



HAL
open science

Trafic neuronal de l'activateur tissulaire du plasminogène (tPA)

Sophie Lenoir

► **To cite this version:**

Sophie Lenoir. Trafic neuronal de l'activateur tissulaire du plasminogène (tPA). Médecine humaine et pathologie. Normandie Université, 2018. Français. NNT : 2018NORMC409 . tel-01884522

HAL Id: tel-01884522

<https://theses.hal.science/tel-01884522v1>

Submitted on 1 Oct 2018

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.



Normandie Université

THÈSE

Pour obtenir le diplôme de doctorat

Spécialité MEDECINE

Préparé au sein de l'Université de Caen Normandie

Trafic neuronal de l'activateur tissulaire du plasminogène (tPA)

**Présentée et soutenue par
Sophie LENOIR**

**Thèse soutenue publiquement le 29/06/2018
devant le jury composé de**

M. ALAIN BUISSON	Professeur des universités, Université Grenoble Alpes	Rapporteur du jury
Mme CHRISTINE MARIE	Professeur des universités, UNIVERSITE DIJON BOURGOGNE	Rapporteur du jury
Mme CATHERINE BAUGE	Maître de conférences HDR, UNIVERSITE CAEN NORMANDIE	Président du jury
M. BRUNO CAULI	Directeur de recherche au CNRS, UNIVERSITE PARIS 6 PIERRE ET MARIE CURIE	Membre du jury
M. MAXIME CAZORLA	Chargé de recherche à l'INSERM, Université Grenoble Alpes	Membre du jury
Mme LYDIA DANGLLOT	Chargé de recherche au CNRS, UNIVERSITE PARIS 7 PARIS DIDEROT	Membre du jury
M. DENIS VIVIEN	Professeur des universités, UNIVERSITE CAEN NORMANDIE	Directeur de thèse

Thèse dirigée par DENIS VIVIEN, Physiopathologie et imagerie des troubles neurologiques



UNIVERSITÉ
CAEN
NORMANDIE



Normandie de Biologie Intégrative,
Santé, Environnement



La science pour la santé
From science to health

Remerciements

Je tiens tout d'abord à remercier Denis Vivien de m'avoir accueillie dans son laboratoire dès mon M1. J'ai énormément appris durant toutes ces années. Merci de nous donner les moyens de réaliser nos projets, de ta disponibilité, de tes conseils et de m'avoir écoutée et fait confiance.

Je remercie chaleureusement les rapporteurs de cette thèse, le Pr. Christine Marie et le Pr. Alain Buisson d'avoir accepté et pris le temps d'évaluer ce travail. Je remercie également le Dr Lydia Danglot, le Dr Bruno Cauli, le Dr Maxime Cazorla et le Dr Catherine Baugé de votre présence au sein de ce jury. C'est une chance pour moi de vous présenter mes travaux et de discuter avec vous.

Un grand merci à Yannick pour tes idées, ton soutien, ton aide et merci également à Laurent. Merci du temps que vous m'avez accordé, de votre implication dans cette thèse, de votre travail, de vos conseils et surtout de votre bonne humeur, merci pour tout.

Merci à Thomas Bertrand de m'avoir transmis ton savoir scientifique et à Alexandre de ta contribution à ce projet. Merci à Carine, Benoit et Sara M pour votre aide précieuse, vos nombreux conseils, vos connaissances et votre disponibilité. C'est vraiment dommage, Carine, que tu n'aies pas pu faire partie de ce jury.

Merci à l'ensemble de l'unité PhIND (sans oublier les anciens de SP2U) de vos encouragements, vos conseils et votre bonne humeur. C'était un réel plaisir de travailler avec vous et merci pour la bonne ambiance et pour tous les bons moments partagés ensemble. Merci également aux membres de l'équipe Cervoxy et plus généralement à toutes les personnes de cyceron ayant de près ou de loin contribué à la réalisation de cette thèse.

Merci à toutes les personnes du « bureau des connards » des fous rires, des bonnes musiques (Merci à Franky pour l'ensemble de son œuvre), de votre humour, de votre bonne humeur (mais pas trop tôt le matin) et des V&B. Un énorme merci à Antoine D et Barbara d'avoir relu toute cette thèse mais merci également à Anastasia, Zuba et Rhéda de m'avoir soutenue et aidée jusqu'au bout. Merci à vous d'être toujours disponibles. Merci également à mes camarades de promo Antoine A et Antoine F du chemin parcouru et de tous les bons moments passés ensemble.

Merci à mes amis qui ont su m'encourager, me soutenir pendant ces années de thèse et de tous les bons moments passés ensemble. Je remercie aussi tous les joueurs de tennis qui m'ont aidée à décompresser.

Un très grand merci à Pierrick pour ta présence, ton soutien, ton aide et tes encouragements.

Et enfin, je remercie ma famille et surtout mes parents, pour tout, de m'avoir toujours encouragée et soutenue, de tout ce que vous m'avez transmis et qui m'a permis d'en arriver là. Je remercie particulièrement mon père d'avoir relu et corrigé toute cette thèse.

Avant-propos

J'ai réalisé ma thèse dans l'unité INSERM U1237 « *Physiopathology and Imaging of Neurological Disorders* » (PhIND) dirigée par le Professeur Denis Vivien. Historiquement, cette unité s'est toujours intéressée aux sérines protéases et plus particulièrement à l'activateur tissulaire du plasminogène ou tPA. Le tPA a initialement été découvert dans le compartiment vasculaire où il joue un rôle important dans l'initiation de la fibrinolyse. Ce qui fait de lui, à l'heure actuelle, le seul traitement pharmacologique autorisé en clinique pour la dégradation des caillots sanguins formés lors d'une ischémie cérébrale. Cependant, l'application et le bénéfice du tPA se limitent à un trop faible nombre de patients à cause de diverses contraintes et effets secondaires de cette molécule. Le tPA est également présent dans le parenchyme cérébral où il peut exercer plusieurs rôles. En conditions physiologiques, le tPA est impliqué dans la plasticité synaptique, dans les processus d'apprentissage et de mémoire ainsi que dans la survie neuronale. En conditions pathologiques, le tPA possède des effets néfastes au sein du système nerveux central (SNC) : il augmente la mort neuronale excitotoxique et la perméabilité de la barrière hématoencéphalique.

Notre laboratoire cherche donc à mieux comprendre les rôles et les mécanismes d'action du tPA dans le SNC et dans le système vasculaire en conditions physiologiques mais également pathologiques. Ces recherches ont pour but d'améliorer l'utilisation du tPA en clinique : en sauvant ses effets bénéfiques tout en maîtrisant ses effets délétères.

Au sein de l'équipe, mes travaux de thèse concernent la caractérisation mais également l'étude de la distribution et du trafic intra-neuronal du tPA. Ainsi, pour présenter mes recherches, j'exposerai dans la première partie de l'introduction les connaissances actuelles sur le tPA. Au vu de la contribution du tPA dans la maturation de la principale neurotrophine cérébrale et de leurs implications communes dans divers mécanismes cérébraux, je présenterai dans un second temps, le facteur neurotrophique issu du cerveau ou BDNF. Pour une bonne compréhension de la régulation et de l'implication de ces protéines dans les divers mécanismes cérébraux, la troisième partie de mon introduction portera sur la description des différentes voies impliquées dans le trafic de vésicules neuronales. Les résultats de ces travaux seront ensuite présentés sous forme d'un article et pour finir, ces résultats seront commentés et mis en perspective dans une discussion.

Résumé

L'activateur tissulaire du plasminogène est une sérine protéase initialement découverte dans le compartiment vasculaire et qui joue un rôle prépondérant dans le processus de fibrinolyse. De manière intéressante, le tPA est également présent dans le parenchyme cérébral, où il est notamment exprimé par les neurones. Le tPA est impliqué dans de nombreuses fonctions cérébrales dont la plasticité synaptique, les processus de mémoire et d'apprentissage ainsi que dans la survie et la mort neuronales. Le tPA est capable d'augmenter la signalisation calcique induite par une activation des récepteurs N-Méthyl-D-Aspartate (NMDAR) : un mécanisme à la base de la plasticité synaptique mais également de la mort neuronale excitotoxique. Cependant, il peut également activer les récepteurs du facteur de croissance épidermique (EGFR) pour induire un effet anti-apoptotique sur les neurones. Afin de mieux comprendre les différentes fonctions du tPA sur les neurones, nous nous sommes intéressés à la distribution et au trafic intracellulaire du tPA. Pour cela, nous avons créé un nouvel outil afin d'imager le tPA dans les neurones en temps réel: un plasmide codant pour une protéine fusion, le tPA-HaloTag®.

Premièrement, nos résultats montrent que le tPA est présent dans les axones et les dendrites des neurones corticaux matures en culture et qu'il est majoritairement présent dans le compartiment post-synaptique. Cette étude a également permis de voir que le tPA est stocké et libéré par des vésicules d'exocytose VAMP2, qu'il peut être endocyté par des vésicules Rab5, recyclé par des vésicules Rab11 et dégradé par des vésicules Rab7. Deuxièmement, nous avons montré que le tPA est présent dans les mêmes vésicules synaptiques que le facteur neurotrophique issu du cerveau (BDNF) : une neurotrophine importante pour le bon fonctionnement cérébral et dont la maturation dépend de l'activité protéolytique du tPA. Ce travail fournit une meilleure compréhension du rôle et de la distribution du tPA dans les neurones et ouvre de nouvelles voies de recherche dans l'implication de du tPA et du BDNF dans la survie neuronale.

Mots clés : tPA, BDNF, trafic, vésicules, neurones

Abstract

Tissue-type Plasminogen Activator (tPA) is a serine protease, firstly discovered for its fibrinolytic role in the vascular compartment. Interestingly, tPA is also present in the brain parenchyma, being notably expressed by neurons. tPA displays important roles in synaptic plasticity (Danny Baranes et al., 1998; Melchor and Strickland, 2006), learning, memory processes (R Madani et al., 1999; R Pawlak et al., 2002), neuronal survival and death. tPA is able to promote N-Methyl-D-Aspartate Receptors (NMDAR)-induced calcium influx, promoting synaptic plasticity or excitotoxic neuronal death. tPA is also able to activate Epidermal Growth Factor Receptors (EGFR), a mechanism mediating its anti-apoptotic effect. To better understand the different functions of tPA on neurons, we studied the pattern of distribution and trafficking of neuronal tPA. For that, we designed a new tool to image tPA in living neurons: a plasmid encoding for a tPA-HaloTag® fusion protein.

We first found that tPA is present in both axons and dendrites of mature cultured cortical neurons and preferentially at the post-synaptic part. Our results also showed that tPA is stored and released by VAMP2 exocytotic vesicles, and can be endocytosed by Rab5 vesicles, recycled by Rab11 vesicles and degraded by Rab7 vesicles. Furthermore, tPA is localized and sorted in the same vesicles than Brain-Derived Neurotrophic Factor (BDNF), one of the most important neurotrophins. Interestingly, BDNF maturation is dependent of tPA proteolytic activity. This work provides a better understanding of the role and distribution of tPA in living neurons and opens new avenues into the involvement of tPA and BDNF in neuronal survival.

Key words: tPA, BDNF, trafficking, vesicles, neurons

Sommaire

Remerciements.....	1
Avant-propos	3
Résumé	5
Abstract	5
Sommaire.....	7
Index des figures.....	11
Liste des abréviations	13
Introduction	15
1. L'activateur tissulaire du plasminogène.....	17
1.1. Historique.....	17
1.2. Structure du tPA.....	18
1.3. Expression du tPA	22
1.3.1. Dans la circulation.....	22
1.3.2. Dans la périphérie.....	23
1.3.3. Dans le système nerveux central	24
1.4. Inhibiteurs du tPA : les serpinés	30
1.4.1. PAI-1.....	32
1.4.2. Neuroserpine	32
1.5. Rôles du tPA	33
1.5.1. Rôles du tPA vasculaire.....	33
1.5.1.1. Fibrinolyse.....	33
1.5.1.2. Barrière Hémato-Encéphalique (BHE)	35
1.5.2. Rôles du tPA dans le SNC	36
1.5.2.1. tPA et développement cérébral	37
1.5.2.2. tPA et modulation glutamatergique.....	38

1.5.2.3.	tPA et plasticité synaptique	39
1.5.2.4.	tPA et excitotoxicité.....	42
1.5.2.5.	tPA et apoptose	43
1.5.2.6.	tPA et inflammation.....	44
1.5.2.7.	tPA et processus cognitifs.....	46
1.5.2.8.	tPA et la substance blanche.....	46
2.	Facteur neurotrophique issu du cerveau	49
2.1.	Historique.....	49
2.2.	Structure	50
2.3.	Expression du BDNF	51
2.4.	Synthèse et sécrétion du BDNF.....	51
2.4.1.	Transcription du gène du BDNF.....	51
2.4.2.	Traduction des ARNm du BDNF	54
2.4.3.	Sécrétion du BDNF.....	56
2.5.	Récepteurs du BDNF	57
2.5.1.	TrkB.....	58
2.5.2.	p75 ^{NTR}	60
2.6.	Rôles du BDNF.....	62
2.6.1.	Rôles du BDNF mature.....	62
2.6.1.1.	mBDNF et survie cellulaire	63
2.6.1.2.	mBDNF, différenciation et croissance des neurites	65
2.6.1.3.	mBDNF et synapses	67
2.6.1.4.	mBDNF et LTP	71
2.6.2.	Rôles du pro-BDNF.....	74
2.6.2.1.	Pro-BDNF et mort cellulaire.....	74
2.6.2.2.	Pro-BDNF et LTD	75

2.6.3. Rôles du pro-domaine	77
2.6.4. BDNF et maladies.....	79
2.7. BDNF et tPA.....	79
3. Trafic vésiculaire neuronal	83
3.1. L'exocytose.....	83
3.1.1. Les protéines SNARE	84
3.1.2. Les différentes étapes de l'exocytose	86
3.2. L'endocytose	88
3.2.1. L'endocytose dépendante de la clathrine	89
3.2.1.1. Les partenaires moléculaires de l'endocytose dépendante de la clathrine	90
3.2.1.2. Les différentes étapes de l'endocytose dépendante de la clathrine	91
3.2.2. L'endocytose indépendante de la clathrine	92
3.2.2.1. Endocytose dépendante des cavéolines	93
3.2.2.2. Macropinocytose	93
3.2.2.3. Phagocytose.....	94
3.3. Recyclage et dégradation.....	95
3.3.1. Les endosomes de tri.....	96
3.3.2. Les endosomes de recyclage	97
3.3.3. Les endosomes de dégradation.....	97
3.3.4. Les protéines Rab.....	99
Objectifs	103
Résultats.....	107
Article 1: Neuronal tissue-type plasminogen activator (tPA) with brain-derived neurotrophic factor (BDNF) are transported in the same vesicular cargoes in neurons...	109

Discussion.....	155
1. Localisation et transport du tPA au sein des neurones.....	158
1.1. Le modèle cellulaire	158
1.2. Localisation du tPA dans les neurones	162
1.3. Transport des vésicules de tPA	165
2. Trafic vésiculaire neuronal du tPA.....	166
2.1. Le tPA neuronal peut être exocyté	166
2.2. Le tPA neuronal peut être endocyté, recyclé ou dégradé.....	168
3. Le tPA et le BDNF sont présents dans les mêmes vésicules synaptiques	171
3.1. Le tPA et le BDNF sont impliqués dans les mêmes fonctions cérébrales.	171
3.2. Le tPA est impliqué dans la balance entre le pro et le mature BDNF.....	171
3.3. L'implication du plasminogène et de la plasmine dans ces mécanismes.	174
3.4. L'implication du tPA et du BDNF dans les maladies cérébrales	176
Conclusion générale.....	179
Autres travaux	183
Article 2 (Revue): Impacts of tissue-type plasminogen activator (tPA) on neuronal survival.....	185
Article 3: Conformations of tissue plasminogen activator (tPA) orchestrate neuronal survival by a crosstalk between EGFR and NMDAR.....	201
Article 4: Tissue plasminogen activator induces neuronal death by raising surface dynamics of extrasynaptic NMDA receptors.	211
Article 5: Store-operated channels/mTOR/Mcl-1 pathway inhibition by carboxyamidotriazole sensitizes ovarian carcinoma cells to anti-BclxL strategies.	229
Bibliographie	261

Index des figures

Figure 1: Distribution de grain d'argent en autoradiographie correspondant à l'hybridation de sondes d'ADNc du tPA sur le chromosome 8.....	19
Figure 2 : Structure et fonctions du tPA.....	21
Figure 3: Clairance hépatique du tPA.....	23
Figure 4: Localisation périphérique du tPA.	23
Figure 5: Localisation du tPA dans le SNC chez la souris.....	24
Figure 6: Expression du tPA par les différentes cellules du SNC chez la souris adulte.....	25
Figure 7: Expression du tPA localisée au niveau des dendrites et des synapses.	26
Figure 8: Le tPA est un neuromodulateur.....	27
Figure 9: Caractérisation des neurones exprimant du tPA.	28
Figure 10: Expression du tPA par les astrocytes activés chez l'Homme.	29
Figure 11: Expression du tPA par la microglie.....	30
Figure 12: Mode d'action des serpinines.	31
Figure 13: Mécanisme d'action de la fibrinolyse endogène	34
Figure 14: Effet du tPA sur la barrière hémato-encéphalique	36
Figure 15: Effet de l'absence du tPA sur la migration neuronale	37
Figure 16: Elévation de la quantité d'ARN messagers du tPA suite à une activation neuronale chez le rat.	41
Figure 17: Les souris tPA KO sont résistantes à la mort neuronale excitotoxique	43
Figure 18: Effets du tPA actif et inactif (S478A tPA) sur la mort neuronale induite par une injection de kaïnate dans l'hippocampe et sur l'activation microgliale.....	45
Figure 19: Le tPA est protecteur contre les dommages axonaux et augmente la remyélinisation	47
Figure 20: Distribution de l'avidine conjuguée à la fluorescéine en autographie correspondant à l'hybridation de sondes d'ADNc du BDNF sur le chromosome 11.	50
Figure 21: Structure protéique du BDNF.....	50
Figure 22: Structure du gène, des transcrits et de la protéine BDNF	53
Figure 23: Synthèse et sécrétion du BDNF.....	55
Figure 24: Les récepteurs du BDNF: p75 ^{NTR} et TrkB.....	58

Figure 25: Signalisation intracellulaire induite par l'interaction entre le BDNF et ses récepteurs	60
Figure 26: Les différents partenaires du récepteur p75 ^{NTR}	62
Figure 27: Le BDNF induit de la neurogenèse hippocampique chez des rats adultes.	64
Figure 28: Le BDNF induit un effet attractif sur les cônes de croissance.....	66
Figure 29: Le BDNF induit une augmentation de l'arborisation des cellules ganglionnaires rétiniennes (RGC).	68
Figure 30: Le BDNF augmente la densité synaptique des neurones pyramidaux hippocampiques chez le rat..	70
Figure 31: Le BDNF peut jouer un rôle de modulateur ou de médiateur de la LTP.....	73
Figure 32: Le pro-BDNF augmente la mort neuronale <i>via</i> une interaction avec les récepteurs p75 ^{NTR} /Sortiline.	75
Figure 33 : Le pro-BDNF augmente la LTD hippocampique grâce aux récepteurs p75 ^{NTR} et NMDA composés de la sous-unité GluN2B.	77
Figure 34: Le pro-peptide du BDNF altère la densité synaptique au niveau de l'hippocampe chez le rat.	78
Figure 35: Le mBDNF est nécessaire et suffisant pour induire la LTP tardive.	80
Figure 36: Le tPA régule la balance entre les effets du pro et du mBDNF.....	81
Figure 37: Recrutement des vésicules synaptiques à la membrane.....	85
Figure 38 : Mécanisme d'action des SNARE dans l'exocytose.	87
Figure 39: Les différentes voies d'endocytose..	89
Figure 40: Cycle de formation des vésicules recouvertes de clathrine.....	92
Figure 41: Les différentes étapes du trafic vésiculaire.	95
Figure 42: Les différentes fonctions des Rab dans le trafic vésiculaire.	99
Figure 43: Localisation et fonction des protéines Rab dans le trafic vésiculaire	101
Figure 44: Schéma représentant le fonctionnement de l'HaloTag®	159
Figure 45: Les neurones corticaux en culture sont capables d'exprimer du tPA.....	160
Figure 46: Les protéines surexprimées sont adressées au bon endroit dans la cellule.....	162
Figure 47: le tPA est présent au niveau des cônes de croissance des neurites en culture. ..	165
Figure 48: Le tPA, le plasminogène et le BDNF sont présents dans les mêmes vésicules.	172
Figure 49 : Mécanismes proposés pour le clivage du plasminogène et du BDNF dans les vésicules ou à la synapse.....	175

Liste des abréviations

ADAMTS	<i>a disintegrin and metalloproteinase with thrombospondin motifs</i> - désintégrine et métalloprotéinase à motif thrombospondines
AMPA	<i>alpha-amino-5-méthylisoazol-4-propionate</i>
AMPc	<i>cyclic adenosine monophosphate</i> - adénosine monophosphate cyclique
AP-2	<i>adaptor protein-2</i>
ARNm	acides ribonucléiques messagers
Asn	asparagine
AVC	accident vasculaire cérébral
BDNF	<i>brain derived neurotrophic factor</i> - facteur neurotrophique issu du cerveau
BHE	barrière hémato-encéphalique
CA1	corne d'Ammon 1
CaMK	<i>calcium/calmodulin-dependent protein kinase</i>
CREB	<i>cAMP responsive element binding protein</i>
CSPGs	chondroïtines sulfate protéoglycanes
EGF	<i>epidermal growth factor</i> - facteurs de croissance épidermique
ERK	<i>extracellular signal-regulated kinase</i>
GABA	<i>gamma-aminobutyric acid</i>
HGF	<i>hepatocyte growth factor</i> - facteur de croissance hépatocytaire
KO	<i>knock-out</i> - invalidation génétique
LBS	<i>lysine Binding Site</i> - site de liaison à la lysine
LRP	<i>low density lipoprotein receptor-related protein</i> - récepteurs aux lipoprotéines de faible densité
LTD	<i>long term depression</i> - dépression à long terme
LTP	<i>long term potentiation</i> - potentialisation à long terme
mBDNF	mature BDNF
MEC	matrice extracellulaire
Met	méthionine
MMP	<i>matrix metalloproteinase</i> - Métalloprotéinases matricielles
NADE	<i>neurotrophin associated cell death executor</i>
NF-κB	<i>nuclear factor-kappa B</i>
NGF	<i>nerve growth factor</i> - facteur de croissance des nerfs
NMDA	<i>N-Methyl-D-Aspartate</i>
NRAGE	<i>neurotrophin-receptor-interacting melanoma-associated antigen homologue</i>
NRIF	<i>neurotrophin-receptor interacting factor</i>
NSF	<i>N-ethylmaleimide-sensitive factor</i>
NT	neurotrophine
p75^{NTR}	pan75 neurotrophin receptor
PAI-1	<i>plasminogen activator inhibitor 1</i> - Inhibiteur de l'activateur du plasminogène 1
PC 1/3	<i>proprotein convertase 1/3</i> - proprotéine convertase 1/3
PCR	<i>polymerase chain reaction</i> - réaction en chaîne par polymérase

PDGF-CC	<i>platelet derived growth factor-CC</i> - facteur de croissance dérivé des plaquettes
PDGFR-α	<i>platelet-derived growth factor receptor alpha</i> – récepteur alpha au facteur de croissance dérivé des plaquettes
PI3K	<i>phosphatidylinositol-3-Kinase</i>
PK	<i>protein kinase</i>
PLAT	<i>plasminogen activator tissue type</i>
PLCy	<i>phospholipase C gamma</i>
Rab	<i>ras-associated binding protein</i>
RCL	<i>reactive center loop</i> - boucle du centre réactif
RGC	<i>retinal ganglion cells</i> - cellules ganglionnaires rétiniennes
RhoA	<i>ras homolog gene family, member A</i>
RIP2	<i>receptor-interacting protein</i>
SC1	<i>schwann cell 1</i>
sc-tPA	<i>single chain tPA</i> - tPA simple chaîne
Serpines	<i>serine proteinase inhibitors</i>
Shc	<i>src homologous and collagen-like adaptor protein</i>
SM	<i>Sec1/Munc18-like protein</i>
SNAP-25	<i>synaptosomal-associated protein 25</i>
SNAP	<i>soluble NSF attachment protein</i>
SNARE	<i>soluble N-ethylmaleimide-sensitive factor attachment protein Receptor</i>
SNC	système nerveux central
t-SNARE	<i>target-SNARE</i> -SNARE cible
tc-tPA	<i>two chain tPA</i> - tPA double chaîne
TGN	<i>trans-golgi network</i> - réseau trans-golgi
tPA	<i>tissue-type plasminogen activator</i> - activateur tissulaire du plasminogène
TRAF6	<i>tumor necrosis factor- receptor associated factors 6</i>
Trk	<i>tropomyosin-related kinase</i> - récepteur tyrosine kinases
TrkB-FL	<i>trkB full length</i>
TrkB-T	<i>trkB-truncated</i>
uPA	<i>urokinase-type plasminogen activator</i> - activateur du plasminogène de type urokinase
UTR	<i>untranslated region</i> - région non transcrite
v-SNARE	<i>vesicular SNARE</i> - SNARE vésiculaire
Val	valine
VAMP	<i>vesicle-associated membrane protein</i>
WT	<i>wild-type</i> - souris sauvages

Introduction

1. L'activateur tissulaire du plasminogène

L'activateur tissulaire du plasminogène (en anglais : *tissue-type plasminogen activator*, tPA) est une sérine protéase présente dans le sang, elle est produite par les cellules endothéliales et elle est principalement connue pour son rôle dans la fibrinolyse. Le tPA est capable de cliver le plasminogène pour donner la plasmine, elle-même capable de dégrader les caillots de fibrine. Il est donc indirectement impliqué dans la reperfusion des vaisseaux sanguins, ce qui lui permet d'être à l'heure actuelle le seul traitement pharmacologique de la phase aigüe des accidents vasculaires cérébraux de type ischémique. Le tPA est également exprimé par plusieurs types cellulaires cérébraux (neurones, oligodendrocytes, microglies, ...) où il joue différents rôles notamment au niveau synaptique et au cours du développement, en conditions physiologiques mais aussi pathologiques.

1.1. Historique

L'histoire du tPA a débuté durant la Grèce antique avec les travaux d'Hippocrate qui avait observé que le sang des personnes décédées subitement ne coagulait pas. Ces observations furent retrouvées par Morgagni en 1761 ([Morgagni, 1761](#)). En 1843, les travaux d'Andral montrent que le sang coagulé pouvait redevenir liquide : il apporte ainsi les prémises du système fibrinolytique ([Andral, 1843](#)). C'est en 1893 que Dastre, Denys et De Marbaix déterminent que ce résultat est la conséquence d'un mécanisme protéolytique qu'ils nomment : fibrinolyse ([Dastre, 1893](#) ; [Denys and De Marbaix, 1889](#)). Vingt ans plus tard, Conradi démontra qu'il était possible de dégrader des caillots sanguins par l'ajout d'extraits de différents organes ([Conradi, 1902](#)), et de la même manière en 1903, Hedin démontra une activité protéolytique dans une fraction de sérum ([Hedin, 1903](#)). Cette fraction sera identifiée plus tard comme étant celle contenant le plasminogène, précurseur de la plasmine, principale enzyme responsable de la dégradation de la fibrine ([Christensen and MacLeod, 1945](#)). Le système fibrinolytique commençait alors à se dévoiler, mais il restait encore à découvrir comment le plasminogène, précurseur inactif, pouvait s'activer.

La première protéine fibrinolytique n'a été mise en évidence qu'en 1933 lorsque Tillett et Garner ont découvert, par hasard, que le milieu de culture de certaines souches de streptocoques contenait un élément capable de dissoudre les caillots sanguins constitués de

fibrine (Tillett and Garner, 1933). Ces observations ont ensuite été confirmées et complétées par Astrup et Permin en 1947, ils nommèrent cet élément « Fibrinolysine Streptococcique » et apportèrent au monde scientifique le concept de thrombolyse, c'est-à-dire : la dégradation de caillots déjà formés (Astrup and Permin, 1947). En 1952, Astrup et Stage parviennent pour la première fois à isoler cette molécule capable d'activer le plasminogène à partir de tissus de cœurs de porc qu'ils nommèrent la fibrikinase (Astrup and Stage, 1952). Ce n'est qu'en 1979 que la fibrikinase fut purifiée, dans un premier temps dans la circulation sanguine (Binder et al., 1979), puis ensuite dans l'utérus (Rijken et al., 1979). Ainsi pour obtenir 1mg de fibrikinase, 5 Kg d'utérus humain étaient nécessaires. Mais grâce aux travaux conjoints de Collen et Rijken, la fibrikinase fut purifiée à partir de surnageant de culture de cellules de mélanome humain permettant ainsi sa caractérisation. Cet activateur fut également rebaptisé « activateur tissulaire du plasminogène » (Rijken and Collen, 1981).

La première utilisation du tPA chez l'Homme a été réalisée par Weimar en 1981. Il traita deux patients atteints d'une thrombose de la veine rénale avec du tPA injecté par voie intraveineuse (Weimar et al., 1981). Deux ans plus tard, Pennica parvenait à cloner le gène du tPA permettant ainsi d'ouvrir la voie de la production de tPA recombinant par des bactéries *E.coli* (Pennica et al., 1983). Quatorze ans plus tard, une autre étude voit le jour, évaluant la possibilité d'utiliser le tPA comme agent thrombolytique dans le cadre de l'ischémie cérébrale (National Institute of Neurological Disorders and Stroke rt-PA Stroke Study Group, 1995). Devant le succès de cette étude, le tPA est à l'heure actuelle le seul agent pharmacologique autorisé dans le traitement aigu des accidents vasculaires cérébraux de type ischémique, en association ou non à la thrombectomie.

1.2. Structure du tPA

Le tPA est une glycoprotéine appartenant à la famille des sérines protéases, il est codé par le gène *PLasminogen Activator Tissue type* (PLAT) qui se trouve sur le bras court du chromosome 8 (Figure 1; Yang-Feng et al., 1986).

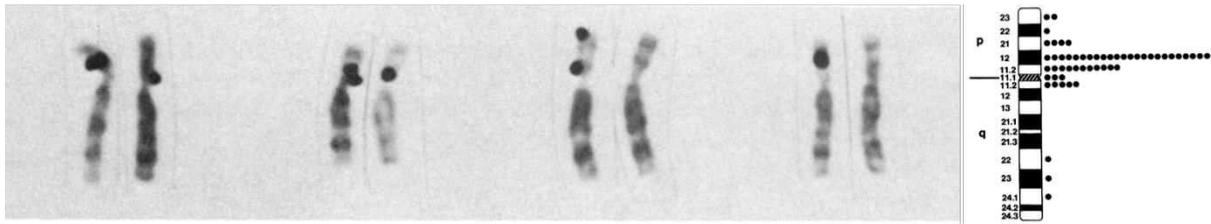


Figure 1: Distribution de grain d'argent en autoradiographie correspondant à l'hybridation de sondes d'ADNc du tPA sur le chromosome 8. La majorité des sondes sont fixées entre les bandes 8p12 et 8q11.2, localisant ainsi le gène du tPA (Yang-Feng et al., 1986).

Le tPA est synthétisé sous la forme d'une chaîne polypeptidique de 527 acides aminés avec une masse moléculaire de 69 kDa (Pennica et al., 1983). Sa structure tridimensionnelle est maintenue par 17 ponts disulfures. Le tPA est composé de cinq domaines, lui permettant d'agir avec diverses protéines mais également d'être impliqué dans diverses fonctions (Figure 2). La chaîne lourde (chaîne A) située en amino-terminale contient les 4 domaines suivants :

- **Finger** (par analogie au premier domaine finger de la fibronectine) : permet au tPA de se lier à la fibrine, formant ainsi un complexe tertiaire avec le plasminogène (Kagitani et al., 1985). Il permet également la liaison avec plusieurs récepteurs membranaires comme les récepteurs aux lipoprotéines de faible densité (en anglais : *Low Density Lipoprotein Receptor-related Protein* ou LRP) ainsi qu'à l'annexine II (Bu et al., 1992; Hajjar et al., 1994a) ;
- **EGF** (forte homologie avec le facteur de croissance épidermique) : permet au tPA d'activer les récepteurs aux facteurs de croissance épidermique (en anglais : *epidermal growth factor* ou EGF) (Correa et al., 2011; Hurtado et al., 2007) ;
- **Kringle 1** : contient un site ayant une forte affinité pour la lysine (en anglais : *Lysine Binding Site* ou LBS) composé de deux acides aminés aromatiques (tryptophane²⁴² et tryptophane²⁵³) formant une poche dans la structure tertiaire du tPA. Ce site étant non-fonctionnel, le rôle du kringle 1 est encore mal connu : il pourrait être impliqué dans la clairance du tPA par les cellules endothéliales du foie *via* la glycosylation sur l'asparagine¹⁷⁷ (Asn) (Kuiper et al., 1988) ;
- **Kringle 2** : contient un site LBS actif. Il permet au tPA de se lier et d'activer divers substrats et/ou récepteurs tels que le plasminogène, la sous-unité GluN1 des récepteurs N-Méthyl-D-Aspartate (NMDA) ainsi que le facteur de croissance dérivé des

plaquettes (en anglais : *platelet derived growth factor-CC* ou PDGF-CC) (Lopez-Atalaya et al., 2008; Fredriksson et al., 2004).

La chaîne légère du tPA (chaîne B) est, quant à elle, composée d'un seul et unique domaine :

- **Sérine protéase** (domaine catalytique) : les acides aminés histidine³²², acide aspartique³⁷¹ et sérine⁴⁷⁸ forment la triade catalytique du tPA, lui conférant ainsi son activité protéolytique qui lui permet de convertir le plasminogène en plasmine (Pennica et al., 1983).

Le tPA possède trois sites de N-glycosylations dont deux sont constitutives : une sur Asn¹¹⁷ (dans le domaine kringle1) et une autre sur Asn⁴⁴⁸ (dans le domaine sérine protéase). La troisième N-glycosylation est variable et se situe sur l'Asn¹⁸⁴ (dans le domaine kringle2). Il existe donc deux types de tPA : le tPA de type I avec les trois N-glycosylations et le tPA de type II avec seulement deux N-glycosylations (Pohl et al., 1984; Spellman et al., 1989). La glycosylation sur l'Asn¹⁸⁴ (tPA de type I) diminue la capacité du tPA à cliver le plasminogène mais diminue également sa liaison à la fibrine (Berg et al., 1993). Le tPA possède aussi un site de O-glycosylation (dans 100% des cas), au niveau de la thréonine⁶¹ dans le domaine EGF (Harris et al., 1991) et un autre site potentiel de N-glycosylation sur l'Asn¹⁴² dans le domaine kringle1 (dans 1% des cas) (Figure 2 ; Borisov et al., 2009).

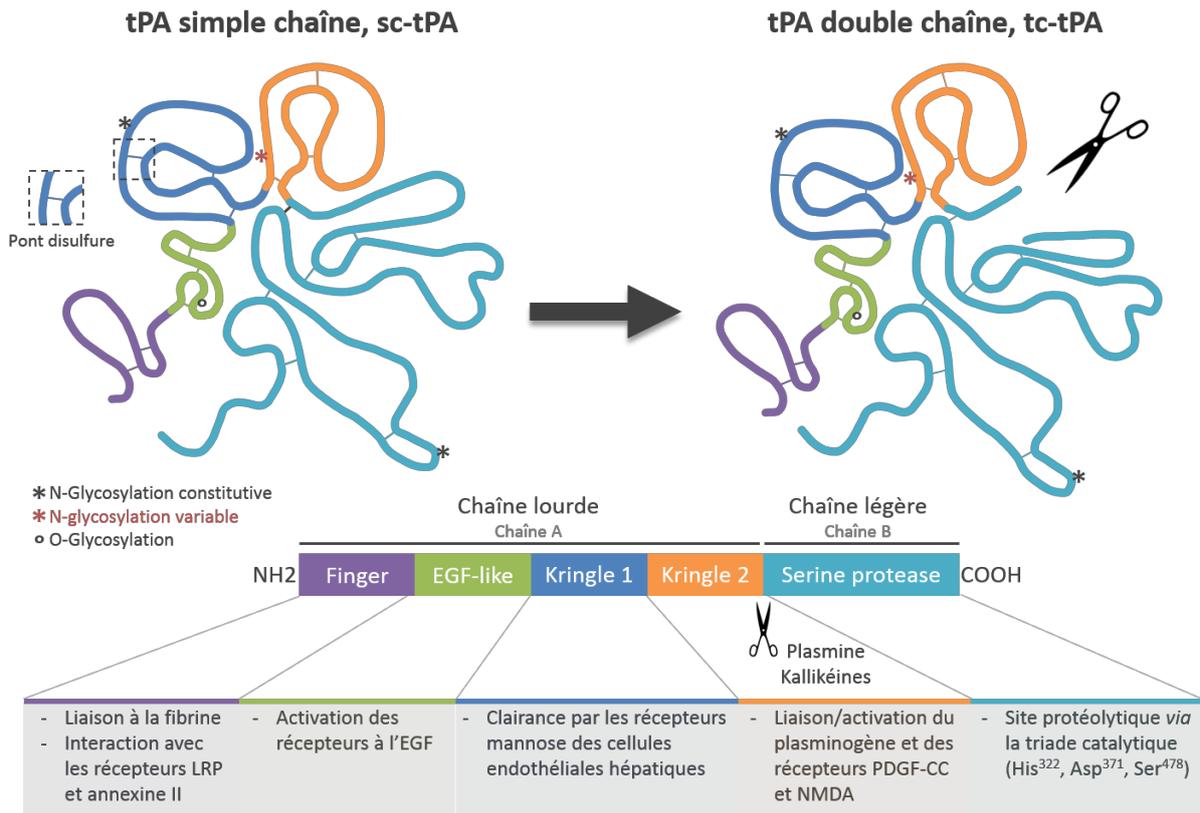


Figure 2 : Structure et fonctions du tPA. Schéma représentant le tPA sous forme simple (sc-tPA) et double chaîne (tc-tPA) mettant en évidence les cinq domaines (finger, EGF, kringle1, kringle2 et sérine protéase), les 17 ponts disulfures, les glycosylations ainsi que le site de clivage par des protéases comme la plasmine et les kallikréines (adapté de : [Chevilley et al., 2015](#); [Hébert et al., 2016](#)).

Comme l'ensemble des sérines protéases, le tPA existe sous deux formes : simple et double chaînes ([Rijken and Collen, 1981](#)). La conversion du tPA simple chaîne (en anglais : *single chain tPA* ou sc-tPA) en sa forme double chaîne (en anglais : *two chain tPA* ou tc-tPA) s'effectue par l'hydrolyse de la liaison peptidique située en carboxy-terminale de la liaison arginine²⁷⁵- isoleucine²⁷⁶. Cette hydrolyse s'effectue par différentes protéases comme la plasmine ou les kallikréines ([Wallén et al., 1982](#); [Ichinose et al., 1984](#)). C'est le pont disulfure entre les cystéine²⁹⁹ (sur la chaîne A) et cystéine⁴³⁰ (sur la chaîne B) qui permet de garder les deux chaînes liées entre-elles ainsi que la création d'un pont salin entre l'arginine³⁰² et l'acide glutamique⁴⁴⁵ ([Lamba et al., 1996](#)).

Le tPA est une sérine protéase particulière car la majorité des sérines protéases sont synthétisées sous une forme simple chaîne zymogène (dépourvue d'activité enzymatique) et ce n'est qu'après leur conversion en forme double chaîne qu'elles deviennent actives.

Contrairement aux autres sérines protéases, le tPA est actif sous ses deux formes (Rijken et al., 1982; Hoylaerts et al., 1982). En présence de fibrine, les deux formes ont la même activité protéolytique, en revanche sans fibrine le tc-tPA présente une activité cinq fois supérieure (Petersen et al., 1988; Wallén et al., 1982).

1.3. Expression du tPA

1.3.1. Dans la circulation

C'est dans le compartiment vasculaire que l'on retrouve la majorité du tPA. Il est essentiellement synthétisé par les cellules endothéliales (Binder et al., 1979) sous sa forme simple chaîne et circule à une concentration d'environ 70 pM (Rijken and Lijnen, 2009). La libération du tPA par les cellules endothéliales peut se faire de deux manières : de façon constitutive (Angles-Cano et al., 1985) ou en réponse à un stimulus spécifique. Les cellules endothéliales sont capables de stocker le tPA et de le libérer en réponse à des facteurs de la cascade de la coagulation ou à l'hypoxie (Emeis et al., 1997). Ce mécanisme joue un rôle important afin d'empêcher la formation d'un thrombus occlusif (Osterlund et al., 2002).

La demi-vie du tPA circulant est d'environ six minutes (Verstraete et al., 1985). Le foie contribue essentiellement à la clairance du tPA grâce à un système de recapture très efficace du tPA circulant par les hépatocytes et par les cellules endothéliales hépatiques (Kuiper et al., 1988). Plusieurs récepteurs sont impliqués dans cette recapture : les récepteurs LRP (Orth et al., 1994), les récepteurs au mannose (Biessen et al., 1997) et la voie dépendante des galectines (Figure 3 ; Nagaoka et al., 2002). De plus, la liaison du tPA avec son inhibiteur sanguin principal : l'inhibiteur de l'activateur du plasminogène de type 1 (en anglais : *plasminogen activator inhibitor 1* ou PAI-1 ; davantage décrit dans la partie : 1.4 Inhibiteurs du tPA : les serpinés) augmente sa clairance (Chandler et al., 1997).

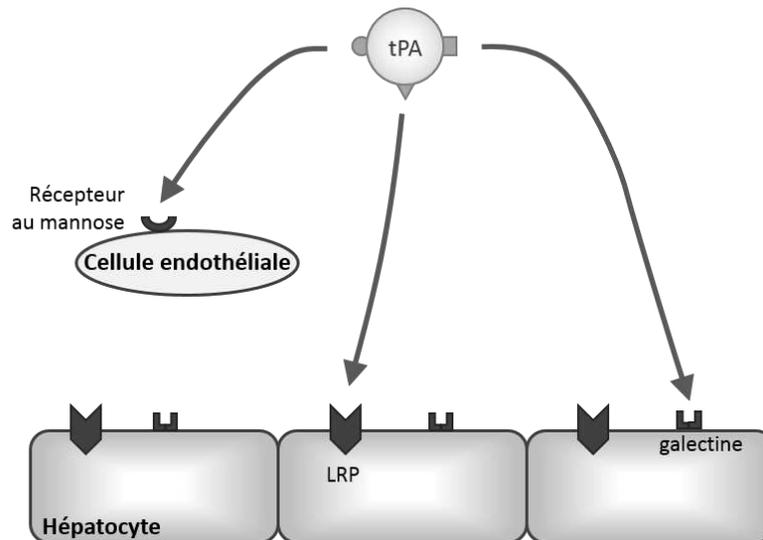


Figure 3: Clairance hépatique du tPA. Le tPA peut être recapturé par trois voies: une voie dépendante des récepteurs au mannose à la surface des cellules endothéliales hépatiques, une voie dépendante des récepteurs LRP et une dernière dépendante des récepteurs galectines ; ces deux dernières se trouvant au niveau des cellules hépatocytaires (adapté de : [Nagaoka et al., 2002](#)).

1.3.2. Dans la périphérie

Comme cela a été évoqué précédemment, l'expression du tPA a dans un premier temps été mise en évidence dans le sang. Depuis, la présence d'une activité du tPA a été observée dans de nombreux organes tels que : l'utérus, les poumons, les reins, les muscles ou le cœur ([Figure 4 ; Albrechtsen, 1957](#)). Dans ces différents tissus, le tPA est souvent associé à une modification de la vascularisation et à un remodelage des tissus.

Tissue	Activity (units/g fresh tissue)	Tissue	Activity (units/g fresh tissue)
Uterus	720	Pituitary	140
Adrenal	410	Kidney	119
Lymph node	378	Muscle	110
Prostate	334	Heart	82
Thyroid	325	Brain	35
Lung	223	Testis	25
Ovary	210	Liver	0

Figure 4: Localisation périphérique du tPA. Activité du tPA dans différents tissus humains mesurée en unité internationale (IU) par gramme de tissu frais ([Rouf et al., 1996](#); adapté de : [Albrechtsen, 1957](#)).

1.3.3. Dans le système nerveux central

Le tPA est également présent au sein du système nerveux central (SNC) où il est exprimé et sécrété par de nombreux types cellulaires. C'est en 1981 que le tPA a été mis en évidence pour la première fois dans le parenchyme cérébral. Soreq et Miskin ont montré la présence du tPA au niveau des vaisseaux cérébraux mais également dans les neurones à différents moments du développement, lui prédisant ainsi d'autres rôles que son implication dans la fibrinolyse (Soreq and Miskin, 1981). En 1993, Sappino et collaborateurs, ont caractérisé pour la première fois la présence du tPA au sein des différentes structures cérébrales. On retrouve ainsi des acides ribonucléiques messagers (ARNm) du tPA dans diverses structures cérébrales telles que : le cervelet, l'hippocampe, l'hypothalamus, le striatum et le cortex (Figure 5 ; Sappino et al., 1993).

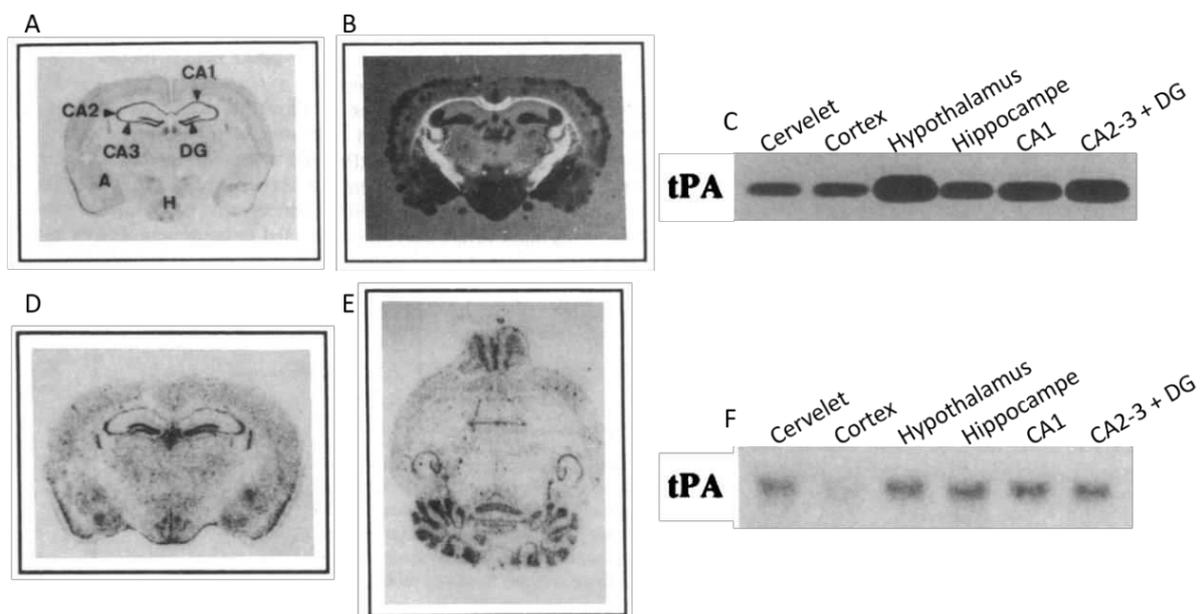


Figure 5: Localisation du tPA dans le SNC chez la souris. A) Coloration au crésyl violet d'une coupe coronale de cerveau de souris : A = amygdale, H = hypothalamus, DG = gyrus denté, CA1, 2 et 3 = corne d'Ammon. B) Activité protéolytique du tPA détectée par zymographie *in situ* sur une coupe coronale de cerveau de souris. C) Activité protéolytique du tPA détectée par zymographie *in situ* au sein de différentes régions du cerveau. D) et E) ARNm du tPA mis en évidence par hybridation *in situ* sur une coupe coronale (D) et horizontale (E) de cerveau de souris. F) Northern blot mettant en évidence les ARNm du tPA selon différentes régions du cerveau (adapté de: Sappino et al., 1993).

Chez l'Homme, Teesalu et collaborateurs ont montré la présence d'ARNm du tPA, également par hybridation *in situ*, dans de nombreuses autres régions du cerveau. On retrouve ces ARNm notamment au niveau des plexus choroïdes, des différents noyaux thalamiques, du tronc cérébral mais aussi au niveau de l'hypophyse et de la moelle épinière (Teesalu et al., 2004). De récents travaux du laboratoire ont permis d'identifier plus précisément, chez la souris, les régions corticales capables d'exprimer le tPA. Parmi celles-ci, on retrouve le cortex rétrosplénial, somatosensoriel primaire, périrhinal et piriforme, avec environ 10-15% de neurones exprimant du tPA (Louessard et al., 2016).

Au niveau cellulaire, le tPA est exprimé par de nombreuses cellules telles que : les neurones, les oligodendrocytes, les mastocytes et les épendymocytes (Figure 6 ; Louessard et al., 2016). Les astrocytes, la microglie et les préicytes sont également capables de produire du tPA (Hultman et al., 2008; Tsirka et al., 1995; Yamamoto et al., 2005).

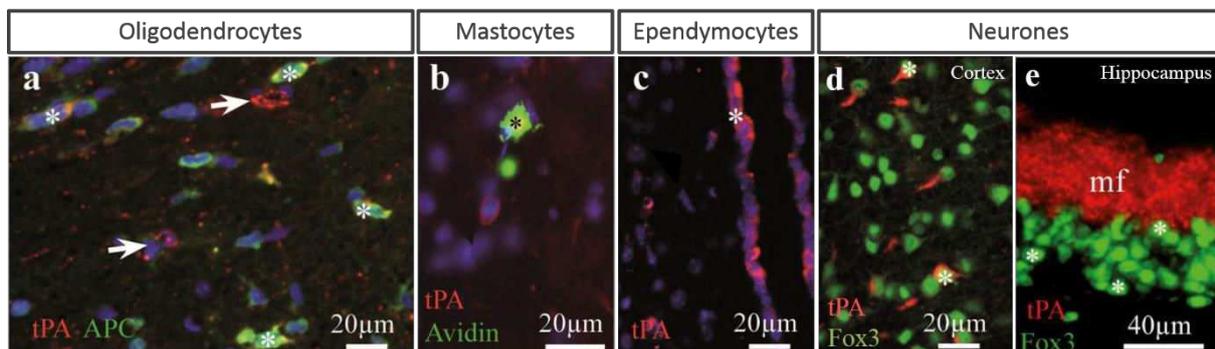


Figure 6: Expression du tPA par les différentes cellules du SNC chez la souris adulte. Immunohistochimie sur coupe de cerveau de souris après injection de colchicine (inhibiteur du transport neuronal). Le tPA (en rouge) est présent au niveau des oligodendrocytes (a ; marquage APC positif en vert, astérisques), des mastocytes (b ; marquage avidine positif en vert, astérisque), des épendymocytes (c ; astérisque), dans les neurones corticaux (d) et dans les fibres hippocampiques (e ; mf= fibres moussues, marquage Fox3 positif en vert, astérisques), (adapté de : Louessard et al., 2016).

Les neurones :

Shin et collaborateurs ont montré, à partir de cultures de neurones hippocampiques, que le tPA est retrouvé dans les dendrites et au niveau des synapses des neurones. Ils ont également montré la présence d'ARNm du tPA au niveau des dendrites, mettant ainsi en évidence la capacité des neurones à synthétiser du tPA dans la région synaptique (Figure 7 ; Shin et al., 2004).

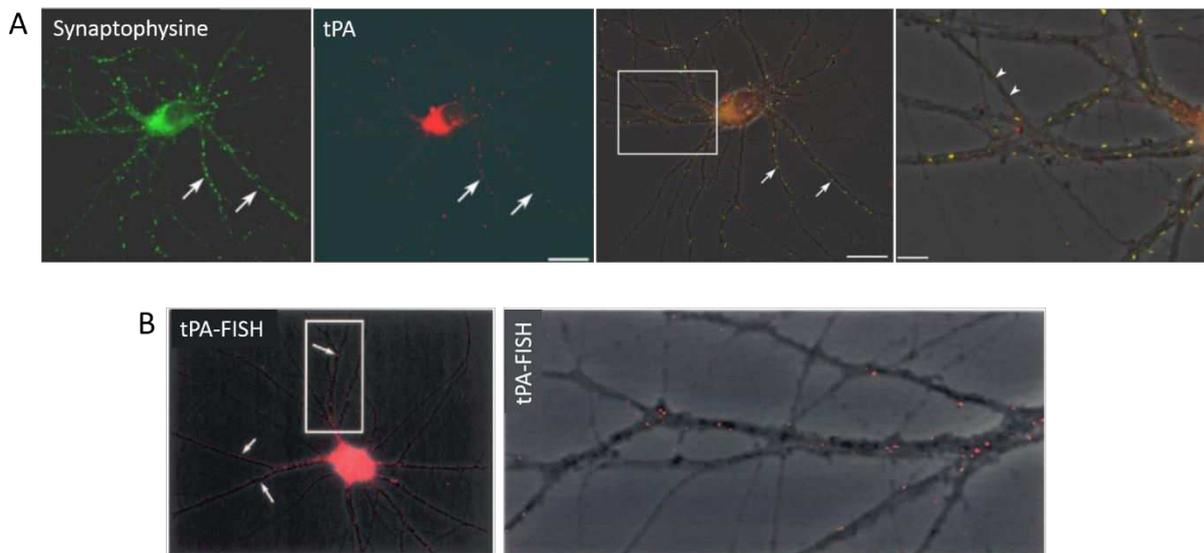


Figure 7: Expression du tPA localisée au niveau des dendrites et des synapses. A) Le tPA (en rouge) est détecté par immunocytochimie au niveau du corps cellulaire et des dendrites des neurones hippocampiques en culture. Le tPA est présent dans des vésicules synaptiques (marquage synaptophysine positif, en vert). Les points jaunes indiquent des colocalisations tPA/synaptophysine (flèches). B) Détection des ARNm du tPA après hybridation *in situ* par fluorescence (tPA-FISH). Les ARNm du tPA (en rouge) sont détectés au niveau du corps cellulaire ainsi que le long de l'arborisation dendritique (Shin et al., 2004).

Le tPA est stocké dans des vésicules au niveau présynaptique (Parmer et al., 1997) et transporté dans des vésicules de sécrétion le long des neurites: ce transport s'effectue dans les deux sens. Le tPA présent dans les vésicules de sécrétion peut être libéré au niveau des cônes de croissance pour permettre l'élongation axonale (Lochner et al., 1998). En 2006, Lochner et collaborateurs ont montré *in vitro* sur des cultures de neurones hippocampiques de sept jours, que le tPA est présent dans des vésicules à cœur-dense et que ces vésicules sont présentes dans des épines dendritiques. Ils ont également trouvé qu'une dépolarisation neuronale, induite par de grandes concentrations de potassium, provoque une exocytose des vésicules contenant le tPA et que ce relargage est dépendant de la concentration extracellulaire en calcium. Le tPA pourrait ainsi interagir avec les récepteurs NMDA pour moduler les fonctions d'apprentissage et de mémoire (Lochner et al., 2006). D'autres études ont confirmé ce résultat : le tPA peut être libéré par les neurones. En effet, l'ajout de chlorure de potassium sur des cellules PC12 (lignée cellulaire dérivée des phéochromocytome de rat ; lignée utilisée pour étudier la différenciation neuronale) ou des neurones corticaux, induit leur dépolarisation entraînant la libération de tPA dans le milieu extracellulaire (Gualandris et al.,

1996; Fernández-Monreal et al., 2004). Le tPA est considéré comme un neuromodulateur (**Figure 8**). Il est contenu dans des vésicules à cœur-dense et suite à une dépolarisation, les neurones sont capables de le libérer par un mécanisme d'exocytose dépendant du calcium. Une fois à la synapse le tPA est capable de moduler les récepteurs NMDA post-synaptiques. De plus l'excès de tPA synaptique peut-être recapturé par les astrocytes *via* les récepteurs LRP (Fernández-Monreal et al., 2004).

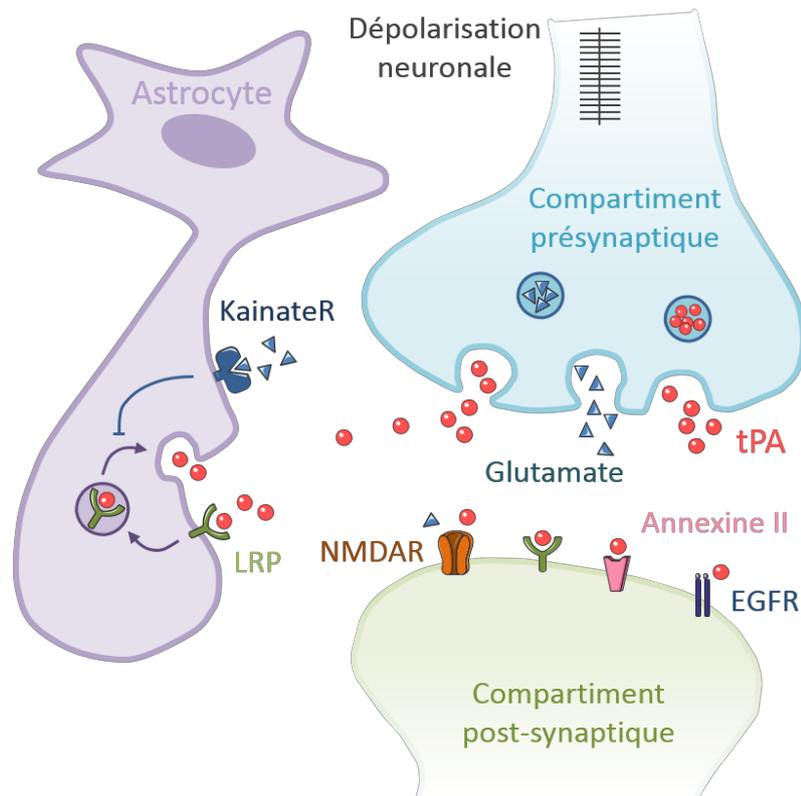


Figure 8: Le tPA est un neuromodulateur. Suite à une dépolarisation neuronale, le tPA contenu dans des vésicules synaptiques est libéré dans la fente synaptique pour aller interagir avec les récepteurs post-synaptiques. L'excès de tPA à la synapse est recapturé par les astrocytes *via* les récepteurs LRP (adapté de : Hébert et al., 2016).

Une récente étude du laboratoire a contribué à mieux caractériser les neurones capables d'exprimer du tPA, il semblerait que tous les neurones ne soient pas capables d'exprimer du tPA et que son expression serait réduite aux neurones glutamatergiques excitateurs pyramidaux. Les auteurs ont également montré que le tPA est stocké dans des vésicules synaptiques : glutamatergique synaptobrevine 2 positives (**Figure 9** ; Louessard et al., 2016).

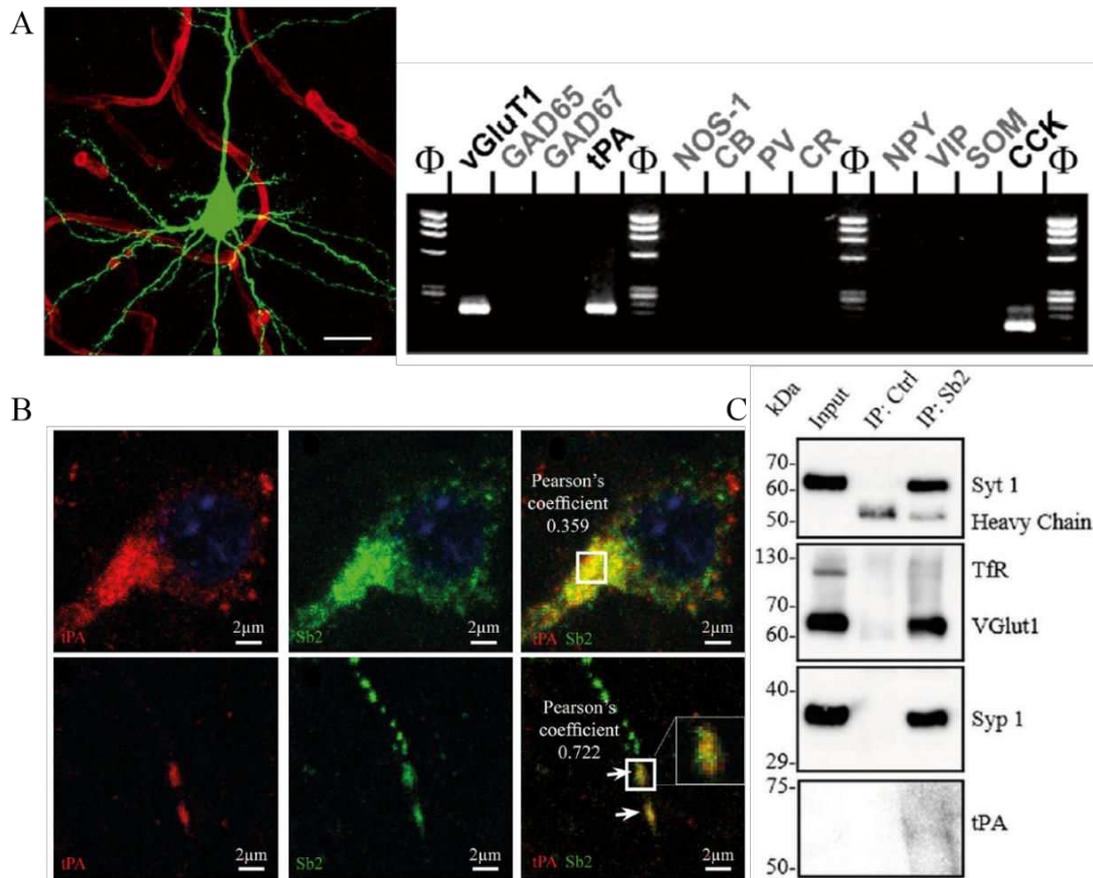


Figure 9: Caractérisation des neurones exprimant du tPA. A) Enregistrement en patch-clamp d'un neurone pyramidal (en vert). Transcription inverse puis réaction en chaîne par polymérase sur une cellule (en anglais : *single-cell reverse transcription polymerase chain reaction* ou sc RT-PCR) révélant l'expression des ARNm de tPA ainsi que les ARNm du transporteur au glutamate (en anglais : *vesicular glutamate transporter 1* ou VGLUT1) et de la cholécystokinine (CCK). B) Immunohistochimie sur coupe de cerveau de souris révélant la présence du tPA (en rouge) dans des vésicules synaptobrevine 2 positives (en vert, Sb2) à la fois dans le corps cellulaire du neurone mais également au niveau des neurites. C) Immunoprécipitation montrant la présence du tPA dans des vésicules synaptobrevine 2 positives (Sb2), synaptotagmine 1 positive (Syt 1), synaptophysine 1 (Syp 1) et VGlut1 positive (adapté de : Louessard et al., 2016).

Les astrocytes :

Une fois libéré dans la synapse par les neurones, le tPA peut être recapturé par les astrocytes *via* les récepteurs LRP et son domaine kringle1. Les astrocytes seraient ensuite capables de libérer ce tPA par un mécanisme dépendant de la voie de signalisation de la protéine kinase C suite à l'activation des récepteurs kainates membranaires. Ce recyclage du tPA synaptique pourrait être à l'origine de la clairance du tPA au sein du SNC (Cassé et al., 2012).

La synthèse de tPA par les astrocytes a également été mise en évidence chez l'Homme. En effet, Hultman et collaborateurs ont montré que les astrocytes seraient capables d'exprimer et de libérer du tPA de façon régulée. Le tPA astrocytaire a été majoritairement retrouvé dans les astrocytes activés suggérant un rôle du tPA astrocytaire au cours des processus pathologiques (**Figure 10** ; Hultman et al., 2008).

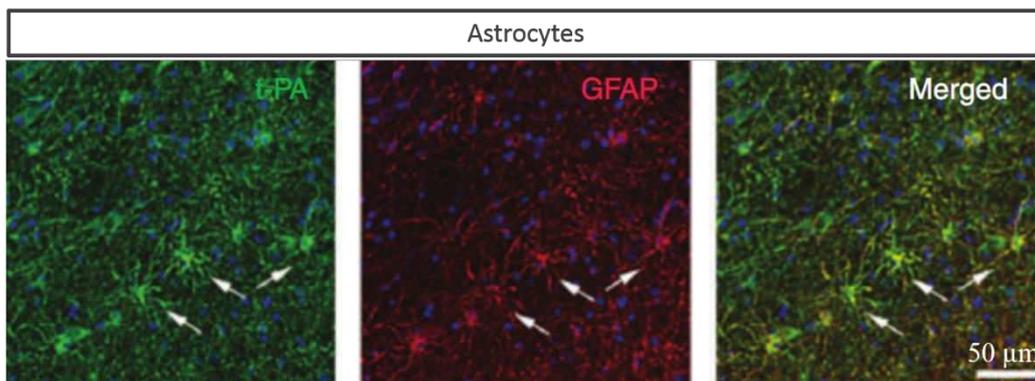


Figure 10: Expression du tPA par les astrocytes activés chez l'Homme. Le tPA (ici en vert) est présent au niveau des astrocytes humains activés (en rouge, marquage GFAP) (Hultman et al., 2008).

Les oligodendrocytes :

Le tPA est également exprimé par les oligodendrocytes (**Figure 6** ; Louessard et al., 2016), et son expression diminue au cours du vieillissement. De plus, il a été démontré un effet anti-apoptotique du tPA sur les oligodendrocytes (Correa et al., 2011). Et de récents travaux du laboratoire ont montré que le tPA des oligodendrocytes est impliqué dans la migration des précurseurs oligodendrocytaires au cours du développement et durant la remyélinisation suite à une lésion de la substance blanche (Leonetti et al., 2017).

La microglie :

La microglie est aussi capable de produire du tPA et sa libération par les cellules microgliales serait associée à des processus inflammatoires et neurodégénératifs (**Figure 11**). De la même manière que pour les astrocytes, le tPA est retrouvé majoritairement associé à de la microglie activée (Tsirka et al., 1995, 1997; Rogove et al., 1999; Siao et al., 2003).

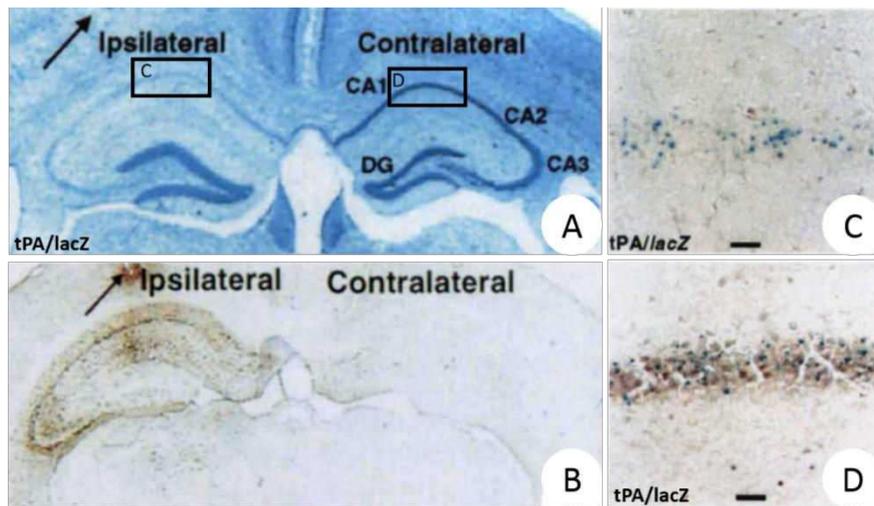


Figure 11: Expression du tPA par la microglie. A) Photomicrographie de coupe coronale de cerveau de souris transgénique tPA/lacZ (promoteur du tPA fusionné avec le gène *lacZ* de bactérie) après coloration au crésyl-violet cinq jours après une injection intra-hippocampique de kaïnate (agoniste des récepteurs glutamatergiques, la flèche indique le site d'injection). L'injection de kaïnate induit la mort des neurones hippocampiques dans les régions CA1-CA3. B) L'immunohistochimie contre l'antigène F4/80 révèle une activation des cellules microgliales dans la zone lésée. La microglie activée est capable de produire des ARNm du tPA (marquage β -galactosidase positif, en bleu) dans la zone lésée (C) et dans la zone saine (D) (adapté de : [Tsirka et al., 1995](#)).

1.4. Inhibiteurs du tPA : les serpinés

Comme montré précédemment, les sources de tPA sont nombreuses dans le SNC. Certains travaux ont montré qu'il y avait une différence entre les niveaux d'expression du tPA et son activité au sein d'une même structure, ce qui suggère la présence d'inhibiteur du tPA dans le parenchyme cérébral ([Sappino et al., 1993](#)). Ces inhibiteurs appartiennent à la famille des serpinés (en anglais : *serine proteinase inhibitors*). Les serpinés sont des protéines monomériques glycosylées d'environ 350-400 acides aminés pour un poids moyen de 40-60 kDa. Elles possèdent une conformation secondaire formant un domaine (en anglais : *core domain*) constitué de trois feuillets β et de huit ou neuf hélices α . Elles ont également une boucle du centre réactif (en anglais : *reactive center loop* ou RCL) qui permet leur interaction avec les protéases. La serpine se fixe sur la protéase par l'intermédiaire de la RCL. Le clivage de la boucle par la protéase permet de former une liaison covalente entre les deux protéines, inhibant ainsi l'activité de la protéase et engendrant une conformation stable du complexe ([Figure 12](#)). Les serpinés peuvent aussi exister sous une forme latente, pour laquelle l'interaction avec la protéase n'est pas possible ([Silverman and Muir, 1993](#); [Tang et al., 2015](#)).

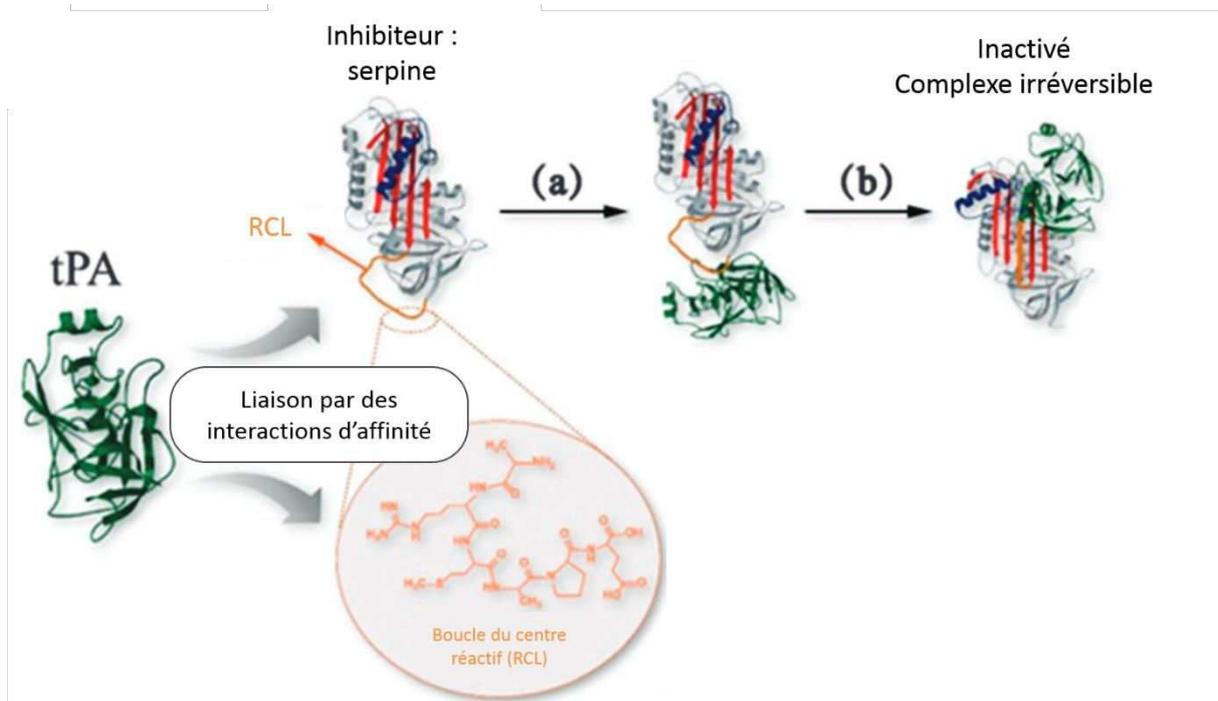


Figure 12: Mode d'action des serpines. Interaction entre la protéase : le tPA et la serpine au niveau de la RCL. (a) Le tPA va cliver la boucle, qui va alors aller s'insérer dans le feuillet β A. (b) La protéase est entraînée au pôle opposé et une liaison covalente se forme entre la serpine et la protéase, ce qui inhibe cette dernière (adapté de : [Tang et al., 2015](#)).

A l'heure actuelle, quatre serpines sont connues pour inhiber le tPA : PAI-1, PAI-2, la neuroserpine et la protéase nexine-1 ([Sprengers and Kluft, 1987](#)). Les principaux inhibiteurs du tPA dans le parenchyme cérébral sont PAI-1 et la neuroserpine, nous développerons davantage leurs rôles par la suite ([Osterwalder et al., 1996](#); [Miranda and Lomas, 2006](#)). La neuroserpine est exprimée de manière physiologique et en grande quantité par les neurones et les astrocytes, alors que PAI-1 ne peut être exprimé que par les astrocytes réactifs suite à certaines conditions de stress ([Docagne et al., 1999](#); [Hino et al., 2001](#)). La protéine nexine-1, quant à elle, est sécrétée par les cellules gliales et les neurones. Elle est capable d'inhiber à la fois les activateurs du plasminogène et la plasmine ([Mansuy et al., 1993](#)). Dans la circulation sanguine, PAI-1 est le principal inhibiteur du tPA ([Miranda and Lomas, 2006](#)). Le rôle de PAI-2 est encore mal connu, il est également capable d'inhiber le tPA mais il est majoritairement intracellulaire et on ne le détecte pas dans le plasma chez l'adulte, seulement durant la grossesse et lors de la présence de tumeur ([Dougherty et al., 1999](#)).

1.4.1. PAI-1

PAI-1 est une protéine de 50 kDa, composée de 379 acides aminés. PAI-1 est principalement retrouvé dans le plasma où il est majoritairement synthétisé par les cellules endothéliales, les plaquettes ou les cellules musculaires lisses (Sprengers and Kluft, 1987; Brogren et al., 2004). Au niveau périphérique, il peut être synthétisé par de nombreux tissus comme le foie, le tissu adipeux, les poumons, les reins ou le cœur.

Dans la circulation, PAI-1 est retrouvé en excès par rapport à la quantité de tPA. La majorité du tPA est donc complexé à PAI-1, inhibant ainsi son activité fibrinolytique. Cette inhibition s'effectue par deux étapes : une première étape de fixation stable au site catalytique et une deuxième étape de fixation aux domaines finger et kringle 2, bloquant ainsi l'interaction du tPA avec la fibrine (Kaneko et al., 1992). De plus, PAI-1 est capable de bloquer de la même manière l'activité du tPA simple et double chaîne (Rijken and Lijnen, 2009). Les complexes tPA-PAI-1 sont très stables, ce qui rend l'inhibition du tPA quasiment définitive (Zhou et al., 2001). De plus, ces complexes ne gênent pas l'élimination du tPA par le foie. En effet, la clairance du tPA par les hépatocytes peut se faire aussi bien sous sa forme libre que sous sa forme complexée avec PAI-1 (Nagaoka et al., 2002).

PAI-1 est également responsable d'une partie de la régulation du tPA dans le système nerveux central (Sprengers and Kluft, 1987). En condition physiologique, PAI-1 est exprimé en très faible quantité par les neurones et les astrocytes (Buisson et al., 1998; Hino et al., 2001) mais PAI-1 est surexprimé par les astrocytes en conditions pathologiques comme par exemple lors d'un accident vasculaire cérébral (AVC) (Docagne et al., 1999).

1.4.2. Neuroserpine

La neuroserpine est une protéine de 54-60 kDa, composée de 410 acides aminés. Elle est principalement retrouvée dans le SNC ; toutefois une faible quantité est également retrouvée dans les reins, le cœur, le pancréas et les testicules (Krueger et al., 1997; Schrimpf et al., 1997). En revanche, la neuroserpine n'est pas du tout exprimée par les cellules endothéliales. Elle est ainsi absente de la circulation sanguine et n'a donc aucune influence sur l'inhibition du tPA vasculaire (Docagne et al., 1999; Hastings et al., 1997; Osterwalder et al., 1996).

Dans le SNC, la neuroserpine est principalement exprimée par les neurones, mais les astrocytes sont également capables de la synthétiser. La neuroserpine inhibe préférentiellement le tPA mais contrairement à PAI-1, cette inhibition est peu stable. Il est probable que le clivage de la RCL par le tPA forme une boucle trop longue, empêchant le complexe tPA/neuroserpine de se stabiliser. Le tPA peut alors hydrolyser la RCL de la neuroserpine, ainsi se libérer et donc retrouver son activité (Barker-Carlson et al., 2002). De ce fait, la durée de vie moyenne des complexes tPA/neuroserpine n'excède par une dizaine de minutes (Miranda and Lomas, 2006). La neuroserpine inhibe préférentiellement le tc-tPA en revanche, les complexes formés avec le sc-tPA sont beaucoup plus stables (Hastings et al., 1997; Barker-Carlson et al., 2002; Yepes and Lawrence, 2004).

1.5. Rôles du tPA

1.5.1. Rôles du tPA vasculaire

1.5.1.1. Fibrinolyse

En réponse au mécanisme de coagulation qui permet, suite à une brèche vasculaire, de créer un caillot sanguin afin de stopper une hémorragie : il existe la fibrinolyse. La balance entre ces deux mécanismes est très importante pour le maintien de l'homéostasie vasculaire.

La fibrinolyse est un mécanisme enzymatique permettant de dégrader les caillots de fibrine qui peuvent se former dans la circulation, suite à une rupture de la paroi des vaisseaux par exemple. La fibrinolyse s'articule autour d'une enzyme principale : la plasmine. La plasmine est capable de dégrader les chaînes de fibrine permettant ainsi la reperfusion des vaisseaux. La plasmine est une sérine protéase sécrétée par le foie sous la forme d'une proenzyme inactive : le plasminogène (Collen and Lijnen, 1991).

Il existe deux activateurs du plasminogène chez l'Homme : le tPA et l'activateur du plasminogène de type urokinase (en anglais : *urokinase-type plasminogen activator* ou uPA) (Blasi et al., 1987). Malgré leurs différences, ces deux protéases sont toutes les deux capables d'activer le plasminogène en plasmine. Comme décrit précédemment, le tPA est synthétisé et sécrété par les cellules endothéliales de manière constitutive ou en réponse à des stimuli. En conditions physiologiques, le tPA n'est pas un bon activateur du plasminogène. En revanche, en présence de fibrine, sa capacité à activer le plasminogène est multipliée par cent (Hoylaerts

et al., 1982). La fibrine possède un site de liaison avec le tPA proche d'un autre site de liaison avec le plasminogène, facilitant ainsi leur interaction. Le tPA va se fixer à la fibrine et au plasminogène et ainsi convertir ce dernier en plasmine (Figure 13). Par ce mécanisme, le tPA est capable d'activer le plasminogène seulement au niveau du caillot de fibrine (Medved and Nieuwenhuizen, 2003). Cette activation locale du plasminogène permet à la plasmine de jouer son rôle fibrinolytique avant d'être inhibée.

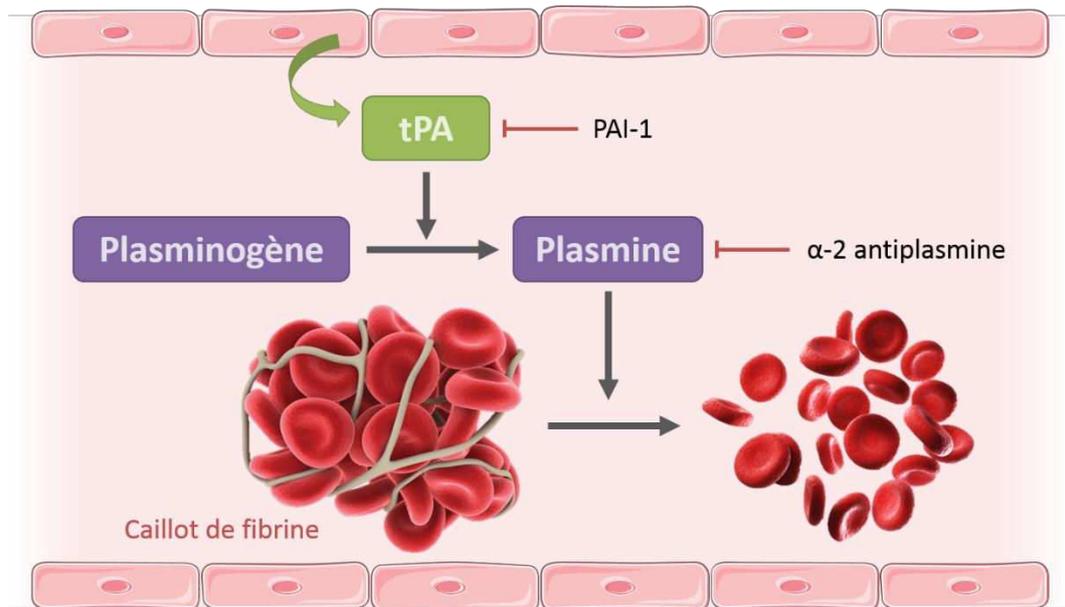


Figure 13: Mécanisme d'action de la fibrinolyse endogène. Le tPA est sécrété par les cellules endothéliales dans la circulation sanguine. Le tPA est capable de convertir le plasminogène en plasmine à proximité des caillots de fibrines. La plasmine peut alors dégrader la fibrine et ainsi lyser les caillots. La régulation de la fibrinolyse s'effectue à deux niveaux : grâce à PAI-1 (inhibiteur du tPA) et avec α -2-antiplasmine (inhibiteur de la plasmine).

Suite à la découverte du système d'activation du plasminogène, de nombreuses études précliniques ont été réalisées afin de trouver des perspectives thérapeutiques dans le traitement de pathologies telles que les thromboses veineuses profondes ou les infarctus (du myocarde ou cérébraux). Ces études ont rapidement montré que l'injection intraveineuse de plasmine était inefficace pour dégrader les caillots sanguins car la plasmine est rapidement inhibée dans le sang (Boyles et al., 1960). Au contraire l'injection d'activateurs du plasminogène permet une reperfusion efficace y compris chez l'Homme (Johnson and McCARTY, 1959). L'uPA possède une affinité pour la fibrine plus faible que le tPA c'est pourquoi le tPA s'est imposé parmi les agents fibrinolytiques.

Il existe deux niveaux de régulation de la fibrinolyse, afin d'éviter une hyperfibrinolyse qui, en plus, d'augmenter le risque d'hémorragie, provoque une altération de la barrière hémato-encéphalique (BHE) (Marcos-Contreras et al., 2016). Le premier niveau de régulation se situe au niveau de la plasmine ; en effet, l' α -2-antiplasmine est capable d'inhiber la plasmine (Holmes et al., 1987). Le deuxième niveau de régulation consiste en l'inactivation du tPA par PAI-1 permettant une diminution de la quantité de plasmine circulante et donc la fibrinolyse (Figure 13).

1.5.1.2. Barrière Hémato-Encéphalique (BHE)

La BHE est une barrière physiologique qui assure une protection entre le parenchyme cérébral et la circulation sanguine. Son rôle est d'empêcher le passage de molécules du sang vers le parenchyme cérébral, à l'exception de certaines molécules nécessaires au cerveau (comme l'oxygène et le glucose). La BHE est composée de cellules endothéliales (reliées entre elles par des jonctions serrées), d'une lame basale (composée de collagène IV, de laminine et de fibronectine), de péricytes et de pieds astrocytaires (Figure 14 ; Abbott et al., 2006).

En conditions pathologiques (Figure 14), le tPA est capable d'altérer la BHE, *via* une interaction avec les récepteurs LRP exprimés à la surface des cellules endothéliales. Cette interaction provoque un décrochage des pieds astrocytaires de la lame basale menant ainsi à l'ouverture de la BHE (Cheng et al., 2006; Polavarapu et al., 2007). En plus d'augmenter le risque d'hémorragie, ce mécanisme mène au passage du tPA vasculaire vers le parenchyme cérébral (Yepes et al., 2003). Le tPA serait également impliquée dans la dégradation de la BHE par l'activation de métalloprotéinases matricielles (en anglais : *matrix metalloproteinase* ou MMP), notamment MMP-9 mais aussi MMP-2 et 3. Ces MMP activées pourraient participer à la dégradation de la matrice extracellulaire, fragiliser les jonctions serrées et altérer la lame basale des vaisseaux cérébraux (Suzuki et al., 2009; Wang et al., 2003). De plus, une étude a montré que chez des animaux déficients en MMP-9 ou en MMP-3, aucune altération de la BHE n'est retrouvée après thrombolyse (Asahi et al., 2000; Suzuki et al., 2007). Par ailleurs, le tPA est capable d'activer le PDGF-CC grâce à ses domaines kringle 2 et sérine protéase. Le PDGF-CC peut ensuite stimuler les récepteurs alpha du facteur de croissance plaquettaire (en anglais : *platelet-derived growth factor receptor alpha* ou PDGFR- α) des péricytes et des astrocytes, l'activation de ces récepteurs provoque une altération de la perméabilité de la BHE

et donc une aggravation du risque d'hémorragie (Su et al., 2008). Cet effet impliquerait le domaine kringle 2 du tPA (Fredriksson et al., 2004).

En conditions physiologiques, il a été montré que le tPA vasculaire pouvait aussi traverser la BHE également grâce à une interaction avec les récepteurs LRP (Benchenane et al., 2005; Mehra et al., 2016).

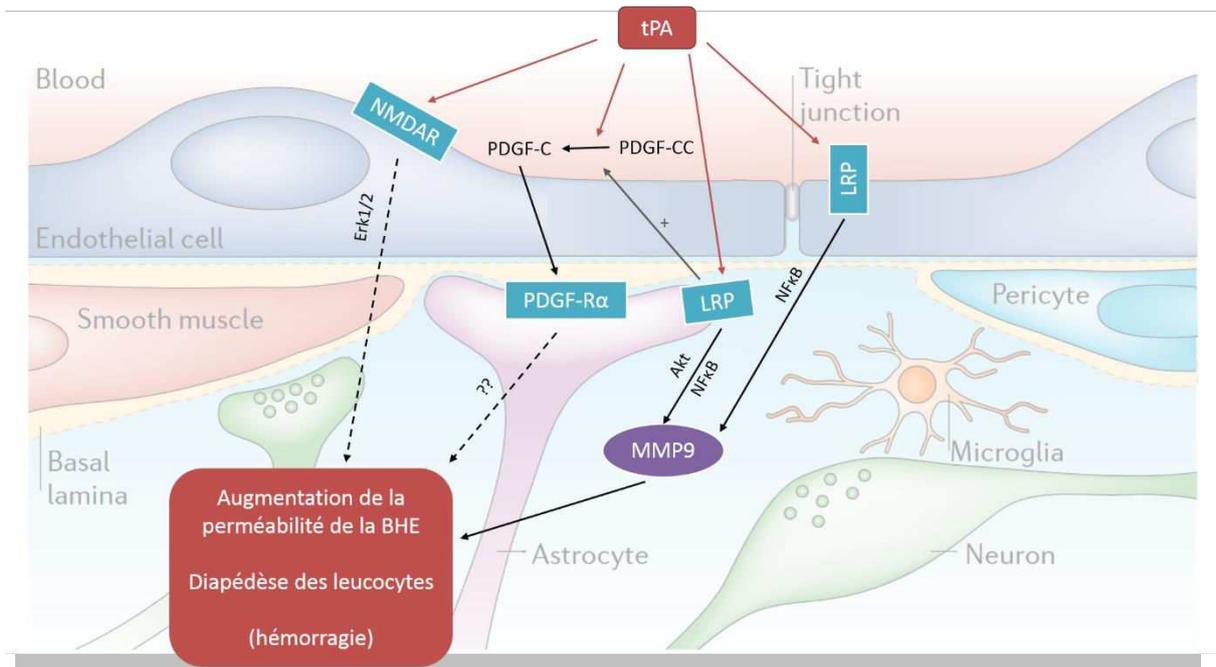


Figure 14: Effet du tPA sur la barrière hémato-encéphalique. La BHE est formée par les cellules endothéliales reliées par des jonctions serrées, une lame basale, des péricytes et des pieds astrocytaires. Le tPA interagit avec les récepteurs LRP des astrocytes et des cellules endothéliales provoquant une augmentation de la production des MMP9. Les MMP9 engendrent une altération de la BHE. De plus, l'activation du PDGF-CC par le tPA contribue au détachement des pieds astrocytaires de la lame basale *via* une interaction avec les récepteurs PDGFR- α . Cette activation est facilitée par l'interaction du tPA avec les récepteurs LRP à la surface des astrocytes (adapté de Abbott et al., 2006; Mehra et al., 2016).

1.5.2. Rôles du tPA dans le SNC

En parallèle de ses fonctions vasculaires, le tPA possède également de nombreux rôles dans le parenchyme cérébral. Comme décrit précédemment, le tPA est synthétisé par différents types cellulaires du SNC et il est retrouvé dans de nombreuses régions cérébrales. Au niveau du parenchyme cérébral, le tPA intervient dans le contrôle de nombreuses fonctions physiopathologiques

1.5.2.1. tPA et développement cérébral

Le développement cérébral est le résultat d'un enchaînement complexe d'événements, incluant la prolifération cellulaire, la différenciation, la migration puis la mise en place de connexions et d'interactions entre les différents types cellulaires (Gupta et al., 2002; Nadarajah et al., 2003; van den Aemele et al., 2014). Ces différentes phases nécessitent, la plupart du temps, la dégradation de la matrice extracellulaire (P. Lu et al., 2011). Pour cela, les cellules sécrètent diverses protéines comme des métalloprotéases (telles que les MMPs ou les désintégrines) et les désintégrines et métalloprotéases à motif thrombospondines (en anglais : *a disintegrin and metalloproteinase with thrombospondin motifs* ou ADAMTS) mais aussi des sérines protéases telles que le tPA. Seeds et collaborateurs ont montré que des souris déficientes en tPA présentent une migration neuronale retardée, mise en évidence par une accumulation des cellules granulaires au sein de la couche moléculaire du cervelet (Figure 15 ; Seeds et al., 1999). Plus récemment, une étude au laboratoire a montré que le tPA était impliqué dans la migration des progéniteurs d'oligodendrocytes au cours du développement. Cet effet implique les récepteurs à l'EGF présents sur les progéniteurs oligodendrocytaires (Leonetti et al., 2017).

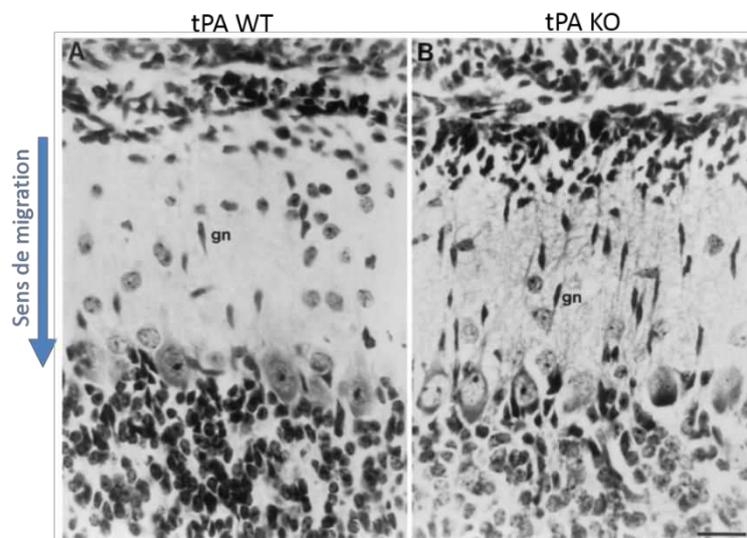


Figure 15: Effet de l'absence du tPA sur la migration neuronale. Microphotographies montrant l'accumulation des cellules granulaires (gn) dans la couche moléculaire du cervelet de souris (P10) déficientes en tPA (en anglais : *knock-out* ou KO) par rapport aux souris sauvages (en anglais : *wild-type* ou WT) (adapté de : Seeds et al., 1999).

Le tPA est également impliqué dans la pousse neuritique. La pousse neuritique se fait à partir de structures transitoires : les cônes de croissance qui sont situés à l'extrémité des

neurites en développement (axone ou dendrite). Le cône de croissance est une structure transitoire et très mobile, il a pour fonction d'explorer l'environnement extracellulaire puis en réponse à des stimuli locaux, il est capable de modifier sa vitesse et sa direction de croissance. L'élongation du cône de croissance permet au neurone d'établir des communications avec des synapses d'un autre neurone ou alors d'établir des connections avec des muscles, des récepteurs sensitifs ou encore des glandes.

De nombreuses études ont regardé le rôle du tPA et de ses inhibiteurs sur la pousse neuritique. L'inhibition de l'activité du tPA ou l'absence de tPA provoque un blocage de la croissance axonale sur des cultures de neurones (D. Baranes et al., 1998; Pittman et al., 1989). En revanche, l'addition ou la surexpression de tPA engendrent une augmentation de la pousse des neurites (D. Baranes et al., 1998; H.-Y. Lee et al., 2007; Pittman and DiBenedetto, 1995). De manière similaire, il semblerait qu'un défaut d'expression de la neuroserpine provoque des déficits d'extension des prolongements (Hill et al., 2000). Le tPA est présent au niveau des cônes de croissance (Verrall and Seeds, 1989) et peut être libéré localement avec des MMP (García-Rocha et al., 1994; Lochner et al., 1998) pour activer le plasminogène. Grâce à la plasmine nouvellement formée et aux MMP une dégradation locale de la matrice extracellulaire (MEC) est possible, aboutissant à la pousse neuritique et/ou à la formation de zone de communications avec d'autres cellules mais également de nouvelles synapses (Huang et al., 1996; Qian et al., 1993). Une autre hypothèse sur le rôle du tPA dans la pousse neuritique implique l'activation du facteur de croissance hépatocytaire (en anglais : *hepatocyte growth factor* ou HGF). Le tPA serait capable d'activer l'HGF participant à l'élongation des axones (Thewke and Seeds, 1999).

1.5.2.2. tPA et modulation glutamatergique

Le glutamate est le principal neurotransmetteur excitateur du cerveau. Il existe trois récepteurs ionotropiques au glutamate : les récepteurs NMDA, kainate et alpha-amino-5-méthylisoazol-4-propionate (AMPA). L'efficacité de la neurotransmission glutamatergique est modulée en fonction de l'activité neuronale et les récepteurs NMDA jouent un rôle important dans ces événements.

Le tPA est capable de cliver le fragment N-terminal de la sous-unité GluN1 des récepteurs glutamatergiques de type NMDA. Ce clivage induit une potentialisation de l'influx calcique de ces récepteurs en présence de glutamate (Nicole et al., 2001). Plusieurs travaux

menés au sein de notre équipe ont permis de caractériser ce mécanisme de potentialisation de la neurotransmission glutamatergique. Ainsi, ce clivage a lieu au niveau de l'Arg²⁶⁰ de la sous-unité GluN1 des récepteurs NMDA (Fernández-Monreal et al., 2004) et nécessite la fixation du domaine kringle 2 du tPA sur la sous-unité GluN1 des récepteurs NMDA (Lopez-Atalaya et al., 2008). De plus, les conformations sous lesquelles se trouvent à la fois les récepteurs NMDA et le tPA influencent leur interaction. En effet, le tPA clive préférentiellement les récepteurs NMDA contenant la sous-unité GluN2D (Baron et al., 2010) et seule la forme simple chaîne du tPA est en mesure d'induire ce clivage (Parcq et al., 2012). Ceci va engendrer une augmentation de l'influx calcique qui va avoir une incidence différente selon l'état physiologique environnant. Cette interaction du tPA avec les récepteurs NMDA va être impliquée dans des processus physiologiques comme la mémoire, l'apprentissage (Benchenane et al., 2007; Obiang et al., 2012) mais également pathologique comme l'excitotoxicité et l'épilepsie (Nicole et al., 2001; Parcq et al., 2012; Bertrand et al., 2015; Qian et al., 1993).

1.5.2.3. tPA et plasticité synaptique

La mise en place d'un souvenir se traduit par une augmentation importante et durable de l'efficacité synaptique. L'hippocampe et l'amygdale sont deux régions qui jouent un rôle très important dans les processus de mémoire et d'apprentissage. Le mécanisme moléculaire qui a été mis en évidence pour médier ces deux fonctions est la potentialisation à long terme (en anglais : *Long Term Potentiation* ou LTP). Expérimentalement, lorsqu'on stimule à haute fréquence des neurones de l'hippocampe, on observe une augmentation plus ou moins persistante de l'efficacité de la transmission synaptique. Ce phénomène a initialement été découvert chez le lapin en 1973 (Bliss and Lomo, 1973) mais il a également été observé dans d'autres régions du cerveau comme dans le cortex (Iriki et al., 1989), dans l'amygdale et le striatum (Uno and Ozawa, 1991). Une récente étude a montré que ce phénomène observé expérimentalement (LTP) constitue directement le support moléculaire et cellulaire de l'apprentissage et de la mémoire (Nabavi et al., 2014).

Le rôle du système glutamatergique dans ce mécanisme a rapidement été mis en évidence, impliquant particulièrement les récepteurs NMDA (Collingridge et al., 1983). Suite à une stimulation à haute fréquence, le neurone pré-synaptique libère une grande quantité

de glutamate. Au sein de la synapse, le glutamate va aller activer différents types de récepteurs post-synaptiques glutamatergiques. Ce sont dans un premier temps les récepteurs ionotropiques, de type AMPA, qui vont être activés provoquant une dépolarisation locale du neurone post-synaptique. Cette dépolarisation est suffisante pour permettre l'expulsion des ions magnésium bloquant le canal des récepteurs glutamatergiques de type NMDA. Le glutamate synaptique peut ensuite activer les récepteurs NMDA, engendrant une entrée de calcium dans l'élément post-synaptique. Cette entrée de calcium va activer différentes kinases dépendantes du calcium qui vont induire un ensemble de cascades moléculaires responsables du renforcement synaptique. On distingue deux types de mécanismes aboutissant à une amélioration de l'efficacité de la transmission synaptique : ceux de la phase précoce de la LTP et ceux de la phase tardive de la LTP. La phase précoce dure quelques heures et implique des mécanismes enzymatiques modulant l'efficacité synaptique (phosphorylation et mobilisation du pool de récepteurs AMPA). La phase tardive de la LTP persiste plusieurs jours et repose principalement sur la synthèse de nouvelles protéines contribuant à l'amélioration de l'efficacité synaptique (Malenka and Bear, 2004).

De façon intéressante, en condition physiologique, le tPA est fortement exprimé dans l'hippocampe et l'amygdale (Sappino et al., 1993; Teesalu et al., 2004). En 1993, Qian et collaborateurs ont mis en évidence que le tPA jouait également un rôle dans ce processus. En effet, suite à une activation des neurones hippocampiques, ils ont observé une augmentation rapide des ARNm du tPA (Figure 16 ; Qian et al., 1993). Une augmentation similaire a été reportée dans les neurones de Purkinje dans le cervelet de rats soumis à un apprentissage de tâches motrices (Seeds et al., 1995). Des études *in vitro*, ont également montré que l'ajout d'inhibiteurs du tPA (PAI-1 ou tPA-stop) interférait avec la phase tardive de la LTP alors que l'ajout de tPA potentialisait ce processus (D. Baranes et al., 1998). Des travaux du laboratoire ont mis en évidence le fait que les effets du tPA sur la LTP seraient plutôt médiés par le sc-tPA que par le tc-tPA (Parcq et al., 2012).

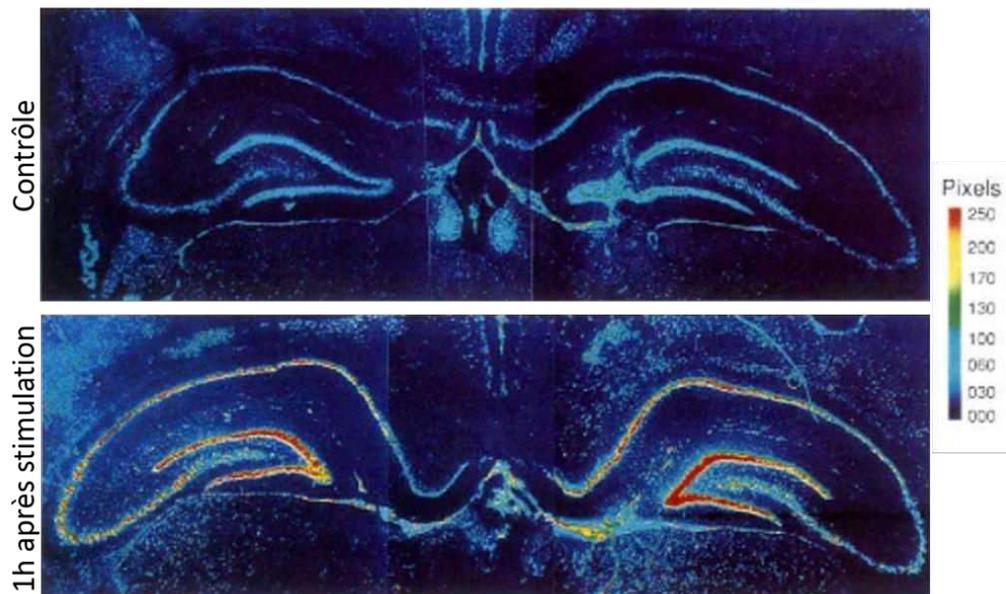


Figure 16: Elévation de la quantité d'ARN messagers du tPA suite à une activation neuronale chez le rat. Hybridation *in situ* des ARNm du tPA dans l'hippocampe de rat en conditions normales et 1h après stimulation électrique du gyrus denté (Qian et al., 1993).

L'implication du tPA dans la LTP est également visible sur le comportement des souris. Madani et collaborateurs, ont mis en évidence chez des souris sur-exprimant le tPA, une augmentation des performances d'apprentissage et de mémorisation grâce à une augmentation de la LTP (R. Madani et al., 1999). A l'inverse, les souris dépourvues de tPA présentent un déficit d'apprentissage, de plus, ce déficit est annulé par l'infusion de tPA directement dans l'hippocampe (R. Pawlak et al., 2002).

Le rôle du tPA dans les processus de LTP pourrait être expliqué par plusieurs mécanismes :

- Par son interaction avec les récepteurs NMDA (Qian et al., 1993) ;
- Par son interaction avec les récepteurs LRP, *via* les voies des signalisations impliquant la protéine kinase A (Zhuo et al., 2000) ;
- Par la dégradation de la matrice extracellulaire, ce qui faciliterait la création de nouvelles synapses (D. Baranes et al., 1998) ;
- Par sa capacité à activer le facteur neurotrophique issu du cerveau (en anglais : *Brain Derived Neurotrophic Factor* ou BDNF) essentiel à la LTP (Pang et al., 2004) ;
- Par sa capacité à cliver la reeline, une protéine importante dans la régulation des fonctions synaptiques (Trotter et al., 2014).

1.5.2.4. tPA et excitotoxicité

L'excès de glutamate est à l'origine d'une mort dite « excitotoxique » dans laquelle les récepteurs glutamatergiques de type NMDA et le calcium intracellulaire jouent un rôle central. L'excitotoxicité est la conséquence d'une suractivation des récepteurs NMDA se traduisant par une entrée massive d'ions calcium dans le neurone. Cette trop forte concentration d'ions calcium est délétère pour le neurone et va provoquer sa mort. Cette excitotoxicité est retrouvée dans diverses pathologies comme : les AVC, les traumatismes médullaires, la sclérose en plaques ou encore la maladie de Parkinson.

Nous avons vu que le tPA est capable de cliver l'extrémité N-terminale de la sous-unité GluN1 des récepteurs NMDA, potentialisant ainsi l'entrée de calcium dans les neurones et que ce mécanisme participe aux effets du tPA sur la plasticité synaptique. En conditions pathologiques, ce mécanisme de clivage des récepteurs NMDA par le tPA va renforcer les effets pro-excitotoxiques du glutamate et contribuer à l'aggravation des lésions (Nicole et al., 2001).

Les premières démonstrations de l'implication du tPA dans la neurotoxicité ont été apportées dès 1995 par Tsirka et collaborateurs (Tsirka et al., 1995). Ils ont montré que les souris déficientes en tPA sont protégées contre des processus de dégénération neuronale provoquée par l'injection intra-hippocampique d'un agoniste glutamatergique : le kaïnate (Figure 17). De plus, Wang et collaborateurs ont montré, en 1998, que les souris déficientes en tPA ont un volume de lésion plus petit que les souris de phénotype sauvage suite à une ischémie cérébrale induite par l'occlusion intraluminale de l'artère cérébrale moyenne à l'aide d'un filament. Ils ont également montré que l'injection de tPA dans la circulation provoque une augmentation du volume de lésion (Wang et al., 1998).

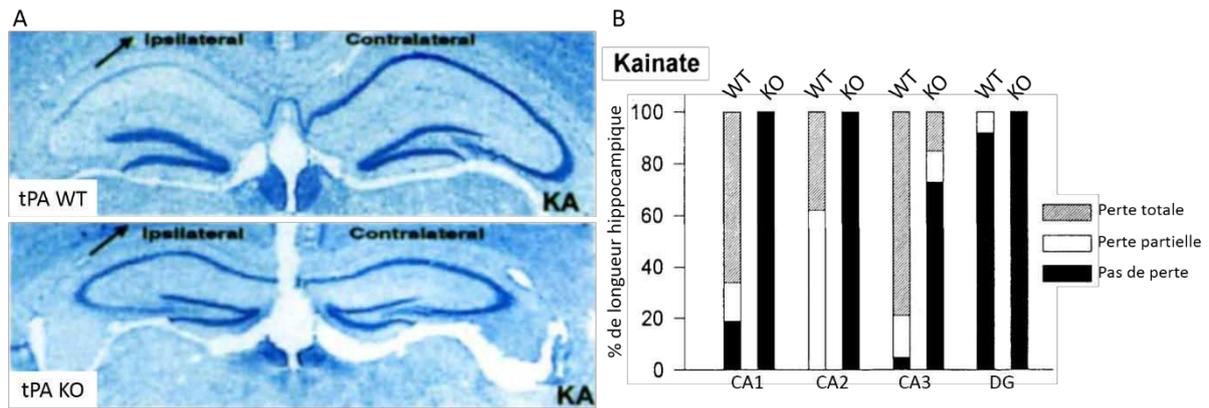


Figure 17: Les souris tPA KO sont résistantes à la mort neuronale excitotoxique. A) Coloration de coupes de cerveaux de souris tPA KO et tPA WT au crésyl-violet cinq jours après une injection intra-hippocampique de kaïnate (KA, agoniste des récepteurs glutamatergiques). B) Mesure du pourcentage de la longueur de l'hippocampe présentant une perte neuronale totale, partielle ou pas de perte chez les souris tPA KO et WT. Les souris déficientes en tPA ne présentent pas de perte neuronale comparées aux souris sauvages (adapté de : [Tsirka et al., 1995](#)).

Plusieurs mécanismes ont été proposés pour expliquer le rôle excitotoxique du tPA :

- Par sa capacité à activer le plasminogène en plasmine. C'est la plasmine qui aurait un rôle direct dans l'excitotoxicité ([Tsirka et al., 1997](#)) ;
- Par sa capacité à activer la microglie. C'est la microglie qui participerait ensuite à la mort neuronale excitotoxique ([Rogove and Tsirka, 1998](#)) ;
- Par sa capacité à cliver la sous-unité GluN1 des récepteurs NMDA et à potentialiser l'entrée de calcium dans les neurones ([Nicole et al., 2001](#); [Parcq et al., 2012](#)) ;
- Par sa capacité à se lier aux récepteurs LRP. C'est l'interaction du tPA avec les récepteurs LRP, présents sur les neurones, qui permettrait d'activer les récepteurs NMDA et provoquerait une augmentation de calcium dans les neurones ([Samson et al., 2008](#)).

1.5.2.5. tPA et apoptose

L'apoptose est un mécanisme de mort cellulaire programmée durant lequel les cellules déclenchent leur autodestruction en réponse à un signal. Contrairement à la nécrose, ce type de mort cellulaire n'induit pas de réponse inflammatoire immédiate car l'intégrité de la membrane plasmique est préservée. L'apoptose est un processus important et fondamental

que ce soit au cours du développement (où l'apoptose neuronale importante et nécessaire) ou au cours de nombreuses pathologies cérébrales.

Il semblerait que le tPA ait un rôle dans les processus apoptotiques. Bien que les premières études suggéraient un effet plutôt pro-apoptotique du tPA sur les cellules endothéliales humaines et sur les neurones corticaux de souris (Flavin et al., 2000; D. Liu et al., 2004), des études plus récentes montrent, au contraire, que le tPA aurait plutôt un rôle anti-apoptotique. En effet, Liot et collaborateurs ont montré un effet anti-apoptotique du tPA sur des cultures de neurones corticaux suite à une privation de sérum. Cet effet serait médié par une diminution de l'activité de la caspase 3, acteur majeur de la cascade apoptotique et serait indépendant de l'activité protéolytique du tPA (Liot et al., 2006). L'activation de la signalisation cellulaire dépendante de la voie phosphatidylinositol-3-Kinase (PI3K) semble responsable de cet effet anti-apoptotique sur les neurones. Cependant, les récepteurs à l'origine de l'activation de cette voie sont encore débattus, certains proposent une activation de l'annexine II (Siao and Tsirka, 2002; H.-Y. Lee et al., 2007) tandis que d'autres suggèrent plutôt une activation des récepteurs à l'EGF (Bertrand et al., 2015; Lemarchand et al., 2016).

Les effets du tPA sur l'apoptose ont été caractérisés de manière beaucoup plus claire au niveau des oligodendrocytes. Le tPA a un effet anti-apoptotique sur ces cellules et cet effet est dépendant de l'activation des récepteurs à l'EGF *via* le domaine EGF du tPA (Correa et al., 2011).

1.5.2.6. *tPA et inflammation*

Les cellules microgliales sont des cellules gliales fortement impliquées dans l'inflammation. Ces cellules constituent les macrophages résidents du cerveau et de la moelle épinière. A l'état de base, ils sont quiescents mais ils peuvent être activés suite à une lésion. Une fois activées, elles vont libérer un ensemble de molécules pro-inflammatoires comme des cytokines et des radicaux oxygénés pouvant être toxiques pour les neurones (Block and Hong, 2005).

Lors d'une lésion excitotoxique, les animaux déficients en tPA présentent une mort neuronale réduite mais également une réaction microgliale nettement réduite (**Figure 18 ; Rogove et al., 1999**). Le tPA participe à l'activation de la microglie *via* l'interaction entre son domaine finger et l'annexine II présents à la surface de la microglie. Une fois activée la microglie va contribuer aux processus neurodégénératifs en libérant différents facteurs toxiques (**Siao and Tsirka, 2002**). Parmi ces facteurs libérés, le tPA lui-même pourrait jouer un rôle particulièrement important dans la mort neuronale en activant différentes cascades moléculaires (**Siao et al., 2003**). Une autre étude propose que cet effet délétère du tPA passe par une interaction avec les récepteurs LRP. En effet, les auteurs ont montré que chez des souris ne possédant pas de récepteurs LRP sur leurs cellules microgliales, l'œdème cérébral et le taux de MMP9 sont réduits après une ischémie en comparaison à des souris sauvages (**Zhang et al., 2009**).

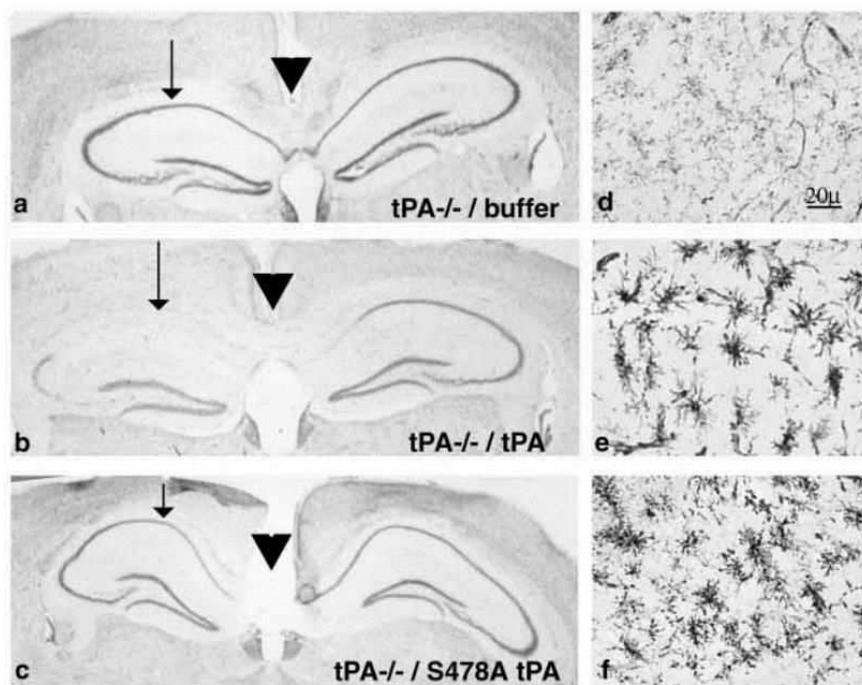


Figure 18: Effets du tPA actif et inactif (S478A tPA) sur la mort neuronale induite par une injection de kainate dans l'hippocampe et sur l'activation microgliale. a) L'injection intra-hippocampique de kainate n'a pas d'effet sur la mort neuronale chez les souris déficientes en tPA (tPA -/-) et n'induit pas d'activation microgliale (d). L'injection de tPA et de kainate, chez des souris déficientes en tPA, induit une mort neuronale hippocampique (b) et une activation des cellules microgliales (e). L'injection de tPA inactif (S478A tPA) chez des souris déficientes en tPA, et de kainate n'entraîne pas de mort neuronale hippocampique (c) mais engendre une activation des cellules microgliales (f). La mort neuronale est visualisée par une coloration au crésyl-violet sur des coupes de cerveaux de souris et l'activation microgliale est révélée par un anticorps contre l'antigène F4/80 (**Rogove et al., 1999**).

1.5.2.7. *tPA et processus cognitifs*

Nous avons vu précédemment que le tPA était majoritairement présent dans l'hippocampe et qu'il est impliqué dans la plasticité synaptique. Ce rôle lui confère donc une influence dans plusieurs types de comportement impliquant la mémoire (Calabresi et al., 2000). Plusieurs études ont montré que le tPA était nécessaire dans l'apprentissage et la mémoire spatiale (Benchenane et al., 2007; Calabresi et al., 2000; Oh et al., 2014). L'interaction entre le tPA et les récepteurs NMDA dans l'hippocampe est un des mécanismes clés par lequel le tPA est impliqué dans la mémoire spatiale (Benchenane et al., 2007; Obiang et al., 2012). De plus, chez des souris déficientes en tPA, une inhibition sélective de l'interaction tPA/NMDA dans le cortex entorhinal (connu pour son rôle dans les processus mnésiques et spatiaux (Fyhn et al., 2004; Steffenach et al., 2005) a permis de mettre en évidence l'importance du tPA dans l'encodage d'informations spatiales (Hébert et al., 2017).

Le tPA est également exprimé dans l'amygdale et dans le noyau de la strie terminale, où il joue un rôle dans les processus de stress, d'anxiété et de peur (Matys et al., 2004; Pawlak et al., 2003). Le tPA est impliqué dans l'acquisition et le rappel au contexte de peur (Huang et al., 1996; Calabresi et al., 2000; Barnes and Thomas, 2008). Plusieurs études ont montré que les souris déficientes en tPA ont un comportement moins anxieux que les souris sauvages (Matys et al., 2005, 2004; Pawlak et al., 2003). De plus, des souris déficientes en neuroserpine (principal inhibiteur du tPA cérébral) ont un comportement plus anxieux que les souris sauvages (Madani et al., 2003).

1.5.2.8. *tPA et la substance blanche*

Dans le cadre de lésions de la substance blanche, le tPA est impliqué dans les mécanismes de remyélinisation et de régénération axonale. Dans un contexte inflammatoire, des dépôts de fibrine se forment au niveau des lésions aggravant ainsi la réponse inflammatoire et la dégénération axonale. Il a été montré que le tPA était protecteur vis à vis de ces dommages axonaux et qu'il augmentait leur régénération grâce à son activité protéolytique, en retirant les dépôts de fibrine (Figure 19 ; Akassoglou et al., 2000). Au contraire, une étude de Minor et collaborateurs montre que ce mécanisme de régénération axonale par le tPA est indépendant de l'activation du plasminogène (Minor et al., 2009). Dans des conditions neuro-inflammatoires, comme dans la sclérose en plaques, l'efficacité de

retrait des dépôts de fibrine est altérée, de plus une diminution de l'expression de tPA est observée ainsi qu'une augmentation de l'expression de PAI-1 (Gveric et al., 2001, 2003). Dans des modèles animaux de sclérose en plaques, les souris déficientes en tPA ont des symptômes plus sévères et ont une moins bonne récupération en comparaison aux souris sauvages (East et al., 2005; Lu et al., 2002). Une autre étude sur des souris déficientes en PAI-1, a montré un retard d'apparition des symptômes et des symptômes moins sévères en comparaison au phénotype sauvage (East et al., 2008).

