

Contrôle de la neuroinflammation par la kinase PKR dans les processus pathologiques de la maladie d'Alzheimer

Anne-Sophie Carret Carret-Rebillat

▶ **To cite this version:**

Anne-Sophie Carret Carret-Rebillat. Contrôle de la neuroinflammation par la kinase PKR dans les processus pathologiques de la maladie d'Alzheimer. Neurosciences [q-bio.NC]. Université Pierre et Marie Curie - Paris VI, 2014. Français. NNT : 2014PA066442 . tel-01205645

HAL Id: tel-01205645

https://theses.hal.science/tel-01205645

Submitted on 26 Sep 2015

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

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

Thèse de doctorat de l'Université Pierre et Marie Curie

Ecole doctorale ED 394

Physiologie, physiopathologie et thérapeutique

Spécialité : Neurosciences

Présentée par

Anne-Sophie CARRET-REBILLAT

Pour obtenir le grade de

DOCTEUR de l'UNIVERSITE PIERRE ET MARIE CURIE

Contrôle de la neuroinflammation par la kinase PKR dans les processus pathologiques de la maladie d'Alzheimer

Présentée et soutenue publiquement le 24 Septembre 2014

Devant le jury composé de :

Mme le Docteur Eliane MEURS	Rapporteur
M. le Professeur Joël ANKRI	Rapporteur
M. le Professeur Jean MARIANI	Examinateur
M. le Professeur Marc VIGNY	Examinateur
M. le Docteur Jean-Philippe BROULAND	Examinateur
M. le Professeur Jacques HUGON	Directeur de Thèse

Remerciements

A Madame le Docteur Eliane MEURS et Monsieur le Professeur Joël ANKRI, qui me font l'honneur d'être rapporteurs de ce travail

A Monsieur le Professeur Jean MARIANI, Monsieur le Professeur Marc VIGNY et Monsieur le Docteur Jean-Philippe BROULAND, qui me font l'honneur de juger ce travail

A Monsieur le Professeur Jacques HUGON, qui a dirigé cette thèse mais aussi conseillé, guidé, accompagné ma carrière depuis un jour de mai 2001 où il m'a accueillie pour la première fois dans son équipe à Hong Kong. Jacques, soyez assuré de ma très grande reconnaissance

A Monsieur le Docteur François MOUTON-LIGER, qui a participé activement à ce travail, dont il a encadré la réalisation au labo et m'a fait passer du stade de débutant à confirmé. Je nous souhaite encore de nombreuses collaborations

A Monsieur le Docteur Raymond CHANG et Madame le Docteur Laura RAVASI, pour leur collaboration à ce travail

A tous ceux du Laboratory of Neurodegenerative Diseases à Hong Kong, avec qui j'ai partagé l'enthousiasme des premières manips

A Claire, Sarah, Mariko, Clarisse, Erika, Sophie et Samantha, qui m'ont apporté conseils, soutien, amitié et m'ont aidée précieusement tout au long de ce travail

A toute l'équipe de l'Institut du Fer à Moulin

A mes collègues, à Coralie, à l'équipe de l'Institut Lejeune, avec qui je partage mon quotidien de médecin, qui se sont adaptés à mes allées et venues entre patients et labo et m'ont apporté un grand soutien

A ceux qui sont mes intimes, il n'y a pas de mots qui puissent témoigner de ma reconnaissance et de mon affection, ils se reconnaîtront

Table des matières

Introduction

I. Maladie d'Alzheimer 4

A. Epidémiologie de la maladie d'Alzheimer 4

1. Prévalence 4
2. Première étiologie de démence 4
3. Conséquences socio-économiques 4
4. Formes sporadiques 5
5. Formes familiales 6

B. Neuropathologie de la maladie d'Alzheimer 7

1. Généralités 7
2. Atrophie cérébrale 7
3. Amyloïdose cérébrale 9
4. Taupathie 14
5. Inflammation cérébrale 17

C. Maladie d'Alzheimer: aspects diagnostiques 19

1. Diagnostic clinique 19
2. Biomarqueurs de la cascade pathologique de la MA 20

D. Maladie d'Alzheimer : aspects thérapeutiques 22

1. Inhibiteurs de l'acétylcholinestérase et mémantine 22
2. Traitements anti-amyloïde 23
3. Traitements ciblant la protéine Tau 24
4. Traitements basés sur les données épidémiologiques 24

II. Inflammation cérébrale 26

A. Système nerveux central et immunité innée 26

1. Immunité innée 26
2. Barrière hémato-encéphalique 26
3. Microglie 27
4. Toll-likereceptors (TLRs) 29
5. LPS 30

B. Inflammation systémique et système nerveux central (SNC) 30

1. Voies de signalisation de l'inflammation de la périphérie vers le système nerveux central 30
2. Effets de l'inflammation systémique sur les fonctions cognitives : sickness behaviour 33
3. Exemples d'inflammation systémique avec neuroinflammation 33

C. Inflammation systémique et maladie d'Alzheimer 35

1. Relation entre inflammation, delirium et maladie d'Alzheimer 36
2. Relation entre inflammation périphérique, inflammation centrale et neurodégénérescence 37
3. Inflammation périphérique et activation des voies de signalisation pathologiques de la maladie d'Alzheimer 39

III. PKR 40

A. Structure et localisation cellulaire 40

B. Activateurs de PKR 42

1. ARN double brin 42
2. TRBP, PACT 42
3. TLRs 42
4. Cytokines 43
5. Autres stress cellulaires 43

C. Rôle physiologique de PKR 43

1. eIF2α kinase 43
2. Transduction du signal 44
3. Apoptose (mort cellulaire programmée) 45

D. Rôle de PKR dans la maladie d'Alzheimer 47

1. Chez l'homme 47
2. In vivo 48
3. In vitro 48

Matériel et méthodes

I. Animaux 51
- **A. Lignées 51**
  - 1. Animaux wild type 51
  - 2. Animaux PKR -/- 51
- **B. Traitement des animaux par le LPS 53**
- **C. Induction de la carence en thiamine : 53**
- **D. Préparation des tissus 54**
- **E. Imagerie fonctionnelle 54**

II. Techniques 55
- **A. Immunoblot et ELISA 55**
  - 1. Extraction des protéines 55
  - 2. Immunoblot 55
  - 3. ELISA 56
- **B. Immunofluorescence sur lames 56**
- **C. Quantitative RT-PCR 57**

III. Analyses statistiques 57

Résultats

I. Travaux réalisés pendant la thèse 59
- **A. Article 1 : « Neuroinflammation and Aβ accumulation linked to systemic inflammation are decreased by genetic PKR down-regulation » 59**
- **B. Résultats complémentaires ne figurant pas dans l'article 60**
  - 1. Activation de PKR par le LPS 60
  - 2. Effet de l'endotoxémie sur le poids des animaux 60
  - 3. Invalidation de PKR dans la lignée PKR -/- 61
  - 4. Effet de l'endotoxémie sur la production d'Aβ42 dans le cortex 62
  - 5. Effet de l'endotoxémie sur la voie de la protéine Tau 63
  - 6. Effet de l'endotoxémie sur la mort neuronale 65
  - 7. PKR module l'hypométabolisme cérébral induit par le LPS 65

II. Travaux réalisés en collaboration 67

Article 2 : « PKR down-regulation prevents neurodegeneration and β-amyloid production in thiamine deficient model ».

Discussion

I. Choix du modèle 68
- **A. Injections de LPS 68**
  - 1. Induction d'un *sickness behaviour* 68
  - 2. Activation de la microglie 68
  - 3. Activation de PKR 69
- **B. Invalidation de PKR 70**

II. PKR contrôle l'inflammation cérébrale 71
- **A. Transfert de l'inflammation de la périphérie vers le SNC 71**
- **B. Rôle de PKR 71**
- **C. Voie de signalisation du NF-κB 72**
- **D. Voie de l'inflammasome 73**

III. PKR contrôle l'amyloïdogénèse dans ce contexte inflammatoire 75

IV. Etat de phosphorylation de Tau en réponse au stress inflammatoire 76

V. Mort neuronale en réponse au stress inflammatoire 77

VI. PKR module le métabolisme cérébral en réponse au LPS 78

VII. L'inhibition de PKR prévient dégénérescence et production d'Aβ dans un modèle de carence en thiamine 78

Conclusion 82

Bibliographie 83

Introduction générale

La maladie d'Alzheimer est un enjeu de santé publique. Au-delà de cette généralité, je manifeste un intérêt particulier pour cette pathologie à travers l'exercice de ma discipline médicale, qui est la gériatrie. Les patients âgés, et principalement ceux atteints de pathologies neurodégénératives, sont très sensibles sur un plan cognitif au stress résultant de conditions inflammatoires, qu'elles soient aigues ou chroniques. Des situations cliniques bien décrites en sont la conséquence : syndrome confusionnel, aggravation du déclin cognitif chez le malade Alzheimer. La compréhension des mécanismes moléculaires qui favorisent la progression des lésions de la maladie d'Alzheimer en cas de stress inflammatoire a motivé ce travail de thèse. J'ai eu l'opportunité de rejoindre une équipe qui conduit une recherche translationnelle, experte tant sur les aspects fondamentaux que neuropathologiques et cliniques de la maladie d'Alzheimer. A travers ses différents travaux, elle a démontré que l'activation de PKR, une kinase de stress initialement décrite pour son rôle dans la réponse antivirale, était étroitement liée à la pathologie Alzheimer. Cette thèse s'inscrit dans la continuité de ces travaux. Elle s'est concentrée sur l'étude du contrôle exercé par PKR sur la neuroinflammation et les processus pathologiques de la maladie d'Alzheimer, à partir d'un modèle d'endotoxémie expérimentale.

Introduction

I. Maladie d'Alzheimer

A. Epidémiologie de la maladie d'Alzheimer

1. Prévalence

En France, la prévalence de la maladie d'Alzheimer (MA) est de 3 % chez les sujets de plus de 65 ans. Elle augmente avec l'âge pour atteindre 15 % des sujets de plus de 85 ans et dans le temps du fait de la progression de la population de personnes âgées.

Prévalence en France en 2010 : *860 000*
Prévalence estimée en France en 2020: *2 000 000*
(Chiffres INSERM)

2. Première étiologie de démence

La maladie d'Alzheimer est la première étiologie de démence (70 % des cas). Il s'agit d'une pathologie neurodégénérative caractérisée par une détérioration progressive et inexorable des fonctions cognitives.

Les autres causes de démence dégénérative primaire sont la dégénérescence lobaire fronto-temporale, la démence à corps de Lewy, la démence au cours de la maladie de Parkinson, la paralysie supra-nucléaire progressive.

Toutes ces pathologies dégénératives peuvent être isolées ou associées à une pathologie vasculaire (démence mixte), les démences secondaires à des lésions vasculaires constituant la deuxième cause de démence après la maladie d'Alzheimer.

3. Conséquences socio-économiques

La perte d'autonomie est constante dans l'évolution de la maladie d'Alzheimer, de même que les troubles psycho-comportementaux, ce qui implique une prise en charge spécifique et coûteuse. Les patients devenus dépendants ont recours à des aidants familiaux et professionnels. Plus d'un tiers vivent en institution, en particulier les patients dits « fragiles » : les plus âgés, les plus isolés socialement, ceux présentant une dépression associée (Dorenlot et al., 2005; Drame et al., 2012).

De part le nombre de sujets atteints et son coût pour la société, la maladie d'Alzheimer est devenue un enjeu majeur de santé publique pour les pays industrialisés où l'espérance de vie augmente.

4. Formes sporadiques

Les formes sporadiques de maladie d'Alzheimer sont les plus fréquentes (95 %), les symptômes débutant pour la majorité des patients après l'âge de 65 ans.

Leur origine est plurifactorielle et encore imparfaitement connue. La recherche épidémiologique a permis de déterminer des facteurs de risque et des facteurs de protection et cherche à mettre en évidence des facteurs modifiables, qui interviendraient notamment durant la période des 40-50 ans (Fratiglioni et al., 2004).

a) Facteurs de risque

- l'âge
- le sexe féminin
- les antécédents familiaux de démence
- facteurs génétiques :
  - ✓ l'allèle ε4 du gène codant pour l'ApoE (Ritchie and Lovestone, 2002).
    L'ApoE est une lipoprotéine ubiquitaire qui assure une fonction de transport et de redistribution du cholestérol et des phospholipides (Zhong and Weisgraber, 2009). Elle a trois isoformes, ApoEε2, ε3 et ε4. Le risque de maladie d'Alzheimer est multiplié par 2 en cas d'allèle ε4 unique et par 5 en présence de deux allèles ε4 (Kuusisto et al., 1994)
  - ✓ certains polymorphismes génétiques identifiés récemment par des études d'association pangénomique : SORL1 (impliqué dans le transport de l'APP), CLU (ou Apolipoprotéine J, participant également au transport des lipides), CR1 (un récepteur cellulaire faisant partie du complément), PICALM et BIN1 (qui pourraient jouer un rôle dans la clearance du peptide β amyloïde) (Reitz and Mayeux, 2014), TREM2 (un récepteur des cellules myéloïdes impliqué dans la phagocytose) (Jonsson et al., 2013)
- les facteurs de risque cardiovasculaires : hypertension artérielle (Posner et al., 2002), diabète de type 2 (Biessels et al., 2006), obésité (Kivipelto et al., 2005), indépendamment ou réunis dans un syndrome dit syndrome métabolique lui-même associé indépendamment au risque de maladie d'Alzheimer (Solfrizzi et al., 2011)

- facteurs socio-économiques : bas niveau d'éducation (Sharp and Gatz, 2011)
- facteurs psychosociaux : dépression (Li et al., 2011)

b) Facteurs de protection

- la consommation modérée d'alcool (définie par 1 à 2 verres de vin par jour) (Mukamal et al., 2003)
- le régime alimentaire méditerranéen (Gu et al., 2010)
- la pratique d'une activité physique régulière (Rovio et al., 2005)
- l'entretien d'un riche réseau social et d'activités de loisirs (Verghese et al., 2003)
- le traitement au long cours par anti-inflammatoires non stéroïdiens (traitement pris pendant au moins 2 ans dans l'indication d'une pathologie inflammatoire chronique) (Etminan et al., 2003)

5. Formes familiales

Il existe des formes familiales de maladie d'Alzheimer. Moins de 5 % correspondent à des formes monogéniques. Les troubles cognitifs sont ici précoces, bien antérieurs à l'âge de 65 ans.

Leur mode de transmission est autosomal dominant. Trois gènes différents ont été identifiés : le gène de la préséniline 1 (chromosome 14), le gène de la préséniline 2 (chromosome 1), et le gène codant pour la protéine APP, l'Amyloid Protein Precursor (chromosome 21).

Les mutations de ces gènes conduisent de façon directe ou indirecte à une augmentation de la production de peptide β amyloïde. Celui-ci s'accumule dans le cerveau des patients sous formes de plaques, formant une des principales lésions de la maladie d'Alzheimer (Guerreiro et al., 2012).

Les formes familiales de maladie d'Alzheimer ont servi de modèle à la théorie de la cascade amyloïde. Cette hypothèse physiopathologique concentre depuis vingt ans la majeure partie de la recherche de nouveaux traitements contre la maladie d'Alzheimer.

B. Neuropathologie de la maladie d'Alzheimer

1. Généralités

Le diagnostic de certitude de maladie d'Alzheimer repose sur l'examen anatomo-pathologique du cerveau. Il révèle des lésions macroscopiques et microscopiques : atrophie cérébrale, plaques séniles et dégénérescences neurofibrillaires comme décrit pour la première fois par Alois Alzheimer en 1907 (Alzheimer et al., 1995).

L'accumulation et l'agrégation extracellulaire de peptide β amyloïde forment les plaques séniles. Les dégénérescences neurofibrillaires sont induites par la phosphorylation anormale de la protéine Tau, constituant intracellulaire des microtubules du cytosquelette. Leur toxicité induit la dysfonction puis la mort neuronale responsable de l'atrophie cérébrale. Une réaction inflammatoire locale est associée, incluant activation microgliale, gliose astrocytaire et production de cytokines pro-inflammatoires (Duyckaerts et al., 2009).

Sur un plan anatomique, les dégénérescences neurofibrillaires débutent préférentiellement dans les structures temporales internes : régions hippocampiques et cortex enthorinal, affectant les fonctions mnésiques. La progression des lésions, notamment au cortex associatif, est responsable d'atteintes du langage, des schémas gestuels, des fonctions visuo-spatiales et exécutives. Les plaques amyloïdes débutent de façon diffuse dans le cortex cérébral.

2. Atrophie cérébrale

L'atrophie cérébrale est la conséquence de l'atteinte synaptique et neuronale. Elle intéresse :

- la substance grise, formée par les corps cellulaires des cellules neuronales
- la substance blanche, formée par les prolongements des cellules neuronales : dendrites et axones, entourés d'une gaine de myéline.

Elle est à la fois corticale et sous-corticale et concerne les régions temporales et temporales internes (dont les régions hippocampiques), pariétales, frontales, plus rarement occipitales, sauf en cas d'atrophie corticale postérieure, une forme atypique de maladie d'Alzheimer.

L'atrophie cérébrale s'accompagne d'une dilatation symétrique des ventricules cérébraux et d'un élargissement des sillons corticaux (Mattson, 2004).

Comparativement à un sujet sain du même âge, le poids du cerveau d'un patient atteint de maladie d'Alzheimer est diminué d'un tiers à l'examen anatomo-pathologique.

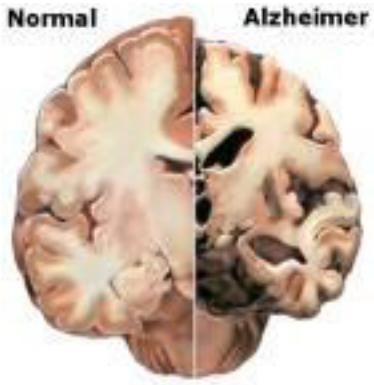


Figure 1 : Coupe coronale de cerveau

A gauche : cerveau sain
A droite : stade évolué de maladie d'Alzheimer présentant une atrophie cérébrale, une dilatation ventriculaire et un élargissement des sillons corticaux (from www.alz.org)

3. Amyloïdose cérébrale

a) Description

Les plaques séniles ou neuritiques sont identifiables par coloration au rouge Congo ou à la thioflavine. Elles sont constituées de substance amyloïde, entourées de prolongements nerveux axonaux dégénérés exprimant la protéine Tau et associées à une gliose astrocytaire et à une activation microgliale.

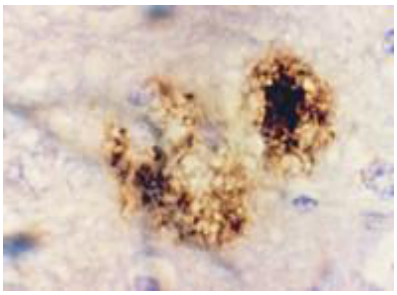


Figure 2 : Plaque sénile

Marquage du peptide β amyloïde en immunohistochimie dans le cortex d'un patient Alzheimer

Des dépôts de substance amyloïde peuvent également être mis en évidence dans la paroi des vaisseaux corticaux de petit calibre, exposés à un risque de rupture (angiopathie amyloïde cérébrale).

Le peptide β amyloïde est le constituant majeur des plaques séniles. Son rôle physiologique est mal connu. Il provient du clivage d'une protéine de plus haut poids moléculaire, la protéine précurseur de l'amyloïde (Amyloid Precursor Protein ou APP).

a) L'APP

L'APP est une protéine transmembranaire qui intervient dans la transmission synaptique, la croissance des neurites, l'adhésion cellulaire et la migration des neurones nouvellement différenciés durant le développement du cortex (Turner et al., 2003).

Le gène de l'APP est situé sur le chromosome 21 (Goldgaber et al., 1987).

Bien que l'APP ait d'abord été isolée dans le cerveau, elle est exprimée de façon ubiquitaire (dans le coeur, les poumons, le foie, les intestins, les reins) (Selkoe, 1994).

b) Amyloïdogénèse

Il existe deux voies catalytiques de clivage de l'APP, selon les protéases impliquées (Chow et al., 2010).

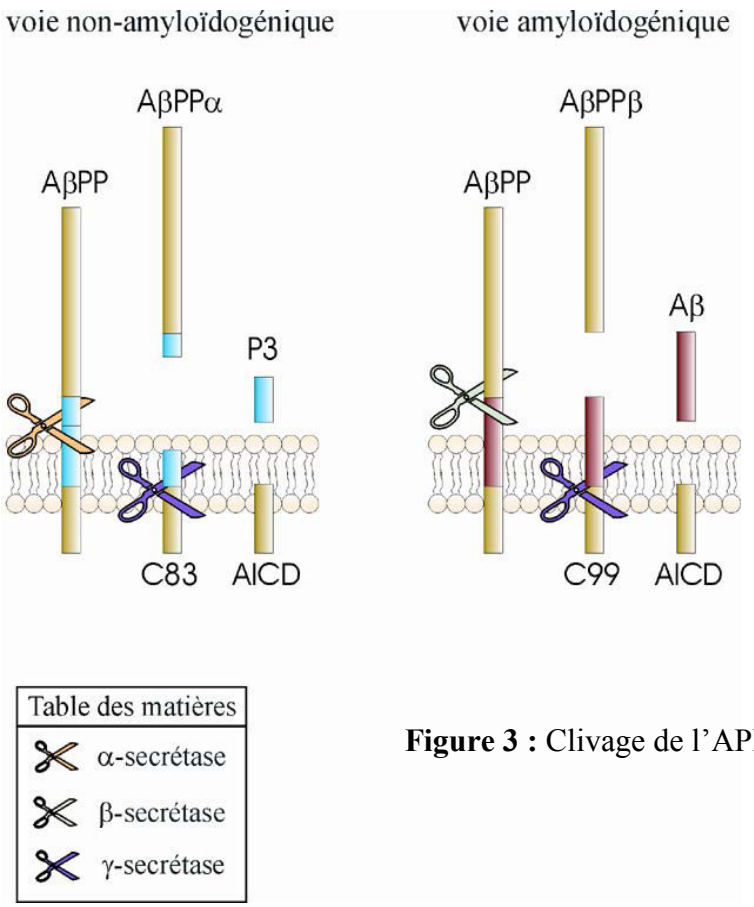


Figure 3 : Clivage de l'APP

La voie la plus commune est la voie dite ***non-amyloïdogénique*** (sujet normal).Le clivage de l'APP a lieu au site α situé dans sa partie extracellulaire, à l'intérieur de son domaine Aβ, ce qui prévient la formation de peptide β amyloïde. Il est assuré par une α-sécrétase.

Alternativement, l'APP peut être clivée par une β-sécrétase, au site β situé à l'extrémité N-terminale du domaine Aβ. C'est la voie dite ***amyloïdogénique***, qui conduit à la formation de peptide β amyloïde. La principale β-sécrétase exprimée dans le système nerveux central est la Beta-site APP Cleaving Enzyme 1 ou BACE1 (Vassar et al., 1999).

Quelque soit la voie empruntée, cette première étape de clivage permet la libération dans l'espace extracellulaire de longs fragments solubles d'APP (sAPP-α ou sAPP-β) tandis que les fragments C83 et C99 (constitués respectivement de 83 et de 99 acides aminés), demeurent ancrés dans la membrane.

Les fragments C83 et C99 sont à nouveau clivés par un complexe γ-sécrétase. Quatre protéines minimum constituent lecomplexe γ-sécrétase : les présénilines 1 et 2 (PS1 et PS2), la nicastrine (Nct), Pen2 (Presenilin enhancer 2), et Aph-1 (Anterior pharynx defective1) (Wolfe, 2008).

Le clivage du fragment C83 permet la libération d'un domaine AICD (Amino-terminal APP Intracellular Domain) dans l'espace intracellulaire et celle d'un peptide de 3kDa, le peptide P3, dans l'espace extracellulaire.

Le clivage du fragment C99 permet aussi la libération d'un domaine AICD mais génère un fragment extracellulaire de taille supérieure, le peptide β amyloïde ou Aβ (Haass et al., 1993). La coupure par la γ-sécrétase conditionne la nature de l'extrémité C-terminale du peptide Aβ qui peut être de 40 (Aβ40) ou de 42 (Aβ42) acides aminés. Les formes de 42 acides aminés s'agrègent plus facilement (Burdick et al., 1997) et sont généralement augmentées de manière sélective dans la maladie d'Alzheimer (Selkoe, 2001).

c) Formes solubles et insolubles d'Aβ

Alors que le peptide P3 semble inoffensif parce que rapidement dégradé, les peptides Aβ40 et Aβ42 s'accumulent dans l'espace extracellulaire pour former les plaques amyloïdes.

Les monomères hydrosolubles de peptide Aβ s'associent entre eux pour former des oligomères. L'association de plusieurs oligomères permet la formation de larges fibres, d'environ 6 à 10 nm, dont la chaîne polypeptidique est arrangée en feuillets β parallèles, rendant la protéine insoluble (Kirschner et al., 1986).

La séquence de formation des plaques suit le schéma suivant : monomères, oligomères, fibrilles, plaques diffuses, plaques sénibles. Aβ existedonc dans l'espace extracellulaire sous deux formes :

- insolubles, les plaques contenant la protéine fibrillaire.
- solubles, les assemblages d'oligomères non fibrillaires (Kayed et al., 2003).

Il est établi que la toxicité de la protéine Aβ joue un rôle essentiel dans la maladie d'Alzheimer. Cette toxicité a été longtemps attribuée à sa forme insoluble agrégée en plaques.

L'observation des modèles murins transgéniques de maladie d'Alzheimer a permis d'établir que les formes solubles oligomériques extracellulaires d'Aβ étaient également toxiques pour le fonctionnement neuronal et cognitif (Larson and Lesne, 2012).

De même, la forme intracellulaire d'Aβ induit dysfonctionnement synaptique, perturbation de l'homéostasie du calcium et phosphorylation de Tau (LaFerla et al., 2007).

Le peptide Aβ exerce donc un effet fonctionnel avant de provoquer des lésions visibles. Sa toxicité est considérée comme l'événement principal à l'origine de la neurodégénérescence au cours de la maladie d'Alzheimer. C'est l'hypothèse de la cascade amyloïde (Hardy and Higgins, 1992; Selkoe, 1991).

d) Cascade amyloïde

Plusieurs évidences supportent cette hypothèse :

- Le peptide Aβ est le constituant principal des plaques séniles (Masters et al., 1985).
- Les mutations génétiques responsables des formes familiales de maladie d'Alzheimer concernent le gène codant pour l'APP (Goate et al., 1991) et les gènes codant pour les présénilines 1 et 2, (constituants du complexe γ-sécrétase). Ces différentes mutations induisent une augmentation de l'amyloïdogénèse et donc de la production de peptide Aβ chez les patients (Scheuner et al., 1996).
- Il en est de même chez les patients porteurs de trisomie 21, qui possèdent trois copies du gène codant pour l'APP et qui développent précocement plaques amyloïdes et démence de type Alzheimer (Lott and Dierssen, 2010).

L'amyloïdose cérébrale initierait une réponse dégénérative chronique, comportant des changements cellulaires et moléculaires multiples (inflammation, activation de kinases, excitotoxicité, stress oxydatif, dégénérescences neurofibrillaires), conduisant à la mort neuronale et responsable sur un plan clinique d'un syndrome démentiel (Hardy and Selkoe, 2002). La pathologie Tau avec la formation des dégénérescences neurofibrillaires est considérée pour beaucoup comme un événement secondaire, mais qui contribue au dysfonctionnement neuronal et cognitif.

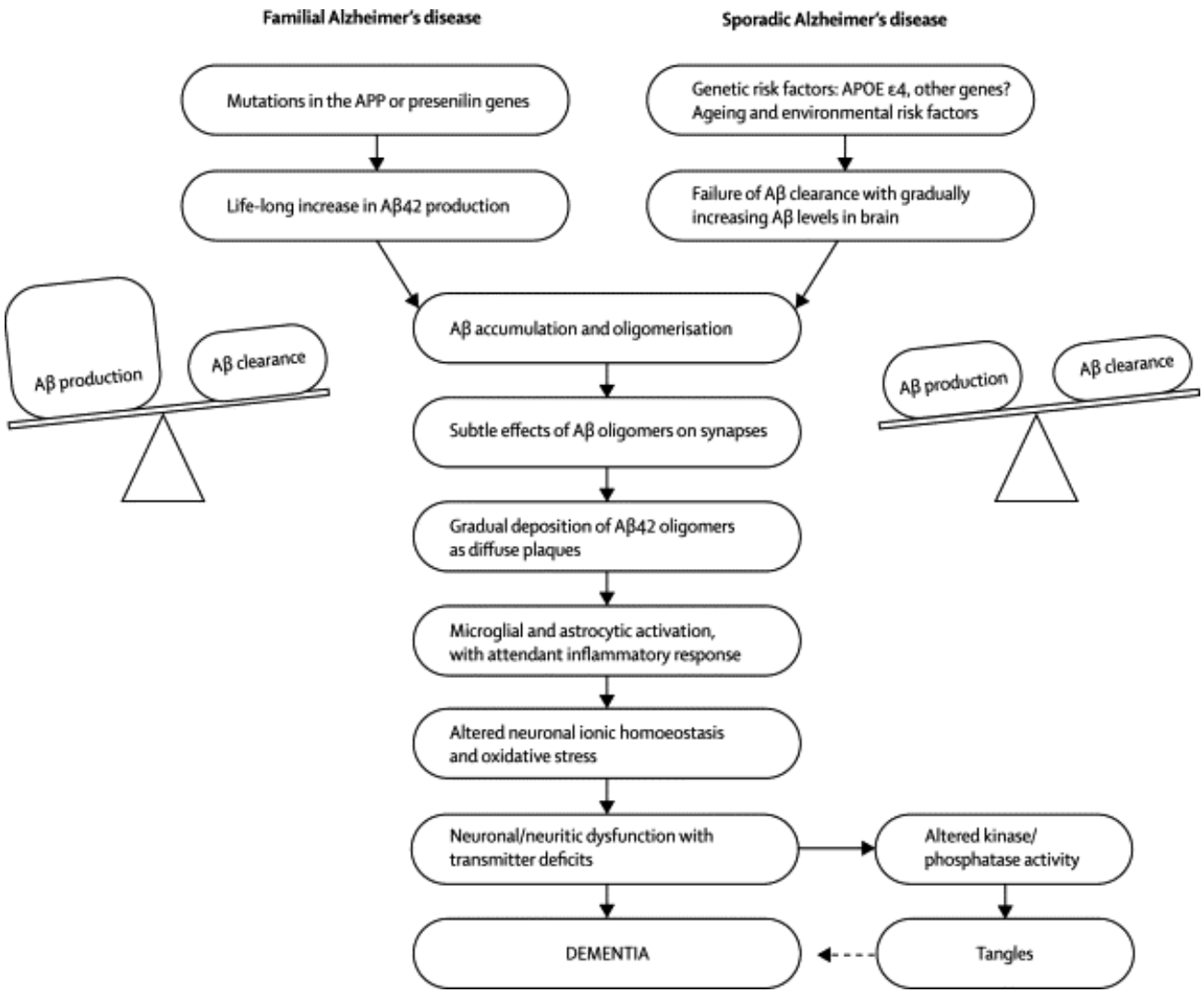


Figure 4 : Amyloid cascade hypothesis - Théorie de la cascade amyloïde
(Blennow et al., 2006)

L'événement central dans la pathogénèse de la maladie d'Alzheimer est le déséquilibre entre la production et l'élimination de peptide Aβ : augmentation de la production d'Aβ dans les formes familiales, diminution de l'élimination d'Aβ dans les formes sporadiques.

4. Taupathie

a) Description

Tau (*Tubulin-Associated Unit*) est une protéine neuronale associée aux microtubules dont elle contrôle la polymérisation.Les microtubules sont des filaments du cytosquelette qui transportent les matériaux synthétisés du corps cellulaire vers les terminaisons nerveuses.

L'équilibre entre phosphorylation et déphosphorylation de Tau module la stabilité du cytosquelette neuronal.

Au cours de la maladie d'Alzheimer, une phosphorylation anormale des protéines Tau provoque la dépolymérisation des microtubules, la dégénérescence neurofibrillaire (DNF) puis la mort neuronale. La dégénérescence neurofibrillaire est la conséquence de l'accumulation intraneuronale de fibrilles pathologiques dans les corps cellulaires des neurones et de leurs prolongements neuritiques.

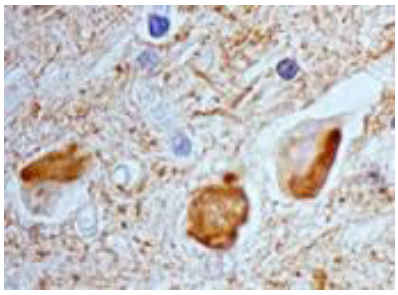


Figure 5 : DNF

Marquage en immunohistochimie dans le cortex d'un patient Alzheimer

Ces filaments pathologiques sont appariés en hélice (paires de filaments en hélice ou PHF) et constitués de protéines Tau anormalement phosphorylées.

b) DNF et taupathies

Les DNF ne sont pas spécifiques de la maladie d'Alzheimer. Les affections neurodégénératives au cours desquelles des DNF ont été décrites ont été regroupées sous le terme de « tauopathies » : dégénérescence cortico-basale, paralysie supranucléaire progressive, syndrome de l'île de Guam, maladie de Pick, dystrophie myotonique de Steinert. Elles surviennent aussi au cours du vieillissement normal (Sergeant et al., 2005).

Si les DNF ne sont pas spécifiques de la maladie d'Alzheimer, leur association à la pathologie amyloïde et leur distribution topographique dans le cerveau reflètent un mécanisme spécifique à la maladie d'Alzheimer (Delacourte, 2006).

Les DNF atteignent progressivement différents territoires corticaux interconnectés, comme décrit par Braak (Braak and Braak, 1991). Elles débutent dans le cortex enthorinal (stades I et II), puis gagnent l'hippocampe (stades III et IV), et l'isocortex (stades V et VI). Les stades neuropathologiques de Braak présentent une parfaite corrélation avec l'atteinte des fonctions cognitives, faisant des protéines Tau pathologiques d'excellents marqueurs biochimiques du processus dégénératif de type Alzheimer (Bancher et al., 1993).

c) Les kinases qui phosphorylent Tau

L'état de phosphorylation de Tau dépend de l'équilibre entre activités kinases et phosphatases.

On a recensé 28 sites spécifiquement phosphorylés dans le cerveau de patients atteints de maladie d'Alzheimer, permettant de classer les kinases phosphorylant Tau en 3 groupes selon la nature du résidu ciblé :

- Les kinases PDPK (proline-directed protein kinases) phosphorylent Tau sur des résidus d'acides aminés sérine et thréonine précédant un résidu d'acide aminé proline. Citons les kinases dépendantes des cyclines (CDK), et notamment le complexe CDK5/p25 (Takahashi et al., 1991), la Glycogène Synthétase Kinase 3 Bêta (GSK3β) (Ishiguro et al., 1992) et les Mitogen-Activated-Protein kinases, les MAP kinases (Erk1/2, jun kinases JNKs et p38) (Avila et al., 2006).
- Les kinases non PDPK (exemple : DYRK1A, dual-specificity tyrosine-(Y)-phophorylation regulated kinase 1A)
- Les tyrosine kinases ciblent des résidus tyrosine (Martin et al., 2013)

(1) GSK3β

La forme active de GSK3β (phosphorylée au niveau de la tyrosine 216) est augmentée dans le cerveau de patients atteints de maladie d'Alzheimer et colocalisée avec les DNF (Leroy et al., 2007; Pei et al., 1997).

GSK3β est à la dois impliquée dans la pathologie amyloïde et la pathologie Tau : des cultures neuronales primaires exposées au peptide Aβ montrent une augmentation de leur activité GSK3β, de la phosphorylation de Tau et de la mort neuronale par apoptose (Takashima et al., 1996).

(2) CDK5

Pour être active, CDK5 doit être couplée avec sa sous-unité régulatrice p35, ou sa forme clivée p25 formant le complexe hyperactif CDK5/p25, qui est augmenté dans le cerveau de patients atteints de maladie d'Alzheimer (Camins et al., 2006).

Une augmentation des niveaux d'activation de JNK et d'expression de DYRK1A a également été décrite chez les patients Alzheimer (Kimura et al., 2007; Shoji et al., 2000).

Les activités phosphatases sont quant à elles dominées par la PP2A (Phosphoprotein Phosphatase A) dont l'activité est diminuée en cas d'Alzheimer (Gong et al., 1995; Liu et al., 2005).

d) Tau dans la cascade amyloïde

La pathologie Tau, corrélée à la perte neuronale, à l'atrophie cérébrale et aux déficits des fonctions cognitives, est située en aval de la cascade amyloïde.

En effet :

- Chronologiquement, les dégénérescences neurofibrillaires se constituent dans le cortex après déposition de peptide β amyloïde (Hardy et al., 1998) bien qu'on en ait détecté précocément dans le tronc cérébral chez des sujets jeunes issus de la population générale (Braak et al., 2011).
- Les mutations du gène codant pour Tau sont responsables d'une pathologie histologiquement différente de la maladie d'Alzheimer, la démence fronto-temporale, caractérisée par des DNF sans déposition d'amyloïde (Spillantini et al., 1998).
- Les souris transgéniques surexprimant à la fois APP et Tau présentent plus de DNF que les souris surexprimant uniquement Tau. Cependant, elles expriment autant de plaques amyloïdes en termes de nombre et de structure que chez les souris surexprimant uniquement APP (Lewis et al., 2001).

5. Inflammation cérébrale

a) Description

Le cerveau a été longtemps considéré comme un organe isolé et protégé sur le plan de l'immunité. Or, il est maintenant acquis qu'au cours de la maladie d'Alzheimer, il est le siège d'une réaction inflammatoire faisant intervenir l'immunité innée et notamment:

- La microglie (McGeer et al., 1993). Les cellules microgliales proviennent des monocytes sanguins ayant pénétré dans le parenchyme du système nerveux central (SNC) et peuvent, lors de lésions du tissu nerveux, s'activer et se transformer en macrophages. Elles sont présentatrices d'antigène et capables de phagocytose.
- Les protéines du complément (McGeer et al., 1989). Elles sont impliquées dans le recrutement des cellules inflammatoires, l'opsonisation et le contrôle de la réponse immune adaptative.
- Les cytokines pro-inflammatoires (Dickson et al., 1993): interleukines (IL1β, IL6), tumor necrosis factor alpha (TNFα), interferons (IFN).Ce sont d'importants médiateurs dans la signalisation de l'inflammation, qui sont sécrététes par les cellules microgliales.
- Les astrocytes (Schechter et al., 1981). Ils assurent un rôle de soutien vis-à-vis des neurones. Leur cytoplasme contient des gliofilaments et des grains de glycogène constituant la réserve énergétique cérébrale. Leurs prolongements cytoplasmiques forment un réseau de soutien structural du SNC.

Les plaques séniles comprennent en sus des dépôts de substance amyloïde une microglie activée en leur centre et une réaction astrocytaire à leur périphérie.

b) La neuroinflammation dans la cascade amyloïde

L'inflammation joue un rôle actif dans la pathogénèse de la maladie d'Alzheimer. Ses médiateurs exercent tant des effets neuroprotecteurs que neurotoxiques, car en l'absence de réponse adaptative, ils deviennent dysfonctionnels et participent au processus de neurodégénérescence (Griffin, 2006).

L'activation de la réaction inflammatoire vise la dégradation des dépôts amyloïdes: phagocytose et clairance de l'amyloïde par la microglie, barrière astrocytaire protégeant les neurones des dépôts amyloïdes.

Mais, l'accumulation de peptide β amyloïde favorisant un état inflammatoire chronique, les capacités de clairance de la microglie se trouvent dépassées, conduisant à la

formation d'un milieu neurotoxique,qui à son tour va entraîner des dommages dans le tissu cérébral (Figure 6) (Heneka et al., 2014). Ces conditionspermettent également d'entretenir la formation d'amyloïde et sa déposition, formant un cercle vicieux. La microglie, par la production de radicaux libres, d'oxyde nitrique et de cytokines pro-inflammatoires facilite la synthèse d'APP, son clivage amyloïdogénique en peptide Aβ42 (Del Bo et al., 1995) et la transformation d'oligomères de peptide Aβ42 en fibrilles amyloïdes (Shirahama et al., 1990).

La microglie activée induit également l'hyperphosphorylation de la protéine Tau et donc les dégénérescences neurofibrillaires (Gorlovoy et al., 2009).

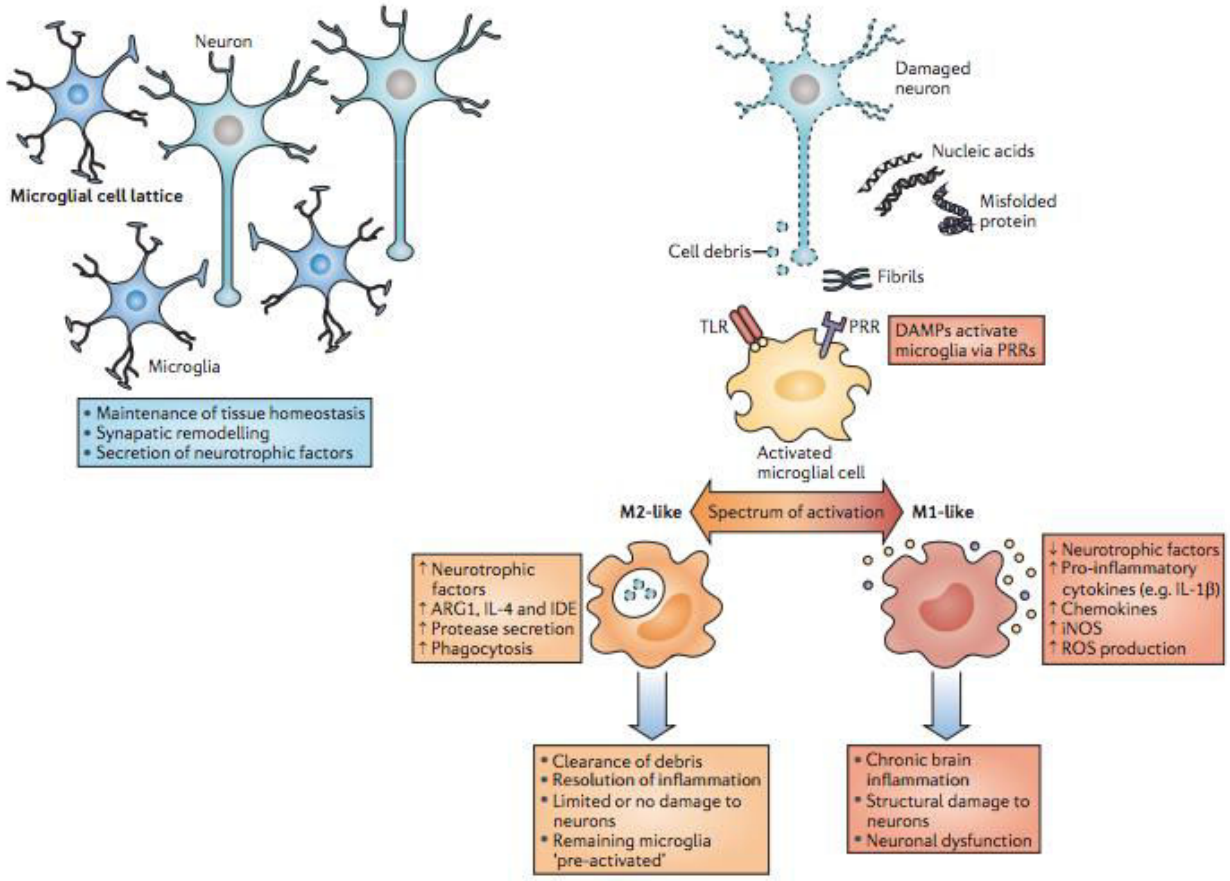


Figure 6 : Fonctions bénéfiques et néfastes de la microglie dans le cerveau

(Heneka et al., 2014)

Dans le cerveau sain, la microglie remodèle les synapses et sécrète des facteurs neurotrophiques. Elle est essentielle au maintien de l'homéostasie tissulaire. Plusieurs protéines endogènes (y compris l'amyloïde-β), peuvent se lier aux récepteurs PRRs qui sont exprimés à sa surface et favorise son activation. Selon l'intensité de la signalisation, le site du tissu et les conditions environnementales, la microglie peut répondre par l'élimination des débris tissulaires et la résolution de la réponse inflammatoire (activation M2-like) ou conduit à un état de neuroinflammation chronique (activation M1-like), provoquant un dysfonctionnement des cellules neuronales puis leur mort

C. Maladie d'Alzheimer: aspects diagnostiques

1. Diagnostic clinique

Le diagnostic de maladie d'Alzheimer est porté sur des critères cliniques, ceux du NINCDS-ADRDA *(National Institute of Neurologic and Communicative Disorders and Stroke- Alzheimer'sDisease and Related Disorders Association)* (McKhann et al., 1984), révisés en 2011 (McKhann et al., 2011).

Selon ces critères le diagnostic comprend :

- Un syndrome démentiel, défini par le déficit d'au moins deux fonctions cognitives dont celle de la mémoire et un retentissement sur les activités de la vie quotidienne, d'évolution progressive.
- L'exclusion des diagnostics différentiels (pathologie cérébro-vasculaire, troubles métaboliques ou infectieux) par la réalisation d'examens complémentaires.

Il s'agit d'un diagnostic de probabilité, avec une spécificité de 70%, le diagnostic de certitude étant anatomo-pathologique.

Aujourd'hui, le développement de biomarqueurs topographiques et pathophysiologiques permet un diagnostic plus précoce, aux stades prodromaux voire précliniques de la maladie, antérieurs au stade démentiel. Deux syndromes cliniques ont été décrits comme précédant le stade de démence : on parle de « subjective cognitive impairment », une plainte cognitive subjective émise par le patient et de « mild cognitive impairment », une plainte cognitive objective émise par le patient sans retentissement sur son autonomie dans la vie quotidienne.

Les lésions cérébrales spécifiques de la maladie d'Alzheimer apparaissent en effet au moins une décennie avant les symptômes cliniques. Leur mesure in vivo permet de porter un diagnostic précoce, de suivre leur progression et d'évaluer l'efficacité des thérapeutiques à l'essai. Un diagnostic précoce est indispensable à la mise en place de nouvelles stratégies thérapeutiques.

2. Biomarqueurs de la cascade pathologique de la MA

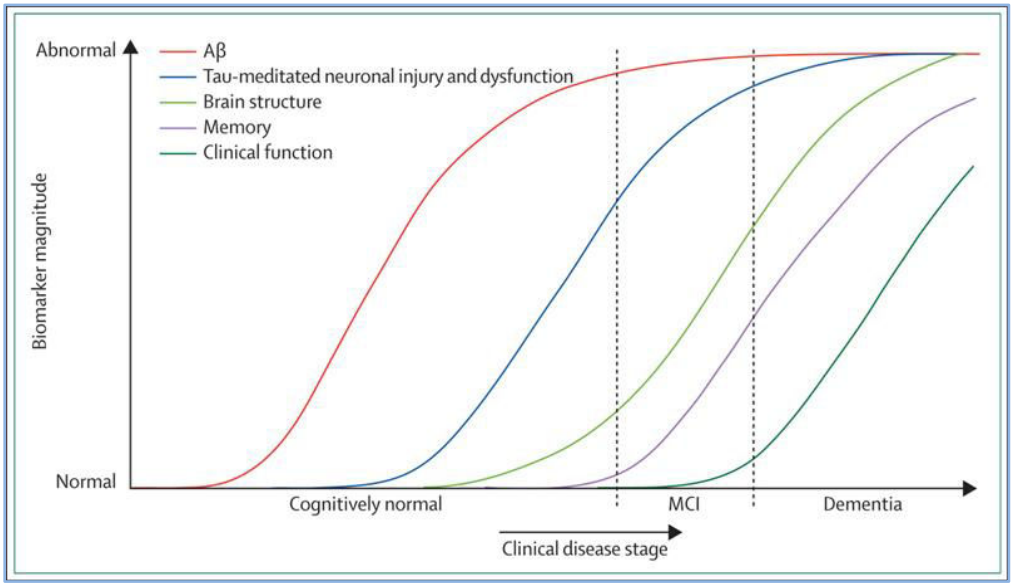


Figure 7: Dynamic biomarkers of the Alzheimer's pathological cascade *(Jack et al., 2010)*

a) Biomarqueurs en imagerie cérébrale

L'échelle de Scheltens est un exemple de mesure volumétrique en Imagerie par Résonance Magnétique (IRM), ciblant l'hippocampe. Elle repose sur trois items cotés sur une coupe coronale : taille de l'hippocampe, élargissement de la corne temporale ventriculaire et élargissement de la fissure choroïdienne, définissant quatre stades (Scheltens et al., 2002) (Figure 7A). La sévérité de l'atrophie cérébrale estimée par la mesure volumétrique de l'hippocampe est fortement corrélée à la sévérité des troubles cognitifs (Jack et al., 1992).

La tomographie par émission monophotonique (TEMP ou SPECT) et la tomographie par émission de positons au fluorodéoxyglucose (TEP ou PET-FDG) identifient respectivement les régions cérébrales sièges d'une hypoperfusion ou d'un hypométabolisme, avec une spécificité et une sensibilité pour la maladie d'Alzheimer supérieures à 85% (Patwardhan et al., 2004).

Un marquage direct des lésions amyloïdes, in vivo, par des ligands marqués au carbone 11 (Pittsburgh compound B, PIB) ou au fluore 18 (florbetapir, florbetaben,

flutemetamol) a été proposé en TEP (Figure 7B). Ce marquage lésionnel montre une grande corrélation avec l'examen anatomo-pathologique post-mortem (Clark et al., 2012).

Un marquage des DNF par un ligand de la protéine Tau (ligand PPB3), également en TEP, est à l'essai mais il faudra attendre les autopsies des patients scannés pour confirmer que le marquage reflétait bien la pathologie (Maruyama et al., 2013).

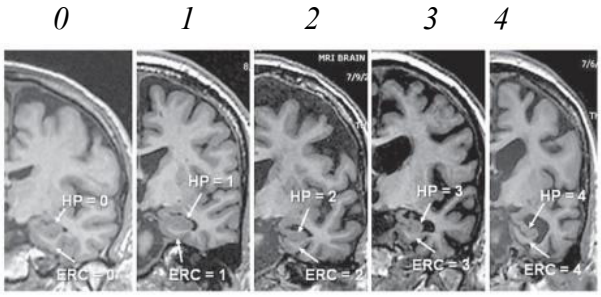
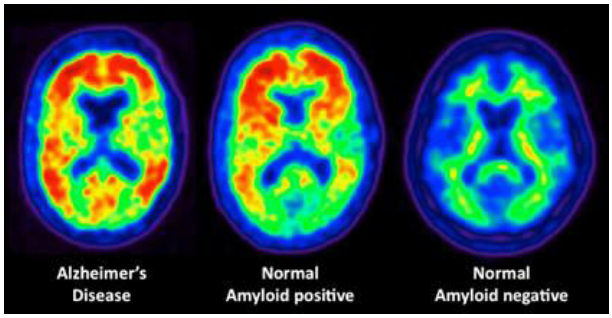


Figure 8 A : Echelle de Scheltens

Stades 0 (absence d'atrophie) à 4 (atrophie sévère)
HP=hippocampe - ERC=cortex entorhinal



B :PIB-amyloid

Le marquage amyloïde le plus intense est représenté en rouge (à gauche chez un patient Alzheimer)

Enfin, on retrouve une augmentation de l'activation microgliale, mesurée en TEP par marquage au PK11195, chez des patients atteints de maladie d'Alzheimer. La microglie activée est colocalisée avec les plaques amyloïdes dans les régions corticales frontales et pariéto-temporales et l'intensité de son marquage est corrélée au statut cognitif des patients, mesuré par le MMSE (Mini Mental Status Examination) (Edison et al., 2008).

b) Biomarqueurs du liquide céphalo-rachidien

(1) Biomarqueurs Aβ et Tau

Les concentrations des peptides Aβ40 et Aβ42 et des formes totale et phosphorylée de Tau sont modifiées dans le liquide céphalo-rachidien (LCR) et obtenues par dosage ELISA à partir d'une ponction lombaire.

Dans le LCR, les concentrations de peptide Aβ42 sont diminuées et cette diminution est corrélée avec la charge amyloïde cérébrale. Les concentrations des formes totale et

phosphorylée (p181) de Tau sont à l'inverse augmentées, reflétant la mort neuronale (Blennow, 2010).

(2) Autres biomarqueurs

Les formes totale et phosphorylée (active) de la kinase pro-papoptotique PKR sont augmentées dans le LCR des patients atteints de maladie d'Alzheimer ou de MCI (Mild Cognitive Impairment ou troubles cognitifs légers principalement amnésiques sans retentissement sur les activités de la vie quotidienne), et corrélées aux niveaux de p181Tau (Mouton-Liger et al., 2012b). Un niveau élevé de pPKR au diagnostic est associé à un déclin cognitif plus rapide (Dumurgier et al., 2013).

Des marqueurs du stress oxydatif ou de l'inflammation ont été également retrouvés augmentés dans le LCR de patients atteints de maladie d'Alzheimer, tels que l'isoprostane (Pratico et al., 2000), issu du métabolisme des lipides, l'IL11, une cytokine pro-inflammatoire (Galimberti et al., 2008) ou encore des marqueurs d'activation microgliale (Blasko et al., 2006).

c) Biomarqueurs sériques

Les résultats dans le sérum sont plus contradictoires. En particulier, les études transversales des taux sériques d'Aβ42 n'ont pas permis de mettre en évidence de modification chez les patients atteints de maladie d'Alzheimer (Mehta et al., 2000), alors que les études longitudinales suggèrent que ces taux sont diminués chez les patients lors du diagnostic et pourraient prédire le début de la maladie (Mayeux et al., 2003).

D. Maladie d'Alzheimer : aspects thérapeutiques
(Figure 9)

1. Inhibiteurs de l'acétylcholinestérase et mémantine

Les thérapeutiques anti-Alzheimer encore utilisées couramment sont les inhibiteurs de l'acétylcholinestérase, enzyme qui dégrade l'acétylcholine au niveau de la fente synaptique (rivastigmine, donepezil, galantamine) et la mémantine, un antagoniste non compétitif des récepteurs NMDA (N-methyl-D-aspartate).

En effet, la maladie d'Alzheimer est marquée par une diminution précoce des concentrations en acétylcholine, neurotransmetteur impliqué dans la mémoire, l'apprentissage et l'attention, due à la dégénérescence du noyau basal de Meynert.

Le récepteur NMDA au glutamate est largement exprimé dans le système nerveux central. Il présente une forte perméabilité aux ions calcium, ce qui lui confère un rôle central dans la plasticité synaptique (conditions physiologiques) et dans la mort neuronale, par excitotoxicité (conditions pathologiques).

L'efficacité de ces traitements reste cependant modeste bien que significative d'après les méta-analyses. Ils agissent sur les symptômes et non sur les mécanismes étio-pathogéniques de la maladie (Trinh et al., 2003; Winblad et al., 2007).

2. Traitements anti-amyloïde

Il existe trois types de stratégies thérapeutiques ciblant l'amyloïde, elles visent à :

- diminuer la production d'Aβ
- prévenir l'agrégationd'Aβ
- augmenter la dégradation d'Aβ

Pour ***diminuer la production d'Aβ***, les essais portent sur des modulateurs des sécrétases qui agissent:

- soit en stimulant l'α-sécrétase, pour orienter le métabolisme de l'APP vers la voie physiologique non amyloïdogène.
- soit en inhibant la β-sécrétase (BACE 1)ou la γ-sécrétase. L'inhibition de la γ-sécrétase, qui est un complexe protéique, comporte un risque d'altération d'autres fonctions physiologiques indispensables telles que la voie Notch, impliquée dans la différenciation cellulaire (Hull et al., 2006).

Pour ***prévenir l'agrégation d'Aβ***, les essais portent sur des GAG-mimétiques (qui ciblent les glysaminoglycanes, GAG) (van Horssen et al., 2003) et des chélateurs de métaux (Ritchie et al., 2003). Les GAG et les métaux tels que le zinc ou le cuivre favorisent en effet l'agrégation d'Aβ.

