces réactives jouent donc plusieurs rôles importants dans le cerveau sain. Toutefois, il est maintenant reconnu qu'en condition pathologique, la production de ROS et de RNS est souvent excessive, et ces derniers deviennent alors des agents neurotoxiques.

1.4.4.1.2. Défense antioxydante cérébrale

Le cerveau est spécialement vulnérable au stress oxydatif et ce dernier est donc équipé d'un important système de défense contre les espèces réactives (Siegel *et al.*, 1989). Ce système comprend une composante enzymatique et non enzymatique.

L'expression des enzymes antioxydantes cérébrales est gouvernée par le facteur de transcription Nrf2 qui contrôle l'activation de l'élément de réponse antioxydante (ARE) (van Muiswinkel & Kuiperij, 2005). La voie Nrf2-ARE est principalement active dans les astrocytes, ce type cellulaire jouant ainsi un rôle critique dans la défense antioxydante cérébrale (Tanaka *et al.*, 1999; Vargas & Johnson, 2009). Les principales enzymes antioxydantes actives dans le cerveau sont la superoxyde dismutase (SOD), les enzymes du glutathion et l'hème oxygénase (HO). La SOD constitue la première ligne de défense du cerveau contre les espèces réactives oxygénées puisque celle-ci catalyse la dismutation de l'espèce réactive oxygénée superoxyde en oxygène et en peroxyde d'hydrogène (H_2O_2 , voir figure 6). Les enzymes du glutathion sont de leur côté absolument essentielles pour la détoxification du H_2O_2 généré par la SOD. La glutathion peroxydase (GPx) catalyse ainsi la réduction du H_2O_2 en eau à l'aide de son co-facteur, le glutathion réduit (GSH). La GPx est aussi présente dans les membranes cellulaires et y catalyse la détoxification des produits de la peroxydation lipidique. La glutathion réductase (GR), pour sa part, sert à maintenir l'activité de la GPx via la réduction du glutathion disulfide oxydé (GSSG) en GSH. L'activité des enzymes du glutathion est cruciale pour empêcher l'interaction du H_2O_2 avec le fer et la formation du dangereux radical hydroxyle (voir figure 6) (Siegel *et al.*, 1989). D'un autre côté, l'enzyme HO catalyse la dégradation de l'hème, un agent pro-oxydant, pour former notamment la biliverdine qui sera convertie en bilirubine, un puissant antioxydant (Vargas & Johnson, 2009). L'enzyme HO comprend un isoforme constitutif (HO-2) ainsi qu'un isoforme inductible, HO-1, fortement exprimé dans la glie. L'expression de HO-1 est induite par l'hème et par différents stimuli oxydatifs et inflammatoires et est fréquemment utilisée en tant que marqueur de stress oxydatif cérébral.

Du côté de la défense antioxydante non-enzymatique, le GSH est un composant central : En plus de son rôle de co-facteur de la GPx, celui-ci est aussi un capteur direct très

efficace du radical hydroxyle (Bains & Shaw, 1997) et du NO (Rauhala *et al.*, 1998). Le GSH (γ -l-glutamyl-l-cysteinylglycine) est un tripeptide composé de glutamate, de cystéine et de glycine, synthétisé principalement dans les astrocytes par la glutamate cystéine ligase et la glutathion synthase (Vargas & Johnson, 2009). Par ailleurs, le *N*-Acétylcystéine (NAC), un donneur de cystéine, pénètre facilement au travers de la BHE et est un agent neuroprotecteur efficace dans la restauration du contenu cérébral en GSH et la suppression du stress oxydatif dans une variété de désordres cérébraux expérimentaux (Cuzzocrea *et al.*, 2000; Fu *et al.*, 2006; Aoyama *et al.*, 2008; Xiong *et al.*, 1999; Lu *et al.*, 2009). Le cerveau peut aussi synthétiser d'autres antioxydants comme la ferritine, une protéine de stockage du fer dont l'expression est induite lors du stress oxydatif (Connor & Benkovic, 1992). Le cerveau dépend aussi d'une panoplie de composés antioxydants qu'il ne peut synthétiser lui-même et qui doivent provenir de la diète; cette catégorie comprend notamment les vitamines C et E, le sélénium et les bioflavanoïdes (Halliwell & Gutteridge, 1989).

1.4.4.1.3. Dommages oxydatifs/nitrosatifs en condition pathologique

Une production excessive d'espèces réactives entraînera inévitablement des dommages aux lipides, à l'ADN et aux protéines de la cellule. La figure 6 suivante résume l'interaction entre les principales ROS et RNS ainsi que leur rôle respectif dans le dommage oxydatif (médié par les ROS) et nitrosatif (médié par les RNS), que l'on regroupe communément sous le terme de dommages oxydatifs/nitrosatifs.

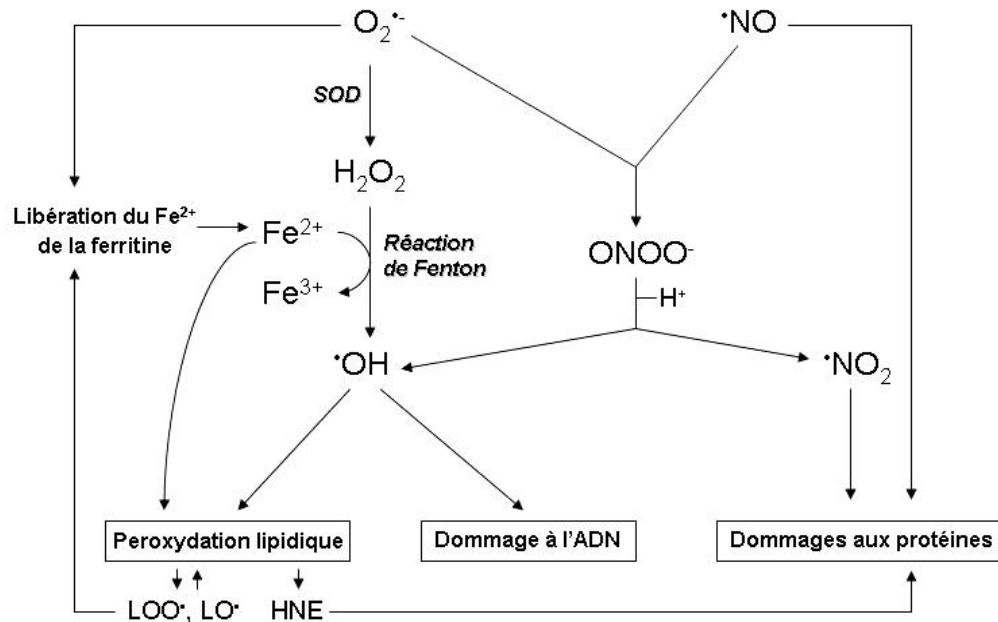


Figure 6. Interaction entre les principales espèces réactives oxygénées et nitrées lors du dommage oxydatif/nitrosatif. ($O_2^{\cdot-}$, superoxyde; $\cdot NO$, oxyde nitrique; SOD, superoxyde dismutase; H_2O_2 , peroxyde d'hydrogène; $\cdot OH$, radical hydroxyle; $ONOO^-$, peroxynitrite; $\cdot NO_2$, radical nitro; LOO^{\cdot} , hydroperoxyde lipidique; LO^{\cdot} , alcooxyde lipidique; HNE, 4-hydroxy-2-nonenal; Fe^{2+} , fer ferreux; Fe^{3+} , fer ferrique)

Les dommages directs médiés par le superoxyde et le H_2O_2 sont plus restreints, leur toxicité étant surtout liée à leur interaction avec le NO et le Fe^{2+} et à la formation du peroxynitrite et du radical hydroxyle, respectivement (Halliwell, 1992). De même, la toxicité du NO est en soi limitée, celle-ci étant surtout due à sa très forte affinité pour les ROS et la génération de peroxynitrite (Guix *et al.*, 2005). Le radical hydroxyle est très instable et celui-ci réagit fortement et de façon non spécifique avec la plupart des constituants cellulaires notamment les lipides et l'ADN (Halliwell, 1992). Le peroxynitrite, de son côté, est aussi très instable et est rapidement protoné en sa forme acide, l'acide peroxynitrique ($ONOOH$), puis scindé en deux espèces réactives, soit le radical hydroxyle et nitro ($\cdot NO_2$) (Beckman & Koppenol, 1996). Le peroxynitrite est très neurotoxique puisqu'il est responsable à la fois de l'initiation d'un stress oxydatif (via le $\cdot OH$) et nitrosatif (via le $\cdot NO_2$), ce dernier étant spécialement dommageable pour les protéines (Guix *et al.*, 2005).

I.4.4.1.3.1. Peroxydation lipidique et oxydation de l'ADN

Le cerveau est riche en acides gras polyinsaturés (AGPIs), ces derniers étant très vulnérables à l'oxydation. La peroxydation lipidique, initiée par le $\cdot\text{OH}$, consiste en l'oxydation et/ou la fragmentation des AGPIs, ce qui a pour conséquence de diminuer la fluidité des membranes cellulaires et d'altérer leur fonction ce qui peut mener, entre autres, à une hausse d'entrée de Ca^{2+} dans la cellule et à la nécrose. Ce processus entraîne la génération de radicaux hydroperoxyles ($\text{LOO}\cdot$) et alcooxyles ($\text{LO}\cdot$) lipidiques, pouvant à leur tour initier la peroxydation lipidique, et de fragments lipidiques tels que l'aldéhyde 4-hydroxy-2-nonenal (HNE), ce dernier pouvant réagir directement avec les protéines et ainsi entraîner une dénaturation et une dysfonction des protéines membranaires.

Le radical hydroxyle réagit aussi fortement avec l'ADN, entraînant l'oxydation des bases azotées et un défaut de pairage de ces dernières lors de la réplication, ce qui mènera ultimement à des défauts de séquence protéique (Siegel *et al.*, 1989).

I.4.4.1.3.2. Nitration et nitrosylation des protéines

Le stress nitrosatif est dommageable pour les protéines puisque celui-ci entraîne leur nitration et/ou leur nitrosylation. La nitration protéique consiste en l'addition d'un groupe nitro ($-\text{NO}_2$) principalement sur les tyrosines, formant des résidus 3-nitrotyrosines (n-tyr). Cette nitration entraîne des changements de conformation et empêche la phosphorylation de la protéine cible, menant à une perte de fonction. Le processus de nitration semble être spécifique à un certain groupe de protéines, soit les métalloprotéines. Parmi celles-ci on retrouve notamment la cytochrome *c* oxydase et la manganèse superoxyde dismutase (Gow *et al.*, 2004), et on a démontré que l'inactivation de ces dernières par le peroxynitrite entraînait la libération de Ca^{2+} , l'augmentation de perméabilité de la membrane mitochondriale, la relâche du cytochrome *c* et l'œdème mitochondrial (Brown, 1999). La nitration protéique joue donc un rôle important dans le processus pathologique et est associée à plusieurs désordres neurodégénératifs (Guix *et al.*, 2005).

La nitrosylation, ou *S*-nitrosylation protéique consiste en l'addition de NO sur des résidus cystéines, produisant un dérivé *S*-nitroso (SNO). La *S*-nitrosylation survient le plus fréquemment via l'intermédiaire d'oxydes d'azote plus élevés comme le groupe nitro (NO₂). Toutefois, celle-ci peut aussi survenir directement à partir du NO lorsque catalysée par un centre métallique ou via l'interaction du NO avec un groupe thiol réduit (RSH) et la formation de l'intermédiaire RSNOH. La *S*-nitrosylation est réversible et celle-ci a surtout été décrite pour son rôle physiologique dans la modulation de plusieurs enzymes, protéines G et kinases, entraînant une perte ou un gain de fonction, selon la protéine cible (Gow *et al.*, 2004). Ainsi, le NO peut inactiver le récepteur NMDA (Lipton *et al.*, 1996) et au contraire activer la guanylate cyclase (Ignarro, 1991). Le rôle de la *S*-nitrosylation en pathologie est moins bien défini mais est actuellement émergent (Nakamura & Lipton, 2008). En effet, la *S*-nitrosylation de protéines telles que glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (Hara *et al.*, 2005), parkin (Chung *et al.*, 2004) et protéine disulfide isomérase (Uehara *et al.*, 2006) a été associée à la neurodégénérescence.

I.4.4.1.3.3. Perturbation de la signalisation cellulaire

En plus d'altérer directement l'intégrité des macromolécules, un excès de ROS et de NO dans le cerveau peut entraîner la perturbation de la signalisation cellulaire et l'activation de voies pro-apoptotiques et pro-inflammatoires telles que la voie des MAPKs et la voie NFκB, respectivement, pour ne nommer que celles-ci. Ces mécanismes seront discutés plus loin dans le présent ouvrage.

I.4.4.2. Stress oxydatif/nitrosatif dans la déficience en thiamine

La présence d'un stress oxydatif/nitrosatif dans le cerveau déficient en thiamine a été clairement démontrée. Langlais et collègues rapportèrent initialement une hausse du niveau de ROS dans le thalamus de rats déficients en thiamine (Langlais *et al.*, 1997), puis l'on démontra une induction de l'expression de HO-1 ainsi que la présence de résidus HNE dans les neurones, indiquant un processus actif de peroxydation lipidique (Calingasan *et al.*, 1999). De plus, une hausse du niveau de résidus n-tyr a été notée dans le thalamus d'animaux déficients en thiamine, indiquant la formation de peroxy-nitrite et la présence

d'un dommage nitrosatif. Consistant avec un stress nitrosatif, une hausse d'immunoréactivité à iNOS et eNOS a été observée dans la microglie et l'EVC, respectivement, suggérant une augmentation de la production de NO dans les régions vulnérables à la DT (Calingasan *et al.*, 1998). D'autre part, le traitement *in vitro* de neurones déficients en thiamine avec la vitamine E est neuroprotecteur, suggérant une contribution de la peroxydation lipidique au processus de mort neuronale (Pannunzio *et al.*, 2000). *In vivo*, l'administration des antioxydants NAC (Hazell & Wang, 2005) et L-deprenyl (Todd & Butterworth, 1998) s'est avérée neuroprotectrice, confirmant le rôle du stress oxydatif dans la pathogenèse de la mort neuronale dans la DT, bien que les mécanismes précis n'aient pas encore été élucidés.

1.4.4.2.1. Rôle de eNOS et importance du stress oxydatif/nitrosatif cérébrovasculaire

Bien qu'une hausse d'expression de iNOS et de eNOS ait été démontrée par immunohistochimie dans la DT, une analyse biomoléculaire plus approfondie de l'expression des isoformes de NOS dans les régions vulnérables à la DT révéla que seule l'expression de eNOS était significativement à la hausse, et ce de façon précoce (Kruse *et al.*, 2004). D'autre part, on observa une hausse d'immunoréactivité de l'enzyme NADPH diaphorase (marqueur de l'activité de NOS) localisée spécifiquement dans les vaisseaux, indiquant une origine endothéliale pour la génération de NO dans la DT (Calingasan *et al.*, 1998). Bien plus, l'utilisation de souris transgéniques permit de démontrer que la délétion du gène de eNOS est neuroprotectrice dans la DT, alors que la délétion du gène de iNOS et de nNOS ne l'est pas, excluant donc un rôle important pour ces deux derniers isoformes de NOS dans la pathogenèse de la mort neuronale dans la DT, et démontrant la neurotoxicité du NO dérivé de eNOS (Calingasan *et al.*, 1999; Calingasan *et al.*, 2000).

Ces résultats pointent vers l'EVC en tant que source majeure de stress oxydatif/nitrosatif dans la DT (Calingasan & Gibson, 2000). L'importance du stress oxydatif/nitrosatif cérébrovasculaire est en plus indiquée par la localisation spécifiquement vasculaire et périvasculaire de l'accumulation de fer et de ferritine dans les régions vulnérables à la DT (Calingasan *et al.*, 1998). On rapporta de plus une induction de l'expression de HO-1 dans l'EVC (Calingasan & Gibson, 2000). La présence d'un stress

oxydatif/nitrosatif cérébrovasculaire dans la DT suggère un lien direct avec la dysfonction de la BHE; cette hypothèse n'a toutefois jamais été évaluée à ce jour.

I.4.4.3. Effets des espèces réactives sur l'intégrité de la BHE

Bien qu'il soit clair que la production inappropriée d'espèces réactives contribue au dommage à la BHE en condition pathologique, les mécanismes à la base de ce dommage demeurent encore non complètement élucidés. Voici les principaux mécanismes proposés.

I.4.4.3.1. Effets directs des espèces réactives sur l'intégrité de la BHE

I.4.4.3.1.1. Dommages oxydatifs/nitrosatifs

La peroxydation lipidique, via le produit 4-HNE, entraîne une augmentation de la perméabilité de la BHE *in vitro* (Mertsch *et al.*, 2001). Toutefois, celle-ci ne semble pas jouer un rôle important dans le dommage à la BHE dans la DT puisque l'on a démontré que les résidus HNE étaient plutôt localisés dans les neurones (Calingasan *et al.*, 1999); cela reste à être vérifié. Du côté de l'ADN, on a démontré que des niveaux élevés de ROS causaient une hyperméthylation de la région du promoteur de la protéine des jonctions adhérentes E-cadhérine, résultant en sa perte d'expression, pouvant possiblement altérer la fonction de la BHE (Lim *et al.*, 2008). Pour ce qui est du dommage aux protéines, il a été suggéré que les espèces réactives puissent moduler la fonction des canaux calciques et ainsi médier la dysfonction de la BHE via une cytotoxicité au Ca^{2+} (Brown & Davis, 2002). De plus, l'exposition de CECs aux espèces réactives oxygénées et nitrées (RNOS) entraîne un dommage direct aux protéines des JS comme ZO-1 (Lee *et al.*, 2004), quoique les mécanismes à l'origine de ce dommage ne soient pas connus. Parmi les RNOS, le peroxy-nitrite et la nitration des protéines semblent jouer un rôle important (Mayhan, 2000), mais les cibles précises de nitration critiques pour la fonction de la BHE restent à être identifiées. Néanmoins, on a récemment démontré que la sous-unité catalytique de la PP2A (PP2Ac) était inactivée par nitration, entraînant un maintien de l'activité de la PP2A, la déphosphorylation des protéines de JS et la dysfonction de la BHE (Wu & Wilson, 2007). D'autres études sont nécessaires afin d'élucider les autres cibles de nitration potentielles.

Dans la DT, on a rapporté une hausse d'immunoréactivité pour les résidus n-tyr dans les neurones (Calingasan *et al.*, 1998); toutefois, l'interprétation de la localisation de ces résidus est questionnable, et d'autres études de co-localisation sont nécessaires afin d'évaluer une potentielle localisation vasculaire.

I.4.4.3.1.2. Altération de la régulation des protéines des JS

Beaucoup d'emphase est mise sur les dommages oxydatifs/nitrosatifs en tant que mécanismes potentiels de dommage à la BHE. Cependant, puisque l'on sait aujourd'hui que les RNOS agissent en tant que seconds messagers dans une panoplie de voies de signalisation cellulaires (Droge, 2002; Guix *et al.*, 2005), de plus en plus d'études démontrent que ceux-ci peuvent aussi interférer avec plusieurs des facteurs de régulation des protéines des JS dans l'EVC. En effet, les ROS (Krizbai *et al.*, 2005) et le NO (Schindler & Bogdan, 2001) peuvent activer les MAPKs; les ROS peuvent aussi activer la PI3K, renforçant ainsi son association avec l'occludin et entraînant l'altération de la structure et de la fonction de cette dernière (Sheth *et al.*, 2003). Plus récemment, on a démontré une autre cible d'activation des ROS, soit la protéine tyrosine kinase (PTK); la phosphorylation des résidus tyrosines des protéines des JS par la PTK a été associée à la rupture de la BHE (Haorah *et al.*, 2007). La présence ou non de tels mécanismes dans la DT reste à être démontrée.

I.4.4.3.2. Effets indirects des espèces réactives sur l'intégrité de la BHE

La communauté scientifique s'entend sur le fait que l'excès de NO entraîne une dysfonction de la BHE (Heo *et al.*, 2005; Pun *et al.*, 2009), bien que la question du rôle direct du NO dans l'altération de la BHE demeure débattue. Toutefois, le NO ainsi que les ROS peuvent clairement altérer la BHE par des mécanismes indirects incluant l'induction des métalloprotéinases matricielles, tel que discuté à la section suivante.

I.4.5. Métalloprotéinases matricielles

Les métalloprotéinases matricielles (MMPs) sont une famille d'endopeptidases dépendantes du zinc responsables de la dégradation de presque tous les composants de la

matrice extracellulaire et participant à l'angiogenèse et à la neurogenèse (Sternlicht & Werb, 2001). Cette famille comprend entre autres les gélatinases A (MMP-2), exprimée de façon constitutive, et B (MMP-9), isoforme inductible. Les MMPs sont exprimées dans la plupart des éléments de l'unité neurovasculaire, par contre MMP-9 est principalement exprimé dans les cellules endothéliales et les péricytes, alors que MMP-2 est d'abord exprimé dans les terminaisons périvasculaires des astrocytes. Toutefois, l'expression de MMP-9 peut aussi être induite dans les astrocytes réactionnels et la microglie activée. L'expression et l'activité des MMPs sont étroitement régulées. La plupart des MMPs sont synthétisés sous la forme de proenzymes (proMMPs) latentes et sont sécrétées dans l'espace extracellulaire sous cette forme. Les proMMPs y sont ensuite activées par clivage par d'autres MMPs ou des protéases. Dans le milieu extracellulaire, l'activité des MMPs est contrôlée par les TIMPs (*tissue inhibitors of MMPs*) (Candelario-Jalil *et al.*, 2009).

La dérégulation de l'expression et de l'activité des MMPs est associée à la rupture de la BHE dans plusieurs désordres cérébraux comme l'ischémie cérébrale (Asahi *et al.*, 2001), la sclérose en plaques expérimentale (Kieseier *et al.*, 1999) et l'encéphalopathie hépatique expérimentale (Nguyen *et al.*, 2006). En effet, en plus de dégrader les éléments de la matrice extracellulaire vasculaire, on a récemment démontré que les MMPs peuvent dégrader les protéines des JS telles que l'occludin, claudin-5 (Yang *et al.*, 2007) et ZO-1 (Hawkins *et al.*, 2008), entraînant une rupture de la BHE. Le MMP-9 joue un rôle particulièrement important dans ce processus, et est induit lors d'un stress oxydatif/nitrosatif (Heo *et al.*, 2005). En effet, le NO, l'espèce réactive la plus importante au niveau de la modulation des MMPs, peut induire l'expression de MMP-9 via une action sur son ARN messager (Akool *et al.*, 2003) ainsi qu'une action au niveau transcriptionnel (Marcet-Palacios *et al.*, 2003) et post-transcriptionnel (Gum *et al.*, 1996). Le NO peut aussi activer MMP-9 par *S*-nitrosylation, selon un mécanisme indépendant du clivage (Gu *et al.*, 2002). De plus, le stress nitrosatif peut aussi activer les MMPs indirectement via la nitration et l'inactivation des TIMPs (Brown *et al.*, 2004). Contrairement au NO, l'effet des autres espèces réactives sur la régulation des MMPs est moins clair, mais les ROS, via l'activation de facteurs de transcription comme NFκB et AP-1, peuvent induire l'expression de MMP-9 (Heo *et al.*, 2005). On a aussi récemment démontré que les ROS pouvaient

entraîner directement l'activation des MMPs ainsi que la réduction des niveaux de TIMPs par un mécanisme dépendant de la PTK (Haorah *et al.*, 2007). L'élévation des niveaux de NO dans l'EVC dans la DT suggère donc fortement un rôle des MMPs, en particulier de MMP-9, dans la pathogenèse de la rupture de la BHE. Toutefois, aucune étude à ce jour ne s'est penchée sur le rôle des MMPs dans la pathogenèse de la DT.

I.4.6. Activation de la microglie et inflammation

Le processus inflammatoire peut lui aussi contribuer aux dommages à la BHE. En effet, l'activation de la microglie peut libérer plusieurs substances toxiques incluant des RNOS, des cytokines, des MMPs et du glutamate, pouvant tous contribuer au dommage endothélial. De plus, les cytokines comme le TNF- α et l'IL-1 β stimulent l'expression de molécules d'adhésion cellulaires telles que l'ICAM-1, entraînant l'extravasation de leucocytes dans le cerveau, générant eux aussi des substances toxiques similaires à celles de la microglie activée. Le processus d'extravasation des leucocytes au travers de l'EVC entraîne directement un dommage aux JS selon un processus impliquant la libération de Ca²⁺ dans l'endothélium, le réarrangement des filaments d'actine du cytosquelette et la redistribution de la protéine des JA vinculine, entraînant l'altération de l'occludin et ZO-1 (Heo *et al.*, 2005). Dans la DT, l'induction de l'expression de cytokines, de la molécule d'adhésion ICAM-1 et l'extravasation des neutrophiles suggèrent un rôle du processus inflammatoire dans la dysfonction de la BHE. Cela reste à être démontré. D'autre part, on a démontré que l'activation de la microglie dans la DT est un phénomène précoce, précédant la rupture de la BHE (Todd & Butterworth, 1999a). Toutefois, l'activation de la microglie, bien que souvent associée à la cytotoxicité, pourrait possiblement protéger la BHE contre le stress cérébrovasculaire dans la DT, puisque la microglie périvasculaire exprime des niveaux élevés de HO-1 et de ferritine (Calingasan & Gibson, 2000). La relation néfaste ou bénéfique entre l'activation de la microglie et la fonction de la BHE dans la DT reste à être démontrée.

I.4.7. Dysfonction du caveolæ et de caveolin-1

I.4.7.1. Caveolæ et caveolin-1 en condition physiologique

Le caveolæ est défini comme une invagination de la membrane plasmique formant un microdomaine membranaire riche en cholestérol et en sphingolipides, que l'on surnomme *compartiments lipidiques* (*lipid rafts*) (figure 7). Ces microdomaines émergent actuellement en tant qu'organelles spécialisés dans une multitude de fonctions cellulaires vitales telles que la régulation du cholestérol, la signalisation cellulaire, l'endocytose et la transcytose. Les caveolins, composantes protéiques du caveolæ, sont reconnues pour médier ces fonctions (Parton & Simons, 2007). Il existe trois isoformes de caveolin (caveolin-1, -2 et -3). Dans le cerveau, caveolin-1 est principalement localisé dans l'endothélium, alors que caveolin-3 est plutôt retrouvé dans les astrocytes (Ikezu *et al.*, 1998). Le caveolæ et caveolin-1 sont abondants dans l'EVC. Sur la face cytoplasmique du caveolæ, les caveolins forment un complexe homo-oligomérique servant d'échafaudage sur lequel les molécules de signalisation peuvent être préassemblées (figure 7 suivante), permettant à caveolin-1 de réguler leur fonction (Okamoto *et al.*, 1998).

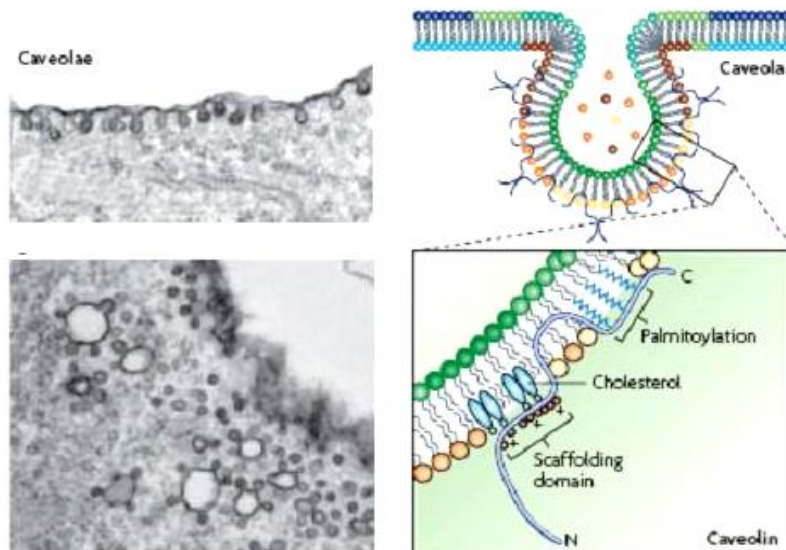


Figure 7. Structure du caveolæ et de caveolin

Adapté, avec permission, de (Parton & Simons, 2007) © Nature Publishing Group

Les complexes de signalisation retrouvés dans le caveolæ incluent des molécules clés comme les protéines G hétérotrimériques, les tyrosines kinases de la famille Src (c-Src), des composants de la voie Ras-MAPKs, la PKC et eNOS. En général, l'on croit que l'interaction directe entre caveolin-1 et ces molécules résulte en leur inactivation (Smart *et al.*, 1999). Certains types de canaux calciques sont aussi localisés dans le caveolæ et caveolin-1 serait apparemment impliquée dans la régulation négative de ces derniers (Wang & al., 2005). Par contre, caveolin-1 pourrait aussi entraîner l'activation de certaines molécules. Récemment, on a démontré que la Nox endothéliale était localisée dans le caveolæ (Yang & Rizzo, 2007; Ushio-Fukai, 2009; Brown & Griendling, 2009), et il a été suggéré que ce dernier soit un site privilégié de régulation de la *signalisation redox* endothéliale via la modulation de Nox (Li, 2009). De plus, un nouveau rôle clé a été postulé pour caveolin-1 en tant que détecteur de flot sanguin et méchanotransducteur entraînant l'activation de eNOS dans un contexte vasoconstricteur; on observe en effet une diminution de l'activité de eNOS chez les souris déficientes pour le gène de caveolin-1 (Yu & al., 2006). Cela semble paradoxal avec la postulation initiale d'un rôle inhibiteur de caveolin-1 sur la fonction de eNOS. Tentant de réconcilier ces données, Yu *et al.* ont suggéré que le couplage du flot sanguin avec l'activité de eNOS pouvait requérir caveolin-1, alors que l'activation de eNOS par des agonistes est un mécanisme distinct étant hyperstimulé en l'absence de caveolin-1, dû à la perte d'influence inhibitrice de caveolin-1 sur la fonction de eNOS.

Un autre rôle critique de caveolin-1 qui retient l'attention dans la présente thèse est la régulation de la perméabilité paracellulaire, postulé par Schubert *et al.* en 2002, qui démontrèrent que des souris déficientes pour le gène de caveolin-1 présentent un défaut au niveau de la morphologie des JS ainsi qu'une perméabilité endothéliale accrue pour l'albumine (Schubert *et al.*, 2002). En effet, on a démontré que les protéines des JS étaient localisées précisément dans le caveolæ et que celles-ci interagissaient physiquement avec caveolin-1, suggérant un rôle de cette dernière dans la régulation de l'assemblage des JS (Nusrat *et al.*, 2000b). Ce n'est que très récemment que la localisation des protéines des JS des CECs dans le caveolæ fut aussi démontrée (McCaffrey *et al.*, 2007). En effet, le rôle de caveolin-1 dans la régulation de la perméabilité de la BHE demeure encore peu exploré.

Toutefois, Song *et al.* ont récemment démontré que caveolin-1 régulaît l'expression des protéines des JS telles que occludin et ZO-1 dans un modèle *in vitro* de BHE (Song *et al.*, 2007).

I.4.7.2. Rôle de caveolin-1 en pathologie

Le peu d'études ayant évalué le rôle de caveolin-1 en pathologie cérébrale et dans la rupture de la BHE ont démontré des résultats contradictoires. Song *et al.* rapportèrent que des CECs exposées à un stimulus pro-inflammatoire présentent une perte d'expression de caveolin-1 ainsi qu'une perte subséquente d'expression des protéines des JS. Ce dernier suggéra donc que caveolin-1 soit impliqué dans la régulation négative de la perméabilité des CECs, similairement à ce qui avait été postulé pour les cellules endothéliales périphériques (Song *et al.*, 2007). Toutefois, un rapport récent a de son côté démontré que l'inflammation des CECs entraînait plutôt une induction de l'expression de caveolin-1, et que cela coïncidait avec la perte d'expression de l'occludin et des ZO (Zhong *et al.*, 2008). De plus, un autre rapport récent a démontré une association entre l'induction de caveolin-1 et la perte d'expression de l'occludin et de claudin-5 *in vivo* (Nag *et al.*, 2007). La disparité entre ces résultats pourrait être expliquée par la différence entre les modèles, mais malgré tout, ces études démontrent un rôle critique de caveolin-1 dans la rupture de la BHE en condition pathologique. Zhong *et al.* ont démontré que caveolin-1 exerçait un effet dommageable sur la BHE via l'activation de la voie Ras-MAPKs (Zhong *et al.*, 2008). De plus, on a démontré *in vitro* que l'activation de caveolin-1 pouvait entraîner l'activation de eNOS et un stress oxydatif/nitrosatif subséquent dans l'endothélium (Lim *et al.*, 2007). Ces résultats contrastent avec le rôle physiologique de caveolin-1 dans la régulation négative des MAPKs et de eNOS et suggèrent qu'en condition pathologique, la fonction normale de caveolin-1 soit altérée et que caveolin-1 puisse ainsi contribuer à l'*activation de l'endothélium* entraînant ultimement la dysfonction de la BHE.

Plusieurs études ont démontré que le stress oxydatif/nitrosatif pouvait moduler l'expression et l'activité de caveolin-1 (Parat & Fox, 2004). En condition physiologique, on sait que des facteurs tels que la voie des MAPKs et la PKA régulent l'expression génique de caveolin-1, et que son activité est modulée entre autres via la phosphorylation par la c-

Src; les stimuli entraînant l'activation de caveolin-1 incluent les facteurs de croissance (Smart *et al.*, 1999). Par contre, en condition pathologique, des stimuli comme le TNF- α (Wang *et al.*, 2008) et les espèces réactives (Parat & Fox, 2004) peuvent induire l'expression de caveolin-1. On a démontré que l'exposition aux ROS entraînait une induction de l'expression de caveolin-1 *in vitro*, et que des antioxydants comme la quercétin (flavanoïde) et la vitamine E prévenaient cette induction (Volonte *et al.*, 2002). Récemment, on a démontré que le mécanisme par lequel les ROS induisaient l'expression de caveolin-1 était l'activation de la voie p38-MAPKs et du facteur de transcription Sp1 (Dasari *et al.*, 2006). Par ailleurs, on a aussi démontré que l'activation de la voie p38-MAPKs pouvait induire la phosphorylation et l'activation de caveolin-1 suite à l'activation par les ROS (Volonte *et al.*, 2001). En plus de moduler l'expression et l'activité de caveolin-1, le stress oxydatif/nitrosatif peut entraîner une dysfonction du caveolæ et de caveolin-1. En effet, on a démontré que les ROS (Peterson *et al.*, 1999) et le NO (Li *et al.*, 2001) entraînaient une dissociation de caveolin-1 du caveolæ ainsi qu'une réduction du trafic de caveolin-1 vers le caveolæ (Parat *et al.*, 2002). Bien plus, les ROS altèrent l'organisation structurale du caveolæ, entraînant un défaut de compartimentation des molécules de signalisation; on a en effet démontré une dissociation de eNOS du caveolæ suite à l'exposition aux ROS (Peterson *et al.*, 1999).

Le stress oxydatif/nitrosatif semble donc interférer avec la régulation de caveolin-1. Une dysfonction de caveolin-1 pourrait entraîner l'activité incontrôlée de molécules endothéliales critiques comme eNOS, Nox, les MAPKs, la PKC et les canaux calciques, ces éléments étant tous associés à la rupture de la BHE. De tels mécanismes pourraient être en cause dans la rupture de la BHE dans la DT; cependant le rôle de caveolin-1 dans la DT n'a fait l'objet d'aucune étude jusqu'à maintenant.

I.5. Hypothèse

La rupture de la BHE est une caractéristique importante du SWK humain et expérimental. Cependant, plusieurs questions demeurent quant à l'origine des anomalies cérébrovasculaires dans la DT. Tout d'abord, les mécanismes responsables de l'extravasation des érythrocytes et des hémorragies ne sont pas bien compris, et l'intégrité structurelle et fonctionnelle des JS demeure relativement inexplorée. Ensuite, la base de la vulnérabilité accrue de l'EVC à la DT dans certaines régions spécifiques du cerveau demeure inconnue. Toutefois, l'EVC semble être un site important de stress oxydatif/nitrosatif, et l'induction sélective de eNOS dans les régions vulnérables suggère une contribution importante du NO dans la pathogenèse de la dysfonction vasculaire. De plus, le NO étant un inducteur important des MMPs, il est possible que ces dernières contribuent à la dysfonction de la BHE dans la DT. Finalement, bien que le stress oxydatif/nitrosatif soit associé à la rupture de la BHE dans plusieurs désordres cérébraux, les mécanismes précis par lesquels les espèces réactives altèrent l'intégrité de la BHE demeurent encore peu élucidés. Récemment, un rôle de caveolin-1 dans la régulation de la perméabilité de la BHE a été démontré, et plusieurs études ont rapporté que la régulation de caveolin-1 était affectée par les espèces réactives; il est donc possible que l'altération de caveolin-1 soit impliquée dans la rupture de la BHE dans la DT. Le rôle du caveolæ et de caveolin-1 n'a encore jamais été exploré dans la DT.

L'hypothèse évaluée dans le cadre de ce projet de doctorat comprend donc deux volets, soit (I) l'analyse de l'intégrité des protéines des JS, et (II) l'étude des mécanismes moléculaires entraînant la rupture de la BHE dans la DT, et se résume de la façon suivante :

- I. La DT (induite par la pyrithiamine) entraîne l'altération des protéines des JS, une caractéristique essentielle sous-tendant la rupture de la BHE.
- II. Le stress oxydatif/nitrosatif cérébrovasculaire, en particulier celui causé par le NO provenant de eNOS, est responsable de la rupture de la BHE via des dommages oxydatif/nitrosatifs, l'induction des MMPs et l'altération de caveolin-1.

Les objectifs spécifiques poursuivis sont les suivants :

- Démontrer l'altération focale de l'expression et de la morphologie des protéines des JS telles que l'occludin, ZO-1 et ZO-2 dans les régions cérébrales vulnérables à la DT présentant une rupture de la BHE telles que le thalamus, versus le cortex frontal (région relativement non vulnérable) chez la souris.
- Démontrer que l'expression des MMPs est spécifiquement à la hausse dans l'EVC du thalamus de souris déficientes en thiamine, versus le cortex frontal.
- Démontrer que la délétion du gène de eNOS entraîne : i) une amélioration de la fonction de la BHE telle que démontrée par l'atténuation de l'extravasation des IgGs et de l'altération des protéines des JS; ii) l'atténuation du stress oxydatif/nitrosatif cérébrovasculaire et iii) l'atténuation de l'induction des MMPs.
- Démontrer l'altération de l'expression de caveolin-1 dans l'EVC du thalamus de souris déficientes en thiamine, versus le cortex frontal.
- Démontrer que l'antioxydant NAC atténue le stress oxydatif/nitrosatif cérébrovasculaire, normalise l'expression de caveolin-1 dans l'EVC et atténue la rupture de la BHE dans le thalamus de souris déficientes en thiamine.

Une attention particulière sera portée à la relation entre la rupture de la BHE et la mort neuronale chez les souris déficientes en thiamine dans le but d'établir la contribution de la rupture de la BHE au processus de neurodégénérescence.

Chapitre II
RÉSULTATS : PRÉSENTATION DES ARTICLES

II.1. Premier article :

Altered expression of tight junction proteins and matrix metalloproteinases in thiamine-deficient mouse brain

Neurochem. Int. 55 : 275-281, 2009

Altered expression of tight junction proteins and matrix metalloproteinases in thiamine-deficient mouse brain

Élizabeth Beauchesne, Paul Desjardins, Alan S. Hazell, Roger F. Butterworth

Neuroscience Research Unit, Saint-Luc Hospital (C.H.U.M.), Montreal,
Quebec, Canada

Corresponding author: Roger F. Butterworth
Neuroscience Research Unit,
CHUM, Campus Saint-Luc,
University of Montreal,
1058 St-Denis Street, Montreal,
Quebec, Canada, H2X 3J4.
Tel: +1 514 890 8000, Ext. 35759
Fax: +1 514 412 7377

Contribution de chaque auteur aux travaux de recherche présentés dans le présent article

Élizabeth Beauchesne a conçu les plans expérimentaux et exécuté toutes les expériences ainsi que l'analyse des données requises. Elle a également rédigé la totalité de l'article. Dr Paul Desjardins, superviseur de laboratoire, a participé à l'élaboration du plan expérimental et à la révision de l'analyse des données. Dr Alan S. Hazell, co-directeur de recherche, a participé à la critique du manuscrit. Dr Roger Butterworth, directeur de recherche, a participé à la rédaction et la révision du manuscrit.

ABSTRACT

Wernicke's encephalopathy (WE) in humans is a metabolic disorder caused by thiamine deficiency (TD). In both humans and experimental animals, TD leads to selective neuronal cell death in diencephalic and brainstem structures. Neuropathologic features of WE include petechial hemorrhagic lesions, and blood-brain barrier (BBB) breakdown has been suggested to play an important role in the pathogenesis of TD. The goal of the present study was to examine expression of the tight junction (TJ) protein occludin, its associated scaffolding proteins zona occludens (ZO-1 and ZO-2), and to measure matrix metalloproteinase (MMP) levels as a function of regional BBB permeability changes in thiamine-deficient mice. TD was induced in 12-week-old male C57Bl/6 mice by feeding a thiamine-deficient diet and administration of the central thiamine antagonist pyriithiamine. BBB permeability was measured by IgG extravasation; expression of occludin, ZO-1 and ZO-2 was measured by Western blot analysis and RT-PCR, structural integrity of the BBB was assessed using occludin and ZO-1 immunostaining, and MMPs levels were measured by gelatin zymography and immunohistochemistry. Studies were performed in vulnerable (medial thalamus) versus spared (frontal cortex) regions of the brain. Hemorrhagic lesions, selective increases in brain IgG extravasation, a concomitant loss in protein expression of occludin, ZO-1 and ZO-2, as well as decreased and disrupted patterns of occludin and ZO-1 immunostaining were observed in the medial thalamus of thiamine-deficient mice. MMP-9 levels were also selectively increased in the medial thalamus of these animals, and were found to be localized in the vascular endothelium, as well as in cells with an apparent polymorphonuclear morphology. No changes of TJ gene expression were observed. These results indicate that alterations in TJ proteins occur in TD, and offer a plausible explanation for the selective increase in BBB permeability in thiamine-deficient animals. They also suggest a role for MMP-9 in the initiation of changes to BBB integrity in TD.

Keywords: thiamine deficiency, blood-brain barrier, tight junction proteins, matrix metalloproteinase-9, Wernicke's encephalopathy

Running title: Blood-brain barrier in thiamine deficiency

Wernicke's encephalopathy (WE) in humans is a metabolic disorder caused by thiamine deficiency (TD) and is characterized clinically by ophthalmoplegia, ataxia and confusion. Neuropathologic features of WE include selective neuronal cell loss and petechial hemorrhagic lesions in mamillary bodies, thalamus and cerebellum with relative sparing of the other brain structures. Given the hemorrhagic nature of the lesions, blood-brain barrier (BBB) breakdown is considered to play an important role in the pathogenesis of WE. Animal models of TD recapitulate the neuropathologic features of WE (Troncoso et al., 1981; Heroux and Butterworth, 1992), and BBB disruption has been shown to occur using classical techniques in these models (Harata and Iwasaki, 1995; Calingasan et al., 1995; Todd and Butterworth, 1999). Furthermore, it has been suggested that dysfunction of the cerebrovascular endothelium predicts regional vulnerability to TD (Calingasan and Gibson, 2000; Kruse et al., 2004).

The BBB is a highly specialized structure composed of a tightly sealed monolayer of cerebrovascular endothelial cells connected at a junctional complex by tight junctions (TJs) (Hawkins and Davis, 2005). The BBB/TJ network comprises integral membrane proteins such as occludin linked to the cytoplasmic scaffolding zona occludens proteins (ZO-1, ZO-2). Expression of these proteins is frequently modified in a wide range of neurological disorders including multiple sclerosis, stroke and Alzheimer's disease (Zlokovic, 2008). Matrix metalloproteinase (MMPs), also known as gelatinases, are zinc dependent endopeptidases that specialize in the degradation of components of the extracellular matrix and basement membrane of the cell, and are implicated in many brain disorders associated with BBB breakdown such as cerebral ischemia (Rosenberg et al., 1998) and experimental multiple sclerosis (Kieseier et al., 1999). However, no studies to date have addressed the possible role of TJ proteins and MMPs in the BBB changes associated with TD.

The goal of the present study therefore was to examine expression of the common TJ protein occludin, its associated scaffolding proteins ZO-1 and ZO-2, as well as the related MMPs (MMP-2, MMP-9) as a function of regional BBB permeability changes due

to TD. Studies were conducted at the symptomatic stage of TD, characterized by hemorrhagic lesions, and evaluations were made in a vulnerable brain structure (medial thalamus) compared to a relatively spared brain structure (frontal cortex). Use was made of a well characterized mouse model of TD previously validated in several laboratories (Ke and Gibson, 2004; Watanabe et al., 1981).