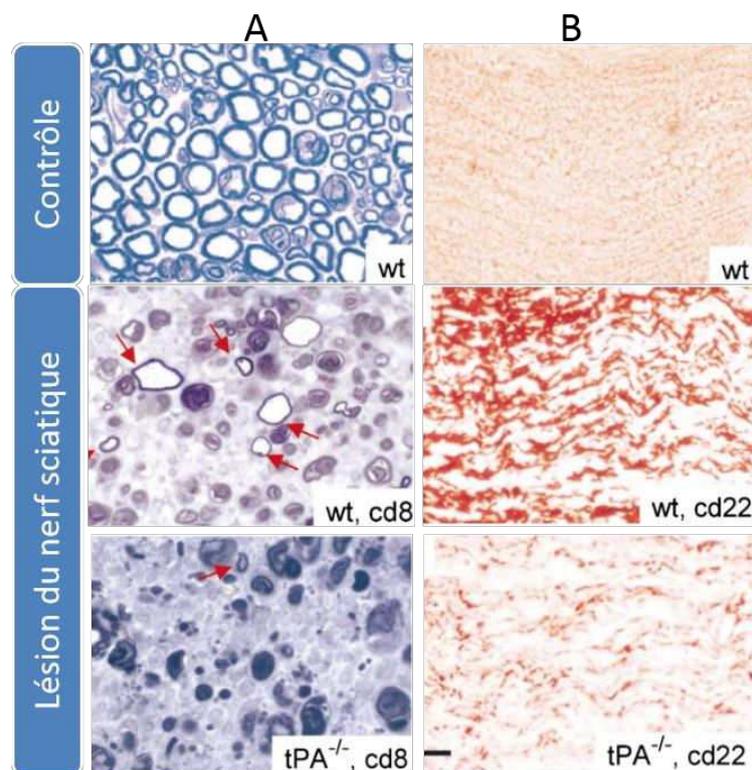


Figure 19: Le tPA est protecteur contre les dommages axonaux et augmente la remyélinisation. A) Coupe de moelle épinière de souris colorée au bleu de toluidine. 8 jours après une lésion du nerf sciatique (cd8), les souris déficientes en tPA (tPA $-/-$) présentent une dégénérescence axonale plus importante que les souris sauvages (wt). B) Coupe de moelle épinière de souris colorée au Oil Red O (marquage de la myéline), 22 jours après la lésion du nerf sciatique (cd22). Les souris déficientes en tPA présentent moins d'axones myélinisés que les souris sauvages (adapté de : Akassoglou et al., 2000).

Le tPA serait également impliqué dans la dégradation des chondroïtines sulfate protéoglycanes (CSPGs), des protéines de la MEC qui inhibent la repousse axonale (Bukhari et al., 2011). Une étude au laboratoire a permis de démontrer que le tPA est capable d'activer ADAMTS-4. Cette protéase est capable de dégrader les CSPGs et d'améliorer la repousse axonale et la récupération fonctionnelle après un traumatisme de la moelle épinière

(Lemarchant et al., 2014). En conditions physiologiques, l'expression d'ADAMTS-4 par les oligodendrocytes contribue également au processus de myélinisation (Pruvost et al., 2017). Enfin le tPA promeut la migration et la survie des oligodendrocytes en cas de lésion de la substance blanche *via* l'interaction entre son domaine EGF et les récepteurs à l'EGF (Correa et al., 2011; Leonetti et al., 2017).

Pour résumer cette première partie, le tPA est une sérine protéase aux multiples fonctions. Initialement, le tPA a été découvert dans le compartiment vasculaire où il joue un rôle important dans la fibrinolyse. Il est responsable du clivage du plasminogène en plasmine, elle-même capable de dégrader les caillots de fibrine.

Le tPA est également présent dans le parenchyme cérébral où il est impliqué dans diverses fonctions aussi bien bénéfiques (développement, apprentissage, mémoire) que délétères (altération de la BHE, mort neuronale excitotoxique).

Au niveau neuronal, le tPA est considéré comme un neuromodulateur. Il est exprimé et libéré par les neurones suite à une dépolarisation. Une fois dans la fente synaptique il interagit avec des récepteurs post-synaptiques (NMDA, EGF, LRP,...) où il peut aussi être recapturé par les astrocytes.

2. Facteur neurotrophique issu du cerveau

Le facteur neurotrophique issu du cerveau (en anglais : *Brain-derived Neurotrophic Factor* ou BDNF) appartient à la famille des neurotrophines qui sont des facteurs de croissance des cellules nerveuses. Cette famille de polypeptides regroupe le facteur de croissance des nerfs (en anglais : *nerve growth factor* ou NGF), le BDNF, la neurotrophine 3 (NT-3) et la neurotrophine 4 (NT-4). On retrouve ces facteurs neurotrophiques dans le cerveau mais également dans le système nerveux périphérique. Le BDNF est une protéine impliquée dans la survie, la croissance, la différenciation des neurones et des synapses. Le BDNF a donc un rôle important dans le développement du cerveau et dans la mémoire à long terme.

2.1. Historique

Le BDNF est le deuxième membre de la famille des neurotrophines à avoir été découvert, après le NGF. C'est en 1982, que le BDNF a été purifié et caractérisé pour la première fois à partir de cerveau de porc par Barde et collaborateurs (Barde et al., 1982). Les auteurs ont montré que le BDNF avait des propriétés neurotrophiques similaires à celles du NGF sur des cultures de neurones sensoriels et que la séquence d'acides aminés du BDNF était très similaire à celle du NGF (Leibrock et al., 1989). Les neurotrophines peuvent interagir avec des récepteurs p75^{NTR} (en anglais : *pan75 neurotrophin receptor*) et avec un des trois récepteurs tyrosine kinases A, B ou C (en anglais : *tropomyosin-related kinase* ou Trk). Le BDNF interagit pour sa part avec les récepteurs p75^{NTR} et TrkB (Chao, 2003).

L'avancée majeure qui a permis de mieux comprendre les rôles des neurotrophines est venue de la découverte que la synthèse des neurotrophines dans le cerveau augmente après une activité ou une stimulation sensorielle (Thoenen, 1991). Cette découverte a inspiré plus tard plusieurs autres études portant sur l'implication des neurotrophines, dont le BDNF, dans la plasticité synaptique. En effet, les recherches des vingt-cinq dernières années ont montré que les neurotrophines régulent le développement et la fonction des circuits neuronaux, dont par exemple la prolifération et la différenciation cellulaires, la croissance des axones et des dendrites, la synaptogenèse, les fonctions synaptiques et la plasticité (Lu et al., 2005; Reichardt, 2006; Minichiello, 2009).

2.2. Structure

Le BDNF est une glycoprotéine appartenant à la famille des neurotrophines, il est codé par le gène également appelé BDNF qui se trouve chez l'Homme sur le chromosome 11 (**Figure 20** ; Maisonpierre et al., 1991; Jones and Reichardt, 1990).

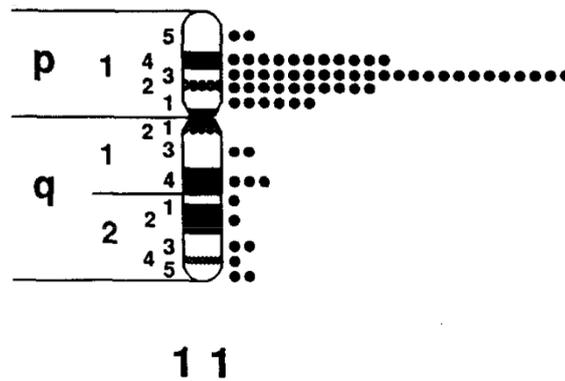


Figure 20: Distribution de l'avidine conjuguée à la fluorescéine en autographie correspondant à l'hybridation de sondes d'ADNc du BDNF sur le chromosome 11. La majorité des sondes est fixée entre les bandes 11p11 et 11p14, localisant ainsi le gène du BDNF (Maisonpierre et al., 1991).

Comme toutes les neurotrophines, le BDNF est synthétisé sous forme d'un précurseur : le pré-pro-BDNF de 249 acides aminés, il va ensuite être successivement clivé en pro-BDNF (35 kDa) puis en mature BDNF (14 kDa, mBDNF). Le BDNF possède donc deux sites de clivage ainsi qu'un site possible de N-glycosylation sur l'Asn¹²¹ (**Figure 21**).

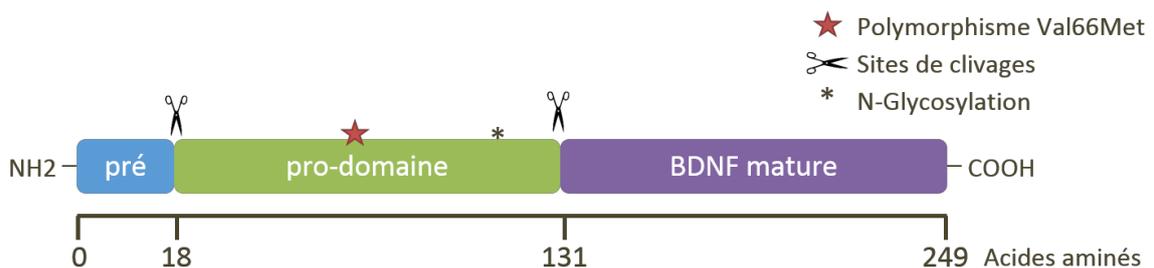


Figure 21: Structure protéique du BDNF. Schéma représentant le pré-pro-BDNF. Le BDNF est composé d'un peptide signal de 18 acides aminés, d'un pro-domaine de 113 acides aminés et d'un domaine mature contenant 118 acides aminés. Il possède un site possible de N-glycosylation sur l'Asn¹²¹ (astérisque noir), deux sites de clivages au niveau des acides aminés 18 et 131 (ciseaux noirs) et un site de mutation possible sur la valine 66 qui peut être remplacé par une méthionine (étoile rouge, polymorphisme Val66Met).

2.3. Expression du BDNF

Les premières études portant sur la localisation des ARNm du BDNF ont révélé qu'il était exprimé seulement par les neurones et principalement dans le SNC : cerveau, cervelet, tronc cérébral et moelle épinière. Au niveau du cerveau, les ARNm du BDNF sont majoritairement retrouvés dans l'hippocampe, l'amygdale, le cortex cérébral, l'hypothalamus et le cervelet (Conner et al., 1997; Kato-Semba et al., 1997; Pruunsild et al., 2007). Zhou et collaborateurs se sont intéressés à l'expression du pro-BDNF et ils ont trouvé une expression de ce précurseur dans le SNC incluant la moelle épinière, la substance noire, l'amygdale, l'hypothalamus, le cervelet et le cortex (Zhou et al., 2004). Des études *in vivo* ont également montré qu'après l'induction d'une ischémie cérébrale chez le rat, les cellules endothéliales, les épendymocytes, les astrocytes et la microglie sont capables de synthétiser du BDNF (Béjot et al., 2011; Madinier et al., 2009).

Malgré son appellation, le BDNF n'est pas seulement présent dans le SNC. En effet, des ARNm du BDNF sont également retrouvés au niveau périphérique : dans le cœur, les poumons, les muscles squelettiques, les testicules, la prostate, la rétine, les reins et les neurones moteurs (Aid et al., 2007; Timmusk et al., 1993).

2.4. Synthèse et sécrétion du BDNF

L'expression du gène du BDNF est hautement régulée et contrôlée par des mécanismes transcriptionnels et post-transcriptionnels. Ce qui confère au BDNF une différence d'expression cellulaire mais également intracellulaire.

2.4.1. Transcription du gène du BDNF

Dans le SNC, les taux d'ARNm du BDNF sont hautement régulés par l'activité neuronale (Zafra et al., 1990; Thoenen, 1991). La dépolarisation membranaire induit une entrée de calcium dans la cellule, des facteurs de transcriptions vont alors être activés et vont réguler le gène du BDNF (Tao et al., 1998, 2002).

Le gène du BDNF comprend neuf exons et la séquence codante se trouve sur l'exon IX. Les huit autres exons, en amont, codent pour des promoteurs qui vont réguler l'expression

spécifique régionale et cellulaire (**Figure 22**; Pruunsild et al., 2007). C'est l'exon IV qui a le plus été caractérisé car c'est cet exon qui contient l'élément promoteur régulant l'expression de BDNF en réponse à une activité neuronale. Le promoteur IV est régulé par différents stimuli dont le calcium et/ ou l'adénosine monophosphate cyclique (en anglais : *cyclic adenosine monophosphate* ou AMPc) (Metsis et al., 1993; Sakata et al., 2009). Ce promoteur contient plusieurs séquences sensibles au calcium et à l'AMPc auxquelles CaRF (en anglais : *calcium responsive transcription factor*) et CREB (en anglais : *cAMP responsive element binding protein*) peuvent respectivement se lier pour initier la transcription du BDNF (Pruunsild et al., 2011; Tao et al., 2002). Une mutation spécifique dans ce promoteur provoque une perturbation de l'expression de BDNF lors d'une stimulation neuronale, ce qui engendre chez ces souris transgéniques un développement anormal du circuit inhibiteur cortical (Hong et al., 2008). Le gène du BDNF encode également pour deux régions non transcrites (en anglais : *untranslated region* ou UTR) en 3' différentes (**Figure 22**), ce qui permet un adressage spécifique des ARNm dans les axones ou dans les dendrites (Kaneko et al., 2012). Le nombre et la structure des promoteurs du BDNF permettent d'expliquer comment le BDNF peut avoir de multiples rôles dans différentes régions cérébrales. L'activation alternative des promoteurs du BDNF dans divers types cellulaires et conditions physiologiques est induite par un épissage alternatif et une polyadénylation différentielle (Aid et al., 2007; Pruunsild et al., 2007) ce qui conduit à la production de plusieurs transcrits du BDNF (**Figure 22**). Ces différents transcrits ont chacun une stabilité et une localisation cellulaire propres.

Les régulations épigénétiques peuvent moduler l'expression de BDNF (Ma et al., 2009; Tsankova et al., 2006). En effet, la régulation épigénétique de la structure de la chromatine joue un rôle important dans la modification de l'efficacité de la transcription du BDNF suite à une activité neuronale. Par exemple, un traitement électroconvulsif ou un stress chronique d'inhibition social chez la souris peut altérer la méthylation des histones et de l'activité du promoteur IV (Ma et al., 2009; Tsankova et al., 2006).

Lors de la transcription du BDNF, plusieurs transcrits peuvent être produits : ils ont en commun la région codante mais possèdent par contre différents segments en 5' et en 3' UTR (**Figure 22**, Aid et al., 2007). Ces différents variants du BDNF commencent juste à être découverts. Une étude chez le rat, a montré que seuls les transcrits contenant un long 3' UTR, sont adressés dans les dendrites où se passe une synthèse locale de BDNF. De plus, une

délétion sélective du transcrit long 3' UTR provoque une augmentation du nombre d'épines dendritiques avec une taille de tête d'épine plus petite dans l'hippocampe et le cortex (J. J. An et al., 2008) accompagnée d'une réduction de l'innervation GABAergique (en anglais : *gamma-aminobutyric acid*) des neurones du cortex visuel (Kaneko et al., 2012). Ces découvertes suggèrent que le BDNF est synthétisé dans les dendrites et qu'il a une fonction importante à ce niveau. Il a également été montré que différents variants lors de l'épissage en 5' UTR étaient séparés dans différents compartiments cellulaires avant d'être traduits localement et sécrétés (Baj et al., 2011).

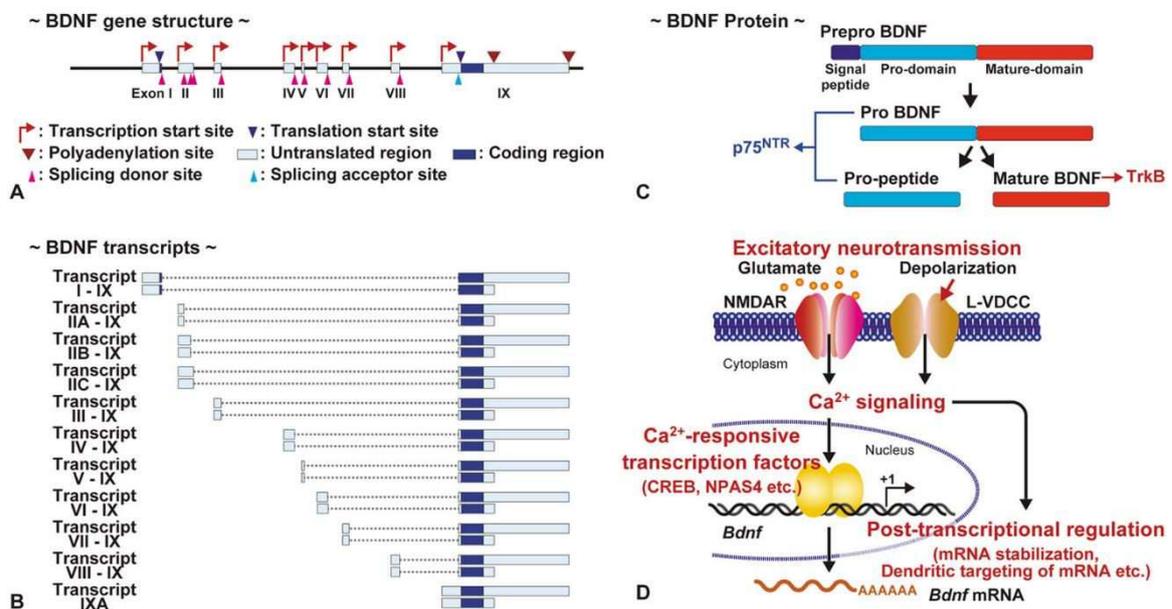


Figure 22: Structure du gène, des transcrits et de la protéine BDNF. A) Structure du gène BDNF de rat et de souris. Le gène du BDNF est régulé par neuf promoteurs (flèches rouges, « *transcription start site* »). B) Le gène du BDNF possède plusieurs sites d'épissage (tête de flèche rose et turquoise (A), « *splicing site* ») et deux sites de polyadénylation (tête de flèche rouge (A), « *polyadenylation site* ») ce qui va aboutir à la formation de différents transcrits du BDNF. C) Après retrait du peptide signal, le pro-BDNF peut être clivé par différentes enzymes pour donner le BDNF mature. Le mBDNF interagit avec les récepteurs TrkB pour exercer son action neurotrophique et le pro-BDNF et le pro-peptide peuvent interagir avec les récepteurs p75^{NTR} aboutissant à un effet délétère sur les neurones. D) La transcription et la post-transcription du BDNF sont régulées par des signaux calciques (Ca²⁺), produits lors d'une activation neuronale (Fukuchi and Tsuda, 2017).

2.4.2. Traduction des ARNm du BDNF

Comme toutes les protéines sécrétées, le BDNF est initialement synthétisé dans le réticulum endoplasmique rugueux sous forme d'un précurseur protéique : le pré-pro-BDNF. Ce dernier est ensuite adressé au réticulum endoplasmique lisse pour donner, après clivage du peptide signal, le pro-BDNF. Le pro-BDNF passe ensuite dans l'appareil de Golgi où il va finalement s'accumuler dans les vésicules du réseau *trans-golgi* (en anglais : *trans-golgi network* ou TGN). Le pro-BDNF est ensuite clivé pour donner le mBDNF (Seidah et al., 1996) mais la localisation de ce clivage et la nature des protéases impliquées restent encore controversées (Figure 23). Une étude d'immunohistochimie et de microscopie électronique avec des anticorps spécifiques du domaine pro et du domaine mature du BDNF montre que le pro-peptide colocalise avec le mBDNF dans des vésicules de sécrétion au niveau de l'axone, ce qui suggère que le clivage aurait lieu dans les vésicules de sécrétion (Dieni et al., 2012). D'autres études ont montré que le clivage du pro-BDNF en mBDNF s'effectue, en extracellulaire, par l'action des protéases extracellulaires comme la plasmine et les MMPs (Lee et al., 2001; Pang et al., 2004; Nagappan et al., 2009). Le pro-BDNF pourrait également être converti, en intracellulaire, par des furines (endoprotéases membranaires) dans le TGN ou par des proprotéines convertase (en anglais : *proprotein convertase 1/3* ou PC 1/3) dans les vésicules de sécrétions (Mowla et al., 2001; Seidah et al., 1996) (Figure 23).

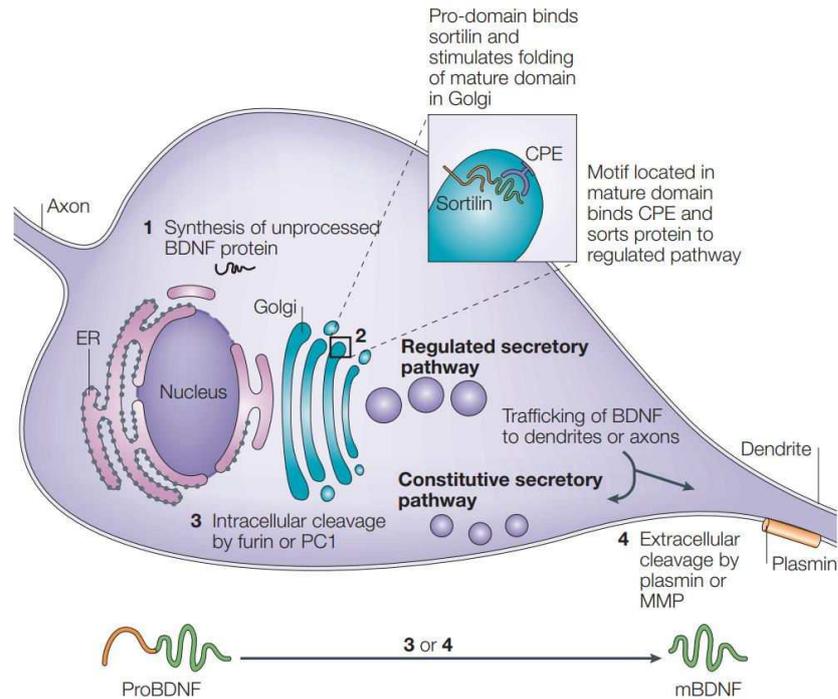


Figure 23: Synthèse et sécrétion du BDNF. 1) Le BDNF est synthétisé par le réticulum endoplasmique rugueux (ER) sous forme d'un précurseur : pro-BDNF. 2) Le pro-BDNF se lie à la sortiline intracellulaire présente dans le Golgi pour faciliter le bon repliement du mature domaine. Un motif présent dans le mature domaine du BDNF lui permet de se lier à la carboxypeptidase E (CPE), cette interaction permet de mettre le BDNF dans de larges vésicules à cœur dense qui constituent le composant principal de la voie de sécrétion régulée. En l'absence de ce motif, le BDNF va être adressé dans des vésicules de sécrétion constitutives. Le BDNF est ensuite transporté jusqu'à son site de relargage au niveau des dendrites ou de l'axone. Le pro-domaine est soit clivé dans le compartiment intracellulaire par les furines ou par les proconvertases 1 (PC1) (3), soit dans le compartiment extracellulaire par les MMP ou par la plasmine (4), pour former le BDNF mature (Lu et al., 2005).

L'identification du polymorphisme nucléotidique (en anglais : *single-nucleotide polymorphism* ou SNP) sur le gène humain du BDNF a permis de révéler l'importance du pro-domaine dans la transformation et la synthèse du BDNF. La mutation résulte d'un remplacement de la valine (Val) en position 66 par une méthionine (Met) dans le pro-domaine du BDNF (Val66Met, Figure 21). Des souris exprimant le Met-BDNF présentent une altération de l'adressage de ce BDNF dans les vésicules de sécrétion mais également à la synapse, de plus il y a moins de Met-BDNF sécrété après une dépolarisation neuronale (Egan et al., 2003). Etant donné que le trafic du Met-BDNF est anormal, il peut altérer la distribution intracellulaire et la sécrétion du Val-BDNF. Ces déficits contribuent à un faible taux de BDNF extracellulaire malgré un taux normal de BDNF total (Chen et al., 2004). Le pro-domaine a

donc un rôle important dans le trafic intracellulaire et dans l'activité de sécrétion du BDNF. Chez les personnes hétérozygotes pour le variant du BDNF (20-30% de la population caucasienne), il a été montré que ce polymorphisme est impliqué d'une part, dans des défauts de mémoire, et d'autre part augmente la susceptibilité de développer des maladies neuropsychiatriques (Chen et al., 2004; Hariri et al., 2003).

2.4.3. Sécrétion du BDNF

Comme vu précédemment, le BDNF est stocké dans les vésicules *trans*-golgiennes avant d'être libéré dans l'espace extracellulaire. La sécrétion des vésicules de BDNF peut se faire de deux manières : de façon constitutive, c'est-à-dire permanente mais non régulée (essentiellement au niveau du soma) ou de façon régulée (essentiellement au niveau des neurites) (Figure 23, Brigadski et al., 2005). La sécrétion régulée du BDNF peut être déclenchée soit par une dépolarisation de la membrane (Lessmann et al., 2003) provoquant une augmentation cytoplasmique de calcium et d'AMPc (Cheng et al., 2011) ou soit par des facteurs extracellulaires incluant les neurotrophines elles-mêmes (Krüttgen et al., 1998). Le pro-domaine du BDNF peut interagir avec la sortiline, un récepteur situé majoritairement dans l'espace intracellulaire (Nielsen et al., 2001), contrôlant ainsi le mode de sécrétion du BDNF (Chen et al., 2005). De plus, le domaine mature du BDNF peut se lier à la carboxypeptidase E pour permettre un adressage du BDNF dans des vésicules de sécrétion pour une exocytose régulée (Figure 23 ; Lou et al., 2005).

Durant la différenciation des axones et des dendrites, la sécrétion de BDNF est davantage localisée à l'extrémité des axones. Le BDNF sécrété permet une auto-amplification de la sécrétion de BDNF dont découle la stabilisation de l'initiation axonale et de la croissance *via* l'AMPc (Cheng et al., 2011). Après la synaptogenèse, la sécrétion de neurotrophines semble être localisée dans les régions pré et post-synaptiques des neurones, afin d'effectuer leurs actions synaptiques. Le BDNF peut être libéré du côté post-synaptique (Lang et al., 2007) mais également en présynaptique. Ces données suggèrent que la sécrétion spontanée de BDNF prend place à la synapse. La sécrétion de BDNF à partir de l'élément présynaptique est également possible *via* un transport antérograde et un transfert axodendritique de neurotrophines *in vivo* (von Bartheld et al., 1996; Altar et al., 1997; Baquet et al., 2004) et *in*

in vitro sur cultures corticales de neurones (Kohara et al., 2001). Cependant, au niveau des neurones, la source de BDNF à la synapse reste controversée. En effet certaines études trouvent que le BDNF est sécrété seulement par l'élément présynaptique (Dieni et al., 2012; Jia et al., 2010; Zakharenko et al., 2003), alors que d'autres études montrent une sécrétion au niveau des deux compartiments synaptiques (Hall et al., 2000; Matsuda et al., 2009; Patterson et al., 1992). De plus, la présence de TrkB à la fois en pré et en post-synaptique suggère que même si le BDNF n'est pas synthétisé en post-synaptique, le BDNF libéré en présynaptique peut-être recapturé par l'élément post-synaptique *via* l'endocytose de BDNF/TrkB et ainsi peut devenir une source additionnelle de BDNF synaptique pouvant être libérée en réponse à un stimulus (Santi et al., 2006).

Une étude sur culture de neurones hippocampiques a montré que la sécrétion de BDNF axonale nécessite une stimulation plus importante qu'au niveau des dendrites (Matsuda et al., 2009). En effet, une stimulation haute fréquence (environ 100 Hz) est nécessaire pour que le BDNF soit sécrété dans l'axone présynaptique (Zakharenko et al., 2003), alors qu'une stimulation basse fréquence (1-10 Hz) est suffisante pour provoquer une sécrétion dendritique de BDNF (Matsuda et al., 2009). Cette différence pourrait s'expliquer par la présence de récepteurs NDMA post-synaptiques qui, comme vu précédemment, sont une source d'entrée de calcium dans les neurones facilitant ainsi l'exocytose des neurotrophines.

La sécrétion neuronale du pro-BDNF reste encore controversée. Des études réalisées *in vitro*, en l'absence de cellules gliales et en présence d'inhibiteur de la plasmine, ont mis en évidence la présence du pro-BDNF dans le milieu extracellulaire (Teng et al., 2005; Yang et al., 2009). D'autres études n'ont toutefois pas réussi à détecter de sécrétion de pro-BDNF par les neurones (Matsumoto et al., 2008). Ceci pourrait s'expliquer par le fait qu'une fois dans l'espace extracellulaire, le pro-BDNF pourrait être rapidement transformé en mBDNF grâce aux MMP3 et MMP7 d'une part et par la plasmine d'autre part. (Lee et al., 2001; Pang et al., 2004).

2.5. Récepteurs du BDNF

Les neurotrophines peuvent se fixer sur deux catégories de récepteurs : les récepteurs neurotrophiques p75^{NTR} et les récepteurs de la famille des tyrosines kinases, incluant TrkA,

TrkB et TrkC. Toutes les neurotrophines ont la même affinité pour les récepteurs p75^{NTR}, en revanche, chaque récepteur Trk interagit avec différentes neurotrophines. Ainsi, le NGF interagit avec les récepteurs TrkA, le BDNF et la NT4 avec les récepteurs TrkB et enfin la NT3 active les récepteurs TrkC.

Il a été montré que le pro-BDNF a une forte affinité pour les récepteurs p75^{NTR} et une faible affinité pour les récepteurs TrkB. Au contraire, le mBDNF est bien plus affiné pour les récepteurs TrkB que pour les récepteurs p75^{NTR} (Figure 24, Teng et al., 2005). Et de manière intéressante, ces deux récepteurs ont des rôles opposés (nous allons développer ces différents rôles par la suite dans la partie « 2.6 Rôles du BDNF ») (Lee et al., 2001).

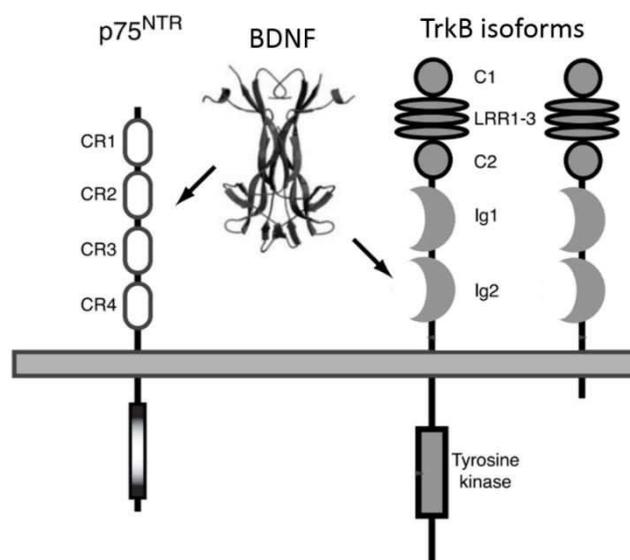


Figure 24: Les récepteurs du BDNF: p75^{NTR} et TrkB. Le récepteur p75^{NTR} est constitué de quatre régions riches en cystéines (en anglais : *cysteine-rich clusters 1-4* ou CR1-4) qui permet la fixation du pro-BDNF et il possède un domaine intracellulaire de mort. Le récepteur TrkB est constitué de deux domaines riches en cystéines (en anglais : *cysteine-rich clusters 1-2* ou C1-2), de répétitions riches en leucines (en anglais : *leucine-rich repeats 1-3* ou LRR1-3), de deux domaines semblables aux immunoglobulines (en anglais : *immunoglobulin-like domains 1-2* ou Ig1-2) et d'un domaine intracellulaire tyrosine kinase. Le récepteur TrkB peut exister sous deux isoformes : TrkB-FL (en anglais: *Full length*) composés du domaine tyrosine kinase intracellulaire et TrkB-T (en anglais : *TrkB-truncated*) sans ce domaine tyrosine kinase (Huang and Reichardt, 2003).

2.5.1. TrkB

Le récepteur TrkB est une protéine transmembranaire hautement glycosylée appartenant à la superfamille des récepteurs à activité tyrosine kinase. Le récepteur TrkB est composé de trois régions différentes (Reichardt, 2006). La région extracellulaire est composée

de deux domaines riches en cystéines entre lesquelles s'intercalent trois domaines riches en leucine suivis de deux domaines semblables aux immunoglobulines qui constituent la zone d'interaction avec le mBDNF. TrkB est également constitué d'une région transmembranaire et d'une partie intracellulaire où se trouve le domaine tyrosine kinase (**Figure 24**). L'activation de ce récepteur est stimulée par la dimérisation induite par le mBDNF et la transphosphorylation des tyrosines (**Huang and Reichardt, 2003**). La région intracellulaire de TrkB est entourée par plusieurs tyrosines qui forment le site de phosphorylation nécessaire à l'activation de la cascade de signalisations et contient des sites de fixation pour la protéine adaptatrice Shc (en anglais : *Src homologous and collagen-like adaptor protein* ou Shc) et pour la phospholipase C γ (en anglais : *phospholipase C gamma* ou PLC γ).

Le recrutement de ces protéines adaptatrices aboutit à l'activation de trois voies de signalisations majeures dont : celles de la PI3K, de ERK (en anglais : *extracellular signal-regulated kinase*) et de la PLC γ (**Figure 25 ; Huang and Reichardt, 2001; Kaplan and Miller, 2000**). Ces voies conduisent à la phosphorylation et à l'activation du facteur de transcription CREB qui peut induire la transcription de nombreux gènes influençant la survie neuronale, la plasticité et les performances cognitives (**Lonze and Ginty, 2002**). La voie des PI3k conduit à l'activation de la kinase Akt (ou protéine kinase B), qui inhibe l'activation des gènes pro-apoptotiques (**Brunet et al., 1999; Datta et al., 1997; del Peso et al., 1997**). La voie PLC γ est également mise en jeu dans des mécanismes de survie cellulaire mais aussi dans la plasticité synaptique et la neurotransmission. Enfin, la voie MEK (en anglais : *MAPK (mitogen-activated protein kinase)/ ERK kinase*) déclenche l'activation et la translocation du facteur de transcription CREB. Ce facteur est responsable de la transcription de gènes essentiels à la prolifération et à la survie cellulaires, la différenciation des neurones, la formation des neurites et stimule également l'activité et/ou l'expression des protéines anti-apoptotiques (**Reichardt, 2006; Riccio et al., 1999**).

Il existe trois isoformes pour le récepteur TrkB (**Figure 24; Huang and Reichardt, 2003**): une forme entière TrkB-FL (en anglais : *TrkB full length*) et deux formes tronquées à l'extrémité C-terminale TrkB-T1 et TrkB-T2 (en anglais : *TrkB-truncated*). Les formes tronquées sont capables de lier le mBDNF avec la même affinité que les récepteurs TrkB-FL, mais l'absence du domaine tyrosine kinase et du site de fixation de la PLC γ fait que leurs fonctions peuvent différer et sont encore méconnues. Certaines études suggèrent que le TrkB-T1 pourrait inhiber

l'induction de la cascade de signalisations déclenchée par l'activation de TrkB-FL en séquestrant le BDNF (Biffo et al., 1995; Fenner, 2012). Une autre étude propose que l'activation de ces récepteurs tronqués soit, tout de même, impliquée dans des mécanismes de survie et de prolifération neuronales *via* un mécanisme impliquant le calcium (Islam et al., 2009).

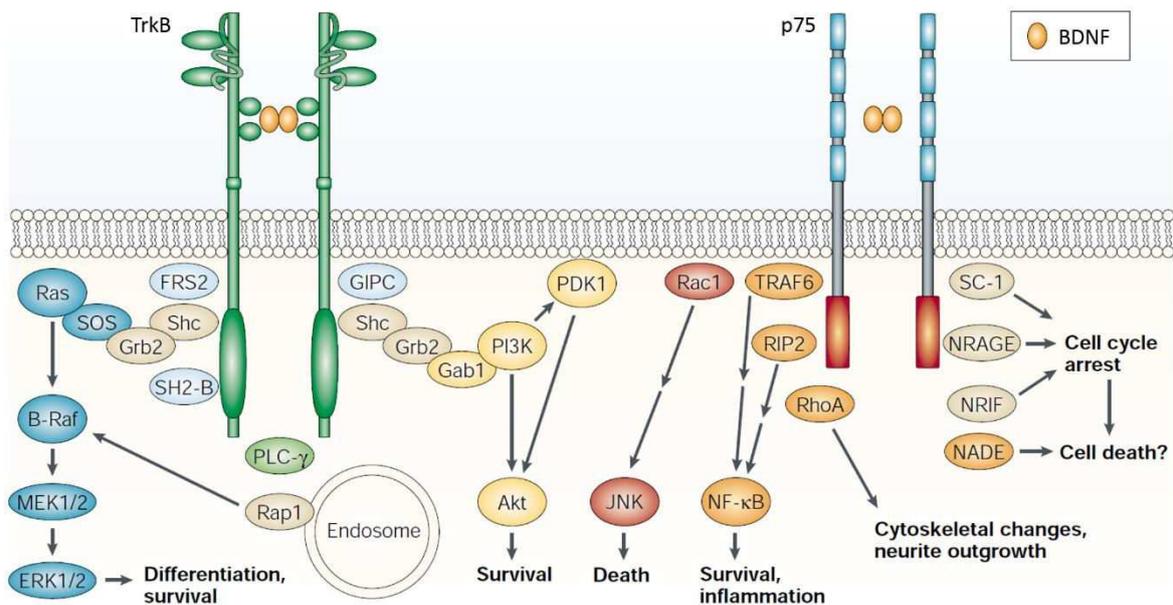


Figure 25: Signalisation intracellulaire induite par l'interaction entre le BDNF et ses récepteurs. L'activation du récepteur TrkB induit des signaux intracellulaires de survie *via* les voies de signalisations ERK1/2, PI3K/Akt et PLC- γ . TrkB recrute et augmente la phosphorylation de PLC- γ et de Shc qui active respectivement PI3K et ERK1/2. La fixation du pro-BDNF sur les récepteurs p75^{NTR} induit une activation de NF- κ B et JNK, module l'activité de RhoA et recrute des protéines adaptatrices, qui se fixent au domaine intracellulaire de p75^{NTR}, tels que : NRIF, NADE (*neurotrophin associated cell death executor*), NRAGE, SC1 et RIP2. Ces protéines peuvent exercer des effets sur l'apoptose, la survie, l'élongation des neurones et sur l'arrêt de leur croissance (Chao, 2003).

2.5.2. p75^{NTR}

Le récepteur p75^{NTR} est le premier récepteur aux neurotrophines à avoir été isolé ; c'est une glycoprotéine transmembranaire initialement identifiée comme un récepteur de faible affinité pour le NGF, puis pour le BDNF (Rodriguez-Tébar et al., 1990). Il appartient à la superfamille des récepteurs des facteurs de nécrose tumorale (en anglais : *Tumor necrosis factor* ou TNF). Il est composé de trois domaines : un domaine extracellulaire avec quatre motifs riches en cystéines, un simple domaine transmembranaire et un domaine de mort au

niveau cytoplasmique qui est similaire aux domaines présents sur les autres protéines de cette famille (**Figure 24**; He and Garcia, 2004; Liepinsh et al., 1997). Ce récepteur est connu pour lier les pro-neurotrophines et activer des voies de signalisations opposées à celles engagées lors de l'activation de TrkB. Plusieurs protéines adaptatrices sont capables de se lier au domaine cytoplasmique de p75^{NTR} dont NRIF (en anglais : *neurotrophin-receptor interacting factor*) (Casademunt et al., 1999; Linggi et al., 2005), NRAGE (en anglais : *neurotrophin-receptor-interacting melanoma-associated antigen homologue*) (Salehi et al., 2000), SC1 (en anglais : *Schwann cell 1*), TRAF6 (en anglais : *tumor necrosis factor- receptor associated factors 6*) (Khursigara et al., 1999; Ye et al., 1999) et RIP2 (en anglais : *receptor-interacting protein 2*) (**Figure 25** ; Hempstead, 2002; Roux and Barker, 2002).

L'activation du récepteur p75^{NTR} et le recrutement de ces différentes protéines adaptatrices provoquent une augmentation de JNK (en anglais : *Jun N-terminal kinase*) et de NF-κB (en anglais : *nuclear factor-kappa B*) (Roux and Barker, 2002). Ces réponses intracellulaires vont engendrer un effet sur l'apoptose, la survie et la mort cellulaire mais également sur l'arrêt de la croissance (Hempstead, 2002). p75^{NTR} module aussi l'activité de RhoA (en anglais : *Ras homolog gene family, member A*) qui est impliqué dans les changements du cytosquelette et dans la croissance des neurites (**Figure 25** ; Chao, 2003).

p75^{NTR} peut avoir un effet par lui-même mais peut également interagir avec différents partenaires protéiques pour former des complexes multimériques avec d'autres récepteurs (**Figure 26**). Ces complexes induisent différentes réponses intracellulaires comme l'apoptose, l'inhibition de la pousse neuritique et la myélinisation (Barker, 2004; Gentry et al., 2004; Bandtlow and Dechant, 2004). Un des partenaires du récepteur p75^{NTR} est la sortiline (Nykjaer et al., 2004). Elle peut se lier spécifiquement au pro-domaine du BDNF et servir de corécepteur au récepteur p75^{NTR} afin de provoquer la mort neuronale (Teng et al., 2005). Une étude a montré que lorsque l'interaction entre le pro-BDNF et la sortiline/p75^{NTR} était bloquée, l'action apoptotique du pro-BDNF sur des cultures de neurones sympathiques était abolie (Teng et al., 2005). Les récepteurs TrkB ont également été identifiés comme étant des corécepteurs de p75^{NTR} (Hempstead et al., 1991). L'activation du complexe p75^{NTR}/TrkB par les neurotrophines provoque une augmentation de la signalisation induite par Trk et promeut la survie cellulaire (**Figure 26**).

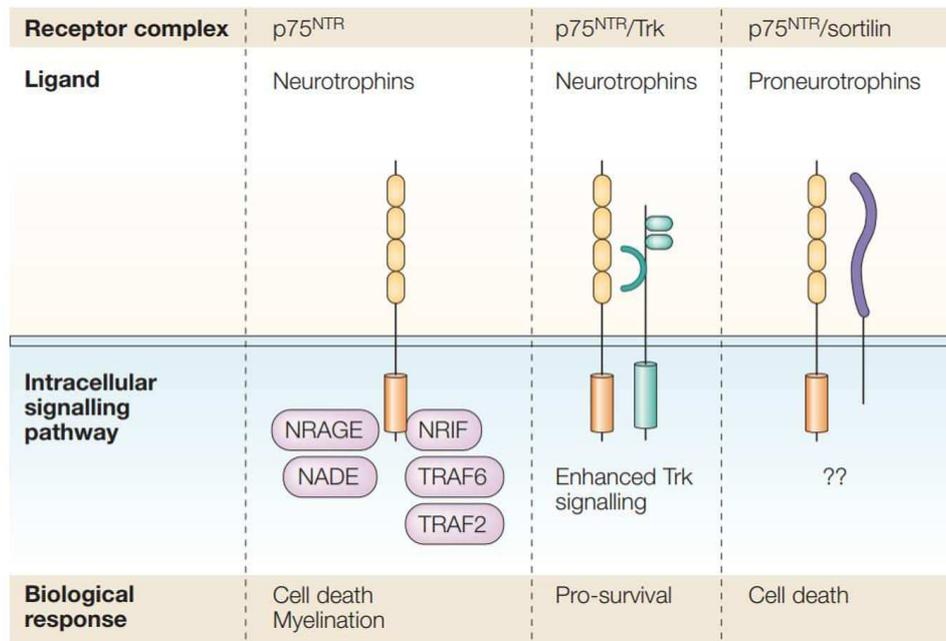


Figure 26: Les différents partenaires du récepteur p75^{NTR}. L'interaction entre les neurotrophines et le récepteur p75^{NTR} peut engendrer une mort cellulaire ou une myélinisation, ces mécanismes impliquent les voies NRAGE, NADE, NRIF, TRAF6 ou TRAF2. Le récepteur p75^{NTR} peut également former des complexes avec d'autres récepteurs comme Trk ou la sortiline, l'activation de ces complexes par les neurotrophines engendre alors respectivement la survie et la mort cellulaire (Lu et al., 2005).

2.6. Rôles du BDNF

Les récepteurs TrkB et p75^{NTR} sont tous les deux exprimés dans le SNC et sont parfois présents sur la même cellule. Le BDNF est impliqué dans de nombreux rôles au niveau du SNC dont la survie ou la mort neuronale, la différenciation cellulaire et axonale, ainsi que la plasticité synaptique. Il est donc important de comprendre les circonstances donnant au BDNF ses effets différentiels. Il est devenu logique de penser que le devenir de la cellule dépend du contexte cellulaire des récepteurs présents à sa surface ainsi que de la sécrétion de pro ou de mBDNF.

2.6.1. Rôles du BDNF mature

Le développement du circuit neuronal implique différentes étapes incluant : la survie et la différenciation des cellules souches neurales, la différenciation des axones et des dendrites, la croissance et la guidance axonale, la formation et la maturation des synapses et enfin le perfectionnement du circuit en développement. Le BDNF a un rôle essentiel dans

toutes ces étapes de développement des circuits neuronaux. Le rôle de survie du BDNF mature est très bien établi (Huang and Reichardt, 2001), celui-ci est possible *via* une interaction avec le récepteur TrkB (Huang and Reichardt, 2003).

2.6.1.1. *mBDNF et survie cellulaire*

Survie et différenciation des cellules souches neurales :

Avant la différenciation neuronale, le BDNF joue déjà un rôle dans la régulation de la survie et dans la différenciation des cellules souches neurales. En effet, les cellules souches neurales sont capables d'exprimer les récepteurs TrkB et p75^{NTR} à leur surface (Ahmed et al., 1995; Lachyankar et al., 1997). Des études *in vitro* sur des cultures de cellules souches neurales corticales et hippocampiques d'embryons de souris montrent que l'ajout de BDNF favorise la survie et la différenciation des cellules souches en neurones (Ahmed et al., 1995; Shetty and Turner, 1998). Jones et collaborateurs ont également montré que le BDNF était nécessaire à la différenciation neuronale : la délétion du BDNF chez des souris provoque une inhibition de la différenciation des interneurons (Jones et al., 1994). Ces résultats suggèrent donc que le BDNF est essentiel lors des premiers stades du développement et principalement lors de la différenciation neuronale. Cependant, après la différenciation neuronale, le BDNF ne semble pas indispensable à la survie des neurones mais nécessaire à la croissance de leurs neurites (Ahmed et al., 1995). Une autre étude a montré que des cellules souches embryonnaires exprimant seulement les récepteurs TrkA ou TrkC meurent en l'absence de leur neurotrophine respective alors qu'au contraire, lorsque ces cellules expriment seulement TrkB, leur survie n'est pas affectée en l'absence de BDNF (Nikoletopoulou et al., 2010).

D'autres études se sont intéressées à l'effet du BDNF sur la survie ainsi que sur la différenciation des cellules souches neurales chez l'adulte au niveau du gyrus denté de l'hippocampe et dans la zone sous ventriculaire. Chez le rat, une infusion directe de BDNF ou une surexpression de BDNF par des adénovirus dans le gyrus denté ou dans la zone sous ventriculaire provoquent une augmentation du nombre de nouveaux neurones dans ces zones (Figure 27; Scharfman et al., 2005; Benraiss et al., 2001). Au contraire, des souris adultes déficientes en BDNF ou en TrkB présentent une diminution de la survie et de la genèse de nouvelles cellules hippocampiques (Bergami et al., 2008; Sairanen et al., 2005). Cet effet bénéfique du BDNF sur les cellules souches neurales adultes semble être médié par TrkB car

la réduction de l'expression de TrkB dans ces cellules montre une altération de leur prolifération et de la neurogenèse chez les souris adultes (Bath et al., 2008; Li et al., 2008).

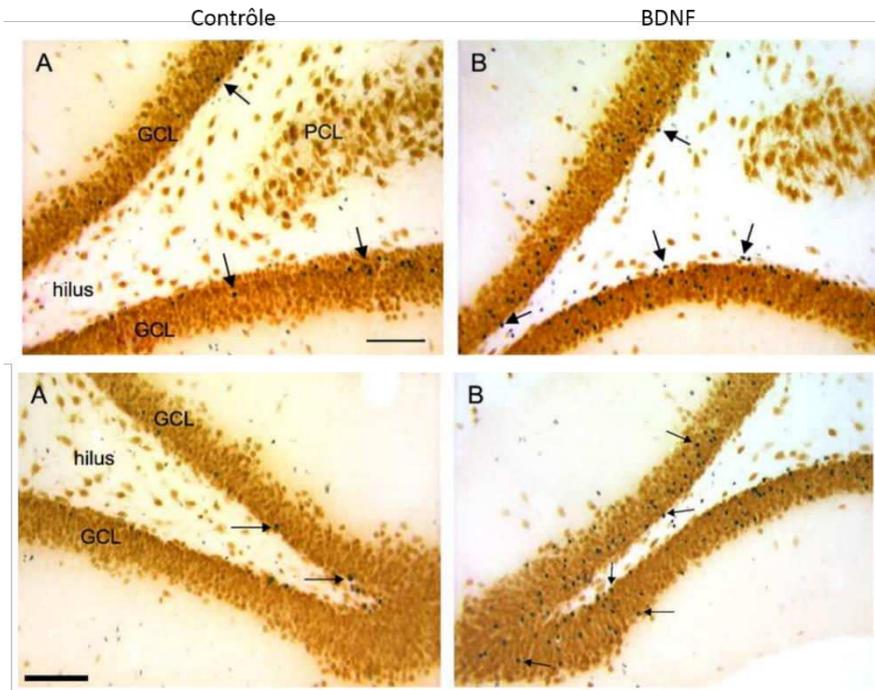


Figure 27: Le BDNF induit de la neurogenèse hippocampique chez des rats adultes. Coupes de cerveaux de rats après l'injection ou non de BDNF dans l'hippocampe. Les cellules doublement marquées (flèches) : avec du bromodésoxyuridine (pour voir la prolifération cellulaire, ici en noire) et avec du NeuN (marquage des neurones, ici en marron) représentent des neurones nouvellement générés. Après injection de BDNF (B), il y a une augmentation de la synthèse de nouveaux neurones dans les couches granulaires de l'hippocampe en comparaison à l'injection d'une solution contrôle (A). GCL = granule cell layer, PCL = pyramidal cell layer (Scharfman et al., 2005).

Survie des neurones différenciés :

Il a été montré que le BDNF augmentait la survie de certaines sous populations de neurones du SNC et sensoriels (Barde, 1989). Cet effet est médié par l'interaction du mBDNF avec les récepteurs TrkB et, par conséquent, par l'activation de voies qui augmentent l'expression des gènes de survie cellulaire (Chao, 2003; Reichardt, 2006). La notion selon laquelle chaque neurotrophine dont le BDNF, favorise la survie de populations spécifiques de neurones du SNC est largement fondée sur les résultats d'études sur des cultures cellulaires (Meyer-Franke et al., 1995), sur des expériences impliquant une axotomie de cellules ganglionnaires rétiniennes (en anglais : *retinal ganglion cells* ou RGC) (Shen et al., 1999) et sur des cultures de neurones moteurs (Hanson et al., 1998). Au contraire, une étude impliquant

des souris déficientes conditionnelles pour le BDNF montre que l'absence de BDNF n'induit pas de diminution significative du nombre de neurones mais conduit à une réduction dans la complexité des dendrites et dans la densité des épines (Rauskolb et al., 2010). Cette étude et celle de Nikolettou et collaborateurs, sur les cellules souches neuronales, suggèrent que le BDNF n'est pas un facteur de survie mais un facteur de différenciation pour la plupart des neurones du SNC (Nikolettou et al., 2010).

2.6.1.2. *mBDNF, différenciation et croissance des neurites*

Une étude sur des cultures de neurones hippocampiques montre que l'ajout de BDNF extracellulaire sur des neurites non différenciés augmente leur différenciation en axones (Shelly et al., 2007). Cet effet est médié par le récepteur TrkB qui accroît l'activité de l'AMPC et PKA, qui vont elles-mêmes activer d'autres enzymes (Barnes et al., 2007; Kishi et al., 2005), conduisant aux modifications du cytosquelette associées à la formation de l'axone. De manière intéressante, le BDNF endogène sécrété par le neurone lui-même contribue à l'initiation axonale. Une étude portant sur la transfection des neurones hippocampiques avec des shRNA (en anglais : *short hairpin RNA*), montre que la diminution de la synthèse de BDNF provoque une altération de l'initiation axonale contrairement aux neurones voisins non transfectés (Cheng et al., 2011). De plus, l'augmentation intracellulaire d'AMPC et de calcium induit un accroissement de la sécrétion de BDNF et de l'activation de TrkB (Krüttgen et al., 1998). Une boucle d'auto-amplification locale est alors établie (la sécrétion de neurotrophines induit une sécrétion de neurotrophines) résultant d'une activité locale et persistante d'AMPC et de PKA suffisante pour induire l'initiation axonale (Cheng et al., 2011).

Dans des cultures de neurones, un gradient extracellulaire de neurotrophines peut provoquer un changement chimiotropique des cônes de croissance axonaux (Figure 28; Song et al., 1997). Cette fonction de guidage axonal est également retrouvée *in vivo*: une étude a montré que les axones des neurones sensoriels pouvaient se diriger vers des billes contenant du BDNF (Tucker et al., 2001). La sécrétion locale de BDNF par le corps cellulaire ou par des dendrites augmente la croissance et le branchage des dendrites voisines (à environ 4,5µm du site de sécrétion du BDNF) (Horch and Katz, 2002). *In vivo*, l'infusion de BDNF chez le *Xenopus laevis* au niveau du tectum optique augmente également le branchement et la complexité dans les axones des RGC. De plus, l'injection d'anticorps contre le BDNF à l'effet opposé, ce

qui montre le rôle du BDNF endogène dans la régulation de la croissance axonale (Cohen-Cory and Fraser, 1995). Au contraire, d'autres études tendent à prouver que des souris dépourvues ou avec une réduction de l'expression de BDNF ou de TrkB, ne présentent pas d'altération de la morphologie ni des projections axonales (Lyckman et al., 2005; Martínez et al., 1998). Ceci peut s'expliquer par des effets compensatoires des autres neurotrophines ou la présence de facteurs d'orientation.

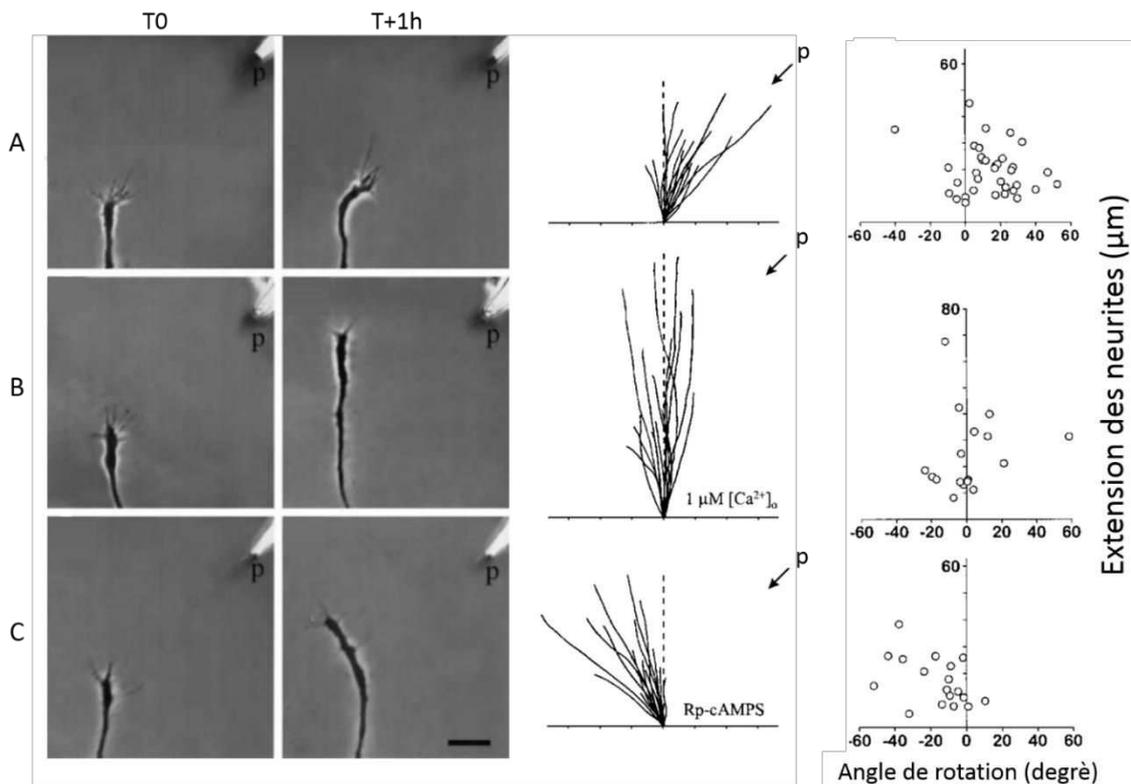


Figure 28: Le BDNF induit un effet attractif sur les cônes de croissance. Culture de neurones de *X. laevis* auquel est ajouté un gradient de différentes molécules à l'aide d'une pipette (p) près des cônes de croissance. La mesure de l'extension et de l'orientation des neurites s'effectue une heure après l'ajout du gradient (T+1h). A) En présence d'un gradient de BDNF, les cônes de croissance sont attirés vers la pipette. B) En présence de BDNF mais d'une faible concentration en calcium, la croissance des neurites n'est plus orienté vers la pipette. C) En présence de Rp-cAMPS (analogue compétiteur de l'AMPC), la croissance des cônes se poursuit à l'opposé de la pipette. Les graphiques au centre représentent les tracés des résultats de 15 neurones pour chaque expérience. L'origine du graphique correspond au lieu de départ du cône de croissance (à T0), la flèche indique la direction du gradient (p= pipette). Les graphiques de droite représentent l'extension des différentes neurites (en μm) en fonction de l'angle de rotation du cône de croissance 1h après les différents traitements (Song et al., 1997).

Au-delà de leur action sur la croissance des axones et des dendrites, l'endocytose des complexes BDNF/TrkB et leur transport dans les neurones affectent la croissance des neurites éloignés du lieu d'endocytose. Par exemple, l'infusion de BDNF chez le *X. laevis* au niveau du tectum optique augmente localement la croissance axonale des RGC mais également l'arborisation dendritique des RGC dans la rétine. De manière intéressante, l'ajout de BDNF directement dans les dendrites des RGC dans la rétine, inhibe leur croissance (Lom et al., 2002). Il y a donc une différence entre l'effet local ou à distance du BDNF, ce qui suggère que la signalisation des complexes BDNF/TrkB à la membrane plasmique diffère de celle des complexes BDNF/TrkB des endosomes. D'autres études plaident en faveur d'un effet du BDNF à distance par rapport à son lieu d'endocytose (Caleo et al., 2003; Mandolesi et al., 2005).

2.6.1.3. *mBDNF et synapses*

Augmentation de la synaptogenèse :

Chez les têtards *X. laevis*, l'infusion de BDNF exogène dans le tectum optique augmente la densité de l'immunomarquage de protéines synaptiques ce qui suggère que le BDNF augmente la synaptogenèse (Alsina et al., 2001). Ce rôle du BDNF peut être attribué en partie au fait que le BDNF induit une augmentation de l'arborisation axonale et dendritique (Figure 29 ; Cohen-Cory and Fraser, 1995; McAllister et al., 1996, 1995), ce qui augmenterait la probabilité d'une rencontre physique entre les axones et les dendrites. Plusieurs études ont montré que le BDNF est impliqué à la fois dans la maturation fonctionnelle et morphologique des synapses neuromusculaires. Le rôle du BDNF sur la modulation synaptique a été dans un premier temps découvert sur des cultures de neurones spinaux de *X. laevis* et de myocytes (Lohof et al., 1993), chez lesquels l'ajout de BDNF recombinant augmente l'activité synaptique en quelques minutes. De plus, l'exposition prolongée de BDNF exogène sur des synapses neuromusculaires immatures pendant quelques jours conduit à une accélération de la maturation de ces synapses avec une augmentation des courants synaptiques spontanés et un accroissement du nombre de protéines de vésicules synaptiques dont la synaptophysine et la synapsine 1 (Wang et al., 1995).

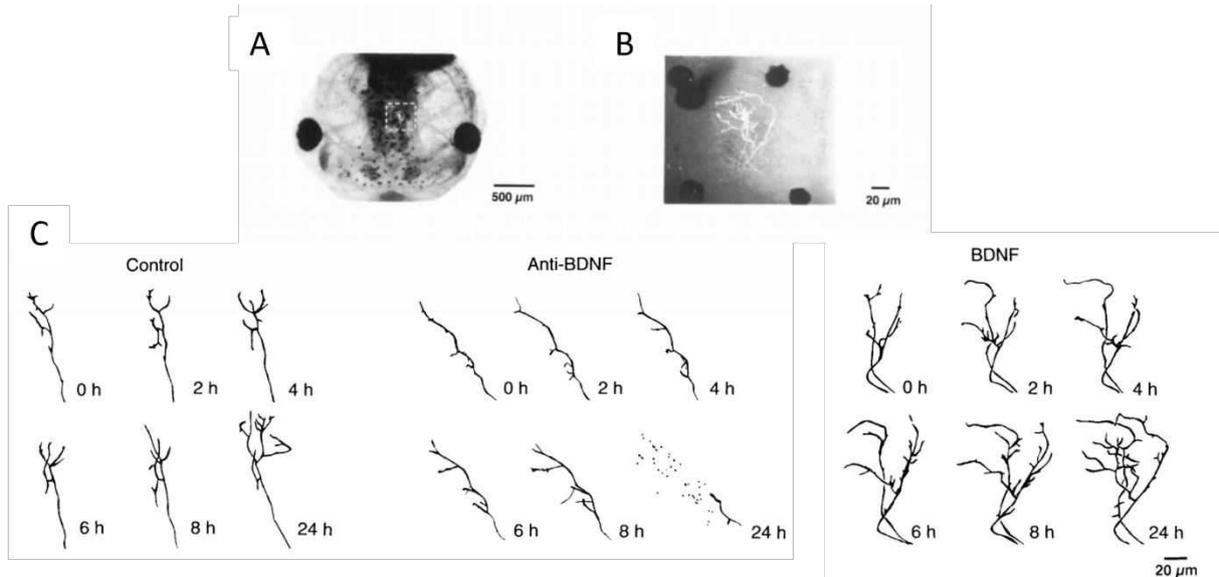


Figure 29: Le BDNF induit une augmentation de l'arborisation des cellules ganglionnaires rétiniennes (RGC). A) Tête de têtard *X. laevis*. B) Zoom de l'image (A) montrant le tectum optique avec l'arborisation neuronale d'une RGC fluorescente. C) Schémas représentatifs de l'arborisation d'une RGC au cours du temps après injection tectale d'un anticorps contrôle, anti-BDNF ou de BDNF. Après 24h, l'extension des branchements des RGC chez les têtards traités avec du BDNF est plus importante en comparaison au contrôle et à l'injection d'anticorps anti-BDNF (Cohen-Cory and Fraser, 1995).

Sur des cultures de neurones hippocampiques, le BDNF exogène augmente la formation de synapses excitatrices et inhibitrices (Vicario-Abejón et al., 1998). Ces effets sur la synaptogenèse et la maturation sont en accord avec l'action des neurotrophines dans l'augmentation de l'expression de nombreuses protéines synaptiques dont les enzymes pour la synthèse des neurotransmetteurs, des protéines des vésicules synaptiques et des sous-unités des récepteurs des neurotransmetteurs post-synaptiques (Vicario-Abejón et al., 2002). Fait intéressant, un court train de potentiels d'action présynaptiques convertit rapidement des contacts non fonctionnels entre les neurones hippocampiques en culture en synapses fonctionnelles ; cet effet peut-être imité en appliquant du BDNF exogène (Shen et al., 2006). Le BDNF régule également la maturation des synapses GABAergiques, dans le cortex visuel en développement : en effet la surexpression de BDNF chez des souris provoque une maturation accélérée de l'innervation et de l'inhibition GABAergique (Huang et al., 1999).

Modulation de l'efficacité synaptique :

L'ajout de BDNF recombinant sur des tranches de cerveau et sur des cultures de neurones, augmente l'efficacité des synapses excitatrices (Bolton et al., 2000; Carmignoto et al., 1997; Kang and Schuman, 1995) et diminue l'efficacité des synapses inhibitrices (Bolton et al., 2000; Tanaka et al., 1997). Ces effets modulateurs sont médiés par le changement soit de l'efficacité de la libération présynaptique de neurotransmetteur suite à une activité neuronale (Boulanger and Poo, 1999; Lessmann et al., 1994), soit par l'amplitude de la réponse post-synaptique induite par les neurotransmetteurs (Levine et al., 1995). Par exemple, le BDNF est responsable d'une augmentation de la libération de glutamate *via* TrkB, grâce à une augmentation de la phosphorylation de la synapsine I dépendante de MAPK (Jovanovic et al., 2000) et de l'expression de Rab3A (en anglais : *ras-associated binding protein* ou Rab) (Alder et al., 2005; Thakker-Varia et al., 2001). L'amélioration des réponses excitatrices post-synaptiques peut être provoquée par une plus forte conductance des récepteurs NMDA *via* la phosphorylation des sous-unités de ce récepteur par TrkB (Lin et al., 1998; Suen et al., 1997). TrkB peut également phosphoryler la sous-unité GluR1 des récepteurs AMPA *via* la CaMKII (en anglais : *calmodulin kinase II*) ou *via* la PKC, ce qui peut améliorer la réponse post-synaptique en permettant l'insertion de cette sous-unité à la membrane (Caldeira et al., 2007a). De manière intéressante, une étude a démontré que des augmentations aiguës ou progressives de BDNF pourraient avoir des effets opposés sur l'efficacité des synapses excitatrices en raison d'une cinétique différentielle de l'activation de TrkB et de la signalisation en aval (Ji et al., 2010). Ceci suggère que l'aspect temporel de la signalisation médié par TrkB est essentiel pour la régulation de l'efficacité synaptique. Contrairement à son effet facilitateur sur les synapses excitatrices, la signalisation BDNF/TrkB supprime l'amplitude des courants post-synaptiques inhibiteurs. Soit par une régulation négative du transport des ions Cl⁻ dans les cellules post-synaptiques (Wardle and Poo, 2003) ou bien par une régulation négative de l'expression à la surface des sous-unités GABA_A (Jovanovic et al., 2004; Lu et al., 2010). De plus, le BDNF peut agir indirectement sur l'activité synaptique par des facteurs *trans*-synaptiques. Une autre étude a montré que la signalisation post-synaptique BDNF/TrkB pouvait induire un relargage d'endocannabinoïdes qui agiraient comme facteurs rétrogrades, afin de réduire la fréquence de relargage spontanée de GABA présynaptique (Lemtiri-Chlieh and Levine, 2010).

Modulation structure synaptique :

Le BDNF joue également un rôle dans la modification de la structure des synapses. L'induction de LTP sur des synapses matures excitatrices est accompagnée par des changements post-synaptiques persistants comme une augmentation du nombre et du volume d'épines dendritiques (**Figure 30**, Kasai et al., 2010). Le BDNF est capable d'induire des changements structurels *via* l'activation des récepteurs TrkB qui vont activer la voie ERK (Alonso et al., 2004), TRPC (en anglais : *transient receptor-potential cation channel subfamily C*) (Amaral and Pozzo-Miller, 2007) et la voie PI3K/Akt (Kumar et al., 2005). Les modifications structurelles des épines dendritiques dépendent du changement persistant du cytosquelette. Dans l'hippocampe adulte, l'activation de la signalisation de BDNF/TrkB stimule les petites GTPases dépendantes de la polymérisation de l'actine *via* la voie PAK-cofilin (en anglais : *p21-activated kinase-cofilin*, deux régulateurs de l'actine impliqués dans la morphologie des épines). Ce qui provoque une augmentation de la polymérisation de l'actine dans les épines dendritiques (Rex et al., 2007). Cette polymérisation de l'actine est nécessaire au développement de la LTP tardive (Fukazawa et al., 2003). La stabilisation des microtubules est également indispensable pour la LTP induite par des stimulations hautes fréquences (Jaworski et al., 2009), elle favorise les changements morphologiques des épines (Gu et al., 2008) et l'accumulation de PSD95 (en anglais : *postsynaptic density protein 95*) dans le compartiment post-synaptique (Hu et al., 2011).

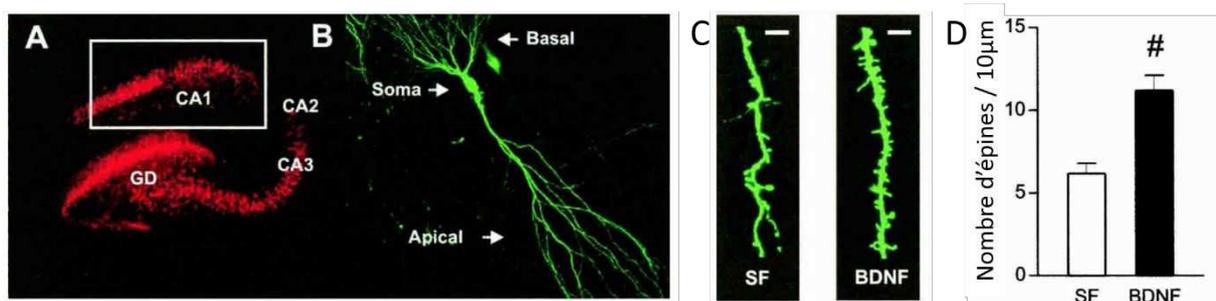


Figure 30: Le BDNF augmente la densité synaptique des neurones pyramidaux hippocampiques chez le rat. Tranches de cerveau de rat transfectées avec un plasmide codant pour la protéine fluorescente en jaune : YFP. A) Marquage immunohistochimique contre NeuN (en rouge) pour identifier les différents sous-champs hippocampiques (CA1-3 et GD), le carré blanc indique la zone sélectionnée à partir de laquelle les neurones pyramidaux ont été choisis pour l'imagerie confocale. B) Neurone pyramidal CA1 représentatif surexprimant YFP (en vert). C) L'ajout de BDNF sur des tranches d'hippocampe augmente le nombre d'épines dendritiques par comparaison avec des neurones non-traités (en anglais : *serum-free* ou SF). D) Quantification du nombre d'épines par 10µm de dendrites apicales (adapté de : Alonso et al., 2004).

Au niveau des synapses hippocampiques, l'élargissement persistant des épines dû à l'activité synaptique dépend de la sécrétion de BDNF endogène et de la synthèse de protéines (Tanaka et al., 2008). Ainsi, le BDNF sécrété peut agir en tant que signal autocrine ou paracrine pour induire la synthèse de protéines permettant un changement morphologique des épines. De plus, la synthèse locale de BDNF dans les dendrites participerait à la plasticité structurale. *In vitro*, dans des cultures de neurones hippocampiques, la phosphorylation de la kinase eEF2 (en anglais : *eukaryotic elongation factor 2*) dépendrait de la traduction locale de BDNF dans les dendrites et pourrait augmenter à la fois la maturation et la densité des épines (Verpelli et al., 2010). Toutefois, aucune preuve directe n'existe montrant que l'induction de la LTP est capable de déclencher la synthèse locale de BDNF *in vivo*.

2.6.1.4. mBDNF et LTP

Il existe deux modèles pour expliquer l'action du BDNF dans la LTP sur les synapses excitatrices (Figure 31). Le BDNF peut être considéré comme un modulateur ou comme un médiateur de la LTP. Plusieurs molécules sont impliquées dans la LTP (Sanes and Lichtman, 1999) or quelques-unes seulement sont de vrais médiateurs. Les fonctions des médiateurs sont directement influencées par l'activité électrique induisant la LTP contrairement aux modulateurs.

Certaines études présentent le BDNF comme un modulateur de la LTP. L'ajout de BDNF au niveau de l'hippocampe sur des tranches de cerveau de rat facilite l'induction de la LTP au niveau des synapses CA3-CA1 en augmentant l'efficacité de la sécrétion de neurotransmetteurs au niveau présynaptique (Figurov et al., 1996). D'autres études ont montré que la facilitation de la LTP induite par le BDNF dans le gyrus denté est médiée par un mécanisme post-synaptique impliquant une augmentation de l'influx de calcium par une activation des récepteurs NMDA et des canaux calciques voltage-dépendants (Kovalchuk et al., 2002). Le BDNF exogène peut également accroître la LTP induite par la toxine tétanique mais aussi bloquer la dépression à long terme (en anglais : *long term depression* ou LTD) induite par des stimulations à basses fréquences, sur des tranches de cortex visuel sans affecter la transmission synaptique basale (Huber et al., 1998; Kinoshita et al., 1999).

D'autres travaux montrent que le BDNF est fortement impliqué dans la plasticité synaptique pas seulement en tant que modulateur mais en tant que médiateur de la LTP. Une étude a montré que le BDNF endogène est nécessaire pour l'induction de la LTP dans les cellules pyramidales de l'hippocampe CA1. La délétion du BDNF, de TrkB (Korte et al., 1995; Minichiello et al., 1999) ou le blocage des fonctions de ceux-ci altèrent la LTP, cependant celle-ci peut être restaurée par l'application de BDNF exogène (Patterson et al., 1996) ou par la surexpression de BDNF par des virus (Korte et al., 1996). L'induction de la LTP par le BDNF implique les récepteurs TrkB et ce mécanisme est dépendant de la PLC γ mais également de la phosphorylation de CREB et de la CaMKIV (Minichiello et al., 2002). De plus, l'interaction BDNF/TrkB est nécessaire pour induire la LTP tardive (Y. Lu et al., 2011). Les stimulations responsables de la LTP provoquent une sécrétion de BDNF qui persiste 5-12 minutes après la fin de la stimulation (Aicardi et al., 2004). Cette sécrétion doit persister au niveau extracellulaire au moins une heure après l'induction de la LTP pour développer une LTP stable (Kang et al., 1997). Comme vu précédemment, la sécrétion de BDNF est nécessaire pour les changements structuraux dans les épines dendritiques après une induction de LTP (Tanaka et al., 2008). La sécrétion de BDNF permet soit une stabilisation de la LTP précoce pour donner une LTP tardive, soit directement engendrer l'induction de la LTP tardive. Les mécanismes impliquant la LTP tardive sont distincts de ceux impliquant la LTP précoce. Pang et collaborateurs ont montré que le mBDNF est suffisant pour l'induction de la LTP tardive. L'ajout de mBDNF sur des tranches d'hippocampe après l'ajout de la toxine tétanique (qui induit seulement de la LTP précoce) résulte en une LTP tardive robuste (Pang et al., 2004). De plus, le mBDNF maintient la LTP tardive sur des tranches d'hippocampe où la synthèse protéique a été inhibée pendant toute l'expérience. Ces résultats indiquent que le mBDNF est la clé de la production de protéines nécessaires à la LTP tardive.

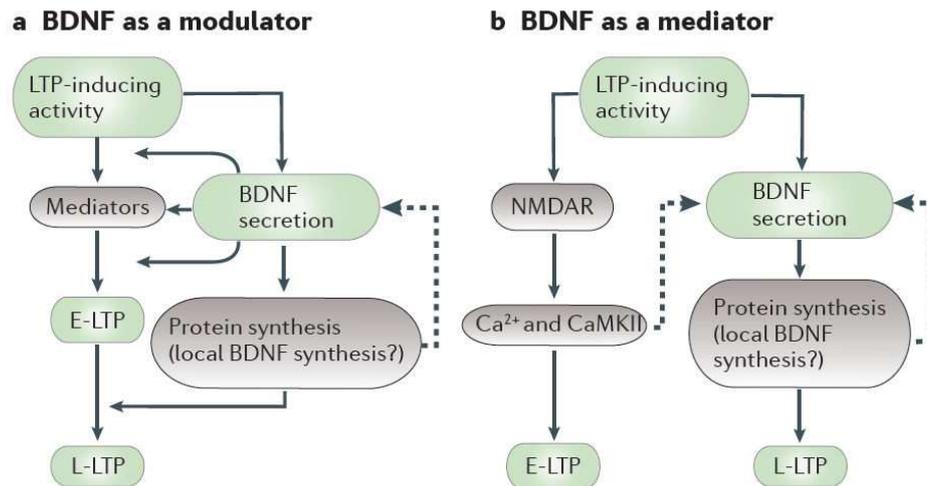


Figure 31: Le BDNF peut jouer un rôle de modulateur ou de médiateur de la LTP. Deux modèles peuvent expliquer le rôle du BDNF dans la LTP, ces modèles s'appuyant principalement sur des études des synapses collatérales de Schaffer-CA1 dans l'hippocampe. a) Le BDNF est un modulateur de la LTP. L'action du BDNF extracellulaire, libéré constitutivement ou après une dépolarisation neuronale, est nécessaire pour permettre des événements cellulaires normaux qui induisent soit la LTP précoce (E-LTP) soit la LTP tardive (L-LTP). b) Le BDNF est un médiateur de la LTP. La LTP précoce pourrait être médiée par l'activation des récepteurs NMDA et des voies Ca²⁺ et CaMKII. Tandis que la libération de BDNF est induite par une activité neuronale, elle peut directement engendrer les événements conduisant à la LTP tardive, comme par exemple en déclenchant la synthèse protéique locale nécessaire à la modification structurelle de la synapse. Les lignes en pointillées indiquent les voies qui restent à démontrer (Park and Poo, 2013).

Comme vu précédemment, la présence du BDNF en pré et en post-synaptique est controversée. Cependant, certains travaux témoignent que pour qu'une stimulation tétanique induise une LTP complète, le BDNF sécrété doit activer les récepteurs TrkB en pré et post synaptique. De plus, une autre étude a montré que l'inhibition de la PLC γ dans les neurones pré et post-synaptiques diminue la LTP hippocampique à des niveaux comparables à ceux trouvés chez des souris déficientes en BDNF ou TrkB (Gärtner et al., 2006). De même, l'inhibition en pré et en post-synaptique de l'activité de TrkB est nécessaire pour abolir la LTP (Du et al., 2009). Cependant, selon les protocoles d'induction de la LTP et en fonction du type de synapses, la nécessité de la signalisation BDNF /TrkB en pré ou post-synaptique peut différer (Cavuş and Teyler, 1996; Grover and Teyler, 1990).

2.6.2. Rôles du pro-BDNF

Le pro-BDNF interagit avec les récepteurs p75^{NTR} (Lee et al., 2001) et cette interaction engendre des effets opposés à ceux du mBDNF avec le récepteur TrkB. L'interaction pro-BDNF/ p75^{NTR} est à l'origine de l'inhibition de la prolifération, de la migration et de la différenciation des cellules souches neurales mais également du nombre de neurones, d'oligodendrocytes et d'astrocytes différenciés (Li et al., 2017). De plus, plusieurs études ont montré que cette interaction était impliquée dans des processus de mort cellulaire, de LTD et d'élimination synaptique des jonctions neuromusculaires (Je et al., 2012). Mais il a également été mis en évidence que le pro-BDNF est délétère lors d'une lésion de la moelle épinière car il diminue la migration et l'infiltration des macrophages dans la lésion (Wong et al., 2010). Le pro-BDNF joue plusieurs rôles *in vivo* : il régule la structure hippocampique, la transmission et la plasticité synaptique. Il régule négativement la complexité et la densité des épines dendritiques dans l'hippocampe (Yang et al., 2014). Cependant, le pro-BDNF peut être nécessaire pour le développement et la régulation des synapses GABAergiques (Langlois et al., 2013).

2.6.2.1. Pro-BDNF et mort cellulaire

Lee et collaborateurs ont trouvé que les ligands qui avaient une forte affinité pour p75^{NTR} étaient les formes non clivées des neurotrophines : les proneurotrophines. Ils ont montré que l'interaction de ces proneurotrophines avec le récepteur p75^{NTR} conduisait à la mort cellulaire. Cet effet est opposé à celui des neurotrophines matures qui, en se liant aux récepteurs Trk, induisent la survie des cellules (Lee et al., 2001). Comme vu précédemment, le récepteur p75^{NTR} peut former des complexes avec la sortiline, et l'interaction entre le pro-domaine du BDNF et le complexe p75^{NTR} /sortiline provoque la mort neuronale. En effet, si l'on bloque cette interaction sur des cultures de neurones sympathiques, alors l'action pro-apoptotique du pro-BDNF est stoppée (Figure 32; Teng et al., 2005). Cette interaction entre le pro-BDNF et les récepteurs p75^{NTR}/sortiline augmente la mort de plusieurs types cellulaires dont les neurones en développement (Li et al., 2017), les cellules de Schwann (Teng et al., 2005), les motoneurones (Taylor et al., 2012) et les cellules musculaires lisses (Lee et al., 2001).

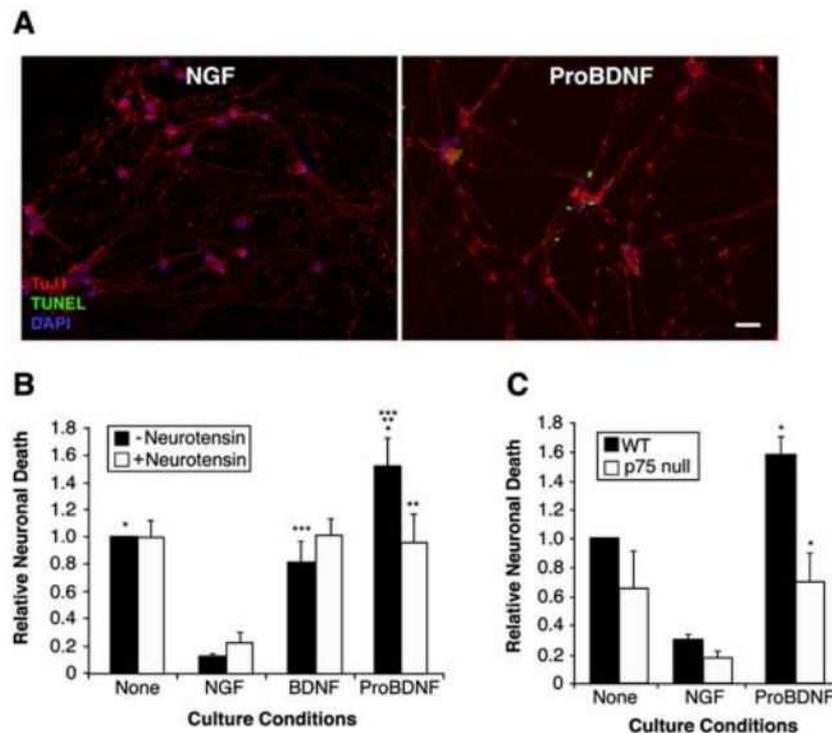


Figure 32: Le pro-BDNF augmente la mort neuronale *via* une interaction avec les récepteurs p75^{NTR}/Sortiline. Cultures de neurones sympathiques de rat incubés avec du NGF, du mBDNF ou du pro-BDNF pendant 48h. A) Une immunocytochimie contre Tuj1 (en rouge ; pour détecter les neurones), DAPI (en bleu ; pour voir les noyaux) et une analyse TUNEL (en vert ; afin de voir les cellules en apoptose) sont effectuées. B) Le NGF et le mBDNF diminuent la mort neuronale contrairement au pro-BDNF qui l'augmente (barres noires). En présence d'un antagoniste de la sortiline: la neurotensine, l'effet délétère du pro-BDNF est complètement inhibé (barres blanches). C) Le pro-BDNF induit une mort neuronale contrairement aux neurones non traités ou traités avec du NGF (barres noires). Chez des souris dépourvues p75^{NTR} (p75 null) la mort neuronale induite par le pro-BDNF est complètement restaurée (barres blanches) (Teng et al., 2005).

2.6.2.2. Pro-BDNF et LTD

Contrairement au mBDNF, le pro-BDNF pourrait faciliter la dépression synaptique *via* p75^{NTR}. Toutefois de manière intéressante, les premières études sur le pro-BDNF ont montré que des souris déficientes en récepteurs p75^{NTR} présentaient des déficits d'apprentissage et de mémoire lors des tests comportementaux tels que : la piscine de Morris, le test d'évitement et dans des tâches d'habituation. Ceci montre que la signalisation induite par les récepteurs p75^{NTR} pourrait être impliquée dans la modulation de la plasticité synaptique (Peterson et al., 1999). Dorénavant, il est évident que l'interaction pro-BDNF/ p75^{NTR} régule la LTD (Figure 33; Woo et al., 2005). Dans cette étude, des expériences de microscopie électronique révèlent une expression de p75^{NTR} dans les épines dendritiques des neurones

hippocampiques CA1. Ce qui soulève la possibilité que l'interaction entre le pro-BDNF et les récepteurs p75^{NTR} pourrait avoir lieu directement au niveau des neurones post-synaptiques CA1. Chez des animaux déficients en p75^{NTR}, la LTD (induite par un train prolongé de stimulations à basse fréquence) est complètement absente au niveau des synapses CA1 de l'hippocampe contrairement aux animaux sauvages (Rösch et al., 2005; Woo et al., 2005). Ce déficit de LTD chez ces animaux est dépendant des récepteurs NMDA et il faut noter que les autres formes de plasticité synaptique, incluant la LTP dépendante des récepteurs NMDA (Rösch et al., 2005; Woo et al., 2005) et la LTD indépendante des récepteurs NMDA (Woo et al., 2005), sont normales chez ces souris déficientes en p75^{NTR}. Le rôle de p75^{NTR} dans la dépression synaptique semble impliquer la sous-unité GluN2B des récepteurs NMDA, une molécule clé dans les mécanismes de LTD (et non dans les mécanismes de LTP) (L. Liu et al., 2004; Massey et al., 2004). Woo et collaborateurs ont également trouvé, par des techniques d'immunohistochimie et d'immuboblots, une réduction significative de l'expression de la sous-unité GluN2B des récepteurs NMDA chez les animaux déficient en p75^{NTR} au niveau de l'hippocampe. De plus, des expériences d'enregistrement sur cellules entières montrent une forte réduction des courants synaptiques médiés par GluN2B dans les neurones CA1 des souris déficientes en p75^{NTR}. Finalement, l'application de pro-BDNF sur des tranches de cerveau de souris sauvages augmente les courants synaptiques médiés par GluN2B. L'induction de la LTD par le pro-BDNF est inversée par un antagoniste de la sous-unité GluN2B (Figure 33). De plus, l'ajout exogène d'un pro-BDNF non clivable en mBDNF sur des tranches de cerveau de souris sauvages augmente la LTD (Woo et al., 2005). Tous ces résultats indiquent que, d'une part, le pro-BDNF active les récepteurs p75^{NTR} pour augmenter la LTD-hippocampique et que, d'autre part, ce mécanisme est dépendant de la présence de la sous-unité GluN2B des récepteurs NMDA.

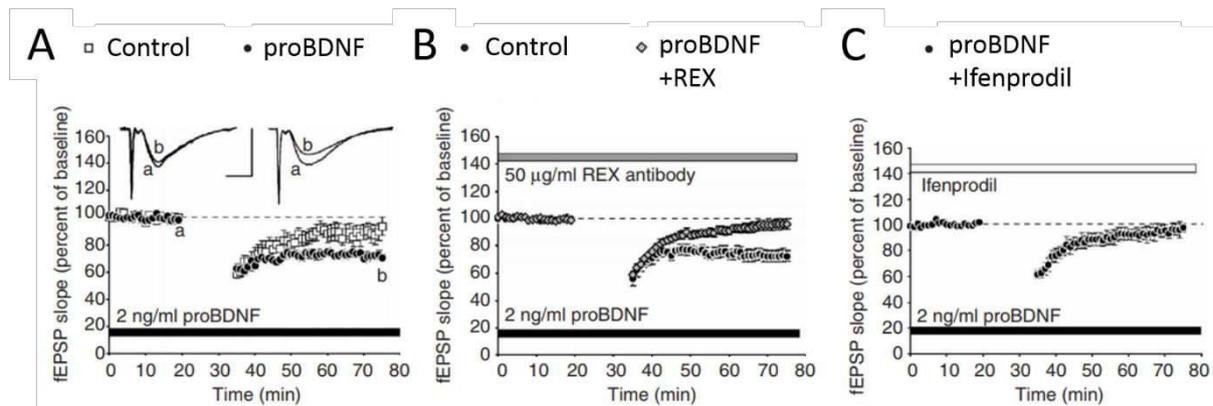


Figure 33 : Le pro-BDNF augmente la LTD hippocampique grâce aux récepteurs p75^{NTR} et NMDA composés de la sous-unité GluN2B. A) Coupes hippocampiques de cerveau de souris âgées de 7-8 semaines présentant des niveaux normaux de LTD (control), et la présence de pro-BDNF (proBDNF) induit une LTD robuste. La LTD induite par le pro-BDNF est inhibée par un blocage de la fonction des récepteurs p75^{NTR} (B, REX) ou GluN2B (C, Ifenprodil) (Woo et al., 2005).

2.6.3. Rôles du pro-domaine

Lors du clivage du pro-BDNF en mBDNF, il y a également génération du pro-domaine (Figure 21). A l'heure actuelle, le devenir du pro-domaine lors du clivage du pro-BDNF reste inconnu. Nous savons que le pro-domaine est responsable de l'interaction du BDNF avec la sortiline (Chen et al., 2005) et agit comme une chaperonne pour diriger le trafic intracellulaire du pro-BDNF dans la voie de sécrétion régulée. Le polymorphisme Val66Met du pro-BDNF diminue l'interaction avec la sortiline, altère le trafic intracellulaire de la protéine et réduit donc la sécrétion de mBDNF en fonction de l'activité neuronale (Chen et al., 2004; Egan et al., 2003).

Quelques études se sont intéressées aux fonctions de ce pro-peptide. Dieni et collaborateurs sont les premiers à avoir détecté la présence du pro-domaine du BDNF *in vivo* au niveau de l'hippocampe par microscopie électronique et par immunoblot (Dieni et al., 2012). Ensuite, plusieurs autres travaux ont montré la présence du pro-peptide du BDNF dans l'hippocampe et ont mis en évidence que ce pro-peptide pouvait être sécrété par les neurones lors d'une activité neuronale (Anastasia et al., 2013; Mizui et al., 2015; Guo et al., 2016). Anastasia et collaborateurs sont arrivés à la conclusion que le pro-domaine issu du polymorphisme Val66Met induit des changements de structure des neurones. Contrairement au pro-peptide Val66, le pro-peptide Met66 du BDNF entraîne une rétractation des cônes de

croissance et une diminution de l'activité hippocampique de Rac (petite protéine G, appartenant à la famille Rho). Ces effets sont médiés par l'interaction du pro-domaine avec un récepteur de la famille des sortilines : le récepteur SorCS2 (en anglais : *sortilin-related Vps10p-domain sorting receptor 2*). Cette étude identifie donc le pro-peptide Met66 comme un nouveau ligand actif qui module la morphologie des neurones. (Anastasia et al., 2013). Une autre étude a montré que ce pro-peptide (Val66Met) régule négativement la structure et la fonction neuronales. Des cultures de neurones hippocampiques mises en présence du pro-domaine du BDNF (Val66Met), voient la densité des épines dendritiques réduire dramatiquement ; cet effet est médié par la voie mitochondriale de la caspase 3 (Figure 34; Guo et al., 2016). Il a également été montré que ce pro-peptide faciliterait la LTD *via* p75^{NTR} et les récepteurs NMDA contenant la sous-unité GluN2B. Cette étude a également mis en évidence que le pro-peptide augmentait l'endocytose des récepteurs AMPA (mécanisme crucial pour la LTD) et que le pro-peptide Met66 inhibait la LTD hippocampique, d'où un rôle fonctionnel du pro-peptide du BDNF dans la dépression synaptique (Mizui et al., 2015).

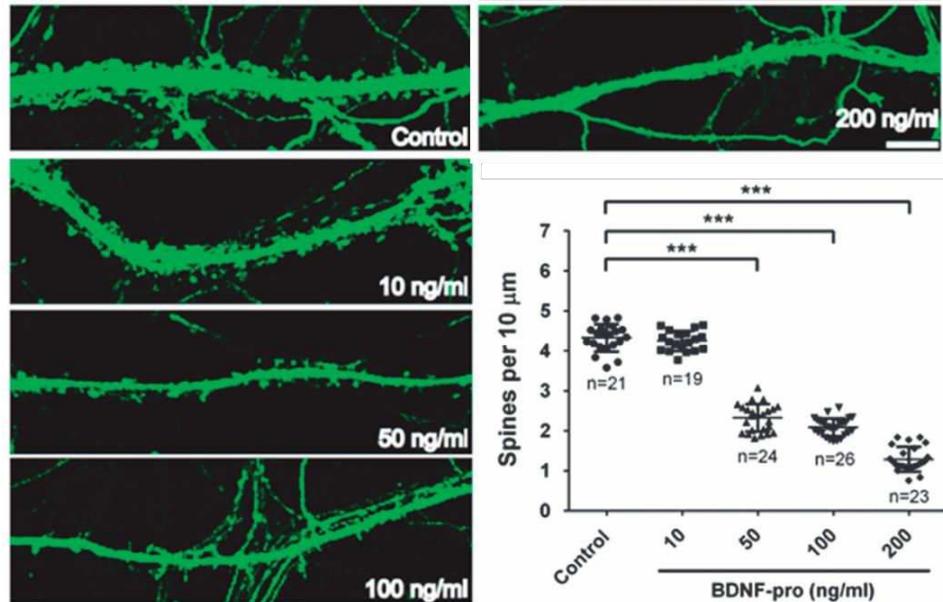


Figure 34: Le pro-peptide du BDNF altère la densité synaptique au niveau de l'hippocampe chez le rat. Des cultures hippocampiques de neurones de rats transfectés avec un plasmide codant pour la GFP sont ensuite traitées avec des doses croissantes de Val66Met pro-peptide du BDNF. Le pro-peptide du BDNF induit une diminution du nombre d'épines par 10µm et ceci de manière dose-dépendante (adapté de : Guo et al., 2016).

2.6.4. BDNF et maladies

Au vu de ses fonctions cérébrales, le BDNF est donc impliqué dans des maladies neurologiques et psychiatriques. La diminution des taux cérébraux de BDNF est associée à une perte neuronale et à des maladies neurodégénératives telles que la maladie d'Alzheimer, la maladie de Parkinson (Scalzo et al., 2010) et la maladie de Huntington (Zuccato et al., 2008). Mais la diminution cérébrale de BDNF a également un rôle dans les maladies psychiatriques chroniques telles que la dépression (Castrén et al., 2007), la schizophrénie (Thompson Ray et al., 2011) et les troubles bipolaires (Sanacora, 2008). De plus, plusieurs études ont également montré que la microglie, les neurones et les astrocytes sont capables de générer du BDNF après un AVC au niveau de la zone non lésée (Madinier et al., 2009; Rickhag et al., 2007; Uchida et al., 2010).

2.7. BDNF et tPA

Les neurones sont capables de sécréter du plasminogène et du tPA (Basham and Seeds, 2001; Louessard et al., 2016). Cette libération de tPA est proportionnelle à l'activité neuronale d'une part (Gualandris et al., 1996; Nagappan et al., 2009) et d'autre part le BDNF induit la synthèse neuronale de tPA (Fiumelli et al., 1999). Une étude *in vitro*, sur des cultures de neurones hippocampiques surexprimant différentes protéines, a mis en évidence que le tPA, le BDNF et le plasminogène seraient probablement localisés dans les mêmes vésicules à cœur dense (Lochner et al., 2008).

Le tPA et le BDNF sont peut-être les deux molécules sécrétées les mieux caractérisées dans les mécanismes de la LTP tardive et de la mémoire à long terme (Pang and Lu, 2004). En effet, les différentes formes de plasticité synaptique sont régulées par l'activité dépendante du clivage extracellulaire du pro-BDNF. Comme vu précédemment, le pro-BDNF active préférentiellement les récepteurs p75^{NTR} (Teng et al., 2005) et régule la LTD hippocampique. L'inhibition de la conversion du pro-BDNF en mBDNF pourrait faire pencher la balance de la plasticité en faveur d'une dépression synaptique. Au contraire, le mBDNF active préférentiellement les récepteurs TrkB et régule la LTP hippocampique. De plus, le pro-BDNF peut être clivé par des protéases extracellulaires comme la plasmine (Figure 35). Cette plasmine est activée par le tPA qui est connu pour son rôle dans la LTP tardive (Huang et al.,

1996; D. Baranes et al., 1998; Pang and Lu, 2004). Ce constat permet de penser que le système tPA/plasmine qui convertit le pro-BDNF en mBDNF au niveau des synapses hippocampiques est impliqué dans l'expression de la LTP tardive. Le pro-BDNF est exprimé dans la région CA de l'hippocampe et son expression est augmentée chez les souris déficientes en tPA ou en plasminogène. De plus, le traitement de tranches hippocampiques de souris déficientes en tPA et en plasminogène avec du mBDNF permet une restauration de la LTP au niveau des synapses CA1, cet effet n'est pas retrouvé avec un pro-BDNF non clivable. Donc, le clivage du pro-BDNF par le tPA/plasmine est crucial pour l'expression de la LTP tardive dans les synapses hippocampiques (Figure 35 ; Pang et al., 2004).

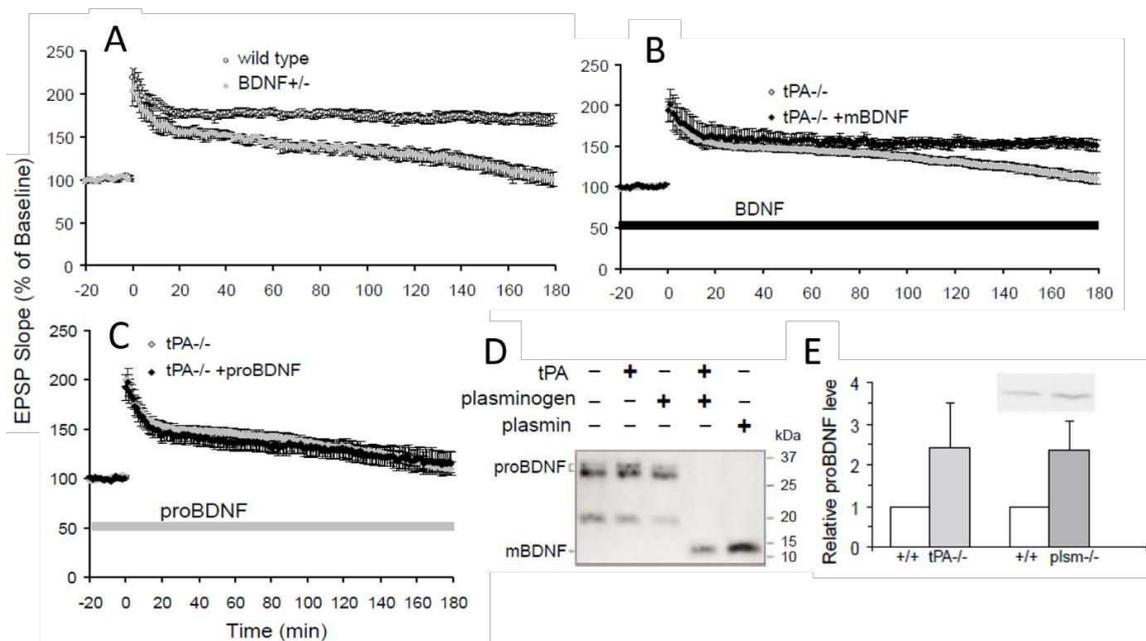


Figure 35: Le mBDNF est nécessaire et suffisant pour induire la LTP tardive. Les potentiels post-synaptiques excitateurs (en anglais : *excitatory postsynaptic potential* ou EPSP) sont induits par des stimulations hautes fréquences (LTP tardive) et enregistrés dans la zone CA1 de l'hippocampe sur des tranches de cerveau de souris sauvages (wild type) ou déficientes en BDNF (BDNF +/-) ou en tPA (tPA -/-). L'ajout de pro ou de mBDNF sur les tranches hippocampiques est mentionné sur les graphiques. A) le BDNF est nécessaire pour l'expression de LTP tardive. Chez les souris hétérozygotes, pour le BDNF les stimulations hautes fréquence échouent pour induire de la LTP tardive. B) L'ajout de BDNF chez des souris déficientes en tPA permet une récupération de la LTP tardive contrairement au pro-BDNF (C). D) La plasmine, mais pas le tPA, est capable de convertir le pro-BDNF en mBDNF. E) Les souris déficientes en tPA ou en plasminogène présentent plus de pro-BDNF dans l'hippocampe que leurs homologues sauvages (adapté de: Pang et al., 2004).

De plus, une étude a montré que l'administration de tPA induit une augmentation de la maturation du BDNF associée à une augmentation de l'activation des récepteurs TrkB dans l'hippocampe. Les auteurs suggèrent que le tPA contrôle la synthèse cérébrale de BDNF *via* une potentialisation de la signalisation des récepteurs NMDA et ce mécanisme serait indépendant de la plasmine (Rodier et al., 2014). Le tPA joue donc un rôle primordial dans la

synthèse et la maturation du BDNF. Il est ainsi impliqué dans la régulation de la balance entre les effets délétères du pro-BDNF et bénéfiques du mBDNF (Figure 36).

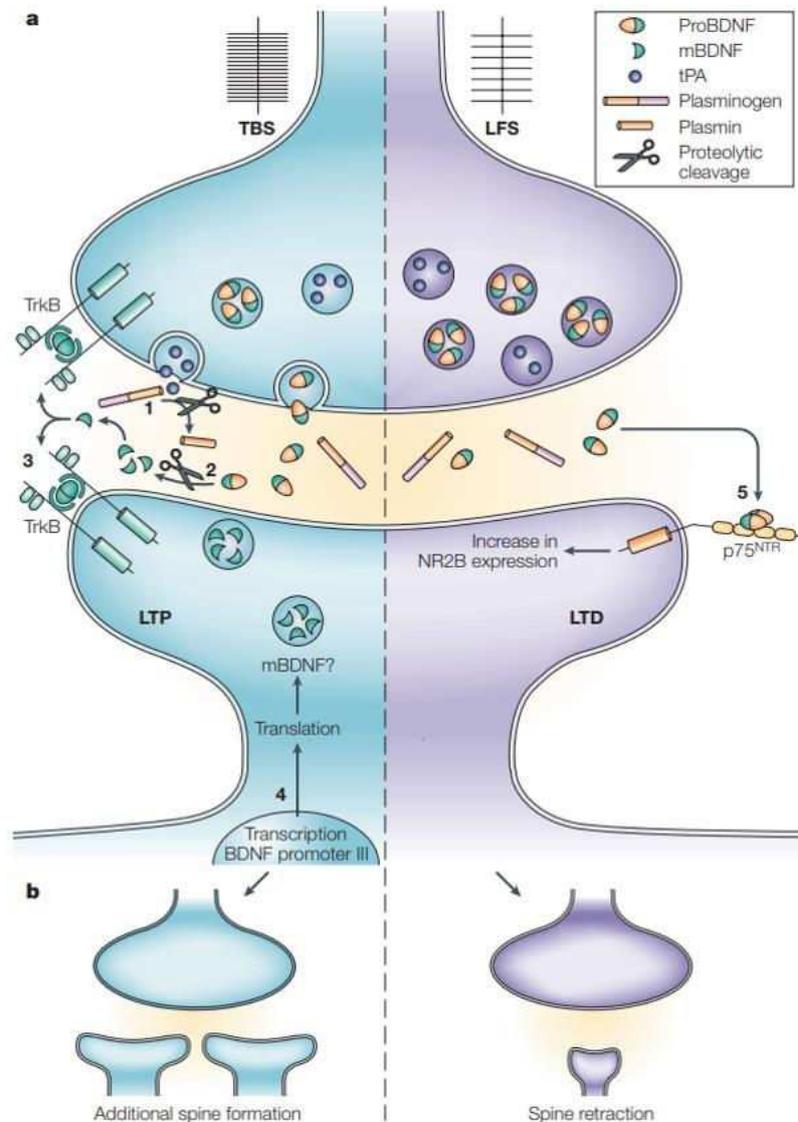


Figure 36: Le tPA régule la balance entre les effets du pro et du mBDNF. A) Cascade moléculaire du traitement du BDNF dans la LTP tardive. En réponse à une stimulation haute fréquence (TBS) le tPA est sécrété dans la fente synaptique et clive le plasminogène, une protéase extracellulaire, en plasmine (1). La plasmine clive le pro-BDNF (qui est libéré suite à l'activité neuronale) en mBDNF (2). Le mBDNF se lie aux récepteurs post-synaptiques TrkB et déclenche une série de voies de signalisation intracellulaire pour induire la LTP (3). Pendant la maintenance de la LTP, le mBDNF pourrait être généré par clivage intracellulaire après une transcription et une traduction post-synaptique (4). Au contraire, le pro-BDNF est sécrété dans le compartiment extracellulaire après une stimulation à basse fréquence du neurone (LFS). Le pro-BDNF non clivé se lie aux récepteurs $p75^{NTR}$ (5) pour faciliter l'induction de la LTD, éventuellement *via* une régulation de la sous-unité GluN2B des récepteurs NMDA. B) L'altération morphologique des synapses induites par le pro et mBDNF. La signalisation induite par mBDNF/TrkB pourrait être un mécanisme actif qui convertit les signaux moléculaires en plasticité structurelle, contribuant à la formation de nouvelles synapses. La signalisation induite par l'interaction pro-BDNF/ $p75^{NTR}$ pourrait moduler négativement la plasticité structurelle et contribuer à la rétraction des synapses (Lu et al., 2005).

La balance entre la quantité de pro- et de mBDNF est importante : un défaut de ce ratio a été observé chez des individus ayant des troubles autistiques mais également chez des individus séropositifs pour le VIH associé à un déclin cognitif, ce qui suggère que la balance de ces deux BDNF peut être dérégulée lors de maladies (Garcia et al., 2012; Bachis et al., 2012). Il a également été retrouvé chez des patients atteints de maladies neuropsychologiques telles que la dépression majeure, la schizophrénie et les troubles bipolaires, une diminution des quantités de tPA et de BDNF dans le sérum des patients (Chen et al., 2017; Jiang et al., 2017). De plus, une étude chez l'animal a montré que le tPA et le BDNF pouvaient jouer un rôle important dans le contrôle de fonctions cognitives influencées par le vieillissement et l'environnement extérieur (Obiang et al., 2011). Le tPA est donc une protéase clé impliquée dans la maturation extracellulaire du pro-BDNF puisqu'elle régule et contrôle les fonctions des isoformes du BDNF.

Pour résumer cette seconde partie, le BDNF est une neurotrophine possédant des rôles très importants dans la survie, la croissance, la différenciation des neurones et des synapses. Le BDNF est donc important pour le développement du cerveau et pour la mémoire à long terme.

Le BDNF existe sous deux formes : une forme immature (pro-BDNF) et une forme mature (mBDNF). Ces deux formes interagissent avec différents récepteurs et engendrent des effets cellulaires opposés. Le pro-BDNF active les récepteurs p75^{NTR}/Sortiline pour induire la mort cellulaire et la LTD. Alors que le mBDNF interagit avec les récepteurs TrkB pour augmenter la survie cellulaire et la LTP.

Le tPA *via* la plasmine peut contrôler le clivage du pro-BDNF en mBDNF. Il joue donc un rôle très important dans la balance entre les effets bénéfiques et délétères du BDNF sur la survie cellulaire et la plasticité synaptique.

3. Trafic vésiculaire neuronal

Le trafic de vésicules a un rôle essentiel dans les cellules, il permet de distribuer des composants à la membrane, d'associer des ligands à leurs récepteurs et d'emporter des molécules solubles vers différents compartiments intracellulaires. Il existe différentes voies intracellulaires de trafic vésiculaire comme: l'exocytose, l'endocytose, le recyclage et la dégradation de vésicules. Ces différents types de trafic impliquent différents acteurs moléculaires, différents modes de transport et différents mécanismes intracellulaires.

3.1. L'exocytose

L'exocytose est un mécanisme moléculaire utilisé par les cellules pour assurer la fusion d'une vésicule de sécrétion avec la membrane plasmique et ainsi libérer son contenu dans le milieu extracellulaire. Ce mécanisme nécessite l'intervention de plusieurs protéines : principalement les SNARE et leurs protéines accessoires. Les lipides qui constituent la membrane plasmique ont également un rôle important dans ce processus grâce à leur capacité à interagir, recruter et/ou activer certaines protéines mais aussi grâce à leur capacité à induire des déformations membranaires *via* leurs propriétés géométriques (Ammar et al., 2013). L'exocytose permet d'éliminer les déchets mais joue également un rôle dans les fonctions de signalisation et de régulation (par exemple : fonctions nerveuse et endocrine) ainsi que dans la production de macromolécules qui auront un rôle à l'extérieur de la cellule (par exemple : les récepteurs membranaires, la matrice extracellulaire ou bien encore le matériel permettant la construction de paroi) (Wu et al., 2014).

Les synapses sont au cœur de la communication entre les différentes cellules du cerveau, elles ont donc un rôle très important. C'est au niveau de la synapse, que les signaux électriques du neurone présynaptique vont être convertis en signaux chimiques pour ensuite être transmis aux neurones post-synaptiques et aux astrocytes environnants. Les signaux chimiques sont des neurotransmetteurs stockés dans des vésicules qui peuvent subir une exocytose déclenchée par le calcium. Certaines terminaisons présynaptiques peuvent contenir des milliers de vésicules. Suite à l'exocytose des neurotransmetteurs, un processus de recyclage des différents composants est mis en place afin de permettre la transmission d'un autre signal (Heuser and Reese, 1973).

3.1.1. Les protéines SNARE

Les SNARE (en anglais : *Soluble N-ethylmaleimide-sensitive-factor attachment protein Receptor*) sont des protéines transmembranaires responsables de la fusion des vésicules avec la membrane mais également du trafic membranaire au sein des cellules eucaryotes. La spécificité et l'énergie nécessaire à cette fusion sont apportées par l'interaction entre deux protéines SNARE complémentaires (une présente sur le compartiment donneur et l'autre sur le compartiment receveur). Les SNARE peuvent être divisées en deux grandes familles : les SNARE vésiculaires (en anglais : *vesicular SNARE* ou v-SNARE) et les SNARE cibles (en anglais : *target-SNARE* ou t-SNARE). Les v-SNARE sont localisées au niveau des vésicules et interagissent par complémentarité avec les t-SNARE présentes au niveau de la membrane plasmique : elles vont ainsi former des complexes qui vont permettre la fusion des membranes (**Figure 37**). Il a été montré que l'interaction entre les protéines SNARE et SM (en anglais : *Sec1/Munc18-like protein*) est indispensable pour l'exocytose. Les protéines SM sont des protéines associées à la syntaxine (comme Munc18) (**Figure 37**). Les principales v-SNARE connues appartiennent à la famille des VAMP (en anglais : *Vesicle-associated membrane protein* ou synaptobrevine) et les t-SNARE comprennent principalement les syntaxines et des SNAP-25 (en anglais : *Synaptosomal-associated protein*). Bien que les SNARE soient classées par rapport à leur fonction (v- ou t-SNARE), elles peuvent également être classées en fonction de leur composition chimique. Ainsi on distingue deux types de SNARE : les R (riche en arginine) et les Q (riche en glutamine) qui sont sous divisées en Qa, Qb et Qc (en fonction de la séquence en acides aminés du domaine SNARE). Souvent les R-SNARE agissent comme les v-SNARE et les Q-SNARE comme les t-SNARE. Les SNARE possèdent toutes un ou deux motifs SNARE et l'association de quatre motifs SNARE donne à ce complexe une conformation favorisant le rapprochement des deux membranes et provoque la fusion membranaire (**Chen and Scheller, 2001; Hanson et al., 1997**). Une fois la fusion réalisée, les SNARE se désassemblent tout en restant sur la membrane. Cette réaction est catalysée par une ATPase (enzyme qui hydrolyse l'adénosine triphosphate) : le NSF (en anglais : *N-ethylmaleimide-sensitive factor*) mais aussi grâce à son cofacteur SNAP (en anglais : *soluble NSF attachment protein*), ce qui permet le recyclage de SNARE pour un nouveau cycle de fusion (**Jahn et al., 2003; Jahn and Scheller, 2006; Söllner et al., 1993**).

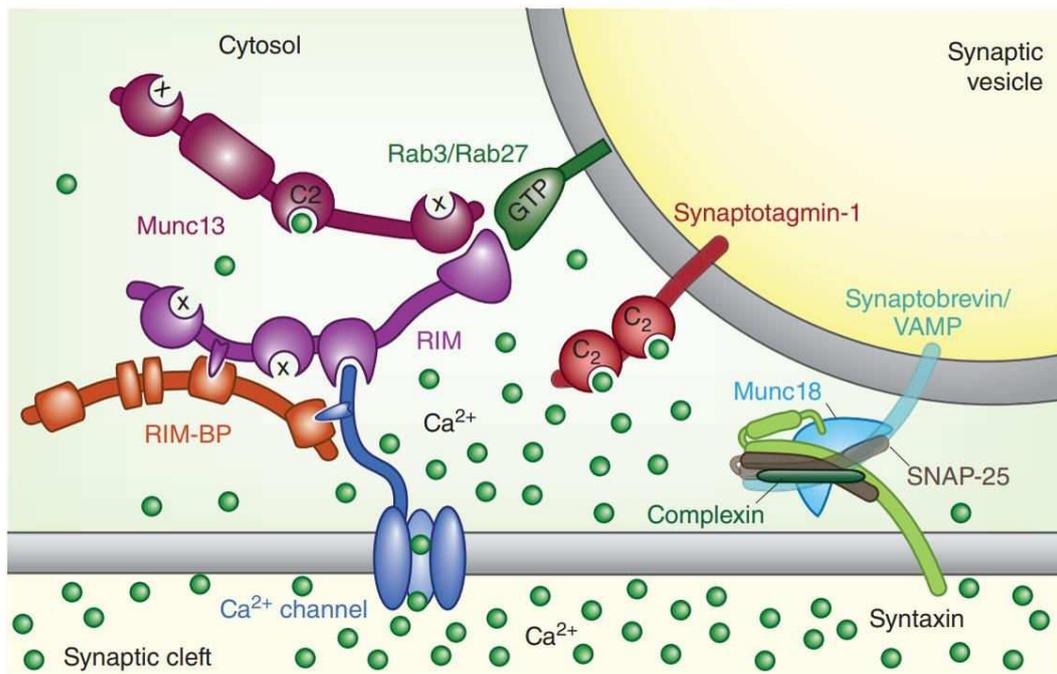


Figure 37: Recrutement des vésicules synaptiques à la membrane. Suite à une dépolarisation, le calcium entre dans la cellule et se lie à la synaptotagmine-1 ce qui provoque un rapprochement des vésicules avec la membrane plasmique. Les vésicules sont ainsi recrutées à la membrane grâce à l'interaction entre les protéines RIM, Munc13, Rab3/Rab27 et les canaux calciques. Ce recrutement permet aux protéines v-SNARE (synaptobrevine/VAMP) présentes à la surface des vésicules d'interagir avec les protéines t-SNARE (Syntaxine et SNAP-25) localisées sur la surface de la membrane plasmique mais également avec la protéine SM (Munc18). La formation de ce complexe appelé *trans*-SNARE va permettre la fusion des vésicules synaptiques avec la membrane (Südhof, 2013).

Le premier complexe SNARE à avoir été identifié dans des extraits de cerveau est le complexe syntaxine et SNAP-25 appartenant à la famille des t-SNARE avec VAMP2 (ou synaptobrevin 2) appartenant à la famille des v-SNARE (Söllner et al., 1993). Depuis, un grand nombre de complexes SNARE ont été découverts (Hong, 2005). Dans cette étude, nous nous focaliserons simplement sur certaines d'entre elles :

- **VAMP2** : a un rôle clé dans la transmission synaptique. Cette protéine est importante dans le contrôle des taux de fusion des vésicules déjà amorcées. Elle n'est toutefois pas indispensable à la fusion vésiculaire. De plus, VAMP2 est impliquée dans le recyclage rapide des vésicules synaptiques (Deák et al., 2004) ;
- **TI-VAMP** (en anglais : *tetanus neurotoxin insensitive-vesicle associated membrane protein* aussi appelé VAMP7) : est impliquée dans la croissance neuronale, dans la transmission synaptique, dans la sécrétion lysosomale et dans le remodelage de la membrane plasmique. De plus, VAMP7 semble intervenir dans le passage des

endosomes précoces vers les endosomes tardifs mais également dans le recyclage à partir des endosomes tardifs (Chaîneau et al., 2009) ;

- **VAMP3** (ou cellubrévine) : est impliquée dans le tri et le recyclage des endosomes mais aussi dans la migration neuronale. Cependant elle n'est pas exprimée par les neurones (Barber et al., 2015).

Les fonctions des endosomes seront développées dans la partie « 3.3 Recyclage et dégradation ».

3.1.2. Les différentes étapes de l'exocytose

Avant d'être libérées dans la fente synaptique, les vésicules doivent être chargées en neurotransmetteurs. Ce chargement est réalisé grâce à un transporteur membranaire qui utilise le gradient de concentration de protons entre la vésicule et le cytoplasme. Ce gradient est généré par un transporteur de protéines qui fonctionne grâce à l'hydrolyse de l'ATP. Avant de pouvoir fusionner avec la membrane, les vésicules subissent plusieurs étapes de maturation au cours desquelles elles acquièrent les propriétés nécessaires à la fusion membranaire. La libération de neurotransmetteurs, *via* l'exocytose des vésicules synaptiques et déclenchée par le calcium, est cruciale pour la communication entre les neurones (Pang and Südhof, 2010). L'exocytose peut également être régulée par une augmentation d'AMPc (Szaszák et al., 2008) ou grâce à l'activation des protéines kinases (Jewell et al., 2011; Zeniou-Meyer et al., 2008).