Pour ***dégrader Aβ*** (les plaques séniles), les essais portent sur l'immunothérapie :

- L'immunothérapie active (vaccin) permet le développement par les patients répondeurs d'anticorps dirigés contre la plaque amyloïde susceptibles de ralentir le déclin cognitif.
- L'immunothérapie passive utilise des anticorps monoclonaux humanisés anti-amyloïde. Des études de phase 3 de 18 mois conduites pour deux d'entre eux, le bapineuzumad et le solanezumad n'ont permis cependant qu'une modeste réduction des plaques amyloïdes sans effet sur le statut cognitif de patients porteurs de la maladie à des stades légers à modérés (Salloway et al., 2009). Ces thérapeutiques sont aujourd'hui testées à des stades pauci-symptomatiques.

3. Traitements ciblant la protéine Tau

Ils concernent :

- Des inhibiteurs de kinases, GSK3β ou CDK5. Cependant, le nombre élevé de kinases impliquées dans la phosphorylation de Tau rend aléatoire l'inhibition d'une seule kinase. Le traitement par valproate de sodium, un inhibiteur de GSK3β, n'a pas montré d'effet sur les fonctions cognitives (Tariot and Aisen, 2009).
- Des activateurs de phosphatases, en particulier PP2A.
- Des inhibiteurs de l'agrégation de Tau. Le methylthioninium chloride (il s'agit du bleu de méthylène, couramment utilisé comme marqueur en histologie) est un candidat (Wischik et al., 2013).

4. Traitements basés sur les données épidémiologiques

Les essais contrôlés avec les inhibiteurs des cyclo-oxygénases (COX 1 et 2) ou avec les anti-inflammatoires non-stéroïdiens n'ont pas apporté la preuve de leur efficacité en termes de prévention ou d'amélioration des symptômes de la maladie bien que ces traitements apparaissent comme protecteurs dans les études épidémiologiques lorsqu'ils sont pris au long cours (Aisen et al., 2003).

Les essais avec les statines, les estrogènes et les anti-oxydants ont également échoué à modifier la progression de la maladie d'Alzheimer (Jick et al., 2000; Li et al., 2004). Enfin, les traitements anti-hypertenseurs exercent un effet de prévention du fait des liens entre facteurs vasculaires et maladie d'Alzheimer (Forette and Hauw, 2010).

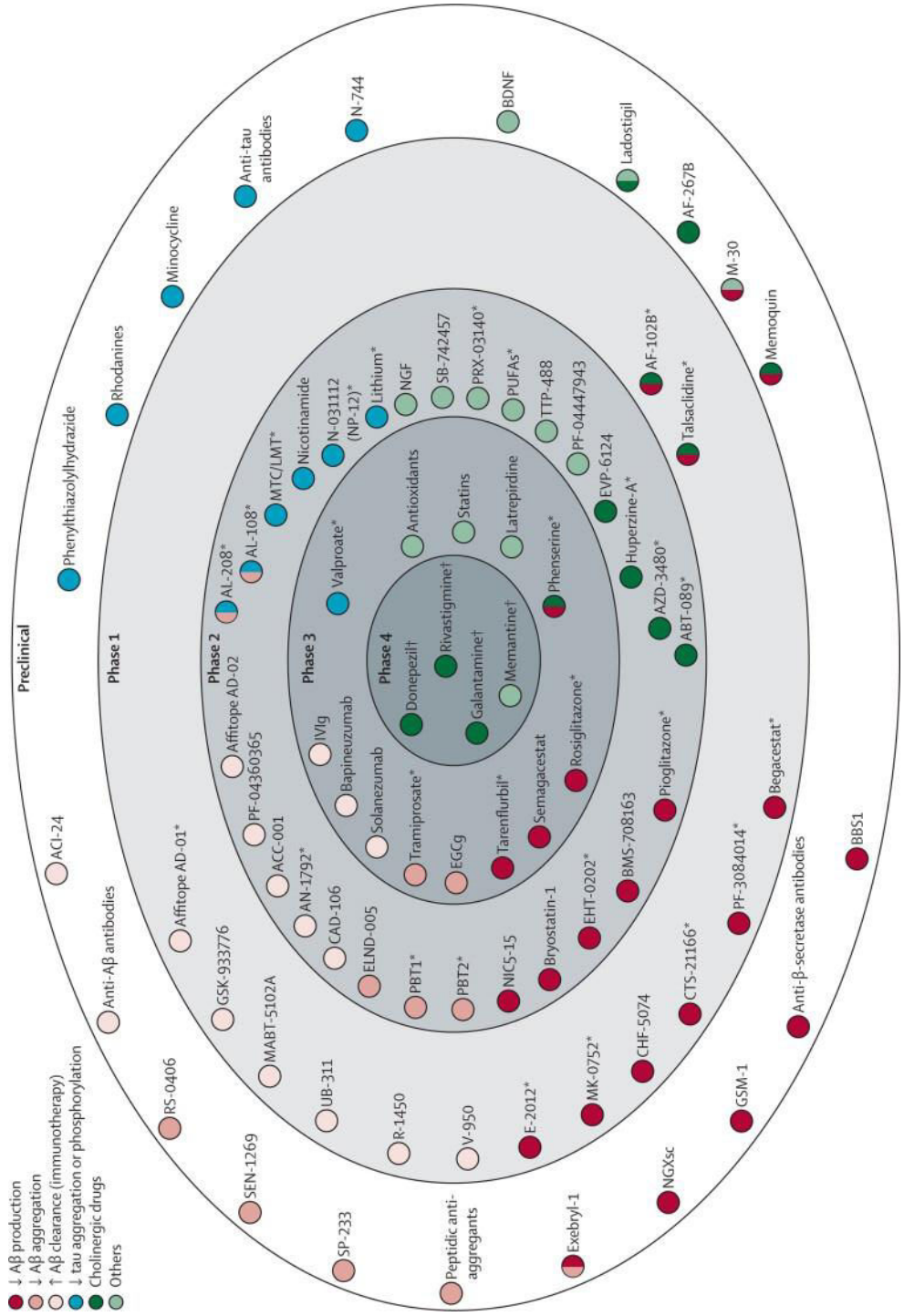


Figure 9 : Essais thérapeutiques anti-Alzheimer
(Mangialasche et al., 2010)

Phase préclinique : expérimentation in vitro et chez l'animal
Phase 1 : étude de la tolérance chez des volontaires sains
Phase 2 : étude de l'efficacité pharmacologique chez les malades
Phase 3 : essai comparatif chez les malades contre placebo ou traitement de référence
Phase 4 : pharmacovigilance

L'inflammation cérébrale est présente à tous les niveaux de cette description de la maladie d'Alzheimer : aspects neuropathologiques mais aussi diagnostiques (biomarqueurs) et thérapeutiques (immunothérapie, effet protecteur des anti-inflammatoires non stéroidiens). La compréhension de ses mécanismes est une cible importante pour la recherche diagnostique et thérapeutique. Certains auteurs parlent d'« inflammation hypothesis » (Zotova et al., 2010).

II. Inflammation cérébrale

A. Système nerveux central et immunité innée

1. Immunité innée

On distingue deux types d'immunité chez l'ensemble des vertébrés :

- L'immunité innée (naturelle), caractérisée par une réponse immédiate et non spécifique aux pathogènes.
- L'immunité adaptative (acquise) dont la réponse est spécifique d'antigène.

L'immunité innée est la première ligne de défense contre les pathogènes (Medzhitov and Janeway, 1997). Leur reconnaissance se fait à partir de leurs structures appelées PAMPs (pathogen-associated molecular patterns), grâce aux récepteurs PRRs (pattern-recognition receptors). Les PRRs peuvent être solubles, membranaires ou cytoplasmiques. Parmi les PRRs membranaires, citons les TLRs (Toll-like receptors).On a attribué également aux PRRs la capacité de reconnaître des molécules endogènes sécrétées ou présentées à la surface des cellules endommagées, appelées DAMPs (damage-associated molecular patterns) ou molécules de danger (Lotze et al., 2007).

Le cerveau a été longtemps considéré comme un organe dépourvu de protection immunitaire car isolé du reste de l'organisme par la barrière hémato-encéphalique qui empêche la transmigration des cellules du système immunitaire systémique (Barker and Billingham, 1977). Les lymphocytes T et B assurant l'immunité adaptative (réponses cellulaire et humorale) ne pénètrent pas le parenchyme cérébral. Toutefois, le cerveau possède son propre système de défense, faisant intervenir l'immunité innée, notamment grâce aux cellules microgliales.

2. Barrière hémato-encéphalique

La barrière hémato-encéphalique (BHE) est l'ensemble des structures séparant le compartiment sanguin de l'encéphale des deux autres compartiments liquidiens extracellulaires du système nerveux central :

- Le liquide extracellulaire du tissu cérébral : interface hémato-cérébrale
- Le liquide céphalorachidien : interface hémato-méningée

Les cellules endothéliales des capillaires cérébraux sont connectées étroitement entre elles par des jonctions serrées formant une couche cellulaire continue sans aucune fenestration. La membrane basale entourant les cellules endothéliales est également continue et recouverte par les projections des cellules astrocytaires, qui subviennent à leurs besoins biochimiques.

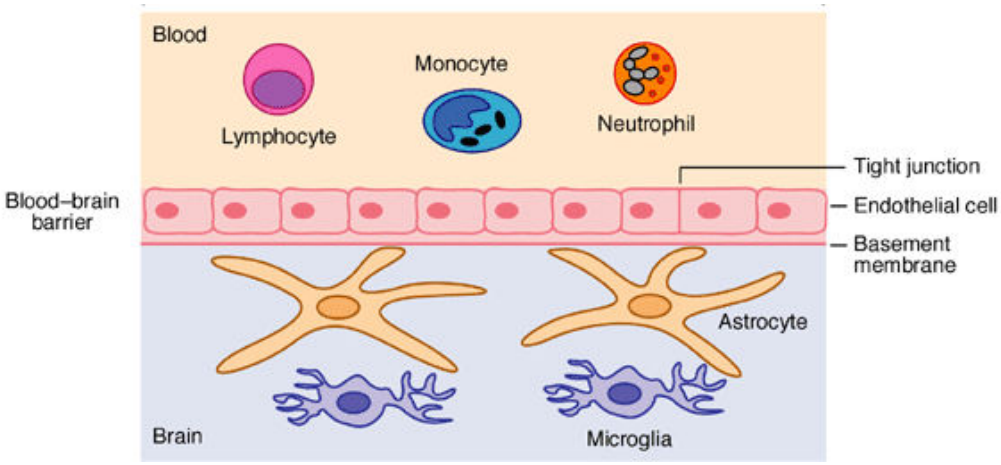


Figure 10 : Représentation schématique de la barrière hémato-encéphalique *(Francis et al., 2003)*

La BHE n'est pas perméable à l'état normal, sauf au niveau des organes circumventriculaires, les régions situées autour des ventricules cérébraux (neurohypophyse, éminence médiane, glande pinéale, area postrema, organe vasculaire de la lame terminale). En effet l'endothélium capillaire à ce niveau ne comporte pas de jonctions serrées, permettant la diffusion limitée de larges molécules.

3. Microglie

Les cellules microgliales ou microglie sont les macrophages résidents du système nerveux central. Elles représentent près de 10 % de la population totale des cellules cérébrales. Leur densité varie d'une région à l'autre, elle est plus importante dans la substance grise. Les cellules microgliales sont les cellules effectrices principales de l'immunité innée, elles assurent la maintenance des tissus et la surveillance immunitaire.

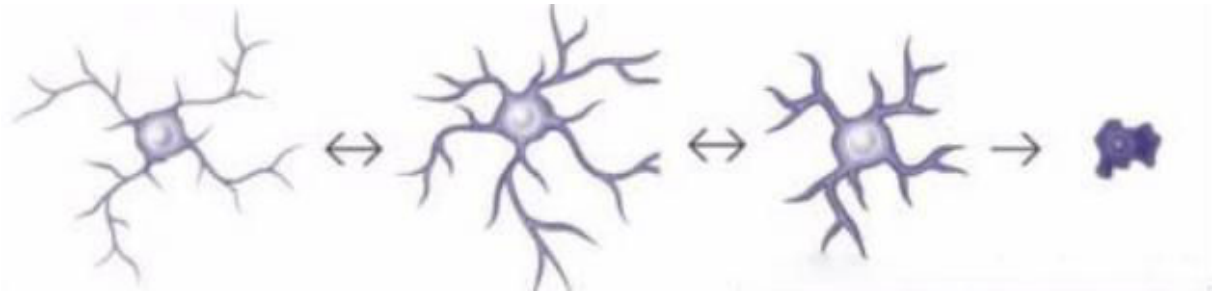
Dans des conditions physiologiques, le rôle de la microglie est d'éliminer les métabolites en excès et les débris tissulaires et de stimuler la réparation des tissus (Nimmerjahn et al., 2005).

Dans des conditions pathologiques, l'activation de la microglie conduit à la production de médiateurs de l'inflammation : complexe majeur d'histocompatibilité de type II (CMH II), cytokines pro-inflammatoires, chimiokines, radicaux libres et protéines du complément, tous participant à la réponse inflammatoire (Moore and O'Banion, 2002).

Similairement aux macrophages, la microglie est capable de phagocytose et de présentation d'antigène.

Au repos, la microglie a une forme quiescente caractérisée par un petit corps cellulaire très ramifié. Ses nombreux prolongements cytoplasmiques sont alignés le long des neurites. Ils sont constamment en mouvement et très sensibles aux changements de leur microenvironnement, scrutant l'espace extracellulaire du parenchyme du système nerveux central (SNC) (Davalos et al., 2005; Raivich, 2005).

La microglie activée prend une forme amiboïde, avec un large corps cellulaire contenant une grande quantité de cytoplasme et des ramifications rétractées. Les cellules peuvent ainsi migrer jusqu'au site endommagé où elles adoptent des fonctions immunitaires complètes. Elles deviennent des cellules phagocytaires capables de présentation antigénique et produisent des médiateurs inflammatoires (Kreutzberg, 1996).



Au repos Transitionnelle Réactive Phagocytique

Figure 11 : Microglie

(Beynon and Walker, 2012)

Les cellules microgliales s'activent par liaison de structures pathogènes (PAMPs) où de danger (DAMPs) à leurs récepteurs de surface (PRRs). Les Toll-likereceptors (TLRs) ont été les premiers récepteurs reconnus pour leur rôle dans la protection de l'hôte.

4. Toll-likereceptors (TLRs)

Les TLRs sont des protéines transmembranaires situées soit dans la membrane plasmique, soit dans la membrane des endosomes. La famille des TLRs comprend 13 récepteurs membranaires chez les mammifères dont 10 sont retrouvés chez l'humain.

Leur domaine extracellulaire permet la reconnaissance et la liaison avec les PAMPs et les DAMPs. Leur domaine cytoplasmique permet la transduction des signaux à la cellule, via des protéines adaptatrices contenant un domaine TIR (Toll-interleukine-l receptor : un motif homologue à la portion intracellulaire du récepteur de l'interleukine-1), comme par exemple le MyD88 (myeloid differentiation factor 88) (Akira, 2006).

Les gènes des TLRs sont dispersés à travers le génome. Ils sont situés sur les chromosomes 4 (TLR1, 3, 6 et 10), 9 (TLR4), 1 (TLR5), X (TLR7 et 8) et 3 (TLR9).

Les TLRs possèdent des ligands, une localisation cellulaire et un profil d'expression différents (Kumar et al., 2009). Ils sont exprimés par de nombreux types cellulaires, immunitaires et non-immunitaires :

- en périphérie : cellules dendritiques, macrophages, cellules NK (natural killer), mastocytes, polynucléaires neutrophiles, lymphocytes T et B ainsi que fibroblastes, cellules épithéliales et kératinocytes.
- dans le SNC : cellules microgliales (qui contrôlent la réponse immunitaire innée), astrocytes, cellules endothéliales et neurones (Bowman et al., 2003; Rolls et al., 2007; Zhou et al., 2006).

Le type et la localisation cellulaire des différents TLRs conditionnent leur fonction (Muzio and Mantovani, 2001) :

- le TLR3 reconnait l'ARN viral double brin (Alexopoulou et al., 2001). Il est largement exprimé dans les compartiments endosomaux où la replication virale se produit.
- les TLR7, 8, et 9 sont exprimés dans la membrane des lysosomes. Les TLR7 et 8 reconnaissent l'ARN viral simple brin. Le TLR9 reconnaît les motifs CpG non méthylés présents dans l'ADN des bactéries et des virus ayant été phagocytés (Heil et al., 2004; Hemmi et al., 2000). Leur activation entraîne la production d'interférons de type 1, impliqués dans la défense contre les pathogènes intracellulaires.

Les TLRs 1,2, 4, 5, 6, et 10 sont exprimés à la surface cellulaire.

- Le TLR4 reconnaît lelipopolysaccharide (LPS), constituant de la membrane cellulaire des bactéries à Gram négatif.
- Le TLR5 reconnaît la flagelline, une protéine présente sur les flagelles bactériens (Hayashi et al., 2001).
- Le TLR2 reconnaît une grande diversité de motifs dont plusieurs composants des bactéries à Gram positif, comme le peptidoglycane (Michelsen et al., 2001).

5. LPS

Un PAMP, pour pathogen-associated molecular pattern,le lipopolysaccharide (LPS), constituant principal de la membrane externe des bactéries à Gram négatif, représente un exemple bien connu de reconnaissance innée conduisant à une réponse inflammatoire par les phagocytes (Wright, 1999).

Le LPS se lie au TLR4, récepteur de l'immunité innée, via une protéine adaptatrice, CD14, favorisant l'expression de cytokines pro-inflammatoires par stimulation du facteur transcriptionnel NF-κB (Zhang and Ghosh, 2000).

B. Inflammation systémique et système nerveux central (SNC)

Le concept de communication de l'inflammation systémique au SNC a été largement exploré à travers des études sur l'animal exposé au LPS ou à des cytokines pro-inflammatoires, en particulier IL-1β, IL-6 et TNFα.

1. Voies de signalisation de l'inflammation de la périphérie vers le système nerveux central

Le LPS et les cytokines pro-inflammatoires sont des molécules de poids moléculaire élevé dont l'accès au tissu cérébral est limité par la BHE.

Il existe des voies alternatives, humorales ou neuronales, permettant la transmission de la signalisation de l'inflammation de la périphérie vers le SNC, malgré une BHE intacte (Figure 12). La description de ces voies est principalement issue de l'observation des modèles animaux. Certaines ont été confirmées par des études en imagerie chez l'homme (Harrison et al., 2009b).

a) Voie des organes circumventriculaires

Le LPS et les cytokines pro-inflammatoires ayant pénétré le parenchyme cérébral par diffusion au niveau des sites ne comportant pas de BHE : organes circumventriculaires, plexus choroïdes et leptoméninges, peuvent exercer une action directe. Les cellules microgliales exprimant à leur surface le TLR4 et son cofacteur CD14 au niveau des organes circumventriculaires sont les premières cellules à reconnaitre le LPS circulant et à initier rapidement la transcription de gènes codant pour des cytokines, comme le TNFα. Celui-ci va ensuite activer NF-κB dans les cellules microgliales adjacentes, entraînant la transcription de gènes pro-inflammatoires (y compris celui codant pour le TNFα) et la progression de la réponse inflammatoire à travers le parenchyme (Nadeau and Rivest, 2000).

b) Voie des prostaglandines

Le LPS et les cytokines pro-inflammatoires entraînent la synthèse de prostaglandines par les cellules endothéliales vasculaires de la BHE, par l'intermédiaire de COX-2 (cyclo-oxygénase 2) (Matsumura and Kobayashi, 2004). Les prostaglandines activent au niveau central l'axe du stress hypothalamo-hypophyso-surrénalien.

c) Voie du nerf vague

Le LPS et les cytokines pro-inflammatoires agissent indirectement sur l'hypothalamus via le nerf vague dont les afférences se projettent au niveau du noyau du tractus solitaire, qui coordonne les réflexes végétatifs (Ek et al., 1998).

d) Voie des progéniteurs myéloïdes

Des cellules immunitaires peuvent directement pénétrer dans le parenchyme cérébral depuis la périphérie, en particulier des progéniteurs myéloïdes circulants, permettant la prolifération de la microglie (Rezaie and Male, 2002).

e) Voie du transport actif de cytokines

Des cytokines pro-inflammatoires peuvent passer de la vascularisation vers le cerveau par transport actif (Conti et al., 2004).

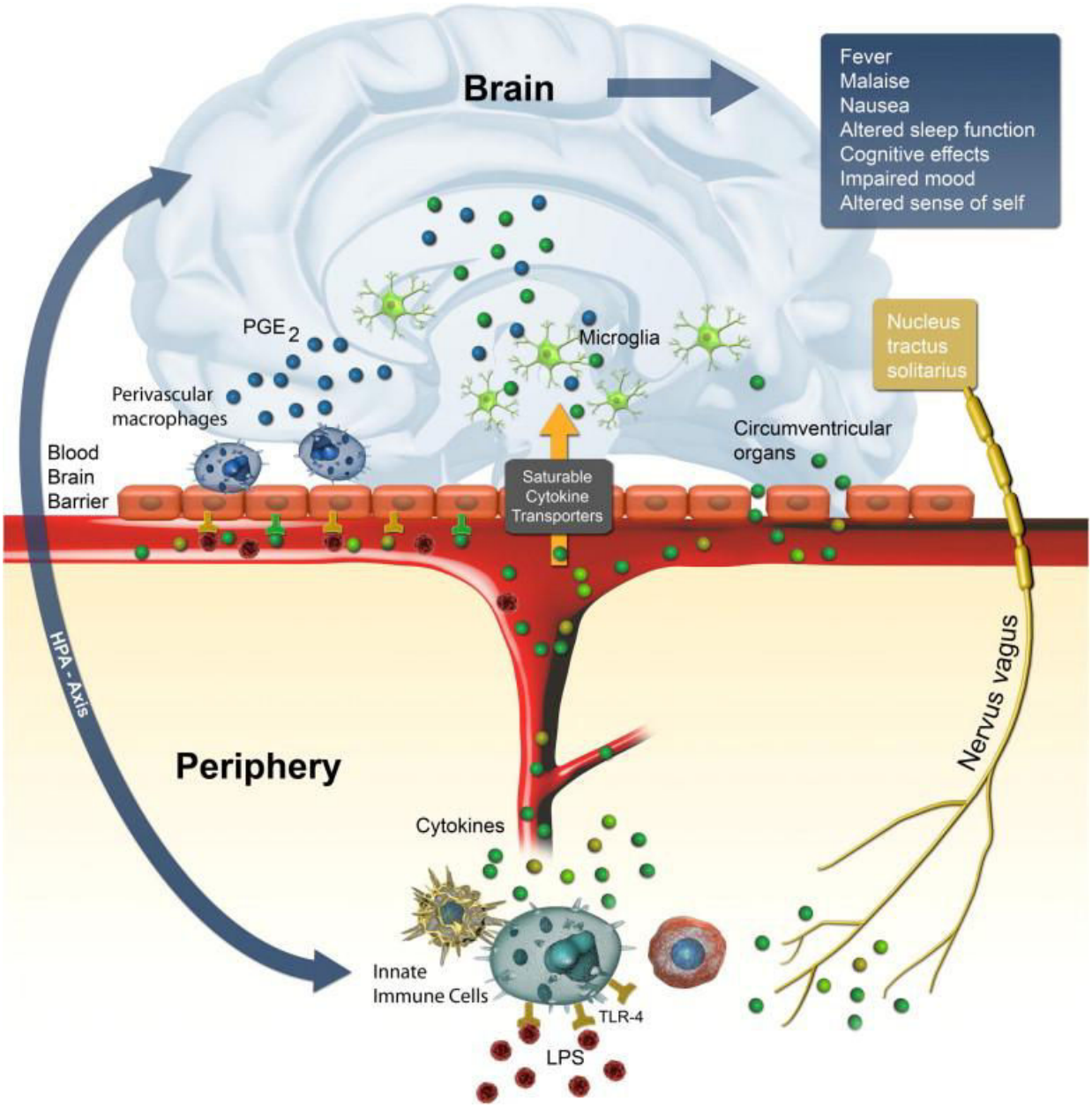


Figure 12 : Voies de signalisation de l'inflammation de la périphérie vers le SNC *(Schedlowski et al., 2014)*

2. Effets de l'inflammation systémique sur les fonctions cognitives : sickness behaviour

L'hypothèse d'une communication entre la périphérie et le cerveau est confortée par la présence de signes cliniques généraux en cas d'inflammation systémique, en particulier d'origine infectieuse, bactérienne ou virale. Il s'agit de symptômes d'apathie, de troubles de la concentration s'accompagnant d'une diminution des interactions sociales et associés à une fièvre avec anorexie. Ces signes existent également chez l'animal sous la forme d'un syndrome appelé ***sickness behaviour***. Il comprend des modifications de la température corporelle, une diminution des activités motrices et de la consommation de nourriture (Dantzer, 2001). Le *sicknessbehaviour* permet à l'organisme de conserver son homéostasie en cas d'agression et résulte d'une adaptation corticale pour contrôler les infections (Hart, 1988; Kluger and Rothenburg, 1979).

De nombreuses conditions pathologiques aseptiques s'accompagnent d'un *sickness behaviour*, suggérant qu'il existe des voies de signalisation communes qu'il s'agisse d'une inflammation systémique d'origine septique ou aseptique (Lotze and Tracey, 2005) :

- chez les patients traités par interféron pour cancer ou hépatite(Capuron et al., 2002)
- en cas de traumatisme ou d'hypoxie (Yang et al., 2004)
- en cas de pathologie inflammatoire: polyarthrite, psoriasis (Poole et al., 2011)

3. Exemples d'inflammation systémique avec neuroinflammation

a) Chez l'homme

(1) Cas du sepsis

Chez l'homme, le sepsis est une condition inflammatoire généralisée d'origine infectieuse caractérisée par une production exacerbée de médiateurs inflammatoires.

Les patients atteints de sepsis ont des symptômes appartenant à la sphère du *sickness behaviour* : fièvre, troubles de la vigilance, de l'attention et de la concentration. Ces symptômes sont associés à un taux élevé d'endotoxine et de cytokines circulantes (Bone, 1991). L'examen anatomo-pathologique des cerveaux des patients décédés de leur sepsis a mis en évidence un phénotype activé des cellules microgliales et une augmentation du niveau d'expression local des cytokines pro-inflammatoires (Lemstra et al., 2007; Sharshar et al., 2004).

(2) Cas de l'endotoxémie

L'administration de faibles doses d'endotoxine (le lipopolysaccharide, LPS) provenant de bactéries à Gram négatif (Salmonella Typhi ou Escherichia Coli) à de jeunes volontaires sains s'accompagne d'une augmentation des taux plasmatiques d'IL-6 et de TNFα. Ces patients ont été soumis à des tests de performance mnésique dont les scores se sont trouvés inversement corrélés aux taux circulants de cytokines (Krabbe et al., 2005). Un taux élevé de cytokines est également associé à des temps de réaction plus longs et à des anomalies du métabolisme cérébral au niveau de la substance noire et du cortex cingulaire, mesurés en IRM fonctionnelle (Brydon et al., 2008; Harrison et al., 2009a).

b) Chez l'animal

L'injection systémique unique de ***LPS*** chez l'animal, usuellement par voie intrapéritonéale (i.p), est suivie en quelques heures :

- de modifications comportementales : le *sickness behaviour*, réversible en 72h
- d'une activation de la microglie
- de la production de cytokines pro-inflammatoires, détectables dans le sérum et dans le cerveau (Spulber et al., 2012).

L'administration systémique de LPS conduit à la production de nombreux autres médiateurs de l'inflammation au niveau cérébral, tels que chemokines (Brown et al., 2010), cyclo-oxygénases (Teeling et al., 2010) et iNOS (Innamorato et al., 2008). L'oxyde nitrique synthase inductible, iNOS (inducible isoform of nitricoxide synthase) permet la synthèse d'oxyde nitrique (nitricoxide, NO), un radical libre cytotoxique, libéré par la microglie activée sous l'action des cytokines pro-inflammatoires (Czapski et al., 2007). Les cyclo-oxygénases (COX 1 et 2), présentes dans la microglie convertissent l'acide arachidonique en prostaglandines (Russo et al., 2011). Le LPS induit également la translocation nucléaire du facteur transcriptionnel STAT3 (Rummel et al., 2008). STAT3 (signal transducer and activator of transcription 3) coopère avec GSK3β pour induire la production d'IL6, d'iNOS et l'activation de la microglie (Beurel and Jope, 2009; Yuskaitis and Jope, 2009).

Les doses de LPS utilisées varient dans les études de 0,1 mg/kg à 10 mg/kg. Les doses les plus faibles induisent déjà un *sickness behaviour*tandis que les doses les plus élevées correspondent à un stress proche du choc septique et peuvent être létales, témoignant d'un effet dose-dépendant (Teeling et al., 2007).

Figure 13 : Exemples de modèles de neuroinflammation utilisant le LPS en administration systémique unique chez la souris C57BL/6

Dose de LPS	Temps avant sacrifice	Médiateurs inflammatoires observés dans le cerveau	Référence
10 mg/kg	6 heures	TNFα, IL-1β Microglie activée (CD45)	*(Thompson et al., 2008)*
3 mg/kg	1 heure	TNFα, IL-1β Microglie activée (Iba1)	*(Qin et al., 2008)*
1 mg/kg	1 semaine	TNFα, IL-6	*(Innamorato et al., 2008)*
0,5 mg/kg	3 heures	IL-1β	*(Begum et al., 2008)*
10 mg/kg	4 heures	TNFα, IL-6, IL-1β	*(Beurel and Jope, 2009)*
0,1 mg/kg	6 heures	TNFα, IL-6, IL-1β	*(Teeling et al., 2010)*
3 mg/kg	24 heures	TNFα, IL-6, IL-1β Microglie activée (Iba1)	*(Sehgal et al., 2011)*
0,3 mg/kg	24 heures	TNFα, IL-6, IL-1β	*(Spulber et al., 2012)*

Bien que le modèle d'inflammation systémique induite par le LPS soit le plus largement utilisé, il existe d'autres modèles expérimentaux comme celui de l'administration par voie i.p d'ARN viral synthétique, le poly (I:C), un ligand des TLR3, qui provoque également un *sickness behaviour* chez les souris C57BL/6, secondaire à la production centrale de cytokines pro-inflammatoires, en particulier l'IL-6 (Cunningham et al., 2007).

C. Inflammation systémique et maladie d'Alzheimer

En conditions physiologiques, un évènement inflammatoire systémique aigu entraîne une inflammation cérébrale transitoire et réversible.Dans des conditions chroniques, telles que le vieillissement ou les maladies neurodégénératives, l'activation microgliale est amorcée (on

parle de « primed microglia »). Soumise à un nouveau stress inflammatoire, la microglie prend un phénotype super-activé, ses effets sont alors amplifiés et prolongés.

1. Relation entre inflammation, delirium et maladie d'Alzheimer

Le delirium est un syndrome confusionnel caractérisé par des troubles cognitifs transitoires (troubles de la vigilance et de l'attention, oubli à mesure, désorientation temporo-spatiale). Sa prévalence est élevée chez les patients âgés et chez les patients atteints de démence. Il survient souvent dans un contexte inflammatoire (infection, chirurgie etc) (Elie et al., 1998; Meagher, 2009; van Munster et al., 2008).La survenue d'un ou plusieurs épisodes de delirium augmente le risque de développer un syndrome démentiel (Rockwood et al., 1999), et celle d'un ou plusieurs épisodes infectieux accélère la progression de la maladie d'Alzheimer(Dunn et al., 2005). L'étude d'une cohorte de 188 patients Alzheimer ayant présenté un épisode infectieux a montré une corrélation entre aggravation du déclin cognitif à 6 mois et taux sériques de TNFα au moment de l'infection (Holmes et al., 2009).

Van Gool et al. ont proposé le modèle suivant d'après ces observations :

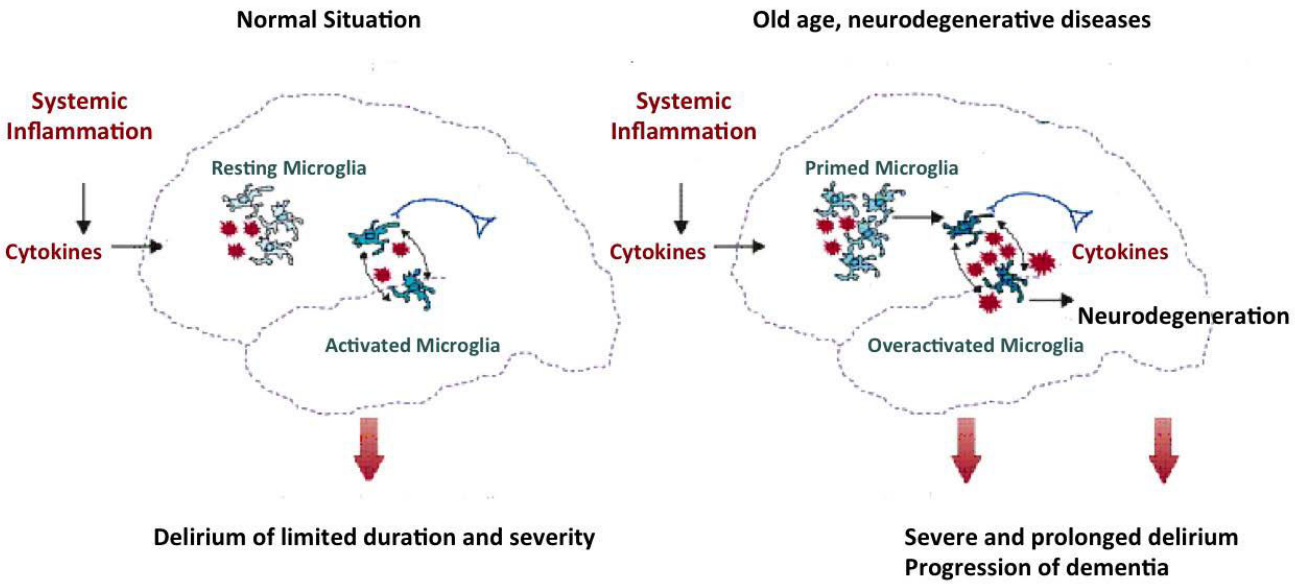


Figure 14 : Modèle de neurodégénérescence à partir d'un épisode inflammatoire périphérique.

En situation normale, la microglie est au repos et s'active en cas de stress inflammatoire systémique. Au cours du vieillissement et en cas de pathologie neurodégénérative, la microglie, qui est amorcée, devient superactivée dans des conditions d'inflammation systémique et participe alors au processus de neurodégénérescence (van Gool et al., 2010)

2. Relation entre inflammation périphérique, inflammation centrale et neurodégénérescence

On a cherché à reproduire expérimentalement ce modèle, en induisant une inflammation systémique, responsable d'une surproduction de cytokines pro-inflammatoires, chez des animaux présentant une neurodégénérescence.

a) Modèle du vieillissement

Des souris BALB/c âgées de 20 mois, 4h après injection de LPS par voie i.p, présentent un niveau d'expression des cytokines IL-1β et IL-10 dans le cortex et la microglie plus élevé que les sujets adultes, alors que leurs taux plasmatiques sont identiques.

L'âge serait un facteur qui majorerait la réponse inflammatoire centrale induite par l'activation du système immunitaire inné périphérique (Henry et al., 2009).

b) Modèle de la maladie à prion

Des souris C57BL/6 traitées par injection stéréotaxique intra-hippocampique de ME7, un homogénat de cerveau infecté par la maladie de la tremblante, développent en quelques semaines une neurodégénérescence associée à une réaction inflammatoire avec activation microgliale et cliniquement une ataxie centrale (Betmouni et al., 1996).

Cunningham et al. ont étudié les effets d'un stress inflammatoire périphérique dans ce modèle de maladie à prion. Les animaux infectés soumis à une injection i.p de LPS présentent :

- un *sickness behaviour* plus sévère (hypothermie, troubles moteurs) et des taux plus élevés d'IL1-β (Combrinck et al., 2002).
- une augmentation de l'expression cérébrale du TNFα et de l'IL-1β (x3) par rapport aux animaux non infectés soumis à la même dose de LPS.
- une augmentation du nombre de neurones apoptotiques (x2) par rapport aux animaux infectés témoins (traités avec du salin), en immunohistochimie (TUNEL et marquage de la caspase 3 activée) (Cunningham et al., 2005).
- une progression plus rapide des signes neurologiques, cognitifs et moteurs liés à la tremblante (Cunningham et al., 2009).

c) Modèles de la maladie d'Alzheimer

(1) Souris APPswe

L'administration i.p de 0,5 mg/kg de LPS une fois par semaine pendant douze semaines à des souris transgéniques APPswe (swedish mutation), un modèle de maladie d'Alzheimer surexprimant l'APP et présentant des plaques amyloïdes cérébrales et une altération des performances cognitives à 12 mois induit :

- une augmentation du nombre et de la taille des cellules microgliales dans le néocortex et l'hippocampe.
- une augmentation des niveaux d'APP, d'Aβ40 et d'Aβ42 dans le cerveau en western blotting et ELISA.
- une augmentation du marquage de l'APP et de l'Aβ dans les neurones (néocortex et hippocampe) en immunohistochimie (Sheng et al., 2003).

(2) Souris 3xTg-AD

Les souris 3xTg-AD possèdent 3 mutations (APPswe, PS1M146V et TauP301L) et reproduisent à la fois les plaques amyloïdes et les dégénérescences neurofibrillaires.

Le traitement par poly (I:C) de ces animaux accélère la formation des plaques amyloides (Krstic et al., 2012).

Exposées au LPS, à la dose de 0,5 mg/kg i.p, 2 fois par semaine pendant 6 semaines, ces souris développent :

- une activation microgliale (marquage du CD45) dans le néocortex et l'hippocampe
- une augmentation de l'IL-1β (mais pas de l'IL-6 ni du TNFα)
- une augmentation de la phosphorylation de Tau (Ser202/Thr205, Thr231/Ser235)
- une augmentation de l'activité enzymatique de CDK5 (Kitazawa et al., 2005)

Cettte étude n'a pas reproduit sur l'APP et l'Aβ les mêmes effets que chez les souris APPswe.

(3) Injection centrale d'Aβ42

L'administration i.p de LPS à des souris wild type C57BL/6 de 12 mois pré-traitées par une injection intracérébroventriculaire (i.cv) d'Aβ42 entraîne une altération cognitive exacerbée (Cakala et al., 2007).

Dans ces modèles murins de maladies neurodégénératives, l'activation du système immunitaire inné périphérique est responsable :

- d'une majoration de la réponse inflammatoire centrale
- d'une majoration des processus de neurodégénérescence

Un stress inflammatoire périphérique peut également activer les voies de signalisation pathologiques de la maladie d'Alzheimer sur un cerveau sain.

3. Inflammation périphérique et activation des voies de signalisation pathologiques de la maladie d'Alzheimer

L'administration de poly (I:C) à des souris wild type en gestation conduit au développement de signes neuropathologiques de type Alzheimer au cours du vieillissement : augmentation de la production d'APP, hyperphophorylation de la protéine Tau, augmentation du taux de cytokines pro-inflammatoires dans l'hippocampe, troubles mnésiques.

Ces effets sont majorés après une seconde administration de poly (I:C) à l'âge adulte (Krstic et al.).

Des souris type ICR traitées par une dose unique de LPS i.p 0,25 mg/kg, testées sur un plan comportemental avant sacrifice, présentent 4 heures après l'injection:

- des troubles de la mémoire (test d'évitement passif et piscine de Morris)
- une augmentation d'Aβ42 dans le cortex et l'hippocampe en ELISA
- une diminution de l'activité α-secrétase et une augmentation des activités β et γ sécrétases (Kahn et al., 2012).

De même, des injections répétées de LPS i.p (0,25 mg/kg par jour pendant 7 jours) entraînent une altération cognitive (piscine de Morris) et une augmentation d'Aβ42 dans l'hippocampe en ELISA (Kahn et al.).

L'injection i.p de LPS altère la perméabilité de la barrière hémato-encéphalique avec un effet dose-dépendant et augmente l'influx d'Aβ dans le cerveau (Jaeger et al., 2009).

Enfin, une injection unique de LPS i.p (0,1 mg/kg) à des souris wild type C57BL/6 augmente rapidement l'activité kinase de CDK5 et la phosphorylation de Tau (Ser202/Thr205 et Ser396/Thr404) (Roe et al., 2011).

Nous avons montré d'après la littérature qu'un stress inflammatoire périphérique, modélisé chez l'animal par l'injection i.p de LPS ou de poly (I:C), induit une inflammation cérébrale, active les voies de signalisation de la maladie d'Alzheimer (voies amyloïde et Tau) et participe au processus de neurodégénérescence.

L'objectif de cette thèse est d'explorer ces voies de signalisation et notamment le rôle de médiateur de la kinase PKR dans ce modèle.

III. PKR

A. Structure et localisation cellulaire

PKR, pour double-stranded RNA-dependent protein kinase, a été mise en évidence à partir de l'étude de cellules infectées par le virus de la vaccine et traitées par interferon. Dans ces conditions, la traduction de l'ARN viral et donc la réplication virale étaient contrôléespar une protéine identifiée secondairement comme une kinase activée par sa liaison à l'ARN double brin (Metz and Esteban, 1972; Sen et al., 1978). Cette protéine a été clonée à l'Institut Pasteur en 1990 par Meurs et al. sous le nom de PKR (Meurs et al., 1990).

PKR appartient à deux familles différentes de protéines :

- La famille des kinases qui phosphorylent le facteur d'initiation eIF2α
- La famille des protéines liant l'ARN double brin

Cette protéine de 551 acides aminés (68kDa) présente :

- Un domaine sérine/thréonine kinase à son extrémité C terminale (domaine catalytique).
- Deux domaines liant l'ARN double brin à son extrémité N terminale. Ces domaines appelés DRBDs (pour dsRNAbindingdomains) ont une structure αββα qui permet une

liaison de forte affinité (Saunders and Barber, 2003). L'ARN double brin se lie aux DRBDs de PKR par l'intermédiaire de groupements OH et phosphates.

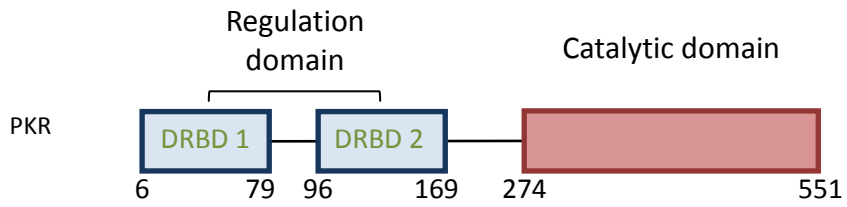


Figure 15 : Structure de PKR

PKR est une protéine ubiquitaire, faiblement exprimée de façon constitutive et principalement localisée dans le cytoplasme cellulaire. Dans certaines conditions de stress cellulaire, PKR est transloquée au niveau du noyau, comme cela est le cas dans les formes sporadiques de maladie d'Alzheimer (Bose et al., 2011; Jeffrey et al., 1995)

La liaison de PKR à l'ARN double brin entraîne un changement de conformation permettant sa dimérisation à partir de son extrémité N terminale, donnant accès à son site catalytique C terminal. La boucle d'activation de PKR nécessite également son autophosphorylation au niveau de ses résidus thréonine Thr446 et Thr451 (Dey et al., 2005; Zhang et al., 2001).

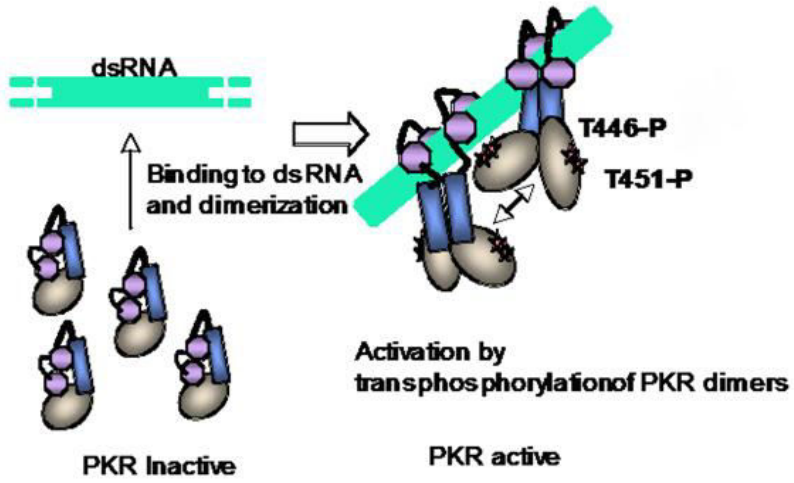


Figure 16 : Activation de PKR

(Dabo and Meurs, 2012)

B. Activateurs de PKR

(Figure 17)

1. ARN double brin

PKR est activée par l'ARN double brin qu'il soit d'origine cellulaire, virale ou synthétique poly (I : C), et agit comme un détecteur d'infection virale (Garcia et al., 2007). L'activation de PKR par sa liaison à l'ARN double brin induit d'une part une inhibition de la traduction et d'autre part affecte la transcription de nombreux gènes par différentes voies de signalisation. Les ARN capables d'activer PKR doivent comporter un minimum de 30 paires de bases (Garcia et al., 2006).

2. TRBP, PACT

En l'absence d'ARN double brin, les DRBDs peuvent fixer d'autres molécules capables de moduler l'activité de PKR, notammentPACT (PKR-associated activator), entraînant sa dissociation de la protéine TRBP (TAR RNA binding protein). PACT et TRBP exercent respectivement des actions activatrice et inhibitrice, dans des conditions précises de stress cellulaire (Daher et al., 2009).

3. TLRs

PKR interagit avec au moins 3 des membres de la famille des récepteurs TLRs: TLR3, 4 et 9. Ces récepteurs de l'immunité innée reconnaissent différents produits microbiens, et notamment le LPS (reconnu par le TLR4).

PKR appartient à la voie de signalisation de TLR4. En effet, des macrophages issus d'animaux wild-type, exposés au LPS, présentent une augmentation de la phosphorylation de PKR (Horng et al., 2001). Les études de modèles murins déficients en PKR et exposés au LPS ont montré *in vivo* et *in vitro* une altération de la signalisation de TLR4 et de la réponse inflammatoire (diminution de la production de cytokines pro-inflammatoires) (Goh et al., 2000).

4. Cytokines

PKR est un important médiateur dans la régulation de la réponse aux cytokines.

En amont, les interferons (IFNs) de type I sont des inducteurs transcriptionnels de PKR. En aval, l'activation de la voie du NF-κB par l'IFNγ et par le TNFα et de la voie de p38 par l'IL-1 est contrôlée par PKR (Deb et al., 2001a; Kumar et al., 1997).

5. Autres stress cellulaires

PKR est activée dans diverses conditions de stress cellulaire :

- stress oxydatif, en particulier lors de la carence en thiamine (vitamine B1) (Wang et al., 2007). La carence en thiamine est associée au processus de neurodégénérescence au cours de l'intoxication alcoolique chronique.
- stress du reticulum endoplasmique.
- stress induit par la neurotoxicité du peptide β amyloïde (Chang et al., 2002a; Chang et al., 2002b; Suen et al., 2003).
-

C. Rôle physiologique de PKR

(Figure 17)

1. eIF2α kinase

PKR fait partie des kinases capables de phosphoryler le facteur d'initiation eIF2 (eukaryotic initiation factor 2) au niveau de sa sous-unité α (sur son résidu sérine s51).

Outre PKR, cette famille de kinases comprend :

- GCN2 (general control non repressed 2)
- PERK (PKR-like endoplasmic reticulum kinase)
- HRI (heme-regulated inhibitor kinase)

EIF2 forme un complexe ternaire avec le Met-ARNt (l'ARN de transfert de démarrage, qui porte le premier acide aminé incorporé dans la protéine, une méthionine) et le GTP (guanosine triphosphate) au niveau de la sous-unité ribosomale 40S (Hershey, 1991). La phosphorylation d'eIF2α empêche la formation de ce complexe et induit l'inhibition de l'initiation de la traduction et donc de la synthèse protéique (Sudhakar et al., 2000).

PKR a été proposée comme un puissant ***agent antiviral*** car en phosphorylant eIF2α, elle permet de contrôler la réplication de l'ARN viral (en bloquant sa traduction) (Garcia et al., 2007; Meurs et al., 1992). La phosphorylation d'eIF2α par PKR peut également activer un processus d'autophagie (autophagocytose cellulaire) qui permet la destruction d'hôtes indésirables, tels que les virus.

La qualité de PKR en tant qu'agent anti-infectieux dépend cependant de la nature du virus et de son mécanisme d'action.

2. Transduction du signal

Par sa capacité à phosphoryler le facteur d'initiation eIF2α, PKR exerce un rôle majeur dans la régulation des fonctions cellulaires. Cependant, PKR peut également phosphoryler d'autres substrats, y compris en l'absence d'activité catalytique.

a) Voie des STAT

Les protéines appartenant à la famille des STAT (signal transducers and activators of transcription) sont des facteurs de transcription et participent à de nombreuses cascades cellulaires de transduction du signal.

La modulation des STAT par PKR intervient dans les mécanismes de signalisation des IFNs et des ARN double brin. La phosphorylation de STAT3 sur ses résidus tyrosine et sérine, nécessaire à son activation est PKR-dépendante (Deb et al., 2001b). PKR et STAT3 sont partenaires dans la régulation de l'autophagie (Shen et al., 2012).

b) Voie des MAP kinases (ERK, p38, JNK)

L'accumulation intracellulaire d'ARN double brin, notamment après transfection avec le poly (I : C) induit l'activation de p38 et JNK(Iordanov et al., 2000).

PKR et JNK sont activées dans des cultures cellulaires de neuroblastome humain SH-SY5Y traitées par la tunicamycine (qui induit un stress du reticulum endoplasmique), par le poly (I : C), ou soumises à un stress oxydatif. L'inhibition pharmacologique de PKR par le PRI diminue l'activation de JNK. PKR contrôlerait l'activation de JNK dans ces conditions.

c) Voie de l'insuline

PKR est activée au cours de maladies métaboliques, comme l'obésité, la résistance à l'insuline et le diabète de type 2. PKR fait le lien entre homéostasie du reticulum endoplasmique, régulation de la traduction protéique via eIF2α et réponse à l'insuline par l'intermédiaire d'IRS1 (InsulinReceptorSubstrate 1).

Les kinases PKR, JNK et IKKβ, associées à ISR1 et à eIF2α constituent un metaflammasome (metabolic inflammasome). PKR est au centre de ce métaflammasome, dont elle contrôle l'assemblage et la régulation et contribue majoritairement à la réponse inflammatoire dans les tissus métaboliques (Nakamura et al., 2010).

d) Voie du NF-κB

Le NF-κB correspond à une famille de facteurs de transcription qui contrôlent l'expression de gènes impliqués dans la réponse immune, la réponse inflammatoire, la différentiation cellulaire et l'apoptose (Ghosh et al., 1998).

PKR peut activer la voie du NF-κB en interagissant avec le complexe IKKβ (inhibitor of nuclear factor κB kinase subunit β) (Bonnet et al., 2000). Ce complexe permet de réguler l'activité transcriptionnelle du NF-κB en induisant sa translocation du cytoplasme vers le noyau de la cellule.

3. Apoptose (mort cellulaire programmée)

L'apoptose résulte d'un programme génétique intrinsèque conduisant à l'élimination de cellules endommagées. L'apoptose est impliquée, en conditions pathologiques, dans la physiopathologie des cancers, des maladies auto-immunes et des maladies neurodégénératives.

PKR est une kinase pro-apoptotique (Gil and Esteban, 2000a).

Plusieurs de ses effecteurs, eIF2α, NF-κB, PP2A et p53 sont des médiateurs de la mort cellulaire. Le gène codant pour le facteur de transcription p53 est inactivé dans la moitié des cancers chez l'homme. PKR peut phosphoryler p53 *in vitro* et *in vivo* et participer à son activation (Cuddihy et al., 1999). Des animaux « nude » (au système immunitaire déficient) ayant reçu un mutant inactif de PKR ont développé des tumeurs solides. PKR aurait implicitement une action anti-tumorale (Koromilas et al., 1992; Meurs et al., 1993).

Enfin, PKR interagit avec les caspases, des protéases initiatrices et effectrices de la mort cellulaire. PKR peut activer la caspase 8 via la protéine FADD (Fas-Associated protein with Death Domain). La caspase 8 induit ensuite la conversion de la pro-caspase 3 (forme inactive) en caspase 3 (forme active) et la formation de l'apoptosome (Balachandran et al., 1998; Gil and Esteban, 2000b).

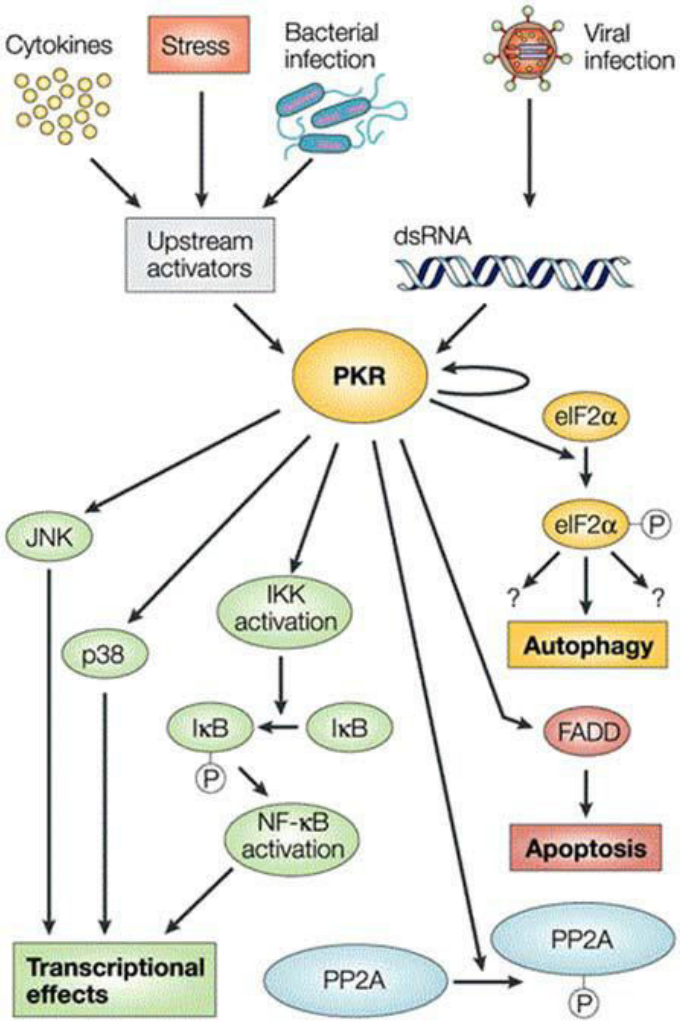


Figure 17 : Activateurs de PKR et principales cibles

(Kirkegaard et al., 2004)

PKR est aujourd'hui considérée comme une protéine de stress. Selon la nature de ce stress, elle exerce des effets contradictoires, tant bénéfiques que délétères à la survie cellulaire. PKR est ainsi impliquée dans la neurodégénérescence au cours de la maladie d'Alzheimer.

D. Rôle de PKR dans la maladie d'Alzheimer

PKR, sous sa forme active, est augmentée dans les cellules neuronales au cours de pathologies neurodégénératives telles que la maladie de Huntington et la maladie de Parkinson et en particulier au cours de la maladie d'Alzheimer (Hugon et al., 2009).

1. Chez l'homme

L'étude des cerveaux de patients atteints de la maladie d'Alzheimer a mis en évidence une augmentation de la phosphorylation d'eIF2α dans les neurones, associée à une augmentation de la phosphorylation de PKR (en immunohistochimie et western blotting). Les formes activées de PKR chez les patients Alzheimer sont principalement cytoplasmiques dans l'hippocampe et le cortex temporal, situées au niveau des neurites dystrophiques en périphérie des plaques séniles, et nucléaires dans le cortex frontal et pariétal. Dans le cortex temporal, PKR est colocalisée avec GSK3β et Tau (Bose et al., 2011; Chang et al., 2002a; Chang et al., 2002b). Il a été également montré que PACT, protéine activatrice de PKR, était augmentée dans les cerveaux de patients atteints de maladie d'Alzheimer et que son signal colocalisait avec le signal de phosphoPKR (Paquet et al., 2012).