2. Experimental procedures

2.1. Animal procedures

12-week-old male C57Bl6 mice (Charles River, St-Constant, QC) were used for all experiments. Mice were housed individually under constant conditions of temperature, humidity and 12 h light/dark cycles and had free access to water at all times. Mice were allowed to adapt to their environment for at least 3 days prior the initiation of treatments and were randomly assigned to either TD or pair-fed control (PFC) groups. All experimental procedures were approved by the Animal Ethics Committee of Saint-Luc Hospital (CHUM) and the University of Montreal.

2.2. Thiamine deficiency protocol

Mice in the TD group (n = 8) were fed a thiamine-deficient diet (ICN Nutritional Biochemicals, Cleveland, OH) and administered daily pyrithiamine hydrobromide (Sigma-Aldrich, St Louis, MO) (0.5 mg per kg body weight) intraperitoneally. Control mice (n = 8) were pair-fed to equal food consumption with the thiamine-deficient mice using the same thiamine-deficient diet and supplemented with daily i.p. injections of thiamine (0.1 mg per kg body weight). Treatments were continued until mice displayed loss of righting reflex (the animal is no longer able to right itself when placed on its back). For the purpose of the present study, this stage was defined as the symptomatic stage of encephalopathy. Any mice exhibiting spontaneous seizures were eliminated from the protocols. Animals were sacrificed by decapitation, the brains were promptly removed and flash frozen in isopentane

on dry ice and stored at -80°C . They were then dissected on ice into frontal cortex and medial thalamus, according to the mouse brain atlas of Paxinos and Franklin (2003).

2.3. Histopathology and immunohistochemistry

A second group of thiamine-deficient and PFC mice was used for histopathologic and immunohistochemical studies. These mice were anaesthetized with a ketamine/xylazine cocktail (50 mg/kg and 9 mg/kg, respectively) and perfused transcardially with 50 ml of saline followed by 100 ml of neutral-buffered formalin containing 4% formaldehyde, 0.5% sodium phosphate buffer, 1.5% methanol and 0.02% glutaraldehyde, pH 7.0 (Fisher Scientific, Fair Lawn, NJ). Brains were then removed and post-fixed 24 h in the same solution. Free-floating 50 μm coronal sections were cut using a sectioning vibratome at the level of the frontal cortex and the medial thalamus. Sections were mounted on slides, stained with cresyl violet 0.1% and mounted for examination. Neuronal cell numbers were assessed by counting four adjacent grid areas (0.4 mm^2) of cresyl violet-stained sections. Histological criteria for neuronal counting included nuclear size and the presence of a nucleolus. For occludin, ZO-1 and MMP-9 immunohistochemistry, frontal cortex and medial thalamus sections were mounted on slides. For occludin and ZO-1 antigen retrieval, sections were incubated in a solution of protease type XIV at 37°C for 15 min (2 mg/ml, Sigma–Aldrich), and for MMP-9, sections were boiled in a microwave for 10 min in 10 mM citrate buffer pH 6.0. Endogenous peroxidase activity was blocked in sections by means of 0.3% H_2O_2 in methanol for 15 min at room temperature and then washed with PBS. The non-specific binding sites were blocked using 10% normal goat serum or rabbit serum in 0.2% Triton X-100/PBS for 30 min. The sections were then incubated overnight with rabbit anti-occludin (1 $\mu\text{g}/\text{ml}$, Invitrogen, Carlsbad, CA), anti-ZO-1 (3 $\mu\text{g}/\text{ml}$, Invitrogen) and goat anti-MMP-9 (pro and active forms, 0.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$, R&D systems, Minneapolis, MN) polyclonal antibodies at 4°C . After washing in PBS, the sections were incubated with biotinylated goat anti-rabbit or rabbit anti-goat IgG secondary antibody (1:200, Vector Laboratories, Burlingame, CA), followed by incubation with ABC reagent (Vector Laboratories). Immunoreactivity was subsequently detected by incubation with

3,3'-diaminobenzidine containing urea hydrogen peroxide (Sigma–Aldrich). Sections were dehydrated in ethanol, cleared with xylene and processed for examination. Sections without primary antibodies were used as negative controls and showed no immunoreactivity.

2.4. Protein extraction

Medial thalamus and frontal cortex samples were homogenized at 4°C in 50 mM Tris–HCl buffer, pH 7.4, containing a protease inhibitor cocktail (Sigma–Aldrich) using a Potter Elvehjem tissue homogenizer. After centrifugation at 12,000 g for 45 min, membranes were separated from the cytosolic fraction, washed in the same buffer and stored at -80°C. Protein concentrations were estimated using a protein assay kit (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA) with bovine serum albumin as standard.

2.5. Western blotting

Membrane fractions from medial thalamus and frontal cortex (10–60 µg protein equivalent) were solubilized in Laemmli buffer (50 mM Tris–HCl, pH 6.8, 10% glycerol, 2% sodium dodecyl sulfate, 0.1 M dithiothreitol, 0.1% bromophenol blue) and boiled for 5 min. Proteins were resolved on 7–9% denaturing SDS–polyacrylamide gels and transferred overnight at 4°C to PVDF membranes (Bio-Rad Laboratories). Membranes were blocked by incubation for 1 h at room temperature in Tris buffered saline containing 0.05% Tween 20 (TBST) and 5% dry milk, then incubated for 1 h with rabbit polyclonal antibodies directed against occludin (1 µg/ml), ZO-1 (0.5 µg/ml), ZO-2 (1 µg/ml), (Invitrogen) and mouse monoclonal antibody directed against β-actin (1/100,000) (Sigma–Aldrich). Membranes were washed several times with TBST and incubated for 1 h with an anti-rabbit or anti-mouse horseradish peroxidase-conjugated secondary antibody (Perkin-Elmer Life Sciences, Boston, MA, USA). After extensive washing with TBST, peroxidase activity was detected by enhanced chemiluminescence using the ECL detection system (Amersham, Arlington Heights, IL, USA). Intensity of the bands was measured by densitometry and quantified using Quantity-One software (Bio-Rad Laboratories). Results are expressed as percentage of the housekeeping protein β-actin to normalize for loading variations.

2.6. IgG extravasation

Ten μg of cytosolic fraction from samples of medial thalamus and frontal cortex were solubilized in Laemmli buffer and boiled for 5 min. Proteins were resolved on 9% denaturing SDS–polyacrylamide gels and transferred overnight at 4°C to PVDF membranes. Membranes were blocked by incubation for 1 h at room temperature in Tris buffered saline containing 0.05% Tween 20 (TBST) and 5% dry milk then incubated for 1 h with an anti-mouse-horseradish peroxidase-conjugated secondary antibody (1:3000, Perkin Elmer Life Sciences). After extensive washing with TBST, peroxidase activity was detected by enhanced chemiluminescence using the ECL detection system (Amersham). Intensity of the bands (IgG light chain) was measured by densitometry using Quantity One software (Bio-Rad Laboratories). The housekeeping protein b-actin was used to normalize for loading variations.

2.7. SDS–PAGE gelatin zymography

This assay detects both MMP-9 and MMP-2 gelatinases. Twenty μg of sample (cytosolic fraction) was electrophoresed at 4°C in 10% SDS–PAGE containing 1 mg/ml of gelatin (Bio-Rad Laboratories). Mixtures (1.5 ng) of recombinant MMP-9 and MMP-2 (US Biological, Cleveland, OH) were used as standards. The gels were processed, incubated in 2.5% Triton X-100 for 1 h, incubated in a zymogen buffer (50 mM Tris, pH 7.4, 5 mM CaCl_2 , 200 mM NaCl, 0.02% Brij.35) at 37°C for 40 h, stained with 0.5% Coomassie Blue R-250 for 3 h, and destained with three changes of 30% methanol, 10% acetic acid (for 15, 30, and 60 min of destain time, respectively, for each change). Finally gels were incubated for 15 min in 30% methanol, 5% glycerol prior to drying between sheets of cellophane. Dried gels were scanned and the bands of activity were quantified using Quantity One software (Bio-Rad laboratories). Gelatinase activity presents as a clear band against a blue background.

2.8. RNA extraction

Total RNA was extracted from medial thalamus using TRIzol reagent (Invitrogen) according to the manufacturer's protocol. Putative contaminating DNA was eliminated by adding 100 U of RNase-free DNase I per 50 µg of total RNA at 37°C for 1 h. Purified RNA was then extracted with phenol, precipitated with ethanol and resuspended in diethylpyrocarbonate-treated water. RNA samples were kept at -80°C until use.

2.9. Semi-quantitative RT-PCR analysis

Expression of ZO-1, ZO-2 and occludin was investigated by one-step semiquantitative reverse transcription-polymerase chain reaction. 18S rRNA was used as an internal standard to monitor loading variations. Total RNA (1 µg) was mixed with 10 mM Tris HCl (pH 8.3), 1.5 mM MgCl₂, 50 mM KCl, 0.01% (w/v) bovine serum albumin, 200 µM dNTPs, primers at 1 µM each, AMV reverse transcriptase (80 U/ml), Taq DNA polymerase (20 U/ml) and 50 µCi/ml [α ³²P]dCTP (3000 Ci/mmol), for a total reaction volume of 50 µL. The reactions were initially heated at 50°C for 20 min followed by PCR at 95°C for 30 s, 60°C for 45 s and 72°C for 1 min. Amplification efficiency conditions were determined after a kinetic study to ensure all experiments were performed in the exponential phase of amplification where PCR products remain proportional to initial template concentration (data not shown). 18S rRNA, ZO-1, ZO-2, and occludin were amplified for 14, 24, 23 and 24 cycles respectively. After amplification, samples were electrophoresed onto 9% polyacrylamide gels, dried, autoradiographed at -80°C with an intensifying screen. Each band was excised and Cerenkov radiation was quantified using a β -counter. Omission of AMV reverse transcriptase from the reaction mixture was used as negative control and resulted in absence of amplification. Oligonucleotide primers were designed using the PRIMER3 program (Rozen and Skaletsky, 2000) at <http://primer3.sourceforge.net/> based on the following Gene-Bank accession numbers: X00686 (18S rRNA, Raynal et al., 1984), D14340 (ZO-1, Itoh et al., 1993), AF113005 (ZO-2, Itoh et al., 1999), and U49185 (occludin, Ando-Akatsuka et al., 1996). The forward and reverse oligonucleotide primer sequences were as follows: 50-GGGGAGGTAGTGACGAAAA ATA-30 and 50-GGGACACTCAGCTAAGAGCATC-

30 (18S rRNA, 280 bp); 50-GGGGCCTA CACTGATCAAGA-30 and 50-TGGAGATGAGGCTTCTGCTT-30 (ZO-1, 234 bp); 50-GTTTGGCCCCATAGCAGATA-30 and 50-TCCGGGTTGAAGAAAATCAC-30 (ZO-2, 243 bp); 50-AC GGACCCTGACCACTATGA-30 and 50-TCAGCAGCAGCCATGTACTC-30 (occludin, 260 bp). The specificity of the oligonucleotide primers was verified using the program BLASTN (National Center for Biotechnology Information, Bethesda, MD).

2.10. Statistical analysis

Data are expressed as mean \pm S.E.M. values. Statistical analysis was performed using Student's t-test to establish significance for 2-group comparisons. A probability of $p < 0.05$ was chosen to establish significance between groups. Data were analyzed by using Prism 4.0 software (GraphPad Software, Inc., San Diego, CA).

3. Results

3.1. Progression of TD encephalopathy and histopathological evaluation

Daily administration of pyriithiamine to mice fed a thiamine-deficient diet resulted within 10 days in neurological symptoms consisting initially of rotational and/or backward movements, followed on day 12 by severe ataxia and opisthotonic episodes lasting for 18-24 h, and finally by complete loss of righting reflex (symptomatic stage). PFC animals killed at equivalent time points did not show any such neurological symptoms. Histological evaluation revealed extensive loss of neurons in the medial thalamus of all symptomatic mice ($66 \pm 1\%$), consistent with previous literature data (Todd and Butterworth, 1998), as well as multiple necrotic/hemorrhagic lesions. Frontal cortex of thiamine-deficient mice did not show any such pathological changes (Fig. 1).

3.2. IgG extravasation

A significant and region-selective increase in brain IgG extravasation (95-fold, $p < 0.0001$) was also observed in the medial thalamus of thiamine-deficient mice (Fig. 2), consistent with BBB breakdown. No significant IgG extravasation was observed in the frontal cortex of these animals (Fig. 2).

3.3. Alteration of tight junction protein expression and morphology

In the medial thalamus of symptomatic thiamine-deficient mice, a significant ($61 \pm 13\%$) decrease in occludin protein was observed compared to PFC mice (Fig. 3, $p < 0.001$). A comparable decrease of ZO-1 (Fig. 4A, $p < 0.01$) and ZO-2 (Fig. 4B, $p < 0.001$) was also evident in the medial thalamus of these animals. No changes were observed in the frontal cortex. RT-PCR analysis revealed no significant effect of TD on TJ gene expression (Fig. 5). Occludin and ZO-1 immunostaining in the medial thalamus of pair-fed control mice appeared as clear dense continuous strands of TJs localizing at cell–cell contacts in the endothelium. However, thalamic sections from thiamine-deficient animals showed a decrease or an absence, as well as a marked disruption and fragmentation of occludin and ZO-1 immunostaining (Fig. 6). No such alterations in TJ protein immunostaining were observed in the frontal cortex of thiamine-deficient mice (data not shown).

3.4. Up-regulation of matrix metalloproteinase-9

Gelatin zymographic analysis of MMPs demonstrated that MMP-9 levels were significantly increased 16-fold ($p < 0.001$) in the medial thalamus of thiamine-deficient mice, compared to PFC mice. A marginally significant ($p < 0.05$) increase in MMP-9 levels was also observed in the frontal cortex of thiamine-deficient mice. No increase in levels of MMP-2 was observed in either brain region (Fig. 7A). Immunohistochemistry revealed a strong increase in MMP-9 expression in endothelial cells, and also in cells with an apparent polymorphonuclear morphology throughout the parenchyma of the medial thalamus from thiamine-deficient mice, compared to PFC mice, where no MMP-9 immunoreactivity was observed (Fig. 7B). No such increase in MMP-9 immunostaining was observed in the frontal cortex of thiamine-deficient mice (data not shown).

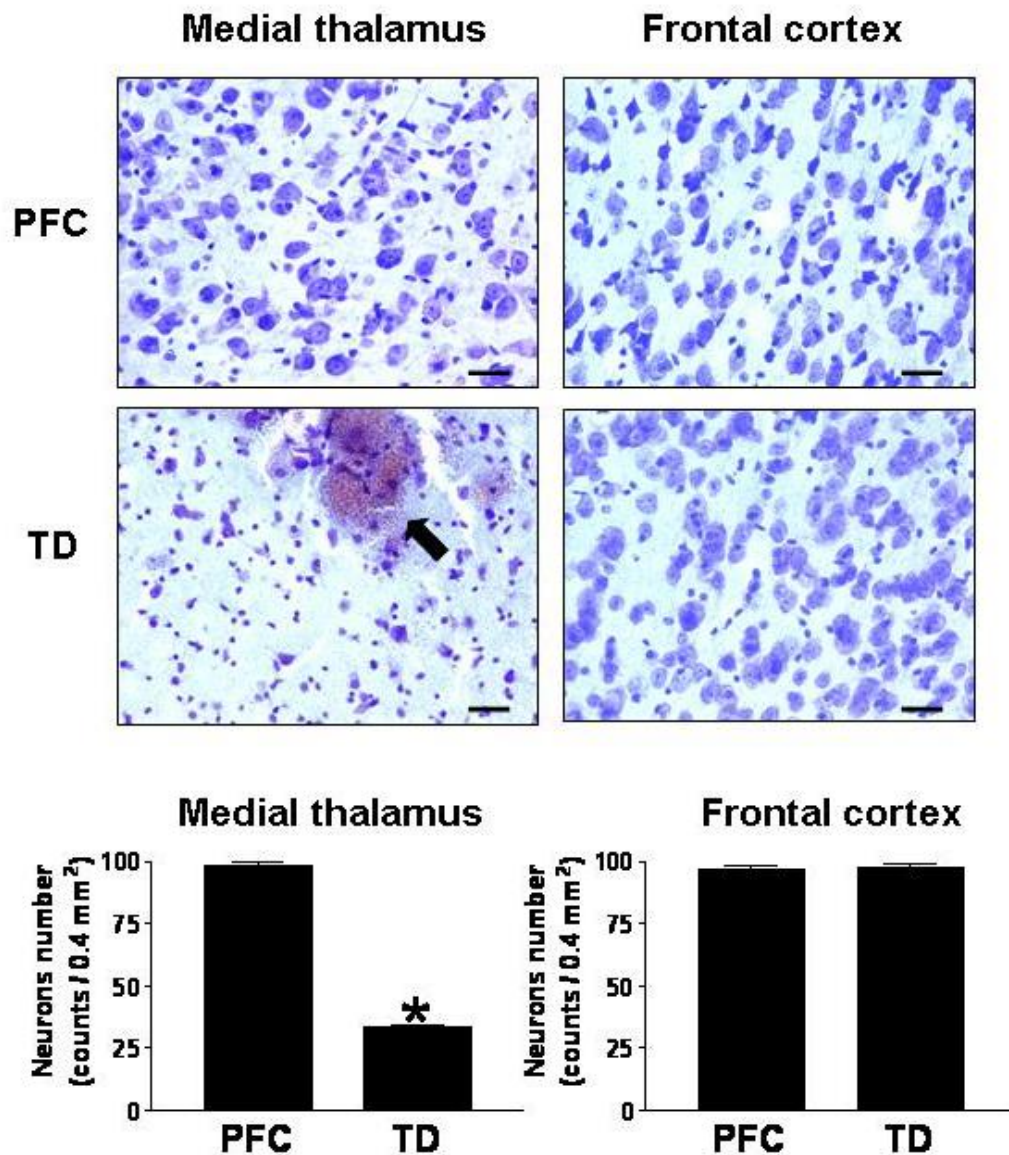


Figure 1. Region-selective hemorrhagic and necrotic lesions in the thiamine-deficient mouse brain. Representative micrograph of cresyl violet stained sections showing hemorrhage (arrow) and extensive neuronal cell death in the medial thalamus (left panel) of a thiamine-deficient mouse (TD) at symptomatic stages of encephalopathy (lower panel) compared to a pair-fed control mouse (PFC) (top panel). Neuronal counts per 4HPF are expressed as mean \pm S.E.M. of 4 animals in each group. Significant difference from PFC mice indicated by * $p < 0.001$ by Student's t-test. Note the absence of neuronal cell death and hemorrhage in the frontal cortex (right panel) of thiamine-deficient animals (scale bar: 40 μ m).

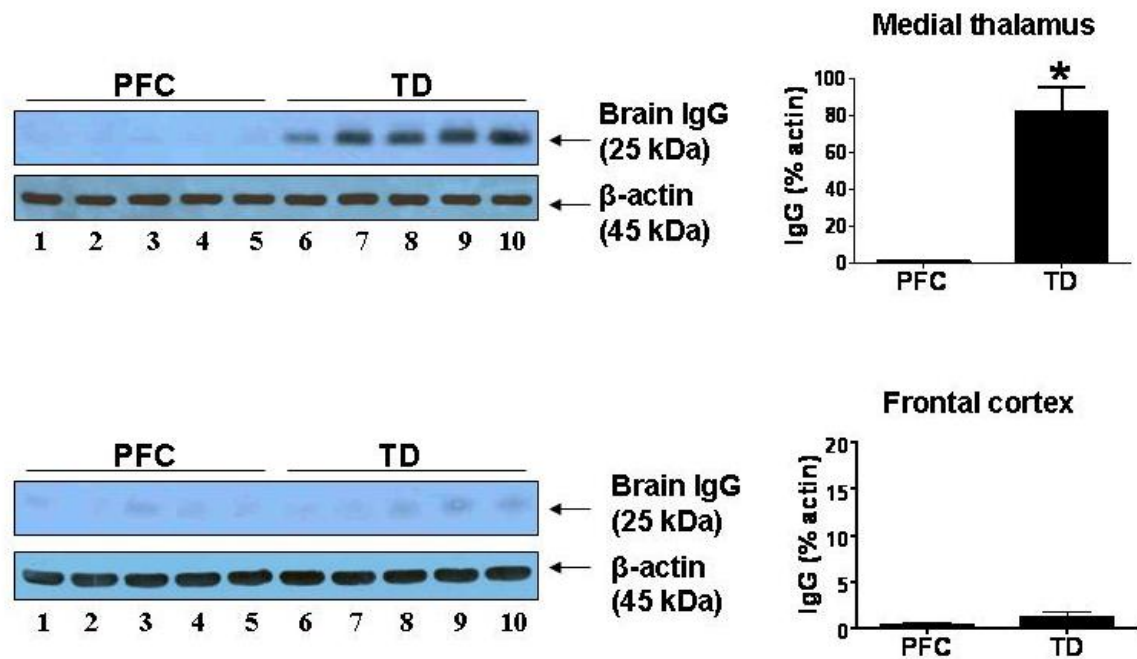


Figure 2. Region-selective IgG extravasation in the thiamine-deficient mouse brain. Western blot analysis showing IgG extravasation in the medial thalamus (upper panel) compared to frontal cortex (lower panel) of thiamine-deficient mice (TD) at symptomatic stages of encephalopathy (lanes 6–10) compared to pair-fed control mice (PFC) (lanes 1–5). Data are expressed as mean \pm S.E.M. of 5 animals in each group. Significant difference from PFC mice indicated by * $p < 0.001$ by Student's t-test.

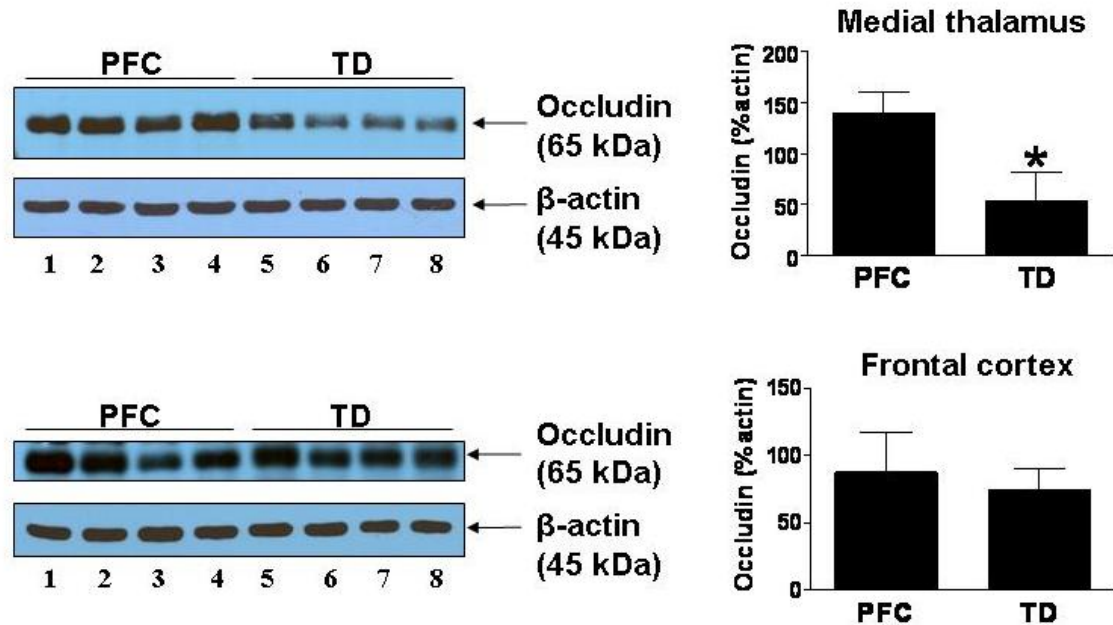


Figure 3. Region-selective loss of occludin protein expression in the thiamine-deficient mouse brain. Western blot analysis showing loss of occludin expression in the medial thalamus (upper panel), compared to frontal cortex (lower panel), of thiamine-deficient mice (TD) at symptomatic stages of encephalopathy (lanes 5–8) compared to pair-fed control mice (PFC) (lanes 1–4). Data are expressed as mean \pm S.E.M. of 4 animals in each group. Significant difference from PFC mice indicated by * $p < 0.001$ by Student's t-test.

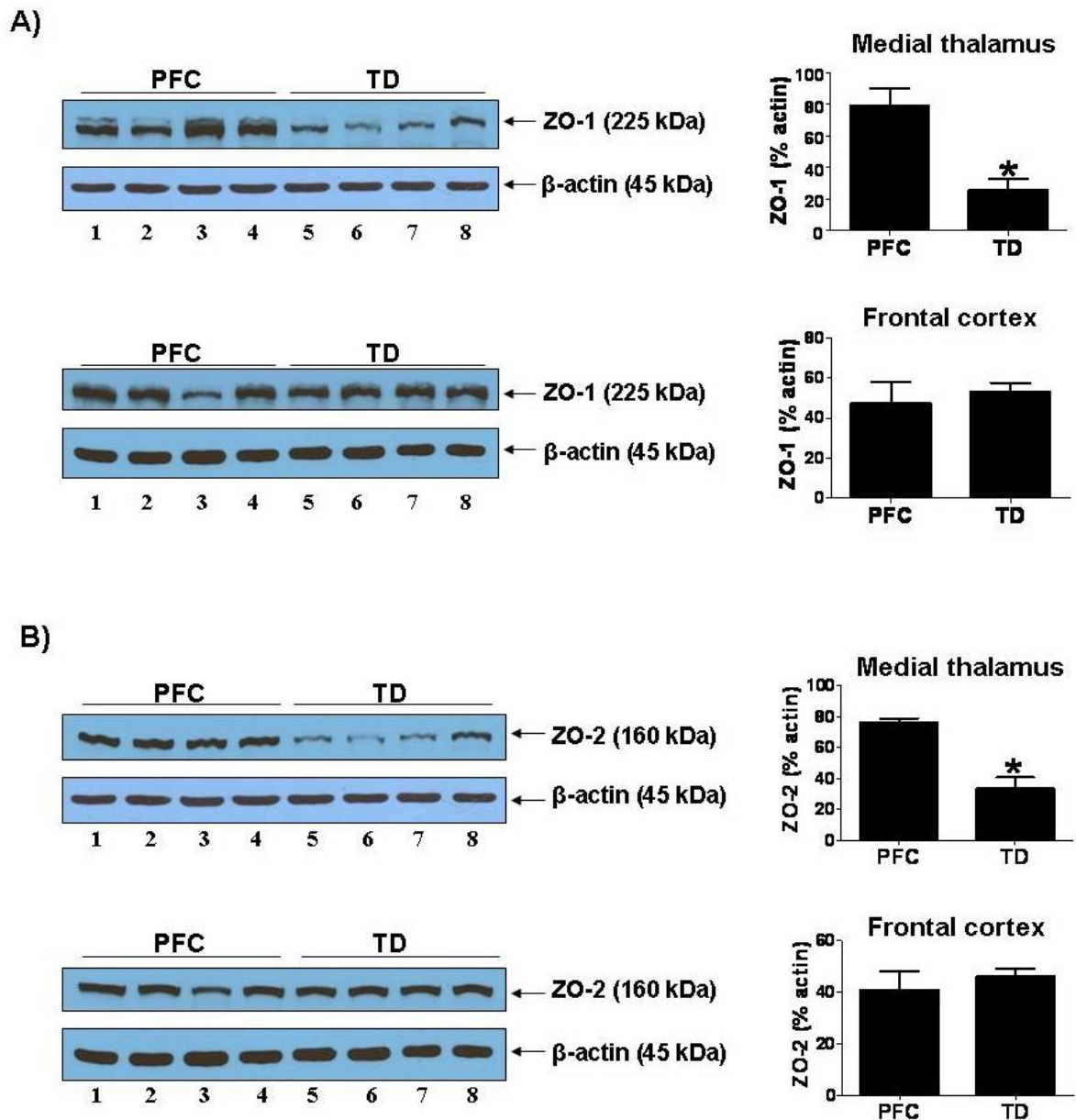


Figure 4. Region-selective loss of zonula occludens-1 and -2 protein expression in the thiamine-deficient mouse brain. Western blot analysis showing loss of expression of ZO-1 (A) and ZO-2 (B) in the medial thalamus (upper panel), compared to frontal cortex (lower panel), of thiamine-deficient mice (TD) at symptomatic stages of encephalopathy (lanes 5–8) compared to pair-fed control mice (PFC) (lanes 1–4). Data are expressed as mean \pm S.E.M. of 4 animals in each group. Values significantly different from PFC mice indicated by * $p < 0.01$ (for ZO-1) and $p < 0.001$ (for ZO-2) by Student's t-test.

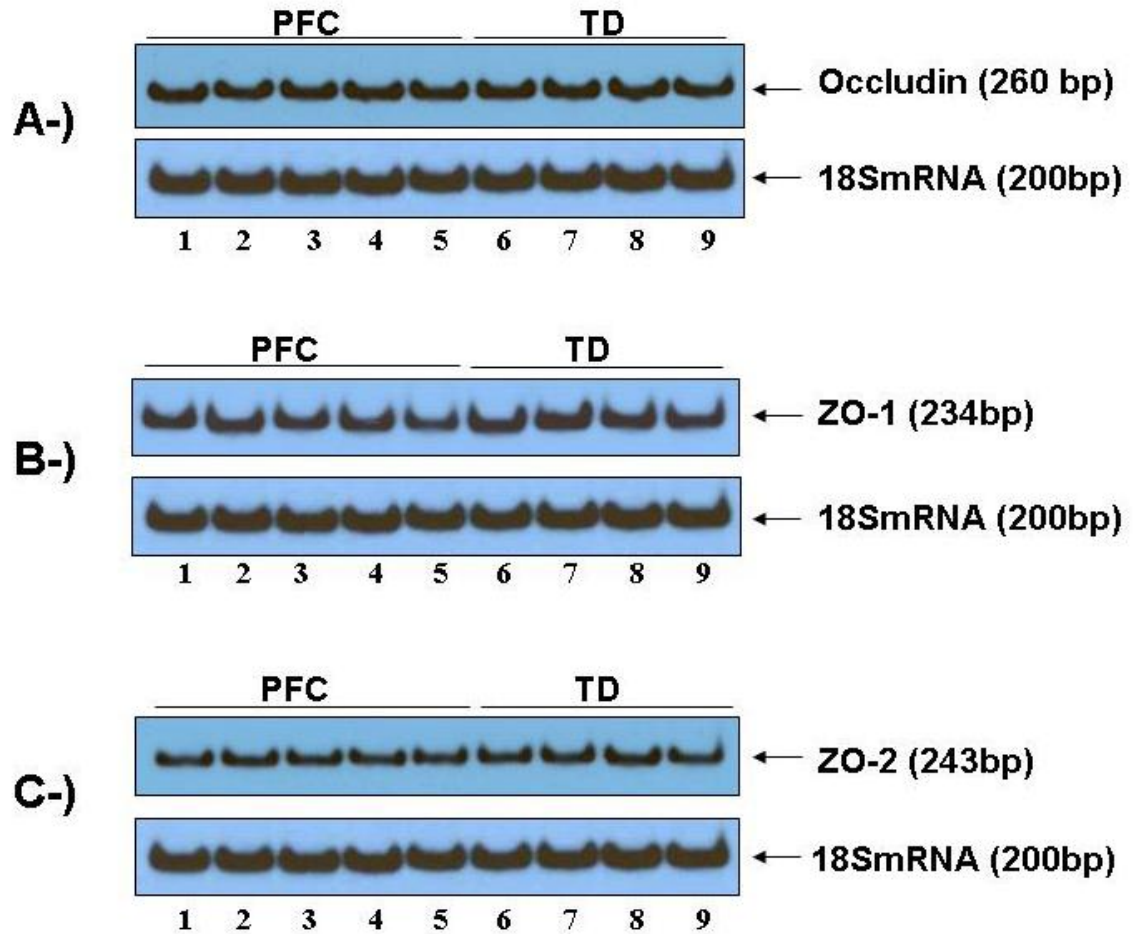


Figure 5. Absence of changes in tight junction proteins gene expression in the thalamus of thiamine-deficient mice. Occludin (A), ZO-1 (B) and ZO-2 (C) gene expression in the medial thalamus of thiamine-deficient mice (TD) at symptomatic stages of encephalopathy (lanes 6–9) compared to pair-fed control mice (PFC) (lanes 1–5). Data are expressed as mean \pm S.E.M. of 5 animals in PFC group and 4 animals in TD group. Occludin, ZO-1 and ZO-2 mRNAs were not significantly different from PFC values by Student's t-test.

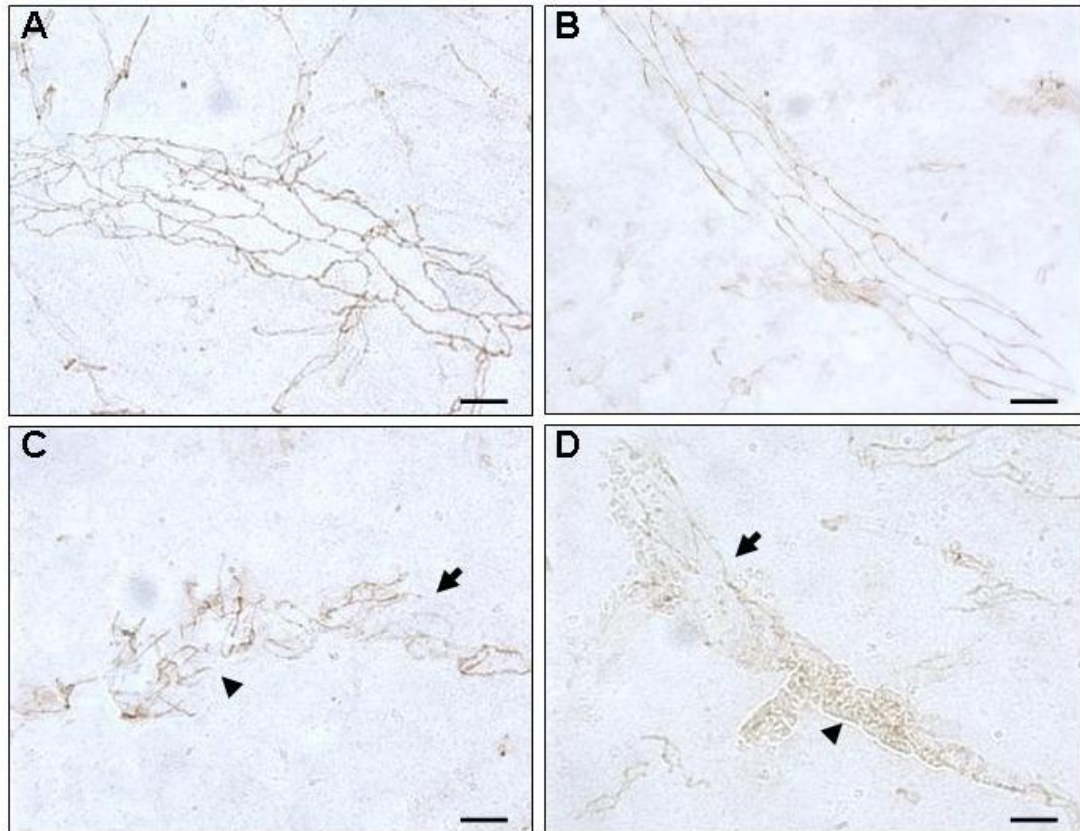


Figure 6. Alterations in the morphology of tight junction proteins in the thalamus of thiamine-deficient mice. Representative micrograph showing occludin (A and C) and ZO-1 (B and D) immunostaining in the medial thalamus of a thiamine-deficient mouse at symptomatic stages of encephalopathy (lower panels) compared to a pair-fed control mouse (upper panels). Typical appearance of occludin and ZO-1 immunostaining showing highly organized strands of tight junctions localizing at cell–cell contacts in the endothelium of PFC mice. Decrease (arrows) and fragmentation (arrowhead in panel C) of occludin and ZO-1 immunostaining in a thiamine-deficient mouse. Arrowhead in panel D shows hemorrhage from the blood vessel (scale bar: 20 μ m).

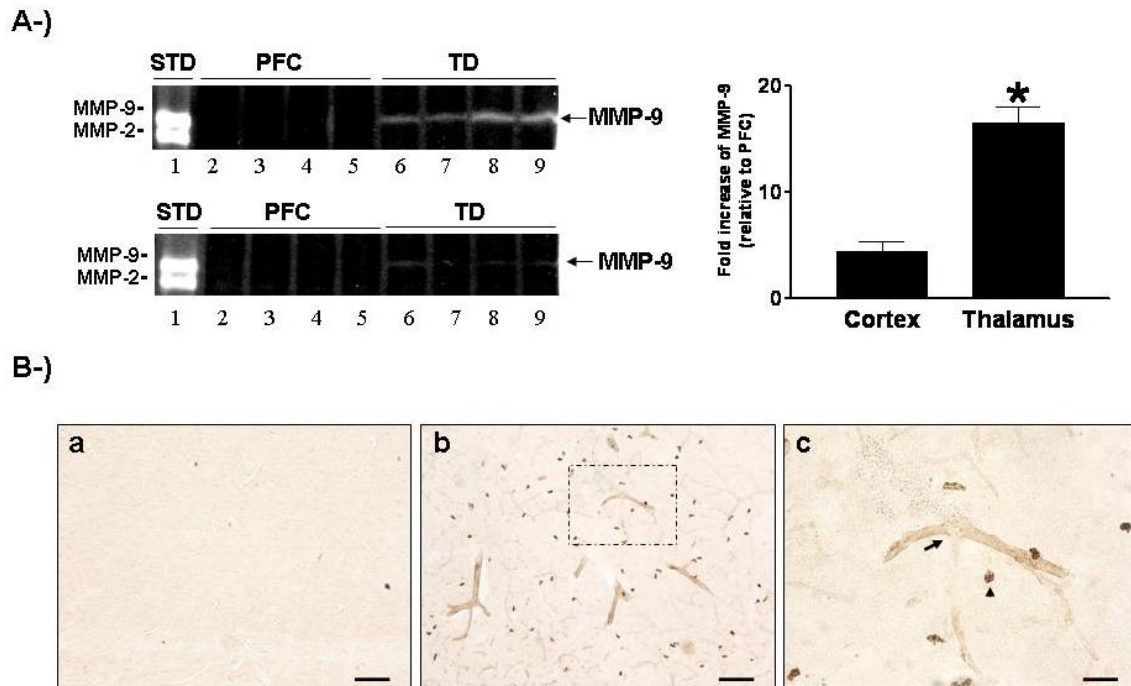


Figure 7. Region-selective MMP-9 up-regulation in the thiamine-deficient mouse brain. (A) Gelatin zymography showing increased levels of MMP-9 in the medial thalamus (upper panel) and the frontal cortex (lower panel) of thiamine-deficient mice (TD) at symptomatic stages of encephalopathy (lanes 6–9) compared to pair-fed control mice (PFC) (lanes 2–5). Lane 1: MMP-2 and MMP-9 positive controls. Data are expressed as mean \pm S.E.M. of 4 animals in each group. Values (expressed as TD/PFC ratio) in medial thalamus significantly different from frontal cortex values indicated by * $p < 0.001$ by Student's t-test. (B) Representative micrograph of MMP-9 immunohistochemistry showing absence of MMP-9 immunoreactivity in a PFC mouse (panel a), and a strong increase in MMP-9 expression in vessel walls and in cells throughout the parenchyma of the medial thalamus from a thiamine-deficient mouse (panel b) (100X magnification). Higher magnification (400X) (panel c) of the framed area in panel b showing extravasation of blood from a degraded area of an MMP-9-positive vessel (arrow), and an MMP-9-positive cell with an apparent polymorphonuclear morphology (arrowhead) (scale bars: 160 μ m (b) and 40 μ m (c)).

4. Discussion

Results of the present study reveal region-selective alterations of proteins with key roles in BBB function. Expression of the TJ protein occludin, as well as its related scaffolding proteins ZO-1 and ZO-2, was selectively altered in medial thalamus of thiamine-deficient mice compared to PFC animals. Downregulation of TJ proteins occurred concomitantly with extravasation of IgG and hemorrhagic lesions in this brain structure. No such changes were observed in frontal cortex, a spared region in TD.

Occludin is a transmembrane protein within the TJs of the cerebrovascular endothelium and its reduced expression is a hallmark of many disorders associated with BBB dysfunction. A previous study showed that a deletion construct lacking the N-terminal region of the occludin gene resulted in altered TJ assembly and impaired BBB function (Bamforth et al., 1999). A similar study using a deletion construct for the C-terminal region of occludin also resulted in a leaky BBB. Furthermore, immunofluorescence analysis revealed that this truncated occludin displayed a disrupted and disorganized arrangement, suggesting an alteration in its oligomerization and assembly (Balda et al., 1996). Similar alterations in TJ morphology were reported recently in cerebrovascular disorders associated with BBB disruption such as experimental autoimmune encephalomyelitis (Morgan et al., 2007) and experimental stroke (McColl et al., 2008). Proteins of the TJ network are linked to the actin cytoskeleton of cerebrovascular endothelial cells via the scaffolding proteins zonula occludens ZO-1 and ZO-2 (Fanning et al., 1998). In addition to providing cytoskeletal anchorage, these proteins control the spatial distribution of occludin. Decreased expression of ZO-1 is associated with BBB leakage in disorders such as multiple sclerosis (Kirk et al., 2003) and diabetic encephalopathy (Hawkins et al., 2007). Results of the present study showing concomitant reductions in expression of occludin, ZO-1 and ZO-2 proteins suggest that similar mechanisms are occurring in TD and offer a plausible explanation for the selective alterations of BBB function and ultimately BBB breakdown in thiamine-deficient animals. Moreover, the decreased and disrupted immunostaining of these TJ proteins, in addition to the absence of changes in their gene expression, suggest

that a post translational alteration of these proteins occurs, ultimately leading to TJ disassembly and BBB leakage.

Occludin and ZOs are vulnerable to attack by MMPs (Yang et al., 2007; Asahi et al., 2001). In the present study, a significant increase in MMP-9 was observed in the medial thalamus in TD, coincident with the loss of expression of occludin and ZOs, and with their altered morphology. Moreover, MMP-9 immunostaining was increased in endothelial cells, and MMP-9-positive endothelial cells displayed areas of degradation and hemorrhage, suggesting degradation by MMP-9 of BBB components such as TJ proteins, basal lamina and extracellular matrix, leading to alteration of BBB integrity in TD. Other MMP-9 positive cells were also observed in the parenchyma of thiamine-deficient mice. Based on morphology of these cells, their exact nature is uncertain, although the appearance of multinuclear/lobulated nuclei suggests they may represent extravasated polymorphonuclear neutrophils, a possible consequence of BBB breakdown in this model. Increase in brain MMP-9 derived from infiltrated neutrophils has been previously shown in several brain disorders associated with BBB breakdown, including experimental stroke (McColl et al., 2008). Whether or not infiltration of peripheral inflammatory cells contributes to increased production of MMP-9 in thiamine-deficient brain, and the active involvement of MMP-9 in alterations of TJs due to TD awaits further studies using MMP-9 inhibitors and neutrophil depletion experiments.

Vascular-derived nitric oxide (NO) is suggested to play an important role in the pathogenesis of TD encephalopathy, and induction of endothelial nitric oxide synthase (eNOS) is associated with thalamic damage due to TD (Calingasan et al., 2000; Kruse et al., 2004). These findings suggest that the vascular endothelium is a major site of NO production in the thiamine-deficient brain and that eNOS-derived NO could account for the selective alterations of BBB integrity observed in this disorder, since NO has the potential to disrupt the BBB by several mechanisms, including oxidative/nitrosative stress and activation of MMPs (Heo et al., 2005). eNOS-derived NO could thus potentially be implicated in the alterations in expression of TJ proteins and MMPs observed in TD.

In conclusion, results of the present study demonstrate that increased permeability of the BBB to IgGs is accompanied by alterations in expression of TJ protein occludin and its associated scaffolding proteins ZO-1 and ZO-2, and suggest the involvement of MMP-9 in the pathogenesis of the region-selective BBB disruption that is characteristic of TD. Further studies are necessary to establish the precise pathophysiologic link between diminished brain thiamine concentrations and region-selective alterations of TJ proteins and BBB integrity.

Acknowledgements

This study was supported by grants from the Canadian Institutes of Health Research. E.B. is recipient of a research scholarship from the University of Montreal.

References

- Ando-Akatsuka, Y., Saitou, M., Hirase, T., Kishi, M., Sakakibara, A., Itoh, M., Yonemura, S., Furuse, M., Tsukita, S., 1996. Interspecies diversity of the occludin sequence: cDNA cloning of human, mouse, dog, and rat-kangaroo homologues. *J. Cell Biol.* 133, 43-47.
- Asahi, M., Wang, X., Mori, T., Sumii, T., Jung, J.C., Moskowitz, M.A., Fini, M.E., Lo, E.H., 2001. Effects of matrix metalloproteinase-9 gene knock-out on the proteolysis of blood-brain barrier and white matter components after cerebral ischemia. *J. Neurosci.* 21, 7724-7732.
- Balda, M.S., Whitney, J.A., Flores, C., Gonzalez, S., Cerejido, M., Matter, K., 1996. Functional dissociation of paracellular permeability and transepithelial electrical resistance and disruption of the apical- basolateral intramembrane diffusion barrier by expression of a mutant tight junction membrane protein. *J. Cell Biol.* 134, 1031-1049.

