



HAL
open science

Les plexus choroïdes : une entrée au niveau cérébral pour l'activateur tissulaire du plasminogène (tPA)

Vincent Zuba

► **To cite this version:**

Vincent Zuba. Les plexus choroïdes: une entrée au niveau cérébral pour l'activateur tissulaire du plasminogène (tPA). Médecine humaine et pathologie. Normandie Université, 2019. Français. NNT : 2019NORMC410 . tel-02631569

HAL Id: tel-02631569

<https://theses.hal.science/tel-02631569>

Submitted on 27 May 2020

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 ASPECTS MOLECULAIRES ET CELLULAIRES DE LA BIOLOGIE

Préparée au sein de l'Université de Caen Normandie

Les plexus choroïdes : une entrée au niveau cérébral pour l'activateur tissulaire du plasminogène (tPA)

**Présentée et soutenue par
Vincent ZUBA**

**Thèse soutenue publiquement le 26/11/2019
devant le jury composé de**

M. VINCENT BEREZOWSKI	Professeur des universités, Université de Lille	Rapporteur du jury
M. JEAN-FRANÇOIS GHERSI-EGEA	Directeur de recherche, Centre Hospitalier Le Vinatier	Rapporteur du jury
Mme ROXANA CARARE	Professeur, Université de Southampton - UK	Membre du jury
Mme MONICA FERNANDEZ MONREAL	Ingénieur de recherche, UNIVERSITE BORDEAUX 2 UFR SC PHARM.	Membre du jury
M. DENIS VIVIEN	Professeur des universités PraticienHosp, Université Caen Normandie	Président du jury
Mme CARINE ALI	Professeur des universités, Université Caen Normandie	Directeur de thèse

Thèse dirigée par CARINE ALI, Physiopathologie et imagerie des troubles neurologiques



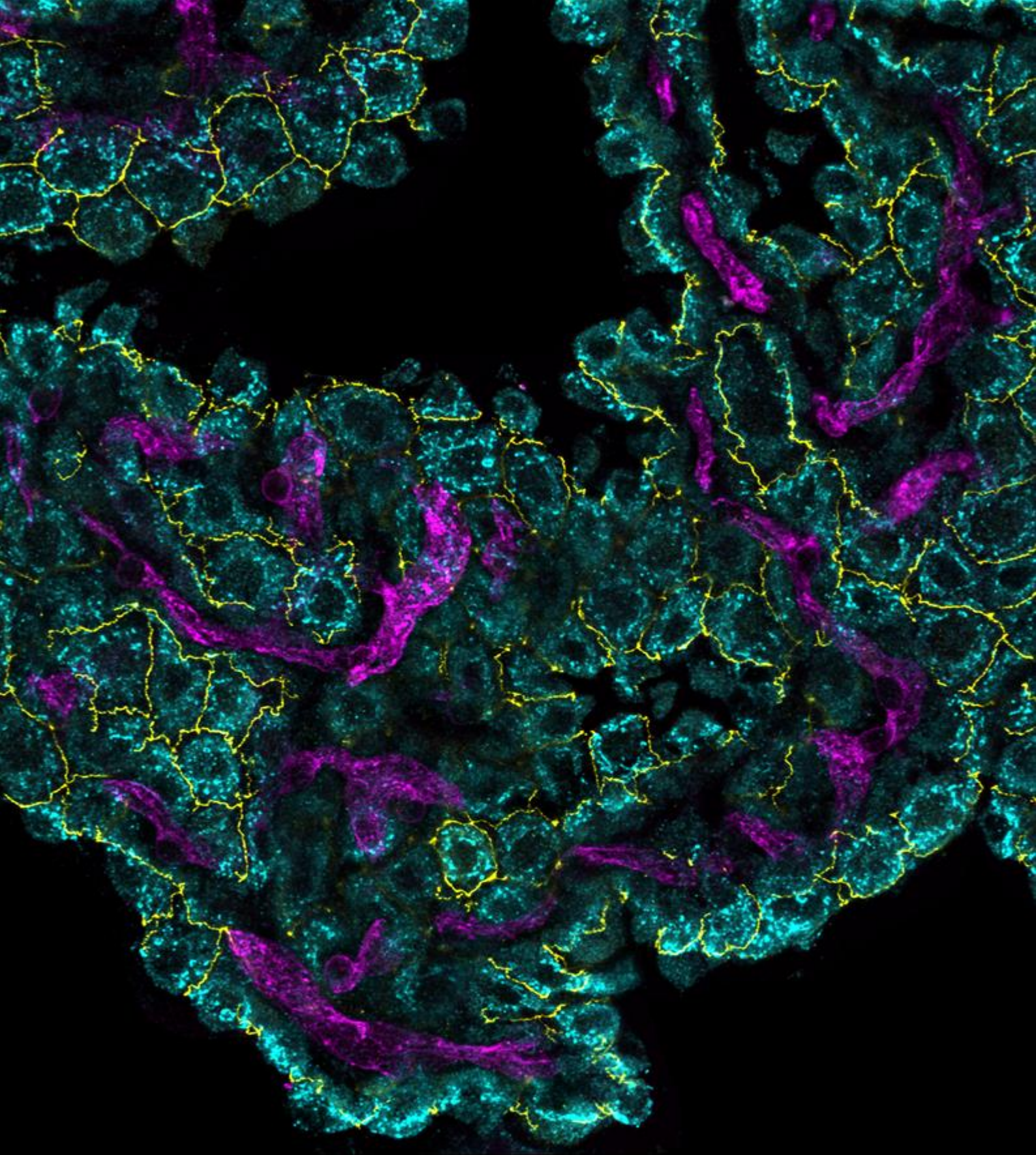
UNIVERSITÉ
CAEN
NORMANDIE



Normandie de Biologie Intégrative,
Santé, Environnement



La science pour la santé
From science to health



Choroid Plexus

(4th ventricle, mouse)

CPECs (TTR)

Junctions (Occludin)

Blood vessels (CD31)

Je remercie le Professeur Denis Vivien de m'avoir accueilli au sein de son unité et également pour l'excellent environnement matériel dans lequel il nous permet d'évoluer au quotidien.

Merci à toi Carine de m'avoir donné ma chance en master 1 puis de m'avoir suivi jusqu'ici. Ça n'a pas été facile tous les jours mais tu as toujours été là, jusqu'au bout et surtout au bout, merci.

Je tiens également à remercier le Docteur Jean-François Gherzi-Egea et le Professeur Vincent Berezowski d'avoir accepté et d'avoir pris le temps d'évaluer ce manuscrit. Je remercie également le Docteur Mónica Fernández Monreal d'avoir accepté d'être présente dans mon jury de thèse. I would also like to thank the Professor Roxana O. Carare for accepting the invitation to be a member of the jury.

Merci aux copains de promo/galère (les Douceaux, Knacki, Brodi et Bébou), déjà 5 ans qu'on passe ensemble, ça aurait été bien différent sans vous.

Merci aux copains/collègues des années passées et aux nouveaux.

Enfin merci à mes parents de m'avoir donné les moyens d'arriver jusqu'ici.

Sommaire

INTRODUCTION	1
I. Les Accidents Vasculaires Cérébraux	3
1. AVC hémorragique	3
2. AVC ischémique	4
3. Facteurs de risques	4
a. Facteurs modifiables	5
b. Facteurs non modifiables	5
4. Physiopathologie de l'AVC ischémique	6
a. Atteinte vasculaire	6
b. Altération de la barrière-hémato-encéphalique	7
c. Atteinte du parenchyme	8
i. Carence énergétique et excitotoxicité	8
ii. Inflammation	9
iii. Apoptose	9
5. Traitement de l'AVC ischémique	10
a. La phase aigüe	10
b. Prévention secondaire	10
c. Rééducation et réadaptation	11
II. L'Activateur tissulaire du Plasminogène (tPA)	13
1. Structure moléculaire	13
2. Expression du tPA	16
a. Expression du tPA dans le compartiment vasculaire	16
b. Expression du tPA en périphérie	17
c. Expression du tPA dans le système nerveux central	17
i. Dans les neurones :	18
ii. Dans les astrocytes :	18
iii. Dans les oligodendrocytes :	19
iv. Dans la microglie :	19
3. Inhibiteurs du tPA	19
4. Fonctions du tPA	20
a. Dans le compartiment vasculaire	20
i. La fibrinolyse	20
ii. Sur la BHE.	21
iii. tPA et couplage neurovasculaire	23
b. Dans le parenchyme cérébral	24
i. tPA et développement cérébral	24
ii. tPA et substance blanche	25
iii. tPA et modulation glutamatergique	26
iv. tPA et plasticité synaptique	27

Sommaire

v. tPA et processus cognitifs	29
vi. tPA et excitotoxicité	29
vii. tPA et apoptose	30
viii. tPA et inflammation	31
III. Les Plexus Choroïdes.	34
1. Structure des plexus choroïdes	35
a. Anatomie	35
b. Développement	37
c. Histologie	39
d. Vascolarisation	40
2. Fonctions	41
a. Production du Liquide CérébroSpinal (LCS)	41
i. Échanges entre le LCS et les fluides du parenchyme	42
b. Sécrétion	46
3. Plexus choroïdes et pathologies.	47
a. Papillome choroïdien et hydrocéphalie	47
b. Sclérose En Plaques (SEP)	47
c. Cas de l'accident vasculaire cérébral	48
i. Effets sur la morphologie	48
ii. Une porte d'entrée pour des cellules immunitaires suite à un AVC	49
OBJECTIFS	53
MATERIELS ET METHODES	57
I. Étude du passage du tPA dans les plexus choroïdes	59
1. Production de tPA et de BSA fluorescents, pour un traçage <i>in vivo</i> et <i>in vitro</i>	59
2. Étude du passage du tPA <i>in vivo</i>	60
a. Injection de tPA ⁵⁵⁵ et BSA ⁴⁸⁸ par voie intraveineuse (IV)	60
b. Prélèvement intracisternal de LCS	60
c. Prélèvement et conservation des organes	60
d. Immunohistochimie	61
e. Dosage du tPA dans le LCS	61
i. Électrophorèse	61
ii. Spectrofluor	62
iii. Zymographie	62
3. Étude du passage du tPA <i>in vitro</i>	63
a. Culture primaire de CPECs	63
b. Évaluation de l'internalisation du tPA par les CPECs	64
c. Étude des mécanismes moléculaires de l'internalisation	65
i. Évaluation de l'effet de la température	65

Sommaire

ii. Évaluation de l'implication des récepteurs LRPs	65
Transfection des CPECs pour traitement avec tPA	68
iii. Évaluation de la contribution du domaine Finger du tPA à l'internalisation	68
4. Étude de l'impact d'une ischémie focale sur le passage du tPA dans les PCs	70
II. Étude de l'effet du tPA endogène sur les PCs	71
1. Étude en imagerie par résonance magnétique	71
2. Étude par immunohistologie	72
III. Analyses statistiques.	72
RESULTATS	73
I. Étude du passage du tPA exogène par les plexus choroïdes	75
1. <i>In vivo</i> , le tPA exogène rejoint le LCS <i>via</i> les plexus choroïdes	75
2. Étude de l'internalisation du tPA <i>in vitro</i>	78
a. Mise en place des outils	78
b. Étude des mécanismes de l'internalisation.	81
3. Étude <i>in vivo</i> de l'impact d'une ischémie focale sur le passage de tPA à travers les PCs	90
II. Étude de l'effet du tPA endogène sur les plexus choroïdes	93
1. Étude en imagerie par résonance magnétique	93
2. Étude par immunohistologie	95
DISCUSSION	99
CONCLUSION	111
BIBLIOGRAPHIE	115

Index des figures et tableaux

Index des figures

Figure 1: Distribution of stroke subtypes.	4
Figure 2: Contribution of modifiable risks factors to stroke.	5
Figure 3: Evolution of the ischemic core and the penumbra.	7
Figure 4: Structure and functional domains of tPA	15
Figure 5: Hepatic clearance of tPA.....	16
Figure 6: Different cell types expressing tPA in the CNS.	18
Figure 7: Mechanism of endogenous fibrinolysis.....	21
Figure 8: Effects of tPA on the Blood Brain Barrier (BBB).....	23
Figure 9: Increase in tPA mRNA levels following neuronal activation in Rats.....	28
Figure 10: Demonstration of the existence of barriers around the SNC by Ehrlich and Goldmann.....	34
Figure 11: Representation of the ventricular apparatus.	36
Figure 12: Choroid plexuses extracted from an 8 weeks old mouse.....	37
Figure 13: Morphological stages of the developing choroidal epithelium.....	38
Figure 14: Electron microscopy microphotograph of a Kolmer cell in contact with CPECs	40
Figure 15: Three-dimensional representation of the vascular network of a large choroid plexus villus.).....	41
Figure 16: The glymphatic pathway.....	44
Figure 17: Pathway of CSF influx into the brain and drainage of CSF/IF from the brain along periarterial basement membranes.	45
Figure 18: Choroid plexuses are an entry route for T cells after stroke.....	51
Figure 19: Primary cultured CPECs share common characteristics with CPECs <i>in situ</i>	64
Figure 20: Determination of the most efficient Stealth RNAi™ for RNA extinction..	67
Figure 21: Distribution of mice groups for evaluation of the effect of focal ischemia on tPA distribution in CPs.....	70
Figure 22: Dose-dependant fluorescent signal of tPA ⁵⁵⁵ (magenta) and BSA ⁴⁸⁸ (green) on SDS-PAGE.....	75
Figure 23: tPA is found in CPs after its intravenous injection.	76

Index des figures et tableaux

Figure 24: BSA and tPA reach the brain parenchyma in areas devoid of barrier.....	77
Figure 25: Kinetics of tPA and BSA internalization in the epithelium of CPs.....	77
Figure 26: Western-Blot for tPA levels in CSF.....	78
Figure 27: Choroid plexus epithelial cells (CPECs) uptake tPA <i>in vitro</i> in a time-dependent manner..	79
Figure 28: Time-dependent uptake of tPA in cultured Choroid plexus epithelial cells (CPECs).....	79
Figure 29: Dose-dependent uptake of tPA in cultured Choroid plexus epithelial cells (CPECs).....	80
Figure 30: Choroid plexus epithelial cells (CPECs) uptake tPA <i>in vitro</i> is dose-dependent.	81
Figure 31: Internalization of tPA by choroid plexus epithelial cells (CPECs) is an active process.	82
Figure 32: Internalization of tPA by choroid plexus epithelial cells (CPECs) is dependent on a member of the LRP family	83
Figure 33: CPECs express LRP1 <i>in vivo</i> ..	84
Figure 34: CPECs express LRP1 <i>in vitro</i>	84
Figure 35: Silencing of the LRP1 receptor in CPECs	85
Figure 36: Internalization of tPA by choroid plexus epithelial cells (CPECs) is not mediated by LRP1.....	86
Figure 37: Silencing of LRP2 in CPECs.	87
Figure 38: Internalization of tPA by choroid plexus epithelial cells (CPECs) is not mediated by LRP2.....	87
Figure 39: Co-silencing of LRP1 and LRP2 does not influence the internalization of tPA in the CPECs.....	88
Figure 40: Characterization of Δ F-tPA and F-BSA.	89
Figure 41: Internalization of tPA by choroid plexus epithelial cells (CPECs) is mediated by its Finger domain.	89
Figure 42: Adjunction of the finger domain of tPA to albumin allows its internalization into the CPECs.	90
Figure 43: Experimental design.	91

Index des figures et tableaux

Figure 44: Quantification of fluorescence in the CPECs after thromboembolic stroke.....	92
Figure 45: Brain volume in Null WT and Null tPA mice.	93
Figure 46: Ventricles volume comparison between Null WT and Null tPA mice.	94
Figure 47: Diffusion coefficient of gadolinium in Null WT and Null tPA mice.	95
Figure 48: CPECs surface in Null WT and Null tPA mice..	96
Figure 49: Comparison of AQP1 expression in Null WT and Null tPA mice.....	97
Figure 50: Comparison of Iba1 positive cells in Null WT and Null tPA mice.....	97
Figure 51: Comparison of CD3 positive cells in Null WT and Null tPA mice.	98
Figure 52: tPA crosses the intact BBB.	102
Figure 53: Modalities of injections into the CSF	103
Figure 54: After intracisternal injection some tPA is found around and in the brain.	103
Figure 55: Intracellular tPA decreases over time in the monolayer of CPECs after 120 minutes of loading.....	105
Figure 56: High-resolution ultrafast Doppler imaging of the rat brain vasculature	107
Figure 57: Differences in morphology and diffusion between WT and tPA KO mice.	109

Index des Tableaux

Table 1: CSF composition	42
Table 2: Sequences of the siRNA duplexes	66
Table 3: Séquences des amorces sens et antisens utilisées pour les gènes d'intérêt et le gène de référence sélectionnés.	67

Abréviations

ACM : Artère Cérébrale Moyenne
ADAMTS : A Disintegrin And Metalloproteinase with Thrombospondin Motifs
ADN : Acide DésoxyriboNucléique
ADNc : AND complémentaires
AMPA : Acide α -Amino-3-hydroxy-5-Méthylisozol-4-Propionate
AQP1 : Aquaporine 1
Ara-C : Cytosine Arabinoside
ARNm : Acides RiboNucléiques messagers
AVC : Accident Vasculaire Cérébral
BHE : Barrière-Hémato-Encéphalique
BrDU : BromoDésoxyUridine
BSA : Bovine Serum Albumin
BSLCS : Barrière Sang - Liquide CérébroSpinal
CCL20 : Chemokine (C-C motif) Ligand 20
CCR6 : C-C Chemokine Receptor type 6
CPECs : Choroid Plexus Epithelial Cells
CSPGs : Chondroïtine Sulfate ProteoGlycanes
Ct : Cycle threshold
DISC : Death-Inducing Signaling Complex
DMEM : Dulbecco's Modified Essential Media
DSC : Débit Sanguin Cérébral
EAE : Encéphalomyélite Autoimmune Expérimentale
EGF : Epidermal Growth Factor
EGFR : Epidermal Growth Factor Receptor
FADD : Fas-Associated protein with Death Domain
FAIR-RARE : Flow Alternating Inversion Recovery - Rapid Imaging with Refocused Echoes
Fas-L : Fibroblast Associated Ligand
FGF2 : Fibroblast Growth Factor 2
FRT : Flippase Recognition Target
fUS : fonctionnal UltraSound
GBD : Global Burden of Diseases, Injuries, and Risk Factors Study
Gd-DTPA : Acide Gadolinium-Diéthylène Triamine Pentacétate
GFP : Green Fluorescent Protein
HBSS : Hank's Balanced Salt Solution
HGF : Hepatocyte Growth Factor
HLA-DR : Human Leucocyte Antigen-DR isotype
HSA : Hémorragie Sous-Arachnoïdienne
ICAM-1 : InterCellular Adhesion Molecule 1
IGF II : Insulin-like Growth Factor II
IMC : Indice de Masse Corporelle
IRM : Imagerie par Résonance Magnétique
IV : IntraVeineuse
JNK : c-Jun N-terminal kinase
KO : Knock-Out

Abréviations

LBS : Lysine Binding Site
LCS : Liquide CérébroSpinal
LRP : Low density lipoprotein Receptor-related Protein
LT : Lymphocyte T
LTP : Long Term Potentiation
MadCAM-1 : Mucosal vascular addressin Cell Adhesion Molecule 1
MAPK : Mitogen-Activated Protein Kinase
MEC : Matrice ExtraCellulaire
MMPs : MétalloProtéinases Matricielles
NMDAR : N-Methyl D-Aspartate Receptor
NOSi : Oxyde Nitrique Synthase inductible
PAI-1 : Plasminogen Activator Inhibitor type 1
PBS : Phosphate Buffer Saline
PCs : Plexus Choroïdes
PDGF-CC : Platelet Derived Growth Factor-CC
PDGFR- α : Platelet-Derived Growth Factor Receptor α
PI3K : Phosphatidyl Inositol-3-Kinase
PLAT : Plasminogen Activator Tissue type
RAP : Receptor Associated Protein
RCL : Reactive Center Loop
RT-PCR : Reverse Transcriptase Polymerase-Chain Reaction
sc-tPA : single-chain tPA
SDS-PAGE : Sodium Dodecyl Sulfate–PolyAcrylamide Gel Electrophoresis
SEP : Sclérose En Plaques
Shh : Sonic hedgehog
siRNA : silencing RiboNucleic Acid
SMCs : Cellules Musculaires Lisses
SMT_r : Stimulation Magnétique Transcrânienne répétée
SNC : Système Nerveux Central
T2HR : T2 Haute Résolution
TA : Temps d'Acquisition
tc-tPA : two-chain tPA
TE : Temps d'Echo
Th17 : Lymphocyte T helper
TNT : Tris-NaCl-Tween Buffer
TOAST : Trial of ORG 10172 in Acute Stroke Treatment
tPA : Activateur tissulaire du Plasminogène
TTR : TransThyRétine
TUNEL : Terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP Nick End Labeling
uPA : Urokinase-type Plasminogen Activator
VCAM-1 : Vascular Cell Adhesion Molecule-1
VEGF : Vascular Endothelial Growth Factor
WT : Wild-Type

Introduction

I. Les Accidents Vasculaires Cérébraux

L'accident vasculaire cérébral (AVC) est, selon l'Organisation Mondiale de la Santé, « l'apparition brutale de troubles focaux (ou globaux en cas de coma) du fonctionnement cérébral, sans cause apparente autre que l'origine vasculaire ». C'est une cause majeure de mortalité et de handicap acquis chez l'adulte. En effet, le « Global Burden of Diseases, Injuries, and Risk Factors Study » (GBD) rapporte qu'en 2016, 13,7 millions de personnes dans le monde ont été victimes d'un AVC, dont 5,5 millions ont succombé (2,6 millions de femmes et 2,9 millions d'hommes). En outre, l'espérance de vie en bonne santé a été réduite d'environ 5 années pour 116,4 millions de patients (Hong *et al.*, 2010). En France, on recense un peu plus de 130 000 nouveaux cas par an, presque 40 000 décès, et plus d'un demi-million de personnes ont une espérance de vie en bonne santé réduite (Johnson *et al.*, 2019).

Le terme AVC regroupe en fait une constellation de pathologies, divisées en deux catégories : les AVC ischémiques et les AVC hémorragiques. Chaque catégorie peut être subdivisée en sous-catégories, selon la cause et/ou la localisation de sa survenue (**Figure 1**).

1. AVC hémorragique

C'est la forme la moins fréquente d'AVC (15,6% des AVC), mais la plus mortelle, puisqu'elle est à l'origine d'un peu plus de 50% des décès post-AVC (2,8 millions) (Johnson *et al.*, 2019). L'AVC hémorragique se caractérise par un saignement dans la boîte crânienne, qui selon la localisation, permet de définir deux groupes :

- S'il a lieu au sein du parenchyme, on parle d'hémorragie intracérébrale (qui peut s'accompagner d'un déversement intra-ventriculaire). Ces hémorragies intraparenchymateuses peuvent résulter de la rupture de petits vaisseaux fragilisés par une hypertension artérielle chronique, une consommation chronique excessive d'alcool, une angiopathie amyloïde, un anévrisme, une malformation artério-veineuse ou encore des troubles de la coagulation (Feldmann *et al.*, 2005; Morotti and Goldstein, 2016; Smith and Eichler, 2006).

- Si l'épanchement de sang se produit dans les méninges, on parle d'hémorragie sous-arachnoïdienne (HSA) ou méningée. Dans 75% des cas, elle est consécutive à la rupture d'un anévrisme, dans 20% des cas il n'y a pas de cause identifiable, les 5% restant sont dus à une

variété de troubles rares tels que des malformations artérioveineuses, des dissections artérielles, des vascularites ou bien des tumeurs (Al-Shahi *et al.*, 2006).

2. AVC ischémique

En 2016, 84,4% des AVC étaient ischémiques et engendraient 2,7 millions de décès (Johnson *et al.*, 2019). Ce type d'AVC est la conséquence de l'obstruction d'un vaisseau cérébral et peut être subdivisé en cinq catégories selon la classification établie pour l'essai clinique TOAST (*Trial of ORG 10172 in Acute Stroke Treatment*) (Adams *et al.*, 1993, **Figure 1**).

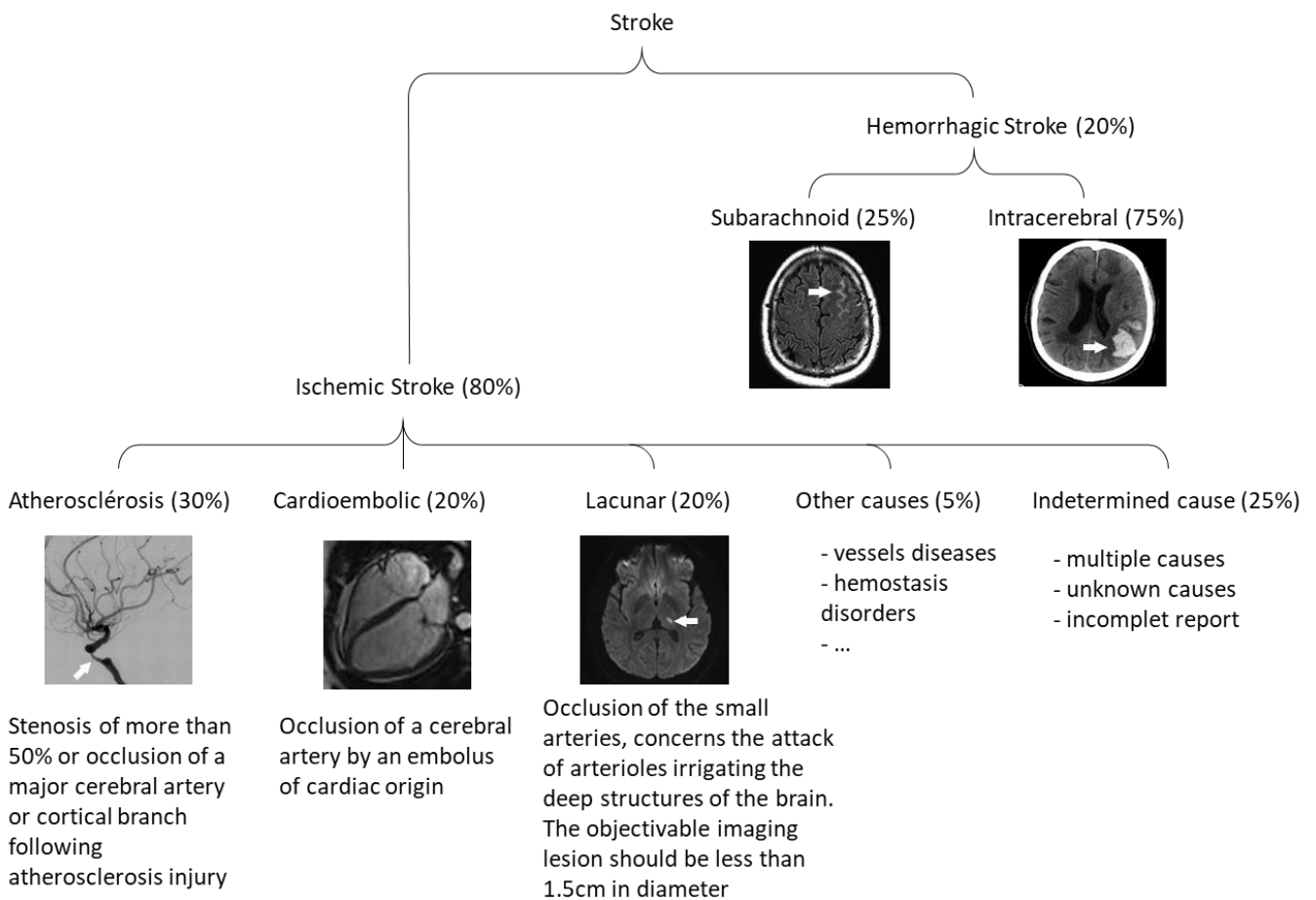


Figure 1: Distribution of stroke subtypes (from Collège des Enseignants de Neurologie, <https://www.cen-neurologie.fr/deuxieme-cycle%20/accidents-vasculaires-cerebraux> and Adams *et al.*, 1993).

3. Facteurs de risques

L'incidence des AVC varie en fonction de nombreux facteurs tels que l'âge, le mode de vie, ou encore l'ethnie (Johnson *et al.*, 2019).

a. Facteurs modifiables

D’après les groupes de travail INTERSTROKE et GBD, neuf AVC sur dix sont la résultante de facteurs de risque modifiables (Feigin *et al.*, 2016; O’Donnell *et al.*, 2016). Ces études ont analysé, pour la première, des données collectées entre 2007 et 2015 dans 32 pays, et pour la deuxième des données collectées entre 1990 et 2013 dans 188 pays. Elles ont mis en lumière trois familles de facteurs modifiables (**Figure 2**) : les facteurs comportementaux (tabagisme, mauvaise alimentation, consommation excessive d’alcool et activité physique limitée), les facteurs environnementaux (pollution et exposition au plomb) et les facteurs métaboliques (diabète, cholestérol, hypertension artérielle, haut indice de masse corporelle (IMC) et insuffisance rénale). Cinq facteurs de risque majeurs ont été mis en avant : l’hypertension artérielle, l’obésité, l’hyperglycémie, l’hyperlipidémie et une dysfonction rénale. Même si une partie de ces facteurs peut avoir une part génétique, il est évident que leur prise en charge, parfois par des mesures simples, pourrait réduire considérablement le risque d’occurrence ou de récurrence d’un AVC.

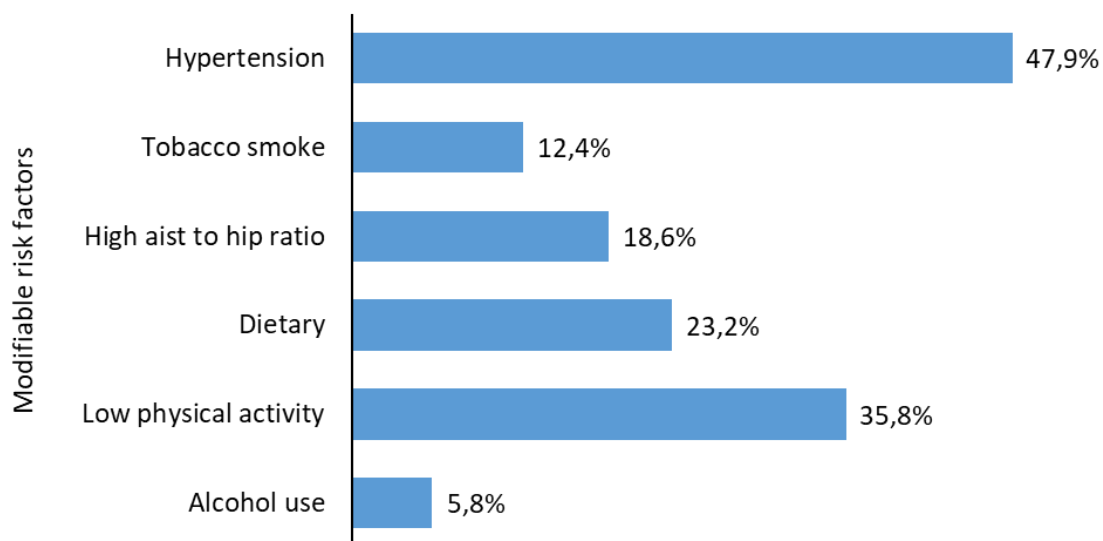


Figure 2: Contribution of modifiable risks factors to stroke (adapted from Feigin *et al.*, 2016).

b. Facteurs non modifiables

Le vieillissement est le facteur majeur et inéluctable. Au-delà de 55 ans les cas d’AVC sont multipliés par deux tous les 10 ans (Boehme *et al.*, 2017).

Les hommes de moins de 85 ans sont plus victimes d’AVC que les femmes, mais celles-ci repassent devant au-delà des 85 ans (Johnson *et al.*, 2019).

L'ethnicité joue aussi un rôle dans la survenue d'AVC. En effet, aux Etats-Unis, le nombre d'AVC est plus important chez les afro-américains (3,5%) comparativement aux caucasiens (2,5%), aux hispaniques (2,1%) et aux asiatiques (1,4%) (Benjamin *et al.*, 2019). En outre, l'incidence des AVC est plus grande en Chine qu'en Europe ou aux États-Unis (Johnson *et al.*, 2019).

On peut également attribuer des causes génétiques à la survenue de certains AVC. L'année dernière, une méta-analyse portant sur un demi-million d'individus a permis d'associer 32 régions génomiques au risque d'AVC (contre une dizaine de *loci* identifiés auparavant). De manière intéressante, et somme toute plutôt logique, plus de la moitié des gènes impliqués dans le risque d'AVC sont aussi impliqués dans des pathologies vasculaires (comme PITX₂, impliqué dans les fibrillations atriales, EDNRA, associé à un épaissement de l'*intima* carotidienne ou encore ILF₃, associé à des risques thromboemboliques veineux, un haut taux de lipides circulant et des maladies des artères coronaires) (Malik *et al.*, 2018).

4. Physiopathologie de l'AVC ischémique

a. Atteinte vasculaire

L'occlusion d'une artère cérébrale peut avoir une origine locale (thrombus, principalement constitué de plaquettes) ou périphérique (embole, riche en fibrine et pauvre en plaquettes). Le caillot en formation ou en migration entraîne une diminution de la lumière artérielle voire son obstruction, ayant pour conséquence une diminution du débit sanguin cérébral (DSC). Chez l'adulte sain, le DSC normal est estimé à 50 mL/min/100g. L'ischémie cérébrale se constitue quand le DSC passe sous le seuil fonctionnel des 22 mL/min/100g ; les neurones sont capables de tenir quelques heures malgré la réduction de 50% du DSC. Quand le DSC descend sous le seuil membranaire à 10 mL/min/100g, les perturbations métaboliques sont telles que les neurones ne survivent que quelques minutes. L'infarctus cérébral est alors constitué (Chen *et al.*, 2019; Dirnagl *et al.*, 1999).

La réduction du DSC n'est pas identique partout dans le territoire de l'occlusion artérielle. La région centrale, qui n'est pas perfusée par des branches collatérales, va subir la plus grande diminution du DSC. Cette zone sera la plus touchée par l'ischémie et les cellules de cette région mourront les premières et de façon précoce : cette zone est définie comme le cœur ou foyer ischémique. *A contrario*, la région périphérique qui elle est perfusée par des collatérales aura une altération du DSC moins importante. Dans cette zone, on peut distinguer deux régions : la pénombre ischémique, directement en pourtour du cœur ischémique, où le

DSC résiduel permet aux cellules de survivre, mais qui mourront sans un retour du DSC à la normale, et enfin une zone d'oligémie où une légère diminution du DSC n'affecte pas le métabolisme cellulaire (J. Astrup *et al.*, 1981a) (**Figure 3**).

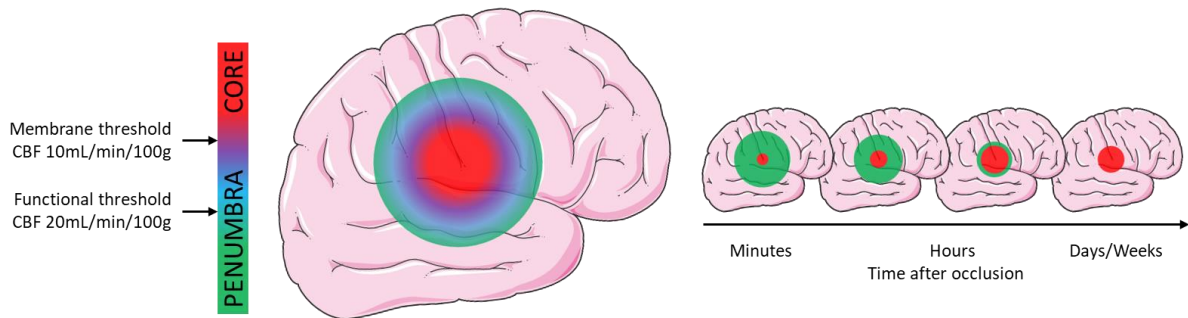


Figure 3: Evolution of the ischemic core and the penumbra. Below the membrane threshold (threshold necessary to maintain ion exchanges across the membrane) neurons are no longer able to maintain their homeostasis and die. At the functional threshold (required for transcription and translation) cells lose their functions. These thresholds determine the ischemic core and ischemic penumbra. Between both thresholds neurons remain viable and able to recover their excitability functions and neurotransmission provided CBF is restored. (adapted from Astrup *et al.*, 1981 et Dirnagl *et al.*, 1999)

b. Altération de la barrière-hémato-encéphalique

Brièvement, la barrière-hémato-encéphalique (BHE) est une barrière filtrante à l'interface entre le compartiment sanguin et le parenchyme cérébral. Cette barrière est composée de plusieurs types cellulaires, à savoir de cellules endothéliales, de péricytes, d'astrocytes et de neurones.

La perméabilisation de la BHE lors des AVC est la conséquence de l'action des métalloprotéinases matricielles (MMPs) qui dégradent d'une part les jonctions serrées entre les cellules endothéliales et d'autre part la lame basale. Cette perméabilisation apparaît à distance de la reperfusion, et serait en fait biphasique. La première phase, qui commence après quelques heures, est réversible et transitoire et serait due à une augmentation de MMP-2. La seconde phase, plus importante, apparaît dans les 24-48h. Cette phase se caractérise par une infiltration leucocytaire et une activation des MMP-3 et MMP-9 par des cytokines pro-inflammatoires (TNF, IL-1 β , etc) qui mènent à une rupture irréversible de la BHE et donc à des dommages tissulaires (pour revue : Berezowski *et al.*, 2012).

La perméabilisation de la BHE entraîne une entrée d'eau au niveau du parenchyme cérébral et crée un œdème vasogénique (Rosenberg and Yang, 2008). Cet œdème augmente

les risques de transformation hémorragique et de ce fait, pourrait contribuer à aggraver l'état des patients (Hornig *et al.*, 1993).

c. Atteinte du parenchyme

i. Carence énergétique et excitotoxicité

Le cerveau nécessite un apport constant d'oxygène et de glucose pour maintenir ses gradients ioniques. Les pompes Na^+/K^+ -ATPases sont les consommatrices majeures d'énergie dans le cerveau afin de maintenir une grande concentration intracellulaire en potassium, et une faible concentration intracellulaire en sodium. Cependant, en cas d'ischémie, les réserves d'ATP ne peuvent assurer la fonction neuronale que pendant une à trois minutes, aboutissant ainsi à une sortie massive de potassium vers l'espace extracellulaire et une entrée de sodium dans la cellule. En découle une perturbation des pompes Ca^{2+} -ATPases qui permettent le maintien d'une faible concentration de calcium dans le compartiment intracellulaire. La résultante de ces perturbations ioniques est une entrée d'eau dans la cellule, due un phénomène osmotique, entraînant ainsi l'apparition d'un œdème. Ces déséquilibres aboutissent à la mort d'une première population de neurones au niveau du cœur ischémique par des mécanismes considérés comme non régulables (Doyle *et al.*, 2008).

Les neurones morts vont déverser leur contenu cytosolique dans leur environnement extracellulaire, notamment des neurotransmetteurs dont le glutamate, qui est excitateur. La disponibilité importante du glutamate va entraîner l'activation des récepteurs ionotropiques Kainate et AMPA (Acide α -Amino-3-hydroxy-5-Méthylisozol-4-Propionate), menant à une entrée massive d'ions Na^+ dans les neurones post-synaptiques. Le sodium intracytosolique entraîne la dépolarisation neuronale, qui permet la levée du blocage des récepteurs NMDA (N-Methyl D-Aspartate Receptor) par le magnésium. La suractivation des NMDAR provoque une entrée trop importante de calcium dans le neurone, à l'origine d'une dépolarisation et d'une perméabilisation de la membrane mitochondriale. Divers radicaux libres oxygénés sont ainsi générés en parallèle de la libération de substances cytotoxiques telles que le cytochrome-c.

Cette composante excitotoxique est un processus déclencheur et exécuteur de la mort cellulaire suite à l'ischémie cérébrale : ils induisent non seulement une mort cellulaire rapide de type nécrotique, mais ils amorcent aussi certaines voies de signalisation inflammatoires et/ou apoptotiques (Doyle *et al.*, 2008).

ii. Inflammation

L'inflammation, se caractérise par l'activation puis la prolifération de cellules gliales et par l'infiltration de la zone ischémisée par les leucocytes circulants (neutrophiles, monocytes, puis lymphocytes). Au niveau moléculaire, l'inflammation s'accompagne de la synthèse de médiateurs aux effets tantôt bénéfiques, tantôt délétères sur la survie cellulaire (Macrez, *et al.*, 2011). Ainsi, suite à l'ischémie cérébrale, la microglie va être activée et produire des cytokines et chemokines en grande quantité, déclenchant la synthèse de molécules d'adhésion à la surface des cellules endothéliales. Celles-ci étant à l'interface entre le sang et le parenchyme cérébral, vont jouer un rôle majeur dans le recrutement et l'infiltration des cellules immunitaires circulantes (Wimmer *et al.*, 2018). Les cellules endothéliales sont également une source de médiateurs de l'inflammation (cytokines, radicaux libres) (Amantea *et al.*, 2009). Il en va de même pour les leucocytes infiltrés et les cellules microgliales qui synthétisent et sécrètent, entre autres, des MMPs, l'oxyde nitrique synthase inductible (NOSi), des médiateurs pro-inflammatoires (TNF), ICAM-1 (*InterCellular Adhesion Molecule 1*) ou encore l'interleukine 6 (IL-6).

iii. Apoptose

L'apoptose est un phénomène de mort cellulaire qui interviendrait plus tardivement dans le cadre des AVC et préférentiellement dans la zone de pénombre ischémique où l'énergie est encore suffisante pour rentrer en mort cellulaire programmée. Il existe deux voies d'activation de l'apoptose, la voie intrinsèque et la voie extrinsèque, toutes deux sont activées dans l'ischémie cérébrale. Pour la voie intrinsèque c'est donc un signal intracellulaire qui est en jeu à savoir une augmentation de calcium. Comme évoqué dans le paragraphe « Carence énergétique et excitotoxicité » l'augmentation de calcium intracellulaire va entraîner la libération de cytochrome c dans le cytoplasme. Le cytochrome c va alors se lier au facteur d'activation de la procaspase-9 qui se retrouvera activée en caspase-9 qui à son tour activera la caspase-3. La caspase-3 va alors activer des endonucléases et fragmenter l'ADN. Les dommages à l'ADN vont entraîner l'activation de p53 qui est aussi un facteur pro-apoptotique. Pour ce qui est de la voie extrinsèque les signaux proviennent de l'environnement extracellulaire tels que le *Fibroblast Associated Ligand* (Fas-L) qui est le ligand lie à son récepteur Fas-R. La formation de ce complexe aboutit au recrutement de la protéine *Fas-Associated protein with Death Domain* (FADD) et interagit alors avec la procaspase-8. Le

complexe ainsi formé, Fas-L–Fas-R–FADD–procaspase-8, dénommé *Death-Inducing Signaling Complex* (DISC), permet l'activation de la caspase-8 et sa libération dans le cytoplasme où elle initiera l'activation de la caspase-3. Les mêmes mécanismes que ceux de la voie intrinsèque sont alors mis en œuvre (Radak *et al.*, 2017).