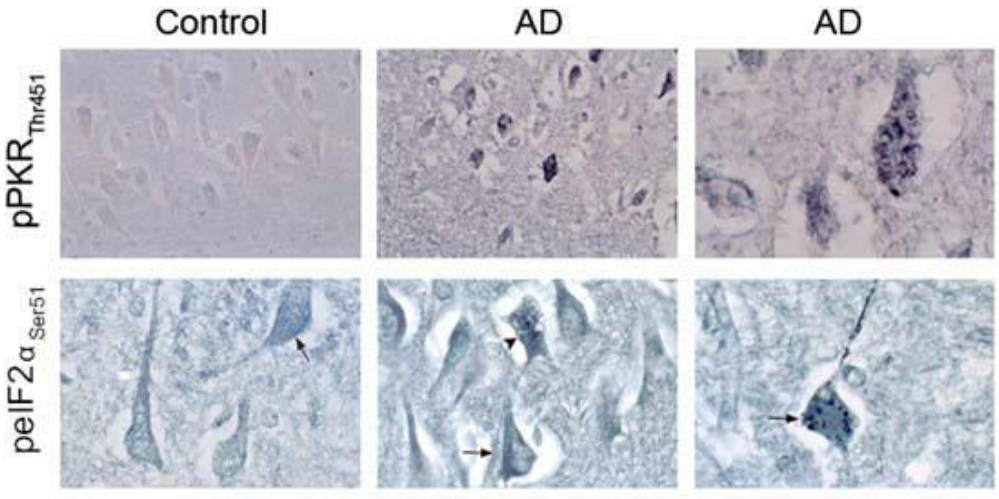


Figure 18 : Marquage de phospho-PKR et phospho-eIFα dansle cerveau de patients Alzheimer (AD) et contrôles *(Chang et al., 2002b)*

Chez les patients Alzheimer, le niveau d'activation de PKR est augmenté:

- dans les lymphocytes circulants (Paccalin et al., 2006).
- dans le LCR (Mouton-Liger et al., 2012b).

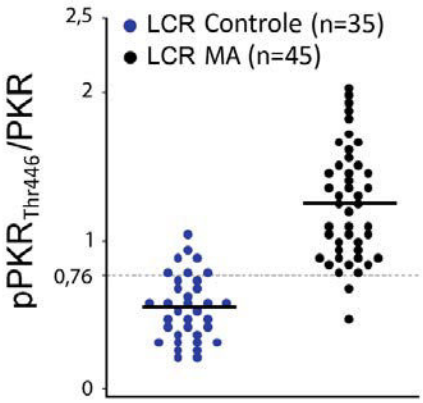


Figure 19 : Niveaux d'activation de PKR (forme phosphorylée/forme totale) mesurés en western blotting dans le LCR de patients Alzheimer (MA) et contrôles *(Mouton-Liger et al., 2012b)*

De plus, le niveau d'activation de PKR dans le LCR est corrélé au déclin cognitif : plus PKR est activée, plus le déclin est sévère (Dumurgier et al., 2013).

Ces résultats font de PKR un potentiel biomarqueur diagnostique et pronostique de la maladie d'Alzheimer.

2. In vivo

Les modèles murins transgéniques de maladie d'Alzheimer, type APPxPS1, caractérisés par une dégénérescence neuronale sévère des régions hippocampiques, présentent également une augmentation de la forme activée de PKR dans leur tissu cérébral (Page et al., 2006).

PKR serait impliquée dans le contrôle de la cognition. Les souris déficientes pour PKR présentent de meilleures performances mnésiques. L'étude électrophysiologique de leurs régions hippocampiques montre une augmentation de la LTP (long-lasting synapticpotentiation) (Zhu et al., 2011).

3. In vitro

Le traitement de cultures cellulaires de neuroblastome humain (SH-SY5Y) par le peptide Aβ42 induit l'activation de PKR et d'eIF2α ainsi que l'apoptose (Chang et al., 2002a).

Des cellules du même type exposées à un stress oxydatif présentent une augmentation de la phosphorylation d'eIF2α associée à une augmentation de l'expression de BACE1 et donc de la production d'Aβ (Mouton-Liger et al., 2012a).

L'inhibition de PKR dans ce modèle diminue la phosphorylation de Tau via l'inhibition de GSK3β (Bose et al., 2011)

En résumé, l'activation de PKR est retrouvée à tous les niveaux du processus dégénératif associé à la maladie d'Alzheimer : augmentation de la phosphorylation de Tau, de l'expression de BACE1 et de la production d'Aβ, neurotoxicité, déclin cognitif.

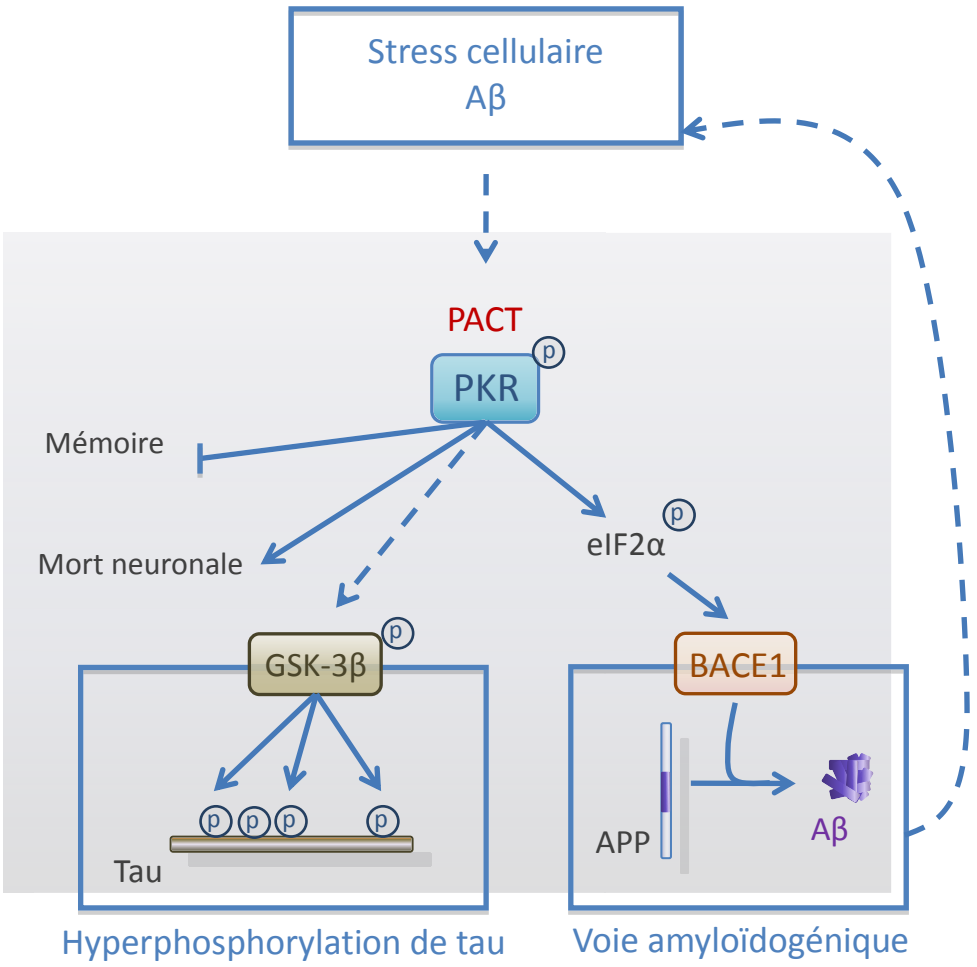


Figure 20: Voie de PKR dans la maladie d'Alzheimer

Objectifs

1- La question principale à laquelle nous avons voulu répondre dans ce travail de thèse est celle du rôle de PKR dans le transfert de l'inflammation périphérique au système nerveux central et dans la genèse des lésions moléculaires de la maladie d'Alzheimer.

Nous avons utilisé un modèle d'endotoxémie par injections périphériques de LPS chez des animaux invalidés pour PKR. Nous avons ensuite étudié chez ces animaux, en immunohistochimie, en biologie moléculaire et en imagerie fonctionnelle deux principales régions d'intérêt, le cortex et l'hippocampe et mesuré, en réponse au stress induit par le LPS, des marqueurs d'inflammation et de mort neuronale, la production de peptide β amyloïde et l'état de phosphorylation de Tau, et le métabolisme cérébral. Nous avons ensuite analysé l'effet de l'invalidation de PKR sur ces réactions, en comparant les résultats obtenus chez les animaux wild type à ceux obtenus chez les animaux déficients en PKR. Ces résultats font l'objet d'une publication en tant que premier auteur: « Neuroinflammation and Aβ accumulation linked to systemic inflammation are decreased by genetic PKR down-regulation ».

2- Nous avons également étudié en utilisant des méthodes similaires l'effet de l'inhibition de PKR sur l'amyloïdogénèse et la mort neuronale dans un deuxième modèle murin de neurodégénérescence par carence en thiamine. Ces résultats font l'objet d'une publication en tant que deuxième auteur (collaboration avec le Dr Mouton-Liger) : « PKR down-regulation prevents neurodegeneration and β-amyloid production in thiamine deficient model ».

Matériel et méthodes

I. Animaux

Plusieurs groupes de souris wild type (WT) C57Bl/6J et invalidés pour PKR (PKR-/-) ont été utilisés. Toutes les expériences ont concerné des animaux adultes mâles âgés de 3 mois. Les différents groupes d'animaux, de statut sanitaire EOPS (exempt d'organisme pathogène spécifique) ont été livrés à l'animalerie de l'Institut du Fer à Moulin une semaine avant chaque expérience et disposés dans une pièce réservée afin d'écarter tout stress supplémentaire éventuel. Ils ont été maintenus selon les normes en vigueur (décret n° 2001-486) : alimentation et hydratation standard ad libitum, cycle obscurité-lumière de 12h, température de 21°C.

A. Lignées

1. Animaux wild type

Il s'agit de mâles âgés de 3 mois issus de la lignée C57Bl/6J, fournis par le laboratoire Janvier.

2. Animaux PKR -/-

Il s'agit également de mâles âgés de 3 mois, issus de la lignée établie par le groupe du Pr Charles Weisman (Université de Zurich), sur fond génétique C57Bl/6J (modèle de Yang). Cette lignée nous a été donnée par le Dr RCC Chang, The University of Hong Kong, Li Ka ShingFaculty of Medicine, Department of Anatomy, Laboratory of Neurodegenerative Diseases. Son transfert vers la France a été financé par une bourse de 3500 euros offerte par l'Ambassade de France en Chine.La lignée est actuellement maintenue au CDTA d'Orléans (Département de Cryopréservation, Distribution, Typage et Archivage animal).

a) Modèles d'invalidation de PKR
(Figure 21)

Il existe deux différentes lignées de souris knock out (KO) pour PKR (PKR -/-). Les animaux homozygotes PKR -/- obtenus ont un phénotype identique à celui des animaux wild type de la même lignée. Leurs caractéristiques en termes de croissance, d'espérance de vie et de fertilité sont similaires. L'examen macroscopique et microscopique de leurs organes ne montre pas non plus de différence, notamment en ce qui concerne la tumorigénèse.

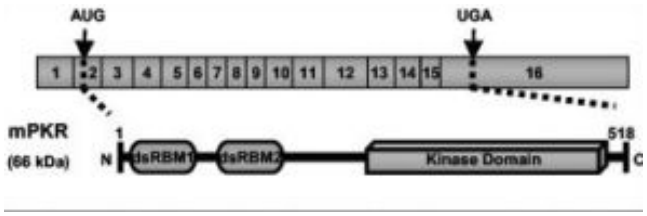
(1) Lignée 129/EvSv x C57BL/6J :N-PKR -/- (modèle de Yang)

Cette lignée, celle que nous avons utilisée, présente une invalidation des exons 2 et 3, correspondant au site de liaison à l'ARN double brin situé à l'extrémité N-terminale de PKR (Yang et al., 1995).Comme pour le modèle d'Abraham, cette lignée est incomplètement KO, car elle exprime une portion tronquée de PKR, de 45 kDa environ. Celle-ci n'est pas fonctionnelle cependant car elle ne fixe pas l'ARN double brin (Baltzis et al., 2002).

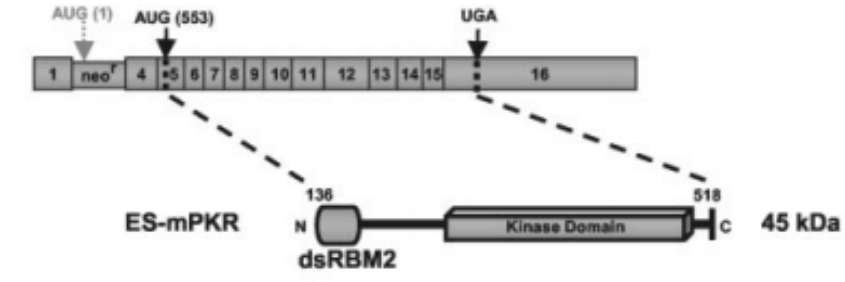
(2) Lignée 129/terSv x BALB/c :C-PKR -/- (modèle d'Abraham)

Cette lignée présente une invalidation de l'exon 12 correspondant au domaine catalytique C-terminal. Elle peut fixer l'ARN double brin mais a perdu son domaine d'activité kinase (Abraham et al., 1999).

A



B



C

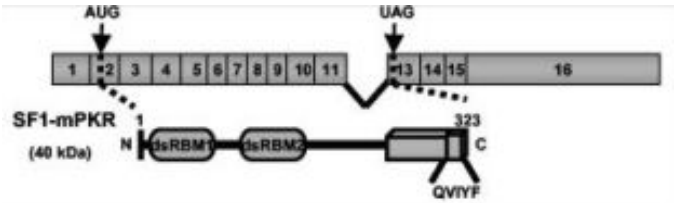


Figure 21: Représentation de l'invalidation de PKR dans les modèles KO (Baltzis et al., 2002)

***A** : PKR murine normale (mPKR), 66 kDa. **B** : N-PKR -/-. Le codon d'initiation AUG au niveau de l'exon 2 est interrompu par un gène de résistance à la néomycine. ES-mPKR (exon skipped mouse PKR) est la protéine PKR tronquée de 45 kDa obtenue. Elle ne contient plus qu'un des deux sites de liaison à l'ARN double brin. Son domaine kinase est intact. **C** : C-PKR -/-. Délétion ciblée de l'exon 12 par épissage alternatif. SF1-mPKR (spliced form 1 of PKR) est la protéine PKR tronquée de 40 kDa obtenue. Elle contient un double site de liaison à l'ARN intact mais son domaine kinase est inactif.*

B. Traitement des animaux par le LPS

Les animaux ont ensuite été traités une fois par jour pendant 3 jours par des injections intrapéritonéales (i.p) soit de sérum physiologique (chlorure de sodium 0.9%) soit par une solution contenant du lipopolysaccharide, LPS (Millipore) à la dose de 1mg/kg. Le LPS est une endotoxine bactérienne produite par les bactéries Gram négatif.



WT OU PKR$^{-/-}$
C756Bl/6J
Mâles âgés de 3 mois

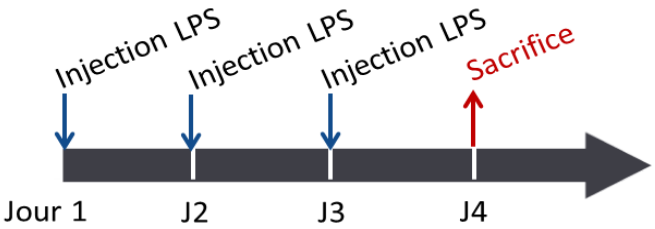


Figure 22: Protocole d'injection du LPS

Le poids des animaux a été contrôlé chaque jour avant traitement et avant sacrifice afin de vérifier l'effet toxique du LPS qui induit une réponse inflammatoire et un *sickness behaviour*.

Les animaux ont ensuite été sacrifiés à J4 soit par élongation soit par administration d'une dose létale de pentobarbital (100 mg/kg, voie i.p).

C. Induction de la carence en thiamine :

Les animaux ont reçu pendant 10 jours soit un régime normal, soit un régime carencé en thiamine (Safe) *ad libitum.* Ceux recevant le régime carencé en thiamine ont été également traités par des injections quotidiennes i.p. d'un inhibiteur de la thiamine pyrophosphokinase, le pyrithiamine hydrobromide. Les animaux recevant le régime normal ont été traités par des injections de salin. Un inhibiteur spécifique de l'activation de PKR, fourni par Sanofi® a été administré oralement à la dose de 30mg/kg/j chez certains animaux, à partir du jour précédant le début du régime.

D. Préparation des tissus

Après élongation, les animaux ont été décapités. Le cerveau a été rapidement disséqué sur la glace pour isoler les régions cérébrales d'intérêt, le cortex et l'hippocampe. Après isolation, ceux-ci ont été immédiatement congelés dans de l'azote liquide et maintenus à -80°C, jusqu'à leur utilisation.

Les animaux sous anesthésie profonde par injection i.p de pentobarbital ont été décapités après perfusion intra-cardiaque de chlorure de sodium 0.9%. Leurs hémisphères cérébraux ont été immédiatement prélevés sur la glace et fixés dans une solution de paraformaldéhyde (PFA) à 4% pendant 24 heures à 4°C, puis transférés dans du PBS sucrose 30% pendant 4 joursà 4°C et enfin congelés à -80°C dans un milieu de cryoconservation (Jung). Des coupes sagittales de cortex et d'hippocampe de 10µm ont été réalisées au cryostat puis transférées sur des lames Superfrost (Thermo Scientific) et conservées à -80°C jusqu'à leur utilisation.

Pour certains animaux sous anesthésie profonde par injection i.p de pentobarbital, d'autres prélèvements ont été réalisés :

- Prélèvement sanguin intracardiaque. Le sang a été collecté dans des tubes EDTA et centrifugé pendant 5 minutes à 10 000 G à température ambiante. Le plasma a ensuite été aliquoté dans des tubes de 50 µl et stocké à -20°C jusqu'à utilisation.
- Prélèvement de la rate
- Prélèvement du cortex et de l'hippocampe

  Ces tissus ont été immédiatement congelés dans de l'azote liquide et maintenus à -80°C, jusqu'à leur utilisation.

E. Imagerie fonctionnelle

(Collaboration avec le Dr Ravasi, plateforme IMPRT de l'Université de Lille 2)

Afin d'étudier in vivo les conséquences fonctionnelles de l'absence de PKR dans notre modèle de neuroinflammation, nous avons entrepris un projet d'imagerie du petit animal (MicroTEP) permettant d'étudier in vivo les phénomènes physiopathologiques. Cette étude nous a ainsi permis d'évaluer le métabolisme cérébral en réponse à une neuroinflammation induite par l'injection de LPS.

Dans un premier temps et après une période minimum de 6 heures de jeûne, les souris ont reçu 13 MBq de l'analogue du glucose fluoré ([18F[FDG) en administration intrapéritonéale. La biodistribution du radiotraceur a duré une heure dont les premières 45

minutes pendant lesquelles la souris était éveillée et les 15 minutes restantes sous anesthésie (Isoflurane à 2,5% et O2 1L/min). Par la suite, chaque animal a été imagé en PET pendant 15 minutes à partir d'une heure après l'injection du radiotraceur.La distribution du radiotraceur dans les différentes régions d'intérêt a été normalisée sur celle du cervelet de chaque souris et des valeurs moyennes ont été extraites par région anatomique et selon le groupe d'appartenance à l'étude.

II. Techniques

A. Immunoblot et ELISA

1. Extraction des protéines

Les échantillons de cortex, d'hippocampe ou de rate ont étélysés et homogénéisés dans le tampon de lyse RIPA (*radio immunoprecipitation assay*) (10 mMNaPi pH 7.8, 59 mMNaCl, 1% Triton, 0.5% DOC, 0.1% SDS et 10% de glycérol) auquel est ajouté extemporanément 0.1µM de calyculin A (inhibiteur des sérine/thréonine phosphatases, Cell Signaling), 1mM de Na3VO4 (inhibiteur de tyrosine phosphatase, Sigma Aldrich) et 1X d'un cocktail d'inhibiteur de protéase (Roche). Les échantillons ont ensuite été soniqués et centrifugés à 15000g pendant 10 min à 4°C. La concentration en protéines dans le surnageant a été déterminée grâce à la méthode de Bradford avec le kit *Micro BCA Protein Assay Reagent* (Thermo Scientific).

2. Immunoblot

Les protéines ont été dénaturées à 96°C pendant 5 minutes, dans du β-mercapto-éthanol et du bleu de charge 1X (150 g/L SDS, 0.3M Tris-HCl pH 6.8, 25% v/v glycérol, bleu de bromophénol). Les lysats protéiques (20 à 50µg) ont été déposés sur des gels de gradient 4%-15% Tris/Glycine polyacrylamide (Biorad) et séparés en fonction de leurs poids moléculaires à 200V pendant 30 minutes en tampon Tris/Glycine SDS (Biorad).

Les protéines ont ensuite été transférées sur membrane de nitrocellulose (0.45µm, Protran, Schleicher &Schuell) dans un tampon de transfert contenant 0.025M de Tris pH 8.5, 0.192M de Glycine et de l'éthanol 20% pendant 1h30 à 4°C. La migration des protéines transférées et la qualité du transfert ont été contrôlées par une coloration transitoire au rouge ponceau (Fluka) pendant 2 min. Afin de minimiser les interactions et liaisons aspécifiques des

anticorps, les membranes ont été bloquées pendant une heure à température ambiante dans une solution de TBS (*Tris-Buffered Saline*) contenant du lait écrémé dilué à 5% (Regilait).

Les membranes ont ensuite été incubées à 4°C sur la nuit, sous agitation modérée, dans une solution d'anticorps primaire dilué dans du TBS contenant 0,5% de lait écrémé. Les membranes ont été lavées en TBS Tween-20 avant l'incubation avec l'anticorps secondaire pendant 1 heure sous agitation modérée à température ambiante et en absence de lumière. Les membranes ont été révélées avec le système d'imagerie Odyssey (LI-COR biosciences). Les résultats obtenus ont été normalisés par rapport à la tubuline ou à l'actine puis quantifiés à l'aide du logiciel Multi Gauge v2.3 (Fujifilm).

3. ELISA

La quantification du niveau d'Aβ-42 au niveau du cortex et de l'hippocampe a été effectuée à partir d'un kit ELISA colorimétrique BetaMark (Covance) sur l'appareil ELISA (MWG-Biotech).

B. Immunofluorescence sur lames

L'immunohistochimie a été utilisée pour la détection de l'activation microgliale (immunomarquage par IBA1) à partir d'anticorps secondaire couplé à un fluorochrome. Un autre immunomarquage avec le DAPI a été réalisé pour permettre de localiser l'hippocampe au microscope.

Les lames ont été rincées 4 fois pendant 15 minutes dans du PBS gélatine à 0.2% et triton 25% (PBS Gel Tx) puis incubées avec un anticorps primaire dirigé contre IBA1 (Wako) dilué au 1:800 pendant la nuit à une température de 4°C. Le lendemain, les lames ont été rincées au PBS Gel Tx puis incubées avec un anticorps secondaire couplé à la Cyanine 3(Jackson Laboratory), dilué au 1:200. Les coupes ont été rincées au PBS Gel Tx avant d'être incubées avec un marqueur nucléaire : le DAPI (VECTASHIELD® Mounting Media, Vector). Les lames ont ensuite été montées et les coupes numérisées au moyen d'une plateforme d'imagerie cellulaire utilisant le logiciel MetaMorph (RopperScientific), permettant de visualiser l'activation microgliale. Celle-ci a été quantifiée à l'aide du logiciel Image J.

C. Quantitative RT-PCR

L'ARN total a été isolé dans le cortex et l'hippocampe des animaux grâce à une solution TRIzol (Invitrogen). La synthèse du premier brin d'ADNc a été réalisée à l'aide du kit Transcriptor First Strand cDNA Synthesis (Roche) avec une combinaison d'amorce aléatoire de type héxamère pour éviter les biais de rétrotranscription incomplète en 3', à partir d'1µg d'ARN total, en suivant les instructions du fabriquant. Les échantillons d'ADNc ont été amplifiés en utilisant le kit Real Time ready Assays (Roche) et le système LightCycler®96 (Roche). Chaque analyse comprenait des amorces spécifiques pour les gènes d'intérêt suivants : TNFα (tumor necrosis factor, alpha), IL1 β (interleukin 1 beta), BACE-1 (beta-site APP cleaving enzyme 1) et GAPDH (glyceraldehyde-3-phosphate deshydrogenase) ainsi qu'une banque de sondes type Universal Probe Library (UPL). Les séquences suivantes ont été utilisées : BACE1 [forward 5'-AAGCTGCCGTCAAGTCCAT-3' et reverse 5'-CTGCTCCCCTAGCCAAAAG-3'], IL-1β [forward 5′-TGAGCACCTTCTTTTCCTTCA-3' et reverse 5′-TTGTCTAATGGGAACGTCACAC-3'], TNFα [forward 5′-TCTTCTCATTCCTGCTTGTGG-3' et reverse 5′-GGTCTGGGCCATAGAACTGA-3'] et GAPDH [forward 5′-AGCTTGTCATCAACGGGAAG-3' et reverse 5′-TTTGATGTTAGTGGGGTCTCG-3']. Les étapes d'amplification de l'ADNc en PCRq, étaient les suivantes : dénaturation initiale 10s à 95°C, suivie de 45 cyles comprenant une étape de dénaturation de 10 s à 95° et une étape d'hybrydation-élongation de 30s à 60°C. Tous les dosages ont été tripliqués. Les niveaux relatifs et le nombre de copies de gènes ont été calculés (normalisation avec GAPDH) selon la méthode deltaCp.

III. Analyses statistiques

L'ensemble des données a été normalisé, moyenné sur Excel et analysé statistiquement à l'aide du logiciel Statview (Fujifilm) selon la méthode du test de Student. Les résultats obtenus à la suite de ces analyses sont considérés significatifs pour une valeur de $p< 0,05$.

Anticorps	Source	Dilution	Espèce
pPKRThr 451	Abcam	1 :100	Rabbit
pPKRThr 446	Abcam	1 :100	Rabbit
PKR	Santa Cruz	1 : 500	Rabbit
eIF2α	CellSignaling	1: 500	Rabbit
peIF2αSer 52	Invitrogen	1: 500	Rabbit
STAT3	CellSignaling	1 :1000	Rabbit
pSTAT3Tyr 705	CellSignaling	1 :1000	Rabbit
APP	CellSignaling	1 : 1000	Rabbit
BACE1	Sigma	1 : 1000	Rabbit
Aβ	Millipore	1 :500	Mouse
TAU 5	Millipore	1 :800	Mouse
pTau AT180	Thermo Scientific	1 :250	Mouse
pTau AT8	Thermo Scientific	1 :250	Mouse
GSK3β	CellSignaling	1 :500	Rabbit
pGSK3β Tyr216	BD Biosciences	1 :500	Mouse
p35 (C-19)	Santa Cruz	1 :250	Rabbit
IBA1	Wako	1 : 400	Rabbit
GFAP	Abcam	1 : 1000	Chicken
Actine	Sigma	1 :250	Rabbit
tubuline	Sigma	1 : 40000	Mouse

Figure 23: Liste des anticorps utilisés en western blot et en immunoflurorescence

Résultats

I. Travaux réalisés pendant la thèse

A. Article 1 : « Neuroinflammation and Aβ accumulation linked to systemic inflammation are decreased by genetic PKR down-regulation »

La maladie d'Alzheimer (MA) est la pathologie neurodégénérative entraînant une démence la plus fréquente. Elle touche plus de 3% des plus de 65 ans. Les lésions cérébrales qui la constituent sont les dépôts de substance β amyloïde (Aβ) et les dégénérescences neurofibrillaires responsables de la mort neuronale, en particulier dans le cortex et l'hippocampe. Ces lésions s'accompagnent d'une réaction inflammatoire centrale qui participe au processus de neurodégénérescence. Les modèles murins d'endotoxémie reproduisent une réaction inflammatoire du système nerveux central comme observé chez l'homme. Nous avons utilisé un modèle murin d'endotoxémie par injections périphériques de LPS et mis en évidence une activation microgliale, une augmentation de la production d'Aβ et de l'expression de BACE1 ainsi qu'une altération du métabolisme dans l'hippocampe des animaux en réponse au LPS. Ces réactions sont contrôlées par la kinase de stress PKR (double-stranded RNA-dependant protein kinase) dont l'invalidation exerce *in vivo* un effet neuroprotecteur. La production d'Aβ serait régulée dans ce modèle par l'activation PKR-dépendante du facteur de transcription STAT3, responsable du contrôle transcriptionnel de BACE1. L'activation de PKR a été retrouvée à plusieurs niveaux du processus dégénératif associé à la MA et a été identifiée comme un potentiel biomarqueur diagnostique et pronostique de la maladie. Nos résultats confirment le rôle de PKR dans la pathogénèse de la MA et l'intérêt de l'inhibition de PKR pour la recherche thérapeutique. *(voir article soumis pages suivantes)*

NEUROINFLAMMATION AND Aβ ACCUMULATION LINKED TO SYSTEMIC INFLAMMATION ARE DECREASED BY GENETIC PKR DOWN-REGULATION

Anne-Sophie Carret-Rebillat[1], Clarisse Pace[1], Sarah Gourmaud[1], Laura Ravasi[2], Samantha Montagne-Stora[1], Sophie Longueville[3], Erika Sudol[1], Raymond Chuen-Chung Chang[4], Claire Paquet[1,5], François Mouton-Liger[1#], Jacques Hugon[1,5#].

Inserm UMR-S942, Lariboisiere Hospital, Paris, France [1]

In vivo preclinical imaging facility, IFR 114 - University of Lille, Nord of France, CHU Lille, France [2]

Inserm UMR-S839 Institut du Fer a Moulin, Paris, France [3]

Laboratory of Neurodegenerative Diseases, Department of Anatomy, LKS Faculty of Medicine, The University of Hong Kong, Pokfulam, Hong Kong SAR [4]

Memory Center, and Department of Histology, Lariboisiere Hospital, University of Paris Diderot, AP-HP, Paris, France [5]

[#] Authors contribute equally to this work

Abstract 200 words

ABSTRACT

Alzheimer's disease (AD) is a neurodegenerative disorder neuropathologically marked by senile plaques composed of amyloid-β (Aβ) peptide, neurofibrillary tangles, neuronal loss and neuroinflammation. Previous works have suggested that systemic inflammation could contribute to neuroinflammation and enhanced Aβ cerebral concentrations. The molecular pathways leading to these events are not fully understood but the release of cytokines such as TNFα could take part in neuroinflammation. PKR is a pro-apoptotic kinase that can trigger inflammation and accumulates in the brain and cerebrospinal fluid of AD patients. The goal of the present study was to assess if neuroinflammation and increased Aβ levels produced by systemic inflammation linked to peripheral administration of lipopolysaccharide (LPS), could be modified in $PKR^{-/-}$ transgenic mice. The results show that in $PKR^{-/-}$ hippocampus, neuroinflammation and Aβ concentrations are significantly reduced as compared to wild-type. Moreover, BACE1 and activated STAT3, previously described as a transcriptional regulator of BACE1, were decreased in $PKR^{-/-}$ brain. Hippocampal metabolism was rather similar in $PKR^{-/-}$ mice under saline or LPS treatment as opposed to a significant decrease in LPS-wild-type compared to controls. Altogether, these findings suggest that PKR could be a valid pharmacological target to attenuate a group of AD specific abnormal molecular pathways in patients.

INTRODUCTION

Alzheimer's disease (AD) is a neurodegenerative disorder marked by memory disturbances progressively associated with aphasia, apraxia, agnosia and behavioral symptoms. Currently, there is no cure for the disease and symptomatic treatment includes choline esterase inhibitors and glutamate antagonists. AD is neuropathologically characterized by senile plaques made of the accumulation of Aβ-peptides, neurofibrillary tangles formed by hyperphosphorylated tau protein, synaptic and neuronal losses and neuroinflammation including the presence of activated microglia[1]. The cause of the disease is not known but according to the amyloid cascade hypothesis, the toxicity of Aβ or Aβ oligomers could lead to detrimental consequences for neurons and to neuroinflammation[2].

Brain inflammation is a key component of the pathological lesions detected in the brain of patients suffering from AD[3, 4]. Astrocytic and microglial cell reactions are often detected surrounding senile plaques. It has been postulated that neuroinflammation could exacerbate brain lesions leading to synaptic dysfunctions and neuronal degeneration. The Aβ-peptide can trigger microglial cell activation inducing the release of the pro-inflammatory cytokines such as TNFα or IL1-β[5].

Recent works have suggested that systemic inflammation could exacerbate or even drive neuronal dysfunction associated with dementia and that the kinases PKR and JNK could play a role in these molecular events[6]. Common molecular pathways linking Diabetes Mellitus and AD were recently proposed: mild systemic inflammation could trigger abnormal consequences in the brain including impaired neuronal insulin signalling, synapse degradation and memory disturbances associated with the release of TNFα and IL1-β. Systemic inflammation is also known to modify microglial phenotypes and systemic manipulations of inflammation can improve the disease status by negatively alter this

progression[7]. This hypothesis stimulated our interest in determining if pro-inflammatory factors such as the ubiquitous kinase PKR, acting peripherally and in the brain, could contribute to abnormal molecular signals leading to increased neuroinflammation and AD brain lesions during systemic inflammation.

PKR is a pro-apoptotic kinase that controls the initial step of protein translation through the phosphorylation of the eukaryotic initiation factor 2 alpha (eIF2α)[8]. PKR is involved in several cellular pathways including innate immunity and defence against viruses. PKR also modulates the synthesis of pro-inflammatory factors via the activation of the NF-κB (nuclear factor κ light-chain-enhancer of activated B cells) pathway after direct interaction with IKKβ (inhibitor of nuclear factor kappa-B kinase subunit beta)[9]. PKR is also involved in the control of the inflammasome and HMGB1 (high-mobility group protein B1) release[10]. This kinase is highly expressed in degenerative neurons in AD brains and can be activated in primary neuronal cultures by Aβ[11, 12]. In addition the levels of phosphorylated PKR are highly increased in the cerebrospinal fluid (CSF) of patients suffering from AD or Mild Cognitive Impairment[13] and can correlate with the cognitive decline in AD patients[14].

Since PKR is elevated in AD CSF and brains and can modulate neuroinflammatory signals, we sought to determine if PKR could control brain inflammation and Aβ accumulation after systemic LPS administration in wild-type (WT) mice and $PKR^{-/-}$ mice. Previous studies reported neuroinflammation induction and Aβ-increase after systemic LPS administration[15]. By use of this experimental model, we further investigated whether PKR played a role in triggering the molecular pathways leading to these pathological processes. The results show that PKR genetic down-regulation reduces neuroinflammation and Aβ accumulation.

RESULTS

Systemic injection of LPS induces brain PKR phosphorylation

To assess the consequences of repeated LPS injections on PKR activation, we first performed immunofluorescence analyses of pPKR staining in sagittal slices of WT mice brain exposed to saline or LPS. In WT mice treated with saline solution, we observed a weak cytoplasmic $pPKR_{Thr446}$ staining in hippocampus and cortex (Figure 1A-B). Repeated injections of LPS lead to a dramatic increase of number of $pPKR_{Thr446}$ positive cells (Figure 1C) in both hippocampus and cortex of WT mice. We found a similar increase in hippocampus by evaluating with imageJ software the intensity of staining (Figure 1D). To evaluate the potential pro-apoptotic effects of PKR in this neuroinflammatory model, we have measured by immunoblotting the cleavage by caspase-3 of the nuclear enzyme poly ADP-ribose polymerase (PARP). LPS-induced PKR activation did not lead to a cleavage of PARP protein (Supplementary Figure 1).

PKR down-regulation prevents hippocampal LPS-induced microglial activation and cytokines production

Microglia and astrocytes are known to be major sources of neuro-inflammation and are strongly activated by intra-peritoneal LPS injection. Our immunohistofluorescence using a specific marker of microglial cells activation, IBA1 (Ionized calcium-binding adaptor molecule 1) confirmed this finding (Figure 2A). Quantified immunofluorescence analyses of IBA1 positive microglia in the hippocampus, using ImageJ software, revealed a 64% increase of the staining intensity in LPS-treated mice compared to untreated mice (Figure 2B). Next, we sought to understand the role of activated PKR in neuroinflammation by injecting LPS in PKR knock-down mice ($PKR^{-/-}$). $PKR^{-/-}$ mice did not express the functional 69 kDa protein but only

at very low level a truncated product of translation (42 kDa) of PKR mRNA devoid of exons 2 and 3 (Supplementary Figure 2).

Analyses of IBA1 staining in hippocampus of LPS-treated $PKR^{-/-}$ mice revealed a significant decrease of microglial activation (-43%) compared to LPS-treated WT mice (Figure 2B). Similar variations were found on astrocytes activation, quantified by enumerating GFAP (glial fibrillary acidic protein) -positive cells in hippocampus (Supplementary Figure 2). Finally, we assessed hippocampal cytokine TNF-α mRNA level by quantitative real time PCR. As expected, the mRNAs level of TNF-α is dramatically increased in LPS-treated mice (+890%). In $PKR^{-/-}$ mice, LPS-induced TNF-α appears less overexpressed (+99%) (Figure 2C). We also found similar protective effect of PKR down regulation with other cytokines, such as IL-1β (not shown).

BACE1 upregulation and Aβ production induced by intra-peritoneal LPS injection is reversed in $PKR^{-/-}$ mice.

Intraperitoneal LPS administration is known to induce a brain Aβ accumulation in WT mice. To confirm this previous observation in our specific model of repeated LPS injection, we first assessed hippocampal APP processing by immunoblotting analyses of mature BACE1 (Figure 3A-B) and APP proteins (Figure 3A and C) and then by evaluating soluble Aβ level with a specific Elisa assay (Figure 3D). Our results are consistent with observations obtained in other LPS models, with a significant increase of mature BACE1 protein level (+58%) and Aβ production (+184%). By contrast, there were no changes in APP protein. To test whether upregulation of BACE1 levels by neuroinflammation occurs only at a translational level, we measured mRNA levels of BACE1 by real-time quantitative PCR. Levels of BACE1 messages from LPS-treated WT mice were 1.8 fold higher than those of untreated-WT mice (Figure 3E).

Interestingly, LPS-treated $PKR^{-/-}$ mice exhibit significantly reduced levels of soluble Aβ and of BACE1 mRNA and protein compared to LPS-treated WT.

As PKR activation could also trigger tau phosphorylation in stress conditions through glycogen synthase kinase -3β (GSK3-β) phosphorylation on tyrosine 216 (pGSK3-β), we performed immunoblot analysis of pGSK3-β, GSK3-β total protein, tau total protein and phosphorylated tau on different sites, such as AT180 (supplementary Figure 4A). Our results reveal a significant increase of pGSK3-β/GSK3-β ratios (+34%) (Supplementary Figure 4B) which is not associated with an increase of tau phosphorylation on AT180 (supplementary Figure 4C), AT8 or AT270 (not shown).

Increase of activated STAT3 level by systemic LPS administration is PKR dependent

Previous *in vitro* researches have shown that stress-induced eIF2α phosphorylation at serine 52 by PKR could increase BACE1 translation and lead to Aβ over-production. Immunoblotting for phosphorylated eIF2α (peIF2α) and eIF2α total protein (Figure 4A) enabled the assessment of the role of the eIF2α activation in LPS-induced amyloidogenic signaling. It showed that $peIF2\alpha_{Ser52}$/ eIF2α ratio is not affected by systemic LPS administration (Figure 4B), suggesting an alternative PKR-dependent pathway for BACE1 upregulation. Activation of the transcription factor STAT3 by phosphorylation on tyrosine 705 is able to regulate BACE1 expression in neurons. Immunoblot analysis of $pSTAT3_{Tyr705}$/ STAT3 ratio revealed a statistically significant increase (+43%) in LPS-treated WT mice versus saline-injected mice (Figure 4C). It is worth noting that such increase was no longer observed after PKR down regulation.

PKR inhibition prevents hippocampal hypometabolism after LPS systemic challenge.

Motion matrix from the CT to the MR was applied to the PET scan (automatically coregistered to the CT scan) (Figure 5A). Volumes of interest were retreived on the PET scan (Figure 5B) and semi-quantification of regional radiotracer uptake, expressed as a percentage of Injected Dose/g, was normalised to the cerebellar uptake. An average was calculated and the region was then considered as striata. The regional tracer uptake normalized the cerebellar one, was averaged among the mice within each group. We reported in Figure 5 the impairment of metabolism in a subregion of the hippocampus, the Ammon's horn.

In this specific region, the LPS-WT animals had a statistically significant metabolic drop when compared to the controls. However, in the $PKR^{-/-}$ mice, the metabolism of the Ammon's horn did not differ whether the mice were under LPS treatment or not (Figure 5C).

DISCUSSION

Our results show that systemic inflammation produced by LPS administration can induce neuroinflammation and increased brain Aβ production in wild-type mice. In addition, the genetic invalidation of the kinase PKR in $PKR^{-/-}$ mice leads to the reduction of neuroinflammation and Aβ accumulation in these mice treated with systemic LPS. Although in this model phosphorylated tau was not modified in LPS treated mice as compared to non-treated mice, activated GSK3β, and activated STAT3 were increased in LPS treated mice. PKR down regulation has prevented the increased brain levels of these enzymes in LPS injected mice. Several questions are to be addressed.

Firstly, is there a modification of peripheral inflammation in $PKR^{-/-}$ mice underpinning the reduction of neuroinflammation detected in $PKR^{-/-}$ mice treated with repeated LPS administration? An answer may be found by further assessing mRNA levels of TNF-α or other cytokines (IL-1β, IL-6…) in the spleen or liver of wild-type and $PKR^{-/-}$ injected animals.

A second question is how can PKR control brain inflammation? Previous studies have shown that LPS injection induces the activation of the innate immune system with production of blood cytokines such as TNF-α and IL-1β that are able to enter the brain in regions with weak blood brain barrier or by active transport through the endothelium among several mechanisms[16]. Consequently, cytokines can activate microglial cells that can also release local cytokines and can induce a spreading of neuroinflammation. PKR has been shown to participate in the production of inflammatory signals either by directly activating IKKβ and the NF-κB signaling[17] or by partially controlling the inflammasome[18]. In our study, TNFα is decreased in injected $PKR^{-/-}$ brain as compared to WT mice suggesting that the invalidation of PKR has reduced the ability of microglial cells to synthesize inflammatory cytokines and

transfer neuro-inflammatory signals. This effect is also revealed in the hippocampus by the reduction of activated microglial cells in LPS-injected PKR$^{-/-}$ mice as compared to LPS-injected WT mice. The result showing that brain PKR is activated in LPS-injected WT mice as compared to control mice validate this model of neuroinflammation and strengthen the putative role of PKR signaling in the control of cytokines release and microglial activation.

An additional question is how PKR can control Aβ production in this model? Previous reports have revealed that systemic LPS administration can increase Aβ levels in the brain of injected mice[19, 20]. Our results have confirmed these results in wild-type mice but have also found that PKR genetic invalidation partially prevented brain Aβ accumulation in PKR$^{-/-}$mice. It is not known if this event is linked to increased Aβ production or reduced Aβ degradation but Aβ accumulation is associated with a clear modification of BACE1 protein levels that could lead to increased Aβ production. There are at least two mechanisms that could link BACE1 and PKR activation. The first one is associated with the peculiar upstream open reading frame of BACE1, which leads to an increased mRNA expression under the control of eIF2α[21, 22]. Surprisingly, 24 hours after the last LPS administration, eIF2α phosphorylation was not found augmented in WT mice whereas phosphorylated PKR was increased. This could be due to the specific activation of eIF2α phosphatases one day after the last LPS injection. As opposed to what previous authors have observed, a recent paper has shown that inhibition of eIF2α phosphorylation did not alter BACE1 levels and Aβ production in neuronal cultures or in transgenic mice[23]. This finding argues in favor of a PKR-dependent and eIF2α-independent mechanism controlling BACE1 levels in neurons. The second mechanism is associated with the control of BACE1 mRNA synthesis by STAT3[24]. Our results have revealed that brain activated STAT3 levels are increased in LPS-injected wild-type mice and not in LPS-injected PKR$^{-/-}$ mice. A previous data has shown that PKR can control the activation of STAT3

and the triggering of the PKR/STAT3/BACE1 pathway could also explain the features of Aβ accumulation in LPS-treated wild-type and $PKR^{-/-}$ mice. Further studies will have to analyze the process of Aβ degradation in this model as well as the putative involvement of γ-secretase in Aβ accumulation.

A last question is why phosphorylated tau is not modified in the brain of LPS-injected mice. A previous study has shown that LPS administration in 3xTg AD mice exacerbates tau phosphorylation at the AT8 antibody site[25]. In our study although we observed a pGSK3-β increase in LPS-treated mice which was not associated with increased tau phosphorylation at the AT8 site. As already described for eIF2α phosphorylation, one can suggest that specific phosphatases are activated 24 h after the LPS administration and further studies will be needed to determine the time course of brain tau phosphorylation and dephosphorylation in this model. The process of tau phosphorylation could also differ in the brains of wild-type mice and transgenic mice after LPS injection.

Our [^{18}F]FDG-microPET study revealed that LPS injection in wild-type mice decreases metabolism in the hippocampus (Amon's Horn) but this effect was not seen in LPS-injected $PKR^{-/-}$ mice. It has been shown previously that sepsis can induce neuroinflammation and a reduction of cerebral metabolism in experimental animals[26]. The authors have demonstrated that in LPS-treated rats, cerebral glucose uptake was reduced in cortical areas and not in the hippocampus but animals received a single LPS injection. The fact that PKR genetic down regulation prevents the modification of neuronal metabolism could be due to the reduced brain neuroinflammation, to the reduction of the observed Aβ accumulation or to the inhibition of pro-apoptotic pathway associated with PKR activation[27] although cleaved PARP levels, indicative of caspase 3 activation, were not modified in LPS-injected wild-type mice.

There are some limitations in our study. All the assessments were performed only at a single time point, 24 hours after the last LPS injection. Further studies will have to decipher if a recovery phase is observed one or two weeks after the induced systemic inflammation either concerning neuroinflammation or Aβ accumulation. Since LPS induces a sickness syndrome, it is difficult to properly assess behavioral disturbances at the time point of our study but cognitive tests could be performed in the future during the recovery phase after LPS administration. Finally the use of new and specific PKR inhibitors in the future will be needed to determine if these results can be reproduced using a pharmacological approach.

Previous studies have shown that systemic infections can exacerbate the evolution of AD patients[28, 29]. In this experimental study, we have shown that systemic inflammation can lead to brain PKR activation and Aβ accumulation. In addition, phosphorylated PKR is increased in the brains and CSF of AD or mild cognitive impairment (MCI)-due to AD patients and CSF PKR levels could correlate with cognitive decline. The reason for increased levels of PKR in AD brain is not known but could be associated with cytokine release or Aβ toxicity and also could be exacerbated by systemic infections or inflammation. An earlier data has revealed that PKR activation could negatively control memory formation in experimental animals[30].

All these findings argue for an early neuroinflammatory process in AD which could be secondarily driven by systemic inflammation and underline the fact that PKR could be a valid new therapeutic target to reduce neuroinflammation and AD brain lesions, to afford neuroprotection and improve memory in affected individuals[31].

METHODS

Animals

C57BL/6J wild type (WT) and PKR knockout ($PKR^{-/-}$) mice (male, 10 weeks old) were used for all experiments. WT mice were purchased from Janvier (Le Genest St Isle, France).

$PKR^{-/-}$ mice, generated by disruption of exons 2 and 3 of the PKR gene[32] were provided by Dr RCC Chang, The University of Hong Kong, Li Ka Shing Faculty of Medicine, Department of Anatomy, Laboratory of Neurodegenerative Diseases.

All mice were held in a temperature-controlled room under a 12 hours light/dark cycle and had access to food and water *ad libitum*. Animal experiments were performed in accordance with the guidelines of the French Agriculture, Food and Forestry Ministry for handling animals (decree 87849, license A75-05-22).

Mice received daily intraperitoneal (i.p) injections of either saline or LPS from *Escherichia coli* 0111:B4 (Millipore, Molsheim, France), 1 mg/kg for 3 days. Twenty-four hours after the last injection, 20 mice were taken to the *in vivo* imaging facility whereas all others were deeply anesthetized with a lethal dose of pentobarbital and intracardially perfused with cold PBS. Brains were then collected in ice, dissected and fixed in 4% paraformaldehyde for immunohistochemistry or immediately frozen in liquid nitrogen for immunoblotting, ELISA or quantitative RT-PCR.

Immunoblotting and ELISA

Cortex and hippocampus were homogenized and sonicated in a radioimmunoprecipitation assay buffer (RIPA buffer) containing 10 mM NaPi pH 7.8, 59 mM NaCl, 1% Triton, 0.5% DOC, 0.1% SDS, 10% glycerol and extemporaneous addition of protease inhibitor cocktail (Roche, Penzberg, Germany), 1 mM Na3VO4 and 0.1 µM calyculin A (Sigma, St Louis, MO) as

phosphatase inhibitors. Tissues were then centrifuged at 15 000 g for 10 minutes and protein concentration is determined with Micro BCA Protein Assay Reagent Kit (Thermo scientific, Cergy-Pontoise, France) using manufacturer's protocol.

For immunoblotting, after denaturation (96°C, 5 minutes, in β-mercaptoethanol with 150 g/L SDS, 0.3M Tris-HCl pH 6.8, 25% glycerol and bromophenol blue), protein samples (25 to 50 µg) were separated on Tris-glycine polyacrylamide gels (Bio-Rad, Nanterre, France) and transferred onto nitrocellulose membranes (GE Healthcare, Chalfont St. Giles, UK) in 25 mM Tris pH 8.3, 200 mM glycine and 20% ethanol. Membranes were incubated 30 minutes in blocking buffer (1 X TBS with 5% milk), and then overnight at 4°C with primary antibodies. Rabbit anti-BACE1 (Santa Cruz, Danvers, MA, USA), rabbit anti-APP (Cell Signaling, Beverly, MA, USA), mouse anti-phosphorylated $GSK3\beta_{Tyr216}$ ($pGSK3\beta_{Tyr216}$) (BD Transduction Laboratories, San Jose, CA, USA), mouse anti-GSK3β (Cell Signaling), mouse AT180 (Thr231/Ser235) (Thermo Scientific), mouse anti-Tau (Thermo Scientific), rabbit anti-$pSTAT3_{Tyr705}$ (Cell Signaling), rabbit anti-STAT3 (Cell Signaling), rabbit anti-actin (Sigma, St. Louis, MO) and mouse anti-tubulin (Santa Cruz) were used as primary antibodies. IR Dye 700DX conjugated anti-mouse IgG and IR Dye 800CW conjugated anti-rabbit IgG (Rockland Immunochemical Inc., Gilbertsville, PA, USA) were used as secondary antibodies. Protein bands were revealed by use of the Odyssey imaging system (Li-Cor Biosciences, Lincoln, NE, USA) and quantified with the Multigauge software (Fuji-film, Tokyo, Japan).

$A\beta_{1-42}$ levels were quantified using a mouse colorimetric $A\beta_{1-42}$ ELISA kit (Covance Inc., Princeton, NJ, USA) following the manufacturer's instructions. Optical absorbance was detected using a 96 well plate reader at 450 nm. Aβ levels were calculated from a standard curve.

Immunohistofluorescence

After fixation in 4% paraformaldehyde, brains were incubated in 30% sucrose, frozen in Jung tissue medium (Leica, Nanterre, France) and sectioned using a cryostat. Sagittal sections (10 µm) were washed in PBS with 0.25% gelatin and 25% Triton and incubated at 4°C for 24 h with rabbit anti-ionized binding molecule adaptor 1 (Iba1) (Wako, Osaka, Japan) and rabbit anti-$pPKR_{Thr446}$ (Abcam, Cambridge, UK) and at room temperature for 2h with secondary antibodies donkey anti-rabbit Cy3 (Jackson Laboratory, Bar Harbor, Maine, USA). Standard epifluorescence images were acquired on a Leica DMRD microscope using a high resolution camera (Coolsnap HQ). The Metamorph software (Roper Scientific, Sarasota, FL, USA) was used for image acquisition. All quantitative image analyses were performed by using NIH ImageJ software, as previously described[33]. Quantification was limited to the areas corresponding to the cortex and hippocampus. DAPI and the cyanine 3 pictures were both background corrected using the rolling ball method. A threshold was then chosen using the 'Auto threshold' function of ImageJ. Cells were subsequently evaluated by defining a region of interest and by running the 'Analyze particles' imageJ function. Afterward, quantification of positive cells was performed using the Colocalization plug-in.

Quantitative RT-PCR

Total RNA was isolated using TRIzol reagent (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) from cortex and hippocampus. Transcriptor First Strand cDNA Synthesis kit (Roche) with a combination of random hexamers and oligo(dT) priming to avoid 3'-bias in the cDNAs was used to synthesize the first strand cDNA from samples with an equal amount of total RNA (1µg), according to the manufacturer's instructions. cDNA samples were forwarded to amplification with Real

Time ready Assays (Roche) using LightCycler®96 Instrument (Roche). Each assay included gene specific primers for TNFα (tumor necrosis factor, alpha), IL1 β (interleukin 1-beta), BACE-1 (beta-site APP cleaving enzyme 1) and GAPDH (glyceraldehydes-3-phosphate dehydrogenase) and a Universal ProbeLibrary (UPL) Probe, which was a short FAM-labeled (6-carboxyfluorescein) hydrolysis probe containing locked nucleic acid (LNA) (Roche).. Mus Musculus BACE1 primers [forward 5'-AAGCTGCCGTCAAGTCCAT-3' and reverse 5'-CTGCTCCCCTAGCCAAAAG-3'], IL-1β primers [forward 5'-TGAGCACCTTCTTTTCCTTCA-3' and reverse 5'-TTGTCTAATGGGAACGTCACAC-3'], TNFα primers [forward 5'-TCTTCTCATTCCTGCTTGTGG-3' and reverse 5'-GGTCTGGGCCATAGAACTGA-3'] and GAPDH primers [forward 5'-AGCTTGTCATCAACGGGAAG-3' and reverse 5'-TTTGATGTTAGTGGGGTCTCG-3'] were used. cDNA amplification was carried out as follows: denaturation at 95°C for 10 seconds, followed by 45 cycles of denaturation at 95°C for 10 seconds and primer annealing-extension step at 60°C for 30 seconds, ending with a cooling step at 37°C for 30 seconds. All assays were performed in triplicates. Relative levels and gene copy numbers were calculated (normalized to GAPDH) using the previously described deltaCp method[17].

[^{18}F]FDG *in vivo* imaging

Eleven C57BL/6J wild type (WT) and nine PKR knockout (PKR$^{-/-}$) mice were taken to imaging facility the night before imaging and kept at room temperature with free access to food and water up to 6 hours prior to radiotracer injection when food was no longer accessible. Positron emission tomography scans were performed in a microPET (Inveon, Siemens). A bolus injection of [^{18}F]FDG (13+/-1.5 MBq; 150 µl in volume) was administered intraperitoneally while the animal was conscious. After injection, the mouse was returned to its cage to allow for biodistribution for approximately 45 min. Then, the mouse was

anesthetized with isoflurane (5% for induction and 1,5% for maintenance in 100% O_2 at a flow rate of 1 L/min) using a nose cone and placed in a prone position on the platform of the scanner. With the help of a laser alignment device attached to the scanner, the mouse was positioned so that the center of the field corresponded to the brain. A CT scan (80KV and 500 mA) was run right before the mouse moved into the PET field of view. PET scanning was initiated at 60 min after radiotracer injection. Total scanning duration was 15 min. For co-registration purposes, a 7T T2-weighted magnetic resonance imaging C57BL/6J brain scan was used to improve cerebral regional delineation on brain PET imaging. Data from the scanner were formatted into 3 frames, 2D-OSEM reconstructed and corrected for scatter and attenuation. Counts detected by the scanner were converted into MBq/mL by use of Inveon Research Workflow (IRW version 3.0, Siemens). This software enables multimodality imaging coregistration and allows manual drawing of volumes of interest (VoIs). MR spatial resolution allows a rather precise identification of several cerebral regions so we drew on the hippocampus on both hemispheres, as shown on the figure 5b. A background VoI was also drawn outside the mouse body. MR whole brain scan was manually coregistered to the CT-scan.