Bamforth, S.D., Kniesel, U., Wolburg, H., Engelhardt, B., Risau, W., 1999. A dominant mutant of occludin disrupts tight junction structure and function. *J. Cell. Sci.* 112, 1879-1888.

Calingasan, N.Y., Baker, H., Sheu, K.R., Gibson, G.E., 1995. Blood-brain barrier abnormalities in vulnerable brain regions during thiamine deficiency. *Exp. Neurol.* 134, 64-72.

Calingasan, N.Y., Gibson, G.E., 2000. Vascular endothelium is a site of free radical production and inflammation in areas of neuronal loss in thiamine-deficient brain. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 903, 353-356.

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, 207-217.

Fanning, A.S., Jameson, B.J., Jesaitis, L.A., Anderson, J.M., 1998. The tight junction protein ZO-1 establishes a link between the transmembrane protein occludin and the actin cytoskeleton. *J Biol. Chem.* 273, 29745-29753.

Harata, N., Iwasaki, Y., 1995. Evidence for early blood-brain barrier breakdown in experimental thiamine deficiency in the mouse. *Metab. Brain Dis.* 10, 159-174.

Hawkins, B.T., Lundeen, T.F., Norwood, K.M., Brooks, H.L., Egleton, R.D., 2007. Increased blood-brain barrier permeability and altered tight junctions in experimental diabetes in the rat: contribution of hyperglycaemia and matrix metalloproteinases. *Diabetologia.* 50, 202-211.

Hawkins, B.T., Davis, T.P., 2005. The blood-brain barrier/neurovascular unit in health and disease. *Pharmacol. Rev.* 57, 173-185.

Heo, J.H., Han, S.W., Lee, S.K., 2005. Free radicals as triggers of brain edema formation after stroke. *Free Radic. Biol. Med.* 39, 51-70.

Heroux, M., Butterworth, R.F., 1992. Animal models of the Wernicke-Korsakoff syndrome. In: Boulton, A., Baker, G.B. Butterworth, R.F., (Eds.) *Animal models of Neurological Disease*. Humana Press, Totowa, NJ, pp. 95-131.

Itoh, M., Morita, K., Tsukita, S., 1999. Characterization of ZO-2 as a MAGUK family member associated with tight as well as adherens junctions with a binding affinity to occludin and alpha catenin. *J. Biol. Chem.* 274, 5981-5986.

Itoh, M., Nagafuchi, A., Yonemura, S., Kitani-Yasuda, T., Tsukita, S., Tsukita, S., 1993. The 220-kD protein colocalizing with cadherins in non-epithelial cells is identical to ZO-1, a tight junction-associated protein in epithelial cells: cDNA cloning and immunoelectron microscopy. *J. Cell Biol.* 121, 491-502.

Ke Z.J., Gibson G.E., 2004. Selective response of various brain cell types during neurodegeneration induced by mild impairment of oxidative metabolism. *Neurochem. Int.* 45, 361-369.

Kieseier, B.C., Seifert, T., Giovannoni, G., Hartung, H.P., 1999. Matrix metalloproteinases in inflammatory demyelination: targets for treatment. *Neurology*. 53, 20-25.

Kirk, J., Plumb, J., Mirakhor, M., McQuaid, S., 2003. Tight junctional abnormality in multiple sclerosis white matter affects all calibres of vessel and is associated with blood-brain barrier leakage and active demyelination. *J. Pathol.* 201, 319-327.

Kruse, M., Navarro, D., Desjardins, P., Butterworth, R.F., 2004. Increased brain endothelial nitric oxide synthase expression in thiamine deficiency: relationship to selective vulnerability. *Neurochem. Int.* 45, 49-56.

McColl, B.W., Rothwell, N.J., Allan, S.M., 2008. Systemic inflammation alters the kinetics of cerebrovascular tight junction disruption after experimental stroke in mice. *J Neurosci.* 28, 9451-9462.

Morgan, L., Shah, B., Rivers, L.E., Barden, L., Groom, A.J., Chung, R., Higazi, D., Desmond, H., Smith, T., Staddon, J.M., 2007. Inflammation and dephosphorylation of the tight junction protein occludin in an experimental model of multiple sclerosis. *Neuroscience.* 147, 664-673.

Paxinos, G., Franklin, K.B.J., 2003. *The Mouse Brain in Stereotaxic Coordinates* (2nd edition), Academic Press, San Diego.

Raynal, F., Michot, B., Bachellerie, J.P., 1984. Complete nucleotide sequence of mouse 18S rRNA gene: comparison with other available homologs. *FEBS Lett.* 167, 263-268.

Rosenberg, G.A., Estrada, E.Y., Dencoff, J.E., 1998. Matrix metalloproteinases and TIMPs are associated with blood-brain barrier opening after reperfusion in rat brain. *Stroke.* 29, 2189-2195.

Rozen, S., Skaletsky, H., 2000. Primer3 on the WWW for general users and for biologist programmers. *Methods Mol. Biol.* 132, 365-386.

Todd, K.G., Butterworth, R.F., 1999. Early microglial response in experimental thiamine deficiency: an immunohistochemical analysis. *Glia.* 25, 190-198.

Todd, K.G., Butterworth, R.F., 1998. Increased neuronal cell survival after L-deprenyl treatment in experimental thiamine deficiency. *J. Neurosci. Res.* 52, 240-246.

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.

Watanabe, I., Tomita, T., Hung, K.S., Iwasaki, Y., 1981. Edematous necrosis in thiamine-deficient encephalopathy of the mouse. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* 40, 454-471.

Yang, Y., Estrada, E.Y., Thompson, J.F., Liu, W., Rosenberg, G.A., 2007. Matrix metalloproteinase-mediated disruption of tight junction proteins in cerebral vessels is reversed by synthetic matrix metalloproteinase inhibitor in focal ischemia in rat. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* 27, 697-709.

Zlokovic, B.V., 2008. The blood-brain barrier in health and chronic neurodegenerative disorders. *Neuron* 57, 178-200.

II.2. Deuxième article :
eNOS gene deletion restores blood-brain barrier integrity and attenuates neurodegeneration in the thiamine-deficient mouse brain

J. Neurochem. 111: 452-459, 2009

**eNOS gene deletion restores blood-brain barrier
integrity and attenuates neurodegeneration in the
thiamine-deficient mouse brain**

Élizabeth Beauchesne, Paul Desjardins, Alan S. Hazell, Roger F. Butterworth

Neuroscience Research Unit, Saint-Luc Hospital (C.H.U.M.), Montreal,
Quebec, Canada

Corresponding author: Roger F. Butterworth
Neuroscience Research Unit,
CHUM, Campus Saint-Luc,
University of Montreal,
1058 St-Denis Street, Montreal,
Quebec, Canada, H2X 3J4.
Tel: +1 514 890 8000, Ext. 35759
Fax: +1 514 412 7377

Contribution de chaque auteur aux travaux de recherche présentés dans le présent article

Élizabeth Beauchesne a conçu les plans expérimentaux et exécuté toutes les expériences ainsi que l'analyse des données requises. Elle a également rédigé la totalité de l'article. Dr Paul Desjardins, superviseur de laboratoire, a participé à l'élaboration du plan expérimental et à la révision de l'analyse des données. Dr Alan S. Hazell, co-directeur de recherche, a participé à la critique du manuscrit. Dr Roger Butterworth, directeur de recherche, a participé à la révision du manuscrit.

ABSTRACT

Wernicke's encephalopathy is a cerebral disorder caused by thiamine (vitamin B₁) deficiency (TD). Neuropathologic consequences of TD include region-selective neuronal cell loss and blood-brain barrier (BBB) breakdown. Early increased expression of the endothelial isoform of nitric oxide synthase (eNOS) occurs selectively in vulnerable brain regions in TD. We hypothesize that region-selective eNOS induction in TD leads to altered expression of tight junction proteins and BBB breakdown. In order to address this issue, TD was induced in C57BL/6 wild-type (WT) and eNOS^{-/-} mice by feeding a thiamine-deficient diet and treatment with the thiamine antagonist pyriithiamine. Pair-fed control mice were fed the same diet with additional thiamine. In medial thalamus of TD-WT mice (vulnerable area), increased heme oxygenase-1 and S-nitrosocysteine immunostaining was observed in vessel walls, compared to pair-fed control-WT mice. Concomitant increases in IgG extravasation, decreases in expression of the tight junction proteins occludin, zona occludens-1 and zona occludens-2, and up-regulation of matrix metalloproteinase-9 in endothelial cells were observed in the medial thalamus of TD-WT mice. eNOS gene deletion restored these BBB alterations, suggesting that eNOS-derived nitric oxide is a major factor leading to cerebrovascular alterations in TD. However, eNOS gene deletion only partially attenuated TD-related neuronal cell loss, suggesting the presence of mechanisms additional to BBB disruption in the pathogenesis of these changes.

Keywords: blood-brain barrier, endothelial nitric oxide synthase, neuronal cell death, thiamine deficiency, Wernicke's encephalopathy

Running title: eNOS in thiamine deficiency encephalopathy

In the Central Nervous System (CNS), thiamine (vitamin B₁) deficiency (TD) results in Wernicke's encephalopathy (WE), a metabolic brain disorder resulting from inhibition in the activity of α -ketoglutarate dehydrogenase, a thiamine-dependent tricarboxylic acid cycle enzyme. WE is a neuropsychiatric disorder characterized clinically by ophthalmoplegia, ataxia and mental changes. Neuropathological evaluation of WE patients reveal an highly selective pattern of neuronal cell loss in thalamic, pontine and cerebellar structures, with relative sparing of the other brain structures (Harper and Butterworth 1997), with petechial hemorrhagic lesions in vulnerable areas occurring early in the progression of the disorder. Animal models of TD recapitulate the neuropathological features of human WE (Troncoso et al. 1981; Heroux and Butterworth 1992).

Blood-brain barrier (BBB) breakdown, consistent with cerebral hemorrhage, has previously been demonstrated using classical techniques in rodent models of TD (Calingasan et al. 1995; Harata and Iwasaki 1995). These studies demonstrated albumin and immunoglobulin-G (IgG) extravasation in the medial thalamus of these animals. Other evidence of BBB dysfunction in TD include reports of increased densities of vesicular profiles (Calingasan et al. 1995) and pinocytotic transport (Manz and Robertson 1972) across cerebrovascular endothelial cells. More recently, alterations of BBB tight junction (TJ) proteins and related matrix metalloproteinase-9 (MMP-9) were reported in the medial thalamus of thiamine-deficient mice (Beauchesne et al. 2009).

Increased expression of the endothelial isoform of nitric oxide synthase (eNOS) was shown to occur selectively in regions of the brain destined to undergo BBB disruption and neuronal cell death (Calingasan et al. 1998; Kruse et al. 2004), and it was suggested that eNOS-derived nitric oxide (NO) was implicated in BBB alterations in TD (Beauchesne et al. 2009). The aims of the present study therefore were to assess the effects of eNOS gene disruption on BBB integrity and neuronal cell death in thiamine-deficient mice. BBB integrity was assessed by analysis of IgG extravasation, integrity of the TJ proteins occludin and the zona occludens (ZO-1, ZO-2), as well as levels of the related MMP-9. Oxidative/nitrosative stress was assessed by heme oxygenase-1 (HO-1) and S-

nitrosocysteine (SNO-Cys) immunohistochemistry. Comparative studies were performed in medial thalamus, a vulnerable structure, compared to frontal cortex, a brain structure that is relatively spared in TD.

Materials and methods

Animal procedures

12-week-old male C57BL/6 wild-type (WT) mice and eNOS knockout (eNOS^{-/-}) mice (Jackson laboratories, Bar Harbor, MA, USA) were used for all experiments. Mice were housed individually under constant conditions of temperature, humidity and 12 h light/dark cycles and had free access to water at all times. Mice were allowed to adapt to their environment for at least 3 days prior the initiation of treatments. WT and eNOS^{-/-} mice were randomly assigned to either thiamine-deficient (TD) or pair-fed control (PFC) groups. All experimental procedures were conducted in accordance with the Guidelines of Canadian Council of Animal care and were approved by Animal Ethics Committee at Saint-Luc Hospital (C.H.U.M.).

Thiamine deficiency protocol

Mice in the TD groups (WT and eNOS^{-/-}) (n = 8) were fed a thiamine-deficient diet (ICN Nutritional Biochemicals, Cleveland, OH, USA) and administered daily pyriethamine hydrobromide (Sigma-Aldrich, St-Louis, MO, USA) (0.5 mg/kg; i.p.). PFC mice (WT and eNOS^{-/-}) (n = 8) were pair-fed to equal food consumption with those of the TD group using the same thiamine-deficient diet and supplemented with daily injections of thiamine (0.1 mg/kg; i.p.). Treatments were continued until TD-WT mice displayed loss of righting reflex (the animal is no longer able to right itself when placed on its back). For the purpose of the present study, this stage was defined as the symptomatic stage of encephalopathy. TD-eNOS^{-/-} mice were pair-killed with the TD-WT mice. Any mice exhibiting spontaneous seizures were eliminated from the protocols. Animals were killed by decapitation, the brains were promptly removed and flash frozen in isopentane on dry ice and stored at -

80°C. Half of the brains (n = 4) were dissected on ice into medial thalamus and frontal cortex according to the mouse brain atlas of Paxinos and Franklin (2003), and the other half were cut in a cryostat at the level of the medial thalamus and frontal cortex; 10 µm fresh-frozen coronal sections were stored at -80°C.

Histopathology

Subsequent groups of thiamine-deficient and PFC mice (WT and eNOS^{-/-}) were used for histopathologic and immunohistochemical studies. These mice were anaesthetized with a ketamine/xylazine cocktail (50 mg/kg and 9 mg/kg, respectively) and perfused transcardially with 50 mL of saline followed by 100 mL of neutral-buffered formalin containing 4% formaldehyde, 0.5% sodium phosphate buffer, 1.5% methanol and 0.02% glutaraldehyde, pH 7.0 (Fisher Scientific, Fair Lawn, NJ, USA). Brains were then removed and post-fixed 24 h in the same solution. Free-floating 50 µm coronal sections were cut using a sectioning vibratome at the level of the medial thalamus and the frontal cortex. Sections were mounted on slides, stained with cresyl violet 0.1% and processed for examination. Neuronal cell numbers were assessed by counting four adjacent grid areas (0.4 mm²) of cresyl violet stained sections under 400X magnification. Histological criteria for neuronal counting included nuclear size and the presence of a nucleolus.

Immunohistochemistry

For HO-1, SNO-Cys and MMP-9 immunohistochemistry, sections were first mounted on slides. For MMP-9 antigen retrieval, sections were boiled in a microwave for 10 min in 10 mM citrate buffer pH 6.0. Endogenous peroxidase activity was blocked in sections by means of 0.3% H₂O₂ in methanol for 15 min at 25°C and then washed with phosphate-buffered saline (PBS). The non-specific binding sites were blocked using 10% normal goat or rabbit serum in 0.2% Triton X-100/PBS for 30 min. The sections were then incubated overnight with rabbit anti-HO-1 (1 : 2000, Assay Designs, Ann Arbor, MI, USA), anti-SNO-Cys (1 : 500, Sigma-Aldrich) and goat anti-MMP-9 (pro and active forms, 0.5 µg/mL, R&D systems, Minneapolis, MN, USA) polyclonal antibodies at 4°C. After washing in

PBS, sections were incubated with biotinylated goat anti-rabbit or rabbit anti-goat IgG secondary antibody (1 : 200, Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA), followed by incubation with ABC reagent (Vector Laboratories). Immunoreactivity was subsequently detected by incubation with 3,3'-diaminobenzidine containing urea hydrogen peroxide (Sigma-Aldrich). Sections were dehydrated in ethanol, cleared with xylene and processed for examination. For occludin immunofluorescence, fresh-frozen sections were air-dried for 30 min, fixed in 100% ethanol for 1 min, rinsed in PBS, blocked in 10% normal goat serum in 0.2% Triton X-100/PBS for 30 min, and then incubated overnight with rabbit anti-occludin (2.5 µg/mL, Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) polyclonal antibody at 4°C. After washing in PBS, sections were incubated with Texas Red-conjugated donkey anti-rabbit IgG secondary antibody (1 : 200, Jackson Laboratories) for 1 h. After rinsing in PBS, sections were mounted in fluorescent mounting medium (Dako, Carpinteria, CA, USA) and processed for examination. Sections without primary antibodies were used as negative controls and showed no immunoreactivity.

Protein extraction

Medial thalamus and frontal cortex samples were homogenized at 4°C in 50 mM Tris-HCl buffer pH 7.4, containing a protease inhibitor cocktail (Sigma-Aldrich) using a Potter-Elvehjem tissue homogenizer. After centrifugation at 12 000 g for 45 min, membranes were separated from the cytosolic fraction, washed in the same buffer and stored at -80°C. Protein concentrations were estimated using a protein assay kit (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA) with bovine serum albumin as standard.

Western blotting

Membrane fractions from medial thalamus and frontal cortex (10–100 µg protein equivalent) were solubilized in Laemmli buffer (50 mM Tris-HCl, pH 6.8, 10% glycerol, 2% sodium dodecyl sulfate, 0.1 M dithiothreitol, 0.1% bromophenol blue) and boiled for 5 min. Proteins were resolved on 7.5–9% denaturing sodium dodecyl sulfate–polyacrylamide gel electrophoresis (SDS–PAGE) and transferred overnight at 4°C to polyvinylidene

difluoride membranes (Bio-Rad Laboratories). Membranes were blocked by incubation for 1 h at 25°C in Tris-buffered saline containing 0.05% Tween 20 (TBST) and 5% dry milk then incubated for 1 h with rabbit polyclonal antibodies directed against occludin (1 µg/mL), ZO-1 (0.5 µg/mL), ZO-2 (1 µg/mL) (Invitrogen) and mouse monoclonal antibodies directed against eNOS (1 : 1000, BD Biosciences, San Jose, CA, USA) and β-actin (1/100 000, Sigma-Aldrich). Membranes were washed several times with TBST and incubated for 1 h with an anti-rabbit or anti-mouse horseradish peroxidase-conjugated secondary antibody (Perkin-Elmer Life Sciences, Boston, MA, USA). After extensive washing with TBST, peroxidase activity was detected by enhanced chemiluminescence using the ECL detection system (GE Healthcare, Piscataway, NJ, USA). Intensity of the bands was measured by densitometry using Quantity-One software (Bio-Rad Laboratories). Results are expressed as percentage of the housekeeping protein β-actin to normalize for loading variations.

IgG extravasation

Ten µg of cytosolic fraction from samples of medial thalamus and frontal cortex were solubilized in Laemmli buffer and boiled for 5 min. Proteins were resolved on 9% denaturing SDS-PAGE and transferred overnight at 4°C to polyvinylidene difluoride membranes. Membranes were blocked by incubation for 1 h at 25°C in Tris buffered saline containing 0.05% Tween 20 (TBST) and 5% dry milk then incubated for 1 h with an anti-mouse horseradish peroxidase-conjugated secondary antibody (1 : 3000, Perkin-Elmer Life Sciences). After extensive washing with TBST, peroxidase activity was detected by enhanced chemiluminescence using ECL detection system (GE Healthcare, Piscataway, NJ, USA). Intensity of the bands (IgG light chain) was measured by densitometry using Quantity One software (Bio-Rad Laboratories). The housekeeping protein b-actin was used to normalize for loading variations.

SDS-PAGE gelatin zymography

This assay detects both MMP-9 and MMP-2 gelatinases. Twenty μg of sample (cytosolic fraction) were electrophoresed at 4°C in 10% SDS–PAGE containing 1 mg/mL of gelatin (Bio-Rad Laboratories). Mixtures (1.5 ng) of recombinant MMP-9 and MMP-2 (US Biological, Cleveland, OH, USA) were used as standards. The gels were processed, incubated in 2.5% Triton X-100 for 1 h, incubated in a zymogen buffer (50 mM Tris–HCl, pH 7.4, 5 mM CaCl_2 , 200 mM NaCl, 0.02% Brij.35) at 37°C for 40 h, stained with 0.5% Coomassie Blue R-250 for 3 h, and destained with three changes of 30% methanol, 10% acetic acid (for 15, 30, and 60 min of destain time, respectively, for each change). Finally, gels were incubated for 15 min in 30% methanol, 5% glycerol prior to drying between sheets of cellophane. Dried gels were scanned and the bands of activity were quantified using Quantity One software (Bio-Rad laboratories). Gelatinase activity presents as a clear band against a dark background.

Statistical analysis

Data are expressed as mean \pm SEM values. Statistical analysis was performed using Student's t-test to establish significance for two group comparisons and One-way ANOVA followed by post-hoc Tukey test to establish significance for multiple group comparisons. A probability of $p < 0.05$ was chosen to establish significance between groups. Data were analyzed by using Prism 4.0 software (GraphPad Software, Inc., San Diego, CA, USA).

Results

Progression of TD encephalopathy

Daily administration of pyriithiamine to WT mice fed a thiamine-deficient diet resulted in a reproducible progression of neurological symptoms starting after 10 days with decreased activity, rotational and/or backward movements, followed on day 12 by severe ataxia and opisthotonic episodes lasting for 18–24 h, and finally by complete loss of righting reflex (symptomatic stage). PFC animals in the WT and $\text{eNOS}^{-/-}$ groups showed no neurological symptoms by days 12–13 (time of killing). TD- $\text{eNOS}^{-/-}$ mice manifested a delay in the

onset and progression of neurological symptoms and at days 12–13 (time of killing), the righting reflex was intact in these mice. Brain samples of eNOS^{-/-} mice manifested no measurable amounts of eNOS protein by western blot analysis (data not shown).

Neuropathology

Histopathological evaluation of cresyl violet sections from TD-WT mice revealed extensive neuronal cell loss ($66 \pm 1\%$) in the medial thalamus of these mice. Hemorrhagic lesions were invariably seen in these sections. There was no neuronal cell loss and hemorrhage in the frontal cortex of TD-WT mice at equivalent time points to those used for analysis of thalamic material. Although present, neuronal cell loss was significantly attenuated (by 27%) in medial thalamus of TD-eNOS^{-/-} mice compared to TD-WT animals, and hemorrhagic thalamic lesions were almost completely prevented in these mice (Fig. 1).

eNOS gene deletion prevents oxidative/nitrosative stress in thalamic vessels of thiamine-deficient mice

Sections from the medial thalamus of TD-WT mice showed a marked increase in HO-1 immunoreactivity in microglia and vessel walls, and an increase in SNO-Cys adducts in the walls of large vessels and capillaries, compared to PFC-WT mice. However, HO-1 and SNO-Cys immunostaining was prevented in vessels of TD-eNOS^{-/-} mice, compared to TD-WT control mice (Fig. 2). No such increases in HO-1 and SNO-Cys immunoreactivity were observed in the frontal cortex of TD-WT mice or in the medial thalamus of PFC-eNOS^{-/-} mice (data not shown).

eNOS gene deletion prevents IgG extravasation in medial thalamus of thiamine-deficient mice

At symptomatic stages of encephalopathy, all TD-WT mice manifested significant extravasation of IgG in the medial thalamus, indicative of BBB breakdown. IgG extravasation in TD-eNOS^{-/-} mice was prevented (95% decrease), compared to TD-WT

mice (Fig. 3). No IgG extravasation was observed in the frontal cortex of TD-WT mice (data not shown).

eNOS gene deletion attenuates TD-induced alterations of occludin, ZO-1 and ZO-2 in medial thalamus of thiamine-deficient mice

Western blot analysis revealed that TD results in a significant loss of expression of the TJ protein occludin in medial thalamus. This loss was significantly attenuated in TD-eNOS^{-/-} mice compared to pair-fed controls values (Fig. 4a). Occludin expression in frontal cortex of thiamine-deficient mice was unaltered (data not shown). Immunohistochemical analysis showed alterations in occludin morphology in the medial thalamus of TD-WT mice, characterized by decreased and fragmented immunostaining compared to PFC mice, showing continuous strands of tight junctions between adjacent endothelial cells. eNOS gene deletion restored the normal appearance of occludin immunostaining in thalamic vessels of thiamine-deficient mice (Fig. 4b). Thiamine deficiency also resulted in a significant loss of expression of ZO-1 and ZO-2 in medial thalamus of WT mice compared to PFC values (Fig. 5). No such alterations of ZO-1 and ZO-2 expression were noted in frontal cortex of thiamine-deficient mice (data not shown). eNOS gene deletion resulted in complete normalization of expression levels of ZO-1 and ZO-2 in medial thalamus of thiamine-deficient mice (Fig. 5).

eNOS gene deletion prevents up-regulation of MMP-9 in medial thalamus of thiamine-deficient mice

Sodium dodecyl sulfate–polyacrylamide gel electrophoresis gelatin zymography analysis revealed that MMP-9 levels were increased 16-fold in medial thalamus of TD-WT mice, compared to PFC-WT values. Up-regulation of MMP-9 in medial thalamus was completely prevented by eNOS gene deletion in thiamine-deficient mice (Fig. 6a). Immunohistochemical analysis also showed a significant increase in MMP-9 immunoreactivity in endothelial and perivascular inflammatory cells in the medial thalamus of WT thiamine-deficient mice (Fig. 6b). eNOS gene deletion resulted in prevention of

MMP-9 increase in the medial thalamus of thiamine-deficient mice. MMP-9 immunoreactivity was not induced in the frontal cortex of thiamine-deficient mice (data not shown).

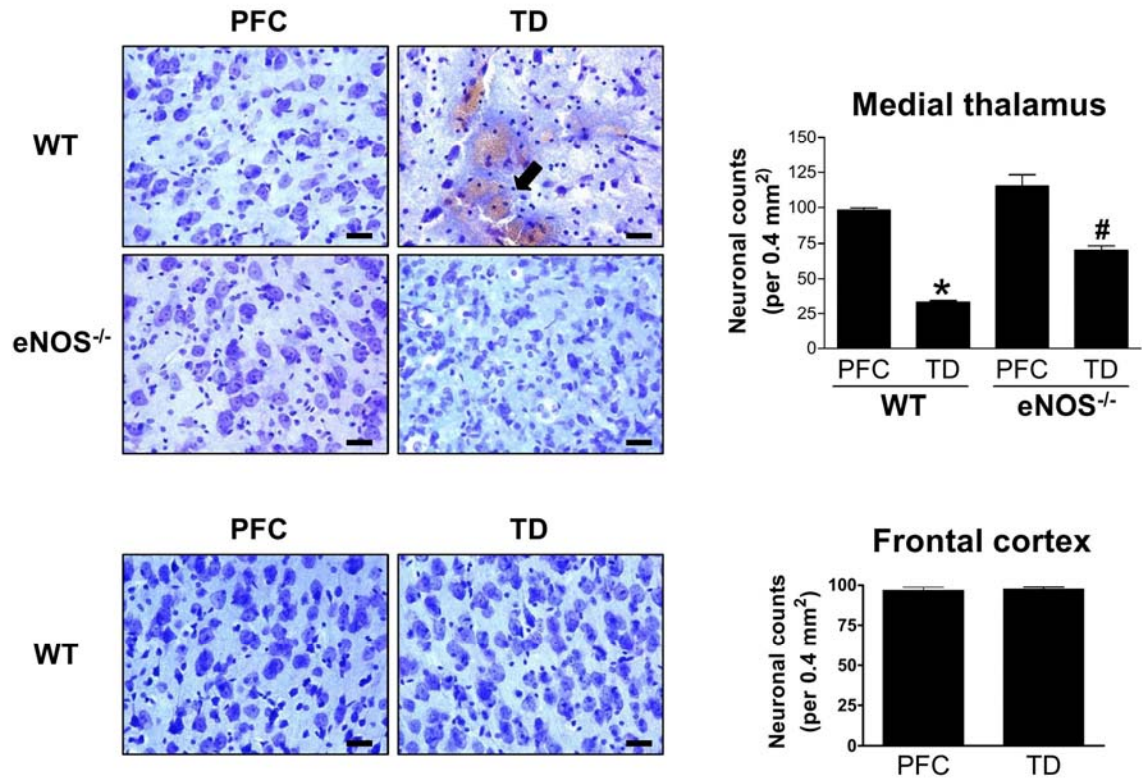


Figure 1. Attenuation of neuronal cell death in the medial thalamus of eNOS^{-/-} thiamine-deficient mice. Representative micrographs of cresyl violet staining showing haemorrhage (arrow) and extensive neuronal cell loss in the medial thalamus of a thiamine-deficient mouse (TD, right panels) from the WT (upper panels) group, compared to a paired control mouse (PFC) (left panels). Note the decrease in neuronal cell death and the absence of haemorrhage in the medial thalamus of a thiamine-deficient mouse from the eNOS^{-/-} group (middle panel), compared to the WT thiamine-deficient mouse. Note the absence of neuronal cell death and haemorrhage in the frontal cortex (spared region) of a WT thiamine-deficient mouse (lower panel). Neuronal counts per 4HPF (400X magnification) are expressed as mean \pm SEM of four animals in each group; * $p < 0.001$ vs. PFC-WT; # $p < 0.001$ vs. TD-WT (Scale bar: 40 μ m).

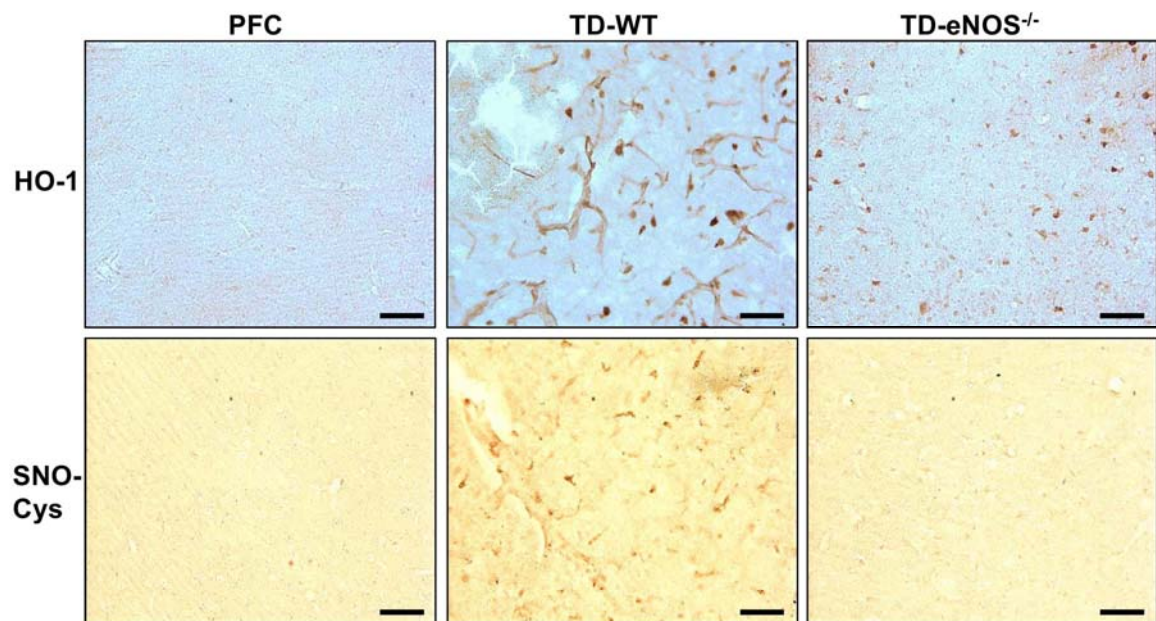


Figure 2. Prevention of oxidative/nitrosative stress in thalamic vessels of eNOS^{-/-} thiamine-deficient mice. Representative micrographs of HO-1 (upper panels) and SNO-Cys (lower panels) immunostaining in medial thalamus of a PFC (left panels) and a thiamine-deficient mouse from WT (middle panels) and eNOS^{-/-} (right panels) group. Note the intense HO-1 immunostaining in vessel walls and the increase in SNO-Cys adducts in walls of large vessels and capillaries of the TD-WT mouse, and the absence of HO-1 and SNO-Cys immunostaining in vessel walls of the TD-eNOS^{-/-} mouse (Scale bar: 100 μ m).

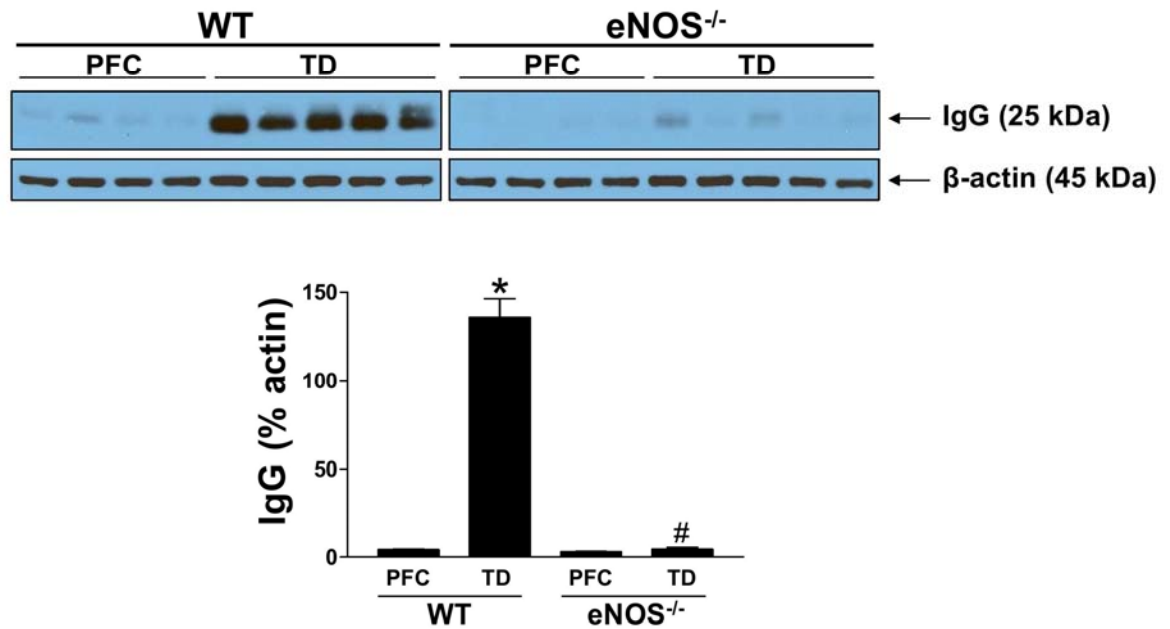


Figure 3. Prevention of IgG extravasation in the medial thalamus of $eNOS^{-/-}$ thiamine-deficient mice. Western blot analysis showing IgG extravasation in the medial thalamus of WT thiamine-deficient (TD) mice compared to PFC-WT controls, and prevention of IgG extravasation in $eNOS^{-/-}$ thiamine-deficient mice, compared to WT thiamine-deficient mice. Data are expressed as mean \pm SEM of four or five animals in each group; * $p < 0.001$ vs. PFC-WT; # $p < 0.001$ vs. TD-WT.

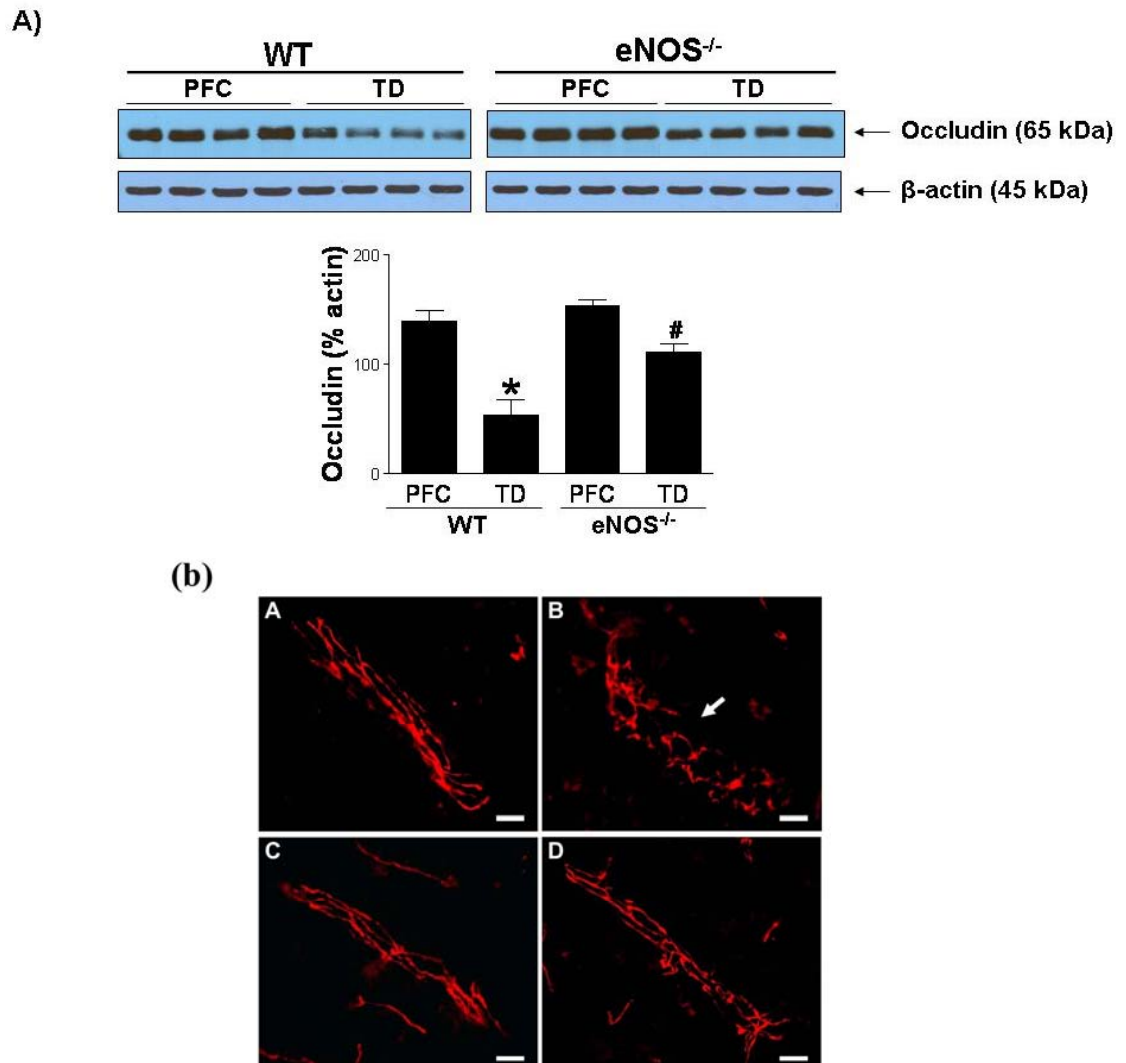


Figure 4. Attenuation of occludin alterations in medial thalamus of eNOS^{-/-} thiamine-deficient mice. (A) Western blot analysis showing loss of expression of occludin in the medial thalamus of WT thiamine-deficient (TD) mice, compared to PFC-WT mice, and attenuation of loss of occludin expression in eNOS^{-/-} thiamine-deficient mice, compared to WT thiamine-deficient mice. Data are expressed as mean \pm SEM of four animals in each group. * $p < 0.001$ vs. PFC-WT; # $p < 0.01$ vs. TD-WT. (B) Representative micrographs of occludin immunostaining showing decreased and fragmented occludin strands in the medial thalamus of a TD-WT mouse (arrow in B), compared to the normal occludin morphology appearing as continuous strands of tight junctions between adjacent endothelial cells as observed in the medial thalamus of a PFC-WT mouse (A). Note the normal appearance of occludin immunostaining in the medial thalamus of PFC and TD-eNOS^{-/-} mice (C and D, respectively) (Scale bar: 20 μ m).

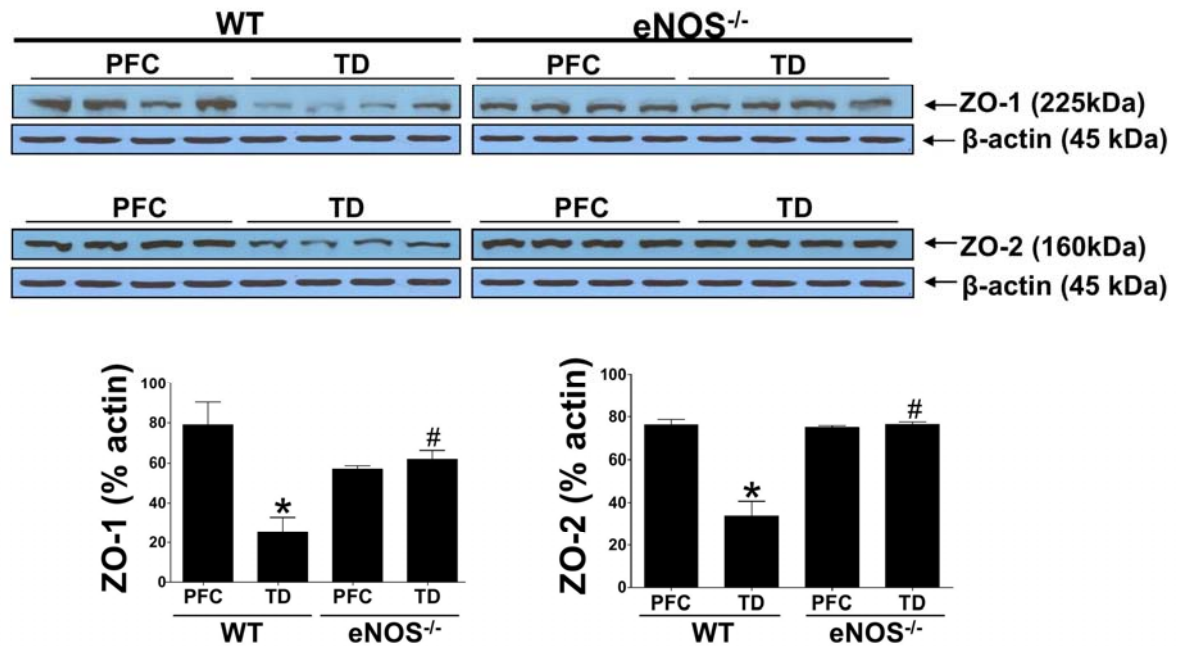
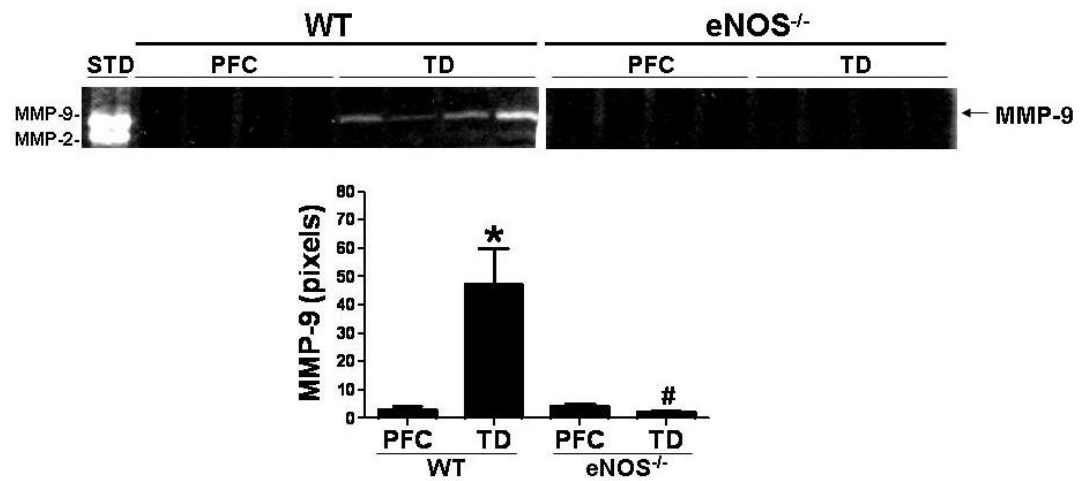


Figure 5. Prevention of loss of zonula occludens-1 and 2 expression in medial thalamus of eNOS^{-/-} thiamine-deficient mice. Western blot analysis showing loss of expression of ZO-1 (upper panel) and ZO-2 (lower panel) in the medial thalamus of WT thiamine-deficient (TD) mice, compared to PFC-WT controls, and prevention of loss of ZO-1 and -2 expression in eNOS^{-/-} thiamine-deficient mice, compared to WT thiamine-deficient mice. Data are expressed as mean \pm SEM of four animals in each group; * p < 0.001 vs. PFC-WT; # p < 0.05 vs. TD-WT (for ZO-1); # p < 0.001 vs. TD-WT (for ZO-2).