Il existe deux types d'exocytose : l'exocytose constitutive et l'exocytose régulée. La première a lieu dans toutes les cellules et permet une libération de composants de la matrice extracellulaire et de protéines nouvellement synthétisées qui seront incorporées à la membrane lors de l'exocytose. Dans l'exocytose régulée, la fusion n'a pas obligatoirement lieu après l'appariement des SNARE mais elle est déclenchée par un signal extracellulaire spécifique (souvent calcique). L'augmentation de calcium dans la cellule conduit au désassemblage du cytosquelette, formé par le réseau d'actine, ce qui permet le recrutement des vésicules à la membrane plasmique. Les vésicules arrimées vont s'amorcer pour ensuite fusionner et ainsi libérer leur contenu. Le détail des différentes étapes qui constituent l'exocytose sont les suivantes (Figure 38 ; Südhof, 2013) :

- **Arrimage** : à la suite d'une stimulation, le calcium intracellulaire se lie à la synaptotagmine (présente à la surface des vésicules) ce qui permet à la vésicule de se positionner près des canaux calciques et ainsi d'engendrer une interaction entre ces canaux et la vésicule synaptique (*via* les protéines d'accrochage : RIM, Munc13 et Rab3/Rab27) (**Figure 37**). Cette interaction permet de rapprocher la vésicule de la membrane plasmique et ainsi permettre aux protéines v-SNARE (VAMP2) de former des complexes avec les protéines t-SNARE (syntaxine 1 et SNAP-25). Les domaines hélicoïdaux des SNARE vont s'enrouler entre eux pour former un faisceau stable de quatre hélices (une hélice VAMP, une hélice syntaxine et deux hélices SNAP-25), le complexe ainsi formé avec les SNARE est appelé complexe *trans*-SNARE ;
- **Amorçage** : la syntaxine va changer de conformation provoquant ainsi la fixation de Munc18. Le complexe *trans*-SNARE étant pleinement assemblé, l'enroulement des hélices permet un rapprochement des deux compartiments et déclenche la fusion des membranes ;
- **Fusion** : Le pore de fusion continue de s'agrandir, libérant ainsi le contenu de la vésicule. Le complexe *trans*-SNARE devient alors un complexe *cis*-SNARE. Les complexes *cis*-SNARE sont ensuite désassemblés par les protéines NSF et son cofacteur protéique (SNAP) qui se fixe au complexe SNARE. Ce désassemblage conduit au recyclage des vésicules et des complexes SNARE pour une nouvelle fusion.

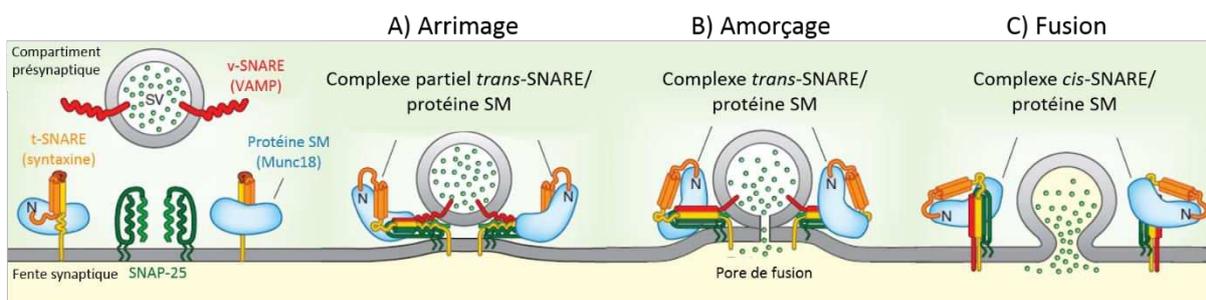


Figure 38 : Mécanisme d'action des SNARE dans l'exocytose. Schéma représentant les protéines impliquées dans l'exocytose. Les protéines v-SNARE (VAMP, en rouge) présentes au niveau des vésicules vont interagir avec les protéines t-SNARE (Syntaxine en orange) présentes à la surface de la membrane plasmique. A) assemblage partiel : les v-SNARE et les t-SNARE vont se complexer pour former un complexe *trans*-SNARE, celui-ci va interagir avec une protéine SM (Munc18, en bleu) et les protéines SNAP-25. B) Les hélices du complexe SNARE vont s'enrouler permettant un rapprochement de la vésicule avec la membrane mais cela va également permettre une ouverture du pore de fusion. C) Durant la phase de fusion, le complexe *trans*-SNARE se relâche et passe dans une configuration *cis*-SNARE, ce dernier va ensuite se désassembler grâce à la protéine NSF (une ATPase et aux protéines SNAP) conduisant ainsi au recyclage de la vésicule. Le pore de fusion va continuer de s'agrandir, libérant alors le contenu de la vésicule dans le milieu extracellulaire (adapté de : Südhof, 2013).

3.2. L'endocytose

L'endocytose est un mécanisme cellulaire utilisé par l'ensemble des cellules eucaryotes et consiste à internaliser des éléments présents à la surface de la membrane plasmique par invagination de celle-ci. Les éléments internalisés peuvent être des molécules extracellulaires, des protéines membranaires mais également des lipides contenus dans la membrane plasmique. L'ensemble de ces éléments endocytés va alors être trié puis pris en charge par un réseau complexe de vésicules pour être, ensuite, dirigé vers des voies de dégradation *via* les lysosomes ou vers des voies de recyclage pour libérer, de nouveau, leur contenu à la membrane. Les voies de recyclage et de dégradation seront explicitées dans la partie « 3.3 Recyclage et dégradation ». L'endocytose est impliquée dans un grand nombre de processus cellulaires comme l'entrée de nutriments dans la cellule, la régulation des récepteurs membranaires, l'établissement de la polarité de la cellule, le remodelage de la membrane cellulaire, l'adhésion et la migration cellulaires, la clairance des cellules apoptotiques, l'entrée de pathogènes et la présentation d'antigènes (Marsh and McMahon, 1999). Au niveau cérébral, l'endocytose est également très importante de par son rôle dans la neurotransmission à travers le recyclage des vésicules synaptiques (Sudhof, 2004).

Il existe différents processus d'endocytose qui se distinguent par la taille des vésicules formées, la nature des molécules internalisées et la machinerie cellulaire impliquée. On distingue donc, la voie d'internalisation dépendante de la clathrine qui est la mieux caractérisée, puis l'endocytose impliquant une évagination de la membrane plasmique comme la phagocytose ou la macropinocytose et enfin, les processus nécessitant une invagination de la membrane indépendante de la clathrine comme l'endocytose dépendante des cavéoles (Figure 39).

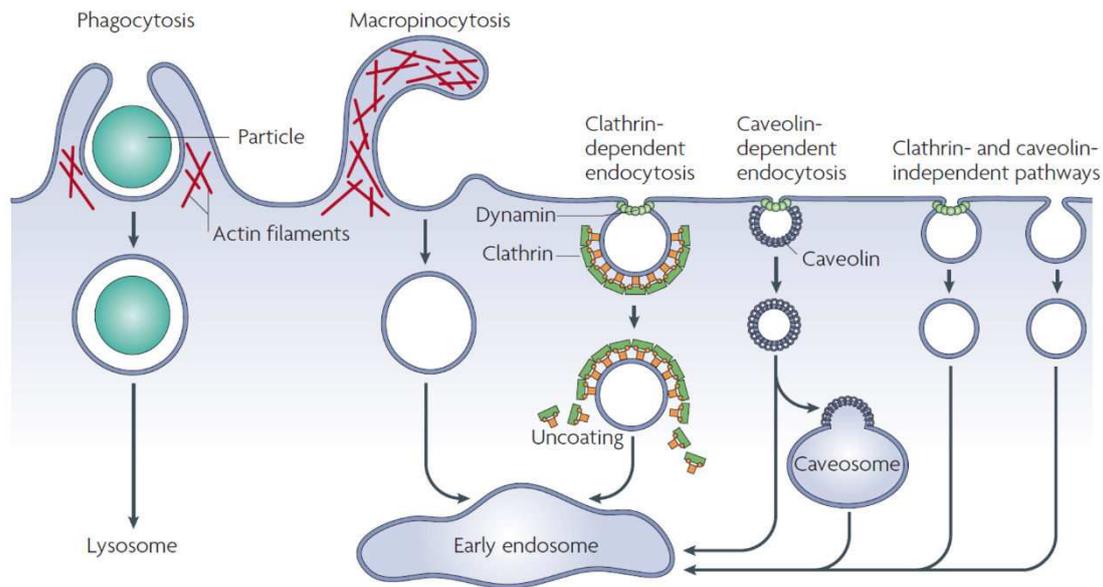


Figure 39: Les différentes voies d'endocytose. Les grosses particules sont internalisées par phagocytose alors que les fluides extracellulaires sont capturés par macropinocytose. Ces deux processus semblent être déclenchés par le remodelage de la membrane plasmique *via* les filaments d'actine et forment des vésicules beaucoup plus grandes en comparaison aux autres voies d'endocytose. Grâce aux différents modes d'endocytose, dépendants ou non de la clathrine, un large panel de molécules peuvent rentrer dans la cellule. La plupart de ces voies conduisent les molécules internalisées vers des endosomes précoces (en anglais : *early endosome*), mais certaines peuvent passer par un compartiment intermédiaire (comme les cavéosomes), où elles seront triées puis prises en charge par d'autres endosomes pour être dégradées ou recyclées (Mayor and Pagano, 2007).

3.2.1. L'endocytose dépendante de la clathrine

L'endocytose dépendante de la clathrine s'effectue par l'intermédiaire d'un récepteur présent à la surface de la cellule et fait intervenir la formation d'un puits recouvert d'un manteau protéique formé de clathrines. Ce type d'endocytose est fondamental dans les mécanismes de neurotransmission, de transduction de signaux et dans la régulation de l'activité de nombreuses protéines membranaires. Elle est donc essentielle à la vie des cellules eucaryotes (McMahon and Boucrot, 2011). L'endocytose dépendante de la clathrine permet l'internalisation de récepteurs membranaires par invagination de la membrane jusqu'à l'obtention d'une vésicule. Le manteau protéique qui recouvre ce type de vésicules va ensuite être enlevé avant la fusion avec les endosomes précoces (en anglais : *early endosome*). Il existe deux types d'internalisation des récepteurs : ceux qui sont internalisés de façon constitutive et indépendamment de la liaison d'un ligand (comme pour les récepteurs aux LDL ou à la

transferrine) et les récepteurs internalisés avec liaison à leur ligand (comme les récepteurs à l'insuline ou à l'EGF) (Hopkins et al., 1985).

L'endocytose dépendante de la clathrine contrôle l'internalisation constitutive et stimulée de nombreux récepteurs ayant des rôles dans le contrôle de la croissance cellulaire, l'homéostasie et la différenciation cellulaire mais également dans la transmission synaptique. En effet, ce type d'endocytose joue un rôle très important dans le recyclage des vésicules synaptiques (Farsi et al., 2018). C'est au niveau du cerveau qu'on retrouve le plus de protéines impliquées dans l'endocytose dépendante de la clathrine ; ces protéines seraient contrôlées par l'activité synaptique et déclenchées par les stimuli d'exocytose (Marks and McMahon, 1998). Le but de cette endocytose synaptique est de recycler les composants des vésicules synaptiques plutôt que les ligands. Des perturbations de ce système d'endocytose ont été rapportées dans de nombreuses pathologies telles que les cancers, myopathies, neuropathies, syndrome métabolique et dans les maladies neurodégénératives (McMahon and Boucrot, 2011).

3.2.1.1. Les partenaires moléculaires de l'endocytose dépendante de la clathrine

Au cours de l'endocytose dépendante de la clathrine, plusieurs partenaires protéiques vont être impliqués afin de jouer des rôles clés. Les partenaires les plus importants retrouvés dans ce type d'endocytose sont :

- **La clathrine** : une protéine cytoplasmique capable de s'auto-polymériser. Elle est composée de trois chaînes lourdes et de trois chaînes légères qui lui confèrent sa forme de « triskèles ». Les clathrines sont responsables de la déformation et de la stabilisation des courbures de la membrane lors de la formation des vésicules (Liu et al., 1995). Pour être recrutées à la membrane, les clathrines ont besoin de protéines adaptatrices et de protéines accessoires ;
- **L'AP-2** (en anglais : *adaptor protein-2*) : est une protéine adaptatrice constituée de quatre sous-unités (α , β 2, μ 2 et σ 2). Les complexes de protéines AP-2 sont recrutés en premier au niveau de la membrane par les récepteurs membranaires. Ils permettent le recrutement à la membrane de la clathrine et des protéines accessoires contrôlant ainsi l'initiation de la polymérisation et l'assemblage du puit de clathrine (Kelly et al., 2014; Paczkowski et al., 2015) ;

- **La dynamine** : est une GTPase également indispensable à l'endocytose. Elle permet la fission entre la membrane et le puit de clathrine assurant ainsi la formation d'une vésicule (Hinshaw, 2002).

En fonction du récepteur ou de la molécule internalisée, différents partenaires peuvent intervenir. Parmi ces protéines accessoires, on peut retrouver les épsines (impliquées dans la sélection des récepteurs), les amphiphysines (impliquées dans le recrutement de la dynamine) et les intersectines (permettent de relier différents composants impliqués dans l'endocytose dépendante de la clathrine) (McMahon and Boucrot, 2011).

3.2.1.2. Les différentes étapes de l'endocytose dépendante de la clathrine

La formation de vésicules peut être divisée en cinq étapes (Figure 40):

- **L'initiation** : recrutement de protéines accessoires au niveau du site de formation de la future vésicule et initiation de l'invagination de la membrane grâce à leur activité enzymatique (Henne et al., 2010) ;
- **Sélection des molécules internalisées** : recrutement, *via* les protéines accessoires, de protéines adaptatrices dont le complexe protéique AP-2, qui vont sélectionner les molécules à internaliser (Traub, 2009) et assurer le recrutement de la clathrine (Boucrot et al., 2010) ;
- **L'assemblage du manteau de clathrine** : les triskèles de clathrine vont ensuite s'auto-polymériser pour permettre une stabilisation de la courbure de la membrane et faire progresser l'invagination de la membrane (Liu et al., 1995) ;
- **La scission** : la dynamine est recrutée au niveau du cou de la vésicule pour permettre la scission entre la vésicule et la membrane plasmique (Mettlen et al., 2009) ;
- **Dissociation** : une fois détachée de la membrane, le manteau de clathrine est dissocié en monomères puis les différentes protéines impliquées dans cette endocytose sont relâchées dans le cytoplasme pouvant ensuite servir à la formation de nouvelles vésicules (McMahon and Boucrot, 2011). Les vésicules nouvellement formées vont pouvoir se déplacer et fusionner avec leur cible endosomale.

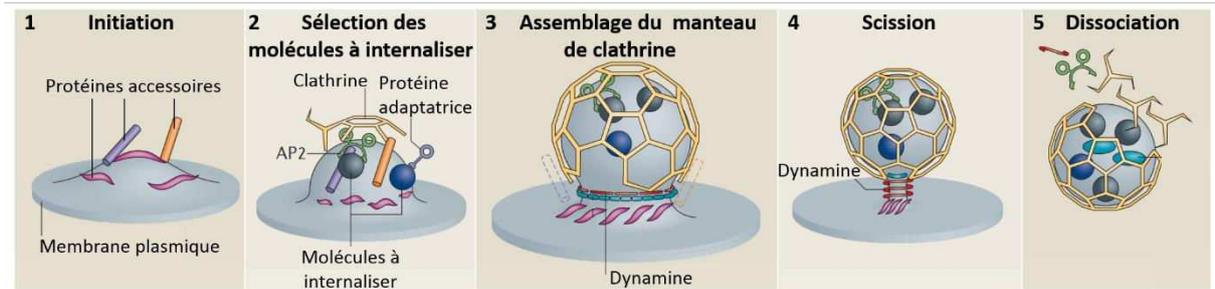


Figure 40: Cycle de formation des vésicules recouvertes de clathrine. Schéma expliquant les étapes d'initiation (impliquant les protéines accessoires ; 1), de sélection des molécules à internaliser (impliquant les protéines adaptatrices et les complexes AP-2 ; 2), d'assemblage du manteau de clathrine (3), de scission (impliquant les dynamines ; 4) et enfin de dissociation et de recyclage des composants (5) (adapté de : [McMahon and Boucrot, 2011](#)).

3.2.2. L'endocytose indépendante de la clathrine

Tout comme l'endocytose dépendante de la clathrine, ce type d'endocytose va permettre l'internalisation de matériel extracellulaire afin de le diriger vers des voies de dégradation ou de recyclage. Ces deux types d'endocytoses jouent des rôles similaires et agissent parfois de façon coordonnée afin de contrôler certains processus comme la signalisation de la dégradation de certains récepteurs ([Sigismund et al., 2008](#)). Cependant, ces deux types d'endocytoses sont régulés par des signaux différents ; ce qui suggère que ces deux voies auraient des rôles distincts offrant ainsi à la cellule un large spectre de possibilités régulatrices. Un des rôles de l'endocytose indépendante de la clathrine est son implication dans la polarisation et la migration cellulaires. En effet, l'internalisation et le recyclage des intégrines, protéines impliquées dans l'adhésion intercellulaire, permettent à la cellule de progresser dans sa migration ([del Pozo et al., 2005](#)).

Un grand nombre de mécanismes d'endocytose indépendante de la clathrine ont été identifiés selon les molécules internalisées et les mécanismes moléculaires utilisés cependant, aucune classification n'a pu être réalisée car ces voies sont nombreuses et complexes ([Mayor et al., 2014](#)). Certaines reposent sur une évagination de la membrane, comme la macropinocytose et la phagocytose alors que d'autres reposent sur l'invagination de la membrane (comme l'endocytose dépendante de la clathrine) : c'est le cas de l'endocytose dépendante des cavéolines, qui est le mode d'endocytose indépendante de la clathrine le mieux caractérisé ([Figure 39](#)).

3.2.2.1. *Endocytose dépendante des cavéolines*

Les cavéoles sont des invaginations membranaires en forme de flacon et recouvertes d'un revêtement protéique composé de cavéolines et de cavins (Kovtun et al., 2015) (Figure 39). Les cavéolines sont caractérisées premièrement par leur forte affinité pour certains lipides en particulier le cholestérol et deuxièmement les cavéolines restent intégrées à la membrane contrairement aux clathrines. Ce type d'endocytose forme des vésicules de 50-80nm de diamètre au niveau de microdomaines membranaires riches en cholestérol et en glycosphingolipides. Les molécules internalisées par ce mécanisme sont ensuite détachées par la dynamine puis dirigées vers un endosome précoce en passant parfois par l'intermédiaire de structures particulières appelées cavéosomes. Les composants de ces cavéoles sont quant à eux, rapidement recyclés vers la membrane, afin de créer d'autres cavéoles.

Les cavéoles sont présents dans la plupart des types cellulaires mais particulièrement au niveau des cellules endothéliales où elles seraient impliquées dans des mécanismes de transcytose et d'endocytose de molécules localisées dans le compartiment vasculaire ; cependant ce rôle reste encore controversé. Ce type d'endocytose s'effectue en réponse à un stress mécanique ou à une lésion de la membrane plasmique montrant ainsi que les cavéoles jouent un rôle important dans la régulation du métabolisme cellulaire (Shvets et al., 2014). Indépendamment de l'endocytose, les cavéoles sont impliquées dans l'activation des voies de signalisations cellulaires, dans la régulation du métabolisme lipidique, dans la mécanosensation (capacité de la membrane à percevoir des forces mécaniques) mais pourraient également intervenir dans la régulation du rythme circadien et dans l'absorption des acides gras dans l'intestin (Parton and Simons, 2007).

3.2.2.2. *Macropinocytose*

Le mécanisme de macropinocytose repose sur une extension de la membrane grâce à la formation de lamellipodes principalement constitués de filaments d'actine (Figure 39). Cette extension membranaire se referme en emprisonnant du matériel extracellulaire créant ainsi une vésicule : le macropinosome. Les macropinosomes sont de larges vésicules irrégulières et très dynamiques d'environ 0,5-5µm de diamètre. Le remplissage de ces vésicules s'effectue de manière non spécifique, elles contiennent donc quelques molécules et un grand volume de liquide extracellulaire. Le macropinosome ainsi formé est dirigé vers un

endosome précoce pour être ensuite digéré dans un lysosome. Ces vésicules sont capables de se déplacer vers le centre de la cellule et ont une durée de vie de 5 à 20 minutes (Swanson and Watts, 1995). Comme pour les autres types d'endocytose, les composants constituant la membrane des macropinosomes sont ensuite recyclés vers la membrane plasmique.

Le rôle de ce type d'endocytose n'a pas encore été totalement élucidé. La macropinocytose serait très active au niveau des macrophages et des cellules dendritiques où elle jouerait un rôle majeur dans la capture d'antigène, dans la migration cellulaire et dans les métastases tumorales. Elle représente également une voie d'entrée pour les pathogènes (Lim and Gleeson, 2011). Ce processus d'endocytose très dynamique serait impliqué dans le transport vers le corps cellulaire des complexes BDNF/TrkB afin qu'ils puissent soit activer la synthèse de gènes spécifiques, soit être dégradés par des lysosomes (Kononenko et al., 2017; Philippidou et al., 2011).

3.2.2.3. *Phagocytose*

La phagocytose correspond à l'internalisation et la dégradation de grosses particules solides, de débris cellulaires ou même de cellules vivantes (comme des bactéries) (Figure 39). Les particules devant être phagocytées se lient à des récepteurs membranaires spécifiques déclenchant ainsi l'endocytose. Il va s'en suivre, une exocytose localisée de molécules permettant l'extension de pseudopodes au niveau du site d'attachement. Ces pseudopodes vont venir envelopper les particules fixées et provoquer leur internalisation au sein des phagosomes cytoplasmiques (Mellman, 2000).

Ce type d'endocytose est un élément essentiel pour le système immunitaire. Effectivement, la phagocytose est réalisée principalement par les granulocytes, les macrophages et les cellules microgliales. Au niveau cérébral, les cellules microgliales participent à l'élimination de la majeure partie des débris cellulaires cependant certaines études suggèrent que les astrocytes pourraient également jouer ce rôle. En effet, ils seraient capables de phagocyter et auraient un rôle important dans l'élimination des débris cellulaires suite à l'apoptose. Au cours du développement embryonnaire 50% des neurones meurent par apoptose : ainsi, les astrocytes pourraient phagocyter les débris cellulaires durant cette période. Cependant, les astrocytes, *via* le mécanisme de phagocytose, seraient également impliqués dans le remodelage de l'arborisation neuronale chez l'adulte et dans des étapes de récupération suite à des lésions induites par une ischémie cérébrale (Tasdemir-Yilmaz and Freeman, 2014).

3.3. Recyclage et dégradation

A l'heure actuelle : la différenciation des compartiments vésiculaires, les voies de transport qui relient ces différents compartiments et les molécules qui sont à l'origine des rôles de ces différents compartiments sont encore mal connues. Il est difficile de bien identifier les différents compartiments vésiculaires car ces structures sont très dynamiques et subissent des ajouts, des retraits, un recyclage et une maturation de leurs différents composants (Grant and Donaldson, 2009). Il n'existe pas de protéines « résidentes » spécifiques pour chacun des compartiments. Cependant, on peut quand même classer les endosomes en trois grandes familles : les endosomes précoces qui regroupent les endosomes de tri et de recyclage, les endosomes tardifs qui sont des endosomes plus matures ayant perdu leur capacité de fusion avec d'autres endosomes et enfin les lysosomes qui sont impliqués dans la dégradation de molécules (Figure 41).

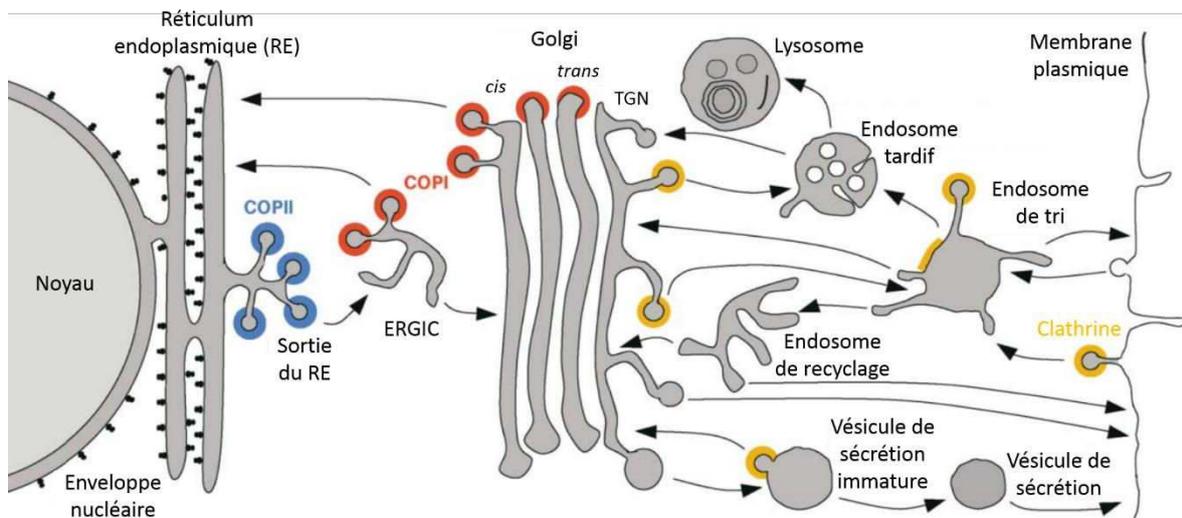


Figure 41: Les différentes étapes du trafic vésiculaire. Schéma représentant les différentes voies du trafic vésiculaire. Les flèches indiquent les étapes de transport et les couleurs précisent la localisation des principaux manteaux protéiques (COPII en bleu, COPI en rouge et Clathrine en jaune). Suite à la synthèse protéique au niveau du réticulum endoplasmique, les protéines vont se diriger vers l'appareil de Golgi pour maturer. Elles vont ensuite transiter dans les vésicules de sécrétion immatures puis dans les vésicules de sécrétion afin d'être exocytées au niveau de la membrane plasmique. Les protéines extracellulaires peuvent être endocytées, *via* un mécanisme dépendant de la clathrine par exemple et elles vont ensuite être recyclées ou dégradées. Il existe deux types de recyclages : une voie rapide (des endosomes de tri directement vers la membrane plasmique) et une voie lente (avec un passage par le TGN ou par les endosomes de recyclages). Ces deux voies vont conduire à une libération du contenu des vésicules dans le milieu extracellulaire. Les protéines non recyclées vont passer successivement de l'endosome de tri à l'endosome tardif puis vers les lysosomes avant d'être dégradées (adapté de : Bonifacino and Glick, 2004).

3.3.1. Les endosomes de tri

Suite à l'endocytose de récepteurs membranaires, par exemple, les vésicules nouvellement formées vont fusionner avec d'autres endosomes pour former des endosomes de tri. Ces endosomes possèdent une structure très dynamique, ils sont situés à la périphérie de la cellule et ont un pH d'environ 6 (Johnson et al., 1993). Après avoir accepté du matériel, les endosomes de tri perdent leur capacité de fusion avec les vésicules nouvellement internalisées. Les endosomes de tri s'acidifient davantage puis sont transportés vers le centre de la cellule le long du réseau de microtubules où ils acquièrent les propriétés des endosomes tardifs (Figure 41).

La fonction principale de ces endosomes est comme son nom l'indique, de diriger les molécules internalisées vers la bonne destination. Les trois destinations connues pour ces endosomes de tri sont : un retour direct vers la membrane plasmique, un adressage vers les endosomes tardifs ou vers les compartiments de recyclage (Figure 41). Le pH acide de ces endosomes de tri, provoque une dissociation des ligands avec leur récepteur (Mukherjee et al., 1997). Cette dissociation représente la première étape du tri des molécules internalisées. La deuxième étape consiste en un tri des molécules internalisées par déformation géométrique des vésicules. En effet, les endosomes initialement sphériques vont s'étendre pour former une partie sphérique contenant la majorité des molécules solubles dont les ligands et une partie tubulaire contenant les composants de la membrane. Les portions tubulaires vont alors être détachées des portions sphériques puis dirigées vers les voies de recyclages ; les portions sphériques vont, quant à elles, subir une maturation et ainsi acquérir les propriétés des endosomes tardifs pour être dirigées vers les voies de dégradation lysosomale (Progida and Bakke, 2016). Lors de la dernière étape, les endosomes de tri deviennent des endosomes tardifs. Les protéines transmembranaires peuvent également être envoyées vers les endosomes tardifs et les lysosomes grâce à l'établissement d'une liaison covalente entre les molécules d'ubiquitine et la partie cytoplasmique des récepteurs. Cette liaison permet dans un premier temps l'internalisation des récepteurs puis dans un second temps, leur prise en charge par des complexes protéiques spécifiques au niveau des endosomes de tri afin de les amener vers les endosomes tardifs puis les lysosomes (Raiborg et al., 2002). Ce mécanisme permet de mettre fin à la signalisation de ces récepteurs rendant alors la cellule insensible aux signaux activateurs de ces récepteurs (Katzmann et al., 2002).

3.3.2. Les endosomes de recyclage

Après le tri des molécules internalisées, certaines sont recyclées et retournent vers la membrane plasmique (**Figure 41**). Il existe deux voies principales pour permettre ce recyclage : une voie lente et une voie rapide. En effet, certaines molécules retournent à la surface en passant directement des endosomes de tri à la membrane plasmique. Alors que d'autres passent par des compartiments spécifiques dédiés au recyclage avant d'être adressées à la membrane (**Goldenring, 2015**).

La voie lente de recyclage implique un transport des protéines à partir des endosomes de tri vers les endosomes de recyclage puis de ces compartiments vers la membrane plasmique (**Figure 41**). Les endosomes de recyclage représentent un compartiment formé principalement d'organites tubulaires associés aux microtubules (**Yamashiro et al., 1984**). Ce compartiment peut diriger les molécules qu'il contient vers de nombreuses destinations bien que la plupart d'entre elles retournent vers la membrane plasmique. Les endosomes de recyclage sont très généralement situés près des centres d'organisation des microtubules et de l'appareil de Golgi. Le transport des molécules du compartiment de recyclage se fait par l'intermédiaire d'un transport sous forme de vésicules ou de tubules qui font transiter les molécules de ce compartiment vers leur destination. Lors de sa maturation, l'endosome précoce élabore des tubules qui deviendront plus tard, le compartiment de recyclage (**Maxfield and McGraw, 2004**). Les déterminants portés par la partie intra-cytoplasmique de ces protéines transmembranaires permettent de diriger spécifiquement ces protéines vers des compartiments particuliers (comme par exemple vers le TGN) plutôt qu'à la membrane (**Ghosh et al., 1998**).

3.3.3. Les endosomes de dégradation

Le passage de l'endosome tardif vers la voie de dégradation est défini par la présence d'un signal de sortie. Ce dernier est présent au niveau du récepteur et permet de diriger les vésicules vers les lysosomes. C'est le cas du récepteur à l'EGF, qui contient au niveau de son domaine cytosolique un signal nécessaire au recrutement de la machinerie de dégradation. L'ubiquitination d'un ou plusieurs résidus lysines au niveau des récepteurs à tyrosine kinase est suffisante pour induire ce processus de dégradation. Ainsi, les récepteurs ou les molécules

présentes dans les endosomes tardifs peuvent être soit recyclés soit dégradés au niveau des lysosomes en fonction de leurs signaux. Une fois à l'intérieur des lysosomes, des enzymes telles que des hydrolases vont dégrader les protéines (Maxfield and McGraw, 2004).

Les lysosomes sont des organites ubiquitaires qui reçoivent leurs substrats des voies d'endocytose, de phagocytose ou d'autophagie (Figure 43). Comme vu précédemment, une fois dans les endosomes de tri, les molécules peuvent être dirigées vers les endosomes tardifs et les lysosomes pour être dégradées. Les endosomes tardifs sont transportés vers le centre de la cellule, puis subissent une acidification jusqu'à un pH 5 et vont s'enrichir en enzymes responsables de l'action catalytique : des hydrolases acides. Après maturation, ces endosomes perdent la capacité de fusionner avec d'autres endosomes (de tri ou de recyclage par exemple) permettant ainsi d'empêcher la dégradation accidentelle de molécules ne devant pas être dégradées (Huotari and Helenius, 2011; Luzio et al., 2001). Le mécanisme responsable du transfert des molécules depuis les endosomes jusqu'aux lysosomes reste controversé. Différentes hypothèses sont avancées : celle de la maturation (les endosomes deviennent des lysosomes), du transport vésiculaire (*via* des intermédiaires de transport) et de la fusion transitoire ou complète (entre les endosomes tardifs et les lysosomes) (Bright et al., 2005; Storrie and Desjardins, 1996). Il y a un ensemble de soixante hydrolases acides dans les lysosomes, elles ont toutes une spécificité différente ce qui permet une dégradation de toutes les molécules arrivant dans les lysosomes, en outre, ces enzymes ne sont actives qu'à pH acide (Hu et al., 2015).

En plus de leurs fonctions cataboliques, de nouvelles fonctions lysosomales ont été découvertes comme une implication dans la signalisation intracellulaire, dans la réparation de la membrane plasmique, dans le métabolisme énergétique et dans l'exocytose (Settembre et al., 2013). En effet, il a été découvert que les lysosomes étaient capables de sécréter leur contenu à l'extérieur de la cellule en réponse à une augmentation de calcium cytosolique (Rodríguez et al., 1997). Cette exocytose lysosomale est à la base de plusieurs mécanismes tels que : la fonction des plaquettes dans la coagulation, la dégranulation des lymphocytes T cytotoxiques et le processus de pigmentation par les mélanocytes.

3.3.4. Les protéines Rab

Les protéines Rab (en anglais : *Ras-associated binding protein*) sont des molécules très largement impliquées dans les différentes étapes du trafic vésiculaire. Ce sont de petites protéines G localisées au niveau des membranes intracellulaires où elles peuvent interagir et recruter d'autres protéines. Elles sont capables d'activer, de recruter différents effecteurs moléculaires comme des adaptateurs de tri, des facteurs d'attachement, des kinases ou des phosphatases. Les Rab sont impliqués dans la régulation de la formation, du mouvement et de la fusion des vésicules vers leur compartiment de destination (**Figure 42; Stenmark, 2009**).

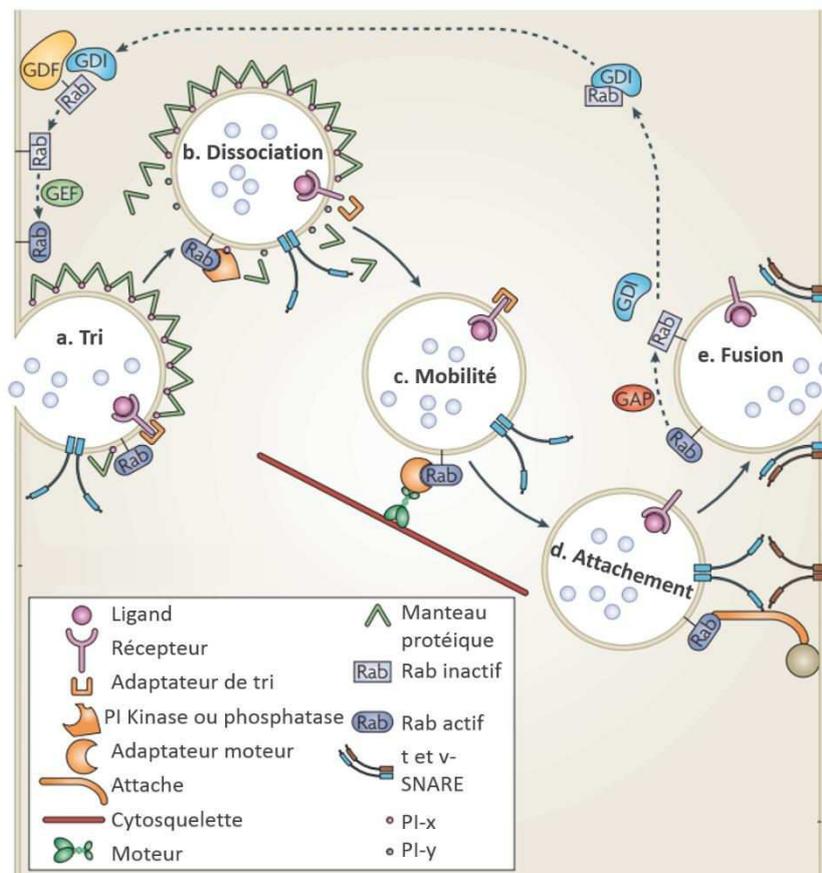


Figure 42: Les différentes fonctions des Rab dans le trafic vésiculaire. Les protéines Rab sont capables de contrôler *via* des effecteurs (en orange) les différentes étapes du trafic vésiculaire. a) Les protéines Rab peuvent activer les adaptateurs de tri afin de sélectionner les récepteurs à endocyper. b) Les Rab peuvent également recruter des phosphoinositides (PI) kinases ou phosphatases pour permettre une dissociation des protéines enveloppant la vésicule (grâce à la conversion de PI-x en PI-y). c) Les Rab sont capables de recruter des adaptateurs moteurs et médient ainsi le transport des vésicules le long des filaments d'actine ou des microtubules. d) les Rabs peuvent médier la fixation des vésicules en recrutant des facteurs d'attachement qui interagissent avec les molécules au niveau de la membrane acceptrice comme les SNARE (t et v-SNARE), ce qui entraîne la fusion membranaire. e) Après la fusion membranaire et l'exocytose, les Rab sont converties sous leur forme inactive (lié au GDP) par des GAP (en anglais : *GTPase-activating protein*) mais elles peuvent être de nouveau activées (lié au GTP) afin d'effectuer un nouveau cycle de trafic vésiculaire grâce à la GEF (en anglais : *guanine nucleotide exchange factor*) (**Stenmark, 2009**).

Les Rab sont, à l'heure actuelle, considérées comme des marqueurs moléculaires des différents compartiments membranaires de la cellule (Chavrier et al., 1990). Il existe plus de soixante protéines Rab chez les mammifères et les rôles de certaines d'entre elles ne sont toujours pas connus. Dans cette étude, nous nous focaliserons simplement sur certaines d'entre elles (pour revue: Hutagalung and Novick, 2011; Figure 43) :

- **Rab5** : est localisé sur les endosome précoces, les phagosomes, les caveosomes et sur la membrane plasmique. Il est impliqué dans la macropinocytose (avec Rab34), dans la maturation des phagosomes précoces (avec Rab14 et 22), dans l'endocytose des vésicules recouvertes de clathrines ainsi que dans la fusion de ces vésicules avec des endosomes précoces.
- **Rab4** : est localisé au niveau des endosomes précoces. Il est impliqué dans le recyclage rapide des endosomes précoces directement vers la membrane plasmique.
- **Rab 15** : est localisé sur les endosomes précoces et de recyclage. Il est impliqué dans le trafic des endosomes précoces vers les endosomes de recyclage.
- **Rab11** : est situé sur les endosomes de recyclage (avec Rab35). Il est impliqué dans la voie lente du recyclage vésiculaire et coordonne le transport de l'endosome à la membrane plasmique.
- **Rab7** : est associé aux endosomes tardifs, aux autophagosomes et aux lysosomes. Il intervient dans la maturation des endosomes tardifs, des phagosomes et dans leur fusion avec les lysosomes.
- **Rab9** : est également présent sur les endosomes tardifs où il joue un rôle dans le trafic de ces endosomes vers le TGN.

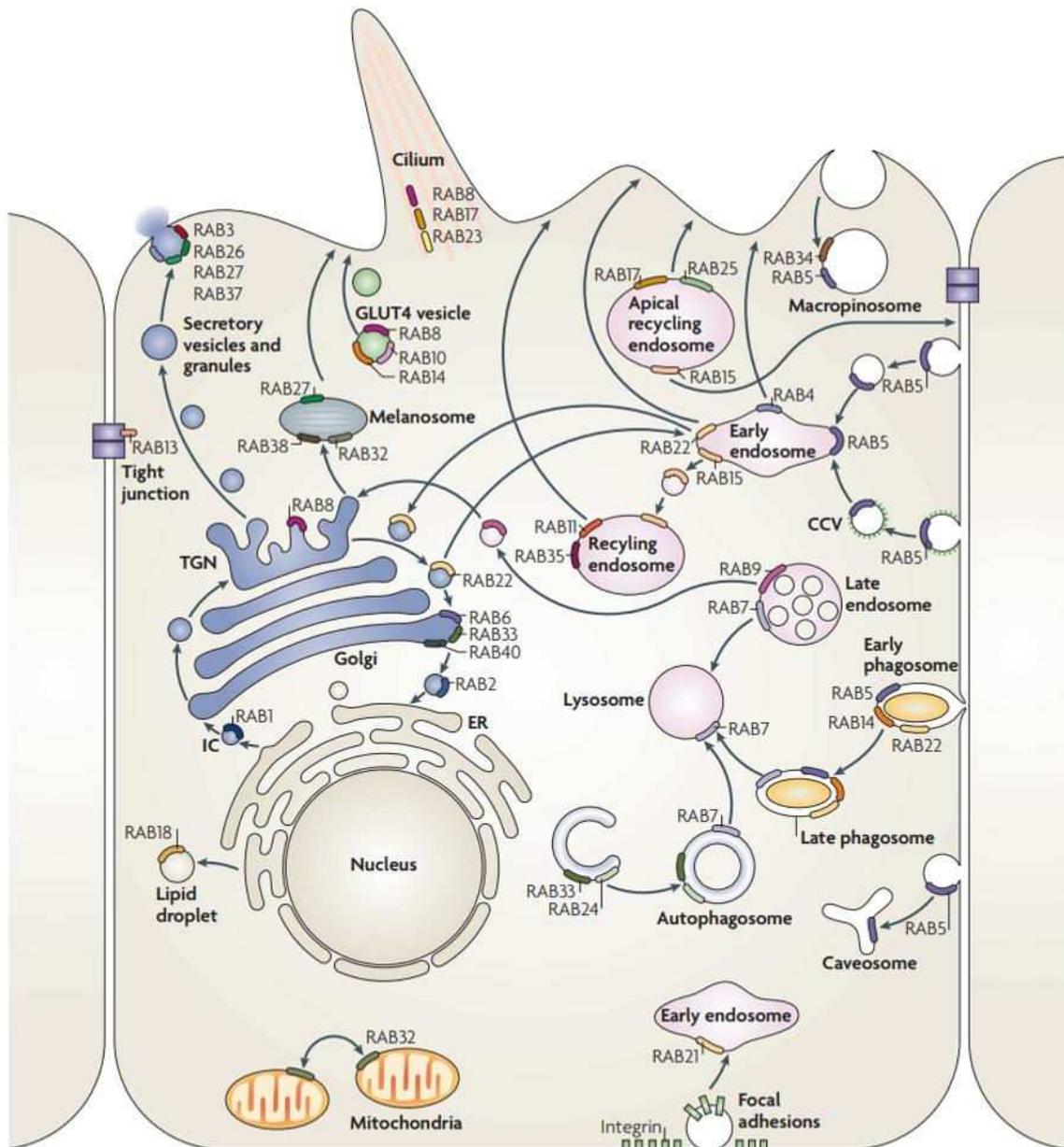


Figure 43: Localisation et fonction des protéines Rab dans le trafic vésiculaire. Schéma représentant une cellule épithéliale avec les différentes voies de transports vésiculaires et la localisation des protéines Rab GTPases. Les protéines extracellulaires peuvent être endocytées par différents mécanismes tels que l'endocytose dépendante de la clathrine (en anglais : *clathrin-coated vesicles* ou CCV) ou dépendante des cavéolines, par macropinocytose ou par phagocytose. En fonction du mode d'endocytose, les protéines se retrouvent soit dans des endosomes précoces (en anglais : *early endosome*), dans des caveosomes, macropinosomes ou dans des phagosomes (Rab5). Une fois endocytées, les vésicules sont soit recyclées soit dégradées. Le recyclage des vésicules peut s'effectuer de deux manières : soit elles sont recyclées rapidement à la membrane (Rab4) ou soit elles le sont plus lentement par l'intermédiaire d'endosomes de recyclage (Rab11 et Rab35). Les protéines non recyclées vont passer par les endosomes tardifs avant d'être dégradées par les lysosomes, les autophagosomes vont également être dégradés par les lysosomes (Rab7). Les molécules présentes dans les endosomes tardifs peuvent également être recyclées et passer par le réseau trans-golgi (en anglais : *trans-Golgi network* ou TGN) via des vésicules (Rab9). Rab8 est impliqué dans le trafic du TGN vers la membrane plasmique et les protéines Rab 3, 26, 27 et 37 sont impliquées dans la régulation de l'exocytose (Stenmark, 2009).

Pour résumer cette dernière partie, le trafic vésiculaire est un mécanisme essentiel et nécessaire pour la survie, la régulation et la communication cellulaire. Il est composé de voies d'exocytose, d'endocytose, de recyclage et de dégradation.

Au niveau neuronal, les protéines nouvellement synthétisées peuvent être libérées à la synapse par exocytose (*via* les SNARE dont les VAMP). Les neurones sont également capables d'endocyter des protéines (*via* les Rab). Une fois endocytées, elles sont soit dégradées par des lysosomes ou alors recyclées par des endosomes de recyclage afin d'être disponibles pour une nouvelle exocytose.

Les différentes voies de trafic intracellulaire permettent une distribution sélective des molécules internalisées vers différents compartiments intracellulaires. Ce système permet d'assurer un contrôle spatio-temporel des effets des diverses protéines cérébrales et leur permettant ainsi de réaliser leurs différentes fonctions.

Objectifs

Objectifs

Au sein du système nerveux central, le tPA est exprimé par de nombreuses cellules dont les neurones. A l'heure actuelle, le tPA est considéré comme un neuromodulateur car il est synthétisé par les neurones, libéré à la synapse suite à une dépolarisation neuronale, il peut interagir avec différents récepteurs post-synaptiques et il peut être recapturé par les astrocytes environnants. Le tPA est impliqué dans de nombreuses fonctions cérébrales qui peuvent être aussi bien bénéfiques (plasticité synaptique et survie neuronale) que délétères (mort neuronale excitotoxique). L'implication du tPA dans les processus de plasticité synaptique passe à la fois par une potentialisation de la neurotransmission glutamatergique (*via* une interaction avec les récepteurs NMDA) mais également par la maturation des neurotrophines (*via* la plasmine) dont le BDNF.

Au sein du système nerveux central, le BDNF joue un rôle essentiel dans la croissance et la survie des neurones ainsi que dans la plasticité synaptique. Cependant, il a été montré que le BDNF pouvait être libéré à la synapse sous deux formes : une forme précurseur (pro-BDNF) et une forme mature (mBDNF). De manière intéressante, ces deux protéines interagissent avec différents récepteurs possédant des effets opposés. Le pro-BDNF engendre des effets délétères sur les neurones alors que le mBDNF possède des rôles bénéfiques. Il existe plusieurs protéines capables de convertir le BDNF et donc de jouer un rôle dans la balance entre les effets bénéfiques et délétères de cette neurotrophine. Le tPA par l'intermédiaire de la plasmine permet cette conversion.

L'endocytose et l'exocytose de protéines sont des mécanismes essentiels dans la régulation et la communication cellulaires. L'exocytose est principalement régulée par les protéines SNARE dont les VAMP et l'endocytose par les protéines Rab. Les voies de trafic intracellulaire permettent une distribution sélective des molécules internalisées vers les compartiments de dégradation ou vers les compartiments de recyclage. Ce système assure alors un contrôle spatio-temporel des effets des différentes protéines cérébrales, leur permettant ainsi, de réaliser leurs différentes fonctions.

Mes travaux de thèse visent donc à caractériser la distribution neuronale du tPA ainsi que son trafic intracellulaire pour une meilleure compréhension de son implication dans les

mécanismes physiopathologiques. Pour cela, nous avons créé un nouveau plasmide codant pour une protéine fusion : le tPA-HaloTag® que nous avons fait surexprimé, *in vitro*, par des neurones corticaux. A l'heure actuelle, très peu d'études se sont intéressées au tPA neuronal ; les résultats de ces différents travaux suggèrent qu'il est :

- Exprimé par les neurones ;
- Principalement exprimé par les neurones glutamatergiques ;
- Présent dans des vésicules synaptobrevine 2 (VAMP2) ;
- Libéré à la synapse suite à une dépolarisation neuronale ;
- Capable de cliver le BDNF *via* la formation de plasmine.

Les questions que nous nous sommes posées sont les suivantes :

- Le tPA est-il exprimé différemment au niveau des axones et des dendrites ?
- Le tPA est-il exprimé différemment entre le compartiment pré et post-synaptique ?
- Quel est le mode de transport neuronal du tPA ?
- Le tPA peut-il être endocyté ? Si oui, quel est son trafic vésiculaire intracellulaire ?
- Le tPA est-il présent dans les mêmes vésicules que le BDNF ?

Ces travaux ont donné lieu à la rédaction d'une publication : « *Neuronal tissue-type plasminogen activator (tPA) with brain-derived neurotrophic factor (BDNF) are transported in the same vesicular cargoes in neurons* » qui est en cours de préparation.

Résultats

Article 1: Neuronal tissue-type plasminogen activator (tPA) with brain-derived neurotrophic factor (BDNF) are transported in the same vesicular cargoes in neurons.

L'activateur tissulaire du plasminogène (tPA) et le facteur neurotrophique issu du cerveau (BDNF) sont transportés dans les mêmes vésicules neuronales.

Article en cours de préparation

Contexte bibliographique :

L'activateur tissulaire du plasminogène (tPA) est une serine protéase qui a initialement été découverte dans le compartiment vasculaire pour son implication dans la fibrinolyse. Cependant, le tPA est également exprimé par les différentes cellules du parenchyme cérébral dont les neurones où il peut avoir des rôles aussi bien bénéfiques sur la modulation de la signalisation et la plasticité synaptique, que délétères dans les processus de mort neuronale excitotoxique.

Objectifs de l'étude :

Au cours de cette étude, nous avons voulu mieux comprendre comment le tPA pouvait avoir des effets opposés sur les neurones. Pour cela, nous avons examiné sa distribution, son transport et son trafic vésiculaire au niveau neuronal.

Principaux résultats :

- ✓ Les vésicules de tPA sont davantage statiques dans les dendrites que dans les axones ;
- ✓ Le tPA est présent dans des vésicules d'exocytose VAMP2 dans les axones et les dendrites ;
- ✓ Le tPA est majoritairement libéré par le compartiment post-synaptique;
- ✓ Le tPA est endocyté par des vésicules Rab5, recyclé par des vésicules Rab11 et dégradé par des vésicules Rab7 ;
- ✓ Le tPA et le BDNF sont transportés et leur trafic s'effectue dans les mêmes vésicules synaptiques.

Neuronal tissue-type plasminogen activator (tPA) with brain-derived neurotrophic factor (BDNF) are transported in the same vesicular cargoes in neurons.

Sophie LENOIR¹, Alexandre VARANGOT¹, Laurent LÉBOUVIER¹, Volkmar LESSMANN², Thierry GALLI³, Yannick HOMMET^{1*} and Denis VIVIEN^{1,4*}

Affiliations:

¹ Normandie Université, UNICAEN, INSERM, UMR-S U1237, Physiopathology and Imaging of Neurological Disorders (PhIND), 14000 Caen, France.

² Institut für Physiologie, Otto-von-Guericke-Universität, Medizinische Fakultät, Leipziger Str., 39120 Magdeburg, Germany

³ Membrane Traffic in Healthy & Diseased Brain, Center of Psychiatry and Neurosciences, INSERM U894, Sorbonne Paris-Cité, Université Paris Descartes, 75014 Paris, France

⁴ CHU Caen, Department of Clinical Research, Caen University Hospital, Caen, France.

* Equal contribution.

Corresponding Author Information:

Denis VIVIEN, PhD

INSERM UMR-S U1237 “Physiopathology and Imaging of Neurological Disorders”, University Caen Normandie, GIP Cyceron, Bd Becquerel, BP5229, 14074 Caen, France.

Phone, fax and e-mail: +33 2 31 47 01 66, +33 2 31 47 02 22, vivien@cyceron.fr

Running title: Neuronal co-trafficking of tPA and BDNF

Keywords: tPA, BDNF, neurons, trafficking, vesicles

ABSTRACT

The serine protease tissue-type Plasminogen Activator (tPA) is known to modulate synaptic signaling and plasticity. Neurons are a known source of tPA in the brain parenchyma. Understanding the mechanisms regulating the neuronal trafficking of tPA is required to further understand how tPA controls synaptic plasticity. Using high-resolution live cell imaging, we demonstrate that tPA is contained in endosomal vesicles in both dendrites and axons. Both populations (axonal vs dendritic) of tPA-containing vesicles differ in their dynamic with dendritic tPA containing-vesicles being mainly static at the synapse and axonal vesicles highly mobile. Exocytosis of tPA containing-vesicles occurs mainly in post-synaptic compartments. tPA was further found to be co-transported with Brain-Derived Neurotrophic factor (BDNF), a key modulator of neuronal survival and brain plasticity that can be proteolytically activated by tPA. In conclusion we evidence that tPA and BDNF are co-transported in neurons and co-released by neuronal dendrites.

INTRODUCTION

Tissue-type plasminogen activator (tPA) is a serine protease which was first shown to be produced by endothelial cells and released in the blood stream, where it plays roles in clotting and fibrinolysis (Astrup and Stage, 1952). Most of its vascular functions are associated with its ability to promote the conversion of plasminogen, bound to fibrin or cells, into plasmin (Hoylaerts et al., 1982). In the brain parenchyma, tPA is expressed in neurons and possibly a subset of glial cells (Hultman et al., 2008). It is involved in cell migration, neuronal plasticity, neuronal survival, maintenance of blood-brain barrier integrity and control of inflammatory processes (Hébert et al., 2016). When released into the extracellular space, tPA mediates generation of plasmin which in turn regulates the degradation of the extracellular matrix (Baricos et al., 1995) and the conversion of growth factors, chemokines precursors, neurotrophins into their active forms (Bruno and Cuello, 2006; Lee et al., 2007; Rodier et al., 2014; Su et al., 2008). Among them, tPA is well known to promote the activation of pro-BDNF (Brain-Derived Neurotrophic Factor) into its mature form (m-BDNF) through a plasmin-dependent mechanism (Pang et al., 2004). tPA can also bind to various receptors including the N-methyl-D- aspartate receptor (NMDAR), the low-density lipoprotein receptor-related protein (LRP), Platelet Derived Growth Factor-CC and annexin-II (Nicole et al., 2001; An et al., 2008; Su et al., 2008; Hajjar et al., 1994). tPA is thus now considered as a neuromodulator and the mechanisms that govern its distribution at the synapse should play an important role. As such, we showed in a previous study (Fernández-Monreal et al., 2004) that tPA released by neurons upon depolarization is recaptured by astrocytes, through a LRP-dependent mechanism. In turn, astrocytes can release tPA at the synaptic cleft by a mechanism dependent on the concentration of extracellular glutamate (Cassé et al., 2012). More recently, we revealed that, when released from neurons, the tPA can promote the conversion of pro-BDNF into m-BDNF by a mechanism dependent on the activation of plasminogen bound to the surface of astrocytes (Briens et al., 2017; Pang et al., 2004). These data are in agreement with previous investigations suggesting that neuronal BDNF and tPA could be co-released at the synaptic cleft (Lochner et al., 2008).

Although tPA was reported to be present at the synapse (Wu et al., 2015), co-immunisolated with synaptobrevin-2 (VAMP-2) positive vesicles (Louessard et al., 2016), associated with an increased synaptic endocytosis (Yepes et al., 2016), the mechanisms that govern its neuronal

trafficking are largely unknown. The present study attempted to examine in detail the neuronal trafficking of tPA. The results indicate that: (i) tPA is present in synaptic vesicles (VAMP-2 positives) in axons and dendrites; (ii) although pre-synaptic tPA containing-vesicles are static and apparently docked at the synapse, axonal tPA containing-vesicles are highly dynamics; (iii), the release of tPA containing vesicles is mainly post-synaptic and (iv) the recapture of synaptic tPA driven by rab-5 (early endosome), their degradation driven by rab-7 (late-endosome) and their recycling driven by rab-11 positive endosomes. tPA was further found to be co-transported with Brain-Derived Neurotrophic factor (BDNF). Altogether, we evidence that tPA and BDNF are co-transported in neurons and co-released by neuronal dendrites.

RESULTS

Axonal and dendritic trafficking of tPA. In order to track endogenous neuronal tPA in live cells, we inserted an HaloTag[®] at its C-terminal end (tPA-HaloTag[®], Fig. 1-A). Several control experiments were performed to validate this new construct. When expressed in HEK-293 cells tPA-HaloTag[®] was detected by either the "HaloTag[®] TMR fluorescent Ligand" or an antibody against tPA (Fig. 1-B). Accordingly, a recombinant proteolytically active tPA-HaloTag[®] was detected in transfected HEK-293 cells (69 kDa for tPA plus 33 kDa for the HaloTag[®]) (Fig. 1-D) and revealed with antibodies raised against either tPA or HaloTag[®] (Fig. 1-C). Control experiments were also performed from cortical and hippocampal mouse neuronal cultures (Fig. 1-E and Suppl. Fig. 1-A), confirming the neuronal expression of tPA-HaloTag[®], revealed either by the HaloTag[®]TMR Ligand or with an antibody raised against tPA. Expression of tPA-HaloTag[®] were driven either by the synaptophysin neuronal specific promoter (pSyn) or a viral promoter (pCMV (CytoMegalovirus)), with similar profiles of expression (Suppl. Fig. 1-B). Similarly, the position of the HaloTag[®], either N-terminal or C-terminal of tPA did not change its neuronal distribution (Suppl. Fig. 1-C).

We then aimed to determine whether or not the expression of neuronal tPA was polarized. Primary cultures of mouse cortical neurons (20 DIV) were transiently transfected for 48 hours with the pCMV_tPA-HaloTag[®] plasmid, and subjected to immunostainings of either MAP2 (microtubule-associated protein 2) or tau (tubulin-associated unit) (Fig. 2-A). We found the presence of tPA in dendrites (MAP2 and tau positive) and axons (tau positive only), with a mean number of 86 of tPA-HaloTag[®] puncta per 100µm in dendrites versus 59 puncta per 100µm in axons (n=22 neurons and n=15 neurons respectively, from 6 individual experiments, p=0.0065). The distribution of neuronal tPA was thus not fully polarized, although the number of tPA dots was twice larger in dendrites than axons (Fig. 2-B). We then investigated the motility of tPA-containing vesicles in axons and dendrites (Fig. 3-A). Kymograph analyses of the trajectories showed that tPA-containing vesicles moved bidirectionally in axons and dendrites (Fig. 3-B and 3-C). Interestingly, the velocity of vesicles, both retrograde and anterograde, was higher in axons than in dendrites (Fig. 3-D) (anterograde: 1.21 µm/s in axon versus 0.94 µm/s in dendrites; p=1.4.10⁻⁵ (270 and 209 vesicles respectively), and retrograde: 1.24 µm/s in axons versus 0.86 µm/s in dendrites p=2.15.10⁻¹⁵ (278 and 317 vesicles respectively), n=5 and 7 neurons respectively from 9 individuals experiments). The number of

mobile vesicles was higher in axons (mainly retrograde) than dendrites (anterograde: 8 vesicles/min in axons versus 5 vesicles/min in dendrite; $p=0.370$ and retrograde: 13 vesicles/min in axon versus 6 vesicles/min in dendrites; $p=0.028$, $n=5$ and 7 neurons respectively from 9 individual experiments) (Fig. 3-E-F). Interestingly, although almost all axonal tPA-containing vesicles were mobile, nearly 1 out of 2 vesicles in dendrites were stationary (mobile/stationary: for axons: 88%/12%, for dendrites: 57%/43%) (Fig. 3-G) ($n=10$ neurons for axons and $n=7$ neurons for dendrites, from $N=6$ experiments). To characterize further the location of tPA at the synapse, neurons were co-transfected with a vector encoding for the postsynaptic marker GFP-homer-1C and immunostained for the presynaptic marker synapsin (Fig. 4-A). We found that 32 % of synapses were tPA-positive ($n=21$ neurons from 6 individual experiments, $p<0.0001$, Fig. 4-B). Furthermore, 55% of synaptic tPA was located post-synaptically, as shown in neurons immunostained for homer-1C and synapsin (Fig. 4-C-E, $n=10$ neurons from 2 individual experiments, $p=0.025$).

tPA is contained in VAMP2-family positive vesicles. Trafficking of synaptic vesicles includes their formation, intracellular movement and exocytosis. Each of these processes is driven by dedicated proteins, named V-SNARE (Vesicular Soluble N-ethylmaleimide-sensitive-factor Attachment protein) (Chaîneau et al., 2009). VAMP2 (aka Synaptobrevin 2) is the main v-SNARE of synaptic vesicles and VAMP3 (aka Cellubrevin) is expressed in astrocytes and transiently in migrating Cajal Retzius cells (Barber, Curr Biol 2015). When expressed in the same cells, VAMP2 and VAMP3 share similar function in exocytosis (Chilcote, JCB 1995). Neurons (DIV 20) expressing tPA-HaloTag[®] were thus co-transfected with GFP-tagged VAMP-2 (Fig. 5-A) and VAMP-3 (Fig. 5-C) and subjected to immunostaining against MAP-2. In axons, VAMP-2-GFP positive spots co-localized with 39% of the total tPA puncta (Pearson's coefficient $r=0.687$). In dendrites VAMP2-GFP positive spots co-localized with 48% of the total tPA puncta ($r=0.740$) (Fig. 5-B; $n=6$ and $n=10$ neurons respectively from 6 individual experiments, $p=0.125$). The presence of VAMP-2 positive vesicles containing tPA was confirmed by using high resolution STED imaging (Fig. 5-E). Accordingly, VAMP-3-GFP co-localized with 53% ($r=0.839$) and with 36% ($r=0.838$) of total tPA puncta in axons and in dendrites respectively (Fig. 5-D; $n=11$ and 13 neurons respectively from 6 individual experiments, $p=0.03$). We then engineered a dual color reporter HaloTag[®]-tPA-SEP construct with the pH sensitive GFP variant superrecliptic PHluorin (SEP) as a sensor of tPA-containing

vesicles exocytosis (Fig. 6-A-B). Control treatment with ammonium chloride to buffer HaloTag®-tPA-SEP-containing vesicles led to the switch of GFP negative tPA-containing vesicles (normally acid) to GFP positive tPA-containing vesicles (NH₄Cl inducing capture of protons), as previously reported (Shen et al., 2014) (Suppl. Fig. 2). Using live cell imaging (Fig. 6-C) we observed that, under resting conditions, the constitutive exocytosis of tPA was higher in dendrites than axons (9 SEP positive vesicles per 100µm in dendrites versus 4 in axons, n=18 and n=13 neurons respectively from 9 individuals experiments, p=0.004) (Fig. 6-D-E).

Synaptic tPA can be recaptured, degraded and recycled. Additional experiments were performed by co-expressing GFP-Rab5 (early endosome), CFP-Rab7 (late endosome) or GFP-Rab11 (recycling endosome), which play complementary functions in recycling of synaptic molecules (Stenmark, 2009). We found colocalization of tPA-HaloTag® and: 1/GFP-Rab5 puncta in axons (42% of the total tPA puncta, r=0.822) and dendrites (36% of the total tPA puncta, r=0.649) (Fig. 7-B-C; n=3 and n=8 neurons respectively from 4 individual experiments, p=0.414), 2/CFP-Rab7 in axons (18% of the total tPA puncta, r= 0.833) and dendrites (16% of the total tPA puncta, r=0.761) (Fig. 7-D-E; n=3 and n=10 neurons respectively from 4 individual experiments, p=0.735) and 3/GFP-Rab11 in axons (57% of the total tPA puncta, r=0.720) and dendrites (44% of the total tPA puncta, r=0.671). (Fig. 7-F-G; n=6 and n=7 neurons respectively from 2 individual experiments, p=0.253). There was no difference in the number of either Rab5-, Rab7- or Rab-11- positive vesicles containing tPA between axons and dendrites (Fig. 7-H). Therefore, tPA appeared to localize to a large extent in the endosomal pathway both in axons and dendrites.

Co-packaging and co-trafficking of tPA with BDNF. The distribution and trafficking of tPA appeared similar to those previously reported for BDNF (Bucci et al., 2014; Shimojo et al., 2015). We thus hypothesized that tPA and BDNF may be co-packaged within neuronal vesicles and co-released at the synaptic cleft. We thus co-transfected cultured cortical neurons (DIV 20) with vectors encoding for tPA-HaloTag® and BDNF-GFP, followed by immunocytochemistry for MAP2 (Fig. 8). Confocal analyses revealed co-localization of tPA and BDNF in dendrites and axons (67% of the total tPA puncta colocalized with BDNF in axons, n=6 and 59% in dendrites, n=6 from 3 independent experiments; p=0.873, with a Pearson's coefficient r=0.778 and r=0.786 respectively) (Fig. 8-A-B). No difference in the number of tPA and BDNF positive vesicles was revealed between axons and dendrites (p=0.150, Fig. 8-C).

Control experiments, using immunocytochemistry to reveal pro-BDNF were performed to confirm that the GFP labelling matched with the presence of the protein BDNF (Suppl Fig. 3). Additional experiments were performed in which co-transfections of tPA-HaloTag® and BDNF-GFP were followed by immunostainings of the pre-synaptic marker synapsin and the post-synaptic marker homer-1C, demonstrating a pre- and post-synaptic co-packaging of tPA and BDNF (Fig. 8-D). Parallel experiments combining co-transfection of tPA-HaloTag®, BDNF-CFP and either GFP-VAMP-2, VAMP-3-GFP, Rab-5-GFP, Rab-7-CFP or Rab-11-GFP further confirmed the notion of a neuronal vesicular co-packaging of tPA and BDNF and recapture (Suppl. Fig. 4). Using high-resolution STED imaging (Fig. 8-E), we consistently confirmed that tPA and BDNF were present in the same vesicles. Confocal time lapse imaging followed by analyses of the kymographs also revealed anterograde and retrograde co-transport of tPA and BDNF containing vesicles (Fig. 8-F). Altogether these data demonstrate that tPA was co-packaged and co-transported with BDNF. Accordingly, tPA was found necessary to mediate activation of pro-BDNF into m-BDNF (plasmin mediated) (suppl. Fig. 5).

Discussion

Neurons represent an ultimate example of polarized cells with a complex network of membrane trafficking pathways which is necessary to allow efficient communication over long distances (Goldstein and Yang, 2000). Axonal and dendritic transports are essentials for neuronal survival and maturation. One of the most convincing demonstrations of the crucial role of axonal transport in neuronal homeostasis is the causal link between defects in this process and neurodegeneration (Holzbaur, 2004). tPA was reported in cortical and hippocampal neurons (Lochner et al., 2006) and possibly presents in a subset of pyramidal glutamatergic neurons (Louessard et al., 2016). tPA was identified in the presynaptic terminals within clear-core synaptic vesicles in direct contact with the presynaptic membrane (Lochner et al., 2006). A previous study also indicated that tPA could activate the mechanism of synaptic vesicles endocytosis (Wu et al., 2015).

In the present study, by studying the intra neuronal dynamics of tPA in live cortical neurons, we showed that tPA is stored in VAMP-2 positive vesicles in axons and dendrites. VAMP-2 is known to mediate the exocytosis of synaptic vesicles in neurons and neuroendocrine cells (Schiavo et al., 1992). Although highly dynamic in axons, tPA-containing vesicles are mainly static in dendrites, possibly docked at the post-synapse prior to their release. Accordingly, measure of the exocytosis of tPA containing-vesicles, using a pH sensitive probe, revealed that the constitutive release of tPA is mainly post-synaptic. tPA also colocalizes with Rab5, Rab7 and Rab11 to a large extent, in favor of a mechanism of neuronal endocytosis, including early and late endosomes, possibly a recycling pathway by exocytosis of tPA (Stenmark, 2009). It is then interesting to note that such distributions have also characteristic features of the trafficking of neuronal BDNF (Bucci et al., 2014; Shimojo et al., 2015). We can thus postulate, that VAMP-2 (possibly VAMP-3 during development) tPA-containing synaptic vesicles are driven a constitute post-synaptic release of tPA at the synapse, then allowing tPA to bind with its previously reported neuronal receptors, LRP (An et al., 2008), Annexin-II (Hajjar et al., 1994) and NMDA receptors (Lopez-Atalaya et al., 2008) to mediate its neuronal functions (Chevilley et al., 2015).

tPA was first shown to be produced and released in the circulation by endothelial cells, where it plays roles in inflammation and fibrinolysis (Zhang et al., 1999; Hoylaerts et al., 1982). In

addition to its roles in the vascular system, tPA plays crucial functions in the central nervous system (CNS) acting either as an enzyme or a growth-factor-like molecule. Thus, tPA is involved in several physiological and pathological CNS processes, including learning and memory, anxiety, epilepsy, stroke, Alzheimer's disease (Baranes et al., 1998; Madani et al., 1999; Pawlak et al., 2003; Qian et al., 1993; Alvarez et al., 2013; Oh et al., 2014). Its neuronal functions are achieved through plasminogen-dependent or plasminogen-independent effects (Melchor and Strickland, 2005). For instance, tPA-mediated generation of plasmin controls the conversion of the pro-brain-derived neurotrophic factor (pro-BDNF) into its mature form (Pang et al., 2004). Here, we demonstrate the neuronal co-packaging and co-trafficking of tPA and BDNF. These data are critical in the understanding of the functions of tPA in the central nervous system. When co-released at the synaptic cleft, tPA, by activating plasminogen-bound astrocytes (Briens et al., 2017), may directly contribute to the generation of active BDNF. These data are in agreement with previous report demonstrating the presence of BDNF (pro and mature) in large core dense synaptic vesicles (Dieni et al., 2012), a type of vesicles known to be involved in constitutive release processes (Kim et al., 2006; Meldolesi et al., 2004). Similarly, the co-packaging of tPA and BDNF was proposed based on co-localization assays (Lochner et al., 2008), without further description of the mechanisms or of the traffic pathways involved. At the synapse, pro-BDNF and mature BDNF are known to activate respectively p75^{NTR} and TrkB to mediate opposite effects (Lu et al., 2005). It is thus interesting to note that tPA and BDNF share a number of common functions in the central nervous system, including regulation of NMDA receptor signaling (Caldeira et al., 2007; Nicole et al., 2001), long-term potentiation (LTP) and long-term depression (LTD) (Patterson et al., 1996; Woo et al., 2005; Qian et al., 1993), learning and memory processes (Madani et al., 1999; Obiang et al., 2012; Tyler et al., 2002; Yamada et al., 2002), neuronal survival (Huang and Reichardt, 2001; Lee et al., 2002; Lemarchand et al., 2016; Liot et al., 2006; Wu et al., 2013) and death (Reddrop et al., 2005; Stary et al., 2015) and anxiety behavior (Pawlak et al., 2003; Martinowich et al., 2007). Thus, our data suggest that tPA could be a direct regulator of the balance of effects of pro-BDNF and BDNF at the synapse (Nagappan et al., 2009). Also interesting our data evidence that the axonal transport of tPA is mainly retrograde, possibly in agreement with its reported neuronal pro-survival functions (Correa et al., 2011; Liot et al., 2006; Wu et al., 2013). In particular, key components of retrograde transport routes, which are responsible for the targeting of neurotrophins and their survival signals to the soma, such

as described for BDNF (Ayloo et al., 2017; Kononenko et al., 2017), have been associated with diseases in humans and mice (Liot et al., 2013). Despite the importance of these axonal compartments, little is known about their nature and the machinery regulating retrograde transport in neurons. Interestingly, both tPA and m-BDNF levels are impaired with aging (Cacquevel et al., 2007; Lommatzsch et al., 2005) and thus associated with impaired synaptic plasticity and neuronal functioning (Bi Oh et al., 2015; Erickson et al., 2010).

In conclusion, our data provide important information about the trafficking of neuronal tPA, allowing a better understanding of how the tPA could contribute to neuronal functions and dysfunctions and thus opening new avenues of research in the field (Fig. 9). Our discovery of a neuronal co-packaging and co-trafficking of tPA and BDNF provide also important insights into the understanding of the mechanisms by which these two molecules may contribute to neuronal fate in healthy and disease brains.

Materials and Methods

Reagents. Recombinant human tPA (Actilyse®) was purchased from Boehringer Ingelheim (Ingelheim am Rhein, Germany). Fetal bovine serum, horse serum, lipofectamine® 2000 reagent, B27 supplement, glutamine, laminin, neurobasal medium and penicillin/streptomycin were purchased from ThermoFisher (Waltham, Massachusetts, USA). Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM), poly-D-lysine, phosphate-buffered saline (PBS), paraformaldehyde, albumin from bovine serum, ammonium chloride (NH₄Cl) and rabbit polyclonal antibody were purchased from Sigma-Aldrich (St Louis, MO, USA). Aprotinin (Trasylol) was purchased from Bayer (Leverkusen, Germany). HaloTag® TMR ligand was purchased from Promega (Madison, Wisconsin, USA). Human Embryonic Kidney HEK-293 cells were purchased from ATCC (Teddington, UK). The following primary antibodies were used for immunocytochemistry: mouse monoclonal anti-HaloTag® (dilution 1:1000; Promega; G9211) rabbit anti-tPA polyclonal antibody (dilution 1:1 500; generous gift from R. Lijnen, Leuven), chicken anti-*Microtubule-associated protein 2 (MAP2)* polyclonal antibody (dilution 1:8 000; Abcam, Cambridge, UK; ab5392), rabbit anti-tau polyclonal antibody (dilution 1:500; Abcam; ab64193), guinea pig anti-synapsin polyclonal antibody (dilution 1:500; Synaptic System; 106 004), rabbit anti-homer1 polyclonal antibody (dilution 1:500; Synaptic System; 160 003) and rabbit anti-proBDNF polyclonal (dilution 1:1 000; alomone labs; ANT-006). Primary antibodies were used for immunoblotting are: anti-tPA (dilution 1:10 000; rabbit polyclonal antibody; abcam; ab62763) and anti-HaloTag® (dilution 1:1000; mouse monoclonal antibody; Promega; G9211). Secondary fluorescent antibodies (Alexa647 or Cy2; dilution 1:800) were purchased from Jackson ImmunoResearch (Bar Harbor, ME, USA) and secondary peroxidase antibodies for immunoblotting: anti-mouse (IgG A9044 1:80 000), anti-rabbit (IgG A0545 1:80 000) from Sigma-Aldrich (St Louis, MO, USA).

Plasmid constructs. The cDNA encoding for amino acids 1 to 32 of the peptide signal of human tPA was amplified from the full-length human tPA cDNA. The corresponding Polymerase Chain Reaction (PCR) product was subcloned into the eukaryotic expression plasmid pCDNA5.1 between NheI and BamHI. Then, the full length coding sequence for mature human tPA was PCR amplified and subcloned downstream of the "peptide signal - 6xHis" between BamHI and

XhoI restriction sites to generate a cDNA encoding for the mature 6xHis human tPA (tPAwt). The cDNA of HaloTag[®] without the Tobacco Etch Virus protease (TEV) cleavage site was PCR amplified from the plasmid pFC14A (Promega, France) and subcloned into pCDNA5.1-tPA between the end of the sequence encoding for tPA and the STOP codon at the end of the HaloTag[®], then fused in BamHI between the His-tag and the beginning of the cDNA for tPA (HD-Fusion technologies from Clontech, USA). For synapsin promote-driven constructs, we replaced the CMV promotor of the plasmid pCI by the cDNA of the synapsin promotor subcloned between BglII and NheI. For pCMV_HaloTag[®]-tPA-SEP, the cDNA encoding for the pH sensitive GFP (pHluorin) was subcloned by fusion into pCMV_HaloTag[®]-tPA between the end of the sequence of tPA and the STOP codon. pCMV_BDNF-GFP was provided by Volkmar Lessmann (Magdeburg, Germany) and the constructs pCMV_GFP-Homer-1C, pCMV_GFP-VAMP, pCMV_GFP-Rab, pCMV_CFP-Rab and pCAG_RFP were provided by Thierry Galli (Paris, France). pPLAT_GFP was purchased from Genecopoeia (Rockville, Maryland, USA). All the constructs were amplified in Escherichia coli DH5 α cells and purified by a Nucleobond endotoxin-free plasmid DNA PC 2000 kit (Macherey-Nagel) according to the manufacturer's instructions.

Labelling of pro-BDNF with fluorescent Alexa. As Alexa Fluor succinimidyl esters react with primary amines, recombinant pro-BDNF was first dialysed at 4 °C overnight against sodium bicarbonate buffer (NaHCO₃ 0.1 m, Tween-80 0.1%, pH 8.4) to remove non-proteinaceous molecules containing primary amines. Then, the purified protein was mixed with the *N*-succinimidyl ester of Alexa⁴⁸⁸ for 4 h at 4 °C with continuous stirring. The resulting solution was dialysed in bicarbonate buffer overnight at 4 °C to remove unbound dye. Afterwards, Alexa-labelled pro-BDNF (pro-BDNF⁴⁸⁸) was frozen and stored at -80 °C until further use.

Immunoblotting. Fluorescence of fifteen micrograms of pro-BDNF⁴⁸⁸ and its cleavage product mBDNF⁴⁸⁸ were directly visualized in a 4-15% polyacrylamide gel using ImageQuant LAS 4000 Camera (GE Healthcare, Chicago, IL, USA). Fifty nanograms of tPA (Actilyse[®]), tPA-HaloTag[®] (coming from tPA-HaloTag[®]-transfected HEK cells) were loaded in 10% polyacrylamide gel. Polyacrylamide gels were then transferred on a PVDF membrane and immunoblotting with

the primary antibodies. After incubation with the secondary antibodies, proteins were visualized with an enhanced chemiluminescence western blot detection reagent (ECL Prime Western Blotting System; GE Healthcare; RPN2232) using ImageQuant LAS 4000 Camera.

Fibrin-agar zymography assay. The presence of active tPA-HaloTag[®] (coming from tPAHaloTag[®]-transfected HEK-293 cells) was detected by direct fibrin autography following sodium dodecylsulphate polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) performed as previously described (Gaussem et al., 1993). Fifty nanograms of purified tPA-HaloTag[®] and Actilyse[®] (control) were subjected to SDS electrophoresis (10% polyacrylamide gels, under non-reducing conditions). SDS was then exchanged with 2.5% Triton X-100. After washing off excess Triton X-100 with distilled water, the gel was carefully overlaid on a 1% agarose gel containing 1 mg/mL bovine fibrinogen, 100 nM plasminogen and 0.2 NIH U/mL of bovine thrombin. Zymograms were allowed to develop at 37°C for 12h and photographed at regular intervals using dark-ground illumination.

Cell cultures. Primary cultures of cortical or hippocampal neurons were prepared from fetal mice (embryonic day 14) as previously described (Buisson et al., 1998). Cortices or hippocampi were dissected and dissociated in DMEM and plated (250 000 cell/ mL) on glass bottom microwell dishes (MatTek Corporation, P35G-1.5-14-C, Ashland, MA, USA) earlier coated with poly-D-lysine (0.1mg/ml) and laminin (0.02mg/ml). Cells were cultured in Neurobasal Medium supplemented with 0.4 mM of glutamine, 2% B27 supplement 50X, 10% horse serum and penicillin/streptomycin (10 000 IU/ml; 10 000 UG/ml). After 1 h, media were replaced by conditioned medium (Neurobasal Medium supplemented with 0.4 glutamine, 2% B27 supplement 50X and penicillin/streptomycin (10 000 IU/ml; 10 000 UG/ml) obtained from primary cultures of astrocytes. Cultures were maintained at 37 °C in a humidified 5% CO₂ atmosphere.

Neuronal transfection. Transfections were performed at Day In Vitro (DIV) 12 or DIV 20. Neuronal cultures were washed with HEPES and Bicarbonate Buffered Salt Solution (HBBSS; NaCl: 116mM, KCl: 5.4mM, CaCl₂: 1.8mM, MgSO₄: 0.8mM, HEPES: 12mM, NaH₂PO₄: 0.34mM,

D-glucose: 5.5mM, NaHCO₃: 25mM and Glycine: 10μM) prior a 8 hours incubation in the presence of the mentioned cDNAs and lipofectamine[®] 2000-containing HBSS, HBSS is then replaced by regular media as described above (cell cultures section).

HaloTag[®] TMR ligand addition. After 24-48h, neuronal cultures were washed with HBBSS, HaloTag[®] TMR ligand was added during 15 minutes and neuronal cultures were washed again with HBBSS (to remove unbound ligand).

Immunocytochemistry. Neuronal cultures were washed with HBBSS, fixed in paraformaldehyde 4% for 20 min at room temperature, washed in PBS (0.1M) and blocked 1 h in PBS containing 0.3% Triton X100 and albumin (4%). The primary and secondary fluorescent antibodies were used (see reagent section) and confocal laser-scanning microscopy was performed (see the next section).

Laser scanning confocal microscopy. Laser-scanning confocal microscopy (LSCM) was performed using an inverted Leica SP5 confocal microscope (Leica Microsystems SAS; Leica, Wetzlar, Germany) equipped with an Argon Gas laser and a X40 NA=1.3 oil immersion objective. Culture was scanned at room temperature with 458-, 488-, 561, 633-nm, laser lines to detect the CFP, GFP or SEP or Cy2, HaloTag[®]TMR ligand and Alexa647, respectively and high-resolution images (1024 x 1024, 12bits) of optical sections (z stack, step: 0.45μm) were captured using sequential line (mean of three) scanning. Colocalizations of two or three fluorophores were qualitatively assessed in the x, y, and z planes of each optical section. Maximal projection images of confocal z series (stacks) were generated where indicated in the figure legends. Minimal adjustments to image contrast and intensity were made in ImageJ software using the levels or contrast/brightness functions.

Live imaging. Time-lapse images were collected at a 512 × 512-pixel resolution (8 bit). A short interval (0.648 s) for a total of 465 images in a non-sequential mode was used to maximize vesicles resolution trajectories. A relatively low laser intensity was used to minimize laser-

induced cellular damage. All acquisitions were performed using a temperature control system (“cube & box”, life imaging services, Basel, Switzerland) at 37°C.

STED microscopy. Confocal and STED images were acquired with a Leica TCS SP8 Confocal/STED 3× microscope with an oil-immersion 100×, 1.44-N.A. objective. Dual-color sequential confocal scans were followed by dual-color sequential STED scans by using a STED microscope. HaloTag®TMR ligand and GFP were excited with 555-nm and 488-nm white light lasers, respectively, at 2–5% of laser power in this particular order. During STED scanning, GFP and HaloTag®TMR ligand signals were depleted with 592 nm and 660 nm time-gated depletion lasers.

Images analysis. Confocal images were analyzed with the ImageJ software. The numbers of vesicles per μm (Fig. 2, 5-8) were analyzed with the “cell counter” (for the number of puncta) and “straight line” functions (for the distance). Localization of tPA-HaloTag® at the synapse was determined with the “RGB plot profile” function (Fig. 4). Co-localization between tPA-HaloTag® and other proteins was studied with the “Pearson’s correlation” function (Plugins JACoP; Fig. 5, 7, 8, suppl. 4) and the “Cell counter” function was used to calculate the percentage of co-localization (Fig. 5-8). Kymographs (Fig. 3, 6, 8, suppl. 2) were made with plugins “kymographbuilder” for generated the process-projected pixels intensities profile in function of time. With distance and time read on projected kymograph, vesicles velocity, flow and dynamic were deduced and all data normalized by time and length of imaged neurite segments. A HaloTag®-tPA-SEP vesicle has been considered stationary if it remained immotile for the entire recording period; a vesicle has been considered mobile only if the displacement was $\geq 2 \mu\text{m}$. The Imaris x64 7.7.2 software (Bitplane) was used to model the two configurations of tPA at the synapse: pre-synaptic tPA and post-synaptic tPA (Fig. 4 and 8).

Analysis of tPA containing vesicles motility. HaloTag®-tPA-SEP motility analysis was analyzed in both axonal and dendritic processes. Axons were distinguished from dendrites firstly based on known morphological characteristics: greater length, thin and uniform diameter, and sparse branching (Banker and Cowan, 1979). After a dozen retrospective immunostainings

with an anti-MAP2 antibody of each neurite, a kymograph type profile for each neuronal process has been established and used as a basis for neurite distinction. We selected the proximal region of axons and dendrites for time-lapse imaging analysis. Only those that appeared to be single axons and separate from other processes in the field were chosen for recording axonal HaloTag[®]-tPA-SEP transport. Regions where crossing or fasciculation occurred were excluded from analysis.

Statistical analyses. All statistical analyses were performed by the Statistica software. A non-parametric Mann-Whitney *U* test was performed for all analyses unless specified in the figure legend (Fig. 3 and suppl. 2). For each experiment with groups of sufficient size to use a parametric test, a Shapiro-Wilk normality test was firstly performed. For significance evaluation, two-tailed Student's *t* test was performed if datasets were normally distributed. Vesicular intensities in NH₄Cl experiments were analyzed with a non-parametric Wilcoxon signed-rank test for matched samples. Values are presented as mean ± SEM.

Figure legends

Figure 1: Generation of the tPA-HaloTag[®]. (A) Scheme of the tPA-HaloTag[®] protein: tPA in blue (69 kDa), HaloTag[®] in orange (33 kDa) and the specific fluorescent ligand of HaloTag[®]: HaloTag[®]TMR Ligand in red. (B) Representative confocal images of HEK-293 cells transfected (+) or not (-) with pCMV_tPA-HaloTag[®], incubated 48h later (+) or not (-) in the presence of the HaloTag[®] TMR ligand, followed by an immunocytochemistry (ICC) against tPA (blue). Scale Bar: 10µm. (C) Immunoblot performed against tPA or HaloTag[®] with recombinant tPA (rtPA) as control (lane 1) or on proteins harvested from HEK-293 cells transfected with pCMV_tPA-HaloTag[®] (lane 2). (D) Fibrin-agar zymography showing the fibrinolytic activity of control tPA (lane 1) and tPA-HaloTag[®] produced by HEK 293 cells (lane 2). (E) Transfection of cortical neurons at DIV 12 (Days In Vitro) with pSYN_tPA-HaloTag[®] (red) and pCMV_GFP-homer-1C (green) plasmids, exposed 4h later to the HaloTag[®]TMR ligand and ICC performed against tPA (in blue). Z-stack and scale Bar: 50µm.

Figure 2: tPA is present in axons and dendrites. (A) Timeline of the experiments. Representative z-stack confocal images of cortical neurons (at DIV 20) transfected with pSYN_tPA-HaloTag[®], incubated in the presence of the TMR ligand (in red) and subjected to an immunocytochemistry against Tau (tubulin-associated unit, in green) and MAP2 (microtubule associated protein 2, in blue). tPA-HaloTag[®] is present in axons (1; MAP2 - and Tau +) and in dendrites (2; MAP2 + and Tau +). Scale Bar: 5µm or 50µm (whole neuron). (B) Quantification of the number of TMR positive puncta per 100 µm along the axons (59 puncta/100 µm) and dendrites (86 puncta/100µm). n=15 and n=22 neurons respectively, from N=6 individual experiments; p=0.0065.

Figure 3: Transport of HaloTag[®]-tPA-SEP in cortical neurons. (A) Timeline of experiments. (B) Transport of tPA-HaloTag[®] in cortical dendrites. Representative kymographs generated from dendrites (in red) and analyzed trajectories of vesicles are shown with a color code, black for anterograde, gray for retrograde and white for static vesicles. Down, representative diagram

of distribution of velocity ($\mu\text{m/s}$) from seven analyzed kymographs (anterograde 270 vesicles, retrograde 278 vesicles, $n=5$ and 7 neurons respectively from 9 experiments). (C) Transport of tPA-HaloTag[®] in cortical axons. Representative kymographs generated from axons and analyzed trajectories of vesicles are shown with the same color code viewed previously in B. Down, diagram illustrates the distribution of velocity ($\mu\text{m/s}$) from five analyzed kymographs (anterograde 209 vesicles, retrograde 317 vesicles from $n=5$ and 7 neurons respectively from 9 experiments). (D) Histogram analysis recapitulate dendritic and axonal vesicles velocities ($\mu\text{m/s}$) in anterograde way (axons: $1.22\mu\text{m/s}$; dendrites: $0.95\mu\text{m/s}$) and in retrograde way (axons: $1.24\mu\text{m/s}$; dendrites: $0.87\mu\text{m/s}$). (Anterograde: 209 vesicles for axon and 270 for dendrites; $p=1.4 \cdot 10^{-5}$. Retrograde 317 vesicles for axons and 278 for dendrites; $p=2.15 \cdot 10^{-15}$. $n=5$ and $n=7$ neurons respectively, from $N=9$ experiments). Student's *t* test. (E) Histogram analysis show the tPA-HaloTag[®] vesicles flow (number of vesicles per min) repartition in anterograde and retrograde directions in dendrites and axons on a time proportion (anterograde: 8 vesicles for axons and 5 for dendrites per min; $p=5.0 \cdot 10^{-1}$. Retrograde 13 vesicles for axons and 6 for dendrites per min; $p=1.43 \cdot 10^{-2}$. $n=5$ and $n=7$ neurons respectively, from $N=9$ experiments). Mann-Whitney's *U* test. (F) Histogram analysis of percentages of tPA positives vesicles repartition in both ways in axons (anterograde: 40%; retrograde: 60%, $p=0.180$) and in dendrites (anterograde: 49%; retrograde: 51%, $p=1.0$). (Axons $n=5$ and dendrites $n=7$ neurons, from $N=9$ experiments). Mann and Whitney' *U* test. (G) Histogram analysis of percentages of dynamic tPA positives (TMR positive puncta, in red) vesicles in axons (88%) and dendrites (57%); $p=0.001$, and of percentages of stationary tPA vesicles in axons (12%) and in dendrites (43%); $p=0.001$, ($n=10$ neurons for axons and $n=7$ neurons for dendrites, from $N=6$ experiments). Student's *t* test.

Figure 4: tPA is present in pre- and post-synaptic elements. (A) Timeline of the experiments. Representative z-stack confocal images of cortical neurons (at DIV 20) co-transfected with pCMV_tPA-HaloTag[®] and pCMV_GFP-homer-1C plasmids followed by immunocytochemistry against synapsin. tPA-HaloTag[®] (TMR ligand, in red) is present at synapses revealed by the presence of GFP-homer1C (post-synaptic protein, green) and synapsin (pre-synaptic protein, blue). Scale Bar: $5\mu\text{m}$ or $50\mu\text{m}$ (whole neuron). (B) Representative diagram show the percentage of synapses containing or not tPA-HaloTag[®]. TMR staining (ie tPA) is present in

32% of all synapses (yellow frame: 1) and 68% of synapses are negative for tPA (white frame: 2), $n=21$ neurons from $N=6$ experiments and $p<.0001$. (C) Timeline of the experiments. Cortical neurons at DIV 20 were transfected with pCMV_tPA-HaloTag[®] plasmid, ICC against synapsin and homer-1C were performed. Representative z-stack confocal images and diagrams show the percentage of tPA located either pre or post-synaptically. Scale Bar: 5 μ m. (D) 55% of all synaptic tPA is post-synaptic (green frame in confocal image; 3) and 45% of all synaptic tPA is pre-synaptic (blue frame in confocal image; 4). $n=10$ neurons from $N=2$ experiments and $p=0.025$. (E) IMARIS reconstructions from confocal images C of pre-synaptic tPA (blue frame; 4) and post-synaptic tPA (green frame; 3).

Figure 5: tPA is associated with VAMP-family proteins. (A) Timeline of the experiments. Representative z-stack images of co-transfected cortical neurons (at DIV20) with pCMV_tPA-HaloTag[®] (TMR ligand, in red) and pCMV VAMP2-GFP (in green), followed by ICC against MAP2 (in blue). tPA-HaloTag[®] colocalizes with VAMP2-GFP (exosome) in axons (MAP2-; frame 1) and in dendrites (MAP2+; frame 2) with Pearson's coefficients respectively: $r=0.687$ and $r=0.740$. Scale Bar: 5 μ m or 50 μ m (whole neuron). (B) Representative diagrams of the percentage of colocalization between tPA-HaloTag[®] and VAMP2-GFP in function of total tPA-HaloTag[®] puncta. There are 39% of colocalization in axons and 48% in dendrites ($p= 0.125$). Schematic diagrams showing the number of tPA and VAMP2 positive puncta per 100 μ m of axons and of dendrites. There are 19 vesicles /100 μ m in axons and 21 vesicles/100 μ m in dendrites ($p>.999$). $n=6$ neurons and $n=10$ neurons respectively, from 6 independent experiments. (C) Representative z-stack images of co-transfected cortical neurons (at DIV20) with pCMV_tPA-HaloTag[®] (TMR ligand, in red) and pCMV_GFP-VAMP3 (in green), followed by ICC against MAP2 (in blue). tPA-HaloTag[®] colocalizes with GFP-VAMP3 (exosome) in axons (MAP2-; frame 3) and in dendrites (MAP2+; frame 4) with Pearson's coefficients respectively: $r=0.839$ and $r=0.838$. Scale Bar: 5 μ m or 50 μ m (whole neuron). (D) Representative diagrams of the percentage of colocalization between tPA-HaloTag[®] and GFP-VAMP3 in function of total tPA-HaloTag[®] puncta. There are 53% of colocalization in axons and 36% in dendrites ($p= 0.030$). Schematic diagrams showing the number of tPA and VAMP3 positive puncta per 100 μ m in axons and dendrites. There are 19 vesicles /100 μ m in axons and 14 vesicles /100 μ m in dendrites ($p= 0.173$). $n=11$ and $n=13$ neurons respectively, from 6 independent experiments.

(E) Representative images of co-transfected cortical neuron (at DIV14) with pCMV_tPA-HaloTag[®] (reveals by TMR ligand, in red) and pCMV_VAMP2-GFP (in green). tPA-HaloTag[®] and VAMP2-GFP colocalize, when revealed by confocal and super-resolution microscopy: Stimulated Emission Depletion (STED) with Pearson's coefficients respectively: $r=0.872$ and $r=0.428$. Scale Bar: 2 μm or 0.5 μm .

Figure 6: Dendritic and axonal release of tPA. (A) Timeline of the experiment. (B) Schematic diagram of a dual color reporter for neuronal tPA. tPA fused to a HaloTag[®] site and the superecliptic pHluorin (SEP) allows simultaneous visualization of total (HaloTag[®]) and extraneuronal (SEP) tPA molecules. (C) Representative z-stack confocal images of transfected cortical neurons (DIV13-20) with pCMV_HaloTag[®]-tPA-SEP plasmid (TMR ligand; in red and SEP; in green), time-lapse were acquired every 30 sec during 2 min ($t=0$ was assigned of exocytosis; Time is in min:sec). After live imaging ICC was performed against MAP2 (in blue) to differentiate axons from dendrites (an example of each are shown). Respective kymographs of HaloTag[®]-tPA-SEP exocytosis are shown. Scale bar represents 2 μm . (D) Histogram analysis of percentages of tPA vesicles exocytosis (SEP positives puncta, in green) compared to the total pool of tPA (TMR positives puncta, in red) positives vesicles in axons (6%) and in dendrites (15%). $n=12$ and $n=10$ neurons respectively, from $N=9$ experiments and $p=0.002$. (E) Schematic diagrams showing the number of static tPA (TMR positive puncta, in red) positives vesicles per 100 μm of axons (12.3) and dendrites (28.2). ($n=13$ for axons and $n=18$ for dendrites, from $N=8$ experiments, $p=0.001$). (F) Schematic histograms of the number of vesicles exocytosed per 100 μm (SEP positive, in green) in axons (4) and dendrites (9). $n=13$ and $n=18$ neurons respectively, from $N=9$ experiments, $p=0.004$.

Figure 7: tPA is associated with Rab-family proteins. (A) Timeline of experiments. (B) Representative z-stack images of co-transfected cortical neurons (DIV20) with pCMV_tPA-HaloTag[®] (TMR ligand, in red) and pCMV_GFP-Rab5 (in green), followed by ICC against MAP2 (in blue). tPA-HaloTag[®] colocalizes with GFP-Rab5 (early endosome) in axons (MAP2-; frame 1) and in dendrites (MAP2+; frame 2) with Pearson's coefficients respectively: $r=0.822$ and $r=0.649$. (C) Representative diagrams of the percentage of colocalization between tPA-

HaloTag[®] and GFP-Rab5 in function of total tPA-HaloTag[®] puncta. There are 42% of colocalization in axons and 36% in dendrites (n=3 and n=8 neurons respectively, from 4 independent experiments, p=0.414). (D) Representative images of co-transfected cortical neurons (at DIV20) with pCMV_tPA-HaloTag[®] (reveals by TMR ligand, in red) and pCMV_CFP-Rab7 (in cyan), followed by ICC against MAP2 (in blue). tPA-HaloTag[®] colocalizes with CFP-Rab7 (late endosome and lysosome degradation) in axon (MAP2-; frame 3) and in dendrites (MAP2+; frame 4) with Pearson's coefficients respectively: r=0.833 and r=0.761). (E) Representative diagrams of percentage of colocalization between tPA-HaloTag[®] and CFP-Rab7 in function of total tPA-HaloTag[®] puncta. There are 18% of colocalization in axons and 16% in dendrites (n=3 and n=10 neurons respectively, from 4 independent experiments and p=0.735). (F) Representative z-stack images of co-transfected cortical neurons (at DIV 20) with pCMV_tPA-HaloTag[®] (TMR ligand, in red) and pCMV_GFP-Rab11 (in green), followed by ICC against MAP2 (in blue). tPA-HaloTag[®] colocalizes with GFP-Rab11 (recycling endosome) in axon (MAP2-; frame 5) and in dendrites (MAP2+; frame 6) with Pearson's coefficients respectively: r=0.720 and r=0.671. (G) Representative diagrams of the percentage of colocalization between tPA-HaloTag[®] and GFP-Rab11 in function of total tPA-HaloTag[®] puncta. There are 57% of colocalization in axons and 46% in dendrites (n=6 and n=7 neurons respectively, from 2 independent experiments and p=0.253). (H) Schematics diagrams showing the number of tPA and Rab positive puncta per 100µm in axons and dendrites. For rab5, there are 10 vesicles/100µm in axons and 15 vesicles/100µm in dendrites (n=3 and n=8 neurons respectively, from 4 independent experiments, p=0.683). For Rab7, there are 9 vesicles/100µm in axons and 7 vesicles/100µm in dendrites (n=3 and n=10 neurons respectively, from 4 independent experiments and p=0.586). For Rab11, there are 27 vesicles/100µm in axons and 25 vesicles/100µm in dendrites (n=6 and n=7 neurons respectively, from 2 independent experiments and p=0.668). For all images: scale Bar: 5µm or 50µm (whole neuron).

Figure 8: tPA is stored in the same synaptic vesicles than Brain-Derived Neurotrophic Factor (BDNF). (A) Timeline of the experiments. Representative z-stack images of co-transfected cortical neurons (DIV20) with pCMV_tPA-HaloTag[®] (reveals by TMR ligand, in red) and pCMV_BDNF-GFP (in green), followed by ICC against MAP2 (in blue). tPA-HaloTag[®] colocalizes

with BDNF-GFP in axons (MAP2-; frame 1) and in dendrites (MAP2+; frame 2) with Pearson's coefficients respectively: $r=0.778$ and $r=0.786$. Scale Bar: $5\mu\text{m}$ or $50\mu\text{m}$ (whole neuron). (B) Representative diagrams of percentage of colocalization between tPA-HaloTag[®] and BDNF-GFP in function of total tPA-HaloTag[®] puncta. There are 67% of colocalization in axons and 59% in dendrites ($n=6$ neurons for both, from 3 independent experiments and $p=0.873$). (C) Schematic diagrams showing the number of tPA and BDNF positive staining per $100\mu\text{m}$ in axons and dendrites. There are 42 vesicles/ $100\mu\text{m}$ in axons and 34 vesicles/ $100\mu\text{m}$ in dendrites ($n=6$ neurons for both, from 3 independent experiments and $p=0.150$). (D) Timeline of the experiments. Representative z-stack images of co-transfected cortical neurons (at DIV26) with pCMV_tPA-HaloTag[®] (reveals by TMR ligand, in red) and pCMV_BDNF-GFP (in green), followed by ICC against synapsin (pre-synaptic marker) or homer-1C (post-synaptic marker) (both in blue). tPA-HaloTag[®] and BDNF-GFP colocalizes with homer-1C (frame 3) and synapsin (frame 4). IMARIS reconstructions from confocal images D of pre-synaptic tPA/BDNF (frame 4) and post-synaptic tPA/BDNF (frame 3). Scale Bar: 5 or $0.5\mu\text{m}$ for zoom and $50\mu\text{m}$ for whole neurons. (E) Timeline of the experiments. Representative images of co-transfected cortical neuron (DIV14) with pCMV_tPA-HaloTag[®] (reveals by TMR ligand, in red) and pCMV_BDNF-GFP (in green). tPA-HaloTag[®] and BDNF-GFP colocalizes for both confocal and super-resolution microscopy: Stimulated Emission Depletion (STED) with Pearson's coefficients respectively: $r=0.829$ and $r=0.592$. Scale Bar: $1\mu\text{m}$ or $0.5\mu\text{m}$. (F) Timeline of experiments. Co-transfected cortical neuron (DIV20) with pCMV_tPA-HaloTag[®] (reveals by TMR ligand, in red) and pCMV_BDNF-GFP (in green). Kymograph generated from moving puncta (white frame) shows that tPA-HaloTag[®] and BDNF-GFP are moving together (anterograde and retrograde transport).

Figure 9: Representative scheme. Representative scheme of the proposed co-trafficking and co-packaging of tPA and BDNF in neurons.

Supplementary 1: Characterization of tPA-HaloTag[®] plasmid. (A) Timeline of the experiments. Representative confocal images of cortical and hippocampal neurons transfected (+) or not (-) with pSYN_tPA-HaloTag[®] and exposed 48h later (+) or not (-) to the

HaloTag[®] TMR ligand, together with an immunocytochemistry (ICC) against tPA (blue) and MAP2 (green). Scale Bar: 20 μ m. (B) Timeline of the experiments. Transfections of pCMV_tPA-HaloTag[®] or pSyn_tPA-HaloTag[®] (both revealed in red) and immunocytochemistry against MAP2 (in blue) show similar neuronal expressions of tPA-HaloTag[®] with the two constructs. Scale Bar: 50 μ m (whole neuron). (C) Timeline of the experiments. Co-Transfections of pCMV_tPA-HaloTag[®] or pCMV_HaloTag[®]-tPA (both in red) with pCMV_GFP-Homer1C (in green) and immunocytochemistries against tPA (in blue) show that the position of the HaloTag[®], either N-terminal or C-terminal of tPA did not change its neuronal distribution. Scale Bar: 50 μ m (whole neuron).

Supplementary 2: HaloTag[®]-tPA-SEP functionality. (A) Timeline of the experiments. (B) Representative confocal z-stack of cortical neurite expressing HaloTag[®]-tPA-SEP. Scale bar: 10 μ m. (C) Timeline imaging of a HaloTag[®]-tPA-SEP vesicle (white arrow in B) exocytosis in basal condition. SEP fluorescence variation is shown by timeline generated kymographs and fluorescence intensity graphs analysis at t1 and t2 stages (Time in min:sec and Scale bar: 1 μ m). (D) Projected neurite kymograph transfected with HaloTag[®]-tPA-SEP before, before and after NH₄Cl (50mM) treatment which reveals total intracellular SEP positives vesicles pool. (E) SEP fluorescence analysis before (pre-exocytosis) and after (post-exocytosis) exocytosis with or without NH₄Cl (50mM). (Pre-exocytosis (p=0.680) and post-exocytosis (p=0.043) n=5 neurons from N=4 experiments). Scale bar: 1 μ m. Wilcoxon's test.

Supplementary 3: Characterization of BDNF-GFP plasmid. Timeline of the experiments. BDNF-GFP (green) colocalizes with the immunostainings performed against proBDNF (in red) in axons (MAP2 -; 1) and dendrites (MAP2 +; 2). Scale Bar: 5 μ m or 50 μ m (whole neuron).

Supplementary 4: tPA and BDNF are associated with VAMPs and Rabs-family protein. (A) Timeline of the experiments. Representative z-stack images of co-transfected cortical neuron (at DIV20) with pSYN_tPA-HaloTag[®] (reveals by TMR ligand, in red), pCMV_BDNF-CFP (in cyan, or pCMV_BDNF-GFP; in green for figure D) and pCMV_GFP-Rab (B-D; in green except for Rab7 who is pCMV_CFP-Rab; in cyan) or GFP-VAMP (E-F; in green). (B) tPA-HaloTag[®] colocalizes with

BDNF-CFP but also with GFP-Rab5 and BDNF-CFP colocalizes with GFP-Rab5 (Pearson's coefficients: $r=0.633$, $r=0.607$ and $r=0.612$ respectively). (C) tPA-HaloTag[®] colocalizes with BDNF-CFP but also with GFP-Rab11 and BDNF-CFP colocalizes with GFP-Rab11 (Pearson's coefficients: $r=0.538$, $r=0.637$ and $r=0.694$ respectively). (D) tPA-HaloTag[®] colocalizes with BDNF-GFP but also with CFP-Rab7 and BDNF-GFP colocalizes with CFP-Rab7 (Pearson's coefficients: $r=0.551$, $r=0.501$ and $r=0.657$ respectively). (E) tPA-HaloTag[®] colocalizes with BDNF-CFP but also with VAMP2-GFP and BDNF-CFP colocalizes with VAMP2-GFP (Pearson's coefficients: $r=0.726$, $r=0.649$ and $r=0.763$ respectively). (F) tPA-HaloTag[®] colocalizes with BDNF-CFP but also with GFP-VAMP3 and BDNF-CFP colocalizes with GFP-VAMP3 (Pearson's coefficients: $r=0.719$, $r=0.760$ and $r=0.781$ respectively). Scale Bar: 5 μ m or 50 μ m (whole neuron).

Supplementary 5: tPA is involved in BDNF maturation. BDNF⁴⁸⁸ (100nM) incubated alone or in the presence of tPA (20nM), plasminogen (50nM), plasmin (25nM) or Aprotinin (20 KUI/ml) alone or in combination during 1h30 at 37°C. SDS-PAGE showing the conversion of pro-BDNF⁴⁸⁸ into mBDNF⁴⁸⁸.

REFERENCES

- Alvarez, V., Rossetti, A.O., Papavasileiou, V., Michel, P., 2013. Acute seizures in acute ischemic stroke: does thrombolysis have a role to play? *J. Neurol.* 260, 55–61. <https://doi.org/10.1007/s00415-012-6583-6>
- An, J., Zhang, C., Polavarapu, R., Zhang, Xiaohui, Zhang, Xiumei, Yepes, M., 2008. Tissue-type plasminogen activator and the low-density lipoprotein receptor-related protein induce Akt phosphorylation in the ischemic brain. *Blood* 112, 2787–2794. <https://doi.org/10.1182/blood-2008-02-141630>
- Astrup, T., Stage, A., 1952. Isolation of a Soluble Fibrinolytic Activator from Animal Tissue. *Nature* 170, 929. <https://doi.org/10.1038/170929a0>
- Ayloo, S., Guedes-Dias, P., Ghiretti, A.E., Holzbaur, E.L.F., 2017. Dynein efficiently navigates the dendritic cytoskeleton to drive the retrograde trafficking of BDNF/TrkB signaling endosomes. *Mol. Biol. Cell* 28, 2543–2554. <https://doi.org/10.1091/mbc.E17-01-0068>
- Banker, G.A., Cowan, W.M., 1979. Further observations on hippocampal neurons in dispersed cell culture. *J. Comp. Neurol.* 187, 469–493. <https://doi.org/10.1002/cne.901870302>
- Baranes, D., Lederfein, D., Huang, Y.Y., Chen, M., Bailey, C.H., Kandel, E.R., 1998. Tissue plasminogen activator contributes to the late phase of LTP and to synaptic growth in the hippocampal mossy fiber pathway. *Neuron* 21, 813–825.
- Baricos, W.H., Cortez, S.L., el-Dahr, S.S., Schnaper, H.W., 1995. ECM degradation by cultured human mesangial cells is mediated by a PA/plasmin/MMP-2 cascade. *Kidney Int.* 47, 1039–1047.
- Bi Oh, S., Suh, N., Kim, I., Lee, J.-Y., 2015. Impacts of aging and amyloid- β deposition on plasminogen activators and plasminogen activator inhibitor-1 in the Tg2576 mouse model of Alzheimer's disease. *Brain Res.* 1597, 159–167. <https://doi.org/10.1016/j.brainres.2014.11.042>
- Briens, A., Bardou, I., Lebas, H., Miles, L.A., Parmer, R.J., Vivien, D., Docagne, F., 2017. Astrocytes regulate the balance between plasminogen activation and plasmin clearance via cell-surface actin. *Cell Discov.* 3, 17001. <https://doi.org/10.1038/celldisc.2017.1>
- Bruno, M.A., Cuello, A.C., 2006. Activity-dependent release of precursor nerve growth factor, conversion to mature nerve growth factor, and its degradation by a protease cascade. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 103, 6735–6740. <https://doi.org/10.1073/pnas.0510645103>
- Bucci, C., Alifano, P., Cogli, L., 2014. The role of rab proteins in neuronal cells and in the trafficking of neurotrophin receptors. *Membranes* 4, 642–677. <https://doi.org/10.3390/membranes4040642>
- Buisson, A., Nicole, O., Docagne, F., Sartelet, H., Mackenzie, E.T., Vivien, D., 1998. Up-regulation of a serine protease inhibitor in astrocytes mediates the neuroprotective activity of transforming growth factor beta1. *FASEB J. Off. Publ. Fed. Am. Soc. Exp. Biol.* 12, 1683–1691.
- Cacquevel, M., Launay, S., Castel, H., Benchenane, K., Chéenne, S., Buée, L., Moons, L., Delacourte, A., Carmeliet, P., Vivien, D., 2007. Ageing and amyloid-beta peptide deposition contribute to an impaired brain tissue plasminogen activator activity by different mechanisms. *Neurobiol. Dis.* 27, 164–173. <https://doi.org/10.1016/j.nbd.2007.04.004>
- Caldeira, M.V., Melo, C.V., Pereira, D.B., Carvalho, R.F., Carvalho, A.L., Duarte, C.B., 2007. BDNF regulates the expression and traffic of NMDA receptors in cultured hippocampal neurons. *Mol. Cell. Neurosci.* 35, 208–219. <https://doi.org/10.1016/j.mcn.2007.02.019>

- Cassé, F., Bardou, I., Danglot, L., Briens, A., Montagne, A., Parcq, J., Alahari, A., Galli, T., Vivien, D., Docagne, F., 2012. Glutamate controls tPA recycling by astrocytes, which in turn influences glutamatergic signals. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 32, 5186–5199. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.5296-11.2012>
- Chaineau, M., Danglot, L., Galli, T., 2009. Multiple roles of the vesicular-SNARE TI-VAMP in post-Golgi and endosomal trafficking. *FEBS Lett.* 583, 3817–3826. <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2009.10.026>
- Chevilly, A., Lesept, F., Lenoir, S., Ali, C., Parcq, J., Vivien, D., 2015. Impacts of tissue-type plasminogen activator (tPA) on neuronal survival. *Front. Cell. Neurosci.* 9, 415. <https://doi.org/10.3389/fncel.2015.00415>
- Correa, F., Gauberti, M., Parcq, J., Macrez, R., Hommet, Y., Obiang, P., Hernangómez, M., Montagne, A., Liot, G., Guaza, C., Maubert, E., Ali, C., Vivien, D., Docagne, F., 2011. Tissue plasminogen activator prevents white matter damage following stroke. *J. Exp. Med.* 208, 1229–1242. <https://doi.org/10.1084/jem.20101880>
- Dieni, S., Matsumoto, T., Dekkers, M., Rauskolb, S., Ionescu, M.S., Deogracias, R., Gundelfinger, E.D., Kojima, M., Nestel, S., Frotscher, M., Barde, Y.-A., 2012. BDNF and its pro-peptide are stored in presynaptic dense core vesicles in brain neurons. *J. Cell Biol.* 196, 775–788. <https://doi.org/10.1083/jcb.201201038>
- Erickson, K.I., Prakash, R.S., Voss, M.W., Chaddock, L., Heo, S., McLaren, M., Pence, B.D., Martin, S.A., Vieira, V.J., Woods, J.A., McAuley, E., Kramer, A.F., 2010. Brain-derived neurotrophic factor is associated with age-related decline in hippocampal volume. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 30, 5368–5375. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.6251-09.2010>
- Fernández-Monreal, M., López-Atalaya, J.P., Benchenane, K., Léveillé, F., Cacquevel, M., Plawinski, L., MacKenzie, E.T., Bu, G., Buisson, A., Vivien, D., 2004. Is tissue-type plasminogen activator a neuromodulator? *Mol. Cell. Neurosci.* 25, 594–601. <https://doi.org/10.1016/j.mcn.2003.11.002>
- Gaussem, P., Grailhe, P., Anglés-Cano, E., 1993. Sodium dodecyl sulfate-induced dissociation of complexes between human tissue plasminogen activator and its specific inhibitor. *J. Biol. Chem.* 268, 12150–12155.
- Goldstein, L.S., Yang, Z., 2000. Microtubule-based transport systems in neurons: the roles of kinesins and dyneins. *Annu. Rev. Neurosci.* 23, 39–71. <https://doi.org/10.1146/annurev.neuro.23.1.39>
- Hajjar, K.A., Jacovina, A.T., Chacko, J., 1994. An endothelial cell receptor for plasminogen/tissue plasminogen activator. I. Identity with annexin II. *J. Biol. Chem.* 269, 21191–21197.
- Hébert, M., Lesept, F., Vivien, D., Macrez, R., 2016. The story of an exceptional serine protease, tissue-type plasminogen activator (tPA). *Rev. Neurol. (Paris)* 172, 186–197. <https://doi.org/10.1016/j.neurol.2015.10.002>
- Holzbaur, E.L.F., 2004. Motor neurons rely on motor proteins. *Trends Cell Biol.* 14, 233–240. <https://doi.org/10.1016/j.tcb.2004.03.009>
- Hoylaerts, M., Rijken, D.C., Lijnen, H.R., Collen, D., 1982. Kinetics of the activation of plasminogen by human tissue plasminogen activator. Role of fibrin. *J. Biol. Chem.* 257, 2912–2919.
- Huang, E.J., Reichardt, L.F., 2001. Neurotrophins: roles in neuronal development and function. *Annu. Rev. Neurosci.* 24, 677–736. <https://doi.org/10.1146/annurev.neuro.24.1.677>
- Hultman, K., Tjärnlund-Wolf, A., Fish, R.J., Wilhelmsson, U., Rydenhag, B., Pekny, M., Kruihof, E.K.O., Jern, C., 2008. Retinoids and activation of PKC induce tissue-type plasminogen activator

- expression and storage in human astrocytes. *J. Thromb. Haemost. JTH* 6, 1796–1803. <https://doi.org/10.1111/j.1538-7836.2008.03084.x>
- Kim, T., Gondré-Lewis, M.C., Arnaoutova, I., Loh, Y.P., 2006. Dense-core secretory granule biogenesis. *Physiol. Bethesda Md* 21, 124–133. <https://doi.org/10.1152/physiol.00043.2005>
- Kononenko, N.L., Claßen, G.A., Kuijpers, M., Puchkov, D., Maritzen, T., Tempes, A., Malik, A.R., Skalecka, A., Bera, S., Jaworski, J., Haucke, V., 2017. Retrograde transport of TrkB-containing autophagosomes via the adaptor AP-2 mediates neuronal complexity and prevents neurodegeneration. *Nat. Commun.* 8, 14819. <https://doi.org/10.1038/ncomms14819>
- Lee, J., Duan, W., Mattson, M.P., 2002. Evidence that brain-derived neurotrophic factor is required for basal neurogenesis and mediates, in part, the enhancement of neurogenesis by dietary restriction in the hippocampus of adult mice. *J. Neurochem.* 82, 1367–1375.
- Lee, S.-R., Guo, S.-Z., Scannevin, R.H., Magliaro, B.C., Rhodes, K.J., Wang, X., Lo, E.H., 2007. Induction of matrix metalloproteinase, cytokines and chemokines in rat cortical astrocytes exposed to plasminogen activators. *Neurosci. Lett.* 417, 1–5. <https://doi.org/10.1016/j.neulet.2007.01.017>
- Lemarchand, E., Maubert, E., Haelewyn, B., Ali, C., Rubio, M., Vivien, D., 2016. Stressed neurons protect themselves by a tissue-type plasminogen activator-mediated EGFR-dependent mechanism. *Cell Death Differ.* 23, 123–131. <https://doi.org/10.1038/cdd.2015.76>
- Liot, G., Roussel, B.D., Lebeurrier, N., Benchenane, K., López-Atalaya, J.P., Vivien, D., Ali, C., 2006. Tissue-type plasminogen activator rescues neurones from serum deprivation-induced apoptosis through a mechanism independent of its proteolytic activity. *J. Neurochem.* 98, 1458–1464. <https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.2006.03982.x>
- Liot, G., Zala, D., Pla, P., Mottet, G., Piel, M., Saudou, F., 2013. Mutant Huntingtin alters retrograde transport of TrkB receptors in striatal dendrites. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 33, 6298–6309. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.2033-12.2013>
- Lochner, J.E., Honigman, L.S., Grant, W.F., Gessford, S.K., Hansen, A.B., Silverman, M.A., Scalettar, B.A., 2006. Activity-dependent release of tissue plasminogen activator from the dendritic spines of hippocampal neurons revealed by live-cell imaging. *J. Neurobiol.* 66, 564–577. <https://doi.org/10.1002/neu.20250>
- Lochner, J.E., Spangler, E., Chavarha, M., Jacobs, C., McAllister, K., Schuttner, L.C., Scalettar, B.A., 2008. Efficient copackaging and cotransport yields postsynaptic colocalization of neuromodulators associated with synaptic plasticity. *Dev. Neurobiol.* 68, 1243–1256. <https://doi.org/10.1002/dneu.20650>
- Lommatzsch, M., Zingler, D., Schuhbaeck, K., Schloetcke, K., Zingler, C., Schuff-Werner, P., Virchow, J.C., 2005. The impact of age, weight and gender on BDNF levels in human platelets and plasma. *Neurobiol. Aging* 26, 115–123. <https://doi.org/10.1016/j.neurobiolaging.2004.03.002>
- Lopez-Atalaya, J.P., Roussel, B.D., Levrat, D., Parcq, J., Nicole, O., Hommet, Y., Benchenane, K., Castel, H., Leprince, J., To Van, D., Bureau, R., Rault, S., Vaudry, H., Petersen, K.-U., Santos, J.S.O., Ali, C., Vivien, D., 2008. Toward safer thrombolytic agents in stroke: molecular requirements for NMDA receptor-mediated neurotoxicity. *J. Cereb. Blood Flow Metab. Off. J. Int. Soc. Cereb. Blood Flow Metab.* 28, 1212–1221. <https://doi.org/10.1038/jcbfm.2008.14>
- Louessard, M., Lacroix, A., Martineau, M., Mondielli, G., Montagne, A., Lesept, F., Lambolez, B., Cauli, B., Mothet, J.-P., Vivien, D., Maubert, E., 2016. Tissue Plasminogen Activator Expression Is Restricted to Subsets of Excitatory Pyramidal Glutamatergic Neurons. *Mol. Neurobiol.* 53, 5000–5012. <https://doi.org/10.1007/s12035-015-9432-7>

- Lu, B., Pang, P.T., Woo, N.H., 2005. The yin and yang of neurotrophin action. *Nat. Rev. Neurosci.* 6, 603–614. <https://doi.org/10.1038/nrn1726>
- Madani, R., Hulo, S., Toni, N., Madani, H., Steimer, T., Muller, D., Vassalli, J.D., 1999. Enhanced hippocampal long-term potentiation and learning by increased neuronal expression of tissue-type plasminogen activator in transgenic mice. *EMBO J.* 18, 3007–3012. <https://doi.org/10.1093/emboj/18.11.3007>
- Martinowich, K., Manji, H., Lu, B., 2007. New insights into BDNF function in depression and anxiety. *Nat. Neurosci.* 10, 1089–1093. <https://doi.org/10.1038/nn1971>
- Melchor, J.P., Strickland, S., 2005. Tissue plasminogen activator in central nervous system physiology and pathology. *Thromb. Haemost.* 93, 655–660. <https://doi.org/10.1160/TH04-12-0838>
- Meldolesi, J., Chierregatti, E., Luisa Malosio, M., 2004. Requirements for the identification of dense-core granules. *Trends Cell Biol.* 14, 13–19. <https://doi.org/10.1016/j.tcb.2003.11.006>
- Nagappan, G., Zaitsev, E., Senatorov, V.V., Yang, J., Hempstead, B.L., Lu, B., 2009. Control of extracellular cleavage of ProBDNF by high frequency neuronal activity. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 106, 1267–1272. <https://doi.org/10.1073/pnas.0807322106>
- Nicole, O., Docagne, F., Ali, C., Margail, I., Carmeliet, P., MacKenzie, E.T., Vivien, D., Buisson, A., 2001. The proteolytic activity of tissue-plasminogen activator enhances NMDA receptor-mediated signaling. *Nat. Med.* 7, 59–64. <https://doi.org/10.1038/83358>
- Obiang, P., Macrez, R., Jullienne, A., Bertrand, T., Lesept, F., Ali, C., Maubert, E., Vivien, D., Agin, V., 2012. GluN2D subunit-containing NMDA receptors control tissue plasminogen activator-mediated spatial memory. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 32, 12726–12734. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.6202-11.2012>
- Oh, S.B., Byun, C.J., Yun, J.-H., Jo, D.-G., Carmeliet, P., Koh, J.-Y., Lee, J.-Y., 2014. Tissue plasminogen activator arrests Alzheimer's disease pathogenesis. *Neurobiol. Aging* 35, 511–519. <https://doi.org/10.1016/j.neurobiolaging.2013.09.020>
- Pang, P.T., Teng, H.K., Zaitsev, E., Woo, N.T., Sakata, K., Zhen, S., Teng, K.K., Yung, W.-H., Hempstead, B.L., Lu, B., 2004. Cleavage of proBDNF by tPA/plasmin is essential for long-term hippocampal plasticity. *Science* 306, 487–491. <https://doi.org/10.1126/science.1100135>
- Patterson, S.L., Abel, T., Deuel, T.A., Martin, K.C., Rose, J.C., Kandel, E.R., 1996. Recombinant BDNF rescues deficits in basal synaptic transmission and hippocampal LTP in BDNF knockout mice. *Neuron* 16, 1137–1145.
- Pawlak, R., Magarinos, A.M., Melchor, J., McEwen, B., Strickland, S., 2003. Tissue plasminogen activator in the amygdala is critical for stress-induced anxiety-like behavior. *Nat. Neurosci.* 6, 168–174. <https://doi.org/10.1038/nn998>
- Qian, Z., Gilbert, M.E., Colicos, M.A., Kandel, E.R., Kuhl, D., 1993. Tissue-plasminogen activator is induced as an immediate-early gene during seizure, kindling and long-term potentiation. *Nature* 361, 453–457. <https://doi.org/10.1038/361453a0>
- Reddrop, C., Moldrich, R.X., Beart, P.M., Farso, M., Liberatore, G.T., Howells, D.W., Petersen, K.-U., Schleuning, W.-D., Medcalf, R.L., 2005. Vampire bat salivary plasminogen activator (desmoteplase) inhibits tissue-type plasminogen activator-induced potentiation of excitotoxic injury. *Stroke* 36, 1241–1246. <https://doi.org/10.1161/01.STR.0000166050.84056.48>

- Rodier, M., Prigent-Tessier, A., Béjot, Y., Jacquin, A., Mossiat, C., Marie, C., Garnier, P., 2014. Exogenous t-PA Administration Increases Hippocampal Mature BDNF Levels. Plasmin- or NMDA-Dependent Mechanism? *PLOS ONE* 9, e92416. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0092416>
- Schiavo, G., Benfenati, F., Poulain, B., Rossetto, O., Polverino de Laureto, P., DasGupta, B.R., Montecucco, C., 1992. Tetanus and botulinum-B neurotoxins block neurotransmitter release by proteolytic cleavage of synaptobrevin. *Nature* 359, 832–835. <https://doi.org/10.1038/359832a0>
- Shen, Y., Rosendale, M., Campbell, R.E., Perrais, D., 2014. pHuji, a pH-sensitive red fluorescent protein for imaging of exo- and endocytosis. *J. Cell Biol.* 207, 419–432. <https://doi.org/10.1083/jcb.201404107>
- Shimojo, M., Courchet, J., Pieraut, S., Torabi-Rander, N., Sando, R., Polleux, F., Maximov, A., 2015. SNAREs Controlling Vesicular Release of BDNF and Development of Callosal Axons. *Cell Rep.* 11, 1054–1066. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2015.04.032>
- Stary, C.M., Sun, X., Giffard, R.G., 2015. Astrocytes Protect against Isoflurane Neurotoxicity by Buffering pro-brain-derived Neurotrophic Factor. *Anesthesiology* 123, 810–819. <https://doi.org/10.1097/ALN.0000000000000824>
- Stenmark, H., 2009. Rab GTPases as coordinators of vesicle traffic. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 10, 513–525. <https://doi.org/10.1038/nrm2728>
- Su, E.J., Fredriksson, L., Geyer, M., Folestad, E., Cale, J., Andrae, J., Gao, Y., Pietras, K., Mann, K., Yepes, M., Strickland, D.K., Betsholtz, C., Eriksson, U., Lawrence, D.A., 2008. Activation of PDGF-CC by tissue plasminogen activator impairs blood-brain barrier integrity during ischemic stroke. *Nat. Med.* 14, 731–737. <https://doi.org/10.1038/nm1787>
- Tyler, W.J., Alonso, M., Bramham, C.R., Pozzo-Miller, L.D., 2002. From acquisition to consolidation: on the role of brain-derived neurotrophic factor signaling in hippocampal-dependent learning. *Learn. Mem. Cold Spring Harb. N* 9, 224–237. <https://doi.org/10.1101/lm.51202>
- Woo, N.H., Teng, H.K., Siao, C.-J., Chiaruttini, C., Pang, P.T., Milner, T.A., Hempstead, B.L., Lu, B., 2005. Activation of p75NTR by proBDNF facilitates hippocampal long-term depression. *Nat. Neurosci.* 8, 1069–1077. <https://doi.org/10.1038/nn1510>
- Wu, F., Echeverry, R., Wu, J., An, J., Haile, W.B., Cooper, D.S., Catano, M., Yepes, M., 2013. Tissue-type plasminogen activator protects neurons from excitotoxin-induced cell death via activation of the ERK1/2-CREB-ATF3 signaling pathway. *Mol. Cell. Neurosci.* 52, 9–19. <https://doi.org/10.1016/j.mcn.2012.10.001>
- Wu, F., Torre, E., Cuellar-Giraldo, D., Cheng, L., Yi, H., Bichler, E.K., García, P.S., Yepes, M., 2015. Tissue-type plasminogen activator triggers the synaptic vesicle cycle in cerebral cortical neurons. *J. Cereb. Blood Flow Metab. Off. J. Int. Soc. Cereb. Blood Flow Metab.* 35, 1966–1976. <https://doi.org/10.1038/jcbfm.2015.155>
- Yamada, K., Mizuno, M., Nabeshima, T., 2002. Role for brain-derived neurotrophic factor in learning and memory. *Life Sci.* 70, 735–744.
- Yepes, M., Wu, F., Torre, E., Cuellar-Giraldo, D., Jia, D., Cheng, L., 2016. Tissue-type plasminogen activator induces synaptic vesicle endocytosis in cerebral cortical neurons. *Neuroscience* 319, 69–78. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2016.01.046>
- Zhang, R.L., Zhang, Z.G., Chopp, M., Zivin, J.A., 1999. Thrombolysis with tissue plasminogen activator alters adhesion molecule expression in the ischemic rat brain. *Stroke* 30, 624–629.