Statistical Analysis

All experiments were performed independently at least three times. All data were normalized and analyzed using the StatView software (Fuji-film). The paired sign test or Student's *t*-test was used to compare the experimental and control groups. Results were considered significant for a value of $p<0.05$ using the student test.

REFERENCES

1. Duyckaerts C, Delatour B, Potier MC. Classification and basic pathology of Alzheimer disease. *Acta Neuropathol* **118**, 5-36 (2009).

2. Hardy J, Selkoe DJ. The amyloid hypothesis of Alzheimer's disease: progress and problems on the road to therapeutics. *Science* **297**, 353-356 (2002).

3. McGeer EG, McGeer PL. Neuroinflammation in Alzheimer's disease and mild cognitive impairment: a field in its infancy. *J Alzheimers Dis* **19**, 355-361 (2010).

4. Zotova E, Nicoll JA, Kalaria R, Holmes C, Boche D. Inflammation in Alzheimer's disease: relevance to pathogenesis and therapy. *Alzheimers Res Ther* **2**, 1 (2010).

5. Khandelwal PJ, Herman AM, Moussa CE. Inflammation in the early stages of neurodegenerative pathology. *J Neuroimmunol* **238**, 1-11 (2011).

6. De Felice FG, Ferreira ST. Inflammation, defective insulin signaling, and mitochondrial dysfunction as common molecular denominators connecting type 2 diabetes to Alzheimer disease. *Diabetes* **63**, 2262-2272 (2014).

7. Perry VH, Nicoll JA, Holmes C. Microglia in neurodegenerative disease. *Nat Rev Neurol* **6**, 193-201 (2010).

8. Marchal JA*, et al.* The impact of PKR activation: from neurodegeneration to cancer. *FASEB J* **28**, 1965-1974 (2014).

9. Bonnet MC, Weil R, Dam E, Hovanessian AG, Meurs EF. PKR stimulates NF-kappaB irrespective of its kinase function by interacting with the IkappaB kinase complex. *Mol Cell Biol* **20**, 4532-4542 (2000).

10. Lu B*, et al.* Novel role of PKR in inflammasome activation and HMGB1 release. *Nature* **488**, 670-674 (2012).

11. Chang RC, Suen KC, Ma CH, Elyaman W, Ng HK, Hugon J. Involvement of double-stranded RNA-dependent protein kinase and phosphorylation of eukaryotic initiation factor-2alpha in neuronal degeneration. *J Neurochem* **83**, 1215-1225 (2002).

12. Chang RC, Wong AK, Ng HK, Hugon J. Phosphorylation of eukaryotic initiation factor-2alpha (eIF2alpha) is associated with neuronal degeneration in Alzheimer's disease. *Neuroreport* **13**, 2429-2432 (2002).

13. Mouton-Liger F*, et al.* Increased cerebrospinal fluid levels of double-stranded RNA-dependant protein kinase in Alzheimer's disease. *Biol Psychiatry* **71**, 829-835 (2012).

14. Dumurgier J*, et al.* Cerebrospinal fluid PKR level predicts cognitive decline in Alzheimer's disease. *PLoS One* **8**, e53587 (2013).

15. Sheng JG, Bora SH, Xu G, Borchelt DR, Price DL, Koliatsos VE. Lipopolysaccharide-induced-neuroinflammation increases intracellular accumulation of amyloid precursor protein and amyloid beta peptide in APPswe transgenic mice. *Neurobiol Dis* **14**, 133-145 (2003).

16. Schedlowski M, Engler H, Grigoleit JS. Endotoxin-induced experimental systemic inflammation in humans: a model to disentangle immune-to-brain communication. *Brain Behav Immun* **35**, 1-8 (2014).

17. Bonnet MC, Daurat C, Ottone C, Meurs EF. The N-terminus of PKR is responsible for the activation of the NF-kappaB signaling pathway by interacting with the IKK complex. *Cell Signal* **18**, 1865-1875 (2006).

18. Yim HC, Williams BR. Protein kinase R and the inflammasome. *J Interferon Cytokine Res* **34**, 447-454 (2014).

19. Kahn MS*, et al.* Prolonged elevation in hippocampal Abeta and cognitive deficits following repeated endotoxin exposure in the mouse. *Behav Brain Res* **229**, 176-184 (2012).

20. Krstic D*, et al.* Systemic immune challenges trigger and drive Alzheimer-like neuropathology in mice. *J Neuroinflammation* **9**, 151 (2012).

21. Mouton-Liger F*, et al.* Oxidative stress increases BACE1 protein levels through activation of the PKR-eIF2alpha pathway. *Biochim Biophys Acta* **1822**, 885-896 (2012).

22. O'Connor T*, et al.* Phosphorylation of the translation initiation factor eIF2alpha increases BACE1 levels and promotes amyloidogenesis. *Neuron* **60**, 988-1009 (2008).

23. Sadleir KR, Eimer WA, Kaufman RJ, Osten P, Vassar R. Genetic Inhibition of Phosphorylation of the Translation Initiation Factor eIF2alpha Does Not Block Abeta-Dependent Elevation of BACE1 and APP Levels or Reduce Amyloid Pathology in a Mouse Model of Alzheimer's Disease. *PLoS One* **9**, e101643 (2014).

24. Wen Y*, et al.* Transcriptional regulation of beta-secretase by p25/cdk5 leads to enhanced amyloidogenic processing. *Neuron* **57**, 680-690 (2008).

25. Kitazawa M, Oddo S, Yamasaki TR, Green KN, LaFerla FM. Lipopolysaccharide-induced inflammation exacerbates tau pathology by a cyclin-dependent kinase 5-mediated pathway in a transgenic model of Alzheimer's disease. *J Neurosci* **25**, 8843-8853 (2005).

26. Semmler A*, et al.* Sepsis causes neuroinflammation and concomitant decrease of cerebral metabolism. *J Neuroinflammation* **5**, 38 (2008).

27. Gil J, Esteban M. The interferon-induced protein kinase (PKR), triggers apoptosis through FADD-mediated activation of caspase 8 in a manner independent of Fas and TNF-alpha receptors. *Oncogene* **19**, 3665-3674 (2000).

28. Holmes C, Cunningham C, Zotova E, Culliford D, Perry VH. Proinflammatory cytokines, sickness behavior, and Alzheimer disease. *Neurology* **77**, 212-218 (2011).

29. Holmes C*, et al.* Systemic inflammation and disease progression in Alzheimer disease. *Neurology* **73**, 768-774 (2009).

30. Zhu PJ*, et al.* Suppression of PKR promotes network excitability and enhanced cognition by interferon-gamma-mediated disinhibition. *Cell* **147**, 1384-1396 (2011).

31. Hugon J, Paquet C, Chang RC. Could PKR inhibition modulate human neurodegeneration? *Expert Rev Neurother* **9**, 1455-1457 (2009).

32. Yang YL*, et al.* Deficient signaling in mice devoid of double-stranded RNA-dependent protein kinase. *EMBO J* **14**, 6095-6106 (1995).

33. Schmuck M*, et al.* Automatic counting and positioning of 5-bromo-2-deoxyuridine (BrdU) positive cells in cortical layers of rat brain slices. *Neurotoxicology* **43**, 127-133 (2014).

34. Pfaffl MW. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic acids research* **29**, e45 (2001).

Figures legends

Figure 1: Activation of PKR in WT mice cortex and hippocampus after LPS systemic challenge. Double-labeling in immunofluorescence of DAPI (blue) and $pPKR_{Thr446}$ (red) in hippocampus (A) and frontal cortex (B) sagittal sections of WT mice treated with saline (sal) or LPS. Percentage of $pPKR_{Thr446}$ positive cells (C) and relative IOD (integrated optical density) of $pPKR_{Thr446}$ immunoreactivity (D) are increased in LPS-treated mice. WT [n=4], *p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001

Figure 2: Microglial activation in WT and $PKR^{-/-}$ mice hippocampus. Double-labeling in immunofluorescence of DAPI (blue) and IBA1 (red) in hippocampus sagittal sections of WT and $PKR^{-/-}$ mice treated with saline or LPS (A). Relative IOD (integrated optical density) of IBA1 immunoreactivity in activated microglial cells. LPS induces microglial activation in WT mice. PKR inhibition prevents microglial activation after LPS treatment (B). mRNA level of TNF-α evaluated by qRT-PCR and normalized to GAPDH mRNA levels. WT [n=4], $PKR^{-/-}$ [n=4], *p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001

Figure 3: Inhibition of PKR decreases BACE1 levels and Aβ production in mice hippocampus after LPS systemic challenge. Immunoblot analysis (A) and protein levels of mature BACE1 (B) and APP (C) and quantification of $Aβ_{1-42}$ by ELISA (D) in WT and $PKR^{-/-}$ mice treated with saline or LPS. LPS induces BACE1 maturation and Aβ production without altering APP levels in WT mice. PKR inhibition prevents BACE1 maturation and Aβ production after LPS treatment. Transcriptional activity on BACE1 in hippocampus assessed with qRT-PCR and normalized to GAPDH mRNA levels (E). WT [n=4], $PKR^{-/-}$ [n=4], **p<0.01

Figure 4: Activation of transcription factor STAT3 after LPS systemic challenge is down-regulated by PKR but not translation initiation factor eIF2α. Immunoblot analysis (A) and corresponding quantification of peIF2α_{Ser51}/eIF2α (B) and pSTAT3$_{Tyr705}$/STAT3 (C) ratios in hippocampus of WT and PKR$^{-/-}$ mice treated with saline or LPS. LPS induces STAT3 but not eIF2α activation in WT mice. PKR inhibition prevents STAT3 activation. WT [n=4], *p<0.05, **p<0.01

Figure 5: (A) Sagittal view of a co-registered PET-CT whole-body mouse. (B) Coronal view of a co-registered murine cerebral MRI-PET. Regions of interest have been drawn on the hippocampus, bilaterally. (C) Hippocampal, Ammon's horn, in vivo metabolism through [^{18}F]FDG-PET.

Figure 6: Schematic representation of PKR-dependent Aβ production in brain after systemic inflammation. Peripheral inflammation communicates with the brain through the blood-brain barrier to induce microglial activation and pro-inflammatory cytokines production, involving PKR pathway. Cytokines, including TNFα, activate PKR in neurons leading to Aβ production. Thereof could be controlled by the activation of transcription factor STAT3.

Contributions

A-S.R., F.M-L. and J.H. designed and performed the study, analyzed the data and wrote the paper. A-S.R. and F.M-L. performed the animal experiments and the immunohistochemistry experiments. S.L. and F.M-L. analyzed the immunohistochemistry data using imageJ software. C.P., S.G. and E.S. performed and quantified the immunoblot experiments. L.R. performed and analyzed the PET imaging studies and contributed to writing and editing. C.P. and R.C. contributed to the experimental design and data analysis. R.C. provided the $PKR^{-/-}$ mice from Hong-Kong University.

Competing financial interests

The authors declare no competing financial interests.

Corresponding author

Correspondence to: Pr. Jacques Hugon

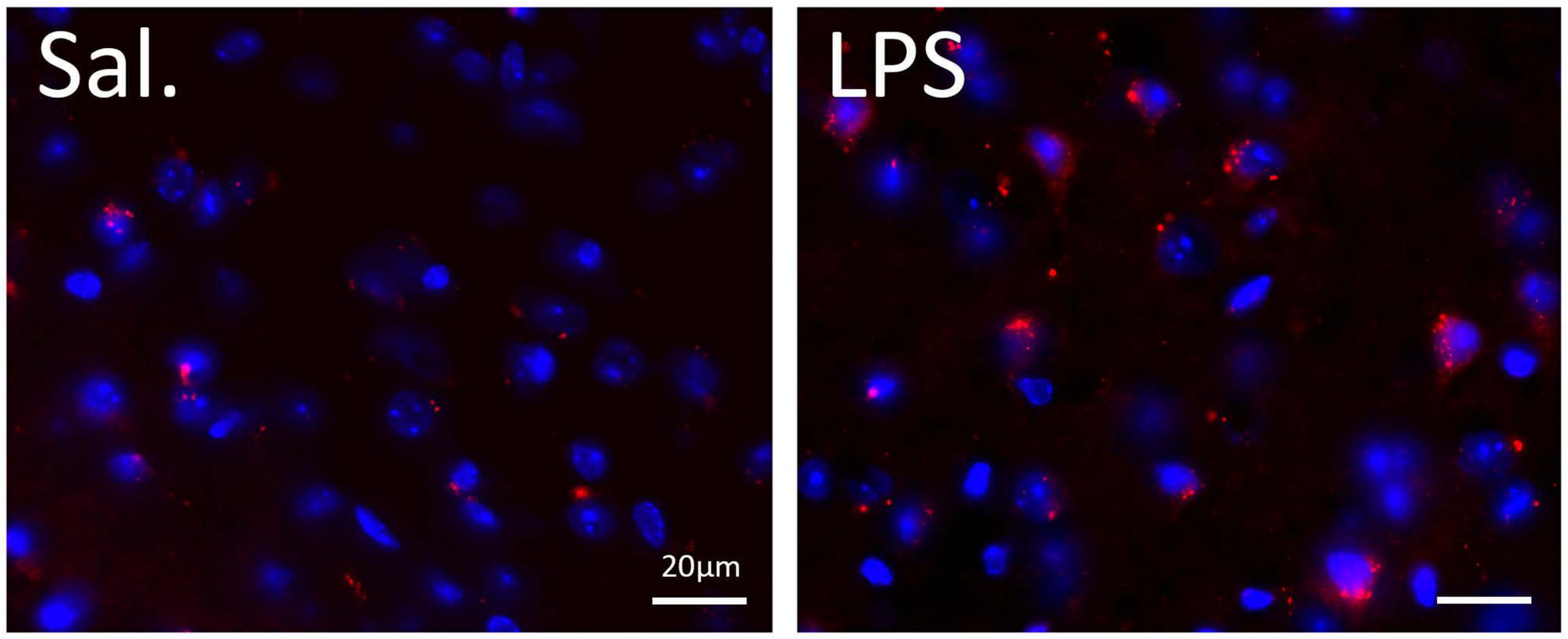
Memory Clinical Centre Paris Nord Ile-de-France, 200 rue du Faubourg Saint-Denis, Paris, France and UMR-S 942, 75010 Paris, France. E-mail: jacques.hugon@inserm.fr

Aknowledgements

This work was partially supported by ANR-MALZ, by INSERM, and APHP. The authors thank Mariko Taga, Laetitia Trottereau, Carmen Lok, Aude Muzerelle, Nicolas Durieux and Florent Auger for their technical help. The authors would also like to thank Drs. Jean Antoine Girault and Anne Roumier from Institut du Fer à Moulin, Paris, for constructive discussion about neuroinflammation in animal models.

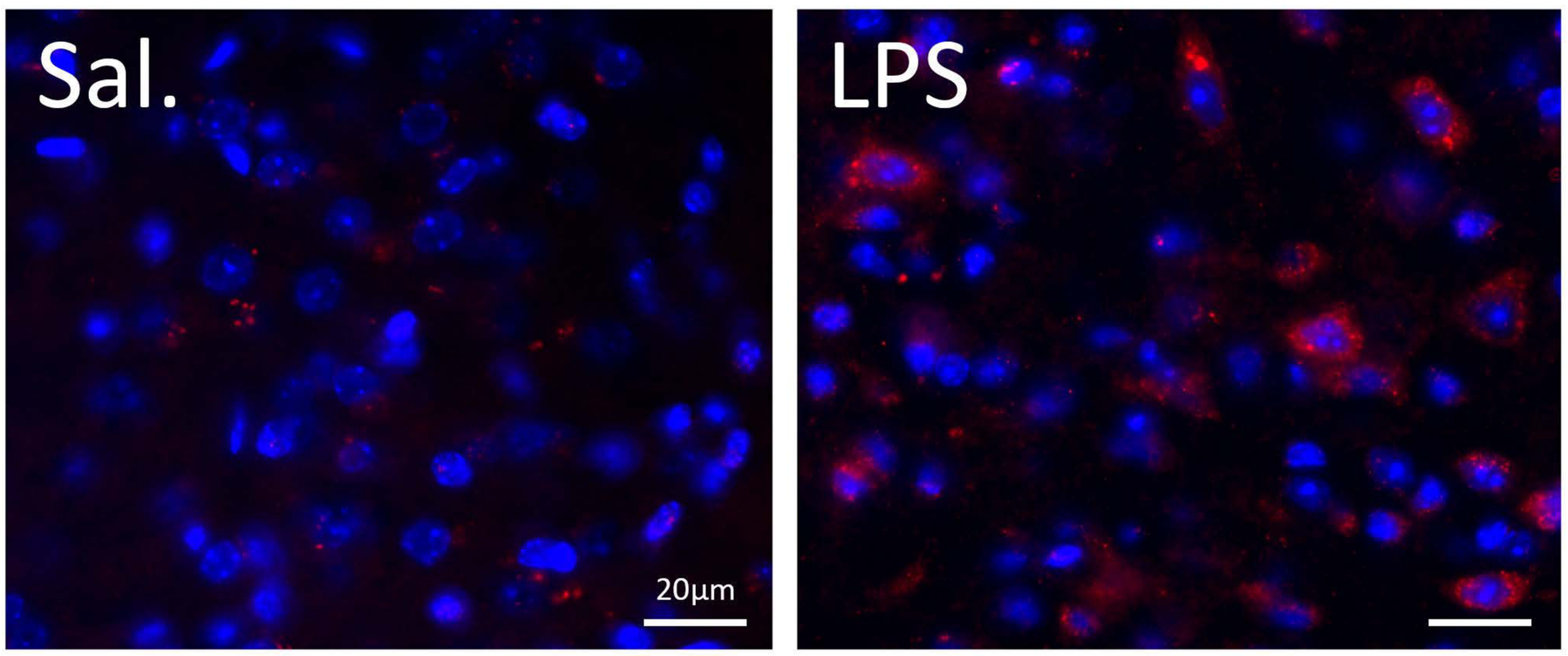
A

Hippocampus
pPKR$_{Thr446}$ + DAPI

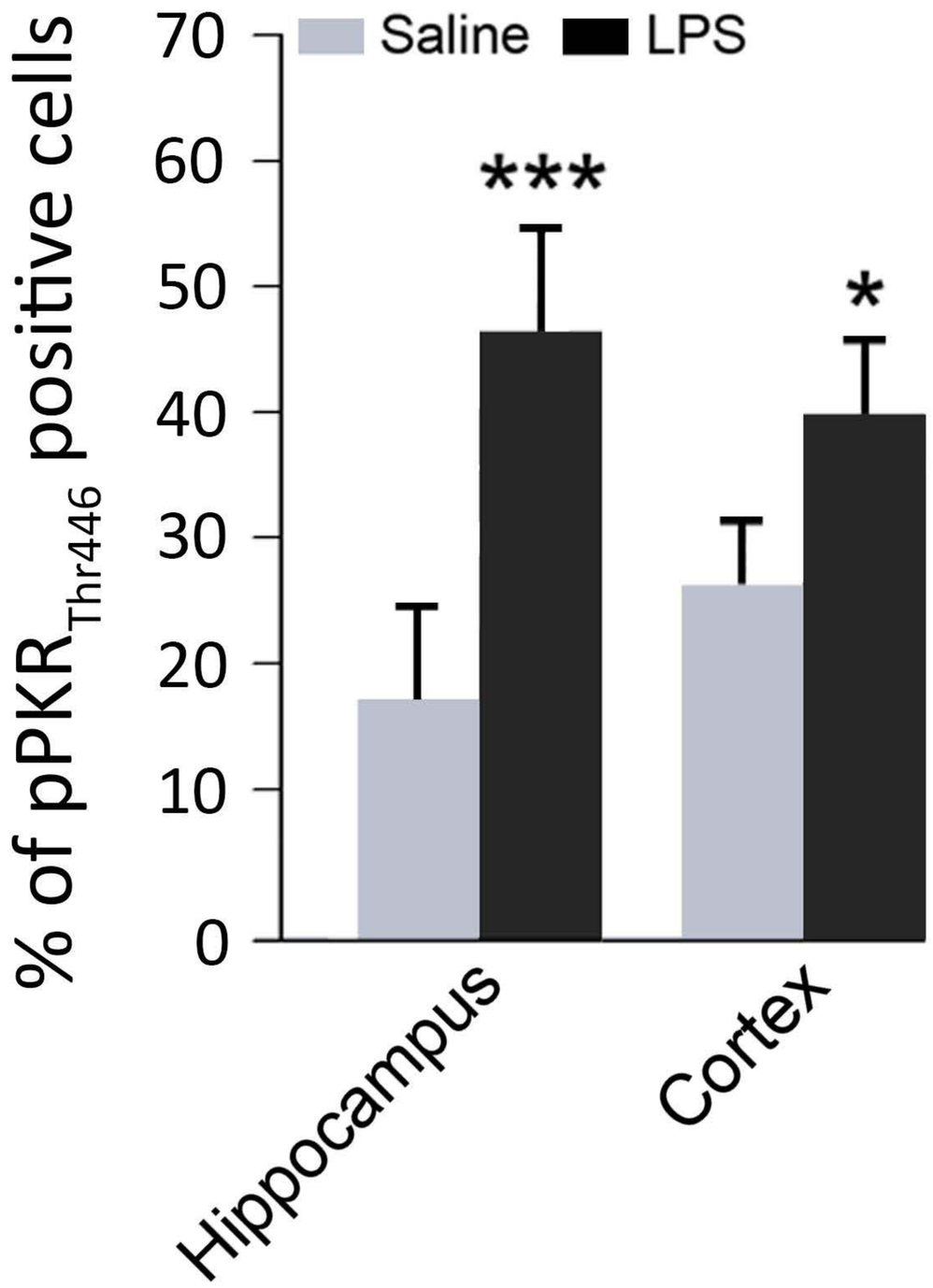


B

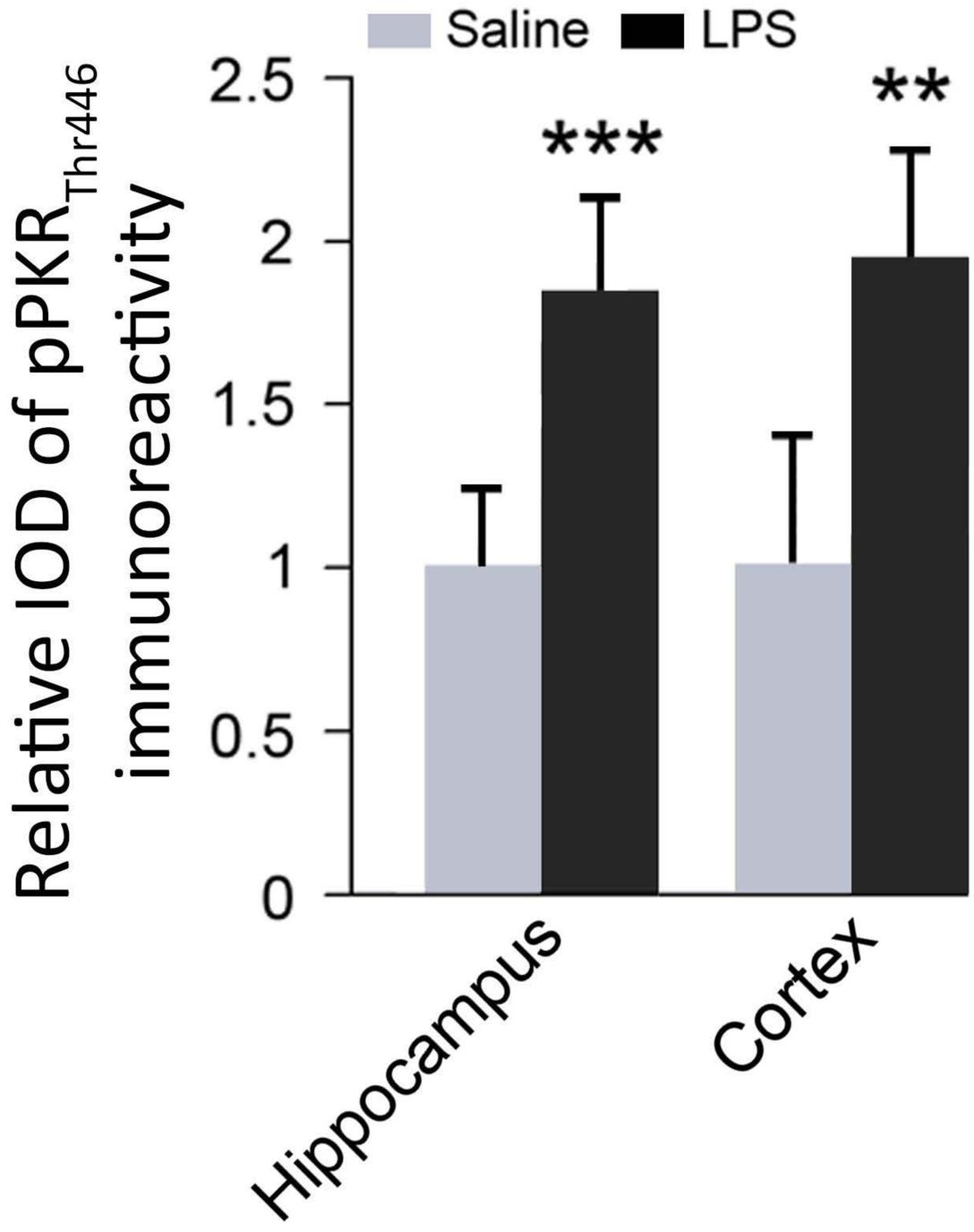
Cortex
pPKR$_{Thr446}$ + DAPI



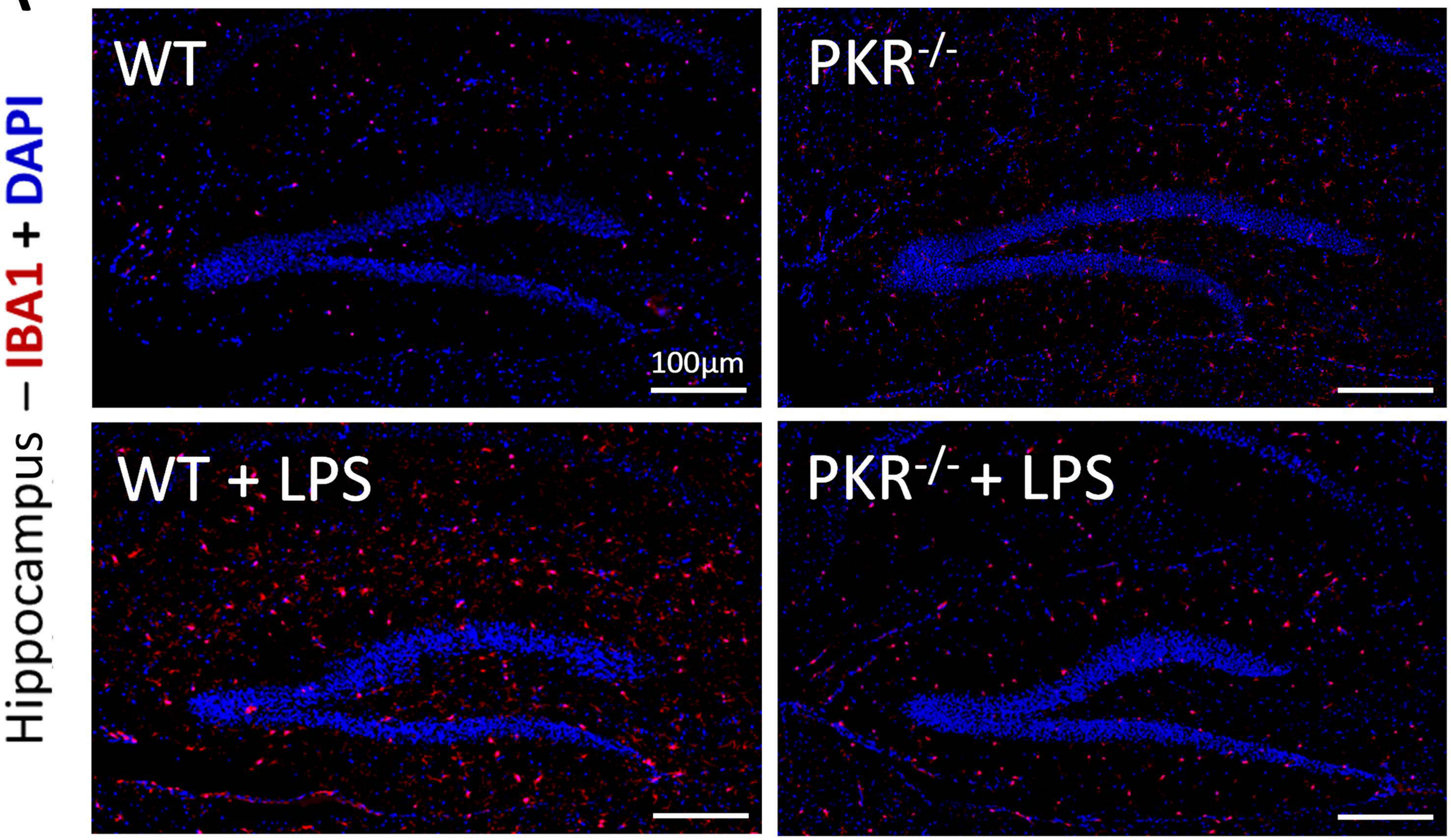
C



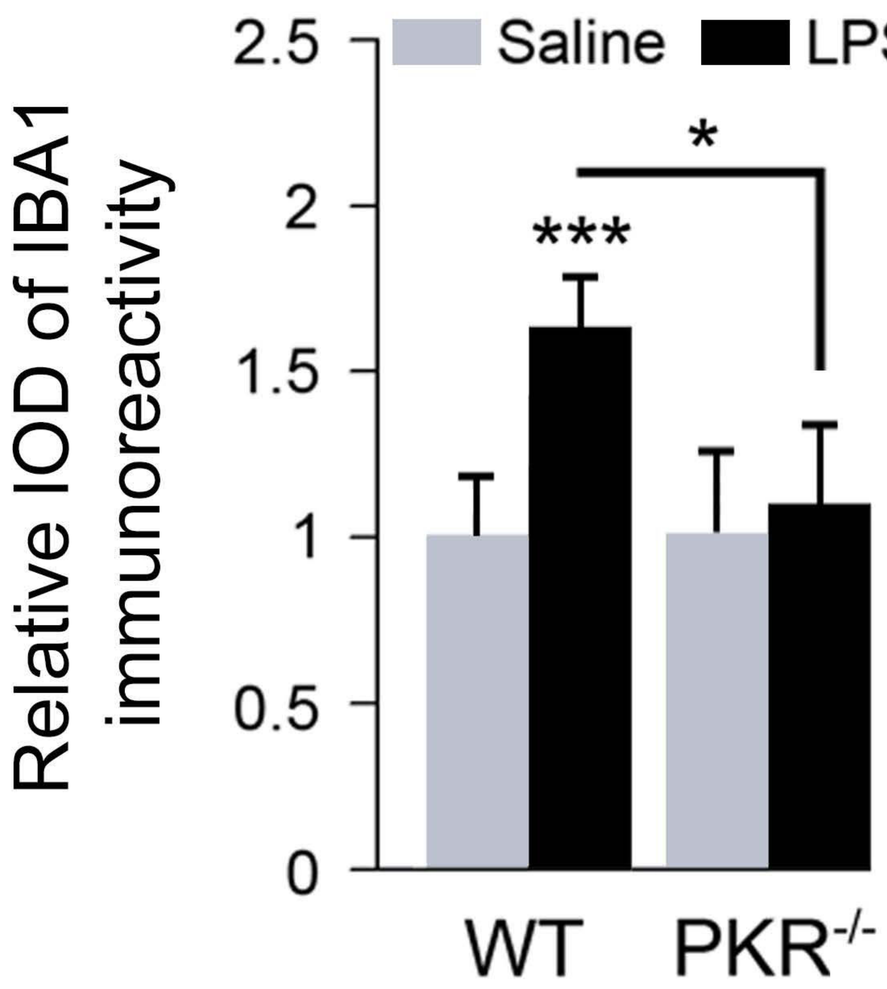
D



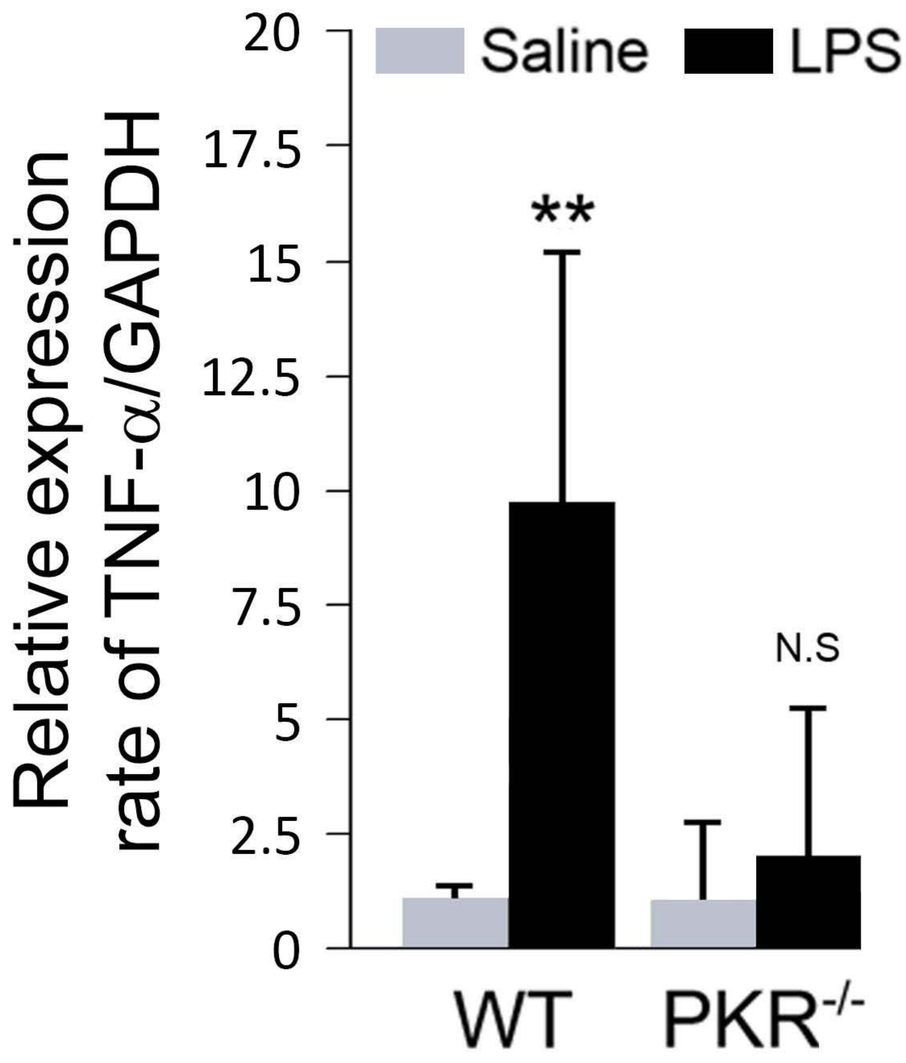
A


Hippocampus – IBA1 + DAPI
WT
PKR-/-
WT + LPS
PKR-/- + LPS
100μm

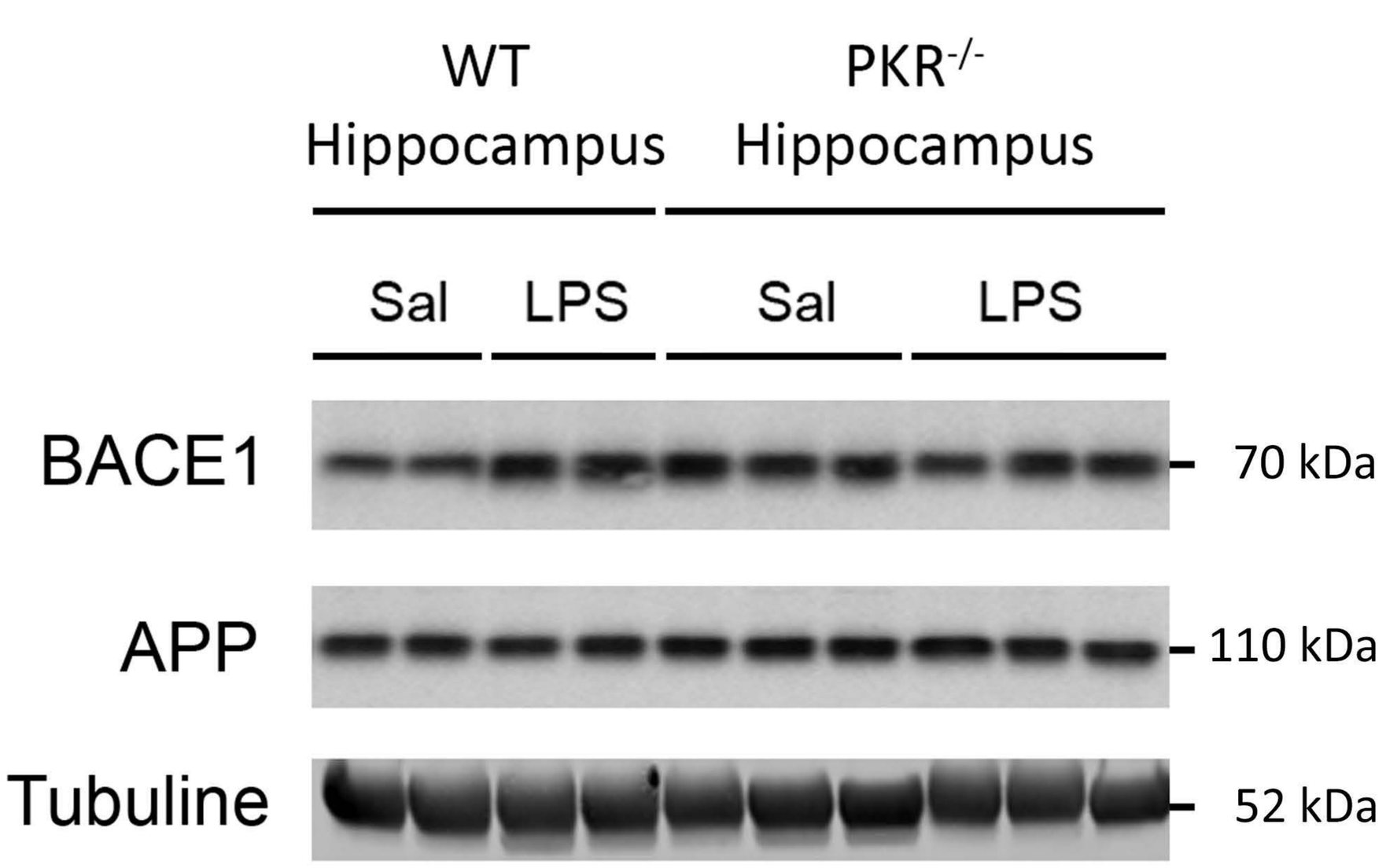
B


Relative IOD of IBA1 immunoreactivity
2.5
2
1.5
1
0.5
0
Saline
LPS
***
*
WT
PKR-/-

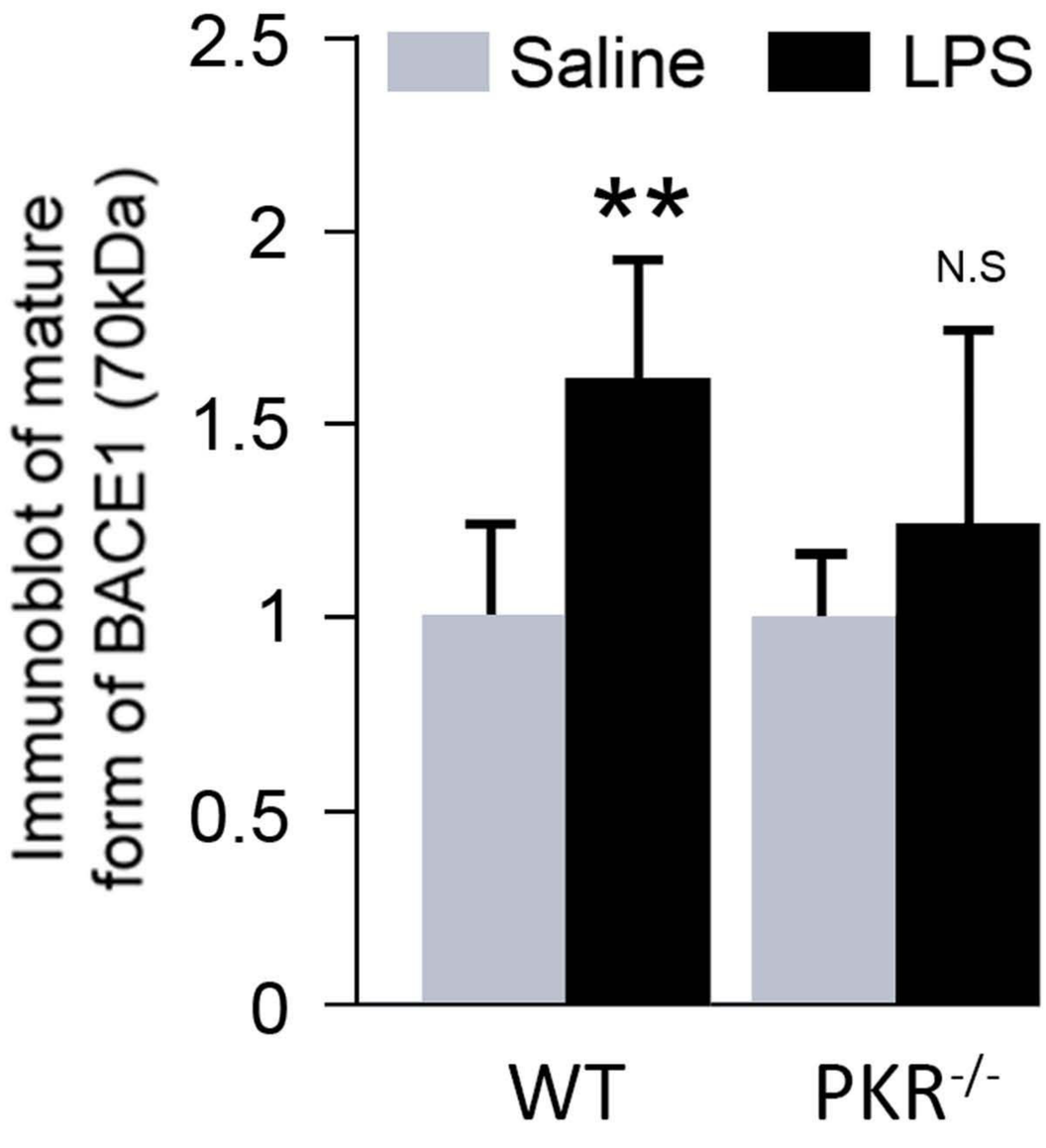
C


Relative expression rate of TNF-α/GAPDH
20
17.5
15
12.5
10
7.5
5
2.5
0
Saline
LPS
**
N.S
WT
PKR-/-

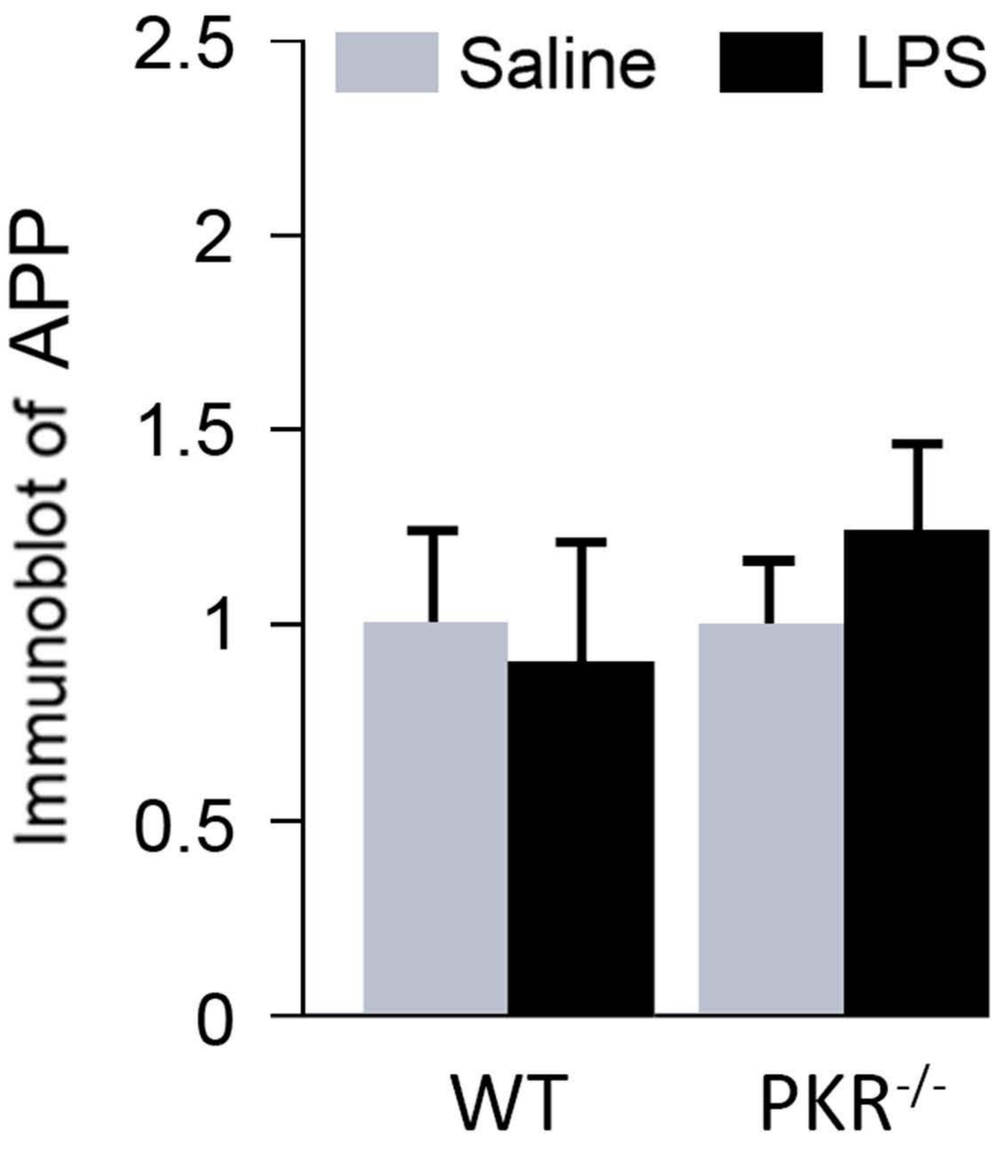
A


WT
Hippocampus
PKR-/-
Hippocampus
Sal
LPS
Sal
LPS
BACE1
70 kDa
APP
110 kDa
Tubuline
52 kDa

B


Saline
LPS
Immunoblot of mature form of BACE1 (70kDa)
2.5
2
1.5
1
0.5
0
**
N.S
WT
PKR-/-

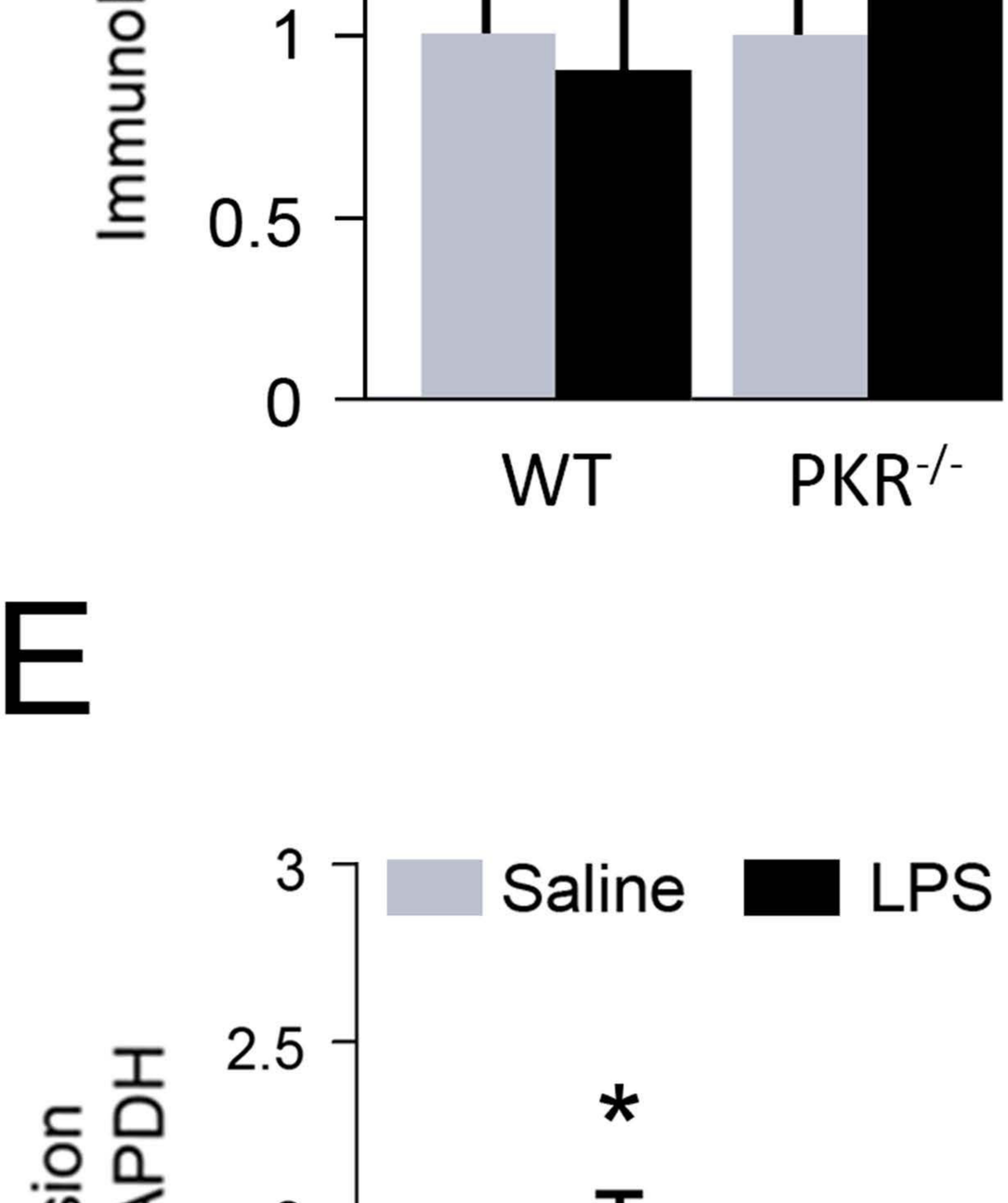
C


Saline
LPS
Immunoblot of APP
2.5
2
1.5
1
0.5
0
WT
PKR-/-

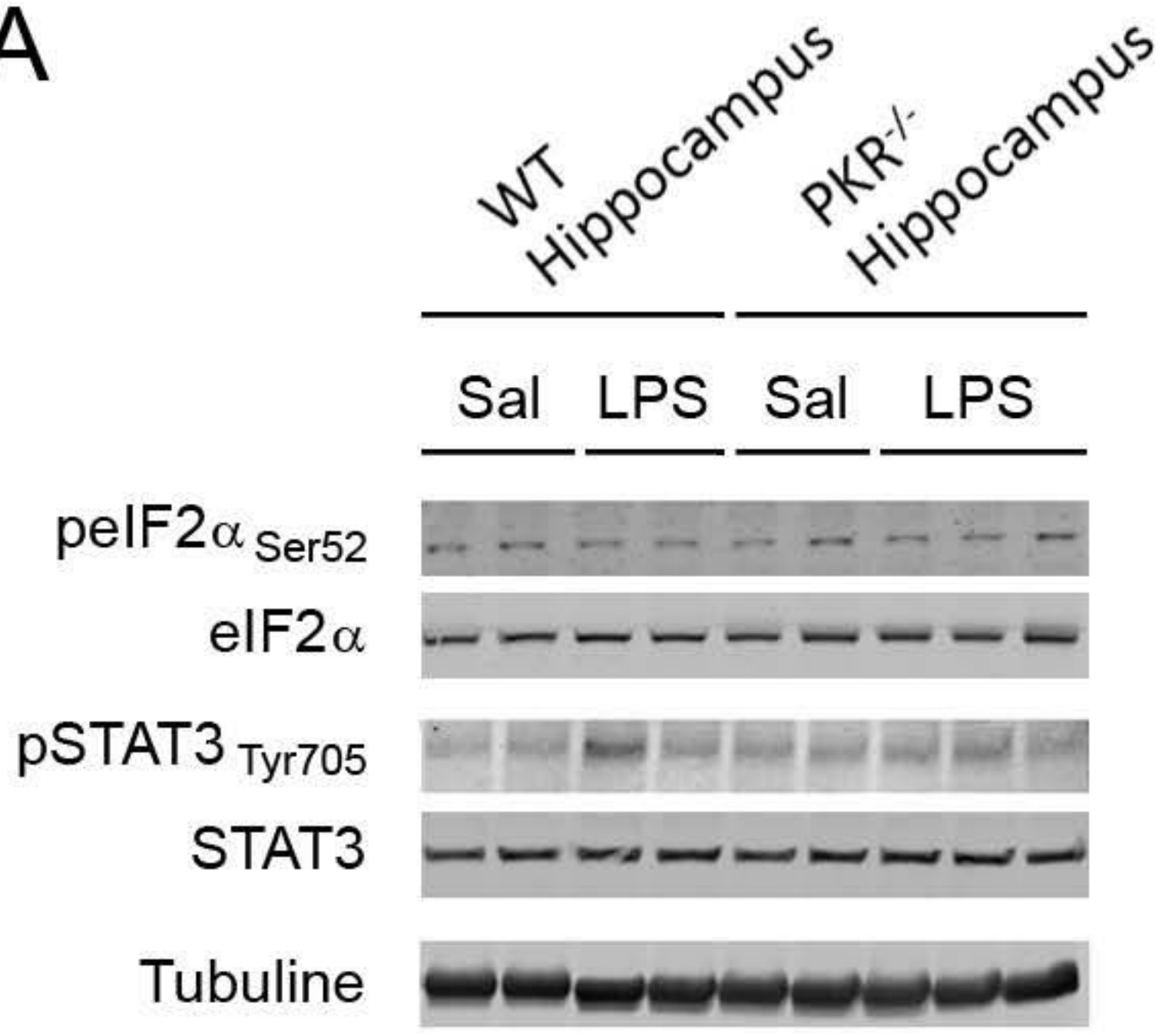
D

Saline
LPS
Elisa of Aβ42
4
3.5
3
2.5
2
1.5
1
0.5
0
**
N.S
WT
PKR-/-

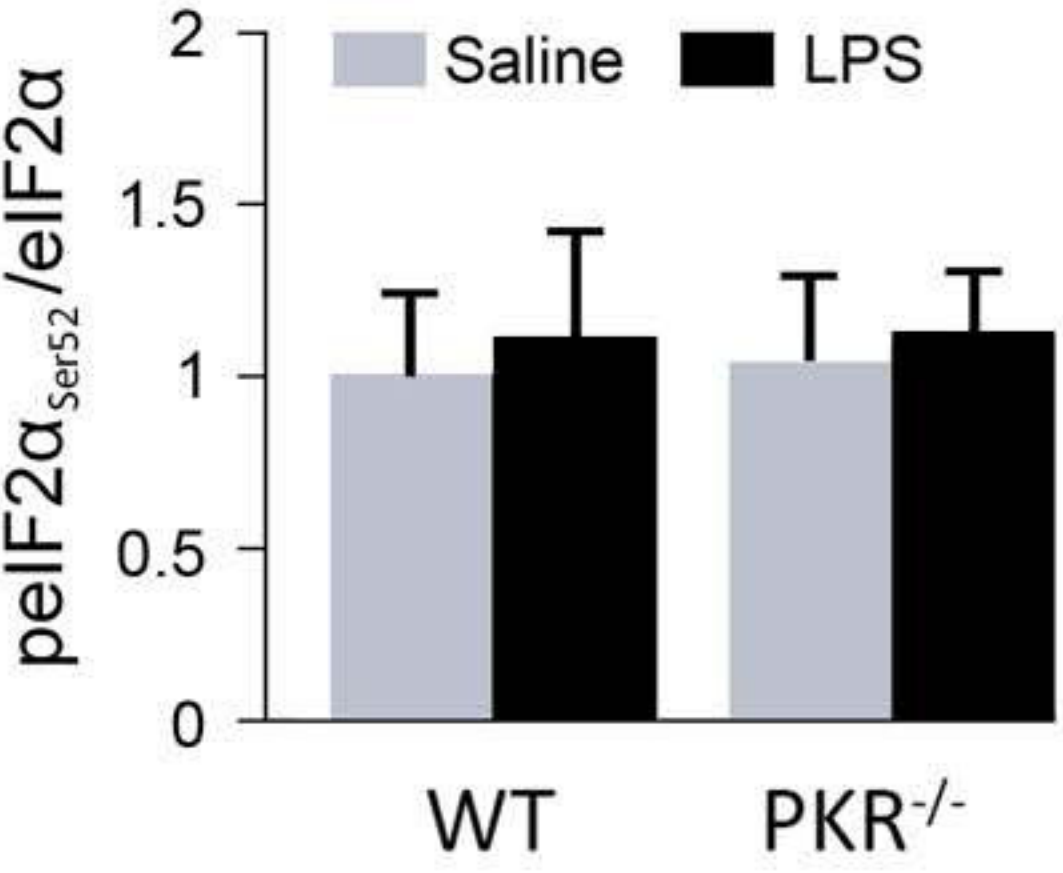
E


Saline
LPS
Relative expression rate of BACE1/GAPDH
3
2.5
2
1.5
1
0.5
0
*
WT
PKR-/-