(b)

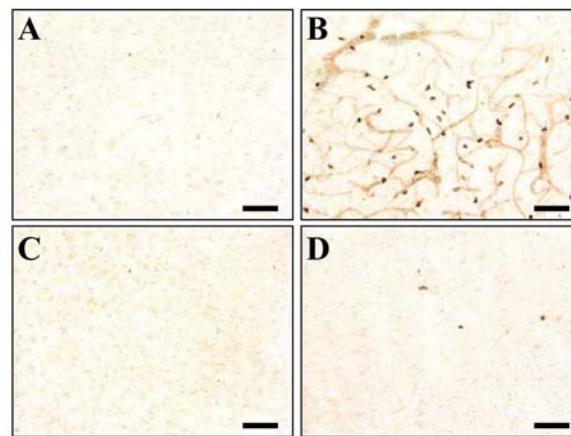


Figure 6. Prevention of matrix metalloproteinase-9 up-regulation in medial thalamus of eNOS^{-/-} thiamine-deficient mice. (A) Gelatin zymography showing induction of MMP-9 in the medial thalamus of WT thiamine-deficient (TD) mice, compared to PFC-WT mice, and the prevention of MMP-9 induction in eNOS^{-/-} thiamine-deficient mice, compared to WT thiamine-deficient mice. MMP-2 and MMP-9 standards (STD) served as positive controls. Data are expressed as mean \pm SEM of four animals in each group; * $p < 0.01$ vs. PFC-WT; # $p < 0.01$ vs. TD-WT. (B) Representative micrographs of MMP-9 immunostaining showing increased MMP-9 expression in endothelial and perivascular inflammatory cells in the medial thalamus of a TD-WT mouse (B), compared to a PFC-WT mouse (A). Note the absence of MMP-9 immunostaining in the medial thalamus of PFC and TD-eNOS^{-/-} mice (C and D, respectively), compared to the TD-WT mouse (Scale bar: 100 μ m).

Discussion

Results of the present study demonstrate that targeted disruption of the eNOS gene leads to significant attenuation of BBB disruption caused by TD. Improvement of barrier integrity was indicated by the almost complete prevention of hemorrhagic lesions and IgG extravasation in medial thalamus, a brain structure shown in previous and the present studies to be selectively vulnerable to TD. In addition to IgG extravasation, results of the present study reveal loss of expression and altered morphology of the TJ protein occludin and of the associated scaffolding proteins ZO-1 and ZO-2, in agreement with results of a previous study (Beauchesne et al. 2009). As was the case with IgG extravasation, eNOS gene deletion afforded a significant attenuation of the TD-related loss of occludin, and completely normalized the expression of ZO-1 and ZO-2 proteins. eNOS gene deletion also prevented alterations in occludin morphology in the medial thalamus of thiamine-deficient mice. Together, these results suggest a major role for eNOS-derived NO in TD-related alterations of BBB function.

Endothelial nitric oxide synthase expression is significantly increased in TD vulnerable areas (Calingasan et al. 1998; Kruse et al. 2004) and results of the present study reveal that eNOS gene deletion leads to a modest, but significant protection against neuronal cell loss, in agreement with the results of previous studies (Calingasan et al. 2000). Thus, rather than being neuroprotective as in other disorders such as cerebral ischemia, eNOS-derived NO is neurotoxic in TD. Moreover, while iNOS and nNOS gene deletion were shown previously to have no protective effect against neuronal cell loss, IgG extravasation or oxidative stress (Calingasan et al. 1999, 2000), the present study shows a significant protective effect of eNOS gene deletion, suggesting that eNOS is the NOS isoform mostly implicated in TD pathogenesis.

Endothelial nitric oxide synthase is known to be implicated in the regulation of cerebral blood flow. It could therefore be argued that eNOS^{-/-} mice used in this study could potentially manifest reductions in cerebral blood flow, leading to diminished entry of the thiamine antagonist pyriithiamine in the brain, attenuation of the loss of thiamine

diphosphate (TDP) levels and improvement of brain thiamine status, compared to WT mice. In order to address this issue, activity of transketolase, a TDP-dependent enzyme routinely used to measure thiamine status, was measured in the brains of thiamine-deficient WT and eNOS^{-/-} mice. No significant differences were observed in either TDP levels or transketolase activities in brains of eNOS^{-/-} thiamine-deficient mice, compared with the WT thiamine-deficient mice, confirming that protection is not the result of improvement of brain thiamine status.

Links between eNOS-derived NO and BBB disruption have been reported in other disorders such as experimental stroke, where eNOS inhibition resulted in reduction of BBB disruption (Han et al. 2006). Although excess NO may directly alter the BBB (Heo et al. 2005), a common mechanism that relates NO to BBB disruption involves oxidative/nitrosative stress. Indeed, peroxynitrite, the reaction product of NO and superoxide, was observed in free radical mediated-endothelial permeability changes in an in vitro study using endothelial cells obtained from CuZn-SOD-transgenic mice (Imaizumi et al. 1996) and in relation to BBB damage in animal models of stroke (Han et al. 2006), excitotoxicity (Parathath et al. 2006) and CNS inflammation (Phares et al. 2007). Oxidative/nitrosative stress has previously been reported in brain in TD (Langlais et al. 1997; Calingasan et al. 1998; Kruse et al. 2004). In the present study, we show that oxidative/nitrosative stress occurs in cerebral thalamic vessels in TD consisting of increased HO-1 and SNO-Cys immunostaining of cerebrovascular endothelial cells. Moreover, eNOS gene deletion prevented these increases in oxidative/nitrosative stress markers. A similar observation was reported earlier where TD-induced increase in nitrotyrosine, another nitrosative stress marker, was significantly attenuated by eNOS gene deletion (Beauchesne et al. 2007). Together, these results suggest that in the medial thalamus of thiamine-deficient mice, eNOS-derived cerebrovascular oxidative/nitrosative stress plays a significant role in the pathogenesis of BBB alterations.

Selective increases in expression of eNOS in thalamus because of TD could also involve the histamine system. Histamine causes increased NO production in cerebrovascular endothelial cells and causes increased BBB permeability (Sarker and

Fraser 2002; Yamauchi et al. 2007) and increased histamine levels have been described in thalamus of thiamine-deficient animals (Langlais et al. 1994).

Another possible mechanism linking eNOS-derived NO to BBB disruption involves MMP-9. MMPs are a family of zinc-dependent endopeptidases that digest almost all extracellular matrix molecules. MMP-9 plays a key role in the degradation of vascular extracellular matrix, and is a well known mediator of BBB disruption (Rosenberg and Yang 2007). NO up-regulates MMP-9 by multiple mechanisms including S-nitrosylation (Gu et al. 2002), an action of NO on MMP-9 mRNA (Akool et al. 2003) as well as actions at the transcriptional (Marcet-Palacios et al. 2003) and post-transcriptional (Gum et al. 1996) levels. A recent report described increased MMP-9 expression in endothelial and perivascular inflammatory cells in the medial thalamus in TD (Beauchesne et al. 2009). In the present study, we show that eNOS gene deletion prevented MMP-9 induction in the medial thalamus of thiamine-deficient mice, suggesting that eNOS-induced upregulation of MMP-9 also contributes to BBB alterations in TD. S-nitrosylation of MMP-9 by eNOS-derived NO offers a plausible explanation for its up-regulation in endothelial cells in TD; this issue merits further study.

The present observations of a major protective effect of eNOS gene deletion on BBB disruption but more modest attenuation of neuronal cell death in the same brain structure of thiamine-deficient animals suggest that BBB breakdown is not obligatory for selective neuronal cell death in TD and that other pathophysiological mechanisms such as NMDA excitotoxicity or lactate acidosis may also be implicated. Sustained HO-1 immunoreactivity in microglial cells, despite eNOS gene deletion, suggests that microglial activation and neuroinflammation may also contribute to neuronal cell death in TD. The notion of distinct mechanisms to explain BBB breakdown and neurodegeneration is in line with findings of a previous study in a mouse model of excitotoxicity, where eNOS gene deletion prevented BBB breakdown but not neuronal cell loss (Parathath et al. 2007).

In conclusion, although the precise mechanism by which brain thiamine depletion induces region-selective eNOS expression in TD is not clear, the present study shows that

eNOS-derived NO, through oxidative/nitrosative stress and MMP-9 pathways, is a critical factor leading to cerebrovascular endothelial alterations in thiamine deficiency encephalopathy.

Acknowledgements

This study was supported by grants from the Canadian Institutes of Health Research. EB is recipient of a research scholarship from the University of Montreal.

References

Akool el S., Kleinert H., Hamada F.M., Abdelwahab M.H., Forstermann U., Pfeilschifter J. and Eberhardt W. (2003) Nitric oxide increases the decay of matrix metalloproteinase 9 mRNA by inhibiting the expression of mRNA-stabilizing factor HuR. *Mol. Cell. Biol.* 23, 4901–4916.

Beauchesne E., Desjardins P., Montgomery J.A. and Butterworth R.F. (2007) Contribution of cerebral vascular endothelium to the pathophysiology of Wernicke's encephalopathy. *J. Neurochem.* 102 (Suppl.1), 165-235.

Beauchesne E., Desjardins P., Hazell A.S. and Butterworth R.F. (2009) Altered expression of tight junction proteins and matrix metalloproteinases in thiamine-deficient mouse brain. *Neurochem. Int.* 55, 275-281.

Calingasan, N.Y., Baker, H., Sheu, K.R. and Gibson, G.E. (1995) Blood-brain barrier abnormalities in vulnerable brain regions during thiamine deficiency. *Exp. Neurol.* 134, 64-72.

Calingasan N.Y., Park L.C., Calo L.L., Trifiletti R.R., Gandy S.E. and 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, 599-610.

Calingasan N.Y., Chun W.J., Park L.C., Uchida K. and Gibson G.E. (1999) Oxidative stress is associated with region-specific neuronal death during thiamine deficiency. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* 58, 946-958.

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, 207-217.

Gu Z., Kaul M., Yan B., Kridel S.J., Cui J., Strongin A., Smith J.W., Liddington R.C. and Lipton S.A. (2002) S-nitrosylation of matrix metalloproteinases: signaling pathway to neuronal cell death. *Science* 297, 1186-1190.

Gum R., Lengyel E., Juarez J., Chen J.H., Sato H., Seiki M. and Boyd D. (1996) Stimulation of 92-kDa gelatinase B promoter activity by ras is mitogen-activated protein kinase kinase 1-independent and requires multiple transcription factor binding sites including closely spaced PEA3/ets and AP-1 sequences. *J. Biol. Chem.* 271, 10672-10680.

Han F., Shirasaki Y. and Fukunaga K. (2006) Microsphere embolism-induced endothelial nitric oxide synthase expression mediates disruption of the blood-brain barrier in rat brain. *J. Neurochem.* 99, 97-106.

Harata N. and Iwasaki Y. (1995) Evidence for early blood-brain barrier breakdown in experimental thiamine deficiency in the mouse. *Metab. Brain Dis.* 10, 159-174.

Harper C. and Butterworth R.F. (1997) Nutritional and metabolic disorders. In: *Greenfield's Neuropathology*. 6th edition,. Lantos P, Graham D (Eds) Edward Arnold, Cambridge. pp. 601-655.

Heo J.H., Han S.W. and Lee S.K. (2005) Free radicals as triggers of brain edema formation after stroke. *Free Radic. Biol. Med.* 39, 51-70.

Heroux, M., Butterworth, R.F., 1992. Animal models of the Wernicke-Korsakoff syndrome. In: Boulton, A., Baker, G.B. Butterworth, R.F., (Eds.) *Animal models of Neurological Disease*. Humana Press, Totowa, NJ, pp. 95-131.

Imaizumi S., Kondo T., Deli M.A., Gobbel G., Joo F., Epstein C.J., Yoshimoto T. and Chan P. H. (1996). The influence of oxygen free radicals on the permeability of the monolayer of cultured brain endothelial cells. *Neurochem. Int.* 29, 205-211.

Kruse M., Navarro D., Desjardins P. and Butterworth R.F. (2004) Increased brain endothelial nitric oxide synthase expression in thiamine deficiency: relationship to selective vulnerability. *Neurochem. Int.* 45, 49-56.

Langlais P.J., Anderson G., Guo S.X. and Bondy S.C. (1997) Increased cerebral free radical production during thiamine deficiency. *Metab. Brain Dis.* 12, 137-143.

Langlais P.J., Zhang S.X., Weilersbacher G., Hough L.B. and Barke K.E. (1994) Histamine-mediated neuronal death in a rat model of Wernicke's encephalopathy. *J. Neurosci. Res.* 38, 565-574.

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.

Marcet-Palacios M., Graham K., Cass C., Befus A.D., Mayers I. and Radomski M.W. (2003) Nitric oxide and cyclic GMP increase the expression of matrix metalloproteinase-9 in vascular smooth muscle. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 307, 429–436.

Parathath S.R., Parathath S. and Tsirka S.E. (2006) Nitric oxide mediates neurodegeneration and breakdown of the blood-brain barrier in tPA-dependent excitotoxic injury in mice. *J. Cell Sci.* 119, 339-349.

Parathath S.R., Gravanis I. and Tsirka S.E. (2007) Nitric oxide synthase isoforms undertake unique roles during excitotoxicity. *Stroke* 38, 1938-1945.

Paxinos G. and Franklin K.B.J. (2003) *The mouse brain in stereotaxic coordinates* (2nd edition). Academic Press, New York.

Phares T.W., Fabis M.J., Brimer C.M., Kean R.B. and Hooper D.C. (2007) A peroxynitrite-dependent pathway is responsible for blood-brain barrier permeability changes during a central nervous system inflammatory response: TNF-alpha is neither necessary nor sufficient. *J. Immunol.* 178, 7334-7343.

Rosenberg G.A. and Yang Y. (2007) Vasogenic edema due to tight junction disruption by matrix metalloproteinases in cerebral ischemia. *Neurosurg. Focus.* 22, E4.

Sarker M.H. and Fraser P.A. (2002) The role of guanylyl cyclases in the permeability response to inflammatory mediators in pial venular capillaries in the rat. *J. Physiol.* 540, 209-218

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

Yamauchi A., Dohgu S., Nishioku T., Shuto H., Naito M., Tsuruo T., Sawada Y. and Kataoka Y. (2007) An inhibitory role of nitric oxide in the dynamic regulation of the blood-brain barrier function. *Cell. Mol. Neurobiol.* 27, 263-270.

II.3. Troisième article :

**Up-regulation of caveolin-1 and blood-brain barrier
breakdown are attenuated by *N*-acetylcysteine
in thiamine deficiency**

Neurochem. Int. 57: 830-837, 2010

**Up-regulation of caveolin-1 and blood-brain barrier
breakdown are attenuated by *N*-acetylcysteine in
thiamine deficiency**

Élizabeth Beaudesne, Paul Desjardins, Roger F. Butterworth, Alan S. Hazell

Neuroscience Research Unit, Saint-Luc Hospital (C.H.U.M.), Montreal,
Quebec, Canada

Corresponding author:

Alan S. Hazell, Ph.D., D.Sc.
Neuroscience Research Unit,
CHUM, Campus Saint-Luc,
University of Montreal,
1058 St-Denis Street, Montreal,
Quebec, Canada, H2X 3J4.
Tel: +1 514 890 8000, Ext. 35740/35758
Fax: +1 514 412 7737

Contribution de chaque auteur aux travaux de recherche présentés dans le présent article

Élizabeth Beauchesne a conçu les plans expérimentaux et exécuté toutes les expériences ainsi que l'analyse des données requises. Elle a également rédigé la totalité du manuscrit. Le Dr Paul Desjardins et le Dr Roger F. Butterworth, directeur de recherche, ont participé à la critique du manuscrit. Le Dr Alan S. Hazell, co-directeur de recherche, a participé à la révision du manuscrit.

ABSTRACT

Wernicke's encephalopathy is a cerebral metabolic disorder caused by thiamine (vitamin B₁) deficiency (TD). Neuropathologic consequences of TD include region-selective neuronal cell loss and blood-brain barrier (BBB) breakdown. Caveolin-1 is involved in the regulation of tight junction proteins and BBB permeability, and is modulated by oxidative stress, a feature of vulnerable brain regions in TD. We hypothesized that TD-related oxidative stress alters BBB integrity via induction of the caveolin-1 pathway. TD was induced in C57BL6 mice by treatment with a thiamine-deficient diet and administration of the thiamine antagonist pyrithiamine, in the absence or presence of the antioxidant *N*-acetylcysteine (NAC). A significant and focal increase in both caveolin-1 gene and protein expression was detected in the thalamus of thiamine-deficient mice, concomitant with IgG extravasation. Reduction of oxidative stress by NAC, as shown by normalization of reduced glutathione levels and attenuation of endothelial heme oxygenase-1 and nitric oxide synthase expression, resulted in prevention of the upregulation of caveolin-1 in TD. Normalization of caveolin-1 levels by NAC was accompanied by a reduction in BBB breakdown, indicated by decreased IgG extravasation, normalization of occludin levels and prevention of matrix metalloproteinase-9 up-regulation. These findings demonstrate a role for caveolin-1 in TD pathogenesis, and suggest that oxidative stress contributes to BBB alterations in TD via modulation of this pathway.

Keywords: thiamine deficiency, *N*-acetylcysteine, oxidative stress, blood-brain barrier, caveolin-1, Wernicke's encephalopathy

Running title: Caveolin-1 in thiamine deficiency

Thiamine, or vitamin B₁, plays a key role in energy metabolism. Thiamine deficiency (TD) results in Wernicke's encephalopathy (WE), in which region-specific structural lesions occur in well-defined areas of the diencephalon and brainstem (Harper and Butterworth, 1997). Animal models of TD recapitulate the neuropathological features of WE (Troncoso et al., 1981; Héroux and Butterworth, 1992), with vulnerable areas displaying neuronal cell loss, petechial hemorrhages (Vortmeyer and Colmant, 1988) and blood–brain barrier (BBB) breakdown, which was shown to represent an important early event preceding the onset of neuronal cell death in thiamine-deficient mice (Harata and Iwasaki, 1995) and rats (Calingasan et al., 1995). In cases of WE, spongiform-like lesions are also observed in the brain (Helbok et al., 2008; Shin et al., 2009), with vacuolation of the neuropil often being present, indicative of enlargement of the extracellular space due to vasogenic edema following BBB breakdown.

Impaired oxidative metabolism, an important feature of TD, is associated with many cerebral disorders in which BBB dysfunction occurs, including stroke (Siesjö, 1992; Klatzo, 1983), Alzheimer's disease (Héroux et al., 1996; Gibson et al., 1997; Bell and Zlokovic, 2009) and Parkinson's disease (Murphy, 2009; Farkas et al., 2000). Thus, understanding the nature of the increased BBB permeability in TD may yield important new insight into the pathophysiology of these illnesses. BBB dysfunction in TD is accompanied by alterations of tight junction (TJ) proteins such as occludin, with matrix metalloproteinase-9 (MMP-9) being involved in this process (Beauchesne et al., 2009a). Free radicals are well-known mediators of BBB damage (Heo et al., 2005; Zlokovic, 2008), and are believed to contribute to TD-related BBB perturbations (Langlais et al., 1997; Calingasan and Gibson, 2000; Hazell and Butterworth, 2009). Indeed, a recent report has demonstrated that endothelial nitric oxide synthase (eNOS)-derived oxidative/nitrosative stress is associated with BBB alterations in TD (Beauchesne et al., 2009b). However, the exact mechanism by which oxidative stress alters the BBB in TD is unknown.

Caveolae, abundant in endothelial cells, is emerging as an important specialized membrane-associated organelle that has vital functions in diverse cellular processes such as

cholesterol regulation, cellular signaling and endothelial transcytosis and endocytosis. Caveolin-1, the major protein component of caveolae, is thought to mediate these functions (Parton and Simons, 2007). A recent study has shown that BBB TJ proteins were located in caveolae and that they physically interact with caveolin-1, suggesting a role for caveolin-1 in the spatial organization and regulation of the TJ proteins and BBB permeability (McCaffrey et al., 2007). The role of caveolin-1 in TJ protein alterations and BBB breakdown in brain injury remains controversial, but recent reports have demonstrated that caveolin-1 may act as a damaging molecule for the BBB in some brain disorders such as cortical cold injury (Nag et al., 2007) and cerebral AIDS (Zhong et al., 2008). Furthermore, increasing evidence show that oxidative stress modulates caveolin-1 expression and function (Parat and Fox, 2004).

The goal of the present study is to evaluate whether caveolin-1 plays a role in TD pathophysiology, and if oxidative stress could alter the BBB in TD via modulation of this pathway. For this purpose we first evaluated caveolin-1 gene and protein expression during progression of TD encephalopathy in the thalamus of thiamine-deficient mice, compared to the frontal cortex, a relatively spared area to TD. We then used the antioxidant *N*-acetylcysteine (NAC) to assess the effect of reduced oxidative stress on caveolin-1 levels, in relation to parameters of BBB integrity, including levels of brain IgG extravasation and expression of occludin and MMP-9 in the thalamus of thiamine-deficient mice. NAC is a widely used antioxidant that acts as a donor of L-cysteine, the precursor for glutathione synthesis in astrocytes, which results in an improved tissue antioxidant status. It readily crosses the BBB and has been used successfully as a neuroprotective drug to restore brain glutathione content and to suppress oxidative stress in a wide range of cerebral disorders such as subarachnoid hemorrhage (Lu et al., 2009), experimental Parkinson's disease (Aoyama et al., 2008), traumatic brain injury (Xiong et al., 1999) and experimental Alzheimer's disease (Fu et al., 2006). In addition, NAC was previously shown to provide significant neuroprotection in thiamine-deficient animals (Hazell and Wang, 2005).

2. Materials and methods

2.1. Model of thiamine deficiency

Twelve weeks old male C57BL/6 mice (Charles River Laboratories, St-Constant, Quebec) were used for all experiments. Mice were housed individually under constant conditions of temperature, humidity and 12h light/dark cycles and had free access to water at all times. Mice were allowed to adapt to their environment for at least 3 days prior the initiation of treatments. Principles of laboratory animal care were followed, and all experimental procedures were approved by the Animal Ethics Committee of the University of Montreal.

Mice were randomly assigned to either pair-fed control (PFC), thiamine-deficient at the presymptomatic stage (PS), thiamine-deficient at the symptomatic stage (TD), or thiamine-deficient treated with the antioxidant NAC (TD+NAC) groups. Mice in the thiamine-deficient groups (PS, TD and TD+NAC) were fed a thiamine-deficient diet (ICN Nutritional Biochemicals, Cleveland, OH) and administered daily pyriethiamine hydrobromide (Sigma-Aldrich, St-Louis, MO) (0.5 mg/kg body weight, i.p.). PFC mice were pair-fed to equal food consumption with those of the TD group using the same thiamine-deficient diet and supplemented with daily injections of thiamine (0.1 mg/kg body weight, i.p.). TD+ NAC mice were additionally treated with daily injections of NAC (163 mg/kg body weight, i.p.). Treatments were continued until mice from the TD group displayed a loss of righting reflex. For the purpose of the present study, this stage was defined as the symptomatic stage of encephalopathy. TD+NAC mice were pair-sacrificed with the TD mice. Mice from the PS group were sacrificed at day 10, before the onset of neurological symptoms; this stage was defined as the presymptomatic stage of encephalopathy. Any mice exhibiting spontaneous seizures were eliminated from the protocols.

2.2. RNA extraction

Total RNA extraction was performed on samples of medial thalamus using TRIzol reagent (Invitrogen Canada, Burlington, ON), according to the manufacturer's protocol.

Putative contaminating DNA was eliminated by adding 100 U of RNase-free DNase I per 50 µg of total RNA at 37°C for 1 h. Purified RNA was then extracted with phenol, precipitated with ethanol and resuspended in diethylpyrocarbonate-treated water. RNA samples were kept at -80°C until use.

2.3. Semi-quantitative RT-PCR analysis

Expression of caveolin-1 mRNA was investigated by one-step semi-quantitative reverse transcription-polymerase chain reaction. 18S rRNA was used as an internal standard to monitor loading variations. Total RNA (1 µg) was mixed with 10 mM Tris-HCl (pH 8.3), 1.5 mM MgCl₂, 50 mM KCl, 0.01% (w/v) bovine serum albumin, 200 µM dNTPs, primers at 1 µM each, AMV reverse transcriptase (80 U/ml), *Taq* DNA polymerase (20 U/ml) and 50 µCi/ml [α ³²P]dCTP (3000 Ci/mmol), for a total reaction volume of 50 µL. The reactions were initially heated at 50°C for 20 min followed by PCR at 95°C for 30 sec, 60°C for 45 sec and 72°C for 1 min. Amplification efficiency conditions were determined after a kinetic study to ensure all experiments were performed in the exponential phase of amplification where PCR products remain proportional to initial template concentration (data not shown). 18S rRNA and caveolin-1 were amplified for 14 and 24 cycles, respectively. After amplification, samples were electrophoresed onto 9% polyacrylamide gels, dried, autoradiographed at -80°C with an intensifying screen. Each band was excised and Cerenkov radiation was quantified using a β -counter. Omission of AMV reverse transcriptase from the reaction mixture was used as negative control and resulted in absence of amplification.

Oligonucleotide primers were designed using the PRIMER3 program (Rozen and Skaletsky, 2000) at <http://primer3.sourceforge.net/> based on the following GeneBank accession numbers: X00686 (18S rRNA, Raynal et al., 1984) and U07645 (caveolin-1, Tang et al., 1994). The forward and reverse oligonucleotide primer sequences were as follows:

5'-GGGGAGGTAGTGACGAAAATA-3' and 5'-GGGACACTCAGCTAAGAGCATC-3' (18S rRNA, 280bp); 5'-GATTGCAGAACCAGAAGGGA-3' and 5'-AGCTTCAAAGAGTGGATCGC-3'

(caveolin-1, 274bp). The specificity of the oligonucleotide primers was verified using the program BLASTN (National Center for Biotechnology Information, Bethesda, MD).

2.4. Histopathology and immunohistochemistry

A first set of mice from the PFC, TD and TD+NAC groups (n = 4) were used for histopathologic and immunohistochemical studies. These mice were anaesthetized with a ketamine/xylazine cocktail (50 and 9 mg/kg, respectively) and perfused transcardially with 50 ml of saline followed by 100 ml of neutral-buffered formalin containing 4% formaldehyde, 0.5% sodium phosphate buffer, 1.5% methanol and 0.02% glutaraldehyde, pH 7.0 (Fisher Scientific, Fair Lawn, NJ). Brains were then removed and post-fixed 24 h in the same solution. Free-floating 50 μ m coronal sections were cut using a sectioning vibratome at the level of the medial thalamus and the frontal cortex.

For HO-1, MMP-9 and caveolin-1 immunohistochemistry, sections were first mounted on slides. For MMP-9 antigen retrieval, sections were boiled in a microwave for 10 min in 10 mM citrate buffer pH 6.0. Endogenous peroxidase activity was blocked in sections by means of 0.3% H₂O₂ in methanol for 15 min at room temperature and then washed with PBS. The non-specific binding sites were blocked using 10% normal goat or rabbit serum in 0.2% Triton X-100/PBS for 30 min. The sections were then incubated overnight with rabbit anti-HO-1 (1:2000, Assay Designs, Ann Arbor, MI), anti-caveolin-1 (1:125, Cell Signaling, Danvers, MA) and goat anti-MMP-9 (pro and active forms, 0.5 μ g/ml, R&D systems, Minneapolis, MN) polyclonal antibodies at 4°C. After washing in PBS, sections were incubated with biotinylated goat anti-rabbit or rabbit anti-goat IgG secondary antibody (1:200, Vector Laboratories, Burlingame, CA), followed by incubation with ABC reagent (Vector Laboratories, Burlingame, CA). Immunoreactivity was subsequently detected by incubation with 3,3'-diaminobenzidine (DAB) containing urea hydrogen peroxide (Sigma-Aldrich, St-Louis, MO). For caveolin-1, DAB containing metal (cobalt) was used to enhance the reaction (Sigma-Aldrich, St-Louis, MO). Sections were dehydrated in ethanol, cleared with xylene and processed for examination. Sections without primary antibodies were used as negative controls and showed no immunoreactivity.

2.5. *Glutathione fluorometric assay*

For glutathione assay, mice (each group, n = 5) were sacrificed by decapitation, the brains were promptly removed, flash frozen in isopentane on dry ice and stored at -80°C . The medial thalamus was dissected on ice according to the mouse brain atlas of Paxinos and Franklin (2003). Reduced glutathione (GSH) levels were measured using a glutathione assay kit, according to the manufacturer's protocol (cat.# K264-100, BioVision, Mountain View, CA). Briefly, medial thalamus samples were homogenized at 4°C in glutathione assay buffer (1:5) and centrifuged at 12,000g for 10 min. 20 μl of perchloric acid (PCA) was added to 60 μl of supernatant for protein removal and GSH stabilization. After 5 min. of centrifugation at 12,000 g, 20 μl of KOH was added to 40 μl of supernatant to neutralize the samples. After 5 min. of centrifugation at 12,000 g, 30 μl of supernatant was taken for the assay. Sample volume and GSH standard volume were completed to 90 μl with assay buffer, then 10 μl of o-phthalaldehyde (OPA) probe, which reacts specifically with GSH, was added to the wells in a dark room. After 40 min. of incubation under agitation, fluorescence was measured using a microplate reader at Ex/Em of 340/450 nm. Values were expressed as nmol of GSH/mg of total protein.

2.6. *Western blotting*

Membrane protein fractions from medial thalamus (15–100 μg protein equivalent) were solubilized in Laemmli buffer (50 mM Tris-HCl, pH 6.8, 10% glycerol, 2% sodium dodecyl sulfate, 0.1 M dithiothreitol, 0.1% bromophenol blue) and boiled for 5 min. Proteins were resolved on 7.5-12% denaturing SDS-polyacrylamide gels and transferred overnight at 4°C to PVDF membranes (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA). Membranes were blocked by incubation for 1 h at room temperature in Tris buffered saline containing 0.05% Tween 20 (TBST) and 5% dried milk then incubated for 1 h with rabbit polyclonal antibodies directed against occludin (1 $\mu\text{g}/\text{ml}$), caveolin-1 (1/1000) and mouse monoclonal antibody directed against eNOS (1:1000, BD Biosciences, Mississauga, ON) and β -actin (1/100 000, Sigma-Aldrich, St-Louis, MO). Membranes were washed several times with

TBST and incubated for 1 h with an anti-rabbit or anti-mouse horseradish peroxidase (HRP)-conjugated secondary antibody (Perkin-Elmer Life Sciences, Boston, MA). After extensive washing with TBST, peroxidase activity was detected by enhanced chemiluminescence using the ECL detection system (Amersham, Arlington Heights, IL). Intensity of the bands was measured by densitometry using quantified using Quantity-One software (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA). Results are expressed as percentage of the housekeeping protein β -actin to normalize for loading variations.

2.7. IgG extravasation

Assessment of IgG extravasation was performed, with modifications, according to the protocol of Calingasan et al. (1995). Ten micrograms of cytosolic protein fractions from medial thalamus samples were solubilized in Laemmli buffer and boiled for 5 min. Proteins were resolved on 9% denaturing SDSpolyacrylamide gels and transferred overnight at 4°C to PVDF membranes. Membranes were blocked by incubation for 1 h at room temperature in Tris buffered saline containing 0.05% Tween 20 (TBST) and 5% dried milk then incubated for 1 h with an anti-mouse-horseradish peroxidase (HRP)-conjugated secondary antibody (1:3000, Perkin-Elmer Life Sciences). After extensive washing with TBST, peroxidase activity was detected by enhanced chemiluminescence using ECL detection system (Amersham). Intensity of the bands (IgG light chain) was measured by densitometry using Quantity One software (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA). The housekeeping protein β -actin was used to normalize for loading variations.

2.8. SDS-PAGE gelatin zymography

This assay detects both MMP-9 and MMP-2 gelatinases. Twenty micrograms of protein samples (cytosolic fraction) were electrophoresed at 4°C in 10% SDS-PAGE containing 1 mg/ml of gelatin (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA). Mixtures (1.5 ng) of recombinant MMP-9 and MMP-2 (US Biological, Cleveland, OH) were used as standards. The gels were processed, incubated in 2.5% triton X-100 for 1 h, incubated in a zymogen buffer (50 mM Tris pH 7.4, 5 mM CaCl₂, 200 mM NaCl, 0.02% Brij.35) at 37°C for 40 h,

stained with 0.5% Coomassie Blue R-250 for 3 h, and destained with three changes of 30% methanol, 10% acetic acid (for 15, 30, and 60 min of destain time, respectively, for each change). Finally, gels were incubated for 15 min in 30% methanol, 5% glycerol prior to drying between sheets of cellophane. Dried gels were scanned and the bands of activity were quantified using Quantity One software (Bio-Rad laboratories, Hercules, CA). Gelatinase activity presents as a clear band against a dark background.

2.9. Protein extraction

Tissue samples were homogenized at 4°C in 50 mM Tris-HCl buffer pH 7.4, containing a protease inhibitor cocktail (Sigma-Aldrich, St-Louis, MO) using a Potter-Elvehjem tissue homogenizer. After centrifugation at 12,000g for 45 min, membranes were separated from the cytosolic fraction, washed in the same buffer and stored at -80°C. Protein concentrations were estimated using a protein assay kit (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA) with bovine serum albumin as standard.

2.10. Statistical analysis

Data are expressed as mean \pm SEM values. Statistical analysis was performed using One-way ANOVA followed by post-hoc Tukey test to establish significance for multiple group comparisons. A probability of $p < 0.05$ was chosen to establish significance between groups. Data were analyzed using Prism 4.0 software (GraphPad Software, Inc., San Diego, CA).

3. Results

3.1. Progression of TD encephalopathy

Daily administration of pyriithiamine to mice fed a thiamine-deficient diet resulted in a reproducible progression of neurological symptoms starting after 10 days with decreased activity, rotational and/or backward movements, followed on day 12 by severe ataxia and opisthotonic episodes lasting for 18-24 h, and finally by complete loss of

righting reflex (symptomatic stage). PS animals showed no neurological symptoms by the time of sacrifice (day 10). PFC animals showed no neurological symptoms by days 12-13 (time of sacrifice). TD+NAC mice manifested a delay in the onset (i.e. 18 ± 6 h compared with the TD mice group) and progression of neurological symptoms and at days 12-13 (time of sacrifice), the righting reflex was intact in these animals.

3.2. Focal up-regulation of caveolin-1 in the thalamus of thiamine-deficient mice

Western blot analysis revealed a significant increase in caveolin-1 protein levels in the thalamus of thiamine-deficient mice in the symptomatic group (Fig. 1A), compared to PFC mice. In contrast, no significant change in levels of caveolin-1 was detected in the frontal cortex. Consistent with these results, immunohistochemical analysis showed a major increase in caveolin-1 immunostaining in the endothelium of vessels of the thalamus of TD mice compared to PFC animals, an increase which was not observed in the frontal cortex (Fig. 1B). Semi-quantitative RT-PCR analysis also revealed a small but significant increase in caveolin-1 gene expression in the thalamus of thiamine-deficient mice at the PS and symptomatic stage of TD (Fig. 2).

3.3. NAC prevents up-regulation of caveolin-1 in the thalamus of thiamine-deficient mice

RT-PCR analysis revealed that the slight increase observed in caveolin-1 mRNA levels in the thalamus of thiamine-deficient (TD) mice is prevented by NAC treatment (Fig. 2). In addition, immunohistochemical analysis revealed that the increase in caveolin-1 protein in TD is blocked by NAC (Fig. 3A). Consistent with these results, western blotting also confirmed that upregulation of caveolin-1 protein levels is prevented by NAC (Fig. 3B).

3.4. NAC attenuates oxidative stress in the thalamus of thiamine-deficient mice

TD treatment resulted in oxidative stress and was detected as a significant decrease in GSH content in the thalamus of TD mice, compared to PFC mice (Fig. 4A). In addition, eNOS and endothelial HO-1 protein content were increased. Perivascular HO-1 staining

cells were also observed. NAC treatment restored GSH levels to control values, attenuated eNOS levels and prevented HO-1 elevation in this brain region in thiamine-deficient mice (Fig. 4B and C).

3.5. NAC attenuates BBB breakdown in the thalamus of thiamine-deficient mice

All mice in the TD group manifested considerable IgG extravasation in the thalamus, compared to PFC mice, indicative of severe BBB breakdown. IgG extravasation in the thalamus of TD + NAC mice was significantly attenuated compared to the TD mice (Fig. 5A). There was no IgG extravasation in the thalamus of the PS group, at day 10 of TD. TD also led to a loss in occludin protein, but NAC administration normalized occludin levels in the thalamus of TD mice, compared to TD animals in the absence of antioxidant treatment (Fig. 5B). In addition, SDS-PAGE gelatin zymography analysis revealed a significant increase in MMP-9 levels in the thalamus of TD mice, compared to PFC mice. This upregulation of MMP-9 was completely prevented by NAC (Fig. 6A). Immunohistochemical assessment showed the increase in MMP-9 immunoreactivity to be localized to endothelial and perivascular cells in the thalamus (Fig. 6B). NAC treatment completely blocked these MMP-9 changes (Fig. 6B).

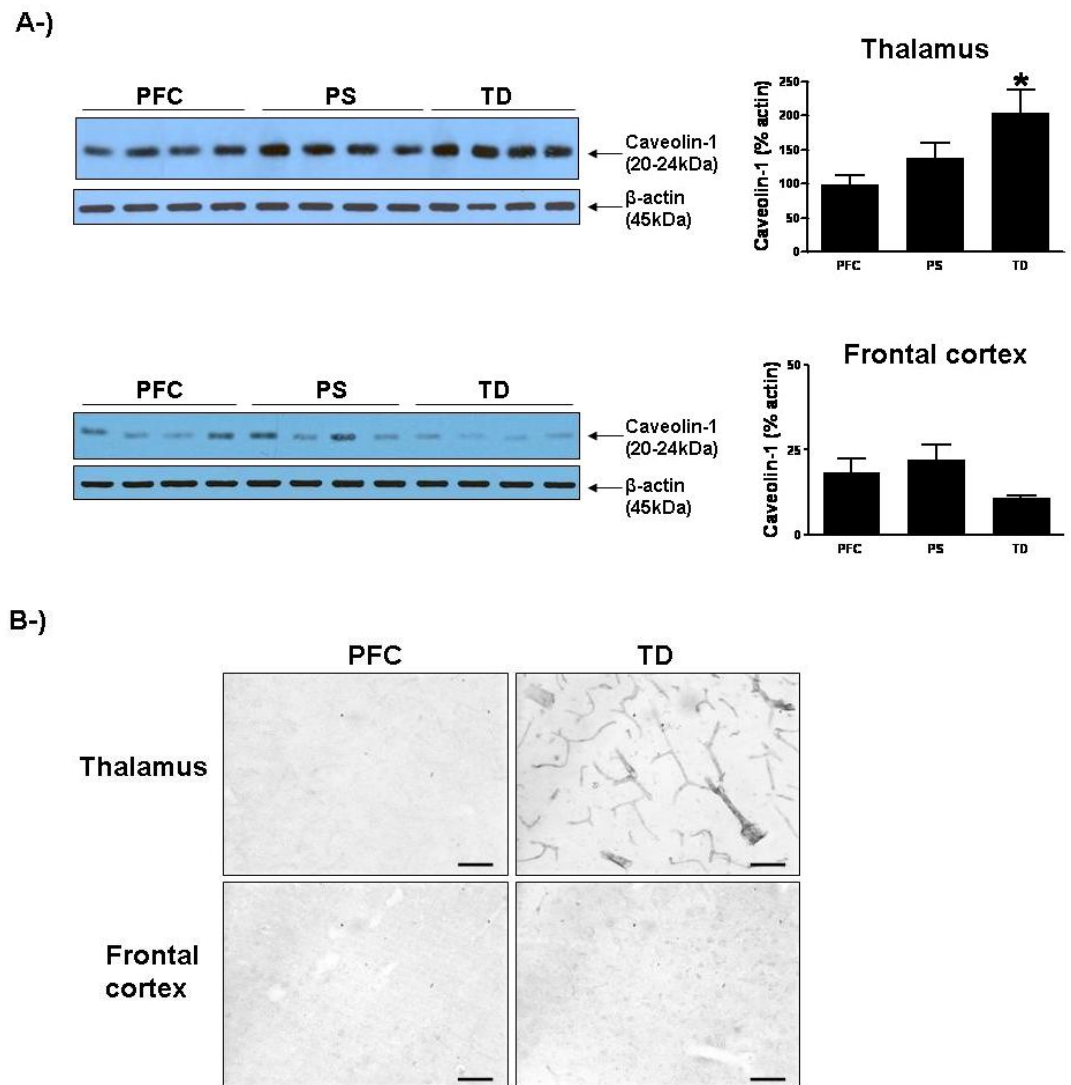


Figure 1. Focal up-regulation of caveolin-1 in the thalamus of thiamine-deficient mice.

A) Western blot analysis showing a significant increase in caveolin-1 protein levels in the thalamus of symptomatic (TD) thiamine-deficient mice, compared to PFC mice. No increase in caveolin-1 was observed in the frontal cortex. Data are expressed as mean \pm SEM of four animals in each group. Significant difference from PFC mice indicated by * $p < 0.05$. **B)** Representative photomicrographs of caveolin-1 immunostaining showing increased caveolin-1 protein in endothelial cells in the thalamus (top panels) of a symptomatic thiamine-deficient mouse (TD, right panels), compared to a PFC mouse (left panels), and the absence of increase in caveolin-1 expression in the frontal cortex (lower panels) of a symptomatic thiamine-deficient mouse (TD), compared to the PFC mouse. Scale bar: 100 μ m.

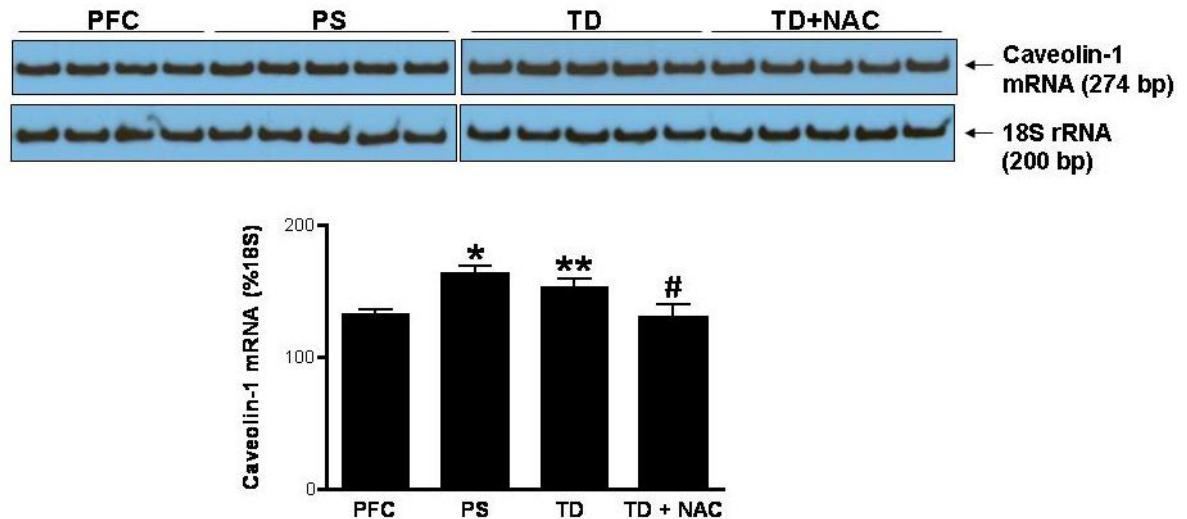


Figure 2. Prevention of the increase in caveolin-1 gene expression in the thalamus of NAC-treated thiamine-deficient mice. RT-PCR analysis showing a significant increase in caveolin-1 mRNA levels in the thalamus of presymptomatic (PS) and symptomatic (TD) thiamine-deficient mice compared to PFC, and normalization of caveolin-1 mRNA levels in the thalamus of NAC-treated thiamine-deficient mice (TD+NAC), compared to PFC animals. Data are expressed as mean \pm SEM of four or five animals in each group. Significant difference from PFC mice indicated by * $p < 0.05$ and ** $p < 0.05$, and from TD mice indicated by # $p < 0.05$.