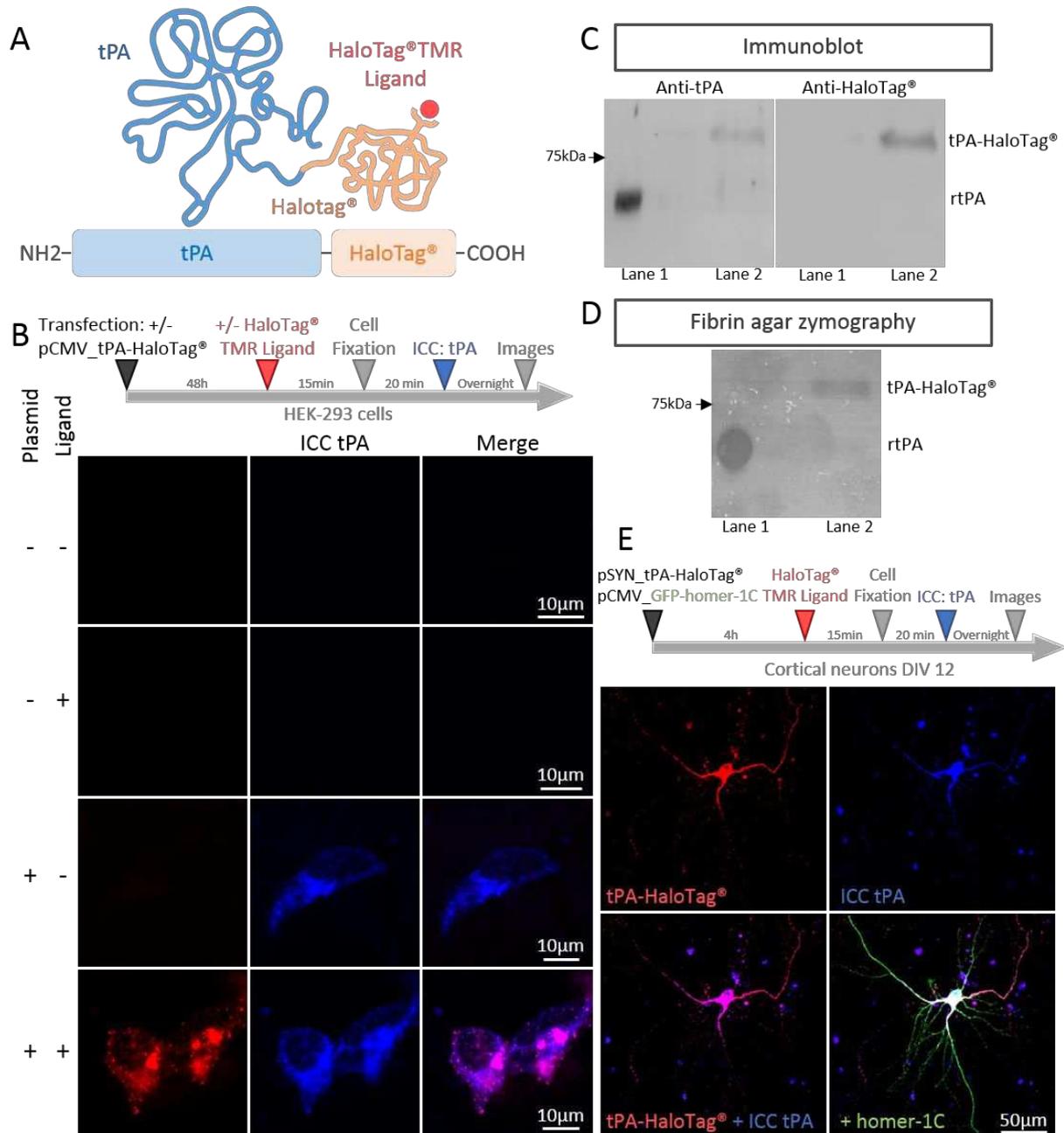


Figure 1: Generation of the tPA-HaloTag[®].

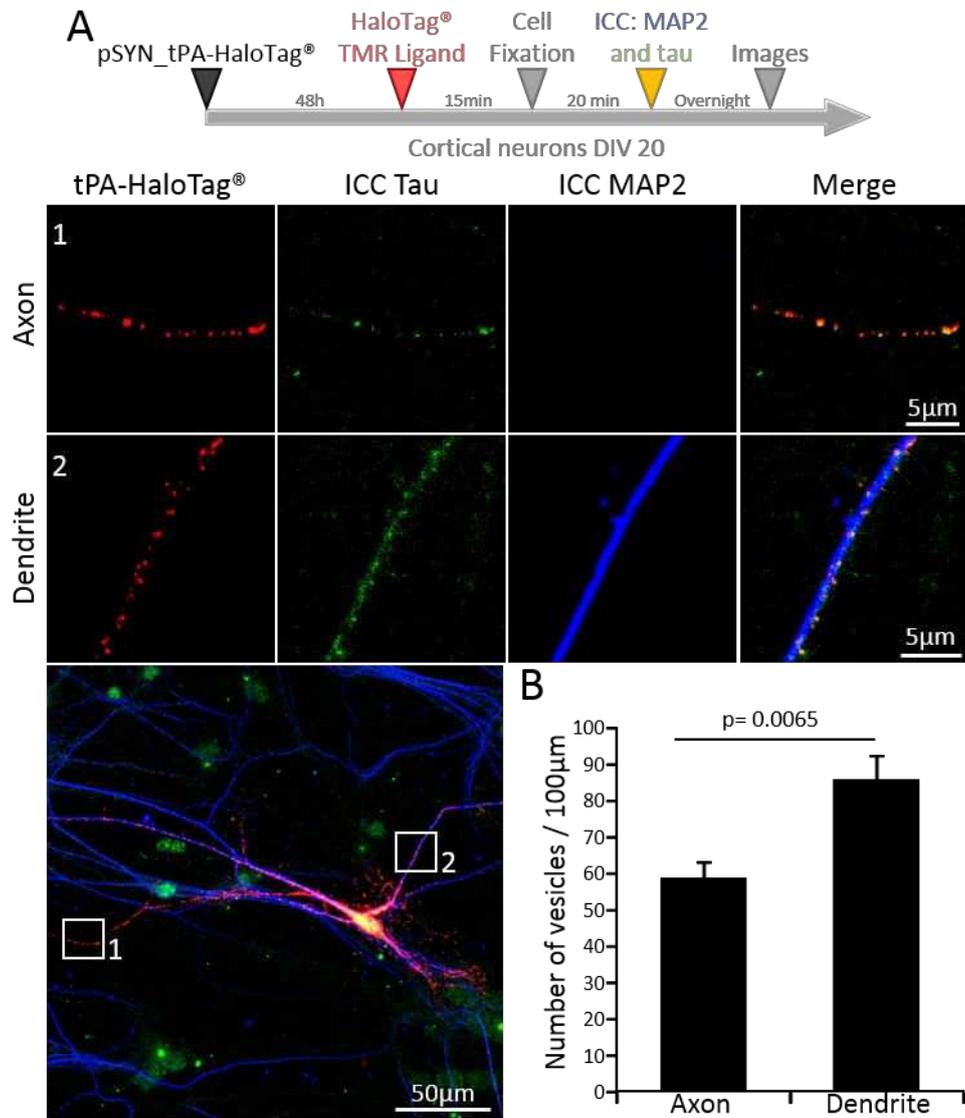


Figure 2: tPA is present in axons and dendrites.

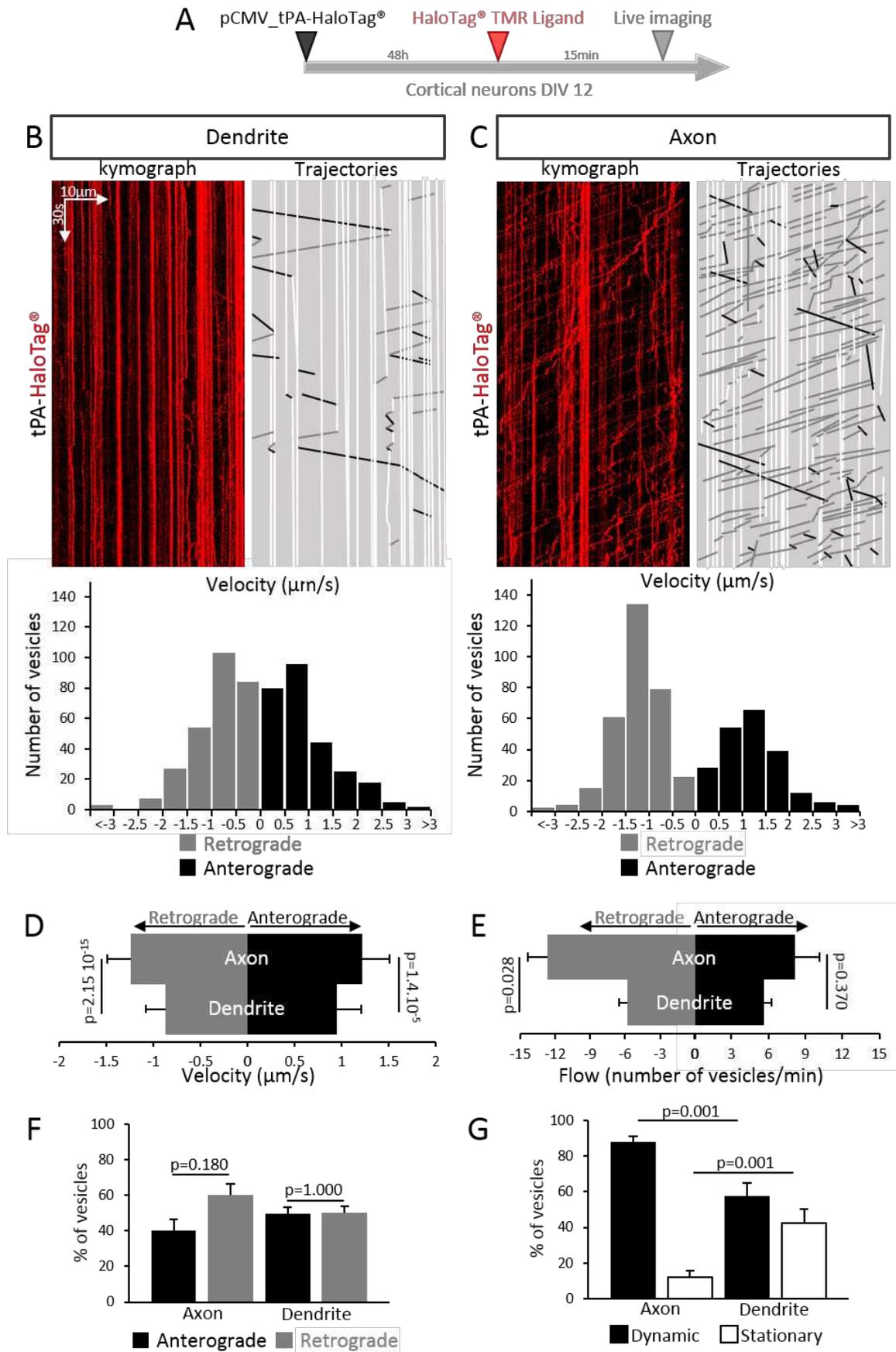


Figure 3: Transport of HaloTag[®]-tPA-SEP in cortical neurons.

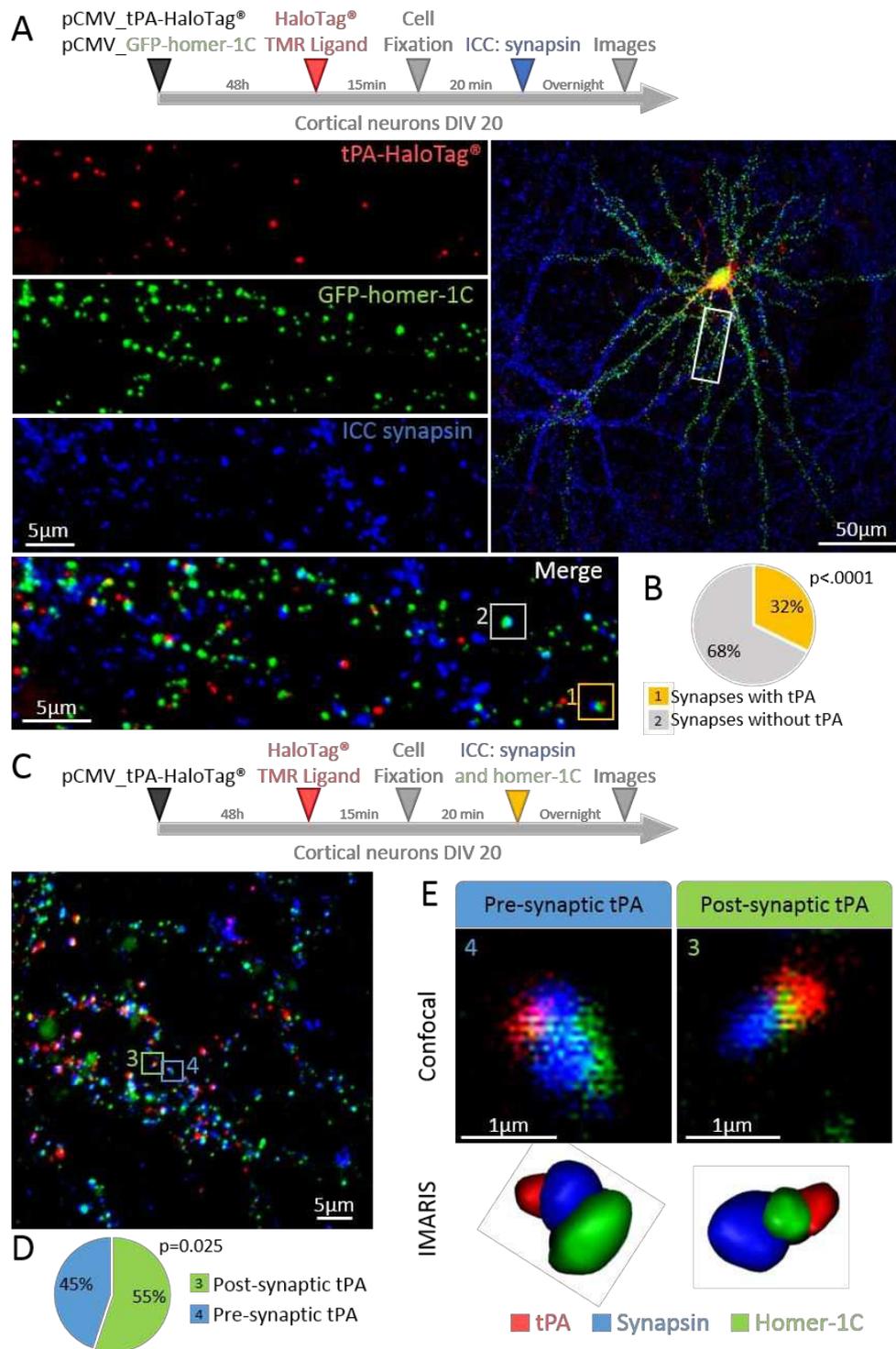


Figure 4: tPA is present in pre- and post-synaptic elements.

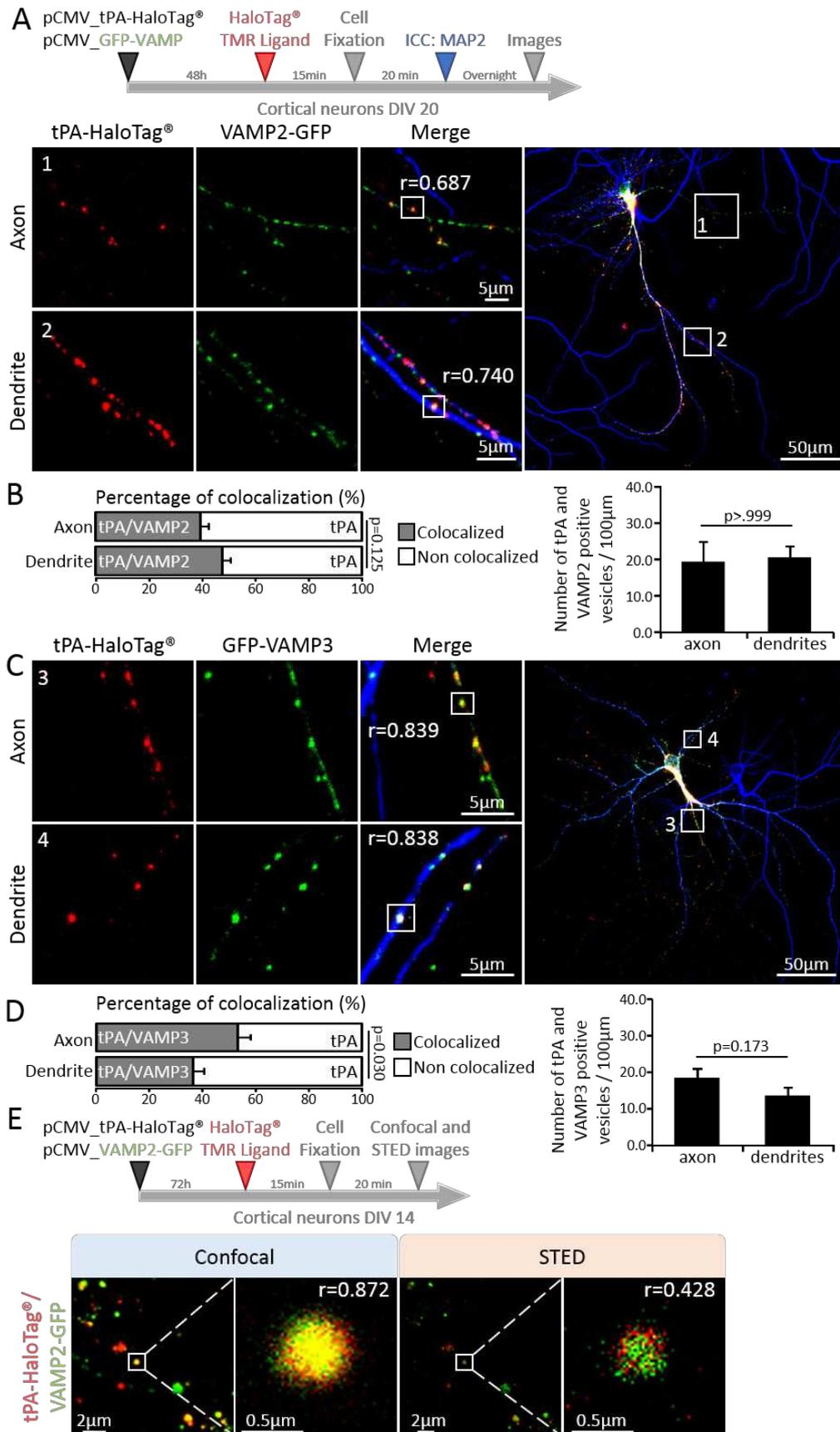


Figure 5: tPA is associated with VAMP-family proteins.

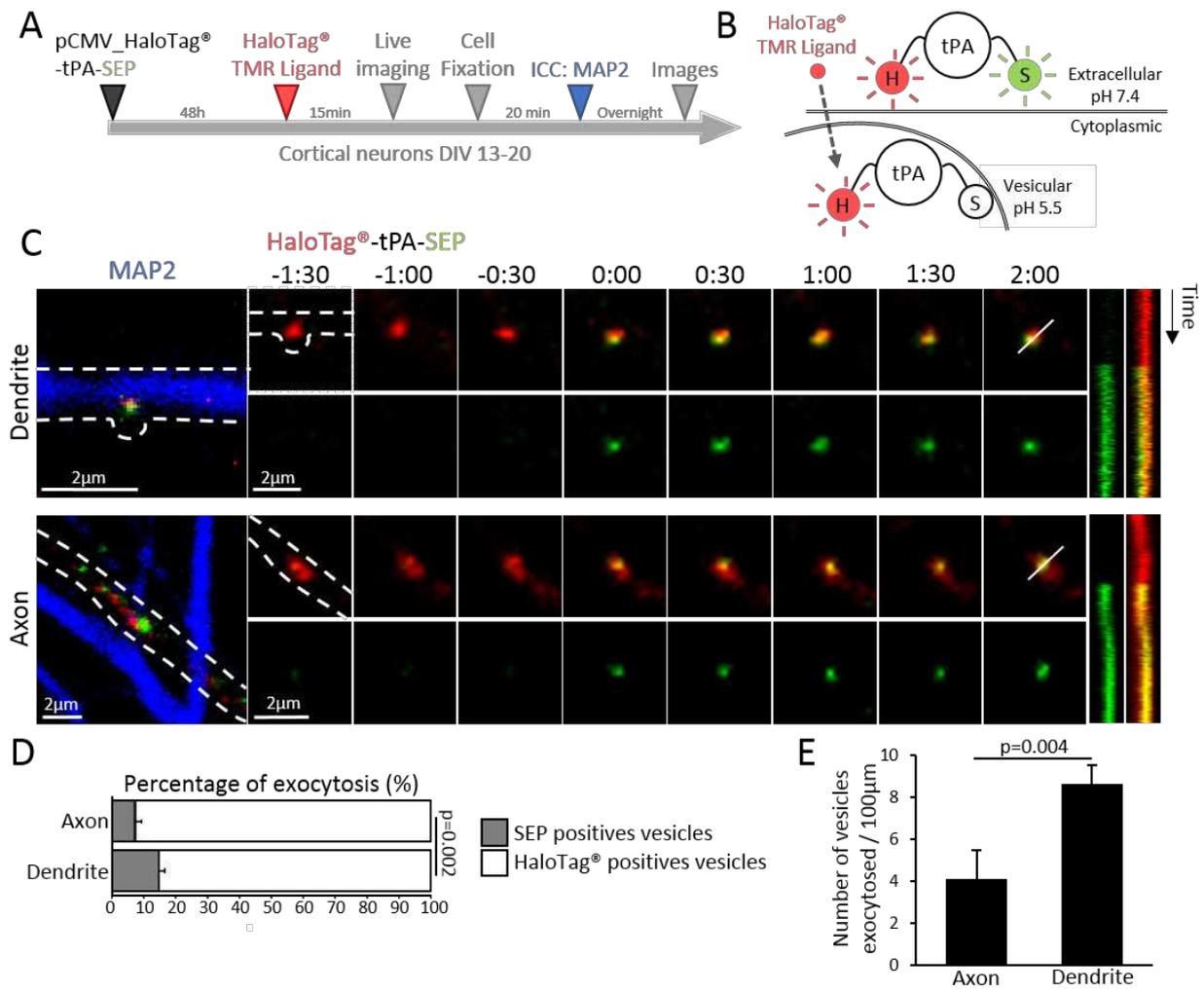


Figure 6: Dendritic and axonal release of tPA.

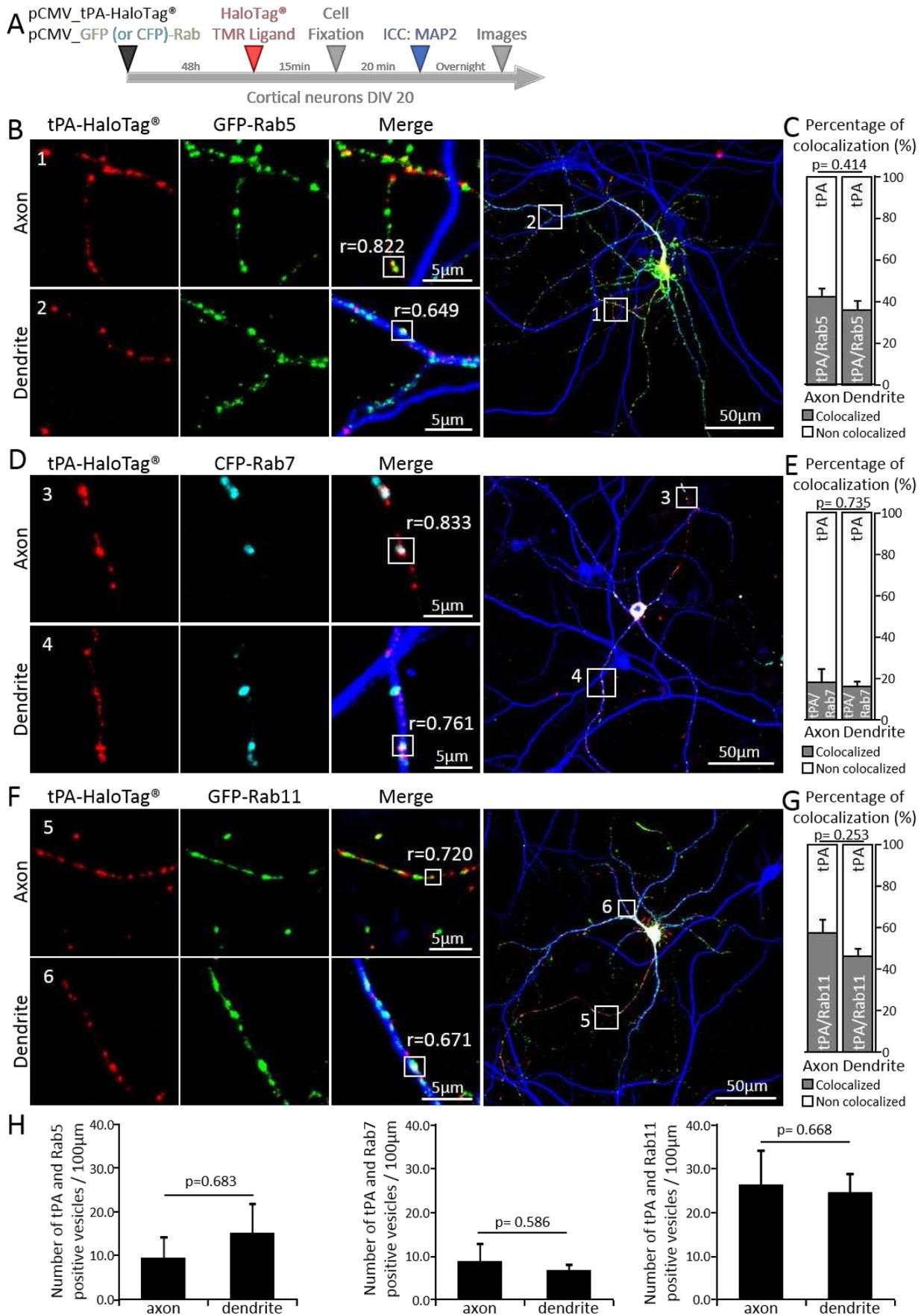


Figure 7: tPA is associated with Rab-family proteins.

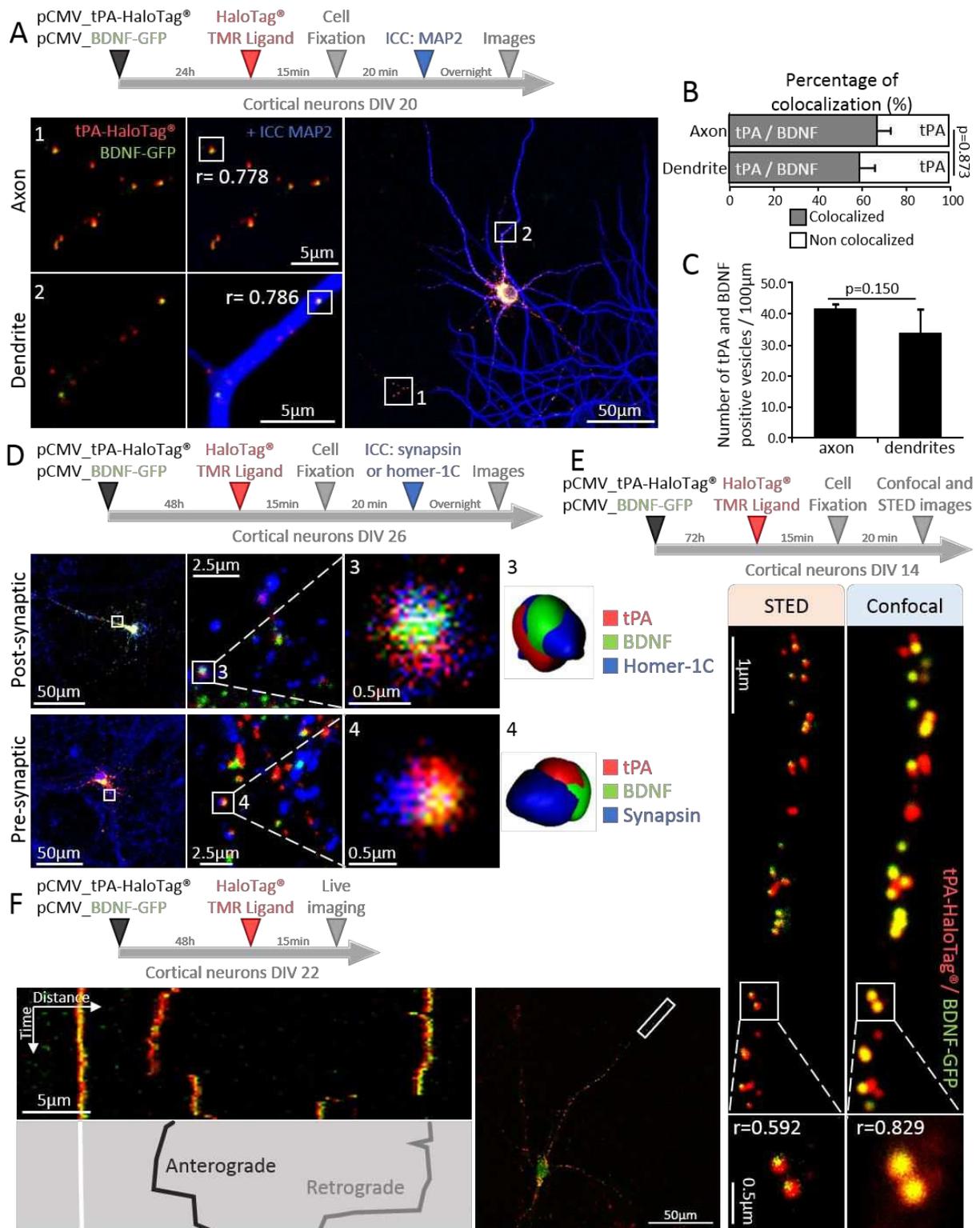


Figure 8: tPA is stored in the same synaptic vesicles than Brain-Derived Neurotrophic Factor (BDNF).

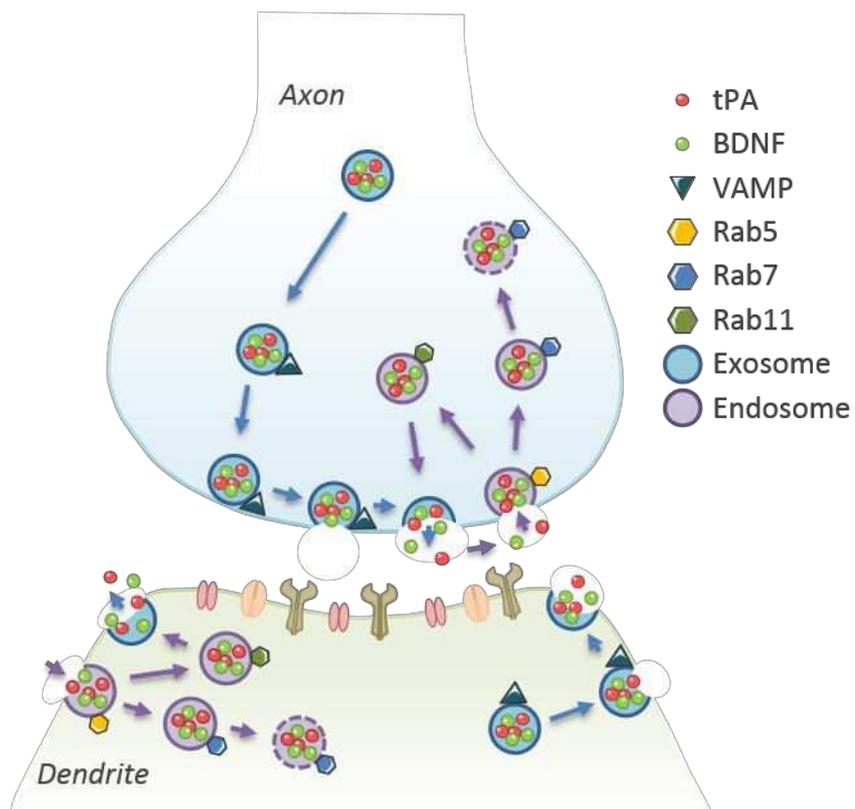
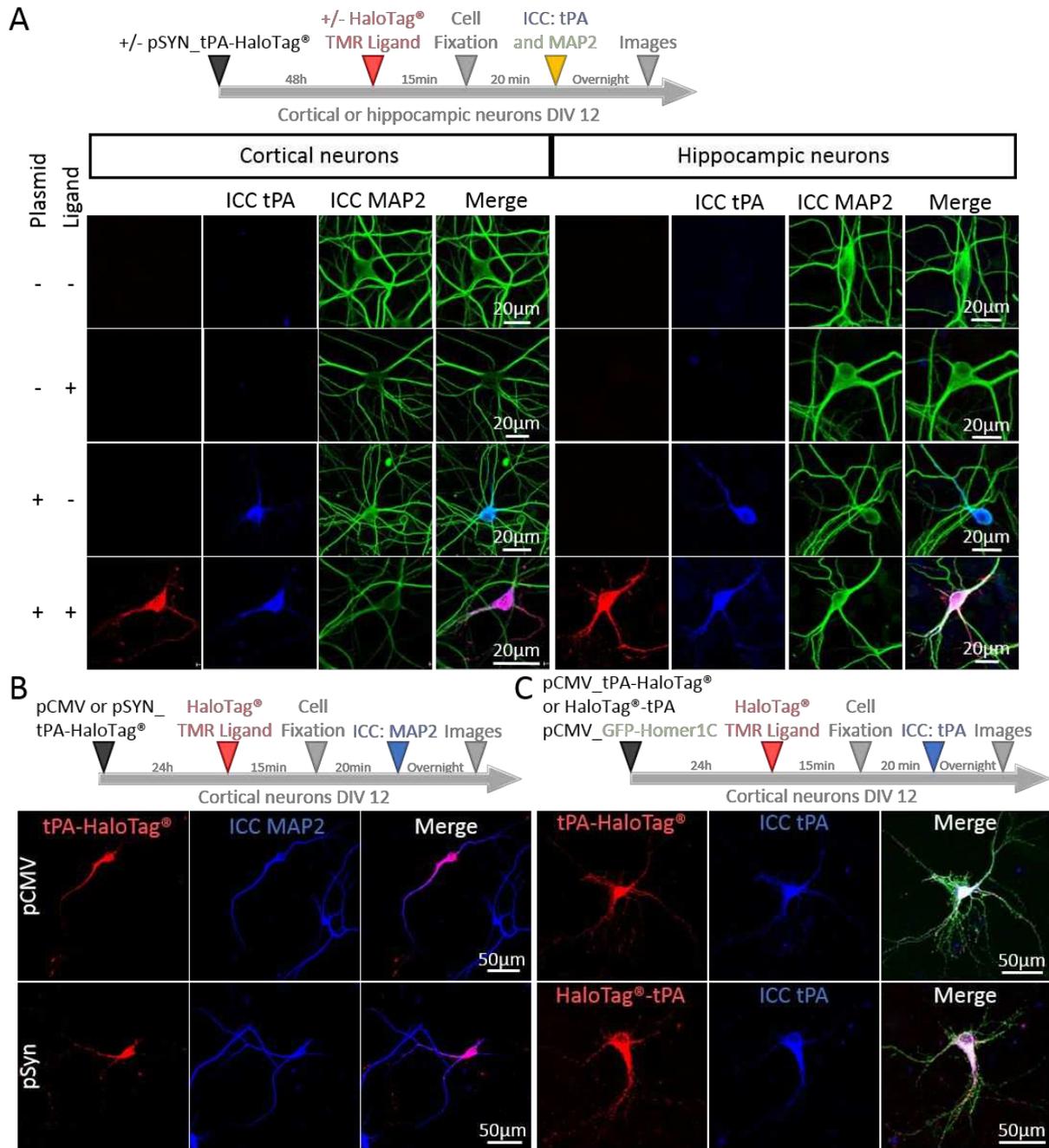
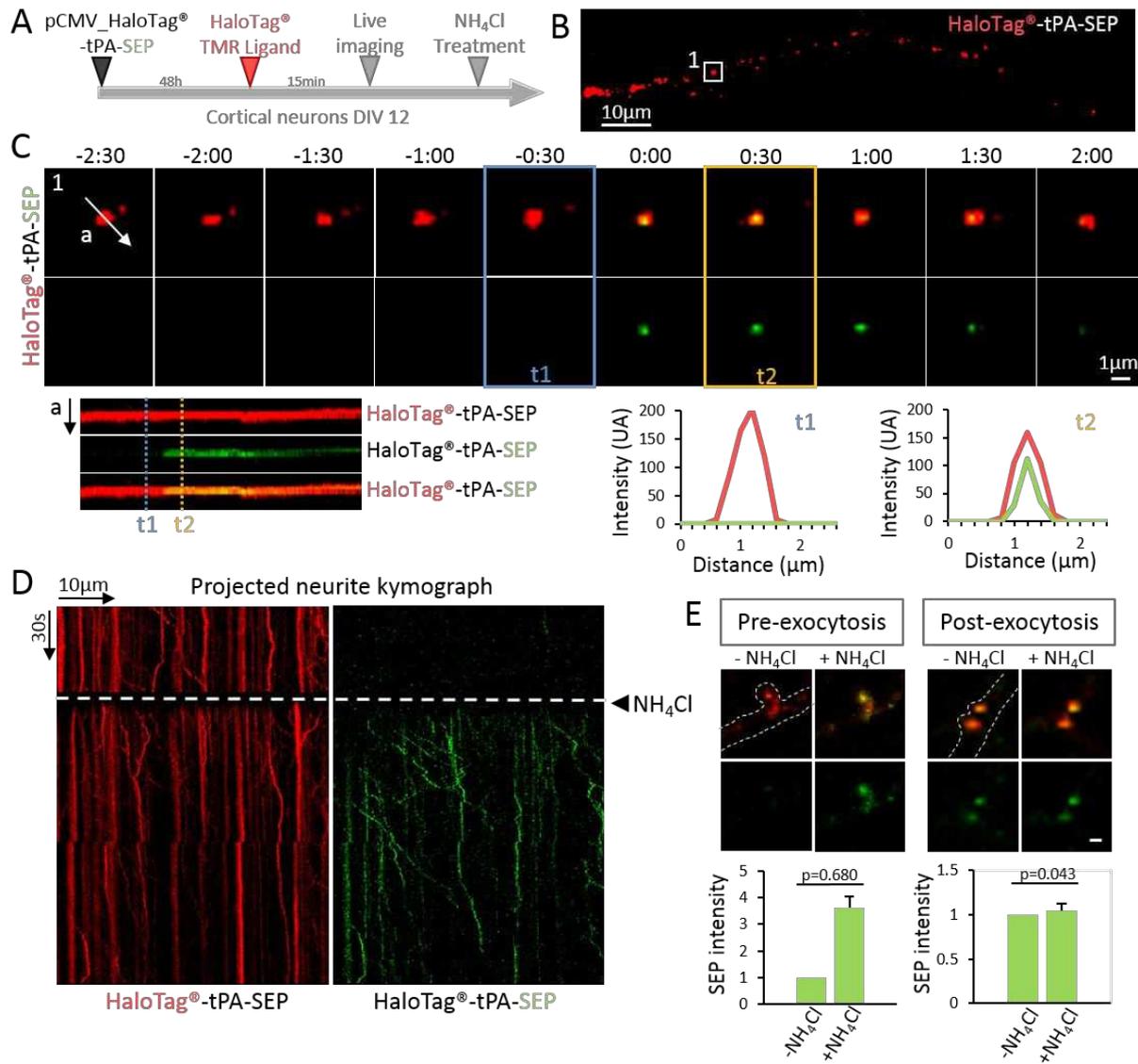
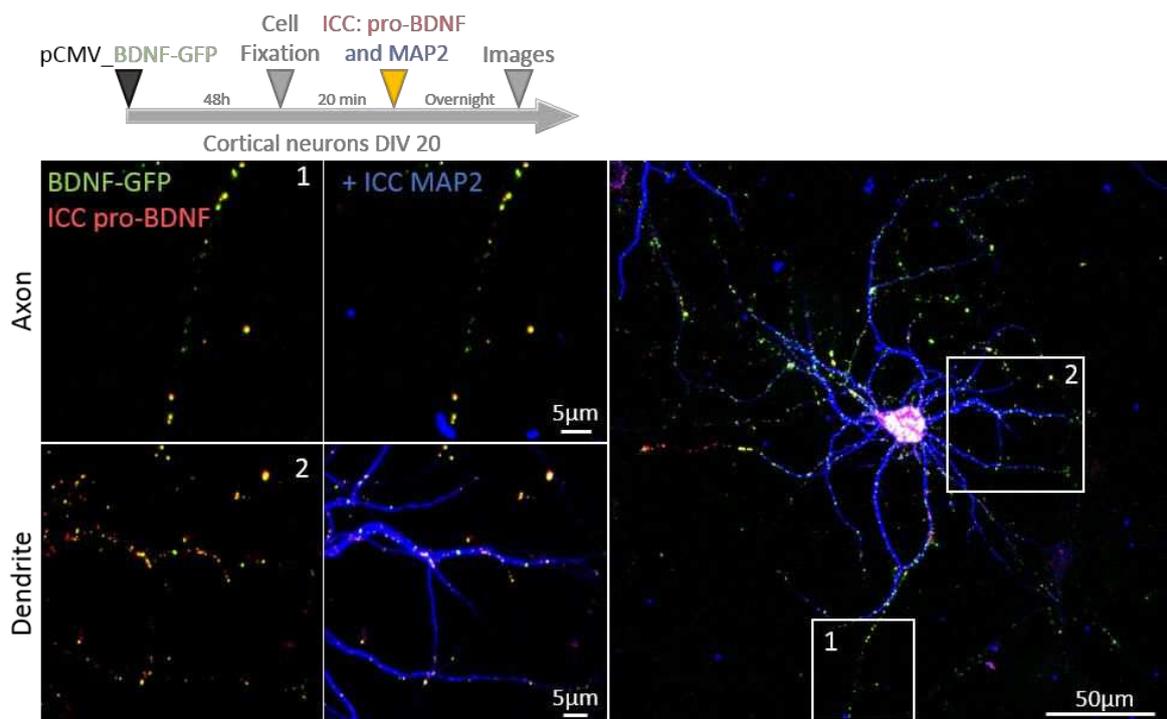


Figure 9: Representative scheme.

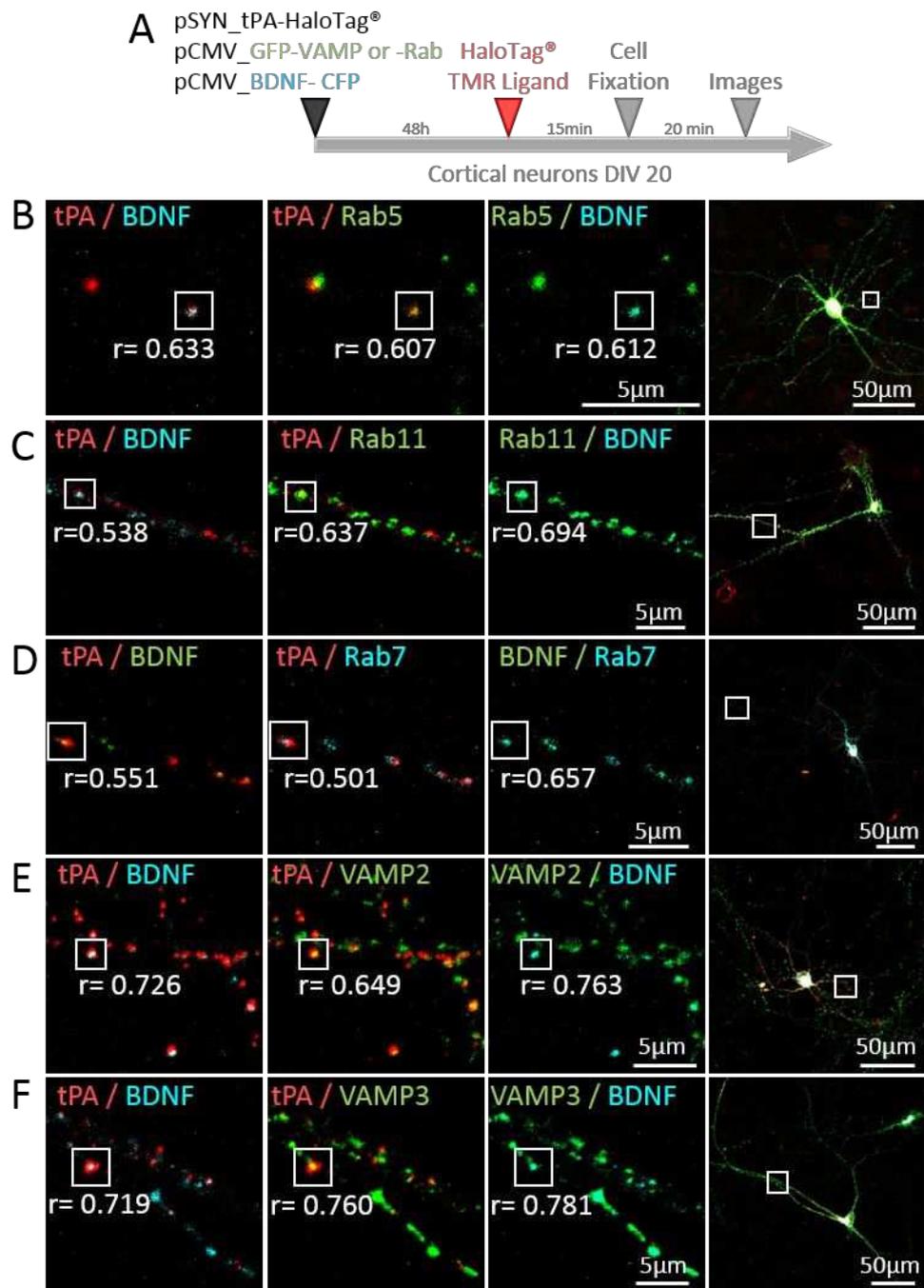


Supplementary 1: Characterization of tPA-HaloTag[®] plasmid.

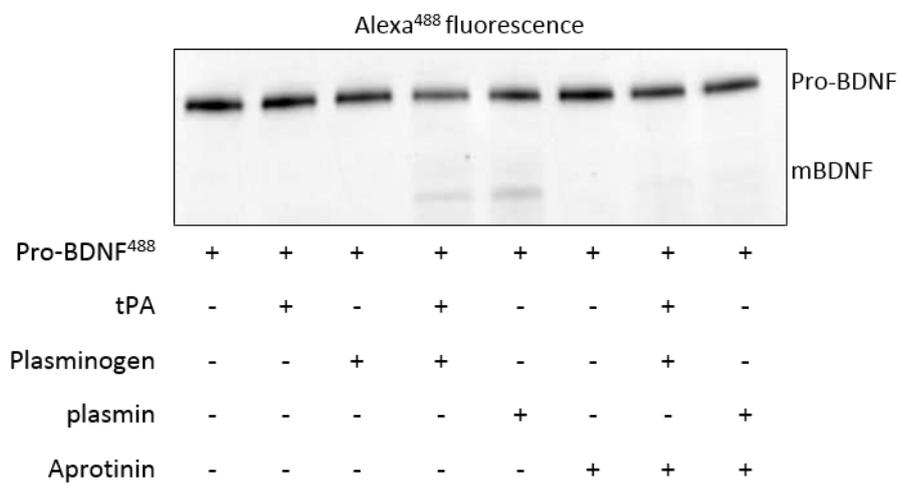
Supplementary 2: HaloTag[®]-tPA-SEP functionality.



Supplementary 3: Characterization of BDNF-GFP plasmid.



Supplementary 4: tPA and BDNF are associated with VAMPs and Rabs-family protein.



Supplementary 5: tPA is involved in BDNF maturation.

Discussion

Discussion

Article 1: Neuronal tissue-type plasminogen activator (tPA) with brain-derived neurotrophic factor (BDNF) are transported in the same vesicular cargoes in neurons.

Le tPA est impliqué dans de nombreux mécanismes physiopathologiques au sein du SNC ; il est donc nécessaire et important d'étudier la localisation et le trafic du tPA dans les neurones pour pouvoir mieux comprendre et expliquer ces différents rôles neuronaux mais également ces fonctions au sein du parenchyme cérébral.

Au cours de ce travail de thèse, nous avons montré dans un premier temps que le tPA est localisé au niveau des axones et des dendrites des neurones mais qu'il est également présent à la synapse. De manière intéressante, nous avons constaté que le tPA était majoritairement dans le compartiment post-synaptique. En accord avec la littérature, nous avons pu voir que le tPA est contenu dans des vésicules d'exocytose VAMP2 positives et qu'il peut être exocyté par les neurones (Halo-tPA-SEP). Le tPA peut également être endocyté par des vésicules Rab5 positives, recyclé par des vésicules Rab11 positives ou dégradé par des vésicules Rab7 positives. Nous avons également remarqué que le tPA peut être contenu dans les mêmes vésicules que le BDNF à la fois dans l'axone, les dendrites et à la synapse des neurones. De plus, nous avons montré que le tPA et le BDNF sont présents dans les mêmes vésicules d'exocytose (VAMP2), d'endocytose (Rab5), de recyclage (Rab11) et de dégradation (Rab7) et qu'ils peuvent être co-transportés le long des neurites de façon rétrograde ou antérograde.

1. Localisation et transport du tPA au sein des neurones

1.1. Le modèle cellulaire

A l'heure actuelle, il est très difficile de détecter et d'étudier le tPA neuronal cortical car les cellules l'expriment en trop faible quantité et les anticorps développés contre le tPA ne sont pas assez spécifiques pour détecter de trop faibles concentrations. *In vivo*, pour visualiser le tPA dans les neurones corticaux, il est nécessaire de réaliser une injection intraventriculaire de colchicine chez les animaux (Louessard et al., 2016). En se liant à la tubuline, la colchicine désorganise le cytosquelette et provoque une inhibition du transport des vésicules dans les axones et les dendrites. Cet arrêt du transport vésiculaire engendre une accumulation des protéines nouvellement formées dans le corps cellulaire des neurones, nous permettant ainsi de détecter le tPA. Cependant, *in vitro*, le traitement avec la colchicine ne fonctionne pas, il est donc très difficile de détecter et d'étudier le tPA dans des cultures de neurones. La surexpression de tPA *via* des plasmides est, à l'heure actuelle, le seul moyen de voir du tPA *in vitro*. C'est donc cette technique que nous avons choisi pour cette étude, en utilisant un nouveau plasmide codant pour une protéine fusion tPA-HaloTag®.

Nous avons décidé de créer un nouveau plasmide : pSYN_tPA-HaloTag® pour surexprimer le tPA dans les neurones en culture car comparativement à la protéine fusion classique : tPA-GFP, la protéine HaloTag® possède de nombreux avantages. L'HaloTag® est une haloalcane déshalogénase modifiée pour se lier à son substrat (les chloroalcanes) de façon irréversible (Encell et al., 2012). L'haloalcane déshalogénase est une enzyme bactérienne (issue des rhodococcus) qui peut transformer les chloroalcanes en alcools. Les chloroalcanes possèdent un groupe de liaison pour interagir avec l'enzyme et un groupe fonctionnel. C'est ce groupe fonctionnel qui confère les multiples rôles de la protéine HaloTag® car il peut être lié à des fluorophores, des ligands réactifs ou à des résines (Figure 44). Cette technique peut donc être utilisée pour l'imagerie, la purification et l'étude des interactions protéiques. L'HaloTag® possède donc plusieurs avantages en comparaison à la protéine GFP classique car on peut:

- Ajouter le ligand lorsqu'on le souhaite (à DIV3, DIV20, ...),
- Marquer différentes populations de protéines grâce à des fluorophores de différentes couleurs (par exemple : avant/après un traitement),
- Différencier des protéines extracellulaires et intracellulaires (grâce à deux types de ligands : cellules perméants et cellules imperméants),
- Purifier notre protéine d'intérêt (grâce à des résines),
- Trouver de nouveaux partenaires interagissant avec notre protéine (grâce à des résines)

Cependant l'inconvénient de cette technique est que, comme pour toutes les expériences impliquant des protéines fusions, la protéine HaloTag® (33 kDa) augmente considérablement la taille du tPA qui est déjà de 69 kDa.

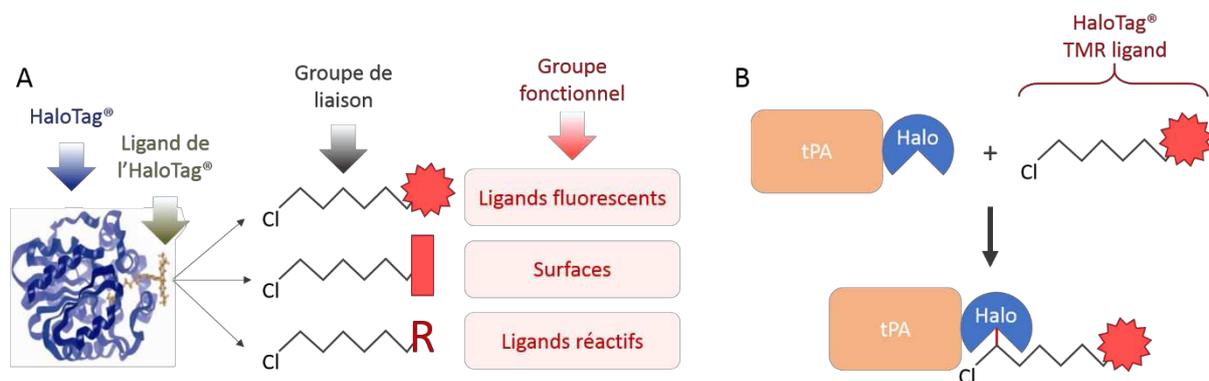


Figure 44: Schéma représentant le fonctionnement de l'HaloTag®. A) L'HaloTag® (en bleu) est une haloalcane déshalogénase mutée. Cette mutation lui permet de se lier de façon spécifique et covalente à son substrat : les chloroalcanes (« ligand de l'HaloTag® », en vert). Les chloroalcanes possèdent un groupe de liaison, reconnu par les haloalcanes déshalogénases (en gris) et un groupe fonctionnel (en rouge). Il existe plusieurs chloroalcanes avec différents groupes fonctionnels qui peuvent être liés à : des ligands fluorescents, des surfaces (par exemple : résines) ou des ligands réactifs. B) Dans notre étude la protéine d'intérêt (le tPA, en orange) est fusionnée avec l'HaloTag® (en bleu), lors de l'ajout du substrat de l'HaloTag® : « l'HaloTag® TMR ligand » sur nos cultures de neurones, ce ligand va aller se fixer de manière spécifique et irréversible sur la protéine fusion : tPA-HaloTag®. La mutation dans la séquence de l'HaloTag® va l'empêcher de cliver le chloroalcane et une liaison covalente va se former entre l'enzyme et le ligand (trait rouge) (adapté de : [Urh and Rosenberg, 2012](#)).

Dans un premier temps, nous avons caractérisé la protéine fusion : le tPA-HaloTag® produite par ce nouveau plasmide et nous avons confirmé que le TMR ligand se fixe bien de façon spécifique à l'HaloTag® ([Article 1 ; Figure 1 et Figure supplémentaire 1](#)). Nous avons également confirmé que l'ajout de l'HaloTag® en C-terminal du tPA n'altère pas sa fonction

protéolytique ([Article](#) ; [Figure 1](#)). Dans un second temps, nous avons pu voir que les promoteurs utilisés pSYN (synaptophysine : promoteur spécifique des neurones) ou pCMV (Cytomégalo virus : promoteur viral) et la localisation de l'HaloTag® en N- ou C-terminal sur le tPA n'influençaient pas l'expression ni l'adressage du tPA dans les neurones ([Article 1](#) ; [Figure supplémentaire 1](#)).

Nous savons que certains neurones du cortex, *in vivo*, sont capables de produire du tPA ([Louessard et al., 2016](#)). La première question que nous nous sommes posée a été de savoir si, *in vitro*, les neurones corticaux étaient également capables de produire du tPA (sans surexpression). Pour répondre à cette interrogation, nous avons transfecté des cultures de neurones avec un plasmide codant pour la séquence du promoteur du tPA suivie de la séquence codante pour la protéine fluorescente GFP pPLAT_GFP. Nous avons pu détecter de la fluorescence verte dans ces cultures : les neurones corticaux en culture sont donc bien capables d'activer le promoteur du tPA et donc par extension, ils peuvent produire du tPA ([Figure 45](#)). De plus, lorsque nous transfectons des cultures avec le plasmide : pPLAT_tPA-HaloTag®, nous obtenons la même distribution neuronale de la protéine fusion : tPA-HaloTag® en comparaison avec les autres promoteurs : pCMV et pSYN ([Article 1](#) ; [Figure supplémentaire 1](#)). Cependant, le promoteur du tPA étant un promoteur faible, nous n'avons pas pu réaliser notre étude avec ce plasmide.

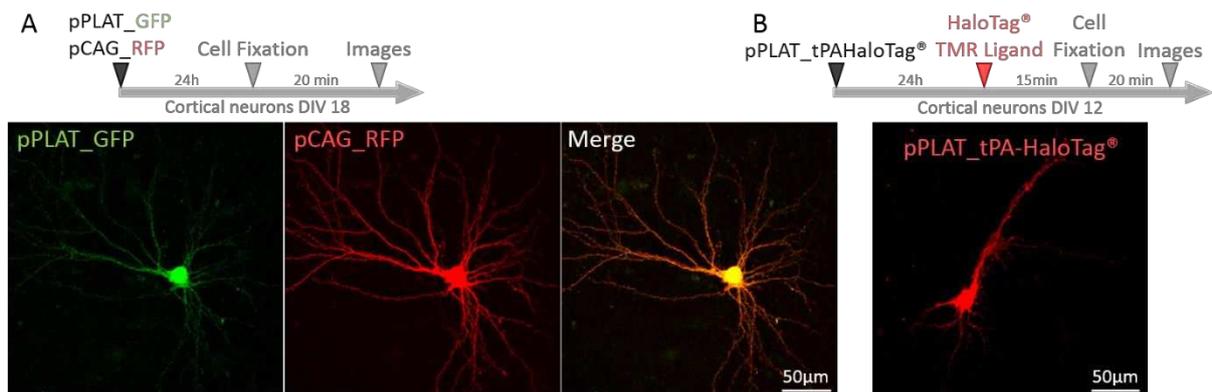


Figure 45: Les neurones corticaux en culture sont capables d'exprimer du tPA. A) *In vitro*, les neurones corticaux (à DIV18) sont capables d'activer le promoteur du tPA (PLAT), cette activation est visualisée grâce à la présence de fluorescence verte (GFP). Les neurones ont été co-transfectés avec un autre plasmide afin de visualiser les neurones transfectés (pCAG_RFP). B) La distribution du tPA-HaloTag® sous le contrôle du promoteur du tPA est semblable à celle sous le contrôle des promoteurs pSYN et pCMV.

La deuxième question que nous nous sommes naturellement posée, était de savoir si notre protéine: tPA-HaloTag[®] était adressée au bon endroit dans la cellule et si le fait de surexprimer plusieurs protéines (double et triple transfection) gênait leur adressage vers leur zone de prédilection. La surexpression de protéines dans une même cellule n'est pas une raison pour qu'elles colocalisent obligatoirement. Si les protéines surexprimées n'étaient pas adressées vers leur zone de prédilection mais accumulées à un endroit dans la cellule avant d'être dégradées, on obtiendrait une parfaite colocalisation de toutes nos protéines surexprimées. Or, ce n'est pas le cas, comme on peut le voir sur la [Figure 4 de l'Article 1](#) : le tPA (en rouge) est très proche des protéines homer1C (en verte) mais ne colocalise que très rarement. Ce qui est également le cas pour les co-transfections du tPA avec les différentes protéines étudiées (VAMP, Rab et BDNF). En effet, si ces protéines colocalisaient obligatoirement, on obtiendrait des pourcentages de colocalisation proche de 100% ([Article 1 ; Figure 5, 7 et 8](#)). Les plasmides codants pour le tPA-HaloTag[®] comprennent la séquence du tPA mais également une séquence codante pour son peptide signal. Le peptide signal est une chaîne peptidique servant à adresser la protéine dans un compartiment cellulaire spécifique. Une fois la protéine bien adressée, le peptide signal est clivé par des protéases ([Coleman et al., 1985; Kapp et al., 2013](#)). La présence du peptide signal permet donc un bon adressage cellulaire de notre protéine : tPA-HaloTag[®]. Il est important de mentionner que toutes les protéines de fusion utilisées dans cette étude sont synthétisées avec leur peptide signal. Un autre élément montrant que les protéines surexprimées *in vitro* sont adressées au bon endroit est l'exemple de l'expression de la protéine homer-1C. Homer-1C est une protéine d'échafaudage située dans le compartiment post-synaptique, elle est donc seulement présente dans les dendrites et plus particulièrement dans les épines dendritiques. La co-surexpression de cette protéine et du tPA-HaloTag[®] dans des cultures de neurones n'empêche pas leur bon adressage. En effet, on peut voir sur la [Figure 46](#) que la protéine GFP-homer1C est seulement adressée dans les épines dendritiques post-synaptiques et qu'elle est absente des axones. Ces deux points montrent bien que, même si l'on surexprime des protéines dans des cultures de neurones, ces protéines sont adressées au bon endroit dans la cellule et toutes les protéines ne colocalisent pas obligatoirement.

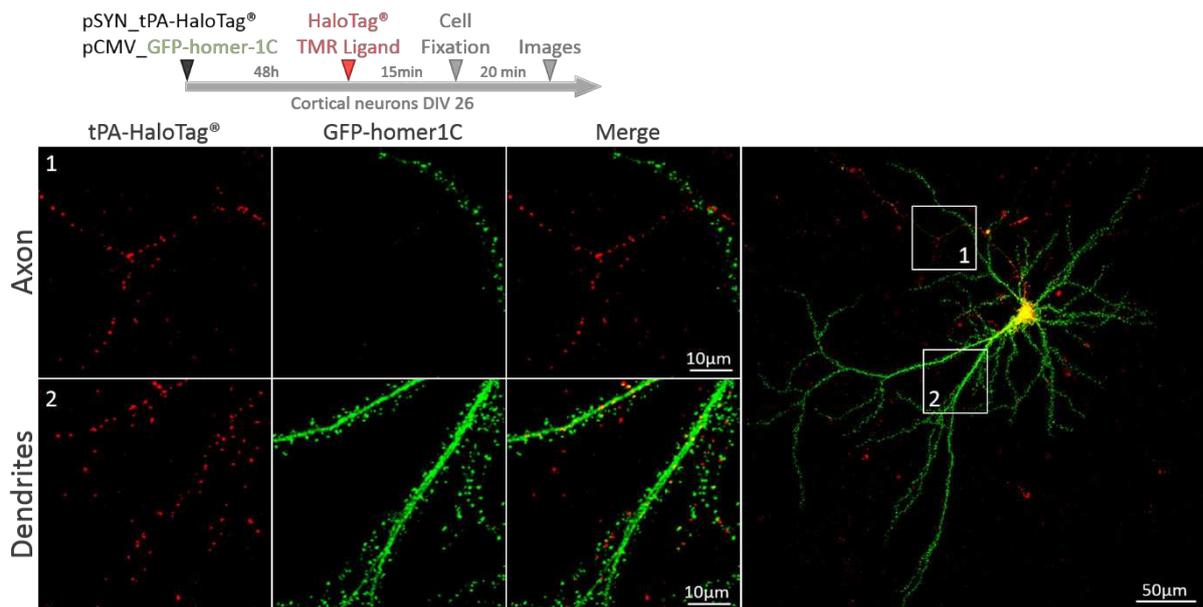


Figure 46: Les protéines surexprimées sont adressées au bon endroit dans la cellule. Culture de neurones corticaux (DIV26) surexprimant les protéines tPA-HaloTag[®] (en rouge) et GFP-homer1C (en vert). Le tPA-HaloTag[®] est présent à la fois dans l'axone (1) et dans les dendrites (2) alors que la protéine GFP-homer1C n'est présente que dans les dendrites (2). Homer1C est une protéine jouant un rôle au niveau des synapses et plus particulièrement au niveau post-synaptique. Cette protéine est donc bien adressée car elle n'est présente que dans les dendrites du neurone et plus particulièrement dans les épines dendritiques.

1.2. Localisation du tPA dans les neurones

Grâce à l'étude de Lochner et collaborateurs (Lochner et al., 2006), on sait que le tPA est présent dans les axones, les dendrites et au niveau des synapses des neurones hippocampiques en culture. Notre étude, qui est basée sur des cultures de neurones corticaux, montre également que le tPA est présent dans ces différents compartiments. De plus, nous montrons que le tPA est adressé préférentiellement dans les dendrites et dans le compartiment post-synaptique (Article 1 ; Figure 2 et 4).

Le tPA est décrit comme un neuromodulateur : il est synthétisé par le neurone présynaptique, libéré à la synapse suite à une dépolarisation, puis interagit avec des récepteurs post-synaptiques et enfin l'excès de tPA à la synapse est recapturé par les astrocytes environnants (Fernández-Monreal et al., 2004). Notre étude souligne que le tPA n'est pas seulement situé dans le compartiment présynaptique mais qu'il est préférentiellement situé dans le compartiment post-synaptique ; ce résultat suggère que le tPA n'aurait pas seulement un rôle de neuromodulateur, ce qui ouvre donc une nouvelle porte

d'étude sur les fonctions du tPA à la synapse. De plus, les résultats obtenus avec le plasmide pCMV_HaloTag®-tPA-SEP nous montrent que le tPA est libéré de façon constitutive au niveau post-synaptique, ce qui renforce l'idée que le tPA n'a pas seulement un rôle de neuromodulateur. Il serait donc intéressant d'étudier avec précision le rôle de ce tPA post-synaptique. Pour cela, les chambres microfluidiques pourraient être utilisées. Les chambres microfluidiques sont des dispositifs contenant des micro-canaux qui permettent d'isoler trois compartiments : un compartiment présynaptique, une chambre synaptique et un compartiment post-synaptique. Ces chambres sont constituées de deux puits reliés entre eux par des micro-canaux dans lesquels seuls les axones peuvent passer. Il est ainsi possible de transfecter uniquement les neurones post-synaptiques, de stimuler spécifiquement les neurones présynaptiques et de regarder ce qu'il se passe à la synapse. Cette technique permettrait d'étudier le rôle du tPA post-synaptique afin de savoir si ce tPA se lie aux récepteurs post-synaptiques et/ou présynaptiques mais également de voir avec quelles protéines il interagit à la synapse.

Plusieurs hypothèses sont envisageables concernant le rôle post-synaptique du tPA : une des hypothèses qui pourrait être mise en avant serait son implication dans la LTP tardive. En effet, nous savons déjà que le tPA est impliqué dans ce type de LTP (D. Baranes et al., 1998). Le tPA post-synaptique pourrait servir de réserve et être libéré à la synapse suite à une dépolarisation du neurone présynaptique. En effet, suite à une stimulation, le neurone présynaptique va libérer une grande quantité de glutamate qui va activer les récepteurs AMPA post-synaptiques provoquant ainsi une dépolarisation locale post-synaptique. Cette dépolarisation locale est nécessaire et suffisante pour libérer les ions magnésium qui bloquent les canaux des récepteurs NMDA permettant ainsi à ces derniers d'être activés par le glutamate synaptique. La dépolarisation locale post-synaptique pourrait également engendrer une libération de tPA, ce tPA pourrait aller sur-activer les récepteurs NMDA augmentant ainsi l'entrée de calcium dans les neurones et donc *a fortiori* les mécanismes responsables de la LTP tardive. Cependant, l'implication du tPA post-synaptique dans la LTP tardive pourrait être expliquée par d'autres mécanismes indépendants de son interaction avec les récepteurs NMDA. Le tPA libéré au niveau post-synaptique pourrait cliver le plasminogène permettant, par la formation de plasmine, de convertir le pro-BDNF en mBDNF et c'est ce mBDNF qui serait impliqué dans les mécanismes de LTP tardive (Pang et al., 2004). Nous

savons également que le tPA intervient dans la dégradation de la MEC *via* la formation de la plasmine ce qui faciliterait la création de nouvelles synapses (D. Baranes et al., 1998). Cependant, dans cette étude, nous avons seulement regardé l'exocytose basale du tPA, il serait donc intéressant de vérifier l'implication du tPA post-synaptique dans ces différents mécanismes *via* des expériences de LTP chimique. Les expériences de LTP chimique permettraient également de regarder si contrairement à l'exocytose basale, la localisation de la libération de tPA diffère lors d'une exocytose régulée. De plus, l'utilisation de mutants du tPA pourrait également permettre de découvrir le ou les domaines du tPA mis en jeu lors de la LTP tardive. Il existe différents mutants du tPA : un tPA inactif, un tPA dépourvu du domaine K2 (tPA- Δ K2), un tPA n'interagissant pas avec les récepteurs NMDA (tPA-K2*), un tPA dépourvu du domaine finger (tPA- Δ F) ou du domaine EGF (tPA- Δ EGF).

Nous savons que le tPA est impliqué dans la pousse neuritique (D. Baranes et al., 1998; Silverman et al., 2005). Ainsi la deuxième hypothèse pour expliquer le rôle du tPA post-synaptique repose sur la présence de tPA au niveau des cônes de croissance (**Figure 47**). Comme vu dans l'introduction (« 1.5.2.1 tPA et développement cérébral »), les fonctions du tPA sur la pousse neuritique pourraient être médiées par les MMP, l'HGF ou le BDNF (García-Rocha et al., 1994; Thewke and Seeds, 1999; Song et al., 1997). Il serait donc intéressant de regarder et d'élucider, grâce à la technique HaloTag®, les mécanismes mis en jeu dans la pousse neuritique afin de comprendre plus précisément le rôle du tPA. De plus, il serait bien de savoir si l'expression et la localisation du tPA dans les neurones changent en fonction de l'âge des neurones en culture afin de mieux caractériser l'expression du tPA au cours du temps.

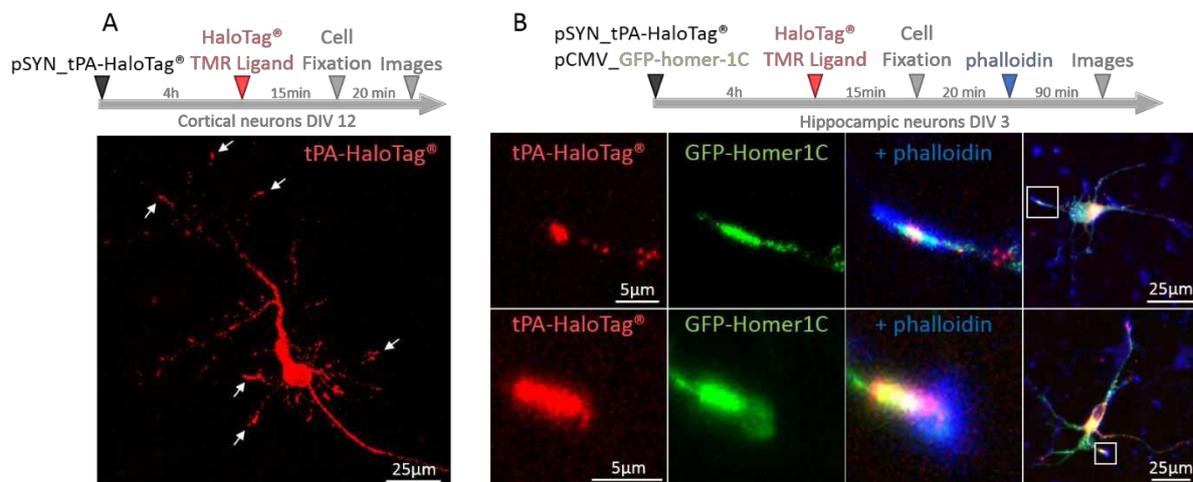


Figure 47: le tPA est présent au niveau des cônes de croissance des neurites en culture. A) Les neurones corticaux en culture (DIV12) présentent une accumulation de tPA-HaloTag[®] au niveau des terminaisons des neurites. B) Culture de neurones hippocampiques transfectés à DIV3 avec les plasmides codant pour le tPA-HaloTag[®] (en rouge) et pour la GFP-homer1C (en vert), après fixation des cellules, un marquage avec la phalloïdine est réalisé (en bleu, pour marquer les filaments d'actine). Le tPA est présent au niveau des cônes de croissance constitués de filaments d'actine, élément nécessaire à la pousse des neurites.

1.3. Transport des vésicules de tPA

Nous avons ensuite montré que le tPA était transporté le long des axones et des dendrites des neurones corticaux en culture et que ce transport s'effectue de façon rétrograde (de la périphérie vers le corps cellulaire) et antérograde (du corps cellulaire vers la périphérie). Nous avons mis en évidence que les vésicules contenant du tPA sont davantage mobiles dans les axones (environ 1,22 μm/s) que dans les dendrites (environ 0,9 μm/s). Ces vitesses sont en accord avec celles retrouvées dans la littérature pour le trafic des vésicules à cœur dense (Kwintar et al., 2009; Lochner et al., 1998) (**Article 1 ; Figure 3**).

Au niveau des dendrites, les vésicules sont plus stationnaires que dans les axones. Ceci peut s'expliquer par le fait que les vésicules de tPA sont sûrement situées au niveau des épines dendritiques et probablement arrimées à la membrane plasmique pour être exocytées suite à une dépolarisation neuronale. De plus, nous avons retrouvé une exocytose plus élevée des vésicules contenant l'HaloTag[®]-tPA-SEP dans les dendrites par rapport aux axones (**Article 1 ; Figure 6**) ; ce résultat confirme l'hypothèse énoncée précédemment. Il serait donc intéressant de vérifier cette hypothèse en effectuant un traitement au KCl sur ces cultures afin de vérifier que la dépolarisation neuronale, induite par le KCl, provoque une diminution de la quantité

de spot de tPA-HaloTag® au niveau des dendrites ou alors une augmentation de l'exocytose de ces vésicules immobiles contenant la protéine HaloTag®-tPA-SEP.

En revanche, les vésicules contenant le tPA sont plus dynamiques dans les axones que dans les dendrites. L'explication la plus probable est que ces vésicules retournent vers le corps cellulaire pour être dégradées par les lysosomes ou alors pour aller activer certains gènes au niveau du noyau. Le transport rétrograde du tPA axonal pourrait avoir un rôle protecteur comme pour le BDNF (Philippidou et al., 2011) en contrôlant des gènes responsables de la survie neuronale. Ce transport rétrograde du tPA serait en accord avec les mécanismes de survie du tPA (Correa et al., 2011; Liot et al., 2006; Wu et al., 2013).

2. Trafic vésiculaire neuronal du tPA

2.1. Le tPA neuronal peut être exocyté

Comme nous l'avons vu dans la partie « 3.1 L'exocytose » de l'introduction, l'exocytose est un mécanisme important pour le fonctionnement des cellules et principalement pour les neurones. Cette fonction est à la base de la communication entre les différentes cellules cérébrales (Wu et al., 2014). Louessard et collaborateurs ont montré, que le tPA était contenu dans des vésicules glutamatergiques synaptobrévines 2 (VAMP2) positives (Louessard et al., 2016). D'autres études ont également révélé que le tPA pouvait être libéré dans le milieu extracellulaire suite à une dépolarisation neuronale par l'intermédiaire du KCl (Fernández-Monreal et al., 2004; Gualandris et al., 1996; Lochner et al., 2006) ou du NDMA (Nicole et al., 2001).

Nos recherches nous ont permis d'une part, de confirmer que le tPA est bien présent dans des vésicules VAMP2 positives (Article 1 ; Figure 5) et d'autre part, de visualiser son exocytose grâce à un outil original : un plasmide codant pour le HaloTag®-tPA-SEP (Article 1 ; Figure 6). La SEP est une protéine fluorescente spéciale : en effet, cette GFP n'est fluorescente qu'à pH 7,4 (pH extracellulaire), lorsque la protéine HaloTag®-tPA-SEP est dans les vésicules (pH 5,5) elle ne peut donc pas émettre de fluorescence. Cette technique nous permet de suivre en direct l'exocytose du tPA : dans les vésicules le tPA est seulement détectable grâce

à sa fluorescence rouge (TMR ligand fixé à l'HaloTag®), lors de l'exocytose le tPA est détectable *via* le TMR Ligand (rouge) mais également grâce à la GFP qui devient fluorescente (verte). Dans cette étude, nous avons montré que le tPA n'était pas seulement libéré de façon régulée (par un stimulus : le KCl ou le NMDA) mais qu'il est également libéré de façon constitutive par le neurone à la fois dans l'axone et les dendrites (**Article 1 ; Figure 6**). Pour confirmer ce résultat, on pourrait traiter nos cultures de neurones exprimant la protéine HaloTag®-tPA-SEP, avec la toxine tétanique qui est un inhibiteur de l'exocytose. De la même manière, il serait intéressant de visualiser l'exocytose régulée du tPA à l'aide d'un traitement au KCl ou au NMDA ; ces deux molécules provoquent une entrée de calcium dans la cellule ce qui va engendrer une dépolarisation neuronale. Comme vu précédemment, nous avons seulement regardé l'exocytose constitutive, c'est-à-dire non provoquée par une dépolarisation neuronale. Dans notre cas, il est possible de comparer l'exocytose spontanée du tPA au niveau axonal *versus* dendritique. L'exocytose spontanée est un mécanisme nécessaire pour le renouvellement de la membrane et des composants de celle-ci (récepteurs, canaux, etc.), elle peut donc s'effectuer tout au long des prolongements. En revanche, lors d'une exocytose régulée (*via* le calcium), la libération présynaptique de molécules ne peut s'effectuer seulement au niveau de la terminaison axonale, contrairement à l'exocytose post-synaptique qui peut s'effectuer tout au long des dendrites au niveau des épines. Il serait peut-être plus pertinent de comparer l'exocytose régulée *versus* constitutive au niveau des axones et au niveau des dendrites. En effet une des hypothèses, qui devrait être vérifiée, est que le tPA est libéré de façon constitutive dans l'élément post-synaptique (dendrites) et de façon régulée au niveau du compartiment présynaptique (axones).

Nous avons également démontré que le tPA peut être contenu dans des vésicules VAMP3 positives (**Article 1 ; Figure 5**). Physiologiquement, VAMP3 est seulement exprimé par les astrocytes et il est impliqué dans les endosomes de recyclage ([Barber et al., 2015](#)). Lorsque VAMP3 est exprimé dans les neurones, il possède les mêmes fonctions d'exocytose que VAMP2 à savoir qu'il peut également interagir avec les t-SNARE, la syntaxine 1 et SNAP-25 ([Chilcote et al., 1995](#)). VAMP7 est une protéine impliquée dans des voies de sécrétion et d'endocytose, ce qui lui permet de jouer un rôle dans la croissance des neurites et la transmission synaptique mais également dans le remodelage de la membrane plasmique et la sécrétion lysosomale ([Chaîneau et al., 2009](#)). Il serait donc intéressant d'étudier l'interaction

du tPA avec VAMP7 au niveau neuronal afin de voir d'une part, si le tPA peut subir une exocytose lysosomale et, d'autre part, confirmer son éventuelle implication dans la croissance des neurites.

2.2. Le tPA neuronal peut être endocyté, recyclé ou dégradé

En revanche, très peu de recherches se sont attachées au rôle du tPA dans l'endocytose, ni à celui de l'endocytose du tPA au niveau neuronal. L'endocytose est un mécanisme cellulaire très important car il est responsable du recyclage et de la dégradation des molécules (Sudhof, 2004). Yepes et collaborateurs ont montré que le tPA augmentait l'endocytose des vésicules synaptiques par un mécanisme indépendant de la plasmine. Le tPA induirait une déphosphorylation de la dynamine I ce qui permettrait le recrutement de la F-actine à la membrane présynaptique ; mécanisme à la base de l'endocytose. Leurs données montrent qu'à la suite d'une exocytose de neurotransmetteurs, le tPA permet l'association entre des vésicules synaptiques nouvellement formées et la F-actine afin de reconstituer le pool de vésicules disponibles pour un nouveau cycle d'exocytose (Yepes et al., 2016).

Notre étude montre que le tPA peut être endocyté par des vésicules Rab5 positives, recyclé par des vésicules Rab11 mais également dégradé par des vésicules Rab7 positives (Article 1 ; Figure 7). Il serait intéressant de regarder si, une fois recyclé, ce tPA peut de nouveau être exocyté. Rab3 est une protéine associée aux vésicules de sécrétion, elle permet l'exocytose des vésicules recyclées (Hutagalung and Novick, 2011). Pour étudier l'exocytose du tPA recyclé, il faudrait transfecter des cultures de neurones avec les plasmides codant respectivement pour le tPA-HaloTag® et la protéine Rab3-GFP puis regarder en microscopie confocale si ces deux protéines colocalisent. On pourrait également approfondir le mode de recyclage du tPA afin de savoir s'il emprunte également la voie de recyclage rapide (vésicule Rab4 positive) ou seulement la voie longue (vésicule Rab11 positive). Afin de vérifier ces différents mécanismes d'endocytose, on pourrait également traiter des cultures de neurones, préalablement transfectés avec les différents plasmides codant pour les Rab-GFP, avec du tPA-HaloTag® et regarder si, d'une part, le tPA-HaloTag® extracellulaire est bien recapturé par les neurones et, d'autre part, si ce tPA est associé aux différentes protéines de la famille des Rab (Rab5, Rab11, Rab7, Rab4 et Rab3).

Lors de cette étude nous avons montré que le tPA est présent dans des endosomes précoces (vésicules Rab5 positive), ce qui suggère fortement qu'il peut être internalisé au préalable par les neurones. Il existe diverses voies d'endocytose de protéines au niveau cérébral (ces voies sont davantage décrites dans l'introduction « 3.2 L'endocytose »). Il serait donc intéressant de regarder par quel type d'endocytose le tPA extracellulaire est recapturé par les neurones. En effet, connaître le mode d'endocytose du tPA pourrait permettre de mieux comprendre son rôle neuronal. Il pourrait être internalisé de manière spécifique suite à sa liaison avec un de ses récepteurs comme les récepteurs LRP, NMDA ou EGF *via* les clathrines. Nous savons déjà, grâce à la littérature, que l'endocytose dépendante de la clathrine joue un rôle essentiel dans la transduction de signaux, dans la neurotransmission (McMahon and Boucrot, 2011) et dans le recyclage des vésicules synaptiques (Farsi et al., 2018). Lors de cette internalisation, le ligand est dégradé alors que le récepteur est recyclé pour être de nouveau disponible à la membrane, afin qu'un autre ligand puisse l'activer. Parmi les récepteurs du tPA, les mieux caractérisés sont les récepteurs LRP qui, en plus d'être des récepteurs pouvant lier le tPA, sont largement décrits pour leur rôle dans l'endocytose. En effet, plusieurs études ont déjà mis en évidence que le tPA pouvait être internalisé *via* les récepteurs LRP : citons comme exemples, les astrocytes où ils seraient responsables de sa clairance cérébrale (Briens et al., 2017), les hépatocytes où ils seraient en partie responsables de sa clairance vasculaire (Narita et al., 1995) enfin au niveau des cellules endothéliales où ils permettraient au tPA de traverser la BHE (Benchenane et al., 2005). L'ensemble de ces résultats font des récepteurs LRP un candidat de choix pour permettre l'endocytose du tPA *via* les clathrines au niveau neuronal. Pour vérifier l'implication de ce type d'endocytose par les récepteurs LRP, nous pourrions utiliser un inhibiteur de ces récepteurs comme RAP (en anglais : *Receptor-associated protein*) ou inhiber l'expression des ARNm grâce aux siRNA (en anglais : *small interfering RNA*). Il serait intéressant de regarder si cette inhibition de l'internalisation neuronale du tPA joue un rôle dans la plasticité synaptique, les processus neurodégénératifs ou dans l'ouverture de la BHE. De plus, nous savons que le tPA interagit avec les récepteurs LRP grâce à son domaine finger, nous pourrions donc utiliser une protéine fusion comprenant : le mutant du tPA délété de son domaine finger et la protéine HaloTag® afin de voir si la protéine tPA Δ F-HaloTag® est toujours internalisée par les neurones. Une autre technique qui pourrait être utilisée, serait d'abolir spécifiquement l'expression de LRP dans les neurones à un moment donné grâce à l'utilisation de la technologie de la recombinaison

Cre-Lox. Nous pourrions croiser ces souris (Laboratoire de Joachim Herz) avec des souris exprimant la Cre-recombinase sous le contrôle d'un promoteur neuronal pour permettre l'extinction spécifique de LRP dans les neurones et ainsi abolir la recapture neuronale du tPA. Il serait intéressant d'étudier le développement cérébral de ces animaux et/ou de les soumettre à des tests comportementaux ainsi qu'à des modèles de pathologies cérébrales afin de comprendre quel rôle joue précisément la recapture neuronale du tPA dans le fonctionnement cérébral.

Enfin, un autre mode d'endocytose pourrait être analysé: la macropinocytose. Il a été montré que le BDNF pouvait être endocyté par macropinocytose, *via* les pincher (Philippidou et al., 2011). Nous savons que cette internalisation est nécessaire au transport rétrograde des neurotrophines afin de promouvoir la survie neuronale par la régulation de l'expression de gènes (Kononenko et al., 2017). Le tPA étant également impliqué dans des mécanismes de survie neuronale, il pourrait donc suivre le même mécanisme d'internalisation non spécifique que le BDNF. De plus, il a été montré que les macropinosomes sont capables de se déplacer vers le centre de la cellule (Swanson and Watts, 1995), ce qui coïnciderait avec le transport rétrograde du tPA (Article 1 ; Figure 3). L'étude de ce mode d'internalisation pourrait être réalisée grâce à des inhibiteurs spécifiques de la macropinocytose comme l'amiloride (molécule qui provoque une acidification intracellulaire et qui altère le fonctionnement des GTPases, sensibles au pH, mais également impliquées dans le remodelage de l'actine) ou la cytochalasine (qui se lie au filament d'actine entraînant une inhibition de la polymérisation de l'actine et donc de la macropinocytose) (Swanson and Watts, 1995). De plus, cette endocytose pourrait être étudiée par microscopie électronique ou par immunocytochimie en marquant les macropinosomes avec un anticorps dirigé contre l'actine. Il serait également possible de surexprimer la SNX5-GFP (en anglais : *phosphoinositol-binding sorting nexin 5*), une protéine associée aux macropinosomes nouvellement formés (Kerr et al., 2006) dans des cultures de neurones. Et ensuite d'ajouter la protéine tPA-HaloTag® sur ces cultures afin de visualiser une éventuelle macropinocytose du tPA par l'imagerie confocale en temps réel.

3. Le tPA et le BDNF sont présents dans les mêmes vésicules synaptiques

3.1. Le tPA et le BDNF sont impliqués dans les mêmes fonctions cérébrales

Comme évoqué dans les différentes parties de l'introduction, le tPA et le BDNF jouent tous les deux un rôle important dans le développement, la survie neuronale mais également dans la plasticité synaptique. Nous savons que le BDNF peut être libéré lors d'une stimulation neuronale (Shimojo et al., 2015) mais il peut également être endocyté pour aller activer des gènes au niveau du corps cellulaire du neurone, pour être dégradé ou alors pour être recyclé (Bucci et al., 2014; Cosker and Segal, 2014). Le BDNF et le tPA suivent donc le même mode de trafic vésiculaire dans les neurones et de plus, ils ont plusieurs fonctions communes dans le parenchyme cérébral telles que ; une implication dans la pousse neuritique, dans la survie ou la mort cellulaire mais aussi dans la LTP ou LTD. De manière intéressante, le tPA peut, par l'intermédiaire de la plasmine, convertir le pro-BDNF en mBDNF (Article 1 ; Figure supplémentaire 5, Pang et al., 2004). Comme décrit dans la deuxième partie de l'introduction, le pro et le mBDNF possèdent des effets opposés sur les neurones *via* une interaction avec des récepteurs différents. En effet, le pro-BDNF interagit avec les récepteurs p75^{NGF}/Sortiline pour engendrer la mort neuronale, la LTD et la rétractation des épines dendritiques, alors que le mBDNF *via* l'interaction avec les récepteurs TrkB, est responsable de la survie cellulaire, de la LTP tardive et de la pousse d'épines dendritiques (Lu et al., 2005).

3.2. Le tPA est impliqué dans la balance entre le pro et le mature BDNF

En permettant le clivage du pro-BDNF en mBDNF par la plasmine, le tPA joue un rôle important dans la balance entre les effets bénéfiques et délétères du BDNF. Cependant, il ne faut pas oublier que les furines et les pro-convertases sont aussi capables de convertir le pro-BDNF en mBDNF dans le compartiment intracellulaire, tout comme les MMP au niveau

extracellulaire (Lu et al., 2005). Dans des cultures de neurones hippocampiques (à DIV 4-8), Lochner et collaborateurs ont constaté que 1) le plasminogène et le pro-BDNF, 2) le plasminogène et le tPA mais également 3) le tPA et le pro-BDNF sont présents dans les mêmes vésicules, sans montrer de véritable colocalisation de ces trois protéines (Figure 48 ; Lochner et al., 2008). Nous montrons aussi que le tPA et le BDNF sont présents dans les mêmes vésicules dans les neurones corticaux en culture (à DIV20). De plus, nous précisons que ces vésicules sont axonales ou dendritiques, pré- et post-synaptiques (Article 1 ; Figure 8). En outre, grâce à la microscopie haute résolution, nous avons pu confirmer la présence de tPA et de BDNF au sein des mêmes vésicules. Nous avons également mis en évidence que ces deux protéines sont transportées ensemble de façon rétrograde et antérograde (Article 1 ; Figure 8). Nous avons observé la présence de vésicules immobiles ce qui nous laisse supposer qu'elles sont arrimées à la membrane pour être exocytées à la suite d'une stimulation neuronale. Et enfin, nous avons montré que ces deux protéines sont contenues ensemble dans des vésicules d'exocytose (VAMP2 positives), qu'elles peuvent être endocytées (Rab5 positives), recyclées (Rab 11 positives) ou dégradées (Rab7 positives) dans les mêmes vésicules (Article 1 ; Figure supplémentaire 4).

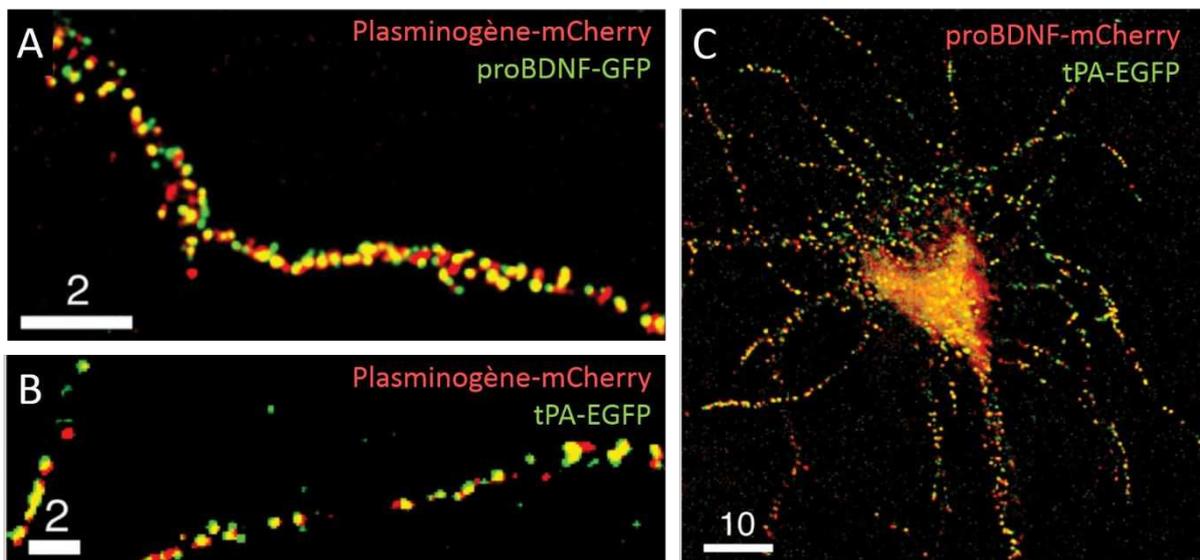


Figure 48: Le tPA, le plasminogène et le BDNF sont présents dans les mêmes vésicules. Culture de neurones hippocampiques à 2-8 DIV surexprimant différentes protéines de fusion: le plasminogène-mCherry, le pro-BDNF-GFP (ou mCherry) ou le tPA-EGFP. Le plasminogène et le pro-BDNF (A) mais également le plasminogène et le tPA (B) et enfin le tPA et le pro-BDNF (C) sont présents dans les mêmes vésicules (adapté de : Lochner et al., 2008).

Dans un premier temps, il serait très intéressant de confirmer la colocalisation du tPA avec le BDNF par une autre méthode d'analyse. Pour cela, la technique d'isolation de vésicules synaptiques suivie d'un immunoblot contre le tPA et le BDNF serait envisageable. Grâce à cette technique, nous pourrions confirmer la présence des différentes Rab et VAMP à la surface de ces vésicules. Nous pourrions également regarder si le plasminogène est présent dans les mêmes vésicules que le tPA et le BDNF. En effet, Lochner et collaborateurs ont seulement montré une colocalisation deux à deux du plasminogène, du tPA et du BDNF mais pas la présence des trois dans une même vésicule. Nous pourrions aussi regarder sous quelle forme est le BDNF. Dieni et collaborateurs ont montré que le mBDNF et son pro-peptide sont présents dans les mêmes vésicules ; ce qui suggère un clivage intra-vésiculaire (Dieni et al., 2012). A l'heure actuelle, les études sur la localisation et le type de protéases clivant le BDNF sont encore controversées. Cependant, il semblerait que les furines et les proconvertases pourraient cliver le BDNF respectivement dans le *trans*-Golgi et dans les vésicules. De plus, il serait également important de vérifier si le tPA, *via* la formation de plasmine, peut cliver le BDNF au sein de ces vésicules d'exocytose. Dans un deuxième temps, cette technique pourrait nous permettre d'évaluer le pH de ces vésicules (Farsi et al., 2018, 2016) afin de savoir si le tPA peut être actif et capable d'activer la plasmine qui pourrait ensuite cliver le pro-BDNF dans ces vésicules et pas seulement à la synapse (Figure 49-B).

Pour mieux comprendre les mécanismes mis en jeu dans la conversion du BDNF, une expérience supplémentaire pourrait être nécessaire afin de savoir si la plasmine est indispensable dans ce clivage ou si les furines, les proconvertases et les MMP sont suffisantes à cette conversion. En effet, des co-cultures de neurones et d'astrocytes surexprimant le pro-BDNF-GFP et le tPAHaloTag® pourraient être réalisées puis traitées ou non avec un inhibiteur de la plasmine : l'aprotinine. Nous pourrions ensuite récupérer le tapis cellulaire et le surnageant afin de regarder par immunoblot les quantités de pro et de mBDNF dans les différentes conditions. Enfin des inhibiteurs des différentes protéases impliquées dans ce clivage du BDNF pourraient aussi être testés.

Il serait également important d'observer l'exocytose simultanée du tPA et du BDNF *via* la surexpression de protéines HaloTag®-tPA-SEP et CFP-BDNF. On pourrait ainsi suivre dans les neurones les vésicules contenant le tPA (en rouge, grâce au TMR ligand) et le BDNF (en cyan grâce à la CFP) pour visualiser leurs exocytoses basale (sans traitement) ou contrôlée (avec

l'ajout de KCl ou de NMDA) grâce à l'apparition de la fluorescence verte de la SEP, au niveau des axones et des dendrites.

3.3. L'implication du plasminogène et de la plasmine dans ces mécanismes

Le plasminogène est principalement synthétisé par les hépatocytes du foie (Raum et al., 1980). Cependant, d'autres organes tels que les reins, le cœur, les testicules, les poumons, la rate et le cerveau sont capables de synthétiser le plasminogène (Zhang et al., 2002). Au niveau cérébral, les neurones constituent la principale source de production du plasminogène: celui-ci est retrouvé au niveau du soma, des axones et des dendrites (Taniguchi et al., 2011) mais également dans l'espace extracellulaire au niveau de la fente synaptique (Tsirka et al., 1997). La conversion du plasminogène en plasmine au niveau cérébral est un mécanisme méconnu. Cependant, le tPA d'origine neuronale semble être important pour l'activation du plasminogène dans le cerveau (Ho-Tin-Noé et al., 2009). De plus, pour être activé en plasmine, le plasminogène nécessite la liaison à l'annexine II localisés sur la surface des cellules (Kim and Hajjar, 2002). C'est pourquoi une étude récente du laboratoire a montré que le tPA pouvait cliver le plasminogène à la surface des astrocytes (Briens et al., 2017). Il serait donc intéressant de vérifier l'hypothèse suivante : suite à une dépolarisation neuronale, le tPA, le BDNF et le plasminogène (présents ou non dans les mêmes vésicules) sont libérés à la synapse. Le tPA, par l'intermédiaire de l'annexine II, présente à la surface des astrocytes, clive le plasminogène en plasmine. Et c'est cette plasmine qui va ensuite cliver le pro-BDNF en mBDNF à la synapse (Figure 49-A).

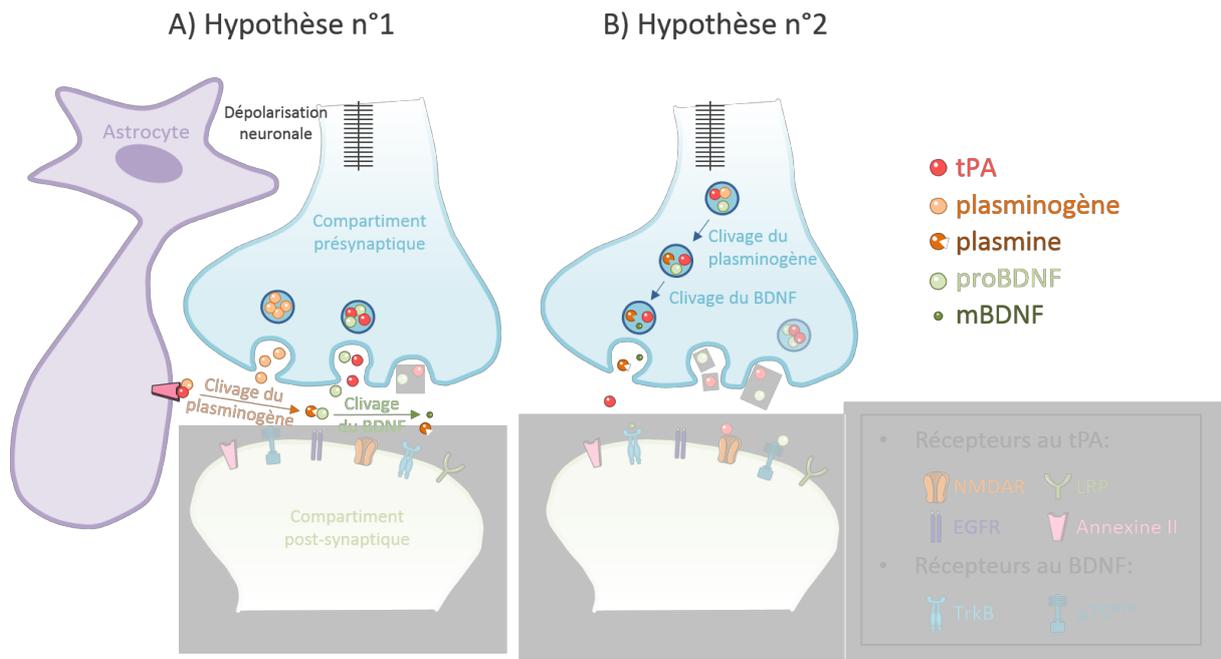


Figure 49 : Mécanismes proposés pour le clivage du plasminogène et du BDNF dans les vésicules ou à la synapse. A) Suite à une dépoliarisation neuronale, le tPA, le pro-BDNF et le plasminogène sont libérés à la synapse. Le tPA clive le plasminogène en plasmine à la surface des astrocytes grâce à l'annexine II. La plasmine ainsi formée peut alors convertir le pro-BDNF en mBDNF. B) Le tPA, le pro-BDNF et le plasminogène sont contenus dans les mêmes vésicules. Le pH vésiculaire permet au tPA d'être actif et de cliver le plasminogène en plasmine. La plasmine peut ensuite convertir le pro-BDNF en mBDNF au sein des vésicules. Suite à une dépoliarisation neuronale, le tPA, la plasmine et le mBDNF sont libérés à la synapse. Au niveau synaptique le tPA peut interagir avec différents récepteurs post-synaptiques dont les récepteurs NMDA, EGF, LRP et annexine II. Le BDNF interagit avec les récepteurs TrkB alors que le pro-BDNF active les récepteurs p75^{NTR}.

Le tPA possède différents rôles au sein de parenchyme cérébral ; ces rôles peuvent être dépendants ou indépendants de la plasmine (pour revue: [Melchor and Strickland, 2005](#)). De plus, comme nous l'avons vu au cours de cette étude, le tPA, par la formation de la plasmine, a un rôle important dans la conversion de BDNF. Il est donc nécessaire de mieux comprendre ou de s'intéresser davantage à la localisation du plasminogène dans ce mécanisme. Est-il présent dans les vésicules synaptiques? Est-il présent dans les mêmes vésicules à cœur dense que le tPA et le BDNF ? Comment est-il libéré à la synapse ? Est-ce qu'il nécessite obligatoirement la présence de récepteurs pour être activé ? Ou la membrane plasmique des vésicules est-elle suffisante ? Est-ce que le pH de ces vésicules est assez élevé pour permettre une activité enzymatique du tPA ? Est-ce que la conversion du BDNF peut également être effectuée dans les vésicules d'exocytose ? Pour répondre à toutes ces questions, il serait intéressant de réaliser les expériences décrites dans la partie « 3.2 Le tPA

est impliqué dans la balance entre le pro et le mature BDNF » grâce à des vésicules synaptiques isolées. Une autre solution serait de créer un nouveau plasmide codant pour un plasminogène-HaloTag® pour ensuite réaliser la même étude que précédemment présentée. Nous pourrions surexprimer cette protéine dans des cultures de neurones corticaux avec différentes autres protéines telles que les Rab, les VAMP ou le BDNF mais nous pourrions également suivre l'exocytose du plasminogène grâce à un plasmide codant pour un HaloTag®-plasminogène-SEP et regarder si le plasminogène est sécrété de façon constitutive ou régulée.

3.4. L'implication du tPA et du BDNF dans les maladies cérébrales

De manière intéressante, plusieurs études ont montré une diminution des quantités de tPA et de mBDNF au cours du vieillissement (Cacquevel et al., 2007; Lommatzsch et al., 2005) mais également dans différentes maladies cérébrales comme les maladies neurodégénératives et neuropsychologiques. La diminution de tPA provoquerait une diminution de la conversion BDNF et par conséquent, une diminution des quantités de mBDNF avec en parallèle une augmentation de pro-BDNF cérébral ; ces changements seraient liés à une diminution de la plasticité et des fonctions neuronales. Il serait donc intéressant de suivre l'implication du tPA dans la balance entre le pro et le mBDNF au niveau des différentes maladies telles que Parkinson, Alzheimer, Huntington ou encore la dépression.

L'étude de Liot et collaborateurs a montré que les neurones corticaux, qui projettent sur le striatum, permettent de délivrer le BDNF aux neurones striataux (qui ne sont pas capables d'en produire). Cependant lors de maladies neurodégénératives comme la maladie d'Huntington, le transport des vésicules, dont le BDNF, est altéré. Le BDNF n'est donc plus apporté aux neurones du striatum ce qui provoque leur dégénérescence (Liot et al., 2013). Au vu de cette étude, nous avons voulu regarder si des animaux dépourvus de tPA présentaient une augmentation de la quantité de pro-BDNF (et de son récepteur : p75^{NGF}) par rapport au mBDNF dans le striatum et si l'absence de tPA provoquait une dégénérescence des neurones du striatum. Ainsi, nous avons réalisé des expériences d'immunoblot à partir de protéines issues de différentes régions de cerveau de souris tPA KO et tPA WT. Cependant, nous n'avons pas noté de différences dans les quantités de pro-BDNF, de mBDNF, de TrkB et de p75^{NGF} chez

les souris tPA KO *versus* tPA WT au niveau du striatum ni au niveau du cortex et de l'hippocampe. L'absence de différences pourrait s'expliquer par la mise en place de mécanismes compensatoires comme : une augmentation de la conversion du BDNF par les furines, les proconvertases ou les MMP. Cependant, il serait primordial de vérifier ce résultat par une technique plus spécifique telle que l'ELISA.

Conclusion générale

Conclusion générale

L'ensemble de mon travail de thèse a contribué à mieux comprendre la localisation et le trafic vésiculaire du tPA neuronal.

Cette étude nous a permis de montrer que le tPA est transporté à la fois dans l'axone et les dendrites des neurones et qu'il est majoritairement présent dans le compartiment post-synaptique ; ce qui lui prédit un rôle autre que celui de neuromodulateur.

Nous avons également montré pour la première fois que, le tPA pouvait être endocyté de manière basale par les neurones et que suite à sa recapture, le tPA pouvait emprunter la voie de dégradation par les lysosomes ou celle de recyclage par les endosomes de recyclage afin d'être potentiellement libéré, de nouveau, à la synapse suite à une dépolarisation.

De plus, nous avons confirmé par différentes techniques (Imagerie confocale, STED et en temps réel), que le tPA et le BDNF sont présents dans les mêmes vésicules et qu'ils sont co-transportés dans les neurones vers le corps cellulaire ou vers les synapses. De plus, nous avons également montré que ces deux protéines suivent les mêmes voies de trafics intracellulaires. En effet, ils peuvent être endocytés, recyclés et/ou dégradés à partir des mêmes vésicules synaptiques.

Nos résultats apportent de nouvelles données concernant le devenir et le trafic vésiculaire du tPA neuronal ainsi que, sur son implication dans la balance entre les effets bénéfiques et délétères du BDNF. Ces résultats ouvrent de nouvelles voies de recherche quant à l'implication de ces deux molécules dans la survie neuronale mais également dans l'étude de différentes maladies neurodégénératives.

Autres travaux

Autres travaux

Article 2 (Revue): Impacts of tissue-type plasminogen activator (tPA) on neuronal survival.

Les impacts de l'activateur tissulaire du plasminogène (tPA) sur la survie neuronale.

Publié dans : *Frontiers in Cellular Neuroscience*

Contexte bibliographique :

L'activateur tissulaire du plasminogène (tPA) est une sérine protéase constituée de cinq domaines qui lui permettent d'interagir avec différents : substrats, protéines de liaison ou récepteurs. Au cours des dernières années, plusieurs études se sont intéressées au rôle du tPA dans différentes maladies du système nerveux central et particulièrement dans les accidents vasculaires cérébraux. Dans le SNC, le tPA possède des rôles bénéfiques mais également délétères, ces rôles opposés du tPA peuvent s'expliquer par le type et la maturité des neurones mais également par le taux, l'origine et la forme du tPA.

Objectifs de l'étude :

A l'heure actuelle les effets différentiels du tPA dans le SNC ne sont pas encore tout à fait compris et plusieurs hypothèses ont été proposées pour expliquer ces effets opposés. Cette revue de la littérature permet de faire une synthèse de ce que nous savons actuellement sur le tPA et de discuter des rôles différentiels de cette protéine sur la survie et la mort neuronales excitotoxiques.



Impacts of tissue-type plasminogen activator (tPA) on neuronal survival

Arnaud Chevilly, Flavie Lesept[†], Sophie Lenoir[†], Carine Ali, Jérôme Parcq and Denis Vivien*

INSERM, UMR-S U919 Serine Proteases and Pathophysiology of the Neurovascular Unit, Université Caen-Normandie, Caen, France

Tissue-type plasminogen activator (tPA) a serine protease is constituted of five functional domains through which it interacts with different substrates, binding proteins, and receptors. In the last years, great interest has been given to the clinical relevance of targeting tPA in different diseases of the central nervous system, in particular stroke. Among its reported functions in the central nervous system, tPA displays both neurotrophic and neurotoxic effects. How can the protease mediate such opposite functions remain unclear but several hypotheses have been proposed. These include an influence of the degree of maturity and/or the type of neurons, of the level of tPA, of its origin (endogenous or exogenous) or of its form (single chain tPA versus two chain tPA). In this review, we will provide a synthetic snapshot of our current knowledge regarding the natural history of tPA and discuss how it sustains its pleiotropic functions with focus on excitotoxic/ischemic neuronal death and neuronal survival.

OPEN ACCESS

Keywords: tissue-type plasminogen activator, excitotoxicity, apoptosis, NMDA receptors, differential effects

Edited by:

Robert Lindsay Medcalf,
Monash University, Australia

Reviewed by:

Vince Ellis,
University of East Anglia, UK
Andre Laval Samson,
The Heart Research Institute, Australia

*Correspondence:

Denis Vivien
vivien@cyceron.fr

[†]These authors have contributed
equally to this work.