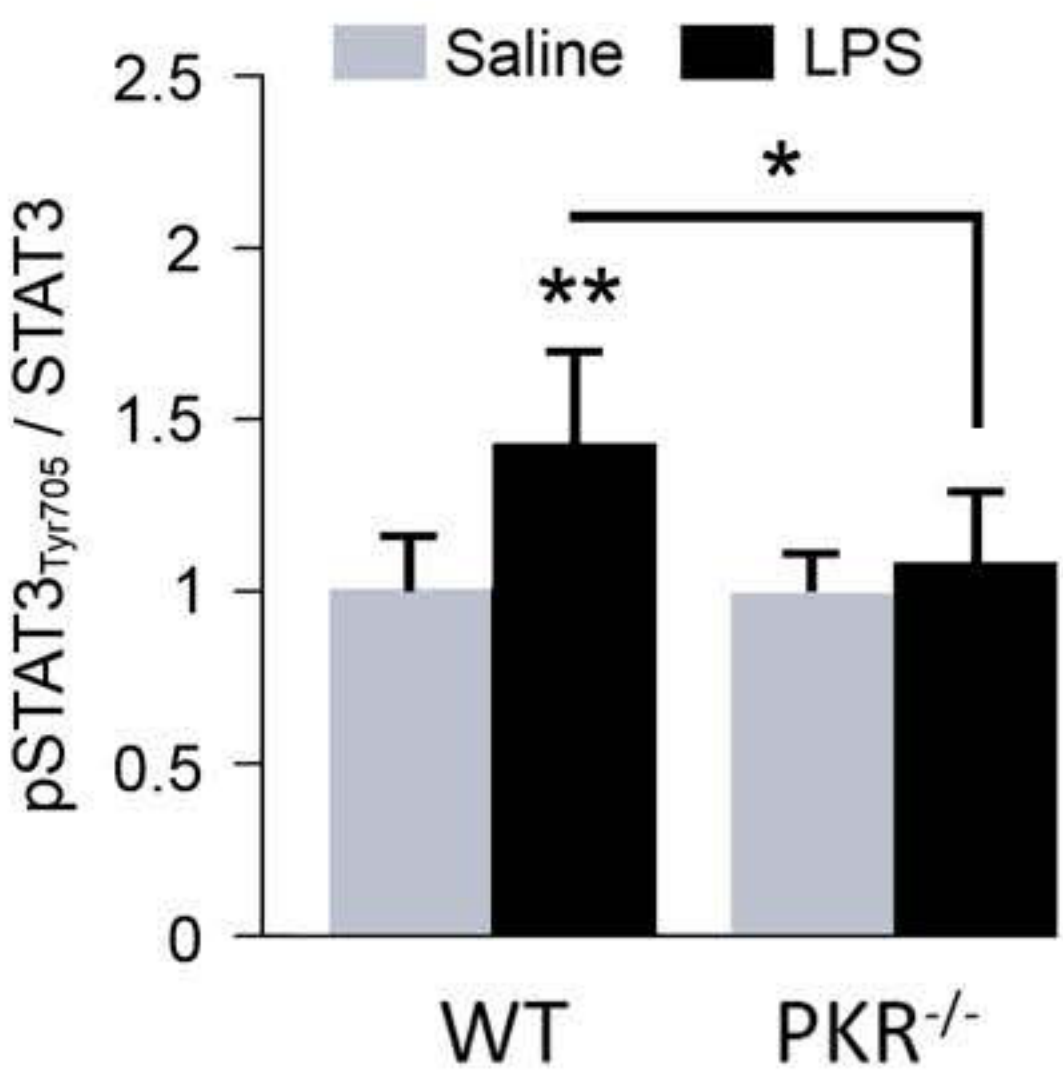
A


WT Hippocampus
PKR-/- Hippocampus
Sal
LPS
Sal
LPS
peIF2α Ser52
eIF2α
pSTAT3 Tyr705
STAT3
Tubuline

B

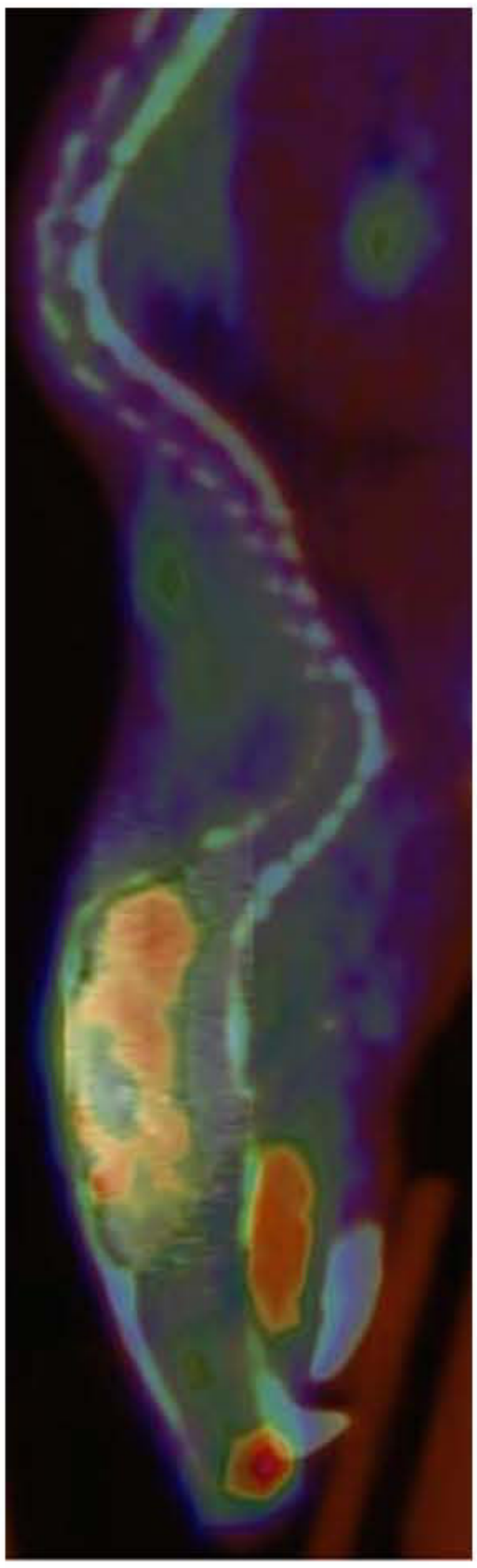

Saline
LPS
peIF2α Ser52 /eIF2α
2
1.5
1
0.5
0
WT
PKR-/-

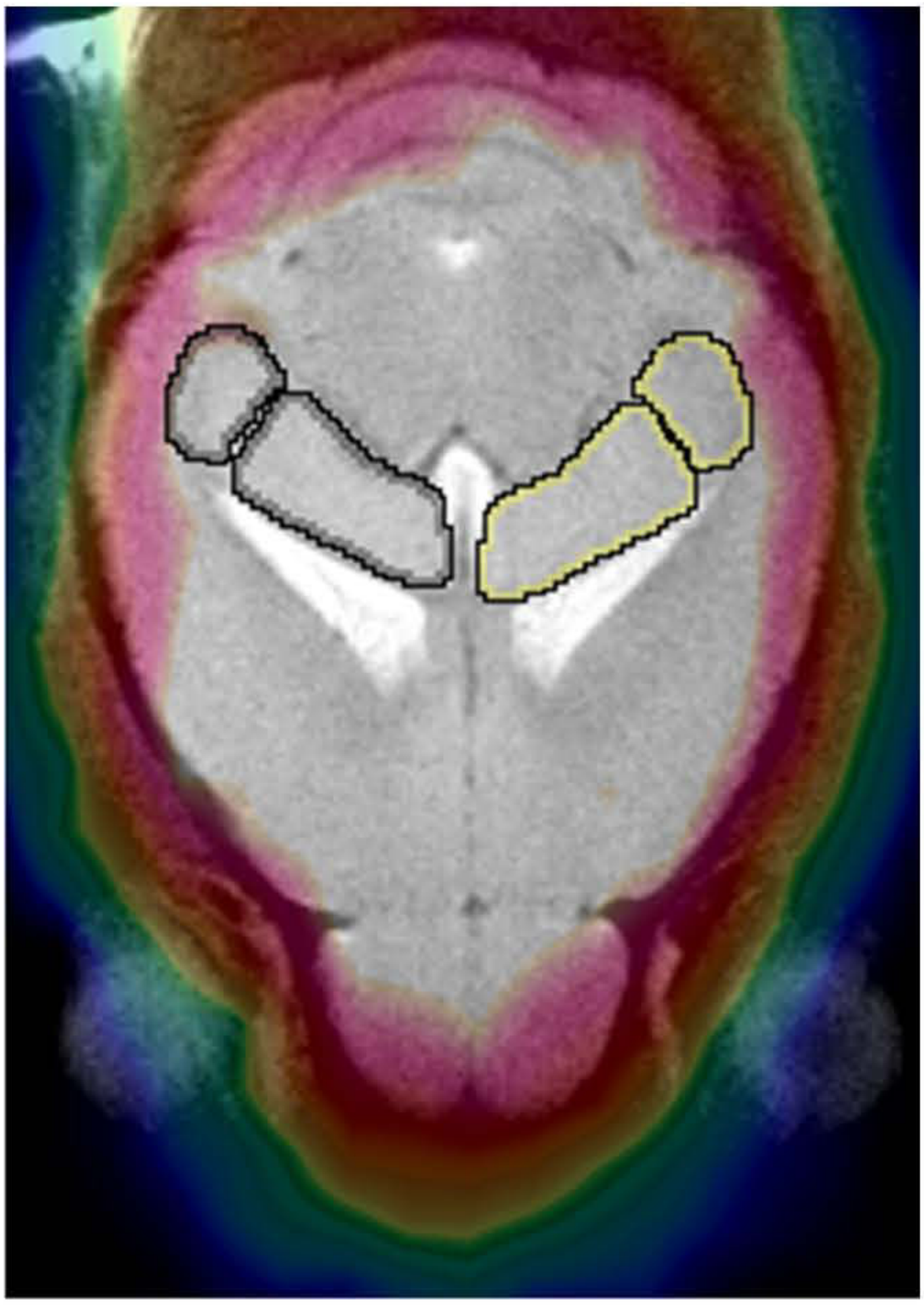
C


Saline
LPS
pSTAT3 Tyr705 / STAT3
2.5
2
1.5
1
0.5
0
*
**
WT
PKR-/-

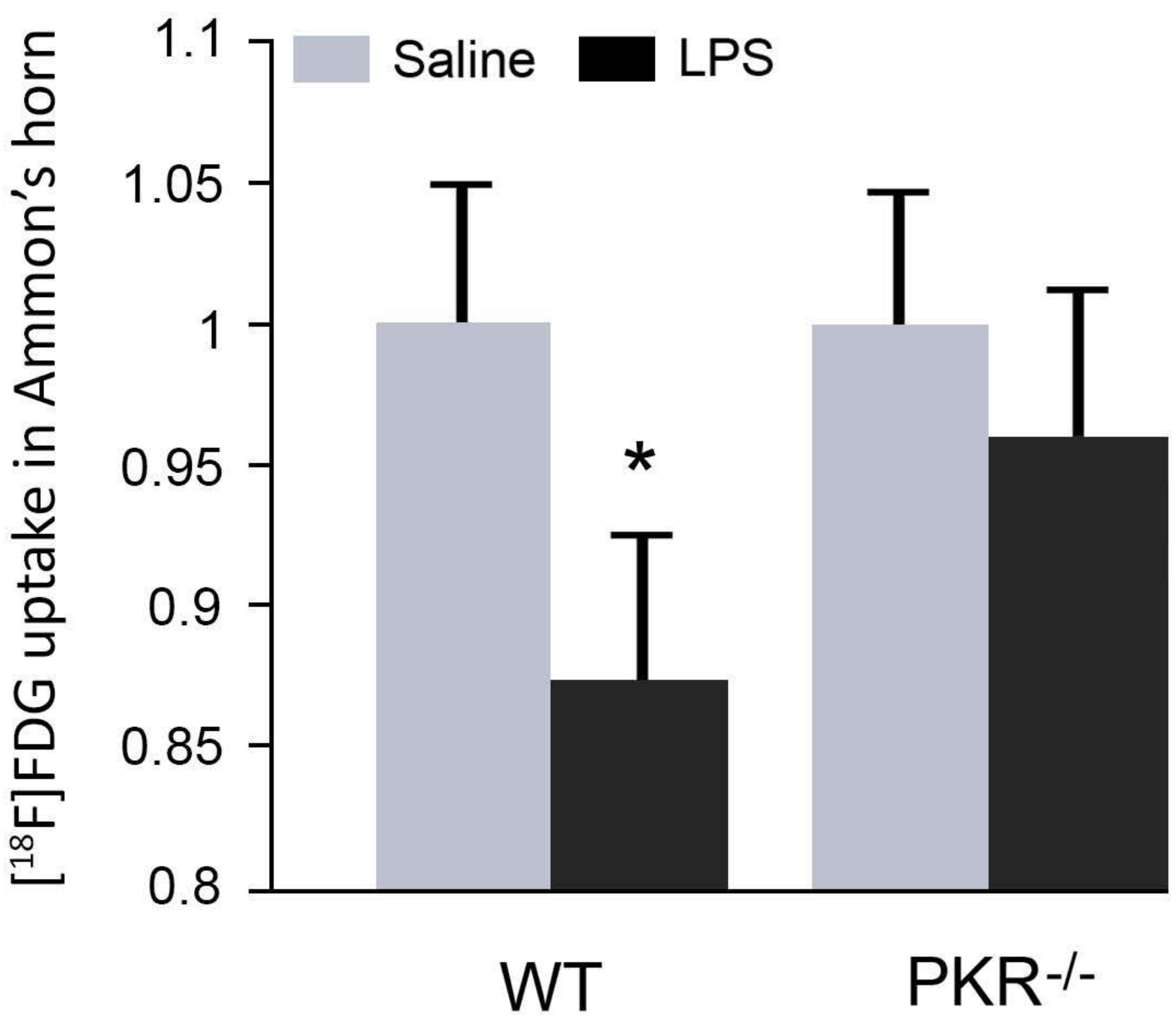
A

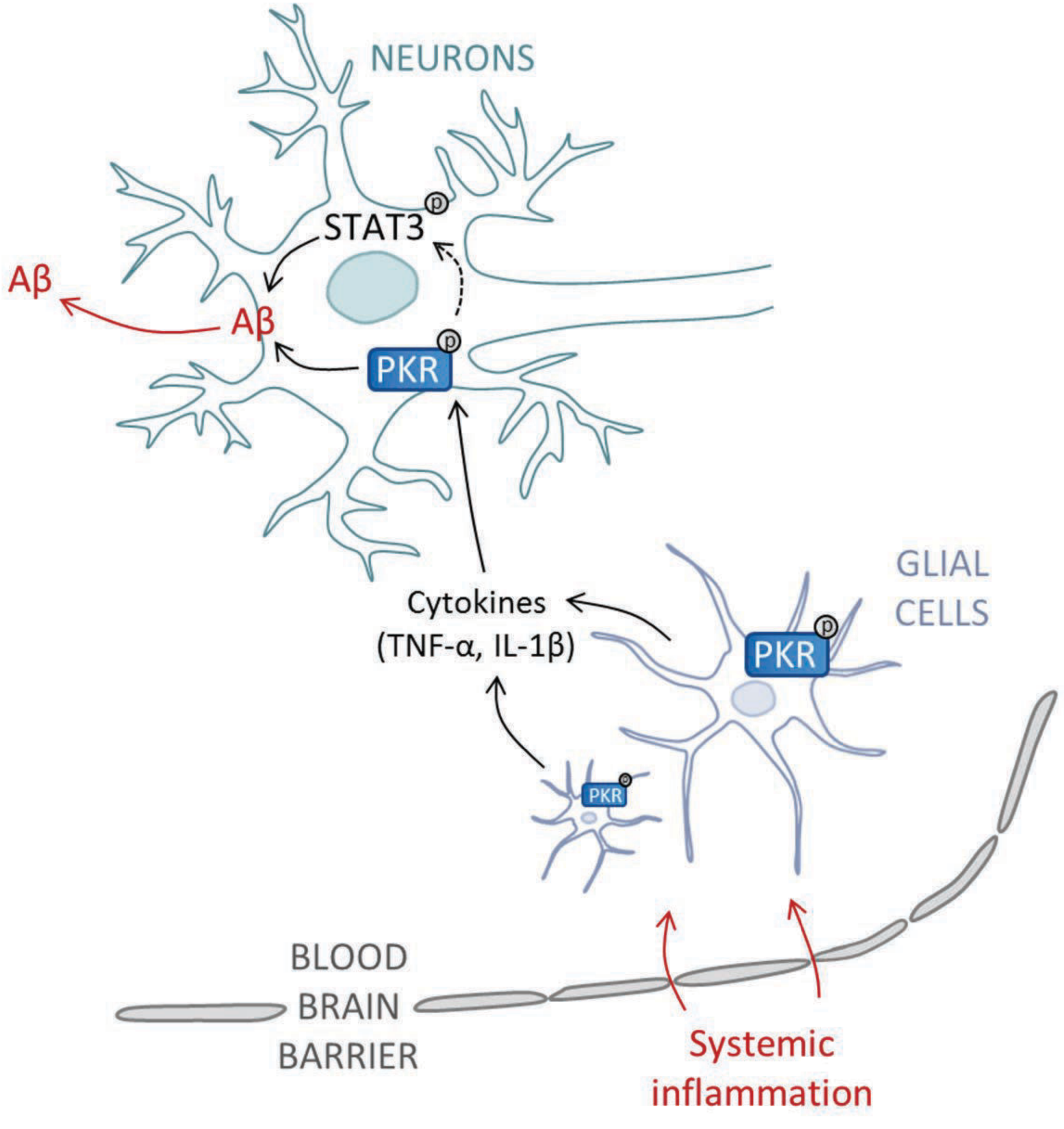
B





C


Saline
LPS
1.1
1.05
1
0.95
0.9
0.85
0.8
[18F]FDG uptake in Ammon's horn
*
WT
PKR-/-

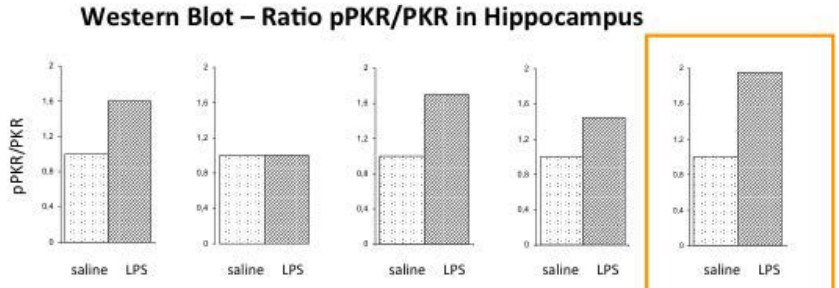

NEURONS
STAT3
P
Aβ
Aβ
PKR
P
Cytokines
(TNF-α, IL-1β)
GLIAL
CELLS
PKR
P
PKR
BLOOD
BRAIN
BARRIER
Systemic
inflammation

B. Résultats complémentaires ne figurant pas dans l'article

1. Activation de PKR par le LPS

Nous avons testé plusieurs schémas d'injection i.p. du LPS chez des souris WT C57Bl/6J âgées de 3 mois. Le schéma choisi est celui à 3 injections successives, à la dose de 1 mg/kg, dans lequel on retrouve une nette activation de PKR dans le cerveau (région hippocampique), mesurée par le ratio forme phosphorylée / forme totale (pPKR/PKR full) en immunoblot.

A



ip LPS injections

0h	500 µg/kg	500 µg/kg	3 mg/kg	5 mg/kg	1 mg/kg
24h	sacrifice	-	sacrifice	sacrifice	1 mg/kg
48h		-			1 mg/kg
72h		sacrifice			sacrifice

B

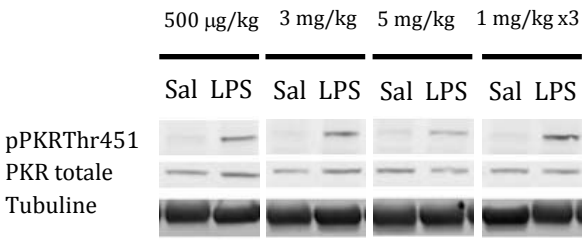


Figure 24: Choix du schéma d'injection du LPS

***A** : Plusieurs schémas d'injection i.p. de LPS ont été testés chez les animaux WT: dose unique (500 µg/kg, 3 mg/kg et 5 mg/kg et sacrifice à 24h ; 500 µg/kg et sacrifice à 72 h) et dose répétée (1mg/kg/j pendant 3 jours et sacrifice à 72h). L'activation de PKR a été mesurée par le ratio pPKR/PKR full. **B** : Analyse par immunoblot de l'expression des formes phosphorylée et totale de PKR*

2. Effet de l'endotoxémie sur le poids des animaux

Les animaux WT et PKR-/- ont été pesés chaque jour avant traitement et avant sacrifice. Nous avons observé une perte de poids maximum d'environ 20% à J3 (calculée par rapport au poids initial à J1), les animaux traités par LPS s'alimentant et s'hydratant moins (qu'ils soient WT ou PKR-/-). Nous avons vérifié dans un groupe d'animaux WT sacrifié une

semaine plus tard, à J11, une récupération sur un plan clinique, les souris recouvrant leur poids initial 72h après la dernière injection.

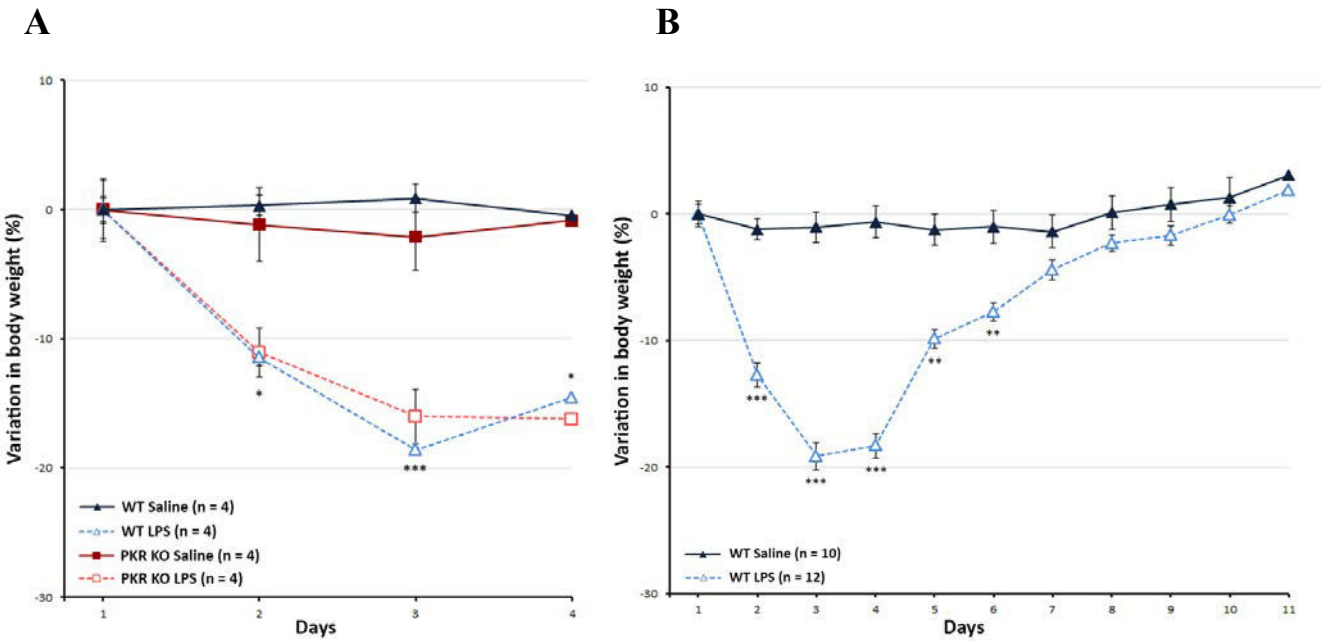


Figure 25: Variation du poids chez les animaux traités par LPS ou salin

A *: Variation du poids des animaux WT et PKR-/- (KO) traités par LPS vs salin, sacrifice à J4.*
B *: Variation du poids des animaux WT traités par LPS vs salin, sacrifice à J11.*
p<0.05, **p<0.01, p*<0.001*

3. Invalidation de PKR dans la lignée PKR -/-

L'invalidation de PKR chez les animaux PKR -/- a été confirmée par l'analyse en immunoblot de l'expression des formes totale et tronquée de PKR dans l'hippocampe des animaux WT et PKR -/-. On retrouve comme attendu chez les animaux WT l'expression de la forme murine totale de PKR (poids moléculaire d'environ 69 kDa). Les animaux PKR -/- n'expriment qu'ES-mPKR (exon skipped mouse PKR), la forme tronquée du modèle invalidé de Yang (poids moléculaire d'environ 42 kDa).

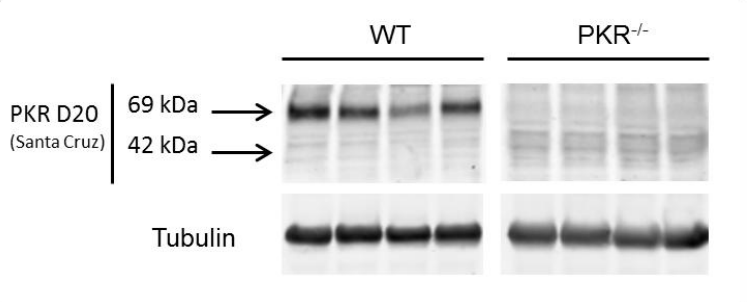


Figure 26: Invalidation de PKR

Analyse par immunoblot de l'expression de la forme totale de PKR dans l'hippocampe des animaux WT et PKR -/- (modèle de Yang). Le poids moléculaire de la forme murine totale de PKR est de 69 kDa, celui de la forme tronquée du modèle de Yang est de 42 kDa

4. Effet de l'endotoxémie sur la production d'Aβ42 dans le cortex

La production d'Aβ42 est augmentée dans le cortex, comme dans l'hippocampe des animaux WT traités par le LPS et modulée par PKR. Chez les animaux WT exposés au LPS et sacrifiés une semaine après la dernière injection, le niveau d'Aβ42 diminue sans toutefois revenir à la normale.

A **B**

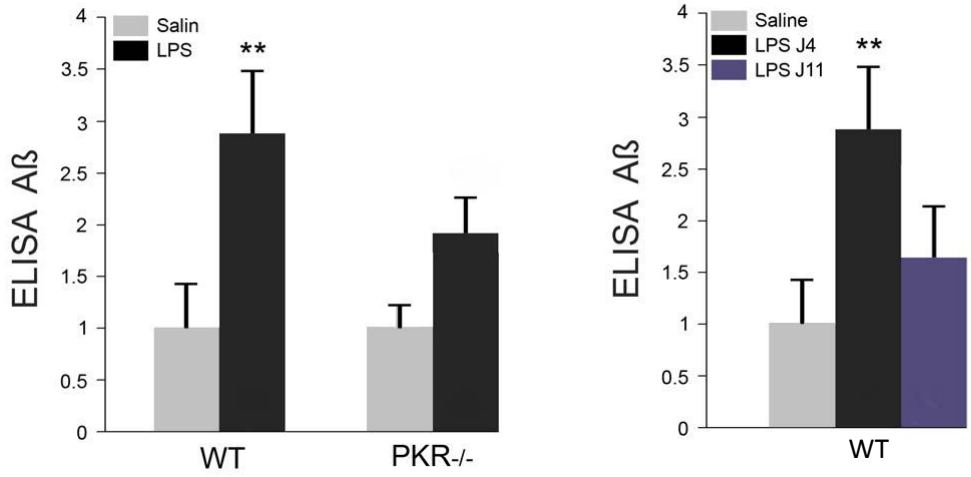


Figure 27: Niveaux d'Aβ42 dans le cortex des animaux WT et PKR-/- traités par LPS

A** : Histogrammes représentant les niveaux d'Aβ42 mesurés en ELISA dans le cortex des animaux WT et PKR-/- traités par LPS vs salin. **B** : Histogrammes représentant les niveaux d'Aβ42 mesurés en ELISA dans le cortex des animaux WT traités par LPS vs salin 24h (J4) et une semaine (J11) après la dernière injection. n=4, *p<0,05, **p<0.01, p<0.001.*

L'augmentation de la production d' Aβ42 en réponse au LPS dans le cortex des animaux WT est vérifiée par l'analyse des niveaux d'expression des oligomères solubles d'Aβ en immunoblot.

A **B**

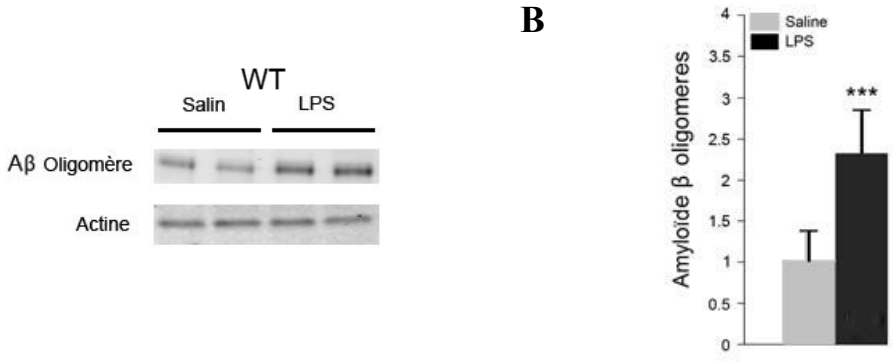


Figure 28: Niveaux d'expression des oligomères d'Aβ

A** : Analyse par immunoblot de l'expression des oligomères d'Aβ dans le cortex des animaux WT traités par LPS vs salin. **B** : Histogrammes correspondants. n=4, *p<0,05, **p<0.01, p<0.001.*

5. Effet de l'endotoxémie sur la voie de la protéine Tau

a) Phosphorylation de Tau

Nous n'avons pas pu mettre en évidence de façon significative d'hyperphosphorylation de Tau chez les animaux WT traités par LPS, notamment dans le cortex. Plusieurs sites de phosphorylation ont été étudiés, dont les sites AT8 (Ser202/Thr205) et AT180 (Th231). Nous n'avons donc pas testé l'effet de l'invalidation de PKR sur la phosphorylation de Tau dans notre modèle.

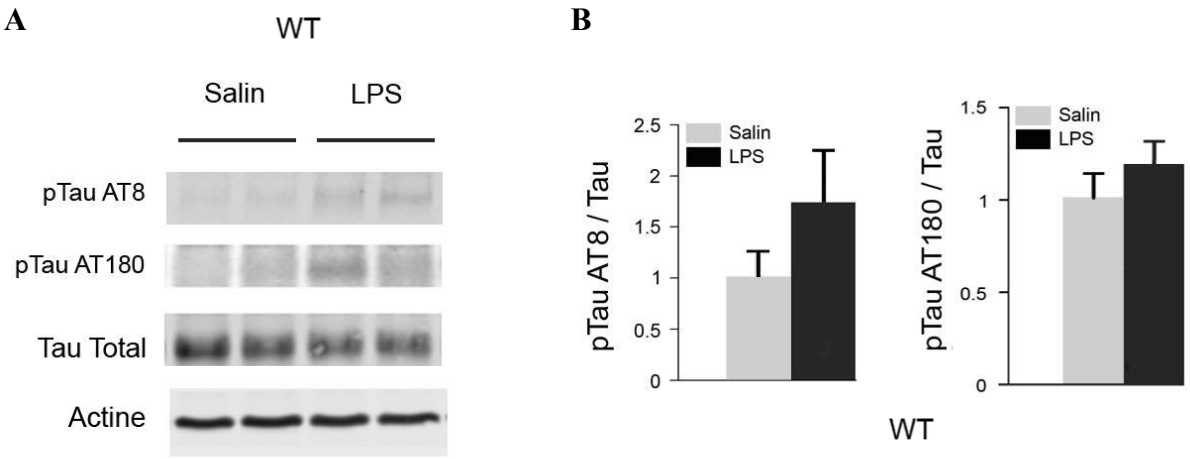


Figure 29: Phosphorylation de Tau chez les animaux WT et PKR -/- traités par LPS

***A** : Analyse par immunoblot de l'expression des formes phosphorylées (pAT8 et pAT180) et totale de Tau dans le cortex des animaux WT traités par LPS vs salin.*
***B** : Histogrammes représentant les niveaux de phosphorylation de Tau, représentés par les ratios forme phosphorylée/forme totale de la protéine. n=12*

b) Activation de kinases phosphorylant Tau

L'analyse des kinases capables de phosphoryler Tau montre l'activation de GSK3β (+60 %) et de CDK5, par l'augmentation de sa sous-unité régulatrice p25 (+55%), avec laquelle elle forme le complexe hyperactif CDK5/p25. P25 est issue du clivage de la protéine p35, dont le niveau d'expression est diminué en parallèle de l'augmentation de p25 dans le cortex des animaux WT exposés au LPS. L'invalidation de PKR module l'activation de ces deux kinases comme illustré ci-dessous.

(1) PKR module l'activation de GSK3β

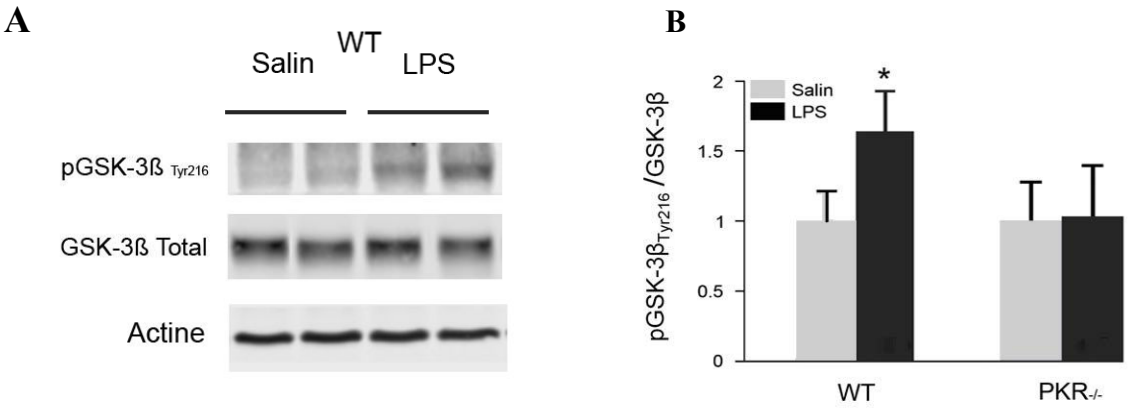


Figure 30: Activation de GSK3β chez les animaux WT et PKR -/- traités par LPS

A *: Analyse par immunoblot de l'expression des formes phosphorylée et totale de GSK3β dans le cortex des animaux WT traités par LPS vs salin.*
B *: Histogrammes représentant les niveaux d'activation de GSK3β dans le cortex des animaux WT et PKR-/- traités par LPS vs salin, représentés par les ratios forme phosphorylée/forme totale.*
*n=12 (WT), n=4 (PKR -/-), *p<0,05, **p<0.01, p***<0.001*

(2) PKR module l'activation de CDK5 via p25

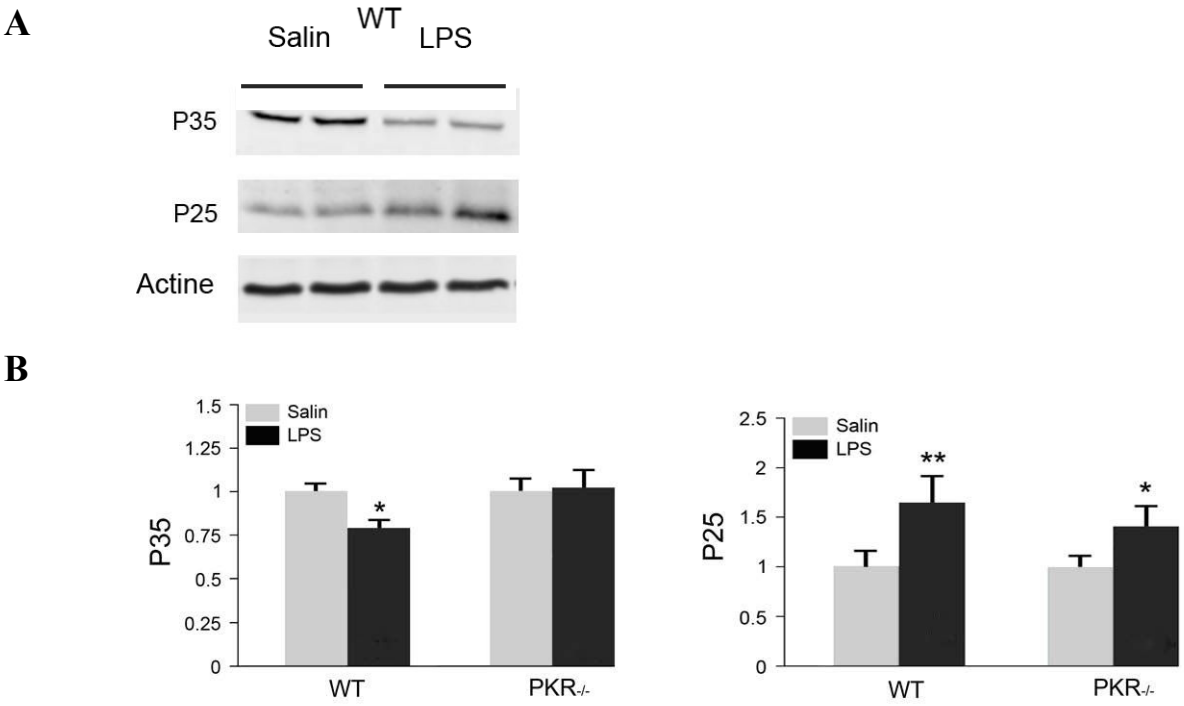


Figure 31: Niveaux de p35 et de p25 chez les animaux WT et PKR -/- traités par LPS

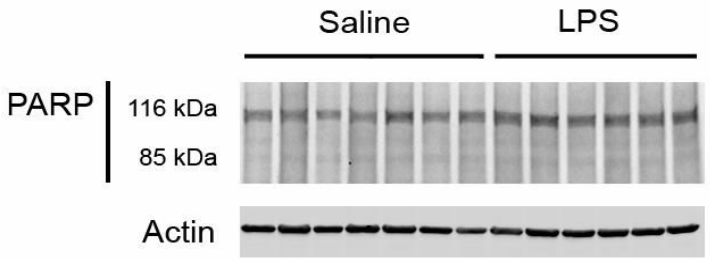
A *: Analyse par immunoblot de l'expression de p35 et p25 dans le cortex des animaux WT traités par LPS vs salin.* ***B*** *: Histogrammes représentant les niveaux d'expression de p35 et de p25 dans le cortex des animaux WT et PKR-/- traités par LPS vs salin. n=12 (WT), n=4 (PKR -/-), *p<0,05, **p<0.01, p***<0.001.*

6. Effet de l'endotoxémie sur la mort neuronale

Nous n'avons pas retrouvé de mort neuronale dans notre modèle. Plusieurs marqueurs d'apoptose ont été analysés dans le cortex des animaux WT exposés au LPS : caspase 3 activée et PARP (poly (ADP-ribose) polymérase) en immunoblot, marquage TUNEL terminal deoxynucleotidyl transferase mediated dUTP nick end labeling) en immunofluorescence.

PARP est clivée en cas d'apoptose. Cette forme n'est pas détectable dans notre modèle.

A



B

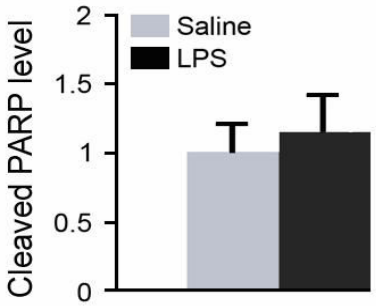


Figure 32: Niveaux de PARP chez les animaux WT traités par LPS

***A** : Analyse par immunoblot de l'expression des formes totale (116 kDa) et clivée (85 kDa) de PARP dans le cortex des animaux WT traités par LPS vs salin. **B** : Histogrammes représentant les niveaux d'expression de PARP. n=6*

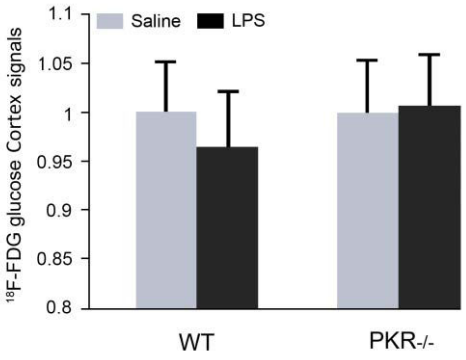
7. PKR module l'hypométabolisme cérébral induit par le LPS

Collaboration avec le Dr Ravasi, plateforme IMPRT de l'Université de Lille 2

Pour étudier in vivo le métabolisme cérébral en tomographie à émission de positons (TEP ou PET), on utilise comme radiotraceur un analogue du glucose, le fluorodesoxyglucose (18F-FDG), qui est capté par les cellules du système nerveux central. Le 18F-FDG produit une image d'hyperfixation dans les régions sièges d'un important métabolisme

Les premiers résultats obtenus en microTEP mettent en évidence une diminution du métabolisme cérébral en réponse au LPS dans l'hippocampe, et plus précisément dans la région de la corne d'Amon (-11%), mesurée par marquage au glucose fluoré (18 F-FDG). L'invalidation de PKR semble atténuer l'effet du LPS sur le métabolisme cérébral.

A



B

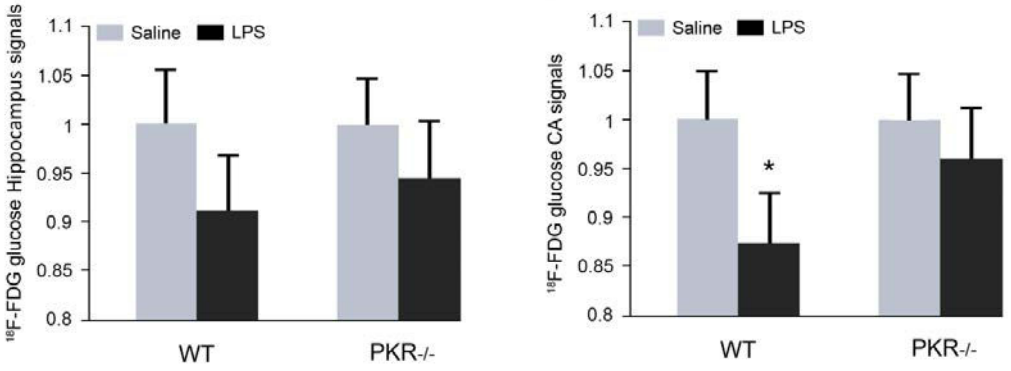


Figure 33: Variations du métabolisme cérébral mesuré en PET par marquage au glucose fluoré 18F-FDG chez les animaux WT et PKR -/- traités par LPS

A *: Histogrammes réprésentant la quantité de glucose fluoré (18F-FDG) incorporé dans le cortex des animaux WT et PKR-/- traités par LPS vs salin.*
B *: Histogrammes réprésentant la quantité de glucose fluoré (18F-FDG) incorporé dans l'hippocampe et dans la Corne d'Amon des animaux WT et PKR-/- traités par LPS vs salin.*
*n=4, *p<0,05, **p<0.01, p***<0.001*

II. Travaux réalisés en collaboration

Article 2 : « PKR down-regulation prevents neurodegeneration and β-amyloid production in thiamine deficient model ».

Dans cette étude, nous avons étudié l'effet de l'inhibition de PKR sur la neurodégénérescence et la production d'Aß dans un modèle murin de neurodégénérescence par carence en thiamine.

La carence en thiamine (vitamine B1) induit une neurodégénérescence dans le cerveau des mammifères, en particulier dans les noyaux thalamiques et le cervelet, associée à une altération chronique du métabolisme oxydatif et à une réaction inflammatoire. Chez l'homme, la carence en thiamine est associée au syndrome de Wernicke-Korsakoff, mais accompagne aussi d'autres troubles neurodégénératifs tels que la maladie d'Alzheimer. Chez la souris, le stress oxydatif induit par la carence en thiamine favorise l'accumulation d'Aß en régulant la maturation de BACE1, et l'activation de PKR et d'eIF2α.

Des souris adultes C57Bl/6J N-PKR -/- et WT ont reçu pendant 10 jours un régime carencé en thiamine associé à un traitement par un inhibiteur de la thiamine pyrophosphokinase. Des groupes contrôles ont reçu un régime normal et du salin.

La carence en thiamine induit chez les animaux WT une augmentation du métabolisme oxydatif et une réaction inflammatoire du SNC (en particulier dans le thalamus et le cervelet), l'activation de PKR et d'eIF2α et la production d'Aß. L'inhibition de PKR chez les animaux carencés en thiamine diminue l'activation d'eIF2α dans le thalamus et le cervelet, protège les neurones du noyau thalamique dorsomédian et les cellules de Purkinje de l'apoptose et diminue l'amyloïdogénèse *(voir article soumis pages suivantes)*

PKR down-regulation prevents neurodegeneration and β-amyloid production in thiamine deficient model.

Running Title: PKR modulates neurodegeneration and Aβ production.

François Mouton-Liger[1,2], Anne-Sophie Rebillat[1], Sarah Gourmaud[1,2], Claire Paquet[1,2,3], Audrey Leguen[1], Julien Dumurgier[2,3], Patrick Bernadelli[4], Veronique Taupin[4], Laurent Pradier[4], Thomas Rooney[4], Jacques Hugon[1,2,3].

[1]Inserm UMR-S942, 75010 Paris, France. [2]Department of Histology, Pathology and Biochemistry Saint Louis Lariboisière Fernand Hospital, Service AP-HP, University of Paris Diderot, 75010 Paris, France. [3]Clinical and Research Memory Center, Paris Nord Ile de France Saint Louis Lariboisière Fernand Hospital, AP-HP, University of Paris Diderot, 75010 Paris, France. [4]Sanofi-Aventis Therapeutic Strategy Unit Aging, 91380 Chilly-Mazarin, France.

Corresponding author: Dr. François Mouton-Liger

Inserm UMR-S 942. Groupe Hospitalier St Louis Lariboisière F.Widal. 2, rue Ambroise Paré. 75010 PARIS - FRANCE
Tel : +33153216681/ **Fax :** +33153216739 **Email Address:** francois.mouton-liger@inserm.fr

Aknowledgements: This work was supported by INSERM, Sanofi and APHP. The authors thank Mariko Taga, Dominique Briet, Clarisse Pace, Silvina Diaz and Cedric Mombereau for their technical help.

ABSTRACT

Brain thiamine homeostasis plays an important role in energy metabolism and displays reduced activity in Alzheimer's disease (AD). Thiamine deficiency (TD) induces regionally specific neuronal death in animal and human brains associated with a mild chronic impairment of oxidative metabolism. These features make the TD model amenable to investigate the cellular mechanisms of neurodegeneration. Once activated by various cellular stresses, including oxidative stress, PKR acts as a pro-apoptotic kinase and negatively controls the protein translation leading to an increase of BACE1 translation. In this study, we used a mouse TD model to assess the involvement of PKR in neuronal death and the molecular mechanisms of AD. Our results showed that the TD model activates the PKR-eIF2α pathway, increases BACE1 expression the levels of Aβ in specific thalamus nuclei and induces motor deficits and neurodegeneration. These effects are reversed by PKR down-regulation (using a specific inhibitor or in PKR knock-out mice).

KEYWORDS

PKR, Neurodegeneration, Thiamine deficiency, Amyloid β, BACE1.

INTRODUCTION

Thiamine (vitamin B1) deficiency (TD) induces regionally selective neurodegeneration in the mammal's brains, particularly in specific thalamus nuclei (submedial thalamus - SmTN and ventral lateral - VLN) and cerebellum[1, 2]. TD-induced neuronal loss is associated with a chronic impairment of oxidative metabolism and neuroinflammation associated with glial activation[3, 4]. Diminished thiamine-dependent processes in humans is associated with Wernicke-Korsakoff syndrome, but also accompany other neurodegenerative disorders such as Alzheimer's disease (AD) [5]. Experimental TD has been used to model the pathogenesis and investigate the cellular mechanisms of neurodegenerative disorders. In mice, TD-induced oxidative stress enhances Aβ accumulation by regulating β-site APP-cleaving enzyme 1 (BACE1) maturation. These effects are amplified in AD mouse model [6, 7].

The double-stranded RNA-dependent protein kinase (PKR) is one of the four mammalian serine-threonine kinases (the others being HRI, GCN2 and PERK) that catalyzes the phosphorylation of the α subunit of eIF2 (eukaryotic translation initiation factor-2) in response to stress signals, leading to an inhibition of protein synthesis[8, 9]. Activation of PKR is induced by various triggers such as viral infection and endoplasmic reticulum or oxidative stresses [10, 11] and could be controlled by an interaction with it specific activator PACT (RAX in rodents). PKR phosphorylation is known to play a significant role in AD [12] and cerebrospinal fluid (CSF) PKR levels could be used as a potential diagnostic biomarker in AD patients[13, 14]. PKR is a proapoptotic kinase[15] and can exert a number of toxic effects on neurons that could contribute to the functional and pathological alterations in AD brains. PKR also contributes to neurodegeneration and to the pathological molecular mechanisms observed in AD. PKR can mediate Tau phosphorylation induced by Aβ exposure in cell cultures[16]. Additionally,

several investigators have demonstrated that eIF2α phosphorylation, via PKR-induced cellular stress, leads to increased BACE1 mRNA translation when, paradoxically, global protein translation is inhibited[17, 18, 19, 20]. These alterations of BACE1 translational control could be explained by a stress-dependent phenomenon of translation initiation[21, 22, 23]. Moreover, PKR and eIF2α are highly phosphorylated in SmTN, and cerebellum of TD mouse model. Analyses performed on cerebellar granule neurons exposed to a thiamine metabolic antagonist suggest that TD-induced neuronal death could be partially mediated by PKR activation[24].

To date, all studies that have explored the deleterious role of PKR activation in neurodegeneration indicate that inhibition of PKR is a promising approach to inhibit pathological mechanisms. Moreover, recent studies have shown that the genetic lack of PKR enhances learning and memory in several behavioral tasks while increasing network excitability [25]. The goal of this study was to assess the role of PKR down-regulation on neurodegeneration and Aβ production in a mouse model of neurodegeneration.

RESULTS

TD induces regional oxidative stress and inflammation

To assess the consequences of the TD-induced stress cascade in our model, we evaluated the expression of markers of oxidative stress and microglial activation by immunofluorescence in brain of mice exposed to 10 days of thiamine deprivation (TD mice) compared to wild-type mice (WT). Malondialdehyde (MDA) is the end-product of lipid peroxidation and is commonly used as an oxidative stress marker. Using a MDA antibody, immunolabellings in TD mice brain showed a strong increase in staining in the cortical (not shown) and the thalamic neurons (37% of MDA positive neurons) in particular in the SmTN and the VLN, (57% and 42% of MDA positive neurons, respectively, Figure 1c). Neurons in WT mice showed weak MDA staining (5.8% of MDA positive neurons) (Figure 1b and 1c). Microglia cells in their inactive state are characterized by a highly branched (ramified) morphology. After activation, they gradually undergo a transition from ramified to round feature (amoeboid). The ratio of these two phenotypical states both stained by an IBA1 antibody (Ionized calcium-binding adaptor molecule 1) can be used as an indicator of microglial activation. Quantified immunofluorescence analyses of IBA1 positive microglia (IBA1+) in the thalamus revealed a 247% increase in the number of amoeboid cells in TD mice compared to controls (Figure 1d and 1e). The percentage of activated microglia was even greater in the SmTN (+343 %) and in the VLN (+289%) (Figure 1d).

TD enhances PKR activation in thalamus and cerebellum.

To determine whether the inflammatory responses and oxidative stress affect the phosphorylation and expression of PKR in TD mice, immunoblotting with antibodies directed against the threonine (446) phosphorylation site or the total PKR protein were performed in the thalamus, the cerebellum, the cortex and the hippocampus (Figure 2a). Quantification of the $pPKR_{Thr446}$/PKR ratio showed a strong increase after TD in the thalamus, in cerebellum and in cortex of 139%, 95% and 43%, respectively (Figure 2b). By contrast, there was no significant change in pPKR in the hippocampus (Figure 2b).

To explore the signaling pathway at the origin of PKR activation in TD, we performed immunoblots of the PKR main stress-dependent inducer, RAX, and the data revealed a significant increase in RAX in the thalamus and cerebellum (Supplementary Figure 1). PKR knockout ($PKR^{-/-}$) mice are viable, phenotypically indistinguishable from their wild-type [26] and have been used in several studies to test the protective role of PKR [25, 27]. As expected, we did not detect a 65kDa PKR band in brain samples of $PKR^{-/-}$ mice (Supplementary Figure 2). We extended the above TD findings by counting $pPKR_{Thr446}$ positive immunoreactive cells in the whole thalamus and in specific nuclei in the SmTN and VLN known to be more strongly affected by TD (Figure 2c and 2d) in animals pretreated (30 mg/kg per os) or not with a PKR inhibitor (PKRinh) provided by Sanofi®. There was a significant enhancement of $pPKR_{Thr446}$ expression after TD exposure and this was decreased in after PKRinh pretreatment (-51% in total thalamus, -52% in SmTN, -54% in VLN) (Figure 2d) were observed in both structures. A comparable TD-induced increased of $pPKR_{Thr446}$ staining was detected in cerebellum where $pPKR_{Thr446}$ is mostly present in Purkinje cell bodies and their arborizations (arrows) (+192%)

(Figure 2e and 2f). In TD mice pretreated with PKRinh, the number of PKR positive neurons was significantly reduced (58.9%) (Figure 2f).