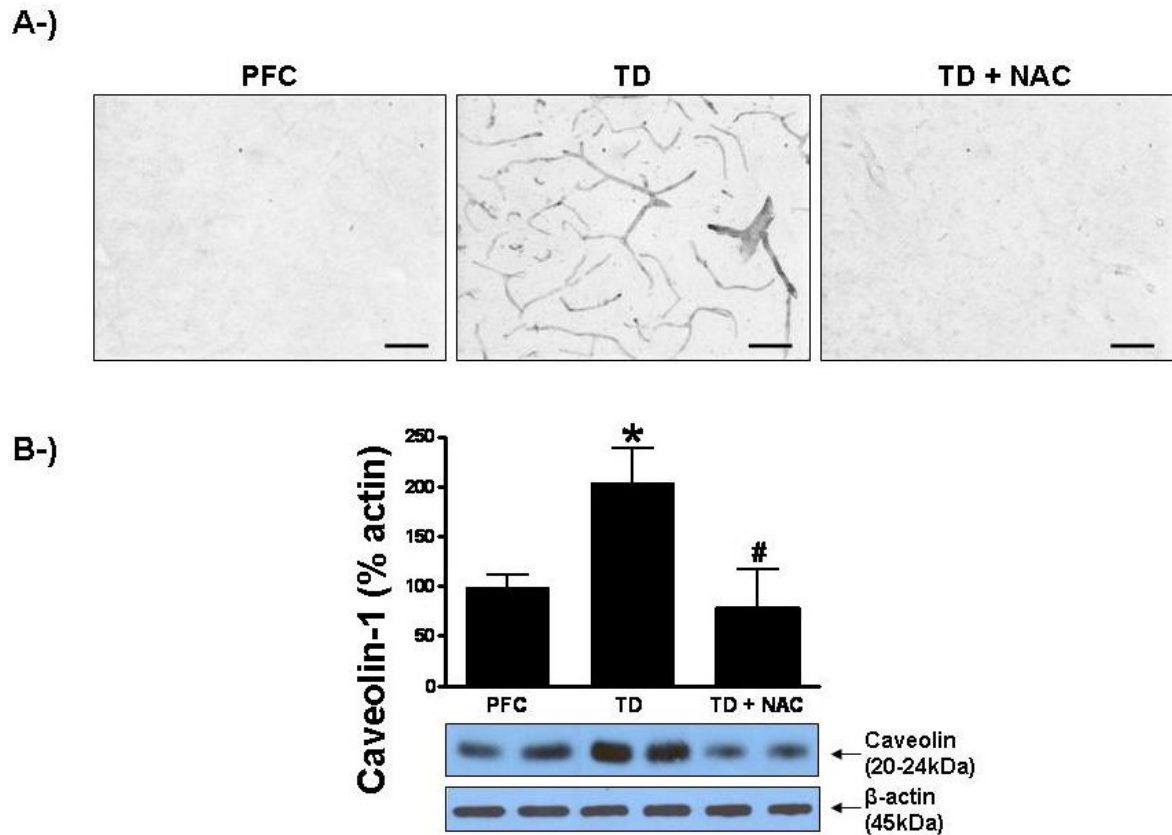


Figure 3. Prevention of the increase in caveolin-1 protein levels in the thalamus of NAC-treated thiamine-deficient mice. **A)** Representative photomicrographs of caveolin-1 immunostaining showing increased caveolin-1 content in endothelial cells in the thalamus of a symptomatic thiamine-deficient mouse (TD, middle panel), compared to a PFC animal (left panel), and the prevention of the increase in caveolin-1 in the thalamus of an NAC-treated thiamine-deficient mouse (TD+NAC, right panel). Scale bar: 100 μ m. **B)** Western blot analysis showing induction of caveolin-1 protein expression in the thalamus of symptomatic thiamine-deficient (TD) mice, compared to PFC mice, and prevention of caveolin-1 induction in NAC-treated thiamine-deficient mice (TD+NAC). Data are expressed as mean \pm SEM of four animals in each group. Significant difference from PFC mice indicated by * p <0.05, and from TD mice indicated by # p <0.05.

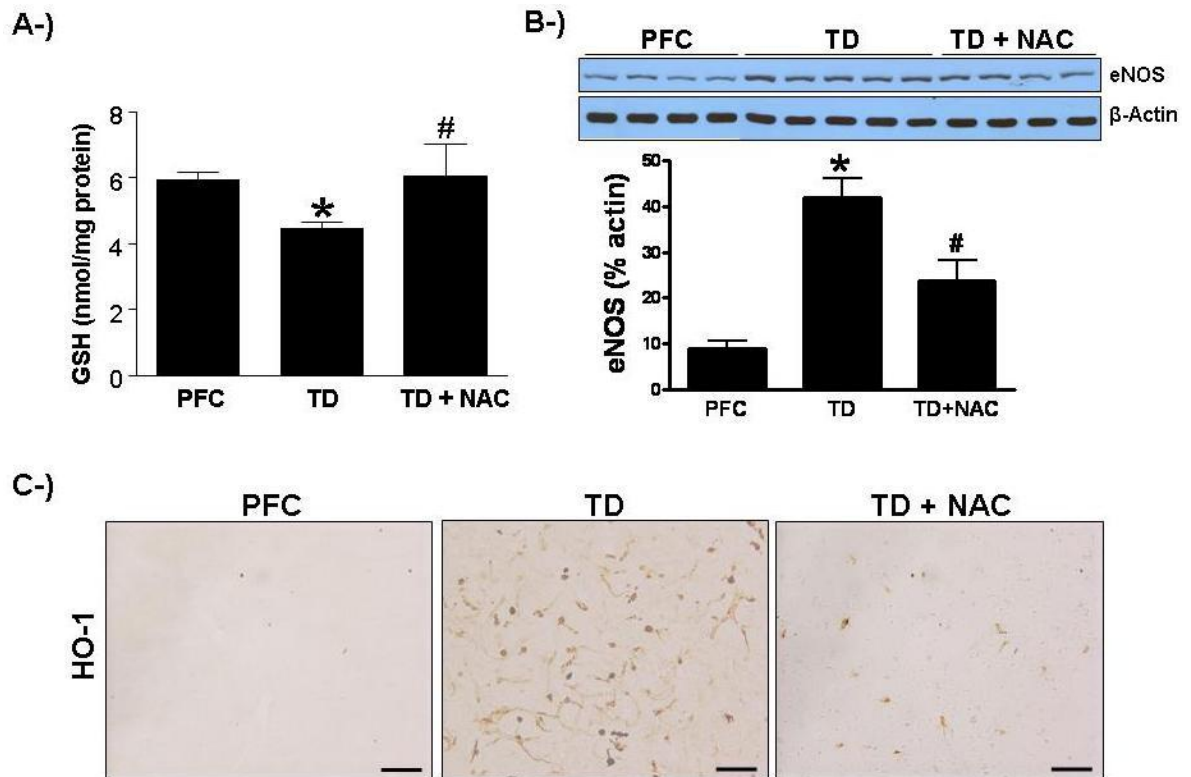


Figure 4. Attenuation of oxidative stress by NAC in the thalamus of thiamine-deficient mice. **A)** Reduced glutathione (GSH) fluorometric assay showing decreased GSH levels in the thalamus of symptomatic thiamine-deficient mice (TD), compared to PFC mice, and the complete restoration of thalamic GSH levels in NAC-treated thiamine-deficient mice (TD+NAC), compared to the TD mice. Data are expressed as mean \pm SEM of five animals in each group. Values significantly different from PFC mice indicated by * $p < 0.05$, and from TD mice indicated by # $p < 0.05$. **B)** Western blot analysis showing induction of eNOS protein in the thalamus of symptomatic thiamine-deficient (TD) mice, compared to PFC mice, and attenuation of eNOS levels in NAC-treated thiamine-deficient mice (TD+NAC), compared to the TD mice. Data are expressed as mean \pm SEM of four or five animals in each group. Values significantly different from PFC mice indicated by * $p < 0.001$, and from TD mice indicated by # $p < 0.05$. **C)** Representative photomicrographs of HO-1 immunostaining in the thalamus of a PFC (left panel), a symptomatic thiamine-deficient (TD, middle panel) and an NAC-treated thiamine-deficient mouse (TD+NAC, right panel). Note the HO-1 immunostaining in vessel walls and perivascular cells of the TD animal, and its prevention in the TD+NAC-treated animal. Scale bar: 100 μ m.

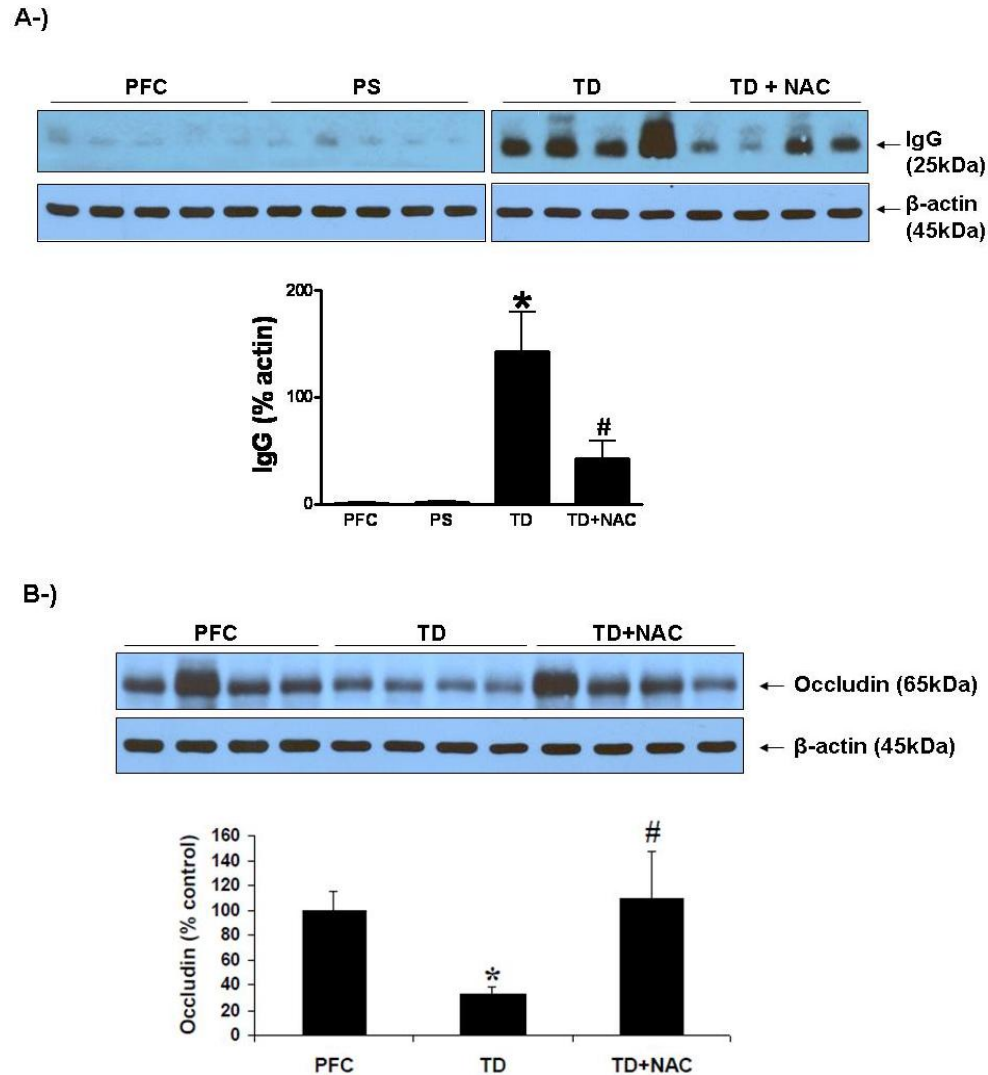


Figure 5. Attenuation of BBB breakdown in the thalamus of NAC-treated thiamine-deficient mice. **A)** Western blot analysis showing considerable IgG extravasation in the thalamus of symptomatic thiamine-deficient (TD) mice compared to PFC mice, and attenuation of IgG extravasation in NAC-treated thiamine-deficient mice (TD+NAC), compared to the TD mice. Note the absence of IgG extravasation in the presymptomatic (PS) mice group. Data are expressed as mean \pm SEM of four or five animals in each group. Significant difference from PFC mice indicated by * $p < 0.01$, and from TD mice indicated by # $p < 0.05$. **B)** Loss of occludin protein in the thalamus of symptomatic thiamine-deficient (TD) mice, compared to PFC mice, and its normalization in NAC-treated thiamine-deficient mice (TD+NAC), compared to TD mice. Data are expressed as mean \pm SEM of four or eight animals in each group. Significant difference from PFC mice indicated by * $p < 0.05$, and from TD mice indicated by # $p < 0.05$.

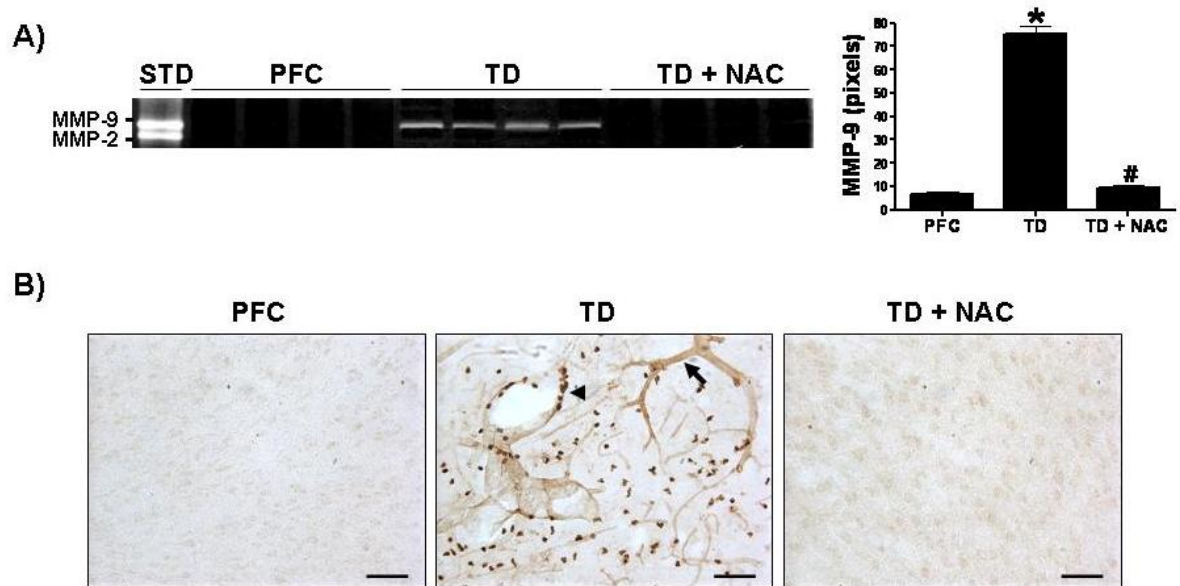


Figure 6. Prevention of MMP-9 induction in the thalamus of NAC-treated thiamine-deficient mice. **A)** Gelatin zymography analysis showing induction of MMP-9 in the thalamus of symptomatic thiamine-deficient (TD) mice, compared to PFC mice, and the prevention of MMP-9 induction in NAC-treated thiamine-deficient mice (TD+NAC). MMP-2 and MMP-9 standards (STD) served as markers. Data are expressed as mean \pm SEM of four animals in each group. Significant difference from PFC values indicated by * $p < 0.001$, and from TD values indicated by # $p < 0.001$. **B)** Representative photomicrographs of MMP-9 immunostaining showing increased MMP-9 expression in endothelial (arrow) and perivascular cells (arrowhead) in the thalamus of a symptomatic thiamine-deficient (TD) mouse (middle panel), compared to a PFC mouse (left panel). Note the absence of MMP-9 immunostaining in the thalamus of the NAC-treated thiamine-deficient (TD+NAC) animal (right panel), compared to the TD mouse. Scale bar: 100 μ m.

4. Discussion

Results of the present study have revealed for the first time that the expression of caveolin-1, a key molecule involved in the regulation of BBB permeability, is altered in TD. Indeed, caveolin-1 expression increases focally in the thalamus, a vulnerable area to TD, while caveolin-1 up-regulation was not observed in the frontal cortex, a brain area that is relatively unaffected by TD.

Although the role of caveolin-1 in cancer is well documented (Glenney and Soppet, 1992; Yang et al., 1998), its role in brain disease and BBB dysfunction remains relatively unknown. Caveolin-1^{-/-} mice were initially shown to manifest elevated endothelial paracellular permeability and vascular dysfunction in lungs (Schubert et al., 2002); it was therefore postulated that caveolin-1 acts as a negative regulator of endothelial paracellular permeability. Later, caveolin-1 was proposed to facilitate TJ proteins assembly (McCaffrey et al., 2007). Studying this idea, Song et al. (2007) demonstrated that caveolin-1 silencing leads to downregulation of occludin and zonula occludens-1 (ZO-1) expression and increased BBB permeability in cerebrovascular endothelial cells (CECs). In contrast, Zhong et al. (2008) showed that caveolin-1 silencing did not alter the expression of TJ proteins in CECs, but rather that caveolin-1 up-regulation mediated TJ protein alterations in CECs exposed to an inflammatory stimulus via activation of the Ras-MAPK pathway, a signaling pathway thought to be activated by oxidative stress and to be involved in occludin downregulation and increased BBB permeability (Park et al., 1999; Chen et al., 2000). Results of the present report show that in TD, BBB breakdown is associated with the concomitant upregulation of caveolin-1, rather than its downregulation, suggesting an involvement of caveolin-1 in the initiation of TD-related BBB damage. However, the significance of caveolin-1 up-regulation in TD, as well as its direct contribution to TD-related BBB breakdown, awaits further studies involving blockade of the caveolin-1 pathway.

Analysis of caveolin-1 expression in the thalamus of thiamine-deficient mice reveals that although significant, the increase in caveolin-1 gene expression is small

compared to the increase in protein. This result suggests that caveolin-1 is subjected to some yet unidentified post-translational modification or diminished destruction. Since caveolin-1 has a very slow turnover (Parat and Fox, 2001), a small increase in caveolin-1 mRNA might then translate into a larger increase in caveolin-1 protein, and therefore explain the observed difference between caveolin-1 gene and protein expression. This issue awaits further investigation.

A recent study from our group has shown that eNOS is linked to BBB alterations found in TD (Beauchesne et al., 2009b). The present report extends this study with the direct demonstration that oxidative stress contributes to BBB damage in TD. Indeed, NAC, an antioxidant previously shown to confer neuroprotection following TD injury (Hazell and Wang, 2005), was shown here to attenuate oxidative stress in the thalamus of thiamine-deficient mice, as indicated by the complete restoration of GSH levels and the attenuation of endothelial NOS and HO-1 responses to TD. Reduction of cerebrovascular oxidative stress by NAC led to the improvement of BBB function as shown by the attenuation of IgG extravasation, prevention of occludin downregulation as well as prevention of MMP-9 up-regulation. A role for oxidative stress in TJ protein changes and BBB damage is well established (for review, see Heo et al., 2005). GSH depletion itself can alter the BBB (Agarwal and Shukla, 1999), and exposure of cerebral endothelial cells (CECs) to ROS was shown to result in BBB breakdown (Chan et al., 1984) and in downregulation of BBB TJ proteins such as occludin (Krizbai et al., 2005). However, the precise mechanisms by which oxidative stress alters TJ proteins and the BBB in TD are not yet elucidated.

Chronic oxidative stress is thought to modulate caveolin-1 expression and affect caveolar integrity (Parat and Fox, 2004). ROS such as hydrogen peroxide were shown to induce caveolin-1 expression (Dasari et al., 2006) and phosphorylation (Volonte et al., 2001; Cao et al., 2004), while antioxidants such as the flavonoid quercetin and vitamin E were shown to normalize its expression in cells exposed to ROS (Volonte et al., 2002). Dasari et al. further demonstrated that induction of caveolin-1 gene expression during oxidative stress occurs through p38-MAPK-mediated activation of the transcription factor Sp1 (Dasari et al., 2006). Free radicals such as ROS are known to be increased in TD

(Langlais et al., 1997), and could therefore explain caveolin-1 up-regulation. Indeed, the present study shows that NAC prevents caveolin-1 gene and protein up-regulation in TD, indicating that TD-related oxidative stress mediates induction of caveolin-1 expression at the transcriptional and translational level. These results suggest that caveolin-1 participates in oxidative stress-mediated BBB damage in TD.

One key physiological role of caveolae is the regulation of many endothelial cell signaling pathways. In caveolae, caveolin-1 is thought to interact, via its scaffolding domain, with several signaling proteins including eNOS. The role of caveolin-1 in eNOS regulation is well characterized (García-Cardena et al., 1997; Bucci et al., 2000). Under normal conditions, eNOS is maintained in an inactive state in caveolae through its interaction with caveolin-1. Upon stimulation, eNOS dissociates from caveolin-1 and binds to calmodulin (Michel et al., 1997; García-Cardena et al., 1998). Transgenic overexpression of caveolin-1 was shown to inhibit eNOS activation and NO production (Bauer et al., 2005). Thus, caveolin-1 is normally involved in the negative regulation of eNOS. However, in TD, both caveolin-1 and eNOS are up-regulated, and eNOS was shown to be actively involved in TD pathogenesis (Beauchesne et al., 2009b). This might seem paradoxical in view of the postulated role of caveolin-1 in the negative regulation of eNOS. One possible explanation is that TD interferes with caveolin-1 normal function. This could occur via TD-induced oxidative stress, since free radicals were shown to directly affect caveolae structure, via a defect in the organization of caveolin-1 scaffold, as well as caveolae function, via a defect in local compartmentalization of signaling molecules (Parat and Fox, 2004). Therefore, TD-induced oxidative stress may alter caveolin-1 function and therefore eNOS regulation, leading to its uncontrolled activation. Such alteration of caveolae function by oxidative stress might then explain why caveolin-1 is associated with BBB damage in some cerebral disorders, since its normal role is rather to preserve BBB integrity (McCaffrey et al., 2007; Song et al., 2007). Whether or not such mechanisms occur in TD awaits further investigation. A recent study describing a new *in vitro* model of the BBB (Nakagawa et al., 2009) may offer unique opportunities to investigate these mechanisms, including the role of astrocytes and pericytes in this process, in the future.

In conclusion, our results demonstrate for the first time a role for caveolin-1 in TD pathogenesis, and suggest that oxidative stress contributes to BBB alterations in TD via modulation of this pathway. In addition to improving our understanding of TD encephalopathy, these findings may lend new insight into mechanisms of BBB damage associated with neurodegeneration in cerebral disorders where impairment of oxidative metabolism and oxidative stress occurs.

Acknowledgements

This study was supported by grants from the Canadian Institutes of Health Research. É. Beaulieu is the recipient of a University of Montreal research scholarship.

References

- Agarwal, R., Shukla, G.S., 1999. Potential role of cerebral glutathione in the maintenance of blood–brain barrier integrity in rat. *Neurochem. Res.* 24, 1507–1514.
- Aoyama, K., Matsumura, N., Watabe, M., et al., 2008. Oxidative stress on EAAC1 is involved in MPTP-induced glutathione depletion and motor dysfunction. *Eur. J. Neurosci.* 27, 20–30.
- Bauer, P.M., Yu, J., Chen, Y., et al., 2005. Endothelial-specific expression of caveolin-1 impairs microvascular permeability and angiogenesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 102, 204–209.
- Beaulieu, E., Desjardins, P., Hazell, A.S., et al., 2009a. Altered expression of tight junction proteins and matrix metalloproteinases in thiamine-deficient mouse brain. *Neurochem. Int.* 55, 275–281.

Beauchesne, E., Desjardins, P., Hazell, A.S., et al., 2009b. eNOS gene deletion restores blood–brain barrier integrity and attenuates neurodegeneration in the thiamine-deficient mouse brain. *J. Neurochem.* 111, 452–459.

Bell, R.D., Zlokovic, B.V., 2009. Neurovascular mechanisms and blood–brain barrier disorder in Alzheimer’s disease. *Acta Neuropathol.* 118, 103–113.

Bucci, M., Gratton, J.P., Rudic, R.D., et al., 2000. In vivo delivery of the caveolin-1 scaffolding domain inhibits nitric oxide synthesis and reduces inflammation. *Nat. Med.* 6, 1362–1367.

Calingasan, N.Y., Baker, H., Sheu, K.R., et al., 1995. Blood–brain barrier abnormalities in vulnerable brain regions during thiamine deficiency. *Exp. Neurol.* 134, 64–72.

Calingasan, N.Y., Gibson, G.E., 2000. Vascular endothelium is a site of free radical production and inflammation in areas of neuronal loss in thiamine-deficient brain. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 903, 353–356.

Cao, H., Sanguinetti, A.R., Mastick, C.C., 2004. Oxidative stress activates both Src kinases and their negative regulator Csk and induces phosphorylation of two targeting proteins for Csk: caveolin-1 and paxillin. *Exp. Cell Res.* 294, 159–171.

Chan, P.H., Schmidley, J.W., Fishman, R.A., et al., 1984. Brain injury, edema, and vascular permeability changes induced by oxygen-derived free radicals. *Neurology* 34, 315–320.

Chen, Y., Lu, Q., Schneeberger, E.E., et al., 2000. Restoration of tight junction structure and barrier function by down-regulation of the mitogen-activated protein kinase pathway in ras-transformed Madin–Darby canine kidney cells. *Mol. Biol. Cell* 11, 849–862.

Dasari, A., Bartholomew, J.N., Volonte, D., et al., 2006. Oxidative stress induces premature senescence by stimulating caveolin-1 gene transcription through p38 mitogen-activated protein kinase/Sp1-mediated activation of two GC-rich promoter elements. *Cancer Res.* 66, 10805–10814.

Farkas, E., De Jong, G.I., de Vos, R.A., Jansen Steur, E.N., Luiten, P.G., 2000. Pathological features of cerebral cortical capillaries are doubled in Alzheimer's disease and Parkinson's disease. *Acta Neuropathol.* 100, 395–402.

Fu, A.L., Dong, Z.H., Sun, M.J., 2006. Protective effect of N-acetyl-L-cysteine on amyloid beta-peptide-induced learning and memory deficits in mice. *Brain Res.* 1109, 201–206.

García-Cardena, G., Martasek, P., Masters, B.S., et al., 1997. Dissecting the interaction between nitric oxide synthase (NOS) and caveolin. Functional significance of the nos caveolin binding domain in vivo. *J. Biol. Chem.* 272, 25437–25440.

García-Cardena, G., Fan, R., Shah, V., et al., 1998. Dynamic activation of endothelial nitric oxide synthase by Hsp90. *Nature* 392, 821–824.

Gibson, G.E., Calingasan, N.Y., Baker, H., Gandy, S., Sheu, K.F., 1997. Importance of vascular changes in selective neurodegeneration with thiamine deficiency. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 826, 516–519.

Glenney Jr., J.R., Soppet, D., 1992. Sequence and expression of caveolin, a protein component of caveolae plasmamembrane domains phosphorylated on tyrosine in Rous sarcoma virus-transformed fibroblasts. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 89, 10517–10521.

Harata, N., Iwasaki, Y., 1995. Evidence for early blood–brain barrier breakdown in experimental thiamine deficiency in the mouse. *Metab. Brain Dis.* 10, 159–174.

Harper, C., Butterworth, R.F., 1997. Nutritional and metabolic disorders. In: Lantos, P., Graham, D. (Eds.), *Greenfield's Neuropathology*. 6th edn. Edward Arnold, Cambridge, pp. 601–655.

Hazell, A.S., Wang, C., 2005. Downregulation of complexin I and complexin II in the medial thalamus is blocked by N-acetylcysteine in experimental Wernicke's encephalopathy. *J. Neurosci. Res.* 79, 200–207.

Hazell, A.S., Butterworth, R.F., 2009. Update of cell damage mechanisms in thiamine deficiency: focus on oxidative stress, excitotoxicity and inflammation. *Alcohol Alcohol.* 44, 141–147.

Helbok, R., Beer, R., Engelhardt, K., 2008. Intracerebral haemorrhage in a malnourished patient, related to Wernicke's encephalopathy. *Eur. J. Neurol.* 15, e99–e100.

Heo, J.H., Han, S.W., Lee, S.K., 2005. Free radicals as triggers of brain edema formation after stroke. *Free Radic. Biol. Med.* 39, 51–70.

Héroux, M., Butterworth, R.F., 1992. Animal models of the Wernicke-Korsakoff syndrome. In: Boulton, A., Baker, G.B., Butterworth, R.F. (Eds.), *Animal Models of Neurological Disease*. Humana Press, New Jersey, pp. 95–131.

Héroux, M., Raghavendra Rao, V.L., Lavoie, J., Richardson, J.S., Butterworth, R.F., 1996. Alterations of thiamine phosphorylation and of thiamine-dependent enzymes in Alzheimer's disease. *Metab. Brain Dis.* 11, 81–88.

Klatzo, I., 1983. Disturbances of the blood–brain barrier in cerebrovascular disorders. *Acta Neuropathol. Suppl.* 8, 81–88.

Krizbai, I.A., Bauer, H., Bresgen, N., et al., 2005. Effect of oxidative stress on the junctional proteins of cultured cerebral endothelial cells. *Cell. Mol. Neurobiol.* 25, 129–139.

Langlais, P.J., Anderson, G., Guo, S.X., et al., 1997. Increased cerebral free radical production during thiamine deficiency. *Metab. Brain Dis.* 12, 137–143.

Lu, H., Zhang, D.M., Chen, H.L., et al., 2009. N-acetylcysteine suppresses oxidative stress in experimental rats with subarachnoid hemorrhage. *J. Clin. Neurosci.* 16, 684–688.

McCaffrey, G., Staats, W.D., Quigley, C.A., et al., 2007. Tight junctions contain oligomeric protein assembly critical for maintaining blood–brain barrier integrity in vivo. *J. Neurochem.* 103, 2540–2555.

Michel, J.B., Feron, O., Sacks, D., et al., 1997. Reciprocal regulation of endothelial nitric oxide synthase by Ca²⁺-calmodulin and caveolin. *J. Biol. Chem.* 272, 15583–15586.

Murphy, A.N., 2009. In a flurry of PINK, mitochondrial bioenergetics takes a leading role in Parkinson's disease. *EMBO Mol. Med.* 1, 81–84.

Nag, S., Venugopalan, R., Stewart, D.J., 2007. Increased caveolin-1 expression precedes decreased expression of occludin and claudin-5 during blood–brain barrier breakdown. *Acta Neuropathol.* 114, 459–469.

Nakagawa, S., Deli, M.A., Kawaguchi, H., Shimizudani, T., Shimono, T., Kittel, A., Tanaka, K., Niwa, M., 2009. A new blood–brain barrier model using primary rat brain endothelial cells, pericytes and astrocytes. *Neurochem. Int.* 54, 253–263.

Parat, M.O., Fox, P.L., 2001. Palmitoylation of caveolin-1 in endothelial cells is post-translational but irreversible. *J. Biol. Chem.* 276, 15776–15782.

Parat, M.O., Fox, P.L., 2004. Oxidative stress, caveolae and caveolin-1. *Subcell. Biochem.* 37, 425–441.

Park, J.H., Okayama, N., Gute, D., et al., 1999. Hypoxia/aglycemia increases endothelial permeability: role of second messengers and cytoskeleton. *Am. J. Physiol.* 277, C1066–C1074.

Parton, R.G., Simons, K., 2007. The multiple faces of caveolae. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 8, 185–194.

Paxinos, G., Franklin, K.B.J., 2003. *The Mouse Brain in Stereotaxic Coordinates*, Third ed. Academic Press, New York.

Raynal, F., Michot, B., Bachellerie, J.P., 1984. Complete nucleotide sequence of mouse 18S rRNA gene: comparison with other available homologs. *FEBS Lett.* 167, 263–268.

Rozen, S., Skaletsky, H., 2000. Primer3 on the WWW for general users and for biologist programmers. *Methods Mol. Biol.* 132, 365–386.

Schubert, W., Frank, P.G., Woodman, S.E., et al., 2002. Microvascular hyperpermeability in caveolin-1 (-/-) knock-out mice. Treatment with a specific nitricoxide synthase inhibitor, L-NAME, restores normal microvascular permeability in Cav-1 null mice. *J. Biol. Chem.* 277, 40091–40098.

Shin, N.Y., Nam, H.S., Lee, S.K., 2009. Hemorrhagic Wernicke encephalopathy in a patient with liver transplantation. *Neurology* 73, 1423.

Siesjö, B.K., 1992. Pathophysiology and treatment of focal cerebral ischemia. Part I: Pathophysiology. *J. Neurosurg.* 77, 169–184.

Song, L., Ge, S., Pachter, J.S., 2007. Caveolin-1 regulates expression of junction associated proteins in brain microvascular endothelial cells. *Blood* 109, 1515–1523.

Tang, Z.L., Scherer, P.E., Lisanti, M.P., 1994. The primary sequence of murine caveolin reveals a conserved consensus site for phosphorylation by protein kinase C. *Gene* 147, 299–300.

Troncoso, J.C., Johnston, M.V., Hess, K.M., et al., 1981. Model of Wernicke's encephalopathy. *Arch. Neurol.* 38, 350–354.

Volonte, D., Galbiati, F., Pestell, R.G., et al., 2001. Cellular stress induces the tyrosine phosphorylation of caveolin-1 (Tyr(14)) via activation of p38 mitogen-activated protein kinase and c-Src kinase. Evidence for caveolae, the actin cytoskeleton, and focal adhesions as mechanical sensors of osmotic stress. *J. Biol. Chem.* 276, 8094–8103.

Volonte, D., Zhang, K., Lisanti, M.P., et al., 2002. Expression of caveolin-1 induces premature cellular senescence in primary cultures of murine fibroblasts. *Mol. Biol. Cell* 13, 2502–2517.

Vortmeyer, A.O., Colmant, H.J., 1988. Differentiation between brain lesions in experimental thiamine deficiency. *Virchows Arch. A. Pathol. Anat. Histopathol.* 414, 61–67.

Xiong, Y., Peterson, P.L., Lee, C.P., 1999. Effect of N-acetylcysteine on mitochondrial function following traumatic brain injury in rats. *J. Neurotrauma* 16, 1067–1082.

Yang, G., Truong, L.D., Timme, T.L., 1998. Elevated expression of caveolin is associated with prostate and breast cancer. *Clin. Cancer Res.* 4, 1873–1880.

Zhong, Y., Smart, E.J., Weksler, B., et al., 2008. Caveolin-1 regulates human immunodeficiency virus-1 Tat-induced alterations of tight junction protein expression via modulation of the Ras signaling. *J. Neurosci.* 28, 7788–7796.

Zlokovic, B.V., 2008. The blood–brain barrier in health and chronic neurodegenerative disorders. *Neuron* 57, 178–201.

Chapitre III
DISCUSSION

La rupture de la BHE est maintenant reconnue en tant que caractéristique pathologique importante du SWK humain et expérimental. Cependant, les mécanismes moléculaires à l'origine des altérations cérébrovasculaires dans le cerveau déficient en thiamine demeurent relativement inexplorés. Ce projet de doctorat s'est penché sur cette question en analysant en premier lieu l'intégrité moléculaire des JS de la BHE, et en évaluant en deuxième lieu la contribution de trois molécules clés à la rupture de la BHE dans la DT, soit MMP-9, eNOS et caveolin-1.

III.1 Intégrité moléculaire des jonctions serrées de la BHE dans la déficience en thiamine

Les rapports précédents ayant examiné l'intégrité fonctionnelle de la BHE dans la DT ont révélé une augmentation de la perméabilité de cette dernière à des protéines comme l'albumine et les IgGs (Harata & Iwasaki, 1995; Calingasan *et al.*, 1995a). D'autre part, l'intégrité structurelle, analysée par microscopie électronique, a révélé une augmentation du nombre de profils vésiculaires au niveau des capillaires, indiquant une augmentation de la pinocytose. Toutefois, la même analyse n'a pas révélé de changement au niveau de l'intégrité structurelle des JS. Les auteurs en ont donc conclu que les JS étaient intactes dans la DT et ont proposé que les protéines plasmatiques pénétraient dans le cerveau via une route transcellulaire (Manz & Robertson, 1972; Calingasan *et al.*, 1995a). Cependant, bien qu'un certain niveau d'IgGs soit présent dans le cerveau normal, indiquant la possibilité d'un mécanisme de transport spécifique à ces dernières (Aihara *et al.*, 1994), l'hypothèse d'un transport de macromolécules non-lipidiques par transcytose au travers de l'EVC demeure controversée (Siegel *et al.*, 1989; Broadwell, 1989). Bien plus, l'hypothèse de la pinocytose n'explique aucunement l'extravasation des érythrocytes dans le cerveau. La nature hémorragique des lésions histologiques typiques de l'encéphalopathie associée à la DT exige donc une autre explication.

Les analyses précédentes des JS par ME ont été réalisées au niveau des capillaires; une éventuelle altération structurelle au niveau de vaisseaux plus larges tels que les

artérioles a donc pu échapper à l'analyse. De plus, les capillaires ont été examinés de façon localisée dans une zone non-hémorragique, ce qui n'exclue pas la possibilité d'altérations dans d'autres zones du parenchyme (Calingasan *et al.*, 1995a). Bien plus, l'analyse de l'intégrité des JS par Manz et Robertson a été effectuée chez un modèle chronique de DT (induit par la diète), un modèle où l'augmentation de perméabilité de la BHE pour l'albumine et les hémorragies sont infréquentes (45% et 30%, respectivement), contrairement au modèle aigu induit par la pyriéthiamine; cela pourrait expliquer pourquoi ces derniers n'ont pas observé d'altérations significatives au niveau de l'intégrité des JS (Robertson & Manz, 1971; Manz & Robertson, 1972).

Contrairement à l'approche microscopique utilisée lors des analyses précédentes, la présente étude a plutôt adopté une approche biomoléculaire dans le but d'étudier l'intégrité des protéines des JS, celle-ci étant essentielle au maintien de la haute résistance transendothéliale et de la faible perméabilité de la BHE. L'expression et/ou la morphologie de ces protéines sont fréquemment modifiées lors de dommages cérébraux associés à une dysfonction de la BHE, dont dans l'ischémie cérébrale (Rosenberg & Yang, 2007), la sclérose en plaques humaine (Kirk *et al.*, 2003) et expérimentale (Morgan *et al.*, 2007), l'insulte traumatique cérébrale (Zhao *et al.*, 2007), le diabète expérimental (Hawkins *et al.*, 2008) et l'encéphalite associée au VIH (Dallastra *et al.*, 1999). Les résultats présentés dans cette thèse ont démontré une altération spécifique de l'expression et de la morphologie de l'occludin et des zonula occludens-1 et -2, protéines clés du complexe des JS, dans les régions cérébrales vulnérables à la DT, en relation avec la rupture de la BHE. En plus de démontrer une perte d'expression, ces protéines démontrent un aspect désorganisé et fragmenté lorsqu'analysées par immunohistochimie. Bien plus, l'altération de la morphologie des protéines des JS présente un aspect focal, précisément localisée au niveau des lésions hémorragiques (résultat non montré). Ces résultats indiquent clairement la présence d'altérations au niveau de la structure des JS et fournissent une explication valable pour la présence d'hémorragies dans le cerveau des souris déficientes en thiamine, ainsi que pour l'extravasation massive de macromolécules plasmatiques comme l'albumine et les

IgGs, ces molécules ne pénétrant que peu dans le cerveau sain. L'altération des JS constitue donc une caractéristique essentielle de la rupture de la BHE dans la DT.

L'analyse concomitante de l'expression génique de l'occludin, ZO-1 et -2 n'a révélé aucune altération significative, indiquant que les changements observés au niveau des protéines sont dus à des altérations post-transcriptionnelles. De telles altérations pourraient comprendre la dégradation ou une altération de la phosphorylation de ces protéines. La dégradation par des protéases comme les MMPs semble être en cause (voir la section suivante). De plus, la déphosphorylation des résidus sérine/thréonine de l'occludin, ou l'hyperphosphorylation des résidus tyrosines de l'occludin ou des ZOs pourraient expliquer le désassemblage de ces protéines. Cela suggère une contribution de kinases ou de phosphatases telles que la PKC, les MAPKs, la PI3K ou la PP2A dans la pathogenèse de la dysfonction endothéliale dans la DT. Toutefois, le rôle de telles kinases/phosphatases dans la régulation des protéines des JS demeure encore non complètement élucidé, ce qui limite la formulation d'hypothèses précises de ce côté pour le moment. La découverte future des mécanismes précis impliqués dans la modulation des protéines des JS permettra d'explorer les voies de signalisation endothéliales précises participant à l'altération de ces protéines dans la DT.

III.2. Mécanismes de rupture de la BHE dans la déficience en thiamine

III.2.1. Rôle des métalloprotéinases matricielles

Les MMPs sont des protéases se spécialisant dans la dégradation des composants de la matrice extracellulaire. Parmi ceux-ci, MMP-9 est principalement exprimée dans la cellule endothéliale cérébrale (Cunningham *et al.*, 2005), et on a démontré que cette dernière pouvait aussi médier la dégradation des protéines des JS telles que l'occludin et les ZOs (Rosenberg & Yang, 2007; Hawkins *et al.*, 2008). L'aspect fragmenté de la morphologie des protéines des JS dans la DT suggère un rôle actif des MMPs. L'analyse

zymographique des gélatinases A (MMP-2) et B (MMP-9) dans la présente étude n'a pas démontré de changement des niveaux de MMP-2, excluant un rôle pour cette gélatinase dans la pathogenèse de la DT. Par contre, la même analyse a révélé une augmentation spécifique des niveaux de MMP-9 dans le thalamus de souris déficientes en thiamine. Inversement, les niveaux de MMP-9 ne sont que très peu augmentés dans le cortex frontal des mêmes souris, région ne démontrant ni altérations des protéines des JS ni changement de perméabilité de la BHE. Bien plus, l'analyse immunohistochimique a révélé que la hausse d'expression de MMP-9 était notamment localisée dans la paroi des vaisseaux sanguins, démontrant une action localisée de cette dernière au niveau de l'EVC.

En plus d'être exprimée dans l'EVC, MMP-9 est aussi clairement exprimée dans des cellules inflammatoires périvasculaires. La figure 8 suivante démontre effectivement de nombreuses cellules positives à MMP-9 apposées contre la paroi d'un vaisseau sanguin. De plus, quelques cellules semblent être localisées à l'intérieur de la paroi du vaisseau.

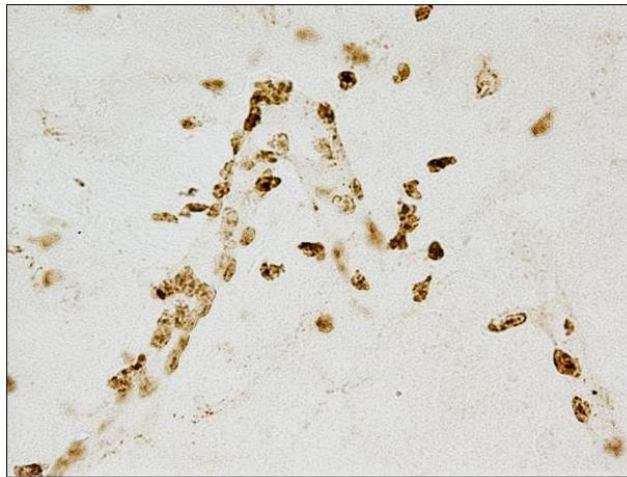


Figure 8. Expression de MMP-9 dans les cellules inflammatoires périvasculaires dans le thalamus de souris déficientes en thiamine (grossissement 400X)

Cela suggère une infiltration de leucocytes circulants dans le cerveau déficient en thiamine pouvant contribuer à la hausse des niveaux de MMP-9. Toutefois, la nature des cellules

inflammatoires exprimant MMP-9 dans la DT reste à être identifiée, cela étant difficile à déterminer avec certitude lors de l'analyse histologique de la présente figure. Par contre, l'infiltration de cellules positives à la myéloperoxydase (neutrophiles) a été démontrée dans le thalamus de souris déficientes en thiamine (Calingasan *et al.*, 2000). Les neutrophiles sont une source majeure de production de MMP-9 lors de l'inflammation, et le MMP-9 provenant des neutrophiles infiltrés contribue au dommage secondaire à la BHE dans des désordres cérébraux comme l'ischémie (McColl *et al.*, 2008). Tout cela suggère une contribution des neutrophiles en tant que source d'expression de MMP-9 et de dommage à la BHE dans le cerveau déficient en thiamine. Cette hypothèse reste à être démontrée. Néanmoins, il est clair selon la présente étude que les niveaux de MMP-9 sont fortement à la hausse au niveau vasculaire dans la DT, suggérant fortement un rôle actif de MMP-9 dans la rupture de la BHE; cela reste à être démontré directement à l'aide d'inhibiteurs sélectifs pour MMP-9. En plus de dégrader les protéines des JS, MMP-9 pourrait aussi être responsable de la rupture précoce de la membrane basale des capillaires sanguins démontrée par Collins il y a plus de quarante ans (Collins, 1967). La dégradation de la lame basale par MMP-9 pourrait aussi expliquer l'extravasation des érythrocytes et des leucocytes dans le cerveau des animaux déficients en thiamine.

Puisque le NO est un puissant inducteur de MMP-9 (Heo *et al.*, 2005), et que l'EVC semble être une source majeure de NO dans la DT, l'hypothèse du présent ouvrage proposait que le NO dérivé de l'EVC soit responsable de l'induction de MMP-9 dans la DT. Cette hypothèse est discutée à la section suivante.

III.2.2. Rôle de eNOS et du stress oxydatif/nitrosatif

eNOS semble jouer un rôle important dans la pathogenèse de la DT, puisque l'expression de cette enzyme est sélectivement induite dans les régions vulnérables telles que le thalamus, comparativement aux régions non vulnérables comme le cortex frontal (Kruse *et al.*, 2004). De plus, la délétion du gène de eNOS est neuroprotectrice dans la DT, indiquant un rôle neurotoxique de eNOS (Calingasan *et al.*, 2000). Bien que eNOS puisse aussi être exprimé dans d'autres types cellulaires comme les neurones et les astrocytes

(Guix *et al.*, 2005), on a démontré que la hausse d'expression de eNOS dans la DT était localisée dans l'EVC (Calingasan *et al.*, 1998; Kruse *et al.*, 2004). De plus, Calingasan *et al.* ont démontré une hausse d'immunoréactivité pour la nicotinamide adénine dinucléotide phosphate (NADPH) diaphorase, un marqueur d'activité de NOS, précisément localisée au niveau de l'endothélium (Calingasan *et al.*, 1998). Tous ces résultats suggèrent fortement que l'EVC soit une source majeure de génération de NO lors de la DT, et que ce NO dérivé de eNOS soit neurotoxique.