Received: 19 June 2015

Accepted: 01 October 2015

Published: 16 October 2015

Citation:

Chevilly A, Lesept F, Lenoir S, Ali C, Parcq J and Vivien D (2015) Impacts of tissue-type plasminogen activator (tPA) on neuronal survival. *Front. Cell. Neurosci.* 9:415. doi: 10.3389/fncel.2015.00415

THE NATURAL HISTORY OF tPA

Morgagni (1761) noted that the blood of patients who died suddenly was not completely coagulated. Denis (1838) observed the spontaneous dissolution of blood clots. Fifty years later, Denys and de Marbaix (1889) postulated the existence of an endogenous fibrinolytic enzyme. Accordingly, Hedin (1903) revealed a proteolytic activity in serum globulin fraction, later identified as the fraction containing a precursor of plasmin. Christensen and Macleod (1945) proposed that this inactive circulating precursor, named plasminogen, could be activated by bacterial extracts like streptokinase. Macfarlane and Biggs (1948) completed the description of the plasminogen activation cascade. In parallel, Conradi (1902) identified tPA, at this time named fibrikinase, in different organs), later characterized to mediate fibrinolysis (Fleisher and Loeb, 1915; Astrup and Permin, 1947; Astrup and Stage, 1952). tPA was then purified from human vessels and uterus in Binder et al. (1979), Rijken et al. (1979) and in larger amounts from Bowes melanoma cell line allowing its biochemical characterization (Collen et al., 1982; Collen and Lijnen, 2009). Pennica et al. (1983) succeeded in cloning and expressing recombinant tPA, providing the primary structure of tPA. tPA is a protein of 527 amino-acids including three glycosylation sites and 17 disulfide bridges (Pennica et al., 1983). Collen and Lijnen (1991) then provided evidence that tPA could facilitate the dissolution of blood clots by inducing the degradation of fibrin in a plasminogen-dependent manner. tPA is now used in the clinic to promote fibrinolysis, especially at the acute phase of ischemic stroke either alone (NINDS, 1995) or combined with thrombectomy (Campbell et al., 2015; Goyal et al., 2015).

In addition to this fibrinolytic function at the origin of its discovery, an increasing number of studies have since the mid-90s, discovered functions of tPA within the brain parenchyma. In particular, tPA is believed to control neuronal fate during several CNS disorders, including multiple sclerosis, Alzheimer's disease, and stroke. The aim of this review is to summarize and discuss structure-function studies related to the influence of tPA on neuronal death and survival.

TPA OR tPAS?

The mature form of tPA is a mosaic protein of five distinct modules, which, from its N-terminal end to its C-terminal end, are: a finger domain (F), an epidermal growth factor-like domain (EGF), two kringle domains (K1 and K2), and a serine protease domain (SP). The finger domain is involved in tPA binding to fibrin and is necessary to promote fibrinolytic activity at low plasminogen activator concentrations (Larsen et al., 1988). In the brain, other functions attributed to the finger domain include its ability to cross the blood-brain barrier (Benchenane et al., 2005), its astrocytic clearance (Cassé et al., 2012) and some of its signaling pathways (Siao and Tsirka, 2002; Pineda et al., 2012). The EGF-like domain shows homology with EGF. Both the trophic and mitogenic functions of tPA have been attributed to this domain (Liot et al., 2006; Ortiz-Zapater et al., 2007; Correa et al., 2011; Haile et al., 2012). The EGF-like domain has been also reported to contribute to the hepatic recapture of tPA (Hajjar and Reynolds, 1994). The kringle domains fold into large loops stabilized by three disulfide bridges. Because of the high-mannose-type glycosylation at Asn117, K1 is of major importance in the uptake of tPA by mannose receptors on liver endothelial cells *in vivo* and *in vitro* (Kuiper et al., 1996). The K2 domain and more specifically its lysine binding site (LBS) is involved in the capacity of tPA to bind and activate substrates and/or receptors such as plasminogen, PDGF-CC (platelet derived growth factor-CC; Fredriksson et al., 2004) and NMDAR (*N*-methyl-D-aspartate receptor; López-Atalaya et al., 2008). The K1 of tPA does not possess a LBS (Kim et al., 2003). The C-terminal domain supports the catalytic activity of tPA and forms the catalytic triad (*His* 322, *Asp* 371, and *Ser* 478) involving an aspartic acid residue (*Asp*371) hydrogen-bonded to a histidine (*His*322), which itself is hydrogen-bonded to a serine (*Ser*478).

As detailed here after, the literature suggests that there is not one but several forms of tPAs.

Long and Short Variants

The pro-form of tPA is a molecule of 562 amino acids. The signal peptide and a pro-peptide of, respectively, 22 and 10 amino acids should be removed before storage in vesicles and release. Three additional amino acids (Gly-Ala-Arg) at the N-terminal end of the molecule can be also removed leading to the release of either the long variant (L-tPA) or the short variant (S-tPA) of 530 and 527 amino acids, respectively (Jörnvall et al., 1983; Berg and Grinnell, 1991). These tPAs include 17 disulfide bridges.

sc-tPA vs. tc-tPA

In contrast to the other members of the chymotrypsin family, tPA is not synthesized and secreted as a "true" zymogen (Madison et al., 1993). Like other members of the family, the secreted single-chain tPA (sc-tPA; **Figure 1A**) can be processed into a two-chain form tPA (tc-tPA; **Figure 1B**) by plasmin or kallikrein (Wallén et al., 1982; Ichinose et al., 1984). However, sc-tPA is an unusually active zymogen (high intrinsic proteolytic activity, low zymogenicity) that does not require proteolytic processing to be active but relies on the presence of an allosteric regulator, such as fibrin (Thelwell and Longstaff, 2007). The passage from the sc-tPA to the tc-tPA form results from the hydrolysis of the peptide bond linking the Arg275 and the Ile276, both parts of the protein remaining connected by a disulfide bridge between Cys299 (heavy chain A) and Cys430

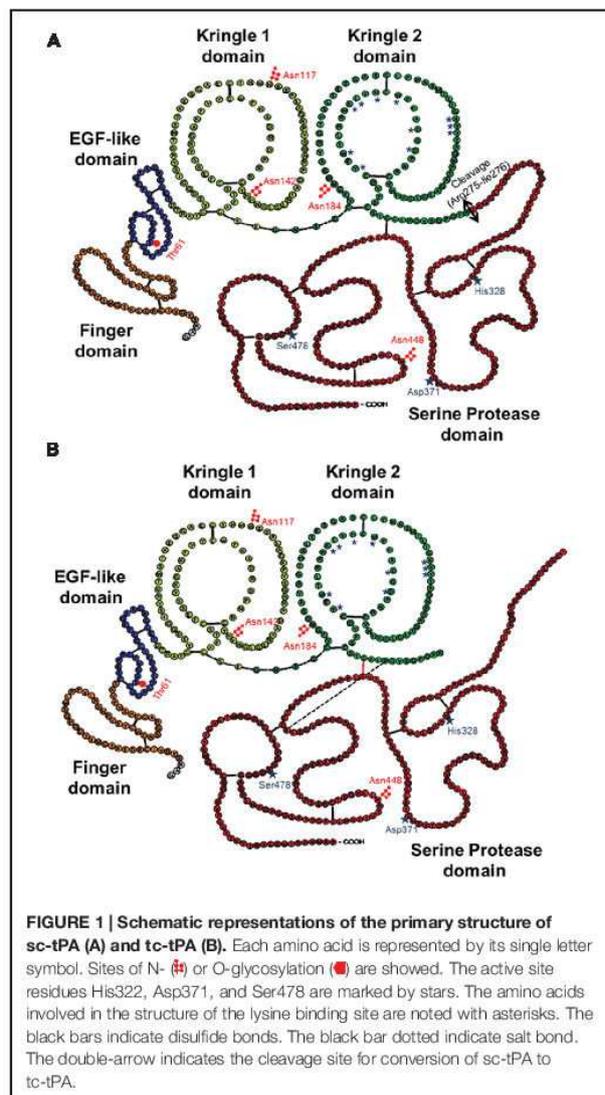


FIGURE 1 | Schematic representations of the primary structure of sc-tPA (A) and tc-tPA (B). Each amino acid is represented by its single letter symbol. Sites of N- (■) or O-glycosylation (■) are shown. The active site residues His322, Asp371, and Ser478 are marked by stars. The amino acids involved in the structure of the lysine binding site are noted with asterisks. The black bars indicate disulfide bonds. The black bar dotted indicate salt bond. The double-arrow indicates the cleavage site for conversion of sc-tPA to tc-tPA.

(light chain B) and a novel salt bridge between Arg302 and Glu445 (Lamba et al., 1996). In the absence of an allosteric regulator such as fibrin, tc-tPA is fivefold catalytically more active than sc-tPA (Rånby et al., 1982; Wallén et al., 1982; Tate et al., 1987; Petersen et al., 1988; Boose et al., 1989). However, in the presence of fibrin, both sc-tPA and tc-tPA display the same catalytic activity (Thelwell and Longstaff, 2007).

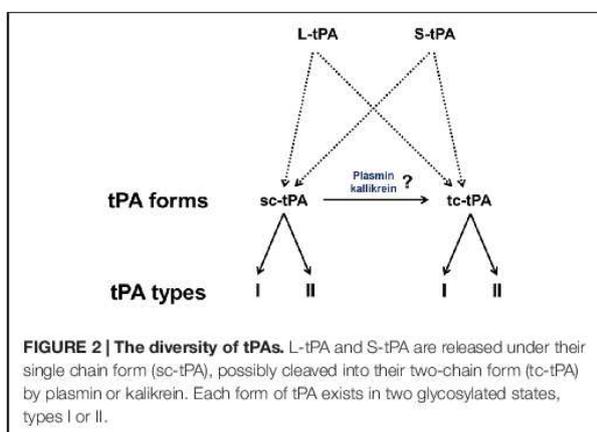
Type I vs. Type II tPA

Type plasminogen activator is a glycoprotein containing three major N-glycosylation sites. Two glycosylations are constitutives at Asn117 within the kringle 1 domain and at Asn448 within the serine protease domain. A third one is alternative at Asn184 within the kringle 2 domain. Type I tPA is glycosylated at Asn117, Asn184, and Asn448, while type II tPA is glycosylated only at Asn117 and Asn448 (Pohl et al., 1984; Spellman et al., 1989; Mori et al., 1995; Jaques et al., 1996). Asn184 acts as a switch that enables long-distance communication between fibrin-binding residues (achieved by the finger domain) and the catalytic site in the protease domain (Rathore et al., 2012). Glycosylation of Asn184 (i.e., type I) reduces the ability of tPA to activate plasminogen as well as its binding to fibrin (Einarsson et al., 1985; Wittwer et al., 1989; Berg et al., 1993). Type I sc-tPA seems to be more stable than type II sc-tPA regarding its conversion to tc-tPA (Wittwer and Howard, 1990; Berg et al., 1993; **Figure 2**). tPA also contains a O-linked fucose at Thr61 (occupancy 100%) within the EGF domain (Harris et al., 1991) and potentially an additional N-glycosylation site at Asn142 within the K1 domain (occupancy 1%; Borisov et al., 2009).

IS tPA GOOD OR BAD FOR NEURONAL SURVIVAL?

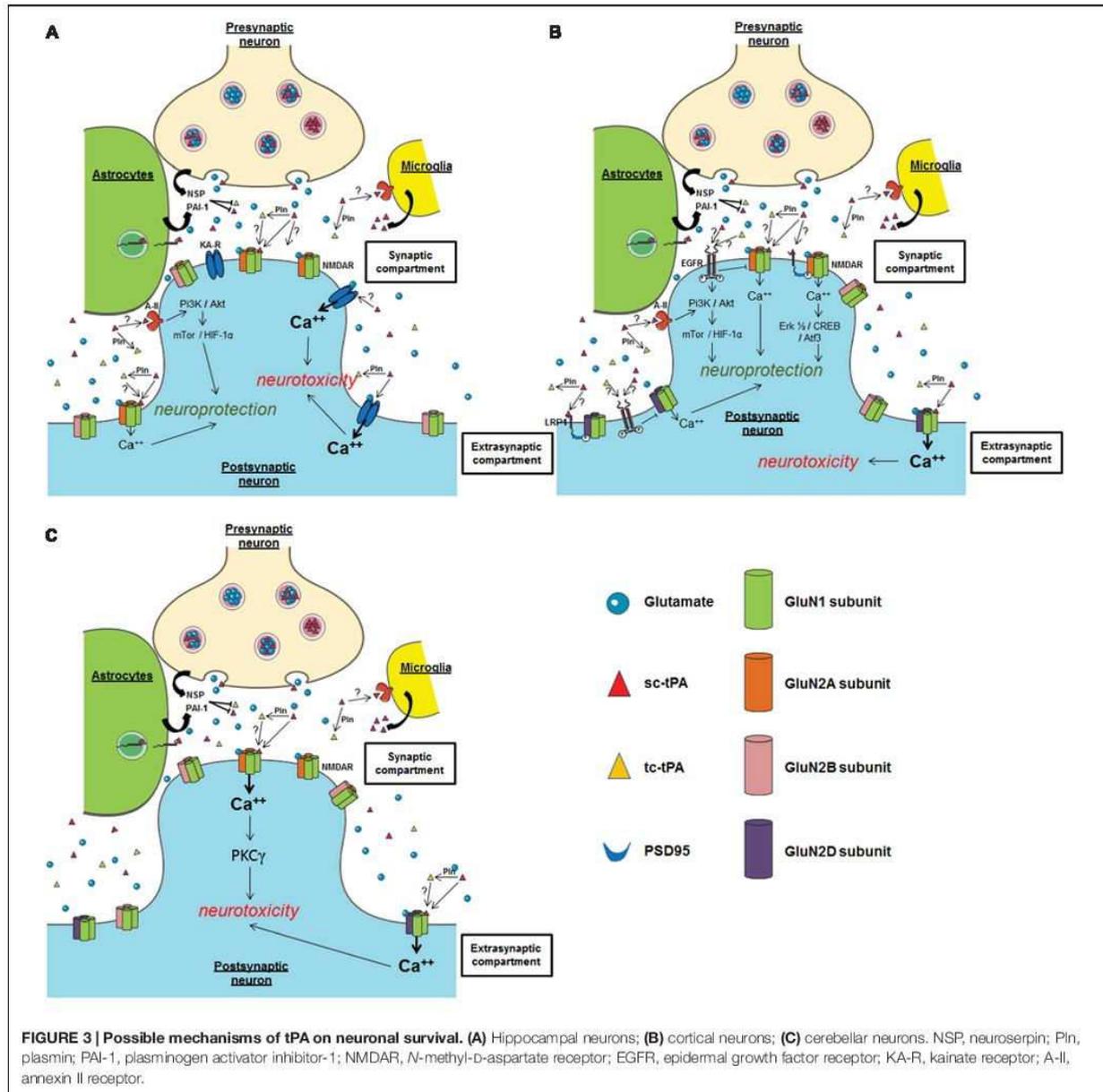
The Facts

The group of Sidney Strickland was the first to demonstrate that tPA deficient mice were more sensitive to hippocampal



neuronal death induced by both NMDAR- and non-NMDAR-agonists (Tsirka et al., 1995), an effect dependent of the ability of tPA to activate plasminogen into plasmin (Tsirka et al., 1997a,b; **Figure 3A**). Accordingly, several studies have reported that inhibitors of tPA, such as neuroserpin and type 1 plasminogen activator inhibitor (PAI-1) protect neurons against toxicity induced by the over-activation of NMDARs (Buisson et al., 1998; Zhang et al., 2002; Gabriel et al., 2003; Lebeurrier et al., 2005). Exogenous tPA was then reported pro-neurotoxic, on cortical neurons, in paradigms of *in vitro* or *in vivo* excitotoxicity mediated by over-activation of NMDAR (Nicole et al., 2001; Liberatore et al., 2003; Reddrop et al., 2005; Park et al., 2008; **Figure 3B**). The tPA was also reported to promote damages on Purkinje cells (Lu and Tsirka, 2002; Li et al., 2006, 2013; Cops et al., 2013; **Figure 3C**), especially by altering the neurotrophic mechanisms that control their postnatal development (Li et al., 2006, 2013).

Both plasmin-dependent and plasmin-independent mechanisms have been proposed to explain the potentiation of NMDAR signaling by tPA (Nicole et al., 2001; Pawlak et al., 2002; Matys and Strickland, 2003), but several recent studies agree that it can occur independently of plasminogen activation (Samson et al., 2008; Echeverry et al., 2010; Parcq et al., 2012). For instance, tPA can interact with the GluN1 subunit of NMDAR involving the LBS of its K2 domain (Nicole et al., 2001; Fernández-Monreal et al., 2004; Kvaajo et al., 2004; López-Atalaya et al., 2008; Parcq et al., 2012). Our group reported that the cleavage of the amino-terminal domain of GluN1 subunit is necessary for enhancement of NMDAR signaling by tPA (Nicole et al., 2001; Fernández-Monreal et al., 2004). In the brain of protease nexin-1 (PN-1, an inhibitor of tPA) deficient mice, Kvaajo et al. (2004), demonstrated an increase in the proteolytic activity of tPA, correlated with a decrease in the amount of the GluN1 subunit of the NMDA receptor. However, no cleavage of GluN1 was observed despite the interaction of tPA with the GluN1 subunits of NMDAR (Kvaajo et al., 2004). Other groups did not detect tPA-dependent cleavage of GluN1, despite enhancement of NMDAR function by exogenous tPA in cortical cultures (Samson et al., 2008). In a more recent study, it was reported that sc-tPA, but not tc-tPA can promote NMDAR signaling and neurotoxicity in cortical neurons (Parcq et al., 2012; Bertrand et al., 2015). These data were the first to describe a differential function of sc-tPA and tc-tPA. tPA would also act on neuronal death by engaging Low density lipoprotein related protein (LRP) receptors, which in turn would enhance Ca^{2+} downstream of NMDAR (Samson et al., 2008). More recent data obtained from Schwann cells showed that tPA can promote NMDAR signaling independently of LRP1 (Mantuano et al., 2015). Similarly, in PC12 and N2a neuron-like cells, tPA may signal through a complex containing NMDAR, LRP1, and Trk receptors (Mantuano et al., 2013). Plasmin, which is generated by the tPA-dependent conversion of plasminogen, has also been reported to cleave NMDARs, specifically the GluN2 subunit. This cleavage can occur at two sites: Lys317 on GluN2A, which relieves Zn^{2+} inhibition and thereby increases



NMDAR function (Yuan et al., 2009), and Arg67 on GluN2B, which increases sensitivity of the NMDAR to glycine (Ng et al., 2012). Whether tPA-dependent plasmin counteracts or interferes with tPA-dependent NMDAR activation is still under debate. Whatever the mechanism, all these studies showed that tPA can increase NMDAR signaling.

By contrast, other studies, in particular using transgenic mice over-expressing tPA in neurons (T4 transgenic mice) or tPA KO mice, suggested that tPA can also have neuroprotective effects (Haile et al., 2012; Wu et al., 2012). These two studies

also proposed a mechanism dependent on the activation of NMDAR and independent on plasmin. *In vitro* and *ex vivo* studies also reported pro-survival effects of tPA on neurons (Liot et al., 2006; Lee et al., 2007; Polavarapu et al., 2007; Bertrand et al., 2015; Lemarchand et al., 2015), mainly anti-apoptotic effects. Also interesting, tPA was reported to attenuate zinc-induced neuronal cell death independently of its proteolytic action (Kim et al., 1999; Siddiq and Tsirka, 2004). Despite the heterogeneity of the paradigms used in these different studies, they all showed that this effect of tPA occurs independently of its proteolytic activity, with the activation of either PI3K/Akt,

AMPK- or mTor-HIF-1 α -dependent signaling pathways needed (Correa et al., 2011; Wu et al., 2012; **Figure 3B**). Two candidates have been proposed as the receptors mediating the pro-survival effects of tPA: Annexin II and EGF receptor (Siao and Tsrirka, 2002; Wu et al., 2012; Bertrand et al., 2015; Lemarchand et al., 2015). The ability of tPA to convert the pro-neurotrophins (BDNF, NGF) to their active forms (Pang et al., 2004) is also a possible explanation to the pro-survival effects of tPA.

WHAT ARE THE POSSIBLE EXPLANATIONS OF THE DIFFERENTIAL EFFECTS OF tPA ON NEURONAL SURVIVAL? (TABLE 1)

Are Target Receptors the Explanations?

In the brain parenchyma, pro-survival and pro-neurotoxic effects of tPA have been shown to involve key receptors/pathways, including NMDAR (Nicole et al., 2001), LRP-mediated PSD95 activation (Martin et al., 2008), annexin-II (Siao and Tsrirka, 2002), and EGF receptor (Liot et al., 2006; Lemarchand et al., 2015). Focusing on NMDARs, the fact that tPA induces toxic or protective effects could also depend on the different subtypes of GluN subunits involved, and/or their location (synaptic versus extrasynaptic; Paoletti et al., 2013). For instance, based on the current literature, it could be postulated that exogenous tPA could promote neurotoxicity on cortical neurons by activating extrasynaptic GluN2D-containing NMDARs (Baron et al., 2010; Jullienne et al., 2011; Montagne et al., 2012), but could lead to a neuroprotective effect by activating synaptic GluN2A-containing NMDARs (Wu et al., 2013a; **Figure 3B**). Several studies also propose that the neuroprotective activity of tPA, even in a paradigm involving NMDARs, is NMDAR-independent (Correa et al., 2011), independent of its proteolytic activity (Liot et al., 2006). In a model of apoptosis induced by serum deprivation (Liot et al., 2006) or when subjected to OGD, the neuroprotective effect of tPA is mediated by an activation of either EGFR (Correa et al., 2011; Bertrand et al., 2015; Lemarchand et al., 2015) or annexin II (Lee et al., 2007). Whether LRP is also involved is still under debate, again dependent on the paradigm used (Martin et al., 2008). Up to now, it is not clear how these different receptors contribute to the differential effects of tPA in neuronal survival. Additional studies are needed including investigations about possible crosstalks between these different receptors.

Are Protocols of Neuronal Injury the Explanation?

Type plasminogen activator-dependent over-activation of NMDARs has been proposed as a mechanism that could mediate both neuroprotective (Wu et al., 2013b) and neurotoxic (Baron et al., 2010) effects of tPA (**Figure 3B**). This discrepancy may be explained by the use of different models to induce neuronal death, either pure NMDAR-mediated excitotoxicity (Baron et al.,

2010) or oxygen glucose deprivation (OGD; Wu et al., 2013b). Whether OGD induces excitotoxicity and/or apoptosis is not well documented and might depend on the severity/duration of the stress. Pathways such as autophagy or endoplasmic reticulum stress may also occur (Badiola et al., 2011; Shi et al., 2012). Another explanation could be the use of differential strategies to block tPA-induced potentiation of NMDAR signaling, MK-801 as a broad irreversible antagonist of NMDARs on one hand (Terro et al., 2000) and an antibody previously characterized to specifically prevent the tPA-dependent potentiation of NMDARs signaling without affecting their basal activity (Benchenane et al., 2007; Macrez et al., 2010) on the other hand. It is interesting to note that either over-activation and blockage of NMDARs are neurotoxic, the first one leading to excitotoxic neuronal death (Nicole et al., 2001), the second one inducing apoptosis (Mattson and Duan, 1999; Henry et al., 2013).

Is Neuronal Maturity an Explanation?

To discuss the differential impact of tPA on neuronal survival, how neurons are mature is also an important issue including whether experiments were performed *in vitro* (neuronal cultures performed from E16 embryo and maintained different times *in vitro*, 5–14 days (Buisson et al., 1998; Samson et al., 2008), *ex vivo* (hippocampal slices harvested at P3 and maintained different times *in vitro*; Lemarchand et al., 2015) or *in vivo* (young versus aged animals; Roussel et al., 2009). For example, it was well-demonstrated that mouse primary cultures of cortical neurons become sensitive to NMDA-induced neuronal death only after 10 days *in vitro*, an effect potentiated by exogenous tPA (Launay et al., 2008). At early times (days *in vitro*), they require trophic factors contained in the culture media (serum) to survive (Hetman et al., 2000; Terro et al., 2000). When removed, serum deprivation led to neuronal apoptosis with a protective effect of exogenous tPA (Liot et al., 2006). Type of neurons may also be critical, with neurotoxic effects of tPA mainly described in cortical neurons (Nicole et al., 2001) or Purkinje neurons (Cops et al., 2013; Li et al., 2013; **Figures 3B,C**). The protective effect of tPA was described on hippocampal neurons (Flavin and Zhao, 2001; Echeverry et al., 2010; Lemarchand et al., 2015; **Figure 3A**) and on cortical neurons (Liot et al., 2006; Wu et al., 2013a; **Figure 3B**).

Does the Origin of tPA (Endogenous vs. Exogenous) make the Difference?

Another important point of discussion is to know whether exogenous and endogenous tPA have differential effects on neuronal survival. The most recent literature in this field demonstrates that endogenous tPA displays neuroprotective activities (Wu et al., 2013a; Lemarchand et al., 2015) and exogenous tPA is neurotoxic (Parcq et al., 2012). Nevertheless, using tPA deficient mice, exogenous tPA may also protect hippocampal neurons subjected to OGD (Lemarchand et al., 2015). These data suggest that tPA (exogenous or endogenous) may have either pro-neurotoxic or pro-survival effects depending of the type of

TABLE 1 | Reported effects of tPA on challenged neurons.

Reference	Model(s)	tPA	Mechanism(s)
Beneficial Kim et al., 1999	<i>In vitro</i> : cortical cultures exposure to 300 mM zinc (mice) <i>In vivo</i> : kainate injection (10 mg/kg) in rats	Exogenous 10 µg/ml Intracerebroventricular tPA 1 mg/ml	Independently of its proteolytic action, tPA attenuated zinc-induced cell death tPA attenuated kainate seizure-induced neuronal death in the hippocampus
Flavin and Zhao, 2001	<i>In vitro</i> : OGD, 2.5 h Cultured hippocampal neurons from rats (DIV 7–10)	Exogenous 1,000 IU	tPA protects neurons from oxygen glucose deprivation (OGD) by a non-proteolytic action
Cantonze et al., 2002	<i>Ex vivo</i> : striatal neurons WT and tPA α - mice subjected to OGD	Endogenous	tPA enhanced ischemia-induced neuronal damage by facilitating apoptosis rather than necrosis
Yi et al., 2004	<i>In vitro</i> : mixed cortical cell cultures (mice) Treatment: zinc (35 µmol/l)	Exogenous 10 µg/ml	tPA attenuated zinc-induced neuronal death, independently of its proteolytic activity
Head et al., 2009	<i>In vitro</i> : primary cultures of neurons (DIV 5–21) exposed to 1.4% isoflurane for 4 h <i>In vivo</i> : 1.4% isoflurane (anesthetic mediated neurotoxicity in mice)	Exogenous 0.03–3 µg/ml	Isoflurane induced apoptosis at DIV 5 (but not DIV 14 or DIV 21) in cultured neurons tPA decreases isoflurane-induced cell death in primary cultures of neurons (DIV 5) Isoflurane-induced neurotoxicity in the developing rodent brain is mediated by reduced tPA synaptic release and enhanced proBDNF/p75NTR-mediated apoptosis
Echeverry et al., 2010	<i>In vitro</i> : cultures of hippocampal neurons (OGD conditions for 30 min (preconditioning) or not, followed 24 h later by incubation under OGD conditions for 55 min)	Endogenous (tPA KO mice) and exogenous (0–1 µM)	Treatment after OGD (early preconditioning). Beneficial effect of tPA involving a LRP1 dependent signaling pathway and independent of its proteolytic activity. Treatment 24 h after OGD (delayed preconditioning): beneficial effect of tPA via a NMDA-dependent signaling pathway (activation of pAkt), and activation of plasmin
Wu et al., 2012	<i>In vitro</i> : cultures of cortical neurons (65 min OGD and then exposed 10 min later to a second episode of hypoxia (10 min OGD, post-conditioning))	Endogenous (transgenic mice T4)	Decrease of the activation of mTOR- HIF α , involving NMDAR
Wu et al., 2013a	<i>In vivo</i> : excitotoxin-induced neuronal death T4 mice and WT Intrastriatal injection of NMDA (50 mM)	T4 mice or IV 1 mg/kg on WT mice	tPA protected the brain from excitotoxin-induced cell death Dose-dependent effect of tPA on NMDA-induced neuronal death – 5 and 10 nM beneficial – 100 at 500 nM deleterious (1) The neuroprotective effect of tPA was mediated by activation of synaptic GluN2A containing NMDAR via a plasminogen-independent mechanism (2) ERK1/2 activation mediated the protective effect of tPA against excitotoxin-induced neuronal death (3) tPA activated the ERK1/2-CREB-Atf3 pathway (4) Atf3-mediated the protective effect of tPA against excitotoxin-induced neuronal death
Wu et al., 2013b	<i>In vitro</i> : cultures of cortical neurons (OGD 55 min)	Exogenous 5–500 nM	Adaptation to metabolic stress – AMPK activation involving NMDAR
Henry et al., 2013	<i>Ex vivo</i> : cortical brain slices from postnatal P10 mice	Endogenous (transgenic mice T4) Exogenous (20 µg/ml)	tPA significantly reduced caspase-3 activity In superficial layers (less mature), tPA alone inhibited apoptosis via EGFR

(Continued)

TABLE 1 | Continued

Reference	Model(s)	tPA	Mechanism(s)
No effects Vandenberghé et al., 1998	<i>In vitro</i> : spinal cords cultures of mice tPA $-/-$ and WT (DIV 10–12) Kainate-induced death of motoneurons (20 and 100 μ M for 24 h)	Endogenous	tPA did not affect the vulnerability of cultured neurons to kainite
Tucker et al., 2000	<i>In vivo</i> : primary cultures of rat cortical neurons Treatment: A β (16 or 25 μ M) and plasminogen (30 nM)	Exogenous 10 μ g/ml	tPA required plasminogen to inhibit A β toxicity and to block A β deposition Degradation of A β fibrils is dependent on tPA and Plg proteolytic activity
Flavin and Zhao, 2001	<i>In vitro</i> : cultured hippocampal neurons from rats (DIV 7–10) \pm NMDA 10 μ M	Exogenous 1,000 IU	tPA resulted in a modest exaggeration of this injury
Yi et al., 2004	<i>In vitro</i> : mixed cortical cell cultures (mice) Treatment: NMDA (50 μ mol/l)	Exogenous 10 μ g/ml	Calcium-mediated neuronal death was not attenuated by tPA
Deleterious			
Tsika et al., 1995	<i>In vivo</i> : kainate induced neuronal death Mouse tPA $-/-$ Mouse WT	Endogenous 120 μ g tPA for 3 days (intra-parenchymal)	tPA is required to promote neuronal degeneration
Wang et al., 1999	<i>In vitro</i> : PC12 cells and primary cultures of cortical neurons (rats; DIV 12–14)	Exogenous 50 μ g/ml	tPA significantly increased hemoglobin-induced cell death
Flavin and Zhao, 2001	<i>In vitro</i> : cultured hippocampal neurons on rats (DIV 7–10) \pm plasminogen	Exogenous 100 IU	Proteolytic action
Nicole et al., 2001	<i>In vitro</i> : mixed cortical cultures or near-pure neuronal cultures (mice) Excitotoxicity: NMDA (10 or 12.5 μ M) or 50 μ M kainate Calcium imaging <i>In vivo</i> : NMDA induced excitotoxic lesions (rats) (50 nmol)	Exogenous 0.2–20 μ g/ml Exogenous 3.0 μ g (intra-parenchymal)	tPA failed to modify the neurotoxicity induced by the exposure to a non-NMDA agonist (kainate) The catalytic activity of tPA enhanced neuronal death induced by exposure to NMDA tPA cleaves the GluN1 subunit of the NMDAR
Gabriel et al., 2003	<i>In vitro</i> : cultured cortical neurons (mice) Mixed cortical cultures of neurons and astrocytes (mice)	Endogenous Apoptosis: serum deprivation (DIV 7) Nifedipine (50 μ M, DIV 14) Excitotoxicity (DIV 13–14) 12.5 μ M of NMDA	TGF- α rescued neurons from NMDA-induced excitotoxicity in mixed cultures through inhibition of tPA activity, involving PAI-1 overexpression by an ERK-dependent pathway in astrocytes
Liberatore et al., 2003	<i>In vivo</i> : kainate-induced excitotoxicity on tPA $-/-$ and WT mice (1.5 nmol of kainate) <i>In vivo</i> : NMDA-induced excitotoxicity in mice (50 mmol/L NMDA)	Exogenous 1.85 μ mol/L Exogenous 46 μ mol/L	Infusion of tPA into tPA $-/-$ mice restored sensitivity to kainate-mediated neurotoxicity and activation of microglia tPA increased the lesion volumes induced by NMDA injection into the striatum
Liot et al., 2004	<i>In vitro</i> : pure cultures of mouse cortical neurons exposed to NMDA (12.5 μ mol/L)	Exogenous 20 μ g/ml	Proteolytic activity

(Continued)

TABLE 1 | Continued

Reference	Model(s)	tPA	Mechanism(s)
Liu et al., 2004	<i>In vitro</i> : primary neuronal cultures (mice; DIV 14) NMDA treatment-induced apoptosis in neurons	Exogenous 20 μ g/ml	tPA potentiated apoptosis in mouse cortical neurons treated with <i>N</i> -methyl-D-aspartate (NMDA) by shifting the apoptotic pathway
Benchenane et al., 2005	<i>In vivo</i> : striatal excitotoxic lesions (rats; NMDA 50 nmol)	Exogenous IV 1 mg/kg	tPA potentiated excitotoxic lesions
Lebourrier et al., 2005	<i>In vivo</i> : excitotoxic lesions in mice induced by NMDA (10 nmol in striatum or 20 nmol in cortex) <i>In vitro</i> : neuronal cortical cultures Serum deprivation (DIV 7) Treatment: neuroserpin (0.5–1 μ M) Excitotoxic paradigms (DIV 13–14) NMDA (12.5 μ mol/l) AMPA (10 μ mol/l) Calcium videomicroscopy	Endogenous	Overexpression of neuroserpin in the brain parenchyma might limit the deleterious effect of tPA on NMDAR-mediated neuronal death
Medina et al., 2005	<i>In vitro</i> : mouse neuroblastoma N2a cells; primary cultures of hippocampal neurons tPA $-/-$ or WT (mouse)	Exogenous 20 μ g/ml	tPA induced Erk1/2 activation in neurons (independently of plasmin), tau phosphorylation and promoted A-beta mediated apoptosis tPA treatments induced GSK3 activation, tau hyperphosphorylation, microtubule destabilization and apoptosis in hippocampal neurons
Benchenane et al., 2007	<i>In vivo</i> studies: Excitotoxic lesions in mice performed by injection of NMDA (10 nmol) into the striatum <i>In vivo</i> studies: permanent MCAO in mice	Exogenous 1 mg/kg	Immunization against the NTD of the GluN1 subunit of NMDAR prevented the neurotoxic effect of endogenous and exogenous tPA
López-Atalaya et al., 2007	<i>In vivo</i> : striatal excitotoxic lesions (rats; 50 nmol)	Exogenous IV 1 mg/kg	tPA increased lesion volumes induced by NMDA (+40%)
López-Atalaya et al., 2008	<i>In vitro</i> : pure neuronal cultures (mice) Excitotoxicity (NMDA 10 μ mol/L) Calcium videomicroscopy (NMDA 12.5–100 μ mol/L)	Exogenous 0.3 μ mol/L	Interaction of tPA with GluN1 led to a subsequent potentiation of NMDA-induced calcium influx and neurotoxicity
Wiegler et al., 2008	<i>In vitro</i> : hippocampal slices from P12 rats (OGD 30 min) Treatment: c-Jun N-terminal kinase inhibitor (XG-102; 12 nM 6 h after OGD)	Exogenous 0.9 μ g/ml	Addition of tPA after OGD enhanced neuronal death in CA1 and XG-102 administration reduced neuronal death, alone or in the presence of tPA
Sun et al., 2009	<i>In vitro</i> : cultured dopaminergic neuroblasts (rat; N27 line) Treatments: aprotinin (200 KIU/ml), <i>L</i> -aminoacaproic acid (2 mM), EGRK (Glu-Gly-Arg-CH ₂ Cl, 100 mg/ml), FPRK (Phe-Pro-Arg-CH ₂ Cl, 100 mg/ml), bivalirudin (20 mg/ml)	Exogenous 10–20 μ g/ml	tPA induced N27 neuroblast cell death. Aprotinin and other protease inhibitors led to an inhibition of tPA-mediated neurotoxicity Aprotinin, FPRK, and EGRK directly antagonized the proteolytic activity of tPA, whereas <i>L</i> -aminoacaproic acid inhibited the binding of tPA to lysine residues on the cell surface
Baron et al., 2010	<i>In vitro</i> study: cortical and hippocampal neurons from mice (DIV 7 or DIV 12–14). Excitotoxic neuronal death (NMDA 50 μ M) <i>In vivo</i> : excitotoxic lesions. Male Swiss mice Hippocampal or cortical bilateral injections of NMDA	Exogenous 20 μ g/ml Exogenous IV 10 mg/kg	Catalytic tPA promoted NMDAR-induced Erk1/2 MAPK activation tPA failed to potentiate excitotoxicity of hippocampal neurons lacking GluN2D tPA exacerbated neurotoxicity through GluN2D-containing NMDAR via Erk 1/2
Guo et al., 2011	<i>In vitro</i> : mouse cortical neurons (DIV14) Neuronal apoptosis model	Exogenous 20 μ g/ml	The anticoagulant factor protein S (PS) protects mouse cortical neurons from tPA/NMDA induced injury. PS blocks the extrinsic apoptotic cascade

(Continued)

TABLE 1 | Continued

Reference	Model(s)	tPA	Mechanism(s)
Jullienne et al., 2011	<i>In vitro</i> : cortical and hippocampal neurons (mice; DIV 12–13) Excitotoxic neuronal death: NMDA (10 μ M) Treatment: UBP145 (0.2 μ M) <i>In vivo</i> : cortical excitotoxic lesions NMDA (mice; 2.5 nmol) Treatment: UBP145 (0.05 nmol)	Exogenous 20 μ g/mL Exogenous IV 10 mg/kg	tPA increased NMDA-mediated neurotoxicity in cortical neuronal cultures but not in hippocampal neuronal cultures UBP145 had no effect on NMDA-mediated neurotoxicity in hippocampal neurons but prevented tPA-induced potentiation of NMDA-mediated neurotoxicity in cortical neurons Inhibition of GluN2D-containing NMDAR with UBP145 can fully prevent the pro-excitotoxic effect of intravenously administered tPA
Rodríguez-González et al., 2011	<i>In vitro</i> : primary mixed cortical cell cultures from rats (OGD 150 min)	Exogenous 5 mg/mL	Treatment with tPA after OGD increased LDH release, active MMP-9, MCP-1, and MMP-2 Treatment with neuroserpin after OGD decreased LDH release and active MMP-9
Roussel et al., 2011	<i>In vitro</i> : primary cultures of cortical neurons (mice; DIV 10) Excitotoxicity induced by 10 μ M NMDA Treatment: HMGB-1 0.3 μ M	Exogenous 0.3 μ M	HMGB-1 reversed the pro-neurotoxic effect of tPA HMGB-1 prevented tPA from potentiating NMDA-evoked Ca^{2+} influx
Ma et al., 2012	<i>In vitro</i> : cultures of cortical neurons (rats; OGD/R) Treatment: neuroserpin	Endogenous	Neuroserpin protected neurons against OGD/R, mainly by inhibiting tPA-mediated acute neuronal excitotoxicity
Montagne et al., 2012	<i>In vitro</i> : cortical cultures of neurons from mice (DIV 12–13) Treatment: memantine (1–10 μ mol/L) Calcium videomicroscopy NMDA (50 μ mol/L) <i>In vitro</i> : cultures of cortical neurons from mice (DIV 15–16) Excitotoxic neuronal death: NMDA 50 μ M	Exogenous 0.3 μ mol/L Exogenous 0.3 μ M	Memantine prevented the potentiation of excitotoxic neuronal death induced by tPA Memantine prevented tPA-exacerbated calcium influx through activated NMDAR In contrast to WT tPA, tPA mutants including deletion of the kringle 2 domain and point mutation of the LBS-containing kringle 2 domain did not promote NMDAR-mediated neurotoxicity
Parcq et al., 2012	<i>In vitro</i> Excitotoxicity induced by exposure of cortical neurons to NMDA (mice; 50 μ M) at DIV 14 NMDA-induced calcium influx recorded from cultured cortical neurons (mice; DIV 12–14) exposed to NMDA (50 μ M) NMDA-induced excitotoxic brain lesions (NMDA 10 mM)	Exogenous 0.3 μ M Exogenous 45 μ M	sc-tPA promoted NMDAR-mediated neurotoxicity through its proteolytic activity; tc-tPA did not sc-tPA promoted both NMDA-induced calcium influx and Erk 1/2 activation, tc-tPA did not
Henry et al., 2013	<i>Ex vivo</i> : cortical brain slices from postnatal P10 mice	Exogenous 20 μ g/mL	In deeper layers (more mature), tPA was associated with glutamate-promoted neuronal necrosis
O'moumendze et al., 2013	<i>In vivo</i> : excitotoxic insult by intra-cortical injection of ibotenate in rats PAI-1 or tPA $-/-$ or WT <i>Ex vivo</i> : brain sections	Endogenous or exogenous 20 μ g/ml	Neonatal brain lesions

stress paradigms used and/or the type of neurons. Thus, whether experiments are performed on wild type neurons, tPA deficient neurons, tPA over-expressing neurons, *in vitro* and *in vivo*, is important to understand the impacts of tPA on neuronal survival (Tsirka et al., 1995; Wang et al., 1998; Nicole et al., 2001; Liot et al., 2006; Echeverry et al., 2010; Wu et al., 2013a).

WHAT ABOUT THE LEVEL OF tPA?

Some authors suggest that low levels of tPA are neuroprotective (Wu et al., 2013a), either exogenous (Baron et al., 2010) or produced by stressed cells (Lemarchand et al., 2015). In contrast, high levels of tPA (mainly exogenous) are neurotoxic (Nicole et al., 2001; Parcq et al., 2012).

Finally, Why not the Form of tPA?

There is so far only one study which discriminated tPA isoforms in the context of neuronal survival, with a clear evidence that sc-tPA is the only one capable to activate NMDAR and to promote excitotoxicity (in mouse cortical neurons subjected to NMDA exposure) both *in vitro* and *in vivo* (Parcq et al., 2012; Bertrand et al., 2015). It is thus interesting to note, that complexes formed between sc-tPA and neuroserpin (NSP) were reported more stable than those formed between tc-tPA and NSP, with no differences when complexes are formed with PAI-1 (Barker-Carlson et al., 2002). Whether conversion of sc-tPA into tc-tPA (by plasmin like activity) may influence the functions of tPA on neuronal survival, especially in the context of brain injuries, need to be investigated.

REFERENCES

- Astrup, T., and Permin, P. M. (1947). Fibrinolysis in the animal organism. *Nature* 159:681. doi: 10.1038/159681b0
- Astrup, T., and Stage, A. (1952). Isolation of a soluble fibrinolytic activator from animal tissue. *Nature* 170:929. doi: 10.1038/170929a0
- Badiola, N., Penas, C., Miñano-Molina, A., Barneda-Zahonero, B., Fadó, R., Sánchez-Opazo, et al. (2011). Induction of ER stress in response to oxygen-glucose deprivation of cortical cultures involves the activation of the PERK and IRE-1 pathways and of caspase-12. *Cell Death Dis.* 2:e149. doi: 10.1038/cddis.2011.31
- Barker-Carlson, K., Lawrence, D. A., and Schwartz, B. S. (2002). Acyl-enzyme complexes between tissue-type plasminogen activator and neuroserpin are short-lived in Vitro. *J. Biol. Chem.* 277, 46852–46857. doi: 10.1074/jbc.M207740200
- Baron, A., Montagne, A., Cassé, F., Launay, S., Maubert, E., Ali, C., et al. (2010). NR2D-containing NMDA receptors mediate tissue plasminogen activator-promoted neuronal excitotoxicity. *Cell Death Differ.* 17, 860–871. doi: 10.1038/cdd.2009.172
- Benchenane, K., Berezowski, V., Ali, C., Fernández-Monreal, M., López-Atalaya, J. P., Brillault, J., et al. (2005). Tissue-type plasminogen activator crosses the intact blood-brain barrier by low-density lipoprotein receptor-related protein-mediated transcytosis. *Circulation* 111, 2241–2249. doi: 10.1161/01.CIR.0000163542.48611.A2
- Benchenane, K., Castel, H., Boulouard, M., Bluthé, R., Fernández-Monreal, M., Roussel, B. D., et al. (2007). Anti-NR1 N-terminal-domain vaccination unmasks the crucial action of tPA on NMDA-receptor-mediated toxicity and spatial memory. *J. Cell Sci.* 120, 578–585. doi: 10.1242/jcs.03354

CONCLUSION

Depending on the study, endogenous tPA was reported as deleterious or beneficial for neurons. Although it is difficult to reconcile these findings, some propose that tPA is neuroprotective at low levels, but neurotoxic at higher levels. Assays of extracellular levels of tPA under specific conditions should be provided to support this hypothesis. Undoubtedly, the target involved is also a key trigger in the effect of tPA. In general, the pro-survival effects of tPA are independent on its proteolytic activity involving, interconnected or independently, EGF receptors, annexin II, PI-3 kinase-, AMPK-, mTor-HIF-1 α -dependent signaling pathways. In the adult, the neurotoxic effects of tPA seem to be dependent on its proteolytic activity, targeting either plasminogen, NMDARs, components of the extracellular matrix, inflammatory mediators, and/or other proteases. However, indirect neurotoxicity might also occur via a non-proteolytic activation of microglia (Siao and Tsirka, 2002). For now, there is no clear clinical data to determine, in human, whether tPA is neurotrophic or neurotoxic and in what conditions. Additional studies are needed to understand further the possible differential functions of tPA on neuronal survival. To address this question, we should consider the different isoforms of tPA (type I sc-tPA, type I tc-tPA, type II sc-tPA, and type II tc-tPA), the possibility that tPA may activate its substrates and/or receptors with differential affinities and that these substrates and/or receptors could be differentially expressed in cortical versus hippocampal neurons depending on their maturity.

- Berg, D. T., Burck, P. J., Berg, D. H., and Grinnell, B. W. (1993). Kringle glycosylation in a modified human tissue plasminogen activator improves functional properties. *Blood* 81, 1312–1322.
- Berg, D. T., and Grinnell, B. W. (1991). Signal and propeptide processing of human tissue plasminogen activator: activity of a pro-tPA derivative. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 179, 1289–1296. doi: 10.1016/0006-291X(91)91713-M
- Bertrand, T., Lesept, L., Chevilley, A., Lenoir, S., Aimable, M., Briens, A., et al. (2015). Conformations of tissue plasminogen activator (tPA) orchestrate neuronal survival by a crosstalk between EGFR and NMDAR. *Cell Death Dis.* (in press).
- Binder, B. R., Spragg, J., and Austen, K. F. (1979). Purification and characterization of human vascular plasminogen activator derived from blood vessel perfusates. *J. Biol. Chem.* 254, 1998–2003.
- Boose, J. A., Kuismanen, E., Gerard, R., Sambrook, J., and Gething, M. J. (1989). The single-chain form of tissue-type plasminogen activator has catalytic activity: studies with a mutant enzyme that lacks the cleavage site. *Biochemistry* 28, 635–643. doi: 10.1021/bi00428a033
- Borisov, O. V., Field, M., Ling, V. T., and Harris, R. J. (2009). Characterization of oligosaccharides in recombinant tissue plasminogen activator produced in Chinese hamster ovary cells: two decades of analytical technology development. *Anal. Chem.* 81, 9744–9754. doi: 10.1021/ac901498k
- Buisson, A., Nicole, O., Docagne, F., Sartelet, H., Mackenzie, E. T., and Vivien, D. (1998). Up-regulation of a serine protease inhibitor in astrocytes mediates the neuroprotective activity of transforming growth factor beta1. *FASEB J.* 12, 1683–1691.
- Campbell, B. C. V., Mitchell, P. J., Kleinig, T. J., Dewey, H. M., Churilov, L., Yassi, N., et al. (2015). Endovascular therapy for ischemic stroke with perfusion-imaging selection. *N. Engl. J. Med.* 372, 1009–1018. doi: 10.1056/NEJMoa1414792

- Cassé, F., Bardou, I., Danglot, L., Briens, A., Montagne, A., Parcq, J., et al. (2012). Glutamate controls tPA recycling by astrocytes, which in turn influences glutamatergic signals. *J. Neurosci.* 32, 5186–5199. doi: 10.1523/JNEUROSCI.5296-11.2012
- Centonze, D., Saulle, E., Pisani, A., Bonsi, P., Tropepi, D., Bernardi, G., et al. (2002). Tissue plasminogen activator is required for striatal post-ischemic synaptic potentiation. *Neuroreport* 13, 115–118. doi: 10.1097/00001756-2002101210-00027
- Christensen, L. R., and Macleod, C. M. (1945). A proteolytic enzyme of serum: characterization, activation, and reaction with inhibitors. *J. Gen. Physiol.* 28, 559–583. doi: 10.1085/jgp.28.6.559
- Collen, D., and Lijnen, H. R. (1991). Basic and clinical aspects of fibrinolysis and thrombolysis. *Blood* 78, 3114–3124.
- Collen, D., and Lijnen, H. R. (2009). The tissue-type plasminogen activator story. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 29, 1151–1155. doi: 10.1161/ATVBAHA.108.179655
- Collen, D., Rijken, D. C., Van Damme, J., and Billiau, A. (1982). Purification of human tissue-type plasminogen activator in centigram quantities from human melanoma cell culture fluid and its conditioning for use in vivo. *Thromb. Haemost.* 48, 294–296.
- Conradi, H. (1902). Über die Beziehung der Autolyse zur Blutgerinnung. *Beitr. chem. Physiol. Path.* 1:136.
- Cops, E. J., Sashindranath, M., Daglas, M., Short, K. M., da Fonseca Pereira, C., Pang, T. Y., et al. (2013). Tissue-type plasminogen activator is an extracellular mediator of Purkinje cell damage and altered gait. *Exp. Neurol.* 249, 8–19. doi: 10.1016/j.expneurol.2013.08.001
- Correa, F., Gauberti, M., Parcq, J., Macrez, R., Hommet, Y., Obiang, P., et al. (2011). Tissue plasminogen activator prevents white matter damage following stroke. *J. Exp. Med.* 208, 1229–1242. doi: 10.1084/jem.20101880
- Denis, P. S. (1838). *Essai sur l'Application de la Chimie à l'Etude Physiologique Du sang de l'Homme*. Paris: JB Ballière.
- Denys, J., and de Marbaix, H. (1889). Les peptonisations provoquées par le chloroforme. *Cellule* 5, 197–251.
- Echeverry, R., Wu, J., Haile, W. B., Guzman, J., and Yepes, M. (2010). Tissue-type plasminogen activator is a neuroprotectant in the mouse hippocampus. *J. Clin. Invest.* 120, 2194–2205. doi: 10.1172/JCI41722.2194
- Einarsson, M., Brandt, J., and Kaplan, L. (1985). Large-scale purification of human tissue-type plasminogen activator using monoclonal antibodies. *Biochim. Biophys. Acta* 830, 1–10. doi: 10.1016/0167-4838(85)90123-2
- Fernández-Monreal, M., López-Atalaya, J. P., Benchenane, K., Cacqueavel, M., Dulin, F., Le Caer, J. P., et al. (2004). Arginine 260 of the amino-terminal domain of NRI subunit is critical for tissue-type plasminogen activator-mediated enhancement of N-methyl-D-aspartate receptor signaling. *J. Biol. Chem.* 279, 50850–50856. doi: 10.1074/jbc.M407069200
- Flavin, M. P., and Zhao, G. (2001). Hippocampal neurons from oxygen-glucose deprivation injury. *J. Neurosci. Res.* 63, 388–394. doi: 10.1002/1097-4547(20010301)63:5
- Fleisher, M. S., and Loeb, L. (1915). Further investigations on the mode of action of substances inhibiting tumor growth and on immunisation against these substances. *J. Exp. Med.* 21, 155–163. doi: 10.1084/jem.21.2.155
- Fredriksson, L., Li, H., Fieber, C., Li, X., and Eriksson, U. (2004). Tissue plasminogen activator is a potent activator of PDGF-CC. *EMBO J.* 23, 3793–3802. doi: 10.1038/sj.emboj.7600397
- Gabriel, C., Ali, C., Lesné, S., Fernández-Monreal, M., Docagne, F., Plawinski, L., et al. (2003). Transforming growth factor alpha-induced expression of type 1 plasminogen activator inhibitor in astrocytes rescues neurons from excitotoxicity. *FASEB J.* 17, 277–279. doi: 10.1096/fj.02-0403jfe
- Goyal, M., Demchuk, A. M., Menon, B. K., Eesa, M., Rempel, J. L., Thornton, J., et al. (2015). Randomized assessment of rapid endovascular treatment of ischemic stroke. *N. Engl. J. Med.* 372, 1019–1030. doi: 10.1056/NEJMoa1414905
- Guo, H., Barrett, T. M., Zhong, Z., Fernández, J. A., Griffin, J. H., Freeman, R. S., et al. (2011). Protein 5 blocks the extrinsic apoptotic cascade in tissue plasminogen activator/N-methyl D-aspartate-treated neurons via Tyro3-Akt-FKHRL1 signaling pathway. *Mol. Neurodegener.* 6:13. doi: 10.1186/1750-1326-6-13
- Haile, W. B., Wu, J., Echeverry, R., Wu, F., An, J., and Yepes, M. (2012). Tissue-type plasminogen activator has a neuroprotective effect in the ischemic brain mediated by neuronal TNF- α . *J. Cereb. Blood Flow Metab.* 32, 57–69. doi: 10.1038/jcbfm.2011.106
- Hajjar, K. A., and Reynolds, C. M. (1994). alpha-Fucose-mediated binding and degradation of tissue-type plasminogen activator by HepG2 cells. *J. Clin. Invest.* 93, 703–710. doi: 10.1172/JCI117023
- Harris, R. J., Leonard, C. K., Guzzetta, A. W., and Spellman, M. W. (1991). Tissue plasminogen activator has an O-linked fucose attached to threonine-61 in the epidermal growth factor domain. *Biochemistry* 30, 2311–2314. doi: 10.1021/bi00223a004
- Head, B. P., Patel, H. H., Niesman, I. R., Drummond, J. C., Roth, D. M., and Patel, P. M. (2009). Inhibition of p75 neurotrophin receptor attenuates isoflurane-mediated neuronal apoptosis in the neonatal central nervous system. *Anesthesiology* 110, 813–825. doi: 10.1097/ALN.0b013e31819b602b
- Hedin, S. G. (1903). On the presence of a proteolytic enzyme in the normal serum of the ox. *J. Physiol.* 30, 195–201. doi: 10.1113/jphysiol.1903.sp000989
- Henry, V. J., Lecointre, M., Laudenbach, V., Ali, C., Macrez, R., Jullienne, A., et al. (2013). High t-PA release by neonate brain microvascular endothelial cells under glutamate exposure affects neuronal fate. *Neurobiol. Dis.* 50, 201–208. doi: 10.1016/j.nbd.2012.10.020
- Hetman, M., Cavanaugh, J. E., Kimelman, D., and Xia, Z. (2000). Role of glycogen synthase kinase-3beta in neuronal apoptosis induced by trophic withdrawal. *J. Neurosci.* 20, 2567–2574.
- Ichinose, A., Kisiel, W., and Fujikawa, K. (1984). Proteolytic activation of tissue plasminogen activator by plasma and tissue enzymes. *FEBS Lett.* 175, 412–418. doi: 10.1016/0014-5793(84)80779-6
- Jaques, A. J., Opendakker, G., Rademacher, T. W., Dwek, R. A., and Zamze, S. E. (1996). The glycosylation of Bowes melanoma tissue plasminogen activator: lectin mapping, reaction with anti-L2/HNK-1 antibodies and the presence of sulphated/glucuronic acid containing glycans. *Biochem. J.* 316, 427–437. doi: 10.1042/bj3160427
- Jörnvall, H., Pohl, G., Bergsdorf, N., and Wallén, P. (1983). Differential proteolysis and evidence for a residue exchange in tissue plasminogen activator suggest possible association between two types of protein microheterogeneity. *FEBS Lett.* 156, 47–50. doi: 10.1016/0014-5793(83)80245-2
- Jullienne, A., Montagne, A., Orset, C., Lesept, F., Jane, D. E., Monaghan, D. T., et al. (2011). Selective inhibition of GluN2D-containing N-methyl-D-aspartate receptors prevents tissue plasminogen activator-promoted neurotoxicity both in vitro and in vivo. *Mol. Neurodegener.* 6:68. doi: 10.1186/1750-1326-6-68
- Kim, H. K., Lee, S. Y., Oh, H. K., Kang, B. H., Ku, H. J., Lee, Y., et al. (2003). Inhibition of endothelial cell proliferation by the recombinant kringle domain of tissue-type plasminogen activator. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 304, 740–746. doi: 10.1016/S0006-291X(03)00656-9
- Kim, Y., Park, J. H., Hong, S. H., and Koh, J. Y. (1999). Nonproteolytic neuroprotection by human recombinant tissue plasminogen activator. *Science* 284, 647–650. doi: 10.1126/science.284.5414.647
- Kuiper, J., Van't Hof, A., Otter, M., Biessen, E. A., Rijken, D. C., and van Berkel, T. J. (1996). Interaction of mutants of tissue-type plasminogen activator with liver cells: effect of domain deletions. *Biochem. J.* 313, 775–780. doi: 10.1042/bj3130775
- Kvajo, M., Albrecht, H., Meins, M., Hengst, U., Troncoso, E., Lefort, S., et al. (2004). Regulation of brain proteolytic activity is necessary for the in vivo function of NMDA receptors. *J. Neurosci.* 24, 9734–9743. doi: 10.1523/JNEUROSCI.3306-04.2004
- Lamba, D., Bauer, M., Huber, R., Fischer, S., Rudolph, R., Kohnert, U., et al. (1996). The 2.3 Å crystal structure of the catalytic domain of recombinant two-chain human tissue-type plasminogen activator. *J. Mol. Biol.* 258, 117–135. doi: 10.1006/jmbi.1996.0238
- Larsen, G. R., Henson, K., and Blue, Y. (1988). Variants of human tissue-type plasminogen activator. *J. Biol. Chem.* 263, 1023–1029.
- Launay, S., Maubert, E., Lebeurrier, N., Tennstaedt, A., Campioni, M., Docagne, F., et al. (2008). HtrA1-dependent proteolysis of TGF-beta controls both neuronal maturation and developmental survival. *Cell Death Differ.* 15, 1408–1416. doi: 10.1038/cdd.2008.82

- Lebeurrier, N., Liot, G., Lopez-Atalaya, J. P., Orset, C., Fernandez-Monreal, M., Sonderegger, P., et al. (2005). The brain-specific tissue-type plasminogen activator inhibitor, neuroserpin, protects neurons against excitotoxicity both *in vitro* and *in vivo*. *Mol. Cell. Neurosci.* 30, 552–558. doi: 10.1016/j.mcn.2005.09.005
- Lee, H. Y., Hwang, I. Y., Im, H., Koh, J. Y., and Kim, Y. H. (2007). Non-proteolytic neurotrophic effects of tissue plasminogen activator on cultured mouse cerebrocortical neurons. *J. Neurochem.* 101, 1236–1247. doi: 10.1111/j.1471-4159.2007.04417.x
- Lemarchand, E., Maubert, E., Haelewyn, B., Ali, C., Rubio, M., and Vivien, D. (2015). Stressed neurons protect themselves by a tissue-type plasminogen activator-mediated EGFR-dependent mechanism. *Cell Death Differ.* doi: 10.1038/cdd.2015.76 [Epub ahead of print].
- Li, J., Ma, Y., Teng, Y. D., Zheng, K., Vartanian, T. K., Snyder, E. Y., et al. (2006). Purkinje neuron degeneration in nervous (nr) mutant mice is mediated by a metabolic pathway involving excess tissue plasminogen activator. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 103, 7847–7852. doi: 10.1073/pnas.0602440103
- Li, J., Yu, L., Gu, X., Ma, Y., Pasqualini, R., Arap, W., et al. (2013). Tissue plasminogen activator regulates Purkinje neuron development and survival. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 110, E2410–E2419. doi: 10.1073/pnas.1305010110
- Liberatore, G. T., Samson, A., Bladin, C., Schleuning, W. D., and Medcalf, R. L. (2003). Vampire bat salivary plasminogen activator (desmoteplase): a unique fibrinolytic enzyme that does not promote neurodegeneration. *Stroke* 34, 537–543. doi: 10.1161/01.STR.0000049764.49162.76
- Liot, G., Benchenane, K., Léveillé, F., López-Atalaya, J. P., Fernández-Monreal, M., Ruocco, A., et al. (2004). 2,7-Bis-(4-amidinobenzylidene)-cycloheptan-1-one dihydrochloride, tPA stop, prevents tPA-enhanced excitotoxicity both *in vitro* and *in vivo*. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* 24, 1153–1159. doi: 10.1097/01.WCB.0000134476.93809.75
- Liot, G., Roussel, B. D., Lebeurrier, N., Benchenane, K., López-Atalaya, J. P., Vivien, D., et al. (2006). Tissue-type plasminogen activator rescues neurons from serum deprivation-induced apoptosis through a mechanism independent of its proteolytic activity. *J. Neurochem.* 98, 1458–1464. doi: 10.1111/j.1471-4159.2006.03982.x
- Liu, D., Cheng, T., Guo, H., Fernández, J. A., Griffin, J. H., Song, X., et al. (2004). Tissue plasminogen activator neurovascular toxicity is controlled by activated protein C. *Nat. Med.* 10, 1379–1383. doi: 10.1038/nm1122
- López-Atalaya, J. P., Roussel, B. D., Ali, C., Maubert, E., Petersen, K. U., Berezowski, V., et al. (2007). Recombinant *Desmodus rotundus* salivary plasminogen activator crosses the blood-brain barrier through a low-density lipoprotein receptor-related protein-dependent mechanism without exerting neurotoxic effects. *Stroke* 38, 1036–1043. doi: 10.1161/01.STR.0000258100.04923.84
- López-Atalaya, J. P., Roussel, B. D., Levrat, D., Parcq, J., Nicole, O., Hommet, Y., et al. (2008). Toward safer thrombolytic agents in stroke: molecular requirements for NMDA receptor-mediated neurotoxicity. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* 28, 1212–1221. doi: 10.1038/jcbfm.2008.14
- Lu, W., and Tsirka, S. E. (2002). Partial rescue of neural apoptosis in the Lurcher mutant mouse through elimination of tissue plasminogen activator. *Development* 129, 2043–2050.
- Ma, J., Yu, D., Tong, Y., and Mao, M. (2012). Effect of neuroserpin in a neonatal hypoxic-ischemic injury model *ex vivo*. *Biol. Res.* 45, 357–362. doi: 10.4067/S0716-97602012000400005
- Macfarlane, R. G., and Biggs, R. (1948). Fibrinolysis; its mechanism and significance. *Blood* 3, 1167–1187.
- Macrez, R., Bezin, L., Le Mauff, B., Ali, C., and Vivien, D. (2010). Functional occurrence of the interaction of tissue plasminogen activator with the NR1 Subunit of N-methyl-D-aspartate receptors during stroke. *Stroke* 41, 2950–2955. doi: 10.1161/STROKEAHA.110.592360
- Madison, E. L., Kobe, A., Gething, M. J., Sambrook, J. F., and Goldsmith, E. J. (1993). Converting tissue plasminogen activator to a zymogen: a regulatory triad of Asp-His-Ser. *Science* 262, 419–421. doi: 10.1126/science.8211162
- Mantuano, E., Lam, M. S., and Gonias, S. L. (2013). LRP1 assembles unique co-receptor systems to initiate cell-signaling in response to tissue-type plasminogen activator and myelin-associated glycoprotein. *J. Biol. Chem.* 288, 34009–34018. doi: 10.1074/jbc.M113.509133
- Mantuano, E., Lam, M. S., Shibayama, M., Campana, W. M., and Gonias, S. L. (2015). The NMDA receptor functions independently and as an LRP1 co-receptor to promote Schwann cell survival and migration. *J. Cell Sci.* 128, 3478–3488. doi: 10.1242/jcs.173765
- Martin, A. M., Kuhlmann, C., Trossbach, S., Jaeger, S., Waldron, E., Roebroek, A., et al. (2008). The functional role of the second NPXY motif of the LRP1 β -chain in tissue-type plasminogen activator-mediated activation of N-methyl-D-aspartate receptors. *J. Biol. Chem.* 283, 12004–12013. doi: 10.1074/jbc.M707607200
- Mattson, M. P., and Duan, W. (1999). "Apoptotic" biochemical cascades in synaptic compartments: roles in adaptive plasticity and neurodegenerative disorders. *J. Neurosci. Res.* 58, 152–166. doi: 10.1002/(SICI)1097-4547(199910)58
- Matys, T., and Strickland, S. (2003). Tissue plasminogen activator and NMDA receptor cleavage. *Nat. Med.* 9, 371–372. doi: 10.1038/nm0403-371
- Medina, M. G., Ledesma, M. D., Dominguez, J. E., Medina, M., Zafra, D., Alameda, F., et al. (2005). Tissue plasminogen activator mediates amyloid-induced neurotoxicity via Erk1/2 activation. *EMBO J.* 24, 1706–1716. doi: 10.1038/sj.emboj.7600650
- Montagne, A., Hébert, M., Jullienne, A., Lesep, F., Le Béhot, A., Louessard, M., et al. (2012). Memantine improves safety of thrombolysis for stroke. *Stroke* 43, 2774–2781. doi: 10.1161/STROKEAHA.112.669374
- Morgagni, J. B. (1761). *De Sedibus, et Causis Morborum per Anatomen Indagatis*. Venezia: Remondini.
- Mori, K., Dwek, R. A., Downing, K. A., Opendakker, G., Pauline, M., and Rudd, P. M. (1995). The activation of Type 1 and Type 2 plasminogen by Type I and Type II tissue plasminogen activator. *Biochem. J.* 270, 3261–3267. doi: 10.1074/jbc.270.7.3261
- Ng, K. S., Leung, H. W., Wong, P. T. H., and Low, C. M. (2012). Cleavage of the NR2B subunit amino terminus of N-methyl-D-aspartate (n.d.) Receptor by tissue plasminogen activator: identification of the cleavage site and characterization of ifenprodil and glycine affinities on truncated NMDA receptor. *J. Biol. Chem.* 287, 25520–25529. doi: 10.1074/jbc.M112.374397
- Nicole, O., Docagne, F., Ali, C., Margail, I., Carmeliet, P., MacKenzie, E. T., et al. (2001). The proteolytic activity of tissue-plasminogen activator enhances NMDA receptor-mediated signaling. *Nat. Med.* 7, 59–64. doi: 10.1038/83358
- NINDS (1995). Tissue plasminogen activator for acute ischemic stroke. *N. Engl. J. Med.* 333, 1581–1587. doi: 10.1056/NEJM199512143332401
- Omouendze, P. L., Henry, V. J., Porte, B., Dupré, N., Carmeliet, P., Gonzalez, B. J., et al. (2013). Hypoxia-ischemia or excitotoxin-induced tissue plasminogen activator-dependent gelatinase activation in mice neonate brain microvessels. *PLoS ONE* 8:e71263. doi: 10.1371/journal.pone.0071263
- Ortiz-Zapater, E., Peiró, S., Roda, O., Corominas, J. M., Aguilar, S., Ampurdanés, C., et al. (2007). Tissue plasminogen activator induces pancreatic cancer cell proliferation by a non-catalytic mechanism that requires extracellular signal-regulated kinase 1/2 activation through epidermal growth factor receptor and annexin A2. *Am. J. Pathol.* 170, 1573–1584. doi: 10.2353/ajpath.2007.060850
- Pang, P. T., Teng, H. K., Zaitsev, E., Woo, N. T., Sakata, K., Zhen, S., et al. (2004). Cleavage of proBDNF by tPA/plasmin is essential for long-term hippocampal plasticity. *Science* 306, 487–491. doi: 10.1126/science.1100135
- Paoletti, P., Bellone, C., and Zhou, Q. (2013). NMDA receptor subunit diversity: impact on receptor properties, synaptic plasticity and disease. *Nat. Rev. Neurosci.* 14, 383–400. doi: 10.1038/nrn3504
- Parcq, J., Bertrand, T., Montagne, A., Baron, A. F., Macrez, R., Billard, J. M., et al. (2012). Unveiling an exceptional zymogen: the single-chain form of tPA is a selective activator of NMDA receptor-dependent signaling and neurotoxicity. *Cell Death. Differ.* 19, 1983–1991. doi: 10.1038/cdd.2012.86
- Park, L., Gallo, E. F., Anrather, J., Wang, G., Norris, E. H., Paul, J., et al. (2008). Key role of tissue plasminogen activator in neurovascular coupling. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 105, 1073–1078. doi: 10.1073/pnas.0708823105
- Pawlak, R., Nagai, N., Urano, T., Napiorkowska-Pawlak, D., Ihara, H., Takada, Y., et al. (2002). Rapid, specific and active site-catalyzed effect of tissue-plasminogen activator on hippocampus-dependent learning in mice. *Neuroscience* 113, 995–1001. doi: 10.1016/S0306-4522(02)00166-5
- Pennica, D., Holmes, W. E., Kohr, W. J., Harkins, R. N., Velhar, G. A., Ward, C. A., et al. (1983). Cloning and expression of human tissue-type plasminogen activator cDNA in *E. coli*. *Nature* 301, 214–221. doi: 10.1038/301214a0

- Petersen, L. C., Johannessen, M., Foster, D., Kumar, A., and Mulvihill, E. (1988). The effect of polymerised fibrin on the catalytic activities of one-chain tissue-type plasminogen activator as revealed by an analogue resistant to plasmin cleavage. *Biochim. Biophys. Acta* 952, 245–254. doi: 10.1016/0167-4838(88)90123-9
- Pineda, D., Ampurdanés, C., Medina, M. G., Serratos, J., Tusell, J. M., Saura, J., et al. (2012). Tissue plasminogen activator induces microglial inflammation via a noncatalytic molecular mechanism involving activation of mitogen-activated protein kinases and Akt signaling pathways and AnnexinA2 and Galectin-1 receptors. *Glia* 60, 526–540. doi: 10.1002/glia.22284
- Pohl, G., Källström, M., Bergsdorf, N., Wallén, P., and Jörnvall, H. (1984). Tissue plasminogen activator: peptide analyses confirm an indirectly derived amino acid sequence, identify the active site serine residue, establish glycosylation sites, and localize variant differences. *Biochemistry* 23, 3701–3707. doi: 10.1021/bi00311a020
- Polavarapu, R., Gongora, M. C., Yi, H., Ranganthan, S., Lawrence, D. A., Strickland, D., et al. (2007). Tissue-type plasminogen activator – mediated shedding of astrocytic low-density lipoprotein receptor – related protein increases the permeability of the neurovascular unit. *Blood* 109, 3270–3278. doi: 10.1182/blood-2006-08-043125
- Rånby, M., Bergsdorf, N., and Nilsson, T. (1982). Enzymatic properties of the one- and two-chain form of tissue plasminogen activator. *Thromb. Res.* 27, 175–183. doi: 10.1016/0049-3848(82)90197-9
- Rathore, Y. S., Rehan, M., Pandey, K., and Ashish, S. G. (2012). First structural model of full-length human tissue-plasminogen activator: a SAXS data-based modeling study. *J. Phys. Chem. B* 116, 496–502. doi: 10.1021/jp207243n
- Reddrop, C., Moldrich, R. X., Beart, P. M., Farso, M., Liberatore, G. T., Howells, D. W., et al. (2005). Vampire bat salivary plasminogen activator (desmoteplase) inhibits tissue-type plasminogen activator-induced potentiation of excitotoxic injury. *Stroke* 36, 1241–1246. doi: 10.1161/01.STR.0000166050.84056.48
- Rijken, D. C., Wijngaards, G., Jong, M. Z., and Welbergen, J. (1979). Purification and partial characterization of plasminogen activator from human uterine tissue. *Biochim. Biophys. Acta* 580, 140–153. doi: 10.1016/0005-2795(79)90205-8
- Rodríguez-González, R., Agulla, J., Pérez-Mato, M., Sobrino, T., and Castillo, J. (2011). Neuroprotective effect of neuroserpin in rat primary cortical cultures after oxygen and glucose deprivation and tPA. *Neurochem. Int.* 58, 337–343. doi: 10.1016/j.neuint.2010.12.006
- Roussel, B. D., Macrez, R., Jullienne, A., Agin, V., Maubert, E., Dauphinot, L., et al. (2009). Age and albumin D site-binding protein control tissue plasminogen activator levels: neurotoxic impact. *Brain* 132, 2219–2230. doi: 10.1093/brain/awp162
- Roussel, B. D., Mysiorek, C., Rouhiainen, A., Jullienne, A., Parcq, J., Hommet, Y., et al. (2011). HMGB-1 promotes fibrinolysis and reduces neurotoxicity mediated by tissue plasminogen activator. *J. Cell Sci.* 124, 2070–2076. doi: 10.1242/jcs.084392
- Samson, A. L., Nevin, S. T., Croucher, D., Niego, B., Daniel, P. B., Weiss, T. W., et al. (2008). Tissue-type plasminogen activator requires a co-receptor to enhance NMDA receptor function. *J. Neurochem.* 107, 1091–1101. doi: 10.1111/j.1471-4159.2008.05687.x
- Shi, R., Weng, J., Zhao, L., Li, X. M., Gao, T. M., and Kong, J. (2012). Excessive autophagy contributes to neuron death in cerebral ischemia. *CNS Neurosci. Ther.* 18, 250–260. doi: 10.1111/j.1755-5949.2012.00295.x
- Siao, C. J., and Tsirka, S. E. (2002). Tissue plasminogen activator mediates microglial activation via its finger domain through annexin II. *J. Neurosci.* 22, 3352–3358.
- Siddiq, M. M., and Tsirka, S. E. (2004). Modulation of zinc toxicity by tissue plasminogen activator. *Mol. Cell. Neurosci.* 25, 162–171. doi: 10.1016/j.mcn.2003.10.007
- Spellman, M. W., Basa, L. J., Leonard, C. K., Chakel, J. A., O'Connor, J. V., Wilson, S., et al. (1989). Carbohydrate structures of human tissue plasminogen activator expressed in Chinese hamster ovary cells. *J. Biol. Chem.* 264, 14100–14111.
- Sun, H. Y., Szlam, F., Levy, J. H., Cséte, M. E., and Tanaka, K. A. (2009). Antifibrinolytic agents reduce tissue plasminogen activator-mediated neuronal toxicity in vitro. *Acta Anaesthesiol. Scand.* 53, 325–331. doi: 10.1111/j.1399-6576.2008.01858.x
- Tate, K. M., Higgins, D. L., Holmes, W. E., Winkler, M. E., Heyneke, H. L., and Vehar, G. A. (1987). Functional role of proteolytic cleavage at arginine-275 of human tissue plasminogen activator as assessed by site-directed mutagenesis. *Biochemistry* 26, 338–343. doi: 10.1049/jimmunol.1100412
- Terro, F., Esclaire, F., Yardin, C., and Hugon, J. (2000). N-methyl-D-aspartate receptor blockade enhances neuronal apoptosis induced by serum deprivation. *Neurosci. Lett.* 278, 149–152. doi: 10.1016/S0304-3940(99)00911-8
- Thelwell, C., and Longstaff, C. (2007). The regulation by fibrinogen and fibrin of tissue plasminogen activator kinetics and inhibition by plasminogen activator inhibitor 1. *J. Thromb. Haemost.* 5, 804–811. doi: 10.1111/j.1538-7836.2007.02422.x
- Tsirka, S. E., Bugge, T. H., Degen, J. L., and Strickland, S. (1997a). Neuronal death in the central nervous system demonstrates a non-fibrin substrate for plasmin. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 94, 9779–9781. doi: 10.1073/pnas.94.18.9779
- Tsirka, S. E., Rogove, A. D., Bugge, T. H., Degen, J. L., and Strickland, S. (1997b). An extracellular proteolytic cascade promotes neuronal degeneration in the mouse hippocampus. *J. Neurosci.* 17, 543–552.
- Tsirka, S. E., Gualandris, A., Amaral, D. G., and Strickland, S. (1995). Excitotoxin-induced neuronal degeneration and seizure are mediated by tissue plasminogen activator. *Nature* 377, 340–344. doi: 10.1038/377340a0
- Tucker, H. M., Kihiko, M., Caldwell, J. N., Wright, S., Kawarabayashi, T., Price, D., et al. (2000). The plasmin system is induced by and degrades amyloid-beta aggregates. *J. Neurosci.* 20, 3937–3946.
- Vandenbergh, W., Van Den Bosch, L., and Robberecht, W. (1998). Tissue-type plasminogen activator is not required for kainate-induced motoneuron death in vitro. *Neuroreport* 9, 2791–2796. doi: 10.1097/00001756-199808240-00020
- Wallén, P., Bergsdorf, N., and Rånby, M. (1982). Purification and identification of two structural variants of porcine tissue plasminogen activator by affinity adsorption on fibrin. *Biochim. Biophys. Acta* 719, 318–328. doi: 10.1016/0304-4165(82)90105-2
- Wang, X., Asahi, M., and Lo, E. H. (1999). Tissue type plasminogen activator amplifies hemoglobin-induced neurotoxicity in rat neuronal cultures. *Neurosci. Lett.* 274, 79–82. doi: 10.1016/S0304-3940(99)00682-5
- Wang, Y. F., Tsirka, S. E., Strickland, S., Stieg, P. E., Soriano, S. G., and Lipton, S. A. (1998). Tissue plasminogen activator (tPA) increases neuronal damage after focal cerebral ischemia in wild-type and tPA-deficient mice. *Nat. Med.* 4, 228–231. doi: 10.1038/ng0598-56
- Wiegler, K., Bonny, C., Coquoz, D., and Hirt, L. (2008). The JNK inhibitor XG-102 protects from ischemic damage with delayed intravenous administration also in the presence of recombinant tissue plasminogen activator. *Cerebrovasc. Dis.* 26, 360–366. doi: 10.1159/000151639
- Wittwer, A. J., and Howard, S. C. (1990). Glycosylation at Asn-184 inhibits the conversion of single-chain to two-chain tissue-type plasminogen activator by plasmin. *Biochemistry* 29, 4175–4180. doi: 10.1021/bi00469a021
- Wittwer, A. J., Howard, S. C., Carr, L. S., Harakas, N. K., Feder, J., Parekh, R. B., et al. (1989). Effects of N-glycosylation on in vitro activity of Bowes melanoma and human colon fibroblast derived tissue plasminogen activator. *Biochemistry* 28, 7662–7669. doi: 10.1021/bi00445a022
- Wu, F., Echeverry, R., Wu, J., An, J., Haile, W. B., Cooper, D. S., et al. (2013a). Tissue-type plasminogen activator protects neurons from excitotoxin-induced cell death via activation of the ERK1/2-CREB-ATF3 signaling pathway. *Mol. Cell. Neurosci.* 52, 9–19. doi: 10.1016/j.mcn.2012.10.001
- Wu, F., Nicholson, A. D., Haile, W. B., Torre, E., An, J., Chen, C., et al. (2013b). Tissue-type plasminogen activator mediates neuronal detection and adaptation to metabolic stress. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* 33, 1761–1769. doi: 10.1038/jcbfm.2013.124
- Wu, F., Wu, J., Nicholson, A. D., Echeverry, R., Haile, W. B., Tong, F. C., et al. (2012). Tissue-type plasminogen activator regulates the neuronal uptake of glucose in the ischemic brain. *J. Neurosci.* 32, 9848–9858. doi: 10.1523/JNEUROSCI.1241-12.2012
- Yi, J. S., Kim, Y. H., and Koh, J. Y. (2004). Infarct reduction in rats following intraventricular administration of either tissue plasminogen activator (tPA) or its non-protease mutant S478A-tPA. *Exp. Neurol.* 189, 354–360. doi: 10.1016/j.expneurol.2004.05.032
- Yuan, H., Vance, K. M., Junge, C. E., Geballe, M. T., Snyder, J. P., Hepler, J. R., et al. (2009). The serine protease plasmin cleaves the amino-terminal domain of the NR2A subunit to relieve zinc inhibition of the N-methyl-D-aspartate receptors. *J. Biol. Chem.* 284, 12862–12873. doi: 10.1074/jbc.M805123200

Zhang, Z., Zhang, L., Yepes, M., Jiang, Q., Li, Q., Arniego, P., et al. (2002). Adjuvant treatment with neuroserpin increases the therapeutic window for tissue-type plasminogen activator administration in a rat model of embolic stroke. *Circulation* 106, 740–745. doi: 10.1161/01.CIR.0000023942.10849.41

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

Copyright © 2015 Chevilley, Lesept, Lenoir, Ali, Parcq and Vivien. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (CC BY). The use, distribution or reproduction in other forums is permitted, provided the original author(s) or licensor are credited and that the original publication in this journal is cited, in accordance with accepted academic practice. No use, distribution or reproduction is permitted which does not comply with these terms.

Article 3: Conformations of tissue plasminogen activator (tPA) orchestrate neuronal survival by a crosstalk between EGFR and NMDAR.

Les conformations de l'activateur tissulaire du plasminogène (tPA) modulent la survie neuronale par une interaction entre les récepteurs NMDA et EGF.

Publié dans : *Cell Death Disease*

Contexte bibliographique :

L'activateur tissulaire du plasminogène est une sérine protéase impliquée dans diverses fonctions, aussi bien neurotrophiques que neurotoxiques, au sein du SNC. Le tPA est produit et libéré sous forme simple chaîne (sc-tPA), il peut ensuite être clivé par la plasmine ou les kallikréines, pour se retrouver sous forme double chaîne (tc-tPA). Afin d'expliquer les rôles opposés du tPA au sein du parenchyme cérébral, nous supposons que ces deux conformations pourraient contrôler différemment les effets du tPA sur la survie neuronale et ce malgré qu'ils aient une activité fibrinolytique identique.

Objectifs de l'étude :

Dans cette étude, nous avons voulu regarder l'influence des deux formes du tPA sur la survie et la mort neuronales, ainsi que les mécanismes et les récepteurs impliqués dans ces phénomènes.

Principaux résultats :

- ✓ Seul le sc-tPA est capable de potentialiser l'influx de calcium induit par l'activation des récepteurs NMDA et par conséquent la mort neuronale excitotoxique ;
- ✓ Le sc-tPA et le tc-tPA sont tous les deux capables d'activer les récepteurs à l'EGF et d'engendrer un effet anti-apoptotique sur les neurones ;
- ✓ L'activation des récepteurs à l'EGF par le tPA permet de diminuer la signalisation induite par les récepteurs NMDA.

OPEN

Citation: *Cell Death and Disease* (2015) 6, e1924; doi:10.1038/cddis.2015.296
© 2015 Macmillan Publishers Limited All rights reserved 2041-4889/15

www.nature.com/cddis

Conformations of tissue plasminogen activator (tPA) orchestrate neuronal survival by a crosstalk between EGFR and NMDAR

T Bertrand^{1,2}, F Lesept^{1,2}, A Chevilly¹, S Lenoir¹, M Aimable¹, A Briens¹, Y Hommet¹, I Bardou¹, J Parcq¹ and D Vivien^{*1}

Tissue-type plasminogen activator (tPA) is a pleiotropic serine protease of the central nervous system (CNS) with reported neurotrophic and neurotoxic functions. Produced and released under its single chain form (sc), the sc-tPA can be cleaved by plasmin or kallikrein in a two chain form, tc-tPA. Although both sc-tPA and tc-tPA display a similar fibrinolytic activity, we postulated here that these two conformations of tPA (sc-tPA and tc-tPA) could differentially control the effects of tPA on neuronal survival. Using primary cultures of mouse cortical neurons, our present study reveals that sc-tPA is the only one capable to promote *N*-methyl-D-aspartate receptor (NMDAR)-induced calcium influx and subsequent excitotoxicity. In contrast, both sc-tPA and tc-tPA are capable to activate epidermal growth factor receptors (EGFRs), a mechanism mediating the antiapoptotic effects of tPA. Interestingly, we revealed a tPA dependent crosstalk between EGFR and NMDAR in which a tPA-dependent activation of EGFRs leads to downregulation of NMDAR signaling and to subsequent neurotrophic effects.

Cell Death and Disease (2015) 6, e1924; doi:10.1038/cddis.2015.296; published online 15 October 2015

Tissue-type plasminogen activator (tPA) is secreted by endothelial cells and promotes fibrinolysis via the conversion of fibrin-bound plasminogen into plasmin.¹ Neurons and some glial cells also secrete tPA.^{2–5} tPA is secreted as a single-chain form (sc-tPA), which can be processed into a two-chain form (tc-tPA) by plasmin or kallikreins.^{6,7} Interestingly, sc-tPA is proteolytically active even without proteolytic processing. In addition to its vascular functions, tPA displays critical roles in the brain parenchyma with roles in cell migration, neuronal plasticity and survival,^{8–14} acting either as an enzyme or as a cytokine-like molecule. Among its actions, tPA is well described to promote neurotoxicity, likely through promotion of *N*-methyl-D-aspartate receptor (NMDAR) activity.^{15–17} Recently, we reported that only sc-tPA can promote NMDAR signaling and neurotoxicity.¹⁸ Interestingly, data from wild-type mice,¹⁹ transgenic mice overexpressing tPA in neurons²⁰ or *in vitro*²¹ also report neuroprotective effects of tPA.^{9,10} The proposed mechanisms involved a tPA-dependent and non-proteolytic activation of either epidermal growth factor receptors (EGFRs)²² on oligodendrocytes or NMDARs.²⁰

Here we explored a link between tPA conformations (sc-tPA and tc-tPA), EGFR- and NMDAR-dependent signaling pathways. Our findings identify sc-tPA as a selective positive modulator of NMDAR signaling in neurons when present at high concentrations and both sc-tPA and tc-tPA as positive modulators of EGFR signaling, this even at low concentrations. We also reveal a crosstalk between these two families of receptors, with the tPA-dependent activation of EGFRs

reducing NMDAR signaling. By these mechanisms, sc-tPA and tc-tPA control neuronal death and survival.

Results

sc-tPA promotes and tc-tPA inhibits NMDAR signaling.

We first investigated NMDAR-induced calcium influx in the presence of either sc-tPA or tc-tPA on primary cultures of cortical neurons (Figure 1). tc-tPA was produced from human recombinant purified sc-tPA (Actilyse, see Materials and Methods, Figure 1a). sc-tPA and tc-tPA were characterized and used at equimolarity, as previously described.¹⁸ When added on neurons, sc-tPA is rapidly converted into tc-tPA (1 h), an effect increased by plasmin (5 nM). Moreover, the conversion of sc-tPA into tc-tPA is blocked by aprotinin (1 μM), an inhibitor of plasmin (Figure 1b). sc-tPA (300 nM) promoted NMDA-induced neuronal calcium influx (80% of cells potentiated; 27% of potentiation; **P*<0.0001). On the contrary, tc-tPA (300 nM) led to a significant decrease in NMDA-induced calcium influx (51% of cells inhibited; 11% of inhibition for tc-tPA 300 nM; **P*<0.0001; Figures 1c and d).

Both sc-tPA and tc-tPA can promote EGFR signaling.

Immunoblottings for phosphorylated EGFRs (phosphotyrosines 1173 and 992) revealed that, similar to EGF (50 ng/ml), both sc-tPA and tc-tPA (300 nM) can activate neuronal EGFRs (Y1173; Figures 2A–C; +82%, +47%, +34% for EGF, sc-tPA and tc-tPA *versus* control, respectively;

¹Inserm, Inserm U919, Serine Proteases and Pathophysiology of the Neurovascular Unit, University Caen Basse-Normandie, GIP Cyceron, Caen, France

*Corresponding author: D Vivien, Inserm U919, GIP Cyceron, Bvd Becquerel, BP522914074, Caen 14074, France. Tel: +33 2 31 47 01 66; Fax: +33 2 31 47 02 22; E-mail: vivien@cyceron.fr

²These authors contributed equally to this work.

Abbreviations: DIV, days *in vitro*; EGF, epidermal growth factor; GluN1, NMDA receptor subunit 1; LRP, low-density lipoprotein receptor-related protein; NMDA, *N*-methyl-D-aspartate; sc-tPA, single-chain tissue-type plasminogen activator; tc-tPA, two-chain tissue-type plasminogen activator.

Received 08.4.15; revised 27.7.15; accepted 17.8.15; Edited by A Yaron



2

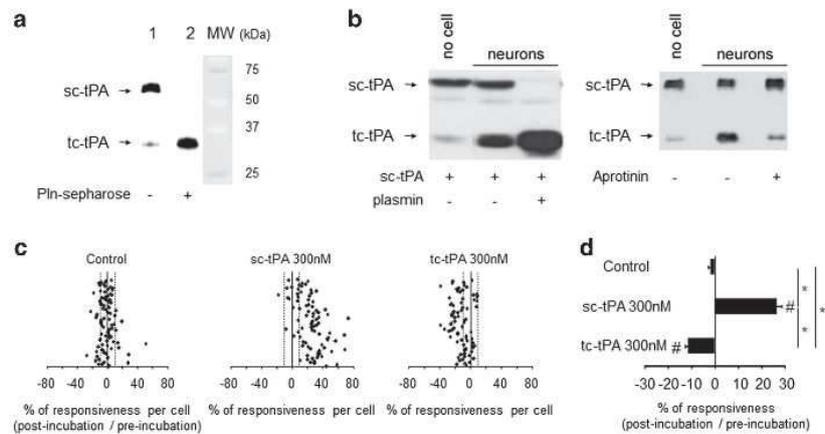


Figure 1 sc-tPA and tc-tPA differentially influence NMDAR signaling. (a) Sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) followed by immunoblotting of sc-tPA and tc-tPA prepared as described in the Materials and Methods section (100 ng per lane). (b) SDS-PAGE followed by immunoblotting of sc-tPA and tc-tPA. sc-tPA was added on cultured cortical neurons 13 DIV for 1 h either alone or in the presence of plasmin or aprotinin. (c) Calcium video imaging performed on primary cultures of cortical neurons (12 DIV). After control NMDA stimulations ($2 \times 25 \mu\text{M}$, 30 s) used as baseline, neurons were incubated for 45 min in the presence of buffer (control, $n=90$ cells), sc-tPA or tc-tPA at 300 nM (sc-tPA, $n=85$ cells; tc-tPA, $n=78$ cells) prior to a second set of NMDA stimulations ($2 \times 25 \mu\text{M}$, 30 s). Percentages of potentiation or inhibition after incubation are calculated for each cell. (d) Percentage of potentiation or inhibition after incubation for each group (mean \pm S.E.M.; * $P < 0.0001$ Kruskal–Wallis test followed by Mann–Whitney test; # $P < 0.0001$ Wilcoxon test comparison of preincubation and postincubation responses)

* $P < 0.05$ and Y992: Figures 2D–F; +56%, +74%, +52% for EGF 50 ng/ml, sc-tPA and tc-tPA versus control, respectively; * $P < 0.05$). Proximity ligation assays (Figures 2G and H) and immunoprecipitation–immunoblotting assays (Figure 2I) revealed that NMDARs (NMDA receptor subunit 1 (GluN1) subunit) form complexes with EGFRs. Interestingly, EGF led to a reduction of NMDA-induced neuronal calcium influx (57% of cells inhibited; 11% of inhibition for EGF; * $P < 0.0001$ when compared with controls; Figures 2J and K).

tPA-dependent crosstalk between NMDARs and EGFRs.

NMDAR-induced calcium influx was studied in the presence of sc-tPA and tc-tPA (300 nM) alone or in the presence of either an inhibitor of the transphosphorylation of EGFRs (AG1478) or a GluN1 antibody previously characterized to prevent tPA-induced potentiation of NMDAR signaling²³ (Figures 3 and 4). The potentiating effect of sc-tPA on NMDA-induced calcium influx (85% of cells potentiated; 25% of potentiation for sc-tPA 300 nM; * $P < 0.0001$ when compared with controls) was completely prevented by GluN1 antibody (NS when compared with controls; * $P < 0.0001$ when compared with sc-tPA alone; Figure 3a–c). In contrast, the presence of AG1478 failed to influence tPA-promoted NMDAR signaling (77% of cells potentiated; 19% of potentiation for sc-tPA 300 nM+AG1478; * $P < 0.0001$ when compared with controls and NS: not significant when compared with sc-tPA alone, Figure 3d–f). In parallel, blockage of the trans-activation of EGFRs by AG1478 (Figures 4a–c) prevented tc-tPA-dependent inhibition of NMDAR signaling (* $P < 0.0001$ considering the percentage of responsiveness for tc-tPA 300 nM alone versus tc-tPA 300 nM+AG1478; 46% versus 15% of cells inhibited in tc-tPA 300 nM and tc-tPA 300 nM+AG1478, respectively). tc-tPA-induced inhibition of NMDAR-mediated calcium influx

was not modulated by the co-application of the GluN1 antibody (54% of cells inhibited; 10% of inhibition for tc-tPA 300 nM alone compared with 59% of cells inhibited and 11% of inhibition for tc-tPA 300 nM+GluN1 antibody; * $P < 0.0001$; Figures 4d–f). Parallel experiments performed using another inhibitor of the activation of EGFR, Gefitinib (5 μM), provided the same results as observed in the presence of AG1478 (Supplementary Figure 2). Altogether, these data reveal a crosstalk between NMDAR signaling and EGFRs in which tPA-mediated EGFR activation leads to an inhibition of NMDAR signaling.

In a paradigm of NMDA-mediated excitotoxicity, only the sc-tPA promotes neuronal death. NMDA-mediated excitotoxicity was tested on primary cultures of cortical neurons subjected to NMDA exposure in the presence of sc-tPA or tc-tPA (300 nM). As expected, NMDA-induced excitotoxicity was potentiated only in the presence of sc-tPA (+47%; * $P < 0.05$; Figure 5a). Co-application of tPA stop, an inhibitor of the proteolytic activity of tPA²⁴ or the GluN1 antibody (see Figure 3) prevented the pro-excitotoxic effect of sc-tPA (* $P < 0.05$; Figures 5b and c).

In a paradigm of serum deprivation (SD)-induced apoptosis, both sc-tPA and tc-tPA are neuroprotective, an effect dependent on EGFR signaling. In a paradigm of apoptotic neuronal death induced by deprivation of trophic factors in cortical neurons, both sc-tPA and tc-tPA displayed antiapoptotic properties. Aprotinin failed to prevent the antiapoptotic effect of sc-tPA, suggesting that the antiapoptotic effect of sc-tPA is not due to its previous conversion into tc-tPA (* $P < 0.05$; Figure 6a). Blockage of the ability of tPA to promote NMDAR-induced calcium influx with the GluN1 antibody did not prevent the antiapoptotic effects of both

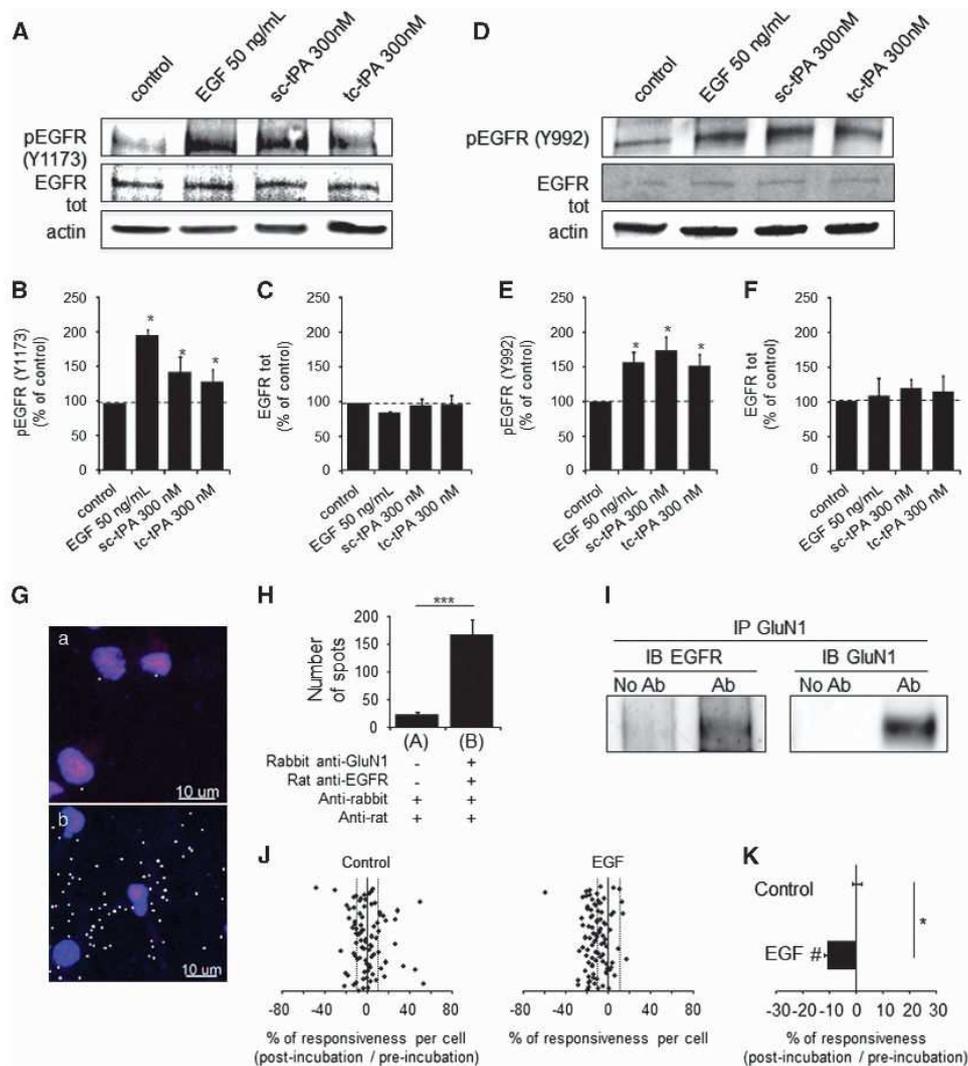


Figure 2 Both sc-tPA and tc-tPA at 300 nM can modulate EGFR signaling. (a) Representative immunoblots for phospho-EGFR (A–C: tyrosine 1173; D–F: tyrosine 992) and total EGFRs on neurons (12–13 DIV) after treatments with EGF (50 ng/ml), sc-tPA or tc-tPA (300 nM) during 15 min. (B, C, E and F) Quantifications of phosphorylated EGFRs and total EGFRs were compared with control (mean \pm S.E.M.; $N=3$ or 4 experiments; $*P<0.05$). (g) Confocal images of endogenous NMDAR–EGFR complexes in cortical neurons. (H) Quantification of NMDAR–EGFR complexes detected by Proximity Ligation Assay (PLA). $***P$ -value <0.001 ; Mann–Whitney U -test, $N=3$. (I) Cross-immunoprecipitation assays demonstrating that EGFRs and NMDARs form stable complexes in cultured neurons. (J) After two NMDA stimulations used as baseline, neurons were incubated for 45 min with buffer (control, $n=85$ cells) or EGF 50 ng/ml (EGF, $n=93$ cells) prior to a second set of NMDA stimulations. Percentages of potentiation or inhibition after incubation are calculated for each cell. (K) Percentage of potentiation or inhibition after incubation for each group (mean \pm S.E.M.; $*P<0.0001$ Kruskal–Wallis test followed by Mann–Whitney U -test; $^{\#}P<0.0001$ Wilcoxon test comparison of preincubation and postincubation responses)

sc-tPA and tc-tPA ($*P<0.05$, Figure 6b). However, blockage of the tPA-dependent transphosphorylation of EGFRs (AG1478) prevented the antiapoptotic activities of both sc-tPA and tc-tPA ($*P<0.05$, Figure 6c).

Low concentrations of sc-tPA and tc-tPA are neurotrophic, an effect mediated by a crosstalk between EGFRs and NMDARs. As it was previously reported that low concentrations of tPA may have protective effects through activation of NMDARs,²⁰ we tested lower concentrations of

sc-tPA and tc-tPA (10 nM; Figure 7) in our different paradigms. Immunoblotting for phosphorylated EGFRs revealed a sc-tPA- and tc-tPA-dependent (10 nM) activation of the EGFRs (+82 and +154% of activation for sc-tPA and tc-tPA at 10 nM, respectively; $*P<0.05$; Figures 7a–c). Parallel experiments using calcium video microscopy revealed that sc-tPA and tc-tPA (10 nM) led to an inhibition of NMDAR signaling (78 and 63% of cells inhibited; 17 and 14% of inhibition for sc-tPA and tc-tPA (10 nM), respectively; $*P<0.0001$). This inhibitory effect was blocked by the

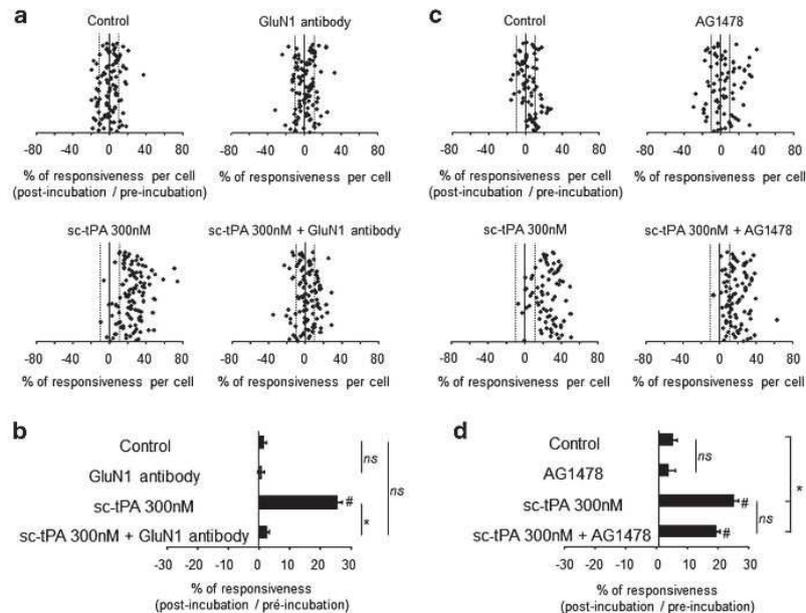


Figure 3 sc-tPA-promoted neuronal calcium influx is dependent on its interaction with NMDARs. Calcium video imaging performed on cortical neurons. (a) After two control NMDA stimulations used as baseline, neurons were incubated for 45 min in the presence of either buffer (control, $n = 104$ cells), sc-tPA at 300 nM (sc-tPA $n = 111$ cells) or GluN1 antibody at 10 $\mu\text{g/ml}$ ($n = 99$ cells) alone or in combination (sc-tPA+GluN1 antibody; $n = 109$ cells) prior to a second set of NMDA stimulations. Percentages of potentiation or inhibition after treatment are calculated for each cell. (b) Percentages of potentiation or inhibition after treatment are calculated for each cell and reported as percentages of responsiveness for each group. (c) In the same protocol, neurons were incubated for 45 min in the presence of buffer (control, $n = 75$ cells), sc-tPA at 300 nM (sc-tPA, $n = 77$ cells) or AG1478 at 5 μM (AG1478, $n = 77$ cells) alone or in combination (sc-tPA+AG1478, $n = 90$ cells) prior to a second set of NMDA stimulations ($2 \times 25 \mu\text{M}$, 30 s). (d) Percentages of responsiveness for each group (mean \pm S.E.M.; * $P < 0.0001$ Kruskal-Wallis test followed by Mann-Whitney test; # $P < 0.0001$ Wilcoxon test comparison of preincubation and postincubation responses). NS: not significant

co-application of AG1478 (3 and 11% of cells inhibited; 7 and 8% of potentiation for sc-tPA and tc-tPA at 10 nM+AG1478, respectively; * $P < 0.0001$; Figures 7d–f). As an additional control, tc-tPA at 1 nM did not influence NMDA-induced calcium influx (Supplementary Figure 1).

Although sc-tPA at 300 nM promoted NMDAR-mediated excitotoxicity, 10 nM of either sc-tPA or tc-tPA protected neurons in the same paradigm of NMDAR-mediated excitotoxicity (–65% of excitotoxic death for sc-tPA, –60% for tc-tPA 10 nM; * $P < 0.05$, Figure 7g). Interestingly, blockage of the transphosphorylation of EGFRs (AG1478; Figure 7g) reversed these neuroprotective actions of sc-tPA and tc-tPA. As expected, both sc-tPA and tc-tPA displayed antiapoptotic properties even at low concentrations (–59% of apoptotic death at 300 nM and –35% at 10 nM; * $P < 0.05$; Figure 7h).

Altogether, these data demonstrate that although direct activation of NMDARs by sc-tPA at high concentrations led to a pro-excitotoxic effect dependent of its proteolytic activity, lower concentrations of both sc-tPA and tc-tPA are antiexcitotoxic by a mechanism involving an EGFR-dependent downregulation of NMDAR signaling independently of their proteolytic activity. Our data also evidence that both sc-tPA and tc-tPA display antiapoptotic functions through a mechanism involving a direct activation of EGFRs and this independently of NMDARs (Figure 8).

Discussion

We propose here a new scheme of the mechanisms through which tPA controls neuronal survival. We show that both conformations (sc-tPA and tc-tPA) have a neurotrophic effect by the activation of EGFRs. EGFRs can complex to NMDARs at the neuronal surface, orchestrating an original tPA-dependent crosstalk between both receptors, leading to a downregulation of NMDAR signaling and subsequent neurotrophic effects. However, when present at high concentration (300 nM), the sc-tPA promotes NMDAR signaling leading to an increased neuronal death, hiding the neurotrophic effects of lower concentrations of tPA.

tPA-driven control of neuronal fate could also depend on the different subtypes of NMDAR subunits involved, as well as on the location of the receptors (synaptic *versus* extrasynaptic). Specifically, exogenous tPA can not only promote neurotoxicity on cortical neurons by activating extrasynaptic GluN2D-containing NMDARs²⁵ but can also activate synaptic GluN2A-containing NMDARs, leading to a neuroprotective effect.¹⁹ Alternatively, the neurotoxic *versus* neuroprotective effects of tPA may reflect different effects of endogenous *versus* exogenous tPA or of chronic *versus* acute treatments. Thus, as previously suggested,²⁰ our present data show that tPA may have opposite effects depending on its concentration, with the low concentrations that are protective and the higher concentrations of sc-tPA that are deleterious. In addition, we

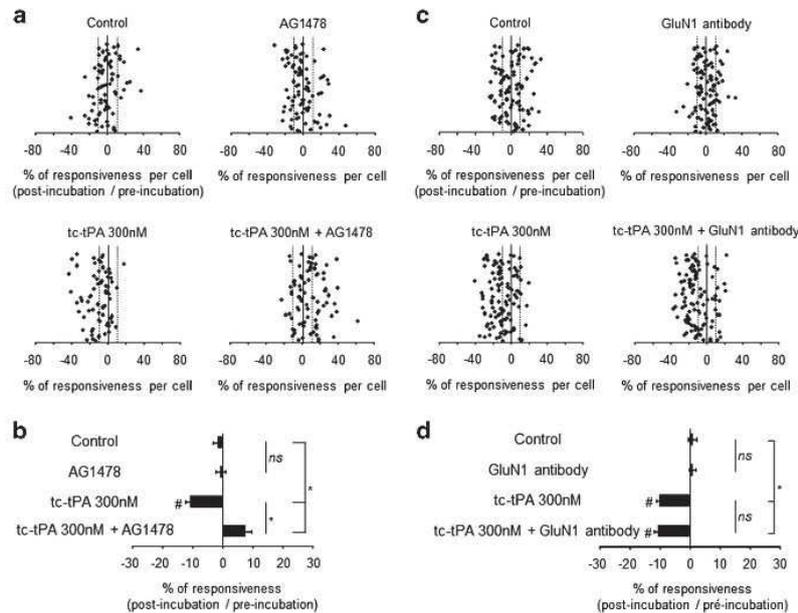


Figure 4 AG1478 reverses the inhibitory effect of tc-tPA on NMDAR signaling independently of its interaction with NMDARs. (a) After two NMDA stimulations used as baseline, neurons were incubated for 45 min in the presence of buffer (control, $n = 74$ cells), AG1478 at $5 \mu\text{M}$ (AG1478, $n = 84$ cells) or tc-tPA at 300 nM alone or in combination (tc-tPA, $n = 70$ cells; tc-tPA+AG1478, $n = 81$ cells) prior to a second set of NMDA stimulations. Percentages of potentiation or inhibition after incubation are calculated for each cell. (b) Percentages of potentiation or inhibition after incubation are calculated for each individual cell and reported as percentages of responsiveness for each group. (c) In the same protocol, neurons were incubated for 45 min in the presence of buffer (control, $n = 99$ cells), GluN1 antibody at $10 \mu\text{g/ml}$ (GluN1 antibody, $n = 99$ cells) or tc-tPA at 300 nM either alone or in combination (tc-tPA 300 nM $n = 103$ cells, tc-tPA+GluN1 antibody $n = 106$ cells) prior to a second set of NMDA stimulations ($2 \times 25 \mu\text{M}$, 30 s). (d) Percentages of potentiation or inhibition after incubation are calculated for each individual cell and reported as percentages of responsiveness for each group (mean \pm S.E.M.; $*P < 0.0001$, Kruskal–Wallis test followed by Mann–Whitney test; $\#P < 0.0001$ Wilcoxon test of comparison of preincubation and postincubation responses). NS: not significant

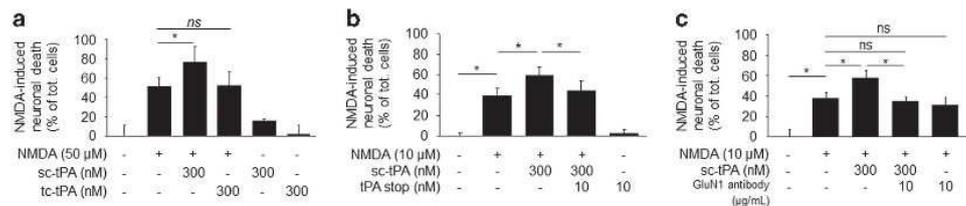


Figure 5 Only high concentrations of active sc-tPA promote excitotoxicity. (a) Cortical neurons (12–13 DIV) were exposed for 1 h to NMDA ($50 \mu\text{M}$) in the presence of sc-tPA or tc-tPA. Neuronal death was quantified 24 h later. (b and c) Same experiments as in panel (a) were performed with neurons exposed for 24 h to NMDA ($10 \mu\text{M}$) in the presence of sc-tPA alone or in combination with tPA stop (10 nM , b) or GluN1 antibody ($10 \mu\text{g/ml}$, c). (mean \pm S.E.M.; $n = 3$ experiments; 4 wells per condition; $*P < 0.05$, NS: not significant, Kruskal–Wallis test followed by Mann–Whitney test)

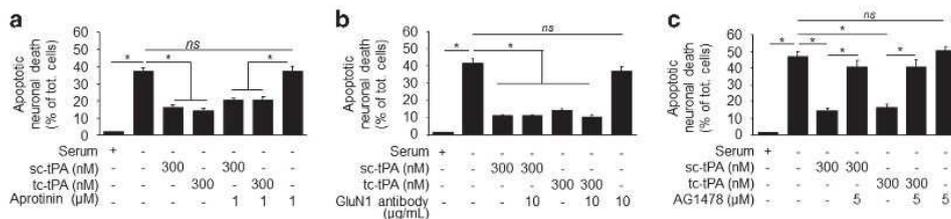


Figure 6 Both sc-tPA and tc-tPA rescue neurons from serum deprivation-induced apoptosis. (a) Neuronal death measured after a 24-h exposure to serum deprivation (SD) alone or in the presence of sc-tPA or tc-tPA at 300 nM alone or plus aprotinin ($1 \mu\text{M}$; mean \pm S.E.M.; $n = 3$ experiments; $*P < 0.05$). (b and c) Neuronal death measured after a 24-h exposure to SD alone or in the presence of sc-tPA or tc-tPA plus GluN1 antibody ($10 \mu\text{g/ml}$; b) or AG1478 ($5 \mu\text{M}$; c) (mean \pm S.E.M.; $n = 3$ experiments; 4 wells per condition; $*P < 0.05$, NS: not significant, Kruskal–Wallis test followed by Mann–Whitney test)

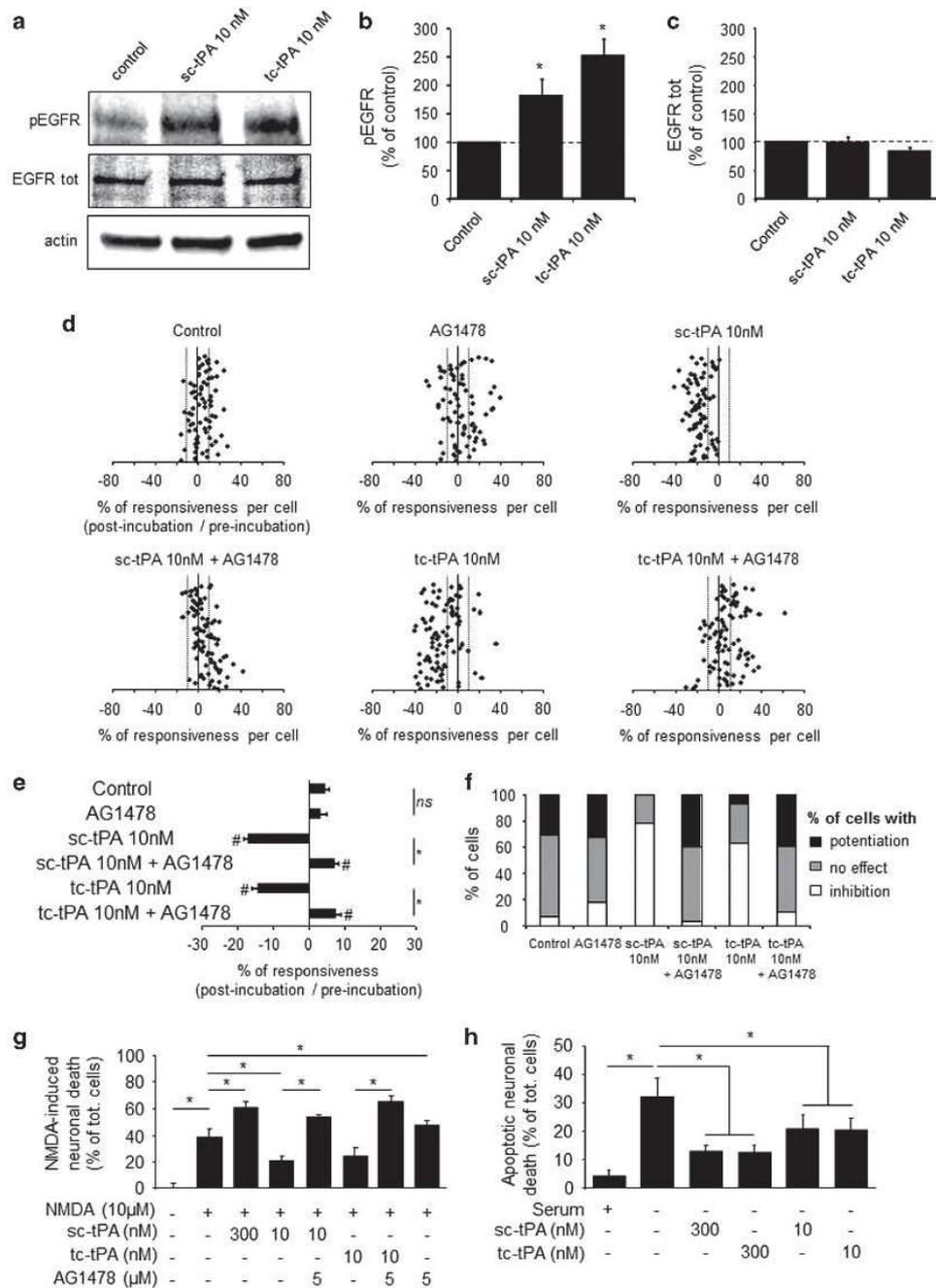


Figure 7 Both sc-tPA and tc-tPA at 10 nM promote EGFR signaling and are neuroprotective. (a) Representative immunoblots for phospho-EGFR (tyrosine 1173) and total EGFR on neurons after treatments with sc-tPA and tc-tPA (10 nM) during 15 min. (b and c) Quantification of phosphorylated EGFRs and total EGFRs compared with the control condition ($n = 3$ experiments; $^*P < 0.05$). (d) After two NMDA stimulations used as baseline, neurons were incubated for 45 min in the presence of buffer (control, $n = 75$ cells), AG1478 at 5 μ M ($n = 77$ cells), sc-tPA (10 nM) alone or in combination with AG1478 (sc-tPA, $n = 78$ cells; sc-tPA+AG1478, $n = 83$ cells) or tc-tPA (10 nM) alone or in combination with AG1478 (tc-tPA, $n = 92$ cells; tc-tPA+AG1478, $n = 92$ cells) prior to a second set of NMDA stimulations. Percentages of potentiation or inhibition after incubation are calculated for each cell. (e) Percentages of responsiveness for each group (mean \pm S.E.M.; $^*P < 0.0001$ Kruskal–Wallis test followed by Mann–Whitney test; $^{\#}P < 0.0001$ Wilcoxon test comparison of preincubation and postincubation responses). (f) Percentages of cells either potentiated, inhibited or without effect for each group. (g) Cortical neurons were subjected to 24-h exposure to NMDA (10 μ M) in the presence of either sc-tPA or tc-tPA (10 nM) alone or in combination with AG1478 (5 μ M; $n = 3$ experiments; 4 wells per condition; $^*P < 0.05$, NS: not significant; Kruskal–Wallis test followed by Mann–Whitney test). (h) Neuronal death measured after a 24-h exposure to either serum deprivation (SD) alone or in the presence of either sc-tPA or tc-tPA at 300 or 10 nM ($n = 3$ experiments; 4 wells per condition experiments; $^*P < 0.05$, NS: not significant; Kruskal–Wallis test followed by Mann–Whitney test, mean \pm S.E.M.).

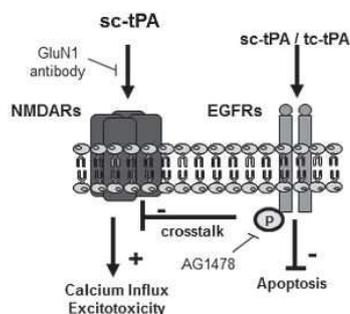


Figure 8 tPA-dependent crosstalk between EGFRs and NMDARs. sc-tPA-induced potentiation of NMDAR signaling and subsequent neurotoxicity, inhibited by GluN1 antibody. tPA also promotes EGFR signaling and subsequent antiapoptotic effects, independently of its conformation (sc-tPA and tc-tPA), an effect occurring even at low concentrations (down to 10 nM) and inhibited by AG-1478, an inhibitor of EGFR transphosphorylation. tPA-dependent activation of EGFRs leads to downregulation of NMDAR signaling and subsequent neurotrophic effects

propose here that tPA may differentially influence neuronal fate and signaling pathways as a function of its conformation with sc-tPA and tc-tPA.