PKR inhibition reduces eIF2α activation in TD

To test if TD-induced PKR activation could control eIF2α phosphorylation, we performed immunoblot analyses in mice pretreated or not with PKRinh or in $PKR^{-/-}$ mice. PKRinh inhibits eIF2α phosphorylation in the thalamus (-31%) and in cerebellum (-39%) (Figure 3a and 3b). After genetic knockdown of PKR, TD-eIF2α activation was also reduced (Figure 3b). Quantified immunofluorescence of peIF2α_{Ser51} positive neurons has confirmed these effects in the studied structures (Figure 4a and 4b). We also found that immunostaining for peIF2α_{Ser51} has a neuronal localization in the thalamus in the ventral posterolateral nucleus (VPL) with a strongest labeling in the SmTN and to a lesser extent in the VLN (Figure 4c).

In cerebellum, TD-dependant activation of peIF2α_{Ser51} was predominantly observed in cell bodies and processes of Purkinje cells. As expected, peIF2α_{Ser51} staining is reduced by down-regulation or inhibition of PKR (Figure 4b and 4d).The expression of peIF2α_{Ser51} signals showed a high degree of colocalization with pPKR$_{Thr446}$ staining in the thalamus (not shown) and in cerebellar Purkinje cells (Figure 4e). Of the four known eIF2α kinases, the most likely to be induced by vitamin B1 deficiency is PKR. Therefore, we try to determine whether PERK, activated by the ER stress/unfolded protein response, GCN2 and HRI could contribute to TD-eIF2α activation. Immunoblots of thalamus and cerebellum samples from TD and control mice did not reveal any statistically significant variations of the pPERK$_{Thr980}$/PERK ratio and HRI levels (Supplementary Figure 3a and 3b). However, we observed a 38.3% increase

(p=0.044) of $pGCN2_{Thr899}$/GCN2 ratio in TD thalamus compared to control (Supplementary Figure 3a and 3c).

PKR inhibition reduces neuronal loss and neurodegeneration due to TD

The neuronal nuclei (NeuN) antigen was used as a specific neuronal marker to quantify neuronal cell loss under various pathological conditions. Cell counting of NeuN positive neurons in TD and control mice did not reveal any significant decrease in the various brain areas evaluated: cortex, cerebellum, hippocampus and thalamus (data not shown). However the evaluation in two specific thalamus nuclei (Figure 5a), in SmTN and VLN displayed a significant decrease of neuron density (54% and 37%, respectively) (Figure 5b). The pre-treatment of mice with PKRinh before TD induction or TD context in Knock-down PKR ($PKR^{-/-}$) significantly reduced neuronal loss observed in the TD-SmTN (-73%). Similar protective effect have been found by pre-treating TD-mice with PKRinh in SmTN (-42%) and VLN (-39%). We then investigated the presence of damaged neurons in different thalamic areas using Fluoro-Jade B (F-J B), an anionic fluorescein derivative that has been reported to specifically stain degenerating neurons. As expected, we did not detect any staining in Wt mice (Figure 5c). In TD thalamus, 97% of F-J B + cells were present in the SmTN or VLN. PKR inhibition did not affect the total number of F-J B stained cells (Figure 5d). To take into account the decrease neuronal density due to TD, we have adjusted the number of F-J B positive neurons to the total number of neurons counted in Figure 5b. Down-regulation of PKR significantly reduced the number of damaged neurons in TD SmTN (-62%) and VLN (-46%). Similar results were obtained in TD mice pretreated with PKRinh (57% and 30%, respectively) (Figure 5e).

At the opposite, we did not observe any effect of PKR inhibition on oxidative stress (Supplementary Figure 4) or microglial activation (Supplementary Figure 5). In summary, PKR inhibition prevents neuronal loss induced by TD but has no effect on TD-induced oxidative stress or neuroinflammation.

Finally, to determine if TD could lead to caspase 3-mediated apoptosis mainly in the SmTN, we quantified the number of neurons positive for a cleaved-caspase 3 antibody (Figure 6a). There was a large increase in apoptosis (+98% of positive cells) in the SmTN (Figure 6b). In addition, cleaved-caspase 3 stainings was also increased in TD purkinje cells (+46% of positive cells) (Figure 7D-E). Interestingly, cleaved-caspase 3 and $pPKR_{Thr446}$ staining showed a high degree of colocalization in the SmTN (Figure 6c) and cerebellum (not shown). Inhibition of PKR, either by PKRinh or in $PKR^{-/-}$ mice, significantly reduced TD-induced caspase 3 levels in SmTN neurons (35% and 44% respectively) (Figure 6b), but not in Purkinje cells (Figure 6d and 6e).

PKR down-regulation inhibited amyloidogenic APP processing in vivo and Aβ production

Previous studies have shown that PKR-induced eIF2α phosphorylation could increase BACE1 translation[17, 18]. To evaluate the functional importance of the PKR-eIF2α pathway in amyloidogenic signaling in TD mice, APP processing was assessed by immunoblotting of APP, BACE1 mature form and amyloid oligomers (Figure 7a). Quantified Immunoblot demonstrated that BACE1 protein and amyloid β levels are significantly increased in TD thalamus (by 110% and 52%, respectively) (Figure 7b and 7d). The TD-induced Aβ increase was confirmed by using Elisa assay for soluble Aβ (Figure 7e). By contrast, there were no changes in mRNA levels of BACE1 measured by real-time quantitative PCR (Figure 7c) or in APP protein expression in TD mice compared to control mice (Figure 7f). After 10 days of TD, $PKR^{-/-}$ and PKRinh pretreated mice both exhibit a significantly reduced levels of Aβ levels in the thalamus (-39% and -33%). In summary, PKR blockade attenuates Aβ levels in TD mice.

We also investigated a potential role of PKR down-regulation on Tau hyperphosphorylation by quantifying levels of pTau on three hyperphosphorylated sites (AT8, AT100 and AT180) and of two kinases, JNK and GSK-3β, known to phosphorylate Tau in stress conditions. Comparisons of thiamine deficient with control mice did not reveal any difference in AT100, AT180, GSK-3β and JNK activation ratio (Supplementary Figure 6).

Decreasing PKR activation mitigates motor deficits.

Marked motor deficits have already been described in several TD models[28]. We therefore assessed motor coordination and balance in our TD mice using a rotarod apparatus (Figure 8a). Analyses of latency to fall in TD and control mice on an accelerating rotarod revealed a significant progressive decline of motor performance from day 8 in TD mice (Figure 8b). PKR down-regulation, either by PKRinh administration or by using $PKR^{-/-}$mice, significantly reduced motor decline at day 8 in TD mice (Figure 8b). After 10 days, motor performance scores of deficient mice were strongly impaired and were not modified by PKR inhibition. Rotarod results of TD mice have to be related to the general status of the mice, as evaluated in this study by body weight measurement (Supplementary Figure 7). In comparison to non-deficient mice, TD mice exhibit a dramatic weight loss starting at day 8 that is not reduced by PKR inhibition. Finally, we also measured $pPKR_{Thr446}$ and $peIF2\alpha_{Ser51}$ in gastrocnemius muscle in order to evaluate a role of PKR-eIF2α pathway inhibition in muscle. Immunoblot analyses did not reveal any variation in the phosphorylation ratios of these two proteins (Supplementary Figure 8).

DISCUSSION

In the present study, we provide experimental data supporting the concept that "*in vivo*" inhibition of the double-stranded RNA activated protein kinase PKR, originally identified as a sensor of virus infection [29], has a neuroprotective action and can decrease Aβ production in a mouse model of neurodegeneration.

TD induces a strong increase of brain PKR activation, particularly in the thalamus and cerebellum. These observations are consistent with the previous study of Wang et al., which showed a progressive increase of PKR phosphorylation on threonine 446 and 451, in these two structures, from the fifth day of TD [24]. In our work, we have described the histological localization of $pPKR_{Thr446}$ overexpression in TD brain. In the thalamus TD-induced, PKR activation is mainly detected in the submedial and ventrolateral nuclei which are also the brain areas most strongly affected by oxidative stress and inflammation. The expression of activated PKR in the cerebellum is mainly in the purkinje layer which is partly comparable to the findings described by our group in human brain affected by prion diseases that can trigger PKR activation [30]. This expression pattern is also in line with the PKR mRNA profile visible on the Allen Brain Atlas which shows a strong expression in Purkinje cells. Additionally, it is known that PACT, or its murine counterpart RAX, is responsible for cellular PKR activation in response to a variety of extracellular stresses [31, 32]. After ethanol exposure, which shares common features with TD, RAX protein located in purkinje layer interacts with PKR to reduce neuronal survival [33]. After TD we have also observed a significant increase of RAX levels in the cerebellum and at a lower magnitude in thalamus, suggesting that RAX could mediate PKR activation in this TD cerebellum.

In vivo inhibition of PKR has been recently shown to exhibits significant positive effects such as enhancing memory and learning in behavioral tasks while increasing network excitability [25, 34, 35, 36] and protecting animals from high-fat diet-induced insulin resistance and glucose intolerance [27]. Previous studies in neuronal cultures have shown that PKR inhibition can attenuate neuronal death induced by various stresses including Aβ neurotoxicity [37, 38]. In the present study we used a well described PKR knockout model [26] and a selective inhibitor of PKR activation (provided by Sanofi®) to further evaluate the role of PKR in neurodegeneration *in vivo*. One of the major findings of this work is the validation that PKR inhibition can protect against neuronal loss in a model characterized by oxidative stress and neuroinflammation. Thalamic regional neuronal loss in TD rodents was described several times by the group of Gibson [39, 40, 41]. Nonetheless, the cellular mechanisms underlying this neuronal loss are not fully understood. One of the major hypotheses to consider is the proapoptotic effect of PKR activation, through triggering of a downstream caspase cascade [42]. By suppressing PKR in our TD model, we probably reduce neuronal loss due to apoptosis and consequently the proportion of damaged neurons. This possibility is consistent with the immunohistochemical results revealing that enhanced cleaved caspase 3 levels are strongly colocalized with $pPKR_{Thr446}$ and significantly reduced after PKR down-regulation in the thalamus. In cerebellum, the increase of cleaved caspase 3 detected in Purkinje cells was not associated with a reduced number of these neurons. Ten days of TD in our model may not be sufficient to observe this phenomenon which is detected in humans brains affected by Wernicke's encephalopathy [1]. Moreover, inhibition of PKR also leads to a decrease in the number of damaged neurons marked by F-J B staining in TD SmTN and VLN.

PKR can control the inflammasome and is involved in the general process of innate immunity and inflammation [43]. However, we did not detect any modifications of the levels of microglial

activation or oxidative stress in TD mice pretreated with PKRinh or in $PKR^{-/-}$ mice. This findings suggest that, in the TD model, PKR inhibition acts downstream of the initial abnormal pathways associated with the lack of vitamin B1 and that the neuroprotective and functional effects obtained with PKR inhibition could be more related to the lack of activation of intrinsic or extrinsic apoptotic pathways [42] or by a late regulation of autophagy[44, 45].

During the last years, *in vitro* studies have demonstrated a role for eIF2α kinases, and in particular PKR, in the translational control of BACE1 levels and in the amyloidogenic pathway [17, 18, 19]. Here, we demonstrate a similar role for PKR on amyloid processes *in vivo*. The activation of eIF2α by TD is strongly co-localized with $pPKR_{Thr446}$ and is reduced by PKR down-regulation. In parallel, the levels of the other major stress-induced eIF2α kinases, activated PERK and HRI remain unchanged in TD thalamus and TD cerebellum. Activated GCN2 is slightly increased only in TD thalamus. Together the finding from PKR-/- mice and the use of PKR inhibitor suggest that eIF2α phosphorylation is mainly under the control of PKR in this TD model. A previous report has revealed that TD increases β-secretase activity without effect on γ-secretase activity, which leads to an increase of Aβ production [7]. Our results support this action on BACE1 levels and that PKR inhibition can attenuate this increase in amyloid production and BACE1 expression. A previous work has shown that OS can induce BACE1 transcription through JNK activation [46]. The assessment of BACE1 mRNA levels and pJNK levels are not in favor of this possibility in TD model. Further data using JNK inhibitors in the TD model will be worth trying. Taken together, these results suggest that the increase of BACE1 levels in TD is regulated, at least in part, by a translational mechanism initiated by the PKR/eIF2α pathway. Zhao et al., have demonstrated that pyrithiamine treatment and diet-induced TD exacerbated Aβ accumulation in the brain of APP/PS1 transgenic mice. On

the other hand, they also described an enhanced number of phosphorylated Tau-positive cells associated with an alteration of GSK3-β activation. However, in our model, we have not observed any variations of Tau phosphorylation and GSK-3β activation, suggesting that an AD brain environment might be necessary for TD-dependent phosphorylation of Tau.

The major functional finding of our study is that using $PKR^{-/-}$ or exposed TD mice to specific inhibitor PKRinh significantly reduced the decline of rotarod performance in TD mice at day 8. The use of the accelerating rotarod test, a highly reproducible method to assess the motor deficit in mice [47], was initiated according to the findings obtained in previous studies on TD models [28]. In our model, a progressive performance decline was detected starting at days 7 in TD mice (Figure 7) and was transiently reduced at day 8 by PKR inhibition. This effect could be related to the neuroprotective effect of PKR inhibition in thalamus and Purkinje cells and could be explained in several ways. (i) neuronal loss occurs in SmTN which is part of VPL and in VLN of the thalamus. VLN serves as a central integrative functional division in the thalamic nuclei for motor control, receiving inputs from the cerebellum, striatum, and cortex [48]. (ii) biochemical abnormalities of the PKR, eIF2α and caspase 3 in purkinje cells which are known to regulate and coordinate motor movements. Further electrophysiological studies analyzing Purkinje cells in TD model will be needed in the future. The strong and global imbalance of the physiologic state of TD animals, as illustrated by the dramatic weight loss observed in all TD mice (with or without PKR suppression) could explain this lack of motor effect of PKR down regulation at day 9 and 10 of TD. Other motor performance tests carried out at the beginning of the decline could strengthen this hypothesis.

In conclusion, our results demonstrate that *in vivo* inhibition of PKR can allow neuroprotection and functional improvement in a TD model of neurodegeneration. In

addition, PKR can modulate the *in vivo* production of Aβ. It is known that PKR is activated in AD brains and other human neurodegenerative disorders [30, 49] and that activated PKR is increased in the CSF of AD patients [14]. In the future, pharmacological inhibition of PKR might therefore represent a valid target to slow neurodegeneration in several human diseases.

METHODS

Mice.

All animal experiments in this study were performed in accordance with the guidelines of the French Agriculture and Forestry Ministry for handling animals (decree 87849, license A75-05-22). PKR knockout ($PKR^{-/-}$) mice were obtained by disruption of the Pkr gene introduced in embryonic stem cells, which were injected into C57BL/6 blastocysts. The chimeric mice were bred to C57BL/6 mice and the progeny homozygous for the disrupted allele, as previously published [26].

TD was induced in animals as previously described [39, 41]. Briefly, mice were housed in a controlled environment (one mouse/cage at 23°C and 53% humidity). The animals were fed for ten days with either a control diet (Safe, Augy, France) or a thiamine deficient diet (Safe) *ad libitum*. TD animals additionally received a daily intraperitoneal injection of a thiamine pyrophosphokinase inhibitor [50], pyrithiamine hydrobromide (Sigma, St. Louis, MO) (0.5 mg/kg body weight) while control animals were injected with saline. Body weights were measured one time per day from day 0 to 10.

For brain preparation, mice were anaesthetized with pentobarbital (40 mg/kg, i.p.) and received an intracardial perfusion with cold PBS. Brains were removed and dissected on ice then placed in 4% (w/v) paraformaldehyde in PBS for immunohistochemistry or immediately frozen in liquid nitrogen for immunoblotting or quantitative RT-PCR.

Pharmacological inhibition of PKR.

An inhibitor of PKR activation, with IC50 value of 2 nM (Reaction Biology Corporation, Malvern, PA, USA) was provided by Sanofi® and administrated daily by oral gavage

(30mg/kg). The IC50 values for the other eIF2α kinases are, 14 nM for GCN2, 1030 nM for PERK and 1410 nM for HRI. The first administration of PKR inhibitor started one day before the beginning of the thiamine deficiency diet.

Rotarod performance.

The rotarod apparatus (Columbus Instruments, Columbus, OH) was used to evaluate the motor coordination and balance of rodents and is especially sensitive in detecting cerebellar dysfunction. Mice were trained for two consecutive days to become acquainted with the rotarod apparatus. Motor performances were assessed in WT and $PKR^{-/-}$ mice from day 1 to 10 with an acceleration range of 4 to 40 rpm in 5 min. The latency to fall off the rotating rod per rotation speed level was recorded as a measure of motor function.

Immunoblot analyses and ELISA.

Thalamus, cerebellum, cortices, hippocampi and gastrocnemius muscles were homogenized and sonicated in a radio immune precipitation assay buffer (RIPA buffer) containing 25 mM β-glycerophosphate, 50 mM sodium fluoride, 2 mM Sodium pyrophosphate, protease inhibitor cocktail (Roche, Penzberg, Germany), 1 mM Sodium orthovanadate, and 0.1 mM calyculin (Sigma) as phosphatase inhibitors. They were centrifuged at 20 000 g for 10 minutes. The protein concentration was determined with Micro BCA Protein Assay Reagent Kit (Thermo scientific, Cergy-Pontoise, France) using the manufacturer's protocol. Protein samples (25 to 40 µg for each samples) were separated on gradient NuPAGE Bis-Tris gels (Invitrogen) and then electroblotted onto nitrocellulose membranes (GE Healthcare, Chalfont St. Giles, UK) in 25 mM Tris, (pH 8.3), 200 mM glycine and 20% ethanol. After

protein transfer, membranes were blocked in 5% milk in TBS, and then incubated with primary antibody.

The following primary antibodies were used in immunoblots: Mouse anti-Amyloid β (Millipore, Billerica, MA, USA), rabbit anti-BACE1 (Santa Cruz, Danvers, MA, USA), mouse anti-phosphorylated GSK-3β_{Tyr216} (pGSK-3β_{Tyr216}) (BD Transduction Laboratories, San Jose, CA, USA), rabbit anti-pGSK-3β_{Ser9} (Cell Signaling, Beverly, MA, USA), mouse anti-GSK-3β (Santa Cruz), anti-phosphorylated JNK$_{Thr183/Tyr185}$ (pJNK$_{Thr183/Tyr185}$), mouse anti-JNK (Santa Cruz), rabbit anti-phosphorylated PKR$_{Thr446}$ (pPKR$_{Thr446}$) (Santa Cruz), rabbit anti-PKR (Santa Cruz), goat anti-PACT/RAX (Santa Cruz), rabbit anti-phosphorylated PERK$_{Thr981}$ (pPERK$_{Thr981}$) (Santa Cruz), rabbit anti-PERK (Santa Cruz), rabbit anti-phosphorylated eIF2α_{Ser51} (peIF2α_{Ser51}) (Cell Signaling), rabbit anti-eIF2α (Cell Signaling), rabbit anti-phosphorylated GCN2$_{Thr899}$ (pGCN2$_{Thr899}$) (Abcam, Cambridge, UK), rabbit anti-GCN2 (Cell Signaling), rabbit anti-HRI (Abcam), mouse AT8 (Ser202) (Innogenetics, Ghent, Belgium), mouse AT100 (Ser212/Thr214) (Thermo Scientific, Cergy Pontoise, France), mouse AT180 (Thr231/Ser235) (Thermo Scientific), mouse anti-Tau (Thermo Scientific) and mouse anti-Tubulin (Santa Cruz). IR Dye 700DX conjugated anti-mouse IgG, IR Dye 800CW conjugated anti-goat IgG and IR Dye 800CW conjugated anti-rabbit IgG (Rockland Immunochemical Inc., Gilbertsville, PA, USA) were used as secondary antibodies. Bound proteins were visualized with the Odyssey Imaging System (Li-Cor Biosciences, Lincoln, NE, USA) and quantified with Multigauge software (Fuji film, Tokyo, Japan). ELISA was used to assess Aβ_{1-42} levels in thalamus samples. Frozen extracts were centrifuged, and the soluble supernatant fractions were collected. The insoluble materials were then dissolved with lysis buffer containing 8% SDS, urea, and 5 mM EDTA. Aβ levels were quantified using mouse Aβ_{1-42} ELISA kit (Invitrogen) following the

manufacturer's instructions. The absorbance was read at 450 nm using a 96 well plate reader, and Aβ levels were calculated from a standard curve.

Fluoro-Jade B histofluorescence

Fluoro-Jade B (a high affinity fluorescent marker for the localization of neuronal degeneration) (Millipore) staining was carried out according to the method described in a previous study [51]. In brief, the sections were first immersed in a solution containing 1% sodium hydroxide in 80% alcohol. They were then incubated in a solution of 0.06% potassium permanganate, and transferred to a 0.0004% Fluoro-Jade B staining solution. With this method neurons that undergo degeneration brightly fluoresce in comparison to the background.

Immunohistofluorescence and confocal imaging.

The other hemi-brain from each mouse was sagitally sectioned on a cryostat apparatus at 10 µm. Sections were processed for immunohistofluorescence blocking solution was PBS (phosphate buffered saline)/0.25% gelatin/5% normal donkey serum/0.3% Triton. Primary antibodies and secondary donkey antibodies were incubated at 4°C for 24 h and at RT for 2 h, respectively, in PBS/0.125% gelatin/0.3% Triton. The primary antibodies used for immunofluorescence were as follows: rabbit anti-$pPKR_{Thr446}$ (Sigma), rabbit anti-$peIF2\alpha_{Ser51}$ (Cell Signaling), rabbit anti-caspase 3 active fragment (BD Bioscience, San Jose, CA, USA), mouse anti-NeuN (Millipore), rabbit anti-Malonaldehyde desoxyguanosine (MDA) (Abcam) and rabbit anti-ionized binding molecule adaptor 1 (Iba1) (Wako, Osaka, Japan). Secondary antibodies were donkey anti-mouse Alexa Fluor 488 (Invitrogen) or donkey anti-rabbit Cy3 (Jackson Laboratory, Bar Harbor, Maine, USA). For double confocal immunohistochemistry

with antibodies from the same species, we used labeled Fab techniques. This approach need to label individually with Zenon kit (Lifescience) one of the primary antibodies with fluorescent labeled-Fab, according to manufacturer's protocol.

Standard epifluorescence images were acquired on a Leica DMRD microscope using a high-resolution camera (Coolsnap HQ). Confocal imaging was performed using a Leica SP2 confocal microscope. The Metamorph software (Roper Scientific, Sarasota,FL, USA) was used for image acquisition.

Quantitative RT-PCR. Total RNA was isolated using TRIzol reagent (Invitrogen) from SH-SY5Y cells. SuperScript II reverse transcriptase kit (Invitrogen) with random decamer priming was used to synthesize the first strand cDNA from samples with an equal amount of total RNA (1µg), according to the manufacturer's instructions. cDNA samples were forwarded to amplification with specific primers for BACE1 and GAPDH using SYBR Green technology (Invitrogen) and the Stratagene Mx3005P PCR cycler (Agilent Technologies, Massy, France). Human BACE1 primers [forward 5'-GCAGGGCTACTACGTGGAGA-3' and reverse 5'-GTATCCACCAGGATGTTGAGC-3'], human GAPDH primers, [forward 5'-AATCCCATCACCATCTTCC-3' and reverse 5'-GGACTCCACGACGTACTCA-3'] were used in the present studies. cDNA amplification was carried out as follows: denaturation at 94°C for 2 minutes, followed by 35 cycles of denaturation at 94°C for 15 seconds, primer annealing at 62°C for 30 seconds, and extension at 72°C for 40 seconds. A final extension was carried out at 72°C for 10 minutes, ending with a 4°C hold cycle. All assays were performed in triplicate, and BACE1 and PKR mRNA levels were normalized with the expression levels of GAPDH. Relative levels and gene copy numbers were calculated using the deltaCp method, as described by Pfaffl [52].

Statistical Analysis. Statistical analysis was performed using GraphPad Prism 5 (GraphPad Software, Inc., La Jolla, CA 92037 USA). Results were considered significant when $p<0.05$ using a non-parametric Mann and Whitney test.

REFERENCES

1. Baker KG, Harding AJ, Halliday GM, Kril JJ, Harper CG. Neuronal loss in functional zones of the cerebellum of chronic alcoholics with and without Wernicke's encephalopathy. *Neuroscience* 1999, **91**(2)**:** 429-438.

2. Chornyy S, Parkhomenko J, Chorna N. Thiamine deficiency caused by thiamine antagonists triggers upregulation of apoptosis inducing factor gene expression and leads to caspase 3-mediated apoptosis in neuronally differentiated rat PC-12 cells. *Acta Biochim Pol* 2007, **54**(2)**:** 315-322.

3. Karuppagounder SS, Shi Q, Xu H, Gibson GE. Changes in inflammatory processes associated with selective vulnerability following mild impairment of oxidative metabolism. *Neurobiol Dis* 2007, **26**(2)**:** 353-362.

4. Ke ZJ, Gibson GE. Selective response of various brain cell types during neurodegeneration induced by mild impairment of oxidative metabolism. *Neurochem Int* 2004, **45**(2-3)**:** 361-369.

5. Heroux M, Raghavendra Rao VL, Lavoie J, Richardson JS, Butterworth RF. Alterations of thiamine phosphorylation and of thiamine-dependent enzymes in Alzheimer's disease. *Metab Brain Dis* 1996, **11**(1)**:** 81-88.

6. Karuppagounder SS, Xu H, Shi Q, Chen LH, Pedrini S, Pechman D*, et al.* Thiamine deficiency induces oxidative stress and exacerbates the plaque pathology in Alzheimer's mouse model. *Neurobiol Aging* 2009, **30**(10)**:** 1587-1600.

7. Zhang Q, Yang G, Li W, Fan Z, Sun A, Luo J*, et al.* Thiamine deficiency increases beta-secretase activity and accumulation of beta-amyloid peptides. *Neurobiol Aging* 2011, **32**(1)**:** 42-53.

8. Dever TE. Gene-specific regulation by general translation factors. *Cell* 2002, **108**(4)**:** 545-556.

9. Proud CG. eIF2 and the control of cell physiology. *Semin Cell Dev Biol* 2005, **16**(1)**:** 3-12.

10. Der SD, Yang YL, Weissmann C, Williams BR. A double-stranded RNA-activated protein kinase-dependent pathway mediating stress-induced apoptosis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1997, **94**(7)**:** 3279-3283.

11. Pyo CW, Lee SH, Choi SY. Oxidative stress induces PKR-dependent apoptosis via IFN-gamma activation signaling in Jurkat T cells. *Biochem Biophys Res Commun* 2008, **377**(3)**:** 1001-1006.

12. Chang RC, Suen KC, Ma CH, Elyaman W, Ng HK, Hugon J. Involvement of double-stranded RNA-dependent protein kinase and phosphorylation of eukaryotic initiation factor-2alpha in neuronal degeneration. *J Neurochem* 2002, **83**(5)**:** 1215-1225.

13. Dumurgier J, Mouton-Liger F, Lapalus P, Prevot M, Laplanche JL, Hugon J*, et al.* Cerebrospinal fluid PKR level predicts cognitive decline in Alzheimer's disease. *PLoS One* 2013, **8**(1)**:** e53587.

14. Mouton-Liger F, Paquet C, Dumurgier J, Lapalus P, Gray F, Laplanche JL*, et al.* Increased cerebrospinal fluid levels of double-stranded RNA-dependant protein kinase in Alzheimer's disease. *Biol Psychiatry* 2012, **71**(9)**:** 829-835.

15. Peidis P, Papadakis AI, Muaddi H, Richard S, Koromilas AE. Doxorubicin bypasses the cytoprotective effects of eIF2alpha phosphorylation and promotes PKR-mediated cell death. *Cell Death Differ* 2010.

16. Bose A, Mouton-Liger F, Paquet C, Mazot P, Vigny M, Gray F*, et al.* Modulation of tau phosphorylation by the kinase PKR: implications in Alzheimer's disease. *Brain Pathol* 2011, **21**(2)**:** 189-200.

17. Ill-Raga G, Palomer E, Wozniak MA, Ramos-Fernandez E, Bosch-Morato M, Tajes M*, et al.* Activation of PKR causes amyloid ss-peptide accumulation via de-repression of BACE1 expression. *PLoS One* 2012, **6**(6)**:** e21456.

18. Mouton-Liger F, Paquet C, Dumurgier J, Bouras C, Pradier L, Gray F*, et al.* Oxidative stress increases BACE1 protein levels through activation of the PKR-eIF2α pathway. *BBA - Molecular Basis of Disease* 2012.

19. O'Connor T, Sadleir KR, Maus E, Velliquette RA, Zhao J, Cole SL*, et al.* Phosphorylation of the translation initiation factor eIF2alpha increases BACE1 levels and promotes amyloidogenesis. *Neuron* 2008, **60**(6)**:** 988-1009.

20. Tajes M, Ill-Raga G, Palomer E, Ramos-Fernandez E, Guix FX, Bosch-Morato M*, et al.* Nitro-oxidative stress after neuronal ischemia induces protein nitrotyrosination and cell death. *Oxid Med Cell Longev* 2013, **2013:** 826143.

21. De Pietri Tonelli D, Mihailovich M, Di Cesare A, Codazzi F, Grohovaz F, Zacchetti D. Translational regulation of BACE-1 expression in neuronal and non-neuronal cells. *Nucleic Acids Res* 2004, **32**(5)**:** 1808-1817.

22. Lammich S, Schobel S, Zimmer AK, Lichtenthaler SF, Haass C. Expression of the Alzheimer protease BACE1 is suppressed via its 5'-untranslated region. *EMBO Rep* 2004, **5**(6)**:** 620-625.

23. Mihailovich M, Thermann R, Grohovaz F, Hentze MW, Zacchetti D. Complex translational regulation of BACE1 involves upstream AUGs and stimulatory elements within the 5' untranslated region. *Nucleic Acids Res* 2007, **35**(9)**:** 2975-2985.

24. Wang X, Fan Z, Wang B, Luo J, Ke ZJ. Activation of double-stranded RNA-activated protein kinase by mild impairment of oxidative metabolism in neurons. *J Neurochem* 2007, **103**(6)**:** 2380-2390.

25. Zhu PJ, Huang W, Kalikulov D, Yoo JW, Placzek AN, Stoica L*, et al.* Suppression of PKR promotes network excitability and enhanced cognition by interferon-gamma-mediated disinhibition. *Cell* 2011, **147**(6)**:** 1384-1396.

26. Yang YL, Reis LF, Pavlovic J, Aguzzi A, Schafer R, Kumar A*, et al.* Deficient signaling in mice devoid of double-stranded RNA-dependent protein kinase. *EMBO J* 1995, **14**(24)**:** 6095-6106.

27. Nakamura T, Furuhashi M, Li P, Cao H, Tuncman G, Sonenberg N*, et al.* Double-stranded RNA-dependent protein kinase links pathogen sensing with stress and metabolic homeostasis. *Cell* 2011, **140**(3)**:** 338-348.

28. Shi Q, Karuppagounder SS, Xu H, Pechman D, Chen H, Gibson GE. Responses of the mitochondrial alpha-ketoglutarate dehydrogenase complex to thiamine deficiency may contribute to regional selective vulnerability. *Neurochem Int* 2007, **50**(7-8)**:** 921-931.

29. Garcia MA, Meurs EF, Esteban M. The dsRNA protein kinase PKR: virus and cell control. *Biochimie* 2007, **89**(6-7)**:** 799-811.

30. Paquet C, Bose A, Polivka M, Peoc'h K, Brouland JP, Keohane C*, et al.* Neuronal phosphorylated RNA-dependent protein kinase in Creutzfeldt-Jakob disease. *J Neuropathol Exp Neurol* 2009, **68**(2)**:** 190-198.

31. Paquet C, Mouton-Liger F, Meurs EF, Mazot P, Bouras C, Pradier L*, et al.* The PKR activator PACT is induced by Abeta: involvement in Alzheimer's disease. *Brain Pathol* 2011, **22**(2)**:** 219-229.

32. Patel CV, Handy I, Goldsmith T, Patel RC. PACT, a stress-modulated cellular activator of interferon-induced double-stranded RNA-activated protein kinase, PKR. *J Biol Chem* 2000, **275**(48)**:** 37993-37998.

33. Chen G, Ma C, Bower KA, Ke Z, Luo J. Interaction between RAX and PKR modulates the effect of ethanol on protein synthesis and survival of neurons. *J Biol Chem* 2006, **281**(23)**:** 15909-15915.

34. Lourenco MV, Clarke JR, Frozza RL, Bomfim TR, Forny-Germano L, Batista AF*, et al.* TNF-alpha Mediates PKR-Dependent Memory Impairment and Brain IRS-1 Inhibition Induced by Alzheimer's beta-Amyloid Oligomers in Mice and Monkeys. *Cell Metab* 2013, **18**(6)**:** 831-843.

35. Medinas DB, Hetz C. Proteostasis Impairment: At the Intersection between Alzheimer's Disease and Diabetes. *Cell Metab* 2013, **18**(6)**:** 771-772.

36. Jiang Z, Belforte JE, Lu Y, Yabe Y, Pickel J, Smith CB*, et al.* eIF2alpha Phosphorylation-dependent translation in CA1 pyramidal cells impairs hippocampal memory consolidation without affecting general translation. *J Neurosci* 2010, **30**(7)**:** 2582-2594.

37. Chang RC, Wong AK, Ng HK, Hugon J. Phosphorylation of eukaryotic initiation factor-2alpha (eIF2alpha) is associated with neuronal degeneration in Alzheimer's disease. *Neuroreport* 2002, **13**(18)**:** 2429-2432.

38. Page G, Rioux Bilan A, Ingrand S, Lafay-Chebassier C, Pain S, Perault Pochat MC*, et al.* Activated double-stranded RNA-dependent protein kinase and neuronal death in models of Alzheimer's disease. *Neuroscience* 2006, **139**(4)**:** 1343-1354.

39. Calingasan NY, Chun WJ, Park LC, Uchida K, Gibson GE. Oxidative stress is associated with region-specific neuronal death during thiamine deficiency. *J Neuropathol Exp Neurol* 1999, **58**(9)**:** 946-958.

40. Ke ZJ, Calingasan NY, DeGiorgio LA, Volpe BT, Gibson GE. CD40-CD40L interactions promote neuronal death in a model of neurodegeneration due to mild impairment of oxidative metabolism. *Neurochem Int* 2005, **47**(3)**:** 204-215.

41. Ke ZJ, DeGiorgio LA, Volpe BT, Gibson GE. Reversal of thiamine deficiency-induced neurodegeneration. *J Neuropathol Exp Neurol* 2003, **62**(2)**:** 195-207.

42. Garcia MA, Gil J, Ventoso I, Guerra S, Domingo E, Rivas C*, et al.* Impact of protein kinase PKR in cell biology: from antiviral to antiproliferative action. *Microbiol Mol Biol Rev* 2006, **70**(4)**:** 1032-1060.

43. Heneka MT, Kummer MP, Stutz A, Delekate A, Schwartz S, Vieira-Saecker A*, et al.* NLRP3 is activated in Alzheimer's disease and contributes to pathology in APP/PS1 mice. *Nature* 2013, **493**(7434)**:** 674-678.

44. Meng Y, Yong Y, Yang G, Ding H, Fan Z, Tang Y*, et al.* Autophagy alleviates neurodegeneration caused by mild impairment of oxidative metabolism. *J Neurochem* 2013, **126**(6)**:** 805-818.

45. Shen S, Niso-Santano M, Adjemian S, Takehara T, Malik SA, Minoux H*, et al.* Cytoplasmic STAT3 represses autophagy by inhibiting PKR activity. *Mol Cell* 2012, **48**(5)**:** 667-680.

46. Tamagno E, Bardini P, Obbili A, Vitali A, Borghi R, Zaccheo D*, et al.* Oxidative stress increases expression and activity of BACE in NT2 neurons. *Neurobiol Dis* 2002, **10**(3)**:** 279-288.

47. Jones BJ, Roberts DJ. The quantiative measurement of motor inco-ordination in naive mice using an acelerating rotarod. *J Pharm Pharmacol* 1968, **20**(4)**:** 302-304.

48. Tlamsa AP, Brumberg JC. Organization and morphology of thalamocortical neurons of mouse ventral lateral thalamus. *Somatosens Mot Res* 2010, **27**(1)**:** 34-43.

49. Bando Y, Onuki R, Katayama T, Manabe T, Kudo T, Taira K*, et al.* Double-strand RNA dependent protein kinase (PKR) is involved in the extrastriatal degeneration in Parkinson's disease and Huntington's disease. *Neurochem Int* 2005, **46**(1)**:** 11-18.

50. Liu JY, Timm DE, Hurley TD. Pyrithiamine as a substrate for thiamine pyrophosphokinase. *J Biol Chem* 2006, **281**(10)**:** 6601-6607.

51. Schmued LC, Hopkins KJ. Fluoro-Jade B: a high affinity fluorescent marker for the localization of neuronal degeneration. *Brain Res* 2000, **874**(2)**:** 123-130.

52. Pfaffl MW. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Res* 2001, **29**(9)**:** e45.

FIGURE LEGENDS

Figure 1. Markers of oxidative stress (MDA) and microglial cell activation (IBA1) in TD thalamus (**a**) Schematic sagittal representation of thalamic nuclei distribution: SmTN (Submedial thalamic nuclei); VLN (Ventrolateral thalamic nuclei) (**b**) MDA immunohistochemistry (green) on sagittal sections of WT and TD thalamus (**c**) Percentage of MDA positive cells in total thalamus, SmTN and VLN in WT [n=6] and TD mice [n=6]. (**d**) IBA1 labeling (red) on sagittal sections of WT and TD thalamus. (**e**) Quantification of relative proportion of IBA1 positive microglial cell phenotypes: ramified shape (inactivated state), amoeboid shape (activated state) in WT [n=7] and TD mice [n=7]. Unclassified shape

corresponds to intermediate state or cells that were unable to be quantified. Scale bars: 10µm. **p<0.01, ***p<0.001

Figure 2. Activation of PKR in TD brain studied by immunoblotting and immunohistochemistry in the thalamus and cerebellum. Immunoblot analyses (**a**) and corresponding quantification of $pPKR_{Thr446,}$ full PKR (**b**) in WT and TD mice protein samples, in thalamus, cerebellum, hippocampus and cortex normalized on Tubulin levels. WT [n=14] and TD [n=14]. * p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001. (**c**) Immunohistochemistry (green) with a $pPKR_{Thr446}$ antibody on WT, TD and TD pretreated with PKRinh mice in sagittal sections of SmTN (submedial thalamus nuclei) (**c**) and cerebellum (**e**). (**d**) The positive cell counting confirmed that PKR is activated after TD treatment and its increase is attenuated by PKRinh administration in total thalamus, specifically in SmTN and VLN (ventrolateral nuclei). (**e**) Cerebellar $pPKR_{Thr446}$ patterns in WT, TD and TD+PKRinh. $pPKR_{Thr446}$ staining is almost absent in granular layer (GL) and molecular layer (ML) but exhibits strong signals, increased after TD in Purkinje cells (PC), both in cell bodies and processes (arrow). (**f**) Percentages of PC with $pPKR_{Thr446}$ nuclear localization have been quantified and as expected, $pPKR_{Thr446}$ staining is decreased in PC after PKRinh administration WT [n=8] and TD [n=8]. Scale bars: 10µm.

Figure 3. PKR inhibition controls eIF2α activity in TD mouse thalamic and cerebellar neurons. (**a-b**) Immunoblot analyses (**a**) and corresponding quantification (**b**) after normalization on Tubulin of $peIF2\alpha_{Ser51}$/eIF2α ratios in 3 groups of mice non exposed to TD (WT [n=14], PKRinh [n=10] and TD+$PKR^{-/-}$ [n=12] and in 3 groups of vitamin B1 deficient mice (TD [n=14], TD+PKRinh [n=10] and TD+$PKR^{-/-}$ [n=12] in total thalamus and cerebellum.

Figure 4. eIF2α_{Ser51} cellular localization in thalamus and cerebellum in TD mice. (**a**-**b**) Double-labeling of DAPI (blue) and peIF2α_{Ser51} (green) in SmTN (submedial thalamus nucleus) (**a**) and cerebellum (**b**) of WT, TD, TD+PKRinh and TD+PKR$^{-/-}$ mice. peIF2α_{Ser51} in cerebellum is present in Purkinje cells cytoplasm and mainly increase after TD at the level of the cells bodies. Scale bars: 10µm. (**c**-**d**) Quantification of positive neurons in SmTN and VLN (ventrolateral nucleus) (**c**) and in Purkinje cells (**d**) suggests that peIF2α_{Ser51} phosphorylation is dependent of pPKR$_{Thr446}$ activation. **p<0.01, ***p<0.001. (**e**) Confocal analysis showed a co-localization of pPKR$_{Thr446}$ (green) and peIF2α (red) in TD cerebellum of the cerebellum. Boxes represent higher magnification at the level of Purkinje cells, where colocalization (yellow) is mainly present in cell bodies.

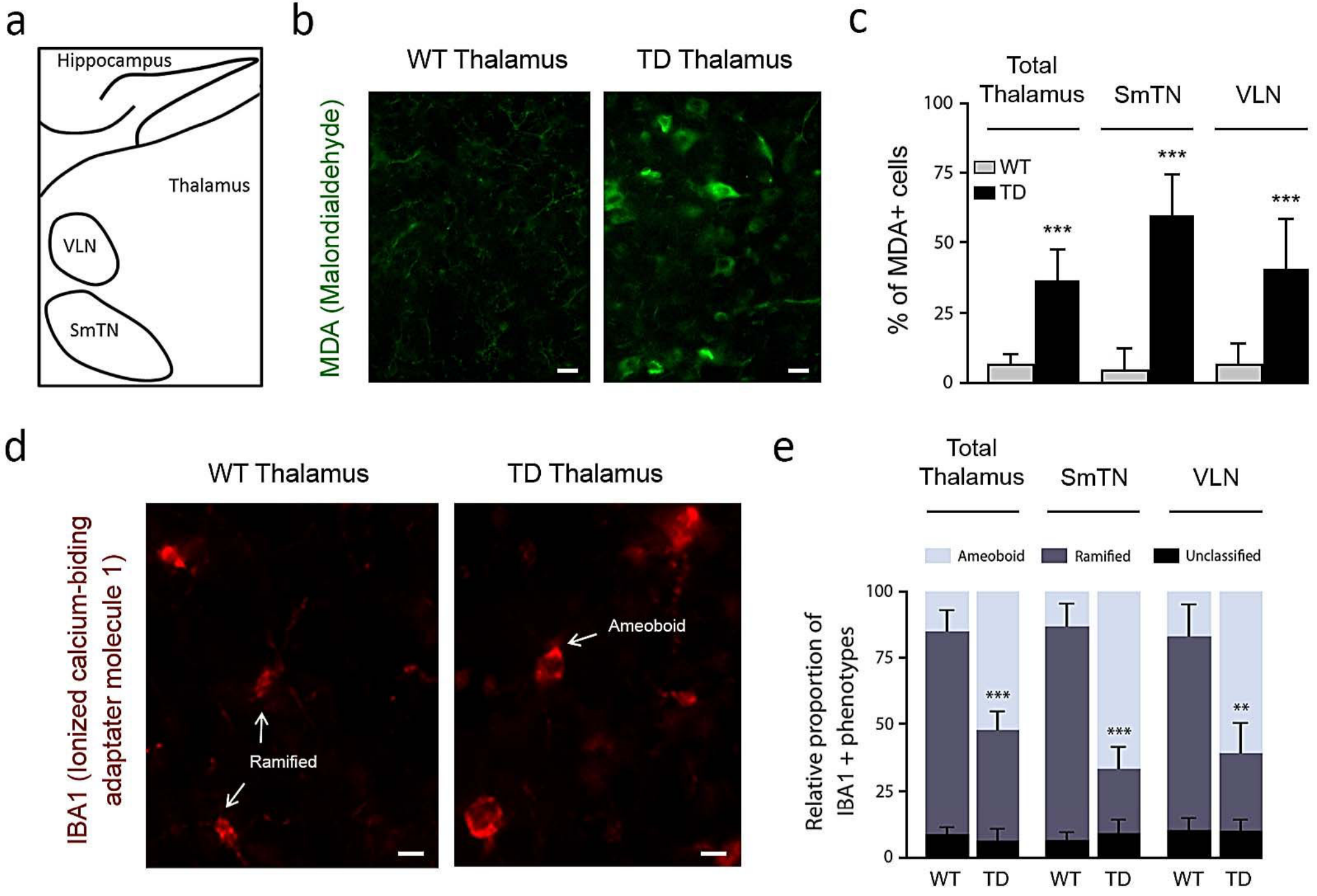
Figure 5. Regional TD-induced neuronal loss and neurodegeneration in thalamus reduced by modulation of PKR activation (**a**) Immunohistochemistry of neuronal nuclear marker NeuN (green) shows decrease number of neuron in TD thalamus compared to control mice, in particular in SmTN (submedial thalamus nucleus) and VLN (surrounded areas). (**b**) Number of marked NeuN cells evaluation indicates that TD-induced neuronal loss is reversed by PKR inhibition in the SmTN and in VLN. WT [n=8], TD [n=8] TD+PKRinh [n=8] and TD+PKR$^{-/-}$ [n=7]. (**c**) FluoroJade B (F-J B) histofluorescence in thalamic regions (surrounded nuclei: SmTN and VLN) reveals, as visible in higher magnification boxes, neurodegenerative neurons in TD mice. Note that WT thalamus did not present a positive signal. (**d-e**) Relative analysis as number of F-J B+ cells in SmTN and VLN (**D**) or percent normalized on the mean number of NeuN+ (**e**). Percentage of TD-damaged neurons is decreased by PKR inhibition (TD+PKRinh and TD+PKR$^{-/-}$) WT [n=8], TD [n=8] TD+PKRinh [n=8] and TD+PKR$^{-/-}$ [n=7] * p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001.

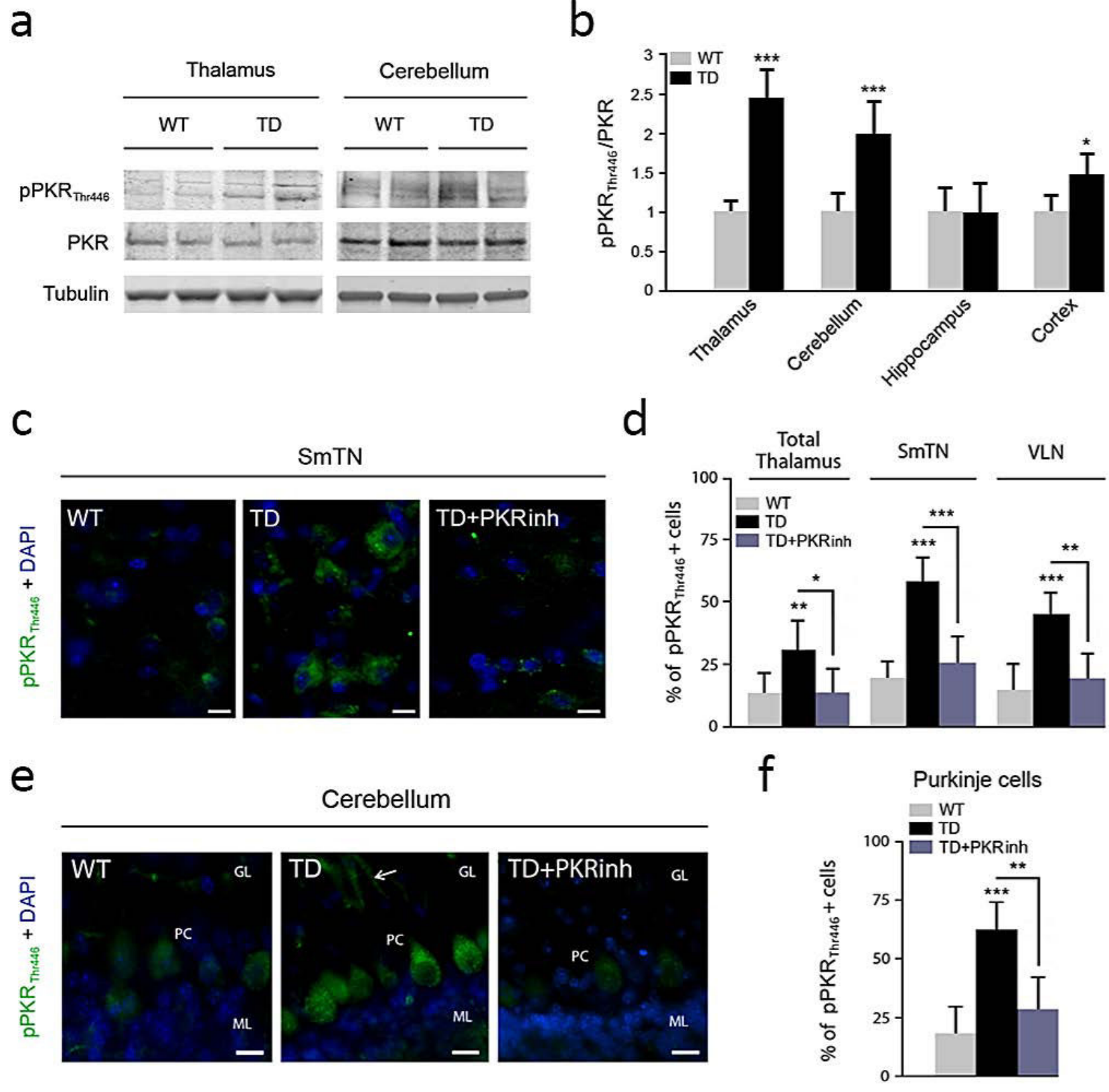
Figure 6. Immunolocalization of caspase 3 is enhanced in TD SmTN (submedial thalamus nucleus) and purkinje cells, and decreased by inhibition of PKR. (**A**) Double-labeling of nuclear marker DAPI (blue) and caspase 3 (red) in SmTN of WT, TD, TD+PKRinh and TD+PKR$^{-/-}$ mice. (**B**) Percentage of cleaved-caspase 3 positive neurons increased by TD is significantly reduced after down-regulating PKR in SmTN (left) but not in VLN (ventrolateral nucleus) (right). (TD+PKRinh and TD+PKR$^{-/-}$). (**C**) Confocal microscopy of double staining of caspase 3 (red)/PKR (green) performed with Zenon labeling kit on coronal sections of TD submedial nuclei of the thalamus (SmTN) showing cytoplasmic colocalizations in neurons (yellow). (**D-E**) Caspase 3 immunolocalization in Purkinje cell layers (cell bodies and arborization) is amplified in TD models but is not reversed by down regulation of PKR. WT [n=8], TD [n=8] TD+PKRinh [n=8] and TD+PKR$^{-/-}$ [n=7] * $p<0.05$, ** $p<0.01$.

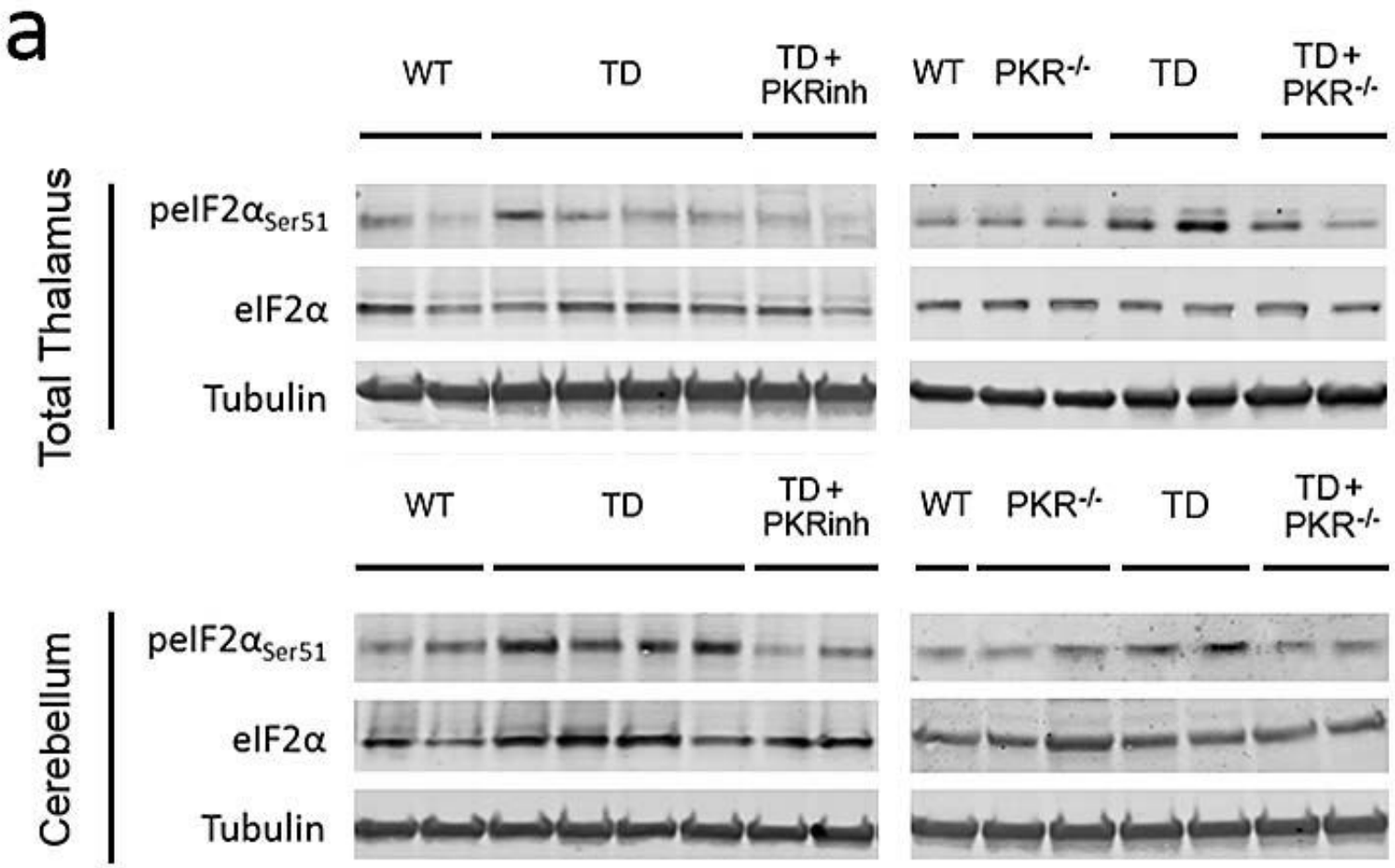
Figure 7. Inhibition of PKR-eIF2α pathway by PKRinh or in PKR$^{-/-}$ mice decreases BACE1 (β-site APP-cleaving enzyme 1) levels and Aβ (Amyloid β) production. (**a**) Immunoblot on thalamus extracts and quantification of BACE1 (**b**), Aβ oligomers (**d**) and APP (**f**). The blots show that TD induces BACE1 maturation and Aβ production without altering APP levels. PKR inhibition partially reduced the effects of TD. WT [n=8], PKRinh [n=8], PKR$^{-/-}$ [n=7] TD [n=8], TD+PKRinh [n=8] and TD+PKR$^{-/-}$ [n=7]. (**c**) Transcriptional activity on BACE1 is not modified in TD thalamus. Effect of TD on BACE1 mRNA levels is assessed with qRT-PCR. BACE1 mRNA levels were normalized to GAPDH mRNA levels. WT [n=6], PKRinh [n=5], PKR$^{-/-}$ [n=5] TD [n=6], TD+PKRinh [n=5] and TD+PKR$^{-/-}$ [n=5]. (**e**) The TD-dependent increase of $A\beta_{1-42}$ peptide was confirmed by a sandwich ELISA method and is expressed as means ±SEM. $A\beta_{1-42}$. The values from TD mice are expressed relative to the values from WT mice which were set

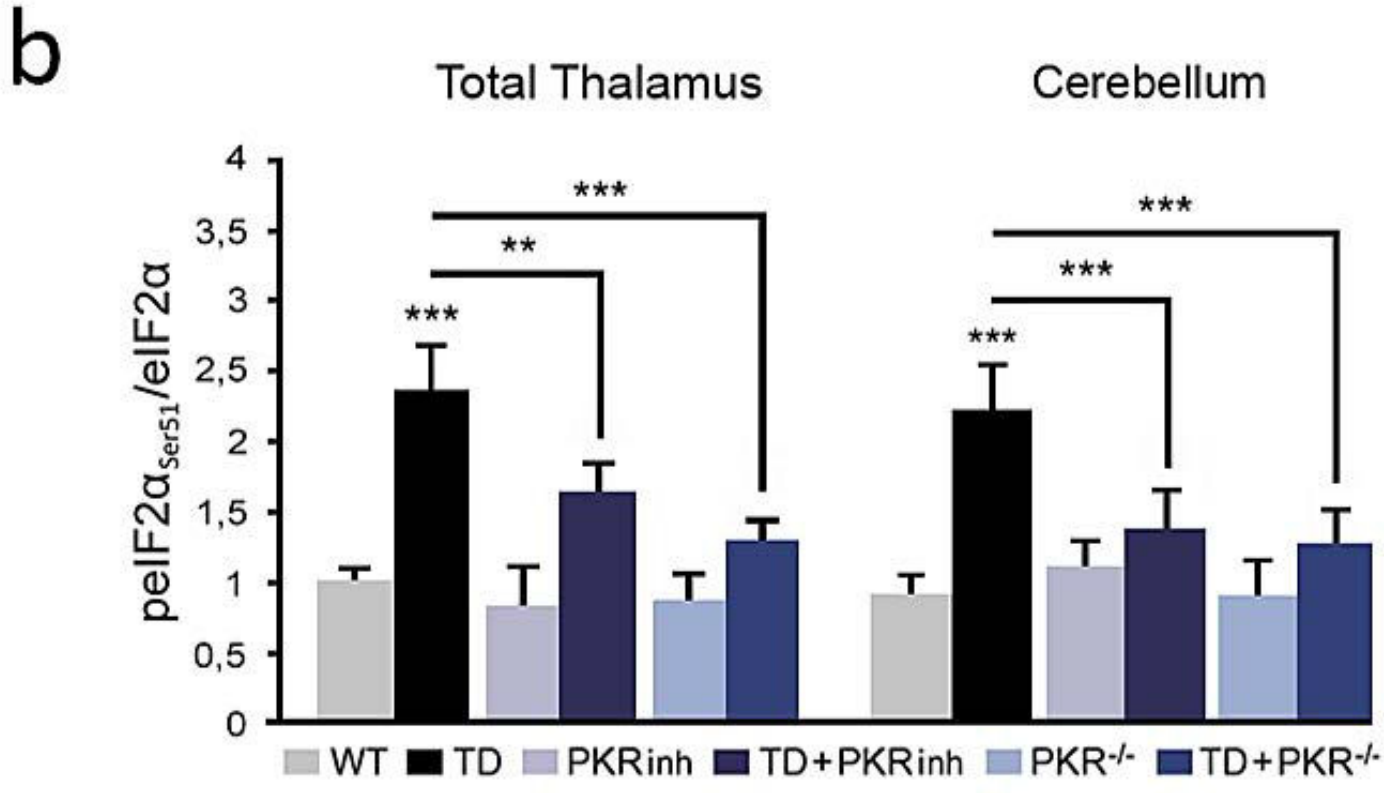
to "1". Immunoblots and ELISA were both performed on 6 different groups of mice: WT [n=8], PKRinh [n=8], $PKR^{-/-}$ [n=7] TD [n=8], TD+PKRinh [n=8] and TD+$PKR^{-/-}$ [n=7]. * $p<0.05$, **$p<0.01$, ***$p<0.001$.