La neurotoxicité de eNOS dans la DT est un concept contrastant avec la vision classique de son rôle neuroprotecteur dû à sa fonction vasodilatatrice, comme c'est le cas dans l'ischémie cérébrale (Zhang *et al.*, 1993; Iadecola *et al.*, 1994). Toutefois, bien que le NO de eNOS exerce un rôle vasodilatateur important en physiologie et que ce rôle soit associé à la neuroprotection, les effets bénéfiques du NO, notamment dans l'ischémie, sont de courte durée (Iadecola *et al.*, 1994; Zhang *et al.*, 1995), et l'exposition prolongée au NO, comme c'est le cas dans le contexte chronique de la DT, pourrait devenir néfaste, ce qui expliquerait la toxicité de eNOS. En effet, l'excès de NO généré par une hyperactivité soutenue de eNOS pourrait s'avérer toxique via la génération d'un stress oxydatif/nitrosatif dans l'EVC. Cette toxicité potentielle du NO de eNOS a d'ailleurs été démontrée dans un modèle ischémique et excitotoxique, où le blocage pharmacologique (Han *et al.*, 2006) et la délétion génétique (Parathath *et al.*, 2007) de eNOS se sont avérés être protecteurs pour la BHE, respectivement.

L'hypothèse de la présente étude proposait une toxicité locale du NO de eNOS, c'est-à-dire au niveau de l'EVC. À ce sujet, Parathath *et al.* ont démontré la possibilité que les différents isoformes de NOS puissent exercer un rôle distinct lors du dommage cérébral excitotoxique; le dommage neuronal étant médié par nNOS et le dommage endothélial, précisément la rupture de la BHE, étant pour sa part médié par eNOS (Parathath *et al.*, 2007). Ces résultats sont consistants avec le concept d'une action localisée du NO et avec un potentiel toxique de eNOS dans l'EVC tel que proposé dans la présente thèse. Cette vision contraste par contre avec celle amenée précédemment par Calingasan *et al.*, qui proposèrent que le NO de eNOS puisse diffuser de son origine vasculaire vers les neurones

dans la DT, où il y exercerait son action neurotoxique (Calingasan *et al.*, 2000). Toutefois, cette hypothèse semble peu plausible puisque bien que les RNOS puissent diffuser au travers des membranes cellulaires, leurs effets sont limités dans le temps et dans l'espace dû à leur courte demi-vie, ce qui est particulièrement le cas pour le NO et le peroxy-nitrite (Guix *et al.*, 2005). Par conséquent, les effets de la majorité des espèces réactives sont concentrés localement au niveau de leur site de production (Heo *et al.*, 2005). Puisque le NO semble dérivé de l'EVC dans la DT, il est plus probable que ce dernier exerce son effet toxique à cet endroit. La BHE semble en effet particulièrement vulnérable au NO de eNOS dans la DT, selon les résultats présentés dans cette thèse. Selon cette vision, la neuroprotection conférée par la délétion du gène de eNOS serait plutôt expliquée indirectement par la protection de la BHE, dont l'intégrité est indispensable à la fonction neuronale. Toutefois, cette hypothèse reste à être vérifiée.

Concernant iNOS, ce dernier est fréquemment associé au dommage cérébral lors de désordres impliquant une réponse inflammatoire. Toutefois, bien que iNOS produise de larges quantités de NO (Guix *et al.*, 2005), et que le NO soit associé à la rupture de la BHE, le rôle de iNOS dans la rupture de la BHE demeure controversé. En effet, des auteurs ont récemment suggéré que iNOS ne soit pas le principal médiateur de la rupture de la BHE lors de l'inflammation, puisque ces derniers n'ont pas observé de corrélation entre l'expression de iNOS et les changements d'intégrité de la BHE induits par les cytokines (Phares *et al.*, 2007). Dans la DT, le rôle de iNOS demeure incertain. En effet, on a rapporté une hausse d'immunoréactivité dans la microglie (Calingasan *et al.*, 1998); par contre aucun changement d'expression de iNOS n'a été observé lors de l'analyse biomoléculaire (Kruse *et al.*, 2004). Bien plus, on a démontré que la délétion du gène de iNOS n'est pas neuroprotectrice et ne réduit pas le niveau de stress oxydatif/nitrosatif, excluant donc un rôle important du NO de iNOS dans la DT (Calingasan *et al.*, 1999).

Cette thèse proposait que eNOS, plutôt que iNOS, soit responsable de la rupture de la BHE dans la DT. Les résultats présentés ont confirmé cette hypothèse en démontrant que la délétion du gène de eNOS atténue fortement l'extravasation des IgGs dans le thalamus de souris déficientes en thiamine. De plus, la délétion du gène de eNOS atténue la perte

d'expression d'occludin et prévient complètement la perte d'expression de ZO-1 et -2. La morphologie de l'occludin, tel qu'analysée par immunohistochimie, apparaît normale chez les souris déficientes en thiamine et déficientes pour le gène de eNOS, comparativement à l'altération de sa morphologie chez les souris déficientes en thiamine sauvages. Ces résultats démontrent clairement une amélioration de la fonction de la BHE suite à la délétion du gène de eNOS dans la DT, et confirment donc un rôle toxique de eNOS dans l'EVC. La présente étude a donc d'abord évalué si cette toxicité du NO pouvait être médiée directement par la génération d'un stress oxydatif/nitrosatif et indirectement par l'induction des MMPs dans l'EVC.

L'analyse immunohistochimique de deux marqueurs de stress oxydatif/nitrosatif, soit HO-1 et les résidus *S*-nitrosocystéines (SNO), a révélé que la délétion du gène de eNOS entraînait la prévention du stress oxydatif/nitrosatif dans les vaisseaux du thalamus de souris déficientes en thiamine, comparativement aux souris déficientes en thiamine sauvages. L'expression de HO-1 est induite par les RNOS (Vargas & Johnson, 2009); ce dernier est donc un bon marqueur de stress oxydatif/nitrosatif largement utilisé. L'expression de HO-1 est aussi induite par l'hème, son substrat, et peut donc aussi représenter une réponse à l'extravasation des érythrocytes dans le cerveau lors de la rupture de la BHE. Cela pourrait par ailleurs expliquer en partie l'expression de HO-1 dans la microglie lors de la DT. L'expression de HO-1 dans la microglie est atténuée suite à la délétion du gène de eNOS tel que démontré par la présente étude et par une étude antérieure (Calingasan *et al.*, 2000). Une autre évidence que la délétion du gène de eNOS atténue le stress oxydatif/nitrosatif dans la DT provient de l'analyse de l'expression de l'enzyme Nox-2, plus précisément de sa sous-unité membranaire gp91phox (Nox-2), responsable de la synthèse du superoxyde. En effet, la figure 9 suivante démontre une réduction significative de l'expression génique de Nox-2 dans le thalamus de souris déficientes en thiamine et déficientes pour le gène de eNOS, comparativement aux souris déficientes en thiamine sauvages.

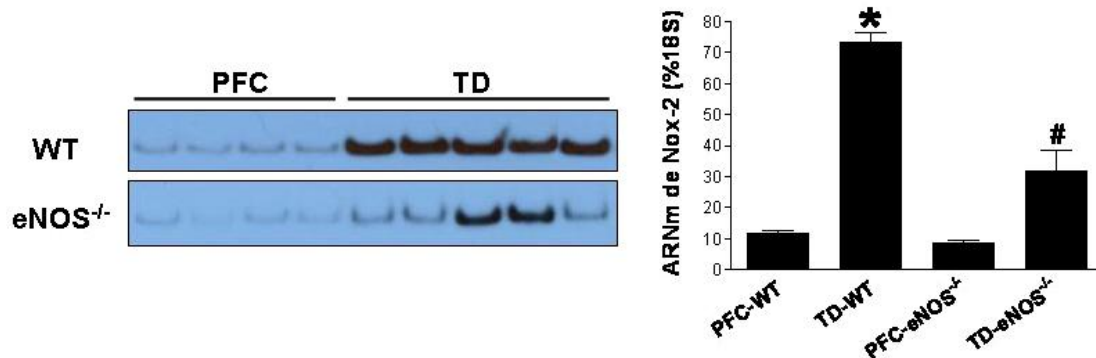


Figure 9. Effet de la délétion du gène de eNOS sur l'expression génique de Nox-2 (gp91phox) dans le thalamus de souris déficientes en thiamine. WT, souris sauvages; eNOS^{-/-}, souris déficientes pour le gène de eNOS; PFC, souris contrôles; TD, souris déficientes en thiamine (*p<0,001 vs PFC-WT; #p<0,001 vs TD-WT)

L'induction de Nox-2 est consistante avec la hausse de production de ROS dans le thalamus de rats déficients en thiamine (Langlais *et al.*, 1997). Bien que le site d'induction de Nox-2 ne puisse pas être identifié sur la base de ce résultat de PCR, il est probable que le NO de eNOS puisse entraîner localement l'induction de l'expression génique de Nox-2 dans l'endothélium via l'activation du facteur de transcription NFκB (Anrather *et al.*, 2006); toutefois, cette dernière hypothèse reste à être vérifiée par l'analyse immunohistochimique de la localisation de Nox-2. La hausse de superoxyde dans l'endothélium, en parallèle avec la hausse de NO, pourrait entraîner la formation de peroxynitrite, ce qui pourrait expliquer l'augmentation de la formation de résidus SNO détectés par immunohistochimie dans la présente étude (Gow *et al.*, 2004). Ensemble, tous ces résultats démontrent que eNOS est une source significative de stress oxydatif/nitrosatif cérébrovasculaire étant associé à l'altération de la BHE dans la DT.

La contribution directe du stress oxydatif/nitrosatif dans le dommage à la BHE a été confirmée dans la présente étude par le traitement de souris déficientes en thiamine avec l'antioxydant NAC. En effet, ces dernières démontrent une amélioration de la fonction de la BHE telle que démontrée par la normalisation des niveaux d'occludin et la réduction significative de l'extravasation des IgGs dans le thalamus, comparativement aux souris

déficientes en thiamine non traitées avec le NAC. La présente étude a d'ailleurs révélé pour la première fois que les niveaux de GSH sont à la baisse dans le thalamus de souris déficientes en thiamine. Ce résultat est en contradiction avec celui de Langlais *et al.*, qui n'observèrent pas de changement dans les niveaux de GSH dans le thalamus de rats déficients en thiamine. Cette différence pourrait être expliquée par la différence d'espèces animales; cette question reste à être clarifiée. Il est à noter que la défaillance en GSH dans la DT pourrait être expliquée par la dysfonction astrocytaire, démontrée récemment (Hazell, 2009). Les astrocytes, en tant que site principal de synthèse de GSH dans le cerveau, semblent jouer un rôle critique au niveau de la protection antioxydante de l'EVC (Schroeter *et al.*, 1999); leur dysfonction pourrait donc très bien contribuer au dommage à la BHE dans la DT. Cela reste à être démontré. La baisse de GSH dans le cerveau de rats entraîne une augmentation de la perméabilité de la BHE, et la normalisation des niveaux de GSH dans les vaisseaux cérébraux par le traitement avec le GSH ou le NAC protège celle-ci (Agarwal & Shukla, 1999). Le GSH semble donc être critique pour le maintien de la fonction de la BHE. De plus, on a démontré que l'activation de la voie Nrf2-ARE et l'induction de l'expression d'enzymes antioxydantes dans les vaisseaux cérébraux protégeaient les protéines des JS et la BHE contre le dommage associé à l'insulte traumatique cérébrale (Zhao *et al.*, 2007). La présente étude a démontré que le NAC entraînait la normalisation des niveaux de GSH et la protection de la BHE dans le thalamus de souris déficientes en thiamine. Cela suggère qu'une défaillance du système antioxydant, en particulier du GSH, contribue à la rupture de la BHE dans la DT via l'exacerbation du stress oxydatif/nitrosatif cérébrovasculaire. En résumé, il est donc clair que le stress oxydatif/nitrosatif cérébrovasculaire, principalement causé par l'induction de eNOS et aussi possiblement par la défaillance du système antioxydant, contribue directement à la rupture de la BHE dans la DT.

Les mécanismes directs par lesquels les espèces réactives peuvent entraîner l'altération de l'intégrité des protéines des JS de la BHE demeurent relativement inconnus, principalement puisque nos connaissances sur les mécanismes de régulation de ces protéines sont actuellement limitées, tel que discuté précédemment. Cette question fait

l'objet d'intenses recherches actuellement, et l'avenir de ce champ de recherche semble être prometteur. La fonction des espèces réactives comme le H₂O₂ et le NO en tant que seconds messagers est un concept relativement nouveau, et les voies de signalisation avec lesquelles celles-ci interfèrent commencent à être identifiées. De plus en plus de rapports démontrent que les espèces réactives peuvent interférer avec les voies de signalisation que l'on pense être responsables de la régulation des protéines des JS. Ces voies incluent celles des MAPKs (Krizbai *et al.*, 2005), de la PI3K (Sheth *et al.*, 2003) et de la PP2A (Wu & Wilson, 2007), pour ne mentionner que celles-ci. Il est donc possible que le stress oxydatif/nitrosatif cérébrovasculaire dans la DT interfère avec ces voies pour entraîner ultimement des changements de phosphorylation des protéines des JS et la dysfonction de la BHE. Cette hypothèse mérite une attention particulière dans les recherches futures sur la DT.

Bien que le rôle direct des espèces réactives comme le NO sur la fonction de la BHE soit peu connu (Pun *et al.*, 2009), le rôle du NO dans la modulation des MMPs, médiateurs importants du dommage à la BHE, est bien décrit. En plus d'induire l'expression de MMP-9 (Gum *et al.*, 1996; Akool *et al.*, 2003; Marcet-Palacios *et al.*, 2003), le NO peut aussi entraîner son activation via la S-nitrosylation (Gu *et al.*, 2002). La nitration des TIMPs peut aussi contribuer à l'induction de l'activité des MMPs (Brown *et al.*, 2004). Compte-tenu du rôle majeur du NO dans la modulation de MMP-9, cette thèse proposait que le NO de eNOS soit responsable de l'induction de l'expression de MMP-9 au niveau de l'EVC. Les résultats présentés dans le présent ouvrage ont démontré que la délétion du gène de eNOS prévenait complètement l'induction de MMP-9 dans le thalamus de souris déficientes en thiamine, ce qui confirme cette hypothèse. De plus, le traitement de souris déficientes en thiamine avec le NAC a aussi prévenu cette induction de MMP-9, démontrant ultimement que le stress oxydatif/nitrosatif est responsable de l'induction de MMP-9 dans la DT. Tout cela démontre que le stress oxydatif/nitrosatif dérivé de eNOS altère la BHE dans la DT via l'induction de MMP-9, tel qu'initialement proposé.

Malgré que eNOS soit clairement impliqué dans la rupture de la BHE dans la DT, la raison de son induction demeure encore nébuleuse. Tout comme dans l'ischémie cérébrale,

l'induction de eNOS pourrait représenter une réponse à la dépression métabolique neuronale, selon un mécanisme toujours non identifié (Zhang *et al.*, 1993). Bien que la nature de l'insulte métabolique soit différente entre les deux désordres, les deux types d'insulte mènent à une réduction de la glycolyse et à une dépression de l'activité de la chaîne respiratoire, entraînant ultimement une défaillance énergétique (Siegel *et al.*, 1989; Hakim & Pappius, 1981; Parker *et al.*, 1984; Aikawa *et al.*, 1984). Dans les deux cas, un signal pourrait alors ainsi être transmis aux cellules endothéliales visant à augmenter le flot sanguin cérébral et l'apport de glucose dans le but de rétablir l'équilibre énergétique cérébral, selon le principe du couplage neurovasculaire. On a démontré que le NO de eNOS participait à la modulation de ce couplage (Toda *et al.*, 2009); par contre, les mécanismes de signalisation intercellulaires derrière le couplage neurovasculaire demeurent encore peu connus (Straub & Nelson, 2007). Néanmoins, une caractéristique commune à l'ischémie et à la DT est l'accumulation de glutamate dans le milieu extracellulaire cérébral (Siegel *et al.*, 1989; Hazell *et al.*, 1993). On a récemment démontré que l'administration de kaïnate, un analogue du glutamate, stimulait l'expression de eNOS dans l'EVC de souris normales (Parathath *et al.*, 2007). De plus, l'activation des récepteurs de glutamate endothéliaux et l'accumulation subséquente de calcium dans l'EVC pourrait aussi entraîner l'activation de eNOS. L'accumulation de glutamate pourrait donc participer à l'induction de l'expression et de l'activité de eNOS dans la DT; cela reste à être démontré. Un autre facteur pouvant possiblement expliquer l'induction de l'expression de eNOS dans la DT est la génération de ROS dans l'endothélium, pouvant notamment provenir d'une dysfonction mitochondriale endothéliale. On a récemment démontré que les ROS pouvaient induire l'expression de eNOS dans l'endothélium (Zhen *et al.*, 2008) via l'activation de la PI3K (Kim *et al.*, 2007), entraînant ultimement la hausse de transcription de eNOS via l'activation du facteur de transcription Sp1 (Guix *et al.*, 2005). Bien que la localisation endothéliale de la production à la hausse de ROS reste à être démontrée, la présente étude a démontré que le traitement avec le NAC entraînait l'atténuation de l'induction de l'expression de eNOS dans le thalamus de souris déficientes en thiamine, consistant avec l'hypothèse que des espèces réactives comme les ROS puissent induire l'expression de eNOS dans l'EVC dans la DT.

Par ailleurs, bien que le NO de eNOS semble être impliqué de façon importante dans la rupture de la BHE dans la DT, d'autres espèces réactives telles que les ROS pourraient être générées dans l'EVC et contribuer à ce dommage. En effet, la hausse des niveaux de ROS, tel que démontrée par Langlais *et al.* initialement (Langlais *et al.*, 1997), pourrait entre autres être localisée dans l'EVC suite à une possible défaillance du métabolisme oxydatif endothélial directement causée par la DT. En condition physiologique, la sous-unité E³ de l' α -KGDH génère une faible quantité de ROS; toutefois, lorsque celle-ci est découplée, la génération de ROS est à la hausse (figure 10) (Tretter & Adam-Vizi, 2005).

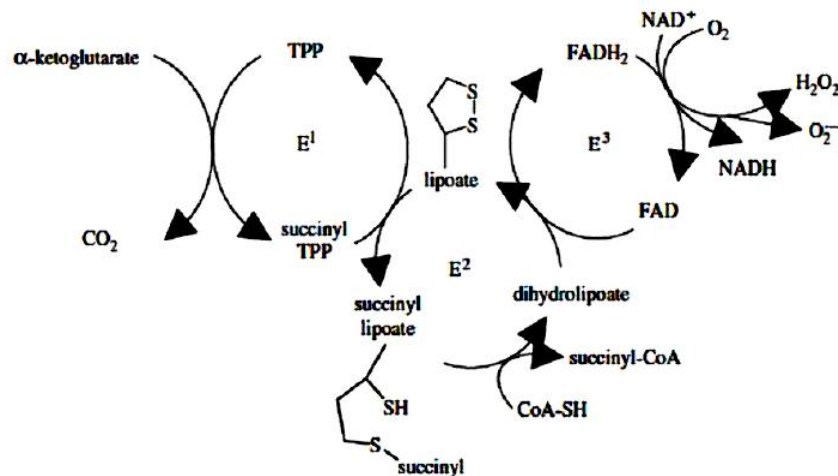


Figure 10. Génération de ROS par l' α -KGDH

Avec permission, de (Tretter & Adam-Vizi, 2005) © The Royal Society

Le stress oxydatif dans la DT pourrait donc provenir initialement de l'altération de l'activité de l' α -KGDH, ce qui serait directement causé par la déficience en TPP (TDP). De plus, une dépression respiratoire, tel qu'observée dans la DT suite à l'altération de l'activité de l' α -KGDH, pourrait aussi être une source importante de la production augmentée de ROS (Siegel *et al.*, 1989). Il est à noter que l' α -KGDH est aussi vulnérable aux ROS (Tretter & Adam-Vizi, 2005), ce qui suggère la possibilité d'un cercle vicieux de

génération de ROS par la mitochondrie dans la DT. Toutefois, l'altération de l' α -KGDH et la dysfonction métabolique dans l'EVC reste à être clairement démontrée. D'autre part, l'activation de la Nox pourrait aussi contribuer à la formation de ROS dans l'EVC, tel que mentionné précédemment; en effet, la Nox-2 vasculaire (sous-unité gp91-phox) a été récemment associée avec la rupture de la BHE chez les souris ischémiques (Khales *et al.*, 2007). La hausse de résidus SNO dans l'EVC dans la DT suggère la génération de peroxynitrite et donc un rôle important pour les ROS; par contre la génération de ROS dans l'EVC dans la DT ainsi que leur contribution au dommage à la BHE reste à être démontrés.

III.2.3. Rôle de caveolin-1

Caveolin-1 est une molécule abondante du caveolæ de l'EVC (Ikezu *et al.*, 1998). Cette dernière est impliquée dans diverses fonctions endothéliales incluant la régulation de multiples voies de signalisation (Smart *et al.*, 1999), du flot sanguin cérébral (Yu & al., 2006) et de la perméabilité de la BHE via la régulation de l'expression (Song *et al.*, 2007) et de l'assemblage (McCaffrey *et al.*, 2007) des protéines des JS. Bien que la fonction normale de caveolin-1 soit généralement associée à la régulation négative de la perméabilité paracellulaire des cellules endothéliales périphériques (Schubert *et al.*, 2002), le rôle de caveolin-1 dans la régulation des protéines des JS de la BHE est peu exploré. Song *et al.* ont démontré que l'inhibition de l'expression de caveolin-1 entraînait une perte d'expression des protéines des JS dans des CECs de souris (Song *et al.*, 2007). Par contre, Zhong *et al.* ont inversement démontré que l'inhibition de caveolin-1 n'entraînait pas de changement au niveau de l'expression basale des protéines des JS dans des CECs humaines (Zhong *et al.*, 2008). La disparité entre ces résultats pourrait être expliquée par un rôle différent de caveolin-1 dans les CECs humaines et animales en condition physiologique. Toutefois, Nag *et al.* ont démontré que chez des rats ayant subi une insulte cérébrale hypothermique, la hausse d'expression de caveolin-1 est associée avec la perte d'expression des protéines des JS, suggérant un rôle potentiellement délétère de caveolin-1 pour la BHE sous certaines conditions pathologiques. Ces derniers démontrèrent non seulement que l'induction de caveolin-1 précédait l'altération des protéines des JS, mais en plus qu'elle

était spécifiquement localisée dans les vaisseaux sanguins présentant une rupture de la BHE (Nag *et al.*, 2007). Similairement, Zhong *et al.* rapportèrent une hausse d'expression de caveolin-1 dans les CECs humaines exposées à un stimulus inflammatoire, et démontrèrent que l'inhibition de caveolin-1 prévenait l'altération des protéines des JS dans cette condition (Zhong *et al.*, 2008). Un autre rapport a aussi démontré une induction de l'expression de caveolin-1 dans la moelle épinière de rats atteints d'encéphalite autoimmune expérimentale (Shin *et al.*, 2005). Tous ces résultats suggèrent un rôle critique de caveolin-1 dans la rupture de la BHE sous certaines conditions pathologiques. Les résultats présentés dans cette thèse démontrent que dans la DT, l'expression de caveolin-1 est sélectivement induite dans l'EVC des régions cérébrales démontrant une rupture de la BHE. Bien que l'inhibition de l'expression de caveolin-1 soit toutefois nécessaire pour confirmer cette hypothèse, ce résultat suggère un rôle critique pour caveolin-1 dans la rupture de la BHE dans la DT.

Le stress oxydatif/nitrosatif est clairement associé à l'altération de l'expression de caveolin-1 (Parat & Fox, 2004). On a récemment démontré que l'activation de la voie p38-MAPK par les ROS, en plus d'entraîner la phosphorylation de caveolin-1 (Volonte *et al.*, 2001), entraînait l'induction de son expression via l'activation du facteur de transcription Sp1 (Dasari *et al.*, 2006). Dans la présente étude, l'atténuation du stress oxydatif/nitrosatif cérébrovasculaire par le NAC a entraîné l'atténuation de l'expression génique et protéique de caveolin-1 dans les vaisseaux du thalamus de souris déficientes en thiamine, ce qui indique une relation entre les espèces réactives d'origine vasculaire et l'induction de l'expression de caveolin-1 dans la DT. Les RNOS, incluant le NO, peuvent aussi altérer la fonction du caveolæ et de caveolin-1, entraînant entre autres une dissociation de caveolin-1 du caveolæ et une altération de la structure du domaine d'échafaudage de ce dernier résultant en un défaut de compartimentation des molécules de signalisation et leur dissociation du caveolæ (Parat & Fox, 2004). Le stress oxydatif/nitrosatif cérébrovasculaire dans la DT suggère la présence de telles altérations, quoique celles-ci restent à être démontrées à l'aide notamment d'études ultrastructurelles.

L'altération de la voie caveolin-1 pourrait donc représenter un des mécanismes par lesquels les espèces réactives altèrent les protéines des JS de la BHE dans la DT. Toutefois, le mode de régulation des protéines des JS par caveolin-1 dans l'EVC demeure inconnu, autant en physiologie qu'en pathologie. Néanmoins, la localisation caveolaire de ces protéines (McCaffrey *et al.*, 2007), et le fait que caveolin-1 module plusieurs voies de signalisation impliquées dans la régulation des protéines des JS (Smart *et al.*, 1999) suggère que caveolin-1 puisse réguler directement la fonction de ces protéines via la modulation de voies de signalisation telles que les GTPases, la PKC et les MAPKs. Ces dernières ont souvent été associées à l'altération des protéines des JS (Wolburg & Lippoldt, 2002), et l'étude de Zhong *et al.* a élégamment démontré que caveolin-1 pouvait altérer l'expression des protéines des JS directement via l'activation de la voie Ras-MAPKs lors de l'inflammation (Zhong *et al.*, 2008). Caveolin-1 pourrait donc jouer un rôle dans l'activation de l'EVC en condition pathologique. L'activation de voies comme les MAPKs par caveolin-1 peut sembler paradoxale si l'on se réfère à la postulation de son rôle dans la régulation négative de cette voie (Smart *et al.*, 1999). Cependant cette régulation pourrait être affectée lors de pathologies impliquant un stress oxydatif/nitrosatif et inflammatoire telles que la DT.

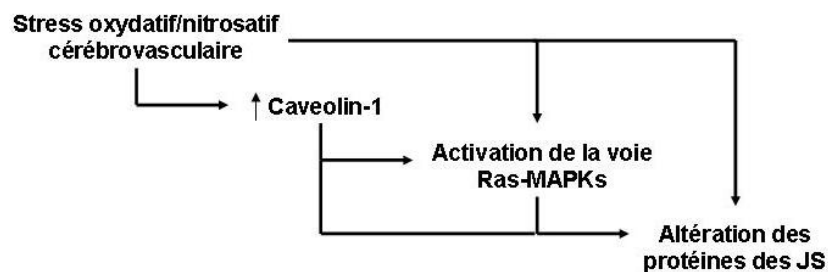


Figure 11. Interrelation possible entre le stress oxydatif/nitrosatif, caveolin-1, la voie Ras-MAPKs et les protéines des jonctions serrées (JS) dans la déficience en thiamine

L'activation de l'endothélium par caveolin-1 pourrait aussi impliquer l'activation de canaux calciques (Wang & al., 2005) et de Nox-2 (Li, 2009), étant tous deux localisés dans le

caveolæ, ce qui entraînerait l'exacerbation des dommages aux JS et du stress oxydatif/nitrosatif, respectivement. Ainsi, caveolin-1 pourrait représenter un modulateur précoce et critique contrôlant des voies de signalisation précises menant à l'altération des protéines des JS et à la rupture de la BHE dans la DT. Le rôle de caveolin-1 et du caveolæ en pathologie, en particulier en pathologie cérébrovasculaire, est un champ de recherche émergent méritant d'être exploré.

La relation entre caveolin-1 et eNOS dans la DT est intrigante. Le stress oxydatif/nitrosatif dérivé de eNOS pourrait expliquer l'induction de caveolin-1. Par contre, la régulation négative de l'activité de eNOS par caveolin-1 est un des rôles les mieux connus de cette dernière (Garcia-Cardena *et al.*, 1997). Dans la DT, l'induction de caveolin-1 et l'activation de eNOS pourrait donc sembler paradoxales. Toutefois, des données récentes démontrant un rôle de caveolin-1 dans la modulation du flot sanguin cérébral viennent modifier la vision originale du rôle négatif de caveolin-1 dans la modulation de l'activité de eNOS. En effet, caveolin-1 agirait en tant que méchanotransducteur répondant à la vasoconstriction par l'activation de eNOS dans le but de rétablir la perfusion cérébrale (Yu & al., 2006). Cela démontre ainsi un rôle possible de caveolin-1 dans l'activation de eNOS, et pourrait donc expliquer l'activation de eNOS en présence de niveaux élevés de caveolin-1 dans la DT. Alternativement, malgré que les niveaux de caveolin-1 soient plus élevés dans la DT, la fonction de cette dernière pourrait être altérée, entraînant une activation incontrôlée de eNOS, dû à la perte d'influence inhibitrice de caveolin-1. L'altération de la structure du domaine d'échafaudage du caveolæ par les ROS et la dissociation subséquente de eNOS du caveolæ pourrait être en cause (Peterson *et al.*, 1999). Une activation incontrôlée de eNOS contribuerait à l'aggravation du stress oxydatif/nitrosatif et des dommages à la BHE dans la DT; de tels mécanismes restent à être démontrés. Un autre point intéressant est que l'expression génique de eNOS et de caveolin-1 est régulée par le même facteur de transcription, soit Sp1. Puisque Sp1 peut être activé par les ROS selon un mécanisme dépendant des MAPKs (Dasari *et al.*, 2006), il est possible que les ROS contribuent à l'induction simultanée de l'expression de eNOS et de

caveolin-1 dans la DT. La relation entre caveolin-1 et eNOS, une molécule exerçant un rôle clé dans la DT, est donc complexe et nécessite une attention particulière dans le futur.

III.2.4. Autres mécanismes possibles

III.2.4.1. Rôle de la microglie et de l'inflammation

Puisque l'inflammation est intimement reliée au stress oxydatif/nitrosatif, et que ce dernier joue un rôle important dans la rupture de la BHE dans la DT, il est donc possible que l'inflammation participe aussi au dommage. Un rapport précédent a révélé une élévation de l'expression des cytokines Il-1 β et TNF- α dans le thalamus de souris déficientes en thiamine, ces dernières étant localisées spécifiquement dans la microglie (Karuppagounder *et al.*, 2007). L'activation de la microglie a été rapportée comme précédant l'extravasation des IgGs dans le cerveau de rats déficients en thiamine (Todd & Butterworth, 1999a); il est donc possible que celle-ci aie un rôle important à jouer dans l'initiation du dommage à la BHE dans la DT. En plus de sécréter des cytokines, la microglie semble démontrer une hausse d'expression de iNOS (Calingasan *et al.*, 1998), et celle-ci pourrait aussi être le site d'induction de l'expression de Nox-2 et ainsi relâcher des ROS dans le cerveau déficient en thiamine. L'analyse de marqueurs inflammatoires chez les souris eNOS^{-/-} déficientes en thiamine a permis d'évaluer la relation possible entre l'inflammation et la rupture de la BHE, ces souris présentant une BHE quasi intacte.

Tout d'abord, l'analyse de l'activation de la microglie chez les souris eNOS^{-/-} déficientes en thiamine, telle que représentée à la figure 12 suivante, a révélé l'absence de changement significatif dans le thalamus de ces souris, comparativement aux souris déficientes en thiamine sauvages.

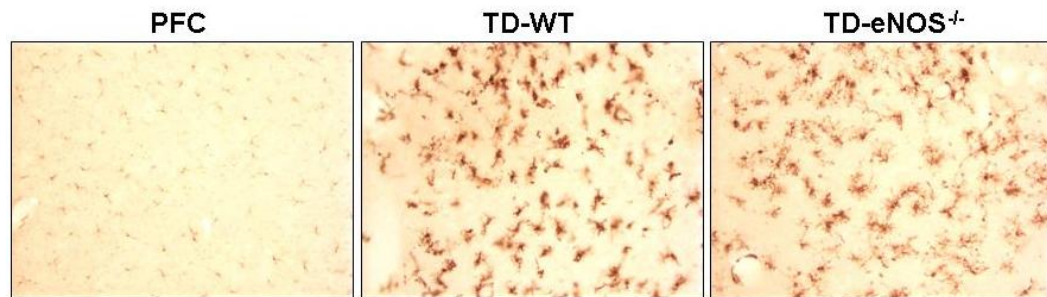


Figure 12. Effet de la délétion du gène de eNOS sur l'activation de la microglie (immunoréactivité à ED-1) dans le thalamus de souris déficientes en thiamine. PFC, souris contrôles (sauvages); TD-WT, souris déficientes en thiamine sauvages; TD-eNOS^{-/-}, souris déficientes en thiamine et déficientes pour le gène de eNOS (grossissement 200X)

Le fait que la microglie soit encore fortement activée en présence d'une BHE intacte suggère que l'activation de la microglie ne soit pas impliquée de façon significative dans la rupture de la BHE dans la DT. Tel que mentionné précédemment, bien que la microglie soit généralement vue comme étant délétère, celle-ci pourrait aussi jouer un rôle protecteur entre autres via l'expression de substances cytoprotectrices telles que les antioxydants HO-1 et ferritine (Calingasan & Gibson, 2000). L'expression de ces dernières par la microglie périvasculaire pourrait ainsi s'avérer bénéfique pour la BHE dans la DT. La relation entre la microglie et la rupture de la BHE dans la DT reste à être explorée. Il est à remarquer que la persistance de l'activation de la microglie chez les souris eNOS^{-/-} déficientes en thiamine, en parallèle avec l'atténuation majeure de l'expression de Nox-2, suggère que la microglie ne soit pas un site majeur d'induction de Nox-2 dans la DT. En revanche, l'élévation de l'expression de Nox-2 pourrait provenir de l'infiltration de cellules inflammatoires périphériques tels que les neutrophiles, et/ou de l'activation de l'EVC, qui seraient atténués chez les souris TD-eNOS^{-/-}. Cela reste à être déterminé.

Similairement, l'analyse de l'expression génique de IL-1 β n'a démontré aucun changement entre les souris déficientes en thiamine eNOS^{-/-} et sauvages, tel qu'illustré à la figure suivante.

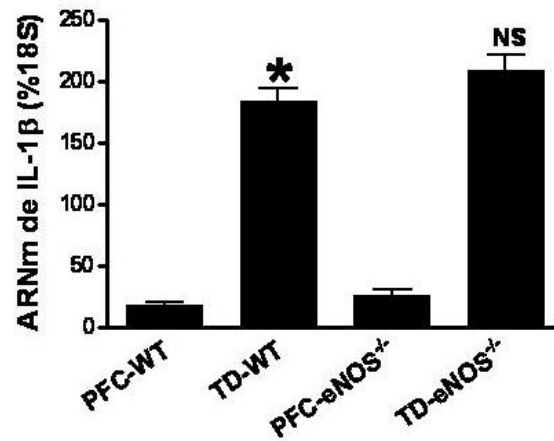


Figure 13. Effet de la délétion du gène de eNOS sur l'expression génique de IL-1 β dans le thalamus de souris déficientes en thiamine. PFC, souris contrôles; TD, souris déficientes en thiamine; WT, souris sauvages; eNOS^{-/-}, souris déficientes pour le gène de eNOS (*p<0,001 vs PFC-WT; NS : vs TD-WT)

Ce résultat est consistant avec l'absence de changement au niveau de l'activation de la microglie, cette dernière étant le site d'induction de IL-1 β dans la DT (Karuppagounder *et al.*, 2007). Bien que la relâche d'IL-1 β , une cytokine pro-inflammatoire, ait été associée à la rupture de la BHE (Huber & al., 2001), la forte induction d'IL-1 β en présence d'une BHE intacte suggère l'absence d'un rôle direct pour cette cytokine dans la rupture de la BHE dans la DT.

D'autre part, le rôle de iNOS, isoforme de NOS généralement associé à la réponse inflammatoire (Guix *et al.*, 2005), ne semble pas critique dans la DT, contrairement à d'autres modèles comme l'ischémie où ce dernier joue un rôle majeur (Iadecola *et al.*, 1995). Bien qu'une augmentation de l'expression de iNOS ait été observée dans la microglie dans la DT, la délétion du gène de iNOS n'est pas neuroprotectrice. Pour ce qui est de son rôle dans la rupture de la BHE, le même groupe a rapporté que les souris iNOS^{-/-} ne démontraient pas non plus de réduction au niveau de l'extravasation des IgGs dans le thalamus (Calingasan *et al.*, 1999) (résultat non montré), excluant donc un rôle important de iNOS dans la pathogenèse de la rupture de la BHE dans la DT.

Tous ces résultats, bien que n'étant pas des évidences directes, constituent des indications préliminaires suggérant que l'activation de la microglie et les voies pro-inflammatoires qu'elle active, telles que la synthèse d'IL-1 β et de iNOS, ne contribuent pas significativement à l'altération de l'intégrité de la BHE dans la DT. La relation entre la microglie, l'inflammation et la fonction de la BHE reste à être confirmée directement par le blocage génétique et/ou pharmacologique de voies pro-inflammatoires.

III.2.4.2. Rôle des astrocytes

L'interaction serrée entre les astrocytes et l'EVC semble protéger la BHE. En effet, les astrocytes relâchent diverses substances telles que TGF- β qui seraient nécessaires pour l'établissement et le maintien du phénotype de barrière de la BHE (Abbott *et al.*, 2006). De plus, on a démontré qu'un déficit astrocytaire entraînait une reconstruction incomplète de la BHE altérée (Kakinuma *et al.*, 1998). Les astrocytes jouent aussi un rôle important dans la défense antioxydante endothéliale (Schroeter *et al.*, 1999). Dans la DT, la présence d'œdème cytotoxique astrocytaire est connue depuis longtemps, et les astrocytes ont été décrits en tant que premier site d'altérations morphologiques (Collins, 1967). Un rapport récent a par ailleurs démontré l'altération de la GFAP, une protéine structurale astrocytaire (Hazell, 2009). La dysfonction de ces cellules pourrait ainsi jouer un rôle important dans la dysfonction de la BHE dans la DT. Cependant, la relation temporelle entre l'initiation de l'insulte astrocytaire et endothéliale n'est pas tout-à-fait claire. Une éventuelle dysfonction initiale de la BHE pourrait aussi inversement contribuer à la dysfonction astrocytaire. En effet, l'interaction entre les astrocytes et l'endothélium est bidirectionnelle, et l'intégrité de la BHE, en particulier de la lame basale, semble critique pour la différenciation des terminaisons astrocytaires périvasculaires. La protéine agrin de la lame basale endothéliale semble en effet essentielle à l'ancrage des terminaisons astrocytaires ainsi qu'à la ségrégation de l'aquaporin 4 (AQP4) et des canaux K⁺, caractéristiques spéciales des terminaisons astrocytaires périvasculaires impliquées dans la régulation ionique et aqueuse de la BHE (Abbott *et al.*, 2006). On a d'ailleurs démontré une baisse d'expression des canaux AQP4 dans la DT (Chan *et al.*, 2004) pouvant potentiellement contribuer à l'exacerbation de l'œdème vasogénique cérébral (Verkman, 2008). L'altération des canaux

AQP4 astrocytaires dans la DT pourrait être causée par une altération de la lame basale endothéliale, suggérant un rôle pour la dysfonction endothéliale dans la dysfonction astrocytaire. D'autre part, des facteurs relâchés lors de l'activation de l'endothélium, tels que les espèces réactives, pourraient aussi être responsables de la défaillance astrocytaire. Tout cela reste hypothétique pour le moment; par contre étant donné l'interaction serrée entre les astrocytes et l'EVC, une examination de plus près de la relation entre ces deux types cellulaires dans la DT s'avère nécessaire.

III.3. Relation entre la rupture de la BHE et la mort neuronale dans la déficience en thiamine

Bien que la présente thèse ait fait la lumière sur certains mécanismes clés participant au dommage cérébrovasculaire dans la DT, la relation de cause à effet entre les changements vasculaires et neuronaux n'est toujours pas établie. En effet, dans l'encéphalopathie liée à la DT comme dans d'autres désordres neurodégénératifs, il existe un débat en ce qui a trait à l'importance de la rupture de la BHE vis-à-vis de la mort neuronale, et vice-versa (Chen *et al.*, 1999). Ce débat a d'importantes implications thérapeutiques. Deux questions majeures se posent :

- 1) Est-ce que la mort neuronale contribue à la rupture de la BHE ?
- 2) Est-ce que la rupture de la BHE contribue au processus de mort neuronale ?

La première question semble plus évidente dans la DT puisqu'il a été démontré que la mort neuronale ne survient qu'après la rupture de la BHE (Harata & Iwasaki, 1995; Calingasan *et al.*, 1995a). Cependant, l'absence d'anomalités structurelles au niveau des neurones en phase précoce de l'encéphalopathie n'exclue pas la possibilité d'anomalités fonctionnelles pouvant contribuer et même initier la dysfonction vasculaire. En effet, la dysfonction métabolique neuronale pourrait entraîner la relâche de diverses substances contribuant à l'activation et à la dysfonction de l'EVC, pouvant possiblement impliquer les astrocytes. La relâche excessive de glutamate par les neurones métaboliquement

compromis (Hazell *et al.*, 1993), par exemple, pourrait jouer un rôle clé, étant capable d'initier une cytotoxicité astrocytaire (Hansson *et al.*, 1994) et endothéliale (Krizbai *et al.*, 1998). Le site primaire de l'insulte métabolique, c'est-à-dire neuronal, astrocytaire (Hazell, 2009) et/ou endothélial (Romero *et al.*, 1997; Calingasan *et al.*, 2000) menant ultimement à la dysfonction vasculaire dans la DT reste toutefois à être clairement identifié.

La deuxième question, à savoir si la rupture de la BHE contribue directement à la mort neuronale dans la DT, n'a jamais été étudiée précisément à ce jour. En effet, bien que l'on ait démontré que la rupture de la BHE précédait la mort neuronale et que l'on ait noté une corrélation entre la localisation spatiale des sites hémorragiques et des sites de lésions neuronales (Harata & Iwasaki, 1995; Calingasan *et al.*, 1995a), le lien causal entre les deux types de lésions n'a pas été clairement démontré. La rupture de la BHE peut affecter les neurones de plusieurs manières. Tout d'abord, l'écoulement de protéines plasmatiques comme l'albumine (Hassel *et al.*, 1994) dans le cerveau est neurotoxique (Kadota *et al.*, 1997). On a aussi démontré que les IgGs pouvaient entrer dans les neurones et y médier une neurotoxicité (Fishman *et al.*, 1990) pouvant entraîner la mort neuronale (Smith *et al.*, 1994). Pour ce qui est des composants plasmatiques cellulaires, l'extravasation d'érythrocytes peut entraîner la libération et la dégradation d'hémoglobine et des dommages oxydatifs subséquents liés à la libération de fer (Halliwell, 1992); d'autre part, l'infiltration de leucocytes circulants entraîne un dommage oxydatif et inflammatoire. Encore plus important, l'intégrité de la BHE est critique pour le maintien de l'équilibre ionique et osmotique et pour empêcher l'accumulation de substances neuroactives telles que le glutamate dans le milieu extracellulaire. La perturbation du microenvironnement neuronal causée par une dysfonction de la BHE peut altérer gravement la fonction neuronale (Zlokovic, 2008). D'autre part, la dysfonction de la BHE peut limiter l'apport de nutriments tels que le glucose, les acides aminés essentiels et les vitamines, ce qui serait critique pour la fonction neuronale (Greenwood, 1991). La BHE est une structure cérébrale essentielle à la fonction normale du cerveau et sa rupture contribue ainsi à la dysfonction et à la mort neuronale de diverses manières et ce, simultanément (Zlokovic, 2008). Les résultats de la présente étude ont démontré que chez les souris eNOS^{-/-} déficientes en

thiamine, la protection de la BHE est associée à l'atténuation de la mort neuronale (environ 30%), ce qui confirme indirectement la contribution de la rupture de la BHE dans la pathogenèse de la mort neuronale dans le thalamus de souris déficientes en thiamine. Cependant, la mort neuronale n'étant pas complètement prévenue chez ces souris, cela indique que la rupture de la BHE n'est pas le seul mécanisme impliqué et que d'autres mécanismes tels que l'excitotoxicité, la défaillance énergétique, l'acidose lactique, l'activation de la microglie, le stress oxydatif et/ou l'inflammation sont impliqués dans le dommage neuronal thalamique lors de la DT.