5. Traitement de l'AVC ischémique

a. La phase aigüe

Lors de la survenue d'un AVC ischémique, l'urgence est de rétablir une circulation rapide afin de réduire au maximum la souffrance tissulaire et ainsi l'étendue des dommages irréversibles.

Aujourd'hui, le seul traitement pharmacologique approuvé est le r-tPA (forme recombinante de l'activateur tissulaire du plasminogène) (NINDS, 1995). Le r-tPA injecté par voie intraveineuse active le plasminogène en plasmine permettant ainsi la dégradation du caillot (la fibrinolyse par le tPA sera détaillée dans le chapitre suivant). Cependant ce traitement pharmacologique présente deux principales limites : un risque de transformation hémorragique élevé et une fenêtre thérapeutique relativement réduite (NINDS, 1995), passée de trois heures en 1995 à 4h30 aujourd'hui (European Cooperative Acute Stroke Study III Hacke *et al.*, 2008).

Le r-tPA n'est pas la seule arme disponible pour traiter l'AVC ischémique. En effet, depuis l'essai clinique MR CLEAN en 2015, l'approche mécanique que l'on appelle thrombectomie a révolutionné la prise en charge des patients. Cette méthode consiste à retirer le caillot *in situ* à l'aide d'un stent déployable qui permet d'extraire le caillot. Il a été montré, lors de l'essai clinique DAWN, que cette méthode de recanalisation est plus efficace que la thrombolyse (Nogueira *et al.*, 2017) mais elle se limite aux artères de gros calibre.

b. Prévention secondaire

Cette prévention varie selon l'étiologie de l'AVC. Comme pour la prévention primaire, elle peut être pharmacologique (prescription d'antihypertenseurs, d'hypocholestérolémiants, d'antidiabétiques, d'antiagrégants plaquettaires, anticoagulants), comportementale (régime alimentaire, activité physique, sevrage tabagique, réduction de la consommation d'alcool ...), et/ou chirurgicale (endarterectomie des sténoses carotidiennes supérieures à 70%).

c. Rééducation et réadaptation

L'AVC étant la première cause de handicap moteur et la deuxième de démence il est nécessaire de mettre en place des stratégies de rééducation et réadaptation afin que l'impact des séquelles soit réduit au minimum.

La rééducation motrice est mise en place pour prévenir, ou traiter, les comorbidités liées à l'AVC (alitement/immobilité, troubles thromboemboliques par exemple), la mobilité des membres et du tronc pour réduire les déficits moteurs et la spasticité. Pour travailler la station debout et l'équilibre, la marche, les membres supérieurs et la fonction de préhension, tout cela dans le but d'arriver à une indépendance dans les fonctions de la vie quotidienne.

Sur le plan cognitif il s'agit de rééduquer la mémoire et d'apporter des stratégies compensatoires (agendas, aides visuelles, etc...), améliorer les fonctions exécutives (raisonnement, attention). Pour les patients atteints d'aphasie une rééducation intensive est préconisée pour améliorer la communication, qu'elle soit écrite ou orale.

Pour traiter ces déficits post-AVC, il existe d'autres moyens que des séances de kinésithérapie, d'orthophonie ou encore d'orthoptie. Par exemple, la stimulation magnétique transcrânienne répétée (SMTr) permet d'agir de manière non-invasive sur les états d'excitation du cortex cérébral. Des stimulations dites à haute fréquence, de l'ordre de 5Hz, permettraient de réactiver les zones hypoactives de l'hémisphère lésé. En parallèle, des stimulations dites à basse fréquence, 1Hz, sur l'hémisphère sain désinhibé permettraient d'y restaurer les processus inhibiteurs (Dionísio *et al.*, 2018).

À ces outils conventionnels il est possible d'ajouter l'utilisation d'outil digitaux (« serious games ») couplés ou non à la réalité virtuelle. Yavuzer et collaborateurs montrent une amélioration de la mobilité des membres supérieurs suite à un entraînement avec une Playstation® couplée à un Eyetoy, comparativement au groupe qui n'était que spectateur, (Yavuzer *et al.*, 2008). Des études montrent que la réhabilitation par le jeu permet d'améliorer l'équilibre (Cho *et al.*, 2012; Noveletto *et al.*, 2018).

Pour résumer, les AVC ont coûté la vie à 5,5 millions de personnes en 2016 (deuxième cause de décès), et de nombreux survivants gardent des séquelles de leur AVC (première cause de handicap acquis chez l'adulte).

Même si la thrombectomie a récemment révolutionné la prise en charge des patients, la thrombolyse pharmacologique par le rtPA à la phase aigüe reste une option de choix pour les AVC ischémiques.

Cependant, le tPA est bien plus qu'un agent pro-fibrinolytique. Nous montrerons dans la partie suivante comment cette protéase (exogène et endogène) contribue à de nombreuses fonctions et dysfonctions du système nerveux central, qu'il est important de connaître notamment pour optimiser la prise en charge des patients.

II. L'Activateur tissulaire du Plasminogène (tPA)

En 1952, Astrup et Stage isolent à partir de cœur de porc une molécule capable d'activer le plasminogène, alors nommée fibrikinase (T. Astrup and Stage, 1952). C'est presque trente ans plus tard que la fibrikinase fut purifiée, initialement dans la circulation sanguine (Binder *et al.*, 1979), puis dans l'utérus (Rijken *et al.*, 1979). En 1979, pour obtenir 1mg de fibrikinase il fallait 5 kg d'utérus ; cependant grâce aux travaux conjoints de Désiré Collen et Dingeman Rijken, la fibrikinase fut purifiée à partir de surnageants de cellules de mélanome humain permettant ainsi sa caractérisation. Cet activateur fut par la suite rebaptisé « activateur tissulaire du plasminogène » (Rijken and Collen, 1981).

L'activateur tissulaire du plasminogène (tPA) est essentiellement décrit comme étant d'origine endothéliale et contrôlant la fibrinolyse vasculaire. En effet le tPA est capable de cliver le plasminogène en plasmine, qui dégrade les caillots de fibrine. De ce fait, le tPA recombinant est utilisé en pratique clinique pour reperfusion des vaisseaux sanguins, faisant de lui le seul traitement pharmacologique de la phase aiguë des AVC ischémiques mais aussi dans les infarctus du myocarde (GUSTO, 1993) ou certaines embolies pulmonaires (Meyer *et al.*, 2014). Le tPA est également exprimé par plusieurs types cellulaires du système nerveux central, où et il intervient dans divers processus, notamment au niveau synaptique et au cours du développement, à la fois en conditions physiologiques et pathologiques.

1. Structure moléculaire

Le tPA est une glycoprotéine de la famille des sérines protéases. Il est codé par le gène *Plasminogen Activator Tissue type* (PLAT) situé sur le bras court du chromosome 8 (Yang-Feng *et al.*, 1986).

Il 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 tertiaire lui est conférée par 17 ponts disulfures. Le tPA est composé de deux chaînes, une chaîne lourde et une chaîne légère, sur lesquelles sont répartis cinq domaines structurels et fonctionnels, lui permettant d'interagir avec diverses protéines. La chaîne lourde, amino-terminale, est constituée des 4 domaines suivants (**Figure 4**) :

- le domaine **Finger** (par analogie au premier domaine Finger de la fibronectine) qui permet par exemple 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 à faible densité (*Low density lipoprotein Receptor-related Protein*, LRP) ainsi qu'à l'annexine II (Bu *et al.*, 1992; Hajjar *et al.*, 1994).

- un domaine homologue à l'**EGF** (*Epidermal Growth Factor*) donnant au tPA la capacité d'activer les récepteurs aux facteurs de croissance épidermique (*Epidermal Growth Factor Receptor*, EGFR) (Correa *et al.*, 2011; Hurtado *et al.*, 2007).

- le domaine **Kringle 1** contenant un site ayant une forte affinité pour la lysine (*Lysine Binding Site*, LBS) composé de deux acides aminés aromatiques (tryptophane²⁴² et tryptophane²⁵³) formant une poche dans la structure tertiaire. Le rôle du kringle 1 est encore méconnu, cependant il pourrait être impliqué dans la clairance du tPA par le foie *via* la glycosylation sur l'asparagine¹⁷⁷ (Kuiper *et al.*, 1988).

- le domaine **Kringle 2** qui contient un site LBS actif permettant au tPA de se lier et d'activer divers substrats et/ou récepteurs tels que le plasminogène, la sous-unité GluN1 des NMDAR ainsi que le facteur de croissance dérivé des plaquettes (*Platelet Derived Growth Factor-CC*, PDGF-CC) (Fredriksson *et al.*, 2004; López-Atalaya *et al.*, 2008).

La chaîne légère du tPA est, pour sa part, composée d'un seul domaine :

- le domaine **Sérine protéase** (domaine catalytique) conférant son activité protéolytique au tPA lui permet de convertir le plasminogène en plasmine grâce au trio catalytique formé par les acides aminés histidine³²², acide aspartique³⁷¹ et sérine⁴⁷⁸ (Pennica *et al.*, 1983).

Les sérines protéases sont synthétisées sous une forme simple chaîne zymogène, sans activité enzymatique, et ce n'est qu'après leur conversion en forme double chaîne qu'elles deviennent actives. Le tPA est une sérine protéase particulière puisqu'il est actif sous ses deux formes, tPA simple chaîne (sc-tPA) et sa forme double chaîne (tc-tPA) (Hoylaerts *et al.*, 1982; Rijken *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 à celle du sc-tPA (Petersen *et al.*, 1988; Wallén *et al.*, 1982).

Introduction – L'Activateur tissulaire du Plasminogène

La conversion du sc-tPA en tc-tPA résulte de de l'hydrolyse de la liaison peptidique située en position carboxy-terminale de la liaison arginine²⁷⁵-isoleucine²⁷⁶. Cette hydrolyse a lieu sous l'action de différentes protéases telles que la plasmine ou les kallikréines (Ichinose *et al.*, 1984; Wallén *et al.*, 1982). C'est le pont disulfure entre les cystéine²⁹⁹ et cystéine⁴³⁰ qui permet la liaison des deux chaînes entre-elles ainsi que la création d'un pont salin entre l'arginine³⁰² et l'acide glutamique⁴⁴⁵ (Lamba *et al.*, 1996).

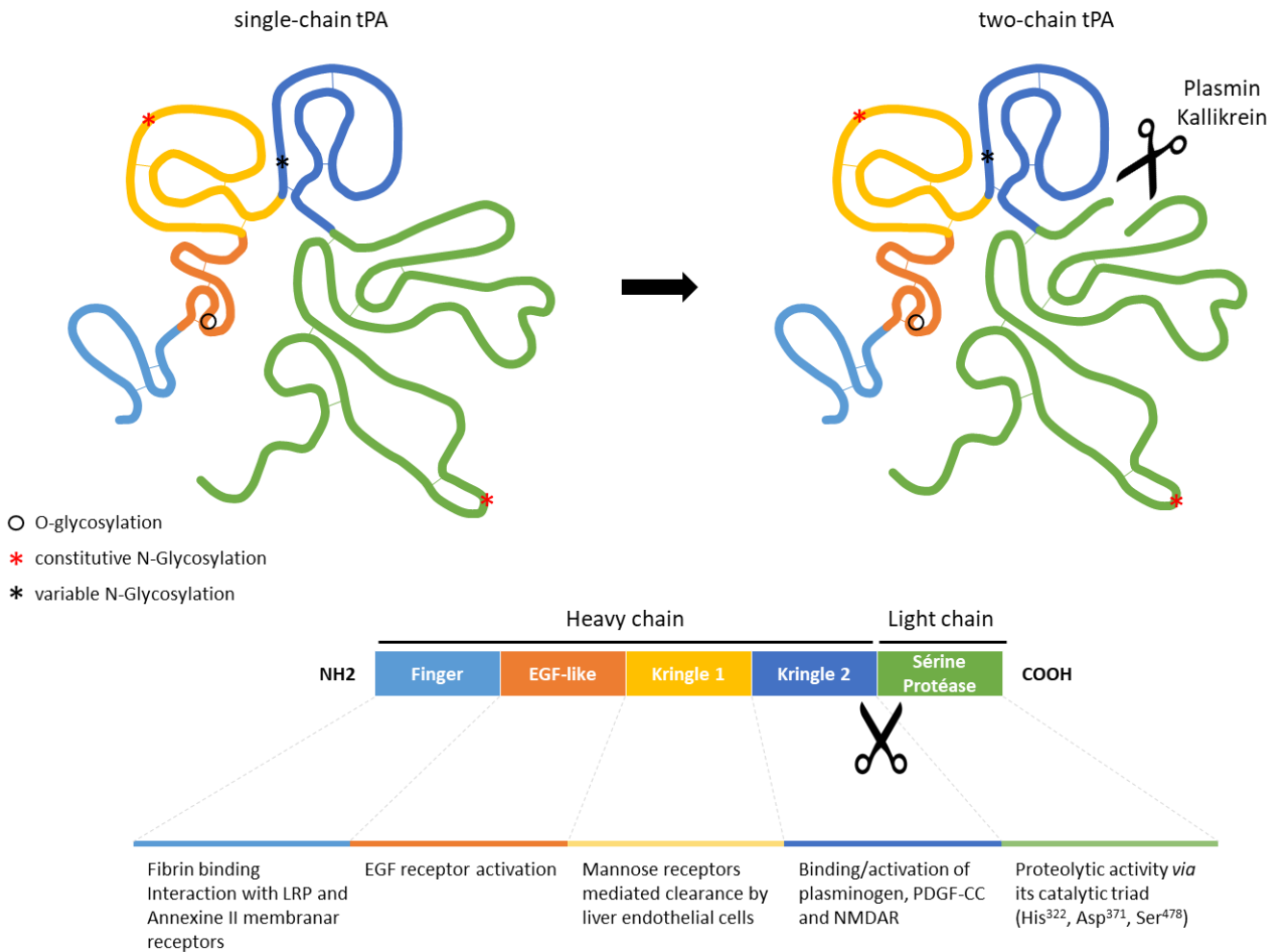


Figure 4: Structure and functional domains of tPA. Schematic representation of tPA in its single-chain (sc-tPA) and two-chain (tc-tPA) forms highlighting the five domains (Finger, EGF-like, kringle1, kringle2 and serine protease), the 17 disulfide bonds, the glycosylations as well as the cleavage site by proteases such as plasmin and kallikreins (adapted from Chevilly *et al.*, 2015 and Hébert *et al.*, 2016).

2. Expression du tPA

a. Expression du tPA dans le compartiment vasculaire

C'est dans le compartiment vasculaire que l'on retrouve la plupart du tPA. Il serait essentiellement synthétisé par les hépatocytes (Riehle *et al.*, 2014; Zhang *et al.*, 1999; Zheng *et al.*, 2019) sous sa forme simple chaîne à une concentration d'environ 70 pM (Rijken and Lijnen, 2009). L'endothélium est une seconde source de tPA vasculaire. Dans les cellules endothéliales, le tPA est stocké dans les corps de Weibel-Palade et sa libération peut avoir lieu selon deux modalités : soit de façon constitutive soit en réponse à un stimulus (Knipe *et al.*, 2010). Cette deuxième modalité est cruciale afin d'empêcher la formation de thrombi occlusifs (Osterlund *et al.*, 2002).

Le tPA circulant a une demi-vie assez courte d'environ six minutes (Verstraete *et al.*, 1985). Le foie est le contributeur majeur de la clairance du tPA grâce à un système de recapture très efficace, par les hépatocytes et par les cellules endothéliales hépatiques (Kuiper *et al.*, 1988). Plusieurs récepteurs sont impliqués dans cette recapture : les récepteurs de la famille des LRP (Orth *et al.*, 1994), les récepteurs au mannose (Biessen *et al.*, 1997) et la voie dépendante des galectines (Nagaoka *et al.*, 2002) (**Figure 5**). De surcroît, la liaison du tPA avec son inhibiteur sanguin principal, l'inhibiteur de l'activateur du plasminogène de type 1 (*Plasminogen Activator Inhibitor type 1*, PAI-1), augmente sa clairance (Chandler *et al.*, 1997).

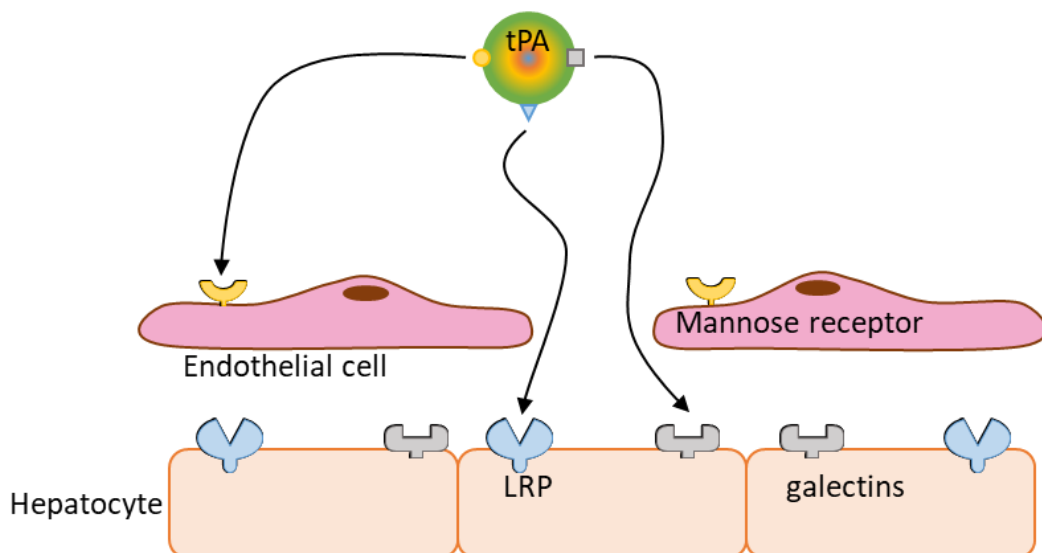


Figure 5: Hepatic clearance of tPA. tPA can be recaptured by three pathways: a mannose receptor-dependent pathway at the hepatic endothelial cell surface, a LRP-dependent pathway, and a galectin receptor-dependent pathway; the latter two being at the hepatocytes level (adapted from Nagaoka *et al.*, 2002).

b. Expression du tPA en périphérie

Comme évoqué dans la section précédente, l'expression du tPA a historiquement été mise en évidence dans le cœur puis isolé à partir du sang. Depuis, la présence d'une activité du tPA a été rapportée dans de nombreux organes tels que : l'utérus, la prostate, la thyroïde, les reins et les muscles (Albrechtsen, 1957). Au sein de ces différents tissus, le tPA, grâce à son activité protéolytique lui permettant de dégrader les tissus conjonctifs, est souvent associé à une modification de la vascularisation et à un remodelage des tissus (Griffiths and Electricwala, 2005).

c. Expression du tPA dans le système nerveux central

Le tPA est également présent au sein du système nerveux central (SNC) où il est exprimé et sécrété par plusieurs types cellulaires. C'est en 1981 qu'il a été mis en évidence pour la première fois dans le parenchyme cérébral (Soreq and Miskin, 1981). Soreq et Miskin lui prédisaient alors d'autres rôles qu'une unique implication dans la fibrinolyse vasculaire. En 1993, Sappino et collaborateurs, caractérisent pour la première fois, chez la souris, la présence de 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 (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 (dont nous reparlerons dans la section qui leur est dédiée), des différents noyaux thalamiques, du tronc cérébral mais aussi au niveau de l'hypophyse et de la moelle épinière (Teesalu *et al.*, 2004). Des travaux menés au laboratoire, chez le rongeur, ont permis d'identifier plus précisément les régions corticales qui expriment le tPA, parmi lesquelles, on retrouve le cortex rétrosplénial, somatosensoriel primaire, périrhinal et piriforme, avec un peu plus de 10% de neurones exprimant du tPA (Louessard *et al.*, 2016).

Au niveau cellulaire, le tPA est exprimé par certains neurones, les oligodendrocytes ou encore les épendymocytes (Louessard *et al.*, 2016). L'expression du tPA par les astrocytes, la microglie et les péricytes reste discutée (Qian *et al.*, 2016; Tsirka *et al.*, 1995; Yamamoto *et al.*, 2005) (**Figure 6**).

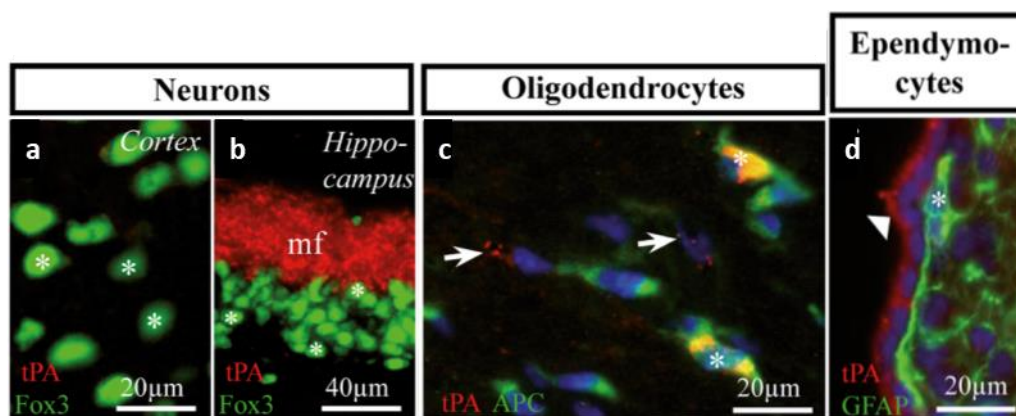


Figure 6: Different cell types expressing tPA in the CNS. Immunohistochemistry on brain sections of mice following colchicine injection (a neuronal transport inhibitor). tPA (in red) is present in neurons (a and b), oligodendrocytes (c), and in the ependymocytes (d) (adapted from Louessard *et al.*, 2016).

i. Dans les neurones :

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

Le tPA est stocké dans des vésicules au niveau présynaptique (Parmer *et al.*, 1997; Fernández-Monreal *et al.*, 2004) puis est transporté dans des vésicules de sécrétion le long des neurites : ce transport peut s'effectuer dans les deux sens. À la synapse, le tPA est capable de moduler positivement l'entrée de calcium à travers les NMDAR post-synaptiques. En plus de son action sur les NMDAR synaptique, le tPA affecte la dynamique des NMDAR extrasynaptiques, cette interaction est responsable entre autre de l'excitotoxicité mentionnée dans le chapitre précédent (Lesept *et al.*, 2016).

ii. Dans les astrocytes :

Une fois à la synapse, le tPA peut être endocyté par les astrocytes via les récepteurs LRP. Les astrocytes peuvent alors libérer ce tPA par un mécanisme dépendant de la voie de signalisation de la protéine kinase C suite à l'activation de récepteurs kaïnate membranaires. Ce recyclage du tPA synaptique pourrait être à l'origine de la clairance du tPA au sein du SNC (Cassé *et al.*, 2012).

iii. Dans les oligodendrocytes :

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

iv. Dans la microglie :

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

3. Inhibiteurs du tPA

Quelques travaux ont montré qu'il y avait une différence entre les niveaux d'expression et d'activité du tPA au sein d'une même structure, laissant supposer la présence d'inhibiteur(s) du tPA au sein du parenchyme cérébral (Sappino *et al.*, 1993). Ces inhibiteurs sont membres de la famille des serpinines (*SERine Proteinase INhibitor*). Les serpinines sont des protéines d'environ 50kDa. Elles sont constituées de trois feuillets β et de huit ou neuf hélices α formant le « *core domain* » de la protéine. Elles ont également un domaine « *reactive center loop* » (RCL) qui leur permet d'interagir avec leurs cibles, les protéases. Le clivage du RCL par la protéase entraîne la formation d'une liaison covalente entre elle et la serpinine, inhibant ainsi son activité (Silverman *et al.*, 2001).

À ce jour, quatre serpinines ont été décrites pour inhiber le tPA : PAI-1, PAI-2, la neuroserpinine et la protéase nexine-1 (Sprengers and Kluft, 1987). Dans le parenchyme cérébral, le tPA est principalement inhibé par PAI-1 et la neuroserpinine (Miranda and Lomas, 2006; Osterwalder *et al.*, 1996). La neuroserpinine est exprimée de manière physiologique et en grande quantité par les neurones et les astrocytes, de son côté PAI-1 ne peut être exprimé que par les astrocytes activés suite à certains stress (Docagne *et al.*, 1999; Hino *et al.*, 2001). La protéine nexine-1 est sécrétée par les cellules gliales et les neurones. Elle est capable d'inhiber à la fois les activateurs du plasminogène et la plasminine (Mansuy *et al.*, 1993). Dans le compartiment vasculaire, PAI-1 est le principal inhibiteur du tPA (Miranda and Lomas,

2006). Le rôle de PAI-2, majoritairement intracellulaire, est encore méconnu, mais on lui a décrit des rôles dans la grossesse, la réponse à une infection virale ou encore certains cancers (Medcalf and Stasinopoulos, 2005).

4. Fonctions du tPA

a. Dans le compartiment vasculaire

i. La fibrinolyse

De la même manière qu'il existe la coagulation qui, suite à une brèche vasculaire, entraîne la formation d'un caillot sanguin pour stopper une hémorragie : il existe la fibrinolyse. L'équilibre et la régulation de ces deux mécanismes est primordial pour le maintien de l'homéostasie vasculaire.

La fibrinolyse est un mécanisme enzymatique permettant la dégradation des caillots de fibrine qui se forment dans la circulation suite à une rupture de l'endothélium. La plasmine est l'actrice principale de la fibrinolyse et elle est capable de dégrader les chaînes de fibrine permettant ainsi la recanalisation des vaisseaux. La plasmine est une sérine protéase hépatique synthétisée sous la forme d'une pro-enzyme inactive, le plasminogène (Collen and Lijnen, 1991).

Chez l'humain, deux activateurs du plasminogène ont été décrits : le tPA et l'activateur du plasminogène de type urokinase (Urokinase-type Plasminogen Activator, uPA) (Blasi *et al.*, 1987). Bien que différentes, ces protéases sont toutes deux capables de cliver le plasminogène inactif en sa forme active la plasmine. Comme détaillé plus haut, le tPA est synthétisé et sécrété constitutivement, ou en réponse à des stimuli, par les cellules endothéliales. Seul, le tPA n'est pas un bon activateur du plasminogène, alors qu'en présence de fibrine, sa capacité à activer le plasminogène est multipliée par cent (Hoylaerts *et al.*, 1982). L'interaction entre le tPA et le plasminogène est facilitée par le fait que leurs domaines respectifs de liaison à la fibrine sont proches. La liaison du tPA avec la fibrine et le plasminogène entraîne la conversion en plasmine. Grâce à ce mécanisme, le tPA n'active le plasminogène qu'au niveau du caillot de fibrine (Medved and Nieuwenhuizen, 2003). L'activation locale du plasminogène par le tPA permet à la plasmine de jouer son rôle fibrinolytique, cette dernière étant très rapidement inhibée par l' α 2-antiplasmine (Holmes *et al.*, 1987).

La découverte du système d'activation du plasminogène, a ouvert de nombreuses perspectives thérapeutiques dans le traitement de pathologies vasculaires (thromboses veineuses profondes, infarctus cérébraux ou du myocarde) et a donc entraîné plusieurs études précliniques dans ce sens. Les résultats de ces études ont mis en lumière l'inefficacité de l'injection intraveineuse de plasmine pour lyser les caillots sanguins car celle-ci est rapidement inhibée dans le sang (Boyles *et al.*, 1960).

La fibrinolyse est régulée à deux niveaux pour éviter, d'une part une hyperfibrinolyse qui augmente le risque d'hémorragique et d'autre part une altération de la BHE (Marcos-Contreras *et al.*, 2016). Le premier niveau agit directement sur la plasmine ; en effet comme évoqué auparavant, elle peut être inhibée par l' α -2-antiplasmin (Holmes *et al.*, 1987). Le deuxième niveau de régulation, en amont de la plasmine, consiste en l'inactivation du tPA par PAI-1 (Figure 7).

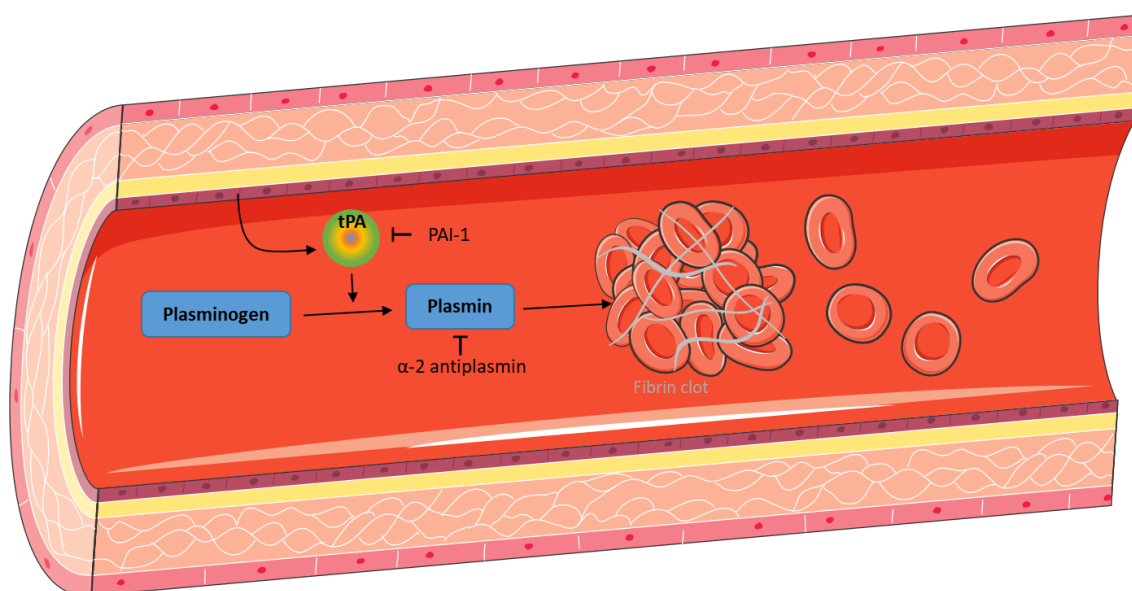


Figure 7: Mechanism of endogenous fibrinolysis. tPA is secreted by endothelial cells into the bloodstream where it can activate circulating plasminogen into plasmin near a fibrin clot. Plasmin is then able to degrade the fibrin, and thus to lyse the clot. There are two levels of regulation for fibrinolysis either by direct inhibition of plasmin (α 2-antiplasmin) or by tPA inhibition (PAI-1).

ii. Sur la BHE.

Il a été démontré qu'après injection intraveineuse, le tPA exogène injecté est retrouvé au niveau du parenchyme cérébral (Benchenane *et al.*, 2005; Wang Y. *et al.*, 1998). Une des explications serait que le tPA passe du compartiment sanguin au compartiment

cérébral au travers de la BHE, mais les mécanismes de ce passage restent discutés : passif à travers une BHE perméabilisée et/ou actif, à travers des mécanismes de transport.

Le tPA est capable d'induire la perméabilisation de la BHE (Yepes *et al.*, 2003) et par conséquent d'augmenter le risque de survenue d'hémorragies cérébrales (NINDS, 1997). Il a été montré que l'injection intra-cérébro-ventriculaire de tPA menait à une perméabilisation de la BHE, et que cette perméabilisation était bloquée par l'inhibition des récepteurs LRP (Yepes *et al.*, 2003). Il a été montré plus tard au laboratoire par Benchenane et collaborateurs que le tPA, suite à une injection par voie intraveineuse, est capable de traverser la BHE en conditions physiologiques et ce de manière indépendante du domaine protéolytique via les récepteurs LRP (Benchenane *et al.*, 2005). Suite à l'induction d'un AVC ischémique l'expression des récepteurs LRP augmente (après 6h et 24h) du côté ipsilatéral (Suzuki *et al.*, 2009) et cette hausse d'expression pourrait expliquer l'augmentation du risque hémorragique. L'interaction du tPA avec les récepteurs LRP pourrait induire un détachement des pieds astrocytaires augmentant de ce fait la perméabilité de la BHE (Polavarapu *et al.*, 2007).

En outre via ses domaines sérine protéase et kringle 2, le tPA est capable d'activer le PDGF-CC, ce qui active les récepteurs α du facteur de croissance plaquettaire (*Platelet-Derived Growth Factor Receptor α* , PDGFR- α) situés sur les astrocytes et péricytes. L'activité induite par le tPA sur ces récepteurs entraîne elle aussi une perméabilisation de la BHE, augmentant ainsi les effets pro-hémorragiques (Su *et al.*, 2008). Comme indiqué dans la partie sur la physiopathologie de l'AVC ischémique, le tPA serait également impliqué dans la dégradation de la BHE via l'activation de MMPs, notamment MMP-9 mais aussi MMP-2 et 3. Les MMPs activées participent à la dégradation de la matrice extracellulaire, fragilisent les jonctions serrées et altèrent la lame basale des vaisseaux cérébraux (Suzuki *et al.*, 2009; X. Wang *et al.*, 2003). De plus, deux études ont montré que chez des animaux déficients en MMP-9 (Asahi *et al.*, 2000) ou en MMP-3 (Suzuki *et al.*, 2007), la BHE n'était pas altérée après thrombolyse avec tPA.

Une autre hypothèse quant à la perméabilisation de la BHE serait un clivage des récepteurs LRPs par le tPA. En effet, Polavarapu et collaborateurs ont mis en évidence, que le clivage du domaine extracellulaire des récepteurs LRPs entraîne le détachement des pieds astrocytaires au niveau de la BHE engendrant des œdèmes périvasculaires. De manière intéressante ils ont aussi observé que le tPA induisait le clivage de LRP *in vitro* en conditions

non ischémiques. Ce constat suggère que le tPA est nécessaire et suffisant pour induire le clivage du domaine extracellulaire des récepteurs LRP (Polavarapu *et al.*, 2007, **Figure 8**)

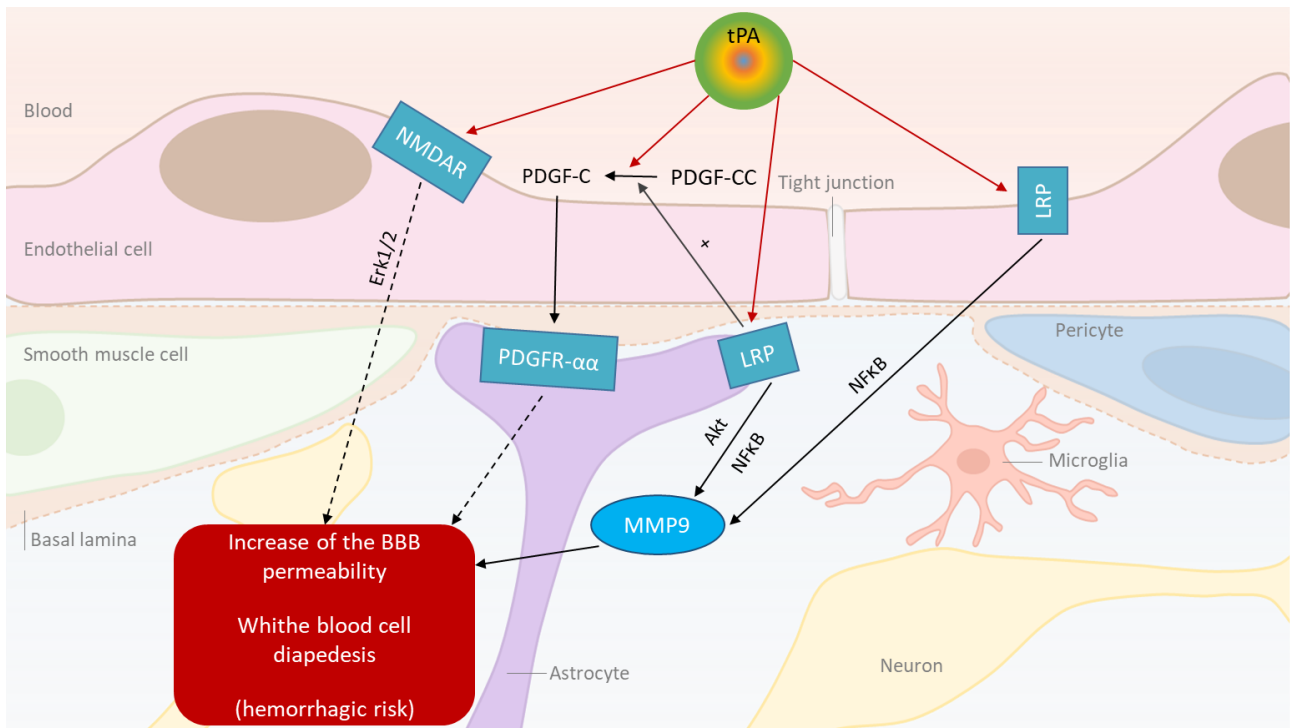


Figure 8: Effects of tPA on the Blood Brain Barrier (BBB). The BBB consists in endothelial cells, interconnected by tight junctions, anchored to a basal lamina, smooth muscle cells, pericytes and astrocytic endfeet enclosing the basal lamina. tPA interacts with astrocytic and endothelial LRP receptors resulting in increased production of MMP9. Metalloproteinase causes alteration to the BBB. In addition, activation of PDGF-CC by tPA contributes to the detachment of astrocytic endfeet from the basal lamina via an interaction with PDGFR- α receptors. This activation is facilitated by the interaction of tPA with LRP on the surface of astrocytes (adapted from Abbott *et al.*, 2006; Mehra *et al.*, 2016).

iii. tPA et couplage neurovasculaire

Le couplage neurovasculaire permet d'augmenter le DSC de manière locale en fonction de l'activité d'une région donnée. Les acteurs de ce couplage sont les neurones, les vaisseaux sanguins mais aussi les astrocytes. Cette triade en association avec les péricytes et les cellules musculaires lisses (SMCs) forment l'unité neurovasculaire (Woolsey *et al.*, 1996).

Comme nous l'avons vu le tPA interagit avec les NMDAR et il n'est donc pas anodin de retrouver des études sur le rôle du tPA dans le tonus vasculaire cérébral et le couplage neurovasculaire. Plusieurs études se sont concentrées sur l'effet du tPA sur le tonus vasculaire dans le cadre de l'ischémie cérébrale. Ainsi, il a été montré que lors d'une ischémie cérébrale chez le rat, l'injection de tPA dans la circulation sanguine diminue la réactivité vasculaire, ce

qui pourrait contribuer aux effets délétères de la reperfusion post-ischémie (Cipolla *et al.*, 2000). De même, Armstead et collaborateurs ont publié plusieurs études rapportant une altération de l'autorégulation causée par le tPA après une ischémie ou un traumatisme cérébral. Ils décrivent cette altération comme potentialisée par le tPA, et dépendante de son interaction avec les NMDAR. Le tPA interagirait avec les NMDAR des cellules endothéliales et activerait les voies *Mitogen-Activated Protein Kinase* (MAPK, *c-Jun N-terminal kinase* (JNK) et ERK), conduisant à une dérégulation des canaux potassiques impliqués dans la dilatation des vaisseaux. A l'inverse, le tPA pourrait également interagir avec les récepteurs LRP et activer la voie MAPK p38, prévenant alors l'altération de l'autorégulation après l'ischémie (Armstead *et al.*, 2016).

Finalement la démonstration la plus claire de la modulation du couplage neurovasculaire par le tPA a été apportée par l'équipe de Iadecola. En effet ils ont mis en évidence une diminution de la réponse hémodynamique lors de la stimulation des vibrisses chez des souris tPA *knock-out* (KO) en comparaison à des souris *wild-type* (WT). Ce déficit est compensé après application de tPA directement au niveau du cortex sensoriel. L'hypothèse est qu'une interaction du tPA synaptique avec les NMDAR post-synaptiques aurait pour effet de promouvoir la production de NO par l'oxyde nitrique synthase neuronale (Park *et al.*, 2008).

Récemment notre équipe a montré que l'hyperhémie fonctionnelle en réponse à la stimulation des vibrisses chez la souris est médiée par l'interaction du tPA avec les NMDAR endothéliaux (Anfray *et al.*, 2019).

b. Dans le parenchyme cérébral

Comme décrit précédemment, le tPA est synthétisé par différents types cellulaires au sein du SNC et il est retrouvé dans de nombreuses régions cérébrales, laissant présager de son implication dans de nombreuses fonctions physiopathologiques.

i. tPA et développement cérébral

Le développement cérébral est un processus complexe résultant d'un enchaînement très organisé d'évènements, 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 phases nécessitent, la plupart du temps, la dégradation de la matrice extracellulaire (Lu *et al.*, 2011).

Pour cela, les cellules sécrètent diverses protéines comme des métalloprotéinases (telles que les MMPs ou les désintégrines) et des désintégrines et métalloprotéinases à motif thrombospondines (*A Disintegrin And Metalloproteinase with Thrombospondin Motifs*, ADAMTS) mais aussi des sérines protéases telles que le tPA. Seeds et collaborateurs ont montré que des souris n'exprimant pas de tPA présentaient une migration neuronale retardée, objectivée par une accumulation des cellules granulaires au sein de la couche moléculaire du cervelet (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). Une autre étude menée au laboratoire a mis en évidence le rôle du tPA dans la migration des neurones corticaux. En effet le tPA interagit, via son domaine Kringle 2, avec les NMDAR des cellules de la glie radiaire et l'inhibition de cette interaction entraîne un retard de migration des neurones vers les couches corticales engendrant des déficits fonctionnels (Pasquet *et al.*, 2019).