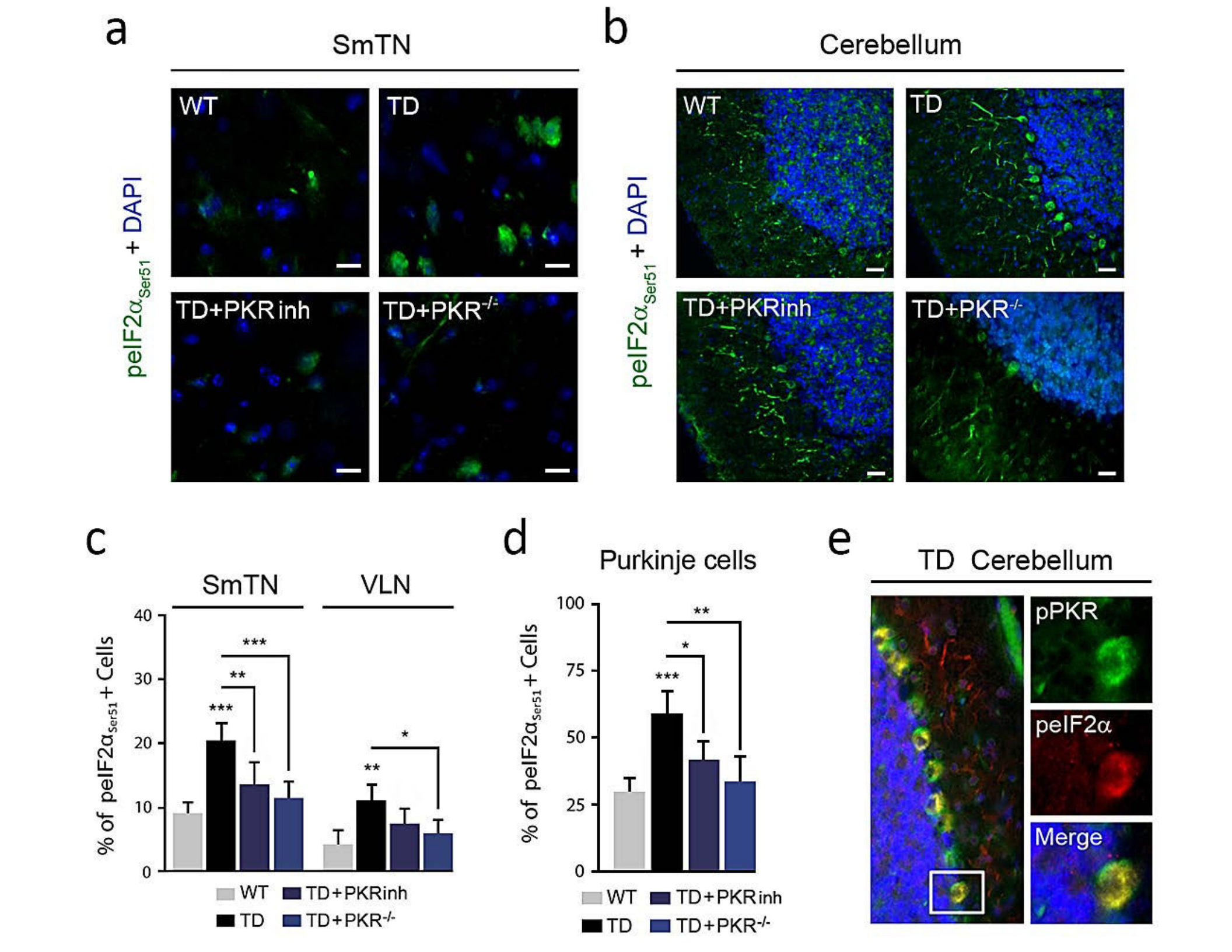
Figure 8. The rotarod motor performance impaired in TD mice is rescued after PKRinh administration or in $PKR^{-/-}$ mice. (**a**) Diagram illustrating latency to fall measured on separate days reveals a strong decrease of motor performance in the 3 groups of TD mice. (**b**) Statistical analysis of measures for each animal the delay between the rotarod performance between on the first day of the experiment and the days 7, 8, 9 or 10. At the beginning of the decline (day 8), down-regulation of PKR maintains motor performance of animals with TD. WT [n=14], PKRinh [n=14], $PKR^{-/-}$ [n=12] TD [n=14], TD+PKRinh [n=14] and TD+$PKR^{-/-}$ [n=12]. * $p<0.05$.

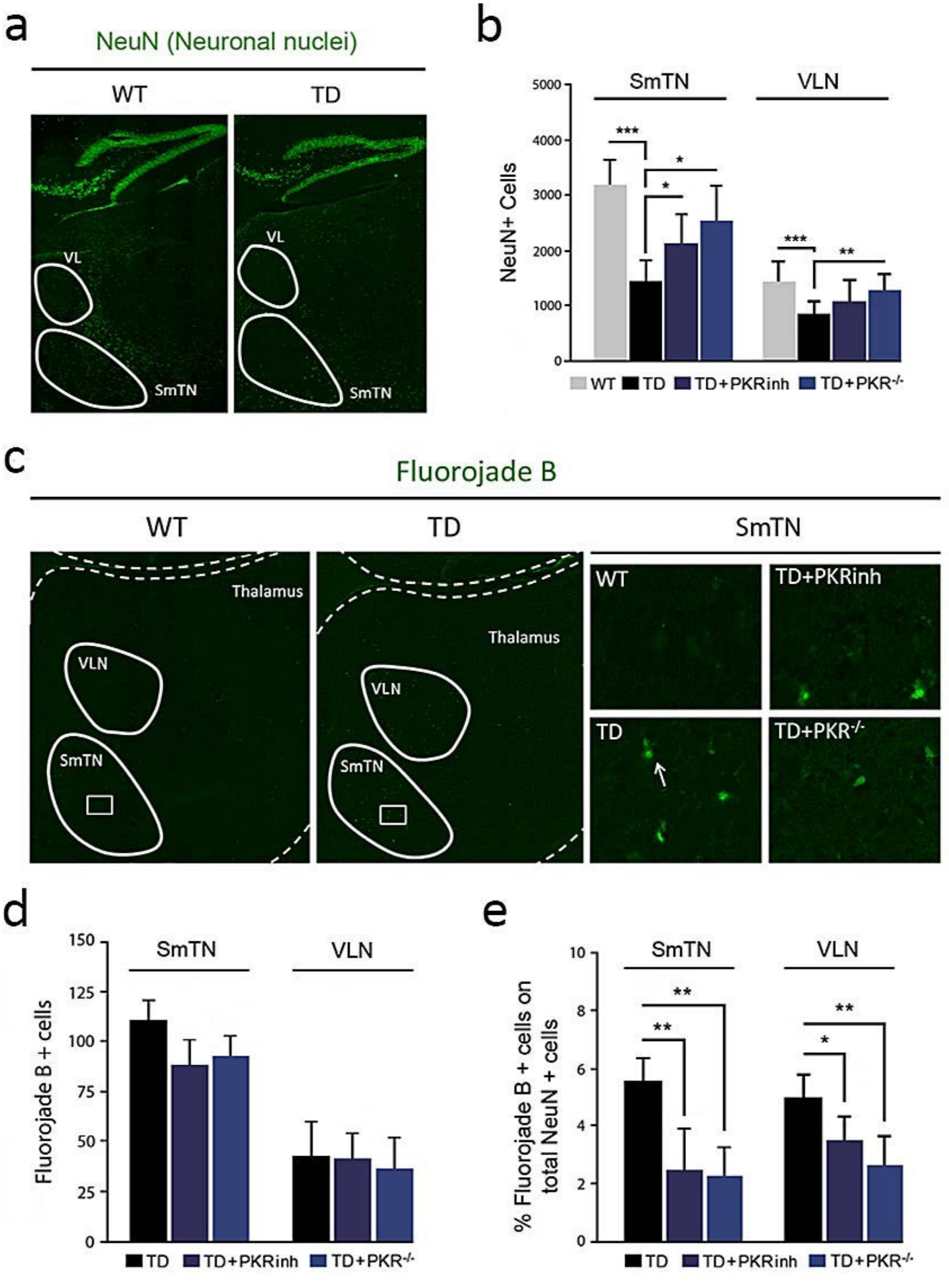

a
Hippocampus
Thalamus
VLN
SmTN
b
WT Thalamus
TD Thalamus
MDA (Malondialdehyde)
c
Total Thalamus
SmTN
VLN
WT
TD
% of MDA+ cells
100
75
50
25
0
***
d
WT Thalamus
TD Thalamus
IBA1 (Ionized calcium-biding adaptater molecule 1)
Ramified
Ameoboid
e
Total Thalamus
SmTN
VLN
Ameoboid
Ramified
Unclassified
Relative proportion of IBA1 + phenotypes
100
75
50
25
0
***
**
WT
TD

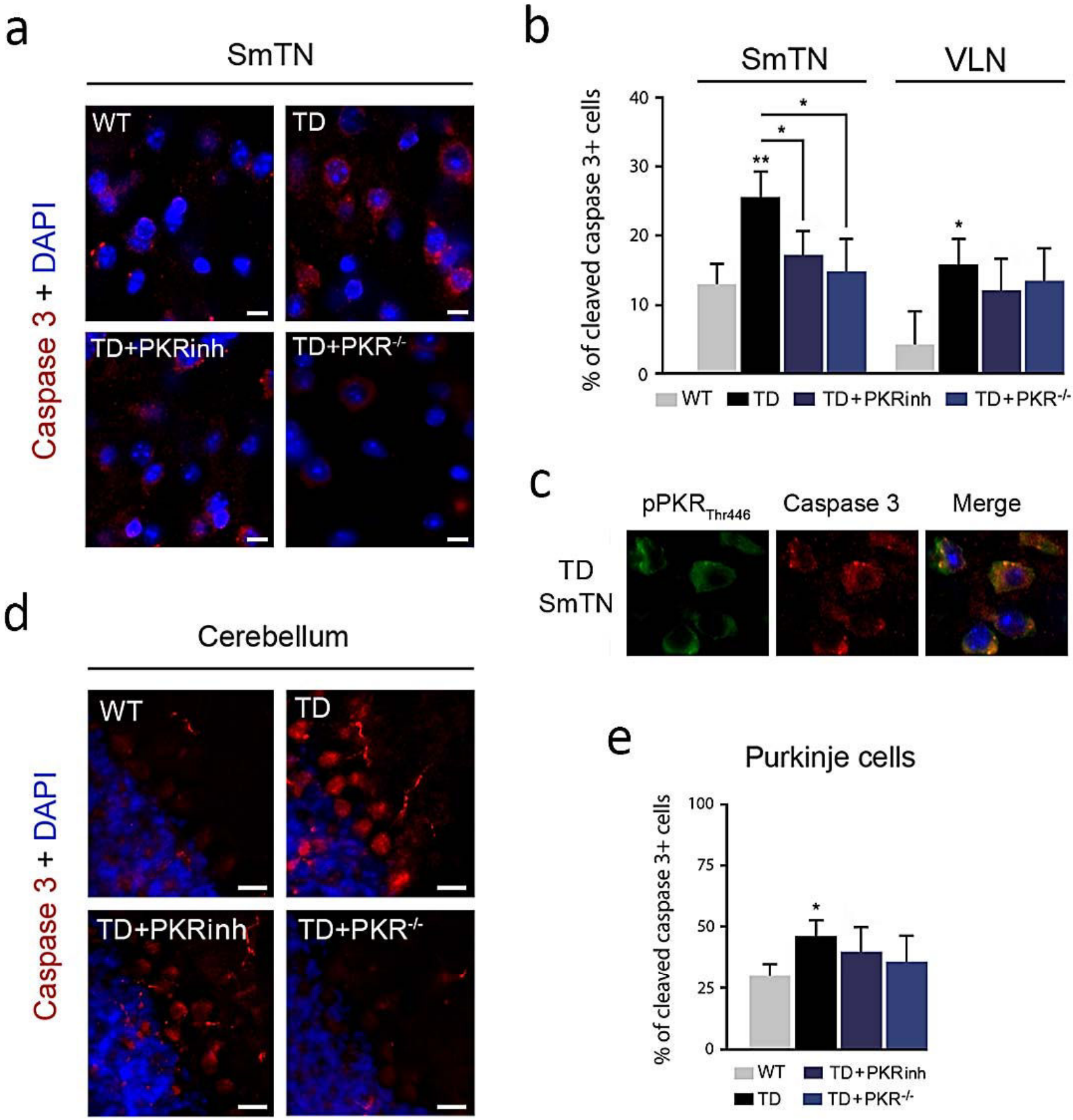

a
Thalamus
Cerebellum
WT
TD
WT
TD
pPKR Thr446
PKR
Tubulin
b
WT
TD
pPKR Thr446/PKR
Thalamus
Cerebellum
Hippocampus
Cortex
c
SmTN
WT
TD
TD+PKRinh
pPKR Thr446 + DAPI
d
Total Thalamus
SmTN
VLN
WT
TD
TD+PKRinh
% of pPKR Thr446 + cells
e
Cerebellum
WT
TD
TD+PKRinh
GL
PC
ML
pPKR Thr446 + DAPI
f
Purkinje cells
WT
TD
TD+PKRinh
% of pPKR Thr446 + cells

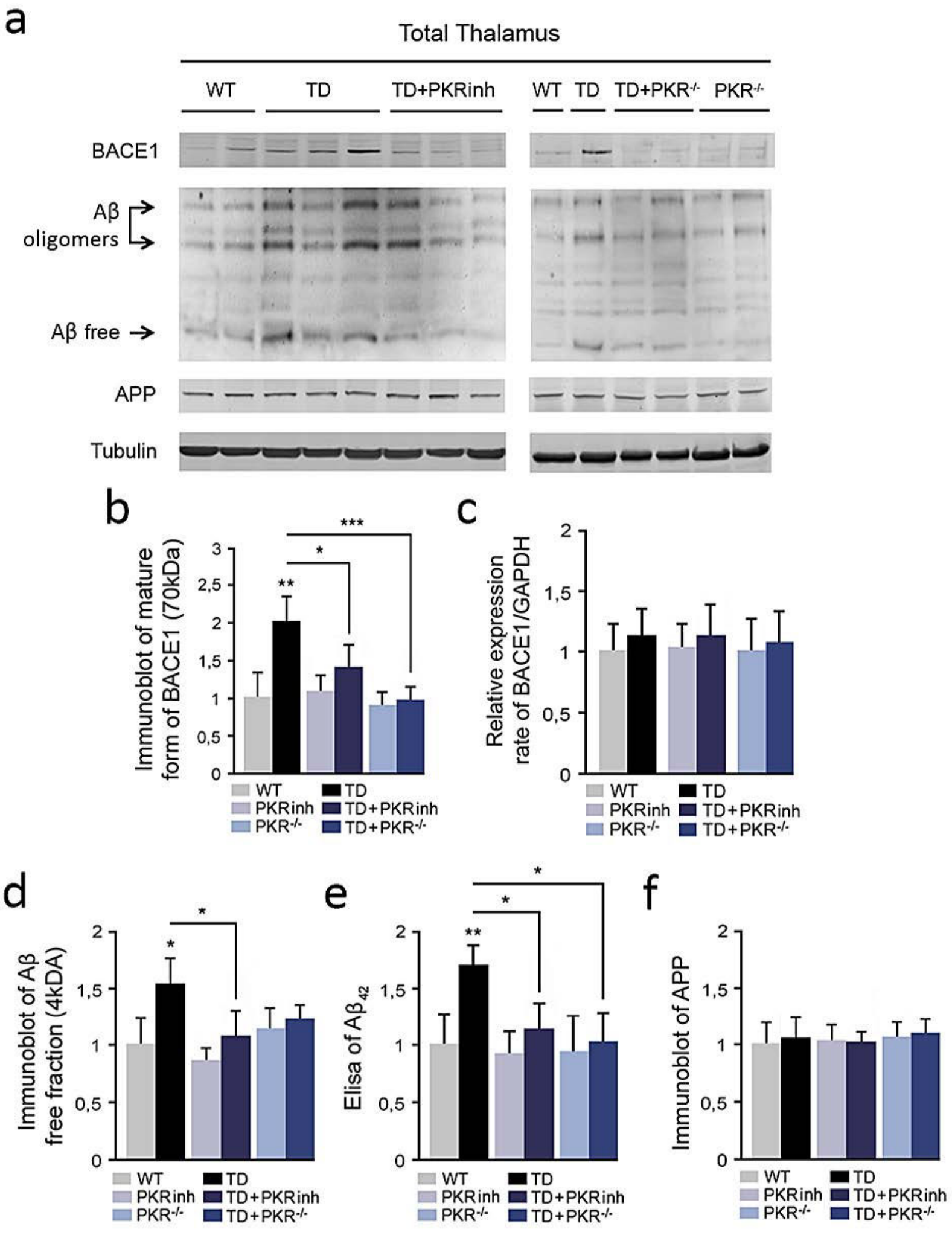

a
WT
TD
TD+ PKRinh
WT
PKR-/-
TD
TD+ PKR-/-
Total Thalamus
peIF2αSer51
eIF2α
Tubulin
WT
TD
TD+ PKRinh
WT
PKR-/-
TD
TD+ PKR-/-
Cerebellum
peIF2αSer51
eIF2α
Tubulin

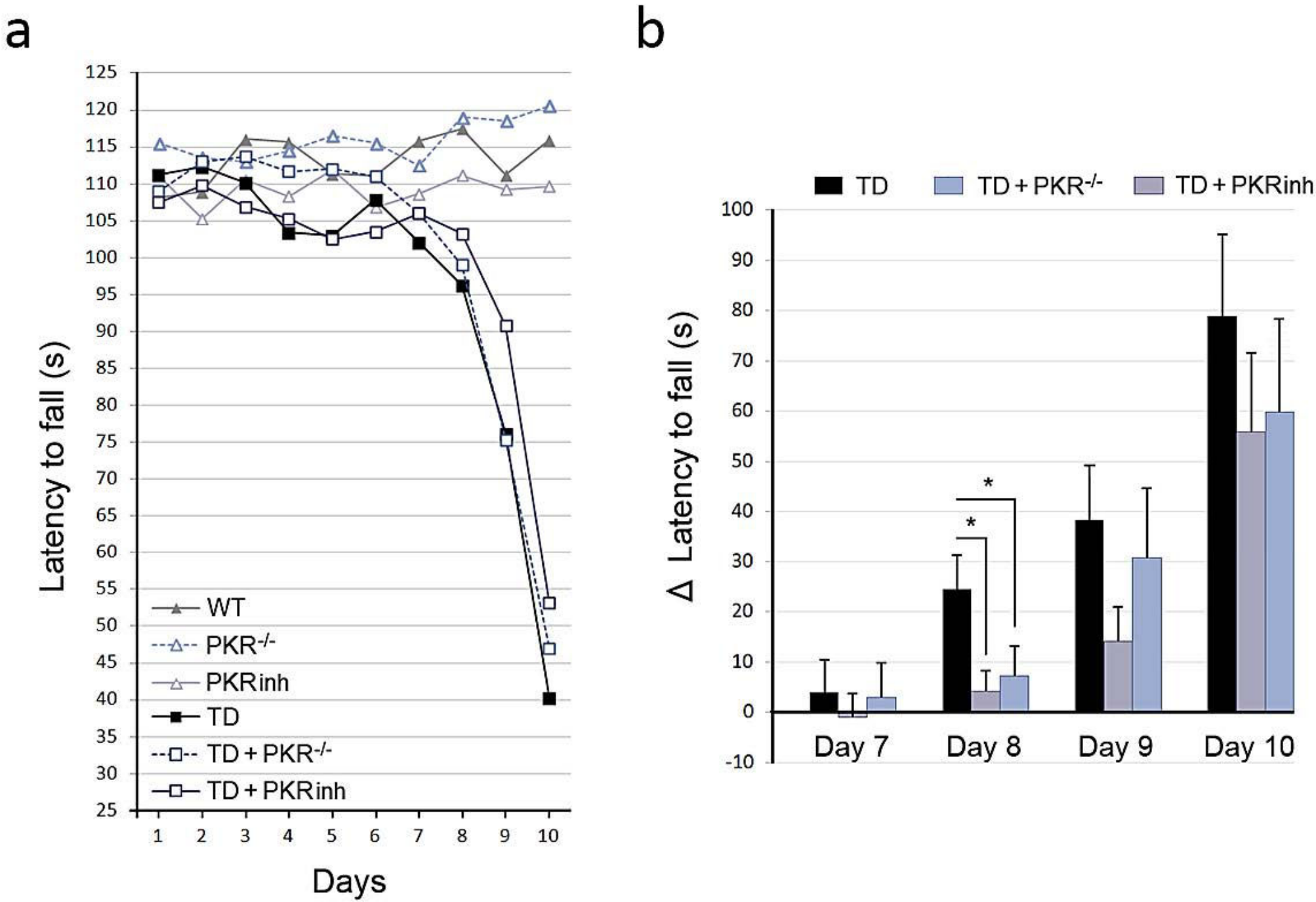

b
Total Thalamus
Cerebellum
peIF2αSer51/eIF2α
4
3,5
3
2,5
2
1,5
1
0,5
0
***
**
***
***
***
***
WT
TD
PKRinh
TD+PKRinh
PKR-/-
TD+PKR-/-


a
SmTN
WT
TD
TD+PKRinh
TD+PKR-/-
peIF2αSer51 + DAPI
b
Cerebellum
WT
TD
TD+PKRinh
TD+PKR-/-
peIF2αSer51 + DAPI
c
SmTN
VLN
% of peIF2αSer51 + Cells
40
30
20
10
0
***
**
***
**
*
WT
TD
TD+PKRinh
TD+PKR-/-
d
Purkinje cells
% of peIF2αSer51 + Cells
100
75
50
25
0
**
*
***
WT
TD
TD+PKRinh
TD+PKR-/-
e
TD Cerebellum
pPKR
peIF2α
Merge


a
NeuN (Neuronal nuclei)
WT
TD
VL
SmTN
VL
SmTN
b
SmTN
VLN
NeuN+ Cells
5000
4000
3000
2000
1000
0
***
*
*
***
**
WT
TD
TD+PKRinh
TD+PKR-/-
c
Fluorojade B
WT
TD
SmTN
Thalamus
VLN
SmTN
Thalamus
VLN
SmTN
WT
TD+PKRinh
TD
TD+PKR-/-
d
Fluorojade B + cells
150
125
100
75
50
25
0
SmTN
VLN
TD
TD+PKRinh
TD+PKR-/-
e
% Fluorojade B + cells on total NeuN + cells
10
8
6
4
2
0
SmTN
VLN
**
**
**
*
TD
TD+PKRinh
TD+PKR-/-


a
SmTN
WT
TD
TD+PKRinh
TD+PKR-/-
Caspase 3 + DAPI
b
SmTN
VLN
% of cleaved caspase 3+ cells
40
30
20
10
0
*
*
**
*
WT
TD
TD+PKRinh
TD+PKR-/-
c
pPKRThr446
Caspase 3
Merge
TD
SmTN
d
Cerebellum
WT
TD
TD+PKRinh
TD+PKR-/-
Caspase 3 + DAPI
e
Purkinje cells
% of cleaved caspase 3+ cells
100
75
50
25
0
*
WT
TD
TD+PKRinh
TD+PKR-/-


a
Total Thalamus
WT
TD
TD+PKRinh
WT
TD
TD+PKR-/-
PKR-/-
BACE1
Aβ oligomers
Aβ free
APP
Tubulin
b
Immunoblot of mature form of BACE1 (70kDa)
***
*
**
WT
TD
PKRinh
TD+PKRinh
PKR-/-
TD+PKR-/-
c
Relative expression rate of BACE1/GAPDH
d
Immunoblot of Aβ free fraction (4kDA)
e
Elisa of Aβ42
f
Immunoblot of APP


a
Latency to fall (s)
Days
WT
PKR-/-
PKRinh
TD
TD + PKR-/-
TD + PKRinh
b
Δ Latency to fall (s)
TD
TD + PKR-/-
TD + PKRinh
Day 7
Day 8
Day 9
Day 10
*
*

Discussion

I. Choix du modèle

A. Injections de LPS

Dans notre introduction, nous avons démontré qu'un stress inflammatoire systémique aigu secondaire à l'injection intrapéritonéale (i.p.) de lipopolysaccharide (LPS) chez l'animal entraîne une réaction inflammatoire du système nerveux central responsable d'un *sickness behaviour* (Dantzer, 2001).Nous avons reproduit ce modèle dans notre étude et testé plusieurs schémas d'injection de LPS. Le schéma choisi est celui comportant 3 injections successives à la dose de 1 mg/kg, qui induit un *sickness behaviour*, une activation microgliale et une activation de PKR.

1. Induction d'un *sickness behaviour*

Les animaux WT exposés au LPS selon ce schéma et observés cliniquement ont présenté un amaigrissement significatif, secondaire à une diminution de la consommation de nourriture et d'eau. Nous n'avons pas réalisé d'étude comportementale proprement dite explorant le retentissement sur les activités motrices et les fonctions cognitives, mais cette observation est cohérente avec les descriptions du *sickness behaviour*secondaire à une endotoxémie expérimentale, y compris en ce qui concerne la récupération par les animaux de leur poids initial 72h après l'arrêt des injections (Combrinck et al., 2002; Cunningham et al., 2009; Dantzer, 2001; Spulber et al., 2012; Teeling et al., 2010).

2. Activation de la microglie

Les injections périphériques de LPS induisent *in vivo* une réaction inflammatoire centrale responsable d'une activation microgliale, mesurée en immunofluorescence par le marquage des cellules microgliales par IBA1et représentée par le rapport du nombre de cellules microgliales amiboïdes / nombre total de cellules microgliales. IBA1 (ionized calcium binding adapter molecule 1) est une protéine de liaison aux ions calcium spécifiquement exprimée dans les macrophages et la microglie. Les cellules ont été différenciées par un logiciel d'analyse morphologique Image J. IBA1 est couramment utilisée pour visualiser les changements morphologiques de la microglie activée (Imai and Kohsaka,

2002). Nous confirmons ici les résultats d'autres auteurs quant à l'activation de la microglie *in vivo* par injection périphérique de LPS, chez la souris sauvage C57BL/6J, marquée par IBA1(Qin et al., 2008; Sehgal et al., 2011), la tyrosine phosphatase CD45 (Thompson et al., 2008), F4/80 (Innamorato et al., 2008; Sheng et al., 2003).

3. Activation de PKR

Le LPS induit dans notre modèle l'activation de PKR dans l'hippocampe et le cortex des animaux WT. PKR appartient à la voie de signalisation du TLR4, un membre de la famille des Toll-like receptors qui reconnaît le LPS (Garcia et al., 2006). Le TLR4 est exprimé à la surface des cellules microgliales et des neurones dans le SNC, des macrophages et des fibroblastes en périphérie. Il participe à la réaction immunitaire innée en tant que récepteur PPR (pattern-recognition receptor), capable de reconnaître des structures pathogènes, comme les PAMPs (pathogen-associated-molecular-patterns) dont le LPS fait partie.

On sait que le LPS est capable d'activer in vitro la phosphorylation de PKR : dans les macrophages (Cabanski et al., 2008; Horng et al., 2001; Hsu et al., 2004), dans les cellules gingivales (Yoshida et al., 2012). L'inhibition de PKR modifie la réponse au LPS : altération de la voie de signalisation de l'inflammation dépendante de STAT1 dans des cultures de cellules gliales exposées au LPS (Lee et al., 2005), altération de la production de cytokines pro-inflammatoires (IL6 et IL12) par les animaux déficients en PKR et par les fibroblastes issus de ces animaux exposés au LPS respectivement in vivo et in vitro (Goh et al., 2000). Une implication des cytokines TNFαet IL-1β, sécrétées par les cellules microgliales activées est aussi probable pour expliquer l'activation de PKR.

Nous n'avons pas mis en évidence en parallèle de l'activation de PKR, d'activation de son principal substrat eIF2α dans l'hippocampe des animaux WT exposés au LPS alors que celui-ci est capable d'activer PKR mais aussi d'autres kinases phosphorylant eIF2α notamment PERK (Tazi et al., 2007) et HRI (Liu et al., 2007). La déphosphorylation d'eIF2α par des phosphatases est une hypothèse probable pour expliquer ces résultats. D'autres auteurs on montré la déphosphorylation d'eIF2α par PP1 (la protéine phosphatase 1) couplée à son cofacteur GADD34 (growth arrest and DNA damage gene) lors de l'activation de cellules dendritiques par le poly (I :C) (Clavarino et al., 2012).

B. Invalidation de PKR

Nous avons utilisé dans notre étude le modèle transgénique N-PKR -/- de Yang qui invalide PKR à son extrémité N-terminale, correspondant à son site de liaison à l'ARN double brin (Yang et al., 1995).Cette lignée est incomplètement knock out, car elle exprime une portion tronquée de PKR, ES-mPKR pour exon-skipped mouse PKR, d'environ 45 kDa. Celle-ci n'est cependant pas fonctionnelle car elle ne fixe pas l'ARN double brin et semble n'avoir que peu d'activité kinasique (Baltzis et al., 2002).

Il existe une autre lignée transgénique C-PKR -/- invalidant PKR à son extrémité C-terminale, correspondant à son domaine catalytique.Elle peut fixer l'ARN double brin mais a perdu son domaine d'activité kinase (Abraham et al., 1999).

Les animaux homozygotes PKR -/- obtenus quelque soit la méthode d'invalidation ont un phénotype identique à celui des animaux wild type de la même lignée. Leurs caractéristiques en termes de croissance, d'espérance de vie et de fertilité sont similaires. L'examen macroscopique et microscopique de leurs organes ne montre pas non plus de différence, notamment en ce qui concerne la tumorigénèse.

Les cultures de fibroblastes embryonnaires issus de ces animaux PKR -/- ont permis de vérifier l'invalidation de PKR pour un certain nombre de fonctions. Ainsi, des fonctions de PKR qui sont invalidées dans le modèle N-PKR -/- ne le sont pas dans le modèle C-PKR -/-, suggérant que le domaine N-terminal de PKR liant l'ARN double brin est essentiel à son activité de signalisation cellulaire, indépendamment de son activité kinase. Pour exemple, les fibroblastes N-PKR -/- traités par le poly (I :C), le TNFα ou le LPS sont résistants à l'apoptose (Baltzis et al., 2002; Der et al., 1997).

Pour confirmer nos résultats et vérifier le rôle joué par l'extrémité N-terminale de PKR dans la signalisation de l'inflammation centrale induite par le LPS, une étude similaire utilisant le modèle C-PKR -/- d'Abraham est nécessaire. Une autre méthode serait d'utiliser un inhibiteur pharmacologique de PKR, tel que le composé oxindole/imidazole ou C16, une molécule de petite taille qui, administré par voie périphérique, inhibe PKR *in vivo* dans le cortex en empêchant son autophosphorylation (Ingrand et al., 2007).

II. PKR contrôle l'inflammation cérébrale

A. Transfert de l'inflammation de la périphérie vers le SNC

Comme décrit dans l'introduction, le LPS peut activer plusieurs voies de signalisation de l'inflammation de la périphérie vers le SNC, malgré une barrière hémato-encéphalique (BHE) intacte. Ces voies ont été principalement décrites à partir de modèles animaux et explorées également chez l'homme (Dantzer, 2001; Schedlowski et al., 2014).

Le LPS induit en périphérie la production de cytokines en se liant au TLR4 exprimé notamment à la surface des macrophages, conduisant à l'activation du facteur NF-κB et à la transcription de gènes codant pour les cytokines.

Le LPS et les cytokines pro-inflammatoires peuvent pénétrer le parenchyme cérébral par diffusion au niveau des sites ne comportant que peu de BHE (organes circumventriculaires). LPS et cytokines sont reconnus par les cellules microgliales entraînant là encore la transcription de gènes codant pour des cytokines pro-inflammatoires (TNFα, IL-1β) et la progression de la réponse inflammatoire à travers le parenchyme cérébral, par un phénomène auto-entretenu (Nadeau and Rivest, 2000). LPS et cytokines agissent indirectement sur l'hypothalamus via le nerf vague (Ek et al., 1998) et sur l'axe du stress hypothalamo-hypophyso-surrénalien via la synthèse de prostaglandines par les cellules endothéliales vasculaires de la BHE (Matsumura and Kobayashi, 2004). Des progéniteurs myéloïdes circulant peuvent pénétrer le parenchyme cérébral, permettant la prolifération de la microglie (Rezaie and Male, 2002). Enfin, des cytokines peuvent passer de la vascularisation vers le cerveau par transport actif (Conti et al., 2004).

B. Rôle de PKR

Dans notre modèle, l'invalidation de PKR module la réponse inflammatoire centrale induite par le LPS et peut intervenir sur chacune de ces voies, tant en périphérie que directement dans le SNC, car la kinase est ubiquitaire dans l'organisme. On sait que l'invalidation de PKR altère la production de cytokines pro-inflammatoires en réponse au LPS *in vivo et in vitro* (Goh et al., 2000). Le LPS, mais aussi les cytokines pro-inflammatoires (TNFα, IL-1) sont par ailleurs des activateurs de la voie de signalisation de PKR (Garcia et al., 2006)

Nous étudions dans un travail encore en cours, dans le SNC et en périphérie dans la rate, les niveaux d'expression des gènes du TNFα et de l'IL-1β chez les animaux WT et PKR-/- exposés au LPS. Ces résultats devraient nous permettre de distinguer à quel niveau, central et périphérique, l'invalidation de PKR module la production de cytokines et les processus d'inflammation.

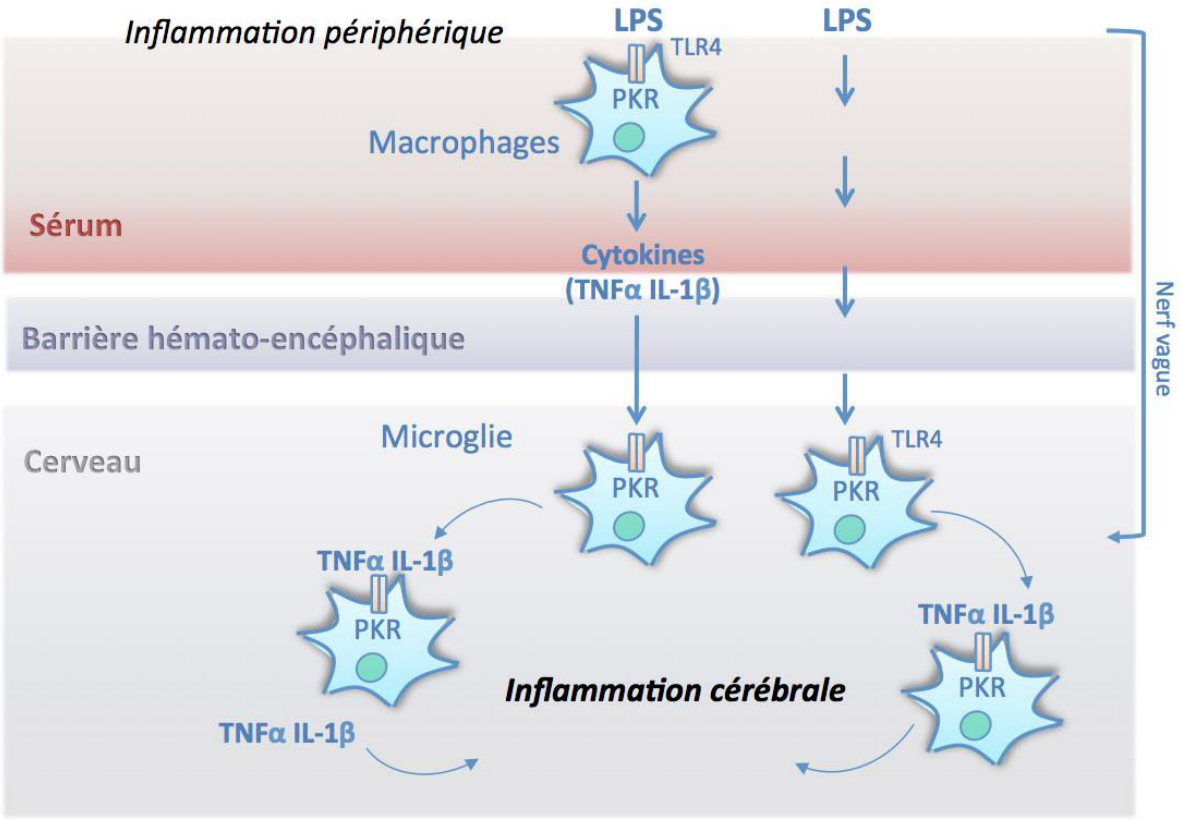


Figure 34: Rôle de PKR dans le transfert de l'inflammation de la périphérie vers le SNC

C. Voie de signalisation du NF-κB

L'implication de PKR dans des processus inflammatoires a été suggérée dès lors qu'elle est activée en présence d'interféron, et qu'elle a pour cible le facteur de transcription pro-inflammatoire NF-κB, impliqué dans les réponses immunitaires innée et adaptative. L'induction de la voie de signalisation du NF-κB est médiée par PKR et IKK (inhibitor of

nuclear factor kappa-B kinase). PKR est physiquement associée au complexe IKK, qui régule l'activité transcriptionnelle du NF-κB (Zamanian-Daryoush et al., 2000).

C'est son extrémité N-terminale complète, c'est-à-dire contenant à la fois les deux sites de liaison à l'ARN double brin (DRBDs) et un troisième domaine situé entre les résidus d'acides aminés 180 et 266, permettant l'homodimérisation de la kinase, qui interagit avec le complexe IKK et l'active, la fonction kinase de PKR n'étant pas nécessaire à cette activation (Bonnet et al., 2006). L'inhibition de PKR empêche l'activation du NF-κB *in vitro*. Le poly (I :C) induit normalement une activation lente et prolongée de IKK, précédée de l'activation de PKR. Appliqué à des lignées cellulaires déficientes en PKR, le poly (I :C) ne parvient pas à activer IKK et la voie du NF-kB (Zamanian-Daryoush et al., 2000). Il en est de même si on expose les mêmes lignées de fibroblastes embryonnaires issus d'animaux PKR -/- au TNFα (Kumar et al., 1997). La voie de signalisation du NF-kB est également altérée dans des co-cultures cellulaires primaires contenant à la fois des neurones, des astrocytes et de la microglie, exposées au peptide beta amyloïde Aβ42 et traitées par un inhibiteur pharmacologique de PKR. Ces cultures présentent une forte diminution de la production et de la libération de TNFα et d'IL-1β (Couturier et al., 2011).

D. Voie de l'inflammasome

PKR est un élément clé du complexe de l'inflammasome dans les macrophages, en interagissant avec NLRP3 et NLRC4, de la famille des récepteurs NOD-like, qui constituent avec la caspase 1 un complexe protéique appelé inflammasome. L'exposition de macrophages à des agonistes de l'inflammasome induit l'autophosphorylation de PKR(Kang and Tang, 2012). L'inflammasome régule la libération de cytokines d'activation caspase-dépendante, dont IL-1β, IL-18 et HMGB1 (High-mobility group protein B1), une protéine nucléaire associée à la chromatine faisant partie des DAMPs (damage-associated molecular patterns ou molécules de danger). L'inhibition de PKR, quelle soit pharmacologique ou qu'elle utilise des modèles transgéniques, altère sévèrement la voie de signalisation de l'inflammasome. L'invalidation de PKR inhibe notamment de façon significative la sécrétion d'IL-1β, d'IL-18 et de HMGB1 dans un modèle murin de péritonite induite par l'injection i.p. de bactéries Gram négatif E. Coli (Lu et al., 2012).

L'inflammasome de type NLRP3 participerait à la pathogénèse de la maladie d'Alzheimer par son action de régulation de l'activité microgliale, conduisant à un état

chronique de neuroinflammation responsable du dysfonctionnement des cellules neuronales. Cette activation chronique pathologique de la microglie est dite stade M1, par opposition au stade physiologique M2, qui permet l'élimination des débris tissus endommagés et la résolution de la réponse inflammatoire (Heneka et al., 2013).

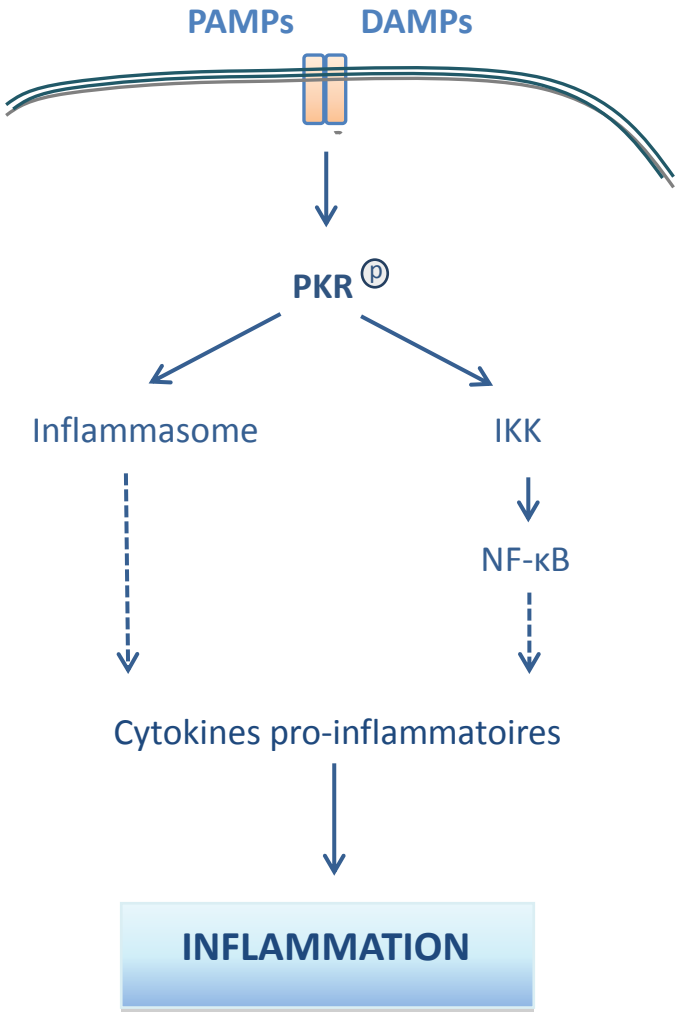


Figure 35: Voies de contrôle de la production de cytokines pro-inflammatoires par PKR

III. PKR contrôle l'amyloïdogénèse dans ce contexte inflammatoire

Notre équipe conduit depuis plusieurs années une recherche translationnelle ciblée sur le rôle de PKR dans la pathogénèse de la maladie d'Alzheimer. Elle a permis d'identifier PKR comme un potentiel biomarqueur diagnostique et pronostique de la maladie, car les niveaux d'activation de PKR sont augmentés dans le LCR des patients atteints, et corrélés à la sévérité du déclin cognitif (Dumurgier et al., 2013; Mouton-Liger et al., 2012b). L'activation de PKR est retrouvée à tous les niveaux du processus dégénératif associé à la maladie d'Alzheimer : augmentation de la phosphorylation de Tau, de l'expression de BACE1 et de la production d'Aβ, neurotoxicité, déclin cognitif (Bose et al., 2011; Chang et al., 2002a; Mouton-Liger et al., 2012a; Zhu et al., 2011). D'autres auteurs ont montré l'activation de la cascade amyloïde *in vivo* dans l'hippocampe et le cortex dans un contexte d'endotoxémie (Jaeger et al., 2009; Kahn et al.; Lee et al., 2008).

Notre étude établit pour la première fois un lien entre neuroinflammation, amyloïdogénèse et PKR. Comme déjà décrit, les cytokines sont des activateurs de PKR (Garcia et al., 2006), l'activation de PKR conduit à la production d'Aβ (Mouton-Liger et al., 2012a) et l'activation de PKR par Aβ contrôle la production de cytokines (Couturier et al., 2011). Dans notre modèle, l'administration périphérique de LPS chez la souris entraîne la production de peptide beta amyloïde Aβ42. Les résultats obtenus en ELISA montrent que l'invalidation de PKR module l'augmentation des taux d'Aβ42 dans l'hippocampe et le cortex des animaux exposés au LPS. Ceci suggère d'une part que PKR serait impliquée dans l'induction de la cascade amyloïde dans un contexte neuroinflammatoire et d'autre part que l'invalidation de PKR exercerait un effet neuroprotecteur. La production d'Aβ42 en réponse au LPS est parallèle à l'augmentation des niveaux protéiques de la β sécrétase BACE1, également dépendante de l'activation de PKR. L'expression de l'APP, la protéine précurseur d'Aβ42, n'est pas modifiée par le LPS ni par l'invalidation de PKR.

Dans notre modèle expérimental d'endotoxémie, l'absence d'activation d'eIF2α, invalide la seule voie connue de régulation de la production d'Aβ impliquant PKR, qui permet de faire le lien entre l'augmentation de la traduction des ARNm de BACE1 et l'activation de la voie PKR-eIF2α en présence d'ARN viral ou d'un stress oxydatif (Ill-Raga et al., 2011; Mouton-Liger et al., 2012a).

Nous avons alors vérifié l'hypothèse d'un contrôle transcriptionnel de BACE1 via l'activation PKR-dépendante du facteur de transcription STAT3. D'autres auteurs ont précédemment établi que l'activation du facteur de transcription STAT3 par le complexe CDK5/p25 conduisait à l'augmentation de la traduction de BACE1 et à la production d'Aβ (Cruz et al., 2006; Fu et al., 2004; Wen et al., 2008). La surexpression de p25, l'activateur de CDK5, induit une augmentation des niveaux d'ARNm et protéiques de BACE1 *in vitro* et *in vivo*. Une région activée par le complexe CDK5/p25 contenant des sites de transduction du signal, notamment pour le facteur de transcription STAT3 a été identifiée sur le promoteur de BACE1 (Wen et al., 2008). La surexpression de p25 induit également chez l'animal une augmentation des niveaux d'Aβ42 dans le cortex (Cruz et al., 2006). Nos résultats semblent valider cette hypothèse : les animaux WT traités par le LPS présentent une augmentation de l'activation de STAT3 dans l'hippocampe, de l'expression de la forme mature de BACE1 et de p25, sous le contrôle de PKR dont l'invalidation altère la réponse au LPS.

Pour confirmer l'hypothèse d'un contrôle transcriptionnel de BACE1 via l'activation PKR-dépendante de STAT3, nous étudions les niveaux d'expression de l'ARNm de BACE1 en RT-PCR dans l'hippocampe des animaux WT et PKR-/- exposés au LPS.

IV. Etat de phosphorylation de Tau en réponse au stress inflammatoire

Nous n'avons pas pu mettre en évidence de façon significative d'hyperphosphorylation de Tau en réponse au LPS dans notre modèle. Plusieurs sites de phosphorylation ont été analysés dont AT8 (Ser202/Thr205) et AT180 (Th231), fréquemment cités, sachant que Tau contient jusqu'à 79 sites de phosphorylation sérine et thréonine (Buee et al., 2000). *In vitro*, l'activation de PKR par le peptide beta amyloïde Aβ42 induit l'activation de GSK3β et la phosphorylation de Tau dans des cellules issues de neuroblastome humain (Bose et al., 2011). *In vivo*, l'administration chronique pendant plusieurs semaines de LPS à des animaux transgéniques 3xTg-AD, qui reproduisent à la fois les plaques amyloïdes et les dégénérescences neurofibrillaires (DNFs), induit une augmentation de l'activité enzymatique de CDK5 et une augmentation de la phosphorylation de Tau (Ser202/Thr205, Thr231/Ser235) dans l'hippocampe (Kitazawa et al., 2005). L'injection unique de LPS i.p à des souris wild type C57BL/6 augmente rapidement l'activité kinase de CDK5 et la phosphorylation de Tau (Ser202/Thr205 et Ser396/Thr404), 40 à 120 minutes après

l'injection, l'effet décroissant au-delà (Roe et al.). Dans notre modèle qui ne présente pas de DNFs, cortex et hippocampe ont été prélevés pour les analyses en biologie moléculaire 24h après la dernière injection de LPS., soit probablement un temps trop tard pour observer une augmentation de l'état de phosphorylation de Tau en réponse au LPS.

L'état de phosphorylation de Tau dépend de l'équilibre entre activités kinases et phosphatases. L'expression de la forme activée de GSK3β (phosphorylée au niveau de la Tyr216) et de p25, sous-unité régulatrice de CDK5, est augmentée dans le cortex des animaux exposés au LPS et modulée par l'invalidation de PKR dans notre modèle. GSK3β et CDK5 appartiennent à la famille des kinases PDPK (proline-directedprotein kinases) capables de phosphoryler Tau sur des sites sérine et thréonine précédant une proline.(Ishiguro et al., 1992; Takahashi et al., 1991). Comme pour eIF2α, la déphosphorylation de Tau par des phosphatases est probable. Les protéines phosphatases 1, 2A et 2B sont présentes dans le cerveau et capables de déphosphoryler Tau *in vitro* (Buee et al., 2000).

V. Mort neuronale en réponse au stress inflammatoire

Nous n'avons pas observé d'apoptose neuronale dans les deux régions d'intérêt étudiées (cortex et hippocampe) chez les animaux exposés au LPS. En particulier, le niveau d'expression de PARP (poly(ADP-ribose) polymérase) n'est pas modifié dans le cortex et la forme clivée de PARP n'est pas détectable en réponse au LPS. Durant l'apoptose, PARP est clivée et sa fonction enzymatique, liée à sa capacité à réparer l'ADN, est inactivée. La forme clivée de PARP est utilisée comme marqueur de l'apoptose (Duriez and Shah, 1997).

L'absence d'apoptose dans le SNC en réponse à l'administration périphérique de LPS dans notre modèle est cohérente avec les observations des autres auteurs. L'apoptose est favorisée par l'existence d'un état antérieur de neurodégénérescence associé à une inflammation cérébrale chronique où la microglie est amorcée, comme c'est le cas dans le modèle de maladie à prion (Cunningham et al., 2005), et par une exposition prolongée au LPS (Lee et al., 2008)

VI. PKR module le métabolisme cérébral en réponse au LPS

L'analyse de l'incorporation cérébrale de glucose fluoré 18F-FDG en microTEP dans notre modèle montre une diminution du métabolisme dans le cortex et l'hippocampe en réponse au LPS. Des observations similaires ont été faites chez l'homme. En effet, un certain nombre de travaux ont étudié les modifications neurocomportementales consécutives à l'induction d'une endotoxémie expérimentale chez l'homme par injection périphérique de LPS, en particulier grâce à l'imagerie fonctionnelle (Schedlowski et al., 2014). En TEP, il a été rapporté une diminution du métabolisme au niveau de l'insula et du cortex cingulaire, régions impliquées dans le contrôle de la motivation et de la réponse émotionnelle positive, après un stress inflammatoire (Hannestad et al., 2012).

L'invalidation de PKR dans notre modèle diminue l'altération du métabolisme cérébral en réponse au LPS, qui témoigne d'un dysfonctionnement neuronal, et pourrait donc avoir des conséquences cognitives. Cela confirme l'impact positif de l'invalidation de PKR sur les fonctions cognitives chez l'animal. Les animaux PKR -/- réalisent de meilleures performances aux épreuves d'apprentissage et de mémoire (Zhu et al., 2011). L'injection i.c.v. (intra-cérébro-ventriculaire) d'oligomères d'Aβ à des souris PKR -/- n'entraîne pas d'atteinte de la mémoire comme c'est le cas chez les animaux WT (Lourenco et al., 2013).

VII. L'inhibition de PKR prévient dégénérescence et production d'Aβ dans un modèle de carence en thiamine

Cette deuxième étude confirme que PKR a une action neuroprotectrice *in vivo* et qu'elle peut diminuer la production d'Aβ dans un modèle murin de neurodégénérescence par carence en thiamine, caractérisé par la présence d'un stress oxydatif et d'une inflammation.

La carence en thiamine induit une forte augmentation de l'activation de PKR dans le cerveau, en particulier dans le thalamus et le cervelet (Wang et al., 2007). Dans le thalamus, l'activation de PKR est principalement détectée dans les noyaux dorsomédian et ventrolatéral, qui sont aussi les régions du cerveau les plus sévèrement touchées par le stress oxydatif et l'inflammation. Dans le cervelet, PKR est principalement activée au niveau des cellules de Purkinje, comme c'est le cas chez l'homme au cours de la maladie à prion (Paquet et al., 2009). Dans cette étude, nous avons utilisé le modèle transgénique d'invalidation de PKR de Yang (Yang et al., 1995) et un inhibiteur sélectif de l'activation de PKR (Sanofi ®) afin de

mieux évaluer son rôle dans la neurodégénérescence *in vivo*. Nous avons retrouvé dans le thalamus une augmentation du niveau de la caspase 3 activée, qui est colocalisée avec PKR en IHC. L'expression de la caspase 3 activée est modulée par l'inhibition de PKR. Nous n'avons par contre pas observé de modifications des niveaux d'activation microgliale ou de stress oxydatif chez les souris exposées à la carence en thiamine, qu'elles soient invalidées pour PKR ou qu'elles aient reçu l'inhibiteur de PKR. Ces résultats suggèrent que l'inhibition de PKR interviendrait en aval des voies de signalisation induites par la carence en thiamine et que son effet neuroprotecteur pourrait être lié à l'absence d'activation des voies intrinsèques et extrinsèques de l'apoptose ou par une régulation tardive de l'autophagie (Garcia et al., 2006; Shen et al., 2012).