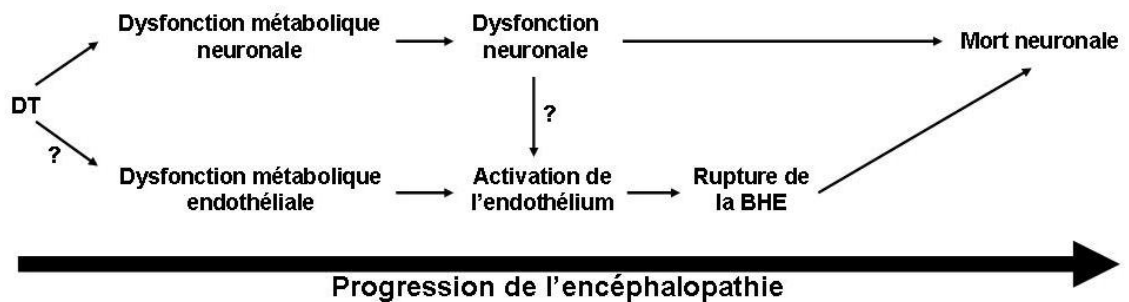


Figure 14. Relation temporelle entre les altérations vasculaires et neuronales dans la déficience en thiamine. DT, déficience en thiamine; BHE, barrière hémato-encéphalique

Ces résultats suggèrent que la rupture de la BHE et la mort neuronale dans la DT soient deux processus à la fois dépendants et indépendants l'un de l'autre (voir la figure 14 ci-haut). Le concept de *couplage neurovasculaire* suggère que la dysfonction neuronale soit intimement liée aux changements vasculaires. Toutefois, la dysfonction endothéliale pourrait aussi provenir directement d'une insulte métabolique locale. Les cellules endothéliales semblent être plus vulnérables que les neurones à l'insulte métabolique induite par la DT puisque celles-ci sont les premières à démontrer des changements morphologiques. Toutefois, bien que la rupture de la BHE précède la mort neuronale, celle-ci semble ne contribuer qu'en partie à la mort neuronale, indiquant un certain degré d'indépendance entre ces changements. Tout cela a des implications thérapeutiques importantes, tel que discuté dans la prochaine section.

Chapitre IV
CONCLUSION ET PERSPECTIVES

IV.1 Conclusion

Les résultats présentés dans cette thèse ont démontré pour la première fois que chez la souris déficiente en thiamine:

- ❖ L'expression et la morphologie des protéines des JS occludin, ZO-1 et ZO-2 sont altérées en relation avec la rupture de la BHE dans le thalamus versus le cortex frontal, région où la BHE est intacte.
- ❖ L'expression de MMP-9 est à la hausse dans le thalamus, localisée spécifiquement au niveau de l'endothélium vasculaire et des cellules inflammatoires périvasculaires
- ❖ La délétion du gène de eNOS protège de façon significative la fonction de la BHE ainsi que son intégrité structurelle, tel que démontré par la normalisation de l'expression et de la morphologie de l'occludin et des ZOs dans le thalamus.
- ❖ eNOS est une source majeure de stress oxydatif/nitrosatif cérébrovasculaire et d'induction de MMP-9 dans le thalamus.
- ❖ L'expression de caveolin-1 est à la hausse spécifiquement dans l'endothélium vasculaire du thalamus, versus le cortex frontal, en relation avec la dysfonction de la BHE.
- ❖ L'antioxydant NAC atténue le stress oxydatif/nitrosatif cérébrovasculaire, l'expression de caveolin-1 et la rupture de la BHE dans le thalamus.

Tous ces résultats confirment l'hypothèse de départ proposant que i) l'altération des protéines des JS contribue à la rupture de la BHE, et que ii) le stress oxydatif/nitrosatif cérébrovasculaire, en particulier celui provenant de eNOS, contribue significativement à l'altération des protéines des JS et à la rupture de la BHE via des dommages directs,

l'induction de MMP-9 et de caveolin-1 dans le thalamus de souris déficientes en thiamine. Conséquemment, ces altérations cérébrovasculaires contribuent à la mort neuronale dans le thalamus. Les conclusions de cette thèse sont représentées à la figure 15 suivante.

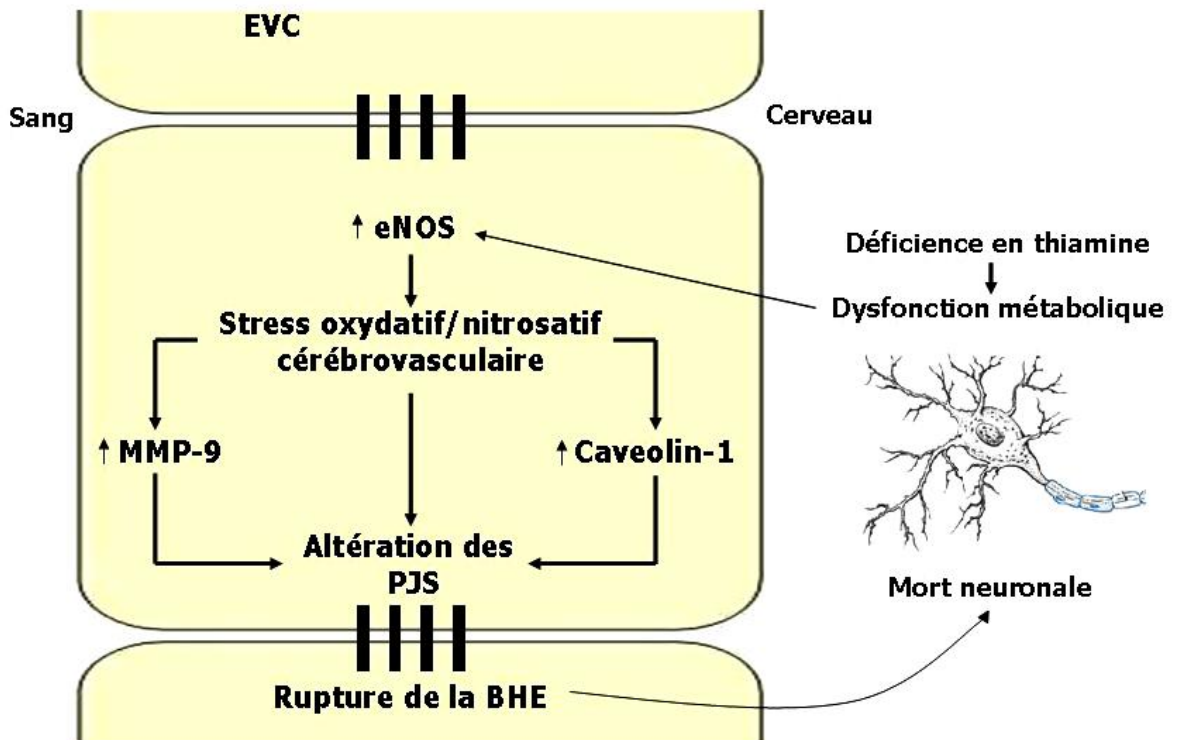


Figure 15. Rôle de eNOS et du stress oxydatif/nitrosatif cérébrovasculaire dans la rupture de la barrière hémato-encéphalique lors de la déficience en thiamine. EVC, endothélium vasculaire cérébral; BHE, barrière hémato-encéphalique; PJS, protéines des jonctions serrées; eNOS, oxyde nitrique synthase endothéliale; MMP-9, métalloprotéinase matricielle-9

IV.2. Perspectives

Le SWK est un désordre alcoolo-nutritionnel dévastateur avec de graves conséquences neurologiques et psychiatriques, résultant en un taux élevé de mortalité lors de la présentation aiguë (encéphalopathie de Wernicke) du syndrome (Victor *et al.*, 1989), et laissant la majorité des patients qui survivent dans un état d'invalidité permanente nécessitant l'hospitalisation de longue durée (Zubaran *et al.*, 1996). Un problème majeur est que ce désordre est la plupart du temps non diagnostiqué (Harper, 1983). En effet, malgré les appels à la vigilance et les tentatives de développement de nouveaux critères de diagnostic permettant une reconnaissance plus précoce de la maladie ainsi que l'identification des patients à risque de développer une DT (Caine *et al.*, 1997; Thomson & Marshall, 2006), le taux de reconnaissance *ante mortem* de la maladie demeure encore très faible (Harper, 2006; Thomson *et al.*, 2008) et lorsqu'elle est reconnue, des dommages irréversibles sont déjà présents dans le cerveau du patient, entraînant la plupart du temps des séquelles permanentes (Victor *et al.*, 1989; Zubaran *et al.*, 1996).

Jusqu'à aujourd'hui, le traitement du SWK consiste en la restauration des niveaux de thiamine via l'administration de thiamine hydrochloride, mais la réponse des patients au traitement, plus spécialement celle des symptômes amnésiques, est souvent incomplète (Zubaran *et al.*, 1996; Thomson & Marshall, 2006). La raison de cette non-réponse à la thiamine, quoique débattue, est généralement attribuée à la sévérité des lésions histologiques dans le diencephale, plus particulièrement dans le thalamus (Victor *et al.*, 1989). Considérant que le traitement avec la thiamine seule n'est pas complètement efficace, il est nécessaire d'élaborer d'autres options de traitement pouvant être utilisées en combinaison avec la thiamine. En effet, bien que la DT soit la cause de la maladie, la perturbation métabolique causée par cette déficience entraîne une cascade temporelle d'événements moléculaires menant ultimement aux lésions histologiques. Une stratégie judicieuse de traitement, en plus de chercher à restaurer les niveaux de thiamine dans le cerveau, serait donc de tenter de bloquer cette cascade pathophysiologique, cette dernière étant possiblement difficile ou impossible à stopper seulement avec la thiamine lorsqu'avancée. L'étude de la pathophysiologie du SWK, le plus souvent dans un contexte

expérimental, a mené à la découverte de plusieurs mécanismes pouvant contribuer à la mort neuronale dans certaines régions spécifiques du cerveau de patients déficients en thiamine, dans l'espoir que ceux-ci mènent au développement d'un traitement plus efficace de l'encéphalopathie (Thomson & Marshall, 2006).

Cette thèse constitue une poursuite des travaux initiés précédemment sur l'importance des anomalies cérébrovasculaires dans la pathogenèse du SWK expérimental (Harata & Iwasaki, 1996), et présente pour la première fois les mécanismes moléculaires à l'origine de ces anomalies. Les résultats ont démontré que la rupture de la BHE, causée par une cascade d'événements moléculaires précis dans l'EVC, contribue significativement au dommage neuronal. Cela est d'un grand intérêt puisque cela signifie que le développement de stratégies thérapeutiques visant à protéger l'intégrité de la BHE pourrait donc limiter le dommage cérébral et les séquelles neuropsychiatriques chez les patients atteints du SWK. Bien entendu, d'autres mécanismes semblent être en cause dans le dommage neuronal et devraient donc aussi être une cible thérapeutique. Quelques essais cliniques ont d'ailleurs été tentés et ont démontré des résultats positifs au niveau du traitement des symptômes amnésiques. Parmi les molécules testées, on retrouve l'activateur noradrénergique *clonidine* (McEntee & Mair, 1980), le bloqueur de la recapture de sérotonine *fluvoxamine* (Stapleton *et al.*, 1988), l'antagoniste du récepteur NMDA *memantine* (Rustembegovic *et al.*, 2003) et l'inhibiteur de l'acétylcholinestérase *donepezil* (Cochrane *et al.*, 2005). Par contre, la prévention du dommage cérébrovasculaire, caractéristique importante de l'encéphalopathie, est aussi nécessaire, mais aucun essai clinique n'a été développé à ce jour dans cette direction.

Les mécanismes de rupture de la BHE ont été clairement démontrés dans cette thèse, et ceux-ci se sont tous avérés être reliés au stress oxydatif/nitrosatif cérébrovasculaire. eNOS semble jouer un rôle majeur au niveau de l'initiation de ce dommage vasculaire en tant que source majeure de stress oxydatif/nitrosatif dans l'endothélium. Bien que la cause de l'induction de eNOS dans les régions vulnérables à la DT ne soit toujours pas connue, cette thèse confirme le rôle délétère de celui-ci spécifiquement dans l'EVC. Cette thèse démontre aussi pour la première fois certains

mécanismes précis par lesquels le stress oxydatif/nitrosatif altère la fonction cérébrale dans la DT, notamment via son interaction avec MMP-9 et caveolin-1, molécules dont le rôle n'avait jamais été exploré précédemment dans la DT. L'étude des mécanismes moléculaires à l'origine de l'altération des protéines des JS de la BHE dans la DT fournit un éventail de possibilités thérapeutiques dans le but de protéger l'intégrité de la fonction cérébrovasculaire. Quatre possibilités s'offrent à nous, dont i) l'inhibition de l'activité de eNOS, ii) le blocage du stress oxydatif/nitrosatif avec des antioxydants, iii) l'inhibition sélective de MMP-9 et iv) l'inhibition de l'expression de caveolin-1.

Bien que eNOS semble jouer un rôle majeur dans le dommage vasculaire, le blocage de son activité n'est peut-être pas la stratégie idéale. Tout d'abord, la spécificité des inhibiteurs de NOS demeure incertaine; de plus, le NO étant impliqué dans plusieurs processus de signalisation et actions physiologiques à l'intérieur et à l'extérieur du cerveau, la modulation adéquate des niveaux de NO via la voie pharmacologique peut s'avérer difficile et risquée (Guix *et al.*, 2005). Un rapport précédant a d'ailleurs démontré que l'utilisation d'inhibiteurs de NOS n'était pas efficace dans la prévention du dommage neuronal chez des souris déficientes en thiamine (Calingasan *et al.*, 1999). Il est important de se rappeler que la toxicité du NO dépend toujours de son niveau de production mais aussi de l'environnement dans lequel ce NO est produit. La présence de ROS, en particulier de superoxyde, joue un rôle critique puisque son interaction avec le NO génère du peroxynitrite, ce dernier étant particulièrement cytotoxique. Une stratégie alternative serait l'utilisation d'antioxydants permettant de réduire le niveau de ROS, de peroxynitrite et aussi de NO, plutôt que de tenter de réduire le niveau de NO via la modulation de l'activité de NOS (Guix *et al.*, 2005).

L'inhibition de l'activité de MMP-9 représente une autre possibilité thérapeutique intéressante. Un problème lié à l'inhibition des MMPs dans le passé était le manque de sélectivité; par contre, un nouvel inhibiteur récemment synthétisé est spécifique pour les gélatinases (MMP-2 et -9), soit le SB-3CT (Brown *et al.*, 2000). Ce dernier s'est récemment avéré efficace dans la prévention des dommages vasculaires et neuronaux en

condition ischémique (Zezong *et al.*, 2005). Il pourrait donc démontrer un potentiel thérapeutique intéressant dans la DT, cela reste à être démontré.

Le rôle de caveolin-1 dans la rupture de la BHE dans la DT, démontré indirectement dans le présent ouvrage, devra être démontré directement via l'inhibition de son expression. L'inhibition de caveolin-1 via la technologie des ARN interférents (siRNA) prévient la perte d'expression de protéines des JS dans des CECs exposées à un stimulus inflammatoire (Zhong *et al.*, 2008); par contre de telles études *in vivo* sont nécessaires afin de confirmer le rôle potentiel de caveolin-1 dans la rupture de la BHE en pathologie. L'inhibition de l'expression de caveolin-1 par la méthode des siRNA serait une approche intéressante à tester chez les animaux déficients en thiamine. L'on pourrait aussi tenter la délétion du gène de caveolin-1, mais cela, tout comme l'inhibition de eNOS, pourrait être risqué dû à la multitude de rôles physiologiques importants exercés par caveolin-1, d'autant plus que le rôle de cette dernière en physiologie n'est pas encore complètement exploré (Parton & Simons, 2007); de plus, on ne connaît pas encore le mode exact de régulation des protéines des JS par caveolin-1. Toutefois, certaines kinases comme les MAPKs semblent être impliquées (Zhong *et al.*, 2008); les recherches futures permettront idéalement d'identifier précisément ces mécanismes et ainsi de les cibler directement, plutôt que de cibler caveolin-1 dont l'action est loin de se limiter seulement à la régulation des JS de la BHE.

Une stratégie thérapeutique idéale, selon les résultats de cette thèse, serait une approche antioxydante. En effet, le stress oxydatif/nitrosatif semble jouer un rôle central dans les mécanismes de rupture de la BHE dans la DT (voir le schéma de la figure 15), et sa suppression permet à la fois d'inhiber l'action délétère de eNOS ainsi que l'expression de MMP-9 et de caveolin-1. L'avantage des antioxydants est de cibler à la fois toutes les espèces réactives produites dans le cerveau, comparativement aux stratégies comme l'inhibition de NOS qui ciblent seulement la production de NO. Ce point est important puisqu'en plus du NO de eNOS, des ROS sont aussi à la hausse dans le thalamus dans la DT (Langlais *et al.*, 1997), et pourraient donc participer directement au dommage neuronal.

Les antioxydants permettent donc à la fois de cibler les dommages oxydatifs vasculaires et neuronaux.

Aucune étude clinique impliquant des antioxydants n'a jamais été tentée chez les patients atteints de SWK. Le NAC serait une molécule antioxydante intéressante à considérer, puisque celui-ci atténue à la fois la rupture de la BHE et la mort neuronale de façon significative dans le thalamus de souris déficientes en thiamine, tel que démontré à la figure 16 suivante.

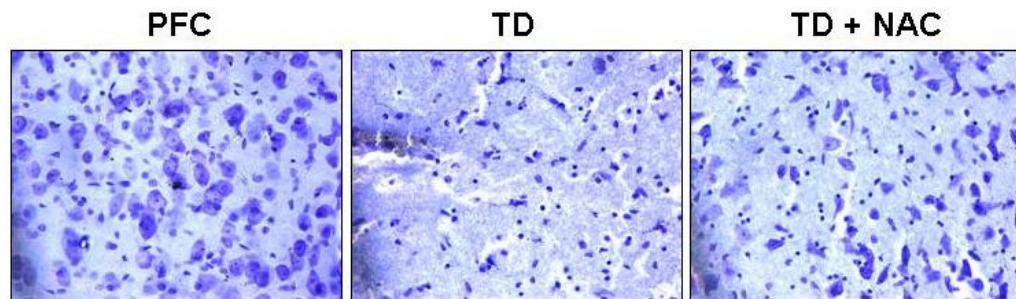


Figure 16. Neuroprotection par le NAC dans le thalamus de souris déficientes en thiamine. PFC, souris contrôles; TD, souris déficientes en thiamine; NAC, *N*-acétylcystéine (grossissement 400X)

Le NAC est une des rares molécules antioxydantes à être utilisée en clinique, notamment pour le traitement de l'hépatotoxicité à l'acétaminophène. Le NAC traverse la BHE et il a démontré un potentiel neuroprotecteur dans une panoplie de désordres cérébraux expérimentaux. Toutefois, ce dérivé synthétique de la cystéine peut entraîner des effets indésirables chez l'humain comme l'hypercystéinémie et des troubles digestifs tels que nausées, vomissements et diarrhée, lorsque administré à fortes doses. De plus, son action est de courte durée (Balch, 1998). Le NAC devrait donc être administré à intervalles rapprochés et à dose modérée lors d'éventuels essais cliniques.

Bien que le stress oxydatif soit maintenant clairement associé à la pathogenèse de plusieurs désordres neurodégénératifs (Ischiropoulos & Beckman, 2003), et que les études

avec des antioxydants se soient avérées fort prometteuses chez les modèles animaux, relativement peu d'études cliniques ont été effectuées chez l'humain avec des antioxydants, et peu de ces dernières ont donné des résultats positifs (Pun *et al.*, 2009), entraînant un certain degré de scepticisme dans la communauté scientifique et médicale par rapport à la validité thérapeutique des stratégies antioxydantes en neurodégénérescence. Toutefois, plusieurs facteurs peuvent potentiellement expliquer la disparité entre les résultats obtenus lors des études cliniques et expérimentales. Tout d'abord, des facteurs d'ordre pharmacocinétique tels que la dose administrée peuvent entrer en jeu; de plus, certaines molécules ne traversent pas facilement la BHE, faisant en sorte qu'une quantité insuffisante de molécules antioxydantes auraient pu se rendre au site de l'insulte oxydative dans le cerveau. D'autre part, le traitement aurait pu être administré à un moment trop tardif dans la progression de l'encéphalopathie, des dommages oxydatifs irréversibles ayant pu être déjà établis au moment de l'étude (Pun *et al.*, 2009). Par ailleurs, le fait que plusieurs désordres cérébraux démontrent une rupture de la BHE peut poser un problème de taille en empêchant la distribution adéquate des molécules antioxydantes au niveau de la région cérébrale affectée (Fagan *et al.*, 2004); cela indique donc la nécessité de traiter le plus rapidement possible, soit idéalement avant l'initiation des dommages cérébrovasculaires.

Un autre facteur majeur ayant pu contribuer significativement à l'échec des études cliniques avec des antioxydants est le choix de la stratégie antioxydante. En effet, l'avancement des connaissances dans le domaine du stress oxydatif a permis de réaliser que certaines approches antioxydantes classiques ne sont peut-être pas idéales. L'administration de vitamine E, par exemple, peut effectivement protéger les membranes cellulaires contre l'oxydation, par contre celle-ci est inefficace contre les espèces réactives générées dans le compartiment cytosolique et ne peut pas non plus protéger l'ADN. Compte-tenu de la diversité des sites de production et du type d'espèces réactives générées dans la cellule, un cocktail d'antioxydants semble nécessaire (Pun *et al.*, 2009); toutefois cette dernière option est cliniquement plus difficile à gérer. Actuellement, une nouvelle avenue thérapeutique est émergente, soit l'utilisation d'*inducteurs monofonctionnels*, une classe de molécules pouvant activer la voie Nrf2-ARE et par conséquent entraîner la transcription simultanée de nombreux gènes antioxydants et anti-inflammatoires initiant ainsi, à elles seules, une

réponse cytoprotectrice à large spectre. Une abondance d'études ont démontré l'effet neuroprotecteur de ces molécules *in vitro* (van Muiswinkel & Kuiperij, 2005). De plus, au courant des cinq dernières années, cette classe de molécules a été abondamment testée *in vivo* et les résultats se sont avérés fort encourageants, puisque l'on a observé un effet protecteur significatif dans une multitude de désordres cérébraux expérimentaux incluant l'ischémie cérébrale, l'hémorragie intracrânienne, la maladie d'Alzheimer et de Parkinson, la sclérose latérale amyotrophique, la maladie de Huntington (Vargas & Johnson, 2009) et l'insulte traumatique cérébrale (Jin *et al.*, 2009; Dash *et al.*, 2009). Plusieurs molécules de cette classe, notamment les bioflavanoïdes et l'acide α -lipoïque, ont donné des résultats positifs lors d'essais cliniques pour le traitement de diverses pathologies et semblent sécuritaires (van Muiswinkel & Kuiperij, 2005). Cependant, ces molécules prometteuses n'ont pas encore été testées chez l'humain en ce qui concerne les pathologies neurodégénératives.

Parmi les *inducteurs monofonctionnels*, l'acide α -lipoïque est une molécule particulièrement attrayante. En effet, en plus de sa fonction en tant qu'inducteur de la voie Nrf2-ARE, celle-ci démontre un pouvoir antioxydant direct exceptionnel : L'acide lipoïque est en effet un chélateur de métaux comme le Fe^{2+} ; Bien plus, ce composé à la fois hydro- et liposoluble est un capteur direct d'espèces réactives incluant le $\cdot OH$ et le $\cdot NO$, et celui-ci atténue aussi l'expression de NF κ B, la réponse inflammatoire et l'expression des MMPs (Halliwell & Gutteridge, 1989; Shay *et al.*, 2009); L'acide lipoïque exerce en plus un rôle clé dans la régénération de plusieurs molécules antioxydantes critiques comme le GSH, la vitamine C et le coenzyme Q (Siegel *et al.*, 1989). L'acide α -lipoïque est d'ailleurs déjà utilisé en clinique pour le traitement de la polynévrite diabétique et de l'intoxication aux métaux lourds. Cette molécule, surnommée *antioxydant universel*, traverse aisément la BHE et devrait donc être considérée pour le traitement de désordres neurodégénératifs dont le SWK. Les inducteurs de Nrf2 n'ont jamais été testés dans le SWK expérimental; il serait intéressant de comparer le niveau de neuroprotection conféré par ces molécules, le cas échéant, à celui conféré par d'autres molécules antioxydantes déjà testées comme le NAC, dans le but de déterminer l'approche antioxydante la plus prometteuse pour d'éventuels essais cliniques chez les patients atteints de SWK.

Avant de passer à l'étape des études cliniques, il est d'abord important de vérifier que les mécanismes pathophysiologiques démontrés dans la présente thèse sont aussi actifs dans le cerveau humain déficient en thiamine. En effet, aucune étude n'a encore été menée dans le but de démontrer la présence d'induction de eNOS et de dommages oxydatifs/nitrosatifs dans les régions cérébrales vulnérables de patients décédés du SWK. Une analyse histopathologique devrait donc être effectuée sur ces cerveaux dans le but de vérifier l'expression de eNOS, de marqueurs de stress oxydatif/nitrosatif, de MMP-9 et de caveolin-1; de plus ces dernières données devraient être corrélées avec le niveau d'extravasation des IgGs et/ou d'albumine ainsi qu'avec le degré de mort neuronale dans ces régions.

Les résultats présentés dans cette thèse, en plus de proposer de nouvelles avenues thérapeutiques pour le SWK, peuvent servir à la compréhension de la pathophysiologie d'autres désordres neurodégénératifs, plusieurs de ces désordres ayant des caractéristiques communes à l'encéphalopathie induite par la déficience en thiamine dont l'altération du métabolisme oxydatif, le stress oxydatif/nitrosatif, la dysfonction de la BHE et la mort neuronale.

En conclusion, cette thèse a démontré les mécanismes moléculaires précis par lesquels la déficience en thiamine entraîne la dysfonction cérébrovasculaire et par conséquent la mort neuronale dans certaines régions spécifiques du cerveau. Ces mécanismes sont tous reliés directement au stress oxydatif/nitrosatif. L'administration précoce d'antioxydants, en combinaison avec la thiamine, devrait donc être une considération importante pour le traitement du syndrome de Wernicke-Korsakoff, en particulier pour les cas d'encéphalopathie de Wernicke aigus.

Chapitre V
BIBLIOGRAPHIE

- Abbott NJ (2005). Dynamics of CNS barriers: evolution, differentiation and modulation. *Cellular and Molecular Neurobiology* **25**, 5-23.
- Abbott NJ, Rönnbäck L, & Hansson E (2006). Astrocyte-endothelial interactions at the blood-brain barrier. *Nature Reviews-Neuroscience* **7**, 41-53.
- Agarwal R & Shukla GS (1999). Potential role of cerebral glutathione in the maintenance of blood-brain barrier integrity in rat. *Neurochemical Research* **24**, 1507-1514.
- Aihara N, Tanno H, Hall JJ, Pitts LH, & Noble LJ (1994). Immunocytochemical localization of immunoglobulins in the rat brain: Relationship to the blood-brain barrier. *The Journal of Comparative Neurology* **342**, 481-496.
- Aikawa H, Watanabe IS, Furuse T, Iwasaki Y, Satoyoshi E, Sumi T, & Moroji T (1984). Low energy levels in thiamine-deficient encephalopathy. *Journal of Neuropathology and Experimental Neurology* **43**, 276-287.
- Akool S, Kleinert H, Hamada FM, Abdelwahab MH, Förstermann U, Pfeilschifter J, & Eberhardt W (2003). Nitric oxide increases the decay of matrix metalloproteinase 9 mRNA by inhibiting the expression of mRNA-stabilizing factor HuR. *Molecular and cellular biology* **23**, 4901-4916.
- Alexander L (1940). Wernicke's disease. Identity of lesions produced experimentally by B₁ avitaminosis in pigeons with hemorrhagic polioencephalitis occurring in chronic alcoholism in man. *American Journal of Pathology* **16**, 61-69.
- Allt G & Lawrenson JG (2001). Pericytes: cell biology and pathology. *Cells Tissues Organs* **169**, 1-11.
- Andreeva AY, Piontek J, Blasig IE, & Utepbergenov DI (2006). Assembly of tight junction is regulated by the antagonism of conventional and novel protein kinase C isoforms. *Int J Biochem Cell Biol* **38**, 222-233.
- Anrather J, Racchumi G, & Iadecola C (2006). NF-kappaB regulates phagocytic NADPH oxidase by inducing the expression of gp91phox. *J Biol Chem* **281**, 5657-5667.

- Aoyama K, Matsumura N, Watabe M, & Nakaki T (2008). Oxidative stress on EAAC1 is involved in MPTP-induced glutathione depletion and motor dysfunction. *European Journal of Neuroscience* **27**, 20-30.
- Armstrong-James M, Ross DT, Chen F, & al. (1988). The effects of thiamine deficiency on the structure and physiology of the rat forebrain. *Metabolic Brain Disease* **3**, 91-124.
- Arthur FE, Shivers RR, & Bowman PD (1987). Astrocyte-mediated induction of tight junctions in brain capillary endothelium: an efficient in vitro model. *Dev Brain Res* **36**, 155-159.
- Asahi M, Wang X, Mori T, Sumii T, Jung JC, Moskowitz MA, Fini ME, & Lo EH (2001). Effects of matrix metalloproteinase-9 gene knockout on the proteolysis of blood-brain barrier and white matter components after cerebral ischemia. *Journal of Neuroscience* **21**, 7724-7732.
- Avdulov NA, Chochina SV, Igbavboa U, O'Hare EO, Schroeder F, Cleary JP, & Wood WG (1997). Amyloid β -peptides increase annular and bulk fluidity and induce lipid peroxidation in brain synaptic plasma membranes. *Neurochem* **68**, 2086-2091.
- Bains JS & Shaw CA (1997). Neurodegenerative disorders in humans: the role of glutathione in oxidative stress-mediated neuronal death. *Brain Research Reviews* **25**, 335-358.
- Balch JF (1998). *The Super Antioxidants, Why they will change the face of healthcare in the 21st century*, Evans & Co., New York.
- Balda MS, Whitney JA, Flores C, Gonzalez S, Cerejido M, & Matter K (1996). Functional dissociation of paracellular permeability and transepithelial electrical resistance and disruption of the apical-basolateral intramembrane diffusion barrier by expression of a mutant tight junction membrane protein. *J Cell Biol* **134**, 1031-1049.
- Bamforth SD, Kniesel U, Wolburg H, Engelhardt B, & Risau W (1999). A dominant mutant of occludin disrupts tight junction structure and function. *Journal of Cellular Science* **112**, 1879-1888.
- Banati RB, Gehrman J, Schubert P, & Kreutzberg GW (1993). Cytotoxicity of microglia. *Glia* **7**, 111-118.

- Barber AJ & Lieth E (1997). Agrin accumulates in the brain microvascular basal lamina during development of the blood-brain barrier. *Dev Dyn* **208**, 62-74.
- Bazzoni G & Dejana E (2004). Endothelial cell-to-cell junctions: molecular organization and role in vascular homeostasis. *Physiological reviews* **84**, 869-901.
- Beckman JS & Koppenol WH (1996). Nitric oxide, superoxide, and peroxynitrite: the good, the bad and the ugly. *American Journal of Physiology* **271**, C1424-C1437.
- Bettendorff L & Wins P (2009). Thiamine diphosphate in biological chemistry: new aspects of thiamin metabolism, especially triphosphate derivatives acting other than as cofactors. *FEBS Journal* **276**, 2917-2925.
- Bjarnegard M, Enge M, Norlin J, Gustafsdottir S, Fredriksson S, Abramsson A, Takemoto M, Gustafsson E, Fassler R, & Betsholtz C (2004). Endothelium-specific ablation of PDGFB leads to pericyte loss and glomerular, cardiac and placental abnormalities. *Development* **131**, 1845-1857.
- Bowman KM, Goodhart R, & Jolliffe N (1939). Observations on role of vitamin B₁ in the etiology and treatment of Korsakoff's psychosis. *Journal of Nerv Ment Disease* **90**, 569-575.
- Broadwell RD (1989). Transcytosis of macromolecules through the blood-brain barrier. A cell biological perspective and critical appraisal. *Acta Neuropathologica* **79**, 117-128.
- Brown S, Bernardo MM, Li ZH, Kotra LP, Tanaka Y, & Fridman RMobashery S (2000). Potent and selective mechanism-based inhibition of gelatinases. *J Am Chem Soc* **122**, 6799-6800.
- Brown DI & Griendling KK (2009). Nox proteins in signal transduction. *Free Radical Biology and Medicine* **47**, 1239-1253.
- Brown DJ, Lin B, Chwa M, Atilano SR, Kim DW, & Kenney MC (2004). Elements of the nitric oxide pathway can degrade TIMP-1 and increase gelatinase activity. *Mol Vis* **10**, 281-288.
- Brown GC (1999). Nitric oxide and mitochondrial respiration. *Biochem Biophys Acta* **1411**, 351-369.

- Brown RC & Davis TP (2002). Calcium modulation of adherens and tight junction function. *Stroke* **33**, 1711.
- Brown RC, Wu L, Hicks K, & O'Neil R (2008). Regulation of blood-brain barrier permeability by transient receptor potential type C and type V calcium-permeable channels. *Microcirculation* **15**, 359-371.
- Butt AM, Jones HC, & Abbott NJ (1990). Electrical resistance across the blood-brain barrier in anesthetized rats: a developmental study. *Journal of Physiology (Lond)* **429**, 47-62.
- Butterworth RF (1986). Cerebral thiamine-dependent enzyme changes in experimental Wernicke's encephalopathy. *Metabolic Brain Disease* **1**, 165-175.
- Butterworth RF (1993). Pathophysiologic mechanisms responsible for the reversible (thiamine-responsive) and irreversible (thiamine non-responsive) neurological symptoms of Wernicke's encephalopathy. *Drug and Alcohol Review* **12**, 315-322.
- Butterworth RF (2009). Thiamine deficiency-related brain dysfunction in chronic liver failure. *Metabolic Brain Disease* **24**, 189-196.
- Butterworth RF, Gaudreau C, Vincelette J, Bourgault A, Lamothe F, & Nutini A (1991). Thiamine Deficiency and Wernicke's Encephalopathy in AIDS. *Metabolic Brain Disease* **6**, 207-212.
- Butterworth RF, Giguere JF, & Besnard AM (1986). Activities of thiamine-dependent enzymes in two experimental models of thiamine-deficiency encephalopathy. 2. Ketoglutarate dehydrogenase. *Neurochemical Research* **11**, 567-577.
- Butterworth RF, Giguere JF, & Besnard AM (1985). Activities of thiamine-dependent enzymes in two experimental models of thiamine-deficiency encephalopathy. 1. The pyruvate dehydrogenase complex. *Neurochemical Research* **10**, 1417-1428.
- Butterworth RF & Heroux M (1989). Effect of pyridoxamine treatment and subsequent thiamine rehabilitation on regional cerebral amino acids and thiamine-dependent enzymes. *Journal of Neurochemistry* **52**, 1079-1084.
- Caine D, Halliday GM, Kril JJ, & Harper CG (1997). Operational criteria for the classification of chronic alcoholics: identification of Wernicke's encephalopathy. *Journal of Neurology, Neurosurgery, and Psychiatry* **62**, 51-60.

- Calingasan NY, Baker H, Sheu KF, & Gibson GE (1995a). Blood-brain barrier abnormalities in vulnerable brain regions during thiamine deficiency. *Experimental Neurology* **134**, 64-72.
- Calingasan NY, Chun WJ, Park LC, Uchida K, & Gibson GE (1999). Oxidative stress is associated with region-specific neuronal death during thiamine deficiency. *Journal of Neuropathology and Experimental Neurology* **58**, 946-958.
- Calingasan NY, Gandy SE, Baker H, Sheu KFR, Kim KS, Wisniewski HM, & Gibson GE (1995b). Accumulation of amyloid precursor protein-like immunoreactivity in rat brain in response to thiamine deficiency. *Brain Research* **677**, 50-60.
- Calingasan NY & Gibson GE (2000). Vascular endothelium is a site of free radical production and inflammation in areas of neuronal loss in thiamine-deficient brain. *Annals of the New York Academy of Sciences* **903**, 353-356.
- Calingasan NY, Huang PL, Chun HS, Fabian A, & Gibson GE (2000). Vascular factors are critical in selective neuronal loss in an animal model of impaired oxidative metabolism. *Journal of Neuropathology and Experimental Neurology* **59**, 207-217.
- Calingasan NY, Park LC, Calo LL, Trifiletti RR, Gandy SE, & Gibson GE (1998). Induction of nitric oxide synthase and microglial responses precede selective cell death induced by chronic impairment of oxidative metabolism. *American Journal of Pathology* **153**, 599-610.
- Candelario-Jalil E, Yang Y, & Rosenberg GA (2009). Diverse roles of matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases in neuroinflammation and cerebral ischemia. *Neuroscience* **158**, 983-994.
- Chan H, Butterworth RF, & Hazell AS (2004). Primary cultures of rat astrocytes respond to thiamine deficiency-induced swelling by downregulating aquaporin-4 levels. *Neuroscience Letters* **366**, 231-234.
- Chan PH, Schmidley JW, Fishman RA, & Longar SM (1984). Brain injury, edema, and vascular permeability changes induced by oxygen-derived free radicals. *Neurology* **34**, 315-320.
- Chen Q, Okada S, & Okeda R (1997). Causality of parenchymal and vascular changes in rats with experimental thiamine deficiency encephalopathy. *Pathology International* **47**, 748-756.

- Chen Y, Lu Q, Schneeberger E, & Goodenough DA (2000). Restoration of tight junction structure and barrier function by down-regulation of the mitogen-activated protein kinase pathway in ras-transformed Madin-Darby canine kidney cells. *Mol Biol Cell* **11**, 849-862.
- Chen ZL, Indyk JA, Bugge TH, Kombrinck KW, Degen JL, & Strickland S (1999). Neuronal death and blood-brain barrier breakdown after excitotoxic injury are independent processes. *The Journal of Neuroscience* **19**, 9813-9820.
- Chung KK, Thomas B, Li X, Pletnikova O, Troncoso JC, Marsh L, Dawson VL, & Dawson TM (2004). S-nitrosylation of parkin regulates ubiquitination and compromises parkin's protective function. *Science* **304**, 1328-1331.
- Clarke H, Soler AP, & Mullin JM (2000). Protein kinase C activation leads to dephosphorylation of occludin and tight junction permeability increase in LLC-PK1 epithelial cell sheets. *J Cell Sci* **113**, 3187-3196.
- Cochrane M, Cochrane A, Jauhar P, & Ashton E (2005). Acetylcholinesterase inhibitor for the treatment of Wernicke-Korsakoff syndrome--three further cases show response to donepezil. *Alcohol and Alcoholism* **40**, 151-154.
- Collins GH (1967). Glial cell changes in the brainstem of thiamine-deficient rats. *American Journal of Pathology* **50**, 791-814.
- Connor JR & Benkovic SA (1992). Iron regulation in the brain: histochemical, biochemical, and molecular considerations. *Annals of neurology* **32**, S51-S61.
- Cunningham LA, Wetzel M, & Rosenberg GA (2005). Multiple roles for MMPs and TIMPs in cerebral ischemia. *Glia* **50**, 329-339.
- Cuzzocrea S, Mazzen E, Costantino G, Serraino I, Dugo L, Calabrò G, Cucinotta G, De Sarro A, & Caputi AP (2000). Beneficial effect of n-acetylcysteine on ischaemic brain injury. *Br J Pharmacol* **130**, 1219-1226.
- Dallastra LM, Pisarov LA, Esplen JE, Werley JV, Moses AV, Nelson JA, & Achim CL (1999). Blood-brain barrier tight junction disruption in human immunodeficiency virus-1 encephalitis. *Am J Pathol* **155**, 1915-1927.
- Dasari A, Bartholomew JN, Volonte D, & Galbiati F (2006). Oxidative stress induces premature senescence by stimulating caveolin-1 gene transcription through p38

mitogen-activated protein kinase/Sp1-mediated activation of two GC-rich promoter elements. *Cancer Research* **66**, 10805-10814.

Dash PK, Zhao J, Orsi SA, Zhang M, & Moore AN (2009). Sulphoraphane improves cognitive function administered following traumatic brain injury. *Neuroscience Letters* **460**, 103-107.

Droge W (2002). Free radicals in the physiological control of cell function. *Physiol Rev* **82**, 47-95.

Easton AS & Abbott NJ (2002). Bradykinin increases permeability by calcium and 5-lipoxygenase in the ECV304/C6 cell culture model of the blood-brain barrier. *Brain Research* **953**, 157-169.

Fagan SC, Hess DC, Hohnadel EJ, Pollock DM, & Ergul A (2004). Targets for vascular protection after acute ischemic stroke. *Stroke* **35**, 2220-2225.

Farquhar MG & Palade GE (1963). Junctional complexes in various epithelia. *J Cell Biol* **17**, 375-412.

Feldman GJ, Mullin JM, & Ryan MP (2005). Occludin: Structure, function and regulation. *Advanced Drug Delivery Reviews* **57**, 883-917.

Fishman PS, Farrand DA, & Kristt DA (1990). Internalization of plasma proteins by cerebellar Purkinje cells. *J Neurol Sci* **100**, 43-49.

Fu AL, Dong ZH, & Sun MJ (2006). Protective effect of N-Acetyl-L-Cysteine on amyloid beta-peptide-induced learning and memory deficits in mice. *Brain Research* **1109**, 201-206.

Funk C (1911). On the chemical nature of the substance which cures polyneuritis in birds induced by a diet of polished rice. *Journal of Physiology* **43**, 395-400.

Furuse M, Hirase T, Itoh M, Nagafuchi A, Yonemura S, Tsukita S, & Tsukita S (1993). Occludin a novel integral membrane protein localizing at tight junctions. *J Cell Biol* **123**, 1777-1788.

- Gaitonde MK, Fayein NA, & Johnson AL (1975). Decreased metabolism *in vivo* of glucose into amino acids of the brain of thiamine-deficient rats after treatment with pyridoxamine. *Journal of Neurochemistry* **24**, 1215-1223.
- Gamper E (1928). Zur Frage der Polioencephalitis haemorrhagica der chronischen Alkoholiker: Anatomische Befund beim alkoholischen Korsakow und ihre Beziehungen zum klinischen Bild. *Deutsche Z Nervenhe* **102**, 122-129.
- Garcia JGN, Wang P, Liu F, Hershenson MB, Borbiev T, & Verin AD (2001). Pertussis toxin directly activates endothelial cell p42/p44 MAP kinases via a novel signaling pathway. *Am J Physiol* **280**, C1233-C1241.
- Garcia-Cardena G, Martasek P, Masters BS, & al. (1997). Dissecting the interaction between nitric oxide synthase (NOS) and caveolin. Functional significance of the nos caveolin binding domain *in vivo*. *J Biol Chem* **272**, 25437-25440.
- Gehrmann J, Bonnekoh P, Miyazawa T, Hossman KA, & Kreutzberg GW (1992). Immunocytochemical study of an early microglial activation in ischemia. *Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism* **12**, 257-269.
- Gehrmann J, Matsumoto Y, & Kreutzberg GW (1995). Microglia: intrinsic immunoeffector cell of the brain. *Brain Research Reviews* **20**, 269-287.
- Gibson GE, Calingasan NY, Baker H, Gandy S, & Sheu KF (1997). Importance of vascular changes in selective neurodegeneration with thiamine deficiency. *Annals of the New York Academy of Sciences* **826**, 516-519.
- Gibson GE, Ksiezak-Reding H, Sheu KFR, Mykytyn V, & Blass JP (1984). Correlation of enzymatic, metabolic and behavioral deficits in thiamine deficiency and its reversal. *Neurochemical Research* **9**, 803-814.
- Gonzalez-Mariscal L, Betanzo A, & Avila-Flores A (2000). MAGUK proteins: structure and role in the tight junctions. *Cell & Developmental Biology* **11**, 315-324.
- Gopalakrishnan S, Raman N, Atkinson SJ, & Marrs JA (1998). Rho GTPase signaling regulates tight junction assembly and protects tight junctions during ATP depletion. *Am J Physiol* **275**, C798-C-809.