Endogenous tPA is produced and released under its single chain-form (sc-tPA)²⁶ and is 90% present under its single-chain form in Alteplase when used for thrombolysis (see Figure 1b, lane no cell). When released, it can be rapidly converted into its two-chain form (tc-tPA) by plasmin^{26,27} present at the cell surface or in solution. Thus endogenous plasmin may directly influence the sc-tPA/tc-tPA ratio. It is now well admitted that the tPA-mediated potentiation of NMDAR signaling is dependent on its proteolytic activity.^{15,17} However, both plasmin-dependent and plasmin-independent mechanisms have been reported.^{15,17,28} Here we demonstrate that potentiation of NMDAR signaling and subsequent neurotoxicity is a phenomenon restricted to sc-tPA and dependent of proteolytic activity. Whether tPA would require low-density lipoprotein receptor-related protein (LRP) or not in order to enhance NMDAR signals could depend on the type of neurons, their state of maturation or the presence of astrocytes in cultures.^{17,29}

Several *in vitro* studies reported antiapoptotic effects of tPA on neurons^{9,10} and oligodendrocytes.²² In agreement with our data, despite the heterogeneity of the toxic paradigms used, they all show that this trophic function of tPA occurs independently of its proteolytic activity. Two candidates have been proposed as the receptors mediating the antiapoptotic effects of tPA: Annexin II and EGFRs.^{10,22} For instance, tPA can bind EGFRs on oligodendrocytes through its EGF-like domain, induces phosphorylation of EGFRs and subsequent signaling pathways, leading to antiapoptotic effects. We evidenced here that both sc-tPA and tc-tPA are antiapoptotic in neurons through a mechanism involving a EGFR-dependent pathway.

Accordingly, data from studies in transgenic mice over-expressing tPA in neurons (T4 mice) suggested that tPA can have neuroprotective effects.^{19,20} In one of these studies, the authors propose a mechanism that is dependent of the activation of NMDARs and independent on plasmin. It is

interesting to note that, in our hands, the tPA-dependent activation of EGFRs led to a reduced NMDAR-mediated calcium influx. These data unmask a tPA-dependent crosstalk between NMDARs and EGFRs, with NMDAR and EGFR that can form complexes. Similarly, in PC-12 cells (pheochromocytoma cells) tPA was reported to control a crosstalk between NMDARs and Trk receptors, a mechanism that involves LRP1 and that is differentially controlled by the dose of tPA.³⁰

In conclusion, our present study provides information that help to understand how tPA can positively or negatively control neuronal fate.

Materials and Methods

Experimental procedures. Experiments were carried out in accordance with the European Communities Council Directive (86/609/EEC) and were approved by the local ethical committee.

Chemicals. NMDA, (+)5-methyl-10,11-dihydro-5H-dibenzo(a,d)cyclopentaen-5,10-imine maleate (MK801) and *N*-(3-Chlorophenyl)-6,7-dimethoxy-4-quinazolinamine hydrochloride (AG1478) were purchased from Tocris (Bristol, United Kingdom). 2,7-Bis-(4-amidinobenzylidene)-cycloheptanone-1-dihydrochloride salt (tPA-stop) was purchased from American Diagnostica (Stamford, CT, USA). Trasylol (aprotinin) was a gift from Bayer HealthCare AG. Iressa (Gefitinib) was purchased from Selleckchem (Houston, TX, USA). 6-Aminocaproic acid, ascorbic acid, bFGF, Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM), HEPES buffer solution, hydrocortisone, poly-D-lysine, cytosine β -D-arabinoside, Arginine, Tween-80, phosphoric acid and 0.4% Trypan Blue Solution, fetal bovine serum and horse serum were from Sigma-Aldrich (L'Isle d'Abeau, France). CNBr-activated Sepharose 4B was from GE Healthcare (Orsay, France). Plasmin was prepared as described.³⁰ Laminin, lipid concentrate and penicillin-streptomycin were purchased from Invitrogen (Cergy Pontoise, France). Endothelial cell basal medium (EBM-2) was purchased from Lonza (Levallois, France).

Sources of tPA. A human recombinant tPA purified from Chinese Hamster Ovary cells (Actilyse, >95% single-chain) was used as single chain tPA (sc-tPA). Two-chain tPA (tc-tPA) was prepared by overnight incubation of sc-tPA with plasmin-coupled Sepharose 4B at 37 °C, followed by a 2 h incubation with immobilized aprotinin to eliminate traces of free plasmin. Both sc-tPA and tc-tPA were dialyzed in a vehicle containing 0.5 M ammonium bicarbonate for neurotoxicity studies or in the Actilyse buffer (arginine, phosphoric acid and Tween-80) for video calcium imaging. Finally, both sc-tPA and tc-tPA were characterized as we previously described.¹⁸

Neuronal cell cultures. Culture of cortical neurons were prepared from fetal mice (E14-15) as previously described.²⁵ Cytosine β -D-arabinoside (10 μ M) was added after 3 days *in vitro* (DIV) to inhibit glial proliferation. Various treatments were performed either after 7 DIV for apoptotic paradigms or 12–13 DIV for NMDA-mediated neurotoxicity assays, calcium imaging experiments and immunoblottings.

tPA and EGFR immunoblottings. tPA immunoblottings were performed using a polyclonal goat antibody (Santa Cruz Biotechnology – sc5239; 1:1000, Heidelberg, Germany) followed by incubation with the appropriate peroxidase-conjugated secondary antibody. Phospho EGFR (Tyr 1173), total EGFR and actin immunoblottings were performed using a polyclonal rabbit antibody (Cell Signaling – 4407; 1:1000, Leiden, The Netherlands), a polyclonal rabbit antibody (Cell Signaling – 4267; 1:1000) and a polyclonal rabbit antibody (Sigma Aldrich – A2066.2 ml; 1:1000), respectively, followed by incubation with the appropriate peroxidase-conjugated secondary antibody. Immunoblots were revealed with an enhanced chemoluminescence ECL2 immunoblotting detection system (Fisher Scientific, Illkirch, France) and imaged in an ImageQuant LAS 4000 Device (GE Healthcare, Orsay, France).

Proximity ligation assay. The proximity ligation assay was performed using the Duolink *In Situ* Kit (Olink Bioscience, Uppsala, Sweden) according to the manufacturer's instructions with the following modifications: PLA probe incubation was of 2 h; amplification step was extended to 2 h. Blocking (1 h at room temperature) and primary antibody (overnight at 4 °C) incubations were performed in a 4% bovine serum albumin (Sigma Aldrich) and 0.2% Triton X-100 solution.



Rabbit anti-GluN1 (ab17345, Abcam, Cambridge, MA, USA) and rat anti-EGFR (ab231, Abcam) were diluted (1:2000 and 1:100, respectively) in the blocking solution. The anti-rabbit (+) PLA probe (1:5) along with an anti-rat (-) probe (1:100) were diluted in the blocking solution. A Goat anti-rat (Jackson ImmunoResearch Inc., Suffolk, UK) were used to make a probe anti-rat according to the manufacturer's instructions using the Duolink Probemaker (Olink Bioscience). Slides were mounted in a mounting medium containing DAPI (4',6-diamidino-2-phenylindole) and 0.1% deparaphenylene-diamine diluted in phosphate-buffered saline and glycerin. The negative control represents the PLA without the primary antibodies.

Ten stack of picture (0.40 μm per section) were taken from 10 different areas of every well with a confocal microscope (Leica SP5, Leica, Nanterre, France). Punctas were counted manually using a z projection of the stack.

Crossed immunoprecipitation assays. Supernatants from TNT buffer (50 mM Tris-HCl, pH 7.4, 150 mM NaCl and 0.5% Triton X-100)-lysed cultured cortical neurons (12 DIV) (500 μg of total proteins) were incubated overnight at 4 °C with an antibody raised against the C-terminal end of the GluN1 subunit of NMDAR (2 μg , Santa Cruz Biotechnology – sc1467) and then coupled to protein G-sepharose beads as described by the manufacturer (GE Healthcare) for immunoprecipitation procedures. Then immunoprecipitated proteins were separated by 7.5% SDS-PAGE, and immunoblots were revealed with either an antibody raised against total EGFRs (Cell Signaling – 4267; 1:1000) or an antibody targeting the C-terminal end of the GluN1 subunit of NMDARs (Santa Cruz Biotechnology – sc1467; 1:250) by following the procedure described above (see 'tPA and EGFR immunoblotting' section).

Calcium video microscopy. Experiments were performed at room temperature on the stage of a Leica DMI6000B inverted microscope (Leica) equipped with a 150W Xenon high stability lamp and a Leica $\times 40$, 1.3 numerical aperture epifluorescence oil immersion objective. Fura-2 ratio images were acquired with a Digital CMOS camera (Hamamatsu, Massy, France; ORCA-Flash2.8 C11440-10C) and digitized (2048 \times 2048) using the Metafluor 6.1 software (Universal Imaging Corporation, Downingtown, PA, USA). Cell cultures were transferred into a serum-free medium (HBBSS) and loaded with 10 μM fura-2 AM (Invitrogen) for 45 min at 37 °C. Neurons were washed, and NMDA treatment (25 μM for 30 s) was applied using a peristaltic pump as baseline. Prior a second run of NMDA stimulations, neurons were incubated for 45 min with sc-tPA and tc-tPA alone or in the presence of either AG1478 (a blocker of the transphosphorylation of EGFRs) or an antibody targeting the N-terminal end of the GluN1 subunit of NMDA receptor (GluN1 antibody) previously characterized to prevent tPA-NMDAR interaction.²³ A mean value of potentiation or inhibition was also measured, including all the recorded cells.

Excitotoxic neuronal death. Excitotoxicity was induced by exposure of cortical neurons to 50 μM NMDA for 1 h or to 10 μM of NMDA for 24 h in serum-free DMEM supplemented with 10 μM of glycine at 12 DIV and performed as previously described.^{25,31} The relative amount of tPA bound to cells was assessed by western blotting.

Induction of apoptosis. SD was induced by exposing neuronal cultures (7 DIV) to a serum-free DMEM supplemented with 10 μM of glycine (+MK-801 at 10 μM to prevent secondary excitotoxicity) and characterized as previously described.^{31,32} The percentage of neuronal death was determined as the number of trypan blue-positive neurons after SD compared with the total number of neurons.

Statistical analysis. For calcium video microscopy with neurons (Figures 1,2), Shapiro test were used followed by Wilcoxon test to compare preincubation and postincubation responsiveness. Significance levels were defined as # $P < 0.0001$. In addition, for group comparison, Kruskal-Wallis tests were used, followed by Mann-Whitney U -tests as *post-hoc* tests. Significance levels were defined as * $P < 0.0001$. Other statistical analyses were performed by the two-tailed Kruskal-Wallis' test, followed by *post-hoc* comparisons with the two-tailed Mann-Whitney's test.

Conflict of Interest

The authors declare no conflict of interest.

Acknowledgements. This work was supported by grants from the INSERM (French National Institute for Health and Medical Research), the University of Caen-Basse Normandie, TC2N (Trans Channel Neuroscience Network) and the Regional Council of Lower Normandy. We thank Professor Carine Ali for review of this manuscript.

1. Thorsen S, Glas-Greenwalt P, Astrup T. Differences in the binding to fibrin of urokinase and tissue plasminogen activator. *Thromb Diath Haemorrh* 1972; **28**: 65–74.
2. Polavarapu R, Gongora MC, Yi H, Ranganathan S, Lawrence D, Strickland D et al. Tissue-type plasminogen activator-mediated shedding of astrocytic low-density lipoprotein receptor-related protein increases the permeability of the neurovascular unit. *Blood* 2007; **109**: 3270–3278.
3. Tsirka SE, Rogove AD, Bugge TH, Degen JL, Strickland S. An extracellular proteolytic cascade promotes neuronal degeneration in the mouse hippocampus. *J Neurosci* 1997; **17**: 543–552.
4. Shin CY, Kundel M, Wells DG. Rapid, activity-induced increase in tissue plasminogen activator is mediated by metabotropic glutamate receptor-dependent mRNA translation. *J Neurosci* 2004; **24**: 9425–9433.
5. Gorter JA, Van Vliet EA, Rauwerda H, Breit T, Stad R, van Schaik L et al. Dynamic changes of proteases and protease inhibitors revealed by microarray analysis in CA3 and entorhinal cortex during epileptogenesis in the rat. *Epilepsia* 2007; **48**: 53–64.
6. Rajapakse S, Ogiwara K, Takano N, Moriyama A, Takahashi T. Biochemical characterization of human kallikrein 8 and its possible involvement in the degradation of extracellular matrix proteins. *FEBS Lett* 2005; **579**: 6879–6884.
7. Rijken DC, Hoylaerts M, Collen D. Fibrinolytic properties of one-chain and two-chain human extrinsic (tissue-type) plasminogen activator. *J Biol Chem* 1982; **257**: 2920–2925.
8. Baranes D, Lederfein D, Huang Y, Chen M, Bailey CH, Kandel ER. Tissue plasminogen activator contributes to the late phase of LTP and to synaptic growth in the hippocampal mossy fiber pathway. *Neuron* 1998; **21**: 813–825.
9. Liot G, Roussel BD, Lebeurrier N, Benchenane K, López-Atalaya JP, Vivien D et al. Tissue-type plasminogen activator rescues neurons from serum deprivation-induced apoptosis through a mechanism independent of its proteolytic activity. *J Neurochem* 2006; **98**: 1458–1464.
10. Lee H-Y, Hwang I-Y, Im H, Koh J-Y, Kim Y-H. Non-proteolytic neurotrophic effects of tissue plasminogen activator on cultured mouse cerebrotal neurons. *J Neurochem* 2007; **101**: 1236–1247.
11. Pittman RN, Ivins JK, Buettner HM. Neuronal plasminogen activators: cell surface binding sites and involvement in neurite outgrowth. *J Neurosci* 1989; **9**: 4269–4286.
12. Seeds NW, Basham ME, Haffke SP. Neuronal migration is retarded in mice lacking the tissue plasminogen activator gene. *Proc Natl Acad Sci USA* 1999; **96**: 14118–14123.
13. Kim Y. Nonproteolytic neuroprotection by human recombinant tissue plasminogen activator. *Science* 1999; **284**: 647–650.
14. Henry VJ, Lecointre M, Laudenbach V, Ali C, Macrez R, Julienne A et al. High t-PA release by neonate brain microvascular endothelial cells under glutamate exposure affects neuronal fate. *Neurobiol Dis* 2013; **50**: 201–208.
15. Nicole O, Docagne F, Ali C, Margall I, Carmeliet P, MacKenzie ET et al. The proteolytic activity of tissue-plasminogen activator enhances NMDA receptor-mediated signaling. *Nat Med* 2001; **7**: 59–64.
16. Wang Y, Tsirka S, Strickland S, Stieg P, Soriano S, Lipton S. Tissue plasminogen activator (tPA) increases neuronal damage after focal cerebral ischemia in wild-type and tPA-deficient mice. *Nat Med* 1998; **4**: 228–231.
17. Samson AL, Nevin ST, Croucher D, Niego B, Daniel PB, Weiss TW et al. Tissue-type plasminogen activator requires a co-receptor to enhance NMDA receptor function. *J Neurochem* 2008; **107**: 1091–1101.
18. Parcq J, Bertrand T, Montagne A, Baron AF, Macrez R, Billard JM et al. Unveiling an exceptional zymogen: the single-chain form of tPA is a selective activator of NMDA receptor-dependent signaling and neurotoxicity. *Cell Death Differ* 2012; **19**: 1983–1991.
19. Wu F, Echeverry R, Wu J, An J, Haile WB, Cooper DS et al. Tissue-type plasminogen activator protects neurons from excitotoxin-induced cell death via activation of the ERK1/2-CREB-ATF3 signaling pathway. *Mol Cell Neurosci* 2013; **52**: 9–19.
20. Wu F, Wu J, Nicholson AD, Echeverry R, Haile WB, Catano M et al. Tissue-type plasminogen activator regulates the neuronal uptake of glucose in the ischemic brain. *J Neurosci* 2012; **32**: 9848–9858.
21. Haile WB, Wu J, Echeverry R, Wu F, An J, Yepes M. Tissue-type plasminogen activator has a neuroprotective effect in the ischemic brain mediated by neuronal TNF- α . *J Cereb Blood Flow Metab* 2012; **32**: 57–69.
22. Corea F, Gauberti M, Parcq J, Macrez R, Hommet Y, Obiang P et al. Tissue plasminogen activator prevents white matter damage following stroke. *J Exp Med* 2011; **208**: 1229–1238.
23. Macrez R, Obiang P, Gauberti M, Roussel B, Baron A, Parcq J et al. Antibodies preventing the interaction of tissue-type plasminogen activator with N-methyl-D-aspartate receptors reduce stroke damages and extend the therapeutic window of thrombolysis. *Stroke* 2011; **42**: 2315–2322.

24. Liot G, Benchenane K, Léveillé F, López-Atalaya JP, Fernández-Monreal M, Ruocco A *et al.* 2,7-Bis-(4-amidinobenzylidene)-cycloheptan-1-one dihydrochloride, tPA stop, prevents tPA-enhanced excitotoxicity both in vitro and in vivo. *J Cereb Blood Flow Metab* 2004; **24**: 1153–1159.
25. Baron A, Montagne A, Cassé F, Launay S, Maubert E, Ali C *et al.* NR2D-containing NMDA receptors mediate tissue plasminogen activator-promoted neuronal excitotoxicity. *Cell Death Differ* 2010; **17**: 860–871.
26. Rijken DC, Collen D. Purification and characterization of the plasminogen activator secreted by human melanoma cells in culture. *J Biol Chem* 1981; **256**: 7035–7041.
27. Wallén P, Pohl G, Bergsdorf N, Rånby M, Ny T, Jörnwall H. Purification and characterization of a melanoma cell plasminogen activator. *Eur J Biochem* 1983; **132**: 681–686.
28. Reddrop C, Moldrich RX, Beart PM, Farso M, Liberatore GT, Howells DW *et al.* Vampire bat salivary plasminogen activator (desmoteplase) inhibits tissue-type plasminogen activator-induced potentiation of excitotoxic injury. *Stroke* 2005; **36**: 1241–1246.
29. Mantuano E, Lam MS, Gonias SL. LRP1 assembles unique co-receptor systems to initiate cell-signaling in response to tissue-type plasminogen activator and myelin-associated glycoprotein. *J Biol Chem* 2013; **288**: 34009–34018.
30. Fleury V, Angles-Cano E. Characterization of the binding of plasminogen to fibrin surfaces: the role of carboxy-terminal lysines. *Biochemistry* 1991; **30**: 7630–7638.
31. Nicole O, Ali C, Docagne F, Plawinski L, MacKenzie ET, Vivien D *et al.* Neuroprotection mediated by glial cell line-derived neurotrophic factor: involvement of a reduction of NMDA-induced calcium influx by the mitogen-activated protein kinase pathway. *J Neurosci* 2001; **21**: 3024–3033.
32. Koh JY, Gwag BJ, Lobner D, Choi DW. Potentiated necrosis of cultured cortical neurons by neurotrophins. *Science* 1995; **268**: 573–575.

tPA-dependent crosstalk between NMDAR and EGFR
T Bertrand *et al*



9



Cell Death and Disease is an open-access journal published by **Nature Publishing Group**. This work is licensed under a **Creative Commons Attribution 4.0 International License**. The images or other third party material in this article are included in the article's Creative Commons license, unless indicated otherwise in the credit line; if the material is not included under the Creative Commons license, users will need to obtain permission from the license holder to reproduce the material. To view a copy of this license, visit <http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>

Supplementary Information accompanies this paper on Cell Death and Disease website (<http://www.nature.com/cddis>)

Article 4: Tissue plasminogen activator induces neuronal death by raising surface dynamics of extrasynaptic NMDA receptors.

L'activateur tissulaire du plasminogène induit la mort neuronale en augmentant la dynamique de surface des récepteurs NMDA extra-synaptiques.

Publié dans : *Cell Death Disease*

Contexte bibliographique :

Les récepteurs NMDA sont des récepteurs au glutamate de type ionotropique, ils sont composés de deux sous-unités GluN1 et de deux sous-unités GluN2 (A, B, C ou D). La partie extracellulaire des récepteurs NMDA est composée d'un domaine amino-terminal (NTD). Les récepteurs NMDA sont impliqués dans de nombreuses fonctions dans le SNC dont la plasticité synaptique et l'excitotoxicité. Ces fonctions sont influencées par la composition en sous-unités mais également par la localisation de ces récepteurs (synaptique *versus* extra synaptique). De plus, ces récepteurs peuvent passer du compartiment synaptique vers le compartiment extra synaptique et inversement. L'activateur tissulaire du plasminogène est une sérine protéase présente dans le parenchyme cérébral où elle est impliquée dans de nombreux processus tels que la plasticité synaptique, l'apoptose ou l'excitotoxicité. Elle peut être synthétisée et sécrétée par les neurones. Le tPA est capable d'interagir avec le domaine NTD de la sous unité GluN1 des récepteurs NMDA *via* ses domaines sérine protéase et kringle 2, provoquant une augmentation de l'entrée de calcium dans la cellule.

Objectifs de l'étude :

Le but de cette étude était de regarder l'influence du tPA sur la dynamique de surface des récepteurs NMDA, *via* la technique de Quantum dot (suivi de molécules uniques), mais également leur signalisation. De plus, nous avons caractérisé l'interaction du tPA avec les récepteurs NMDA grâce au développement d'un anticorps monoclonal capable de bloquer les effets potentialisateur du tPA sur les récepteurs NMDA.

Principaux résultats :

- ✓ Le tPA augmente la dynamique de surface des récepteurs NMDA extra-synaptiques mais pas celle des récepteurs synaptiques ;
- ✓ Le regroupement des récepteurs NMDA extra-synaptiques, *via* l'augmentation de la dynamique de surface, provoque une augmentation de la signalisation de ces récepteurs ;
- ✓ L'inhibition de l'interaction entre le tPA et les récepteurs NMDA, *via* un anticorps, empêche la potentialisation de l'influx calcique mais diminue également la dynamique de surface de ces récepteurs ;
- ✓ L'inhibition de l'interaction tPA/NMDA réduit la mort neuronale de type excitotoxique *in vitro* et *in vivo*.

OPEN

Citation: *Cell Death and Disease* (2016) 7, e2466; doi:10.1038/cddis.2016.279
Official journal of the Cell Death Differentiation Association

www.nature.com/cddis

Tissue-type plasminogen activator controls neuronal death by raising surface dynamics of extrasynaptic NMDA receptors

Flavie Lesept¹, Arnaud Chevilly^{1,6}, Julie Jezequel^{2,3,6}, Laurent Ladépêche^{2,3}, Richard Macrez¹, Margaux Aimable¹, Sophie Lenoir¹, Thomas Bertrand¹, Laëtitia Rubrecht⁴, Pascale Galea⁴, Laurent Lebouvier¹, Karl-Uwe Petersen⁵, Yannick Hommet¹, Eric Maubert¹, Carine Ali¹, Laurent Groc^{2,3} and Denis Vivien^{4,1}

N-methyl-D-aspartate receptors (NMDARs) are ion channels whose synaptic *versus* extrasynaptic localization critically influences their functions. This distribution of NMDARs is highly dependent on their lateral diffusion at the cell membrane. Each obligatory subunit of NMDARs (GluN1 and GluN2) contains two extracellular clamshell-like domains with an agonist-binding domain and a distal N-terminal domain (NTD). To date, the roles and dynamics of the NTD of the GluN1 subunit in NMDAR allosteric signaling remain poorly understood. Using single nanoparticle tracking in mouse neurons, we demonstrate that the extracellular neuronal protease tissue-type plasminogen activator (tPA), well known to have a role in the synaptic plasticity and neuronal survival, leads to a selective increase of the surface dynamics and subsequent diffusion of extrasynaptic NMDARs. This process explains the previously reported ability of tPA to promote NMDAR-mediated calcium influx. In parallel, we developed a monoclonal antibody capable of specifically blocking the interaction of tPA with the NTD of the GluN1 subunit of NMDAR. Using this original approach, we demonstrate that the tPA binds the NTD of the GluN1 subunit at a lysine in position 178. Accordingly, when applied to mouse neurons, our selected antibody (named GluNomab) leads to a selective reduction of the tPA-mediated surface dynamics of extrasynaptic NMDARs, subsequent signaling and neurotoxicity, both *in vitro* and *in vivo*. Altogether, we demonstrate that the tPA is a ligand of the NTD of the obligatory GluN1 subunit of NMDAR acting as a modulator of their dynamic distribution at the neuronal surface and subsequent signaling.

Cell Death and Disease (2016) 7, e2466; doi:10.1038/cddis.2016.279; published online 10 November 2016

N-methyl-D-aspartate receptors (NMDARs) are tetrameric assemblies of dimers of GluN1 and GluN2 (GluN2A-D) subunits (possibly GluN3A-B). Their extracellular region forms a massive protrusion composed of eight clamshell-like domains arranged in two layers: a distal N-terminal domain (NTD) layer and a layer of four agonist-binding domains (ABDs) directly connected to the transmembrane domain (TMD).¹ Subunit composition and synaptic *versus* extrasynaptic localization critically influence NMDAR functions.² Synaptic *versus* extrasynaptic distribution of NMDARs is highly dependent on their lateral diffusion at the cell membrane.^{3–5} It is interesting to note that this diffusion can be modulated by extracellular factors such as matrix metalloproteases or co-agonists.^{6–8} In cortical and hippocampal areas, NMDARs are principally composed of GluN1 subunits that are associated with GluN2A and GluN2B.⁹ In contrast to GluN2 subunit NTDs,¹⁰ less is known about the obligatory role and dynamics of the NTD of the GluN1 subunit (GluN1 NTD) in NMDAR allosteric signaling. A recent work by Zhu *et al.*¹⁰

show that GluN1 NTD is highly mobile and actively participates in defining the gating and pharmacological profile of NMDARs. These data suggested that any ligand that binds GluN1 NTD may stabilize its opened or closed conformations and thus act as a positive, or negative, allosteric modulator of NMDAR.

Tissue-type plasminogen activator (tPA), a serine protease of 69 kDa, is expressed in most organs, including the brain and the spinal cord.^{11–14} It consists of five different functional domains through which it interacts with various substrates, binding proteins and receptors.^{15,16} In the central nervous system (CNS), tPA can be synthesized and released by virtually all cell types. This neuromodulator displays an array of important functions, which are involved in synaptic plasticity,¹⁷ learning and memory processes,^{18,19} anxiety²⁰ and neuronal survival or death.^{14,21–23} Although previous studies demonstrated that tPA was a modulator of NMDARs signaling through a possible interaction with the GluN1 NTD,^{22,24} the exact molecular mechanism of this function remains under debate.¹⁰

¹Inserm, Inserm UMR-S U919, Serine Proteases and Pathophysiology of the Neurovascular Unit, Université Caen-Normandie, GIP Cyceron, Caen, France; ²Interdisciplinary Institute for Neuroscience, Université de Bordeaux UMR 5297, Bordeaux, France; ³CNRS IINS UMR 5297, Bordeaux, France; ⁴SysDiag CNRS/Bio-Rad, UMR3145, Montpellier, France and ⁵PAION Deutschland GmbH, Aachen, Germany

*Corresponding author: D Vivien, INSERM U919 SP2U, Bvd Henri Becquerel, GIP Cyceron, Caen 14074, France. Tel: +33 2 31 47 01 66; Fax: +33 2 31 47 02 22; E-mail: vivien@cyceron.fr

⁶These authors contributed equally to this work.

Abbreviations: Cter GluN1, C-terminal end of GluN1 subunit; DIV, day *in vitro*; GluN, NMDA receptor subunit; K2, kringle 2 domain of tPA; LBS, lysine-binding site; NMDAR, *N*-methyl-D-aspartate receptor; NTD, N-terminal domain; QD, quantum dot; TMD, transmembrane domain; tPA, tissue-type plasminogen activator; WT, wild-type. Received 24.3.16; revised 18.7.16; accepted 02.8.16; Edited by E Baehrecke

tPA promotes the dynamics of extrasynaptic NMDAR
F Lesept et al

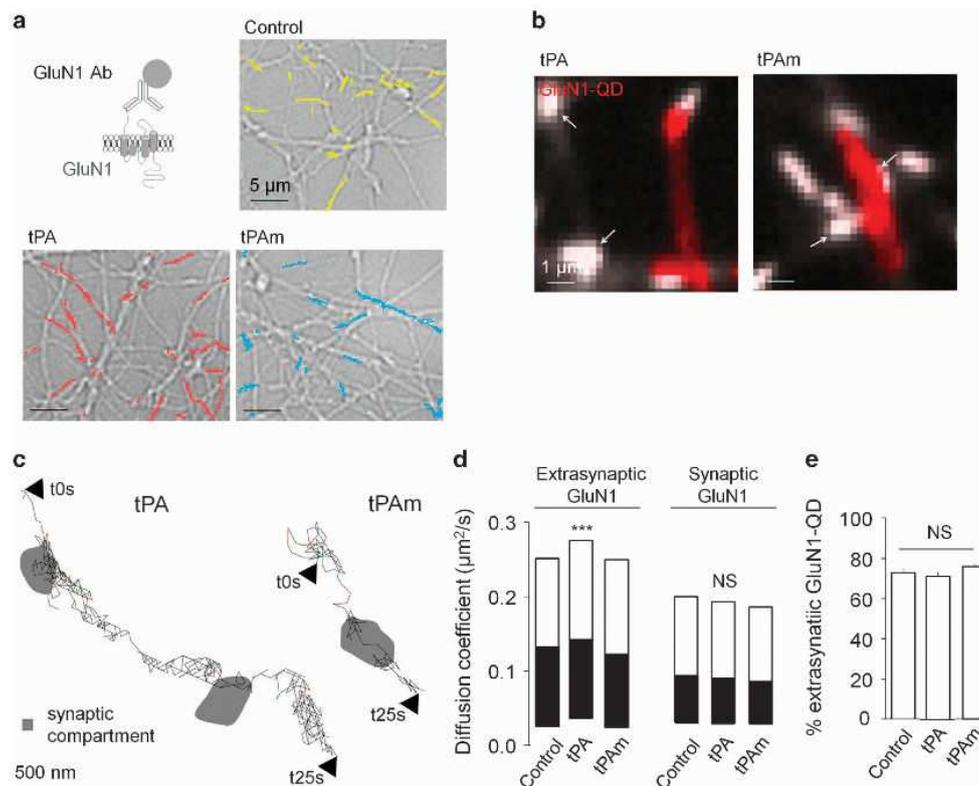
2

In this study, we postulated that tPA could alter NMDAR-evoked signaling and subsequent neurotoxicity through modifications of their surface dynamics and distribution. Thus, using nanoparticle tracking and antibody-based screening in living neurons, we demonstrate that the neuronal extracellular serine protease tPA can selectively increase neuronal extrasynaptic NMDARs surface diffusion. This selective diffusion of NMDAR is the consequence of a direct interaction of tPA with a functionally critical single amino acid (lysine 178) within the GluN1 NTD. By this mechanism, tPA promotes NMDAR-dependent calcium influx and excitotoxic neuronal death both *in vitro* and *in vivo*.

Results

tPA selectively increases extrasynaptic NMDAR surface dynamics, clustering and subsequent signaling. In living hippocampal culture, single nanoparticle tracking was used to image surface NMDARs and their response to

exogenously applied tPA (see Materials and methods section; Figure 1). NMDAR surface diffusion was recorded in cultured neurons that were incubated with single nanoparticle complexes containing a quantum dot (QD) associated with polyclonal antibodies raised against GluN1 NTD (Figure 1a). Surface diffusion of GluN1-NMDAR was recorded under control conditions and in the presence of either a wild-type (WT) tPA (tPA, 300 nM; Figure 1a) or a non-proteolytic tPA (tPA_m, 300 nM). Figures 1a to c illustrate, at different magnifications, the distinct diffusion patterns of representative trajectories of surface NMDAR following exposure to either WT tPA or tPA_m. We then compared the diffusion NMDAR to discriminate potential compartment-specific effect of tPA. As shown previously, synaptic NMDAR are less diffusive than their extrasynaptic counterparts.^{3,25} Although the diffusion of synaptic receptors remained unchanged, exposure to tPA increased the diffusion of extrasynaptic receptors ($***P < 0.001$) (Figures 1c and d). In contrast to its WT form, inactive tPA_m failed to influence the



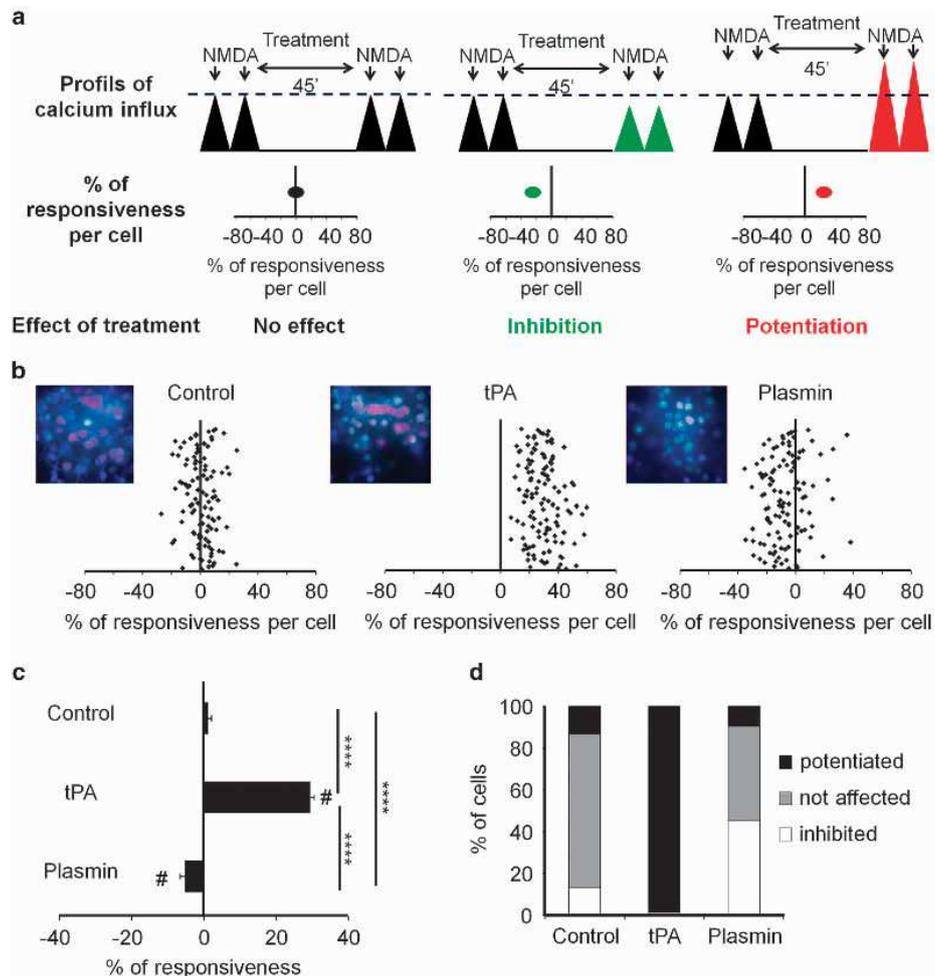


Figure 2 tPA-induced potentiation of NMDAR-mediated neuronal calcium influx is independent of plasmin. (a) Schematic representation of calcium video imaging on primary cultures of cortical neurons (12–14 DIV). The neurons were stimulated twice with the NMDA, then incubated with the treatment during 45 min prior a second run of NMDA stimulations. Each neuron responsive to NMDA is thus its own control. By comparison between the two runs of NMDA stimulations (% of responsiveness per cell), we visualized the effect of treatment on NMDA-induced calcium influx estimated the % of responsiveness per cell with either no effect of the treatment, an inhibitory effect or a potentiating effect. Each dot represents one individual neuron, with data collected from a minimum of three independent experiments. (b) After control NMDA stimulations used as baseline, neurons were incubated for 45 min with either plasmin buffer (control, $n = 107$ cells), tPA (300 nM, $n = 123$ cells) or plasmin (100 $\mu\text{g}/\text{mL}$; $n = 115$ cells). Each dot represents one cell. (c) Percentage of stimulation or inhibition after incubation were calculated for each individual cell and reported as the percentages of responsiveness for each group (mean \pm S.E.M.; $N = 3$ independent experiments; **** $P < 0.0001$ Kruskal–Wallis and Mann–Whitney tests for group comparison; * $P < 0.0001$ Wilcoxon signed-rank test for the comparison pre- and post-incubation responses). (d) Represents the percentages of potentiated, not affected and inhibited cells

dynamics of NMDARs. It should be noted that these acute applications of tPA did not modify the percentage of detected extrasynaptic GluN1-NMDAR. This indicates a stable pool of membrane NMDAR within this time frame (Figure 1e). Altogether, these data provide the first direct evidence that tPA can increase extrasynaptic, but not synaptic, GluN1-NMDAR surface dynamics in living neurons.

Next, we investigated the influence of tPA on consecutive NMDA-evoked calcium influx (Figure 2). The neurons were stimulated twice with the NMDA, then incubated with the treatment during 45 min prior a second run of NMDA stimulations. Each neuron responsive to NMDA is thus its

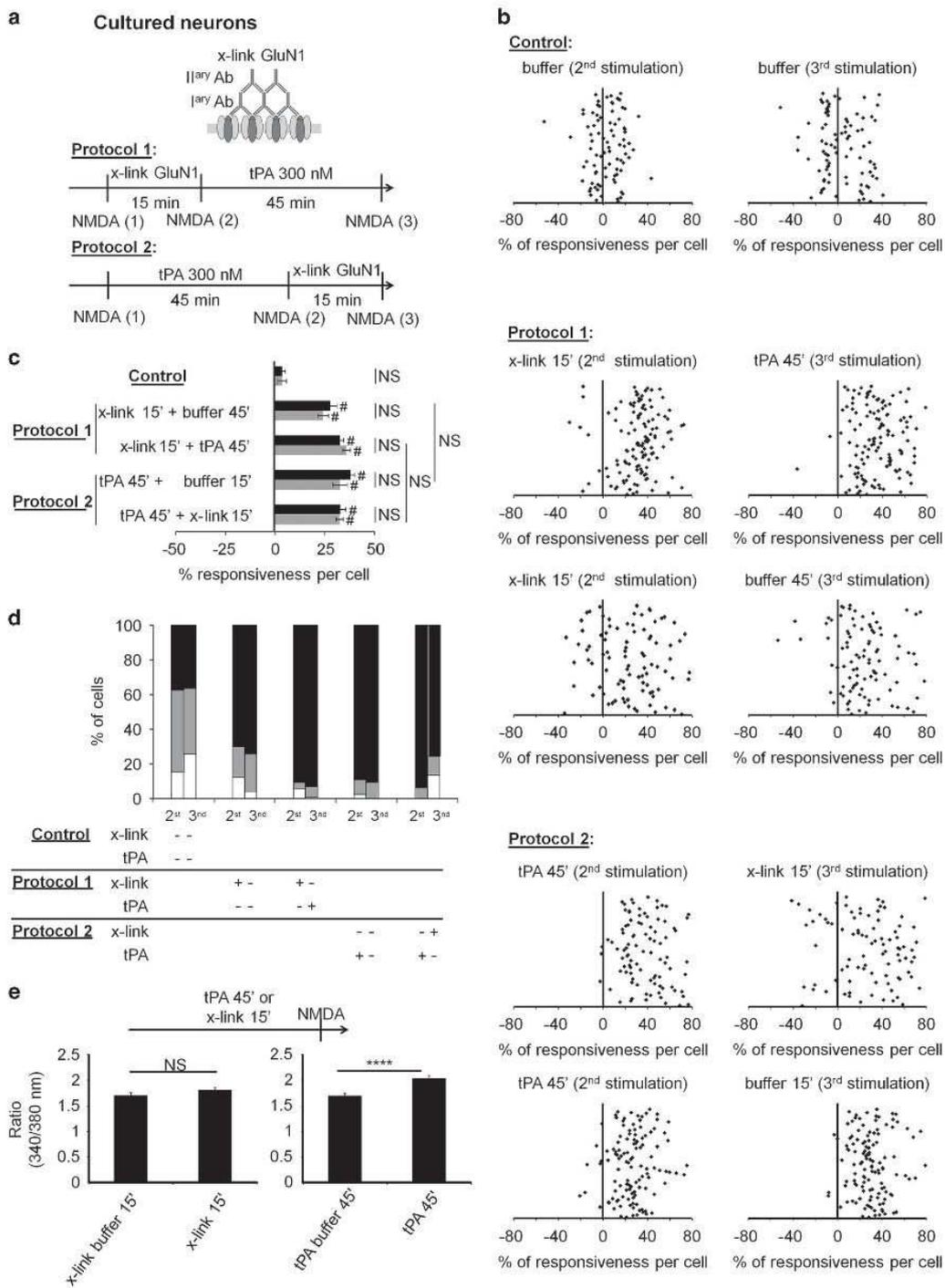
own control. By comparison between the two runs of NMDA stimulations (% of responsiveness per cell), we visualized the effect of treatment on NMDA-induced calcium influx estimated by the % of responsiveness per cell with either no effect of the treatment, an inhibitory effect or a potentiating effect. Each dot represents one individual neuron, with data collected from a minimum of three independent experiments (Figure 2a). tPA treatment increased NMDA-induced calcium influx (300 nM; 92% of neurons potentiated, +28% stimulation in mean value; **** $P < 0.0001$ when compared with control neurons; Figures 2b–d). This effect is independent of the plasmin because plasmin did not elicit such a potentiation of

tPA promotes the dynamics of extrasynaptic NMDAR
F Lesept et al

4

NMDA-evoked calcium influx (Figure 2). To directly address whether this functional effect of tPA on NMDA-induced calcium influx response requires, or could be mimicked by, surface diffusion of NMDAR. We artificially reduced NMDAR surface

dynamics and created NMDAR clusters using a cross-link protocol (x-link)²⁶⁻²⁸ (Figure 3a). It should be noted that x-link alone, without NMDA application, does not alter the amplitude of calcium influx, as previously reported^{28,29} (Figure 3e).



Remarkably, after a first challenge with NMDA, x-link led to an increase of NMDA-induced calcium influx (90% of neurons potentiated, +33% stimulation in mean value; control $n=85$ cells and x-link $n=128$ cells; **** $P<0.0001$ when compared with control cells), indicating that NMDA-induced calcium influx response requires dynamic diffusion of surface NMDAR. The same effect was observed following tPA treatment (94% of cells potentiated, +38% stimulation in mean value; protocol 2, $n=95$ cells; **** $P<0.0001$ when compared with control cells; Figures 3c and d). Importantly, no additional effect on calcium response was observed when adding tPA after performing x-link (NS, not significant, protocol 1), or when performing x-link after adding tPA (NS; protocol 2; Figures 3b–d). The same results were obtained when x-link was induced by Glunomab (Supplementary Figure 1) instead of polyclonal antibodies against GluN1 NTD subunit (residues 385–399, Figure 3). Altogether, these data demonstrate that NMDA-induced calcium influx requires a fast dynamic diffusion of NMDAR, allowing clustering, as shown by x-link experiments. For extrasynaptic NMDARs, this process is promoted by tPA.

Promotion of NMDARs signaling is caused by tPA interaction with GluN1: critical role of lysine 178 (GluN1 NTD^{Lys178}). To identify the putative binding site of tPA on GluN1 NTD,^{22,30–32} we first screened a series of monoclonal antibodies we have generated using recombinant GluN1 NTD as antigen (residues 19–371; Figure 4a). Positive antibodies on ELISA (Figure 4b and Supplementary Figure 2) were further selected by immunoblottings raised against recombinant GluN1 NTD (Figure 4c and Supplementary Figure 2). Then, histochemistry performed with selected antibodies (e.g., clone 15A4B2 also named Glunomab) revealed positive stainings in cortical and hippocampal neurons (mouse and rat). Glunomab-positive staining colocalizes with a parallel immunostaining performed against the C-terminal end of GluN1 (Cter-GluN1) both in cortical and hippocampal but not in non-neuronal tissue sections (Figures 4d and e). As Glunomab is not optimum for direct immunoblotting, we tested its specificity after we have performed a pull down of the GluN1 subunit by using an antibody raised against the Cter-GluN1 (Figures 4e–g, clone 15A4B2, Glunomab). These experiments were performed from whole cortex and primary cultures of cortical neurons protein extracts. We then evaluated the blocking activity of each positive clone on tPA-driven potentiation of NMDAR signaling using calcium video-imaging assays performed on primary cultures of cortical neurons (Figures 4g–i). NMDA exposure led to reproducible waves of calcium influx that were potentiated

by 31% in the presence of tPA (300 nM; mean value of potentiation with 81% of cells potentiated; **** $P<0.0001$; control, $n=92$ cells and tPA, $n=139$). Antibodies from clone 6C9B6 failed to influence tPA-induced potentiation of NMDA-induced calcium influx (+38% of potentiation with 78% of cells potentiated; $n=119$ cells; # $P<0.0001$ compared with pre-incubation responses; NS, not significant compared with tPA alone). However, Glunomab completely abolished the tPA-dependent potentiation of NMDA-induced calcium influx (**** $P<0.0001$ when compared with tPA alone, $n=139$ cells). Of note, Glunomab did not affect basal NMDAR signaling ($n=46$ cells).

Then, an epitope mapping of Glunomab was performed to refine the binding site of tPA on the GluN1 NTD. Immunoblottings for 141 overlapping pentadecapeptides frame shifted by three residues covering the entire amino-acid sequence of GluN1 NTD (residues 19–371) were revealed with Glunomab (Supplementary Figure 3a). Once reactive peptides were identified, a corresponding alanine scanning (Alascan) was performed to identify key residues contributing to the epitope of Glunomab (Supplementary Figure 3b). These studies revealed that Glunomab binds to the ¹⁷²EGRAAQKRLLEE¹⁸⁶ sequence of the rat GluN1 NTD, a sequence 100% conserved between species from mouse to human (Supplementary Figures 3c and d). Alascan also revealed ¹⁷⁶AQKRL¹⁸⁰ as the minimal epitope and both arginine 174 (R174) and glutamic acid 185 (E185) as putative stabilizing amino acids. Positioning of the minimal epitope (¹⁷⁶AQKRL¹⁸⁰) in the structure of heterotetrameric NMDAR reveals that this epitope is accessible to extracellular molecules (Supplementary Figure 3e).

We demonstrated previously that the lysine-binding site (LBS) of the kringle 2 domain of tPA was important to promote NMDAR signaling.^{33,34} Thus, we postulated that the lysine 178 (K¹⁷⁸) in the minimal epitope of Glunomab could be critical for the binding of tPA on GluN1 NTD. To address this question, NMDA-induced calcium influx was recorded in HEK-293 cells transfected with WT GluN2A in combination with either WT GluN1-1b (GluN1-1b WT) or GluN1-1b containing a point mutation of the lysine in position 178 into valine (K178V) or GluN1-1b containing a point mutation of lysine in position 190 into valine as control (K190V) (Figures 5a–c). As observed in cultured cortical neurons, tPA enhanced NMDA-induced calcium influx (+27% of potentiation with 62% of cells potentiated; *** $P<0.001$ compared with control; control, $n=34$ cells; tPA, $n=36$) and Glunomab prevented tPA-induced potentiation of NMDAR signaling (** $P<0.01$ when compared with tPA alone; $n=30$ cells). K178V mutated

Figure 3 tPA mimicks x-link-induced NMDARs clustering. (a) Schematic representation of the x-link procedure performed on cultured cortical neurons and used to induce an artificial clustering of GluN1-NMDAR,^{26–28} as well as the detailed sequence of treatments. (b) NMDA-induced calcium influx measured after the following treatments: buffer alone ($n=85$ cells), x-link 15' then tPA 45' (protocol 1, $n=128$ cells) or tPA buffer 45' ($n=97$ cells) and tPA 45' then x-link 15' (protocol 2, $n=95$ cells) or x-link buffer 15' ($n=114$ cells). Each dot represents one cell. (c) Percentage of stimulation or inhibition after incubation were calculated for each individual cell and reported as percentages of responsiveness for each group. (mean \pm S.E.M.; $N=3$ independent experiments; NS, not significant; **** $P<0.0001$ Kruskal–Wallis test followed by Mann–Whitney test for group comparison; # $P<0.0001$ Wilcoxon signed-rank test for the comparison pre- and post-incubation responses). (d) Percentages of potentiated, not affected and inhibited cells. (e) Comparison of the amplitudes of calcium influx after tPA 45' ($n=87$ cells) or x-link 15' ($n=77$ cells) treatments and their controls (tPA buffer 45', $n=68$ cells; x-link buffer 15', $n=92$ cells) without a pre-treatment with NMDA (as shown on the diagram). Effects of tPA 45' or x-link 15' are not dependent of the pre-incubation NMDA stimulation. In contrast to tPA 45' condition, the x-link does not lead a augmentation of calcium influx amplitude. (mean \pm S.E.M.; $N=3$ independent experiments; **** $P<0.0001$ Mann–Whitney test for group comparison)

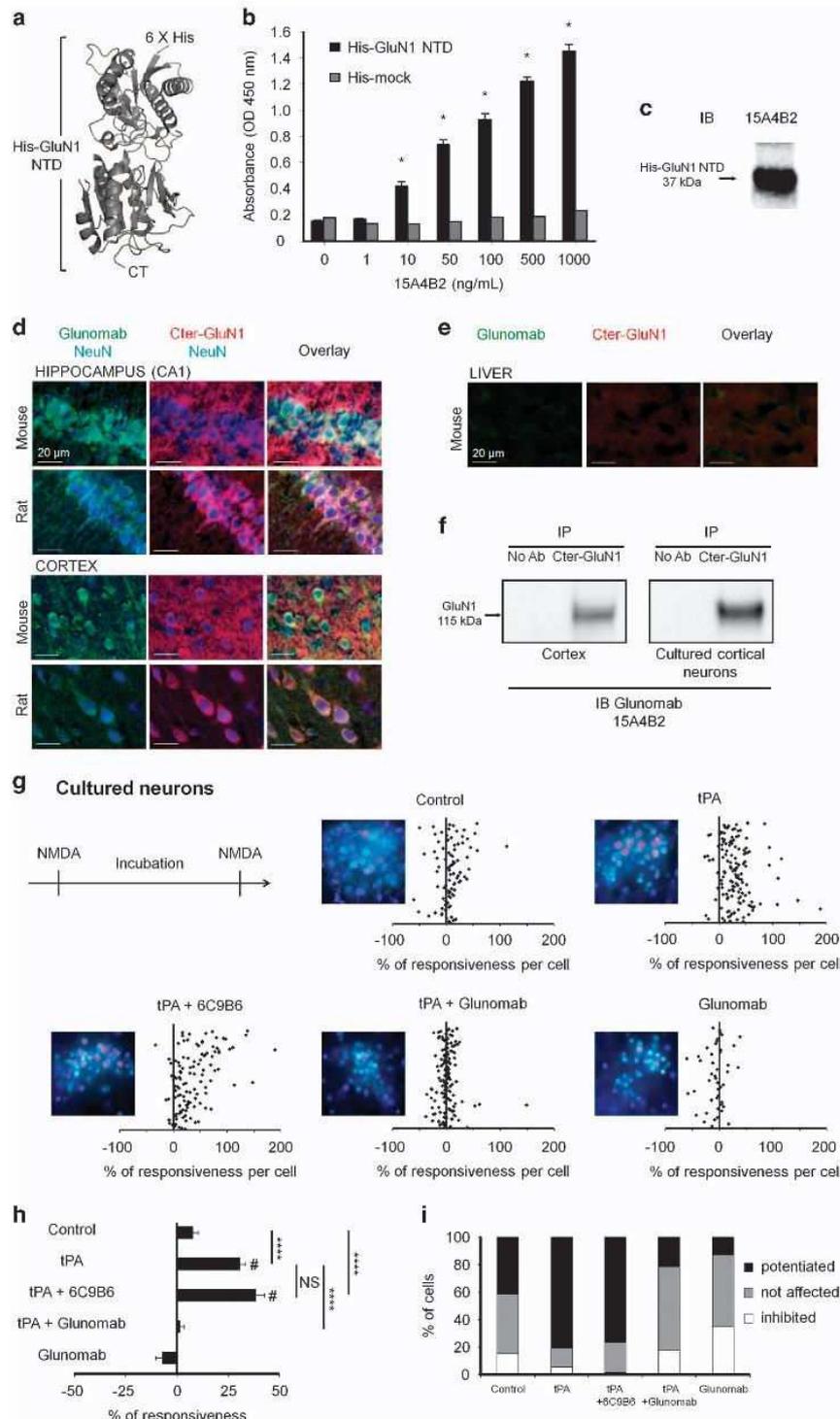
tPA promotes the dynamics of extrasynaptic NMDAR

F Lesept et al

6

NMDAR were still responsive to NMDA stimulation but failed to respond to tPA ($n=35$ cells). The control point mutation K190V did not modify NMDAR responsiveness to tPA

incubation ($n=37$ cells; NS compared with tPA alone), neither the blocking activity of Glunomab ($****P<0.0001$ compared with GluN1-1b K190V in tPA condition; $n=47$ cells). These



mutations do not influence the basal activity of NMDAR in the absence of tPA (Figure 5d). Accordingly, binding of Glunomab was reduced on HEK-293 cells transfected with GluN1-1b K178V compared with cells expressing NMDARs containing either GluN1-1b WT or GluN1-1b K190V (Figures 5e and f). Taken together, these data demonstrate that lysine 178 within the GluN1 NTD is of decisive importance in effecting tPA-induced potentiation of NMDAR signaling and, equally important, these findings revealed Glunomab as a selective antagonist of tPA's action on NMDAR.

To ascertain whether the LBS contained in the kringle 2 domain of tPA (K2) was indeed the tPA moiety that interacts with the lysine 178 of the GluN1 NTD, we used a previously characterized mutant of tPA containing an inactive LBS (W254R), hereafter termed tPA K2*.³³ NMDA-induced calcium influx was recorded in HEK-293 cells transfected with rat cDNAs encoding both GluN1-1b WT and GluN2A in combination with WT rat tPA (tPA WT) or tPA K2* (Figure 6a). Although Glunomab reduced NMDAR signaling recorded in the presence of tPA WT (−18% of potentiation with 62% of cells inhibited; #*P* < 0.01; *n* = 29 cells), it failed to reduce NMDA-induced calcium influx recorded in the presence of tPA K2* (***P* < 0.01 compared with tPA WT; *n* = 19 cells; Figures 6b and c). These data show that Glunomab is specific of the tPA/NMDAR interaction directly involving the LBS of tPA and the lysine in position 178 within GluN1 NTD.

Preventing tPA/GluN1 NTD interaction reduces extrasynaptic NMDAR diffusion, tPA-promoted NMDAR signaling and subsequent neurotoxicity. NMDAR surface diffusion was then recorded on cultured hippocampal neurons incubated with single nanoparticle complexes containing a QD associated with either an antibody raised against GluN1 NTD subunit or Glunomab. These experiments were designed to assess the effects of endogenous tPA on the dynamics of NMDAR at the neuronal surface. Figures 7a and b illustrate the distinct diffusion patterns from representative trajectories of surface NMDAR, labeled with control antibodies (control Ab) or Glunomab. The epitopes of the control Ab and of Glunomab are different corresponding, respectively, to the amino-acid residues 385–399 and 176–180 of the GluN1 subunit. However, both control Ab and Glunomab can bind

GluN1 NTD. In consequence, the striking reduction in receptor surface diffusion by Glunomab compared with the control antibody can be only explained by the specificity of Glunomab, that is, its capacity to prevent the interaction of tPA with the GluN1 subunit of the NMDAR. Indeed, the fraction of immobile receptors increased more than twofold (Figure 7c). When the curve of the average square displacement (MSD) over time was calculated for the two conditions, the Glunomab curve was shifted to the right, indicating a stronger confined behavior of NMDAR in this condition (Figure 7d). We then recorded and specifically compared the diffusion of synaptic and extrasynaptic NMDAR to discriminate potential compartment-specific effect of tPA binding site. Although the reduced diffusion observed with Glunomab was marked for extrasynaptic receptors (****P* < 0.0001; control Ab, *n* = 170 trajectories; Glunomab, *n* = 146), only a slight reduction was observed for synaptic receptors (**P* < 0.05; control Ab, *n* = 148 trajectories; Glunomab, *n* = 261; Figure 7e). Altogether our data demonstrate that endogenous tPA selectively increases the surface dynamics of extrasynaptic NMDAR and subsequent calcium influx.

We then tested whether the blockage of the tPA-dependent potentiation of NMDARs surface dynamics could reduce the pro-neurotoxic action of exogenous tPA in a paradigm of NMDA-mediated neuronal death (Figure 8). NMDA alone (12.5 μM), led to approximately 40% neuronal death 24 h later. Whereas, tPA-promoted NMDA-induced neuronal death (60%, **P* < 0.05; *n* = 3 independent experiments; *n* = 9 dishes; Figure 8a), this potentiating effect was prevented in a dose-dependent manner by Glunomab (0.1, 1, 10 μg/ml; **P* < 0.05; *N* = 3 independent experiments; *n* = 9 dishes; Figure 8b). *In vivo*, as previously reported,³² excitotoxic neuronal death, induced by stereotaxic administration of NMDA (10 nmol) in the mouse striatum, was potentiated by an intravenous injection of tPA (10 mg/kg). This potentiation was not observed if Glunomab (160 μg) was co-administered with tPA (**P* < 0.05; *n* = 7, 8 or 9 per group; Figures 8c and d). We previously showed that tPA promotes the neuronal ERK(½) activation mediating its pro-neurotoxic effects.³⁵ Accordingly, we measured the phosphorylated and total ERK(½) levels in primary neuronal cultures subjected to NMDA (50 μM), tPA (300 nM) and Glunomab (10 μg/ml) exposures either alone or in

Figure 4 Production and characterization of Glunomab (clone 15A4B2), a monoclonal antibody raised against GluN1 NTD. (a) Structure of the bilobate amino-terminal domain of GluN1 (GluN1 NTD, PDB ID: 3Q41).⁵⁰ The GluN1 NTD was used as antigen for immunization assays in mice. (b) Example of an indirect ELISA assay performed with conditioned media harvested from Glunomab (clone 15A4B2), using a His-tagged mock protein as a control or the His-GluN1 NTD as the specific antigen (1–1000 ng/ml of antibody, *N* = 4 independent experiments; **P* < 0.05 compared between one dose and previous dose; Kruskal–Wallis and Mann–Whitney tests). (c) Immunoblotting performed after SDS-PAGE resolution of recombinant His-GluN1 NTD (20 μg loaded per lane) and immunoglobulin Glunomab (clone 15A4B2) as the primary antibody (*N* = 2 experiments). (d) Immunostaining performed from hippocampal (CA1) and cortical tissue sections (mice and rats) using either Glunomab (clone 15A4B2) (1 : 400, green) or an antibody against the C-terminal GluN1 subunit (Cter-GluN1, 1 : 400, red) or NeuN (1 : 250, blue). (e) Control immunostainings performed from liver tissue sections (mice) using either Glunomab (clone 15A4B2) (1 : 400, green) or an antibody against the C-terminal GluN1 subunit (Cter-GluN1, 1 : 400, red). (f) Immunoprecipitation (IP) assays from mouse cortices or primary cultures of cortical neurons using Cter-GluN1 subunit antibody followed by immunoblotting (IB) using Glunomab (clone 15A4B2) (representative data of three independent samples). (g) Calcium video imaging was performed on primary cultures of cortical neurons (12–14 DIV, see Materials and Methods section). After two successive control NMDA stimulations, neurons were incubated for 45 min with buffer (control, *n* = 98 cells), Glunomab alone (10 μg/ml, *n* = 46 cells), tPA alone (300 nM, *n* = 139 cells) or with immunoglobulins corresponding to Glunomab (clone 15A4B2) (10 μg/ml, *n* = 139 cells) or the clone 6C9B6 (10 μg/ml, *n* = 119 cells). A second set of NMDA stimulations was then performed. Each dot represents one cell. Each graph is accompanied by an image during NMDA stimulation after treatment. (h) Percentage of stimulation or inhibition after incubation were calculated for each individual cell and reported as percentages of responsiveness for each group (mean ± S.E.M.; *N* = 3 independent experiments; NS, not significant; *****P* < 0.0001; Kruskal–Wallis and Mann–Whitney tests for group comparison; #*P* < 0.0001 Wilcoxon signed-rank test for the comparison pre- and post-incubation responses). (i) Percentages of potentiated, not affected and inhibited cells

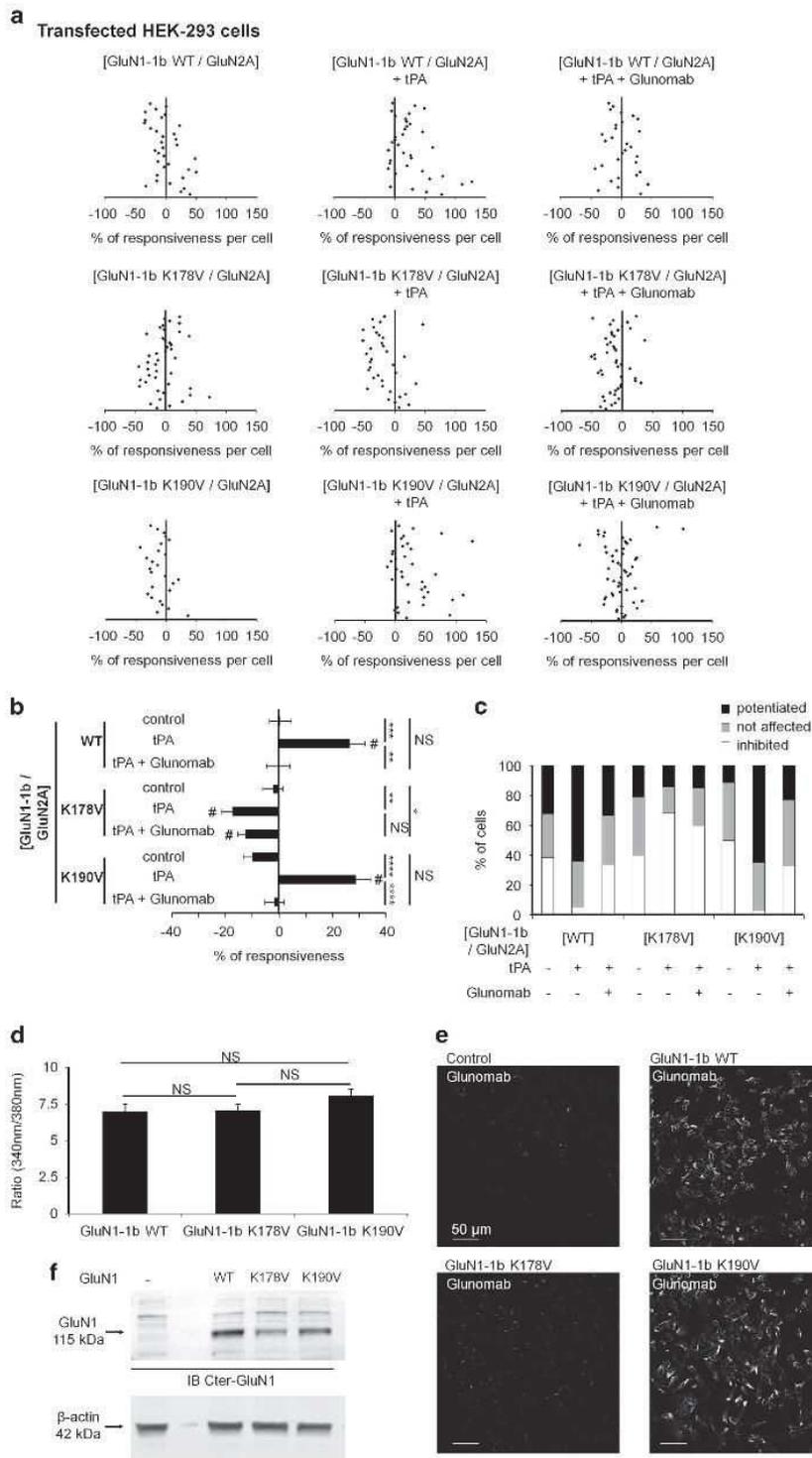
tPA promotes the dynamics of extrasynaptic NMDAR

F Lesept et al

8

combination (Supplementary Figure 4). After 5 min of treatment, tPA promotes the NMDAR-ERK(1/2) activation, an effect prevented by the presence of Glunomab (* $P < 0.05$, $N = 5$

independent experiments, including a total of $n = 20$ individual dishes per condition). These data show that the control of neuronal survival is one of the physio-pathological tPA effects



that involve its ability to influence the surface dynamics of extrasynaptic NMDAR.

Discussion

In this report, we demonstrate that extrasynaptic GluN1-NMDARs surface dynamics and subsequent signaling are

increased by the neuronal extracellular serine protease tPA, leading to an enhanced NMDAR signaling and neurotoxicity (Supplementary Figure 5). These effects are the direct consequence of an interaction of tPA with the lysine in position 178 (¹⁷⁶AQKRL¹⁸⁰) of the GluN1 NTD of NMDAR. Thus, tPA acts as a modulator of NMDARs distribution at the neuronal surface.

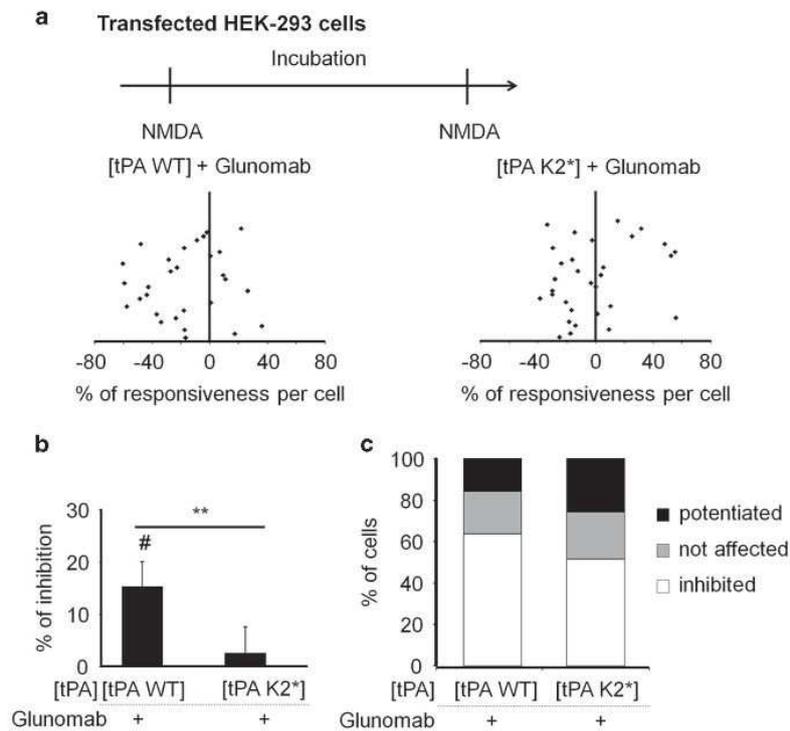


Figure 6 tPA-induced potentiation of NMDAR signaling is dependent of the LBS of the tPA kringle 2 domain (kringle 2-tPA^{LBS}). **(a)** Calcium video imaging performed on HEK-293 cells transiently transfected with GluN1-1b WT and GluN2A in combination with tPA WT or a tPA containing a point mutation within its LBS-containing kringle 2 domain (W254, tPA K2*).³⁵ After control NMDA stimulations (used as baseline), transfected HEK-293 cells with either GluN1-1b/GluN2A/tPA WT ($n=44$ cells) or GluN1-1b/GluN2A/tPA K2* ($n=31$ cells) were incubated for 20 min with Glunomab (10 μ g/ml), before a second set of NMDA stimulations. **(b)** Percentages of inhibition after incubation with Glunomab were calculated for each individual cell and reported as the percentages of inhibition for each group (mean \pm S.E.M.; $N=3$ independent experiments; ** $P<0.01$ Kruskal–Wallis and Mann–Whitney tests for group comparison; # $P<0.01$ Wilcoxon signed-rank test for the comparison pre- and post-incubation responses). **(c)** Percentages of potentiated, not affected and inhibited cells

Figure 5 tPA-induced potentiation of NMDAR signaling involves the lysine 178 of the GluN1 NTD (GluN1 NTD^{Lys178}). **(a)** Calcium video imaging performed on HEK-293 cells transiently transfected with either GluN1-1b WT, K178V mutated GluN1-1b or K190V mutated GluN1-1b in combination with WT GluN2A. After control NMDA stimulations (used as baseline), transfected cells with GluN1-1b WT and GluN2A were incubated for 20 min with either buffer (control, $n=34$ cells), tPA (300 nM, $n=36$ cells) and/or Glunomab (10 μ g/ml, $n=30$ cells), before a second set of NMDA stimulations. The same set of NMDA stimulations were applied on cells transfected with mutated GluN1-1b K178V or mutated GluN1-1b K190V incubated with either buffer ($n=43$ cells or $n=26$, respectively) or tPA (300 nM, $n=35$ cells or $n=37$, respectively) or tPA with Glunomab ($n=47$ cells and $n=52$ cells, respectively). Each dot represents one cell. **(b)** Percentage of stimulation or inhibition after incubation were calculated for each individual cell and reported as the percentages of responsiveness for each group (mean \pm S.E.M.; $N=3$ independent experiments; * $P<0.05$; ** $P<0.01$; *** $P<0.001$; **** $P<0.0001$ Kruskal–Wallis and Mann–Whitney tests for group comparison; # $P<0.01$ Wilcoxon signed-rank test for the comparison pre- and post-incubation responses). **(c)** Percentages of potentiated, not affected and inhibited cells. **(d)** Calcium video imaging performed on HEK-293 cells transiently transfected with either GluN1-1b WT, K178V mutated GluN1-1b or K190V mutated GluN1-1b in combination with WT GluN2A. Before an incubation with different treatment, two first NMDA stimulations (100 μ M) were performed on transfected HEK-293 cells with GluN1-1b WT (or K178V or K190V) and GluN2A. The K178V and K190V point mutations within GluN1 do not influence the basal activity of NMDAR in the absence of tPA. (mean \pm S.E.M.; $N=3$ independent experiments; NS, not significant; Kruskal–Wallis and Mann–Whitney tests for group comparison). **(e)** Representative images of immunolabelings revealed with Glunomab (as primary antibody, 1 : 800) performed on HEK-293 cells transiently transfected with either GluN1-1b WT, mutated GluN1-1b K178V or mutated GluN1-1b K190V in combination with WT GluN2A ($N=3$ independent experiments). **(f)** Immunoblotting raised against GluN1 (Cter-GluN1, 1 : 250) performed from protein extracts of HEK-293 cells transiently transfected with either GluN1-1b WT, K178V mutated GluN1-1b or K190V mutated GluN1-1b in combination with WT GluN2A and a loading control using β -actin antibody (20 μ g loaded per lane, $N=1$ experiment)

tPA promotes the dynamics of extrasynaptic NMDAR
F Lesept et al

10

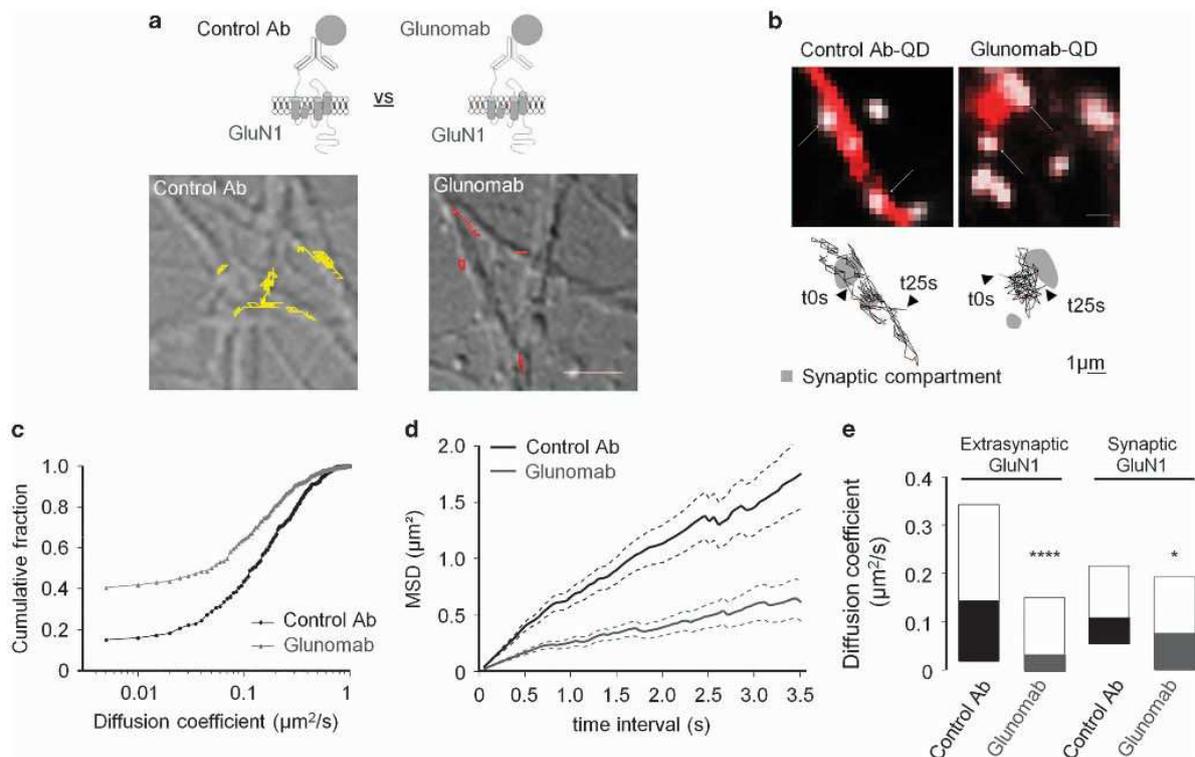


Figure 7 Blockage of the ability of tPA to bind GluN1 NTD alters extrasynaptic GluN1-NMDARs surface diffusion and increases their confined behavior. (a) Up: GluN1-NMDAR tracked using a single anti-GluN1 antibody QD complex obtained either by coupling a control GluN1 NTD subunit antibody (control Ab, Alomone Labs, 1 : 200) or the Glunomab antibody (1 : 200) to QDs. Down: representative GluN1-QD (GluN1 QD) trajectories on cultured hippocampal neurons (11–12 DIV) with control Ab (yellow) or Glunomab (red). (b) Representative trajectories of surface GluN1-QD (black lines, 500 frames, 50-ms acquisition) in the vicinity and within synapses (white arrows). Synaptic trajectories are defined by their colocalization with synaptic labeling (Mitotracker, white), trajectories outside synapses being considered as extrasynaptic. Note that the diffusion of NMDAR targeted by Glunomab is reduced outside synapses. Scale bar = $1 \mu\text{m}$. (c) Cumulative distribution of the instantaneous diffusion coefficient of NMDARs targeted by the control Ab or Glunomab. The population of NMDAR targeted by Glunomab shows a reduced diffusion speed and a higher proportion of immobile receptors compared with the one tracked with the control Ab (immobile fraction Control Ab = 15%; Glunomab = 41%). (d) Plot of the MSD versus time of total GluN1 tracked with control Ab ($n = 273$ trajectories) or Glunomab ($n = 129$). The red curve (Glunomab) tends toward a negative curvature, characteristic of a confined behavior. (e) Instantaneous diffusion coefficient distributions (median 25–75% IQR) of extrasynaptic (control Ab = $0.1489 \mu\text{m}^2/\text{s}$ IQR = 0.0228 – $0.3476 \mu\text{m}^2/\text{s}$, $n = 148$ trajectories; Glunomab = $0.0318 \mu\text{m}^2/\text{s}$ IQR = 0.00008 – $0.1532 \mu\text{m}^2/\text{s}$, $n = 261$) versus synaptic GluN1-QD (control Ab = $0.1132 \mu\text{m}^2/\text{s}$ IQR = 0.0511 – $0.2148 \mu\text{m}^2/\text{s}$, $n = 170$ trajectories; Glunomab = $0.0764 \mu\text{m}^2/\text{s}$ IQR = 0.0014 – $0.1909 \mu\text{m}^2/\text{s}$, $n = 146$; * $P < 0.05$, **** $P < 0.001$; Kruskal–Wallis and Dunn’s multiple comparison test)

In the CNS, tPA is a well-known serine protease expressed and released in the extracellular space by many cell types including neurons.^{11–14} Among the reported receptors of tPA in the CNS, one is NMDAR with GluN1 as a possible binding site.²² In this study, we provide molecular evidence that tPA is a ligand of NMDAR. We first demonstrate that tPA directly interacts with the GluN1 NTD of NMDARs and identify the lysine in position 178 in the GluN1 NTD as its binding site. These data are in agreement with previous demonstrations that the tPA-induced potentiation of NMDAR signaling involves the LBS contained in the K2.^{33,34} Thus, we can postulate that this interaction of tPA with the lysine 178 of the GluN1 NTD is the first and necessary step of a previously suggested two-step process, which also involves arginine in position 260 of the GluN1 NTD.³⁶ To date, the cleavage of the amino-terminal domain of the GluN1 subunit by tPA is still debated. However, there is no doubt about the capacity of tPA to enhance the NMDAR signaling.²⁴ Further investigation is thus needed to

determine whether GluN1 cleavage is necessary for the enhancement of NMDAR function by tPA or whether GluN1 cleavage is the result of a bystander effect, inhibits desensitization of NMDA receptors or has other functions. Also interesting, plasmin (which is generated by a tPA-dependent processing of the plasminogen) has also been reported to cleave NMDARs, specifically the GluN2 subunit. This cleavage can occur at two sites: lysine 317 on GluN2A, which relieves Zn^{2+} inhibition and thereby increases NMDAR function,³⁷ and arginine 67 on GluN2B, which increases sensitivity of the NMDA receptor to glycine.³⁸

NMDARs are diverse in their molecular subunit composition, their pharmacological properties and their subcellular localization. The dynamics and pharmacological features of NMDAR NTDs are critical for the control of the functional and pharmacological diversities of NMDARs. Although the regulatory functions of the GluN2 NTDs are well documented,⁹ the functions of the GluN1 NTD remain largely unknown. In a

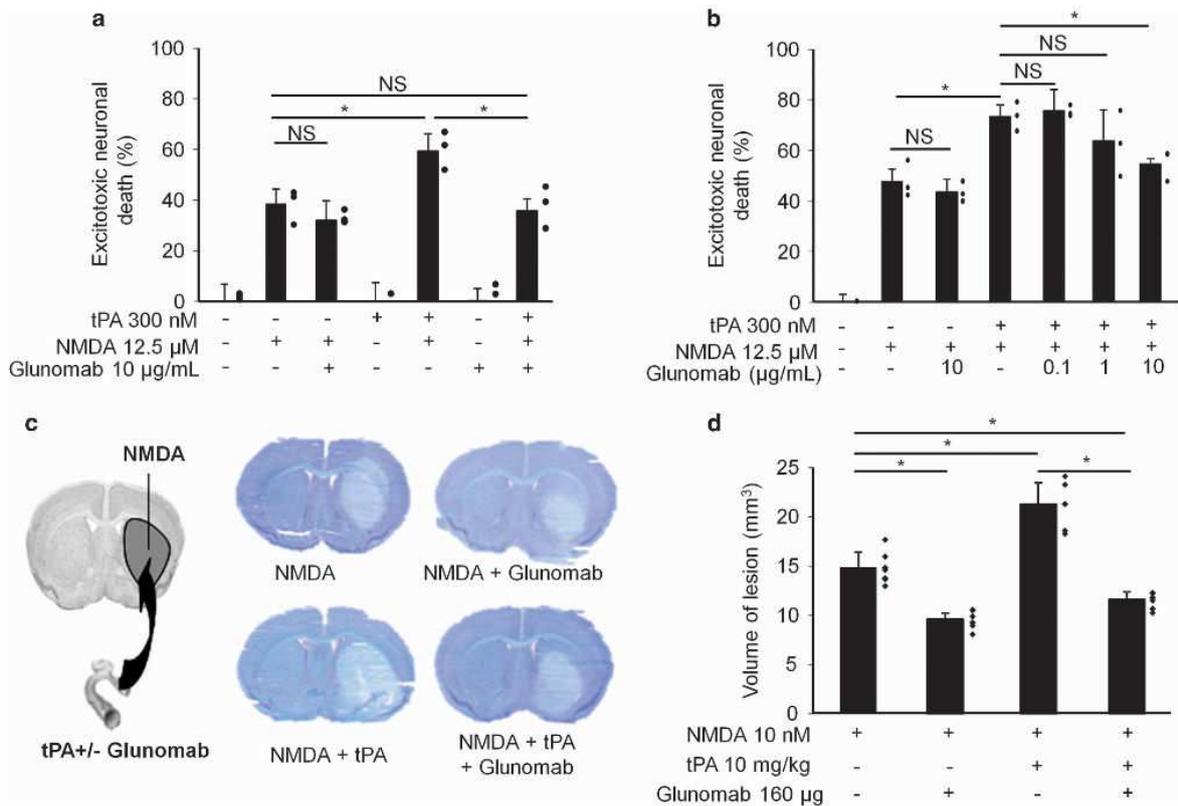


Figure 8 Blockage of the ability of tPA to bind GluN1 NTD interaction prevents the pro-excitotoxic effects of tPA *in vitro* and *in vivo* without alter its anti-apoptotic effect. (a) Neuronal death was assessed on primary cultured cortical neurons (12–14 DIV) by measuring LDH release in the bathing media after 24-h exposure to NMDA alone (12.5 μ M) or in the presence of tPA (300 nM) and/or Glunomab (10 μ g/ml) (mean \pm S.E.M.; $N=3$ independent experiments, including $n=9$ individual dishes per condition; each spot represents an average value for the three independent experiments; NS, not significant; $*P<0.05$; Kruskal–Wallis and Mann–Whitney tests). (b) Same experiments as in (a) were performed in the presence of decreasing concentrations of Glunomab (10, 1, 0.1 μ g/ml; mean \pm S.E.M.; $N=3$ independent experiments, including $n=9$ individual dishes per condition; $*P<0.05$; Kruskal–Wallis and Mann–Whitney tests; each spot represents an average value for the three independent experiments). (c) Left: schematic representation of unilateral striatal injection of NMDA (10 nmoles, 1 μ l). Right: illustrative images of excitotoxic lesions in all conditions. (d) Quantification of volume of excitotoxic lesions (mean \pm S.E.M.; $n=7, 8$ or 9 mice per group; $*P<0.05$ Kruskal–Wallis and Mann–Whitney tests; each spot represents individual lesion volumes).

recent study, it was showed that GluN1 NTD was highly mobile and actively participated in defining the gating and pharmacological profile of NMDAR. As proposed by Paoletti's group, this discovery redefines the possible functional consequences of interactions between GluN1 NTDs of NMDAR and extracellular molecules.¹⁰ Several studies propose that ifenprodil and polyamines are involved in the modification of NMDAR conformation by shielding negative charges present on GluN1 and GluN2B NTD lower lobes.^{39–41} In this study, we propose that tPA is one of these extracellular molecules capable of binding to the GluN1 NTD and, as such, to influence NMDAR signaling. Accordingly, antibodies that target the binding site of such molecules, like Glunomab, are putative modulators of NMDARs. Surface trafficking has recently emerged as a crucial cellular pathway involved in the pathophysiological tuning of excitatory synapse transmission.^{42,43} Through the use of single particle imaging in neurons, we showed that, by selectively controlling extrasynaptic NMDARs diffusion, tPA has a key role in synaptic adaptation processes and functions of NMDARs signaling. It is important to note that tPA did not

influence the percentages of detected synaptic and extrasynaptic NMDARs, respectively.

Although the relationship between the surface dynamics of NMDAR and their signaling has yet to be proven, our present data support a strong relationship between surface dynamics and subsequent signaling. By increasing the surface dynamics of a fraction of extrasynaptic NMDAR, we can propose that cumulative effects in the whole population of NMDARs are responsible for the potentiating effect of tPA on NMDARs signaling. These observations fit with our previous finding that tPA-promoted neurotoxicity through a mechanism that involved extrasynaptic and possibly GluN2D-containing NMDARs,^{35,44} a phenomenon also associated with an activation of the ERK(1/2) pathway.³⁵ In this study, we show that Glunomab is also capable to prevent the tPA-dependent increase of neuronal ERK(1/2) activation. Moreover, the neurotoxicity of tPA can be explained by the conformation (single or two chain tPA; sc-tPA or tc-tPA) and by its concentration.⁴⁵ sc-tPA (conformation using in this study) decreased NMDAR-dependent calcium influx at 10 nM causing a neuroprotective

tPA promotes the dynamics of extrasynaptic NMDAR
F Lesept et al

12

effect, 300 nM tPA led to an increased NMDAR signaling and neurotoxicity. This protective effect of low doses of tPA was also reported by the group of Manuel Yepes.⁴⁶ Accordingly, although tPA promotes NMDA-induced excitotoxicity,²² GluN1 antibody appears to be a promising neuroprotective tool. These data are also in agreement with the proposal that the activation of synaptic NMDARs promotes cell survival, whereas activation of extrasynaptic NMDARs promotes cell death.² Interestingly, a non-proteolytic form of tPA failed to promote the surface dynamics of NMDAR, suggesting that at least the catalytic site of tPA is required for this process. Whether the cleavage of GluN1 is needed,²² remains to be investigated. Although the use of general NMDARs blockers for the treatment of disorders of the CNS is associated with unacceptable effects,⁴⁷ the present data suggest that targeting the potentiating effect of tPA on extrasynaptic NMDARs, may offer promising therapeutic avenues.

In conclusion, we identified the extracellular serine protease tPA, produced and released by neurons,^{11,12,23} as a ligand of the GluN1 NTD leading to a specific increase of the surface dynamics of extrasynaptic NMDARs, their synaptic diffusion and subsequent neurotoxicity.

Materials and Methods

Ethical statement. Experiments were performed in accordance with French ethical laws (act no. 87-848; Ministère de l'Agriculture et de la Forêt) and European Communities Council Directives of 24 November 1986 (86/609/EEC) guidelines for the care and use of laboratory animals, and were approved by the local and regional ethics committees (authorization code CENOMEXA 0113-03). All efforts were made to limit animal suffering. None of the experimental procedures induced animal mortality except one mouse during surgery (Figure 8 condition NMDA+tPA i.v.). All experiments were performed following the ARRIVE guidelines (www.nc3rs.org.uk), including randomization for the administration of test substances as well as analyses that were performed in a blinded manner. Male mice were housed on a 12-h light (0700 hours)/dark (1900 hours) cycle with *ad libitum* access to water and rodent chow (10 mice per cage).

Chemicals. (5*R*,10*S*)-5-Methyl-10,11-dihydro-5*H*-dibenzo[*a,d*]cyclohepten-5,10-iminemaleate (MK801) and *N*-methyl-D-aspartate (NMDA), 2-amino-5-phosphonovaleic acid (AP5) were purchased from Tocris (Bristol, UK). Human tPA (Actilyse) was from Boehringer Ingelheim (Paris, France). tPA buffer was 34.84 mg/ml arginine, 10.72 mg/ml phosphoric acid and 0.1 mg/ml Tween 80. 5-Bromo-4-chloro-3-indolyl phosphate, alkaline-phosphatase-conjugated goat anti-mouse IgG, 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide, lipofectamine 2000, Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM), poly-D-lysine, laminin, glutamine, cytosine β-D-arabinoside (Ara-C), glycine, HEPES, phosphate-buffered saline (PBS) solution, Freund adjuvants, Trypan blue solution (0.4%), paraformaldehyde, anti-mouse, anti-goat/sheep peroxidase antibody, anti-β-actin (A2066) were purchased from Sigma-Aldrich (L'Isle d'Abeau, France). Goat anti-rabbit IgG and anti-mouse IgG were purchased from ThermoFisher (Villebon-sur-Yvette, France). FuGENE-6 was purchased from Promega (Charbonnières-les-Bains, France). TRITC-, FITC-, Dye Light 649 nm-conjugated secondary antibodies were purchased from Jackson ImmunoResearch Laboratories (West Grove, PA, USA). Polyclonal antibodies raised against C-terminal end of GluN1 (Cter-GluN1) subunit was purchased from Santa Cruz (sc 1467, Heidelberg, Germany). Anti-NeuN antibody was purchased from Abcam (ab131624, Paris, France). Protein A sepharose was purchased from GE Healthcare (Orsay, France). ECL-Plus detection system was purchased from PerkinElmer Life and Analytical Sciences (Cambridge, UK). Polyclonal antibodies raised against GluN1 NTD subunit was purchased from Alomone Labs (AGC 001, Jerusalem, Israel). QDs 655 labeled goat F(ab)₂ anti-mouse (Q11021) and anti-rabbit IgG (Q11421), secondary anti-mouse Alexa 568 antibody (A11004), Green MitoTracker (M7514), RPMI 1640 medium, Fura-2 AM, fetal bovine serum and horse serum, neurobasal medium, B27 supplement (50X) were purchased from Life Technologies (Saint Aubin, France). Lactate dehydrogenase (LDH) detection kit and mouse isotyping test kit were purchased from Roche Diagnostics (Mannheim, Germany). The anti-phosphorylated

Erk(1/2) and anti-Erk(1/2) antibodies were purchased from Cell Signaling (Saint Quentin Yvelines, France).

Single particle (QD) tracking and immunochemistry. Hippocampal neurons from E18 Sprague-Dawley rats were cultured as previously described.⁴⁸ Cells were plated on poly-lysine pre-coated cover slips and maintained in a 3% horse serum containing neurobasal medium. After 3 day *in vitro* (DIV), the original medium was replaced with a serum-free medium. Cultures were maintained at 37 °C in 5% CO₂. To investigate the impact of tPA on NMDAR diffusion, cultures were pre-incubated 45 min with either active tPA (300 nM, 37 °C) or tPAm (non-proteolytic tPA, 300 nM, 37 °C). QD detection and subsequent analysis were performed as previously described.⁷ Briefly, hippocampal neurons (11–12 DIV) were incubated for 10 min (37 °C) with polyclonal antibodies against GluN1 NTD subunit (Alomone Labs; 1 : 200). Neurons were then washed and incubated for 10 min (37 °C) with QDs 655 goat F(ab)₂ anti-rabbit (1 : 10 000). Green MitoTracker (1 : 1000) was used as a synaptic marker. For the data illustrated in Figure 7, neurons were incubated for 10 min (37 °C) with either the control anti-GluN1 NTD subunit (1 : 200) or the GluN1 antibody (1 : 200). The same protocol was followed, except that neurons were incubated with QD 655 goat F(ab)₂ anti-rabbit or anti-mouse. Signals were detected using an EM-CCD camera (Quantem, Roper Scientific, Evry, France). QDs were followed on randomly selected dendritic regions for up to 20 min. QD recording sessions were processed with the Metamorph software (Universal Imaging Corporation, Chester, PA, USA). Instantaneous diffusion coefficient distributions of GluN1-QD are represented using median and interquartile range. The top white portion, the line between the white and the black portions and the bottom black portion correspond of the first quartile, the median and the third quartile, respectively.

Calcium video imaging and x-link protocol in neurons. Cortical neurons were prepared from E14.5 Swiss mice as previously described.³⁵ Cortices were dissected and dissociated in DMEM, and plated on 35 mm dishes previously coated with poly-lysine (0.1 mg/ml) and laminin (0.02 mg/ml). Cells were cultured in DMEM supplemented with 5% fetal bovine serum, 5% horse serum and 2 mM glutamine. Cultures were maintained at 37 °C in 5% CO₂. Cultures were transferred into a serum-free HEPES-buffered saline solution (HBSS: NaCl 116 mM, KCl 5.4 mM, CaCl₂ 1.8 mM, MgSO₄ 0.8 mM, HEPES 12 mM, NaH₂PO₄ 0.34 mM, D-glucose 5.5 mM, NaHCO₃ 25 mM, Glycine 10 μM) at DIV 12 and loaded with 10 μM Fura-2 AM for 45 min at 37 °C. The Ca²⁺ bound form of Fura-2 gets excited at 340 nm, the Ca²⁺ unbound form at 380 nm and both recorded at 510 nm. Neurons were washed and NMDA stimulations (2 × 25–50 μM for 30 s) were applied using a peristaltic pump. Neurons were then treated with monoclonal antibodies named GluN1 antibody (10 μg/ml), and/or, its isotopic control 6C9B6 (10 μg/ml), and/or tPA (300 nM) (Figures 2 and 4, Supplementary Figure 1) and/or plasmin (100 μg/ml) (Figure 2) during 45 min. For each cell, the area under curve (AUC) corresponding to the intracellular calcium influx induced by NMDA (ratio 340/380) was calculated before (AUC_b) (mean of the two first pre-treatment stimulations) and after treatment (AUC_a) (tPA, plasmin, GluN1 antibody, 6C9B6, x-link) (mean of the 2 s post-treatment stimulations). We then compared, for each cell, the amount of NMDA-induced calcium influx (AUC) after treatment with the NMDA-induced calcium influx recorded before treatment. Thus, each cell is its own control with an expression of the modification of the NMDA-induced calcium influx because of the treatment performed between the two rounds of stimulations, expressed as a percentage of response to treatments (% of responsiveness).

$$\% \text{ of responsiveness} = [(AUC)_a / (AUC)_b] * 100$$

with (AUC)_a: sum of area under curve of Fura-2 ratio during both NMDA stimulations after treatment and (AUC)_b: sum of area under curve of Fura-2 ratio during NMDA stimulations before treatment.

Experiments were performed at room temperature, on the stage of a Leica DMI6000B inverted microscope equipped with a 150 W Xenon high stability lamp and a Leica 40 ×, 1.3 numerical aperture epifluorescence oil immersion objective (Wetzlar, Germany). Fura-2 (excitation: 340, 380 nm, emission: 510 nm) ratio images were acquired with a Digital CMOS camera (Hamamatsu, ORCA-Flash2.8 C11440-10C, Massy, France) and digitized (2048 × 2048 pixels) using Metafluor 6.1 software (Universal Imaging Corporation). For x-link procedures, neurons were treated for 15 min with primary anti-GluN1 (1 : 20) and secondary (1 : 30) antibodies (x-link) (Figure 3 and Supplementary Figure 1). The buffer of GluN1 antibody, control 6C9B6 and x-link is PBS solution.

Production and purification of monoclonal antibodies and ELISA. Eight-week-old Balb/C male mice (20–25 g) were immunized by intraperitoneal injection of immunogenic mixtures: complete Freund adjuvant (first injection) and incomplete Freund adjuvant (once a week during 3 weeks) alone (control) or containing the rHis-GluN1 NTD. Sp2/OAg14 myeloma cell line (ATCC, CRL 1581, Molsheim, France) was fused with splenocytes from selected immunized mouse according to standard protocols and fusion product was plated in culture microplates for 15 days before primary screening.

Clone selection was performed using indirect ELISA along this process: from primary screening, confirmation to sub-cloning screenings. Antigens used were rHis-GluN1 NTD and His-mock as negative control. After primary screening and confirmation, two antibody-producing hybridomas were identified and were sub-cloned twice then frozen in liquid nitrogen. Monoclonal antibodies were produced *in vitro* after collecting concentrated supernatants. Purifications were done by affinity chromatography on protein A sepharose. The mAbs were isotyped with a mouse isotyping test kit according to the manufacturer's recommendations.

6C9B6 is a clone produced in parallel to Glunomab. Like Glunomab, it binds recombinant NTD of GluN1, but it does not block the capacity of tPA to bind to and promote NMDAR signaling, thus targeting a different epitope than GluN1.

Immunoblotting and immunoprecipitation. Proteins (20 μ g) were resolved on 7.5% SDS-PAGE blots under denaturing conditions and transferred onto a polyvinylidene difluoride membrane. Membranes were blocked with Tris-buffered saline (10 mM Tris and 200 mM NaCl, pH 7.4) containing 0.05% Tween 20 and 0.4% BSA. Blots were incubated overnight with primary antibodies: Glunomab (clone 15A4B2, 0.5 mg/ml, 1 : 1000) or Cter-GluN1 antibody (1 : 250). After incubation with the anti-mouse or anti-goat peroxidase-conjugated secondary antibody, proteins were visualized with an enhanced chemiluminescence ECL-Plus detection system. For the immunoprecipitation, supernatants from TNT buffer (50 mM Tris-HCl, pH 7.4, 150 mM NaCl, and 0.5% Triton 100X)-lysed tissues or cultures (500 μ g of proteins) were incubated overnight at 4 °C in the presence of the Cter-GluN1 antibody (2 μ g). Samples were then coupled to protein G-sepharose beads as described by the manufacturer (GE Healthcare, Orsay, France). Proteins were separated by 7.5% SDS-PAGE, blots were exposed in the presence of Glunomab (1 : 1000) and revealed following the procedure of immunoblotting described above.

Immunohistochemistry. Adults mice (Swiss males; 35–45 g) and rats (Sprague-Dawley males, 350–400 g) were deeply anesthetized and perfused transcardially with 4% paraformaldehyde in 150 ml or 400 ml of 0.1M sodium phosphate buffer, respectively. Coronal sections of brain and liver (10 μ m) were incubated overnight at room temperature with Glunomab (1 : 500), anti-Cter-GluN1 antibody (1 : 400) and anti-NeuN antibody (1 : 250). Detection was performed using F(ab')₂ fragments of donkey anti-goat linked TRITC, anti-mouse linked FITC or anti-chicken linked Dylight 649 nm (1 : 600). All sections were examined with a Leica DM6000 microscope. Images were captured using a CoolSnap camera and visualized with Metavue 5.0 software (Molecular Devices, Sunnyvale, CA, USA).

Epitope mapping and Alascan. Epitope mapping and Alascan are presented in Supplementary Figure 3. A total of 141 overlapping pentadecapeptides, frame-shifted by three or one residue covering the entire amino-acid sequence of GluN1 NTD (residues 19–371), were prepared using the Spot technique according to the protocol previously described by Laune et al.⁴⁹ Briefly, peptides were assembled using Fmoc chemistry on a cellulose membrane containing an aminopolyethyleneglycol moiety. The C-terminal residue of each peptide was coupled to the moiety. After Fmoc deprotection, the other amino acids were sequentially added as in conventional solid-phase peptide synthesis. Finally, the side-chain protecting groups were removed by trifluoroacetic acid treatment in the presence of appropriate scavengers, whereas the linkage of the peptides to the membrane was maintained. Free cysteines were replaced with non-reactive acetamidomethyl cysteines. Once reactive peptides were identified, alanine scanning of positive sequences was performed to identify key residues contributing to the epitope; signal extinction indicated a key contribution of the aa whereas a decrease in the signal meant partial contribution to the epitope.

Purified mAbs were incubated on the membrane, and then antibody binding was detected by using an alkaline-phosphatase-conjugated goat anti-mouse IgG. For staining, 5-bromo-4-chloro-3-indolyl phosphate (BCIP) and 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) were used as substrates. A blue precipitate was observed on peptides to which the antibody was bound. To allow the

re-use of the membrane, it was sequentially treated with dimethylformamide, then 1% SDS, 0.1% 2-mercaptoethanol in 8 M urea, then ethanol/water/acetic acid (50 : 40 : 10 vol/vol/vol) and, finally, ethanol in order to remove the precipitated dye and molecules bound to the peptides.

Transfection and calcium video imaging in HEK-293 cells. Human embryonic kidney 293 cells (HEK-293 cells) were grown in RPMI 1640 supplemented with 5% fetal bovine serum and with NMDA antagonists (200 μ M AP5 and 2 mM MgCl₂). Cells were transfected by lipofection (8 μ l, FuGENE-6), with a mixture containing 2 μ g of GluN1-1b WT (or GluN1-1b K178V or GluN1-1b K190V; Figure 5) and 2 μ g of GluN2A or with tPA WT or tPA K2* (Figure 6). Transfected HEK-293 cells were loaded with 10 μ M fura-2 AM for 30 min at 37 °C in HBSS containing 0.1% pluronic F-127, 20% solution in DMSO, AP5 (200 μ M) and MgCl₂ (2 mM) and then incubated for an additional 45-min period in HBSS prior recording. We used the same set up and data analysis as mentioned in the methods section for calcium video imaging in neurons. Concentrations of tPA and Glunomab were also of 300 nM and 10 μ g/ml, respectively. NMDA exposures were performed at 100 μ M for 30 s and the duration of treatments was of 20 min between the two rounds of NMDA stimulations.

Site-directed mutagenesis. Mutagenesis of rat wt-GluN1-1b (GluN1-1b K178V or GluN1-1b K190V) was performed with the QuikChange XL Kit (VWR International France, Fontenay-sous-Bois, France) and the following primers: 5'-GGCAGCGCAGtGCGCTTGGAG-3' and 5'-CGTCCCTCGTGGTCTGTCG-3' (to GluN1-1b K178V), 5'-ACGGGAGTCCgtgAGTAAAAAGGAACATATG-3' and 5'-TCCTCCAGCAACGTCTCC-3' (to GluN1-1b K190V). Mutations were confirmed by sequence analysis. Site-directed mutagenesis strategy in K2 domain of tPA sequencing procedure have been described previously.³³

Excitotoxic neuronal death. Cultures of cortical neurons at 12–13 DIV were prepared in same way as that reported above for calcium video imaging. Neurons were rinsed three times with serum-free medium and as previously described.³⁵ Excitotoxicity was induced by exposure to NMDA (12.5 μ M) for 24 h. NMDA was applied alone or together with tPA (300 nM) and/or Glunomab (0.1, 1 or 10 μ g/ml). Twenty-four hours later, neuronal death was quantified by measurement of LDH released from damaged cells.

In vivo excitotoxic lesions. Twelve-week-old Swiss mice (male) were anesthetized (2% of isoflurane in 1/3 O₂ and 2/3 N₂O) and placed in a stereotaxic frame prior injection. A cortical unilateral injection (coordinates: 0.5 mm posterior, 3.0 mm lateral, –0.8 mm ventral to the bregma; stereotaxic atlas G Paxinos & KBJ Franklin) of NMDA (10 nmoles, 1 μ l) was performed. Fifteen minutes after the excitotoxic lesion, a 200 μ l intravenous bolus injection of tPA (10 mg/kg) or saline with or without Glunomab (160 μ g) was given via a catheter previously inserted into the tail vein. Solutions were injected by the use of a micropipette made with hematologic micropipettes. Twenty-four hours later, mice were killed and the brains removed and frozen in isopentane. Cryostat-cut coronal brain sections (20 μ m) were stained with thionine and a volumetric analysis of brain lesions was performed with the Image J software (NIH software, National Institute of Health, Bethesda, MD, USA). Region of interest were determined through the use of a stereotaxic atlas for the mouse and an image analysis system (Scion Image Scion Corporation, Frederick, MD, USA) was used to measure lesion corresponding to the nonstained area ($n = 7, 8$ or 9 per group).

P-Erk(1/2)-dependent NMDAR signaling. Erk(1/2) activation by phosphorylation was used as an index of NMDAR signaling. NMDARs were activated by exposure of the primary neuronal cultures to NMDA (50 μ M), tPA (300 nM) and Glunomab (10 μ g/ml) either alone or in combination. After 5 min of treatment, cells were chilled on ice and lysed in buffer containing Tris-NaCl-Triton 1% of protease inhibitor cocktail and 1% of phosphatase inhibitor cocktail. Lysates were clarified by centrifugation at 13 000 g, for 10 min at 4 °C. Proteins were quantified and immunoblotted using adequate primary antibodies (anti-phosphorylated Erk(1/2) and anti-Erk(1/2), 1 : 1000) followed by incubation with the appropriate peroxidase-conjugated secondary antibody. Erk(1/2) and p-Erk(1/2) levels were investigated by running separate gels from the same protein extracts.

Statistical analysis. Normality was tested for all analyses of variance. The instantaneous diffusion coefficients (Figures 1d and 7e) is reported as the median \pm 25–75% (interquartile range, IQR). The other data of Figures 1 and 7 are

tPA promotes the dynamics of extrasynaptic NMDAR

F Lesept et al

14

expressed as mean \pm S.E.M. Comparisons between groups for instantaneous diffusion coefficient were performed with Kruskal–Wallis test followed by Dunn's multiple comparison test as post-hoc test. Comparison between extrasynaptic fractions (Figure 1e) was performed with one-way ANOVA. Significance levels were defined as * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ and not significant (NS). For calcium video imaging of neurons (Figures 2,3 and 4 and Supplementary Figure 1) and of HEK-293 cells (Figures 5 and 6), the responsiveness was analyzed by Wilcoxon signed-rank test to compare pre- and post-incubation NMDA responses. Significance levels were defined as # $P < 0.0001$ (for neurons experiments) and * $P < 0.01$ (for HEK-293 cells experiments). In addition, for group comparison, Kruskal–Wallis tests were used followed by Mann–Whitney U -tests as post-hoc tests, significance levels were defined as * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$, **** $P < 0.0001$ and NS. Results are expressed as mean \pm S.E.M. For Elisa (Figure 4), the excitotoxic neuronal death (Figures 8a and b), *in vivo* excitotoxic lesions (Figure 8d), P-Erk (1/2)-dependent NMDAR signaling (supplementary Figure 4), Kruskal–Wallis tests were used followed by Mann–Whitney U -test as post-hoc test. Results are expressed as mean \pm S.E.M., significance levels was defined as * $P < 0.05$ and NS.

Conflict of Interest

DV, CA, K-UP and RM are co-inventors on the following patent 'Treatment of neurological or neurodegenerative disorders' (WO2011023250A1). The original patent WO2011023250A1 was completed and now published under the number WO2014187879A2 (additional references: EP2805972A1, WO2014187879A3). The present invention relates to the field of antibodies. In particular, it provides an anti-NMDA antibody or fragment or derivative thereof which is effective in inhibiting the deleterious effects of tissue-type plasminogen activator (tPA) mediated by *N*-methyl-D-aspartate (NMDA) receptors being toxic to neurons and inflicting damage to the neurovascular unit/blood–brain barrier (BBB) or regulating it in a way that leads to pathological consequences.

Acknowledgements. We thank N Colloc'h for her help and expertise in using the software PYMOL, S Cobo for technical assistance. We thank also F Docagne, B Roussel and A Young for their comments and help for editing. This work was supported by grants from the INSERM (French National Institute for Health and Medical Research), TC2N (European Trans Channel Neuroscience Network), FP7 ERANET-NEURON network 3-275-006, Equipe FRM N°DEQ20140329555, the Regional Council of Lower Normandy, the CNRS (Centre National Recherche Scientifique) and the IDEX Bordeaux.

- Paoletti P, Bellone C, Zhou Q. NMDA receptor subunit diversity: impact on receptor properties, synaptic plasticity and disease. *Nat Rev Neurosci* 2013; **14**: 383–400.
- Hardingham GE, Bading H. Synaptic versus extrasynaptic NMDA receptor signalling: implications for neurodegenerative disorders. *Nat Rev Neurosci* 2010; **11**: 682–696.
- Groc L, Heine M, Cousins SL, Stephenson FA, Lounis B, Cognet L et al. NMDA receptor surface mobility depends on NR2A-2B subunits. *Proc Natl Acad Sci USA* 2006; **103**: 18769–18774.
- Bard L, Sainlos M, Bouchet D, Cousins S, Mikasova L, Breillat C et al. Dynamic and specific interaction between synaptic NR2D-NMDA receptor and PDZ proteins. *Proc Natl Acad Sci USA* 2010; **107**: 19561–19566.
- Triller A, Choquet D. Surface trafficking of receptors between synaptic and extrasynaptic membranes: and yet they do move! *Trends Neurosci* 2005; **28**: 133–139.
- Michaluk P, Mikasova L, Groc L, Frischknecht R, Choquet D, Kaczmarek L. Matrix metalloproteinase-9 controls NMDA receptor surface diffusion through integrin beta1 signaling. *J Neurosci* 2009; **29**: 6007–6012.
- Groc L, Lafourcade M, Heine M, Renner M, Racine V, Sibarita JB et al. Surface trafficking of neurotransmitter receptor: comparison between single-molecule/quantum dot strategies. *J Neurosci* 2007; **27**: 12433–12437.
- Papouin T, Ladépêche L, Ruel J, Sacchi S, Labasque M, Hanini M et al. Synaptic and extrasynaptic NMDA receptors are gated by different endogenous coagonists. *Cell* 2012; **150**: 633–646.
- Cull-Candy SG, Leszkiewicz DN. Role of distinct NMDA receptor subtypes at central synapses. *Sci STKE* 2004; **re16**.
- Zhu S, Stroebel D, Yao CA, Taly A, Paoletti P. Allosteric signaling and dynamics of the clamshell-like NMDA receptor GluN1 N-terminal domain. *Nat Struct Mol Biol* 2013; **20**: 477–485.
- Shin CY, Kundel M, Wells DG. Rapid, activity-induced increase in tissue plasminogen activator is mediated by metabotropic glutamate receptor-dependent mRNA translation. *J Neurosci* 2004; **24**: 9425–9433.
- Siao CJ, Fernandez SR, Tsirka SE. Cell type-specific roles for tissue plasminogen activator released by neurons or microglia after excitotoxic injury. *J Neurosci* 2003; **23**: 3234–3242.
- Lemarchant S, Pruvost M, Hébert M, Gauberti M, Hommet Y, Briens A et al. tPA promotes ADAMTS-4-induced CSPG degradation, thereby enhancing neuroplasticity following spinal cord injury. *Neurobiol Dis* 2014; **66C**: 28–42.
- Bukhari N, Torres L, Robinson JK, Tsirka SE. Axonal regrowth after spinal cord injury via chondroitinase and the tissue plasminogen activator (tPA)/plasmin system. *J Neurosci* 2011; **31**: 14931–14943.
- Yepes M, Roussel BD, Ali C, Vivien D. Tissue-type plasminogen activator in the ischemic brain: more than a thrombolytic. *Trends Neurosci* 2009; **32**: 48–55.
- Polavarapu R, Gongora MC, Yi H, Ranganathan S, Lawrence DA, Strickland D et al. Tissue-type plasminogen activator-mediated shedding of astrocytic low-density lipoprotein receptor-related protein increases the permeability of the neurovascular unit. *Blood* 2007; **109**: 3270–3278.
- Samson AL, Medcalf RL. Tissue-type plasminogen activator: a multifaceted modulator of neurotransmission and synaptic plasticity. *Neuron* 2006; **50**: 673–678.
- Madani R, Hulo S, Toni N, Madani H, Steimer T, Muller D et al. Enhanced hippocampal long-term potentiation and learning by increased neuronal expression of tissue-type plasminogen activator in transgenic mice. *EMBO J* 1999; **18**: 3007–3012.
- Pawlak R, Nagai N, Urano T, Napiorkowska-Pawlak D, Ihara H, Takada Y et al. Rapid, specific and active site-catalyzed effect of tissue-plasminogen activator on hippocampus-dependent learning in mice. *Neuroscience* 2002; **113**: 995–1001.
- Pawlak R, Magarinos AM, Melchor J, McEwen B, Strickland S. Tissue plasminogen activator in the amygdala is critical for stress-induced anxiety-like behavior. *Nat Neurosci* 2003; **6**: 168–174.
- Lot G, Roussel BD, Lebeurrier N, Benchenane K, López-Atalaya JP, Vivien D et al. Tissue-type plasminogen activator rescues neurons from serum deprivation-induced apoptosis through a mechanism independent of its proteolytic activity. *J Neurochem* 2006; **98**: 1458–1464.
- Nicole O, Docagne F, Ali C, Margail I, Carmeliet P, MacKenzie ET et al. The proteolytic activity of tissue-plasminogen activator enhances NMDA receptor-mediated signaling. *Nat Med* 2001; **7**: 59–64.
- Wu F, Wu J, Nicholson AD, Echeverry R, Haile WB, Catano M et al. Tissue-type plasminogen activator regulates the neuronal uptake of glucose in the ischemic brain. *J Neurosci* 2012; **32**: 9848–9858.
- Samson AL, Nevin ST, Croucher D, Niego B, Daniel PB, Weiss TW et al. Tissue-type plasminogen activator requires a co-receptor to enhance NMDA receptor function. *J Neurochem* 2008; **107**: 1091–1101.
- Groc L, Heine M, Cognet L, Brickley K, Stephenson FA, Lounis B et al. Differential activity-dependent regulation of the lateral mobilities of AMPA and NMDA receptors. *Nat Neurosci* 2004; **7**: 695–696.
- Heine M, Groc L, Frischknecht R, Bèique JC, Lounis B, Rumbaugh G et al. Surface mobility of postsynaptic AMPARs tunes synaptic transmission. *Science* 2008; **320**: 201–205.
- Groc L, Choquet D, Chauloff F. The stress hormone corticosterone conditions AMPAR surface trafficking and synaptic potentiation. *Nat Neurosci* 2008; **11**: 868–870.
- Dupuis JP, Ladépêche L, Seth H, Bard L, Varela J, Mikasova L et al. Surface dynamics of GluN2B-NMDA receptors controls plasticity of maturing glutamate synapses. *EMBO J* 2014; **33**: 842–861.
- Mikasova L, De Rossi P, Bouchet D, Georges F, Rogemond V, Didelot A et al. Disrupted surface cross-talk between NMDA and Ephrin-B2 receptors in anti-NMDA encephalitis. *Brain* 2012; **135**: 1606–1621.
- Macrez R, Obiang P, Gauberti M, Roussel B, Baron A, Parcq J et al. Antibodies preventing the interaction of tissue-type plasminogen activator with N-methyl-D-aspartate receptors reduce stroke damages and extend the therapeutic window of thrombolysis. *Stroke* 2011; **42**: 2315–2322.
- Kvajjo M, Albrecht H, Meins M, Hengst U, Troncoso E, Lefort S et al. Regulation of brain proteolytic activity is necessary for the in vivo function of NMDA receptors. *J Neurosci* 2004; **24**: 9734–9743.
- Benchenane K, Castel H, Boulouard M, Bluthé R, Fernandez-Monreal M, Roussel BD et al. Anti-NR1 N-terminal-domain vaccination unmasks the crucial action of tPA on NMDA-receptor-mediated toxicity and spatial memory. *J Cell Sci* 2007; **120**: 578–585.
- Parcq J, Bertrand T, Baron AF, Hommet Y, Anglès-Cano E, Vivien D et al. Molecular requirements for safer generation of thrombolytics by bioengineering the tissue-type plasminogen activator A chain. *J Thromb Haemost* 2013; **11**: 539–546.
- López-Atalaya JP, Roussel BD, Ali C, Maubert E, Petersen KU, Berezowski V et al. Recombinant Desmodus rotundus salivary plasminogen activator crosses the blood-brain barrier through a low-density lipoprotein receptor-related protein-dependent mechanism without exerting neurotoxic effects. *Stroke* 2007; **38**: 1036–1043.
- Baron A, Montagne A, Cassé F, Launay S, Maubert E, Ali C et al. NR2D-containing NMDA receptors mediate tissue plasminogen activator-promoted neuronal excitotoxicity. *Cell Death Differ* 2010; **17**: 860–871.
- Fernández-Monreal M, López-Atalaya JP, Benchenane K, Cacquevel M, Dulin F, Le Caer JP et al. Arginine 260 of the amino-terminal domain of NR1 subunit is critical for tissue-type plasminogen activator-mediated enhancement of N-methyl-D-aspartate receptor signaling. *J Biol Chem* 2004; **279**: 50850–50856.

tPA promotes the dynamics of extrasynaptic NMDARF Lesept *et al*

15

37. Yuan H, Vance KM, Junge CE, Geballe MT, Snyder JP, Hepler JR *et al*. The serine protease plasmin cleaves the amino-terminal domain of the NR2A subunit to relieve Zinc inhibition of the N-methyl-D-aspartate receptors. *J Biol Chem* 2009; **284**: 12862–12873.
38. Ng KS, Leung HW, Wong PT, Low CM. Cleavage of the NR2B subunit amino terminus of N-methyl-D-aspartate (NMDA) receptor by tissue plasminogen activator: identification of the cleavage site and characterization of ifenprodil and glycine affinities on truncated NMDA receptor. *J Biol Chem* 2012; **287**: 25520–25529.
39. Mony L, Zhu S, Carvalho S, Paoletti P. Molecular basis of positive allosteric modulation of GluN2B NMDA receptors by polyamines. *EMBO J* 2011; **30**: 3134–3146.
40. Tomitori H, Suganami A, Saiki R, Mizuno S, Yoshizawa Y, Masuko T *et al*. Structural changes of regulatory domain heterodimer of N-methyl-D-aspartate receptor subunits GluN1 and GluN2B through the binding of spermine and ifenprodil. *J Pharmacol Exp Ther* 2012; **343**: 82–90.
41. Zhu S, Paoletti P. Allosteric modulators of NMDA receptors: multiple sites and mechanisms. *Curr Opin Pharmacol* 2015; **20**: 14–23.
42. Lau C G, Zukin R S. NMDA receptor trafficking in synaptic plasticity and neuropsychiatric disorders. *Nat Rev Neurosci* 2007; **8**: 413–426.
43. Bard L, Groc L. Glutamate receptor dynamics and protein interaction: lessons from the NMDA receptor. *Mol Cell Neurosci* 2011; **48**: 298–307.
44. Obiang P, Macrez R, Jullienne A, Bertrand T, Lesept F, Ali C *et al*. GluN2D subunit-containing NMDA receptors control tissue plasminogen activator-mediated spatial memory. *J Neurosci* 2012; **32**: 12726–12734.
45. Bertrand T, Lesept F, Chevilly A, Lenoir S, Aimable M, Briens A *et al*. Conformations of tissue plasminogen activator (tPA) orchestrate neuronal survival by a crosstalk between EGFR and NMDAR. *Cell Death Dis* 2015; **6**: e1924.
46. Wu F, Echeverry R, Wu J, An J, Haile WB, Cooper DS *et al*. Tissue-type plasminogen activator protects neurons from excitotoxin-induced cell death via activation of the ERK1/2-CREB-ATF3 signaling pathway. *Mol Cell Neurosci* 2013; **52**: 9–19.
47. Parsons MP, Raymond L. Extrasynaptic NMDA receptor involvement in central nervous system disorders. *Neuron* 2014; **82**: 279–293.
48. Ladepeche L, Dupuis JP, Bouchet D, Doudnikoff E, Yang L, Campagne Y *et al*. Single-molecule imaging of the functional crosstalk between surface NMDA and dopamine D1 receptors. *Proc Natl Acad Sci USA* 2013; **110**: 18005–18010.
49. Laune D, Molina F, Ferrières G, Villard S, Bès C, Fleunier F *et al*. Application of the Spot method to the identification of peptides and amino acids from the antibody paratope that contribute to antigen binding. *J Immunol Methods* 2002; **267**: 53–70.
50. Farina AN, Blain KY, Maruo T, Kwiatkowski W, Choe S, Nakagawa T. Separation of domain contacts is required for heterotetrameric assembly of functional NMDA receptors. *J Neurosci* 2011; **31**: 3565–3579.