Ces dernières années, des études *in vitro* ont montré que les kinases phosphorylant eIF2α, et en particulier PKR, sont impliquées dans le contrôle de la traduction de BACE1 et dans la cascade amyloïde (Ill-Raga et al., 2011; Mouton-Liger et al., 2012a; O'Connor et al., 2008). Nous observons ici un rôle similaire de PKR sur la voie amyloïde *in vivo*. La forme activée d'eIF2α est fortement co-localisée avec pPKRThr446 chez les animaux exposés à la carence en thiamine et son expression est diminuée par l'inhibition de PKR. En parallèle, le niveau d'activation de PERK, une autre des 4 kinases phosphorylant eIF2α, reste inchangé dans le thalamus. Cela indique que la phosphorylation d'eIF2α est principalement sous le contrôle de PKR après exposition à la carence en thiamine, bien que HRI et GCN2 n'aient pas été testées et pourraient également contribuer à ce processus. D'autres auteurs ont montré que la carence en thiamine augmente l'activité β-sécrétase, conduisant à l'augmentation de la production d'Aβ (Zhang et al., 2011). Nos résultats confirment que l'expression de BACE1 est augmentée par la carence en thiamine et que l'inhibition de PKR décroit la production d'Aβ et l''expression de BACE1. L'analyse de ces différents résultats suggère que l'augmentation des niveaux de BACE1 est au moins en partie contrôlée par un mécanisme traductionnel initié par la voie PKR/eIF2α.

Zhao et al., ont montré que le traitement par la pyrithiamine et un régime carencé en thiamine exacerbe l'accumulation cérébrale d'Aβ dans le modèle murin de MA APP/PS1. Ils ont également décrit une augmentation de la phosphorylation de Tau en IHC. Dans notre modèle, nous n'avons pas observé de variations de la phosphorylation de Tau ni de l'activation de GSK-3β. L'environnement cérébral spécifique de la MA pourrait être indispensable à la phosphorylation de Tau en réponse à la carence en thiamine.

Sur un plan fonctionnel, la conclusion majeure de notre étude concerne les meilleures performances des animaux exposés à la carence en thiamine au Rotarod qu'ils soient PKR-/- ou traités par l'inhibiteur de PKR à J8.

En conclusion, nos résultats montrent que l'inhibition de PKR *in vivo* dans un modèle de neurodégénérescence par carence en thiamine exerce un effet neuroprotecteur, améliore les capacités fonctionnelles et module la production d'Aβ. PKR est activée dans les cerveaux de patients atteints de MA ainsi qu'au cours d'autres pathologies neurodégénératives (Bando et al., 2005; Paquet et al., 2009). L'inhibition pharmacologique de PKR représente donc une cible intéressante dans le traitement des maladies neurodégénératives.

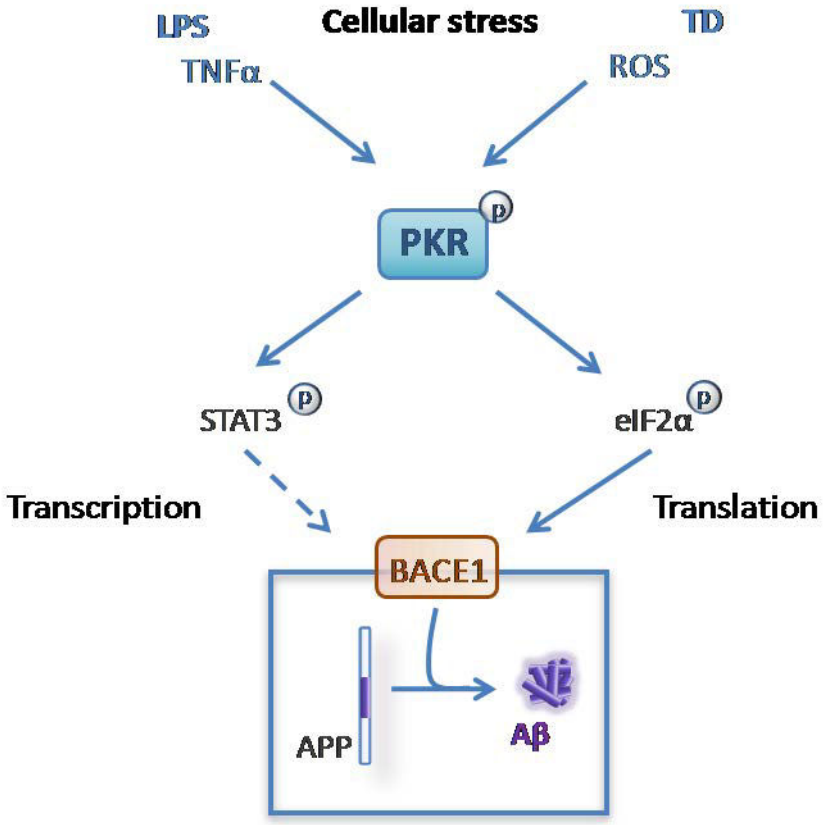


Figure 36: Voies de signalisation dépendantes de PKR conduisant à la production d'Aβ

L'activation de PKR par le LPS et par la carence en thiamine (TD : thiamine deficiency) conduit à la production d'Aβ. Dans le premier cas, la production d'Aβ serait dépendante du contrôle transcriptionnel de BACE1 par la voie PKR-STAT3. Dans le deuxième cas, la production d'Aβ serait dépendante du contrôle traductionnel de BACE 1 par la voie PKR-eIF2α. ROS : reactive oxygen species.

Conclusion

La neuroinflammation appartient au tableau neuropathologique de la maladie d'Alzheimer. Chez les patients, un stress inflammatoire périphérique, responsable d'une augmentation des taux de cytokines circulantes, entraîne la progression de la maladie.

Notre étude s'est concentrée sur les voies de signalisation de l'inflammation de la périphérie vers le système nerveux central et sur leur lien avec la progression des lésions de la maladie d'Alzheimer. A partir de modèles murins d'endotoxémie expérimentale et de carence en vitamine B1, nous avons mis en évidence un effet modulateur de la kinase de stress PKR sur l'inflammation cérébrale, la production de peptide β amyloïde et le métabolisme cérébral.

L'activation de PKR est étroitement liée à la pathologie Alzheimer.Elle est retrouvée à tous les niveaux du processus dégénératif associé à la maladie d'Alzheimer : hyperphosphorylation de Tau, augmentation de l'expression de BACE1, augmentation de la production d'Aβ, neurotoxicité, déclin cognitif et finalement inflammation cérébrale.

Sur un plan thérapeutique, l'inhibition spécifique de PKR constitue une cible très intéressante. Son inhibition directe par des molécules en cours d'élaboration pourra permettre d'envisager dans le futur une action combinée sur la neuroprotection, sur la diminution des voies amyloïde et Tau, et sur la neuroinflammation.

Bibliographie

Abraham, N., et al., 1999. Characterization of transgenic mice with targeted disruption of the catalytic domain of the double-stranded RNA-dependent protein kinase, PKR. J Biol Chem. 274**,** 5953-62.

Aisen, P.S., et al., 2003. Effects of rofecoxib or naproxen vs placebo on Alzheimer disease progression: a randomized controlled trial. JAMA. 289**,** 2819-26.

Akira, S., 2006. TLR signaling. Curr Top Microbiol Immunol. 311**,** 1-16.

Alexopoulou, L., et al., 2001. Recognition of double-stranded RNA and activation of NF-kappaB by Toll-like receptor 3. Nature. 413**,** 732-8.

Alzheimer, A., et al., 1995. An English translation of Alzheimer's 1907 paper, "Uber eine eigenartige Erkankung der Hirnrinde". Clin Anat. 8**,** 429-31.

Avila, J., et al., 2006. Tau phosphorylation, aggregation, and cell toxicity. J Biomed Biotechnol. 2006**,** 74539.

Balachandran, S., et al., 1998. Activation of the dsRNA-dependent protein kinase, PKR, induces apoptosis through FADD-mediated death signaling. EMBO J. 17**,** 6888-902.

Baltzis, D., Li, S., Koromilas, A.E., 2002. Functional characterization of pkr gene products expressed in cells from mice with a targeted deletion of the N terminus or C terminus domain of PKR. J Biol Chem. 277**,** 38364-72.

Bancher, C., et al., 1993. Neuropathological staging of Alzheimer lesions and intellectual status in Alzheimer's and Parkinson's disease patients. Neurosci Lett. 162**,** 179-82.

Bando, Y., et al., 2005. Double-strand RNA dependent protein kinase (PKR) is involved in the extrastriatal degeneration in Parkinson's disease and Huntington's disease. Neurochem Int. 46**,** 11-8.

Barker, C.F., Billingham, R.E., 1977. Immunologically privileged sites. Adv Immunol. 25**,** 1-54.

Begum, A.N., et al., 2008. Curcumin structure-function, bioavailability, and efficacy in models of neuroinflammation and Alzheimer's disease. J Pharmacol Exp Ther. 326**,** 196-208.

Betmouni, S., Perry, V.H., Gordon, J.L., 1996. Evidence for an early inflammatory response in the central nervous system of mice with scrapie. Neuroscience. 74**,** 1-5.

Beurel, E., Jope, R.S., 2009. Lipopolysaccharide-induced interleukin-6 production is controlled by glycogen synthase kinase-3 and STAT3 in the brain. J Neuroinflammation. 6**,** 9.

Beynon, S.B., Walker, F.R., 2012. Microglial activation in the injured and healthy brain: what are we really talking about? Practical and theoretical issues associated with the measurement of changes in microglial morphology. Neuroscience. 225**,** 162-71.

Biessels, G.J., et al., 2006. Risk of dementia in diabetes mellitus: a systematic review. Lancet Neurol. 5**,** 64-74.

Blasko, I., et al., 2006. Measurement of thirteen biological markers in CSF of patients with Alzheimer's disease and other dementias. Dement Geriatr Cogn Disord. 21**,** 9-15.

Blennow, K., de Leon, M.J., Zetterberg, H., 2006. Alzheimer's disease. Lancet. 368**,** 387-403.

Blennow, K., 2010. Biomarkers in Alzheimer's disease drug development. Nat Med. 16**,** 1218-22.

Bone, R.C., 1991. Gram-negative sepsis. Background, clinical features, and intervention. Chest. 100**,** 802-8.

Bonnet, M.C., et al., 2000. PKR stimulates NF-kappaB irrespective of its kinase function by interacting with the IkappaB kinase complex. Mol Cell Biol. 20**,** 4532-42.

Bonnet, M.C., et al., 2006. The N-terminus of PKR is responsible for the activation of the NF-kappaB signaling pathway by interacting with the IKK complex. Cell Signal. 18**,** 1865-75.
Bose, A., et al., 2011. Modulation of tau phosphorylation by the kinase PKR: implications in Alzheimer's disease. Brain Pathol. 21**,** 189-200.
Bowman, C.C., et al., 2003. Cultured astrocytes express toll-like receptors for bacterial products. Glia. 43**,** 281-91.
Braak, H., Braak, E., 1991. Neuropathological stageing of Alzheimer-related changes. Acta Neuropathol. 82**,** 239-59.
Braak, H., et al., 2011. Stages of the pathologic process in Alzheimer disease: age categories from 1 to 100 years. J Neuropathol Exp Neurol. 70**,** 960-9.
Brown, C.M., et al., 2010. Production of proinflammatory cytokines and chemokines during neuroinflammation: novel roles for estrogen receptors alpha and beta. Endocrinology. 151**,** 4916-25.
Brydon, L., et al., 2008. Peripheral inflammation is associated with altered substantia nigra activity and psychomotor slowing in humans. Biol Psychiatry. 63**,** 1022-9.
Buee, L., et al., 2000. Tau protein isoforms, phosphorylation and role in neurodegenerative disorders. Brain Res Brain Res Rev. 33**,** 95-130.
Burdick, D., et al., 1997. Preferential adsorption, internalization and resistance to degradation of the major isoform of the Alzheimer's amyloid peptide, A beta 1-42, in differentiated PC12 cells. Brain Res. 746**,** 275-84.
Cabanski, M., et al., 2008. PKR regulates TLR2/TLR4-dependent signaling in murine alveolar macrophages. Am J Respir Cell Mol Biol. 38**,** 26-31.
Cakala, M., Malik, A.R., Strosznajder, J.B., 2007. Inhibitor of cyclooxygenase-2 protects against amyloid beta peptide-evoked memory impairment in mice. Pharmacol Rep. 59**,** 164-72.
Camins, A., et al., 2006. The role of CDK5/P25 formation/inhibition in neurodegeneration. Drug News Perspect. 19**,** 453-60.
Capuron, L., et al., 2002. Neurobehavioral effects of interferon-alpha in cancer patients: phenomenology and paroxetine responsiveness of symptom dimensions. Neuropsychopharmacology. 26**,** 643-52.
Chang, R.C., et al., 2002a. Involvement of double-stranded RNA-dependent protein kinase and phosphorylation of eukaryotic initiation factor-2alpha in neuronal degeneration. J Neurochem. 83**,** 1215-25.
Chang, R.C., et al., 2002b. Phosphorylation of eukaryotic initiation factor-2alpha (eIF2alpha) is associated with neuronal degeneration in Alzheimer's disease. Neuroreport. 13**,** 2429-32.
Chow, V.W., et al., 2010. An overview of APP processing enzymes and products. Neuromolecular Med. 12**,** 1-12.
Clark, C.M., et al., 2012. Cerebral PET with florbetapir compared with neuropathology at autopsy for detection of neuritic amyloid-beta plaques: a prospective cohort study. Lancet Neurol. 11**,** 669-78.
Clavarino, G., et al., 2012. Protein phosphatase 1 subunit Ppp1r15a/GADD34 regulates cytokine production in polyinosinic:polycytidylic acid-stimulated dendritic cells. Proc Natl Acad Sci U S A. 109**,** 3006-11.
Combrinck, M.I., Perry, V.H., Cunningham, C., 2002. Peripheral infection evokes exaggerated sickness behaviour in pre-clinical murine prion disease. Neuroscience. 112**,** 7-11.
Conti, B., et al., 2004. Cytokines and fever. Front Biosci. 9**,** 1433-49.

Couturier, J., et al., 2011. Prevention of the beta-amyloid peptide-induced inflammatory process by inhibition of double-stranded RNA-dependent protein kinase in primary murine mixed co-cultures. J Neuroinflammation. 8**,** 72.
Cruz, J.C., et al., 2006. p25/cyclin-dependent kinase 5 induces production and intraneuronal accumulation of amyloid beta in vivo. J Neurosci. 26**,** 10536-41.
Cuddihy, A.R., et al., 1999. Double-stranded-RNA-activated protein kinase PKR enhances transcriptional activation by tumor suppressor p53. Mol Cell Biol. 19**,** 2475-84.
Cunningham, C., et al., 2005. Central and systemic endotoxin challenges exacerbate the local inflammatory response and increase neuronal death during chronic neurodegeneration. J Neurosci. 25**,** 9275-84.
Cunningham, C., et al., 2007. The sickness behaviour and CNS inflammatory mediator profile induced by systemic challenge of mice with synthetic double-stranded RNA (poly I:C). Brain Behav Immun. 21**,** 490-502.
Cunningham, C., et al., 2009. Systemic inflammation induces acute behavioral and cognitive changes and accelerates neurodegenerative disease. Biol Psychiatry. 65**,** 304-12.
Czapski, G.A., et al., 2007. Role of nitric oxide in the brain during lipopolysaccharide-evoked systemic inflammation. J Neurosci Res. 85**,** 1694-703.
Dabo, S., Meurs, E.F., 2012. dsRNA-dependent protein kinase PKR and its role in stress, signaling and HCV infection. Viruses. 4**,** 2598-635.
Daher, A., et al., 2009. TRBP control of PACT-induced phosphorylation of protein kinase R is reversed by stress. Mol Cell Biol. 29**,** 254-65.
Dantzer, R., 2001. Cytokine-induced sickness behavior: where do we stand? Brain Behav Immun. 15**,** 7-24.
Davalos, D., et al., 2005. ATP mediates rapid microglial response to local brain injury in vivo. Nat Neurosci. 8**,** 752-8.
Deb, A., et al., 2001a. RNA-dependent protein kinase PKR is required for activation of NF-kappa B by IFN-gamma in a STAT1-independent pathway. J Immunol. 166**,** 6170-80.
Deb, A., et al., 2001b. Protein kinase PKR is required for platelet-derived growth factor signaling of c-fos gene expression via Erks and Stat3. EMBO J. 20**,** 2487-96.
Del Bo, R., et al., 1995. Reciprocal control of inflammatory cytokines, IL-1 and IL-6, and beta-amyloid production in cultures. Neurosci Lett. 188**,** 70-4.
Delacourte, A., 2006. The natural and molecular history of Alzheimer's disease. J Alzheimers Dis. 9**,** 187-94.
Der, S.D., et al., 1997. A double-stranded RNA-activated protein kinase-dependent pathway mediating stress-induced apoptosis. Proc Natl Acad Sci U S A. 94**,** 3279-83.
Dey, M., et al., 2005. Mechanistic link between PKR dimerization, autophosphorylation, and eIF2alpha substrate recognition. Cell. 122**,** 901-13.
Dickson, D.W., et al., 1993. Microglia and cytokines in neurological disease, with special reference to AIDS and Alzheimer's disease. Glia. 7**,** 75-83.
Dorenlot, P., et al., 2005. Major depression as a risk factor for early institutionalization of dementia patients living in the community. Int J Geriatr Psychiatry. 20**,** 471-8.
Drame, M., et al., 2012. Nursing home admission in elderly subjects with dementia: predictive factors and future challenges. J Am Med Dir Assoc. 13**,** 83 e17-20.
Dumurgier, J., et al., 2013. Cerebrospinal fluid PKR level predicts cognitive decline in Alzheimer's disease. PLoS One. 8**,** e53587.
Dunn, N., et al., 2005. Association between dementia and infectious disease: evidence from a case-control study. Alzheimer Dis Assoc Disord. 19**,** 91-4.
Duriez, P.J., Shah, G.M., 1997. Cleavage of poly(ADP-ribose) polymerase: a sensitive parameter to study cell death. Biochem Cell Biol. 75**,** 337-49.

Duyckaerts, C., Delatour, B., Potier, M.C., 2009. Classification and basic pathology of Alzheimer disease. Acta Neuropathol. 118**,** 5-36.
Edison, P., et al., 2008. Microglia, amyloid, and cognition in Alzheimer's disease: An [11C](R)PK11195-PET and [11C]PIB-PET study. Neurobiol Dis. 32**,** 412-9.
Ek, M., et al., 1998. Activation of vagal afferents after intravenous injection of interleukin-1beta: role of endogenous prostaglandins. J Neurosci. 18**,** 9471-9.
Elie, M., et al., 1998. Delirium risk factors in elderly hospitalized patients. J Gen Intern Med. 13**,** 204-12.
Etminan, M., Gill, S., Samii, A., 2003. Effect of non-steroidal anti-inflammatory drugs on risk of Alzheimer's disease: systematic review and meta-analysis of observational studies. Bmj. 327**,** 128.
Forette, F., Hauw, J.J., 2010. [Treatment of Alzheimer's disease and future approaches]. Therapie. 65**,** 429-37.
Francis, K., et al., 2003. Innate immunity and brain inflammation: the key role of complement. Expert Rev Mol Med. 5**,** 1-19.
Fratiglioni, L., Paillard-Borg, S., Winblad, B., 2004. An active and socially integrated lifestyle in late life might protect against dementia. Lancet Neurol. 3**,** 343-53.
Fu, A.K., et al., 2004. Cyclin-dependent kinase 5 phosphorylates signal transducer and activator of transcription 3 and regulates its transcriptional activity. Proc Natl Acad Sci U S A. 101**,** 6728-33.
Galimberti, D., et al., 2008. Intrathecal levels of IL-6, IL-11 and LIF in Alzheimer's disease and frontotemporal lobar degeneration. J Neurol. 255**,** 539-44.
Garcia, M.A., et al., 2006. Impact of protein kinase PKR in cell biology: from antiviral to antiproliferative action. Microbiol Mol Biol Rev. 70**,** 1032-60.
Garcia, M.A., Meurs, E.F., Esteban, M., 2007. The dsRNA protein kinase PKR: virus and cell control. Biochimie. 89**,** 799-811.
Ghosh, S., May, M.J., Kopp, E.B., 1998. NF-kappa B and Rel proteins: evolutionarily conserved mediators of immune responses. Annu Rev Immunol. 16**,** 225-60.
Gil, J., Esteban, M., 2000a. Induction of apoptosis by the dsRNA-dependent protein kinase (PKR): mechanism of action. Apoptosis. 5**,** 107-14.
Gil, J., Esteban, M., 2000b. The interferon-induced protein kinase (PKR), triggers apoptosis through FADD-mediated activation of caspase 8 in a manner independent of Fas and TNF-alpha receptors. Oncogene. 19**,** 3665-74.
Goate, A., et al., 1991. Segregation of a missense mutation in the amyloid precursor protein gene with familial Alzheimer's disease. Nature. 349**,** 704-6.
Goh, K.C., deVeer, M.J., Williams, B.R., 2000. The protein kinase PKR is required for p38 MAPK activation and the innate immune response to bacterial endotoxin. EMBO J. 19**,** 4292-7.
Goldgaber, D., et al., 1987. Isolation, characterization, and chromosomal localization of human brain cDNA clones coding for the precursor of the amyloid of brain in Alzheimer's disease, Down's syndrome and aging. J Neural Transm Suppl. 24**,** 23-8.
Gong, C.X., et al., 1995. Phosphatase activity toward abnormally phosphorylated tau: decrease in Alzheimer disease brain. J Neurochem. 65**,** 732-8.
Gorlovoy, P., et al., 2009. Accumulation of tau induced in neurites by microglial proinflammatory mediators. FASEB J. 23**,** 2502-13.
Griffin, W.S., 2006. Inflammation and neurodegenerative diseases. Am J Clin Nutr. 83**,** 470S-474S.
Gu, Y., et al., 2010. Food combination and Alzheimer disease risk: a protective diet. Arch Neurol. 67**,** 699-706.

Guerreiro, R.J., Gustafson, D.R., Hardy, J., 2012. The genetic architecture of Alzheimer's disease: beyond APP, PSENs and APOE. Neurobiol Aging. 33**,** 437-56.
Haass, C., et al., 1993. beta-Amyloid peptide and a 3-kDa fragment are derived by distinct cellular mechanisms. J Biol Chem. 268**,** 3021-4.
Hannestad, J., et al., 2012. Glucose metabolism in the insula and cingulate is affected by systemic inflammation in humans. J Nucl Med. 53**,** 601-7.
Hardy, J., et al., 1998. Genetic dissection of Alzheimer's disease and related dementias: amyloid and its relationship to tau. Nat Neurosci. 1**,** 355-8.
Hardy, J., Selkoe, D.J., 2002. The amyloid hypothesis of Alzheimer's disease: progress and problems on the road to therapeutics. Science. 297**,** 353-6.
Hardy, J.A., Higgins, G.A., 1992. Alzheimer's disease: the amyloid cascade hypothesis. Science. 256**,** 184-5.
Harrison, N.A., et al., 2009a. Inflammation causes mood changes through alterations in subgenual cingulate activity and mesolimbic connectivity. Biol Psychiatry. 66**,** 407-14.
Harrison, N.A., et al., 2009b. Neural origins of human sickness in interoceptive responses to inflammation. Biol Psychiatry. 66**,** 415-22.
Hart, B.L., 1988. Biological basis of the behavior of sick animals. Neurosci Biobehav Rev. 12**,** 123-37.
Hayashi, F., et al., 2001. The innate immune response to bacterial flagellin is mediated by Toll-like receptor 5. Nature. 410**,** 1099-103.
Heil, F., et al., 2004. Species-specific recognition of single-stranded RNA via toll-like receptor 7 and 8. Science. 303**,** 1526-9.
Hemmi, H., et al., 2000. A Toll-like receptor recognizes bacterial DNA. Nature. 408**,** 740-5.
Heneka, M.T., et al., 2013. NLRP3 is activated in Alzheimer's disease and contributes to pathology in APP/PS1 mice. Nature. 493**,** 674-8.
Heneka, M.T., Kummer, M.P., Latz, E., 2014. Innate immune activation in neurodegenerative disease. Nat Rev Immunol. 14**,** 463-77.
Henry, C.J., et al., 2009. Peripheral lipopolysaccharide (LPS) challenge promotes microglial hyperactivity in aged mice that is associated with exaggerated induction of both pro-inflammatory IL-1beta and anti-inflammatory IL-10 cytokines. Brain Behav Immun. 23**,** 309-17.
Hershey, J.W., 1991. Translational control in mammalian cells. Annu Rev Biochem. 60**,** 717-55.
Holmes, C., et al., 2009. Systemic inflammation and disease progression in Alzheimer disease. Neurology. 73**,** 768-74.
Horng, T., Barton, G.M., Medzhitov, R., 2001. TIRAP: an adapter molecule in the Toll signaling pathway. Nat Immunol. 2**,** 835-41.
Hsu, L.C., et al., 2004. The protein kinase PKR is required for macrophage apoptosis after activation of Toll-like receptor 4. Nature. 428**,** 341-5.
Hugon, J., Paquet, C., Chang, R.C., 2009. Could PKR inhibition modulate human neurodegeneration? Expert Rev Neurother. 9**,** 1455-7.
Hull, M., Berger, M., Heneka, M., 2006. Disease-modifying therapies in Alzheimer's disease: how far have we come? Drugs. 66**,** 2075-93.
Ill-Raga, G., et al., 2011. Activation of PKR causes amyloid ss-peptide accumulation via de-repression of BACE1 expression. PLoS One. 6**,** e21456.
Imai, Y., Kohsaka, S., 2002. Intracellular signaling in M-CSF-induced microglia activation: role of Iba1. Glia. 40**,** 164-74.
Ingrand, S., et al., 2007. The oxindole/imidazole derivative C16 reduces in vivo brain PKR activation. FEBS Lett. 581**,** 4473-8.

Innamorato, N.G., et al., 2008. The transcription factor Nrf2 is a therapeutic target against brain inflammation. J Immunol. 181**,** 680-9.
Iordanov, M.S., et al., 2000. Activation of p38 mitogen-activated protein kinase and c-Jun NH(2)-terminal kinase by double-stranded RNA and encephalomyocarditis virus: involvement of RNase L, protein kinase R, and alternative pathways. Mol Cell Biol. 20**,** 617-27.
Ishiguro, K., et al., 1992. Tau protein kinase I converts normal tau protein into A68-like component of paired helical filaments. J Biol Chem. 267**,** 10897-901.
Jack, C.R., Jr., et al., 1992. MR-based hippocampal volumetry in the diagnosis of Alzheimer's disease. Neurology. 42**,** 183-8.
Jack, C.R., Jr., et al., 2010. Hypothetical model of dynamic biomarkers of the Alzheimer's pathological cascade. Lancet Neurol. 9**,** 119-28.
Jaeger, L.B., et al., 2009. Lipopolysaccharide alters the blood-brain barrier transport of amyloid beta protein: a mechanism for inflammation in the progression of Alzheimer's disease. Brain Behav Immun. 23**,** 507-17.
Jeffrey, I.W., et al., 1995. Nuclear localization of the interferon-inducible protein kinase PKR in human cells and transfected mouse cells. Exp Cell Res. 218**,** 17-27.
Jick, H., et al., 2000. Statins and the risk of dementia. Lancet. 356**,** 1627-31.
Jonsson, T., et al., 2013. Variant of TREM2 associated with the risk of Alzheimer's disease. N Engl J Med. 368**,** 107-16.
Kahn, M.S., et al., Prolonged elevation in hippocampal Abeta and cognitive deficits following repeated endotoxin exposure in the mouse. Behav Brain Res. 229**,** 176-84.
Kahn, M.S., et al., 2012. Prolonged elevation in hippocampal Abeta and cognitive deficits following repeated endotoxin exposure in the mouse. Behav Brain Res. 229**,** 176-84.
Kang, R., Tang, D., 2012. PKR-dependent inflammatory signals. Sci Signal. 5**,** pe47.
Kayed, R., et al., 2003. Common structure of soluble amyloid oligomers implies common mechanism of pathogenesis. Science. 300**,** 486-9.
Kimura, R., et al., 2007. The DYRK1A gene, encoded in chromosome 21 Down syndrome critical region, bridges between beta-amyloid production and tau phosphorylation in Alzheimer disease. Hum Mol Genet. 16**,** 15-23.
Kirkegaard, K., Taylor, M.P., Jackson, W.T., 2004. Cellular autophagy: surrender, avoidance and subversion by microorganisms. Nat Rev Microbiol. 2**,** 301-14.
Kirschner, D.A., Abraham, C., Selkoe, D.J., 1986. X-ray diffraction from intraneuronal paired helical filaments and extraneuronal amyloid fibers in Alzheimer disease indicates cross-beta conformation. Proc Natl Acad Sci U S A. 83**,** 503-7.
Kitazawa, M., et al., 2005. Lipopolysaccharide-induced inflammation exacerbates tau pathology by a cyclin-dependent kinase 5-mediated pathway in a transgenic model of Alzheimer's disease. J Neurosci. 25**,** 8843-53.
Kivipelto, M., et al., 2005. Obesity and vascular risk factors at midlife and the risk of dementia and Alzheimer disease. Arch Neurol. 62**,** 1556-60.
Kluger, M.J., Rothenburg, B.A., 1979. Fever and reduced iron: their interaction as a host defense response to bacterial infection. Science. 203**,** 374-6.
Koromilas, A.E., et al., 1992. Malignant transformation by a mutant of the IFN-inducible dsRNA-dependent protein kinase. Science. 257**,** 1685-9.
Krabbe, K.S., et al., 2005. Low-dose endotoxemia and human neuropsychological functions. Brain Behav Immun. 19**,** 453-60.
Kreutzberg, G.W., 1996. Microglia: a sensor for pathological events in the CNS. Trends Neurosci. 19**,** 312-8.
Krstic, D., et al., Systemic immune challenges trigger and drive Alzheimer-like neuropathology in mice. J Neuroinflammation. 9**,** 151.

Krstic, D., et al., 2012. Systemic immune challenges trigger and drive Alzheimer-like neuropathology in mice. J Neuroinflammation. 9**,** 151.
Kumar, A., et al., 1997. Deficient cytokine signaling in mouse embryo fibroblasts with a targeted deletion in the PKR gene: role of IRF-1 and NF-kappaB. EMBO J. 16**,** 406-16.
Kumar, H., Kawai, T., Akira, S., 2009. Toll-like receptors and innate immunity. Biochem Biophys Res Commun. 388**,** 621-5.
Kuusisto, J., et al., 1994. Association of apolipoprotein E phenotypes with late onset Alzheimer's disease: population based study. Bmj. 309**,** 636-8.
LaFerla, F.M., Green, K.N., Oddo, S., 2007. Intracellular amyloid-beta in Alzheimer's disease. Nat Rev Neurosci. 8**,** 499-509.
Larson, M.E., Lesne, S.E., 2012. Soluble Abeta oligomer production and toxicity. J Neurochem. 120 Suppl 1**,** 125-39.
Lee, J.H., et al., 2005. Double-stranded RNA-activated protein kinase is required for the LPS-induced activation of STAT1 inflammatory signaling in rat brain glial cells. Glia. 50**,** 66-79.
Lee, J.W., et al., 2008. Neuro-inflammation induced by lipopolysaccharide causes cognitive impairment through enhancement of beta-amyloid generation. J Neuroinflammation. 5**,** 37.
Lemstra, A.W., et al., 2007. Microglia activation in sepsis: a case-control study. J Neuroinflammation. 4**,** 4.
Leroy, K., Yilmaz, Z., Brion, J.P., 2007. Increased level of active GSK-3beta in Alzheimer's disease and accumulation in argyrophilic grains and in neurones at different stages of neurofibrillary degeneration. Neuropathol Appl Neurobiol. 33**,** 43-55.
Lewis, J., et al., 2001. Enhanced neurofibrillary degeneration in transgenic mice expressing mutant tau and APP. Science. 293**,** 1487-91.
Li, G., et al., 2004. Statin therapy and risk of dementia in the elderly: a community-based prospective cohort study. Neurology. 63**,** 1624-8.
Li, G., et al., 2011. Temporal relationship between depression and dementia: findings from a large community-based 15-year follow-up study. Arch Gen Psychiatry. 68**,** 970-7.
Liu, F., et al., 2005. Dephosphorylation of tau by protein phosphatase 5: impairment in Alzheimer's disease. J Biol Chem. 280**,** 1790-6.
Liu, S., et al., 2007. The function of heme-regulated eIF2alpha kinase in murine iron homeostasis and macrophage maturation. J Clin Invest. 117**,** 3296-305.
Lott, I.T., Dierssen, M., 2010. Cognitive deficits and associated neurological complications in individuals with Down's syndrome. Lancet Neurol. 9**,** 623-33.
Lotze, M.T., Tracey, K.J., 2005. High-mobility group box 1 protein (HMGB1): nuclear weapon in the immune arsenal. Nat Rev Immunol. 5**,** 331-42.
Lotze, M.T., Deisseroth, A., Rubartelli, A., 2007. Damage associated molecular pattern molecules. Clin Immunol. 124**,** 1-4.
Lourenco, M.V., et al., 2013. TNF-alpha mediates PKR-dependent memory impairment and brain IRS-1 inhibition induced by Alzheimer's beta-amyloid oligomers in mice and monkeys. Cell Metab. 18**,** 831-43.
Lu, B., et al., 2012. Novel role of PKR in inflammasome activation and HMGB1 release. Nature. 488**,** 670-4.
Martin, L., et al., 2013. Tau protein kinases: involvement in Alzheimer's disease. Ageing Res Rev. 12**,** 289-309.
Maruyama, M., et al., 2013. Imaging of tau pathology in a tauopathy mouse model and in Alzheimer patients compared to normal controls. Neuron. 79**,** 1094-108.

Masters, C.L., et al., 1985. Amyloid plaque core protein in Alzheimer disease and Down syndrome. Proc Natl Acad Sci U S A. 82**,** 4245-9.
Matsumura, K., Kobayashi, S., 2004. Signaling the brain in inflammation: the role of endothelial cells. Front Biosci. 9**,** 2819-26.
Mattson, M.P., 2004. Pathways towards and away from Alzheimer's disease. Nature. 430**,** 631-9.
Mayeux, R., et al., 2003. Plasma A[beta]40 and A[beta]42 and Alzheimer's disease: relation to age, mortality, and risk. Neurology. 61**,** 1185-90.
McGeer, P.L., et al., 1989. Activation of the classical complement pathway in brain tissue of Alzheimer patients. Neurosci Lett. 107**,** 341-6.
McGeer, P.L., et al., 1993. Microglia in degenerative neurological disease. Glia. 7**,** 84-92.
McKhann, G., et al., 1984. Clinical diagnosis of Alzheimer's disease: report of the NINCDS-ADRDA Work Group under the auspices of Department of Health and Human Services Task Force on Alzheimer's Disease. Neurology. 34**,** 939-44.
McKhann, G.M., et al., 2011. The diagnosis of dementia due to Alzheimer's disease: recommendations from the National Institute on Aging-Alzheimer's Association workgroups on diagnostic guidelines for Alzheimer's disease. Alzheimers Dement. 7**,** 263-9.
Meagher, D., 2009. More attention, less confusion: time to lessen the burden of delirium. Int Rev Psychiatry. 21**,** 1-3.
Medzhitov, R., Janeway, C.A., Jr., 1997. Innate immunity: the virtues of a nonclonal system of recognition. Cell. 91**,** 295-8.
Mehta, P.D., et al., 2000. Plasma and cerebrospinal fluid levels of amyloid beta proteins 1-40 and 1-42 in Alzheimer disease. Arch Neurol. 57**,** 100-5.
Metz, D.H., Esteban, M., 1972. Interferon inhibits viral protein synthesis in L cells infected with vaccinia virus. Nature. 238**,** 385-8.
Meurs, E., et al., 1990. Molecular cloning and characterization of the human double-stranded RNA-activated protein kinase induced by interferon. Cell. 62**,** 379-90.
Meurs, E.F., et al., 1992. Constitutive expression of human double-stranded RNA-activated p68 kinase in murine cells mediates phosphorylation of eukaryotic initiation factor 2 and partial resistance to encephalomyocarditis virus growth. J Virol. 66**,** 5805-14.
Meurs, E.F., et al., 1993. Tumor suppressor function of the interferon-induced double-stranded RNA-activated protein kinase. Proc Natl Acad Sci U S A. 90**,** 232-6.
Michelsen, K.S., et al., 2001. The role of toll-like receptors (TLRs) in bacteria-induced maturation of murine dendritic cells (DCS). Peptidoglycan and lipoteichoic acid are inducers of DC maturation and require TLR2. J Biol Chem. 276**,** 25680-6.
Moore, A.H., O'Banion, M.K., 2002. Neuroinflammation and anti-inflammatory therapy for Alzheimer's disease. Adv Drug Deliv Rev. 54**,** 1627-56.
Mouton-Liger, F., et al., 2012a. Oxidative stress increases BACE1 protein levels through activation of the PKR-eIF2alpha pathway. Biochim Biophys Acta. 1822**,** 885-96.
Mouton-Liger, F., et al., 2012b. Increased cerebrospinal fluid levels of double-stranded RNA-dependant protein kinase in Alzheimer's disease. Biol Psychiatry. 71**,** 829-35.
Mukamal, K.J., et al., 2003. Prospective study of alcohol consumption and risk of dementia in older adults. Jama. 289**,** 1405-13.
Muzio, M., Mantovani, A., 2001. Toll-like receptors (TLRs) signalling and expression pattern. J Endotoxin Res. 7**,** 297-300.
Nadeau, S., Rivest, S., 2000. Role of microglial-derived tumor necrosis factor in mediating CD14 transcription and nuclear factor kappa B activity in the brain during endotoxemia. J Neurosci. 20**,** 3456-68.

Nakamura, T., et al., 2010. Double-stranded RNA-dependent protein kinase links pathogen sensing with stress and metabolic homeostasis. Cell. 140**,** 338-48.
Nimmerjahn, A., Kirchhoff, F., Helmchen, F., 2005. Resting microglial cells are highly dynamic surveillants of brain parenchyma in vivo. Science. 308**,** 1314-8.
O'Connor, T., et al., 2008. Phosphorylation of the translation initiation factor eIF2alpha increases BACE1 levels and promotes amyloidogenesis. Neuron. 60**,** 988-1009.
Paccalin, M., et al., 2006. Activated mTOR and PKR kinases in lymphocytes correlate with memory and cognitive decline in Alzheimer's disease. Dement Geriatr Cogn Disord. 22**,** 320-6.
Page, G., et al., 2006. Activated double-stranded RNA-dependent protein kinase and neuronal death in models of Alzheimer's disease. Neuroscience. 139**,** 1343-54.
Paquet, C., et al., 2009. Neuronal phosphorylated RNA-dependent protein kinase in Creutzfeldt-Jakob disease. J Neuropathol Exp Neurol. 68**,** 190-8.
Paquet, C., et al., 2012. The PKR activator PACT is induced by Abeta: involvement in Alzheimer's disease. Brain Pathol. 22**,** 219-29.
Patwardhan, M.B., et al., 2004. Alzheimer disease: operating characteristics of PET--a meta-analysis. Radiology. 231**,** 73-80.
Pei, J.J., et al., 1997. Distribution, levels, and activity of glycogen synthase kinase-3 in the Alzheimer disease brain. J Neuropathol Exp Neurol. 56**,** 70-8.
Poole, L., Dickens, C., Steptoe, A., 2011. The puzzle of depression and acute coronary syndrome: reviewing the role of acute inflammation. J Psychosom Res. 71**,** 61-8.
Posner, H.B., et al., 2002. The relationship of hypertension in the elderly to AD, vascular dementia, and cognitive function. Neurology. 58**,** 1175-81.
Pratico, D., et al., 2000. Increased 8,12-iso-iPF2alpha-VI in Alzheimer's disease: correlation of a noninvasive index of lipid peroxidation with disease severity. Ann Neurol. 48**,** 809-12.
Qin, L., et al., 2008. Increased systemic and brain cytokine production and neuroinflammation by endotoxin following ethanol treatment. J Neuroinflammation. 5**,** 10.
Raivich, G., 2005. Like cops on the beat: the active role of resting microglia. Trends Neurosci. 28**,** 571-3.
Reitz, C., Mayeux, R., 2014. Alzheimer disease: epidemiology, diagnostic criteria, risk factors and biomarkers. Biochem Pharmacol. 88**,** 640-51.
Rezaie, P., Male, D., 2002. Mesoglia & microglia--a historical review of the concept of mononuclear phagocytes within the central nervous system. J Hist Neurosci. 11**,** 325-74.
Ritchie, C.W., et al., 2003. Metal-protein attenuation with iodochlorhydroxyquin (clioquinol) targeting Abeta amyloid deposition and toxicity in Alzheimer disease: a pilot phase 2 clinical trial. Arch Neurol. 60**,** 1685-91.
Ritchie, K., Lovestone, S., 2002. The dementias. Lancet. 360**,** 1759-66.
Rockwood, K., et al., 1999. The risk of dementia and death after delirium. Age Ageing. 28**,** 551-6.
Roe, A.D., et al., Lipopolysaccharide-induced tau phosphorylation and kinase activity--modulation, but not mediation, by corticotropin-releasing factor receptors. Eur J Neurosci. 34**,** 448-56.
Roe, A.D., et al., 2011. Lipopolysaccharide-induced tau phosphorylation and kinase activity--modulation, but not mediation, by corticotropin-releasing factor receptors. Eur J Neurosci. 34**,** 448-56.
Rolls, A., et al., 2007. Toll-like receptors modulate adult hippocampal neurogenesis. Nat Cell Biol. 9**,** 1081-8.

Rovio, S., et al., 2005. Leisure-time physical activity at midlife and the risk of dementia and Alzheimer's disease. Lancet Neurol. 4**,** 705-11.
Rummel, C., et al., 2008. Selective contribution of interleukin-6 and leptin to brain inflammatory signals induced by systemic LPS injection in mice. J Comp Neurol. 511**,** 373-95.
Russo, I., et al., 2011. Cyclooxygenase-1 is involved in the inhibition of hippocampal neurogenesis after lipopolysaccharide-induced neuroinflammation. Cell Cycle. 10**,** 2568-73.
Salloway, S., et al., 2009. A phase 2 multiple ascending dose trial of bapineuzumab in mild to moderate Alzheimer disease. Neurology. 73**,** 2061-70.
Saunders, L.R., Barber, G.N., 2003. The dsRNA binding protein family: critical roles, diverse cellular functions. Faseb J. 17**,** 961-83.
Schechter, R., Yen, S.H., Terry, R.D., 1981. Fibrous Astrocytes in senile dementia of the Alzheimer type. J Neuropathol Exp Neurol. 40**,** 95-101.
Schedlowski, M., Engler, H., Grigoleit, J.S., 2014. Endotoxin-induced experimental systemic inflammation in humans: a model to disentangle immune-to-brain communication. Brain Behav Immun. 35**,** 1-8.
Scheltens, P., et al., 2002. Structural magnetic resonance imaging in the practical assessment of dementia: beyond exclusion. Lancet Neurol. 1**,** 13-21.
Scheuner, D., et al., 1996. Secreted amyloid beta-protein similar to that in the senile plaques of Alzheimer's disease is increased in vivo by the presenilin 1 and 2 and APP mutations linked to familial Alzheimer's disease. Nat Med. 2**,** 864-70.
Sehgal, N., et al., 2011. Cytochrome P4504f, a potential therapeutic target limiting neuroinflammation. Biochem Pharmacol. 82**,** 53-64.
Selkoe, D.J., 1991. The molecular pathology of Alzheimer's disease. Neuron. 6**,** 487-98.
Selkoe, D.J., 1994. Cell biology of the amyloid beta-protein precursor and the mechanism of Alzheimer's disease. Annu Rev Cell Biol. 10**,** 373-403.
Selkoe, D.J., 2001. Alzheimer's disease results from the cerebral accumulation and cytotoxicity of amyloid beta-protein. J Alzheimers Dis. 3**,** 75-80.
Sen, G.C., Taira, H., Lengyel, P., 1978. Interferon, double-stranded RNA, and protein phosphorylation. Characteristics of a double-stranded RNA-activated protein kinase system partially purified from interferon treated Ehrlich ascites tumor cells. J Biol Chem. 253**,** 5915-21.
Sergeant, N., Delacourte, A., Buee, L., 2005. Tau protein as a differential biomarker of tauopathies. Biochim Biophys Acta. 1739**,** 179-97.
Sharp, E.S., Gatz, M., 2011. Relationship between education and dementia: an updated systematic review. Alzheimer Dis Assoc Disord. 25**,** 289-304.
Sharshar, T., et al., 2004. The neuropathology of septic shock. Brain Pathol. 14**,** 21-33.
Shen, S., et al., 2012. Cytoplasmic STAT3 represses autophagy by inhibiting PKR activity. Mol Cell. 48**,** 667-80.
Sheng, J.G., et al., 2003. Lipopolysaccharide-induced-neuroinflammation increases intracellular accumulation of amyloid precursor protein and amyloid beta peptide in APPswe transgenic mice. Neurobiol Dis. 14**,** 133-45.
Shirahama, T., et al., 1990. Amyloid enhancing factor-loaded macrophages in amyloid fibril formation. Lab Invest. 62**,** 61-8.
Shoji, M., et al., 2000. JNK activation is associated with intracellular beta-amyloid accumulation. Brain Res Mol Brain Res. 85**,** 221-33.
Solfrizzi, V., et al., 2011. Metabolic syndrome, mild cognitive impairment, and progression to dementia. The Italian Longitudinal Study on Aging. Neurobiol Aging. 32**,** 1932-41.

Spillantini, M.G., Bird, T.D., Ghetti, B., 1998. Frontotemporal dementia and Parkinsonism linked to chromosome 17: a new group of tauopathies. Brain Pathol. 8**,** 387-402.
Spulber, S., et al., 2012. Molecular hydrogen reduces LPS-induced neuroinflammation and promotes recovery from sickness behaviour in mice. PLoS One. 7**,** e42078.
Sudhakar, A., et al., 2000. Phosphorylation of serine 51 in initiation factor 2 alpha (eIF2 alpha) promotes complex formation between eIF2 alpha(P) and eIF2B and causes inhibition in the guanine nucleotide exchange activity of eIF2B. Biochemistry. 39**,** 12929-38.
Suen, K.C., et al., 2003. Reduction of calcium release from the endoplasmic reticulum could only provide partial neuroprotection against beta-amyloid peptide toxicity. J Neurochem. 87**,** 1413-26.
Takahashi, M., et al., 1991. A novel brain-specific 25 kDa protein (p25) is phosphorylated by a Ser/Thr-Pro kinase (TPK II) from tau protein kinase fractions. FEBS Lett. 289**,** 37-43.
Takashima, A., et al., 1996. Exposure of rat hippocampal neurons to amyloid beta peptide (25-35) induces the inactivation of phosphatidyl inositol-3 kinase and the activation of tau protein kinase I/glycogen synthase kinase-3 beta. Neurosci Lett. 203**,** 33-6.
Tariot, P.N., Aisen, P.S., 2009. Can lithium or valproate untie tangles in Alzheimer's disease? J Clin Psychiatry. 70**,** 919-21.
Tazi, K.A., et al., 2007. In vivo altered unfolded protein response and apoptosis in livers from lipopolysaccharide-challenged cirrhotic rats. J Hepatol. 46**,** 1075-88.
Teeling, J.L., et al., 2007. Sub-pyrogenic systemic inflammation impacts on brain and behavior, independent of cytokines. Brain Behav Immun. 21**,** 836-50.
Teeling, J.L., et al., 2010. The effect of non-steroidal anti-inflammatory agents on behavioural changes and cytokine production following systemic inflammation: Implications for a role of COX-1. Brain Behav Immun. 24**,** 409-19.
Thompson, W.L., Karpus, W.J., Van Eldik, L.J., 2008. MCP-1-deficient mice show reduced neuroinflammatory responses and increased peripheral inflammatory responses to peripheral endotoxin insult. J Neuroinflammation. 5**,** 35.
Trinh, N.H., et al., 2003. Efficacy of cholinesterase inhibitors in the treatment of neuropsychiatric symptoms and functional impairment in Alzheimer disease: a meta-analysis. JAMA. 289**,** 210-6.
Turner, P.R., et al., 2003. Roles of amyloid precursor protein and its fragments in regulating neural activity, plasticity and memory. Prog Neurobiol. 70**,** 1-32.
van Gool, W.A., van de Beek, D., Eikelenboom, P., 2010. Systemic infection and delirium: when cytokines and acetylcholine collide. Lancet. 375**,** 773-5.
van Horssen, J., et al., 2003. Heparan sulphate proteoglycans in Alzheimer's disease and amyloid-related disorders. Lancet Neurol. 2**,** 482-92.
van Munster, B.C., et al., 2008. Time-course of cytokines during delirium in elderly patients with hip fractures. J Am Geriatr Soc. 56**,** 1704-9.
Vassar, R., et al., 1999. Beta-secretase cleavage of Alzheimer's amyloid precursor protein by the transmembrane aspartic protease BACE. Science. 286**,** 735-41.
Verghese, J., et al., 2003. Leisure activities and the risk of dementia in the elderly. N Engl J Med. 348**,** 2508-16.
Wang, X., et al., 2007. Activation of double-stranded RNA-activated protein kinase by mild impairment of oxidative metabolism in neurons. J Neurochem. 103**,** 2380-90.
Wen, Y., et al., 2008. Transcriptional regulation of beta-secretase by p25/cdk5 leads to enhanced amyloidogenic processing. Neuron. 57**,** 680-90.
Winblad, B., et al., 2007. Memantine in moderate to severe Alzheimer's disease: a meta-analysis of randomised clinical trials. Dement Geriatr Cogn Disord. 24**,** 20-7.

Wischik, C.M., Harrington, C.R., Storey, J.M., 2013. Tau-aggregation inhibitor therapy for Alzheimer's disease. Biochem Pharmacol. 88**,** 529-539.
Wolfe, M.S., 2008. Gamma-secretase inhibition and modulation for Alzheimer's disease. Curr Alzheimer Res. 5**,** 158-64.
Wright, S.D., 1999. Toll, a new piece in the puzzle of innate immunity. J Exp Med. 189**,** 605-9.
Yang, H., et al., 2004. Reversing established sepsis with antagonists of endogenous high-mobility group box 1. Proc Natl Acad Sci U S A. 101**,** 296-301.
Yang, Y.L., et al., 1995. Deficient signaling in mice devoid of double-stranded RNA-dependent protein kinase. EMBO J. 14**,** 6095-106.
Yoshida, K., et al., 2012. Interaction between PKR and PACT mediated by LPS-inducible NF-kappaB in human gingival cells. J Cell Biochem. 113**,** 165-73.
Yuskaitis, C.J., Jope, R.S., 2009. Glycogen synthase kinase-3 regulates microglial migration, inflammation, and inflammation-induced neurotoxicity. Cell Signal. 21**,** 264-73.
Zamanian-Daryoush, M., et al., 2000. NF-kappaB activation by double-stranded-RNA-activated protein kinase (PKR) is mediated through NF-kappaB-inducing kinase and IkappaB kinase. Mol Cell Biol. 20**,** 1278-90.
Zhang, F., et al., 2001. Binding of double-stranded RNA to protein kinase PKR is required for dimerization and promotes critical autophosphorylation events in the activation loop. J Biol Chem. 276**,** 24946-58.
Zhang, G., Ghosh, S., 2000. Molecular mechanisms of NF-kappaB activation induced by bacterial lipopolysaccharide through Toll-like receptors. J Endotoxin Res. 6**,** 453-7.
Zhang, Q., et al., 2011. Thiamine deficiency increases beta-secretase activity and accumulation of beta-amyloid peptides. Neurobiol Aging. 32**,** 42-53.
Zhong, N., Weisgraber, K.H., 2009. Understanding the association of apolipoprotein E4 with Alzheimer disease: clues from its structure. J Biol Chem. 284**,** 6027-31.
Zhou, H., et al., 2006. A requirement for microglial TLR4 in leukocyte recruitment into brain in response to lipopolysaccharide. J Immunol. 177**,** 8103-10.
Zhu, P.J., et al., 2011. Suppression of PKR promotes network excitability and enhanced cognition by interferon-gamma-mediated disinhibition. Cell. 147**,** 1384-96.
Zotova, E., et al., 2010. Inflammation in Alzheimer's disease: relevance to pathogenesis and therapy. Alzheimers Res Ther. 2**,** 1.

CARRET-REBILLAT Anne-Sophie-Thèse de doctorat- Année 2014

Contrôle de la neuroinflammation par la kinase PKR dans les processus pathologiques de la maladie d'Alzheimer

Résumé

La maladie d'Alzheimer (MA) est la pathologie neurodégénérative entraînant une démence la plus fréquente. Elle touche plus de 3% des plus de 65 ans. Les lésions cérébrales qui la constituent sont les dépôts de substance β amyloïde (Aβ) et les dégénérescences neurofibrillaires responsables de la mort neuronale, en particulier dans le cortex et l'hippocampe. Ces lésions s'accompagnent d'une réaction inflammatoire centrale qui participe au processus de neurodégénérescence.
Les modèles murins d'endotoxémie reproduisent une réaction inflammatoire du système nerveux central comme observé chez l'homme. Nous avons utilisé un modèle murin d'endotoxémie par injections périphériques de LPS et mis en évidence une activation microgliale, une augmentation de la production d'Aβ et de l'expression de BACE1 ainsi qu'une altération du métabolisme dans l'hippocampe des animaux en réponse au LPS. Ces réactions sont contrôlées par la kinase de stress PKR (double-stranded RNA-dependant protein kinase) dont l'invalidation exerce *in vivo* un effet neuroprotecteur. La production d'Aβ serait régulée dans ce modèle par l'activation PKR-dépendante du facteur de transcription STAT3, responsable du contrôle transcriptionnel de BACE1.
L'activation de PKR a été retrouvée à plusieurs niveaux du processus dégénératif associé à la MA et a été identifiée comme un potentiel biomarqueur diagnostique et pronostique de la maladie.
Nos résultats confirment le rôle de PKR dans la pathogénèse de la MA et l'intérêt de l'inhibition de PKR pour la recherche thérapeutique.

Involvement of PKR-mediated inflammation in Alzheimer's disease pathology

Abstract

Alzheimer's disease (AD) is the most common neurodegenerative disease leading to dementia. More than 3% of those over 65 years are affected. Pathological features of AD are β amyloid (Aβ) deposition and neurofibrillary tangles resulting in neuronal death, specifically in cortex and hippocampus. Brain inflammation is associated and involved in the neurodegeneration process.
Murine models of endotoxemia show inflammation in the central nervous system as observed in humans. Using a model of endotoxemia by peripheral LPS injections in mice, we observed an activation of microglia, an increase of Aβ production and BACE1 expression and a decreased metabolism in the hippampus of LPS treated animals. These reactions are controlled by the stress kinase PKR (double stranded RNA-dependent protein kinase) whose invalidation exerts a neuroprotective effect *in vivo*. Aβ production in this model would be regulated by the PKR-dependent activation of the transcription factor STAT3, responsible for transcriptional control of BACE1. Activation of PKR is involved at several levels of the degenerative process associated with AD and has been identified as a potential diagnostic and prognostic biomarker of AD. These results confirm the role of PKR in the pathogenesis of AD and the interest of PKR down-regulation for therapeutic research.