De nombreuses études se sont intéressées au rôle du tPA et de ses inhibiteurs sur la pousse neuritique. L'absence de tPA ou l'inhibition de l'activité du tPA provoque un blocage de la croissance axonale dans des modèles de cultures de neurones (Baranes *et al.*, 1998; Pittman *et al.*, 1989). En revanche, l'ajout ou la surexpression de tPA augmente la pousse neuritique (Baranes *et al.*, 1998; Lee *et al.*, 2007; Pittman and DiBenedetto, 1995). Parallèlement il semblerait qu'un défaut d'expression de la neuroserpine engendre des déficits dans l'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 MMPs pour activer le plasminogène (García-Rocha *et al.*, 1994; Lochner *et al.*, 1998). La plasmine ainsi activée et les MMPs libérées provoquent une dégradation locale de la matrice extracellulaire (MEC), favorisant la pousse neuritique et la mise en place de nouvelles synapses (Huang *et al.*, 1996; Qian *et al.*, 1993). Une autre hypothèse implique l'activation du facteur de croissance hépatocytaire (*Hepatocyte Growth Factor*, HGF). Le tPA serait capable d'activer l'HGF participant à l'élongation des axones (Thewke and Seeds, 1999).

ii. tPA et substance blanche

Le tPA est impliqué dans les processus de remyélinisation et de régénérescence axonale. De fait, en conditions inflammatoires (cas de la sclérose en plaques par exemple), des

dépôts de fibrine se forment au niveau des lésions entraînant une aggravation la réponse inflammatoire, et accentuant la dégénération axonale. Par son action pro-fibrinolytique, le tPA est capable de réduire les dommages axonaux (Akassoglou *et al.*, 2000; Gveric, 2003; Gveric *et al.*, 2001). En outre, le tPA serait impliqué dans la dégradation des *Chondroïtine Sulfate ProteoGlycanes* (CSPGs), protéines de la MEC inhibitrices de la repousse axonale (Bukhari *et al.*, 2011). Une récente étude menée au laboratoire a mis en lumière la capacité du tPA à activer ADAMTS-4, une protéase capable de dégrader les CSPGs, et ainsi d'améliorer la repousse axonale et la récupération fonctionnelle successive à un traumatisme médullaire (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 son domaine homologue à l'EGF (Correa *et al.*, 2011; Leonetti *et al.*, 2017).

iii. tPA et modulation glutamatergique

Le tPA est capable de cliver le fragment N-terminal de la sous-unité GluN1 des NMDAR. Cette modification structurale induit une potentialisation de l'influx calcique de ces récepteurs en présence de glutamate (Nicole *et al.*, 2001). Plusieurs travaux du laboratoire ont permis de caractériser ce mécanisme de potentialisation de la neurotransmission glutamatergique. De fait, on sait que le clivage a lieu au niveau de l'arginine²⁶⁰ de la sous-unité GluN1 des NMDAR et nécessite la fixation du domaine Kringle 2 du tPA sur la sous-unité GluN1 des NMDAR (Fernández-Monreal *et al.*, 2004; López-Atalaya *et al.*, 2008). Au-delà du clivage, les conformations sous lesquelles se présentent les NMDAR et le tPA influencent leur interaction. En effet, le tPA clive préférentiellement les NMDAR contenant la sous-unité GluN2D (Baron *et al.*, 2010) et seul le sc-tPA peut induire ce clivage (Parcq *et al.*, 2012). La plasmine, suite à son activation par le tPA, peut cliver les NMDAR et accroître l'influx calcique. Cette interaction du tPA avec les NMDAR est impliquée dans des processus physiologiques comme la mémoire ou l'apprentissage (Benchenane *et al.*, 2007; Obiang *et al.*, 2012), mais aussi pathologique comme l'excitotoxicité ou l'épilepsie (Bertrand *et al.*, 2015; Nicole *et al.*, 2001; Parcq *et al.*, 2012; Z. Qian *et al.*, 1993).

iv. tPA et plasticité synaptique

Une des fonctions de notre cerveau est de pouvoir enregistrer des événements et d'y accéder à façon. Ce phénomène qui n'est autre que la mémoire se traduit par une augmentation importante et durable de l'efficacité synaptique au niveau cérébral. 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, c'est ce que l'on appelle la potentialisation à long terme (*Long Term Potentiation*, LTP). Cette LTP a été observée pour la première fois chez le lapin en 1973 (Bliss and Lomo, 1973). Puis, ce phénomène a été observé dans d'autres régions cérébrales comme le cortex (Iriki *et al.*, 1989), l'amygdale ou le striatum (Uno and Ozawa, 1991). Une étude a montré que ce phénomène observé expérimentalement constituait 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 NMDAR (Collingridge *et al.*, 1983). Suite à une stimulation à haute fréquence, le neurone pré-synaptique libère une grande quantité de glutamate dans la fente synaptique, et celui-ci va activer différents types de récepteurs post-synaptiques glutamatergiques. Dans un premier temps ce sont les récepteurs ionotropiques, de type AMPA, qui sont activés entraînant une dépolarisation locale du neurone post-synaptique. Cette dépolarisation permet l'expulsion des ions magnésium bloquant le canal des NMDAR. Le glutamate synaptique peut ensuite activer les NMDAR, engendrant une entrée de calcium dans l'élément post-synaptique. L'entrée de calcium va induire un ensemble de cascades moléculaires responsables du renforcement synaptique. Il y a 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 s'appuie principalement sur la synthèse de nouvelles protéines contribuant à l'amélioration de l'efficacité synaptique (Malenka and Bear, 2004).

De manière intéressante, physiologiquement, 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 montré que le tPA jouait également un rôle dans ce processus. De fait, suite

à une activation des neurones hippocampiques, ils ont observé une augmentation rapide de la synthèse des ARNm du tPA (Qian *et al.*, 1993, **Figure 9**). Une augmentation similaire a été reportée dans les cellules 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 (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).

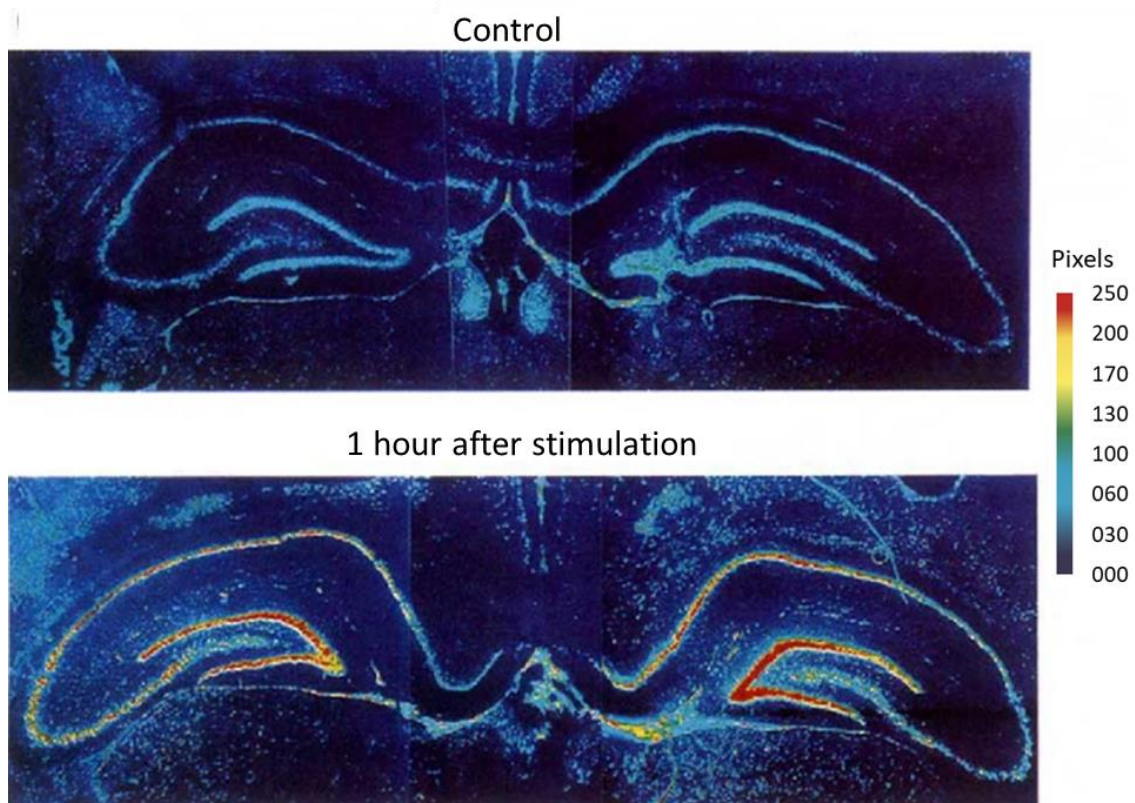


Figure 9: Increase in tPA mRNA levels following neuronal activation in Rats. *In situ* hybridization of tPA mRNAs in the rat hippocampus under normal condition (top) and 1h after electrical stimulation of the dentate gyrus (bottom) (adapted from, Qian *et al.*, 1993).

Madani et collaborateurs ont mis en lumière, chez des souris surexprimant le tPA, une augmentation des performances d'apprentissage et de mémorisation grâce à une LTP augmentée (Madani *et al.*, 1999). *A contrario*, les souris déficientes en tPA présentent un déficit d'apprentissage, déficit qui se retrouve annulé après infusion de tPA directement dans l'hippocampe (Pawlak *et al.*, 2002).

v. tPA et processus cognitifs

Comme vu précédemment, le tPA est fortement présent dans l'hippocampe et l'amygdale et il est impliqué dans la plasticité synaptique. De fait, le tPA contribue à plusieurs types de mémoire (Hébert *et al.*, 2016). Quelques travaux ont mis en avant la nécessité du tPA dans l'apprentissage et la mémoire spatiale (Benchenane *et al.*, 2007; Calabresi *et al.*, 2000; Oh *et al.*, 2014). L'interaction entre tPA et NMDAR 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 surcroît, une inhibition sélective de l'interaction tPA/NMDAR dans le cortex entorhinal, structure connue 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 le codage d'informations spatiales. En effet, les souris sauvages dont l'interaction tPA/NMDAR était inhibée présentaient les mêmes déficits que les souris déficientes en tPA (Hébert *et al.*, 2017).

Le tPA est également exprimé dans l'amygdale et dans sa voie majeure de sortie à savoir 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, 2005; Pawlak *et al.*, 2003). Le tPA participe à l'acquisition et à la rétention d'indices dans un contexte de peur (Calabresi *et al.*, 2000; Y.-Y. Huang *et al.*, 1996). D'autres études ont rapporté que les souris déficientes en tPA avaient un comportement moins anxieux que leurs congénères non mutés (Matys *et al.*, 2004, 2005; Pawlak *et al.*, 2003). De plus, les souris déficientes en neuroserpine, principal inhibiteur du tPA au sein du SNC, ont un comportement plus anxieux que les souris sauvages (Madani *et al.*, 2003). Cependant une étude récemment menée au laboratoire montre que sur un score composite de dépression chez la souris, il n'y a pas de différence entre les souris déficientes en tPA et les souris non déficientes (Party *et al.*, 2019).

vi. tPA et excitotoxicité

Comme décrit précédemment, l'excès de glutamate extracellulaire entraîne une mort excitotoxique dans laquelle les NMDAR et le calcium intracellulaire occupent un rôle central. Pour rappel, l'excitotoxicité est la conséquence d'une suractivation des NMDAR se traduisant par une entrée massive d'ions calcium dans le neurone. Une trop grande concentration d'ions calcium est délétère pour le neurone et va donc entraîner 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.

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

Dès 1995 Tsirka et ses collaborateurs ont montré que les souris déficientes en tPA étaient protégées contre des processus de dégénérescence neuronale provoquée par une injection intra-hippocampique de kainate, un agoniste glutamatergique (Tsirka *et al.*, 1995). De surcroît, Wang et ses collaborateurs ont montré dans un modèle d'ischémie cérébrale par occlusion intraluminale de l'ACM, que les souris déficientes en tPA avaient un volume de lésion inférieur à celui des souris non déficientes. Ils ont également montré que l'injection de tPA dans la circulation provoquait une augmentation du volume de lésion (Wang *et al.*, 1998).

Plusieurs mécanismes ont été proposés pour expliquer l'effet pro-excitotoxique du tPA :

- sa capacité à activer la microglie, cette dernière participant ensuite à la mort neuronale excitotoxique (Rogove and Tsirka, 1998)

- sa capacité à cliver la sous-unité GluN1 des NMDAR et à potentialiser l'entrée de calcium dans les neurones (Nicole *et al.*, 2001; Parcq *et al.*, 2012)

- sa capacité à se lier aux récepteurs LRP. L'interaction du tPA avec les récepteurs LRP, présents sur les neurones, permettant d'activer les NMDAR et provoquant ainsi une augmentation de calcium dans les neurones (Samson *et al.*, 2008).

vii. 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 fondamental que ce soit

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

Le tPA a été associé à des processus apoptotiques par diverses études, mais sans consensus. 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; Liu *et al.*, 2004), des études plus récentes montrent, au contraire, que le tPA aurait plutôt un rôle anti-apoptotique. En effet au laboratoire, Liot et collaborateurs ont montré un effet anti-apoptotique du tPA sur des neurones corticaux dans un modèle d'apoptose par privation de sérum. Cet effet serait la conséquence d'une diminution de l'activité de la caspase 3, acteur majeur de la cascade apoptotique, et ne dépendrait pas de l'activité protéolytique du tPA (Liot *et al.*, 2006). L'activation de la signalisation cellulaire dépendante de la voie Phosphatidyl Inositol-3-Kinase (PI3K) semble responsable de cet effet anti-apoptotique sur les modèles de cultures de neurones. Cependant, les récepteurs à l'origine de l'activation de cette voie sont encore débattus, certains proposent une activation de l'annexine II (Lee *et al.*, 2007; Siao and Tsirka, 2002) tandis que d'autres suggèrent plutôt une activation des récepteurs à l'EGF (Bertrand *et al.*, 2015; Lemarchand *et al.*, 2016). Ces effets du tPA dans l'apoptose ne sont pas dépendant de son domaine protéolytique, on parle alors d'effet « cytokine-like » du tPA (Docagne *et al.*, 2015)

Une étude menée au laboratoire a montré que le tPA a un effet anti-apoptotique sur les oligodendrocytes. Cet effet résulterait de l'interaction de son domaine homologue à l'EGF avec les récepteurs à l'EGF des oligodendrocytes (Correa *et al.*, 2011).

viii. tPA et inflammation

Les cellules microgliales sont des cellules gliales fortement impliquées dans l'inflammation. Elles constituent les macrophages résidents du SNC. En conditions physiologiques elles sont dans un état quiescent mais elles peuvent être activées 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 n'exprimant pas de tPA présentent non seulement une mort neuronale réduite mais aussi une réaction microgliale nettement

moindre (Rogove *et al.*, 1999). Le tPA participe à l'activation de la microglie *via* l'interaction de son domaine Finger avec l'annexine II présente à la surface de la microglie. Une fois activée la microglie contribue aux processus neurodégénératifs par libération de différents facteurs toxiques (Siao and Tsirka, 2002). Parmi ces facteurs libérés on retrouve le tPA qui 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 dépend d'une interaction avec les récepteurs LRP. En effet, chez des souris déficientes en récepteurs LRP sur leurs cellules microgliales, l'œdème cérébral et le taux de MMP9 sont réduits après une ischémie en comparaison aux souris sauvages (C. Zhang *et al.*, 2009).

Le tPA est aussi impliqué dans l'infiltration monocytaire au sein du parenchyme. En effet Reijerkerk et collaborateurs ont montré *in vitro* que les monocytes provoquent un relargage de tPA par les cellules endothéliales et que ce tPA participe à la diapédèse des monocytes par son implication dans la dégradation des protéines de jonctions (Reijerkerk *et al.*, 2008). Plus tard ils ont montré que la dégradation de la BHE et la transmigration des monocytes étaient dépendante de l'interaction entre le tPA et la sous-unité GluN1 des NMDAR (Reijerkerk *et al.*, 2010). Au laboratoire a été développé un anticorps, le Glunomab[®], qui se lie à la sous-unité GluN1 des NMDAR empêchant ainsi toute interaction avec le tPA. Avec cet anticorps Macrez et collaborateurs ont mis en évidence une réduction de l'infiltration de cellules immunitaires à travers la BHE (Macrez, *et al.*, 2011).

Alors que les études expérimentales associent fortement le tPA aux processus d'excitotoxicité, d'apoptose et d'inflammation (Mehra *et al.*, 2016), les preuves chez l'Homme restent parcellaires. En 2013, Alvarez et ses collaborateurs ont montré que chez les patients, la thrombolyse avec du tPA augmentait la survenue de crises d'épilepsie à la phase aiguë des AVC ischémiques et cela, indépendamment du taux de recanalisation ou de symptômes d'hémorragies intracérébrales (Alvarez *et al.*, 2013). En 2016, l'étude OPHELIE (*Outcome of Patients Treated by IV Rt-PA for Cerebral Ischaemia According to the Ratio Sc-tPA/Tc-tPA*) vient compléter l'étude d'Alvarez et collaborateurs en montrant que le risque épileptique est plus élevé chez les patients ayant été thrombolysés avec du r-tPA contenant plus de sc-tPA que de tc-tPA (Leys *et al.*, 2016). Ces études rejoignent la précédente étude de Tsirka et collaborateurs en 1995 qui démontrait le tPA était à l'origine de crises épileptiques dans un modèle d'étude préclinique (Tsirka *et al.*, 1995). L'équipe de Tisserand a également montré

chez l'Homme que le traitement par le tPA après une ischémie cérébrale était associé à une augmentation des volumes de lésion au niveau de la substance grise alors qu'ils observent une diminution de ceux-ci dans la substance blanche (Tisserand *et al.*, 2014).

Pour résumer, le tPA, est une protéine pléiotrope, tantôt protéase, tantôt cytokine. Il participe à de nombreuses fonctions et dysfonctions du SNC. En conditions pathologiques, elle peut selon sa cible cellulaire notamment, contrôler le devenir neuronal.

Ainsi, en ciblant spécifiquement ses domaines fonctionnels, il est possible de réduire ses effets néfastes et/ou optimiser ses effets bénéfiques.

Ces observations concernent non seulement le tPA endogène au parenchyme cérébral, mais potentiellement aussi le tPA vasculaire, endogène ou surtout exogène, tel qu'il est administré en clinique dans le traitement des AVC.

On sait en effet que le tPA vasculaire peut traverser la BHE aussi bien en situation pathologique que physiologique.

Il est donc important de savoir si le tPA peut franchir d'autres barrières du SNC pour rejoindre le parenchyme et d'établir des stratégies pour l'en empêcher. C'est pourquoi dans la partie suivante nous parlerons d'une autre barrière, la barrière sang - liquide cérébrospinal qui prend place dans les plexus choroïdes.

III. Les Plexus Choroïdes.

Au début du 20^{ème} siècle Paul Ehrlich et Edwin Goldmann mettent en évidence l'existence de barrière(s) autour du SNC. En effet, après injection de bleu de trypan dans la circulation sanguine ils observent que tous les organes étaient colorés à l'exception du SNC, en répétant l'expérience « à l'envers » en injectant du bleu de trypan dans le LCS ils observent un SNC coloré et une périphérie intacte (**Figure 10**).

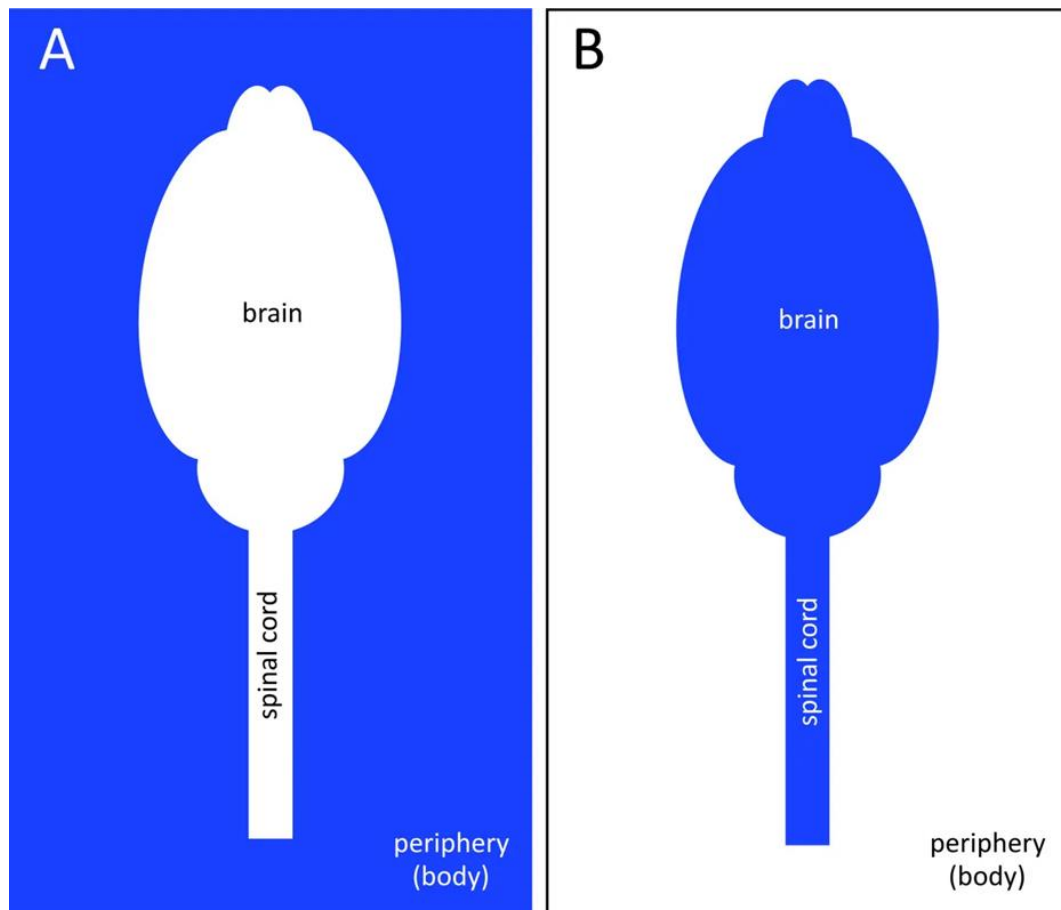


Figure 10: Demonstration of the existence of barriers around the SNC by Ehrlich and Goldmann. **A**, An injection of trypan blue into the vascular compartment results in peripheral tissue staining but not CNS staining. **B**, An injection of trypan blue in the CSF stains the CNS but not the periphery (adapted from Liddelow, 2011).

Le SNC compte plusieurs barrières : la barrière hémato-encéphalique (BHE, la plus connue), la barrière entre le sang et le liquide cérebrospinal (BSLCS), la barrière leptoméningée, la barrière LCS-neuroépithélium (seulement pendant le développement), la barrière hémato-rétinienne et la barrière « nez-cerveau » (Liddelow, 2011). La BSLCS a pour fondement les plexus choroïdes.

1. Structure des plexus choroïdes

(pour revue Dohrmann, 1970)

Les plexus choroïdes (PCs) sont des formations intraventriculaires composées de d'un stroma conjonctif qui sert d'assise à des cellules épithéliales, les cellules épithéliales de plexus choroïdes (*Choroid Plexus Epithelial Cells*, CPECs), et dans lequel on retrouve des capillaires sanguins fenêtrés. Leur découverte est attribuée à Herophilus (335-280 av. J-C.). Dix-neuf siècles plus tard, Vésale, dans son ouvrage *De humani corporis fabrica libri septem*, décrit l'anatomie générale des PCs. En 1964, Willis décrit les PCs du quatrième ventricule et leur attribue la présence de structures glandulaires qui seraient responsables de la sécrétion du liquide retrouvé dans les ventricules. En 1695, Ridley décrit les PCs du troisième ventricule, complétant ainsi la description de tous les PCs (Dohrmann, 1970).

Bien qu'ayant été anatomiquement décrits tôt dans notre Histoire, comme beaucoup de structures dans le corps humain, les fonctions des PCs n'ont été explorées qu'à partir du 19^e siècle. En 1919, en développant un modèle d'hydrocéphalie chez le chien, Dandy montre que les PCs sécrètent le liquide cébrospinal (LCS) (Dandy, 1919). En 1964, Smith et collaborateurs ont mis en évidence un transport de protéines au travers de PCs isolés (D. E. Smith *et al.*, 1964) élargissant ainsi les fonctions des PCs à autre chose que la seule sécrétion de LCS. S'en suivront nombre de travaux consacrés à la découverte des mécanismes régissant la physiologie des PCs. Aujourd'hui, il est admis qu'ils produisent environ 80 % du LCS, synthétisent plusieurs de ses composants, dont la transthyrétine (TTR) qui est un marqueur canonique des PCs (Aldred *et al.*, 1995), transportent de nombreuses molécules du sang vers le LCS, entre autres la vitamine C (Spector and Lorenzo, 1973), réabsorbent certains produits du métabolisme cérébral tels la taurine (Keep and Xiang, 1996), participent à l'immunosurveillance cérébrale (Nathanson and Chun, 1989) et sont une niche pour des cellules souches neurales et gliales (Itokazu *et al.*, 2006).

a. Anatomie

Les PCs sont au nombre de quatre et sont localisés dans les ventricules cérébraux. Le PC du troisième ventricule, en position médiane, collé au toit du ventricule, communique avec les deux PCs latéraux au travers des trous de Monro. Les PCs des ventricules latéraux sont

issus de la fente de Bichat et occupent la partie centrale et la corne temporelle de ces ventricules. Pour terminer, le PC du quatrième ventricule, qui n'est pas lié physiquement aux trois autres, est apposé au toit de ce ventricule. Ce plexus émane du trou de Magendie et se projette bilatéralement dans les recessus latéraux du quatrième ventricule pour se terminer dans l'espace sous arachnoïdien après être passé par les trous de Luschka (**Figure 11**).

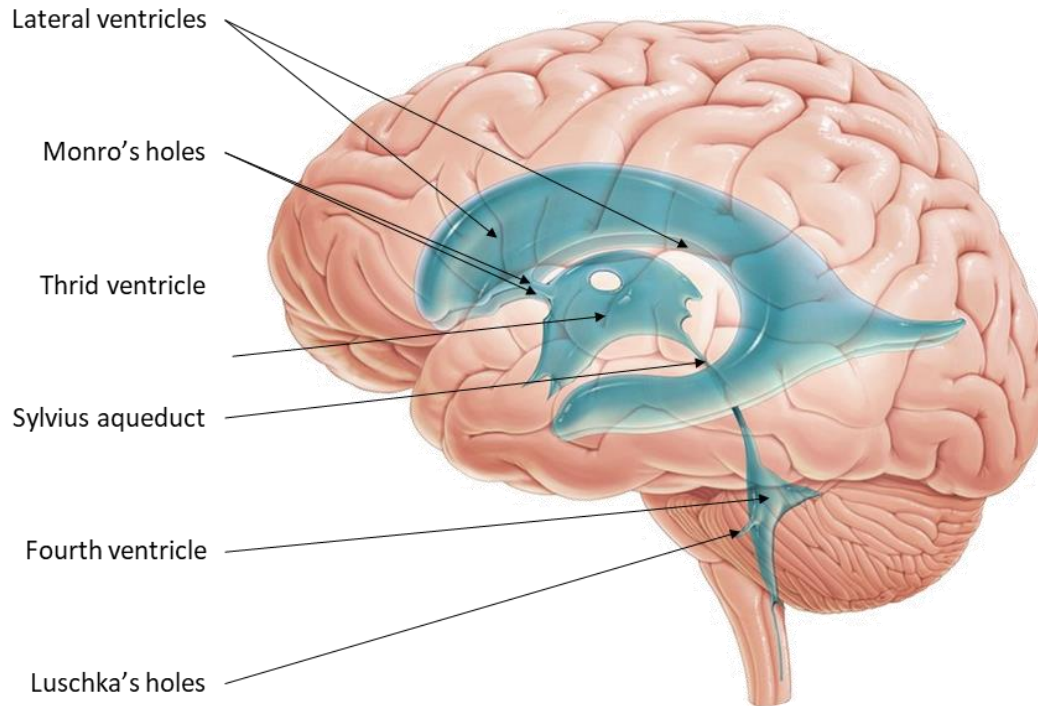


Figure 11: Representation of the ventricular apparatus. The lateral ventricles communicate with the third ventricle through Monro's holes. The third ventricle is connected to the fourth by the Sylvius aqueduct. On either side of the fourth ventricle are Luschka's holes.

Chez la souris, il est aisé de différencier à la loupe binoculaire les différents PC du fait de leurs architectures propres. En effet, le plexus du quatrième ventricule, le plus aisé à prélever chez le rongeur, forme un Y avec des lobules s'enroulant autour d'un axe vasculaire. Les PC latéraux quant à eux sont semblables à un voile à l'exception du « sommet » qui présente plus un aspect lobulaire. Finalement le PC du troisième ventricule a une architecture intermédiaire, on pourrait le définir comme un enchevêtrement de plexus latéraux (**Figure 12**).

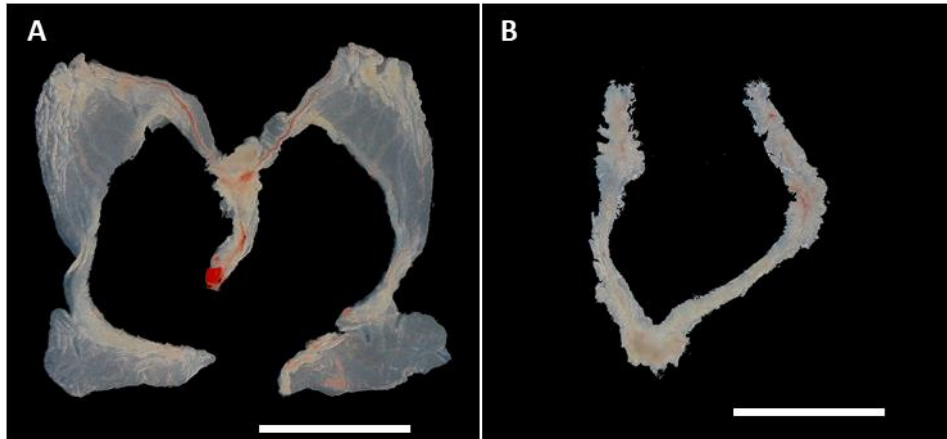


Figure 12: Choroid plexuses extracted from an 8 weeks old mouse. The lateral choroid plexuses are interconnected by the choroid plexus of the third ventricle (**A**). The choroid plexus of the fourth ventricle is shown in **B** (scale bars represent 2mm).

b. Développement

Les PC ont une double origine embryonnaire : ils sont issus de l'union du neuroectoderme et du mésoderme. Les PC se développent depuis la partie dorsale du tube neural. Une fois le tube fermé commence le développement du PC du 4e ventricule dans le cerveau postérieur (dès le 9,5 jour embryonnaire (E9,5) chez la souris). S'ensuit la formation des PC des ventricules latéraux (télencéphale, E12,5), suivi du PC du 3e ventricule (diencéphale, E14,5) (Shuangshoti and Netsky, 1966; Swetloff and Ferretti, 2005). Durant le développement de ce dernier PC a lieu une fusion avec les PC latéraux, après passage d'une portion au travers du foramen de Monroe.

Le PC du 4e ventricule se développe en formant deux crêtes situées de part et d'autre de la partie dorsale du tube neural du cerveau postérieur. Ces crêtes vont converger par la suite pour ne former qu'un PC. Les PC latéraux se développent dans la partie médiane qui relie les cavités du télencéphale dorsal à partir de la fissure choroïdienne.

Les CPECs dérivent de l'épithélium neural alors que les cellules du tissu conjonctif dérivent du mésenchyme qui s'est invaginé dans le tube neural au site de formation des PC. Les progéniteurs qui donneront les CPECs sont identifiables avant l'apparition même des PC grâce à des marqueurs tels que la TTR (von Frowein *et al.*, 2006). Le développement de l'épithélium choroïdien se décrit en quatre phases basées sur la morphologie des CPECs (Shuangshoti and Netsky, 1966). Le premier stade est défini par un feuillet de cellules

épithéliales pseudostratifiées. Au stade 2, les cellules se transforment en un épithélium cylindrique haut simple et apparaissent de rares villosités. Au troisième stade, elles prennent une forme de cellule épithéliale aplatie (cuboïde) et le noyau est en position centrale ou apicale et les villosités choroïdiennes se multiplient. Au stade 4 le noyau passe en position basale et on retrouve les jonctions serrées entre cellules voisines et les villosités choroïdiennes sont encore plus nombreuses et deviennent également plus complexes (Lun *et al.*, 2015, **Figure 13**).

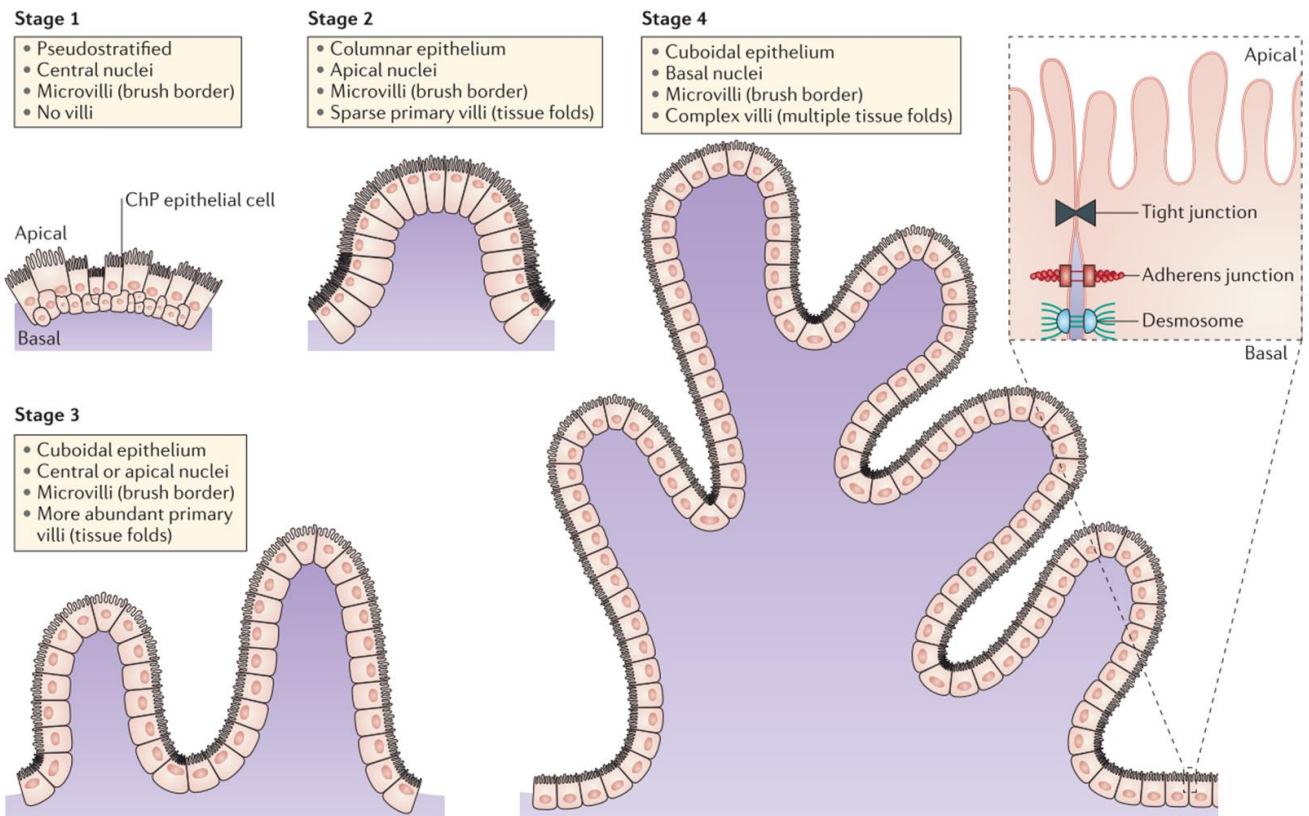


Figure 13: Morphological stages of the developing choroidal epithelium. The CPs of each ventricle are organized into a layer of cuboidal epithelium enclosing a rich vascular system and other stromal cells. Maturation of CPECS happens in four stages. At stage 1 CPECS are pseudostratified with nuclei in central position and little to no villi. A transition to a cylindrical epithelium with nuclei at the apical level and the appearance of sparse primary villi describe stage 2. At stage 3, CPECS flatten out and become more cubic, nuclei are centrally or apically and primary villi in the tissue become more numerous. Finally, at stage 4, nuclei are located at the basal level and villi are more complex. Junctions and adhesion molecules are found between adjacent cells, allowing the mature PC to function as a barrier between the blood and the cerebrospinal fluid (CSF) (Lun *et al.*, 2015).

Il est intéressant de noter que les CPECS et le tissu conjonctif se développent de manière synchrone. La vascularisation dans les PC en devenir est notamment régulée par des

facteurs originaires des CPECs tels que la protéine Sonic Hedgehog qui va agir sur les péricytes, eux-mêmes capables d'organiser le développement des vaisseaux qui, à leur tour agiront sur les CPECs (Nielsen and Dymecki, 2010). En outre la sécrétion de Shh (*Sonic hedgehog*) promeut la prolifération des CPECs (X. Huang *et al.*, 2009).

c. Histologie

Bien que l'architecture des PCs permette de les identifier facilement, les différences s'effacent quant à l'organisation histologique. Du fait de leur double origine embryologique (mésoderme et ectoderme), les PCs sont considérés comme étant le résultat de l'accolement de deux tissus, d'une part un tissu épithélial externe en continuité de l'épendyme, qui borde les ventricules, et d'autre part un stroma conjonctif central vascularisé qui sert d'assise à cet épithélium.

Les villosités choroïdiennes sont bordées par un épithélium cubique unistratifié, dont les CPECs sont en contact direct avec le LCS avec leur pôle apical. Cet épithélium repose sur une membrane basale continue, elle-même reposant sur le stroma. Les CPECs ont un noyau arrondi en position centrale, ou basale, où la chromatine y est légèrement condensée. Les mitochondries sont dispersées dans le cytoplasme et se présentent sous forme de tubes allongés. Le réticulum granulaire est distribué dans le cytoplasme qui contient de nombreux ribosomes. L'appareil de Golgi est quant à lui à proximité du noyau.

Le stroma des PCs contient aussi des cellules nécessaires à l'immunosurveillance. Le développement de marqueurs spécifiques des lignées lymphoïdes et myéloïdes a permis de préciser la nature des différents types cellulaires résidant dans le stroma, et de montrer chez le rongeur et l'humain la présence de macrophages et de cellules dendritiques. Ces cellules myéloïdes, présentes en conditions physiologiques, pourraient, dans un contexte d'infection virale, jouer un rôle de réservoir, voire faciliter la pénétration cérébrale de l'agent infectieux (Hanly and Petito, 1998; Mcmenamin, 1999; Serot *et al.*, 1998, 2000).

Du côté apical des CPECs, on trouve des cellules à activité phagocytaire appelées cellules de Kolmer ou cellules des épiplexus (Ling *et al.*, 1998). D'apparence amiboïde, ces cellules possèdent le plus souvent des extensions cytoplasmiques qui semblent être en contact avec les microvillosités épithéliales à la surface desquelles on les retrouve. En effet, chez le chat, après une injection intracérébroventriculaire d'encre de Chine on observe

l'apparition, dès une heure, de particules d'encre de Chine à l'intérieur de ces cellules (Carpenter *et al.*, 1970, **Figure 14**).

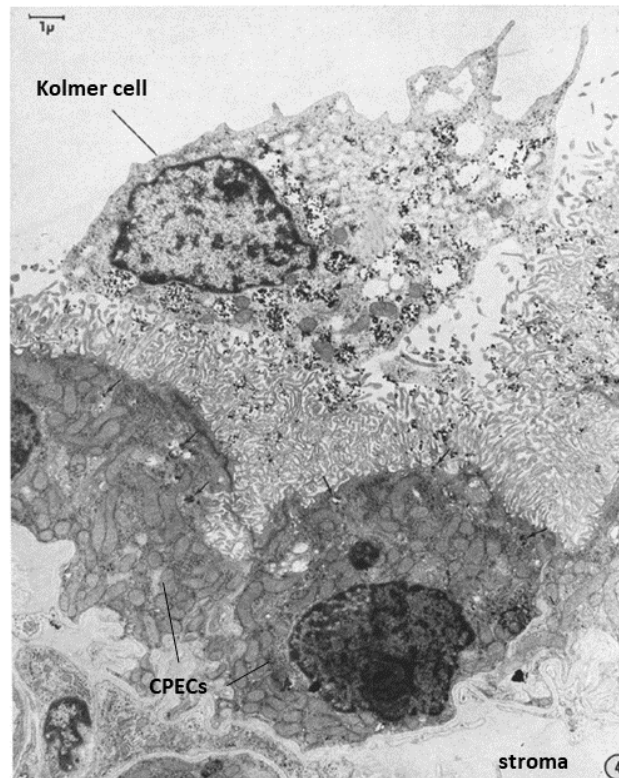


Figure 14: Electron microscopy microphotograph of a Kolmer cell in contact with CPECs (adapted from : Carpenter *et al.*, 1970)

Avec toutes leurs villosités, la surface développée par les PCs est très supérieure à ce que l'on pourrait s'imaginer au vu de la petite taille de ces structures. En effet Edel Voetmann en 1949 approxime leur surface à un peu plus de 200 cm².

d. Vascularisation

Les PCs apparaissent comme des structures translucides, facilement repérables par leur réseau vasculaire considérablement développé. Les PCs des ventricules latéraux sont perfusés par les artères choroïdiennes antérieures, qui se prolongent depuis les carotides internes d'une part, et par les artères choroïdiennes postérieures, qui font suite aux artères cérébrales postérieures d'autre part. Ils sont drainés par les veines choroïdiennes inférieure et supérieure qui se drainent à leur tour dans la veine cérébrale interne (veine de Galien). Les artères choroïdiennes postérieures irriguent également le plexus du troisième ventricule, alors que le plexus du quatrième ventricule est vascularisé par les artères cérébelleuses inféropostérieures. La vascularisation se compose d'artères de petit calibre, d'artérioles, de

capillaires et de larges sinus veineux aux parois fines. Le stroma contient un réseau vasculaire très développé et anastomosé avec des artérioles et veinules, à la base des villosités, qui se terminent en capillaires, dans la partie distale des villosités (**Figure 15**).

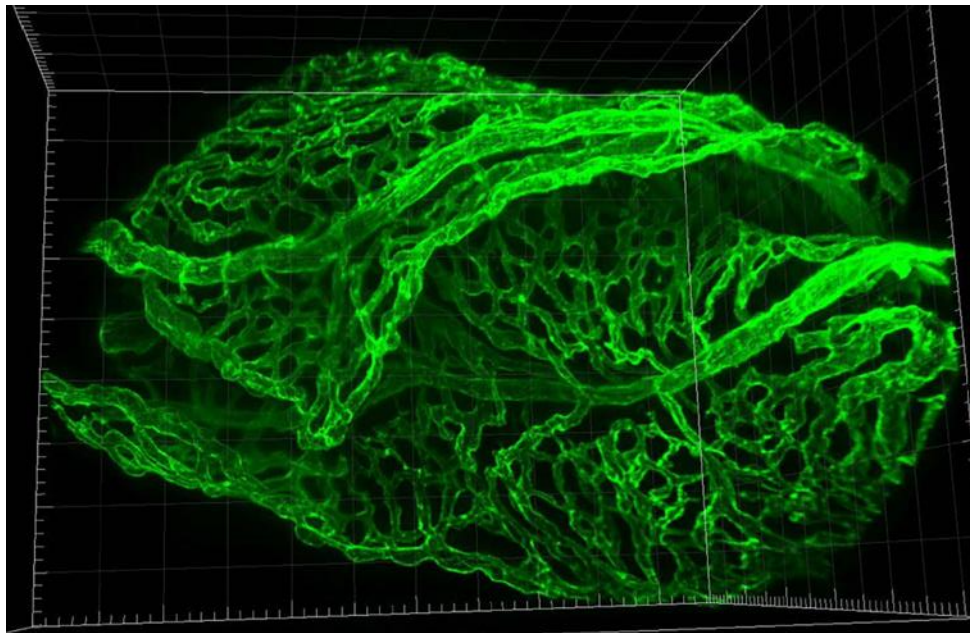


Figure 15: Three-dimensional representation of the vascular network of a large choroid plexus villus. Choroidal vessels are labeled using an antibody directed against reca-1, and the choroidal tissue is imaged by light sheet fluorescence microscopy. Small graduations are 10 μm apart (Gherzi-Egea *et al.*, 2018).