- Gow AJ, Farkouh CR, Munson DA, Posencheg MA, & Ischiropoulos H (2004). Biological significance of nitric oxide-mediated protein modifications. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* **287**, L262-L268.
- Greenwood J (1991). Mechanisms of blood-brain barrier breakdown. *Neuroradiology* **33**, 95-100.
- Greenwood J, Love ER, & Pratt OE (1982). Kinetics of thiamine transport across the blood-brain barrier in the rat. *Journal of Physiology* **327**, 95-103.
- Gu Z, Kaul M, Yan B, Kridel SJ, Cui J, Strongin A, Smith JW, Liddington RC, & Lipton SA (2002). S-nitrosylation of matrix metalloproteinases: signaling pathway to neuronal cell death. *Science* **297**, 1186-1190.
- Gudden H (1896). Klinische und anatomische Beitrage zur Kenntniss der multiplen Alkoholneuritis nebst Bemerkungen ueber die Regenerations-vorgaenge im peripheren Nervensystem. *Arch Psychiatry* **28**, 643-741.
- Guix FX, Uribesalgo I, Coma M, & Muñoz FJ (2005). The physiology and pathophysiology of nitric oxide in the brain. *Progress in Neurobiology* **76**, 126-152.
- Gum R, Lengyel E, Juarez J, Chen JH, Sato H, Seiki M, & Boyd D (1996). Stimulation of 92-kDa gelatinase B promoter activity by ras is mitogen-activated protein kinase kinase 1-independent and requires multiple transcription factor binding sites including closely spaced PEA3/ets and AP-1 sequences. *J Biol Chem* **271**, 10672-10680.
- Hakim AM (1984). The induction and reversibility of cerebral acidosis in thiamine deficiency. *Annals of neurology* **16**, 673-679.
- Hakim AM (1986). Effect of thiamine deficiency and its reversal on cerebral blood flow in the rat. Observations on the phenomena of hyperperfusion, "no reflow", and delayed hypoperfusion. *Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism* **6**, 79-85.
- Hakim AM & Pappius HM (1981). The effect of thiamine deficiency on local cerebral glucose utilization. *Annals of neurology* **9**, 334-339.
- Halliwell B (1992). Reactive oxygen species and the central nervous system. *Journal of Neurochemistry* **59**, 1609-1623.

- Halliwell B & Gutteridge JMC (1989). *Free radicals in biology and medicine*, Second edition, Oxford University Press, New York.
- Ham D & Karska-Wysocki B (2005). Energy and glucose pathways in thiamine deficient primary rat brain microvascular endothelial cells. *Gen Physiol Biophys* **24**, 467-474.
- Han F, Shirasaki Y, & Fukunaga K (2006). Microsphere embolism-induced endothelial nitric oxide synthase expression mediates disruption of the blood-brain barrier in rat brain. *Journal of Neurochemistry* **99**, 97-106.
- Hanisch UK (2002). Microglia as a source and target of cytokines. *Glia* **40**, 140-155.
- Hansson E, Johanson BB, Westergren I, & Ronnback L (1994). Glutamate-induced swelling of single astroglial cells in primary culture. *Neuroscience* **63**, 1057-1066.
- Haorah J, Ramirez SH, Schall K, Smith D, Pandya R, & Persidsky Y (2007). Oxidative stress activates protein tyrosine kinase and matrix metalloproteinases leading to blood-brain barrier dysfunction. *Journal of Neurochemistry* **101**, 566-576.
- Hara MR, Agrawal N, Kim SF, Cascio MB, Fujimuro M, Ozeki Y, Takahashi M, Cheah JH, Tankou SK, Hester LD, Ferris CD, Hayward SD, Snyder SH, & Sawa A (2005). S-nitrosylated GADPH initiates apoptotic cell death by nuclear translocation following Siah1 binding. *Nature Cell Biology* **7**, 665-674.
- Harata N & Iwasaki Y (1995). Evidence for early blood-brain barrier breakdown in experimental thiamine deficiency in the mouse. *Metabolic Brain Disease* **10**, 159-174.
- Harata N & Iwasaki Y (1996). The blood-brain barrier and selective vulnerability in experimental thiamine-deficiency encephalopathy in the mouse. *Metabolic Brain Disease* **11**, 55-69.
- Harding A, Halliday G, Caine D, & Kril J (2000). Degeneration of anterior thalamic nuclei differentiates alcoholics with amnesia. *Brain* **123**, 141-154.
- Harper C (1979). Wernicke's encephalopathy: a more common disease than realised. *Journal of Neurology, Neurosurgery, and Psychiatry* **42**, 226-231.

- Harper C (2006). Thiamine (vitamin B₁) deficiency and associated brain damage is still common throughout the world and prevention is simple and safe! *European Journal of Neurology* **13**, 1078-1082.
- Harper C (1983). The incidence of Wernicke's encephalopathy in Australia-a neuropathological study of 131 cases. *Journal of Neurology, Neurosurgery, and Psychiatry* **46**, 593-598.
- Harper C & Butterworth RF (1997). Nutritional and Metabolic Disorders. In *Greenfield's Neuropathology*, (Lantos P & Graham D, eds.), pp. 601-655. Edward Arnold, Cambridge.
- Harper CG (1980). Sudden, unexpected death and Wernicke's encephalopathy: a complication of prolonged intravenous feeding. *Australia and New Zealand Journal of Medicine* **10**, 230-235.
- Hassel B, Iversen EG, & Fonnum F (1994). Neurotoxicity of albumin *in vivo*. *Neuroscience Letters* **167**, 29-32.
- Hawkins BT, Lundeen TF, Norwood KM, Brooks HL, & Egleton RD (2008). Increased blood-brain barrier permeability and altered tight junctions in experimental diabetes in the rat: contribution of hyperglycaemia and matrix metalloproteinases. *Diabetologia* **50**, 202-211.
- Hazell AS (2009). Astrocytes are a major target in thiamine deficiency and wernicke's encephalopathy. *Neurochemistry International* **55**, 129-135.
- Hazell AS, Butterworth RF, & Hakim AM (1993). Cerebral vulnerability is associated with selective increase in extracellular glutamate concentration in experimental thiamine deficiency. *Journal of Neurochemistry* **61**, 1155-1158.
- Hazell AS, Hakim AM, Senterman MK, & Hogan MJ (1998). Regional activation of L-type voltage-sensitive calcium channels in experimental thiamine deficiency. *Journal of Neuroscience Research* **52**, 742-749.
- Hazell AS, Rama Rao KV, Danbolt NC, Pow DV, & Butterworth RF (2001). Selective down-regulation of the astrocyte glutamate transporters GLT-1 and GLAST within the medial thalamus in experimental Wernicke's encephalopathy. *Journal of Neurochemistry* **78**, 560-568.

- Hazell AS & Wang C (2005). Downregulation of complexin I and complexin II in the medial thalamus is blocked by N-acetylcysteine in experimental Wernicke's encephalopathy. *Journal of Neuroscience Research* **79**, 200-207.
- Heo JH, Han SW, & Lee SK (2005). Free radicals as triggers of brain edema formation after stroke. *Free Radical Biology and Medicine* **39**, 51-70.
- Heroux M & Butterworth RF (1992). Animal Models of the Wernicke-Korsakoff Syndrome. In *Neuromethods, Vol.22: Animal Models of Neurological Disease, II*, (Boulton A, Baker GB, & Butterworth RF, eds.), pp. 95-131. Humana Press, Totowa, NJ.
- Héroux M & Butterworth RF (1988). Reversible alterations of cerebral α -aminobutyric acid in pyridoxamine-treated rats: implications for the pathogenesis of Wernicke's encephalopathy. *Journal of Neurochemistry* **51**, 1221-1226.
- Héroux M & Butterworth RF (1995). Regional alterations of thiamine phosphate esters and of thiamine diphosphate-dependent enzymes in relation to function in experimental Wernicke's encephalopathy. *Neurochemical Research* **20**, 87-93.
- Hertz L & Peng L (1992). Energy metabolism at the cellular level of the CNS. *Can J Physiol Pharmacol* **70**, S145-S157.
- Hoyumpa AM, Nichols S, Henderson GI, & Schenker S (1978). Intestinal thiamine transport: effect of chronic ethanol administration in rats. *American Journal of Clinical Nutrition* **31**, 938-945.
- Huber JD & al. (2001). Inflammatory pain alters blood-brain barrier permeability and tight junctional protein expression. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* **280**, H1241-H1248.
- Hung SC, Hung SH, Tarng DC, Yang WC, Chen TW, & Huang TP (2001). Thiamine deficiency and unexplained encephalopathy in hemodialysis and peritoneal dialysis patients. *American Journal of Kidney Diseases* **38**, 941-947.
- Iadecola C, Pelligrino DA, Moskowitz MA, & Lassen NA (1994). Nitric oxide synthase inhibition and cerebrovascular regulation. *Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism* **14**, 175-192.

- Iadecola C, Xu X, Zhang F, El-Fakahany EE, & Ross ME (1995). Marked induction of calcium-independent nitric oxide synthase activity after focal cerebral ischemia. *Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism* **15**, 52-59.
- Ignarro LJ (1991). Signal transduction mechanisms involving nitric oxide. *Biochem Pharmacol* **41**, 485-490.
- Ikezu T, Ueda H, Trapp D, Nishiyama K, Sha JF, Volonte D, Galbiati F, Byrd AL, Bassell G, Serizawa H, Lane WS, Lisanti MP, & Okamoto T (1998). Affinity-purification and characterization of caveolins from the brain. Differential expression of caveolin-1, -2 and -3 in brain endothelial and astroglial cell types. *Brain Research* **804**, 177-192.
- Ischiropoulos H & Beckman JS (2003). Oxidative stress and nitration in neurodegeneration: cause, effect, or association? *Journal of Clinical Investigation* **111**, 163-169.
- Itokawa Y (1995). Thiamine and nervous system function: An historical sketch. *Metabolic Brain Disease* **11**, 1-7.
- Itokawa Y & Cooper JR (1970). Ion movements and thiamine. II. The release of the vitamin from membrane fragments. *Biochem Biophys Acta* **196**, 274-284.
- Jin W, Wang H, Yan W, Zhu L, Hu Z, Ding Y, & Tang K (2009). Role of Nrf2 in protection against traumatic brain injury in mice. *Journal of Neurotrauma* **26**, 131-139.
- Kadota E, Nonaka K, Karasumo M, Nishi K, Teramura K, & Hashimoto S (1997). Neurotoxicity of serum components, comparison between CA1 and striatum. *Acta Neurochir Suppl (Wien)* **70**, 141-143.
- Kakinuma Y, Hama H, Sugiyama F, Yagami K, Goto K, Murakami K, & Fukamizu A (1998). Impaired blood-brain barrier function in angiotensinogen-deficient mice. *Nature Medicine* **4**, 1078-1080.
- Kale G, Naren AP, Sheth P, & Rao RK (2003). Tyrosine phosphorylation of occludin attenuates its interaction with ZO-1, ZO-2, and ZO-3. *Biochem Biophys Res Commun* **302**, 324-329.
- Kandel ER, Schwartz JH, & Jessell TM (1991). *Principles of Neural Science*, Fourth edition, McGraw-Hill Companies, (Appendix B, pp.1289-1301).

- Kant F (1932). Die Pseudoencephalitis Wernicke der Alkoholiker (Polioencephalitis haemorrhagica superior acuta). *Arch Psychiat Nerven* **98**, 702-768.
- Karuppagounder SS, Shi Q, Xu H, & Gibson GE (2007). Changes in inflammatory processes associated with selective vulnerability following mild impairment of oxidative metabolism. *Neurobiology of Disease* **26**, 353-362.
- Khales T, Luedike P, Endres M, Galla HJ, Steinmetz H, Busse R, Neumann-Haefelin T, & Brandes RP (2007). NADPH oxidase plays a central role in blood-brain barrier damage in experimental stroke. *Stroke* **38**, 3000-3006.
- Kieseier BC, Seifert T, Giovannoni G, & Hartung HP (1999). Matrix metalloproteinases in inflammatory demyelination: targets for treatment. *Neurology* **53**, 20-25.
- Kim JA, Formoso G, Li Y, Potenza MA, Marasciulo FL, Montagnani M, & Quon MJ (2007). Epigallocatechin gallate, a green tea polyphenol, mediates NO-dependent vasodilatation using signaling pathways in vascular endothelium requiring reactive oxygen species and Fyn. *J Biol Chem* **282**, 13736-13745.
- Kinnersley HW & Peters RA (1930). Brain localization of lactic acidosis in avitaminosis B₁ and its relation to the origin of symptoms. *Biochem J* **24**, 711-722.
- Kirk J, Plumb J, Mirakhur M, & McQuaid S (2003). Tight junctional abnormality in multiple sclerosis white matter affects all calibres of vessel and is associated with blood-brain barrier leakage and active demyelination. *Journal of Pathology* **201**, 319-327.
- Koehler RC, Roman RJ, & Harder DR (2008). Astrocytes and the regulation of cerebral blood flow. *Trends in Neuroscience* **32**, 160-169.
- Korsakoff SS (1887). Disturbance of psychic function in alcoholic paralysis and its relation to the disturbance of the psychic sphere in multiple neuritis of non-alcoholic origin. *Vestnik Psichiatrii* **IV**, fascicle 2.
- Kril JJ (1996). Neuropathology of Thiamine Deficiency Disorders. *Metabolic Brain Disease* **11**, 9-17.
- Krizbai IA, Bauer H, Bresgen N, Eckl PM, Farkas A, Szatmári E, Traweger A, Wejksza K, & Bauer HC (2005). Effect of oxidative stress on the junctional proteins of cultured cerebral endothelial cells. *Cellular and Molecular Neurobiology* **25**, 129-139.

- Krizbai IA, Deli MA, Pestenacz A, Siklos CA, Andras I, & Joo F (1998). Expression of glutamate receptors on cultured cerebral endothelial cells. *J Neurosc Res* **54**, 814-819.
- Kruse M, Navarro D, Desjardins P, & Butterworth RF (2004). Increased brain endothelial nitric oxide synthase expression in thiamine deficiency: relationship to selective vulnerability. *Neurochemistry International* **45**, 49-56.
- Laforenza U, Patrini C, Gastaldi G, & Rindi G (1990). Effects of acute and chronic ethanol administration on thiamine metabolizing enzymes in some brain areas and other organs of the rat. *Alcohol* **25**, 591-603.
- Langlais PJ, Anderson G, Guo SX, & Bondy SC (1997). Increased cerebral free radical production during thiamine deficiency. *Metabolic Brain Disease* **12**, 137-143.
- Langlais PJ & Mair RG (1990). Protective effects of the glutamate antagonist MKB801 on pyriethiamine-induced lesions and amino acids changes in rat brain. *The Journal of Neuroscience* **10**, 1664-1674.
- Lee H, Namkoong K, Kim D, Kim K, Cheong Y, Kim S, Lee W, & Kim K (2004). Hydrogen peroxide-induced alterations of tight junction proteins in bovine brain microvascular endothelial cells. *Microvasc Res* **68**, 231-238.
- Leong DK & Butterworth RF (1996). Neuronal cell death in Wernicke's encephalopathy: Pathophysiologic mechanisms and implications for PET imaging. *Metabolic Brain Disease* **11**, 71-79.
- Leybaert L (2005). Neurobarrier coupling in the brain: a partner of neurovascular and neurometabolic coupling? *Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism* **25**, 2-16.
- Li H, Brodsky S, Basco M, Romanov V, De Angelis DA, & Goligorsky MS (2001). Nitric oxide attenuates signal transduction: Possible role in dissociating caveolin-1 scaffold. *Circulation Research* **88**, 229-236.
- Li PL (2009). Redox signalsomes in membrane lipid raft clusters of endothelial cells. *Free Radical Biology and Medicine* **47** (Suppl 1), S1.
- Li X & Stark GR (2002). NFkB-dependent signaling pathways. *Experimental Hematology* **30**, 285-296.

- Lim EJ, Smart EJ, Toborek M, & Hennig B (2007). The role of caveolin-1 in PCB77-induced eNOS phosphorylation in human-derived endothelial cells. *Am J Physiol Hearth Circ Physiol* **293**, H3340-H3347.
- Lim SO, Gu JM, Kim MS, Park YN, Park CK, Cho JW, Park YM, & Jung G (2008). Epigenetic changes induced by reactive oxygen species in hepatocellular carcinoma: methylation of the E-cadherin promotor. *Gastroenterology* **135**, 2128-2140.
- Lipton SA, Choi YB, Sucher NJ, Pan ZH, & Stamler JS (1996). Redox state, NMDA receptors and NO-related species. *Trends Pharmacol Sci* **17**, 186-187.
- Lohmann C, Krischke M, Wegener J, & Galla HJ (2004). Tyrosine phosphatase inhibition induces loss of blood-brain barrier integrity by matrix metalloproteinase-dependent and -independent pathways. *Brain Research* **995**, 184-196.
- Loo DT, Copani A, Pike CJ, Whittermore ER, Walencewicz AJ, & Cotman CW (1993). Apoptosis is induced by beta-amyloid in cultured central nervous system neurons. *Proc Natl Acad Sci USA* **90**, 7951-7955.
- Lovatt D, Sonnewald U, Waagepetersen HS, Schousboe A, He W, Lin JH, Han X, Takano T, Wang S, Sim FJ, Goldman SA, & Nedergaard M (2007). The transcriptome and metabolic gene signature of protoplasmic astrocytes in the adult murine cortex. *Journal of Neuroscience* **27**, 12255-12266.
- Lu H, Zhang DM, Chen HL, & al. (2009). N-acetylcysteine suppresses oxidative stress in experimental rats with subarachnoid hemorrhage. *J Clin Neurosci* **16**, 684-688.
- Manz HJ & Robertson DM (1972). Vascular permeability to horseradish peroxidase in brainstem lesions of thiamine-deficient rats. *American Journal of Pathology* **66**, 565-576.
- Marcet-Palacios M, Graham K, Cass C, Befus AD, Mayers I, & Radomski MW (2003). Nitric oxide and cyclic GMP increase the expression of matrix metalloproteinase-9 in vascular smooth muscle. *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics* **307**, 429-436.
- Mattson MP, Cheng B, Davis D, Bryant K, Lieberburg I, & Rydel RE (1992). β -Amyloid peptide destabilized calcium homeostasis and render human cortical neurons vulnerable to excitotoxicity. *Journal of Neuroscience* **12**, 376-389.

- Mayhan WG (2000). Nitric oxide donor-induced increase in permeability of the blood-brain barrier. *Brain Research* **866**, 101-108.
- McCaffrey G, Staatz WD, Quigley CA, Nametz N, Seelbach MJ, Campos CR, Brooks TA, Egleton RD, & Davis TP (2007). Tight junctions contain oligomeric protein assembly critical for maintaining blood-brain barrier integrity *in vivo*. *Journal of Neurochemistry* **103**, 2540-2555.
- McCandless DW (1982). Energy metabolism in the lateral vestibular nucleus in pyriethiamin-induced thiamin deficiency. *Annals of the New York Academy of Sciences* **378**, 355-364.
- McCull BW, Rothwell NJ, & Allan SM (2008). Systemic inflammation alters the kinetics of cerebrovascular tight junction disruption after experimental stroke in mice. *The Journal of Neuroscience* **28**, 9451-9462.
- McEntee WJ & Mair RG (1980). Memory enhancement in Korsakoff's psychosis by clonidine: further evidence for a noradrenergic deficit. *Ann Neurol* **7**, 466-470.
- Mertsch K, Blasig I, & Grune T (2001). 4-hydroxynonenal impairs the permeability of an *in vitro* rat blood-brain barrier. *Neuroscience Letters* **314**, 135-138.
- Morgan L, Shah B, Rivers LE, Barden L, Groom AJ, Chung R, Higazi D, Desmond H, Smith T, & Staddon JM (2007). Inflammation and dephosphorylation of the tight junction protein occludin in an experimental model of multiple sclerosis. *Neuroscience* **147**, 664-673.
- Munozos P, Vendrell M, & Ferrer I (1993). Proto-oncogen c-fos induction in thiamine-deficient encephalopathy. Protective effect of nicardipine on pyriethiamine-induced lesions. *Journal of Neurological Science* **118**, 175-180.
- Myers RE (1979). Lactic acid accumulation as cause of brain edeme and cerebral necrosis resulting from oxygen deprivation. In *Advances in Perinatal Neurology*, (Korobkin R & Guilleminault G, eds.), pp. 85-114. Spectrum, New York.
- Nag S, Venugopalan R, & Stewart DJ (2007). Increased caveolin-1 expression precedes decreased expression of occludin and claudin-5 during blood-brain barrier breakdown. *Acta Neuropathologica* **114**, 459-469.

- Nakagawa S, Deli MA, Nakao S, Honda M, Hayashi K, Nakaoka R, Kataoka Y, & Niwa M (2007). Pericytes from brain microvessels strengthen the barrier integrity in primary cultures of rat brain endothelial cells. *Cell Mol Neurobiol* **27**, 687-694.
- Nakamura T & Lipton SA (2008). Emerging roles of S-Nitrosylation in protein misfolding and neurodegenerative diseases. *Antioxidants & Redox signaling* **10**, 87-101.
- Navarro D, Zwingmann C, Hazell AS, & Butterworth RF (2005). Brain lactate synthesis in thiamine deficiency: a re-evaluation using 1H-13C nuclear magnetic resonance spectroscopy. *Journal of Neuroscience Research* **79**, 33-41.
- Nguyen JH, Yamamoto S, Steers J, Sevlever D, Lin W, Shimojima N, Castanedes-Casey M, Genco P, Golde T, Richelson E, Dickson D, McKinney M, & Eckman CB (2006). Matrix metalloproteinase-9 contributes to brain extravasation and edema in fulminant hepatic failure mice. *Journal of Hepatology* **44**, 1105-1114.
- Nico B, Frigeri A, Nicchia GP, Corsi P, Ribatti D, Quondamatteo F, Herken R, Girolamo F, Marzullo A, Svelto M, & al. (2003). Severe alterations of endothelial and glial cells in the blood-brain barrier of dystrophic mdx mice. *Glia* **42**, 235-251.
- Nunbhakdi-Craig V, Machleidt T, Ogris E, Bellotto D, White III CL, & Sontag E (2002). Protein phosphatase 2A associates with and regulates atypical PKC and the epithelial tight junction complex. *J Cell Biol* **158**, 967-978.
- Nusrat A, Chen JA, Foley CS, Liang TW, Tom J, Cromwell M, Quan C, & Mrsny RJ (2000a). The coiled-coil domain of occludin can act to organize structural and functional elements of the epithelial tight junction. *J Biol Chem* **275**, 29816-29822.
- Nusrat A, Parkos CA, Verkade P, Foley CS, Liang TW, Innis-Whitehouse W, Eastburn KK, & Madara JL (2000b). Tight junctions are membrane microdomains. *Journal of Cell Science* **113**, 1771-1781.
- Okamoto T, Schlegel A, Scherer PE, & Lisanti MP (1998). Caveolins, a family of scaffolding proteins for organizing "preassembled signaling complexes" at the plasma membrane. *The Journal of biological chemistry* **273**, 5419-5422.
- Okeda R, Taki K, Ikari R, & Funata N (1995). Vascular changes in acute Wernicke's encephalopathy. *Acta Neuropathologica* **89**, 420-424.

- Paemeleire K & Leybaert L (2000). ATP-dependent astrocyte-endothelial calcium signaling following mechanical damage to a single astrocyte in astrocyte-endothelial co-cultures. *J Neurotrauma* **17**, 345-358.
- Pannunzio P, Hazell AS, Pannunzio M, Rao KV, & Butterworth RF (2000). 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. *Journal of Neuroscience Research* **62**, 286-292.
- Parat MO & Fox PL (2004). Oxidative stress, caveolae and caveolin-1. *Subcellular biochemistry* **37**, 425-441.
- Parat MO, Stachowicz RZ, & Fox PL (2002). Oxidative stress inhibits caveolin-1 palmitoylation and trafficking in endothelial cells. *Biochem J* **361**, 681-688.
- Parathath SR, Gravanis I, & Tsirka SE (2007). Nitric oxide synthase isoforms undertake unique roles during excitotoxicity. *Stroke* **38**, 1938-1945.
- Pardridge WM (2007). Blood-brain barrier delivery. *Drug Discov Today* **12**, 54-61.
- Park JH, Okayama N, Gute D, Krsmanovic A, Battarbee H, & Alexander JS (1999). Hypoxia/aglycemia increases endothelial permeability: Role of second messengers and cytoskeleton. *Am J Physiol* **277**, C1066-C1074.
- Parker WD, Hass R, Stumpf DA, Parks J, Eguren LA, & Jackson C (1984). Brain mitochondrial metabolism in experimental thiamine deficiency. *Neurology* **34**, 477-481.
- Parton RG & Simons K (2007). The multiple faces of caveolae. *Nature Reviews-Molecular Cell Biology* **8**, 185-194.
- Patrini C, Reggiani C, Laforenza U, & Rindi G (1988). Blood-brain transport of thiamine monophosphate in the rat: A kinetic study in vivo. *Journal of Neurochemistry* **50**, 90-93.
- Pentschew A (1970). Dysoria, a new dimension of pathology. *Arch Psychiat Nervenkr* **213**, 139-148.

- Pentschew A & Garro F (1966). Lead encephalo-myelopathy of the suckling rat and its implications on the porphyrinopathic nervous diseases-With special reference to the permeability disorders of the nervous system's capillaries. *Acta Neuropathologica* **6**, 266-278.
- Peppiatt CM, Howarth C, Mobbs P, & Attwell D (2006). Bidirectional control of CNS capillary diameter by pericytes. *Nature* **443**, 700-704.
- Peters RA (1936). The biochemical lesion in vitamin B₁ deficiency. *Lancet* **1**, 1161-1165.
- Peterson TE, Poppa V, Ueba H, Wu A, Yan C, & Berk BC (1999). Opposing effects of reactive oxygen species and cholesterol on endothelial nitric oxide synthase and endothelial cell caveolae. *Circulation Research* **85**, 29-37.
- Phares TW, Fabis MJ, Brimer CM, Kean RB, & Hooper DC (2007). A peroxynitrite-dependent pathway is responsible for blood-brain barrier permeability changes during a central nervous system inflammatory response: TNF- α is neither necessary nor sufficient. *J Immunol* **178**, 7334-7343.
- Piani D, Frei K, Do KO, Cuenod M, & Fontana A (1991). Murine brain macrophages induce NMDA receptor mediated neurotoxicity by secreting glutamate. *Neuroscience Letters* **133**, 159-162.
- Prickett CO (1934). The effect of a deficiency of vitamin B₁ upon the central and peripheral nervous system of the rat. *American Journal of Physiology* **107**, 459-470.
- Pun PBL, Lu J, & Mochhala S (2009). Involvement of ROS in BBB dysfunction. *Free Radical Research* **43**, 348-364.
- Ramsauer M, Krause D, & Dermietzel R (2002). Angiogenesis of the blood-brain barrier *in vitro* and the function of cerebral pericytes. *FASEB J* **16**, 1274-1276.
- Rauhala P, Lin AM, & Chiueh CC (1998). Neuroprotection by S-nitrosoglutathione of brain dopamine neurons from oxidative stress. *FASEB J* **12**, 165-173.
- Rindi G & deGiusseppe L (1961). A new chromatographic method for the determination of thiamine and its mono-, di- and triphosphates in animal tissues. *Biochem J* **78**, 602-606.

- Rindi G, Imarisio L, & Patrini C (1986). Effects of acute and chronic ethanol administration on regional thiamine pyrophosphokinase activity in the rat brain. *Biochemical Pharmacology* **35**, 3903-3908.
- Rindi G, Patrini C, Comincioli V, & Reggiani C (1980). Thiamine content and turnover rates of some rat nervous regions, using labeled thiamine as a tracer. *Brain Research* **181**, 369-380.
- Rindi G & Perri V (1961). Uptake of pyriethamine by tissue of rats. *Biochem J* **80**, 214-216.
- Robertson DM & Manz HJ (1971). Effect of thiamine deficiency on the competence of the blood-brain barrier to albumin labeled with fluorescent dyes. *American Journal of Pathology* **63**, 393-399.
- Romero IA, Rist RJ, Aleshaiker A, & Abbott NJ (1997). Metabolic and permeability changes caused by thiamine deficiency in immortalized rat brain microvessel endothelial cells. *Brain Research* **756**, 133-140.
- Rosenberg GA & Yang Y (2007). Vasogenic edema due to tight junction disruption by matrix metalloproteinases in cerebral ischemia. *Neurosurgery Focus* **22**, E4.
- Rubin LL, Hall DE, Porter S, Barbu K, Cannon C, Horner HC, Janatpour M, Liaw CW, Manning K, Morales J, Tanner LJ, Tomaselli KJ, & Bard F (1991). A cell culture model of the blood-brain barrier. *J Cell Biol* **115**, 1725-1736.
- Rustembegovic A, Kundurovic Z, Sapcann A, & Sofic E (2003). A placebo-controlled study of memantine (Ebixa) in dementia of Wernicke-Korsakoff syndrome. *Med Arh* **57**, 149-150.
- Sakakibara A, Furuse M, Saitou M, Ando-Akatsuka Y, & Tsukita S (1997). Possible involvement of phosphorylation of occludin in tight junction formation. *J Cell Biol* **137**, 1393-1401.
- Salas-Salvado J, Garcia-Lorda P, & Cuatrecasas G (2000). Wernicke's syndrome after bariatric surgery. *Clinical Nutrition* **19**, 371-373.
- Savettieri G, Di Liegro I, Catania C, Licata L, Pitarresi GL, D'Agostino S, Schiera G, De Carro V, Giandalia LI, Giannola LI, & Costelli A (2000). Neurons and ECM regulate occludin localization in brain endothelial cells. *NeuroReport* **11**, 1081-1084.

- Schindler H & Bogdan C (2001). NO as a signaling molecule: effects on kinases. *Int Immunopharmacol* **1**, 1443-1455.
- Scholz W (1949). Histologische und topische Veränderungen und Vulnerabilitätsverhältnisse im menschlichen Gehirn bei Sauerstoffmangel, Ödem und plasmatischen Infiltrationen. I. Problemstellung und feingewebliche Situation. *Arch Psychiat Nervenkr* **181**, 621-665.
- Schroeter ML, Mertsch K, Giese H, Müller S, Sporbert A, Hickel B, & Blasig IE (1999). Astrocytes enhance radical defence in capillary endothelial cells constituting the blood-brain barrier. *FEBS Lett* **449**, 241-244.
- Schroth G, Wichmann W, & Valavanis A (1991). Blood-brain barrier disruption in acute Wernicke encephalopathy: MR findings. *J Comput Assist Tomogr* **15**, 1059-1061.
- Schubert W, Frank PG, Woodman SE, Hyogo H, Cohen DE, Chow CW, & Lisanti MP (2002). Microvascular hyperpermeability in caveolin-1 (-/-) knock-out mice. *The Journal of biological chemistry* **277**, 40091-40098.
- Sharma SK & Quastel JH (1965). Transport and metabolism of thiamine in rat brain cortex *in vitro*. *Biochem J* **94**, 790-800.
- Shay KP, Moreau RF, Smith AR, & Haren TM (2009). Alpha-lipoic acid as a dietary supplement: molecular mechanisms and therapeutic potential. *Biochem Biophys Acta* **1790**, 1149-1160.
- Sheth P, Basuroy S, Li C, Naren AP, & Rao RK (2003). Role of phosphatidylinositol 3-kinase in oxidative stress-induced disruption of tight junctions. *J Biol Chem* **278**, 49239-49245.
- Shin T, Kim H, Jin JK, Moon C, Ahn M, Tanuma N, & Matsumoto Y (2005). Expression of caveolin-1, -2, and -3 in the spinal cords of Lewis rats with experimental autoimmune encephalomyelitis. *Neuroimmunol* **165**, 11-20.
- Siegel G, Agranoff B, Albers RW, & Molinoff P (1989). *Basic Neurochemistry*, Fourth edition, Raven Press, New-York.
- Smart EJ, Graf GA, McNiven MA, Sessa WC, Engelman JA, Scherer PE, Okamoto T, & Lisanti MP (1999). Caveolins, liquid-ordered domains, and signal transduction. *Molecular and cellular biology* **19**, 7289-7304.

- Smith RG, Alexianu ME, Crawford G, Nyormoi O, Stefani E, & Appel SH (1994). Cytotoxicity of immunoglobulins from amyotrophic lateral sclerosis patients on a hybrid motoneuron cell line. *Proc Natl Acad Sci USA* **91**, 3393-3397.
- Soffer D, Zirkin H, Alkan M, & Berginer VM (1989). Wernicke's encephalopathy in acquired immune deficiency syndrome (AIDS): a case report. *Clinical Neuropathology* **8**, 192-194.
- Somogyi JC, Kopp PM, Filippini L, & Monnat A (1980). Transketolase-TPP-effect in chronic alcoholics with various degrees of liver cirrhosis. *Vitaminology* **26**, 221-229.
- Song L, Ge S, & Pachter JS (2007). Caveolin-1 regulates expression of junction-associated proteins in brain microvascular endothelial cells. *Blood* **109**, 1515-1523.
- Spruill SC & Kuller JA (2002). Hyperemesis gravidarum complicated by Wernicke's encephalopathy. *Obstetrics and Gynecology* **99**, 875-877.
- Staddon JM, Herrenknecht K, Smales C, & Rubin LL (1995). Evidence that tyrosine phosphorylation may increase tight junction permeability. *J Cell Sci* **108**, 609-619.
- Stapleton JM, Eckardt MJ, Martin P, Adinoff B, Roehrich L, Bone G, Rubinow D, & Linnoila M (1988). Treatment of alcoholic organic brain syndrome with the serotonin reuptake inhibitor fluvoxamine: a preliminary study. *Adv Alcohol Subs Abuse* **7**, 47-51.
- Sternlicht MD & Werb Z (2001). How matrix metalloproteinases regulate cell behavior. *Annu Rev Cell Dev Biol* **17**, 463-516.
- Straub SV & Nelson MT (2007). Astrocyte calcium signaling: the information currency coupling neuronal activity to the cerebral microcirculation. *Trends Cardiovasc Med* **17**, 183-190.
- Sullivan E, Lane B, Deshmukh A, & al. (1999). *In vivo* mamillary body volume deficits in amnesic and nonamnesic alcoholics. *Alcohol Clinical and Experimental Research* **23**, 1629-1636.
- Tai YH, Flick J, Levine SA, Madara JL, Sharp GW, & Donowitz M (1996). Regulation of tight junction resistance in T84 monolayers by elevation in intracellular Ca^{2+} a protein kinase C effect. *J Membr Biol* **149**, 71-79.

- Tanaka J, Toku K, Zhang B, & al. (1999). Astrocytes prevent neuronal cell death induced by reactive oxygen and nitrogen species. *Glia* **28**, 85-96.
- Thomson AD, Baker H, & Leevy C (1970). Patterns of ³⁵S-thiamine hydrochloride absorption in the malnourished alcoholic patient. *Journal of Laboratory Clinical Medicine* **76**, 34-35.
- Thomson AD, Cook CCH, Guerrini I, Sheedy D, Harper C, & Marshall EJ (2008). Wernicke's encephalopathy: "Plus ca change, plus c'est la meme chose". *Alcohol and Alcoholism* **43**, 180-186.
- Thomson AD, Cook CCH, Touquet R, & Henry JA (2002). The Royal College of Physicians report on alcohol: Guidelines for managing Wernicke's encephalopathy in the Accident & Emergency department. *Alcohol and Alcoholism* **37**, 513-521.
- Thomson AD & Marshall EJ (2006). The natural history and pathophysiology of Wernicke's encephalopathy and Korsakoff's psychosis. *Alcohol and Alcoholism* **41**, 151-158.
- Toda N, Ayajiki K, & Okamura T (2009). Cerebral blood flow regulation by nitric oxide: recent advances. *Pharmacol Rev* **61**, 62-97.
- Todd KG & Butterworth RF (1999a). Early microglial response in experimental thiamine deficiency: an immunohistochemical analysis. *Glia* **25**, 190-198.
- Todd KG & Butterworth RF (1998). Increased neuronal cell survival after L-deprenyl treatment in experimental thiamine deficiency. *Journal of Neuroscience Research* **52**, 240-246.
- Todd KG & Butterworth RF (1999b). Mechanisms of selective neuronal cell death due to thiamine deficiency. *Annals of the New York Academy of Sciences* **893**, 404-411.
- Torvik A (1985). Two types of brain lesions in Wernicke's encephalopathy. *Neuropathology and Applied Neurobiology* **11**, 179-190.
- Torvik A (1987). Topographic distribution and severity of brain lesions in Wernicke's encephalopathy. *Journal of Neuropathology* **6**, 25-29.

- Torvik A, Lindboe CF, & Rodge S (1982). Brain lesions in alcoholics. A neuropathological study with clinical correlations. *Journal of Neurological Science* **56**, 233-248.
- Tretter L & Adam-Vizi V (2005). Alpha-ketoglutarate dehydrogenase: a target and generator of oxidative stress. *Phil Trans R Soc B* **360**, 2335-2345.
- Troncoso JC, Johnston MV, Hess KM, Griffin JW, & Price DL (1981). Model of Wernicke's encephalopathy. *Archives of neurology* **38**, 350-354.
- Tsukamoto T & Nigan SK (1997). Tight junction proteins form large complexes and associates with the cytoskeleton in an ATP depletion model for reversible junction assembly. *J Biol Chem* **272**, 16133-16139.
- Uehara T, Nakamura T, Yao D, Shi ZQ, Gu Z, Ma Y, Masliah E, Nomura Y, & Lipton SA (2006). S-nitrosylated protein-disulphide isomerase links protein misfolding to neurodegeneration. *Nature* **441**, 513-517.
- Ushio-Fukai M (2009). Compartmentalization of redox signaling through NADPH oxidase-derived ROS. *Antioxidants & Redox signaling* **11**, 1289-1299.
- van Muiswinkel FL & Kuiperij HB (2005). The Nrf2-ARE signaling pathway: promising drug target to combat oxidative stress in neurodegenerative disorders. *Current Drug Targets-CNS & Neurological Disorders* **4**, 267-281.
- Vargas MR & Johnson JA (2009). The Nrf2-ARE cytoprotective pathway in astrocytes. *Expert reviews in molecular medicine* **11**, 1-20.
- Vemuganti R, Kalluri H, Yi JH, Bowen KK, & Hazell AS (2006). Gene expression changes in thalamus and inferior colliculus associated with inflammation, cellular stress, metabolism and structural damage in thiamine deficiency. *European Journal of Neuroscience* **23**, 1172-1188.
- Verin AD, Liu F, Bogatcheva N, Borbiev T, Hershenson MB, Wang P, & Garcia JG (2000). Role of ras-dependent ERK activation in phorbol-ester induced endothelial cell barrier dysfunction. *Am J Physiol* **279**, L360-L370.
- Verkman AS (2008). Mammalian aquaporins: diverse physiological roles and potential clinical significance. *Expert reviews in molecular medicine* **10**, 1-18.

- Victor M, Adams RD, & Collins GH (1989). The Wernicke-Korsakoff Syndrome and Related Neurologic Disorders Due to Alcoholism and Malnutrition, Second Edition. *Contemporary Neurology Series*, **30** (Plum F & McDowell FA, eds.), F.A. Davis Company, Philadelphia.
- Victor M, Adams RD, & Collins GH (1971). The Wernicke-Korsakoff syndrome. A clinical and pathological study of 245 patients, 82 with post-mortem examinations, *Contemporary Neurology Series*, **7** (Plum F & McDowell FA, eds.), F.A. Davis Company, Philadelphia
- Volonte D, Galbiati F, Pestell RG, & Lisanti MP (2001). Cellular stress induces the tyrosine phosphorylation of caveolin-1 (Tyr¹⁴) via activation of p38 mitogen-activated proteine kinase and c-Src kinase. Evidence for caveolae, the actin cytoskeleton, and focal adhesions as mechanical sensors of osmotic stress. *J Biol Chem* **276**, 8094-8103.
- Volonte D, Zhang K, Lisanti MP, & Galbiati F (2002). Expression of caveolin-1 induces premature cellular senescence in primary cultures of murine fibroblasts. *Mol Biol Cell* **13**, 2502-2517.
- Vonderahe AR (1941). Sequelae of severe disease of the abdominal viscera. *JAMA* **116**, 390-395.
- Wachtel M, Frei K, Ehler E, Fontana A, Winterhalter K, & Gloor SM (1999). Occludin proteolysis and increased permeability in endothelial cells through tyrosine phosphatase inhibition. *J Cell Sci* **112**, 4347-4356.
- Wang L, Lim EJ, Toborek M, & Hennig B (2008). The role of fatty acids and caveolin-1 in tumor necrosis factor alpha-induced endothelial cell activation. *Metabolism* **57**, 1328-1339.
- Wang XL & al. (2005). Caveolae targeting and regulation of large conductance Ca²⁺-activated K⁺ channels in vascular endothelial cells. *J Biol Chem* **280**, 11656-11664.
- Wang Y, Zhang J, Yi XJ, & Yu FS (2004). Activation of ERK1/2 MAP kinase pathway induces tight junction disruption in human corneal epithelial cells. *Exp Eye Res* **78**, 125-136.
- Watanabe I (1978). Pyridiamine-induced acute thiamine-deficient encephalopathy in the mouse. *Exp Mol Pathol* **28**, 381-394.

- Watanabe I, Iwasaki Y, Aikawa H, Satoyoshi E, & Davis JW (1981a). Hemorrhage of thiamine-deficient encephalopathy. *Journal of Neuropathology and Experimental Neurology* **40**, 566-580.
- Watanabe I, Tomita T, Hung KS, & Iwasaki Y (1981b). Edematous necrosis in thiamine-deficient encephalopathy of the mouse. *Journal of Neuropathology and Experimental Neurology* **40**, 454-471.
- Wernicke C (1881). *Lehrbuch der Gehirnkrankheiten für Aerzte und Studierende Vol 2*, Theodor Fischer, Kassel, pp.229-242.
- Winston AP, Jamieson CP, Madira W, Gatward NM, & Palmer RL (2000). Prevalence of thiamine deficiency in anorexia nervosa. *International Journal of Eating Disorders* **28**, 451-454.
- Wolburg H & Lippoldt A (2002). Tight junctions of the blood-brain barrier: Development, composition and regulation. *Vascular Pharmacology* **38**, 323-337.
- Wolburg H, Neuhaus J, Kniesel U, Krauss B, Schmid EM, Öcalan M, Farrell C, & Risau W (1994). Modulation of tight junction structure in blood-brain barrier ECs. Effects of tissue culture, second messengers and cocultured astrocytes. *J Cell Sci* **107**, 1347-1357.
- Wong V (1997). Phosphorylation of occludin correlates with occludin localization and function at the tight junction. *Am J Physiol* **273**, C1859-C1867.
- Wu F & Wilson JX (2007). Endogenous peroxynitrite-dependent activation of protein phosphatase type 2 mediates microvascular endothelial barrier dysfunction. *Free Radical Biology and Medicine* **43**, S145.
- Xiong Y, Peterson PL, & Lee CP (1999). Effect of N-acetylcysteine on mitochondrial function following traumatic brain injury in rats. *Journal of Neurotrauma* **16**, 1067-1082.
- Yang B & Rizzo V (2007). TNF- α potentiates protein tyrosine nitration through activation of NADPH oxidase and eNOS localized in membrane rafts and caveolae of bovine aortic endothelial cells. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* **292**, H954-H962.
- Yang Y, Estrada EY, Thompson JF, Liu W, & Rosenberg GA (2007). Matrix metalloproteinase-mediated disruption of tight junction proteins in cerebral vessels is

- reversed by synthetic matrix metalloproteinase inhibitor in focal ischemia in rat. *Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism* **27**, 697-709.
- Yu J & al. (2006). Direct evidence for the role of caveolin-1 and caveolae in mechanotransduction and remodeling of blood vessels. *J Clin Invest* **116**, 1284-1291.
- Zepong G, Cui J, Brown S, Fridman R, Mobashery S, Strongin AY, & Lipton SA (2005). A highly specific inhibitor of matrix metalloproteinase-9 rescues laminin from proteolysis and neurons from apoptosis in transient focal cerebral ischemia. *The Journal of Neuroscience* **25**, 6401-6408.
- Zhang F, Xu F, & Iadecola C (1995). Time-dependence of the effect of nitric oxide synthase inhibition on cerebral ischemic damage. *Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism* **15**, 595-601.
- Zhang Q, Yang G, Li W, Fan Z, Sun A, Luo J, & Ke ZJ (2009). Thiamine deficiency increases β -secretase activity and accumulation of β -amyloid peptides. *Neurobiology of Aging* **32**, 42-53.
- Zhang ZG, Chopp M, Zaloga C, Pollock JS, & Förstermann U (1993). Cerebral endothelial nitric oxide synthase expression after focal cerebral ischemia in rats. *Stroke* **24**, 2016-2022.
- Zhao J, Moore AN, Redell JB, & Dash PK (2007). Enhancing expression of Nrf2-driven genes protects the blood-brain barrier after brain injury. *The Journal of biological chemistry* **27**, 10240-10248.
- Zhen J, Lu H, Wang XQ, Vaziri ND, & Zhou XJ (2008). Upregulation of endothelial and inducible nitric oxide synthase expression by reactive oxygen species. *American Journal of Hypertension* **21**, 28-34.
- Zhong Y, Smart EJ, Weksler B, Couraud PO, Hennig B, & Toborek M (2008). Caveolin-1 regulates human immunodeficiency virus-1 tat-induced alterations of tight junction protein expression via modulation of the ras signaling. *The Journal of Neuroscience* **28**, 7788-7796.
- Zlokovic BV (2008). The blood-brain barrier in health and chronic neurodegenerative disorders. *Neuron* **57**, 178-201.

Zubaran C, Fernandes JG, & Rodnight R (1996). Wernicke-Korsakoff syndrome.
Postgraduate Medical Journal **73**, 27-31.