Cell Death and Disease is an open-access journal published by **Nature Publishing Group**. This work is licensed under a **Creative Commons Attribution 4.0 International License**. The images or other third party material in this article are included in the article's Creative Commons license, unless indicated otherwise in the credit line; if the material is not included under the Creative Commons license, users will need to obtain permission from the license holder to reproduce the material. To view a copy of this license, visit <http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>

© The Author(s) 2016

Supplementary Information accompanies this paper on Cell Death and Disease website (<http://www.nature.com/cddis>)

Article 5: Store-operated channels/mTOR/Mcl-1 pathway inhibition by carboxyamidotriazole sensitizes ovarian carcinoma cells to anti-Bcl_{xL} strategies.

L'inhibition de la voie SOCE/mTORC1/Mcl-1, par le carboxyamidotriazole (CAI), permet une sensibilisation des cellules cancéreuses ovariennes pour des stratégies thérapeutiques anti-Bcl-x_L.

Article en cours de préparation

Contexte bibliographique :

Le cancer ovarien est la principale cause de cancers gynécologiques et son mauvais pronostic nécessite la mise en place de nouvelles stratégies thérapeutiques pour surmonter la chimiorésistance. Les protéines anti-apoptotiques Bcl-x_L et Mcl-1 ont été identifiées comme des cibles clés pour tuer les cellules cancéreuses ovariennes. De plus, le développement de molécules pharmacologiques comme BH3 s'est avéré très efficace pour inhiber Bcl-x_L. Cependant, Mcl-1 reste un obstacle pour le succès de ces stratégies et l'inhibition de son expression représente donc un défi dans la recherche sur le cancer de l'ovaire. La traduction de Mcl-1 pourrait être diminuée par l'inhibition mTORC1, d'ailleurs plusieurs études ont montré que la signalisation calcique permettrait de réguler l'activité de mTORC1. Parmi les inhibiteurs des canaux calciques utilisés dans les essais cliniques, il a été démontré que le carboxyamidotriazole (CAI) stabilise la rechute du cancer de l'ovaire lorsqu'il est utilisé en monothérapie.

Objectifs de l'étude :

Au cours de cette étude, nous avons voulu regarder si l'inhibition des canaux calciques : SOCE par le CAI, permettait une inhibition de mTORC1 et donc une diminution de la traduction de Mcl-1.

Principaux résultats :

- ✓ CAI inhibe l'expression de Mcl-1 *in vitro* et *ex vivo* ;
- ✓ L'inhibition de la voie SOCE/mTORC1 par CAI1 en combinaison avec une inhibition de Bcl-x_L provoquent une apoptose des cellules cancéreuses ovariennes.

Store-operated channels/mTOR/Mcl-1 pathway inhibition by carboxamidotriazole sensitizes ovarian carcinoma cells to anti-Bcl_{xL} strategies

Marie-Laure Bonnefond^{1,2}, Romane Florent^{1,2}, Sophie Lenoir³, Nicolas Elie^{1,4},
Bernard Lambert^{1,2,5}, Edwige Abeilard^{1,2}, Florence Giffard^{1,2}, Marie-Hélène Louis^{1,2}, Mélanie Briand^{1,2,6},
Denis Vivien³, Laurent Poulain^{1,2}, Pascal Gauduchon^{1,2,3}, Monique N'Diaye^{1,2*}

¹Normandie Univ, UNICAEN, INSERM U1086 ANTICIPE (Interdisciplinary Research Unit for Cancers Prevention and Treatment, BioTICLA axis (Biology and Innovative Therapeutics for Ovarian Cancers), Caen, France

²UNICANCER, Comprehensive Cancer Center François Baclesse, BioTICLA lab, Caen, France

³Normandie Univ, UNICAEN, INSERM UMR-S 1237 - Physiopathologie et imagerie des troubles neurologiques (PhIND), tPA and Neurovascular Disorders team, Caen, France

⁴Normandie Univ, UNICAEN, Centre de Microscopie Appliqué à la Biologie (CMabio, Structure Fédérative 4206 ICORE)

⁵CNRS

⁶Centre de Ressources Biologiques « OvaRessources », François Baclesse Comprehensive Cancer Centre, Caen, France

*Corresponding Author: Dr Monique N'Diaye; e-mail: monique.ndiaye@unicaen.fr

Running title:

Abbreviations: 4E-BP1: eukaryotic translation initiation factor 4E (eIF4E)-binding protein; [Ca²⁺]_i: intracytosolic calcium concentration; CAI: Carboxyamidotriazole; CaM: Calmodulin; IP3R: Inositol Trisphosphate Receptor; mTORC1/2: mammalian Target Of Rapamycin Complex 1 / 2; p70S6K: p70 S6 kinase; PARP: Poly(ADP-ribose) polymerase; PI3K: phosphatidylinositol 3-kinase; STIM: stromal interaction molecule, ORAI: calcium release-activated calcium modulator; SERCA: sarco/endoplasmic reticulum Ca²⁺-ATPase; SOCE: Store-Operated Calcium Entry; TRP: Transient Receptor Potential

Key words: ovarian cancer, SOCE, mTORC1, Mcl-1, calcium signal, ABT-737, apoptosis

Abstract

Ovarian cancer is the leading cause of gynecologic cancer and its poor prognosis requires novel therapeutic strategies to overcome natural and acquired chemoresistance. The anti-apoptotic proteins Bcl-x_L and Mcl-1 have been identified as key targets to kill ovarian cancer cells and development of pharmacological molecules as BH3-mimetics (e.i. ABT-737) were proved to be extremely efficient to inhibit Bcl-x_L. However, Mcl-1 remains a hurdle to the success of these strategies and inhibiting Mcl-1 expression or activation constitutes a challenge for ovarian cancer research. Mcl-1 translation could be down-regulated through mTORC1 inhibition and among the pathway that could regulate its activity calcium signaling emerged as an attractive strategy. Actually, calcium signaling is profoundly remodeled during carcinogenesis and we and other previously demonstrated that it could control mTORC1 activation. Among calcium channel inhibitors used in clinical trial, carboxyamidotriazole (CAI) was shown to stabilize relapse ovarian cancer when used as a single agent.

This study highlighted that this calcium channel inhibitor down-regulated Mcl-1 expression *in vitro* and in *ex vivo* patient tumors. The molecular pathway involved Store-Operated Calcium Entry (SOCE) and mTORC1 inhibition and combination of CAI with anti-Bcl-x_L strategies elicited a massive apoptosis of ovarian carcinoma cells. Its effect on mTORC1 and Mcl-1 was mimicked by the potent SOCE inhibitor, YM58483, which also triggered a massive apoptosis when combined to ABT-737. Taken together, this study suggests that CAI *via* its action on Mcl-1 could sensitize to anti-Bcl-x_L strategies and that modulating SOCE could extent the therapeutic arsenal for ovarian cancer treatment.

Introduction

In spite of a low incidence in the population, epithelial ovarian carcinoma (EOC) is the fifth-leading cause of cancer-related deaths in women. It is estimated that in 2016, there will be more than 22440 new cases of ovarian cancers and 14080 deaths in United States [1]. The standard treatment consists of a surgical resection of the tumor mass as complete as possible and a platinum-based chemotherapy in combination with paclitaxel [2]. Despite a good response to the first line chemotherapy, 80% of patients will relapse during the first 18 months due to inherent or acquired chemoresistance. Escape from apoptosis is one of the major hallmarks of cancer cells and is frequently due to alteration of the ratio of [anti- versus pro-apoptotic] members of the Bcl-2 family that leads to an increase in apoptotic threshold upon oncogenic stress [3]. This anti-apoptotic dependence could be considered as a therapeutic opportunity and it is widely accepted that targeting anti-apoptotic members is a relevant strategy to induce apoptosis in many types of cancer [4]. Our group previously showed that the anti-apoptotic proteins Mcl-1 and Bcl-x_L were able to cooperate to allow ovarian carcinoma cells to overcome stress-induced chemotherapy and that the concomitant inhibition of Mcl-1 and Bcl-x_L activity is sufficient to induce apoptosis in ovarian cancer cells without the requirement of chemotherapy [5-7]. These proteins are now considered as relevant targets for the treatment of chemoresistant ovarian cancers and the identification of adequate strategies for their efficient inhibition constitutes an exciting challenge.

The crucial role of Bcl-x_L in the chemoresistance of cancers has favored the development of many tools to counteract its anti-apoptotic effect such as BH3-mimetics. These molecules that mimic the BH3 domain are able to hinder the function of anti-apoptotics proteins by binding their hydrophobic groove. Among these molecules, ABT-263 (Navitoclax), the orally administrable derivative of ABT-737, is currently undergoing Phase I and II clinical trials in different locations including ovarian cancer (NCT02591095). However ABT-737 does not target Mcl-1 and overexpression of this protein constitutes a hurdle to ABT-737-induced apoptosis in several cancer types including ovarian cancer [6].

Several strategies have been tested to inhibit Mcl-1 expression or activity and whereas researches on BH3-mimetics that specifically target Mcl-1 are still in development, the benefit of PI3K/Akt/mTOR inhibitors to control Mcl-1 expression was investigated. Actually, this survival pathway is overexpressed in almost half of high-grade serous ovarian tumors and constitutes a key target for gynecological cancer therapy [8-10]. Moreover mTORC1 was demonstrated to induce Mcl-1 translation through 4-EBP1 phosphorylation [11, 12]. These arguments allowed the development of numerous PI3K/Akt/mTOR inhibitors that displayed anti-tumoral activities, either used as single agents [13, 14] or in therapeutic combinations. In this context, the rational of combining PI3K/Akt/mTOR inhibitor with ABT-737 appeared strongly efficient to induced apoptosis in various cancer types including ovarian cancers *in vitro* and *in vivo* PDX models [14-18]. Among the different possibilities to impede PI3K/Akt/mTOR activation, the role of calcium has emerged for several years and appeared to be particularly attractive.

Calcium is the most important second messenger in the cell and it regulates fundamental physiological events as gene expression, survival but also cell death. Its impact on the cell destiny relies on its finely regulation of the amplitude and/or the frequency of its signal [19-22]. As cancer cells require intense

metabolism for their growth and motility, carcinogenesis often comes along with the modulation of calcium homeostasis (via modulation of calcium channels and pumps) for supplying cancer cells' needs and activates pro-survival pathways [22-24]. In this context, several studies have highlighted that mTORC1 was a target for calcium. [25-32] and we showed that calcium chelation by BAPTA-AM and calmodulin inhibition by W7 led to Mcl-1 decrease *via* mTORC1/4E-BP1 pathway down-regulation and sensitized ovarian cancer cells to anti-Bcl-x_L strategies [33].

Modulating calcium signaling is now viewed as an emerging anti-tumoral strategy and few calcium inhibitors have been included in clinical trials [21, 22]. One of the compounds evaluated, carboxyamidotriazole (CAI) was shown to have anti-tumoral and anti-angiogenic properties *in vitro* and *in vivo* that was linked to its ability to inhibit calcium channels [34-42]. This molecule has reached several phase II clinical trials and had shown encouraging results for ovarian carcinoma as it was demonstrated to stabilize for more than 6 months 31 % of patients with relapsed ovarian cancer [43]. As we previously showed that Mcl-1 was a target for calcium inhibitor, we wanted to assess if CAI used in clinical trial could modulate its expression, what are the potential molecular mechanism involved and if CAI could sensitize platinum-refractory ovarian cancer cells to anti-Bcl-x_L strategies.

Material and methods

Cell culture

The human platinum-resistant ovarian carcinoma cell lines IGROV1-R10, OVCAR3, and SKOV3 were used. IGROV1-R10 was established as described previously (34) from the IGROV1 cell line, kindly provided by Dr. Jean Bénard (Institut Gustave Roussy, Villejuif, France). OVCAR3 and SKOV3 were obtained from the ATCC. The cell lines were authenticated in April 2016 by Microsynth who compared their STR profiles with the ATCC database. They were grown in RPMI1640 medium (Gibco) supplemented with 2 mM Glutamax™, 25mM HEPES, 10% FBS (Gibco) and 33 mM sodium bicarbonate and were maintained in a 5% CO₂ humidified atmosphere at 37°C.

Reagents:

CAI, YM58493, thapsigargin were provided by Tocris (R&D Systems). ABT-737 was supplied by Selleckem and Bortezomib (Velcade®) was supplied by Millennium Pharmaceuticals. Fura-2AM was purchased from Thermo Fisher Scientific. These compounds were commonly stored as stock solutions in DMSO at -20°C.

Proliferation analysis:

Cell number and viability were estimated by a semi-automated image-based cell analyzer (Cedex XS Analyzer, Roche Applied Science, Meylan, France) using the Trypan blue exclusion method.

Cell cycle analysis by flow cytometry:

Adherent and floating cells were pooled, washed with phosphate-buffered saline (PBS 1X) and fixed with ethanol 70%. Cells were then centrifuged at 2000 r.p.m. for 5 min and incubated for 30 min at 37°C in PBS 1X, to allow the release of low-molecular weight DNA. Cell pellets were stained with propidium iodide using the DNA Prep Coulter Reagent Kit (Beckman-Coulter). Samples were analyzed using Gallios flow cytometer (Beckman Coulter).

Western-Immunoblotting:

Cells were rinsed with ice-cold PBS 1X and lysed in Lysis buffer (15 mM HEPES, 50 mM KCl, 10 mM NaCl, 1 mM MgCl₂, 0,25% glycerol, 0.5% laurylmaltoside, 5 μM GDP, 1 μM microcystin (Enzo Life Sciences), 1 mM sodium orthovanadate and cOmplete Protease Inhibitor Cocktail (Sigma-Aldrich/Roche). After centrifugation, proteins were quantified using the Bradford assay (Bio-Rad, CA). Thirty micrograms of proteins were separated by SDS-PAGE (Biorad) and transferred to PVDF-membranes (Millipore). After blocking, membranes were incubated overnight at 4°C with the following primary antibodies: anti-Noxa (#114C307, Calbiochem), anti-Bcl 2 (#M0887, DAKO), anti-actin (MAB1501, Merck Millipore), anti-Mcl-1 (#5453), anti-Bcl-x_L (#2764), PARP(#9542), Bim (#2819), Puma ((#12450), caspase-3 (#9662), p-Akt(thr308; #13038), p-Akt(ser473; #4060), Akt (#9272), p-4E-BP1(Thr70; #4370), 4E-BP1 (#9644), p-p70S6K(Thr389; #9205) and p70S6K (#9202), p-mTORC1(Ser2448 ; #5536), p-CamKII (Thr286; #12716) (Cell Signaling Technology). Membranes were then incubated with the appropriate horseradish peroxidase-conjugated secondary antibodies (GE Healthcare). Revelation was done

using ECL Prime Western Blot detection reagent (GE Healthcare). Western blots shown are from one experiment representative of at least three independent experiments and cell lysates. Signals were quantified by pixel densitometry using the ImageJ software.

RNA extraction and real-time quantitative reverse transcription PCR (qRT-PCR):

Total RNA were isolated from ovarian carcinoma cell lines using Trizol (Invitrogen, Life Technologies). RNA quantity and quality were assessed using the NanoDrop™ 2000 spectrophotometer (Thermo Scientific). The first strand cDNA was synthesized using Omniscript reverse transcriptase kit (Qiagen) with random hexamers. cDNA (25 ng) were combined with 10 µmol/l of each forward and reverse primers, 50 µmol/l of the Taq-Man® probe and TaqMan® Fast Universal PCR Master Mix (Applied Biosystems) in a 20 µl final reaction volume. Corresponding custom inventoried (ID: Hs00172036_m1 for Mcl-1 and Hs99999905_m1 for GAPDH) TaqMan® Gene Expression Assays were used (Applied Biosystems). All PCR amplification reactions were carried out in triplicate and detection was done on an Applied ABI Prism 7500 Fast PCR system (Applied Biosystems). GAPDH was used as a housekeeping reference gene for normalization.

siRNA tranfection:

PAGE purified siRNAs were synthesized and annealed by the Eurogentec Company. Specific double-stranded 21 nt RNA oligonucleotides forming a 19 bp duplex core with 2 nt 3' overhangs were used to silence Bcl-x_L (5' auuggugagucggaucgca-3', noted siXL). siGENOME Non-Targeting siRNA Pool#1 (noted siCT) was purchased from Dharmacon. siRNA duplexes were transfected using the INTERFERin™ transfection reagent according to the manufacturer's instructions (Polyplus-Transfection). Briefly, cells were seeded in 25 cm² flasks to reach 30–50% of confluence at the time of transfection. The transfection reagent and the siRNAs were mixed and complex formation was allowed to proceed for 15 min at room temperature before to be applied to cells. After indicated time, cells were trypsinized and washed with ice-cold PBS 1X before analysis.

Calcium imaging:

Intracellular calcium concentrations variations were analyzed by microspectrofluorometry using the Ca²⁺-sensitive probe Fura-2-AM as described previously [44]. Briefly, ovarian carcinoma cells were incubated at 37 °C in HBBSS buffer (116 mM NaCl; 5.4 mM KCl; 0.8 mM MgSO₄; 12 mM HEPES; 0.34 mM NaH₂PO₄; 25 mM NaHCO₃; 5.5 mM D-glucose; 10 µM Glycine; 1.8 mM CaCl₂; pH 7.4) supplemented with 10 µM Fura-2-AM (#F1201 Thermofisher Scientific) for 45 min. Following probe loading, cells were treated or not by 5 µM CAI for 45 min. Then they were placed in a recording chamber mounted on the stage of an epifluorescence microscope (Lieca DMI 6000 B) inverted microscope equipped with a 150 W Xenon high stability lamp and a Leica 40 ×, 1.3 numerical aperture epifluorescence oil immersion objective (Wetzlar, Germany). Fura-2AM-loaded cells were treated with 2 µM thapsigargin in HBBSS without CaCl₂ (0Ca²⁺) to trigger calcium efflux from the RE. In order to test SOCE, calcium was reintroduced in the medium by using classical HBBSS (+Ca²⁺). During the acquisition, cells were irradiated alternately with 340 and 380 nm light, and fluorescence from the trapped dye was measured at 510 nm. The ratio of fluorescence intensities recorded after excitation at 340 nm (F340) and at

380 nm (F380) was used to estimate intracellular calcium concentrations ($[Ca^{2+}]_i$) and was acquired every 5 seconds with a Digital CMOS camera (Hamamatsu, ORCA-Flash2.8 C11440-10C). The monochromator and the photometers allow emission and detection of fluorescence from ~12 cells in the field of view. Data analysis was performed using MM Fluor software (Universal Imaging Corporation).

Patients' eligibility

Based on preliminary findings, eligibility criteria for tumour sampling was stringent. At the time of their initial surgery, patients diagnosed with high grade serous ovarian cancer (HGSOC) and who had never undergone prior chemotherapy were identified. One to five tumor nodes from the peritoneal carcinomatosis were obtained during initial surgery and used for the *ex vivo* study. All patients provided written informed consent. The protocol received all necessary institutional approvals (Declaration of biologic collections to Ministry of Higher Education and Research number: DC 2010-1243)

Ex vivo experiments

- *Exposure to CAI*

Immediately following surgery, vibratome-sliced patient nodes (400 μm) were treated with either vehicle (DMSO) or 5 μM CAI into sterile prewarmed complete culture medium supplemented with 1% antibiotic (Gibco) and incubated in a 5% CO_2 humidified atmosphere at 37 C°. After treatment, slices were then fixed as described above for further analyses. Histology of all samples was confirmed by a certified pathologist.

- *Immunohistochemical analysis*

Automated immunohistochemistry using a Ventana Discovery XT autostainer was performed on 4 μm -thick paraffin sections. Slides were deparaffinized with EZPrep buffer and epitopes were unmasked by 15 minutes high-temperature treatment in CC1 EDTA buffer. Sections were incubated 40 minutes at room temperature with anti-Mcl-1 antibody (#ab32087, Abcam). Secondary antibody (Omnimap Rabbit Ventana) was incubated 16 minutes at room temperature. After washes, staining was performed with DAB and sections were counterstained with Hematoxylin using Ventana reagents according to manufacturer's protocol.

- *Image acquisition*

Whole slide images of histological sections were digitized at 20 \times (0,5 μm /pixel) using the ScanScope CS microscope slide scanner (Leica Biosystems, Nussloch, Germany). They were recorded as tiled tiff images.

- *Image processing*

For each image a region of interest (ROI) has been drawn using the ImageScope software (Leica Biosystems, Nussloch, Germany). The ROIs have been subsampled by hexagonal tiling as described in previous study [45] to take into the account the intra-tumor heterogeneity.

The images are processed using a program in Python programming language with libraries Openslide [46], Scikit-image [47] and Mahotas [48]. An automatic threshold on the blue component of the color image is applied to compute the tissue areas in ROIs. For the detection of the brown color which corresponds to immunostaining DAB, a Ruifrok Deconvolution was used [49]. Images with MCL-1 immunostaining were computed as an integral transmittance between 0 and 1 to describe intensity of staining in each hexagon.

Statistical analysis

The values were presented as means \pm S.E.M. for at least three independent experiments. Paired student's *t*-test was used for statistical analysis. Differences were considered statistically different if $p < 0.05$ (*); $p < 0.01$ (**); $p < 0.001$ (***)).

Results:

CAI inhibits Mcl-1 expression and has an anti-proliferative effect on ovarian carcinoma cells

Bcl-2 family member expression was analyzed in IGROV1-R10, OVCAR3 and SKOV3 cell lines treated with increasing concentrations of CAI from 24h to 72h. Whereas any variation in Bcl-2 family member expression was noticed in the 3 cell lines tested for 24h of treatment, a drastic decrease of Mcl-1 was observed from 48h of treatment in IGROV1-10 and from 72h of treatment in OVCAR3 and SKOV3 cells (Figure 1A). This decrease appeared from 2.5 μ M of CAI and is accentuated for 5 μ M (-85% for 5 μ M/48h of treatment in IGROV1-R10 and -80% and -60% for 5 μ M CAI /72h of treatment for OVCAR3 and SKOV3 respectively).

Regarding the other anti-apoptotic members, Bcl-x_L expression was not modulated by CAI excepted for OVCAR3 and SKOV3 cells in which it seemed to be slightly induced after 72h of treatment (Figure 1A). As for Bcl-2, this protein was not expressed in IGROV1-R10 cells as previously described [33] and was not modulated upon CAI treatment for OVCAR3 and SKOV3 (Figure 1A).

We also studied the effect CAI on IGROV1-R10, OVCAR3, and SKOV3 ovarian cancer cell lines proliferation. For this purpose the three cell lines were treated with increasing concentrations of CAI for 24h, 48h and 72h. Results showed that from a concentration of 2,5 μ M, this calcium inhibitor exerts an anti-proliferative effect on the 3 cell lines. However, whereas this effect was observed for a 48h-treatment in IGROV1-R10 cells, it only appeared for a 72h-treatment in OVCAR3 and SKOV3 cells (Figure 1B). Sub-G1 peak analysis revealed that conditions under which Mcl-1 is inhibited (5 μ M / 48h for IGROV1-R10, 5 μ M / 72h for OVCAR3 and SKOV3), CAI did not induce apoptotic events as confirmed by the absence of PARP and caspase 3 cleavages (Figure 1C and D). This supports that CAI-induced Mcl-1 inhibition is not a consequence of cell death nor cleavage by caspase 3 protein as previously described [50].

CAI-induced Mcl-1 inhibition is not transcriptional or post-translational but is correlated with inhibition of mTORC1 pathway

To decipher the mechanisms underlying Mcl-1 down-regulation by CAI, Mcl-1 mRNA expression was quantified using RT-qPCR. Treatment of cells with 5 μ M CAI for 48h (IGROV1-R10) or 72h (OVCAR3 and SKOV3) did not inhibit Mcl-1 at mRNA level (Figure 2A), suggesting that CAI induced Mcl-1 down-regulation through transcription-independent mechanism.

To evaluate if Mcl-1 decrease upon CAI treatment was a consequence of proteasomal degradation, we incubated ovarian carcinoma cells with CAI for 48h (IGROV1-R10) or 72h (OVCAR3 and SKOV3) but supplemented the medium with bortezomib, a proteasome inhibitor, for the 24 last hours before analysis. As depicted in Figure 2B, bortezomib dose-dependently prevented Mcl-1 degradation in the 3 cell lines tested. However, this pre-treatment did not prevent the loss of Mcl-1 induced by CAI, ruling out the involvement of posttranslational events in CAI-induced Mcl-1 decrease and strongly suggesting translational events.

To further elucidate mechanisms by which CAI might inhibit Mcl-1 translation, we studied its impact on the Akt/mTOR pathway. This pathway is the most frequently deregulated pathway in ovarian cancer and it is also known to regulate Mcl-1 translation [12, 33, 51]. Treatment with increasing dose of CAI showed that CAI was

able to dose-dependently inhibit mTORC1 activation in the 3 cell lines, as reflected by p-mTOR(ser2448) inhibition and by mTORC1 targets inhibition, p-4E-BP1 and p-p70S6K (Figure 2C). According with previous reports, mTORC1 inhibition by 2,5 μM CAI led to a negative feedback loops that triggered an up-regulation of p-Akt(thr308) in the 3 cell lines tested and to up-regulation of p-Akt(ser473) for OVCAR3 and SKOV3. In contrast to OVCAR3 and SKOV3, CAI inhibited p-Akt(ser473) and p-Akt(thr308) in IGROV1-R10 suggesting that this compound acts as an inhibitor of mTORC2 or upstream targets in this cell line. Nethertheless, these results suggest that despite context-dependent effects on Akt activation, CAI down-regulates mTORC1 pathway leading to Mcl-1 translation inhibition in ovarian carcinoma cells.

CAI combined with anti-Bcl-x_L strategies leads to apoptosis in ovarian carcinoma

As Bcl-x_L and Mcl-1 cooperate to protect ovarian carcinoma cells from apoptosis, we next evaluated the efficacy of CAI/anti-Bclx_L strategies. First, we combined CAI with the BH3-mimetic ABT-737. As CAI-induced modulation of protein expression occurred slower than ABT-737-inhibited Bcl-x_L activity, cells were pretreated with CAI 24h for IGROV1-R10 or 48h for OVCAR3 and SKOV3 cells and ABT-737 was added for another 24h of treatment. As illustrated in figure 3A, this combination led to a drastic decrease of cell viability of the 3 cell lines (about -75% for IGROV1-R10, -90% for OVCAR3 and -80% for SKOV3 cells). This observation was supported by the important increase of sub-G1 peaks in flow cytometry (Figure 3B) as well as by the occurrence of PARP and caspase 3 cleavages in western blot (Figure 3C). Moreover, CAI combination with siRNA targeting Bcl-x_L, triggered massive apoptosis in the 3 cell lines as suggested by caspase 3 and PARP cleavages (Figure 3D).

Store-mediated Ca²⁺ entry is inhibited upon CAI treatment in ovarian carcinoma cell lines

As CAI is known to inhibit various calcium channels, we then looked for the identification of the channels targeted by this compound in our ovarian carcinoma model [34-39]. For this purpose, store-operated calcium entry (SOCE) was evaluated by using "Ca²⁺ re-addition" methodology [52]. SOCE is an ubiquitous Ca²⁺ entry pathway that is mediated by the interaction of a Ca²⁺ sensor at the endoplasmic reticulum (Stromal Interaction Molecule 1- STIM-1). Upon calcium release by IP3R opening, STIM-1 molecule aggregate on RE surface and physically interact with ORAI 1 protein (Calcium release-activated calcium channel protein 1) located on plasma membrane. This leads to the formation of a channel (Store-Operated Channel) that allows calcium influx from extracellular medium [53].

Cells were thus placed in a Ca²⁺-free HBBSS medium with 2 μM thapsigargin, an inhibitor of sarcoplasmic-endoplasmic reticulum Ca²⁺-ATPase (SERCA), in order to deplete calcium from endoplasmic reticulum. Upon this treatment, IGROV1-R10, OVCAR3 and SKOV3 cells exhibited a rapid rise in [Ca²⁺]_i reflecting calcium release from RE *via* IP3 receptor [54]. Subsequent reintroduction of 2 mM CaCl₂ to the extracellular medium triggered a sustained increase in [Ca²⁺]_i from baseline (x4.23 in IGROV1-R10, x2.66 in OVCAR3 and x7.28 in SKOV3), which is consistent with a characteristic SOCE-mediated Ca²⁺ influx from the extracellular solution (Figure 4A and 4B). Experiment was reiterated with cells pretreated 1 hour with 5 μM CAI and showed that whereas CAI did not inhibit calcium release from IP3R, it strongly inhibited SOCE induced-calcium entry in all the cell lines tested

(Fig. 4A and 4B). Altogether, this demonstrates that CAI inhibits store-operated calcium channels in ovarian carcinoma cells.

YM58483, a potent SOCE inhibitor, down-regulates mTORC1 pathway and Mcl-1 and its combination with Bcl-x_L inhibition leads to massive apoptosis cell death

In order to confirm the involvement of SOCE in Mcl-1 down-regulation, we evaluated the effect of YM58483, known as a potent SOCE inhibitor [55]. We first verified that this compound was able to inhibit store-operated calcium entry in our model. For this purpose, “Ca²⁺ re-addition” protocol was studied in the 3 cell lines pre-treated or not with YM58483 and revealed that this compound did not inhibit calcium release triggered by thapsigargin in Ca²⁺ depleted medium; however, as expected, it strongly reduced calcium entry *via* SOCE upon calcium reintroduction (Figure 5A).

We then evaluated if YM58483 mimicked the effect of CAI on mTORC1 and Mcl-1 expression. For this purpose, we treated our cells 48h (IGROV1-R10) and 72h (OVCAR3 and SKOV3) with this SOCE inhibitor, and proteins expressions were assessed by western blot. As depicted in figure 5B, this compound inhibited mTORC1 phosphorylation (ser2448) and its downstream targets, p-4EBP1, p-p70S6K and Mcl-1. Moreover, SOCE inhibitor did not down-regulate phosphorylation of Akt at residues Thr308 and Ser473, but, as observed for CAI, the inhibition of mTORC1 targets led to a feedback loops that re-induce their activation.

Afterwards, we evaluated the efficacy of YM58483 /ABT-737 combination on our 3 carcinoma cell lines. Whereas, this SOCE inhibitor did not induce any cell death on its own at the concentrations tested, its combination to ABT-737 elicited a massive apoptosis, as illustrated by caspase 3 and PARP cleavages and the emergence of a strong sub-G1 peak (Figure 5C and 5D).

Altogether, these experiments illustrate that CAI acts as a SOCE inhibitor and that inhibiting these channels strongly sensitizes to anti-Bcl-x_L strategies.

To decipher the molecular link between intracytosolic calcium inhibition and decrease in mTORC1 activity and Mcl-1 expression, we evaluated the involvement of CamKII activity. Actually, this calcium/calmodulin-stimulated serine/threonine protein kinase is one of the major calcium sensors in the cell and it was described to modulate several cellular processes as carcinogenesis by controlling cancer cell survival [56]. Phosphorylated CamKII (Thr286) was expressed in the 3 cell lines at basal level however neither CAI, nor YM58483 inhibited this kinase activation (Figure 6A, 6B), suggesting that this kinase is not involved in Mcl-1 inhibition induced by SOCE down-regulation.

Moreover, mTORC1 is known to be negatively controlled by phosphorylated AMP-activated protein kinase (p-AMPK) [57]. As CAI and YM58483 inhibited mTORC, we then tested if these 2 compounds were able to induce AMPK activation in our models. However, as illustrated in Figure 6A and 6B, these 2 molecules did not triggered AMPK activation in the 3 cell lines tested suggesting that AMPK was not involved in mTORC1 down-regulation.

CAI inhibits Mcl-1 in tumor patients

The data from *in vitro* experiments prompted us to evaluate the action of CAI on some patient's peritoneal ovarian carcinoma nodes. *Ex vivo* experiments performed on tumor samples is relevant as cancer cell lines differ substantially from patient tumors and impact the response to treatments [56, 58]. Moreover, the three dimensional architectural integrity and micro-environment are preserved during *ex vivo* assays allowing testing the efficacy of innovative treatments in several cancer localizations including ovarian carcinoma [59-61].

For this purpose, each tumor samples from chemotherapy naïve ovarian cancer patients were vibratome-sliced (400 μm) and slices from the same node were treated with either vehicle (DMSO) or 5 μM CAI for 48h. Immunohistochemistry revealed that upon CAI treatment, Mcl-1 expression was strongly inhibited (Figure 7A). In order to half-quantify the DAB staining loss, slides were divided in virtual hexagons (160 μm diameter) and the intensity (transmittance) of the staining was evaluated by the mean of histo-imaging tools (Figure 7B). Histograms revealed that for CAI conditions (Red), the majority of hexagons exhibited a lower staining than those presented in DMSO conditions (Blue) confirming the decrease of Mcl-1 expression.

Discussion

Despite remarkable advances in the understanding of chemoresistance molecular mechanisms, no alternative to platinum-based therapy has been approved yet for ovarian cancer. We and others have shown that the anti-apoptotic proteins Bcl-x_L and Mcl-1 could constituted key targets for future therapeutic strategies [7, 62, 63]. In this line, targeting Mcl-1 *via* mTORC1 inhibition by calcium signaling modulation seemed to constitute an attractive way to sensitize ovarian carcinoma to anti-Bcl-x_L strategies [33].

Our study showed that CAI had an anti-proliferative effect in the 3 ovarian cancer cell lines tested. This anti-proliferative action was already observed with CAI in several other types of cancers for the same range of concentrations and for the same durations of treatment [38, 39, 41, 64-67]. In our conditions, CAI anti-proliferative effect was not accompanied with a G2/M cell cycle arrest as observed in other cancer cell lines [65, 67, 68]. These authors and others also found that CAI used as a single agent could induce apoptosis, whereas we did not observed any apoptotic feature upon ovarian carcinoma cell lines treatment. This discrepancy could be due to higher CAI concentrations used (30 μM instead of 5 μM) or longer times of treatment [65, 69].

The effect of CAI treatment on Bcl-2 family protein expression reveals that Mcl-1 was drastically inhibited upon exposure to this calcium inhibitor. To our knowledge, it is the first time that CAI was demonstrated to inhibit this anti-apoptotic protein and reinforces our hypothesis that Mcl-1 constitutes a target of calcium modulation [33]. Noxa and Puma were also found to be down-regulated, a result that we also observed after calcium chelation by BAPTA-AM [33]. Previous studies reported that Noxa and Puma could be transcriptionally induced by calcium signal in MDA-MB-231 human breast cancer cells [70]. However, the calcium inhibitor CAI did not preclude the transcription of these 2 BH3-only (data not shown) suggesting that

other molecular mechanisms could be involved. Finally, in contrast to previous studies, CAI did not inhibit Bcl-2 expression implying that its action on Bcl-2 family depends on cellular context [65, 71].

CAI did not alter calcium release from IP3 receptor induced by thapsigargin as it was already demonstrated in HUVEC and Rat-1 cells [36, 72]. In contrast, this compound drastically inhibited SOC in all 3 cell lines tested; an observation that was supported by others [35, 36, 41, 42]. SOC represents one of the major calcium channels in non-excitabile cells. These channels are composed of 2 sub-units, one belonging to ER membrane (STIM-1) and the other to cell plasma membrane (ORAI-1). Upon ER calcium depletion, these subunits interact with each other leading to a calcium influx from extracellular compartments in order to refill cytoplasm and ER stocks subsequently. CAI effect on these calcium channels was confirmed by the use of YM-58483, a potent SOCE inhibitor which not only led to the inhibition of Mcl-1 but also mimicked the effect of CAI on Akt/mTOR pathway.

The link between SOCE and the expression of Bcl-2 family members had already been pointed out by few studies but led to divergent conclusions. On the one hand, mutated STIM-1 (triggering a constitutive SOC activation) led to an induction of Mcl-1 transcription in HEK293; on the other hand, ORAI1 knock-down promoted Mcl-1 and inhibited Noxa expressions leading to survival of mice activated T cell [73, 74]. These discrepancies are probably inherent to the model and further studies are required to understand the molecular pathway involved.

Our study suggests that CAI-induced mTORC1 down-regulation seemed to differ upon cellular context: whereas 5 μ M CAI treatment lead to pAkt(ser473) inhibition in IGROV1-R10 cell line (suggesting that it could be considered as an mTORC2 inhibitor), this compound had no effect on this protein in OVCAR3 and SKOV3 but induced a transient upregulation of p-Akt(ser473) by a compensatory feedback loop as previously described [75]. Similar findings were obtained with BAPTA-AM in human breast cancer cells [76, 77], in ovarian cancer cell lines [33], and in HEK293, A549 and HUVEC [32]. In this latter study, authors showed that calcium/calmodulin regulates mTORC1 and mTORC2 but the 2 complexes differ in their sensitivity. Indeed, mTORC1 was shown to be inhibited by calcium chelation or calmodulin inhibition for lower concentrations than those efficient to inhibit mTORC2. Hence, authors concluded that mTORC1 inhibition occurred independently of Akt activation.

This is an interesting point to mention as other studies revealed that calcium could activate mTORC1 through up-stream events. Indeed, it was reported that calcium/calmodulin could activate mTORC1 through a direct binding of calmodulin to Akt through its pleckstrin homology domain [78, 79].

Besides, calcium/calmodulin can also control Akt (and subsequently mTORC1) through the activation of calcium-activated kinases. Consistently, a calcium/CaM/CaMKK2 complex was described to bind and activate p-Akt(thr308) in ovarian carcinoma cells[80]. However, in our hand, p-Akt(308) was not inhibited by the calcium inhibitor CAI suggesting that CamKK2 was not involved in CAI-induced mTORC1 inhibition. Moreover, one of CamKK2's major targets is AMPK protein and it could be suggested, in view of our results, that decreasing calcium could lead to a decrease in CamKK2/AMPK pathway and consequently to an up-regulation of mTORC1 [81]. However, the opposed result we obtained suggests that calcium/CamKK2 is not the main pathway that is targeted by CAI in our model.

In other studies, calcium/CaM was shown to activate p-Akt(ser473), and subsequently mTORC1, through CaMKII activation in B lymphocytes [31]. Consistent with this finding, SKF-96365, another SOCE inhibitor was described to inhibit the calcium/CaMKII/Akt/mTORC1-mediated pathway in colorectal cancer cells [82]. However neither CAI nor YM58483 inhibited the activation of this protein in our model of carcinoma cell. These examples highlight that depending on cellular context, SOC mediated calcium entry could have specific action on Akt/mTORC1 pathway. As this pathway is frequently deregulated in cancer, especially in ovarian cancer, SOCE have thus a crucial role in tumor development and accumulating evidence supports that activation of store-operated Ca^{2+} entry is involved in cancer progression. First, it was reported that these calcium channels are differentially expressed in malignant cells. For example, STIM1 and ORAI1 were found higher expressed in hepatoma tissues than in precancerous tissues or non-tumor tissues of the same patients [83, 84]. Second, these channels were demonstrated to have a crucial role in invasion of glioblastoma cells [85], angiogenesis of endothelial progenitor cells isolated from tumoral patients [41], migration and metastasis of breast cancer cells [86] or cervical cancer cells [87]. Finally, SOC were also involved in chemoresistance in various cancer localizations including ovarian carcinoma suggesting that SOCE inhibition constitute a relevant target to sensitize carcinoma cells to chemotherapy [88, 89].

Our previous *ex vivo* study on tumor sample patients revealed that ABT-737 was able to induce cell death when administered as a single agent contradicting the results routinely obtained *in vitro*, but supporting previous observations in *ex vivo* prostate carcinoma [59]. The identification of predictive factors to ABT-737 treatment highlighted Bim (a BH3-only pro-apoptotic protein known to sequester Bcl-x_L and Mcl-1) as a key predictive factor. However, 44% of patient neither responded to ABT-737 nor to its combination with carboplatin and we showed that in this case, high Mcl-1 expression is involved in resistance to ABT-737 treatment. It could be hypothesized that CAI represented a relevant strategy to sensitized ovarian carcinoma to ABT-737 for these patients. Our findings could also explain the mild efficacy of CAI in clinical trials realized on ovarian carcinoma [43]. As these cells are “addicted” to Bcl-x_L and Mcl-1, treatment with CAI could not have a benefit when used as a single agent because Mcl-1 inhibition is not sufficient to induce apoptosis in ovarian cancer.

Taken together we demonstrated that CAI has anti-proliferative effect on ovarian cell lines and that it inhibits Mcl-1 expression through SOCE/mTORC1 inhibition which led to a strong sensitization of ovarian carcinoma to anti-Bcl-x_L strategies. As Store-Operated Channels are known to interact with the frequently deregulated PI3K/Akt/mTOR pathway, they could constitute relevant target to overcome apoptosis resistance in ovarian carcinoma. The knowledge of molecular pathways involved in chemoresistance will allow finding more precisely the key targets that could precipitate ovarian cancer cell to apoptosis. This was illustrated by the recent study where CAI enhanced sorafenib anti-tumor activity through a ROS and NANOG dependent pathway in non-small cell lung cancer [67]. It could then be hypothesized that CAI *via* its action on SOCE and Mcl-1 could extent the therapeutic arsenal for ovarian cancer treatment if pertinently combined.

Conflict of interest

The authors declare no conflict of interest.

Acknowledgments

The research was supported by the Ligue Contre le Cancer (Comité départemental de l'Orne). MLB was funded by grant from Normandy Regional Council and Accord Healthcare Inc. We thank the Biological Ressource Centre OvaRessources for samples archiving and management. We thank Marilyne Guillamin (Flow Cytometry Core Facility, SF 4206 ICORE of University of Caen Normandy) for technical assistance. We thank Dr Nicolas Vigneron (INSERM U1086, ANTICIPE) for its advices concerning statistical data.

Legends

Figure 1: CAI inhibits Mcl-1 protein expression and has an anti-proliferative effect on 3 ovarian cell lines. A) Expressions of Mcl-1, Bcl-x_L, Bcl-2, were appreciated by western blot in IGROV1-R10, OVCAR3 and SKOV3 cells were treated by increasing concentrations of CAI for 24h, 48h and 72h. Quantification of Mcl-1 protein expression upon CAI treatment in the 3 cell lines tested was realized with Image J software. Data are expressed as mean ± SEM of 3 independent experiments. Statistical differences were analyzed with a paired-student t-test: *p < 0.05, **p < 0.01, ***p < 0.001 (n=3). **B)** Number of viable cells was assessed by blue trypan exclusion. Curves show the percentage of viable cells normalized to the number of viable cells at the beginning of the treatment (100%). Results are expressed as mean ± SEM of 3 independent experiments. **C)** Histograms represent the distribution of cells in cell cycle phase (sub-G1, G0-G1, S and G2-M) induced by 5 μM CAI for 48h (IGROV1-R10 cells) and 72h (for OVCAR3 and SKOV3 cells) and studied by flow cytometry. Results are expressed as mean ± SEM of 3 independent experiments. **C)** The effect of 5 μM CAI on PARP and caspase 3 cleavages was assessed by western blot for 24h, 48h and 72h in IGROV1-R10, OVCAR3 and SKOV3 cell lines.

Figure 2: Investigation of the mechanisms involved in CAI-induced Mcl-1 decrease A) Cells were treated or not (DMSO) with 5 μM CAI during 48h for IGROV1-R10 and 72h OVCAR3 or for SKOV3. Mcl-1 mRNA expression was assessed by real time quantitative RT-PCR. GAPDH was used as a housekeeping reference gene for normalization. Histograms represent the relative mRNA expression in treated cells normalized to that of control cells. Data are expressed as mean ± SEM of 3 independent experiments. Statistical differences were analyzed with a paired-student t-test: NS: non-significant. **B)** Ovarian carcinoma cell lines were treated or not (DMSO) with 5 μM CAI during 48h h for IGROV1-R10 and OVCAR3 or 72h for SKOV3 and 100 nM bortezomib were added for the last 24h of treatment. Mcl-1 expression was followed by western blot **C)** CAI decrease MTORC1 pathway. Cells were treated with increasing dose of CAI during 48h for IGROV1-R10 and 72h for OVCAR3 and SKOV3. The effect of CAI treatment on the activation of the PI3K/Akt/mTOR pathway was analyzed by studying the protein expression of P-Akt (S473 and T308) and total Akt, P-mTORC1 (ser2448) and P-mTORC2 (ser2448), P-p70S6K (T389) and total p70S6K and P-4E-BP1 (T70) and total 4E-BP1 by western blot analysis.

Figure 3: CAI combined with anti-Bcl-x_L strategies leads to apoptosis in ovarian carcinoma. cells were treated or not (DMSO) with 5 μ M CAI during 48h for IGROV1-R10 and OVCAR3 or 72h for SKOV3 and 1 μ M ABT-737 was added 24h before the end of the experiment. **A)** Cell viability was assessed by trypan blue exclusion. Data are expressed as mean \pm SEM of 3 independent experiments. Statistical differences were analyzed with a paired-student t-test: * p < 0.05, ** p < 0.01, *** p < 0.001. **B)** Sub-G1 events were studied by flow cytometry. Data are expressed as mean \pm SEM of 3 independent experiments. Statistical differences were analyzed with a paired-student t-test: * p < 0.05, ** p < 0.01, *** p < 0.001. **C)** PARP and caspase 3 cleavages were assessed by western-blot, **D)** cells were transfected with anti-Bcl-x_L siRNA during 24h for IGROV1-R10 and OVCAR3 or 48h for SKOV3 then cells were treated with 5 μ M CAI during 48h for IGROV1-R10 and 72h for OVCAR3 or SKOV3. Mcl-1 and Bcl-x_L expressions and PARP and caspase 3 cleavages were studied by western blot.

Figure 4: CAI does not bloc IP₃R calcium release but inhibits Store-Operated Calcium Channel Entry. **A)** Effect of CAI on IP₃R and Store-operated calcium channels. Microspectrofluorimetry using Fura-2AM probe was realized in the 3 carcinoma cell lines IGROV1-R10, OVCAR3 and SKOV3 cells. During exposure to 0Ca²⁺, depletion of the intracellular stores was triggered by the addition of 2 μ M thapsigargin to the bathing medium. Subsequent replenishment of 2 mM Ca²⁺ to the medium elicited a rise in [Ca²⁺]_i due to Ca²⁺ influx through open store-operated channels. Black tracings depict the representative changes in [Ca²⁺]_i recorded from DMSO treated cells and Grey tracings depict the representative changes in [Ca²⁺]_i recorded from cells pre-treated 1h with 5 μ M CAI. **B)** Means \pm SEM of the amplitude of thapsigargin-induced Ca²⁺ release and Ca²⁺ store-operated channels entry recorded from CAI pre-treated cells (black bar) or not (DMSO) (white bar).

Figure 5: YM48583 blocks store-dependent calcium entry, inhibits mTORC1 targets and Mcl-1 and sensitizes ovarian carcinoma cells to ABT-737. **A)** Effect of YM-58483 on IP₃R and Store-operated calcium channels. Microspectrofluorimetry using Fura-2AM probe was realized in the 3 carcinoma cell lines IGROV1-R10, OVCAR3 and SKOV3 cells. During exposure to 0Ca²⁺, depletion of the intracellular stores was triggered by the addition of 2 μ M thapsigargin to the bathing medium. Subsequent replenishment of 2mM Ca²⁺ to the medium elicited a rise in [Ca²⁺]_i due to Ca²⁺ influx through open store-operated channels. Black tracings depict the representative changes in [Ca²⁺]_i recorded from DMSO treated cells and grey tracings depict the representative changes in [Ca²⁺]_i recorded from cells pre-treated 1h with 15 μ M for IGROV1-R10 and OVCAR3 cells or 20 μ M For SKOV3 cells. **B)** Effect of YM58483 on Akt/mTORC1 pathway. Cells were treated with YM-58483 (15 μ M for 48h for IGROV1-R10 cells, 15 μ M for 72h for OVCAR3 cells and 20 μ M for 72h for SKOV3 cells. The effect of CAI treatment on the activation of the PI3K/Akt/mTOR pathway was analyzed by studying the protein expression of P-Akt (S473 and T308) and total Akt, p-mTORC1 (ser2448) and p-mTORC2 (ser2448), p-p70S6K (T389) and total p70S6K and P-4E-BP1 (T70) and total 4E-BP1 by western blot analysis. **C)** YM58483 sensitizes ovarian carcinoma cells to ABT-737. Cells were treated with YM-58483 (15 μ M for 48h for IGROV1-R10 cells, 15 μ M for 72h for OVCAR3 cells and 20 μ M for 72h for SKOV3 cells. One micromolar ABT-737 was added the 24h last hour of treatment. PARP and caspase 3 cleavages were assessed by western-blot, **D)** YM58483 sensitizes ovarian carcinoma cells to ABT-737. Cells were treated with YM-58483 (15 μ M for 48h for IGROV1-R10 cells, 15 μ M for

72h for OVCAR3 cells and 20 μ M for 72h for SKOV3 cells. One micromolar ABT-737 was added the 24h last hour of treatment. Sub-G1 events were studied by flow cytometry.

Figure 6: Inhibition of Mcl-1 by CAI and YM58483 does not involve CamKII and AMPK. A) Cells were treated with increasing dose of CAI during 48h for IGROV1-R10 and 72h for OVCAR3 and SKOV3. The effect of CAI treatment on p-CamKII, p-AMPK, AMPK, 4EBP1 and Mcl-1 was assessed by western blot. **B)** Cells were treated with YM-58483 (15 μ M for 48h for IGROV1-R10 cells, 15 μ M for 72h for OVCAR3 cells and 20 μ M for 72h for SKOV3 cells. The effect of YM58483 treatment on p-CamKII, p-AMPK, AMPK, 4EBP1 and Mcl-1 was assessed by western blot.

Figure 7: CAI inhibits Mcl-1 *ex vivo* in tumor samples patients A) Vibratome-sliced patient nodes were treated with DMSO or CAI for 48h. Slices were then paraffin embedded and Mcl-1 immunohistochemistry was performed. **B)** For Mcl-1 staining quantification, ROIs have been drawn and subsampled by hexagonal tiling. Measurement of brown color intensity was reflected by transmittance between 0 and 1 to describe intensity of Mcl-1 staining in each hexagon: a low transmittance reflects poor staining whereas a high transmittance reflects a strong staining. Histograms illustrate the distribution of hexagons according to the value of their transmittance in DMSO and CAI conditions.

Reference List

- [1] R.L. Siegel, K.D. Miller, A. Jemal, J.A. Ledermann, F.A.U. Raja FA, C.F. Fotopoulou, A.F. Gonzalez-Martin, N.F. Colombo, and C. Sessa, *Cancer Statistics*, 2017
Newly diagnosed and relapsed epithelial ovarian carcinoma: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up.
- [2] J.A. Ledermann, F.A.U. Raja FA, C.F. Fotopoulou, A.F. Gonzalez-Martin, N.F. Colombo, and C. Sessa, *Newly diagnosed and relapsed epithelial ovarian carcinoma: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up*.
- [3] D. Hanahan and R.A. Weinberg, *Hallmarks of cancer: the next generation*. *Cell* 144 (2011) 646-674.
- [4] P. Juin, O. Geneste, F. Gautier, S. Depil, and M. Campone, *Decoding and unlocking the BCL-2 dependency of cancer cells*. *Nat Rev Cancer* 13 (2013) 455-465.
- [5] C. Gloaguen, A.S. Voisin-Chiret, S.J. Sopkova-de Oliveira, J. Fogha, F. Gautier, G.M. De, G. Burzicki, S. Perato, C. Petigny-Lechartier, J.K. Simonin-Le, E. Brotin, D. Goux, M. N'diaye, B. Lambert, M.H. Louis, L. Ligat, F. Lopez, P. Juin, R. Bureau, S. Rault, and L. Poulain, *First evidence that oligopyridines, alpha-helix foldamers, inhibit Mcl-1 and sensitize ovarian carcinoma cells to Bcl-xL-targeting strategies*. *J Med. Chem* 58 (2015) 1644-1668.
- [6] K. Simonin, M. N'diaye, S. Lheureux, C. Loussouarn, S. Dutoit, M. Briand, F. Giffard, E. Brotin, C. Blanc-Fournier, and L. Poulain, *Platinum compounds sensitize ovarian carcinoma cells to ABT-737 by modulation of the Mcl-1/Noxa axis*. *Apoptosis* 18 (2013) 492-508.
- [7] E. Brotin, M. Meryet-Figuere, K. Simonin, R.E. Duval, M. Villedieu, J. Leroy-Dudal, E. Saison-Behmoaras, P. Gauduchon, C. Denoyelle, and L. Poulain, *Bcl-XL and MCL-1 constitute pertinent targets in ovarian carcinoma and their concomitant inhibition is sufficient to induce apoptosis*. *Int. J Cancer* 126 (2010) 885-895.
- [8] L. Kassem and O. Abdel-Rahman, *Targeting mTOR pathway in gynecological malignancies: Biological rationale and systematic review of published data*. *Crit Rev. Oncol Hematol.* 108 (2016) 1-12.
- [9] S. Mabuchi, H. Kuroda, R. Takahashi, and T. Sasano, *The PI3K/AKT/mTOR pathway as a therapeutic target in ovarian cancer*. *Gynecol. Oncol* 137 (2015) 173-179.
- [10] The Cancer Genome Atlas Research Network, *Integrated genomic analyses of ovarian carcinoma*. *Nature* 474 (2011) 609-615.
- [11] A.C. Hsieh and D. Ruggero, *Targeting eukaryotic translation initiation factor 4E (eIF4E) in cancer*. *Clin Cancer Res* 16 (2010) 4914-4920.
- [12] J.R. Mills, Y. Hippo, F. Robert, S.M. Chen, A. Malina, C.J. Lin, U. Trojahn, H.G. Wendel, A. Charest, R.T. Bronson, S.C. Kogan, R. Nadon, D.E. Housman, S.W. Lowe, and J. Pelletier, *mTORC1 promotes survival through translational control of Mcl-1*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105 (2008) 10853-10858.

- [13] L. Willems, N. Chapuis, A. Puissant, T.T. Maciel, A.S. Green, N. Jacque, C. Vignon, S. Park, S. Guichard, O. Herault, A. Fricot, O. Hermine, I.C. Moura, P. Auberger, N. Ifrah, F. Dreyfus, D. Bonnet, C. Lacombe, P. Mayeux, D. Bouscary, and J. Tamburini, The dual mTORC1 and mTORC2 inhibitor AZD8055 has anti-tumor activity in acute myeloid leukemia. *Leukemia* 26 (2012) 1195-1202.
- [14] I.K. Zervantonakis, C. Iavarone, H.Y. Chen, L.M. Selfors, S. Palakurthi, J.F. Liu, R. Drapkin, U. Matulonis, J.D. Levenson, D. Sampath, G.B. Mills, and J.S. Brugge, Systems analysis of apoptotic priming in ovarian cancer identifies vulnerabilities and predictors of drug response. *Nat. Commun.* 8 (2017) 365.
- [15] G.R. Anderson, S.E. Wardell, M. Cakir, L. Crawford, J.C. Leeds, D.P. Nussbaum, P.S. Shankar, R.S. Soderquist, E.M. Stein, J.P. Tingley, P.S. Winter, E.K. Zieser-Misenheimer, H.M. Alley, A. Yllanes, V. Haney, K.L. Blackwell, S.J. McCall, D.P. McDonnell, and K.C. Wood, PIK3CA mutations enable targeting of a breast tumor dependency through mTOR-mediated MCL-1 translation. *Sci. Transl. Med.* 8 (2016) 369ra175.
- [16] A.C. Faber, D. Li, Y. Song, M.C. Liang, B.Y. Yeap, R.T. Bronson, E. Lifshits, Z. Chen, S.M. Maira, C. Garcia-Echeverria, K.K. Wong, and J.A. Engelman, Differential induction of apoptosis in HER2 and EGFR addicted cancers following PI3K inhibition. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106 (2009) 19503-19508.
- [17] A. Jebahi, M. Villedieu, C. Petigny, E. Brotin, M.H. Louis, E. Abeillard, F. Giffard, M. Guercio, M. Briand, P. Gauduchon, S. Lheureux, and L. Poulain, PI3K/mTOR dual inhibitor NVP-BEZ235 decreases Mcl-1 expression and sensitizes ovarian carcinoma cells to Bcl-x-targeting strategies, provided that Bim expression is induced. *Cancer Lett* 2014).
- [18] C. Petigny-Lechartier, C. Duboc, A. Jebahi, M.H. Louis, E. Abeillard, C. Denoyelle, P. Gauduchon, L. Poulain, and M. Villedieu, The mTORC1/2 Inhibitor AZD8055 Strengthens the Efficiency of the MEK Inhibitor Trametinib to Reduce the Mcl-1/[Bim and Puma] ratio and to Sensitize Ovarian Carcinoma Cells to ABT-737. *Mol. Cancer Ther.* 16 (2017) 102-115.
- [19] M.J. Berridge, P. Lipp, and M.D. Bootman, The versatility and universality of calcium signalling. *Nat Rev Mol Cell Biol* 1 (2000) 11-21.
- [20] N. Prevarskaya, H. Ouadid-Ahidouch, R. Skryma, and Y. Shuba, Remodelling of Ca²⁺ transport in cancer: how it contributes to cancer hallmarks? *Philos. Trans. R. Soc. Lond B Biol. Sci.* 369 (2014) 20130097.
- [21] C. Cui, R. Merritt, L. Fu, and Z. Pan, Targeting calcium signaling in cancer therapy. *Acta Pharm. Sin. B* 7 (2017) 3-17.
- [22] G.R. Monteith, N. Prevarskaya, and S.J. Roberts-Thomson, The calcium-cancer signalling nexus. *Nat. Rev. Cancer* 17 (2017) 367-380.
- [23] G.R. Monteith, F.M. Davis, and S.J. Roberts-Thomson, Calcium channels and pumps in cancer: changes and consequences. *J Biol Chem* 287 (2012) 31666-31673.
- [24] N. Prevarskaya, R. Skryma, and Y. Shuba, Targeting Ca²⁺ transport in cancer: close reality or long perspective? *Expert Opin Ther Targets* 17 (2013) 225-241.

- [25] N.M. Conus, B.A. Hemmings, and R.B. Pearson, Differential regulation by calcium reveals distinct signaling requirements for the activation of Akt and p70S6k. *J Biol Chem* 273 (1998) 4776-4782.
- [26] K.M. Hannan, G. Thomas, and R.B. Pearson, Activation of S6K1 (p70 ribosomal protein S6 kinase 1) requires an initial calcium-dependent priming event involving formation of a high-molecular-mass signalling complex. *Biochem. J* 370 (2003) 469-477.
- [27] L.M. Graves, Y. He, J. Lambert, D. Hunter, X. Li, and H.S. Earp, An intracellular calcium signal activates p70 but not p90 ribosomal S6 kinase in liver epithelial cells. *J Biol. Chem* 272 (1997) 1920-1928.
- [28] P. Gulati, L.D. Gaspers, S.G. Dann, M. Joaquin, T. Nobukuni, F. Natt, S.C. Kozma, A.P. Thomas, and G. Thomas, Amino acids activate mTOR complex 1 via Ca²⁺/CaM signaling to hVps34. *Cell Metab* 7 (2008) 456-465.
- [29] F. Mercan, H. Lee, S. Kolli, and A.M. Bennett, Novel role for SHP-2 in nutrient-responsive control of S6 kinase 1 signaling. *Mol. Cell Biol.* 33 (2013) 293-306.
- [30] X. Zhou, D.S. Lin, F. Zheng, M.A. Sutton, and H. Wang, Intracellular calcium and calmodulin link brain-derived neurotrophic factor to p70S6 kinase phosphorylation and dendritic protein synthesis. *J Neurosci. Res.* 88 (2010) 1420-1432.
- [31] Z. Ke, D. Liang, Q. Zeng, Q. Ren, H. Ma, L. Gui, S. Chen, M. Guo, Y. Xu, W. Gao, S. Zhang, and L. Chen, hsBAFF promotes proliferation and survival in cultured B lymphocytes via calcium signaling activation of mTOR pathway. *Cytokine* 62 (2013) 310-321.
- [32] R.J. Li, J. Xu, C. Fu, J. Zhang, Y.G. Zheng, H. Jia, and J.O. Liu, Regulation of mTORC1 by lysosomal calcium and calmodulin. *Elife.* 5 (2016).
- [33] M.L. Bonnefond, B. Lambert, F. Giffard, E. Abeillard, E. Brotin, M.H. Louis, M.S. Gueye, P. Gauduchon, L. Poulain, and M. N'diaye, Calcium signals inhibition sensitizes ovarian carcinoma cells to anti-Bcl-xL strategies through Mcl-1 down-regulation. *Apoptosis.* 20 (2015) 535-550.
- [34] S. Antoniotti, P.A. Fiorio, S. Pregnotato, A. Mottola, D. Lovisolo, and L. Munaron, Control of endothelial cell proliferation by calcium influx and arachidonic acid metabolism: a pharmacological approach. *J Cell Physiol* 197 (2003) 370-378.
- [35] M. D'Amato, A.M. Flugy, G. Alaimo, B. Bauder, E.C. Kohn, L.G. De, and R. Alessandro, Role of calcium in E-selectin induced phenotype of T84 colon carcinoma cells. *Biochem Biophys Res Commun* 301 (2003) 907-914.
- [36] M. Faehling, J. Kroll, K.J. Fohr, G. Fellbrich, U. Mayr, G. Trischler, and J. Waltenberger, Essential role of calcium in vascular endothelial growth factor A-induced signaling: mechanism of the antiangiogenic effect of carboxyamidotriazole. *FASEB J* 16 (2002) 1805-1807.
- [37] P.A. Fiorio, C. Grange, S. Antoniotti, C. Tomatis, A. Merlino, B. Bussolati, and L. Munaron, Arachidonic acid-induced Ca²⁺ entry is involved in early steps of tumor angiogenesis. *Mol Cancer Res* 6 (2008) 535-545.

- [38] T.W. Moody, J. Chiles, E. Moody, G.J. Sieczkiewicz, and E.C. Kohn, CAI inhibits the growth of small cell lung cancer cells. *Lung Cancer* 39 (2003) 279-288.
- [39] Y. Wu, A.J. Palad, W.J. Wasilenko, P.F. Blackmore, W.A. Pincus, G.L. Schechter, J.R. Spoonster, E.C. Kohn, and K.D. Somers, Inhibition of head and neck squamous cell carcinoma growth and invasion by the calcium influx inhibitor carboxyamido-triazole. *Clin Cancer Res* 3 (1997) 1915-1921.
- [40] A. Enfissi, S. Prigent, P. Colosetti, and T. Capiod, The blocking of capacitative calcium entry by 2-aminoethyl diphenylborate (2-APB) and carboxyamidotriazole (CAI) inhibits proliferation in Hep G2 and Huh-7 human hepatoma cells. *Cell Calcium* 36 (2004) 459-467.
- [41] F. Lodola, U. Laforenza, E. Bonetti, D. Lim, S. Dragoni, C. Bottino, H.L. Ong, G. Guerra, C. Ganini, M. Massa, M. Manzoni, I.S. Ambudkar, A.A. Genazzani, V. Rosti, P. Pedrazzoli, F. Tanzi, F. Moccia, and C. Porta, Store-operated Ca²⁺ entry is remodelled and controls in vitro angiogenesis in endothelial progenitor cells isolated from tumoral patients. *PLoS One* 7 (2012) e42541.
- [42] O. Mignen, C. Brink, A. Enfissi, A. Nadkarni, T.J. Shuttleworth, D.R. Giovannucci, and T. Capiod, Carboxyamidotriazole-induced inhibition of mitochondrial calcium import blocks capacitative calcium entry and cell proliferation in HEK-293 cells. *J Cell Sci* 118 (2005) 5615-5623.
- [43] M.M. Hussain, H. Kotz, L. Minasian, A. Premkumar, G. Sarosy, E. Reed, S. Zhai, S.M. Steinberg, M. Raggio, V.K. Oliver, W.D. Figg, and E.C. Kohn, Phase II trial of carboxyamidotriazole in patients with relapsed epithelial ovarian cancer. *J Clin Oncol* 21 (2003) 4356-4363.
- [44] F. Lesept, A. Chevilly, J. Jezequel, L. Ladepeche, R. Macrez, M. Aimable, S. Lenoir, T. Bertrand, L. Rubrecht, P. Galea, L. Lebouvier, K.U. Petersen, Y. Hommet, E. Maubert, C. Ali, L. Groc, and D. Vivien, Tissue-type plasminogen activator controls neuronal death by raising surface dynamics of extrasynaptic NMDA receptors.
- [45] B. Plancoulaine, A. Laurinaviciene, P. Herlin, J. Besusparis, R. Meskauskas, I. Baltrusaityte, Y. Iqbal, and A. Laurinavicius, A methodology for comprehensive breast cancer Ki67 labeling index with intra-tumor heterogeneity appraisal based on hexagonal tiling of digital image analysis data. *Virchows Arch.*2015).
- [46] A. Goode, B.F. Gilbert, J.F. Harkes, D.F. Jukic, M. Satyanarayanan, S. van der Walt, J.L. Schonberger, J. Nunez-Iglesias, F. Boulogne, J.D. Warner, N. Yager, E. Gouillart, T. Yu, A.C. Ruifrok, and D.A. Johnston, OpenSlide: A vendor-neutral software foundation for digital pathology
scikit-image: image processing in Python
Quantification of histochemical staining by color deconvolution.
- [47] S. van der Walt, J.L. Schonberger, J. Nunez-Iglesias, F. Boulogne, J.D. Warner, N. Yager, E. Gouillart, T. Yu, A.C. Ruifrok, and D.A. Johnston, scikit-image: image processing in Python
Quantification of histochemical staining by color deconvolution.
- [48] L.P. Coelho, Mahotas: Open source software for scriptable computer vision. *Journal of Open Research Software* 1 (2013).
- [49] A.C. Ruifrok and D.A. Johnston, Quantification of histochemical staining by color deconvolution.

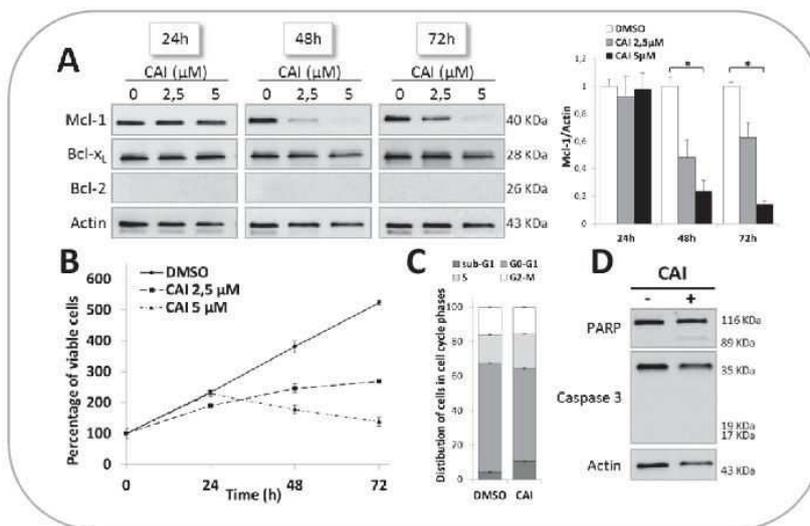
- [50] L.W. Thomas, C. Lam, and S.W. Edwards, Mcl-1; the molecular regulation of protein function. *FEBS Lett* 584 (2010) 2981-2989.
- [51] A.C. Hsieh, M. Costa, O. Zollo, C. Davis, M.E. Feldman, J.R. Testa, O. Meyuhas, K.M. Shokat, and D. Ruggero, Genetic dissection of the oncogenic mTOR pathway reveals druggable addiction to translational control via 4EBP-eIF4E. *Cancer Cell* 17 (2010) 249-261.
- [52] G.S. Bird, W.I. DeHaven, J.T. Smyth, and J.W. Putney, Jr., Methods for studying store-operated calcium entry. *Methods* 46 (2008) 204-212.
- [53] I. Jardin and J.A. Rosado, STIM and calcium channel complexes in cancer. *Biochim. Biophys. Acta* 1863 (2016) 1418-1426.
- [54] J. Lytton, M. Westlin, and M.R. Hanley, Thapsigargin inhibits the sarcoplasmic or endoplasmic reticulum Ca-ATPase family of calcium pumps. *J Biol. Chem* 266 (1991) 17067-17071.
- [55] J. Ishikawa, K. Ohga, T. Yoshino, R. Takezawa, A. Ichikawa, H. Kubota, and T. Yamada, A pyrazole derivative, YM-58483, potently inhibits store-operated sustained Ca²⁺ influx and IL-2 production in T lymphocytes. *J Immunol.* 170 (2003) 4441-4449.
- [56] Y.Y. Wang, R. Zhao, and H. Zhe, The emerging role of CaMKII in cancer.
- [57] M.M. Mihaylova and R.J. Shaw, The AMPK signalling pathway coordinates cell growth, autophagy and metabolism. *Nat. Cell Biol.* 13 (2011) 1016-1023.
- [58] V.C. Daniel, L. Marchionni, J.S. Hierman, J.T. Rhodes, W.L. Devereux, C.M. Rudin, R. Yung, G. Parmigiani, M. Dorsch, C.D. Peacock, and D.N. Watkins, A primary xenograft model of small-cell lung cancer reveals irreversible changes in gene expression imposed by culture in vitro. *Cancer Res* 69 (2009) 3364-3373.
- [59] K. Bray, H.Y. Chen, C.M. Karp, M. May, S. Ganesan, V. Karantza-Wadsworth, R.S. DiPaola, and E. White, Bcl-2 modulation to activate apoptosis in prostate cancer. *Mol. Cancer Res* 7 (2009) 1487-1496.
- [60] S. Lheureux, M. N'diaye, C. Blanc-Fournier, A.E. Dugue, B. Clarisse, S. Dutoit, F. Giffard, E. Abeilard, M. Briand, A. Labiche, J.M. Grellard, H. Crouet, S. Martin, F. Joly, and L. Poulain, Identification of predictive factors of response to the BH3-mimetic molecule ABT-737: an ex vivo experiment in human serous ovarian carcinoma. *Int. J Cancer* 136 (2015) E340-E350.
- [61] C. Seveno, D. Loussouarn, S. Brechet, M. Campone, P. Juin, and S. Barille-Nion, gamma-Secretase inhibition promotes cell death, Noxa upregulation, and sensitization to BH3 mimetic ABT-737 in human breast cancer cells. *Breast Cancer Res* 14 (2012) R96.
- [62] S. Chen, Y. Dai, H. Harada, P. Dent, and S. Grant, Mcl-1 down-regulation potentiates ABT-737 lethality by cooperatively inducing Bak activation and Bax translocation. *Cancer Res* 67 (2007) 782-791.
- [63] K.M. Lucas, N. Mohana-Kumaran, D. Lau, X.D. Zhang, P. Hersey, D.C. Huang, W. Weninger, N.K. Haass, and J.D. Allen, Modulation of NOXA and MCL-1 as a strategy for sensitizing melanoma cells to the BH3-mimetic ABT-737. *Clin Cancer Res* 18 (2012) 783-795.

- [64] R. Alessandro, S. Fontana, M. Giordano, C. Corrado, P. Colomba, A.M. Flugy, A. Santoro, E.C. Kohn, and L.G. De, Effects of carboxyamidotriazole on in vitro models of imatinib-resistant chronic myeloid leukemia. *J Cell Physiol* 215 (2008) 111-121.
- [65] L. Guo, Z.S. Li, H.L. Wang, C.Y. Ye, and D.C. Zhang, Carboxyamido-triazole inhibits proliferation of human breast cancer cells via G(2)/M cell cycle arrest and apoptosis. *Eur J Pharmacol* 538 (2006) 15-22.
- [66] P.A. Lambert, K.D. Somers, E.C. Kohn, and R.R. Perry, Antiproliferative and antiinvasive effects of carboxyamido-triazole on breast cancer cell lines. *Surgery* 122 (1997) 372-378.
- [67] C. Chen, R. Ju, J. Shi, W. Chen, F. Sun, L. Zhu, J. Li, D. Zhang, C. Ye, and L. Guo, Carboxyamidotriazole Synergizes with Sorafenib to Combat Non-Small Cell Lung Cancer through Inhibition of NANOG and Aggravation of Apoptosis. *J Pharmacol. Exp. Ther.* 362 (2017) 219-229.
- [68] J.L. Yang, X.J. Qu, Y. Yu, E.C. Kohn, and M.L. Friedlander, Selective sensitivity to carboxyamidotriazole by human tumor cell lines with DNA mismatch repair deficiency. *Int J Cancer* 123 (2008) 258-263.
- [69] S. Ge, S.A. Rempel, G. Divine, and T. Mikkelsen, Carboxyamido-triazole induces apoptosis in bovine aortic endothelial and human glioma cells. *Clin Cancer Res* 6 (2000) 1248-1254.
- [70] P.R. van Ginkel, M.B. Yan, S. Bhattacharya, A.S. Polans, and J.D. Kenealey, Natural products induce a G protein-mediated calcium pathway activating p53 in cancer cells. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 288 (2015) 453-462.
- [71] F.G. Perabo, A.W. Demant, A. Wirger, D.H. Schmidt, M. Sitia, E. Wardelmann, S.C. Muller, and E.C. Kohn, Carboxyamido-triazole (CAI) reverses the balance between proliferation and apoptosis in a rat bladder cancer model. *Anticancer Res* 25 (2005) 725-729.
- [72] K.D. Rodland, R.P. Wersto, S. Hobson, and E.C. Kohn, Thapsigargin-induced gene expression in nonexcitable cells is dependent on calcium influx. *Mol Endocrinol* 11 (1997) 281-291.
- [73] K.D. Kim, S. Srikanth, M.K. Yee, D.C. Mock, G.W. Lawson, and Y. Gwack, ORAI1 deficiency impairs activated T cell death and enhances T cell survival. *J Immunol.* 187 (2011) 3620-3630.
- [74] T. Hewavitharana, X. Deng, Y. Wang, M.F. Ritchie, G.V. Girish, J. Soboloff, and D.L. Gill, Location and function of STIM1 in the activation of Ca²⁺ entry signals. *J Biol. Chem* 283 (2008) 26252-26262.
- [75] M. Breuleux, M. Klopfenstein, C. Stephan, C.A. Doughty, L. Barys, S.M. Maira, D. Kwiatkowski, and H.A. Lane, Increased AKT S473 phosphorylation after mTORC1 inhibition is rictor dependent and does not predict tumor cell response to PI3K/mTOR inhibition. *Mol Cancer Ther* 8 (2009) 742-753.
- [76] F.M. Davis, I. Azimi, R.A. Faville, A.A. Peters, K. Jalink, J.W. Putney, Jr., G.J. Goodhill, E.W. Thompson, S.J. Roberts-Thomson, and G.R. Monteith, Induction of epithelial-mesenchymal transition (EMT) in breast cancer cells is calcium signal dependent. *Oncogene*2013).
- [77] C.M. Coticchia, C.M. Revankar, T.B. Deb, R.B. Dickson, and M.D. Johnson, Calmodulin modulates Akt activity in human breast cancer cell lines. *Breast Cancer Res. Treat.* 115 (2009) 545-560.

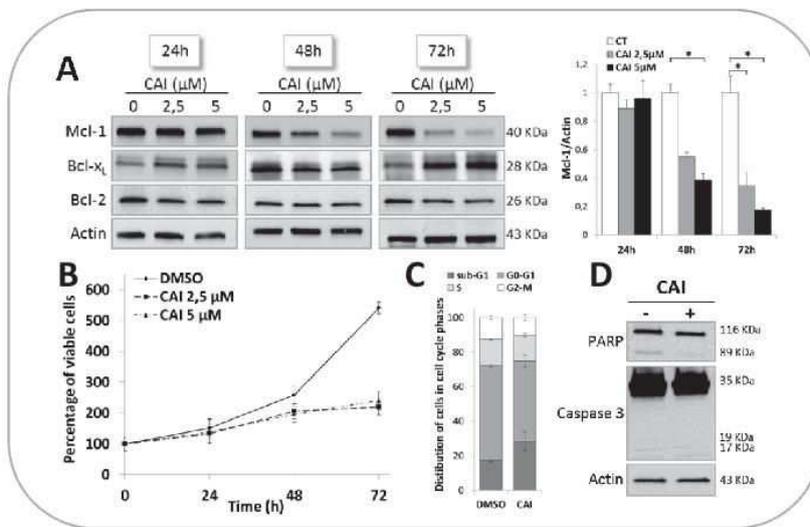
- [78] T.B. Deb, C.M. Cotichia, and R.B. Dickson, Calmodulin-mediated activation of Akt regulates survival of c-Myc-overexpressing mouse mammary carcinoma cells. *J Biol Chem* 279 (2004) 38903-38911.
- [79] B. Dong, C.A. Valencia, and R. Liu, Ca²⁺/calmodulin directly interacts with the pleckstrin homology domain of AKT1. *J Biol. Chem* 282 (2007) 25131-25140.
- [80] A.M. Gocher, G. Azabdaftari, L.M. Euscher, S. Dai, L.G. Karacosta, T.F. Franke, and A.M. Edelman, Akt activation by Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase kinase 2 (CaMKK2) in ovarian cancer cells. *J Biol. Chem* 292 (2017) 14188-14204.
- [81] M. Hoyer-Hansen and M. Jaattela, AMP-activated protein kinase: a universal regulator of autophagy? *Autophagy*. 3 (2007) 381-383.
- [82] Z. Jing, X. Sui, J. Yao, J. Xie, L. Jiang, Y. Zhou, H. Pan, and W. Han, SKF-96365 activates cytoprotective autophagy to delay apoptosis in colorectal cancer cells through inhibition of the calcium/CaMKIIγ/AKT-mediated pathway. *Cancer Lett.* 372 (2016) 226-238.
- [83] N. Yang, Y. Tang, F. Wang, H. Zhang, D. Xu, Y. Shen, S. Sun, and G. Yang, Blockade of store-operated Ca²⁺ entry inhibits hepatocarcinoma cell migration and invasion by regulating focal adhesion turnover. *Cancer Lett.* 330 (2013) 163-169.
- [84] B.D. Tang, X. Xia, X.F. Lv, B.X. Yu, J.N. Yuan, X.Y. Mai, J.Y. Shang, J.G. Zhou, S.J. Liang, and R.P. Pang, Inhibition of Orai1-mediated Ca²⁺ entry enhances chemosensitivity of HepG2 hepatocarcinoma cells to 5-fluorouracil. *J Cell Mol. Med.* 21 (2017) 904-915.
- [85] R.K. Motiani, M.C. Hyzinski-Garcia, X. Zhang, M.M. Henkel, I.F. Abdullaev, Y.H. Kuo, K. Matrougui, A.A. Mongin, and M. Trebak, STIM1 and Orai1 mediate CRAC channel activity and are essential for human glioblastoma invasion. *Pflugers Arch.* 465 (2013) 1249-1260.
- [86] S. Yang, J.J. Zhang, and X.Y. Huang, Orai1 and STIM1 are critical for breast tumor cell migration and metastasis. *Cancer Cell* 15 (2009) 124-134.
- [87] Y.F. Chen, W.T. Chiu, Y.T. Chen, P.Y. Lin, H.J. Huang, C.Y. Chou, H.C. Chang, M.J. Tang, and M.R. Shen, Calcium store sensor stromal-interaction molecule 1-dependent signaling plays an important role in cervical cancer growth, migration, and angiogenesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 108 (2011) 15225-15230.
- [88] K. Kondratska, A. Kondratskyi, M. Yassine, L. Lemonnier, G. Lepage, A. Morabito, R. Skryma, and N. Prevarskaya, Orai1 and STIM1 mediate SOCE and contribute to apoptotic resistance of pancreatic adenocarcinoma. *Biochim. Biophys. Acta* 1843 (2014) 2263-2269.
- [89] S. Schmidt, G. Liu, G. Liu, W. Yang, S. Honisch, S. Pantelakos, C. Stourmaras, A. Honig, and F. Lang, Enhanced Orai1 and STIM1 expression as well as store operated Ca²⁺ entry in therapy resistant ovary carcinoma cells. *Oncotarget.* 5 (2014) 4799-4810.

Figure 1, Bonnefond et al.

IGROV1-R10



OVCAR3



SKOV3

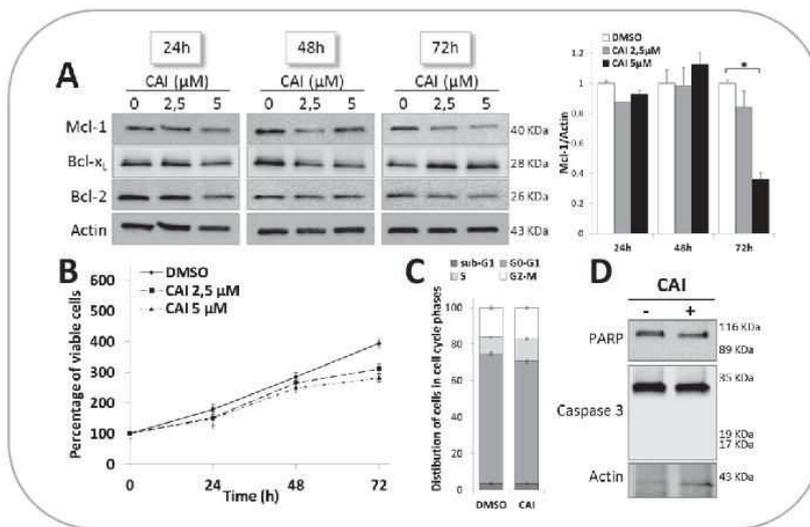


Figure 2, Bonnefond et al.

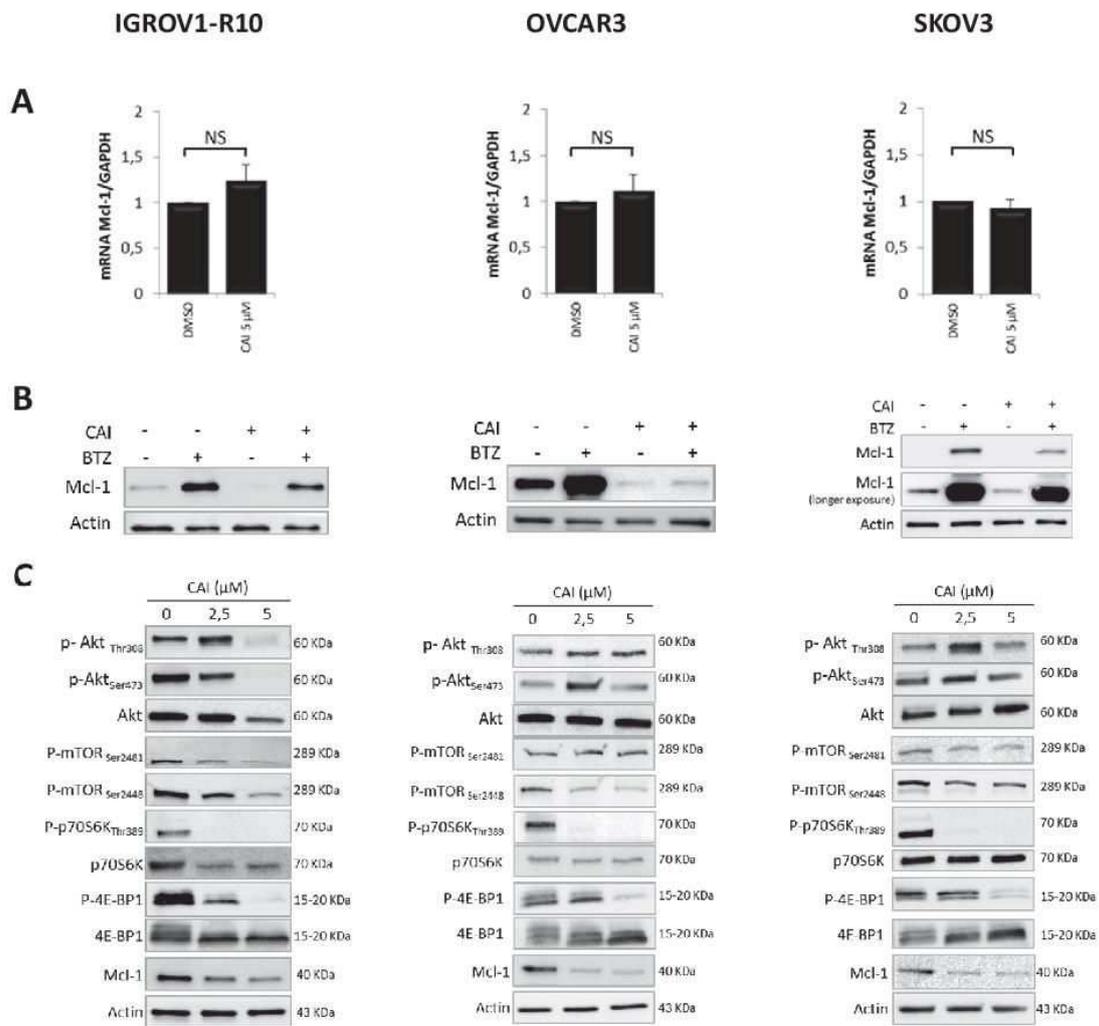


Figure 3, Bonnefond et al.

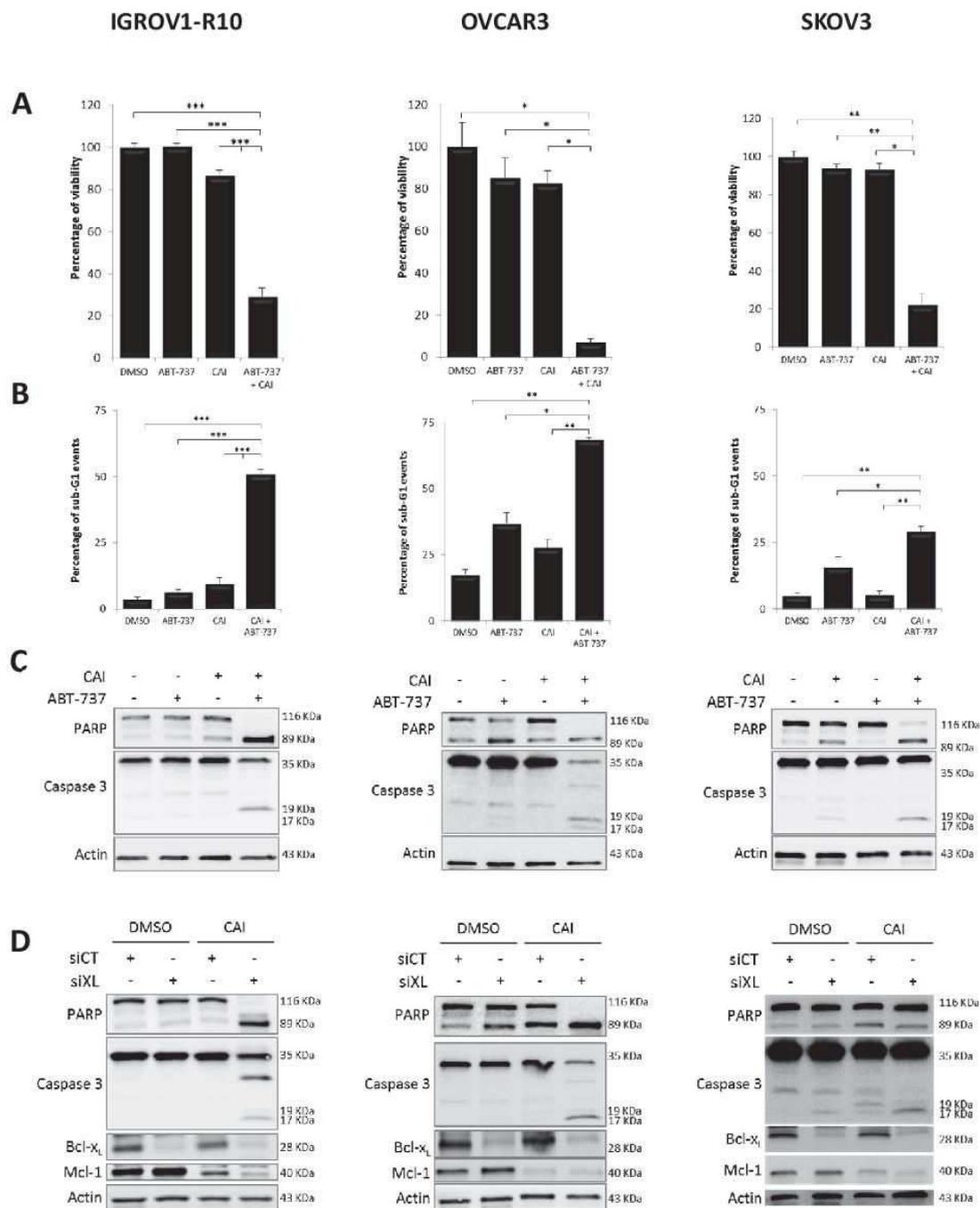


Figure 4, Bonnefond et al.

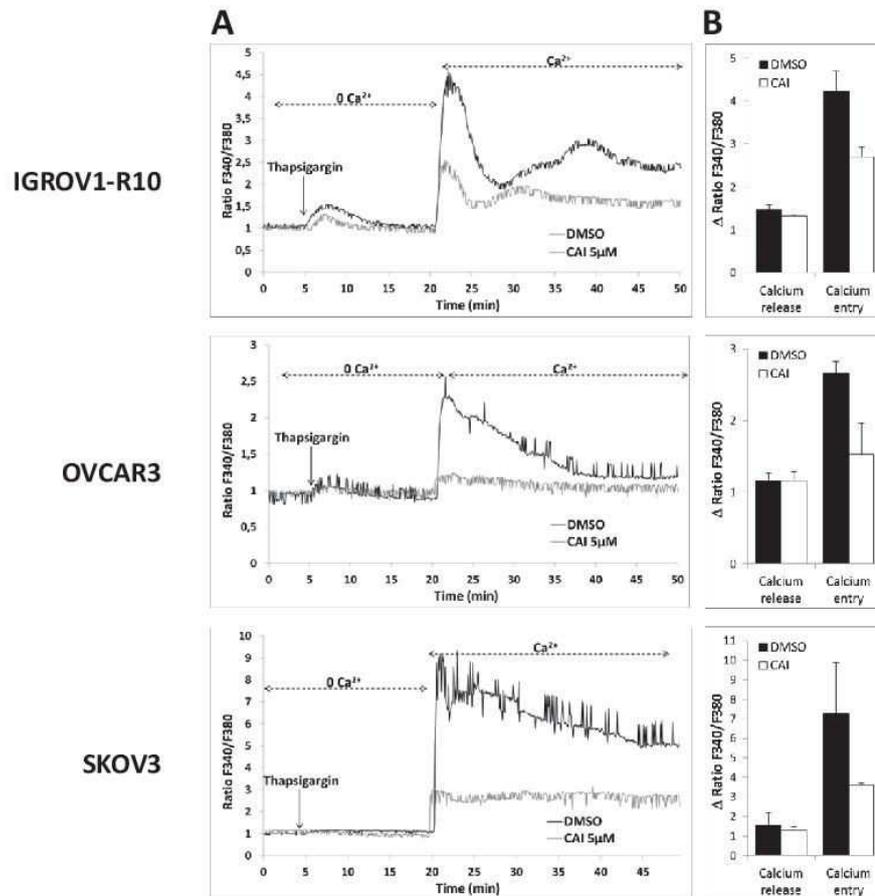


Figure 5, Bonnefond et al.

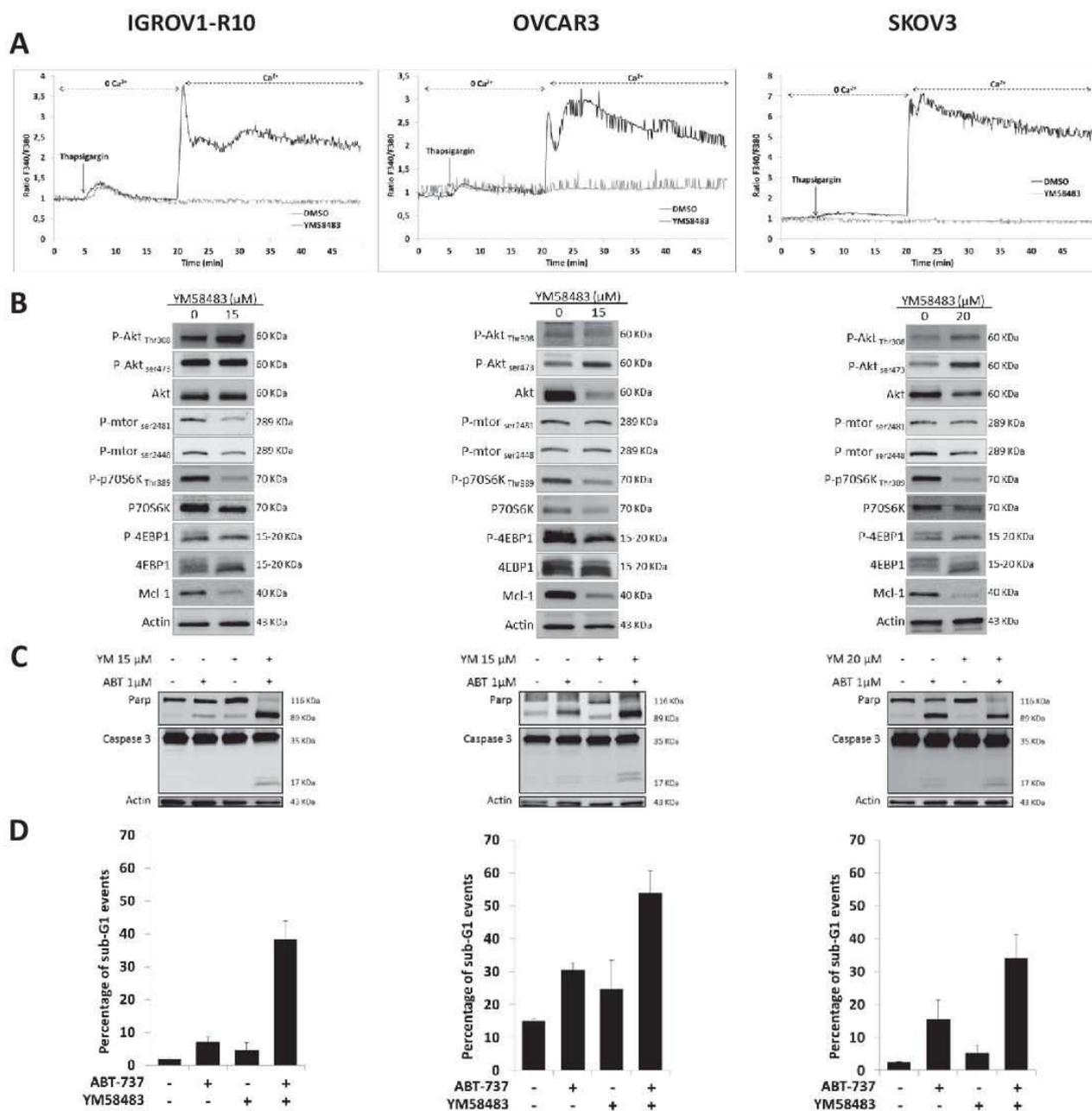
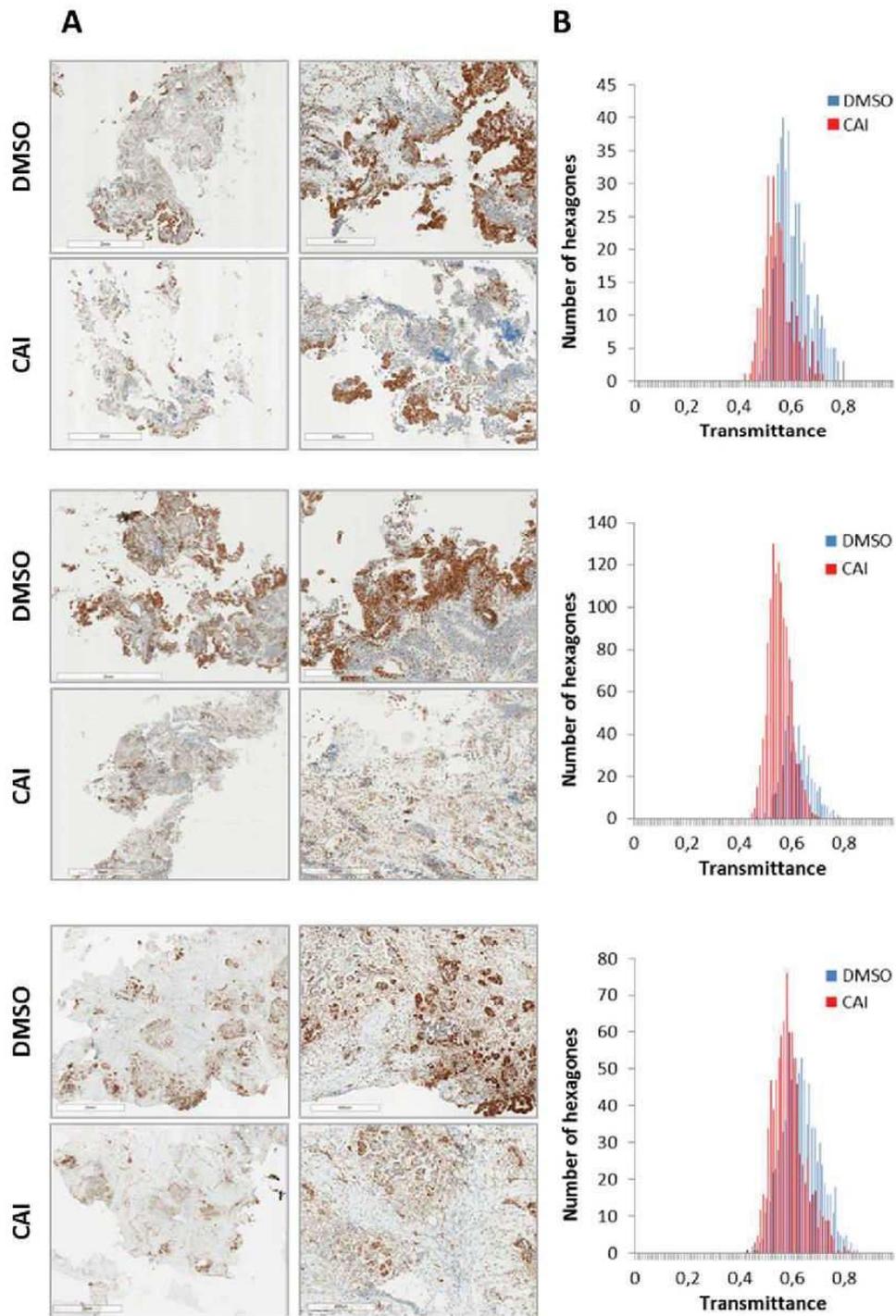


Figure 7, Bonnefond et al.



Bibliographie

Bibliographie

- Abbott, N.J., Rönnebeck, L., Hansson, E., 2006. Astrocyte-endothelial interactions at the blood-brain barrier. *Nat. Rev. Neurosci.* 7, 41–53. <https://doi.org/10.1038/nrn1824>
- Ahmed, S., Reynolds, B.A., Weiss, S., 1995. BDNF enhances the differentiation but not the survival of CNS stem cell-derived neuronal precursors. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 15, 5765–5778.
- Aicardi, G., Argilli, E., Cappello, S., Santi, S., Riccio, M., Thoenen, H., Canossa, M., 2004. Induction of long-term potentiation and depression is reflected by corresponding changes in secretion of endogenous brain-derived neurotrophic factor. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 101, 15788–15792. <https://doi.org/10.1073/pnas.0406960101>
- Aid, T., Kazantseva, A., Piirsoo, M., Palm, K., Timmusk, T., 2007. Mouse and rat BDNF gene structure and expression revisited. *J. Neurosci. Res.* 85, 525–535. <https://doi.org/10.1002/jnr.21139>
- Akassoglou, K., Kombrinck, K.W., Degen, J.L., Strickland, S., 2000. Tissue plasminogen activator-mediated fibrinolysis protects against axonal degeneration and demyelination after sciatic nerve injury. *J. Cell Biol.* 149, 1157–1166.
- Albrechtsen, O.K., 1957. The fibrinolytic activity of human tissues. *Br. J. Haematol.* 3, 284–291.
- Alder, J., Thakker-Varia, S., Crozier, R.A., Shaheen, A., Plummer, M.R., Black, I.B., 2005. Early presynaptic and late postsynaptic components contribute independently to brain-derived neurotrophic factor-induced synaptic plasticity. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 25, 3080–3085. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.2970-04.2005>
- Alonso, M., Medina, J.H., Pozzo-Miller, L., 2004. ERK1/2 activation is necessary for BDNF to increase dendritic spine density in hippocampal CA1 pyramidal neurons. *Learn. Mem. Cold Spring Harb. N* 11, 172–178. <https://doi.org/10.1101/lm.67804>
- Alsina, B., Vu, T., Cohen-Cory, S., 2001. Visualizing synapse formation in arborizing optic axons in vivo: dynamics and modulation by BDNF. *Nat. Neurosci.* 4, 1093–1101. <https://doi.org/10.1038/nn735>
- Altar, C.A., Cai, N., Bliven, T., Juhasz, M., Conner, J.M., Acheson, A.L., Lindsay, R.M., Wiegand, S.J., 1997. Anterograde transport of brain-derived neurotrophic factor and its role in the brain. *Nature* 389, 856–860. <https://doi.org/10.1038/39885>
- Alvarez, V., Rossetti, A.O., Papavasileiou, V., Michel, P., 2013. Acute seizures in acute ischemic stroke: does thrombolysis have a role to play? *J. Neurol.* 260, 55–61. <https://doi.org/10.1007/s00415-012-6583-6>
- Amaral, M.D., Pozzo-Miller, L., 2007. TRPC3 channels are necessary for brain-derived neurotrophic factor to activate a nonselective cationic current and to induce dendritic spine formation. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 27, 5179–5189. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.5499-06.2007>
- Ammar, M.R., Kassas, N., Chasserot-Golaz, S., Bader, M.-F., Vitale, N., 2013. Lipids in Regulated Exocytosis: What are They Doing? *Front. Endocrinol.* 4, 125. <https://doi.org/10.3389/fendo.2013.00125>
- An, J., Zhang, C., Polavarapu, R., Zhang, Xiaohui, Zhang, Xiumei, Yepes, M., 2008. Tissue-type plasminogen activator and the low-density lipoprotein receptor-related protein induce Akt phosphorylation in the ischemic brain. *Blood* 112, 2787–2794. <https://doi.org/10.1182/blood-2008-02-141630>
- An, J.J., Gharami, K., Liao, G.-Y., Woo, N.H., Lau, A.G., Vanevski, F., Torre, E.R., Jones, K.R., Feng, Y., Lu, B., Xu, B., 2008. Distinct role of long 3' UTR BDNF mRNA in spine

- morphology and synaptic plasticity in hippocampal neurons. *Cell* 134, 175–187. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2008.05.045>
- Anastasia, A., Deinhardt, K., Chao, M.V., Will, N.E., Irmady, K., Lee, F.S., Hempstead, B.L., Bracken, C., 2013. Val66Met polymorphism of BDNF alters prodomain structure to induce neuronal growth cone retraction. *Nat. Commun.* 4, 2490. <https://doi.org/10.1038/ncomms3490>
- Andral, G., 1843. *Essai d'hématologie pathologique*. Fortin, Masson et Cie.
- Angles-Cano, E., Balaton, A., Le Bonniec, B., Genot, E., Elion, J., Sultan, Y., 1985. Production of monoclonal antibodies to the high fibrin-affinity, tissue-type plasminogen activator of human plasma. Demonstration of its endothelial origin by immunolocalization. *Blood* 66, 913–920.
- Asahi, M., Asahi, K., Jung, J.C., del Zoppo, G.J., Fini, M.E., Lo, E.H., 2000. Role for matrix metalloproteinase 9 after focal cerebral ischemia: effects of gene knockout and enzyme inhibition with BB-94. *J. Cereb. Blood Flow Metab. Off. J. Int. Soc. Cereb. Blood Flow Metab.* 20, 1681–1689. <https://doi.org/10.1097/00004647-200012000-00007>
- Astrup, T., Permin, P.M., 1947. Fibrinolysis in the Animal Organism. *Nature* 159, 681–682. <https://doi.org/10.1038/159681b0>
- Astrup, T., Stage, A., 1952. Isolation of a Soluble Fibrinolytic Activator from Animal Tissue. *Nature* 170, 929. <https://doi.org/10.1038/170929a0>
- Ayloo, S., Guedes-Dias, P., Ghiretti, A.E., Holzbaur, E.L.F., 2017. Dynein efficiently navigates the dendritic cytoskeleton to drive the retrograde trafficking of BDNF/TrkB signaling endosomes. *Mol. Biol. Cell* 28, 2543–2554. <https://doi.org/10.1091/mbc.E17-01-0068>
- Bachis, A., Avdoshina, V., Zecca, L., Parsadanian, M., Mocchetti, I., 2012. Human immunodeficiency virus type 1 alters brain-derived neurotrophic factor processing in neurons. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 32, 9477–9484. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.0865-12.2012>
- Baj, G., Leone, E., Chao, M.V., Tongiorgi, E., 2011. Spatial segregation of BDNF transcripts enables BDNF to differentially shape distinct dendritic compartments. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 108, 16813–16818. <https://doi.org/10.1073/pnas.1014168108>
- Bandtlow, C., Dechant, G., 2004. From cell death to neuronal regeneration, effects of the p75 neurotrophin receptor depend on interactions with partner subunits. *Sci. STKE Signal Transduct. Knowl. Environ.* 2004, pe24. <https://doi.org/10.1126/stke.2352004pe24>
- Banker, G.A., Cowan, W.M., 1979. Further observations on hippocampal neurons in dispersed cell culture. *J. Comp. Neurol.* 187, 469–493. <https://doi.org/10.1002/cne.901870302>
- Baquet, Z.C., Gorski, J.A., Jones, K.R., 2004. Early striatal dendrite deficits followed by neuron loss with advanced age in the absence of anterograde cortical brain-derived neurotrophic factor. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 24, 4250–4258. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.3920-03.2004>
- Baranes, Danny, Lederfein, D., Huang, Y., Chen, M., Bailey, C.H., Kandel, E.R., 1998. to the Late Phase of LTP and to Synaptic Growth in the Hippocampal Mossy Fiber Pathway. *Cell* 21, 813–825.
- Baranes, D., Lederfein, D., Huang, Y.Y., Chen, M., Bailey, C.H., Kandel, E.R., 1998. Tissue plasminogen activator contributes to the late phase of LTP and to synaptic growth in the hippocampal mossy fiber pathway. *Neuron* 21, 813–825.
- Barber, M., Arai, Y., Morishita, Y., Vigier, L., Causeret, F., Borello, U., Ledonne, F., Coppola, E., Contremoulins, V., Pfrieger, F.W., Tissir, F., Govindan, S., Jabaudon, D., Proux-Gillardeaux, V., Galli, T., Pierani, A., 2015. Migration Speed of Cajal-Retzius Cells

- Modulated by Vesicular Trafficking Controls the Size of Higher-Order Cortical Areas. *Curr. Biol.* CB 25, 2466–2478. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2015.08.028>
- Barde, Y.A., 1989. Trophic factors and neuronal survival. *Neuron* 2, 1525–1534.
- Barde, Y.A., Edgar, D., Thoenen, H., 1982. Purification of a new neurotrophic factor from mammalian brain. *EMBO J.* 1, 549–553.
- Baricos, W.H., Cortez, S.L., el-Dahr, S.S., Schnaper, H.W., 1995. ECM degradation by cultured human mesangial cells is mediated by a PA/plasmin/MMP-2 cascade. *Kidney Int.* 47, 1039–1047.
- Barker, P.A., 2004. p75^{NTR} is positively promiscuous: novel partners and new insights. *Neuron* 42, 529–533. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2004.04.001>
- Barker-Carlson, K., Lawrence, D.A., Schwartz, B.S., 2002. Acyl-enzyme complexes between tissue-type plasminogen activator and neuroserpin are short-lived in vitro. *J. Biol. Chem.* 277, 46852–46857. <https://doi.org/10.1074/jbc.M207740200>
- Barnes, A.P., Lilley, B.N., Pan, Y.A., Plummer, L.J., Powell, A.W., Raines, A.N., Sanes, J.R., Polleux, F., 2007. LKB1 and SAD kinases define a pathway required for the polarization of cortical neurons. *Cell* 129, 549–563. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2007.03.025>
- Barnes, P., Thomas, K.L., 2008. Proteolysis of proBDNF is a key regulator in the formation of memory. *PLoS One* 3, e3248. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0003248>
- Baron, A., Montagne, A., Cassé, F., Launay, S., Maubert, E., Ali, C., Vivien, D., 2010. NR2D-containing NMDA receptors mediate tissue plasminogen activator-promoted neuronal excitotoxicity. *Cell Death Differ.* 17, 860–871. <https://doi.org/10.1038/cdd.2009.172>
- Basham, M.E., Seeds, N.W., 2001. Plasminogen expression in the neonatal and adult mouse brain. *J. Neurochem.* 77, 318–325.
- Bath, K.G., Mandairon, N., Jing, D., Rajagopal, R., Kapoor, R., Chen, Z.-Y., Khan, T., Proenca, C.C., Kraemer, R., Cleland, T.A., Hempstead, B.L., Chao, M.V., Lee, F.S., 2008. Variant brain-derived neurotrophic factor (Val66Met) alters adult olfactory bulb neurogenesis and spontaneous olfactory discrimination. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 28, 2383–2393. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.4387-07.2008>
- Béjot, Y., Prigent-Tessier, A., Cachia, C., Giroud, M., Mossiat, C., Bertrand, N., Garnier, P., Marie, C., 2011. Time-dependent contribution of non neuronal cells to BDNF production after ischemic stroke in rats. *Neurochem. Int.* 58, 102–111. <https://doi.org/10.1016/j.neuint.2010.10.019>
- Benchenane, K., Berezowski, V., Ali, C., Fernández-Monreal, M., López-Atalaya, J.P., Brillault, J., Chuquet, J., Nouvelot, A., MacKenzie, E.T., Bu, G., Cecchelli, R., Touzani, O., Vivien, D., 2005. Tissue-type plasminogen activator crosses the intact blood-brain barrier by low-density lipoprotein receptor-related protein-mediated transcytosis. *Circulation* 111, 2241–2249. <https://doi.org/10.1161/01.CIR.0000163542.48611.A2>
- Benchenane, K., Castel, H., Boulouard, M., Bluthé, R., Fernandez-Monreal, M., Roussel, B.D., Lopez-Atalaya, J.P., Butt-Gueulle, S., Agin, V., Maubert, E., Dantzer, R., Touzani, O., Dauphin, F., Vivien, D., Ali, C., 2007. Anti-NR1 N-terminal-domain vaccination unmasks the crucial action of tPA on NMDA-receptor-mediated toxicity and spatial memory. *J. Cell Sci.* 120, 578–585. <https://doi.org/10.1242/jcs.03354>
- Benraiss, A., Chmielnicki, E., Lerner, K., Roh, D., Goldman, S.A., 2001. Adenoviral brain-derived neurotrophic factor induces both neostriatal and olfactory neuronal recruitment from endogenous progenitor cells in the adult forebrain. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 21, 6718–6731.

- Berg, D.T., Burck, P.J., Berg, D.H., Grinnell, B.W., 1993. Kringle glycosylation in a modified human tissue plasminogen activator improves functional properties. *Blood* 81, 1312–1322.
- Bergami, M., Rimondini, R., Santi, S., Blum, R., Götz, M., Canossa, M., 2008. Deletion of TrkB in adult progenitors alters newborn neuron integration into hippocampal circuits and increases anxiety-like behavior. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 105, 15570–15575. <https://doi.org/10.1073/pnas.0803702105>
- Bertrand, T., Lesept, F., Chevillet, A., Lenoir, S., Aimable, M., Briens, A., Hommet, Y., Bardou, I., Parcq, J., Vivien, D., 2015. Conformations of tissue plasminogen activator (tPA) orchestrate neuronal survival by a crosstalk between EGFR and NMDAR. *Cell Death Dis.* 6, e1924. <https://doi.org/10.1038/cddis.2015.296>
- Bi Oh, S., Suh, N., Kim, I., Lee, J.-Y., 2015. Impacts of aging and amyloid- β deposition on plasminogen activators and plasminogen activator inhibitor-1 in the Tg2576 mouse model of Alzheimer's disease. *Brain Res.* 1597, 159–167. <https://doi.org/10.1016/j.brainres.2014.11.042>
- Biessen, E.A., van Teijlingen, M., Vietsch, H., Barrett-Bergshoeff, M.M., Bijsterbosch, M.K., Rijken, D.C., van Berkel, T.J., Kuiper, J., 1997. Antagonists of the mannose receptor and the LDL receptor-related protein dramatically delay the clearance of tissue plasminogen activator. *Circulation* 95, 46–52.
- Biffo, S., Offenhäuser, N., Carter, B.D., Barde, Y.A., 1995. Selective binding and internalisation by truncated receptors restrict the availability of BDNF during development. *Dev. Camb. Engl.* 121, 2461–2470.
- Binder, B.R., Spragg, J., Austen, K.F., 1979. Purification and characterization of human vascular plasminogen activator derived from blood vessel perfusates. *J. Biol. Chem.* 254, 1998–2003.
- Blasi, F., Vassalli, J.D., Danø, K., 1987. Urokinase-type plasminogen activator: proenzyme, receptor, and inhibitors. *J. Cell Biol.* 104, 801–804.
- Bliss, T.V., Lomo, T., 1973. Long-lasting potentiation of synaptic transmission in the dentate area of the anaesthetized rabbit following stimulation of the perforant path. *J. Physiol.* 232, 331–356.
- Block, M.L., Hong, J.-S., 2005. Microglia and inflammation-mediated neurodegeneration: multiple triggers with a common mechanism. *Prog. Neurobiol.* 76, 77–98. <https://doi.org/10.1016/j.pneurobio.2005.06.004>
- Bolton, M.M., Pittman, A.J., Lo, D.C., 2000. Brain-derived neurotrophic factor differentially regulates excitatory and inhibitory synaptic transmission in hippocampal cultures. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 20, 3221–3232.
- Bonifacino, J.S., Glick, B.S., 2004. The mechanisms of vesicle budding and fusion. *Cell* 116, 153–166.
- Borisov, O.V., Field, M., Ling, V.T., Harris, R.J., 2009. Characterization of oligosaccharides in recombinant tissue plasminogen activator produced in Chinese hamster ovary cells: two decades of analytical technology development. *Anal. Chem.* 81, 9744–9754. <https://doi.org/10.1021/ac901498k>
- Boucrot, E., Saffarian, S., Zhang, R., Kirchhausen, T., 2010. Roles of AP-2 in clathrin-mediated endocytosis. *PLoS One* 5, e10597. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0010597>
- Boulanger, L., Poo, M.M., 1999. Gating of BDNF-induced synaptic potentiation by cAMP. *Science* 284, 1982–1984.