Les capillaires des PC sont plus volumineux (environ 15 μm de diamètre) que d'autres capillaires périphériques (environ 3 μm de diamètre) (Voetmann, 1949). L'endothélium est fenêtré et repose sur une membrane basale. Les capillaires prennent pour assise une lame basale continue et naviguent dans chaque villosité choroïdienne en bordant directement les CPECs. Ces capillaires sont différents de l'endothélium des capillaires de la BHE, dans le parenchyme cérébral, car ils présentent des fenestrations allant de 30 à 50 nm (Dohrmann, 1970).

2. Fonctions

a. Production du Liquide CérébroSpinal (LCS)

Le volume de LCS chez l'adulte sain est d'environ 125 - 150 mL, avec une production d'environ 25 mL/h, soit 4 à 5 renouvellements par jour. Les plexus choroïdes secrètent l'essentiel de ce fluide (Wright *et al.*, 2012). Seule une petite partie a pour origine le parenchyme cérébral, et proviendrait de l'ultrafiltration à travers les vaisseaux cérébraux.

Cette importante sécrétion est explicable par plusieurs facteurs, dont un débit sanguin élevé au sein du tissu choroïdien, des capillaires fenêtrés résistant faiblement aux petits solutés, une surface épithéliale d'échange importante, et enfin le fait que la production de LCS est le fruit d'un processus de sécrétion actif et non d'une ultrafiltration du plasma sanguin. De nombreux mécanismes homéostatiques contrôlent le transport des ions au travers des CPECs, il en résulte une composition relativement constante du LCS (

Table 1).

Table 1: CSF composition (adapted from Ransom, 2017)

Components	
Water	99 (%)
Proteins	35 (mg/dL)
Glucose	60 (mg/dL)
Sodium	147 (mM/L)
Potassium	2,8 (mM/L)
Calcium	1,1 (mm/L)
Magnesium	1,1 (mM/L)
Chloride	113 (mM/L)
Bicarbonate	22 (mM/L)
pH	7,33

Le mécanisme de sécrétion du LCS est complexe et régulé. Il consiste en un flux actif et unidirectionnel d'ions d'un côté à l'autre de l'épithélium choroïdien, ce flux crée un gradient osmotique et entraîne un mouvement d'eau du stroma vers le système ventriculaire.

i. Échanges entre le LCS et les fluides du parenchyme

Le LCS est contenu dans le système ventriculaire, l'espace sous-arachnoïdien, entre pie-mère et *glia limitans*, et dans les espaces périvasculaires, zone entre pie-mère et vaisseaux sanguins pénétrants (Iloff *et al.*, 2012). Le LCS n'est pas le seul fluide du cerveau : on y retrouve le sang avec qui il échange au travers des CPECs. Un autre fluide est le liquide interstitiel, celui-ci est retrouvé entre les cellules du parenchyme et baigne le cerveau. Enfin, le quatrième fluide du système nerveux central serait la lymphe. Chez le rongeur un système lymphatique a été décrit et se situe le long des sinus veineux et des artères de la dure-mère (Aspelund *et al.*,

2015; Louveau *et al.*, 2015). Les vaisseaux lymphatiques sortent du cerveau en suivant les vaisseaux sanguins et rejoignent ensuite les nœuds lymphatiques cervicaux (Aspelund *et al.*, 2015).

Le parenchyme du SNC est imprégné par le liquide interstitiel, celui-ci peut diffuser le long des fibres de matière blanche et sous les cellules épendymaires qui tapissent les ventricules. Les compositions du LCS et du liquide interstitiel sont très semblables et cela s'explique par l'absence de barrière entre ces deux fluides. La première interface entre le LCS et le liquide interstitiel est celle formée par les cellules épendymaires qui possèdent des jonctions gap et sont donc perméables au LCS. L'autre interface est composée par les espaces périvasculaires ; ceux-ci prennent place le long des artères pénétrantes en provenance de la surface corticale. Au niveau de ces espaces, les artères emportent avec elles de la pie-mère et donc du LCS de l'espace sous-arachnoïdien qui les entoure. La pie-mère est alors en contact avec les pieds astrocytaires. Ce système d'échange appelé « glymphatique » est composé des pieds astrocytaires de la *glia limitans*, qui communique avec le liquide interstitiel, autour des espaces périvasculaires contenant du LCS. L'injection de traceurs dans le LCS a permis de visualiser le flux de LCS dans l'espace périvasculaire et la communication, à ce niveau, entre le LCS et le liquide interstitiel (Iff *et al.*, 2012). Le traceur est retrouvé après 10 minutes dans les espaces péri-artériels, puis à 30 minutes dans les espaces péri-veineux. L'équipe de Maiken Nedergaard a postulé que les espaces péri-artériels permettent l'entrée de LCS dans l'espace interstitiel, alors que les espaces péri-veineux permettraient au liquide interstitiel d'être drainé vers le LCS pour être ensuite éliminé (Iff *et al.*, 2012 ; Nedergaard, 2013 ; **Figure 16**)

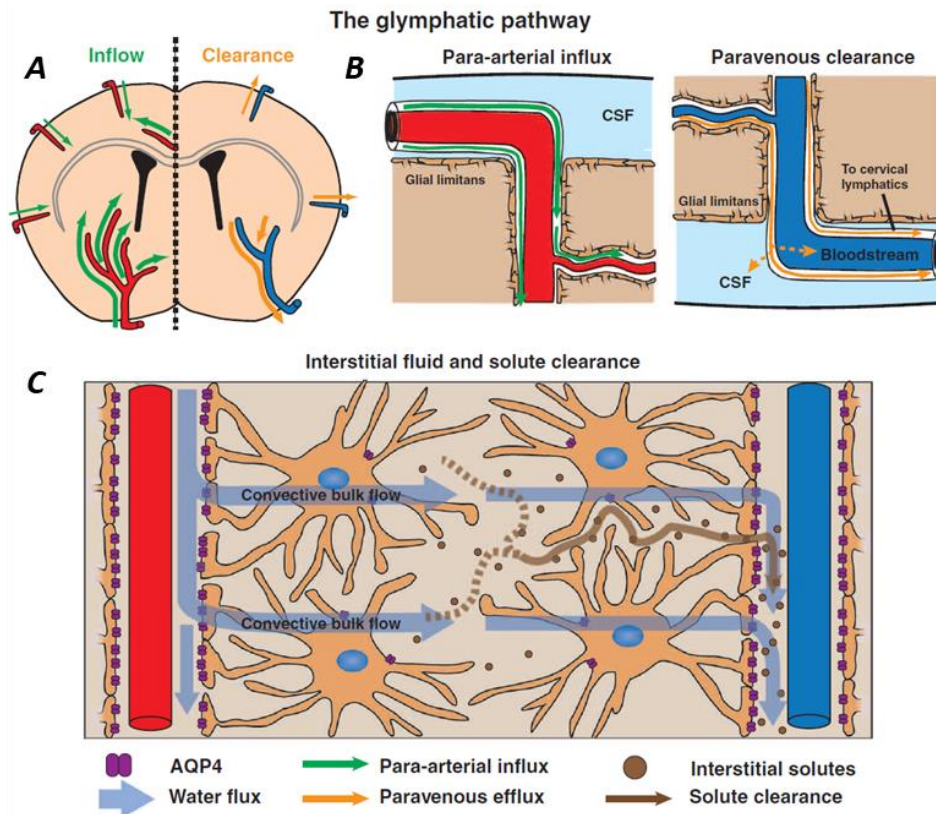


Figure 16: The glymphatic pathway. **A, B**, CSF enters the cerebral parenchyma along the penetrating arteries and exits through the perivenous spaces. **C**, The passage from periarterial spaces to perivenous spaces occurs thanks to a bulk flow of water and is mediated by water channels, the aquaporins 4 (adapted from : Iliff *et al.*, 2012).

L'équipe du Pr. Carrare remet en cause plusieurs points dans la théorie du glymphatique telle que décrite par l'équipe du Pr Nedergaard et notamment des imprécisions sur la micro-anatomie vasculaire (MacGregor Sharp *et al.*, 2019; Weller *et al.*, 2018). Avant l'hypothèse du glymphatique, avec son équipe elle avait proposé un autre système pour les échanges entre le LCS, le liquide interstitiel et le parenchyme cérébral. En effet elle suggérait un mécanisme par lequel le LCS atteint le parenchyme en s'insinuant entre la pie-mère et les pieds astrocytaires formant la *glia limitans* puis était drainé hors du parenchyme en suivant les membranes basales des capillaires et artères (Carare *et al.*, 2008). Ce système a été étudié plus finement et nommé IPAD, pour Drainage Intramural PériArtériel. La membrane basale sur laquelle repose les SMCs et celle de la *tunica media* servent de voie d'efflux du liquide interstitiel (Albargothy *et al.*, 2018, **Figure 17**) puis rejoignent les voies de drainage décrites dans le paragraphe suivant.

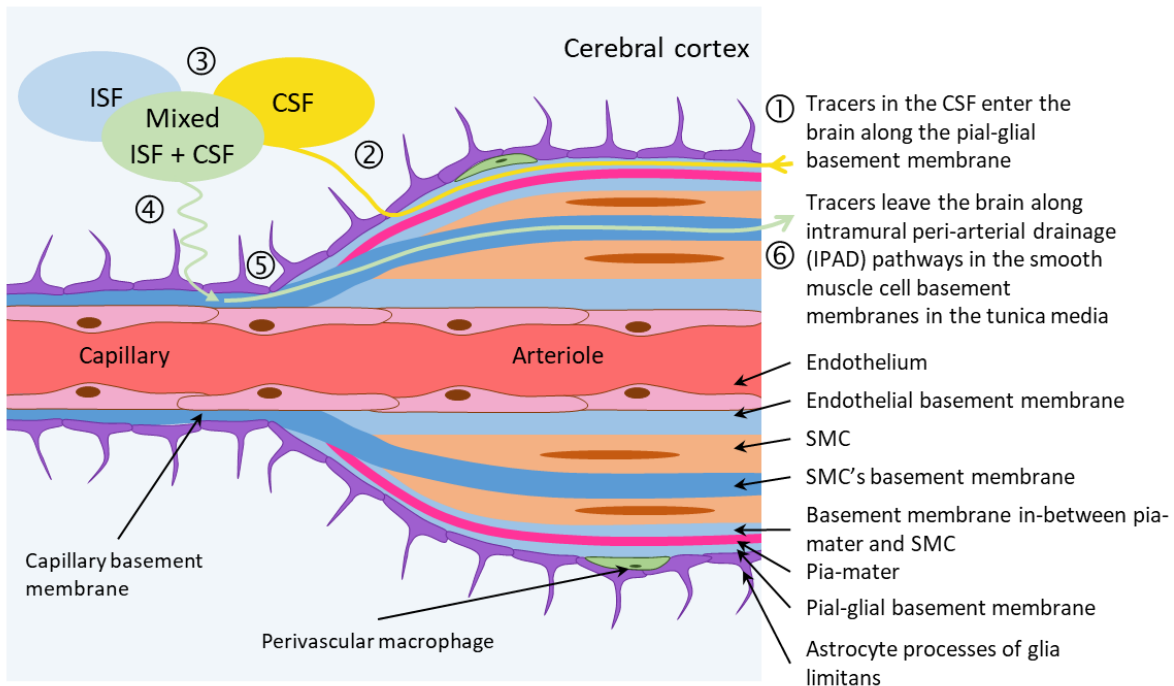


Figure 17: Pathway of CSF influx into the brain and drainage of CSF/IF from the brain along periarterial basement membranes. (1) Entry of tracers from the CSF to the cerebral parenchyma along pial-glia basement membranes. (2) The CSF enters the parenchyma (mechanisms are still unclear) and mixes with the interstitial fluid (IF), (3). The CSF/IF mixture diffuses into the extracellular spaces of the parenchyma (4) to penetrate the capillary basement membranes (5) and then flows out of the brain along the basement membranes of the smooth muscle cells (SMCs) of the *tunica media* located in the walls of arterioles and arteries (6, IPAD route) (adapted from : Albargothy *et al.*, 2018)

Plusieurs mécanismes de réabsorption permettent au LCS d'être drainé vers la circulation sanguine ou le système lymphatique. Le premier mécanisme de réabsorption implique des villosités arachnoïdiennes. Une fois le LCS dans l'espace sous-arachnoïdien il est réabsorbé *via* les villosités arachnoïdiennes puis drainé dans les sinus de la dure-mère. Un deuxième système de réabsorption se situe sous la plaque cribiforme et implique le système lymphatique. La plaque cribiforme, comme son nom l'indique, est perforée et permet le passage des nerfs olfactifs, mais laisse aussi passer le LCS. Celui-ci rejoint alors le système lymphatique présent dans la muqueuse nasale (Lun *et al.*, 2015; Pollay, 2012). Finalement il a été montré que le système lymphatique associé au sinus veineux de la dure-mère permet de réabsorber du LCS. Des traceurs fluorescents injectés directement dans le parenchyme sont retrouvés dans ces vaisseaux lymphatiques (Aspelund *et al.*, 2015). En résumé, ces systèmes permettent l'élimination de macromolécules présentes au niveau du parenchyme cérébral.

b. Sécrétion

Les CPECs produisent de nombreuses protéines qui peuvent être sécrétées vers le LCS ou le sang

La protéine la plus abondamment synthétisée est la TTR qui, *in vitro*, constitue environ 20 % des molécules néosynthétisées et 50 % des molécules sécrétées par les CPECs. Les activités de synthèse varient en fonction de l'âge. Chez le rat, l'ARNm de la TTR est exprimé dans les PC dès le 10^e jour de gestation alors que l'expression d'ARNm d'IGF II (*Insulin-like Growth Factor II*) débute le 13^e jour et se maintient à un taux élevé par la suite durant la morphogénèse puis décroît (Cavallaro *et al.*, 1993). *In vitro*, chez le rat, l'IGF II a un rôle paracrine/autocrine et augmente la croissance des CPECs (Nilsson *et al.*, 1996). L'IGF II est normalement transporté par une protéine porteuse l'« *IGF binding protein* » dont il existe 6 isoformes ; chez le rat l'isoforme 2 est synthétisée et sécrétée par les PCs (Sullivan and Feldman, 1994).

Les CPECs synthétisent aussi le facteur endothélial de croissance vasculaire (*Vascular Endothelial Growth Factor*, VEGF). Ce polypeptide est associé à la vasculogénèse au cours du développement, ainsi qu'à l'angiogénèse dans diverses situations physiologiques et pathologiques. Il a la capacité d'induire des fenestrations dans les endothéliums. Au niveau du tissu choroïdien, ce facteur est exprimé de manière constitutive par les cellules épithéliales, mais n'a pas été détecté dans les vaisseaux choroïdiens fenêtrés (Chodobski *et al.*, 2003; Naito *et al.*, 1995). L'épithélium choroïdien, en sécrétant le VEGF, non pas dans le LCS, mais au pôle basolatéral de ses cellules, pourrait donc être responsable du phénotype particulier des vaisseaux choroïdiens.

Les CPECs synthétisent aussi des facteurs régulateurs de la niche neurogénique de la zone sous-ventriculaire, cette niche qui abrite des progéniteurs neuraux qui pourraient être recrutés suite à un AVC (Arvidsson *et al.*, 2002). En effet ils sécrètent des facteurs de prolifération tel que le facteur de croissance fibroblastique basique (*Fibroblast Growth Factor 2*, FGF2) qui permet le maintien de la population de cellules souches en promouvant la prolifération (Douet *et al.*, 2013; Hayamizu *et al.*, 2001). Comme mentionné précédemment ils sécrètent de l'IGF2 qui permet le renouvellement des cellules souches (Ziegler *et al.*, 2012) ou encore du TGF β qui peut aussi réguler la prolifération des cellules souches (Wachs *et al.*, 2006).

3. Plexus choroïdes et pathologies.

a. Papillome choroïdien et hydrocéphalie

La principale pathologie qui touche les PCs est le papillome choroïdien. Il s'agit de tumeurs bénignes qui ne représentent que 0,5% des cancers intracrâniens et qui touche majoritairement les jeunes enfants. Ces papillomes entraînent une augmentation de la pression intracrânienne ainsi qu'une hydrocéphalie lesquelles sont souvent accompagnées de symptômes neurologiques (dépendant de la localisation de la tumeur) (Bahar *et al.*, 2017).

L'hydrocéphalie peut donc être la conséquence d'un papillome choroïdien et se caractérise par une accumulation de LCS dans le cerveau et des ventricules gonflés. Cependant les tumeurs choroïdiennes ne sont pas les seules causes d'hydrocéphalie, en effet les hémorragies intraventriculaires peuvent obstruer de manière transitoire le flux de LCS (Jergović *et al.*, 2016). L'hydrocéphalie peut aussi être non-obstructive, c'est à dire que le flux de LCS n'est pas altéré dans les ventricules mais que l'absorption est réduite.

b. Sclérose En Plaques (SEP)

La sclérose en plaques (SEP) est une maladie inflammatoire progressive chronique du SNC dans laquelle une réponse auto-immune attaque la gaine de myéline. Une spécificité de la maladie est la migration des cellules inflammatoires périphériques vers le SNC. Les PCs sont un site d'entrée pour les lymphocytes vers le LCS. Dans les PCs de patients atteints de SEP on retrouve des lymphocytes T (LT) dans les vaisseaux et le stroma ainsi qu'une expression de la molécule d'adhésion vasculaire 1 (*Vascular Cell Adhesion Molecule-1*, VCAM-1) à la surface des cellules endothéliales et un intense marquage de HLA-DR (*Human Leukocyte Antigen-DR isotype*) sur les cellules stromales, les CPECS et les cellules de Kolmer (Vercellino *et al.*, 2008).

Dans le modèle murin d'encéphalomyélite autoimmune expérimentale (EAE), on retrouve chez les souris une augmentation de l'expression de la molécule d'adhérence intercellulaire-1 (*InterCellular Adhesion Molecule-1*, ICAM-1) et l'expression *de novo* de la protéine d'adhésion cellulaire MadCAM-1 (*Mucosal vascular addressin Cell Adhesion Molecule-1*), dans les vaisseaux des PCs, deux arguments supplémentaires pour une intervention des PCs dans l'entrée des cellules immunitaires dans le cerveau (Engelhardt et Coisne, 2011).

Les souris déficientes en CCR6, un récepteur caractéristique des cellules lymphocytaires Th-17 (lymphocyte T helper), sont résistantes à l'induction de l'EAE. De plus, CCL20 (chemiokine à motif CC ligand 20, un ligand de CCR6) est exprimée de façon constitutive par les CPECs, à la fois chez la souris et chez l'homme. Ceci suggère encore une fois un rôle pour les PCs dans l'entrée des cellules Th-17 dans le SNC. En effet, la susceptibilité à l'EAE est restaurée suite à une injection de LT non mutés aux souris déficientes en CCR6. Il a été montré que les LT pénètrent dans le cerveau avant l'apparition de la maladie et qu'ils déclenchent un recrutement massif de LT effectrices indépendamment de CCR6 au niveau des vaisseaux cérébraux activés, ce qui suggère que les PCs sont le point d'entrée initial des LT dans le cerveau, avant une nouvelle entrée massive de LT au travers de la BHE (Reboldi *et al.*, 2009).

c. Cas de l'accident vasculaire cérébral

i. Effets sur la morphologie

Hémorragie

Dans un modèle de HSA chez le lapin, il a été rapporté que les PCs changeaient de morphologie, à savoir une dilatation latérale et sous-cellulaire ainsi que l'apparition d'inclusions denses au niveau du cytoplasme. Cette même étude rapporte un nombre plus important de cellules de Kolmer à la surface des CPECs (Liszcak *et al.*, 1984). Toujours chez le lapin, Kotan et collaborateurs ont mis en évidence une réduction du nombre de CPECs et de la taille des microvillosités 10 jours après l'induction de HSA (Kotan *et al.*, 2014).

Ischémie

Peu d'études ont été menées sur les lésions des PC après une ischémie focale. Les modèles utilisés requièrent l'occlusion de l'artère cérébrale moyenne (ACM) et cette occlusion peut entraîner une réduction de l'apport sanguin au PC latéral (Ennis and Keep, 2006) du fait de la proximité de l'embranchement de l'artère choroïdienne antérieure avec la bifurcation de l'ACM. Chez le rat, Ennis et Keep ont observé une réduction de 38% du débit sanguin du PC latéral après l'occlusion de l'ACM et une réduction de 53% si les animaux subissaient une occlusion de l'artère carotide commune. Nagahiro *et al.*, (1994) ont examiné les effets de différentes durées d'occlusion de l'ACM et d'occlusion carotidienne interne chez le rat. Ils ont mis en évidence une perturbation de la BSLCS en IRM avec un agent de contraste, de l'acide gadolinium-diéthylène triamine pentacétate (Gd-DTPA), chez des animaux présentant une ischémie de 15 et 30 min avec une reperfusion de 6h. Ils n'ont pas trouvé de preuve de

changements morphologiques des PCs après 6 h de reperfusion par coloration hématoxyline et éosine. Une autre étude, menée par Li et collaborateurs (2002), a rapporté que le volume des CPECs augmentait (de 1 à 4 jours) et que les PCs présentaient une coloration au BrdU indiquant une prolifération cellulaire et cela après une occlusion de l'ACM pendant 2h puis reperfusion. De manière intéressante, le marquage BrdU après l'occlusion de l'ACM n'était pas limité au PC latéral, mais s'étendait également aux PCs des 3^{ème} et 4^{ème} ventricules indiquant des effets à distance de la zone d'ischémie sur la prolifération des CPECs. Gillardon *et al.*, (1996) ont mis en évidence la mort de CPECs du PC latéral (coloration TUNEL) 6h après l'occlusion permanente de l'ACM mais pas après 90 minutes chez le rat. De plus Ennis et Keep (Ennis and Keep, 2006) ont mis en évidence un œdème des PCs latéraux après occlusion de l'ACM chez des rats. Parallèlement une étude en IRM chez l'humain, publiée cette année, a mis en évidence que les PCs latéraux des patients ayant subi un AVC ischémique unilatéral avaient un plus grand volume que ceux des sujets sains et cela dès la prise en charge et jusque 12 mois après l'AVC. Les auteurs émettent l'hypothèse que cet élargissement des PCs a lieu de manière très précoce après l'AVC voire même qu'il précéderait l'accident ischémique (Egorova *et al.*, 2019).

ii. Une porte d'entrée pour des cellules immunitaires suite à un AVC

En 2017 une équipe a montré dans un modèle d'AVC murin, qu'un jour après l'induction de l'AVC il y avait une augmentation de l'expression de gènes impliqués dans la transmigration des macrophages, tels que CX3CL1, VCAM-1 et MadCAM1. Cette augmentation de l'expression est en accord avec le fait qu'ils retrouvent une augmentation du nombre de macrophages dans les PCs jusque trois jours post-AVC ainsi qu'une augmentation de leur nombre dans le LCS un jour après. Ils expliquent ensuite qu'après injection de macrophages, exprimant une GFP, dans le système ventriculaire ils retrouvent ces macrophages au niveau de la lésion émettant l'hypothèse que les monocytes rejoignent la lésion *via* le LCS (Ge *et al.*, 2017).

Cette même année, et toujours dans un modèle d'AVC ischémique murin par occlusion de l'ACM, Llovera et collaborateurs ont montré que les PCs étaient la voie d'entrée principale pour les LT vers la lésion. Cinq jours après l'occlusion ils ont recensé 60% de LT en plus dans les PCs ipsilatéraux comparés au PCs contralatéraux (**Figure 18 A**). Pour suivre les LT depuis les PCs vers la lésion ils ont utilisé des souris exprimant une GFP photo-activable dans

les LT (**Figure 18 B**). Quatre jours après l'occlusion permanente de l'ACM les LT sont photo-activés au niveau des PCs et leur distribution est observée jusque 12h post-illumination (**Figure 18 C**). Ils observent une augmentation progressive du nombre de LT photo-activés en position péri-lésionnelle. Ils estiment que la proportion de LT infiltrés est pour 2/3 en provenance des PCs et le tiers restant provenant d'autres voies d'infiltration. Leurs expériences suggèrent que les LT s'infiltreraient *via* le stroma des PCs et non par le LCS (**Figure 18 D et E**). En effet, ils montrent que le stroma des PCs communique avec la paroi médiale des ventricules latéraux et que l'obstruction du ventricule n'influe pas le nombre de LT retrouvés au niveau de la lésion. Ils font ensuite le parallèle entre leur modèle et la réalité de la physiologie humaine et ils montrent que chez l'humain la population de LT est aussi augmentée dans les PCs suite à un AVC (**Figure 18 F et G**) (Llovera *et al.*, 2017).

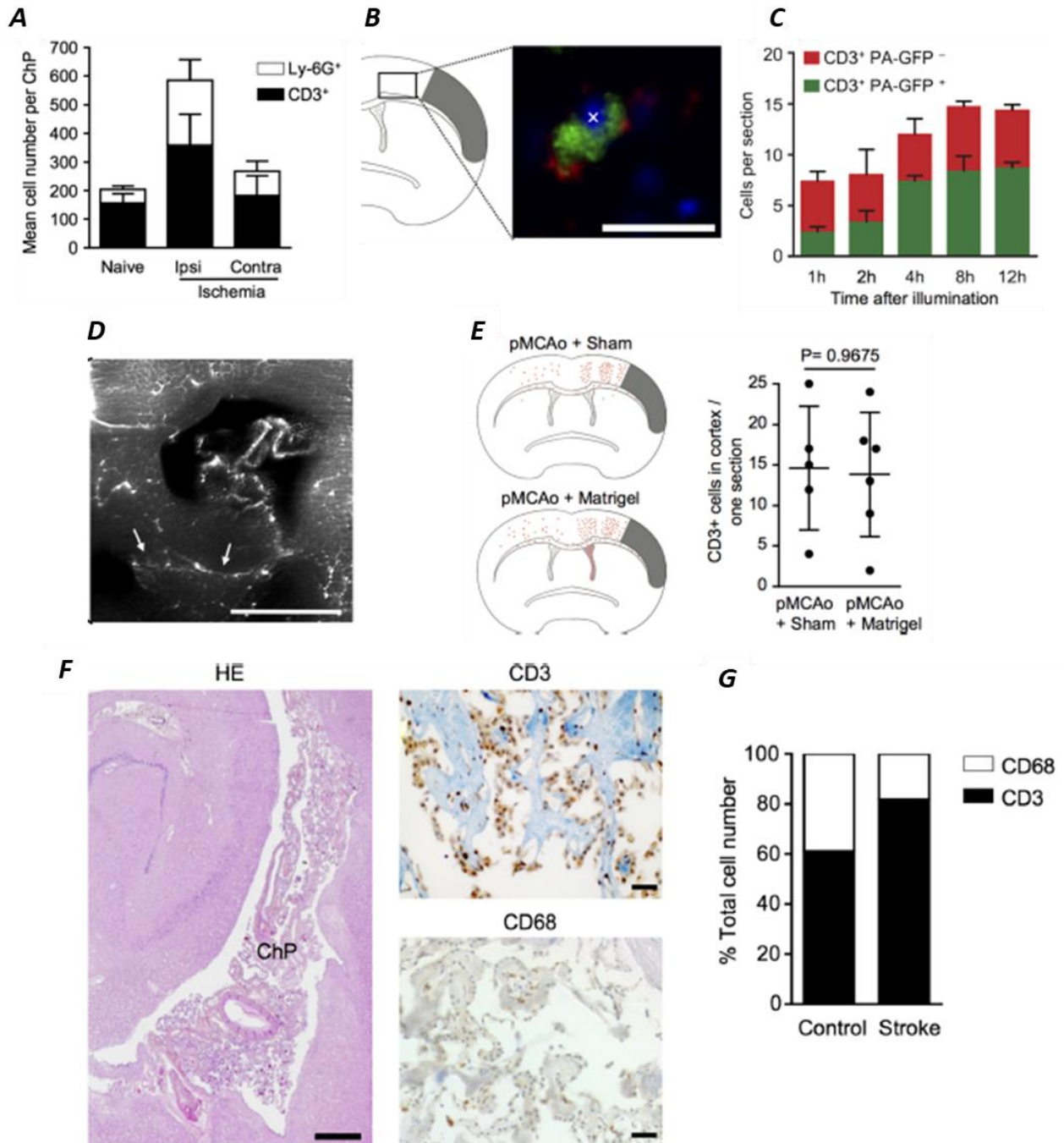


Figure 18: Choroid plexuses are an entry route for T cells after stroke. **A** Number of T (CD3) and myeloid cells (Ly-6G) in choroid plexuses 5 days after stroke (mean±SEM). **B** Representative image of a T-cell (red) photoactivated in the CP GFP⁺ (green) (10 μm scale bar). **C** Quantification of T-cells GFP⁻ (red) and GFP⁺ (green), 4 days after stroke (time indicated after illumination). **D** Coronal image of a clarified brain perfused with lectin. Arrows highlight penetrating cerebral vessels from the CP, indicating the CP-parenchymal cerebral junction (0.5 mm scale bar). **E** Accumulative topographic maps and quantification of CD3⁺ T cells per one ipsilateral coronal brain section at bregma location 5 days after pMCAo + Sham or pMCAo + matrigel treatment. **F** Representative image of a hematoxylin-eosin-labeled section of human CP (temporal horn) (left, 1mm scale), and CD3⁺ T cells, monocyte/macrophage CD68⁺ staining (right, 40 μm scale). **G** Analysis of the ratio of CD68⁺ and CD3⁺ cells in the ipsilateral CP of healthy patients or stroke patients.

Pour résumer, les PCs sont des structures centrales au sein du SNC, à la fois au sens propre de par leur localisation, et au sens figuré du fait de leur implication dans de nombreux processus physiologiques ou pathologiques : production du LCS, élimination, de déchets métaboliques et immunosurveillance du SNC.

De récentes données leur attribuent un rôle majeur de porte d'entrée des cellules inflammatoires vers le SNC.

Nous nous sommes demandés si en plus de la BHE, les PCs pourraient eux aussi être une voie d'entrée du tPA vasculaire vers le parenchyme cérébral.

Objectifs

Objectifs

Le tPA exogène peut passer du compartiment vasculaire au parenchyme cérébral. Il peut ainsi influencer des processus physiologiques, et participer au devenir neuronal en conditions pathologiques, en particulier aggraver la mort neuronale lors d'un AVC ischémique. Comprendre par où et comment le tPA vasculaire peut rejoindre le parenchyme cérébral pourrait donc avoir un intérêt thérapeutique majeur.

Historiquement, le laboratoire a montré que le tPA peut traverser la barrière hémato-encéphalique (BHE), notamment par transcytose au travers des cellules endothéliales de la BHE et cela sous le contrôle des récepteurs LRP (Benchenane *et al.*, 2005). Des mutants du tPA incapables de franchir la BHE ce sont d'ailleurs révélés comme non neurotoxiques dans un modèle d'AVC (López-Atalaya *et al.*, 2008).

Pour ma part, je me suis intéressé à une autre voie d'entrée potentielle du tPA : les plexus choroïdes (PCs). En effet, les PCs forment une barrière physique entre le compartiment sanguin et le LCS, mais nous savons maintenant qu'ils sont une route de migration pour les cellules inflammatoires et que le LCS peut véhiculer des solutés, *via* les espaces péri-artériels, vers le parenchyme cérébral (Carare *et al.*, 2008; Iliff *et al.*, 2012).

Ainsi, mon objectif principal de thèse a été d'étudier l'hypothèse d'un passage du tPA exogène par les PCs. Pour cela, j'ai produit un tPA traçable *in vivo* et *in vitro*, et je me suis d'abord appuyé sur un modèle *in vivo* pour étudier sa distribution après injection intraveineuse, en me focalisant sur les PCs et le LCS. Par la suite, j'ai mis en place au laboratoire un modèle de culture primaire des cellules épithéliales de plexus choroïdes (CPECs) de souris pour disséquer *in vitro* le(s) mécanisme(s) sous-jacents à l'internalisation du tPA exogène par les CPECs.

En parallèle de ce projet principal, j'ai aussi cherché à savoir si le tPA endogène pouvait influencer la structure et la physiopathologie des PCs. En effet, certains auteurs rapportent la présence d'ARNm du tPA (Dubois-Dauphin *et al.*, 2004) ou une activité protéolytique du tPA (Teesalu *et al.*, 2004) dans les PCs. Mais aucune étude n'a cherché à déterminer l'impact possible de ce tPA endogène. Aussi, j'ai débuté une caractérisation du phénotype des PCs dans une nouvelle lignée de souris générée au laboratoire, n'exprimant

Objectifs

pas de tPA. Je me suis intéressé à quelques paramètres macrostructuraux, ainsi qu'aux cellules immunitaires résidentes et à la fonction de drainage du LCS par une nouvelle méthode d'IRM.

Matériels et méthodes

L'ensemble des expériences menées *in vivo* a fait l'objet d'une demande d'autorisation de projet validée par le CENOMEXA (Comité d'Ethique NORmandie en Matière d'EXpérimentation Animale) et a reçu l'autorisation #11043 du Ministère de l'Enseignement Supérieur, de la Recherche et de l'Innovation. Les expériences sont réalisées dans le respect du bien-être animal et en accord avec les réglementations française (décret 87/848) et européenne (2010/63/ EU).

I. Étude du passage du tPA dans les plexus choroïdes

Pour évaluer le passage du tPA à travers les PCs, le tPA est couplé à un fluorophore, l'AlexaFluor® 555, puis injecté à des souris par voie intraveineuse (IV). Pour suivre la cinétique du passage, le LCS, le cerveau et le cervelet sont prélevés à différents temps : 10, 30, 60 ou 120 minutes après l'injection IV. Le fluorophore couplé au tPA permet de le visualiser par la suite en microscopie confocale sur coupes histologiques ou sur gel d'électrophorèse du LCS (un dosage enzymatique a également été réalisé). Le tPA est co-injecté avec de l'albumine bovine sérique (*Bovine Serum Albumin*, BSA), elle-même couplée à l'Alexafluor® 488 (par la suite, BSA⁴⁸⁸). L'albumine est choisie comme protéine contrôle car elle a une masse moléculaire proche de celle du tPA et n'est que très peu capable de franchir les PCs en conditions physiologiques (Liddelow *et al.*, 2014).

1. Production de tPA et de BSA fluorescents, pour un traçage *in vivo* et *in vitro*

Dix mg d'Actilyse® (Boehringer Ingelheim) sont dialysés dans un tampon bicarbonate 0,3M et pH 8,4, à 4°C pendant 48h, afin d'éliminer les excipients, en particulier l'arginine (le tampon de dialyse est changé toutes les douze heures). Ensuite, le tPA est mélangé avec 1mg d'AlexaFluor® 555 Succinimidyl Ester ($\lambda_{\text{excitation}}$: 555nm ; $\lambda_{\text{émission}}$: 592nm ; Life Technologies™), dilué dans 100µL de diméthylsulfoxyde, pendant 6h à température ambiante et sous agitation constante. Dans ces conditions, une liaison amine se crée entre l'ester de succinate de l'AlexaFluor® et les amines libres du tPA. Afin d'éliminer l'AlexaFluor® 555 en excès, la solution est dialysée dans un tampon bicarbonate d'abord, puis dans un tampon phosphate salin (pour rendre la solution injectable). Finalement, 100 mg d'arginine hydrochloride sont ajoutés afin d'empêcher le tPA⁵⁵⁵ de précipiter.

La BSA, déjà couplée à l'Alexa 488 ($\lambda_{\text{excitation}}$: 494nm et $\lambda_{\text{émission}}$: 517nm) a été achetée chez Life Technologies™.

Les protéines fluorescentes sont conservées à -80°C jusqu'à utilisation.

2. Étude du passage du tPA *in vivo*

a. Injection de tPA⁵⁵⁵ et BSA⁴⁸⁸ par voie intraveineuse (IV)

Des souris Swiss (mâles de 8 semaines) sont anesthésiées profondément avec un mélange d'isoflurane (5% en O₂/N₂O (30%/70%)) puis maintenues sous isoflurane (2,5% en O₂/N₂O (30%/70%)) pendant la chirurgie ; leur température est régulée grâce à une sonde rectale couplée à une couverture chauffante. Après avoir placé l'animal dans un cadre stéréotaxique, une incision de la queue (environ 5mm) est réalisée au-dessus de la veine caudale puis les aponévroses sont dégagées. À l'aide d'une aiguille de 25G (environ 1/3 du diamètre de la veine), la veine caudale est incisée, permettant l'insertion d'un cathéter de 0,3 mm de diamètre sur 2 cm environ. L'injection d'un mélange de 50 µg de tPA⁵⁵⁵ et de 50 µg de BSA⁴⁸⁸ dans 200 µL de sérum physiologique (0,9% NaCl) est faite sur environ 5 secondes.

Suite à l'injection IV les souris sont maintenues sous isoflurane (2,5% en O₂/N₂O (30%/70%)), dans le cadre stéréotaxique et surveillées dans l'attente du prélèvement de LCS puis du cerveau et du cervelet (entre 10 min et 120 min selon les groupes).

b. Prélèvement intracisternal de LCS

Un analgésique local (lidocaïne) est appliqué suivant le plan d'incision 5 minutes avant de commencer la chirurgie. Les plans musculaires supérieurs de la nuque sont détachés et écartés afin de démasquer la grande citerne au niveau de la jonction entre le crâne et la première vertèbre. Une fois la grande citerne démasquée une micropipette en verre est insérée dans la citerne afin de récolter le LCS (jusque 7-8 µL). La micropipette est vidée dans un tube et le tube est placé dans de la glace carbonique puis stocké à -80°C jusqu'à utilisation.

Suite au prélèvement de LCS, l'anesthésie gazeuse est remontée à 5% en O₂/N₂O (30%/70%) puis les souris sont transférées au poste de perfusion où elles sont immédiatement remises sous anesthésie.

c. Prélèvement et conservation des organes

Les souris sont mises à mort par perfusion intracardiaque de sérum physiologique hépariné à 4°C pour éliminer le contenu du compartiment sanguin. Une fois le compartiment sanguin purgé de tout son contenu le sérum physiologique hépariné est remplacé par une solution de tampon phosphate, à 0,1 M et pH 7,4, avec 4% de paraformaldéhyde. Après

perfusion, cerveau et cervelet sont extraits de la boîte crânienne et placés dans une solution de tampon phosphate salin (*Phosphate Buffered Saline*, PBS) contenant 20% de sucre pendant 48h (renouvelé quatre fois). Les tissus sont ensuite inclus dans du Cryomatrix™ (Thermo Scientific™) et conservés à -80°C. Des coupes de 10 µm d'épaisseur sont réalisées à l'aide d'un cryostat (Leica, CM3050S), disposées sur des lames poly-lysine qui sont conservées à -80°C jusqu'à utilisation.

d. Immunohistochimie

Après décongélation, les coupes de tissus sont rincées et réhydratées dans du PBS. Elles sont ensuite incubées dans une solution de PBS contenant 0,25% de Triton™ X-100 pendant la nuit à température ambiante et en atmosphère humide, avec un anticorps anti-TTR pour marquer les CPECs (1:1000 ; Abcam 9015) ou anti CD-31 pour marquer l'endothélium (1:1000 ; BD Pharmingen 553370).

Le lendemain, après trois rinçages avec du PBS, les coupes sont incubées dans du PBS contenant 0,25% de Triton™ X-100, pendant 90 minutes à température ambiante et atmosphère humide, de fragments Fab'2 dirigés contre l'espèce hôte de l'anticorps primaire (1:1000 ; Jackson ImmunoResearch). Après plusieurs rinçages, les coupes sont recouvertes d'un milieu de montage (Fluoromount-G®, SouthernBiotech) contenant, ou non, du DAPI et d'une lamelle couvre-objet.

Les lames sont ensuite observées et microphotographiées avec microscope confocal inversé (Leica TCS SP8) pour être analysés avec Fiji Is Just ImageJ (Schindelin *et al.*, 2012).

Pour chaque animal, une douzaine de clichés est réalisée, en moyenne, sur 5 coupes (4 de cerveau et une de cervelet). Sur chaque image, les CPECs sont manuellement comptées, grâce à l'immunomarquage de la TTR, ainsi que les spots de tPA⁵⁵⁵ et de BSA⁴⁸⁸.

e. Dosage du tPA dans le LCS

i. Électrophorèse

Après ajout de tampon de charge (Sucrose, SDS, Bleu de Bromophénol), les échantillons de LCS sont soumis à une électrophorèse (SDS-PAGE) en conditions non réductrices (200V, 50min) sur un gel de polyacrylamide 10%. La fluorescence du tPA⁵⁵⁵ est détectée dans le gel grâce à une caméra ImageQuant™ LAS 4000 (GE Healthcare), et la quantification du signal est faite avec Fiji is just ImageJ.

ii. Spectrofluor

Un dosage de l'activité enzymatique du tPA est réalisé par Spectrozyme®. L'activité enzymatique du tPA est mesurée grâce au clivage d'un substrat fluorogénique (Spectrofluor FL444, $\lambda_{\text{excitation}}$: 360 nm et $\lambda_{\text{émission}}$: 440 nm). Les échantillons de LCS sont dilués dans 50 μL de tampon Tris-NaCl (Tris 50 mM, NaCl 150 mM, pH 8) et sont répartis dans une plaque 96 puits. Une gamme étalon de tPA, allant de 10 ng à 2 mg, est préparée afin de déterminer la quantité de tPA contenue dans les échantillons. Un distributeur automatique couplé à l'automate de lecture de plaque distribue 50 μL de substrat dans chaque puits avant la lecture de la fluorescence. Une mesure est faite toutes les 45 secondes sur une durée de 1h30. L'activité du tPA est déterminée et quantifiée avec le coefficient directeur de la densité optique en fonction du temps.

La quantité de tPA dans les échantillons de LCS est trop faible et ne suffit pas à dépasser le seuil de détection apporté par cette technique.

iii. Zymographie

Les échantillons de LCS sont préparés en ajoutant du tampon de charge et sont soumis à une électrophorèse (SDS-PAGE) en conditions non réductrices (110 V, 120 min, 4°C) sur un gel de polyacrylamide 8%. Pendant la migration est préparé un gel de fibrine-agar. Une solution de fibrinogène (contenant de traces de plasminogène) à 2,5 mg/mL est mélangée avec une solution d'agarose 2%, dans cette préparation est ajouté de la thrombine (10 UI/mL). La préparation est alors versée dans une boîte de pétri carrée et polymérise à température ambiante en 30 minutes.

La migration terminée les gels sont incubés deux fois 30 minutes à 4°C dans un bain de Triton™ X-100 à 2,5%. Les gels sont ensuite rincés pendant une heure à 4°C dans de l'eau pure stérile (changement d'eau toutes les 10 minutes). Une fois rincés les gels sont posés sur l'agarose (contenant fibrinogène et trombine) et laissés à 4°C pendant la nuit. Le lendemain les gels sont mis à incuber à 37°C pendant au moins 2h jusqu'à apparition de plages de lyse. Les gels sont ensuite scannés et les plages de lyse sont mesurées avec Fiji Is Just ImageJ.

La zymographie sur LCS n'a pas été poursuivie car non adaptée aux petits volumes disponibles.

3. Étude du passage du tPA *in vitro*

a. Culture primaire de CPECs

Les CPECs sont isolées en se basant sur un protocole décrit chez le rat par Monnot et Zheng (2013), avec quelques modifications. Après mise à mort par dislocation cervicale, précédée d'une anesthésie profonde avec un mélange d'isoflurane (5% en O₂/N₂O (30%/70%)), et récupération des cerveaux de dix souris Swiss de 8 semaines, les plexus choroïdes des 3^e et 4^e ventricules et des ventricules latéraux sont disséqués sous une loupe binoculaire. Les plexus sont dilacérés dans 1mL d'HBSS glacé (*Hank's Balanced Salt Solution*, Sigma) puis subissent une digestion enzymatique par de la pronase (Pronase E from *Streptomyces griseus*, Serva Electrophoresis) à 2mg/mL pendant 20 minutes à 37°C et sous atmosphère à 5% CO₂. La digestion est stoppée par ajout de 4 mL d'HBSS glacé. Les grappes de plexus sont centrifugées à 4°C pendant 5min à 800g, le surnageant, qui contient principalement des débris, est aspiré puis le culot et resuspendu dans 6 mL d'HBSS glacé, centrifugé de nouveau à 800g pendant 5min. Le culot est ensuite resuspendu dans 2 mL de milieu de croissance (pyruvate de sodium 110 µg/mL, glutamine 2 mM, sérum de veau foetal 10%, facteur de croissance épidermique 0,01 mg/mL et 1% de pénicilline/streptomycine dilués dans du Milieu Essentiel Modifié par Dulbecco (DMEM)) à 37°C puis dissocié mécaniquement à l'aide d'une seringue munie d'une aiguille de 21 G. Les cellules dissociées sont dans un premier tempsensemencées dans une coupelle de 35 mm et incubées à 37°C et 5% CO₂ pendant 4h afin que les fibroblastes et macrophages adhèrent au plastique. Après 4h, les CPECs en suspension dans la coupelle sont récupérées etensemencées dans des plaques de 24 puits préalablement traitées avec du collagène de type I issu de queue de rat (Cultrex™) à 0,1 mg/mL dans de l'acide acétique 0,02 M. Après 48h, les plaques sont rincées avec du PBS et le milieu est remplacé par du milieu supplémenté avec du cytosine arabinoside (Ara-C). Les cellules sont ensuite rincées et le milieu changé un jour sur deux jusqu'à utilisation après 8 jours de culture. La présence continue de l'inhibiteur de synthèse de l'ADN Ara-C inhibe spécifiquement la croissance de cellules contaminantes telles que les fibroblastes stromaux. Contrairement aux CPECs, ces cellules expriment des transporteurs de nucléosides incapables de distinguer les résidus de ribose et d'arabinose et incorporent ainsi l'Ara-C dans leur ADN génomique, ce qui entraîne la suppression spécifique de leur croissance (Lazarevic and Engelhardt, 2016).

Après 8 jours en culture, les CPECs présentent des caractéristiques identiques à celles des plexus *in situ*, à savoir une forme cuboïde, l'expression de la TTR et la présence de jonctions serrées (**Figure 19**).

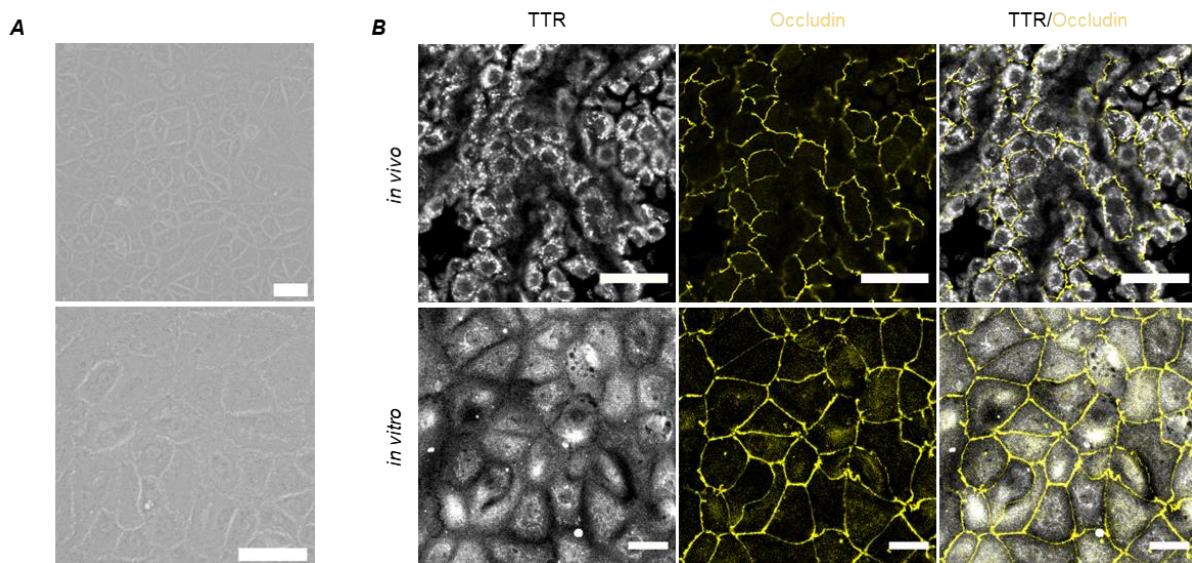


Figure 19: Primary cultured CPECs share common characteristics with CPECs *in situ*. **A** Microphotographs of CPECs in phase contrast 8 days after seeding (scale bars 100 μm). **B** Microphotographs showing immunoreactivity to TTR (gray) and to occludin (yellow) both *in vivo* (upper panel) and *in vitro* (bottom panel) (scale bars 30 μm).

b. Évaluation de l'internalisation du tPA par les CPECs

Les cultures de CPECs sont rincées deux fois avec du PBS à 37°C, puis maintenues pendant 1h dans un milieu dépourvu de sérum, et traitées avec du tPA⁵⁵⁵ à dose fixe / durée variable ou dose variable / durée fixe. Après traitement, les cellules sont rincées trois fois avec du PBS froid. Les protéines totales sont extraites à 4°C dans un tampon Tris-HCl 50 mM, pH 7,4, NaCl 150 mM et 0,5% Triton™ X-100 (tampon TNT) supplémentés en inhibiteurs de protéases et phosphatases 1 μg/mL. Après centrifugation (12000g à 4°C pendant 20 min), les surnageants sont collectés puis dosés grâce au kit Pierce BCA Protein assay kit. Après ajout de tampon de charge (Sucrose, SDS, Bleu de Bromophénol) les protéines totales sont séparées selon leur masse moléculaire par électrophorèse (SDS-PAGE) sur un gel de polyacrylamide 10% en conditions non réductrices (200 V, 50min). La fluorescence du tPA⁵⁵⁵ est détectée directement dans le gel avec une caméra ImageQuant™ LAS 4000, et la quantification du signal est faite avec Fiji Is Just ImageJ.

c. Étude des mécanismes moléculaires de l'internalisation

Pour chaque approche, après traitement, les cellules sont rincées trois fois avec du PBS froid. Les protéines totales sont extraites à 4°C dans un tampon TNT supplémentés en inhibiteurs de protéases et phosphatases à 1 µg/mL. Après une centrifugation à 12000g et à 4°C pendant 20min, les surnageants sont collectés puis les protéines dosées avec le *Pierce BCA Protein assay kit*. Après ajout de tampon de charge (Sucrose, SDS, Bleu de Bromophénol) les protéines totales sont séparées selon leur masse moléculaire par électrophorèse (SDS-PAGE) sur un gel de polyacrylamide 10% en conditions non réductrices (200 V, 50min). La fluorescence du tPA⁵⁵⁵ est détectée directement dans le gel avec une caméra ImageQuant™ LAS 4000, et la quantification du signal est faite avec Fiji Is Just ImageJ.

i. Évaluation de l'effet de la température

Pour déterminer si le transport de tPA est un processus actif, les CPECs sont traitées pendant 15 minutes avec 40 nM de tPA⁵⁵⁵ soit à 37°C, soit à 4°C.

ii. Évaluation de l'implication des récepteurs LRPs

Approche pharmacologique

Pour démontrer la contribution potentielle des LRPs au transport de tPA, les CPECs sont traitées avec 40 nM de tPA⁵⁵⁵ pendant 15 minutes avec ou sans un antagoniste compétitif, le *Receptor Associated Protein* (RAP, Herz *et al.*, 1991) à une concentration de 500 nM (Cassé *et al.*, 2012).

Approche d'ARN interférent

Une approche par transfection de petits acides ribonucléiques interférents (siRNA) est utilisée pour déterminer quel(s) membre(s) de la famille LRP est (sont) impliqué(s) dans l'internalisation du tPA.

Trois duplex de Stealth RNAi™ dirigés contre LRP1 et trois autres contre LRP2 (

Table 2) sont testés.

Table 2: Sequences of the siRNA duplexes

	Sense	Anti-sense
siLRP1_01	UGGCUGACGGGAAACUUCUACUUUG	CAAAGUAGAAGUUUCCCGUCAGCCA
siLRP1_02	CACACCCAUUUGCCGUGACACUGUA	UACAGUGUCACGGCAAUUGGGUGUG
siLRP1_03	CCAAGGUGUGAGGUGAACAAGUGUA	UACACUUGUUCACCUCACACCUUGG
siLRP2_01	CCUCAUCCGUUUGGAAUAAGCUUUAU	AUAAGCUUUAUCCAAACGGAUGAGG
siLRP2_02	GGUACGGGUCUCUGCUCUAUCUUAA	UUAAGAUAGAGC-AGAGACCCGUACC
siLRP2_03	CGACGACAGAUAAUCAGCAACUUAA	UUAAGUUCTCUGAUUAUCUGUCGUCG

Détermination des oligonucléotides à employer

Transfection des CPECs

Les oligoribonucléotides Stealth RNAi™ (20 nM) sont transfectés dans des cultures de CPECs à l'aide de Lipofectamine 2000 (2 µg, Invitrogen™). Le duplex de contrôle négatif Stealth RNAi™ siRNA Negative Control, Medium GC (Invitrogen™) est utilisé comme condition contrôle (scramble). Après 48h de transfection les cellules sont rincées avec du PBS puis les ARNs extraits pour déterminer le duplex de siRNA le plus efficace.

Extraction d'ARN et RT-PCR

Les ARN totaux sont extraits avec du TRI-Reagent® (Sigma) selon le protocole fourni. Brièvement, les cellules sont lysées dans le TRI Reagent® et les ARNs sont isolés par ajout de chloroforme. Les ARNs totaux sont rincés avec de l'éthanol puis resuspendus dans 10 µL d'eau pure stérile. La quantité d'ARNs totaux est ensuite évaluée avec un spectrophotomètre (NanoPhotometer N50, Implen).

La réaction de RT-PCR (*Reverse Transcriptase Polymerase-Chain Reaction*) est réalisée à partir de 1 µg d'ARN avec le kit de rétrotranscriptase M-MLV Reverse Transcriptase (Sigma) dans un volume final de 20 µL. Le cycle de température de la réaction de RT-PCR est le suivant : 20°C pendant 10 min ; 37°C pendant 50 min ; puis 85°C pendant 10 min. Les ADNc (ADN complémentaires) produits sont ensuite stockés à -20°C jusqu'à utilisation.

PCR quantitative

La PCR quantitative en temps réel (RT-qPCR) est réalisée à partir de 1 µL d'ADNc dilué au 1/20^e dans un volume final de 15 µL de iQ SYBR Green Supermix 1x (Bio-Rad) contenant

200 nM d'amorces sens et anti-sens (**Table 3**). D'après les séquences codantes pour les ARNm, des amorces spécifiques au génome murin ont été déterminées en utilisant le logiciel Primer3Plus (<http://www.bioinformatics.nl/cgi-bin/primer3plus/primer3plus.cgi>).

Table 3: Sequences of the sense and antisense primers used for the genes of interest and the selected housekeeping gene.

Gene	Sense	Anti-sense
ACTB (β-actine)	GCAGCTCCTTCGTTGCCGGT	TACAGCCCGGGGAGCATCGT
LRP1	CGAGGAGCAGGTTGTTAGTCAG	CAGAAGCAGCAGGAGAAGCAG
LRP2	TGGGCGTGTCTGGGTCTG	GTGGCATTGTTCTCATCTCTCC
LRP4	GGCCCAACGGCCTCACCATC	CCCCGAGCGGTTTTCCCT

Les mesures, réalisées en triplicats, sont acquises par un thermocycleur en temps réel CFX96 c1000 (Bio-Rad) selon le cycle de température suivant : 95°C pendant 3min ; 40 cycles de : 95°C pendant 2 s, 60°C pendant 20 s ; puis 70°C pendant 30 s.

La β -actine a été utilisée comme gène de ménage, les niveaux d'expression des gènes d'intérêts ont été calculés comme suit : expression relative d'ARNm = $2^{-(Ct \text{ gène d'intérêt} - Ct \beta\text{-actine})}$, où Ct (*Cycle threshold*) est le seuil de détection.

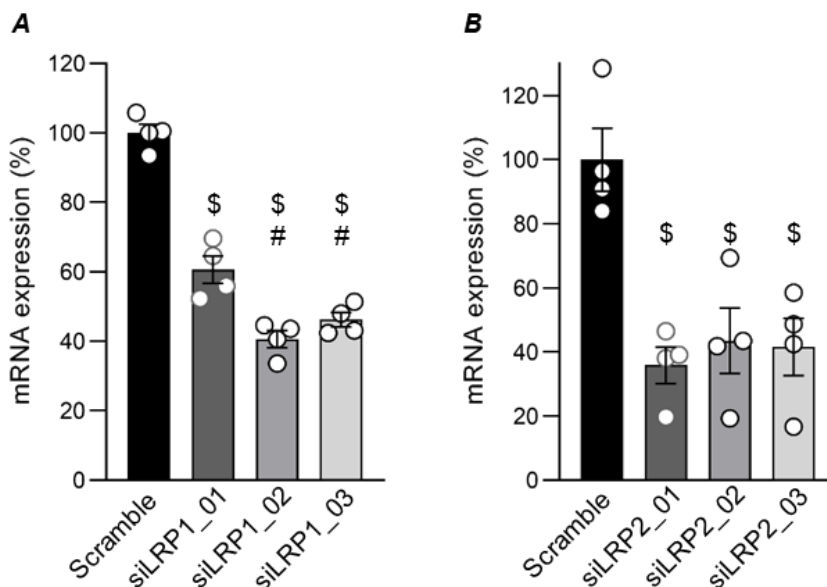


Figure 20: Determination of the most efficient Stealth RNAi™ for RNA extinction. Quantitative PCR for relative expression of LRP1 and LRP2mRNAs expressed as percentage of Scramble (mean \pm SEM, n=4) in primary cultured CPECs, computed by calcul of $2^{-\Delta\Delta Ct}$ (Ct: cycle threshold). Housekeeping gene (actin), used for normalization, was not influenced *in vitro*, \$ different from Scramble, # different from siLRP1_01. (p=0,029) Mann-Whitney U test.

Transfection des CPECs pour traitement avec tPA

Sur la base des résultats de PCR (**Figure 20**), les CPECs sont alors transfectées soit avec le duplex siLRP1_02 ou le Scramble soit avec le duplex siLRP2_01 ou le Scramble comme décrit précédemment (Transfection des CPECs). Après 48h de transfection, les CPECs sont rincées 3 fois avec du PBS puis exposées 15min à 40 nM de tPA⁵⁵⁵ ; les protéines totales sont récupérées, séparées par électrophorèse puis le gel est photographié avec la caméra ImageQuant™ LAS 4000 et la fluorescence est quantifiée avec Fiji Is Just ImageJ.

Après photographie à la caméra, le gel est ensuite récupéré pour subir une technique d'immunoempreinte afin de confirmer l'extinction au niveau protéique des récepteurs LRP1 et LRP2.

Protocole d'immunoempreinte.

Les protéines sont transférées (120 min, 200 mA) sur une membrane de cellulose en milieu humide (Tris 24 mM, glycine 192 mM, éthanol 20%). La membrane est ensuite incubée dans une solution de TTBS-BSA 2% (Tween Tris Buffered Saline, Tris 10 mM, NaCl 200 mM, Tween 0,1%- BSA 2%, pH 7,4) pendant 1 h puis incubée sur la nuit à 4°C avec l'anticorps primaire anti-LRP1 (Abcam 92544) dilué au 1:1000 dans le tampon TTBS-BSA 2%. Après rinçage avec le tampon TTBS, la membrane est incubée avec l'anticorps secondaire couplé à de la peroxydase, dilué au 1:50000 dans du TTBS-BSA 2%, pendant 1 h à température ambiante. La détection se fait à l'aide du kit Pierce ECL Plus Western blotting substrate, la membrane est ensuite placée dans la caméra ImageQuant™ LAS 4000 puis la quantification du signal est faite avec Fiji Is Just ImageJ.

Cette technique d'immunoempreinte n'a pas été concluante pour LRP2 du fait de sa haute masse moléculaire (environ 520 kDa). C'est pourquoi seule l'expression des ARNm a été évaluée pour l'extinction de LRP2.

iii. Évaluation de la contribution du domaine Finger du tPA à l'internalisation

Pour déterminer l'implication du domaine Finger du tPA dans le processus d'internalisation par les CPECs, sont utilisés le Δ F-tPA, un mutant du tPA sans domaine finger et une protéine fusion, la F-BSA, ayant le domaine finger du tPA en position N-terminale de l'albumine.

Matériels et méthodes

Production des protéines recombinantes (Δ F-tPA et F-BSA) et couplage aux AlexaFluor® : le système eucaryote de production de protéine recombinante choisi est le système Flp-in (ThermoFisher scientific). Le principe repose sur l'établissement d'une lignée stable en co-transfectant une construction sur-exprimant la protéine d'intérêt et une construction sur-exprimant une flippase. L'expression de cette flippase permet ainsi l'insertion de la séquence codante pour la protéine d'intérêt et de son promoteur entre des signaux de cibles de reconnaissances de la flippase (FRT) présents dans le génome des cellules HEK293/FRT. Après sélection par un antibiotique eucaryote (hygromycine B) les cellules stables sont placées en production sans sérum (60 boîtes de Pétri par protéine, diamètre 10cm), les milieux de culture sont prélevés et changés tous les 4 jours pendant 12 jours.

Lors de la construction des vecteurs d'expression, un tag 6xHistidines est fusionné en N-terminal du Δ F-tPA et de la F-BSA (cDNA obtenu chez GenScript). Ce tag permet la purification des protéines recombinantes par chromatographie liquide à haute performance en utilisant des colonnes d'affinité Nickel-Acide NitriIotriAcétique (Ni-NTA, GE Healthcare) et un gradient d'imidazole en phase mobile. Les éluions positives sont regroupées, concentrées et dialysées dans un tampon phosphate.

Les protéines Δ F-tPA et F-BSA sont respectivement couplées à des AlexaFluor® 488 et 555 selon le protocole décrit précédemment, à la différence qu'il n'y a pas de dialyse initiale puisqu'il n'y pas d'excipients dans les protéines produites.

Des PCs entiers sont prélevés sur des souris (Swiss mâles de 8 semaines) et sont rapidement nettoyés avec du PBS à 37°C. Ils sont ensuite mis en présence pendant 15 min soit à 40 nM de tPA⁵⁵⁵ et de 4 nM à 400 nM de Δ F-tPA⁴⁸⁸, soit de BSA⁴⁸⁸ et de F-BSA⁵⁵⁵. Après traitement ils sont rincés trois fois avec du PBS puis fixés avec solution de tampon phosphate, à 0,1 M et pH 7,4, avec 4% de paraformaldéhyde pendant 15min. Les PCs sont montés entre lame et lamelle dans du Fluoromount-G® puis microphotographiés avec un microscope confocal inversé (Leica TCS SP8) pour être ensuite analysés avec Fiji Is Just ImageJ. La présence des différentes protéines est quantifiée par leur fluorescence au sein des CPECs qui sont délimités manuellement.

4. Étude de l'impact d'une ischémie focale sur le passage du tPA dans les PCs

Pour évaluer l'impact d'une ischémie focale sur la distribution du tPA dans les PCs, le modèle d'ischémie thromboembolique chez la souris, développé au laboratoire (Orset *et al.*, 2007) est appliqué et suivi d'une injection par voie IV de tPA⁵⁵⁵. Les souris sont divisées en quatre groupes selon le schéma de la **Figure 21**.

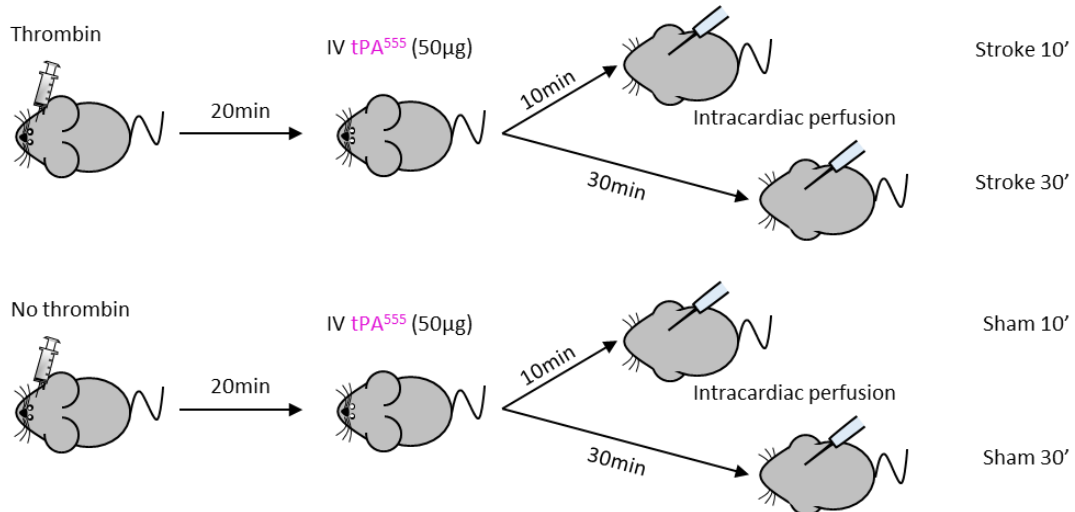


Figure 21: Distribution of mice groups for evaluation of the effect of focal ischemia on tPA distribution in PCs.

Les animaux sont profondément anesthésiés (5% en O₂/N₂O (30%/70%)) puis placés dans un cadre stéréotaxique et maintenus anesthésiés (2,5% en O₂/N₂O (30%/70%)). Une approche subtemporale est réalisée, avec une résection du muscle masséter droit et une craniotomie localisée. La dure-mère est excisée spécifiquement au niveau de la bifurcation de l'artère cérébrale moyenne en ses branches postérieure et antérieure. A l'aide d'une micropipette en verre, de la thrombine (1 µL à 1 UI) est injectée sur une minute directement dans l'ACM, engendrant ainsi la formation locale, rapide et stable d'un thrombus riche en fibrine. Le débit sanguin cérébral est réduit à un niveau résiduel et stable d'environ 20% de la valeur de base.

Les animaux reçoivent, 20min après la fin de l'injection de thrombine ou l'abord chirurgical seul, une injection de tPA⁵⁵⁵ en IV. Ils sont ensuite perfusés 10 ou 30 minutes après l'injection de tPA⁵⁵⁵ de la même manière que décrit précédemment (paragraphe : Injection de tPA⁵⁵⁵ et BSA⁴⁸⁸ par voie intraveineuse (IV)). Leurs cerveau et cervelet sont inclus et préparés de la même manière que pour l'étude de distribution du tPA sans ischémie focale. Les lames

sont ensuite observées avec un microscope confocal inversé SP8 de chez Leica. La fluorescence totale du tPA⁵⁵⁵ est mesurée dans les CPECs.

II. Étude de l'effet du tPA endogène sur les PCs

Des souris pas de tPA (Null tPA), et leurs contrôles des souris Null WT (Wild type) ont été comparées. Cette nouvelle souche de souris n'exprimant pas le tPA a été produite en collaboration avec l'institut Clinique de la Souris (Illkirch- Graffenstaden, 67400 France). Brièvement, l'exon 3 du tPA est flanqué de site LoxP, créant des souris tPA Flox ; ces souris sont ensuite croisées avec des souris Cre donnant naissance à une génération de souris dont l'exon est excisé et qui n'expriment pas de tPA. Les analyses sur ces souris se divisent en deux parties, une première partie en imagerie par résonance magnétique (IRM) et une autre par immunohistologie.

1. Étude en imagerie par résonance magnétique

Les paramètres étudiés avec l'IRM sont la diffusion du LCS et l'analyse volumétrique des cerveaux et ventricules. Les images ont été acquises sur une IRM 7 Tesla Pharmascan de chez Bruker. Pour déterminer le coefficient de diffusion du LCS le protocole est le suivant, le premier jour, une acquisition FAIR-RARE (*Flow Alternating Inversion Recovery - Rapid Imaging with Refocused Echoes*) est faite sur les souris pour établir une référence. Le second jour les souris reçoivent une injection de DOTA-Gadolinium (DOTA-Gd) dans la grande citerne (approche chirurgicale identique à celle pour le prélèvement de LCS), puis sont placées dans l'IRM pour 8 répétitions de la séquence FAIR-RARE. Les acquisitions permettent d'établir des cartes quantitatives de gadolinium pour chacune des répétitions et ainsi de calculer un coefficient de diffusion du gadolinium pour chaque animal.

* Séquence FAIR-RARE (*Flow Alternating Inversion Recovery - Rapid Imaging with Refocused Echoes*) : utilisée pour calculer la valeur du T1, qui est modifiée en fonction de la quantité de DOTA-Gd présente. Géométrie : 1 coupe (médio-sagittale) de 0,8 mm d'épaisseur, partagée en 64*64 voxels de résolution 0,3*0,3 mm, temps d'acquisition (TA) : 5 min, temps d'écho (TE) = 5,3 ms et 10 temps d'inversion.

Pour l'analyse volumétrique la séquence anatomique pondérée en T2 est utilisé.

* Séquence anatomique T2HR (T2 haute résolution) : utilisée pour faire de la volumétrie. Géométrie : 20 coupes (sagittales) de 0,5 mm d'épaisseur, partagée en 256*256 voxels de résolution 0,07*0,07 mm, TA : 3 min, TE = 40 ms.

Les analyses volumétriques sont réalisées sur les séquences anatomiques avec le logiciel Fiji Is Just ImageJ.

2. Étude par immunohistologie

Pour la partie immunohistologie, le protocole de perfusion et de fixation des tissus est modifié pour préserver les protéines de jonctions. Les animaux ne sont perfusés qu'avec du sérum physiologique hépariné. Cerveaux et cervelets sont placés dans une solution de PBS avec 10% de sucrose pendant 12h, puis 20% de sucrose pendant 12h de plus et enfin du sucrose 30% pour 24h. Ils sont ensuite inclus et coupés au cryostat (Leica CM3050S) puis les lames sont stockées à -80°C. Le jour de l'immunomarquage les lames sont décongelées et les coupes de tissus sont fixées avec solution de tampon phosphate, à 0,1 M et pH7,4, avec 4% de paraformaldéhyde pendant 15min puis sont ensuite rincées avec du PBS. Le protocole d'immunomarquage est le même que décrit précédemment. Les anticorps primaires utilisés sont dirigés contre la TTR pour marquer les CPECs (1:1000 ; Abcam 9015), l'aquaporine 1 (1:10000 ; Abcam 168387), Iba1 pour marquer microglies et macrophages (1:1000 ; Abcam 178846) et CD3 pour marquer les lymphocytes T (1:200 ; Abcam 5690).

III. Analyses statistiques.

Les résultats sont exprimés sous la forme moyenne ou médiane \pm SEM. Les échantillons étant non appariés et ayant un faible effectifs un test de U de Mann-Whitney a été utilisé. Les statistiques ont été faites avec le logiciel Statistica.

Résultats

I. Étude du passage du tPA exogène par les plexus choroïdes

Il a été montré que l'activateur tissulaire du plasminogène (tPA) vasculaire pouvait rejoindre le parenchyme cérébral *via* la BHE par un mécanisme de transcytose médié par LRP1 (Benchenane *et al.*, 2005). Comme les plexus choroïdes (PCs) sont une autre voie d'entrée possible dans le système nerveux central, nous avons testé l'hypothèse selon laquelle le tPA vasculaire pourrait aussi transiter par les PCs.

1. *In vivo*, le tPA exogène rejoint le LCS *via* les plexus choroïdes

Pour pouvoir suivre la distribution du tPA *in situ* nous avons utilisé des molécules recombinantes fluorescentes : du tPA couplé avec une AlexaFluor® 555 (couplage réalisé au laboratoire) et de l'albumine sérique bovine (BSA) couplée à une AlexaFluor® 488 (produit commercial). Une électrophorèse en SDS-PAGE sur gel de polyacrylamide nous montre que les protéines fluorescentes ont la masse moléculaire attendue et que la fluorescence est proportionnelle à la quantité de protéine couplée déposée (**Figure 22**).



Figure 22: Dose-dependant fluorescent signal of tPA⁵⁵⁵ (magenta) and BSA⁴⁸⁸ (green) on SDS-PAGE.

Ensuite, des souris Swiss mâles de 8 semaines, réparties en quatre groupes (10, 30, 60 ou 120 min, n=5 par groupe) ont reçu une injection intraveineuse d'une solution contenant 50 μg de tPA⁵⁵⁵ et 50 μg de BSA⁴⁸⁸. Selon leur groupe, le cerveau, le cervelet et le liquide cébrospinal (LCS) sont collectés entre 10 et 120 minutes post-injection. Les cerveaux et cervelets sont coupés puis observés par microscope confocale. Dès 10 minutes après l'injection, nous détectons des ponctuas de tPA dans les PCs, et ce jusqu'à 60 minutes post-injection, mais pratiquement plus aucun ponctua n'est détecté après 120 minutes (**Figure 23**, colonne de gauche). Les ponctuas sont présents dans l'épithélium et parfois dans le stroma. Nous n'avons pas retrouvé d'albumine dans les PCs quel que soit le temps après l'injection

(**Figure 23**, colonne du milieu), alors qu'on en retrouve (ainsi que du tPA fluorescent) dans les organes circumventriculaires comme l'éminence médiane (**Figure 24**).

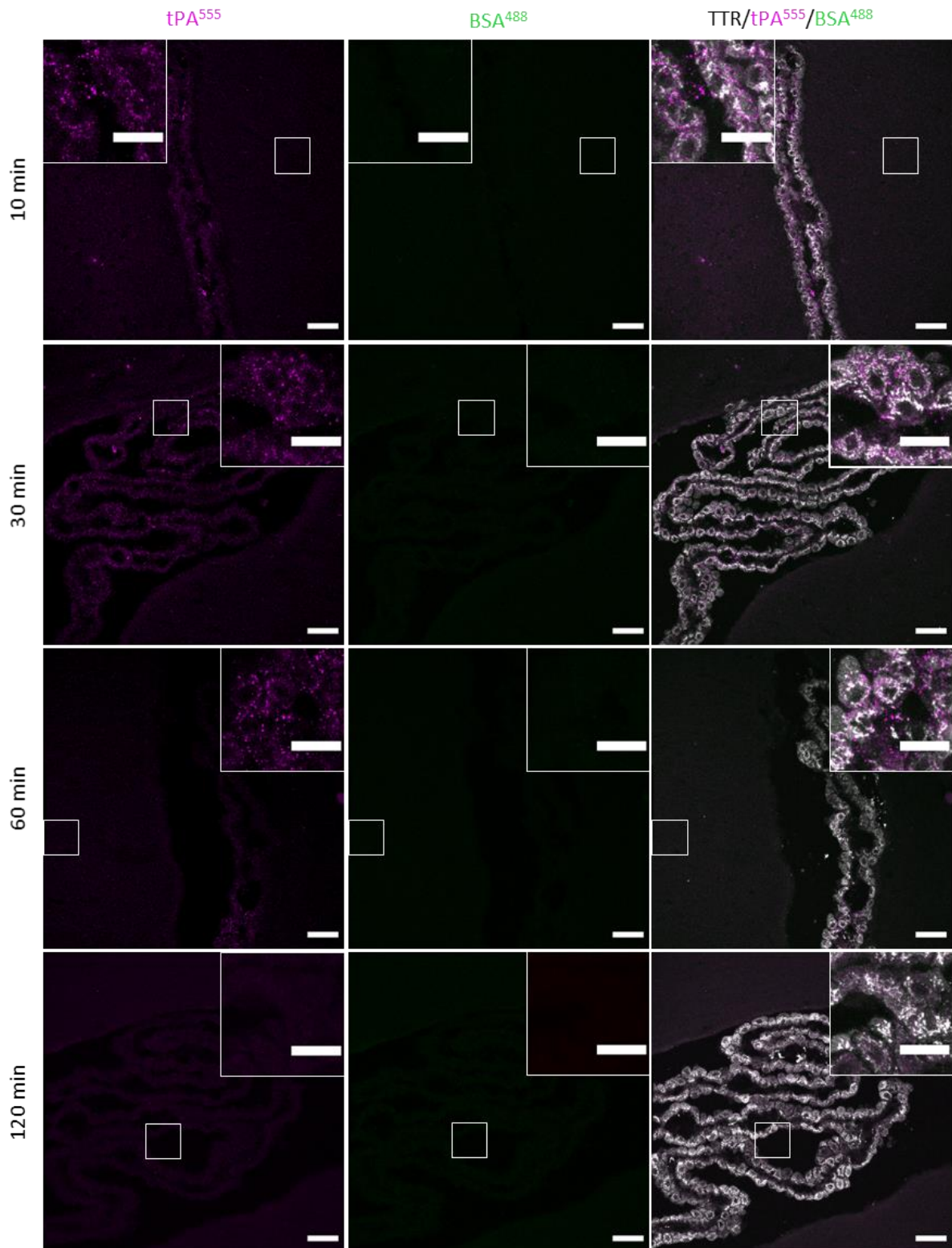


Figure 23: tPA is found in CPs after its intravenous injection. Confocal photomicrographs of CPs with tPA⁵⁵⁵ (left, magenta), BSA⁴⁸⁸ (middle, green) and tPA⁵⁵⁵, BSA⁴⁸⁸ and TTR (right, gray) staining, scale bar 40 μm and 20 μm in the magnified inserts (representative of n=5).

Trente minutes après l’injection, la BSA a diffusé en dehors du système vasculaire et se retrouve dans le parenchyme cérébral, le tPA semble confiné au niveau des vaisseaux, immunomarqués avec le CD31 (**Figure 24**).

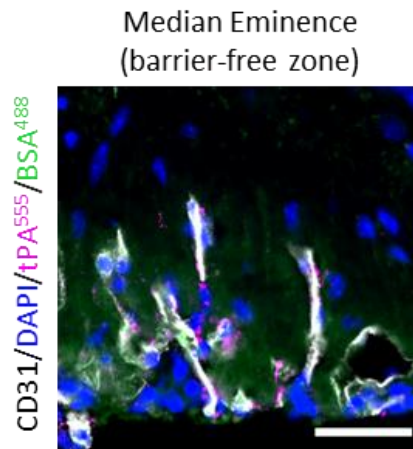


Figure 24: BSA and tPA reach the brain parenchyma in areas devoid of barrier. Confocal photomicrograph shows the Median Eminence with tPA⁵⁵⁵ (magenta), BSA⁴⁸⁸ (green), CD31 (gray) and DAPI (blue) staining, scale bar 40µm.

Pour quantifier l’internalisation du tPA, nous avons compté les ponctuas de tPA dans les cellules immuno-positives pour la TTR (pour rappel la TTR est un marqueur des CPECs, (**Figure 25 A**). La quantification indique que le pic d’internalisation du tPA est à 30 minutes post-injection, puis nous ne détectons plus de tPA dans les PCs après deux heures, reflétant probablement un arrêt de l’internalisation et une sortie en dehors des CPECs (**Figure 25 B**).

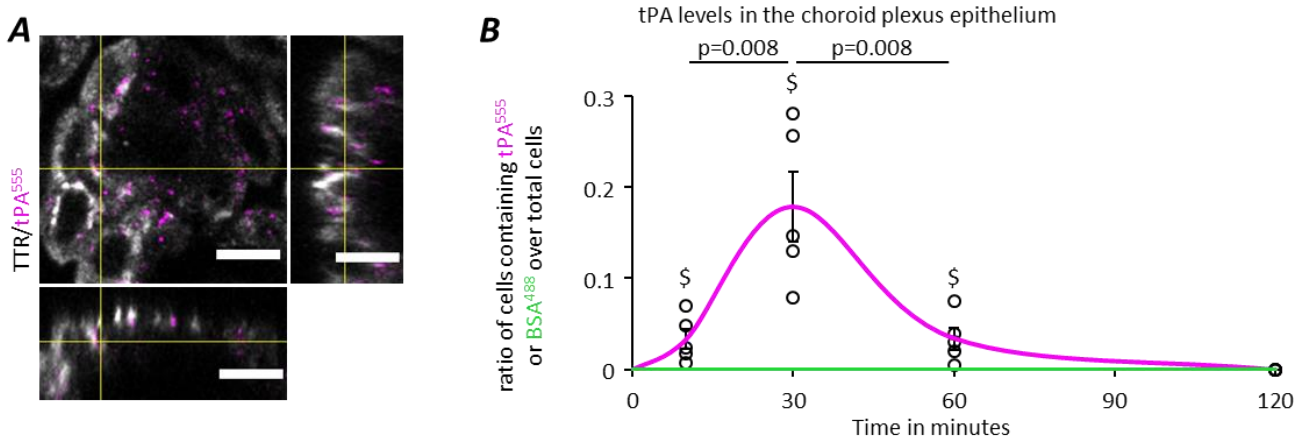


Figure 25: Kinetics of tPA and BSA internalization in the epithelium of CPs. **A**, Confocal photomicrograph of a CP section (representative of n=5), tPA⁵⁵⁵ (magenta) and TTR (gray) staining, panels show projection over the XZ axis (bottom) and over the YZ axis (right), scale bar 10µm. **B**, Graph shows mean ratio ±SEM (n=5) of CPECs containing tPA⁵⁵⁵ or BSA⁴⁸⁸ over total CPECs. The magenta curve corresponds to tPA⁵⁵⁵ and the green one to BSA⁴⁸⁸, \$ different from 0 min and 120 min (p=0.008), Mann-Whitney *U* test.

Le profil en cloche de la courbe d'internalisation du tPA semble indiquer un passage du tPA depuis le sang vers le LCS, c'est pourquoi nous avons récupéré les LCS afin d'y détecter l'éventuelle présence de tPA exogène. L'analyse par immunoempreinte révèle l'absence de tPA dans le LCS à 10 et 30 minutes, et sa présence à 60 et 120 minutes (**Figure 26**). Notre anticorps étant spécifique de la séquence humaine, nous pouvons donc affirmer qu'il s'agit ici de tPA exogène.

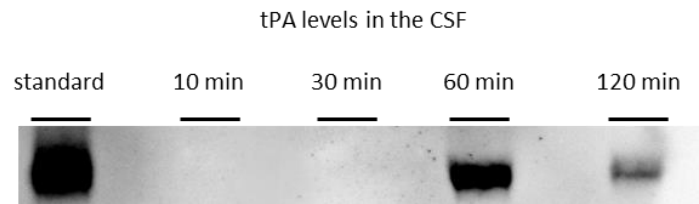


Figure 26: Western-Blot for tPA levels in CSF samples harvested from the cisterna magna 10 to 120 minutes after IV administration (representative of 3 different samples).

Ces résultats montrent donc qu'après une injection par voie intraveineuse : (1) le tPA est internalisé par les CPECs et (2) qu'il est ensuite transporté vers le LCS.

Les PCs sont donc une voie d'entrée potentielle du tPA vers le parenchyme cérébral.

2. Étude de l'internalisation du tPA *in vitro*

Pour étudier les mécanismes d'internalisation du tPA au niveau des PCs, nous avons mis au point un modèle de culture primaire de CPECs de souris (voir Culture primaire de CPECs p 63).

a. Mise en place des outils

Les CPECs sont incubées entre 5 et 60 minutes avec 40 nM de tPA⁵⁵⁵. Le tPA est présent sous forme de ponctuas dans les CPECs *in vitro* dès 5 minutes de traitement, ponctuas dont le nombre augmente jusqu'à 60 minutes (**Figure 27**).

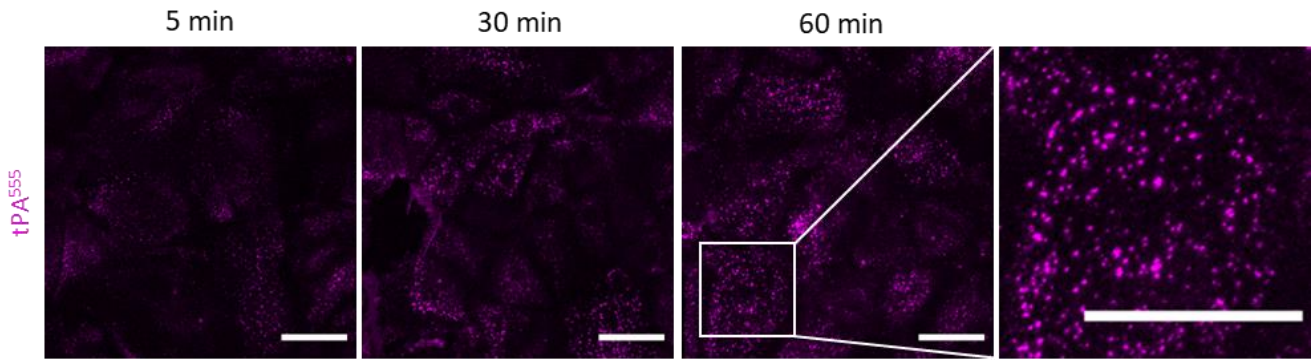


Figure 27: Choroid plexus epithelial cells (CPECs) uptake tPA *in vitro* in a time-dependent manner. CPECs were exposed to 40nM tPA⁵⁵⁵ for 5 to 60 min. Photomicrographs (representative of n=4) show tPA⁵⁵⁵ staining (magenta), scale bar 40μm.