- Boyles, P.W., Meyer, W.H., Graff, J., Ashley, C.C., Ripic, R.G., 1960. Comparative effectiveness of intravenous and intra-arterial fibrinolysin therapy. *Am. J. Cardiol.* 6, 439–446.
- Briens, A., Bardou, I., Lebas, H., Miles, L.A., Parmer, R.J., Vivien, D., Docagne, F., 2017. Astrocytes regulate the balance between plasminogen activation and plasmin clearance via cell-surface actin. *Cell Discov.* 3, 17001. <https://doi.org/10.1038/celldisc.2017.1>
- Brigadski, T., Hartmann, M., Lessmann, V., 2005. Differential vesicular targeting and time course of synaptic secretion of the mammalian neurotrophins. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 25, 7601–7614. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.1776-05.2005>
- Bright, N.A., Gratian, M.J., Luzio, J.P., 2005. Endocytic delivery to lysosomes mediated by concurrent fusion and kissing events in living cells. *Curr. Biol. CB* 15, 360–365. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2005.01.049>
- Brogren, H., Karlsson, L., Andersson, M., Wang, L., Erlinge, D., Jern, S., 2004. Platelets synthesize large amounts of active plasminogen activator inhibitor 1. *Blood* 104, 3943–3948. <https://doi.org/10.1182/blood-2004-04-1439>
- Brunet, A., Bonni, A., Zigmond, M.J., Lin, M.Z., Juo, P., Hu, L.S., Anderson, M.J., Arden, K.C., Blenis, J., Greenberg, M.E., 1999. Akt promotes cell survival by phosphorylating and inhibiting a Forkhead transcription factor. *Cell* 96, 857–868.
- Bruno, M.A., Cuello, A.C., 2006. Activity-dependent release of precursor nerve growth factor, conversion to mature nerve growth factor, and its degradation by a protease cascade. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 103, 6735–6740. <https://doi.org/10.1073/pnas.0510645103>
- Bu, G., Williams, S., Strickland, D.K., Schwartz, A.L., 1992. Low density lipoprotein receptor-related protein/alpha 2-macroglobulin receptor is an hepatic receptor for tissue-type plasminogen activator. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 89, 7427–7431.
- Bucci, C., Alifano, P., Cogli, L., 2014. The role of rab proteins in neuronal cells and in the trafficking of neurotrophin receptors. *Membranes* 4, 642–677. <https://doi.org/10.3390/membranes4040642>
- Buisson, A., Nicole, O., Docagne, F., Sartelet, H., Mackenzie, E.T., Vivien, D., 1998. Up-regulation of a serine protease inhibitor in astrocytes mediates the neuroprotective activity of transforming growth factor beta1. *FASEB J. Off. Publ. Fed. Am. Soc. Exp. Biol.* 12, 1683–1691.
- Bukhari, N., Torres, L., Robinson, J.K., Tsrka, S.E., 2011. Axonal regrowth after spinal cord injury via chondroitinase and the tissue plasminogen activator (tPA)/plasmin system. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 31, 14931–14943. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.3339-11.2011>
- Cacquevel, M., Launay, S., Castel, H., Benchenane, K., Chéenne, S., Buée, L., Moons, L., Delacourte, A., Carmeliet, P., Vivien, D., 2007. Ageing and amyloid-beta peptide deposition contribute to an impaired brain tissue plasminogen activator activity by different mechanisms. *Neurobiol. Dis.* 27, 164–173. <https://doi.org/10.1016/j.nbd.2007.04.004>
- Calabresi, P., Napolitano, M., Centonze, D., Marfia, G.A., Gubellini, P., Teule, M.A., Berretta, N., Bernardi, G., Frati, L., Tolu, M., Gulino, A., 2000. Tissue plasminogen activator controls multiple forms of synaptic plasticity and memory. *Eur. J. Neurosci.* 12, 1002–1012.
- Caldeira, M.V., Melo, C.V., Pereira, D.B., Carvalho, R., Correia, S.S., Backos, D.S., Carvalho, A.L., Esteban, J.A., Duarte, C.B., 2007a. Brain-derived neurotrophic factor regulates the expression and synaptic delivery of alpha-amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazole

- propionic acid receptor subunits in hippocampal neurons. *J. Biol. Chem.* 282, 12619–12628. <https://doi.org/10.1074/jbc.M700607200>
- Caldeira, M.V., Melo, C.V., Pereira, D.B., Carvalho, R.F., Carvalho, A.L., Duarte, C.B., 2007b. BDNF regulates the expression and traffic of NMDA receptors in cultured hippocampal neurons. *Mol. Cell. Neurosci.* 35, 208–219. <https://doi.org/10.1016/j.mcn.2007.02.019>
- Caleo, M., Medini, P., von Bartheld, C.S., Maffei, L., 2003. Provision of brain-derived neurotrophic factor via anterograde transport from the eye preserves the physiological responses of axotomized geniculate neurons. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 23, 287–296.
- Carmignoto, G., Pizzorusso, T., Tia, S., Vicini, S., 1997. Brain-derived neurotrophic factor and nerve growth factor potentiate excitatory synaptic transmission in the rat visual cortex. *J. Physiol.* 498 (Pt 1), 153–164.
- Casademunt, E., Carter, B.D., Benzell, I., Frade, J.M., Dechant, G., Barde, Y.A., 1999. The zinc finger protein NRIF interacts with the neurotrophin receptor p75(NTR) and participates in programmed cell death. *EMBO J.* 18, 6050–6061. <https://doi.org/10.1093/emboj/18.21.6050>
- Cassé, F., Bardou, I., Danglot, L., Briens, A., Montagne, A., Parcq, J., Alahari, A., Galli, T., Vivien, D., Docagne, F., 2012. Glutamate controls tPA recycling by astrocytes, which in turn influences glutamatergic signals. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 32, 5186–5199. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.5296-11.2012>
- Castrén, E., Vöikar, V., Rantamäki, T., 2007. Role of neurotrophic factors in depression. *Curr. Opin. Pharmacol.* 7, 18–21. <https://doi.org/10.1016/j.coph.2006.08.009>
- Cavuş, I., Teyler, T., 1996. Two forms of long-term potentiation in area CA1 activate different signal transduction cascades. *J. Neurophysiol.* 76, 3038–3047. <https://doi.org/10.1152/jn.1996.76.5.3038>
- Chaineau, M., Danglot, L., Galli, T., 2009. Multiple roles of the vesicular-SNARE TI-VAMP in post-Golgi and endosomal trafficking. *FEBS Lett.* 583, 3817–3826. <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2009.10.026>
- Chandler, W.L., Alessi, M.C., Aillaud, M.F., Henderson, P., Vague, P., Juhan-Vague, I., 1997. Clearance of tissue plasminogen activator (TPA) and TPA/plasminogen activator inhibitor type 1 (PAI-1) complex: relationship to elevated TPA antigen in patients with high PAI-1 activity levels. *Circulation* 96, 761–768.
- Chao, M.V., 2003. Neurotrophins and their receptors: a convergence point for many signalling pathways. *Nat. Rev. Neurosci.* 4, 299–309. <https://doi.org/10.1038/nrn1078>
- Chavrier, P., Parton, R.G., Hauri, H.P., Simons, K., Zerial, M., 1990. Localization of low molecular weight GTP binding proteins to exocytic and endocytic compartments. *Cell* 62, 317–329.
- Chen, S., Jiang, H., Liu, Y., Hou, Z., Yue, Y., Zhang, Y., Zhao, F., Xu, Z., Li, Y., Mou, X., Li, L., Wang, T., Zhao, J., Han, C., Sui, Y., Wang, M., Yang, Z., Lu, Y., Zhu, Y., Li, J., Shen, X., Sun, F., Chen, Q., Chen, H., Yuan, Y., 2017. Combined serum levels of multiple proteins in tPA-BDNF pathway may aid the diagnosis of five mental disorders. *Sci. Rep.* 7, 6871. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-06832-6>
- Chen, Y.A., Scheller, R.H., 2001. SNARE-mediated membrane fusion. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 2, 98–106. <https://doi.org/10.1038/35052017>
- Chen, Z.-Y., Ieraci, A., Teng, H., Dall, H., Meng, C.-X., Herrera, D.G., Nykjaer, A., Hempstead, B.L., Lee, F.S., 2005. Sortilin controls intracellular sorting of brain-derived neurotrophic

- factor to the regulated secretory pathway. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 25, 6156–6166. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.1017-05.2005>
- Chen, Z.-Y., Patel, P.D., Sant, G., Meng, C.-X., Teng, K.K., Hempstead, B.L., Lee, F.S., 2004. Variant brain-derived neurotrophic factor (BDNF) (Met66) alters the intracellular trafficking and activity-dependent secretion of wild-type BDNF in neurosecretory cells and cortical neurons. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 24, 4401–4411. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.0348-04.2004>
- Cheng, P.-L., Song, A.-H., Wong, Y.-H., Wang, S., Zhang, X., Poo, M.-M., 2011. Self-amplifying autocrine actions of BDNF in axon development. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 108, 18430–18435. <https://doi.org/10.1073/pnas.1115907108>
- Cheng, T., Petraglia, A.L., Li, Z., Thiyagarajan, M., Zhong, Z., Wu, Z., Liu, D., Maggirwar, S.B., Deane, R., Fernández, J.A., LaRue, B., Griffin, J.H., Chopp, M., Zlokovic, B.V., 2006. Activated protein C inhibits tissue plasminogen activator-induced brain hemorrhage. *Nat. Med.* 12, 1278–1285. <https://doi.org/10.1038/nm1498>
- Chevilly, A., Lesept, F., Lenoir, S., Ali, C., Parcq, J., Vivien, D., 2015. Impacts of tissue-type plasminogen activator (tPA) on neuronal survival. *Front. Cell. Neurosci.* 9, 415. <https://doi.org/10.3389/fncel.2015.00415>
- Chilcote, T.J., Galli, T., Mundigl, O., Edelman, L., McPherson, P.S., Takei, K., De Camilli, P., 1995. Cellubrevin and synaptobrevins: similar subcellular localization and biochemical properties in PC12 cells. *J. Cell Biol.* 129, 219–231.
- Christensen, L.R., MacLeod, C.M., 1945. A PROTEOLYTIC ENZYME OF SERUM: CHARACTERIZATION, ACTIVATION, AND REACTION WITH INHIBITORS. *J. Gen. Physiol.* 28, 559–583.
- Cohen-Cory, S., Fraser, S.E., 1995. Effects of brain-derived neurotrophic factor on optic axon branching and remodelling in vivo. *Nature* 378, 192–196. <https://doi.org/10.1038/378192a0>
- Coleman, J., Inukai, M., Inouye, M., 1985. Dual functions of the signal peptide in protein transfer across the membrane. *Cell* 43, 351–360.
- Collen, D., Lijnen, H.R., 1991. Basic and clinical aspects of fibrinolysis and thrombolysis. *Blood* 78, 3114–3124.
- Collingridge, G.L., Kehl, S.J., McLennan, H., 1983. Excitatory amino acids in synaptic transmission in the Schaffer collateral-commissural pathway of the rat hippocampus. *J. Physiol.* 334, 33–46.
- Conner, J.M., Lauterborn, J.C., Yan, Q., Gall, C.M., Varon, S., 1997. Distribution of brain-derived neurotrophic factor (BDNF) protein and mRNA in the normal adult rat CNS: evidence for anterograde axonal transport. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 17, 2295–2313.
- Correa, F., Gauberti, M., Parcq, J., Macrez, R., Hommet, Y., Obiang, P., Hernangómez, M., Montagne, A., Liot, G., Guaza, C., Maubert, E., Ali, C., Vivien, D., Docagne, F., 2011. Tissue plasminogen activator prevents white matter damage following stroke. *J. Exp. Med.* 208, 1229–1242. <https://doi.org/10.1084/jem.20101880>
- Cosker, K.E., Segal, R.A., 2014. Neuronal signaling through endocytosis. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* 6. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a020669>
- Datta, S.R., Dudek, H., Tao, X., Masters, S., Fu, H., Gotoh, Y., Greenberg, M.E., 1997. Akt phosphorylation of BAD couples survival signals to the cell-intrinsic death machinery. *Cell* 91, 231–241.

- Deák, F., Schoch, S., Liu, X., Südhof, T.C., Kavalali, E.T., 2004. Synaptobrevin is essential for fast synaptic-vesicle endocytosis. *Nat. Cell Biol.* 6, 1102–1108. <https://doi.org/10.1038/ncb1185>
- del Peso, L., González-García, M., Page, C., Herrera, R., Nuñez, G., 1997. Interleukin-3-induced phosphorylation of BAD through the protein kinase Akt. *Science* 278, 687–689.
- del Pozo, M.A., Balasubramanian, N., Alderson, N.B., Kiosses, W.B., Grande-García, A., Anderson, R.G.W., Schwartz, M.A., 2005. Phospho-caveolin-1 mediates integrin-regulated membrane domain internalization. *Nat. Cell Biol.* 7, 901–908. <https://doi.org/10.1038/ncb1293>
- Dieni, S., Matsumoto, T., Dekkers, M., Rauskolb, S., Ionescu, M.S., Deogracias, R., Gundelfinger, E.D., Kojima, M., Nestel, S., Frotscher, M., Barde, Y.-A., 2012. BDNF and its pro-peptide are stored in presynaptic dense core vesicles in brain neurons. *J. Cell Biol.* 196, 775–788. <https://doi.org/10.1083/jcb.201201038>
- Docagne, F., Nicole, O., Marti, H.H., MacKenzie, E.T., Buisson, A., Vivien, D., 1999. Transforming growth factor-beta1 as a regulator of the serpins/t-PA axis in cerebral ischemia. *FASEB J. Off. Publ. Fed. Am. Soc. Exp. Biol.* 13, 1315–1324.
- Dougherty, K.M., Pearson, J.M., Yang, A.Y., Westrick, R.J., Baker, M.S., Ginsburg, D., 1999. The plasminogen activator inhibitor-2 gene is not required for normal murine development or survival. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 96, 686–691.
- Du, J., Wei, H., Wang, Z., Wong, S.T., Poo, M., 2009. Long-range retrograde spread of LTP and LTD from optic tectum to retina. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 106, 18890–18896. <https://doi.org/10.1073/pnas.0910659106>
- East, E., Baker, D., Pryce, G., Lijnen, H.R., Cuzner, M.L., Gverić, D., 2005. A role for the plasminogen activator system in inflammation and neurodegeneration in the central nervous system during experimental allergic encephalomyelitis. *Am. J. Pathol.* 167, 545–554. [https://doi.org/10.1016/S0002-9440\(10\)62996-3](https://doi.org/10.1016/S0002-9440(10)62996-3)
- East, E., Gverić, D., Baker, D., Pryce, G., Lijnen, H.R., Cuzner, M.L., 2008. Chronic relapsing experimental allergic encephalomyelitis (CREAE) in plasminogen activator inhibitor-1 knockout mice: the effect of fibrinolysis during neuroinflammation. *Neuropathol. Appl. Neurobiol.* 34, 216–230. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2990.2007.00889.x>
- Egan, M.F., Kojima, M., Callicott, J.H., Goldberg, T.E., Kolachana, B.S., Bertolino, A., Zaitsev, E., Gold, B., Goldman, D., Dean, M., Lu, B., Weinberger, D.R., 2003. The BDNF val66met polymorphism affects activity-dependent secretion of BDNF and human memory and hippocampal function. *Cell* 112, 257–269.
- Emeis, J.J., van den Eijnden-Schrauwen, Y., van den Hoogen, C.M., de Priester, W., Westmuckett, A., Lupu, F., 1997. An endothelial storage granule for tissue-type plasminogen activator. *J. Cell Biol.* 139, 245–256.
- Encell, L.P., Friedman Ohana, R., Zimmerman, K., Otto, P., Vidugiris, G., Wood, M.G., Los, G.V., McDougall, M.G., Zimprich, C., Karassina, N., Learish, R.D., Hurst, R., Hartnett, J., Wheeler, S., Stecha, P., English, J., Zhao, K., Mendez, J., Benink, H.A., Murphy, N., Daniels, D.L., Slater, M.R., Urh, M., Darzins, A., Klaubert, D.H., Bulleit, R.F., Wood, K.V., 2012. Development of a dehalogenase-based protein fusion tag capable of rapid, selective and covalent attachment to customizable ligands. *Curr. Chem. Genomics* 6, 55–71. <https://doi.org/10.2174/1875397301206010055>
- Erickson, K.I., Prakash, R.S., Voss, M.W., Chaddock, L., Heo, S., McLaren, M., Pence, B.D., Martin, S.A., Vieira, V.J., Woods, J.A., McAuley, E., Kramer, A.F., 2010. Brain-derived neurotrophic factor is associated with age-related decline in hippocampal volume. *J.*

- Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci. 30, 5368–5375.
<https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.6251-09.2010>
- Farsi, Z., Gowrisankaran, S., Kronic, M., Rammner, B., Woehler, A., Lafer, E.M., Mim, C., Jahn, R., Milosevic, I., 2018. Clathrin coat controls synaptic vesicle acidification by blocking vacuolar ATPase activity. *eLife* 7. <https://doi.org/10.7554/eLife.32569>
- Farsi, Z., Preobraschenski, J., van den Bogaart, G., Riedel, D., Jahn, R., Woehler, A., 2016. Single-vesicle imaging reveals different transport mechanisms between glutamatergic and GABAergic vesicles. *Science* 351, 981–984.
<https://doi.org/10.1126/science.aad8142>
- Fenner, B.M., 2012. Truncated TrkB: beyond a dominant negative receptor. *Cytokine Growth Factor Rev.* 23, 15–24. <https://doi.org/10.1016/j.cytogfr.2012.01.002>
- Fernández-Monreal, M., López-Atalaya, J.P., Benchenane, K., Léveillé, F., Cacquevel, M., Plawinski, L., MacKenzie, E.T., Bu, G., Buisson, A., Vivien, D., 2004. Is tissue-type plasminogen activator a neuromodulator? *Mol. Cell. Neurosci.* 25, 594–601.
<https://doi.org/10.1016/j.mcn.2003.11.002>
- Figurov, A., Pozzo-Miller, L.D., Olafsson, P., Wang, T., Lu, B., 1996. Regulation of synaptic responses to high-frequency stimulation and LTP by neurotrophins in the hippocampus. *Nature* 381, 706–709. <https://doi.org/10.1038/381706a0>
- Fiumelli, H., Jabaudon, D., Magistretti, P.J., Martin, J.L., 1999. BDNF stimulates expression, activity and release of tissue-type plasminogen activator in mouse cortical neurons. *Eur. J. Neurosci.* 11, 1639–1646.
- Flavin, M.P., Zhao, G., Ho, L.T., 2000. Microglial tissue plasminogen activator (tPA) triggers neuronal apoptosis in vitro. *Glia* 29, 347–354.
- Fredriksson, L., Li, H., Fieber, C., Li, X., Eriksson, U., 2004. Tissue plasminogen activator is a potent activator of PDGF-CC. *EMBO J.* 23, 3793–3802.
<https://doi.org/10.1038/sj.emboj.7600397>
- Fukazawa, Y., Saitoh, Y., Ozawa, F., Ohta, Y., Mizuno, K., Inokuchi, K., 2003. Hippocampal LTP is accompanied by enhanced F-actin content within the dendritic spine that is essential for late LTP maintenance in vivo. *Neuron* 38, 447–460.
- Fukuchi, M., Tsuda, M., 2017. Convergence of neurotransmissions at synapse on IEG regulation in nucleus. *Front. Biosci. Landmark Ed.* 22, 1052–1072.
- Fyhn, M., Molden, S., Witter, M.P., Moser, E.I., Moser, M.-B., 2004. Spatial representation in the entorhinal cortex. *Science* 305, 1258–1264.
<https://doi.org/10.1126/science.1099901>
- Garcia, K.L.P., Yu, G., Nicolini, C., Michalski, B., Garzon, D.J., Chiu, V.S., Tongiorgi, E., Szatmari, P., Fahnstock, M., 2012. Altered balance of proteolytic isoforms of pro-brain-derived neurotrophic factor in autism. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* 71, 289–297.
<https://doi.org/10.1097/NEN.0b013e31824b27e4>
- García-Rocha, M., Avila, J., Armas-Portela, R., 1994. Tissue-type plasminogen activator (tPA) is the main plasminogen activator associated with isolated rat nerve growth cones. *Neurosci. Lett.* 180, 123–126.
- Gärtner, A., Polnau, D.G., Staiger, V., Sciarretta, C., Minichiello, L., Thoenen, H., Bonhoeffer, T., Korte, M., 2006. Hippocampal long-term potentiation is supported by presynaptic and postsynaptic tyrosine receptor kinase B-mediated phospholipase Cgamma signaling. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 26, 3496–3504.
<https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.3792-05.2006>

- Gaussem, P., Grailhe, P., Anglés-Cano, E., 1993. Sodium dodecyl sulfate-induced dissociation of complexes between human tissue plasminogen activator and its specific inhibitor. *J. Biol. Chem.* 268, 12150–12155.
- Gentry, J.J., Barker, P.A., Carter, B.D., 2004. The p75 neurotrophin receptor: multiple interactors and numerous functions. *Prog. Brain Res.* 146, 25–39. [https://doi.org/10.1016/S0079-6123\(03\)46002-0](https://doi.org/10.1016/S0079-6123(03)46002-0)
- Ghosh, R.N., Mallet, W.G., Soe, T.T., McGraw, T.E., Maxfield, F.R., 1998. An endocytosed TGN38 chimeric protein is delivered to the TGN after trafficking through the endocytic recycling compartment in CHO cells. *J. Cell Biol.* 142, 923–936.
- Goldenring, J.R., 2015. Recycling endosomes. *Curr. Opin. Cell Biol.* 35, 117–122. <https://doi.org/10.1016/j.ceb.2015.04.018>
- Goldstein, L.S., Yang, Z., 2000. Microtubule-based transport systems in neurons: the roles of kinesins and dyneins. *Annu. Rev. Neurosci.* 23, 39–71. <https://doi.org/10.1146/annurev.neuro.23.1.39>
- Grant, B.D., Donaldson, J.G., 2009. Pathways and mechanisms of endocytic recycling. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 10, 597–608. <https://doi.org/10.1038/nrm2755>
- Grover, L.M., Teyler, T.J., 1990. Two components of long-term potentiation induced by different patterns of afferent activation. *Nature* 347, 477–479. <https://doi.org/10.1038/347477a0>
- Gu, J., Firestein, B.L., Zheng, J.Q., 2008. Microtubules in dendritic spine development. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 28, 12120–12124. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.2509-08.2008>
- Gualandris, A., Jones, T.E., Strickland, S., Tsirka, S.E., 1996. Membrane depolarization induces calcium-dependent secretion of tissue plasminogen activator. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 16, 2220–2225.
- Guo, J., Ji, Y., Ding, Y., Jiang, W., Sun, Y., Lu, B., Nagappan, G., 2016. BDNF pro-peptide regulates dendritic spines via caspase-3. *Cell Death Dis.* 7, e2264. <https://doi.org/10.1038/cddis.2016.166>
- Gupta, A., Tsai, L.-H., Wynshaw-Boris, A., 2002. Life is a journey: a genetic look at neocortical development. *Nat. Rev. Genet.* 3, 342–355. <https://doi.org/10.1038/nrg799>
- Gveric, D., Hanemaaijer, R., Newcombe, J., van Lent, N.A., Sier, C.F., Cuzner, M.L., 2001. Plasminogen activators in multiple sclerosis lesions: implications for the inflammatory response and axonal damage. *Brain J. Neurol.* 124, 1978–1988.
- Gveric, D., Herrera, B., Petzold, A., Lawrence, D.A., Cuzner, M.L., 2003. Impaired fibrinolysis in multiple sclerosis: a role for tissue plasminogen activator inhibitors. *Brain J. Neurol.* 126, 1590–1598. <https://doi.org/10.1093/brain/awg167>
- Hajjar, K.A., Jacovina, A.T., Chacko, J., 1994a. An endothelial cell receptor for plasminogen/tissue plasminogen activator. I. Identity with annexin II. *J. Biol. Chem.* 269, 21191–21197.
- Hajjar, K.A., Jacovina, A.T., Chacko, J., 1994b. An endothelial cell receptor for plasminogen/tissue plasminogen activator. I. Identity with annexin II. *J. Biol. Chem.* 269, 21191–21197.
- Hall, J., Thomas, K.L., Everitt, B.J., 2000. Rapid and selective induction of BDNF expression in the hippocampus during contextual learning. *Nat. Neurosci.* 3, 533–535. <https://doi.org/10.1038/75698>

- Hanson, M.G., Shen, S., Wiemelt, A.P., McMorris, F.A., Barres, B.A., 1998. Cyclic AMP elevation is sufficient to promote the survival of spinal motor neurons in vitro. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 18, 7361–7371.
- Hanson, P.I., Heuser, J.E., Jahn, R., 1997. Neurotransmitter release - four years of SNARE complexes. *Curr. Opin. Neurobiol.* 7, 310–315.
- Hariri, A.R., Goldberg, T.E., Mattay, V.S., Kolachana, B.S., Callicott, J.H., Egan, M.F., Weinberger, D.R., 2003. Brain-derived neurotrophic factor val66met polymorphism affects human memory-related hippocampal activity and predicts memory performance. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 23, 6690–6694.
- Harris, R.J., Leonard, C.K., Guzzetta, A.W., Spellman, M.W., 1991. Tissue plasminogen activator has an O-linked fucose attached to threonine-61 in the epidermal growth factor domain. *Biochemistry (Mosc.)* 30, 2311–2314.
- Hastings, G.A., Coleman, T.A., Haudenschild, C.C., Stefansson, S., Smith, E.P., Barthlow, R., Cherry, S., Sandkvist, M., Lawrence, D.A., 1997. Neuroserpin, a brain-associated inhibitor of tissue plasminogen activator is localized primarily in neurons. Implications for the regulation of motor learning and neuronal survival. *J. Biol. Chem.* 272, 33062–33067.
- He, X.-L., Garcia, K.C., 2004. Structure of nerve growth factor complexed with the shared neurotrophin receptor p75. *Science* 304, 870–875. <https://doi.org/10.1126/science.1095190>
- Hébert, M., Anfray, A., Chevilly, A., Martinez de Lizarondo, S., Quenault, A., Louessard, M., Roussel, B.D., Obiang, P., Save, E., Orset, C., Maubert, E., Vivien, D., Agin, V., 2017. Distant Space Processing is Controlled by tPA-dependent NMDA Receptor Signaling in the Entorhinal Cortex. *Cereb. Cortex N. Y. N* 1991 27, 4783–4796. <https://doi.org/10.1093/cercor/bhw275>
- Hébert, M., Lesept, F., Vivien, D., Macrez, R., 2016. The story of an exceptional serine protease, tissue-type plasminogen activator (tPA). *Rev. Neurol. (Paris)* 172, 186–197. <https://doi.org/10.1016/j.neurol.2015.10.002>
- Hedin, S.G., 1903. On the presence of a proteolytic enzyme in the normal serum of the ox. *J. Physiol.* 30, 195–201. <https://doi.org/10.1113/jphysiol.1903.sp000989>
- Hempstead, B.L., 2002. The many faces of p75NTR. *Curr. Opin. Neurobiol.* 12, 260–267.
- Hempstead, B.L., Martin-Zanca, D., Kaplan, D.R., Parada, L.F., Chao, M.V., 1991. High-affinity NGF binding requires coexpression of the trk proto-oncogene and the low-affinity NGF receptor. *Nature* 350, 678–683. <https://doi.org/10.1038/350678a0>
- Henne, W.M., Boucrot, E., Meinecke, M., Evergren, E., Vallis, Y., Mittal, R., McMahon, H.T., 2010. FCHO proteins are nucleators of clathrin-mediated endocytosis. *Science* 328, 1281–1284. <https://doi.org/10.1126/science.1188462>
- Heuser, J.E., Reese, T.S., 1973. Evidence for recycling of synaptic vesicle membrane during transmitter release at the frog neuromuscular junction. *J. Cell Biol.* 57, 315–344.
- Hill, R.M., Parmar, P.K., Coates, L.C., Mezey, E., Pearson, J.F., Birch, N.P., 2000. Neuroserpin is expressed in the pituitary and adrenal glands and induces the extension of neurite-like processes in AtT-20 cells. *Biochem. J.* 345 Pt 3, 595–601.
- Hino, H., Akiyama, H., Iseki, E., Kato, M., Kondo, H., Ikeda, K., Kosaka, K., 2001. Immunohistochemical localization of plasminogen activator inhibitor-1 in rat and human brain tissues. *Neurosci. Lett.* 297, 105–108.
- Hinshaw, J.E., 2002. *Dynamin and its Role in Membrane Fission*. National Center for Biotechnology Information (US).

- Holmes, W.E., Nelles, L., Lijnen, H.R., Collen, D., 1987. Primary structure of human alpha 2-antiplasmin, a serine protease inhibitor (serpin). *J. Biol. Chem.* 262, 1659–1664.
- Holzbaur, E.L.F., 2004. Motor neurons rely on motor proteins. *Trends Cell Biol.* 14, 233–240. <https://doi.org/10.1016/j.tcb.2004.03.009>
- Hong, E.J., McCord, A.E., Greenberg, M.E., 2008. A biological function for the neuronal activity-dependent component of Bdnf transcription in the development of cortical inhibition. *Neuron* 60, 610–624. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2008.09.024>
- Hong, W., 2005. SNAREs and traffic. *Biochim. Biophys. Acta* 1744, 493–517.
- Hopkins, C.R., Miller, K., Beardmore, J.M., 1985. Receptor-mediated endocytosis of transferrin and epidermal growth factor receptors: a comparison of constitutive and ligand-induced uptake. *J. Cell Sci. Suppl.* 3, 173–186.
- Horch, H.W., Katz, L.C., 2002. BDNF release from single cells elicits local dendritic growth in nearby neurons. *Nat. Neurosci.* 5, 1177–1184. <https://doi.org/10.1038/nn927>
- Ho-Tin-Noé, B., Enslin, H., Dœuvre, L., Corsi, J.-M., Lijnen, H.R., Anglés-Cano, E., 2009. Role of plasminogen activation in neuronal organization and survival. *Mol. Cell. Neurosci.* 42, 288–295. <https://doi.org/10.1016/j.mcn.2009.08.001>
- Hoylaerts, M., Rijken, D.C., Lijnen, H.R., Collen, D., 1982. Kinetics of the activation of plasminogen by human tissue plasminogen activator. Role of fibrin. *J. Biol. Chem.* 257, 2912–2919.
- Hu, X., Ballo, L., Pietila, L., Viesselmann, C., Ballweg, J., Lombard, D., Stevenson, M., Merriam, E., Dent, E.W., 2011. BDNF-induced increase of PSD-95 in dendritic spines requires dynamic microtubule invasions. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 31, 15597–15603. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.2445-11.2011>
- Hu, Y.-B., Dammer, E.B., Ren, R.-J., Wang, G., 2015. The endosomal-lysosomal system: from acidification and cargo sorting to neurodegeneration. *Transl. Neurodegener.* 4. <https://doi.org/10.1186/s40035-015-0041-1>
- Huang, E.J., Reichardt, L.F., 2003. Trk receptors: roles in neuronal signal transduction. *Annu. Rev. Biochem.* 72, 609–642. <https://doi.org/10.1146/annurev.biochem.72.121801.161629>
- Huang, E.J., Reichardt, L.F., 2001. Neurotrophins: roles in neuronal development and function. *Annu. Rev. Neurosci.* 24, 677–736. <https://doi.org/10.1146/annurev.neuro.24.1.677>
- Huang, Y.Y., Bach, M.E., Lipp, H.P., Zhuo, M., Wolfer, D.P., Hawkins, R.D., Schoonjans, L., Kandel, E.R., Godfraind, J.M., Mulligan, R., Collen, D., Carmeliet, P., 1996. Mice lacking the gene encoding tissue-type plasminogen activator show a selective interference with late-phase long-term potentiation in both Schaffer collateral and mossy fiber pathways. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 93, 8699–8704.
- Huang, Z.J., Kirkwood, A., Pizzorusso, T., Porciatti, V., Morales, B., Bear, M.F., Maffei, L., Tonegawa, S., 1999. BDNF regulates the maturation of inhibition and the critical period of plasticity in mouse visual cortex. *Cell* 98, 739–755.
- Huber, K.M., Sawtell, N.B., Bear, M.F., 1998. Brain-derived neurotrophic factor alters the synaptic modification threshold in visual cortex. *Neuropharmacology* 37, 571–579.
- Hultman, K., Tjärnlund-Wolf, A., Fish, R.J., Wilhelmsson, U., Rydenhag, B., Pekny, M., Kruihof, E.K.O., Jern, C., 2008. Retinoids and activation of PKC induce tissue-type plasminogen activator expression and storage in human astrocytes. *J. Thromb. Haemost. JTH* 6, 1796–1803. <https://doi.org/10.1111/j.1538-7836.2008.03084.x>
- Huotari, J., Helenius, A., 2011. Endosome maturation. *EMBO J.* 30, 3481–3500. <https://doi.org/10.1038/emboj.2011.286>

- Hurtado, M., Lozano, J.J., Castellanos, E., López-Fernández, L.A., Harshman, K., Martínez-A, C., Ortiz, A.R., Thomson, T.M., Paciucci, R., 2007. Activation of the epidermal growth factor signalling pathway by tissue plasminogen activator in pancreas cancer cells. *Gut* 56, 1266–1274. <https://doi.org/10.1136/gut.2006.097188>
- Hutagalung, A.H., Novick, P.J., 2011. Role of Rab GTPases in membrane traffic and cell physiology. *Physiol. Rev.* 91, 119–149. <https://doi.org/10.1152/physrev.00059.2009>
- Ichinose, A., Kiesel, W., Fujikawa, K., 1984. Proteolytic activation of tissue plasminogen activator by plasma and tissue enzymes. *FEBS Lett.* 175, 412–418.
- Iriki, A., Pavlides, C., Keller, A., Asanuma, H., 1989. Long-term potentiation in the motor cortex. *Science* 245, 1385–1387.
- Islam, O., Loo, T.X., Heese, K., 2009. Brain-derived neurotrophic factor (BDNF) has proliferative effects on neural stem cells through the truncated TRK-B receptor, MAP kinase, AKT, and STAT-3 signaling pathways. *Curr. Neurovasc. Res.* 6, 42–53.
- Jahn, R., Lang, T., Südhof, T.C., 2003. Membrane fusion. *Cell* 112, 519–533.
- Jahn, R., Scheller, R.H., 2006. SNAREs—engines for membrane fusion. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 7, 631–643. <https://doi.org/10.1038/nrm2002>
- Jaworski, J., Kapitein, L.C., Gouveia, S.M., Dortland, B.R., Wulf, P.S., Grigoriev, I., Camera, P., Spangler, S.A., Di Stefano, P., Demmers, J., Krugers, H., Defilippi, P., Akhmanova, A., Hoogenraad, C.C., 2009. Dynamic microtubules regulate dendritic spine morphology and synaptic plasticity. *Neuron* 61, 85–100. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2008.11.013>
- Je, H.S., Yang, F., Ji, Y., Nagappan, G., Hempstead, B.L., Lu, B., 2012. Role of pro-brain-derived neurotrophic factor (proBDNF) to mature BDNF conversion in activity-dependent competition at developing neuromuscular synapses. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 109, 15924–15929. <https://doi.org/10.1073/pnas.1207767109>
- Jewell, J.L., Oh, E., Ramalingam, L., Kalwat, M.A., Tagliabracci, V.S., Tackett, L., Elmendorf, J.S., Thurmond, D.C., 2011. Munc18c phosphorylation by the insulin receptor links cell signaling directly to SNARE exocytosis. *J. Cell Biol.* 193, 185–199. <https://doi.org/10.1083/jcb.201007176>
- Ji, Y., Lu, Y., Yang, F., Shen, W., Tang, T.T.-T., Feng, L., Duan, S., Lu, B., 2010. Acute and gradual increases in BDNF concentration elicit distinct signaling and functions in neurons. *Nat. Neurosci.* 13, 302–309. <https://doi.org/10.1038/nn.2505>
- Jia, Y., Gall, C.M., Lynch, G., 2010. Presynaptic BDNF promotes postsynaptic long-term potentiation in the dorsal striatum. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 30, 14440–14445. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.3310-10.2010>
- Jiang, H., Chen, S., Li, C., Lu, N., Yue, Y., Yin, Y., Zhang, Y., Zhi, X., Zhang, D., Yuan, Y., 2017. The serum protein levels of the tPA-BDNF pathway are implicated in depression and antidepressant treatment. *Transl. Psychiatry* 7, e1079. <https://doi.org/10.1038/tp.2017.43>
- Johnson, A.J., McCARTY, W.R., 1959. The lysis of artificially induced intravascular clots in man by intravenous infusions of streptokinase. *J. Clin. Invest.* 38, 1627–1643. <https://doi.org/10.1172/JCI103941>
- Johnson, L.S., Dunn, K.W., Pytowski, B., McGraw, T.E., 1993. Endosome acidification and receptor trafficking: bafilomycin A1 slows receptor externalization by a mechanism involving the receptor's internalization motif. *Mol. Biol. Cell* 4, 1251–1266.

- Jones, K.R., Fariñas, I., Backus, C., Reichardt, L.F., 1994. Targeted disruption of the BDNF gene perturbs brain and sensory neuron development but not motor neuron development. *Cell* 76, 989–999.
- Jones, K.R., Reichardt, L.F., 1990. Molecular cloning of a human gene that is a member of the nerve growth factor family. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 87, 8060–8064.
- Jovanovic, J.N., Czernik, A.J., Fienberg, A.A., Greengard, P., Sihra, T.S., 2000. Synapsins as mediators of BDNF-enhanced neurotransmitter release. *Nat. Neurosci.* 3, 323–329. <https://doi.org/10.1038/73888>
- Jovanovic, J.N., Thomas, P., Kittler, J.T., Smart, T.G., Moss, S.J., 2004. Brain-derived neurotrophic factor modulates fast synaptic inhibition by regulating GABA(A) receptor phosphorylation, activity, and cell-surface stability. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 24, 522–530. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.3606-03.2004>
- Kagitani, H., Tagawa, M., Hatanaka, K., Ikari, T., Saito, A., Bando, H., Okada, K., Matsuo, O., 1985. Expression in *E. coli* of finger-domain lacking tissue-type plasminogen activator with high fibrin affinity. *FEBS Lett.* 189, 145–149.
- Kaneko, M., Sakata, Y., Matsuda, M., Mimuro, J., 1992. Interactions between the finger and kringle-2 domains of tissue-type plasminogen activator and plasminogen activator inhibitor-1. *J. Biochem. (Tokyo)* 111, 244–248.
- Kaneko, M., Xie, Y., An, J.J., Stryker, M.P., Xu, B., 2012. Dendritic BDNF synthesis is required for late-phase spine maturation and recovery of cortical responses following sensory deprivation. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 32, 4790–4802. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.4462-11.2012>
- Kang, H., Schuman, E.M., 1995. Long-lasting neurotrophin-induced enhancement of synaptic transmission in the adult hippocampus. *Science* 267, 1658–1662.
- Kang, H., Welcher, A.A., Shelton, D., Schuman, E.M., 1997. Neurotrophins and time: different roles for TrkB signaling in hippocampal long-term potentiation. *Neuron* 19, 653–664.
- Kaplan, D.R., Miller, F.D., 2000. Neurotrophin signal transduction in the nervous system. *Curr. Opin. Neurobiol.* 10, 381–391.
- Kapp, K., Schrempf, S., Lemberg, M.K., Dobberstein, B., 2013. Post-Targeting Functions of Signal Peptides. Landes Bioscience.
- Kasai, H., Fukuda, M., Watanabe, S., Hayashi-Takagi, A., Noguchi, J., 2010. Structural dynamics of dendritic spines in memory and cognition. *Trends Neurosci.* 33, 121–129. <https://doi.org/10.1016/j.tins.2010.01.001>
- Katoh-Semba, R., Takeuchi, I.K., Semba, R., Kato, K., 1997. Distribution of brain-derived neurotrophic factor in rats and its changes with development in the brain. *J. Neurochem.* 69, 34–42.
- Katzmann, D.J., Odorizzi, G., Emr, S.D., 2002. Receptor downregulation and multivesicular-body sorting. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 3, 893–905. <https://doi.org/10.1038/nrm973>
- Kelly, B.T., Graham, S.C., Liska, N., Dannhauser, P.N., Höning, S., Ungewickell, E.J., Owen, D.J., 2014. Clathrin adaptors. AP2 controls clathrin polymerization with a membrane-activated switch. *Science* 345, 459–463. <https://doi.org/10.1126/science.1254836>
- Kerr, M.C., Lindsay, M.R., Luetterforst, R., Hamilton, N., Simpson, F., Parton, R.G., Gleeson, P.A., Teasdale, R.D., 2006. Visualisation of macropinosome maturation by the recruitment of sorting nexins. *J. Cell Sci.* 119, 3967–3980. <https://doi.org/10.1242/jcs.03167>
- Khursigara, G., Orlinick, J.R., Chao, M.V., 1999. Association of the p75 neurotrophin receptor with TRAF6. *J. Biol. Chem.* 274, 2597–2600.

- Kim, J., Hajjar, K.A., 2002. Annexin II: a plasminogen-plasminogen activator co-receptor. *Front. Biosci. J. Virtual Libr.* 7, d341-348.
- Kim, T., Gondré-Lewis, M.C., Arnaoutova, I., Loh, Y.P., 2006. Dense-core secretory granule biogenesis. *Physiol. Bethesda Md* 21, 124–133. <https://doi.org/10.1152/physiol.00043.2005>
- Kinoshita, S., Yasuda, H., Taniguchi, N., Katoh-Semba, R., Hatanaka, H., Tsumoto, T., 1999. Brain-derived neurotrophic factor prevents low-frequency inputs from inducing long-term depression in the developing visual cortex. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 19, 2122–2130.
- Kishi, M., Pan, Y.A., Crump, J.G., Sanes, J.R., 2005. Mammalian SAD kinases are required for neuronal polarization. *Science* 307, 929–932. <https://doi.org/10.1126/science.1107403>
- Kohara, K., Kitamura, A., Morishima, M., Tsumoto, T., 2001. Activity-dependent transfer of brain-derived neurotrophic factor to postsynaptic neurons. *Science* 291, 2419–2423. <https://doi.org/10.1126/science.1057415>
- Kononenko, N.L., Claßen, G.A., Kuijpers, M., Puchkov, D., Maritzen, T., Tempes, A., Malik, A.R., Skalecka, A., Bera, S., Jaworski, J., Haucke, V., 2017. Retrograde transport of TrkB-containing autophagosomes via the adaptor AP-2 mediates neuronal complexity and prevents neurodegeneration. *Nat. Commun.* 8, 14819. <https://doi.org/10.1038/ncomms14819>
- Korte, M., Carroll, P., Wolf, E., Brem, G., Thoenen, H., Bonhoeffer, T., 1995. Hippocampal long-term potentiation is impaired in mice lacking brain-derived neurotrophic factor. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 92, 8856–8860.
- Korte, M., Griesbeck, O., Gravel, C., Carroll, P., Staiger, V., Thoenen, H., Bonhoeffer, T., 1996. Virus-mediated gene transfer into hippocampal CA1 region restores long-term potentiation in brain-derived neurotrophic factor mutant mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 93, 12547–12552.
- Kovalchuk, Y., Hanse, E., Kafitz, K.W., Konnerth, A., 2002. Postsynaptic Induction of BDNF-Mediated Long-Term Potentiation. *Science* 295, 1729–1734. <https://doi.org/10.1126/science.1067766>
- Kovtun, O., Tillu, V.A., Ariotti, N., Parton, R.G., Collins, B.M., 2015. Cavin family proteins and the assembly of caveolae. *J. Cell Sci.* 128, 1269–1278. <https://doi.org/10.1242/jcs.167866>
- Krueger, S.R., Ghisu, G.P., Cinelli, P., Gschwend, T.P., Osterwalder, T., Wolfer, D.P., Sonderegger, P., 1997. Expression of neuroserpin, an inhibitor of tissue plasminogen activator, in the developing and adult nervous system of the mouse. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 17, 8984–8996.
- Krüttgen, A., Möller, J.C., Heymach, J.V., Shooter, E.M., 1998. Neurotrophins induce release of neurotrophins by the regulated secretory pathway. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 95, 9614–9619.
- Kuiper, J., Otter, M., Rijken, D.C., van Berkel, T.J., 1988. Characterization of the interaction in vivo of tissue-type plasminogen activator with liver cells. *J. Biol. Chem.* 263, 18220–18224.
- Kumar, V., Zhang, M.-X., Swank, M.W., Kunz, J., Wu, G.-Y., 2005. Regulation of dendritic morphogenesis by Ras-PI3K-Akt-mTOR and Ras-MAPK signaling pathways. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 25, 11288–11299. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.2284-05.2005>

- Kwinter, D.M., Lo, K., Mafi, P., Silverman, M.A., 2009. Dynactin regulates bidirectional transport of dense-core vesicles in the axon and dendrites of cultured hippocampal neurons. *Neuroscience* 162, 1001–1010. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2009.05.038>
- Lachyankar, M.B., Condon, P.J., Quesenberry, P.J., Litofsky, N.S., Recht, L.D., Ross, A.H., 1997. Embryonic precursor cells that express Trk receptors: induction of different cell fates by NGF, BDNF, NT-3, and CNTF. *Exp. Neurol.* 144, 350–360. <https://doi.org/10.1006/exnr.1997.6434>
- Lamba, D., Bauer, M., Huber, R., Fischer, S., Rudolph, R., Kohnert, U., Bode, W., 1996. The 2.3 Å crystal structure of the catalytic domain of recombinant two-chain human tissue-type plasminogen activator. *J. Mol. Biol.* 258, 117–135. <https://doi.org/10.1006/jmbi.1996.0238>
- Lang, S.B., Stein, V., Bonhoeffer, T., Lohmann, C., 2007. Endogenous brain-derived neurotrophic factor triggers fast calcium transients at synapses in developing dendrites. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 27, 1097–1105. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.3590-06.2007>
- Langlois, A., Diabira, D., Ferrand, N., Porcher, C., Gaiarsa, J.-L., 2013. NMDA-dependent switch of proBDNF actions on developing GABAergic synapses. *Cereb. Cortex N. Y. N 1991* 23, 1085–1096. <https://doi.org/10.1093/cercor/bhs071>
- Lee, H.-Y., Hwang, I.-Y., Im, H., Koh, J.-Y., Kim, Y.-H., 2007. Non-proteolytic neurotrophic effects of tissue plasminogen activator on cultured mouse cerebrocortical neurons. *J. Neurochem.* 101, 1236–1247. <https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.2007.04417.x>
- Lee, J., Duan, W., Mattson, M.P., 2002. Evidence that brain-derived neurotrophic factor is required for basal neurogenesis and mediates, in part, the enhancement of neurogenesis by dietary restriction in the hippocampus of adult mice. *J. Neurochem.* 82, 1367–1375.
- Lee, R., Kermani, P., Teng, K.K., Hempstead, B.L., 2001. Regulation of cell survival by secreted proneurotrophins. *Science* 294, 1945–1948. <https://doi.org/10.1126/science.1065057>
- Lee, S.-R., Guo, S.-Z., Scannevin, R.H., Magliaro, B.C., Rhodes, K.J., Wang, X., Lo, E.H., 2007. Induction of matrix metalloproteinase, cytokines and chemokines in rat cortical astrocytes exposed to plasminogen activators. *Neurosci. Lett.* 417, 1–5. <https://doi.org/10.1016/j.neulet.2007.01.017>
- Leibrock, J., Lottspeich, F., Hohn, A., Hofer, M., Hengerer, B., Masiakowski, P., Thoenen, H., Barde, Y.A., 1989. Molecular cloning and expression of brain-derived neurotrophic factor. *Nature* 341, 149–152. <https://doi.org/10.1038/341149a0>
- Lemarchand, E., Maubert, E., Haelewyn, B., Ali, C., Rubio, M., Vivien, D., 2016. Stressed neurons protect themselves by a tissue-type plasminogen activator-mediated EGFR-dependent mechanism. *Cell Death Differ.* 23, 123–131. <https://doi.org/10.1038/cdd.2015.76>
- Lemarchant, S., Pruvost, M., Hébert, M., Gauberti, M., Hommet, Y., Briens, A., Maubert, E., Gueye, Y., Féron, F., Petite, D., Mersel, M., do Rego, J.-C., Vaudry, H., Koistinaho, J., Ali, C., Agin, V., Emery, E., Vivien, D., 2014. tPA promotes ADAMTS-4-induced CSPG degradation, thereby enhancing neuroplasticity following spinal cord injury. *Neurobiol. Dis.* 66, 28–42. <https://doi.org/10.1016/j.nbd.2014.02.005>
- Lemtiri-Chlieh, F., Levine, E.S., 2010. BDNF evokes release of endogenous cannabinoids at layer 2/3 inhibitory synapses in the neocortex. *J. Neurophysiol.* 104, 1923–1932. <https://doi.org/10.1152/jn.00472.2010>

- Leonetti, C., Macrez, R., Pruvost, M., Hommet, Y., Bronsard, J., Fournier, A., Perrigault, M., Machin, I., Vivien, D., Clemente, D., De Castro, F., Maubert, E., Docagne, F., 2017. Tissue-type plasminogen activator exerts EGF-like chemokinetic effects on oligodendrocytes in white matter (re)myelination. *Mol. Neurodegener.* 12, 20. <https://doi.org/10.1186/s13024-017-0160-5>
- Lessmann, V., Gottmann, K., Heumann, R., 1994. BDNF and NT-4/5 enhance glutamatergic synaptic transmission in cultured hippocampal neurones. *Neuroreport* 6, 21–25.
- Lessmann, V., Gottmann, K., Malsangio, M., 2003. Neurotrophin secretion: current facts and future prospects. *Prog. Neurobiol.* 69, 341–374.
- Levine, E.S., Dreyfus, C.F., Black, I.B., Plummer, M.R., 1995. Brain-derived neurotrophic factor rapidly enhances synaptic transmission in hippocampal neurons via postsynaptic tyrosine kinase receptors. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 92, 8074–8077.
- Li, J.-Y., Liu, J., Manaph, N.P.A., Bobrovskaya, L., Zhou, X.-F., 2017. ProBDNF inhibits proliferation, migration and differentiation of mouse neural stem cells. *Brain Res.* 1668, 46–55. <https://doi.org/10.1016/j.brainres.2017.05.013>
- Li, Y., Luikart, B.W., Birnbaum, S., Chen, J., Kwon, C.-H., Kernie, S.G., Bassel-Duby, R., Parada, L.F., 2008. TrkB regulates hippocampal neurogenesis and governs sensitivity to antidepressive treatment. *Neuron* 59, 399–412. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2008.06.023>
- Liepinsh, E., Ilag, L.L., Otting, G., Ibáñez, C.F., 1997. NMR structure of the death domain of the p75 neurotrophin receptor. *EMBO J.* 16, 4999–5005. <https://doi.org/10.1093/emboj/16.16.4999>
- Lim, J.P., Gleeson, P.A., 2011. Macropinocytosis: an endocytic pathway for internalising large gulps. *Immunol. Cell Biol.* 89, 836–843. <https://doi.org/10.1038/icb.2011.20>
- Lin, S.Y., Wu, K., Levine, E.S., Mount, H.T., Suen, P.C., Black, I.B., 1998. BDNF acutely increases tyrosine phosphorylation of the NMDA receptor subunit 2B in cortical and hippocampal postsynaptic densities. *Brain Res. Mol. Brain Res.* 55, 20–27.
- Linggi, M.S., Burke, T.L., Williams, B.B., Harrington, A., Kraemer, R., Hempstead, B.L., Yoon, S.O., Carter, B.D., 2005. Neurotrophin receptor interacting factor (NRIF) is an essential mediator of apoptotic signaling by the p75 neurotrophin receptor. *J. Biol. Chem.* 280, 13801–13808. <https://doi.org/10.1074/jbc.M410435200>
- Liot, G., Roussel, B.D., Lebeurrier, N., Benchenane, K., López-Atalaya, J.P., Vivien, D., Ali, C., 2006. Tissue-type plasminogen activator rescues neurones from serum deprivation-induced apoptosis through a mechanism independent of its proteolytic activity. *J. Neurochem.* 98, 1458–1464. <https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.2006.03982.x>
- Liot, G., Zala, D., Pla, P., Mottet, G., Piel, M., Saudou, F., 2013. Mutant Huntingtin alters retrograde transport of TrkB receptors in striatal dendrites. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 33, 6298–6309. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.2033-12.2013>
- Liu, D., Cheng, T., Guo, H., Fernández, J.A., Griffin, J.H., Song, X., Zlokovic, B.V., 2004. Tissue plasminogen activator neurovascular toxicity is controlled by activated protein C. *Nat. Med.* 10, 1379–1383. <https://doi.org/10.1038/nm1122>
- Liu, L., Wong, T.P., Pozza, M.F., Lingenhoehl, K., Wang, Y., Sheng, M., Auberson, Y.P., Wang, Y.T., 2004. Role of NMDA receptor subtypes in governing the direction of hippocampal synaptic plasticity. *Science* 304, 1021–1024. <https://doi.org/10.1126/science.1096615>
- Liu, S.H., Wong, M.L., Craik, C.S., Brodsky, F.M., 1995. Regulation of clathrin assembly and trimerization defined using recombinant triskelion hubs. *Cell* 83, 257–267.

- Lochner, J.E., Honigman, L.S., Grant, W.F., Gessford, S.K., Hansen, A.B., Silverman, M.A., Scalettar, B.A., 2006. Activity-dependent release of tissue plasminogen activator from the dendritic spines of hippocampal neurons revealed by live-cell imaging. *J. Neurobiol.* 66, 564–577. <https://doi.org/10.1002/neu.20250>
- Lochner, J.E., Kingma, M., Kuhn, S., Meliza, C.D., Cutler, B., Scalettar, B.A., 1998. Real-time imaging of the axonal transport of granules containing a tissue plasminogen activator/green fluorescent protein hybrid. *Mol. Biol. Cell* 9, 2463–2476.
- Lochner, J.E., Spangler, E., Chavarha, M., Jacobs, C., McAllister, K., Schuttner, L.C., Scalettar, B.A., 2008. Efficient copackaging and cotransport yields postsynaptic colocalization of neuromodulators associated with synaptic plasticity. *Dev. Neurobiol.* 68, 1243–1256. <https://doi.org/10.1002/dneu.20650>
- Lohof, A.M., Ip, N.Y., Poo, M.M., 1993. Potentiation of developing neuromuscular synapses by the neurotrophins NT-3 and BDNF. *Nature* 363, 350–353. <https://doi.org/10.1038/363350a0>
- Lom, B., Cogen, J., Sanchez, A.L., Vu, T., Cohen-Cory, S., 2002. Local and target-derived brain-derived neurotrophic factor exert opposing effects on the dendritic arborization of retinal ganglion cells in vivo. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 22, 7639–7649.
- Lommatzsch, M., Zingler, D., Schuhbaeck, K., Schloetcke, K., Zingler, C., Schuff-Werner, P., Virchow, J.C., 2005. The impact of age, weight and gender on BDNF levels in human platelets and plasma. *Neurobiol. Aging* 26, 115–123. <https://doi.org/10.1016/j.neurobiolaging.2004.03.002>
- Lonze, B.E., Ginty, D.D., 2002. Function and regulation of CREB family transcription factors in the nervous system. *Neuron* 35, 605–623.
- Lopez-Atalaya, J.P., Roussel, B.D., Levrat, D., Parcq, J., Nicole, O., Hommet, Y., Benchenane, K., Castel, H., Leprince, J., To Van, D., Bureau, R., Rault, S., Vaudry, H., Petersen, K.-U., Santos, J.S.O., Ali, C., Vivien, D., 2008. Toward safer thrombolytic agents in stroke: molecular requirements for NMDA receptor-mediated neurotoxicity. *J. Cereb. Blood Flow Metab. Off. J. Int. Soc. Cereb. Blood Flow Metab.* 28, 1212–1221. <https://doi.org/10.1038/jcbfm.2008.14>
- Lou, H., Kim, S.-K., Zaitsev, E., Snell, C.R., Lu, B., Loh, Y.P., 2005. Sorting and activity-dependent secretion of BDNF require interaction of a specific motif with the sorting receptor carboxypeptidase e. *Neuron* 45, 245–255. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2004.12.037>
- Louessard, M., Lacroix, A., Martineau, M., Mondielli, G., Montagne, A., Lesept, F., Lambolez, B., Cauli, B., Mothet, J.-P., Vivien, D., Maubert, E., 2016. Tissue Plasminogen Activator Expression Is Restricted to Subsets of Excitatory Pyramidal Glutamatergic Neurons. *Mol. Neurobiol.* 53, 5000–5012. <https://doi.org/10.1007/s12035-015-9432-7>
- Lu, B., Pang, P.T., Woo, N.H., 2005. The yin and yang of neurotrophin action. *Nat. Rev. Neurosci.* 6, 603–614. <https://doi.org/10.1038/nrn1726>
- Lu, H., Cheng, P.-L., Lim, B.K., Khoshnevisrad, N., Poo, M.-M., 2010. Elevated BDNF after cocaine withdrawal facilitates LTP in medial prefrontal cortex by suppressing GABA inhibition. *Neuron* 67, 821–833. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2010.08.012>
- Lu, P., Takai, K., Weaver, V.M., Werb, Z., 2011. Extracellular matrix degradation and remodeling in development and disease. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* 3. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a005058>

- Lu, W., Bhasin, M., Tsirka, S.E., 2002. Involvement of tissue plasminogen activator in onset and effector phases of experimental allergic encephalomyelitis. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 22, 10781–10789.
- Lu, Y., Ji, Y., Ganesan, S., Schloesser, R., Martinowich, K., Sun, M., Mei, F., Chao, M.V., Lu, B., 2011. TrkB as a potential synaptic and behavioral tag. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 31, 11762–11771. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.2707-11.2011>
- Luzio, J.P., Mullock, B.M., Pryor, P.R., Lindsay, M.R., James, D.E., Piper, R.C., 2001. Relationship between endosomes and lysosomes. *Biochem. Soc. Trans.* 29, 476–480.
- Lyckman, A.W., Fan, G., Rios, M., Jaenisch, R., Sur, M., 2005. Normal eye-specific patterning of retinal inputs to murine subcortical visual nuclei in the absence of brain-derived neurotrophic factor. *Vis. Neurosci.* 22, 27–36. <https://doi.org/10.1017/S095252380522103X>
- Ma, D.K., Jang, M.-H., Guo, J.U., Kitabatake, Y., Chang, M.-L., Pow-Anpongkul, N., Flavell, R.A., Lu, B., Ming, G.-L., Song, H., 2009. Neuronal activity-induced Gadd45b promotes epigenetic DNA demethylation and adult neurogenesis. *Science* 323, 1074–1077. <https://doi.org/10.1126/science.1166859>
- Madani, R., Hulo, S., Toni, N., Madani, H., Steimer, T., Muller, D., Vassalli, J.D., 1999. Enhanced hippocampal long-term potentiation and learning by increased neuronal expression of tissue-type plasminogen activator in transgenic mice. *EMBO J.* 18, 3007–12. <https://doi.org/10.1093/emboj/18.11.3007>
- Madani, R., Hulo, S., Toni, N., Madani, H., Steimer, T., Muller, D., Vassalli, J.D., 1999. Enhanced hippocampal long-term potentiation and learning by increased neuronal expression of tissue-type plasminogen activator in transgenic mice. *EMBO J.* 18, 3007–3012. <https://doi.org/10.1093/emboj/18.11.3007>
- Madani, R., Kozlov, S., Akhmedov, A., Cinelli, P., Kinter, J., Lipp, H.-P., Sonderegger, P., Wolfer, D.P., 2003. Impaired explorative behavior and neophobia in genetically modified mice lacking or overexpressing the extracellular serine protease inhibitor neuroserpin. *Mol. Cell. Neurosci.* 23, 473–494.
- Madinier, A., Bertrand, N., Mossiat, C., Prigent-Tessier, A., Beley, A., Marie, C., Garnier, P., 2009. Microglial involvement in neuroplastic changes following focal brain ischemia in rats. *PloS One* 4, e8101. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0008101>
- Maisonpierre, P.C., Le Beau, M.M., Espinosa, R., Ip, N.Y., Belluscio, L., de la Monte, S.M., Squinto, S., Furth, M.E., Yancopoulos, G.D., 1991. Human and rat brain-derived neurotrophic factor and neurotrophin-3: gene structures, distributions, and chromosomal localizations. *Genomics* 10, 558–568.
- Malenka, R.C., Bear, M.F., 2004. LTP and LTD: an embarrassment of riches. *Neuron* 44, 5–21. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2004.09.012>
- Mandolesi, G., Menna, E., Harauzov, A., von Bartheld, C.S., Caleo, M., Maffei, L., 2005. A role for retinal brain-derived neurotrophic factor in ocular dominance plasticity. *Curr. Biol. CB* 15, 2119–2124. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2005.10.045>
- Mansuy, I.M., van der Putten, H., Schmid, P., Meins, M., Botteri, F.M., Monard, D., 1993. Variable and multiple expression of Protease Nexin-1 during mouse organogenesis and nervous system development. *Dev. Camb. Engl.* 119, 1119–1134.
- Marcos-Contreras, O.A., Martinez de Lizarrondo, S., Bardou, I., Orset, C., Pruvost, M., Anfray, A., Frigout, Y., Hommet, Y., Lebouvier, L., Montaner, J., Vivien, D., Gauberti, M., 2016. Hyperfibrinolysis increases blood-brain barrier permeability by a plasmin- and

- bradykinin-dependent mechanism. *Blood* 128, 2423–2434. <https://doi.org/10.1182/blood-2016-03-705384>
- Marks, B., McMahon, H.T., 1998. Calcium triggers calcineurin-dependent synaptic vesicle recycling in mammalian nerve terminals. *Curr. Biol.* CB 8, 740–749.
- Marsh, M., McMahon, H.T., 1999. The structural era of endocytosis. *Science* 285, 215–220.
- Martínez, A., Alcántara, S., Borrell, V., Del Río, J.A., Blasi, J., Otal, R., Campos, N., Boronat, A., Barbacid, M., Silos-Santiago, I., Soriano, E., 1998. TrkB and TrkC signaling are required for maturation and synaptogenesis of hippocampal connections. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 18, 7336–7350.
- Martinowich, K., Manji, H., Lu, B., 2007. New insights into BDNF function in depression and anxiety. *Nat. Neurosci.* 10, 1089–1093. <https://doi.org/10.1038/nn1971>
- Massey, P.V., Johnson, B.E., Moulton, P.R., Auberson, Y.P., Brown, M.W., Molnar, E., Collingridge, G.L., Bashir, Z.I., 2004. Differential roles of NR2A and NR2B-containing NMDA receptors in cortical long-term potentiation and long-term depression. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 24, 7821–7828. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.1697-04.2004>
- Matsuda, N., Lu, H., Fukata, Y., Noritake, J., Gao, H., Mukherjee, S., Nemoto, T., Fukata, M., Poo, M.-M., 2009. Differential activity-dependent secretion of brain-derived neurotrophic factor from axon and dendrite. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 29, 14185–14198. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.1863-09.2009>
- Matsumoto, T., Rauskolb, S., Polack, M., Klose, J., Kolbeck, R., Korte, M., Barde, Y.-A., 2008. Biosynthesis and processing of endogenous BDNF: CNS neurons store and secrete BDNF, not pro-BDNF. *Nat. Neurosci.* 11, 131–133. <https://doi.org/10.1038/nn2038>
- Matys, T., Pawlak, R., Matys, E., Pavlides, C., McEwen, B.S., Strickland, S., 2004. Tissue plasminogen activator promotes the effects of corticotropin-releasing factor on the amygdala and anxiety-like behavior. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 101, 16345–16350. <https://doi.org/10.1073/pnas.0407355101>
- Matys, T., Pawlak, R., Strickland, S., 2005. Tissue plasminogen activator in the bed nucleus of stria terminalis regulates acoustic startle. *Neuroscience* 135, 715–722. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2005.06.076>
- Maxfield, F.R., McGraw, T.E., 2004. Endocytic recycling. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 5, 121–132. <https://doi.org/10.1038/nrm1315>
- Mayor, S., Pagano, R.E., 2007. Pathways of clathrin-independent endocytosis. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 8, 603–612. <https://doi.org/10.1038/nrm2216>
- Mayor, S., Parton, R.G., Donaldson, J.G., 2014. Clathrin-independent pathways of endocytosis. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* 6. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a016758>
- McAllister, A.K., Katz, L.C., Lo, D.C., 1996. Neurotrophin regulation of cortical dendritic growth requires activity. *Neuron* 17, 1057–1064.
- McAllister, A.K., Lo, D.C., Katz, L.C., 1995. Neurotrophins regulate dendritic growth in developing visual cortex. *Neuron* 15, 791–803.
- McMahon, H.T., Boucrot, E., 2011. Molecular mechanism and physiological functions of clathrin-mediated endocytosis. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 12, 517–533. <https://doi.org/10.1038/nrm3151>
- Medved, L., Nieuwenhuizen, W., 2003. Molecular mechanisms of initiation of fibrinolysis by fibrin. *Thromb. Haemost.* 89, 409–419.
- Mehra, A., Ali, C., Parcq, J., Vivien, D., Docagne, F., 2016. The plasminogen activation system in neuroinflammation. *Biochim. Biophys. Acta* 1862, 395–402. <https://doi.org/10.1016/j.bbadis.2015.10.011>

- Melchor, J.P., Strickland, S., 2006. physiology and pathology 93, 655–660.
- Melchor, J.P., Strickland, S., 2005. Tissue plasminogen activator in central nervous system physiology and pathology. *Thromb. Haemost.* 93, 655–660. <https://doi.org/10.1160/TH04-12-0838>
- Meldolesi, J., Chieriegatti, E., Luisa Malosio, M., 2004. Requirements for the identification of dense-core granules. *Trends Cell Biol.* 14, 13–19. <https://doi.org/10.1016/j.tcb.2003.11.006>
- Mellman, I., 2000. Quo vadis: polarized membrane recycling in motility and phagocytosis. *J. Cell Biol.* 149, 529–530.
- Metsis, M., Timmusk, T., Arenas, E., Persson, H., 1993. Differential usage of multiple brain-derived neurotrophic factor promoters in the rat brain following neuronal activation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 90, 8802–8806.
- Mettlen, M., Pucadyil, T., Ramachandran, R., Schmid, S.L., 2009. Dissecting dynamin's role in clathrin-mediated endocytosis. *Biochem. Soc. Trans.* 37, 1022–1026. <https://doi.org/10.1042/BST0371022>
- Meyer-Franke, A., Kaplan, M.R., Pfrieger, F.W., Barres, B.A., 1995. Characterization of the signaling interactions that promote the survival and growth of developing retinal ganglion cells in culture. *Neuron* 15, 805–819.
- Minichiello, L., 2009. TrkB signalling pathways in LTP and learning. *Nat. Rev. Neurosci.* 10, 850–860. <https://doi.org/10.1038/nrn2738>
- Minichiello, L., Calella, A.M., Medina, D.L., Bonhoeffer, T., Klein, R., Korte, M., 2002. Mechanism of TrkB-mediated hippocampal long-term potentiation. *Neuron* 36, 121–137.
- Minichiello, L., Korte, M., Wolfer, D., Kühn, R., Unsicker, K., Cestari, V., Rossi-Arnaud, C., Lipp, H.P., Bonhoeffer, T., Klein, R., 1999. Essential role for TrkB receptors in hippocampus-mediated learning. *Neuron* 24, 401–414.
- Minor, K., Phillips, J., Seeds, N.W., 2009. Tissue plasminogen activator promotes axonal outgrowth on CNS myelin after conditioned injury. *J. Neurochem.* 109, 706–715. <https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.2009.05977.x>
- Miranda, E., Lomas, D.A., 2006. Neuroserpin: a serpin to think about. *Cell. Mol. Life Sci. CMLS* 63, 709–722. <https://doi.org/10.1007/s00018-005-5077-4>
- Mizui, T., Ishikawa, Y., Kumanogoh, H., Lume, M., Matsumoto, T., Hara, T., Yamawaki, S., Takahashi, M., Shiosaka, S., Itami, C., Uegaki, K., Saarma, M., Kojima, M., 2015. BDNF pro-peptide actions facilitate hippocampal LTD and are altered by the common BDNF polymorphism Val66Met. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 112, E3067–3074. <https://doi.org/10.1073/pnas.1422336112>
- Morgagni, G., 1761. *Jo. Baptistae Morgagni ... De sedibus, et causis morborum per anatomen indagatis libri quinque ... ; tomus primus duos priores continens libros-[secundus tres reliquos libros continens].* ex Typographia Remondiniana.
- Mowla, S.J., Farhadi, H.F., Pareek, S., Atwal, J.K., Morris, S.J., Seidah, N.G., Murphy, R.A., 2001. Biosynthesis and post-translational processing of the precursor to brain-derived neurotrophic factor. *J. Biol. Chem.* 276, 12660–12666. <https://doi.org/10.1074/jbc.M008104200>
- Mukherjee, S., Ghosh, R.N., Maxfield, F.R., 1997. Endocytosis. *Physiol. Rev.* 77, 759–803. <https://doi.org/10.1152/physrev.1997.77.3.759>
- Nabavi, S., Fox, R., Proulx, C.D., Lin, J.Y., Tsien, R.Y., Malinow, R., 2014. Engineering a memory with LTD and LTP. *Nature* 511, 348–352. <https://doi.org/10.1038/nature13294>

- Nadarajah, B., Alifragis, P., Wong, R.O.L., Parnavelas, J.G., 2003. Neuronal migration in the developing cerebral cortex: observations based on real-time imaging. *Cereb. Cortex N. Y. N* 1991 13, 607–611.
- Nagaoka, M.R., Strital, E., Kouyoumdjian, M., Borges, D.R., 2002. Participation of a galectin-dependent mechanism in the hepatic clearance of tissue-type plasminogen activator and plasma kallikrein. *Thromb. Res.* 108, 257–262.
- Nagappan, G., Zaitsev, E., Senatorov, V.V., Yang, J., Hempstead, B.L., Lu, B., 2009. Control of extracellular cleavage of ProBDNF by high frequency neuronal activity. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 106, 1267–1272. <https://doi.org/10.1073/pnas.0807322106>
- Narita, M., Bu, G., Herz, J., Schwartz, A.L., 1995. Two receptor systems are involved in the plasma clearance of tissue-type plasminogen activator (t-PA) in vivo. *J. Clin. Invest.* 96, 1164–1168. <https://doi.org/10.1172/JCI118105>
- National Institute of Neurological Disorders and Stroke rt-PA Stroke Study Group, 1995. Tissue plasminogen activator for acute ischemic stroke. *N. Engl. J. Med.* 333, 1581–1587. <https://doi.org/10.1056/NEJM199512143332401>
- Nicole, O., Docagne, F., Ali, C., Margail, I., Carmeliet, P., MacKenzie, E.T., Vivien, D., Buisson, A., 2001. The proteolytic activity of tissue-plasminogen activator enhances NMDA receptor-mediated signaling. *Nat. Med.* 7, 59–64. <https://doi.org/10.1038/83358>
- Nielsen, M.S., Madsen, P., Christensen, E.I., Nykjaer, A., Gliemann, J., Kasper, D., Pohlmann, R., Petersen, C.M., 2001. The sortilin cytoplasmic tail conveys Golgi-endosome transport and binds the VHS domain of the GGA2 sorting protein. *EMBO J.* 20, 2180–2190. <https://doi.org/10.1093/emboj/20.9.2180>
- Nikoletopoulou, V., Lickert, H., Frade, J.M., Rencurel, C., Giallonardo, P., Zhang, L., Bibel, M., Barde, Y.-A., 2010. Neurotrophin receptors TrkA and TrkC cause neuronal death whereas TrkB does not. *Nature* 467, 59–63. <https://doi.org/10.1038/nature09336>
- Nykjaer, A., Lee, R., Teng, K.K., Jansen, P., Madsen, P., Nielsen, M.S., Jacobsen, C., Kliemann, M., Schwarz, E., Willnow, T.E., Hempstead, B.L., Petersen, C.M., 2004. Sortilin is essential for proNGF-induced neuronal cell death. *Nature* 427, 843–848. <https://doi.org/10.1038/nature02319>
- Obiang, P., Macrez, R., Jullienne, A., Bertrand, T., Lesept, F., Ali, C., Maubert, E., Vivien, D., Agin, V., 2012. GluN2D subunit-containing NMDA receptors control tissue plasminogen activator-mediated spatial memory. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 32, 12726–12734. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.6202-11.2012>
- Obiang, P., Maubert, E., Bardou, I., Nicole, O., Launay, S., Bezin, L., Vivien, D., Agin, V., 2011. Enriched housing reverses age-associated impairment of cognitive functions and tPA-dependent maturation of BDNF. *Neurobiol. Learn. Mem.* 96, 121–129. <https://doi.org/10.1016/j.nlm.2011.03.004>
- Oh, S.B., Byun, C.J., Yun, J.-H., Jo, D.-G., Carmeliet, P., Koh, J.-Y., Lee, J.-Y., 2014. Tissue plasminogen activator arrests Alzheimer's disease pathogenesis. *Neurobiol. Aging* 35, 511–519. <https://doi.org/10.1016/j.neurobiolaging.2013.09.020>
- Orth, K., Willnow, T., Herz, J., Gething, M.J., Sambrook, J., 1994. Low density lipoprotein receptor-related protein is necessary for the internalization of both tissue-type plasminogen activator-inhibitor complexes and free tissue-type plasminogen activator. *J. Biol. Chem.* 269, 21117–21122.
- Osterlund, B., Andersson, B., Häggmark, S., Jern, C., Johansson, G., Seeman-Lodding, H., Biber, B., 2002. Myocardial ischemia induces coronary t-PA release in the pig. *Acta Anaesthesiol. Scand.* 46, 271–278.

- Osterwalder, T., Contartese, J., Stoeckli, E.T., Kuhn, T.B., Sonderegger, P., 1996. Neuroserpin, an axonally secreted serine protease inhibitor. *EMBO J.* 15, 2944–2953.
- Paczkowski, J.E., Richardson, B.C., Fromme, J.C., 2015. Cargo adaptors: structures illuminate mechanisms regulating vesicle biogenesis. *Trends Cell Biol.* 25, 408–416. <https://doi.org/10.1016/j.tcb.2015.02.005>
- Pang, P.T., Lu, B., 2004. Regulation of late-phase LTP and long-term memory in normal and aging hippocampus: role of secreted proteins tPA and BDNF. *Ageing Res. Rev.* 3, 407–430. <https://doi.org/10.1016/j.arr.2004.07.002>
- Pang, P.T., Teng, H.K., Zaitsev, E., Woo, N.T., Sakata, K., Zhen, S., Teng, K.K., Yung, W.-H., Hempstead, B.L., Lu, B., 2004. Cleavage of proBDNF by tPA/plasmin is essential for long-term hippocampal plasticity. *Science* 306, 487–491. <https://doi.org/10.1126/science.1100135>
- Pang, Z.P., Südhof, T.C., 2010. Cell biology of Ca²⁺-triggered exocytosis. *Curr. Opin. Cell Biol.* 22, 496–505. <https://doi.org/10.1016/j.ceb.2010.05.001>
- Parcq, J., Bertrand, T., Montagne, A., Baron, A.F., Macrez, R., Billard, J.M., Briens, A., Hommet, Y., Wu, J., Yepes, M., Lijnen, H.R., Dutar, P., Anglés-Cano, E., Vivien, D., 2012. Unveiling an exceptional zymogen: the single-chain form of tPA is a selective activator of NMDA receptor-dependent signaling and neurotoxicity. *Cell Death Differ.* 19, 1983–1991. <https://doi.org/10.1038/cdd.2012.86>
- Park, H., Poo, M., 2013. Neurotrophin regulation of neural circuit development and function. *Nat. Rev. Neurosci.* 14, 7–23. <https://doi.org/10.1038/nrn3379>
- Parmer, R.J., Mahata, M., Mahata, S., Sebald, M.T., O'Connor, D.T., Miles, L.A., 1997. Tissue plasminogen activator (t-PA) is targeted to the regulated secretory pathway. Catecholamine storage vesicles as a reservoir for the rapid release of t-PA. *J. Biol. Chem.* 272, 1976–1982.
- Parton, R.G., Simons, K., 2007. The multiple faces of caveolae. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 8, 185–194. <https://doi.org/10.1038/nrm2122>
- Patterson, S.L., Abel, T., Deuel, T.A., Martin, K.C., Rose, J.C., Kandel, E.R., 1996. Recombinant BDNF rescues deficits in basal synaptic transmission and hippocampal LTP in BDNF knockout mice. *Neuron* 16, 1137–1145.
- Patterson, S.L., Grover, L.M., Schwartzkroin, P.A., Bothwell, M., 1992. Neurotrophin expression in rat hippocampal slices: a stimulus paradigm inducing LTP in CA1 evokes increases in BDNF and NT-3 mRNAs. *Neuron* 9, 1081–1088.
- Pawlak, R., Magarinos, A.M., Melchor, J., McEwen, B., Strickland, S., 2003. Tissue plasminogen activator in the amygdala is critical for stress-induced anxiety-like behavior. *Nat. Neurosci.* 6, 168–174. <https://doi.org/10.1038/nn998>
- Pawlak, R., Nagai, N., Urano, T., Napiorkowska-Pawlak, D., Ihara, H., Takada, Y., Collen, D., Takada, A., 2002. Rapid, specific and active site-catalyzed effect of tissue-plasminogen activator on hippocampus-dependent learning in mice. *Neuroscience* 113, 995–1001.
- Pawlak, R., Nagai, N., Urano, T., Napiorkowska-Pawlak, D., Ihara, H., Takada, Y., Collen, D., Takada, A., 2002. Rapid, specific and active site-catalyzed effect of tissue-plasminogen activator on hippocampus-dependent learning in mice. *Neuroscience* 113, 995–1001.
- Pennica, D., Holmes, W.E., Kohr, W.J., Harkins, R.N., Vohar, G.A., Ward, C.A., Bennett, W.F., Yelverton, E., Seeburg, P.H., Heyneker, H.L., Goeddel, D.V., Collen, D., 1983. Cloning and expression of human tissue-type plasminogen activator cDNA in *E. coli*. *Nature* 301, 214–221. <https://doi.org/10.1038/301214a0>

- Petersen, L.C., Johannessen, M., Foster, D., Kumar, A., Mulvihill, E., 1988. The effect of polymerised fibrin on the catalytic activities of one-chain tissue-type plasminogen activator as revealed by an analogue resistant to plasmin cleavage. *Biochim. Biophys. Acta* 952, 245–254.
- Peterson, D.A., Dickinson-Anson, H.A., Leppert, J.T., Lee, K.F., Gage, F.H., 1999. Central neuronal loss and behavioral impairment in mice lacking neurotrophin receptor p75. *J. Comp. Neurol.* 404, 1–20.
- Philippidou, P., Valdez, G., Akmentin, W., Bowers, W.J., Federoff, H.J., Halegoua, S., 2011. Trk retrograde signaling requires persistent, Pincher-directed endosomes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 108, 852–857. <https://doi.org/10.1073/pnas.1015981108>
- Pittman, R.N., DiBenedetto, A.J., 1995. PC12 cells overexpressing tissue plasminogen activator regenerate neurites to a greater extent and migrate faster than control cells in complex extracellular matrix. *J. Neurochem.* 64, 566–575.
- Pittman, R.N., Ivins, J.K., Buettner, H.M., 1989. Neuronal plasminogen activators: cell surface binding sites and involvement in neurite outgrowth. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 9, 4269–4286.
- Pohl, G., Källström, M., Bergsdorf, N., Wallén, P., Jörnvall, H., 1984. Tissue plasminogen activator: peptide analyses confirm an indirectly derived amino acid sequence, identify the active site serine residue, establish glycosylation sites, and localize variant differences. *Biochemistry (Mosc.)* 23, 3701–3707.
- Polavarapu, R., Gongora, M.C., Yi, H., Ranganathan, S., Lawrence, D.A., Strickland, D., Yepes, M., 2007. Tissue-type plasminogen activator-mediated shedding of astrocytic low-density lipoprotein receptor-related protein increases the permeability of the neurovascular unit. *Blood* 109, 3270–3278. <https://doi.org/10.1182/blood-2006-08-043125>
- Progida, C., Bakke, O., 2016. Bidirectional traffic between the Golgi and the endosomes - machineries and regulation. *J. Cell Sci.* 129, 3971–3982. <https://doi.org/10.1242/jcs.185702>
- Pruunsild, P., Kazantseva, A., Aid, T., Palm, K., Timmusk, T., 2007. Dissecting the human BDNF locus: bidirectional transcription, complex splicing, and multiple promoters. *Genomics* 90, 397–406. <https://doi.org/10.1016/j.ygeno.2007.05.004>
- Pruunsild, P., Sepp, M., Orav, E., Koppel, I., Timmusk, T., 2011. Identification of cis-elements and transcription factors regulating neuronal activity-dependent transcription of human BDNF gene. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 31, 3295–3308. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.4540-10.2011>
- Pruvost, M., Lépine, M., Leonetti, C., Etard, O., Naveau, M., Agin, V., Docagne, F., Maubert, E., Ali, C., Emery, E., Vivien, D., 2017. ADAMTS-4 in oligodendrocytes contributes to myelination with an impact on motor function. *Glia* 65, 1961–1975. <https://doi.org/10.1002/glia.23207>
- Qian, Z., Gilbert, M.E., Colicos, M.A., Kandel, E.R., Kuhl, D., 1993. Tissue-plasminogen activator is induced as an immediate-early gene during seizure, kindling and long-term potentiation. *Nature* 361, 453–457. <https://doi.org/10.1038/361453a0>
- Raiborg, C., Bache, K.G., Gillooly, D.J., Madshus, I.H., Stang, E., Stenmark, H., 2002. Hrs sorts ubiquitinated proteins into clathrin-coated microdomains of early endosomes. *Nat. Cell Biol.* 4, 394–398. <https://doi.org/10.1038/ncb791>
- Raum, D., Marcus, D., Alper, C.A., Levey, R., Taylor, P.D., Starzl, T.E., 1980. Synthesis of human plasminogen by the liver. *Science* 208, 1036–1037.

- Rauskolb, S., Zagrebelsky, M., Dreznjak, A., Deogracias, R., Matsumoto, T., Wiese, S., Erne, B., Sendtner, M., Schaeren-Wiemers, N., Korte, M., Barde, Y.-A., 2010. Global deprivation of brain-derived neurotrophic factor in the CNS reveals an area-specific requirement for dendritic growth. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 30, 1739–1749. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.5100-09.2010>
- Reddrop, C., Moldrich, R.X., Beart, P.M., Farso, M., Liberatore, G.T., Howells, D.W., Petersen, K.-U., Schleuning, W.-D., Medcalf, R.L., 2005. Vampire bat salivary plasminogen activator (desmoteplase) inhibits tissue-type plasminogen activator-induced potentiation of excitotoxic injury. *Stroke* 36, 1241–1246. <https://doi.org/10.1161/01.STR.0000166050.84056.48>
- Reichardt, L.F., 2006. Neurotrophin-regulated signalling pathways. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.* 361, 1545–1564. <https://doi.org/10.1098/rstb.2006.1894>
- Rex, C.S., Lin, C.-Y., Kramár, E.A., Chen, L.Y., Gall, C.M., Lynch, G., 2007. Brain-derived neurotrophic factor promotes long-term potentiation-related cytoskeletal changes in adult hippocampus. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 27, 3017–3029. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.4037-06.2007>
- Riccio, A., Ahn, S., Davenport, C.M., Blendy, J.A., Ginty, D.D., 1999. Mediation by a CREB family transcription factor of NGF-dependent survival of sympathetic neurons. *Science* 286, 2358–2361.
- Rickhag, M., Teilum, M., Wieloch, T., 2007. Rapid and long-term induction of effector immediate early genes (BDNF, Neurtin and Arc) in peri-infarct cortex and dentate gyrus after ischemic injury in rat brain. *Brain Res.* 1151, 203–210. <https://doi.org/10.1016/j.brainres.2007.03.005>
- Rijken, D.C., Collen, D., 1981. Purification and characterization of the plasminogen activator secreted by human melanoma cells in culture. *J. Biol. Chem.* 256, 7035–7041.
- Rijken, D.C., Hoylaerts, M., Collen, D., 1982. Fibrinolytic properties of one-chain and two-chain human extrinsic (tissue-type) plasminogen activator. *J. Biol. Chem.* 257, 2920–2925.
- Rijken, D.C., Lijnen, H.R., 2009. New insights into the molecular mechanisms of the fibrinolytic system. *J. Thromb. Haemost. JTH* 7, 4–13. <https://doi.org/10.1111/j.1538-7836.2008.03220.x>
- Rijken, D.C., Wijngaards, G., Zaal-de Jong, M., Welbergen, J., 1979. Purification and partial characterization of plasminogen activator from human uterine tissue. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Protein Struct.* 580, 140–153. [https://doi.org/10.1016/0005-2795\(79\)90205-8](https://doi.org/10.1016/0005-2795(79)90205-8)
- Rodier, M., Prigent-Tessier, A., Béjot, Y., Jacquin, A., Mossiat, C., Marie, C., Garnier, P., 2014. Exogenous t-PA Administration Increases Hippocampal Mature BDNF Levels. Plasmin- or NMDA-Dependent Mechanism? *PLOS ONE* 9, e92416. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0092416>
- Rodríguez, A., Webster, P., Ortego, J., Andrews, N.W., 1997. Lysosomes behave as Ca²⁺-regulated exocytic vesicles in fibroblasts and epithelial cells. *J. Cell Biol.* 137, 93–104.
- Rodríguez-Tébar, A., Dechant, G., Barde, Y.A., 1990. Binding of brain-derived neurotrophic factor to the nerve growth factor receptor. *Neuron* 4, 487–492.
- Rogove, A.D., Siao, C., Keyt, B., Strickland, S., Tsirka, S.E., 1999. Activation of microglia reveals a non-proteolytic cytokine function for tissue plasminogen activator in the central nervous system. *J. Cell Sci.* 112 (Pt 22), 4007–4016.
- Rogove, A.D., Tsirka, S.E., 1998. Neurotoxic responses by microglia elicited by excitotoxic injury in the mouse hippocampus. *Curr. Biol. CB* 8, 19–25.

- Rösch, H., Schweigreiter, R., Bonhoeffer, T., Barde, Y.-A., Korte, M., 2005. The neurotrophin receptor p75NTR modulates long-term depression and regulates the expression of AMPA receptor subunits in the hippocampus. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 102, 7362–7367. <https://doi.org/10.1073/pnas.0502460102>
- Rouf, S.A., Moo-Young, M., Chisti, Y., 1996. Tissue-type plasminogen activator: characteristics, applications and production technology. *Biotechnol. Adv.* 14, 239–266.
- Roux, P.P., Barker, P.A., 2002. Neurotrophin signaling through the p75 neurotrophin receptor. *Prog. Neurobiol.* 67, 203–233.
- Sairanen, M., Lucas, G., Ernfors, P., Castrén, M., Castrén, E., 2005. Brain-derived neurotrophic factor and antidepressant drugs have different but coordinated effects on neuronal turnover, proliferation, and survival in the adult dentate gyrus. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 25, 1089–1094. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.3741-04.2005>
- Sakata, K., Woo, N.H., Martinowich, K., Greene, J.S., Schloesser, R.J., Shen, L., Lu, B., 2009. Critical role of promoter IV-driven BDNF transcription in GABAergic transmission and synaptic plasticity in the prefrontal cortex. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 106, 5942–5947. <https://doi.org/10.1073/pnas.0811431106>
- Salehi, A.H., Roux, P.P., Kubu, C.J., Zeindler, C., Bhakar, A., Tannis, L.L., Verdi, J.M., Barker, P.A., 2000. NRG1, a novel MAGE protein, interacts with the p75 neurotrophin receptor and facilitates nerve growth factor-dependent apoptosis. *Neuron* 27, 279–288.
- Samson, A.L., Nevin, S.T., Croucher, D., Niego, B., Daniel, P.B., Weiss, T.W., Moreno, E., Monard, D., Lawrence, D.A., Medcalf, R.L., 2008. Tissue-type plasminogen activator requires a co-receptor to enhance NMDA receptor function. *J. Neurochem.* 107, 1091–1101. <https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.2008.05687.x>
- Sanacora, G., 2008. New understanding of mechanisms of action of bipolar medications. *J. Clin. Psychiatry* 69 Suppl 5, 22–27.
- Sanes, J.R., Lichtman, J.W., 1999. Can molecules explain long-term potentiation? *Nat. Neurosci.* 2, 597–604. <https://doi.org/10.1038/10154>
- Santi, S., Cappello, S., Riccio, M., Bergami, M., Aicardi, G., Schenk, U., Matteoli, M., Canossa, M., 2006. Hippocampal neurons recycle BDNF for activity-dependent secretion and LTP maintenance. *EMBO J.* 25, 4372–4380. <https://doi.org/10.1038/sj.emboj.7601303>
- Sappino, A.P., Madani, R., Huarte, J., Belin, D., Kiss, J.Z., Wohlwend, A., Vassalli, J.D., 1993. Extracellular proteolysis in the adult murine brain. *J. Clin. Invest.* 92, 679–685. <https://doi.org/10.1172/JCI116637>
- Scalzo, P., Kümmer, A., Bretas, T.L., Cardoso, F., Teixeira, A.L., 2010. Serum levels of brain-derived neurotrophic factor correlate with motor impairment in Parkinson's disease. *J. Neurol.* 257, 540–545. <https://doi.org/10.1007/s00415-009-5357-2>
- Scharfman, H., Goodman, J., Macleod, A., Phani, S., Antonelli, C., Croll, S., 2005. Increased neurogenesis and the ectopic granule cells after intrahippocampal BDNF infusion in adult rats. *Exp. Neurol.* 192, 348–356. <https://doi.org/10.1016/j.expneurol.2004.11.016>
- Schiavo, G., Benfenati, F., Poulain, B., Rossetto, O., Polverino de Laureto, P., DasGupta, B.R., Montecucco, C., 1992. Tetanus and botulinum-B neurotoxins block neurotransmitter release by proteolytic cleavage of synaptobrevin. *Nature* 359, 832–835. <https://doi.org/10.1038/359832a0>
- Schrimpf, S.P., Bleiker, A.J., Brecevic, L., Kozlov, S.V., Berger, P., Osterwalder, T., Krueger, S.R., Schinzel, A., Sonderegger, P., 1997. Human neuroserpin (PI12): cDNA cloning and

- chromosomal localization to 3q26. *Genomics* 40, 55–62. <https://doi.org/10.1006/geno.1996.4514>
- Seeds, N.W., Basham, M.E., Haffke, S.P., 1999. Neuronal migration is retarded in mice lacking the tissue plasminogen activator gene. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 96, 14118–14123.
- Seeds, N.W., Williams, B.L., Bickford, P.C., 1995. Tissue plasminogen activator induction in Purkinje neurons after cerebellar motor learning. *Science* 270, 1992–1994.
- Seidah, N.G., Benjannet, S., Pareek, S., Chrétien, M., Murphy, R.A., 1996. Cellular processing of the neurotrophin precursors of NT3 and BDNF by the mammalian proprotein convertases. *FEBS Lett.* 379, 247–250.
- Settembre, C., Fraldi, A., Medina, D.L., Ballabio, A., 2013. Signals from the lysosome: a control centre for cellular clearance and energy metabolism. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 14, 283–296. <https://doi.org/10.1038/nrm3565>
- Shelly, M., Cancedda, L., Heilshorn, S., Sumbre, G., Poo, M.-M., 2007. LKB1/STRAD promotes axon initiation during neuronal polarization. *Cell* 129, 565–577. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2007.04.012>
- Shen, S., Wiemelt, A.P., McMorris, F.A., Barres, B.A., 1999. Retinal ganglion cells lose trophic responsiveness after axotomy. *Neuron* 23, 285–295.
- Shen, W., Wu, B., Zhang, Z., Dou, Y., Rao, Z.-R., Chen, Y.-R., Duan, S., 2006. Activity-induced rapid synaptic maturation mediated by presynaptic cdc42 signaling. *Neuron* 50, 401–414. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2006.03.017>
- Shen, Y., Rosendale, M., Campbell, R.E., Perrais, D., 2014. pHuji, a pH-sensitive red fluorescent protein for imaging of exo- and endocytosis. *J. Cell Biol.* 207, 419–432. <https://doi.org/10.1083/jcb.201404107>
- Shetty, A.K., Turner, D.A., 1998. In vitro survival and differentiation of neurons derived from epidermal growth factor-responsive postnatal hippocampal stem cells: inducing effects of brain-derived neurotrophic factor. *J. Neurobiol.* 35, 395–425.
- Shimojo, M., Courchet, J., Pieraut, S., Torabi-Rander, N., Sando, R., Polleux, F., Maximov, A., 2015. SNAREs Controlling Vesicular Release of BDNF and Development of Callosal Axons. *Cell Rep.* 11, 1054–1066. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2015.04.032>
- Shin, C.Y., Kundel, M., Wells, D.G., 2004. Rapid, activity-induced increase in tissue plasminogen activator is mediated by metabotropic glutamate receptor-dependent mRNA translation. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 24, 9425–9433. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.2457-04.2004>
- Shvets, E., Ludwig, A., Nichols, B.J., 2014. News from the caves: update on the structure and function of caveolae. *Curr. Opin. Cell Biol.* 29, 99–106. <https://doi.org/10.1016/j.ceb.2014.04.011>
- Siao, C.-J., Fernandez, S.R., Tsirka, S.E., 2003. Cell type-specific roles for tissue plasminogen activator released by neurons or microglia after excitotoxic injury. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 23, 3234–3242.
- Siao, C.-J., Tsirka, S.E., 2002. Tissue plasminogen activator mediates microglial activation via its finger domain through annexin II. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 22, 3352–3358. <https://doi.org/20026281>
- Sigismund, S., Argenzio, E., Tosoni, D., Cavallaro, E., Polo, S., Di Fiore, P.P., 2008. Clathrin-mediated internalization is essential for sustained EGFR signaling but dispensable for degradation. *Dev. Cell* 15, 209–219. <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2008.06.012>
- Silverman, J., Muir, W.W., 1993. A review of laboratory animal anesthesia with chloral hydrate and chloralose. *Lab. Anim. Sci.* 43, 210–216.

- Silverman, M.A., Johnson, S., Gurkins, D., Farmer, M., Lochner, J.E., Rosa, P., Scalettar, B.A., 2005. Mechanisms of transport and exocytosis of dense-core granules containing tissue plasminogen activator in developing hippocampal neurons. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 25, 3095–3106. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.4694-04.2005>
- Söllner, T., Whiteheart, S.W., Brunner, M., Erdjument-Bromage, H., Geromanos, S., Tempst, P., Rothman, J.E., 1993. SNAP receptors implicated in vesicle targeting and fusion. *Nature* 362, 318–324. <https://doi.org/10.1038/362318a0>
- Song, H.J., Ming, G.L., Poo, M.M., 1997. cAMP-induced switching in turning direction of nerve growth cones. *Nature* 388, 275–279. <https://doi.org/10.1038/40864>
- Soreq, H., Miskin, R., 1981. Plasminogen activator in the rodent brain. *Brain Res.* 216, 361–374.
- Spellman, M.W., Basa, L.J., Leonard, C.K., Chakel, J.A., O'Connor, J.V., Wilson, S., van Halbeek, H., 1989. Carbohydrate structures of human tissue plasminogen activator expressed in Chinese hamster ovary cells. *J. Biol. Chem.* 264, 14100–14111.
- Sprengers, E.D., Kluft, C., 1987. Plasminogen activator inhibitors. *Blood* 69, 381–387.
- Stary, C.M., Sun, X., Giffard, R.G., 2015. Astrocytes Protect against Isoflurane Neurotoxicity by Buffering pro-brain-derived Neurotrophic Factor. *Anesthesiology* 123, 810–819. <https://doi.org/10.1097/ALN.0000000000000824>
- Steffenach, H.-A., Witter, M., Moser, M.-B., Moser, E.I., 2005. Spatial memory in the rat requires the dorsolateral band of the entorhinal cortex. *Neuron* 45, 301–313. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2004.12.044>
- Stenmark, H., 2009. Rab GTPases as coordinators of vesicle traffic. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 10, 513–525. <https://doi.org/10.1038/nrm2728>
- Storrie, B., Desjardins, M., 1996. The biogenesis of lysosomes: is it a kiss and run, continuous fusion and fission process? *BioEssays News Rev. Mol. Cell. Dev. Biol.* 18, 895–903. <https://doi.org/10.1002/bies.950181108>
- Su, E.J., Fredriksson, L., Geyer, M., Folestad, E., Cale, J., Andrae, J., Gao, Y., Pietras, K., Mann, K., Yepes, M., Strickland, D.K., Betsholtz, C., Eriksson, U., Lawrence, D.A., 2008. Activation of PDGF-CC by tissue plasminogen activator impairs blood-brain barrier integrity during ischemic stroke. *Nat. Med.* 14, 731–737. <https://doi.org/10.1038/nm1787>
- Südhof, T.C., 2013. A molecular machine for neurotransmitter release: synaptotagmin and beyond. *Nat. Med.* 19, 1227–1231. <https://doi.org/10.1038/nm.3338>
- Südhof, T.C., 2004. The synaptic vesicle cycle. *Annu. Rev. Neurosci.* 27, 509–547. <https://doi.org/10.1146/annurev.neuro.26.041002.131412>
- Suen, P.C., Wu, K., Levine, E.S., Mount, H.T., Xu, J.L., Lin, S.Y., Black, I.B., 1997. Brain-derived neurotrophic factor rapidly enhances phosphorylation of the postsynaptic N-methyl-D-aspartate receptor subunit 1. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 94, 8191–8195.
- Suzuki, Y., Nagai, N., Umemura, K., Collen, D., Lijnen, H.R., 2007. Stromelysin-1 (MMP-3) is critical for intracranial bleeding after t-PA treatment of stroke in mice. *J. Thromb. Haemost. JTH* 5, 1732–1739. <https://doi.org/10.1111/j.1538-7836.2007.02628.x>
- Suzuki, Y., Nagai, N., Yamakawa, K., Kawakami, J., Lijnen, H.R., Umemura, K., 2009. Tissue-type plasminogen activator (t-PA) induces stromelysin-1 (MMP-3) in endothelial cells through activation of lipoprotein receptor-related protein. *Blood* 114, 3352–3358. <https://doi.org/10.1182/blood-2009-02-203919>
- Swanson, J.A., Watts, C., 1995. Macropinocytosis. *Trends Cell Biol.* 5, 424–428.

- Szaszák, M., Christian, F., Rosenthal, W., Klussmann, E., 2008. Compartmentalized cAMP signalling in regulated exocytic processes in non-neuronal cells. *Cell. Signal.* 20, 590–601. <https://doi.org/10.1016/j.cellsig.2007.10.020>
- Tanaka, J.-I., Horiike, Y., Matsuzaki, M., Miyazaki, T., Ellis-Davies, G.C.R., Kasai, H., 2008. Protein synthesis and neurotrophin-dependent structural plasticity of single dendritic spines. *Science* 319, 1683–1687. <https://doi.org/10.1126/science.1152864>
- Tanaka, T., Saito, H., Matsuki, N., 1997. Inhibition of GABAA synaptic responses by brain-derived neurotrophic factor (BDNF) in rat hippocampus. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 17, 2959–2966.
- Tang, Z., Li, D., Luan, Y., Zhu, L., Du, H., Tao, Y., Wang, Y., Haddleton, D.M., Chen, H., 2015. Conjugation of polymers to proteins through an inhibitor-derived peptide: taking up the inhibitor “berth.” *Chem. Commun. Camb. Engl.* 51, 10099–10102. <https://doi.org/10.1039/c5cc02659h>
- Taniguchi, Y., Inoue, N., Morita, S., Nikaido, Y., Nakashima, T., Nagai, N., Okada, K., Matsuo, O., Miyata, S., 2011. Localization of plasminogen in mouse hippocampus, cerebral cortex, and hypothalamus. *Cell Tissue Res.* 343, 303–317. <https://doi.org/10.1007/s00441-010-1110-5>
- Tao, X., Finkbeiner, S., Arnold, D.B., Shaywitz, A.J., Greenberg, M.E., 1998. Ca²⁺ influx regulates BDNF transcription by a CREB family transcription factor-dependent mechanism. *Neuron* 20, 709–726.
- Tao, X., West, A.E., Chen, W.G., Corfas, G., Greenberg, M.E., 2002. A calcium-responsive transcription factor, CaRF, that regulates neuronal activity-dependent expression of BDNF. *Neuron* 33, 383–395.
- Tasdemir-Yilmaz, O.E., Freeman, M.R., 2014. Astrocytes engage unique molecular programs to engulf pruned neuronal debris from distinct subsets of neurons. *Genes Dev.* 28, 20–33. <https://doi.org/10.1101/gad.229518.113>
- Taylor, A.R., Gifondorwa, D.J., Robinson, M.B., Strupe, J.L., Pevette, D., Johnson, J.E., Hempstead, B., Oppenheim, R.W., Milligan, C.E., 2012. Motoneuron programmed cell death in response to proBDNF. *Dev. Neurobiol.* 72, 699–712. <https://doi.org/10.1002/dneu.20964>
- Teesalu, T., Kulla, A., Simisker, A., Sirén, V., Lawrence, D.A., Asser, T., Vaheri, A., 2004. Tissue plasminogen activator and neuroserpin are widely expressed in the human central nervous system. *Thromb. Haemost.* 92, 358–368. <https://doi.org/10.1160/TH02-12-0310>
- Teng, H.K., Teng, K.K., Lee, R., Wright, S., Tevar, S., Almeida, R.D., Kermani, P., Torkin, R., Chen, Z.-Y., Lee, F.S., Kraemer, R.T., Nykjaer, A., Hempstead, B.L., 2005. ProBDNF induces neuronal apoptosis via activation of a receptor complex of p75NTR and sortilin. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 25, 5455–5463. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.5123-04.2005>
- Thakker-Varia, S., Alder, J., Crozier, R.A., Plummer, M.R., Black, I.B., 2001. Rab3A is required for brain-derived neurotrophic factor-induced synaptic plasticity: transcriptional analysis at the population and single-cell levels. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 21, 6782–6790.
- Thewke, D.P., Seeds, N.W., 1999. The expression of mRNAs for hepatocyte growth factor/scatter factor, its receptor c-met, and one of its activators tissue-type plasminogen activator show a systematic relationship in the developing and adult cerebral cortex and hippocampus. *Brain Res.* 821, 356–367.

- Thoenen, H., 1991. The changing scene of neurotrophic factors. *Trends Neurosci.* 14, 165–170.
- Thompson Ray, M., Weickert, C.S., Wyatt, E., Webster, M.J., 2011. Decreased BDNF, trkB-TK+ and GAD67 mRNA expression in the hippocampus of individuals with schizophrenia and mood disorders. *J. Psychiatry Neurosci. JPN* 36, 195–203. <https://doi.org/10.1503/jpn.100048>
- Tillett, W.S., Garner, R.L., 1933. THE FIBRINOLYTIC ACTIVITY OF HEMOLYTIC STREPTOCOCCI. *J. Exp. Med.* 58, 485–502.
- Timmusk, T., Palm, K., Metsis, M., Reintam, T., Paalme, V., Saarma, M., Persson, H., 1993. Multiple promoters direct tissue-specific expression of the rat BDNF gene. *Neuron* 10, 475–489.
- Traub, L.M., 2009. Tickets to ride: selecting cargo for clathrin-regulated internalization. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 10, 583–596. <https://doi.org/10.1038/nrm2751>
- Trotter, J.H., Lussier, A.L., Psilos, K.E., Mahoney, H.L., Sponaugle, A.E., Hoe, H.-S., Rebeck, G.W., Weeber, E.J., 2014. Extracellular proteolysis of reelin by tissue plasminogen activator following synaptic potentiation. *Neuroscience* 274, 299–307. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2014.05.046>
- Tsankova, N.M., Berton, O., Renthal, W., Kumar, A., Neve, R.L., Nestler, E.J., 2006. Sustained hippocampal chromatin regulation in a mouse model of depression and antidepressant action. *Nat. Neurosci.* 9, 519–525. <https://doi.org/10.1038/nn1659>
- Tsirka, S.E., Gualandris, A., Amaral, D.G., Strickland, S., 1995. Excitotoxin-induced neuronal degeneration and seizure are mediated by tissue plasminogen activator. *Nature* 377, 340–344. <https://doi.org/10.1038/377340a0>
- Tsirka, S.E., Rogove, A.D., Bugge, T.H., Degen, J.L., Strickland, S., 1997. An extracellular proteolytic cascade promotes neuronal degeneration in the mouse hippocampus. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 17, 543–552.
- Tucker, K.L., Meyer, M., Barde, Y.A., 2001. Neurotrophins are required for nerve growth during development. *Nat. Neurosci.* 4, 29–37. <https://doi.org/10.1038/82868>
- Tyler, W.J., Alonso, M., Bramham, C.R., Pozzo-Miller, L.D., 2002. From acquisition to consolidation: on the role of brain-derived neurotrophic factor signaling in hippocampal-dependent learning. *Learn. Mem. Cold Spring Harb. N* 9, 224–237. <https://doi.org/10.1101/lm.51202>
- Uchida, H., Yokoyama, H., Kimoto, H., Kato, H., Araki, T., 2010. Long-term changes in the ipsilateral substantia nigra after transient focal cerebral ischaemia in rats. *Int. J. Exp. Pathol.* 91, 256–266. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2613.2010.00712.x>
- Uno, M., Ozawa, N., 1991. Long-term potentiation of the amygdalo-striatal synaptic transmission in the course of development of amygdaloid kindling in cats. *Neurosci. Res.* 12, 251–262.
- Urh, M., Rosenberg, M., 2012. HaloTag, a Platform Technology for Protein Analysis. *Curr. Chem. Genomics* 6, 72–78. <https://doi.org/10.2174/1875397301206010072>
- van den Aamele, J., Tiberi, L., Vanderhaeghen, P., Espuny-Camacho, I., 2014. Thinking out of the dish: what to learn about cortical development using pluripotent stem cells. *Trends Neurosci.* 37, 334–342. <https://doi.org/10.1016/j.tins.2014.03.005>
- Verpelli, C., Piccoli, G., Zibetti, C., Zanchi, A., Gardoni, F., Huang, K., Brambilla, D., Di Luca, M., Battaglioli, E., Sala, C., 2010. Synaptic activity controls dendritic spine morphology by modulating eEF2-dependent BDNF synthesis. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 30, 5830–5842. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.0119-10.2010>

- Verrall, S., Seeds, N.W., 1989. Characterization of 125I-tissue plasminogen activator binding to cerebellar granule neurons. *J. Cell Biol.* 109, 265–271.
- Verstraete, M., Bounameaux, H., de Cock, F., Van de Werf, F., Collen, D., 1985. Pharmacokinetics and systemic fibrinolytic effects of recombinant human tissue-type plasminogen activator (rt-PA) in humans. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 235, 506–512.
- Vicario-Abejón, C., Collin, C., McKay, R.D., Segal, M., 1998. Neurotrophins induce formation of functional excitatory and inhibitory synapses between cultured hippocampal neurons. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 18, 7256–7271.
- Vicario-Abejón, C., Owens, D., McKay, R., Segal, M., 2002. Role of neurotrophins in central synapse formation and stabilization. *Nat. Rev. Neurosci.* 3, 965–974. <https://doi.org/10.1038/nrn988>
- von Bartheld, C.S., Byers, M.R., Williams, R., Bothwell, M., 1996. Anterograde transport of neurotrophins and axodendritic transfer in the developing visual system. *Nature* 379, 830–833. <https://doi.org/10.1038/379830a0>
- Wallén, P., Bergsdorf, N., Rånby, M., 1982. Purification and identification of two structural variants of porcine tissue plasminogen activator by affinity adsorption on fibrin. *Biochim. Biophys. Acta* 719, 318–328.
- Wang, T., Xie, K., Lu, B., 1995. Neurotrophins promote maturation of developing neuromuscular synapses. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 15, 4796–4805.
- Wang, X., Lee, Sun-Ryung, Arai, K., Lee, Seong-Ryong, Tsuji, K., Rebeck, G.W., Lo, E.H., 2003. Lipoprotein receptor-mediated induction of matrix metalloproteinase by tissue plasminogen activator. *Nat. Med.* 9, 1313–1317. <https://doi.org/10.1038/nm926>
- Wang, Y.F., Tsirka, S.E., Strickland, S., Stieg, P.E., Soriano, S.G., Lipton, S.A., 1998. Tissue plasminogen activator (tPA) increases neuronal damage after focal cerebral ischemia in wild-type and tPA-deficient mice. *Nat. Med.* 4, 228–231.
- Wardle, R.A., Poo, M., 2003. Brain-derived neurotrophic factor modulation of GABAergic synapses by postsynaptic regulation of chloride transport. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 23, 8722–8732.
- Weimar, W., Stibbe, J., van Seyen, A.J., Billiau, A., De Somer, P., Collen, D., 1981. Specific lysis of an iliofemoral thrombus by administration of extrinsic (tissue-type) plasminogen activator. *Lancet Lond. Engl.* 2, 1018–1020.
- Wong, I., Liao, H., Bai, X., Zaknic, A., Zhong, J., Guan, Y., Li, H.-Y., Wang, Y.-J., Zhou, X.-F., 2010. ProBDNF inhibits infiltration of ED1+ macrophages after spinal cord injury. *Brain. Behav. Immun.* 24, 585–597. <https://doi.org/10.1016/j.bbi.2010.01.001>
- Woo, N.H., Teng, H.K., Siao, C.-J., Chiaruttini, C., Pang, P.T., Milner, T.A., Hempstead, B.L., Lu, B., 2005. Activation of p75NTR by proBDNF facilitates hippocampal long-term depression. *Nat. Neurosci.* 8, 1069–1077. <https://doi.org/10.1038/nn1510>
- Wu, F., Echeverry, R., Wu, J., An, J., Haile, W.B., Cooper, D.S., Catano, M., Yepes, M., 2013. Tissue-type plasminogen activator protects neurons from excitotoxin-induced cell death via activation of the ERK1/2-CREB-ATF3 signaling pathway. *Mol. Cell. Neurosci.* 52, 9–19. <https://doi.org/10.1016/j.mcn.2012.10.001>
- Wu, F., Torre, E., Cuellar-Giraldo, D., Cheng, L., Yi, H., Bichler, E.K., García, P.S., Yepes, M., 2015. Tissue-type plasminogen activator triggers the synaptic vesicle cycle in cerebral cortical neurons. *J. Cereb. Blood Flow Metab. Off. J. Int. Soc. Cereb. Blood Flow Metab.* 35, 1966–1976. <https://doi.org/10.1038/jcbfm.2015.155>

- Wu, L.-G., Hamid, E., Shin, W., Chiang, H.-C., 2014. Exocytosis and endocytosis: modes, functions, and coupling mechanisms. *Annu. Rev. Physiol.* 76, 301–331. <https://doi.org/10.1146/annurev-physiol-021113-170305>
- Yamada, K., Mizuno, M., Nabeshima, T., 2002. Role for brain-derived neurotrophic factor in learning and memory. *Life Sci.* 70, 735–744.
- Yamamoto, C., Sugato, M., Fujiwara, Y., Kaji, T., 2005. Selective promotion of plasminogen activator inhibitor-1 secretion by activation of proteinase-activated receptor-1 in cultured human brain microvascular pericytes: comparison with endothelial cells. *Biol. Pharm. Bull.* 28, 208–211.
- Yamashiro, D.J., Tycko, B., Fluss, S.R., Maxfield, F.R., 1984. Segregation of transferrin to a mildly acidic (pH 6.5) para-Golgi compartment in the recycling pathway. *Cell* 37, 789–800.
- Yang, J., Harte-Hargrove, L.C., Siao, C.-J., Marinic, T., Clarke, R., Ma, Q., Jing, D., Lafrancois, J.J., Bath, K.G., Mark, W., Ballon, D., Lee, F.S., Scharfman, H.E., Hempstead, B.L., 2014. proBDNF negatively regulates neuronal remodeling, synaptic transmission, and synaptic plasticity in hippocampus. *Cell Rep.* 7, 796–806. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2014.03.040>
- Yang, J., Siao, C.-J., Nagappan, G., Marinic, T., Jing, D., McGrath, K., Chen, Z.-Y., Mark, W., Tessarollo, L., Lee, F.S., Lu, B., Hempstead, B.L., 2009. Neuronal release of proBDNF. *Nat. Neurosci.* 12, 113–115. <https://doi.org/10.1038/nn.2244>
- Yang-Feng, T.L., Opdenakker, G., Volckaert, G., Francke, U., 1986. Human tissue-type plasminogen activator gene located near chromosomal breakpoint in myeloproliferative disorder. *Am. J. Hum. Genet.* 39, 79–87.
- Ye, X., Mehlen, P., Rabizadeh, S., VanArsdale, T., Zhang, H., Shin, H., Wang, J.J., Leo, E., Zapata, J., Hauser, C.A., Reed, J.C., Bredesen, D.E., 1999. TRAF family proteins interact with the common neurotrophin receptor and modulate apoptosis induction. *J. Biol. Chem.* 274, 30202–30208.
- Yepes, M., Lawrence, D.A., 2004. Neuroserpin: a selective inhibitor of tissue-type plasminogen activator in the central nervous system. *Thromb. Haemost.* 91, 457–464. <https://doi.org/10.1160/TH03-12-0766>
- Yepes, M., Sandkvist, M., Moore, E.G., Bugge, T.H., Strickland, D.K., Lawrence, D.A., 2003. Tissue-type plasminogen activator induces opening of the blood-brain barrier via the LDL receptor-related protein. *J. Clin. Invest.* 112, 1533–1540. <https://doi.org/10.1172/JCI19212>
- Yepes, M., Wu, F., Torre, E., Cuellar-Giraldo, D., Jia, D., Cheng, L., 2016. Tissue-type plasminogen activator induces synaptic vesicle endocytosis in cerebral cortical neurons. *Neuroscience* 319, 69–78. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2016.01.046>
- Zafra, F., Hengerer, B., Leibrock, J., Thoenen, H., Lindholm, D., 1990. Activity dependent regulation of BDNF and NGF mRNAs in the rat hippocampus is mediated by non-NMDA glutamate receptors. *EMBO J.* 9, 3545–3550.
- Zakharenko, S.S., Patterson, S.L., Dragatsis, I., Zeitlin, S.O., Siegelbaum, S.A., Kandel, E.R., Morozov, A., 2003. Presynaptic BDNF required for a presynaptic but not postsynaptic component of LTP at hippocampal CA1-CA3 synapses. *Neuron* 39, 975–990.
- Zeniou-Meyer, M., Liu, Y., Béglé, A., Olanich, M.E., Olanish, M., Hanauer, A., Becherer, U., Rettig, J., Bader, M.-F., Vitale, N., 2008. The Coffin-Lowry syndrome-associated protein RSK2 is implicated in calcium-regulated exocytosis through the regulation of PLD1.

- Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 105, 8434–8439.
<https://doi.org/10.1073/pnas.0710676105>
- Zhang, C., An, J., Strickland, D.K., Yepes, M., 2009. The low-density lipoprotein receptor-related protein 1 mediates tissue-type plasminogen activator-induced microglial activation in the ischemic brain. *Am. J. Pathol.* 174, 586–594.
<https://doi.org/10.2353/ajpath.2009.080661>
- Zhang, L., Seiffert, D., Fowler, B.J., Jenkins, G.R., Thinnis, T.C., Loskutoff, D.J., Parmer, R.J., Miles, L.A., 2002. Plasminogen has a broad extrahepatic distribution. *Thromb. Haemost.* 87, 493–501.
- Zhang, R.L., Zhang, Z.G., Chopp, M., Zivin, J.A., 1999. Thrombolysis with tissue plasminogen activator alters adhesion molecule expression in the ischemic rat brain. *Stroke* 30, 624–629.
- Zhou, A., Carrell, R.W., Huntington, J.A., 2001. The serpin inhibitory mechanism is critically dependent on the length of the reactive center loop. *J. Biol. Chem.* 276, 27541–27547.
<https://doi.org/10.1074/jbc.M102594200>
- Zhou, X.-F., Song, X.-Y., Zhong, J.-H., Barati, S., Zhou, F.H.-H., Johnson, S.M., 2004. Distribution and localization of pro-brain-derived neurotrophic factor-like immunoreactivity in the peripheral and central nervous system of the adult rat. *J. Neurochem.* 91, 704–715.
<https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.2004.02775.x>
- Zhuo, M., Holtzman, D.M., Li, Y., Osaka, H., DeMaro, J., Jacquin, M., Bu, G., 2000. Role of tissue plasminogen activator receptor LRP in hippocampal long-term potentiation. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 20, 542–549.
- Zuccato, C., Marullo, M., Conforti, P., MacDonald, M.E., Tartari, M., Cattaneo, E., 2008. Systematic assessment of BDNF and its receptor levels in human cortices affected by Huntington's disease. *Brain Pathol. Zurich Switz.* 18, 225–238.
<https://doi.org/10.1111/j.1750-3639.2007.00111.x>

Résumé

L'activateur tissulaire du plasminogène est une sérine protéase initialement découverte dans le compartiment vasculaire et qui joue un rôle prépondérant dans le processus de fibrinolyse. De manière intéressante, le tPA est également présent dans le parenchyme cérébral, où il est notamment exprimé par les neurones. Le tPA est impliqué dans de nombreuses fonctions cérébrales dont la plasticité synaptique, les processus de mémoire et d'apprentissage ainsi que dans la survie et la mort neuronales. Le tPA est capable d'augmenter la signalisation calcique induite par une activation des récepteurs N-Méthyl-D-Aspartate (NMDAR) : un mécanisme à la base de la plasticité synaptique mais également de la mort neuronale excitotoxique. Cependant, il peut également activer les récepteurs du facteur de croissance épidermique (EGFR) pour induire un effet anti-apoptotique sur les neurones. Afin de mieux comprendre les différentes fonctions du tPA sur les neurones, nous nous sommes intéressés à la distribution et au trafic intracellulaire du tPA. Pour cela, nous avons créé un nouvel outil afin d'imager le tPA dans les neurones en temps réel: un plasmide codant pour une protéine fusion, le tPA-HaloTag®.

Premièrement, nos résultats montrent que le tPA est présent dans les axones et les dendrites des neurones corticaux matures en culture et qu'il est majoritairement présent dans le compartiment post-synaptique. Cette étude a également permis de voir que le tPA est stocké et libéré par des vésicules d'exocytose VAMP2, qu'il peut être endocyté par des vésicules Rab5, recyclé par des vésicules Rab11 et dégradé par des vésicules Rab7. Deuxièmement, nous avons montré que le tPA est présent dans les mêmes vésicules synaptiques que le facteur neurotrophique issu du cerveau (BDNF) : une neurotrophine importante pour le bon fonctionnement cérébral et dont la maturation dépend de l'activité protéolytique du tPA. Ce travail fournit une meilleure compréhension du rôle et de la distribution du tPA dans les neurones et ouvre de nouvelles voies de recherche dans l'implication de du tPA et du BDNF dans la survie neuronale.

Mots clés : tPA, BDNF, trafic, vésicules, neurones

Abstract

Tissue-type Plasminogen Activator (tPA) is a serine protease, firstly discovered for its fibrinolytic role in the vascular compartment. Interestingly, tPA is also present in the brain parenchyma, being notably expressed by neurons. tPA displays important roles in synaptic plasticity (Danny Baranes et al., 1998; Melchor and Strickland, 2006), learning, memory processes (R Madani et al., 1999; R Pawlak et al., 2002), neuronal survival and death. tPA is able to promote N-Methyl-D-Aspartate Receptors (NMDAR)-induced calcium influx, promoting synaptic plasticity or excitotoxic neuronal death. tPA is also able to activate Epidermal Growth Factor Receptors (EGFR), a mechanism mediating its anti-apoptotic effect. To better understand the different functions of tPA on neurons, we studied the pattern of distribution and trafficking of neuronal tPA. For that, we designed a new tool to image tPA in living neurons: a plasmid encoding for a tPA-HaloTag® fusion protein.

We first found that tPA is present in both axons and dendrites of mature cultured cortical neurons and preferentially at the post-synaptic part. Our results also showed that tPA is stored and released by VAMP2 exocytotic vesicles, and can be endocytosed by Rab5 vesicles, recycled by Rab11 vesicles and degraded by Rab7 vesicles. Furthermore, tPA is localized and sorted in the same vesicles than Brain-Derived Neurotrophic Factor (BDNF), one of the most important neurotrophins. Interestingly, BDNF maturation is dependent of tPA proteolytic activity. This work provides a better understanding of the role and distribution of tPA in living neurons and opens new avenues into the involvement of tPA and BDNF in neuronal survival.

Key words: tPA, BDNF, trafficking, vesicles, neurons