Afin de quantifier cette internalisation en fonction du temps, nous avons mesuré la fluorescence sur les extraits protéiques des tapis cellulaires prélevés aux différents temps de traitement et séparés par électrophorèse (**Figure 28**).

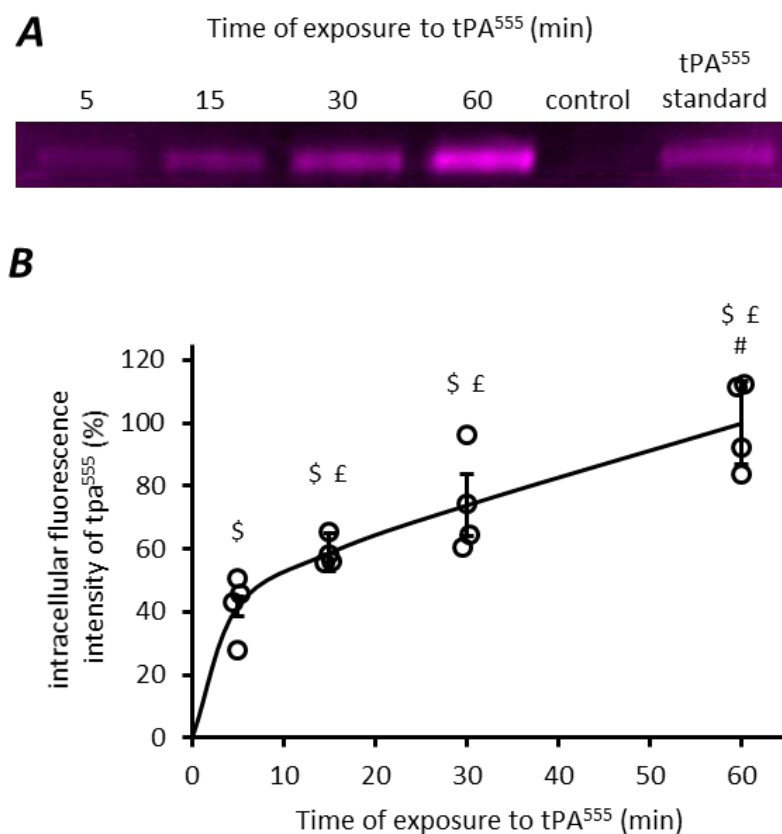


Figure 28: Time-dependent uptake of tPA in cultured Choroid plexus epithelial cells (CPECs). **A**, CPECs were exposed to 40nM tPA⁵⁵⁵ for 5 to 60min. and protein extracts underwent electrophoresis **B**, Quantification of fluorescence expressed as percentage of maximal uptake (n=4) mean ±SEM of **A**, \$ different from control, £ different from 5 minutes, # different from 15 minutes (p=0.029), Mann-Whitney *U* test.

L'internalisation du tPA est un phénomène dépendant du temps, semble-t-il avec une phase initiale rapide, puisqu'après 5 minutes de traitement la quantité de tPA internalisée correspond déjà à environ 40% de celle internalisée à 60 minutes (**Figure 28 B**).

Les CPECs ont également été traitées avec des doses croissantes de tPA (de 20nM à 400nM) pendant 15 minutes. En microscopie, nous observons que pour une durée fixe de traitement, le nombre de ponctuas augmente proportionnellement à la dose de tPA appliquée (**Figure 29**).

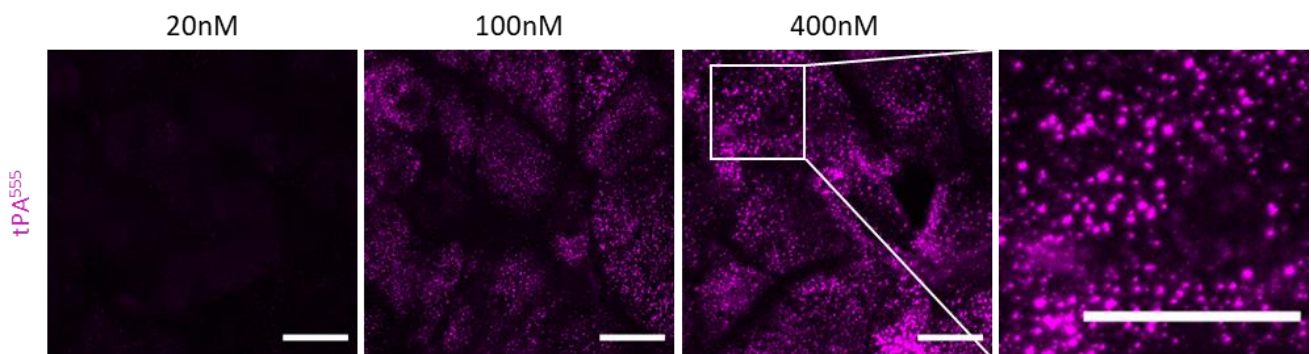


Figure 29: Dose-dependent uptake of tPA in cultured Choroid plexus epithelial cells (CPECs). CPECs were exposed for 15 minutes to 20-400nM of tPA⁵⁵⁵. Photomicrographs (representative of n=4) show tPA⁵⁵⁵ staining (magenta), scale bar 40 μ m.

Afin de quantifier cette internalisation en fonction du temps, nous avons mesuré la fluorescence sur les extraits protéiques des tapis cellulaires prélevés aux différents temps de traitement et séparés par électrophorèse. En accord avec nos observations en microscopie, l'internalisation de tPA dans les CPECs est proportionnelle à la quantité de tPA appliquée dans le milieu extracellulaire (**Figure 30**).

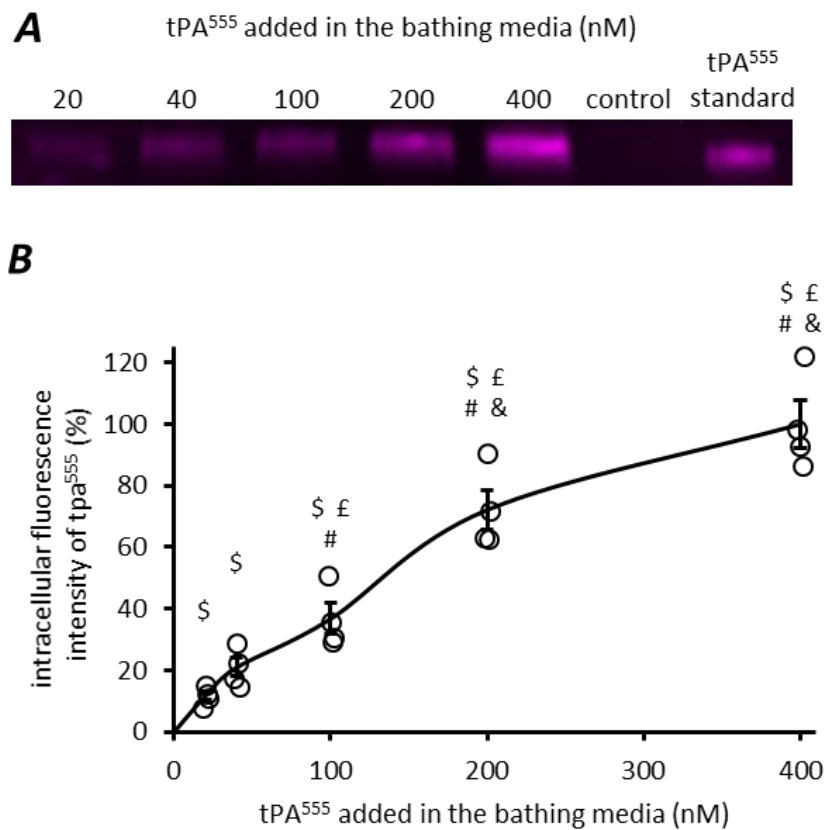


Figure 30: Choroid plexus epithelial cells (CPECs) uptake tPA *in vitro* is dose-dependent. **A**, Electrophoresis (representative of n=4) of protein extracts from monolayer of CPECs exposed for 15min to tPA⁵⁵⁵ (20nM-400nM). **B**, Graph shows quantification of fluorescence expressed as percentage of maximal uptake (n=4) mean \pm SEM of **A**, \$ different from control, £ different from 20 nM, # different from 40 nM, & different from 100 nM (p=0.029), Mann-Whitney *U* test.

b. Étude des mécanismes de l'internalisation.

Les résultats de ces deux premières expériences montrent que l'internalisation du tPA repose sur un mécanisme actif. Cette hypothèse est confortée par l'observation que l'internalisation n'est pas possible à 4°C (**Figure 31**).

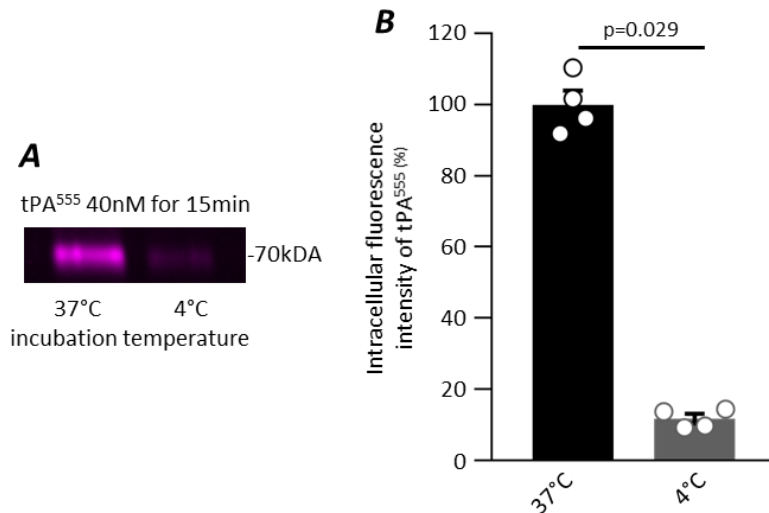


Figure 31: Internalization of tPA by choroid plexus epithelial cells (CPECs) is an active process. **A**, Electrophoresis (representative of n=4) of protein extracts from monolayer of CPECs exposed to 40nM of tPA⁵⁵⁵ for 15min at 37°C or 4°C. **B**, Graph shows quantification of fluorescence expressed as percentage of maximal uptake (n=4) mean \pm SEM of **A**, 37°C different from 4°C (p=0.029), Mann-Whitney U test.

Nous savons qu'au niveau des cellules endothéliales de la BHE, le tPA est transporté grâce à son domaine Finger, et par une transcytose dépendante de LRP1 (Benchenane *et al.*, 2005). Nous avons donc émis l'hypothèse qu'un membre de la famille des récepteurs LRP pourrait aussi être responsable de l'internalisation du tPA par les CPECs. Pour tester cette hypothèse nous avons comparé l'internalisation du tPA par les CPECs en absence ou en présence de la protéine RAP (*Receptor Associated Protein*), un antagoniste compétitif des LRP, (Herz *et al.*, 1991).

Au microscope, nous observons que les CPECs co-traitées avec du tPA et RAP, présentent moins de ponctuas de tPA que les cellules non co-traitées (**Figure 32 A**).Ce résultat est confirmé par laquantification de la fluorescence dans les CPECs, avec une réduction de 40% de l'internalisation de tPA induite par le co-traitement tPA+RAP (**Figure 32 B et C**).

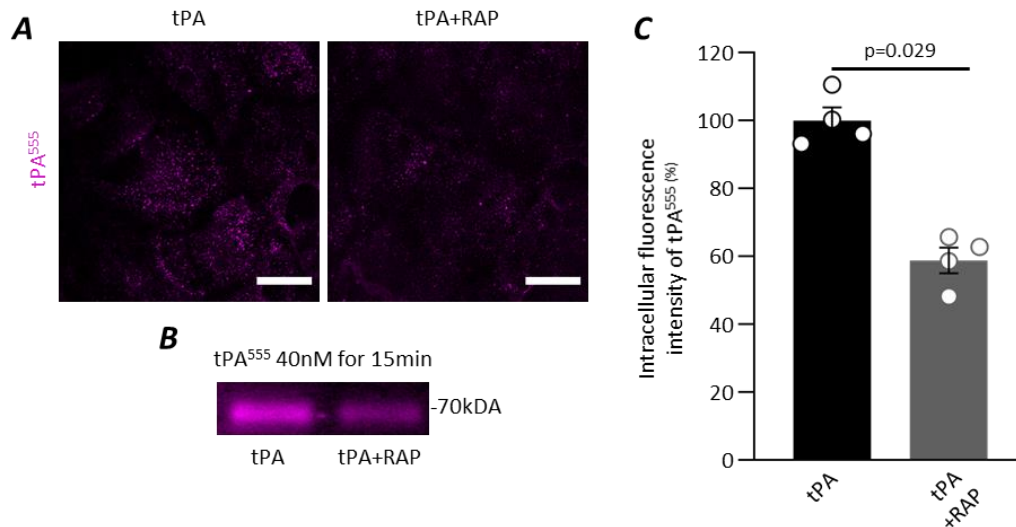


Figure 32: Internalization of tPA by choroid plexus epithelial cells (CPECs) is dependent on a member of the LRP family. **A**, Representative photomicrographs (n=4) of CPECs exposed for 15 minutes to tPA⁵⁵⁵ (40 nM) alone or co exposed with RAP (500nM), scale bar 40µm. **B**, Electrophoresis (representative of n=4) of protein extracts from monolayer of CPECs exposed for 15 minutes to tPA⁵⁵⁵ (40 nM) alone or co exposed with RAP (500nM). **C**, Graph shows mean ±SEM of fluorescence quantification of **B**, tPA different from tPA+RAP (p=0.029), Mann-Whitney U test.

Nous montrons donc ici que l’internalisation du tPA par les CPECs dépend au moins en partie d’un membre de la famille des LRP.

Les membres de la famille LRP les plus communément évoqués dans le transport du tPA sont LRP1 et LRP2. Nous avons donc recherché leur présence au niveau des CPECs *in vivo* et *in vitro*.

In vivo, une étude en immunohistochimie révèle la présence de récepteurs LRP1 dans les PCs, au niveau du pôle basal des CPECs (**Figure 33**, gauche). De plus, chez les souris ayant reçu une injection IV de tPA⁵⁵⁵, nous retrouvons des ponctuas de tPA au niveau de l’immunomarquage LRP1 (**Figure 33**, droite).

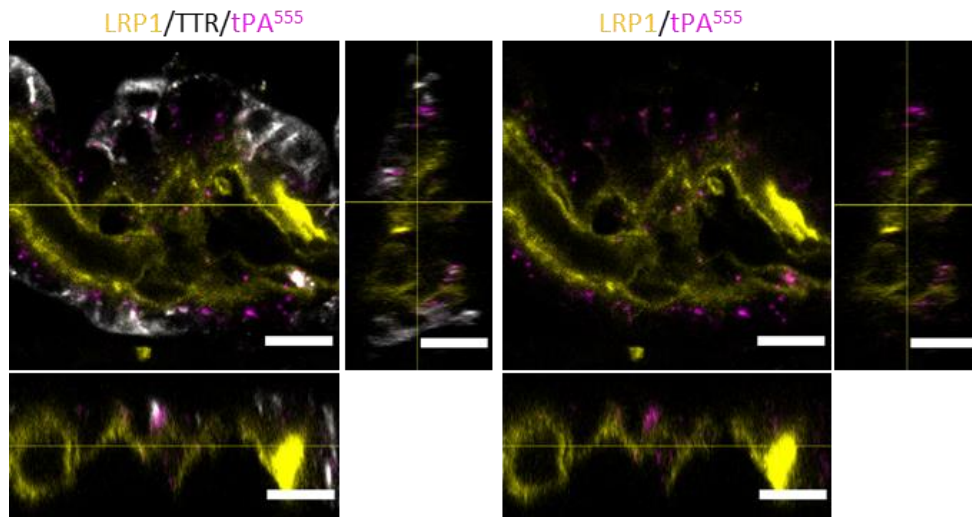


Figure 33: CPECs express LRP1 *in vivo*. Mice were intravenously injected with tPA⁵⁵⁵, photomicrographs (representative of n=5) show tPA⁵⁵⁵ (magenta), LRP1 (yellow), and TTR (gray), panels show projection over the XZ axis (bottom) and over the YZ axis (right), scale bar 10µm.

Dans notre modèle de culture primaire de CPECs, les récepteurs LRP1 sont aussi exprimés, mais de manière homogène, puisque nos cellules ne sont pas polarisées (**Figure 34**)

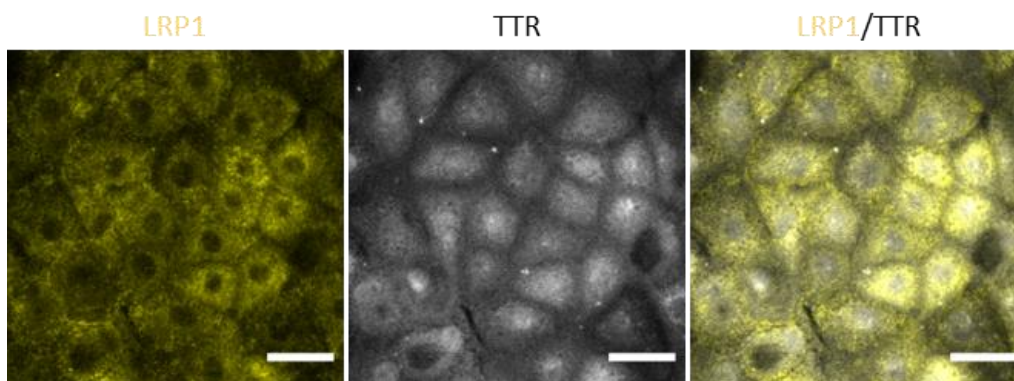


Figure 34: CPECs express LRP1 *in vitro*. Representative photomicrographs (n=4) of CPECs in culture show LRP1 (left, yellow), TTR (middle, gray) and as a merged image (right), scale bar 40µm.

Nous avons tenté de réaliser des analyses immunohisto- et immunocyto-chimiques pour LRP2 (mégaline), mais les anticorps commerciaux testés n'ont pas donné de résultats convaincants.

Afin de tester l'implication potentielle de LRP1 dans le transport de tPA via les CPECs, nous avons donc mis en place une approche d'ARNs interférents (siRNA) *in vitro*. Les cultures

de CPECs ont été transfectées avec un siRNA anti-LRP1 puis traitées avec du tPA (voir Approche d'ARN interférent p65). L'extinction des ARNs messagers de LRP1 est efficace à 60% en ce qui concerne le niveau d'ARNm (**Figure 35**).

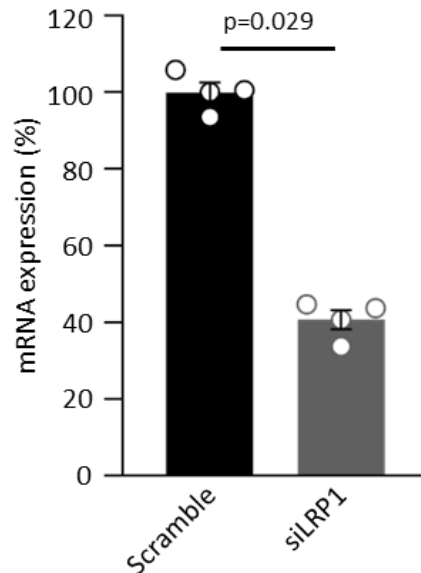


Figure 35: Silencing of the LRP1 receptor in CPECs. Quantitative PCR for relative levels of LRP1 mRNA expressed as percentage of Scramble (mean \pm SEM, n=4) in CPECs cultures, computed by calculating the $2^{-\Delta\Delta Ct}$ (where Ct is the threshold cycle value). The housekeeping gene expression (actin), used for normalization, was not influenced by the stages *in vitro*, siLRP1 different from Scramble (p=0.029), Mann-Whitney U test.

L'extinction des ARNm se traduit par une réduction de l'expression protéique de LRP1 de 60% par rapport aux contrôles, agent de transfection seul ou scramble (**Figure 36 A et B**). Cependant, cette réduction importante de l'expression de LRP1 ne modifie pas la capacité des CPECs à internaliser le tPA exogène (**Figure 36 C et D**).

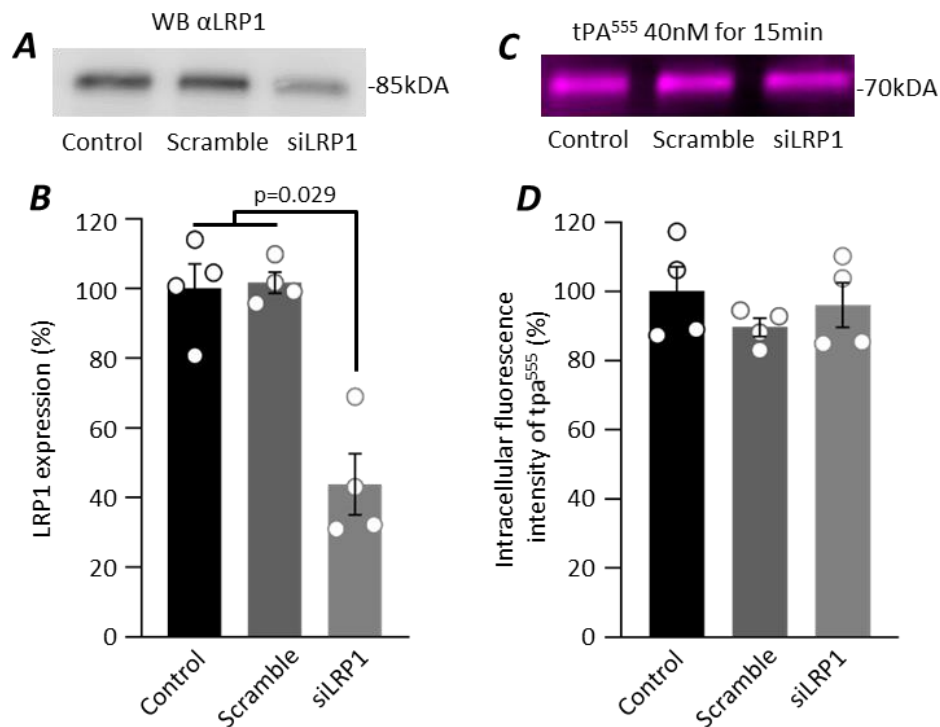


Figure 36: Internalization of tPA by choroid plexus epithelial cells (CPECs) is not mediated by LRP1 **A**, Representative western blot (n=4) against LRP1 after transfection with nothing (Control), negative control (Scramble) or siRNA anti-LRP1 (siLRP1). **B**, Graph shows quantification mean \pm SEM of LRP1 expressed as percentage of control (n=4) of **A**, siLRP1 different from Control and Scramble (p=0.029), Mann-Whitney U test. **C**, Electrophoresis (representative of n=4) of protein extracts from monolayer of CPECs exposed for 15 minutes to tPA⁵⁵⁵ (40 nM) after transfection with control, scramble or siLRP1. **D**, Graph shows quantification of fluorescence expressed as percentage of control (n=4) mean \pm SEM of **C**.

L'internalisation de tPA ne dépend donc pas de son partenaire classique, LRP1. Nous nous sommes donc intéressés à LRP2.

Les CPECs ont été transfectées avec un siRNA anti-LRP2 et l'extinction des ARNm de LRP2 a été efficace avec une réduction d'environ 60% (**Figure 37**). Nous n'avons pas pu confirmer cette extinction à l'échelle protéique, faute d'anticorps adapté. L'extinction de LRP2 n'affecte pas l'internalisation du tPA au sein des CPECs (**Figure 38**).

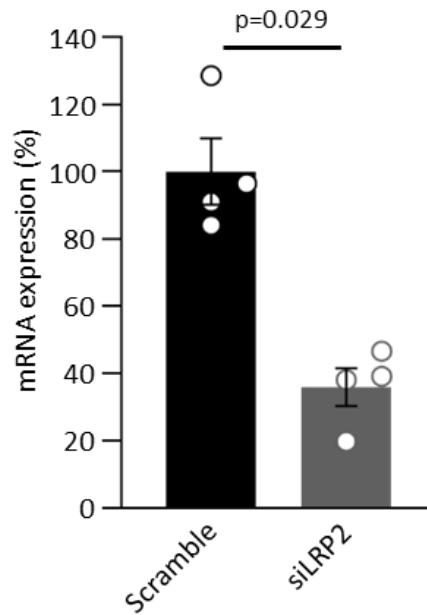


Figure 37: Silencing of LRP2 in CPECs. Quantitative PCR for relative levels of LRP2 mRNA expressed as percentage of Scramble (mean \pm SEM, n=4) in CPECs cultures, computed by calculating the $2^{-\Delta\Delta Ct}$ (where Ct is the threshold cycle value). The housekeeping gene expression (actin), used for normalization, was not influenced by the stages *in vitro*, siLRP2 different from Scramble (p=0.029), Mann-Whitney *U* test.

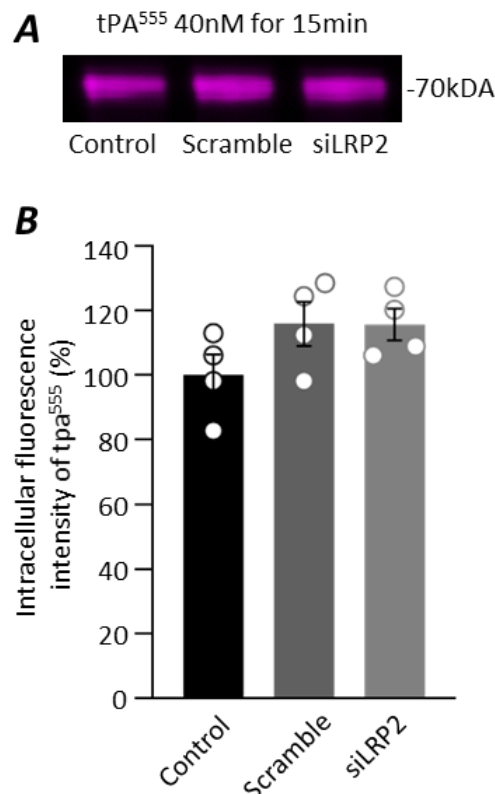


Figure 38: Internalization of tPA by choroid plexus epithelial cells (CPECs) is not mediated by LRP2. **A**, Electrophoresis (representative of n=4) of protein extracts from monolayer of CPECs exposed for 15 minutes to tPA⁵⁵⁵ (40 nM) after transfection with control, scramble or siLRP2. **B**, Graph shows quantification of fluorescence expressed as percentage of control (n=4) mean \pm SEM of **C**.

Nous avons par la suite co-transfecté des siRNA anti-LRP1 et anti-LRP2 dans les CPECs puis les avons traitées avec du tPA. L’extinction de LRP1 et LRP2 combinée n’influence pas non plus l’internalisation du tPA (**Figure 39**).

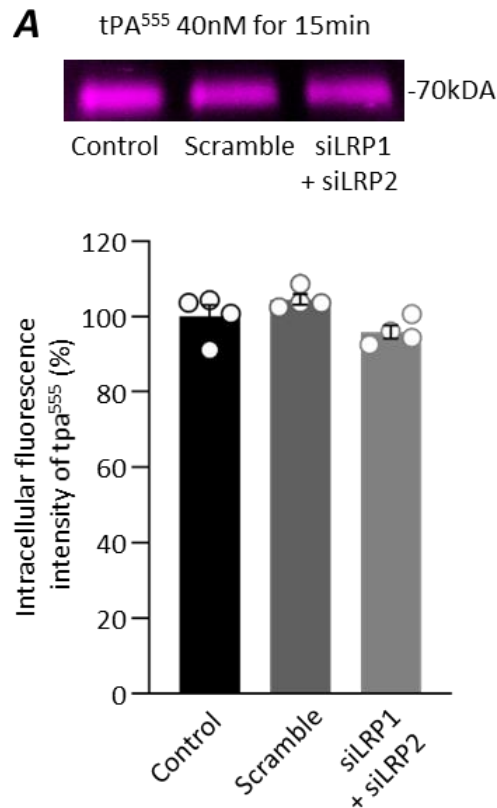


Figure 39: Co-silencing of LRP1 and LRP2 does not influence the internalization of tPA in the CPECs. **A**, Electrophoresis (representative of n=4) of protein extracts from monolayer of CPECs exposed for 15 minutes to tPA⁵⁵⁵ (40 nM) after transfection with control, scramble or siLRP1 + siLRP2. **B**, Graph shows quantification of fluorescence expressed as percentage of control (n=4) mean \pm SEM of **A**.

En conclusion, bien que l’internalisation de tPA par les CPECs implique un membre de la famille des LRP (puisque’elle est bloquée par RAP), ce membre n’est pas un des plus couramment décrits, LRP1 et/ou LRP2.

Le tPA interagit avec LRP grâce à son domaine Finger (Bu *et al.*, 1992). C’est pourquoi nous avons développé deux variantes du tPA et de l’albumine ; un tPA dépourvu de son domaine Finger : Δ F-tPA, et de l’albumine à laquelle est greffée le domaine Finger du tPA : F-BSA. Ces protéines ont été couplées à des fluorophores et leur fluorescence a ensuite été vérifiée sur gel de polyacrylamide après électrophorèse (**Figure 40**).

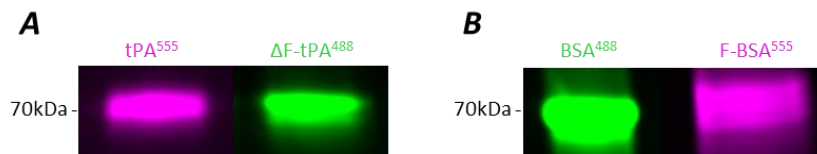


Figure 40: Characterization of ΔF -tPA and F-BSA. **A**, Electrophoresis of 5 μ g of tPA⁵⁵⁵ (magenta) and ΔF tPA⁴⁸⁸ (green) in SDS-PAGE. **B**, Electrophoresis of 5 μ g of BSA⁴⁸⁸ (green) and F-BSA⁵⁵⁵ (magenta) in SDS-PAGE.

Ex-vivo, des PCs de souris Swiss mâles de 8 semaines ont été traités avec 40 nM de tPA⁵⁵⁵ et avec des doses croissantes de ΔF -tPA. Le tPA⁵⁵⁵ est effectivement internalisé par les CPECs alors que le ΔF -tPA ne l'est pas même à de fortes concentrations extracellulaires (**Figure 41**).

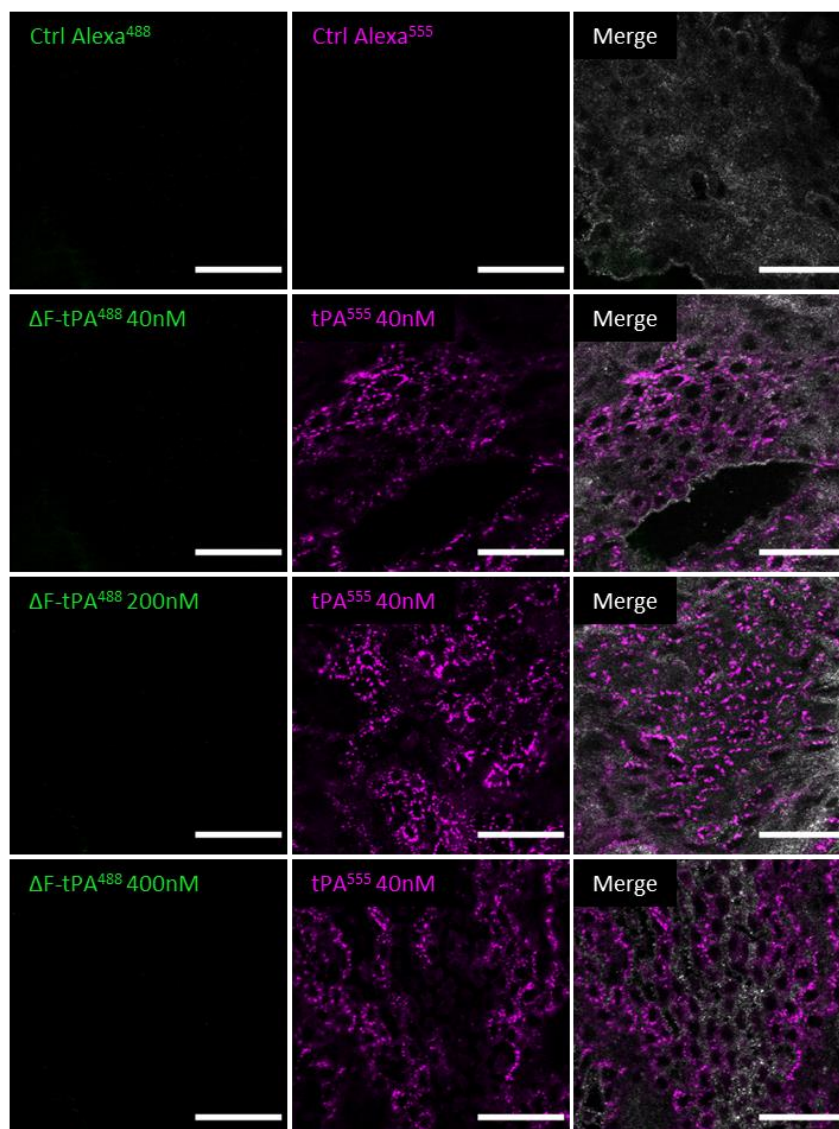


Figure 41: Internalization of tPA by choroid plexus epithelial cells (CPECs) is mediated by its Finger domain. Photomicrographs (representative of n=4) of CPs explant exposed to tPA⁵⁵⁵ (40 nM) and ΔF -tPA⁴⁸⁸ (40nM, 200nM or 400nM) for 15min.

Le domaine Finger du tPA est donc nécessaire pour l'internalisation par les CPECs.

Le pouvoir du domaine Finger du tPA comme médiateur du transport a été testé en traitant les cellules avec de la BSA native ou couplée au domaine Finger du tPA. Comme *in vivo*, la BSA n'est pas internalisée par les CPECs *ex vivo*. En revanche, la protéine fusion F-BSA est internalisée par les CPECs (Figure 42).

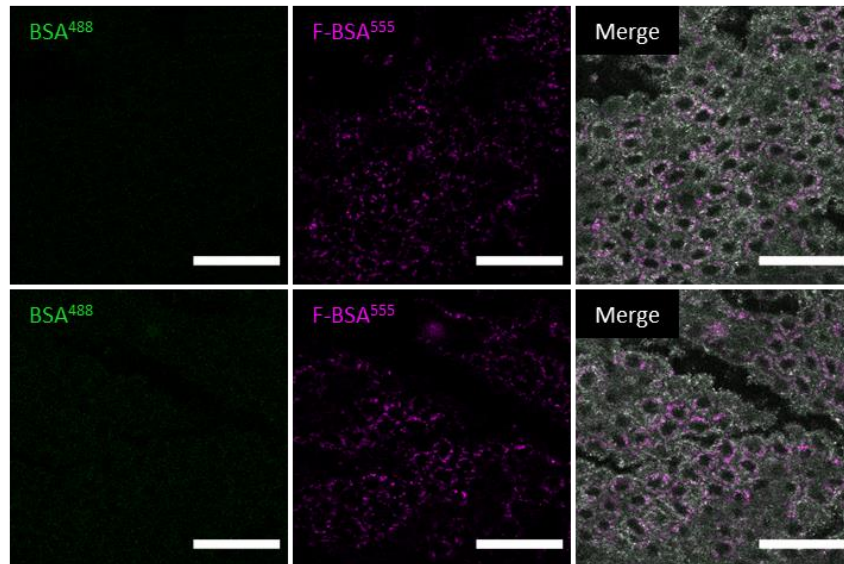


Figure 42: Adjunction of the finger domain of tPA to albumin allows its internalization into the CPECs. Photomicrographs (representative of n=4) of CPs explant exposed to BSA⁴⁸⁸ (40nM) and F-BSA⁵⁵⁵ (40 nM) for 15min.

En conclusion, nous montrons que le tPA est internalisé par les CPECs, par un phénomène actif dépendant d'un membre de la famille des LRP, qui n'est ni LRP1, ni LRP2. Par ailleurs, le transport du tPA requiert la présence obligatoire de son domaine Finger.

3. Étude *in vivo* de l'impact d'une ischémie focale sur le passage de tPA à travers les PCs

Nous avons voulu savoir si en conditions ischémiques, le passage du tPA vasculaire à travers les PCs était modifié.

Pour cela, un AVC thromboembolique a été induit chez des souris mâles (8 semaines) par injection de thrombine dans l'embranchement de l'artère cérébrale moyenne, puis après 20 minutes d'occlusion, une thrombolyse intraveineuse a été réalisées avec 50µg de tPA⁵⁵⁵ (Figure 43). Sur la base de la cinétique de passage que nous avons établie en conditions

physiologiques (**Figure 23**), nous avons choisi d'étudier la présence de tPA exogène dans les PCs 10 ou 30 minutes après l'injection.

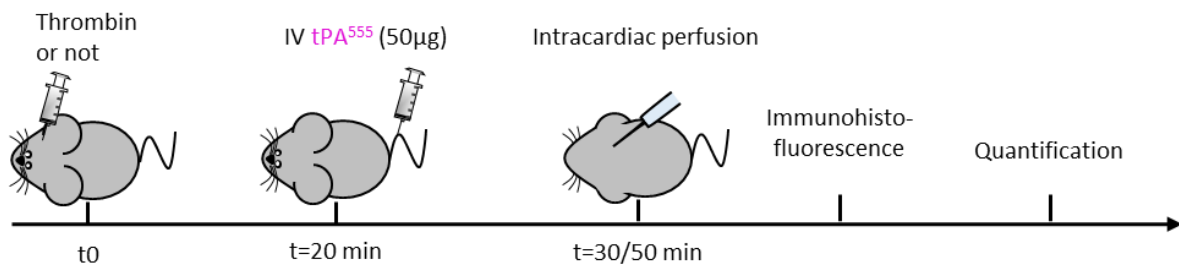


Figure 43: Experimental design : thromboembolic stroke was performed, or not, on mice, 20min later mice were injected intravenously with 50µg of tPA⁵⁵⁵. Then, 10 or 30min after IV injection mice were perfused, brains collected and prepared for immunohistology.

En histologie, aucune différence majeure ne semble exister entre les animaux témoins opérés et les animaux ischémiés (**Figure 44 A**). Ces observations sont confirmées par quantification dans tous les PCs (ceux des ventricules latéraux ipsilatéral et contralatéral et ceux des troisième et quatrième ventricules) de la quantité de tPA (intensité de fluorescence), mais nous ne révélons pas de différence significative entre le groupe non ischémié (sham) et le groupe ischémié (stroke) quel que soit le temps (**Figure 44 B**). De même, une comparaison des ventricules latéraux ipsi- et contra- latéraux ne met pas en évidence de différence inter-hémisphérique du rapport d'intensité de fluorescence contra/ipsi-latéral (**Figure 44 C**).

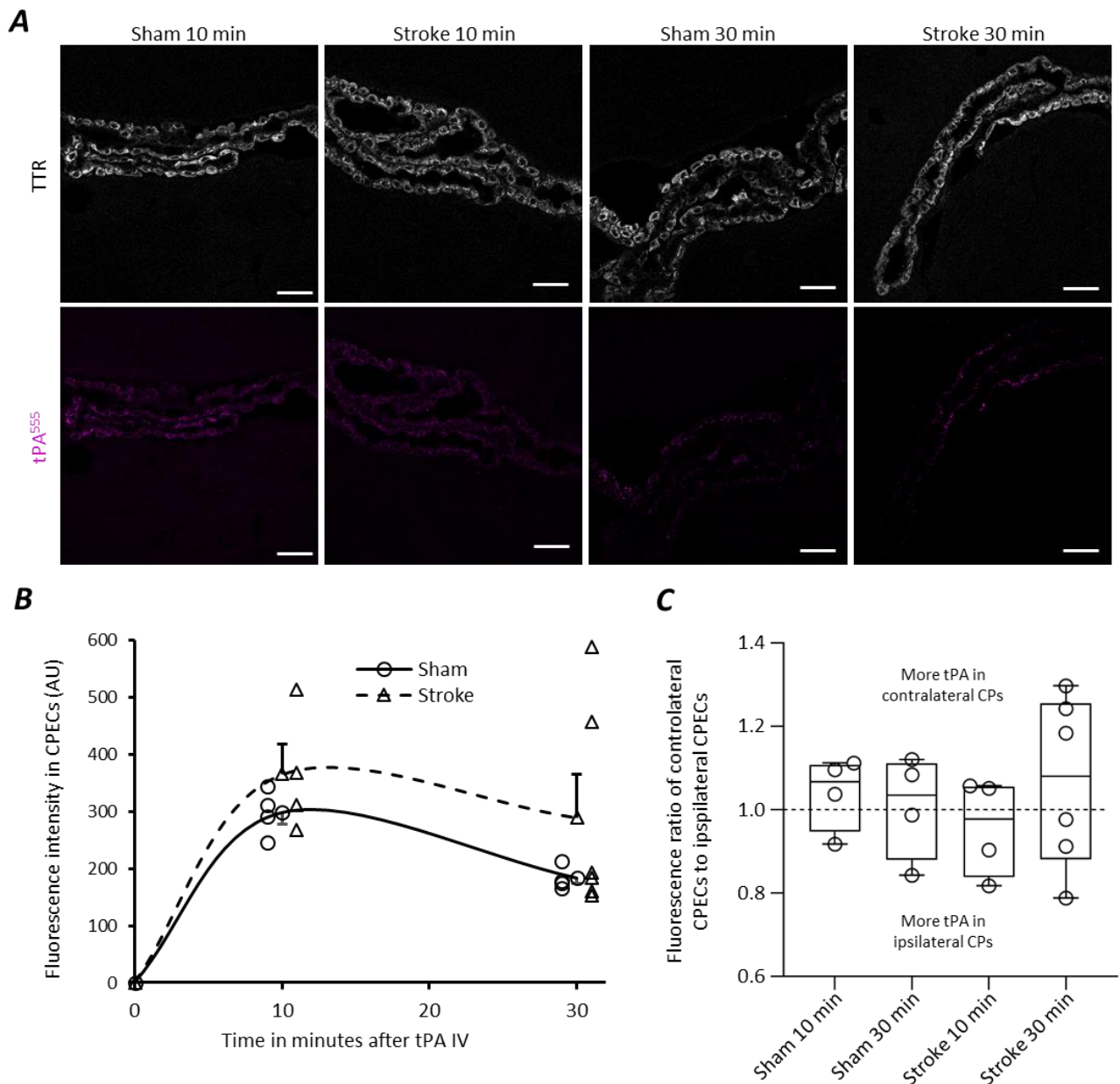


Figure 44: Quantification of fluorescence in the CPECs after thromboembolic stroke. **A**, Confocal photomicrographs of CPs sections with TTR staining (gray, top) and tPA⁵⁵⁵ (magenta, bottom), scale bar 40µm (representative of n=4, except for the “Stroke 30 min” group n=6). **B**, Graph shows mean ratio ±SEM (n=4, n=6 stroke 30’) of the fluorescence of tPA⁵⁵⁵ in CPECs. **C**, median contralateral/ipsilateral ratio ±SEM (n=4, except for the “Stroke 30 min” group n=6) of tPA⁵⁵⁵ fluorescence in CPECs.

Cette étude préliminaire suggère une tendance vers une intensité de fluorescence plus importante dans le groupe ischémié 10 et 30 minutes après injection de tPA (**Figure 44 B**) mais pas de redistribution entre PCs latéraux (**Figure 44 C**). Cependant, l’effectif étudié doit être augmenté pour déterminer si le passage de tPA vasculaire à travers les PCs est effectivement modifié par l’ischémie, chez la souris.

II. Étude de l'effet du tPA endogène sur les plexus choroïdes

Dans cette partie nous avons voulu savoir si l'absence de tPA endogène pouvait avoir des conséquences sur la structure des PCs. Nous avons donc utilisé des souris générées au laboratoire n'exprimant pas de tPA.

1. Étude en imagerie par résonance magnétique

La première partie de cette étude repose sur l'imagerie par résonance magnétique (IRM), avec d'une part, des données anatomiques et d'autre part, des données sur la diffusion du LCS dans différentes régions du cerveau.

La mesure du volume cérébral total sur les séquences acquises en T2 haute résolution ne révèle aucune différence entre les souris contrôles (Null WT) et les souris n'exprimant pas de tPA (Null tPA) (**Figure 45**), avec respectivement un volume moyen de $468 \pm 22 \text{ mm}^3$ et $469 \pm 10 \text{ mm}^3$.

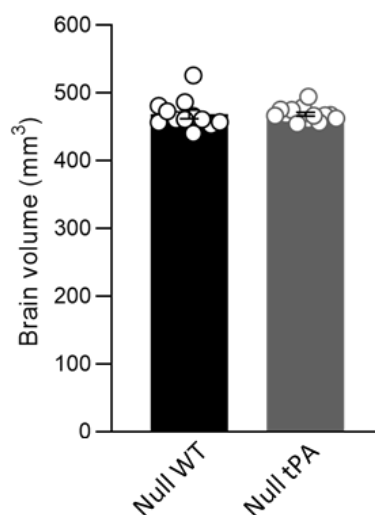


Figure 45: Brain volume in Null WT and Null tPA mice. Mean ratio \pm SEM of whole brain volume in mm^3 (Null WT n=12, Null tPA n=14).

Nous avons ensuite mesuré le volume des différents ventricules sur les séquences anatomique haute résolution, pondérées en T2 (**Figure 46 A**). Pour les souris Null WT le volume total est en moyenne de $7,6 \pm 1,7 \text{ mm}^3$ contre $7,4 \pm 1,5 \text{ mm}^3$ pour les souris Null tPA, ne montrant pas de différence significative entre les deux groupes (**Figure 46 B**). Si l'on considère chaque ventricule indépendamment, il n'y a pas non plus de différence entre les souches. Le volume moyen pour le ventricule gauche est de $2,8 \pm 1,16 \text{ mm}^3$ pour les Null WT

contre $2,5 \pm 0,6 \text{ mm}^3$ chez les Null tPA (**Figure 46 C**). Pour le ventricule droit le volume moyen est de $2,6 \pm 0,7 \text{ mm}^3$ pour les Null WT contre $2,8 \pm 0,8 \text{ mm}^3$ chez les Null tPA (**Figure 46 D**). Le volume moyen pour le troisième ventricule est de $1,4 \pm 0,2 \text{ mm}^3$ pour les Null WT contre $1,2 \pm 0,2 \text{ mm}^3$ chez les Null tPA (**Figure 46 E**). Le volume moyen du quatrième ventricule est de $0,9 \pm 0,1 \text{ mm}^3$ pour les Null WT contre $0,8 \pm 0,2 \text{ mm}^3$ chez les Null tPA (**Figure 46 F**).

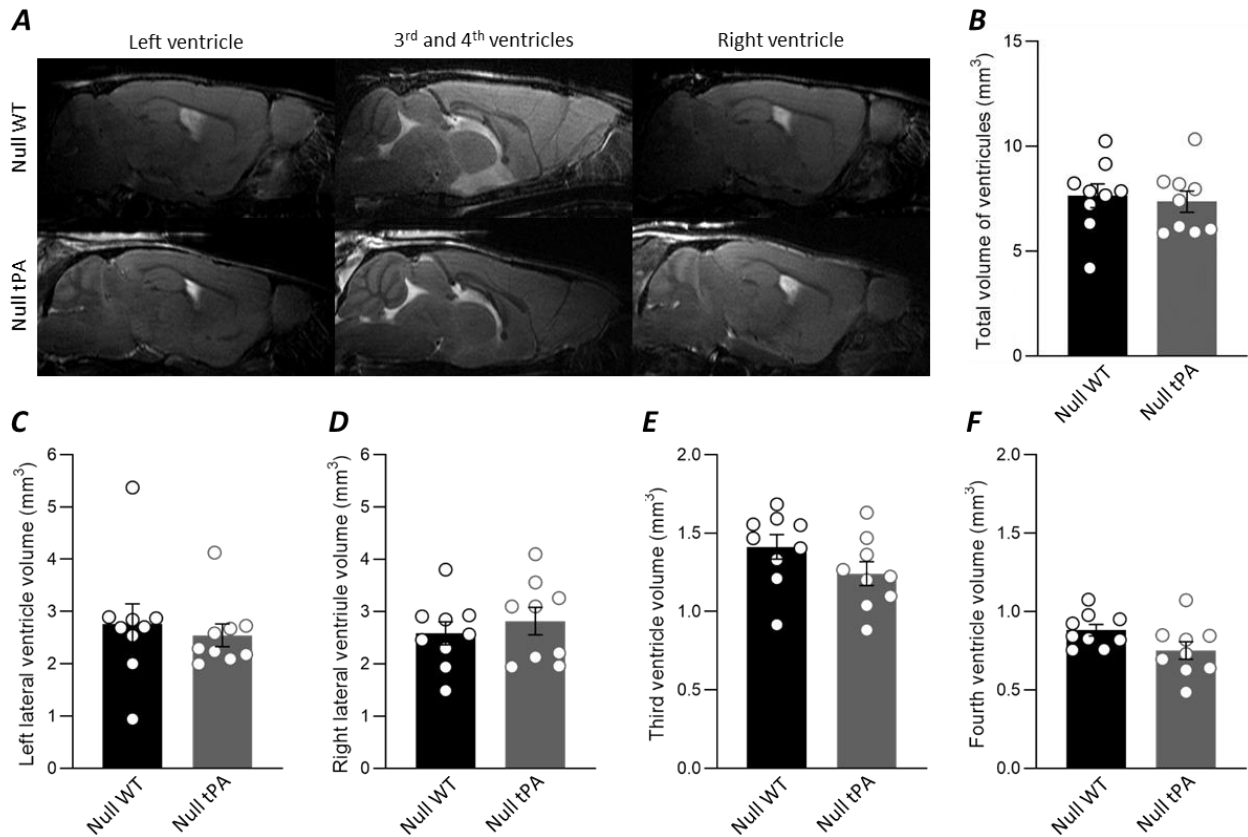


Figure 46: Ventricles volume comparison between Null WT and Null tPA mice. **A**, T2 high resolution MRI, Left ventricle on the left, 3rd and 4th ventricles in the middle and right ventricle on the right, Null WT on top, Null tPA below (representative of n=9). **B**, Mean ±SEM of total ventricles volume in mm³. **C**, Mean ±SEM of left the ventricle volume in mm³. **D**, Mean ±SEM of the right ventricle volume in mm³. **E**, Mean ±SEM of the third ventricle volume in mm³. **F**, Mean ±SEM of the fourth ventricle volume in mm³.

Nous avons ensuite évalué par IRM s’il existait des différences dans la diffusion du LCS entre les deux génotypes Null WT et Null TPA. Le premier jour une séquence FAIR-RARE permet d’établir le niveau de diffusion basal des souris, puis le lendemain nous réalisons une injection de gadolinium (un agent de contraste réhaussant le signal en T1) dans la *cisterna magna* suivie de la même séquence FAIR-RARE répétée 8 fois. L’ensemble des 9 séquences IRM permet de calculer des coefficients de diffusion du Gadolinium dans les différentes structures cérébrales (**Figure 47**). Les coefficients de diffusion ne diffèrent pas entre les génotypes ne révélant pas de différence de diffusion du gadolinium dans le parenchyme cérébral et cela quelle que soit la région considérée (bulbes olfactifs $0,027 \pm 0,011$ mm²/min pour les Null WT contre $0,022 \pm 0,012$ mm²/min, septum $0,020 \pm 0,006$ mm²/min contre $0,022 \pm 0,006$ mm²/min et thalamus $0,015 \pm 0,006$ mm²/min contre $0,014 \pm 0,007$ mm²/min).

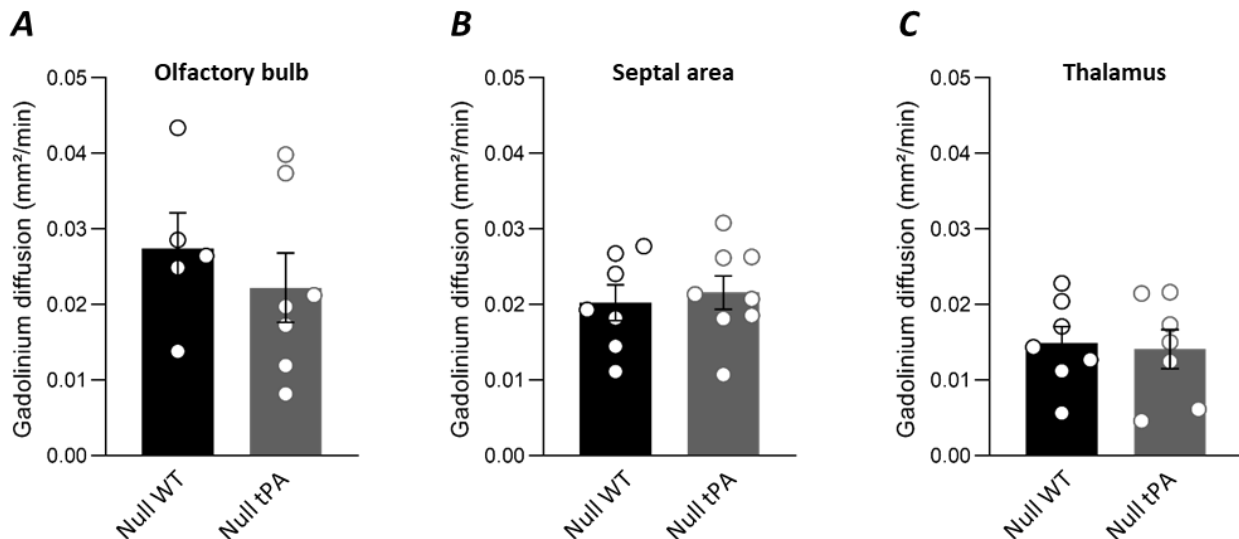


Figure 47: Diffusion coefficient of gadolinium in Null WT and Null tPA mice. Mean ratio \pm SEM gadolinium diffusion coefficient in mm²/min in **A** the olfactory bulb (Null WT n=5, Null tPA n=7), **B** septal area (Null WT n=7, Null tPA n=8) and **C** Thalamus (Null WT n=7, Null tPA n=7).

2. Étude par immunohistologie

En accord avec nos analyses volumétriques réalisées en IRM (**Figure 46**), nous avons déterminé que la surface moyenne des CPECs (définie grâce à l’immunomarquage contre la TTR) ne diffère pas significativement entre les deux souches, avec une aire moyenne de $170,7 \pm 7,2$ mm² et de $172,5 \pm 5,2$ mm² pour les souris Null WT et Null tPA respectivement (**Figure 48**).

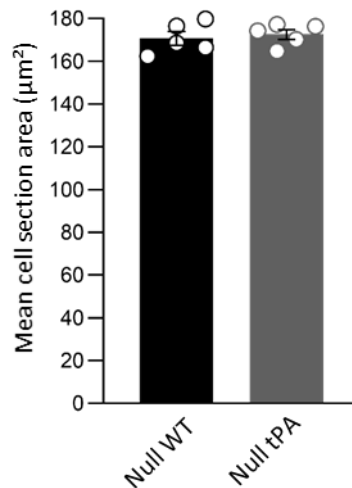


Figure 48: CPECs surface in Null WT and Null tPA mice. Mean ratio \pm SEM of CPECS surface in μm^2 (Null WT n=4, Null tPA n=5).

En conclusion, le tPA endogène n'influence pas la structure des PCs, ni leur fonction de drainage de LCS.

Nous nous sommes ensuite intéressés à l'aquaporine 1 (AQP1), un canal à eau majeur pour la sécrétion du LCS par les PCs (Oshio *et al.*, 2005). Le profil d'immunomarquage en liseré (en rouge **Figure 49 A**) témoigne de l'expression de l'aquaporine 1 au pôle apical des CPECs. Le rapport entre l'aire de l'immunomarquage positif pour l'AQP1 et l'aire des CPECs (c'est-à-dire l'aire marquée pour la TTR), n'est pas différent entre les souris Null WT et les souris Null KO, respectivement $0,35 \pm 0,02$ contre $0,36 \pm 0,03$ (**Figure 49 B**).

Outre la fonction de sécrétion de LCS, les PCs sont un poste d'immunosurveillance du cerveau et une porte d'entrée pour les cellules immunitaires. Comme le tPA exogène a été décrit comme un facteur favorisant l'infiltration des cellules immunitaires à travers la BHE (Reijerkerk *et al.*, 2008), nous avons testé l'hypothèse selon laquelle le tPA endogène pourrait réguler ce rôle d'immunosurveillance des PCs (**Figures 50 et 51**).

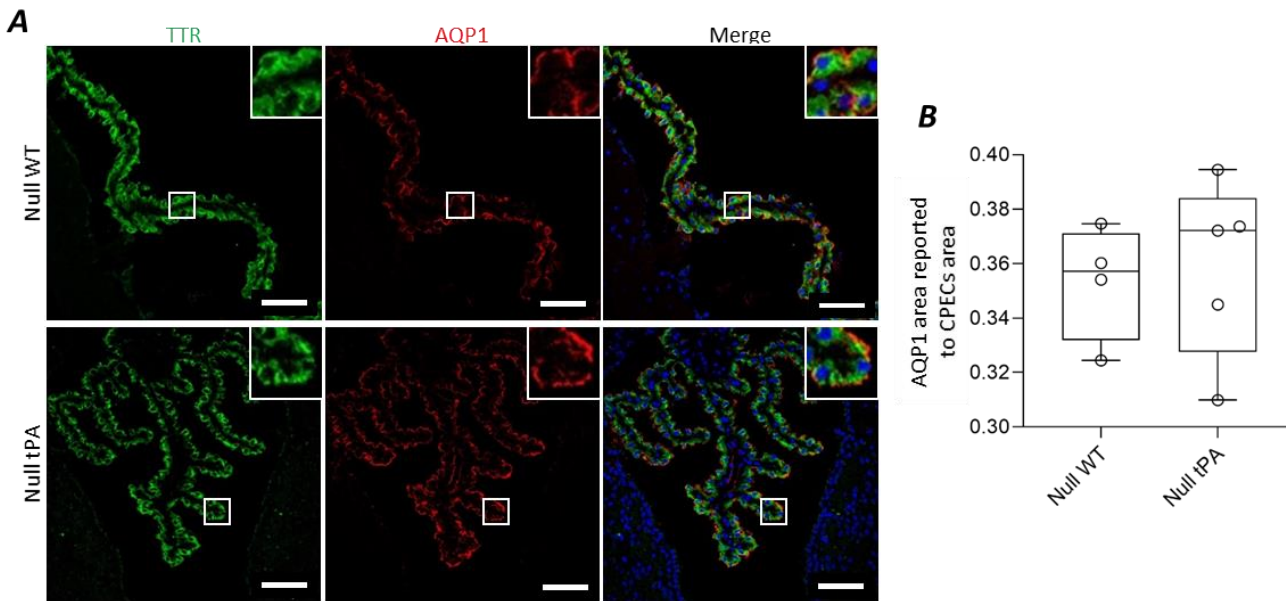


Figure 49: Comparison of AQP1 expression in Null WT and Null tPA mice. **A**, Confocal photomicrographs of CPs sections with TTR (left, green), AQP1 (middle, red) and as merged image (right) stainings, scale bar 50 μ m. **B**, Median ratio \pm SEM of AQP1 staining reported to TTR staining (Null WT n=4, Null tPA n=5).

Pour commencer, un immunomarquage contre Iba1, un marqueur de macrophages dans les plexus choroïdes, a été effectué (**Figure 50 A**) et le nombre de cellules marquées a été rapporté à l'aire du stroma. Le comptage ne révèle pas de différence du nombre de cellules entre souris Null WT, $2,9 \pm 0,2$ cellules/1000 μ m², et Null tPA, $2,5 \pm 0,8$ cellules/1000 μ m² (**Figure 50 B**).

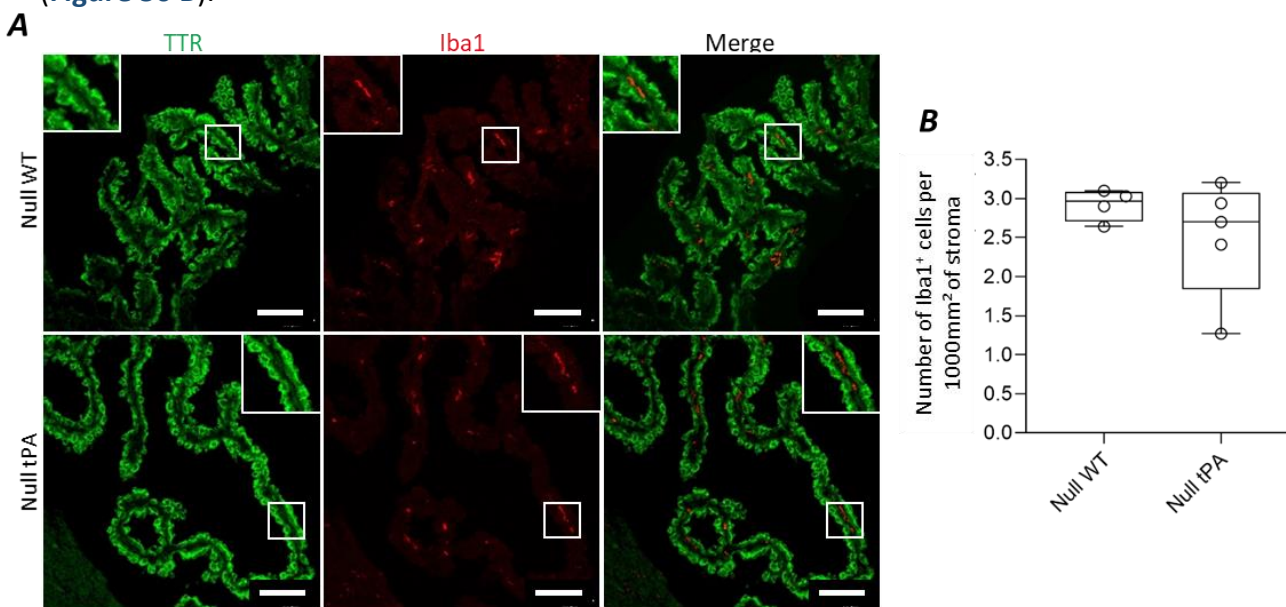


Figure 50: Comparison of Iba1 positive cells in Null WT and Null tPA mice. **A**, Confocal photomicrographs of CPs sections with TTR (left, green), Iba1 (middle, red) and as merged image (right) staining, scale bar 50 μ m. **B**, Median number \pm SEM of Iba1 positive cells per 1000mm² of stroma (Null WT n=4, Null tPA n=5).

Ensuite, nous avons étudié la population de lymphocytes T par un immunomarquage ciblant le CD3 (cluster de différenciation 3). Ces cellules sont très peu présentes dans les CPECs, seulement une trentaine de cellules pour une cinquantaine de coupes (**Figure 51 A**). Il n'y a pas de différence significative dans le nombre de cellules CD3⁺ entre les génotypes : $0,15 \pm 0,05$ cellules. $1000\mu\text{m}^2$ pour les Null WT contre $0,11 \pm 0,02$ cellules/ $1000\mu\text{m}^2$ pour les Null tPA (**Figure 51 B**).

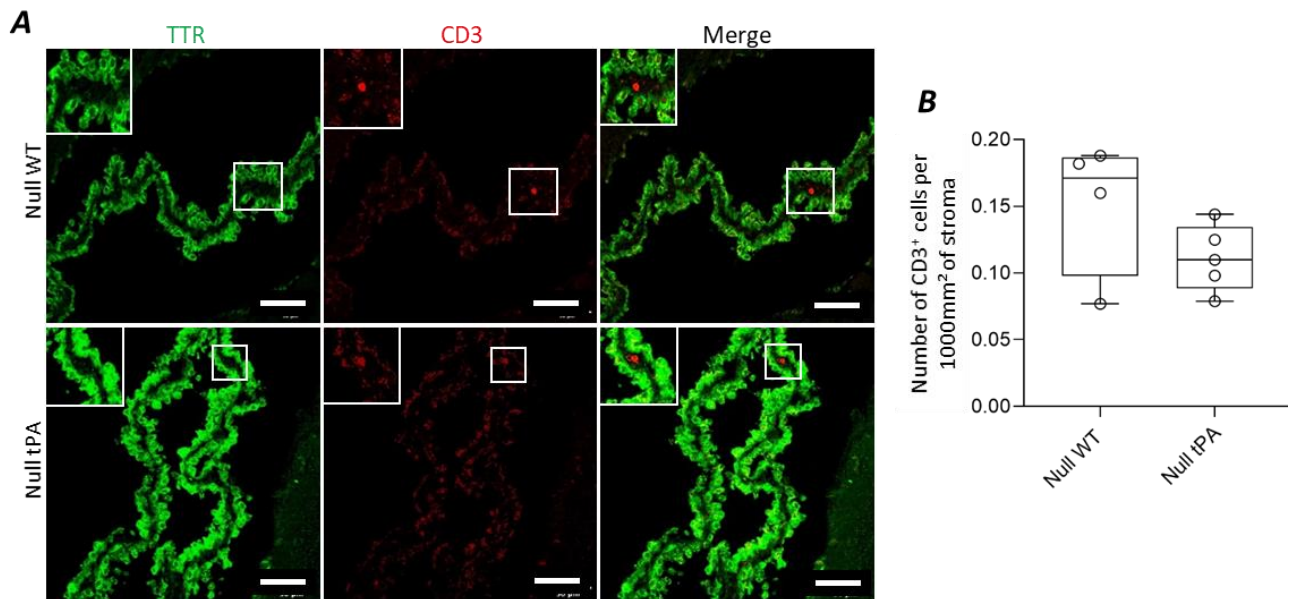


Figure 51: Comparison of CD3 positive cells in Null WT and Null tPA mice. **A**, Confocal photomicrographs of CPs sections with TTR (left, green), CD3 (middle, red) and as merged image (right) staining, scale bar $50\mu\text{m}$. **B**, Median number \pm SEM of CD3 positive cells per 1000mm^2 of stroma (Null WT $n=4$, Null tPA $n=5$).

L'ensemble de ces résultats montre que tPA endogène n'influence pas la fonction d'immunosurveillance des PCs en conditions basales.

Discussion

Le tPA cérébral endogène est impliqué dans de nombreuses fonctions et dysfonctions du système nerveux central, que ce soit pendant le développement ou à l'âge adulte. Dans des conditions pathologiques, le tPA peut contrôler le devenir neuronal, en fonction, entre autres, de sa cible (type de cellule, récepteur...). Il est donc impératif de comprendre le ou les mécanismes cellulaires et moléculaires sous-jacent spécifiquement à chaque fonction du tPA. Un autre niveau de complexité est que le tPA vasculaire (recombinant et très probablement endogène) peut également participer aux (dys)fonctions cérébrales. Cela peut résulter d'actions directes à l'interface entre les vaisseaux et le parenchyme cérébral et/ou du passage du tPA vasculaire vers le parenchyme cérébral. Comprendre comment le tPA vasculaire peut atteindre le cerveau est de fait un enjeu important, car il peut représenter une cible thérapeutique. Jusqu'à présent, la barrière hémato-encéphalique (BHE) était la seule «porte du cerveau» considérée dans notre groupe de recherche, il a été démontré que le tPA peut traverser la BHE dans des conditions physiologiques ou pathologiques (Benchenane, *et al.*, 2005). Au cours de ma thèse, j'ai étudié l'hypothèse selon laquelle les plexus choroïdes (PC) sont une voie d'entrée potentielle du tPA vers parenchyme cérébral.

A notre connaissance, nous fournissons la première démonstration que, suite à une injection intraveineuse, le tPA se retrouve dans l'épithélium des PCs, avec un profil en forme de cloche (pic à 30 minutes, **Figure 23**), compatible avec deux hypothèses : soit une dégradation au sein cellules épithéliales et/ou un passage à travers les PCs, vers le liquide cébrospinal (LCS). La détection de tPA dans le LCS à partir 60 minutes après l'injection est en faveur de l'existence d'un passage transchoroïdien (**Figure 26**). En 2005, dans notre équipe, Benchenane et collaborateurs ont également montré la présence de tPA dans le LCS 60 minutes après une injection IV chez le rat. Les auteurs ont alors émis l'hypothèse que ce tPA avait été transporté au travers de la BHE, sur la base d'études mécanistiques *in vitro* et sur l'immunodétection du tPA entre la lame basale et les pieds astrocytaires (Benchenane, *et al.*, 2005 a and b, **Figure 52**). Cependant, les auteurs ne se sont pas intéressés aux PCs. En effet, comme le montre la figure suivante, ils ne se sont intéressés qu'à la BHE et à certains de ses composants, à savoir la lame basale et les pieds astrocytaires.

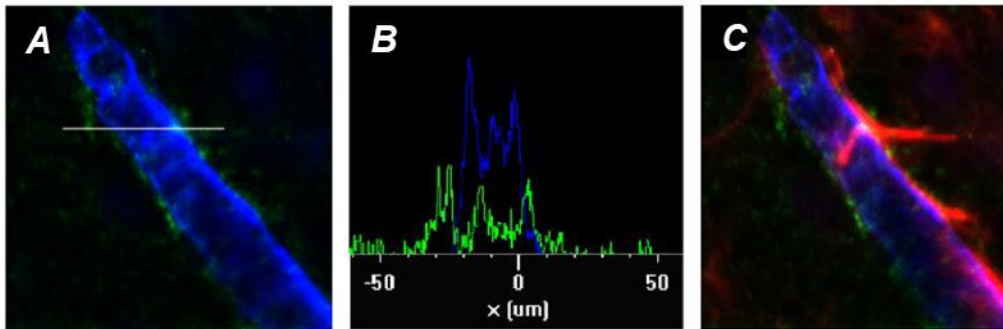


Figure 52: tPA crosses the intact BBB. **A**, Superposition of the immunostainings against biotinylated tPA (green) and collagen IV (blue). **B**, Intensity of fluorescence for each pixel present in a line crossing a capillary as indicated in **A**. **C**, Superposition of immunostainings against biotinylated-tPA (green), collagen IV (blue) and GFAP (red) (adapted from Benchenane *et al.*, 2005)

Une fois dans le LCS, quelle est l'étape suivante dans le parcours du tPA ? Hormis dans les organes circumventriculaires (**Figure 24**), nous n'avons pas trouvé de tPA dans le parenchyme, à l'instar de Benchenane et collaborateurs (**Figure 52 C**).

Cela soulève la possibilité que le tPA reste soit dans le LCS ou est éliminé. Cependant, nos résultats semblent exclure la première hypothèse puisque nous détectons moins de tPA dans le LCS après 120 minutes par rapport aux niveaux à 60 minutes. Alternativement, nous ne pouvons pas exclure qu'une fois dilué dans le système ventriculaire, la quantité de tPA qui atteint le cerveau soit inférieure à notre limite de sensibilité de détection.

Iloff *et al.* ont montré qu'il y avait moins de traceurs détectés dans les espaces périvasculaires suite à une infusion dans les ventricules par rapport à une injection directe dans la *cisterna magna* (Iloff *et al.*, 2012, **Figure 53**). En effet, les plexus sont au début de la circulation du LCS. S'affranchir du trajet depuis les ventricules vers les espaces sous-arachnoïdiens semble pertinent pour pouvoir objectiver un passage du tPA depuis le LCS vers le parenchyme.

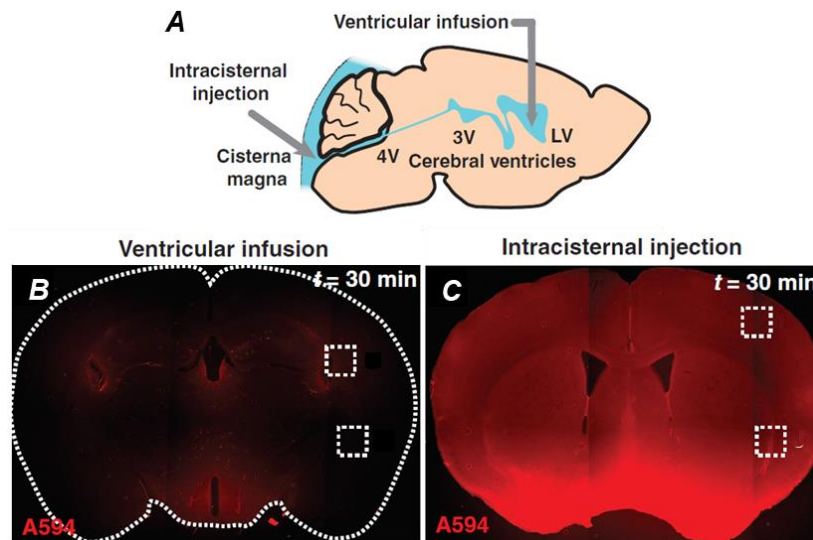


Figure 53: Modalities of injections into the CSF (A), and the resulting diffusion in B and C (adapted from, Iliff *et al.*, 2012)

Suite à une étude préliminaire, nous avons détecté du tPA autour des artères pénétrantes et une légère fluorescence dans le parenchyme (Figure 54).

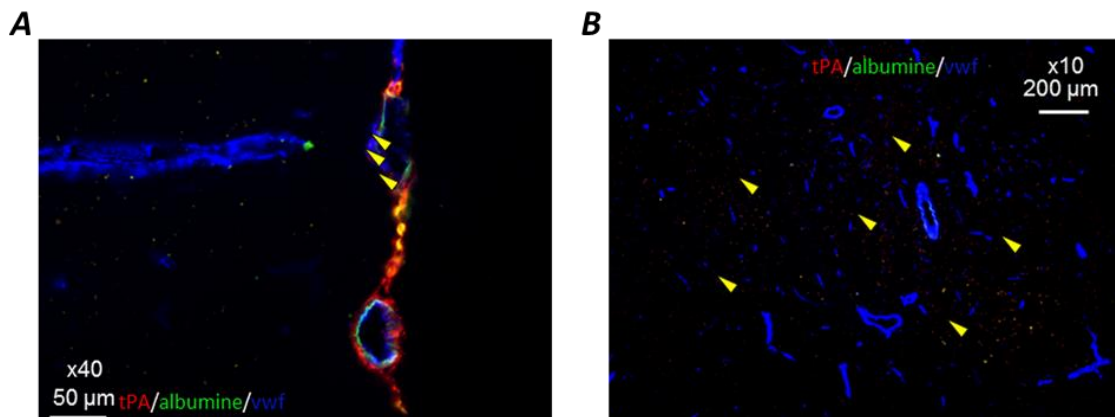


Figure 54: After intracisternal injection some tPA is found around and in the brain. **A**, tPA (red) is in the meninges and some around penetrating arteries (yellow arrowheads) scale bar 50 μm . **B**, tPA sparsely found in the cortex (yellow arrowheads) scale bar 200 μm .

Pour étudier les mécanismes d'internalisation du tPA au niveau des PCs, nous avons développé un modèle de culture primaire de CPECs de souris, adapté du protocole développé par Monnot et Zheng (2013). La plupart des études *in vitro* sur les CPECs reposent sur des lignées cellulaires humaines ou murines. Cependant, Lazarevic et Engelhardt (2016) ont montré que les cultures primaires constituaient le meilleur modèle de barrière sang-LCS (BSLCS) comparativement aux lignées cellulaires inductibles ou tumorales. En effet, ils ont

montré que ces lignées cellulaires n'exprimaient pas toujours les protéines caractéristiques des épithéliums ou n'étaient pas en mesure d'établir des jonctions serrées complètes. Notons le développement très récent d'un modèle de culture à partir de plexus de Rhésus macaques (Delery and MacLean, 2019), il serait très intéressant de reproduire les expériences dans ce modèle afin de se rapprocher de la physiologie humaine. Comme toute culture primaire comparée à une lignée cellulaire, notre modèle nécessite l'utilisation d'animaux et, dans notre cas, de nombreuses souris adultes (10 souris pour obtenir une plaque à 24 puits), ce qui représente une limite éthique. Cependant, notre modèle nous a permis de montrer que l'internalisation du tPA est un phénomène actif, qui dépend à la fois du temps d'exposition et de la dose de tPA. De plus, comme nous le verrons plus tard, ce modèle nous a permis de disséquer les mécanismes cellulaires et moléculaires impliqués dans l'internalisation du tPA.

Une limite potentielle de notre modèle est que les cellules épithéliales ne sont pas polarisées. Il est donc pratique pour étudier les processus d'internalisation mais pas vraiment d'évaluer l'externalisation. Une possibilité pour surmonter ce problème aurait pu être d'ensemencer les cellules sur des inserts. Alternativement, nous avons effectué des expériences de « *pulse-chase* », en exposant les CPECs au tPA pendant 120 minutes, puis en remplaçant le milieu par un milieu sans tPA. En l'absence de tout stimulus, nous avons observé une nette diminution de l'intensité de la fluorescence dans la monocouche cellulaire en moins de 45 minutes (**Figure 55**). Ceci pourrait s'expliquer par une libération constitutive de tPA par les CPECs. Cependant, nous devons conforter cette hypothèse en montrant une libération réelle et en excluant la possibilité d'une dégradation intracellulaire. En outre, nous souhaiterions savoir si des stimuli spécifiques pourraient contrôler l'efficacité de la libération (un stress inflammatoire par exemple ou une étude de privation d'oxygène et de glucose imitant des conditions ischémiques). Il pourrait également être pertinent d'étudier des molécules thérapeutiques : par exemple, le peptide immunomodulateur Cop-1, qui a été approuvé par la FDA pour le traitement de la sclérose en plaques, et qui est connu pour induire la libération de médiateurs neurogènes (Cruz *et al.*, 2018).

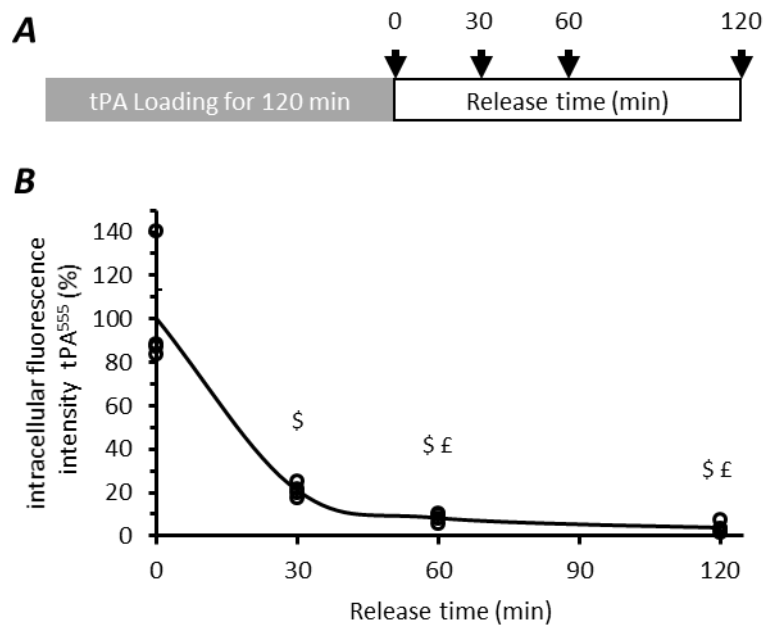


Figure 55: Intracellular tPA decreases over time in the monolayer of CPECs after 120 minutes of loading. **A** Experimental design: CPECs were exposed to 40nM of tPA⁵⁵⁵ for 120 minutes. Then, cells were rinsed with PBS and medium without tPA added and left in the incubator for 0 to 120 minutes. **B**, Quantification of fluorescence expressed as percentage of maximal uptake (n=4) mean \pm SEM of **A**, \$ different from 0 minutes, £ different from 30 minutes ($p=0.029$), Mann-Whitney *U* test.

Une autre étude intéressante pourrait consister à récupérer des vésicules extracellulaires provenant de CPECs, en effet il a été démontré que ces systèmes vésiculaires transmettaient des informations au SNC via le LCS. (Balusu *et al.*, 2016), de plus certaines de ces vésicules pourraient contenir du tPA (Lenoir *et al.*, 2019).

Une autre découverte clé de notre travail est que l'internalisation du tPA implique un membre de la famille LRP, car elle est réduite par la protéine RAP, et qui n'est pas LRP1. LRP1 est en effet le principal transporteur connu de tPA. De fait, il a été démontré au laboratoire que LRP1 est responsable de la transcytose du tPA au travers de la BHE (Benchenane, *et al.*, 2005, 2005b). Cependant, l'extinction de l'expression de LRP1 de près de 60% n'a pas réduit l'internalisation du tPA. Nous nous sommes ensuite concentrés sur LRP2 (mégaline), un autre récepteur du tPA. Cependant, une fois de plus, l'extinction de l'expression de LRP2 provoquée par l'ARNi n'a eu aucun effet sur l'internalisation du tPA. L'extinction des deux (LRP1 + LRP2) n'a également eu aucun impact sur l'internalisation du tPA par les CPECs.

À notre connaissance, la littérature sur RAP ne mentionne aucune interaction avec d'autres récepteurs que ceux de la famille LRP. Par conséquent, il serait utile de réaliser une

analyse par RNAseq afin d'identifier quels membres de la famille LRP sont exprimés par les CPECs. Ensuite, une extinction sélective de chacun des membres exprimés pourra être effectuée.

De plus, comme RAP à la concentration testée ne réduit le transport de tPA que de 40%, un autre acteur pourrait être impliqué dans ce processus. Nous testons actuellement l'hypothèse d'une implication de l'annexine II, qui est exprimée par les PC (Dreier *et al.*, 1998). Cette hypothèse annexine II est cohérente avec notre démonstration que l'internalisation du tPA recrute son domaine de Finger, connu pour interagir avec l'annexine II (Cesarman *et al.*, 1994).

A propos du domaine Finger, notons qu'il nous a permis de rendre possible le passage d'une molécule normalement non transportée à travers les CPECs. Ce genre de protéine fusion avec le domaine Finger du tPA pourrait avoir un intérêt clinique, pour faire rentrer dans le parenchyme des molécules à visée thérapeutique.

Nous nous sommes ensuite intéressés au passage du tPA dans un contexte d'AVC ischémique couplé à une thrombolyse. Dans le modèle d'AVC thromboembolique mis en place au laboratoire (Orset *et al.*, 2007), nous montrons une accumulation plus importante de tPA dans les PCs induite par l'AVC. Cette étude préliminaire doit être complétée pour confirmer ces observations et savoir s'il s'agit d'une modification de la cinétique de passage et/ou une internalisation sans externalisation. Plusieurs mécanismes pourraient expliquer cette éventuelle accumulation : le rôle de senseur des plexus, déjà démontré dans le cadre d'un traumatisme médullaire (Moore et Oglesbee, 2012; Shechter *et al.*, 2013), ou encore une augmentation de la pression artérielle (Bath *et al.*, 2003), qui augmenterait le DSC en faveur des PCs et par conséquent augmenterait la disponibilité du tPA.

Cette étude pilote devra être répétée pour augmenter la taille de l'échantillon. Il sera important d'associer ce travail à des analyses immunohistologiques, afin de savoir si les modifications d'entrée du tPA par les plexus ischémiques impactent les fonctions des PCs, en terme d'immunosurveillance/d'entrée des cellules inflammatoires. Avec la technique d'imagerie fUS, ultra-rapide par ultrasons (Macé *et al.*, 2011), disponible au laboratoire (en collaboration avec M. Tanter de l'Institut Langevin), il serait intéressant, grâce à des microbulles remplies d'un gaz inerte, d'imager en haute résolution, les PCs (Errico *et al.*, 2016,

Figure 56). Ces microbulles pourraient être conjuguées à du tPA pour une imagerie en temps réel de l'absorption du tPA.

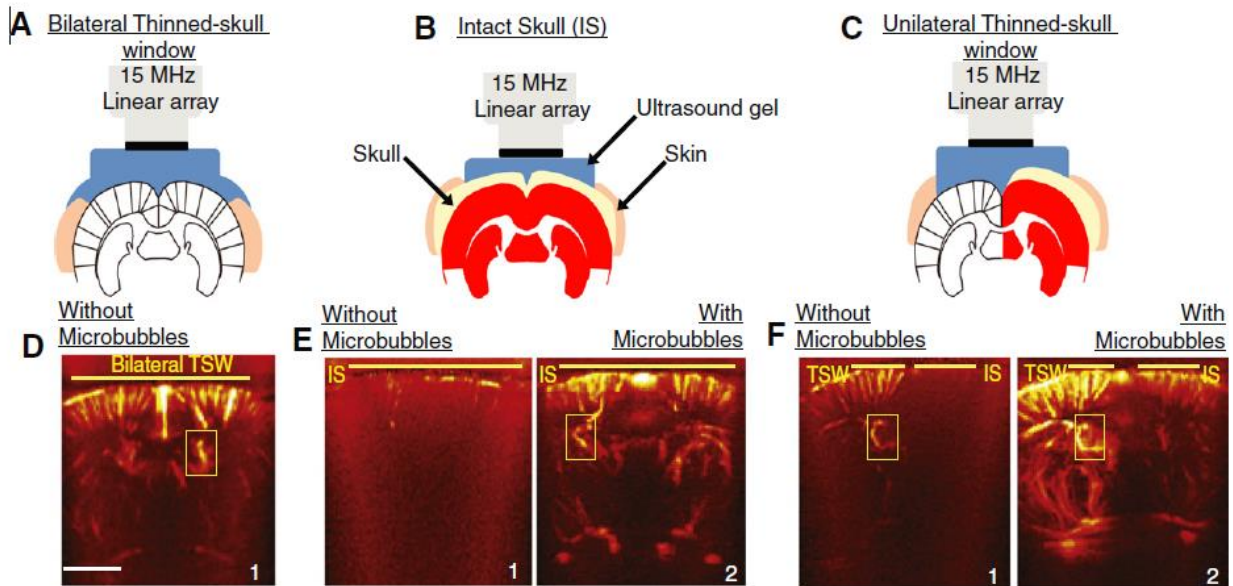


Figure 56: High-resolution ultrafast Doppler imaging of the rat brain vasculature through the intact skull (IS) after intravenous injection of microbubble contrast agents. A–C: Schematic of the three imaging configurations used: bilateral thinned skull window (TSW, A), intact skull (IS, B) or unilateral thinned skull window (C). D–F: Examples of vascular maps obtained with the different imaging modalities in absence (1) or presence of microbubbles (2). D: High quality imaging of both superficial and deep cerebral structures was obtained in the control configuration, i.e. without microbubbles through the bilateral thinned-skull window. E–F: In absence of contrast agent, the microvascular structures of the brain are no longer distinguishable through the intact skull (IS). However, the loss of signal due to the cranial bone is fully compensated by the injection of 150 μ l of microbubble contrast agents. The yellow boxes in D–F show the fUS signal in the choroid plexus of the lateral ventricle, allowing the correct US probe placement above the S1HL at Bregma -1 mm. Scale bar: 2 mm. (Errico *et al.*, 2016)

De plus, étant donné que les mécanismes de transport du tPA à travers la BHE ne sont pas identiques dans des conditions normales et ischémiques (Benchenane *et al.*, 2005a ;2005b), il importera de reproduire notre paradigme expérimental (pharmacologie, ARN interférant, etc.) sur cultures primaires de CPECs soumises à une privation d'oxygène et de glucose.

Une question importante restée sans réponse dans notre étude est de définir le «but» du transport de tPA à travers les CPECs. En outre, les quantités de tPA traversant les PCs sont-elles suffisamment élevées pour influencer les fonctions cérébrales ? Quel(s) test(s) doit (doivent) être effectué(s) ? Nous avons plusieurs pistes qui incluent un immunomarquage c-fos, un marqueur d'activation neuronale, ou un traceur fluorescent pour le calcium

(GCaMP), molécule de signalisation impliquée dans certains effets du tPA (Nicole *et al.*, 2001). Il serait également très difficile de distinguer la contribution respective du tPA des PCs par rapport à la BHE. Une fois que nous aurons identifié le membre de la famille LRP impliqué, nous pourrions utiliser des approches pharmacologiques. Alternativement, nous pourrions induire une photothrombose des PCs, telle que décrite par Llovera *et al.*, (2017), et mesurer ainsi l'impact de l'obstruction de la voie choroïdienne, dans des conditions physiologiques ou pathologiques, en particulier un accident vasculaire cérébral.

Comme mentionné dans l'introduction, le tPA endogène est impliqué dans de nombreuses fonctions et son absence peut entraîner des déficits dans les processus d'apprentissage (Pawlak *et al.*, 2002), des altérations de la mémoire spatiale (Hébert *et al.*, 2017) ou des anomalies de la migration neuronale (Pasquet *et al.*, 2019). Dans ce contexte, nous avons voulu déterminer si le tPA endogène pouvait également influencer la physiologie des PCs. Pour ce faire, nous avons utilisé des souris n'exprimant pas le tPA (une souche générée au laboratoire) et avons étudié les paramètres anatomiques, la diffusion du LCS et la fonction immunitaire.

En 2015, Stefanistch et ses collaborateurs ont montré que les souris déficientes en tPA présentaient une asymétrie des ventricules latéraux (Stefanitsch *et al.*, 2015, **Figure 57 A-C**). Nous n'avons pas trouvé une telle asymétrie dans notre modèle de souris tPA Null. De plus, nous n'avons observé aucune variation de la structure ou de la taille des PCs et aucune différence dans l'expression de AQP1. Il y a quelques mois, Yu et ses collègues ont montré que les souris déficientes en tPA présentaient des dysfonctionnements du système glymphatique. En effet, suite à l'injection de traceurs dans la *cisterna magna*, ils montrent que la clairance de ces traceurs est plus lente chez les souris déficientes en tPA par rapport aux souris (Yu *et al.*, 2019, **Figure 57 D-K**). Dans notre étude IRM, nous n'avons trouvé aucune différence entre les coefficients de diffusion du LCS. Pour évaluer cette différence, ils ont mesuré la fluorescence des traceurs ayant diffusés dans le parenchyme cérébral suite à une injection intracisternale. Dans notre étude, l'IRM nous donne la capacité d'extraire des valeurs quantitatives de gadolinium et ainsi de disposer de données quantifiées sur la diffusion. Nous ne pouvons pas exclure que les différences génotypiques contribuent également à ces résultats divergents.

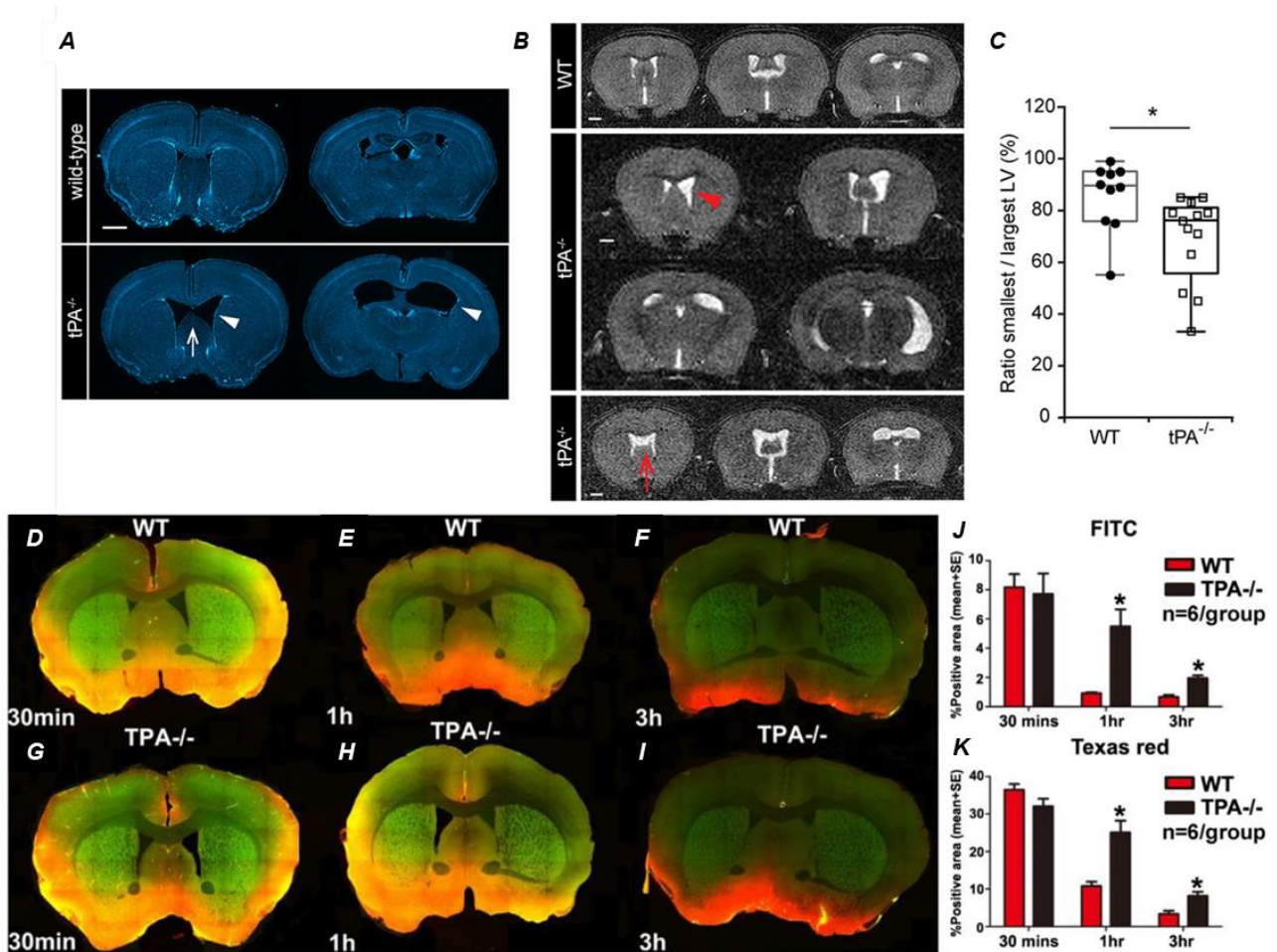


Figure 57: Differences in morphology and diffusion between WT and tPA KO mice. **(A)** Lateral ventricular abnormalities (arrowheads) and hypoplastic septum separating the lateral ventricles (LV; arrows) were seen in tPA KO mice in *ex vivo* sections visualized with DAPI and with **(B)** *in vivo* magnetic resonance imaging (MRI) of WT and tPA KO adult mice. **(B)** Montage from MR scans of an adult WT female mouse (upperpanel) and two tPA KO mice (middle panels, images from a male adult tPA KO mouse and lower panel, images from a female adult tPA KO mouse). **(C)** Quantification of the ratio between the smallest to the largest ventricular size from the MRI scans confirmed that tPA KO mice (n = 13) displayed a significant asymmetry in lateral ventricular size as compared to WT littermate controls (n = 10). **(D-K)** Compared with adult WT mice, adult tPA KO mice exhibit significantly delayed clearance of dyes injected into the cisterna magna indicating impaired functioning of the glymphatic system (adapted from, Stefanitsch *et al.*, 2015 and Yu *et al.*, 2019).

Les PCs sont un site d'immunosurveillance (Gherzi-Egea *et al.*, 2018) et constituent une entrée vers le LCS pour certaines cellules immunitaires, pour les lymphocytes dans la SEP (Reboldi *et al.*, 2009), ou les monocytes dans dans le cadre d'infections (Steinmann *et al.*, 2013). Le profil des immunomarquages ciblant Iba1 (pour les macrophages) et CD3 (pour les cellules T) n'a pas différé entre les souris de type sauvage et tPA NULL, montrant que le tPA

Discussion

endogène n'influence pas la fonction d'immunosurveillance des PCs dans des conditions basales. Il est évident que ces analyses histologiques doivent être reproduites dans des conditions pathologiques connues pour recruter les PCs en tant qu'entrée de cellules immunitaires (modèle d'AVc ou de SEP).

Conclusion

Conclusion

Mon travail de thèse contribue à mieux comprendre le cheminement du tPA vasculaire vers le SNC d'une part et son implication dans des fonctions des PCs.

La première partie de mes travaux de thèse a permis de démontrer que le tPA d'origine vasculaire peut rejoindre le SNC *via* la porte d'entrée que sont les PCs. Cette démonstration a été faite à la fois *in vivo*, en conditions physiologique et pathologique, et *in vitro* sur des cultures de CPECs, que j'ai mise en place au laboratoire. *In vivo* la cinétique de passage du tPA dans les CPECs a un profil en cloche et le tPA est retrouvé dans le LCS après ce pic d'internalisation des CPECs. *In vitro* nous montrons que l'internalisation du tPA est dépendante à la fois de la dose et du temps et qu'elle nécessite le domaine Finger du tPA.

La seconde partie visait à déterminer un rôle du tPA sur les fonctions du PC. Sur les paramètres étudiés, circulation et production du LCS et le rôle d'immunosurveillance, nous n'avons pas montré de différence entre les souris contrôles et les souris déficientes en tPA.

Ces résultats permettent d'apporter de nouvelles connaissances sur les relations entre le tPA et les PCs. Un résultat intéressant à noter est le rôle du domaine Finger du tPA qui pourrait être utilisé pour apporter des molécules dans le SNC *via* les PCs.

Bibliographie

A

- Abbott NJ, Rönnbäck L, and Hansson E (2006, January) Astrocyte-endothelial interactions at the blood-brain barrier *Nat Rev Neurosci*.
- Adams HP, Bendixen BH, Kappelle LJ, Biller J, Love BB, Gordon DL, and Marsh EE (1993) Classification of subtype of acute ischemic stroke. Definitions for use in a multicenter clinical trial. TOAST. Trial of Org 10172 in Acute Stroke Treatment. *Stroke* **24**, 35–41.
- Akassoglou K, Kombrinck KW, Degen JL, and Strickland S (2000) Tissue plasminogen activator-mediated fibrinolysis protects against axonal degeneration and demyelination after sciatic nerve injury *J Cell Biol* **149**, 1157–1166.
- Al-Shahi R, White PM, Davenport RJ, and Lindsay KW (2006) Subarachnoid haemorrhage *BMJ* **333**, 235–240.
- Albargothy NJ, Johnston DA, MacGregor Sharp M, Weller RO, Verma A, Hawkes CA, and Carare RO (2018) Convective influx/glymphatic system: tracers injected into the CSF enter and leave the brain along separate periarterial basement membrane pathways *Acta Neuropathol* **136**, 139–152.
- Albrechtsen OK (1957) The Fibrinolytic Activity of Human Tissues *Br J Haematol* **3**, 284–291.
- Aldred AR, Brack CM, and Schreiber G (1995) The cerebral expression of plasma protein genes in different species *Comp Biochem Physiol -- Part B Biochem*.
- Alvarez V, Rossetti AO, Papavasileiou V, and Michel P (2013) Acute seizures in acute ischemic stroke: does thrombolysis have a role to play? *J Neurol* **260**, 55–61.
- Amantea D, Nappi G, Bernardi G, Bagetta G, and Corasaniti MT (2009) Post-ischemic brain damage: Pathophysiology and role of inflammatory mediators *FEBS J* **276**, 13–26.
- Armstead WM, Riley J, Yarovoi S, Higazi AA-R, and Cines DB (2016) Tissue-Type Plasminogen Activator-A296-299 Prevents Impairment of Cerebral Autoregulation After Stroke Through Lipoprotein-Related Receptor-Dependent Increase in cAMP and p38. *Stroke* **47**, 2096–102.
- Arvidsson A, Collin T, Kirik D, Kokaia Z, and Lindvall O (2002) Neuronal replacement from endogenous precursors in the adult brain after stroke *Nat Med* **8**, 963–970.
- Asahi M, Asahi K, Jung JC, Del Zoppo GJ, Fini ME, and Lo EH (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* **20**, 1681–1689.
- Aspelund A, Antila S, Proulx ST, Karlsten TV, Karaman S, Detmar M, ... Alitalo K (2015) A dural lymphatic vascular system that drains brain interstitial fluid and macromolecules *J Exp Med* **212**, 991–999.
- Astrup J, Siesjö BK, and Symon L (1981a) Thresholds in cerebral ischemia - the ischemic penumbra. *Stroke* **12**, 723–725.

Bibliographie

Astrup J, Siesjö BK, and Symon L (1981b) Thresholds in cerebral ischemia — the ischemic penumbra *Stroke*.

Astrup T, and Stage A (1952) Isolation of a Soluble Fibrinolytic Activator from Animal Tissue *Nature* **170**, 929–929.

B

Bahar M, Hashem H, Tekautz T, Worley S, Tang A, de Blank P, and Wolff J (2017) Choroid plexus tumors in adult and pediatric populations: the Cleveland Clinic and University Hospitals experience. *J Neurooncol* **132**, 427–432.

Balusu S, Van Wonterghem E, De Rycke R, Raemdonck K, Stremersch S, Gevaert K, ... Vandembroucke RE (2016) Identification of a novel mechanism of blood-brain communication during peripheral inflammation via choroid plexus-derived extracellular vesicles. *EMBO Mol Med* **8**, 1162–1183.

Baranes D, Lederfein D, Huang Y-Y, Chen M, Bailey CH, and Kandel ER (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.

Baron A, Montagne A, Cassé F, Launay S, Maubert E, Ali C, and Vivien D (2010) NR2D-containing NMDA receptors mediate tissue plasminogen activator-promoted neuronal excitotoxicity *Cell Death Differ* **17**, 860–871.

Bath P, Chalmers J, Powers W, Beilin L, Davis S, Lenfant C, ... International Society of Hypertension Writing Group (2003) International Society of Hypertension (ISH): statement on the management of blood pressure in acute stroke. *J Hypertens* **21**, 665–72.

Benchenane K, Berezowski V, Ali C, Fernández-Monreal M, López-Atalaya JP, Brillault J, ... 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.

Benchenane K, Berezowski V, Fernández-Monreal M, Brillault J, Valable S, Dehouck MP, ... Ali C (2005) Oxygen glucose deprivation switches the transport of tPA across the blood-brain barrier from an LRP-dependent to an increased LRP-independent process *Stroke* **36**, 1059–1064.

Benchenane K, Castel H, Boulouard M, Bluthé R, Fernández-Monreal M, Roussel BD, ... 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.

Benjamin EJ, Muntner P, Alonso A, Bittencourt MS, Callaway CW, Carson AP, ... Virani SS (2019) Heart Disease and Stroke Statistics—2019 Update: A Report From the American Heart Association *Circulation* **139**, e56–e66.

Berezowski V, Fukuda AM, Cecchelli R, and Badaut J (2012) Endothelial cells and astrocytes: A concerto en duo in ischemic pathophysiology *Int J Cell Biol*.

Bibliographie

- Bertrand T, Lesept F, Chevilly A, Lenoir S, Aimable M, Briens A, ... Vivien D (2015) Conformations of tissue plasminogen activator (tPA) orchestrate neuronal survival by a crosstalk between EGFR and NMDAR *Cell Death Dis* **6**.
- Biessen EAL, van Teijlingen M, Vietsch H, Barrett-Bergshoeff MM, Bijsterbosch MK, Rijken DC, ... 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.
- Binder BR, Spragg J, and Austen KF (1979) Purification and characterization of human vascular plasminogen activator derived from blood vessel perfusates. *J Biol Chem* **254**, 1998–2003.
- Blasi F, Vassalli JD, and Dano K (1987, April) Urokinase-type plasminogen activator: Proenzyme, receptor, and inhibitors *J Cell Biol*.
- Bliss TVP, and 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* (Vol. 232).
- Block ML, and Hong J-S (2005, June) Microglia and inflammation-mediated neurodegeneration: Multiple triggers with a common mechanism *Prog Neurobiol*.
- Boehme AK, Esenwa C, and Elkind MSV (2017, February 3) Stroke Risk Factors, Genetics, and Prevention *Circ Res*. Lippincott Williams and Wilkins.
- Boyles PW, Meyer WH, Graff J, Ashley CC, and Ripic RG (1960) Comparative effectiveness of intravenous and intra-arterial fibrinolytic therapy *Am J Cardiol* **6**, 439–446.
- Bu G, Williams S, Strickland DK, and Schwartz AL (1992) Low density lipoprotein receptor-related protein/alpha 2-macroglobulin receptor is an hepatic receptor for tissue-type plasminogen activator. *Proc Natl Acad Sci* **89**, 7427–7431.
- Bukhari N, Torres L, Robinson JK, and Tsirka SE (2011) Axonal regrowth after spinal cord injury via chondroitinase and the tissue plasminogen activator (tPA)/plasmin system *J Neurosci* **31**, 14931–14943.

C

- Calabresi P, Napolitano M, Centonze D, Marfia GA, Gubellini P, Teule MA, ... Gulino A (2000) Tissue plasminogen activator controls multiple forms of synaptic plasticity and memory *Eur J Neurosci* **12**, 1002–1012.
- Carare RO, Bernardes-Silva M, Newman TA, Page AM, Nicoll JAR, Perry VH, and Weller RO (2008) Solutes, but not cells, drain from the brain parenchyma along basement membranes of capillaries and arteries: significance for cerebral amyloid angiopathy and neuroimmunology *Neuropathol Appl Neurobiol* **34**, 131–144.
- Carpenter SJ, McCarthy LE, and Borison HL (1970) Electron microscopic study on the epiplexus (Kolmer) cells of the cat choroid plexus *Zeitschrift Für Zellforsch Und Mikroskopische Anat* **110**, 471–486.

Bibliographie

- Cassé F, Bardou I, Briens A, Montagne A, Parcq J, Alahari A, ... Galli T (2012) Glutamate controls tPA recycling by astrocytes, which in turn influences glutamatergic signals *J Neurosci* **32**, 5186–5199.
- Cavallaro T, Martone RL, Stylianopoulou F, and Herbert J (1993) Differential expression of the insulin-like growth factor II and transthyretin genes in the developing rat choroid plexus. *J Neuropathol Exp Neurol* **52**, 153–62.
- Cesarman GM, Guevara CA, and Hajjar KA (1994) An endothelial cell receptor for plasminogen/tissue plasminogen activator (t-PA). II. Annexin II-mediated enhancement of t-PA-dependent plasminogen activation. *J Biol Chem* **269**, 21198–203.
- Chandler WL, Alessi MC, Aillaud MF, Henderson P, Vague P, and Juhan-Vague I (1997) Clearance of Tissue Plasminogen Activator (TPA) and TPA/Plasminogen Activator Inhibitor Type 1 (PAI-1) Complex *Circulation* **96**, 761–768.
- Chen C, Bivard A, Lin L, Levi CR, Spratt NJ, and Parsons MW (2019) Thresholds for infarction vary between gray matter and white matter in acute ischemic stroke: A CT perfusion study *J Cereb Blood Flow Metab* **39**, 536–546.
- Chevilly A, Lesept F, Lenoir S, Ali C, Parcq J, and Vivien D (2015, October 16) Impacts of tissue-type plasminogen activator(tPA) on neuronal survival *Front Cell Neurosci*. Frontiers Research Foundation.
- Cho KH, Lee KJ, and Song CH (2012) Virtual-reality balance training with a video-game system improves dynamic balance in chronic stroke patients *Tohoku J Exp Med* **228**, 69–74.
- Chodobski A, Chung I, Koźniewska E, Ivanenko T, Chang W, Harrington FJ, ... Szmydynger-Chodobska J (2003) Early neutrophilic expression of vascular endothelial growth factor after traumatic brain injury *Neuroscience* **122**, 853–867.
- Cipolla MJ, Lessov N, and Clark WM (2000) Postischemic attenuation of cerebral artery reactivity is increased in the presence of tissue plasminogen activator *Stroke* **31**, 940–945.
- Collen D, and Lijnen HR (1991) Basic and clinical aspects of fibrinolysis and thrombolysis. *Blood* **78**, 3114–24.
- Collingridge GL, Kehl SJ, and McLennan H (1983) Excitatory amino acids in synaptic transmission in the Schaffer collateral-commissural pathway of the rat hippocampus. *J Physiol* **334**, 33–46.
- Correa F, Gauberti M, Parcq J, Macrez R, Hommet Y, Obiang P, ... Docagne F (2011) Tissue plasminogen activator prevents white matter damage following stroke *J Exp Med* **208**, 1229–1242.
- Cruz Y, García EE, Gálvez J V, Arias-Santiago S V, Carvajal HG, Silva-García R, ... Ibarra A (2018) Release of interleukin-10 and neurotrophic factors in the choroid plexus: possible inducers of neurogenesis following copolymer-1 immunization after cerebral ischemia. *Neural Regen Res* **13**, 1743–1752.

D

- Dandy WE (1919) EXPERIMENTAL HYDROCEPHALUS. *Ann Surg* **70**, 129–42.
- Delery EC, and MacLean AG (2019) Culture Model for Non-human Primate Choroid Plexus *Front Cell Neurosci* **13**.
- Dionísio A, Duarte IC, Patrício M, and Castelo-Branco M (2018) The Use of Repetitive Transcranial Magnetic Stimulation for Stroke Rehabilitation: A Systematic Review *J Stroke Cerebrovasc Dis*.
- Dirnagl U, Iadecola C, and Moskowitz MA (1999) Pathobiology of ischaemic stroke: an integrated view *Trends Neurosci* **22**, 391–397.
- Docagne F, Nicole O, Marti HH, MacKenzie ET, Buisson A, and Vivien D (1999) Transforming growth factor- β 1 as a regulator of the serpins/t-PA axis in cerebral ischemia *FASEB J* **13**, 1315–1324.
- Docagne F, Parcq J, Lijnen HR, Ali C, and Vivien D (2015) Understanding the functions of endogenous and exogenous tissue-type plasminogen activator during stroke *Stroke* **46**, 314–320.
- Dohrmann GJ (1970) The choroid plexus: A historical review *Brain Res* **18**, 197–218.
- Douet V, Kerever A, Arikawa-Hirasawa E, and Mercier F (2013) Fractone-heparan sulphates mediate FGF-2 stimulation of cell proliferation in the adult subventricular zone *Cell Prolif* **46**, 137–145.
- Doyle KP, Simon RP, and Stenzel-Poore MP (2008) Mechanisms of ischemic brain damage *Neuropharmacology* **55**, 310–318.
- Dreier R, Schmid KW, Gerke V, and Riehemann K (1998) Differential expression of annexins I, II and IV in human tissues: an immunohistochemical study. *Histochem Cell Biol* **110**, 137–48.
- Dubois-Dauphin M, Eder-Colli L, Vallet P, Stutz A, Nef S, and Vassalli JD (2004) Induction of enhanced green fluorescent protein expression in response to lesions in the nervous system *J Comp Neurol* **474**, 108–122.

E

- Egorova N, Gottlieb E, Khelif MS, Spratt NJ, and Brodtmann A (2019) Choroid plexus volume after stroke *Int J Stroke* **0**, 1–8.
- Engelhardt B, and Coisne C (2011, January 18) Fluids and barriers of the CNS establish immune privilege by confining immune surveillance to a two-walled castle moat surrounding the CNS castle *Fluids Barriers CNS*.
- Ennis SR, and Keep RF (2006) The effects of cerebral ischemia on the rat choroid plexus *J Cereb Blood Flow Metab* **26**, 675–683.

Errico C, Osmani BF, Pezet S, Couture O, Lenkei Z, and Tanter M (2016) Transcranial functional ultrasound imaging of the brain using microbubble-enhanced ultrasensitive Doppler *Neuroimage* **124**, 752–761.

F

Feigin VL, Roth GA, Naghavi M, Parmar P, Krishnamurthi R k., Chugh S, ... Forouzanfar MH (2016) Global burden of stroke and risk factors in 188 countries, during 1990–2013: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2013 *Lancet Neurol* **15**, 913–924.

Feldmann E, Broderick JP, Kernan WN, Viscoli CM, Brass LM, Brott T, ... Horwitz RI (2005) Major risk factors for intracerebral hemorrhage in the young are modifiable *Stroke* **36**, 1881–1885.

Fernández-Monreal M, López-Atalaya JP, Benchenane K, Léveillé F, Cacquevel M, Plawinski L, ... Vivien D (2004) Is tissue-type plasminogen activator a neuromodulator? *Mol Cell Neurosci* **25**, 594–601.

Flavin MP, Zhao G, and Ho LT (2000) Microglial tissue plasminogen activator (tPA) triggers neuronal apoptosis in vitro *Glia* **29**, 347–354.

Fredriksson L, Li H, Fieber C, Li X, and Eriksson U (2004) Tissue plasminogen activator is a potent activator of PDGF-CC *EMBO J*.

Fyhn M, Molden S, Witter MP, Moser EI, and Moser MB (2004) Spatial representation in the entorhinal cortex *Science (80-)* **305**, 1258–1264.

G

García-Rocha M, Avila J, and 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.

Ge R, Tornero D, Hirota M, Monni E, Laterza C, Lindvall O, and Kokaia Z (2017) Choroid plexus-cerebrospinal fluid route for monocyte-derived macrophages after stroke *J Neuroinflammation* **14**.

Gherzi-Egea J-F, Strazielle N, Catala M, Silva-Vargas V, Doetsch F, and Engelhardt B (2018) Molecular anatomy and functions of the choroidal blood-cerebrospinal fluid barrier in health and disease *Acta Neuropathol* **135**, 337–361.

Gillardot F, Lenz C, Kuschinsky W, and Zimmermann M (1996) Evidence for apoptotic cell death in the choroid plexus following focal cerebral ischemia *Neurosci Lett* **207**, 113–116.

Griffiths JB, and Electricwala A (2005) Production of tissue plasminogen activators from animal cells In *Vertebrate Cell Culture I* (pp. 147–166). Berlin/Heidelberg: Springer-Verlag.

Bibliographie

- Gupta A, Tsai LH, and Wynshaw-Boris A (2002) Life is a journey: A genetic look at neocortical development *Nat Rev Genet.*
- GUSTO AI (1993) The Effects of Tissue Plasminogen Activator, Streptokinase, or Both on Coronary-Artery Patency, Ventricular Function, and Survival after Acute Myocardial Infarction *N Engl J Med* **329**, 1615–1622.
- Gveric D (2003) Impaired fibrinolysis in multiple sclerosis: a role for tissue plasminogen activator inhibitors *Brain* **126**, 1590–1598.
- Gveric D, Hanemaaijer R, Newcombe J, van Lent NA, Sier CF, and Cuzner ML (2001) Plasminogen activators in multiple sclerosis lesions: implications for the inflammatory response and axonal damage. *Brain* **124**, 1978–88.

H

- Hacke W, Kaste M, Bluhmki E, Brozman M, Dávalos A, Guidetti D, ... Toni D (2008) Thrombolysis with alteplase 3 to 4.5 hours after acute ischemic stroke *N Engl J Med* **359**, 1317–1329.
- Hajjar KA, Jacovina AT, and Chacko J (1994) An endothelial cell receptor for plasminogen/tissue plasminogen activator. I. Identity with annexin II. *J Biol Chem* **269**, 21191–7.
- Hanly A, and Petito CK (1998) HLA-DR-positive dendritic cells of the normal human choroid plexus: A potential reservoir of HIV in the central nervous system *Hum Pathol* **29**, 88–93.
- Hayamizu TF, Chan PT, and Johanson CE (2001) FGF-2 immunoreactivity in adult rat ependyma and choroid plexus: responses to global forebrain ischemia and intraventricular FGF-2. *Neurol Res* **23**, 353–8.
- Hébert M, Anfray A, Chevilly A, Martinez De Lizarrondo S, Quenault A, Louessard M, ... Agin V (2017) Distant Space Processing is Controlled by tPA-dependent NMDA Receptor Signaling in the Entorhinal Cortex *Cereb Cortex* **27**, 4783–4796.
- Hébert M, Lesept F, Vivien D, and Macrez R (2016) The story of an exceptional serine protease, tissue-type plasminogen activator (tPA) *Rev Neurol (Paris)* **172**, 186–197.
- Herz J, Goldstein JL, Strickland DK, Ho YK, and Brown MS (1991) 39-kDa protein modulates binding of ligands to low density lipoprotein receptor-related protein/ α 2-macroglobulin receptor *J Biol Chem* **266**, 21232–21238.
- Hill RM, Parmar PK, Coates LC, Mezey E, Pearson JF, and Birch NP (2000) *Neuroserpin is expressed in the pituitary and adrenal glands and induces the extension of neurite-like processes in AtT-20 cells* *Biochem. J* (Vol. 345).
- Hino H, Akiyama H, Iseki E, Kato M, Kondo H, Ikeda K, and Kosaka K (2001) Immunohistochemical localization of plasminogen activator inhibitor-1 in rat and human brain tissues *Neurosci Lett* **297**, 105–108.
- Holmes WE, Nelles L, Lijnen HR, and Collen D (1987) Primary structure of human α 2-antiplasmin, a serine protease inhibitor (serpin) *J Biol Chem* **262**, 1659–1664.

Bibliographie

- Hong K-S, Saver JL, Kang D-W, Bae H-J, Yu K-H, Koo J, ... Lee B-C (2010) Years of Optimum Health Lost Due to Complications After Acute Ischemic Stroke *Stroke* **41**, 1758–1765.
- Hornig CR, Bauer T, Simon C, Trittmacher S, and Dorndorf W (1993) Hemorrhagic transformation in cardioembolic cerebral infarction *Stroke* **24**, 465–468.
- Hoylaerts M, Rijken DC, Lijnen HR, and Collen D (1982) Kinetics of the activation of plasminogen by human tissue plasminogen activator. Role of fibrin. *J Biol Chem* **257**, 2912–9.
- Huang X, Ketova T, Fleming JT, Wang H, Dey SK, Litingtung Y, and Chiang C (2009) Sonic hedgehog signaling regulates a novel epithelial progenitor domain of the hindbrain choroid plexus *Development* **136**, 2535–2543.
- Huang Y-Y, Bach ME, Lipp H-P, Zhuo M, Wolfer DP, Hawkins RD, ... 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.
- Hurtado M, Lozano JJ, Castellanos E, Lopez-Fernandez LA, Harshman K, Martinez-A C, ... Paciucci R (2007) Activation of the epidermal growth factor signalling pathway by tissue plasminogen activator in pancreas cancer cells *Gut* **56**, 1266–1274.

I

- Ichinose A, Kisiel W, and Fujikawa K (1984) Proteolytic activation of tissue plasminogen activator by plasma and tissue enzymes *FEBS Lett.*
- Iliff JJ, Wang M, Liao Y, Plogg BA, Peng W, Gundersen GA, ... Nedergaard M (2012) A paravascular pathway facilitates CSF flow through the brain parenchyma and the clearance of interstitial solutes, including amyloid β . *Sci Transl Med* **4**, 147ra111.
- Iriki A, Pavlides C, Keller A, and Asanuma H (1989) Long-term potentiation in the motor cortex *Science (80-)* **245**, 1385–1387.
- Itokazu Y, Kitada M, Dezawa M, Mizoguchi A, Matsumoto N, Shimizu A, and Ide C (2006) Choroid plexus ependymal cells host neural progenitor cells in the rat *Glia* **53**, 32–42.

J

- Jergović I, Budinčević H, Planjar-Prvan M, and Bielen I (2016) Transient Obstructive Hydrocephalus in Patients with Intracerebral Hemorrhage: Report of Two Cases *Acta Clin Croat* **55**, 497–500.
- Johnson CO, Nguyen M, Roth GA, Nichols E, Alam T, Abate D, ... Murray CJL (2019) Global, regional, and national burden of stroke, 1990–2016: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2016 *Lancet Neurol* **18**, 439–458.

K

- Kagitani H, Tagawa M, Hatanaka K, Ikari T, Saito A, Bando H, ... Matsuo O (1985) Expression in *E. coli* of finger-domain lacking tissue-type plasminogen activator with high fibrin affinity *FEBS Lett* **189**, 145–149.
- Keep RF, and Xiang J (1996) Choroid plexus taurine transport *Brain Res.*
- Knipe L, Meli A, Hewlett L, Bierings R, Dempster J, Skehel P, ... Carter T (2010) A revised model for the secretion of tPA and cytokines from cultured endothelial cells *Blood*.
- Kotan D, Aydin MD, Gundogdu C, Aygul R, Aydin N, and Ulvi H (2014) Parallel development of choroid plexus degeneration and meningeal inflammation in subarachnoid hemorrhage - experimental study. *Adv Clin Exp Med* **23**, 699–704.
- Kuiper J, Otter M, Rijken DC, and van Berkel TJC (1988) Characterization of the interaction in vivo of tissue-type plasminogen activator with liver cells. *J Biol Chem* **263**, 18220–4.

L

- Lamba D, Bauer M, Huber R, Fischer S, Rudolph R, Kohnert U, and 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.
- Lazarevic I, and Engelhardt B (2016) Modeling immune functions of the mouse blood-cerebrospinal fluid barrier in vitro: Primary rather than immortalized mouse choroid plexus epithelial cells are suited to study immune cell migration across this brain barrier *Fluids Barriers CNS* **13**, 1–20.
- Lee HY, Hwang IY, Im H, Koh JY, and Kim YH (2007) Non-proteolytic neurotrophic effects of tissue plasminogen activator on cultured mouse cerebrocortical neurons *J Neurochem* **101**, 1236–1247.
- Lemarchand E, Maubert E, Haelewyn B, Ali C, Rubio M, and Vivien D (2016) Stressed neurons protect themselves by a tissue-type plasminogen activator-mediated EGFR-dependent mechanism *Cell Death Differ* **23**, 123–131.
- Lemarchant S, Pruvost M, Hébert M, Gauberti M, Hommet Y, Briens A, ... Vivien D (2014) TPA promotes ADAMTS-4-induced CSPG degradation, thereby enhancing neuroplasticity following spinal cord injury *Neurobiol Dis* **66**, 28–42.
- Lenoir S, Varangot A, Lebouvier L, Galli T, Hommet Y, and Vivien D (2019) Post-synaptic release of the neuronal tissue-type plasminogen activator (tPA) *Front Cell Neurosci* **13**.
- Leonetti C, Macrez R, Pruvost M, Hommet Y, Bronsard J, Fournier A, ... Docagne F (2017) Tissue-type plasminogen activator exerts EGF-like chemokinetic effects on oligodendrocytes in white matter (re)myelination *Mol Neurodegener* **12**, 20.

Bibliographie

- Lesept F, Chevilly A, Jezequel J, Ladépêche L, Macrez R, Aimable M, ... Vivien D (2016) Tissue-type plasminogen activator controls neuronal death by raising surface dynamics of extrasynaptic NMDA receptors *Cell Death Dis* **7**.
- Leys D, Hommet Y, Jacquet C, Moulin S, Sibon I, Mas J-L, ... Vivien D (2016) Proportion of single-chain recombinant tissue plasminogen activator and outcome after stroke *Neurology* **87**, 2416–2426.
- Li Y, Chen J, and Chopp M (2002) Cell proliferation and differentiation from ependymal, subependymal and choroid plexus cells in response to stroke in rats *J Neurol Sci* **193**, 137–146.
- Liddelow SA (2011, January 18) Fluids and barriers of the CNS: A historical viewpoint *Fluids Barriers CNS*.
- Liddelow SA, Dziegielewska KM, Møllgård K, Whish SC, Noor NM, Wheaton BJ, ... Saunders NR (2014) Cellular specificity of the blood-CSF barrier for albumin transfer across the choroid plexus epithelium *PLoS One* **9**.
- Ling EA, Kaur C, and Lu J (1998) Origin, nature, and some functional considerations of intraventricular macrophages, with special reference to the epiplexus cells *Microsc Res Tech* **41**, 43–56.
- Liot G, Roussel BD, Lebeurrier N, Benchenane K, López-Atalaya JP, Vivien D, and 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.
- Liszcak TM, Black PM, Tzouras A, Foley L, and Zervas NT (1984) Morphological changes of the basilar artery, ventricles, and choroid plexus after experimental SAH *J Neurosurg* **61**, 486–493.
- Liu D, Cheng T, Guo H, Fernández JA, Griffin JH, Song X, and Zlokovic B V. (2004) Tissue plasminogen activator neurovascular toxicity is controlled by activated protein C *Nat Med* **10**, 1379–1383.
- Llovera G, Benakis C, Enzmann G, Cai R, Arzberger T, Ghasemigharagoz A, ... Liesz A (2017) The choroid plexus is a key cerebral invasion route for T cells after stroke *Acta Neuropathol* **134**, 851–868.
- Lochner JE, Kingma M, Kuhn S, Meliza CD, Cutler B, and Scalettar BA (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.
- López-Atalaya JP, Roussel BD, Levrat D, Parcq J, Nicole O, Hommet Y, ... Vivien D (2008) Toward safer thrombolytic agents in stroke: Molecular requirements for NMDA receptor-mediated neurotoxicity *J Cereb Blood Flow Metab*.
- Louessard M, Lacroix A, Martineau M, Mondielli G, Montagne A, Lesept F, ... Maubert E (2016) Tissue Plasminogen Activator Expression Is Restricted to Subsets of Excitatory Pyramidal Glutamatergic Neurons. *Mol Neurobiol* **53**, 5000–12.

Bibliographie

- Louveau A, Smirnov I, Keyes TJ, Eccles JD, Rouhani SJ, Peske JD, ... Kipnis J (2015) Structural and functional features of central nervous system lymphatic vessels *Nature* **523**, 337–341.
- Lu P, Takai K, Weaver VM, and Werb Z (2011) Extracellular Matrix degradation and remodeling in development and disease *Cold Spring Harb Perspect Biol* **3**.
- Lun MP, Monuki ES, and Lehtinen MK (2015) Development and functions of the choroid plexus-cerebrospinal fluid system *Nat Rev Neurosci* **16**, 445–457.

M

- Macé E, Montaldo G, Cohen I, Baulac M, Fink M, and Tanter M (2011) Functional ultrasound imaging of the brain. - Supplementary Info *Nat Methods* **31**, 662–666.
- MacGregor Sharp M, Bulters D, Brandner S, Holton J, Verma A, Werring DJ, and Carare RO (2019) The fine anatomy of the perivascular compartment in the human brain: relevance to dilated perivascular spaces in cerebral amyloid angiopathy *Neuropathol Appl Neurobiol* **45**, 305–308.
- Macrez R, Ali C, Toutirais O, Le Mauff B, Defer G, Dirnagl U, and Vivien D (2011) Stroke and the immune system: from pathophysiology to new therapeutic strategies *Lancet Neurol* **10**, 471–480.
- Macrez R, Obiang P, Gauberti M, Roussel BD, Baron A, Parcq J, ... Ali C (2011) 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* **42**, 2315–2322.
- Madani R, Hulo S, Toni N, Madani H, Steimer T, Muller D, and Vassalli JD (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.
- Madani R, Kozlov S, Akhmedov A, Cinelli P, Kinter J, Lipp H-P, ... Wolfer DP (2003) Impaired explorative behavior and neophobia in genetically modified mice lacking or overexpressing the extracellular serine protease inhibitor neuroserpin. *Mol Cell Neurosci* **23**, 473–94.
- Malenka RC, and Bear MF (2004, September 30) LTP and LTD: An embarrassment of riches *Neuron*.
- Malik R, Chauhan G, Traylor M, Sargurupremraj M, Okada Y, Mishra A, ... Dichgans M (2018) Multiancestry genome-wide association study of 520,000 subjects identifies 32 loci associated with stroke and stroke subtypes *Nat Genet* **50**, 524–537.
- Mansuy IM, van der Putten H, Schmid P, Meins M, Botteri FM, and Monard D (1993) Variable and multiple expression of Protease Nexin-1 during mouse organogenesis and nervous system development. *Development* **119**, 1119–34.

Bibliographie

- Marcos-Contreras OA, Martinez de Lizarrondo S, Bardou I, Orset C, Pruvost M, Anfray A, ... Gauberti M (2016) Hyperfibrinolysis increases blood-brain barrier permeability by a plasmin- and bradykinin-dependent mechanism *Blood* **128**, 2423–2434.
- Matys T, Pawlak R, Matys E, Pavlides C, McEwen BS, and Strickland S (2004) Tissue plasminogen activator promotes the effects of corticotropin-releasing factor on the amygdala and anxiety-like behavior *Proc Natl Acad Sci* **101**, 16345–16350.
- Matys T, Pawlak R, and Strickland S (2005) Tissue plasminogen activator in the bed nucleus of stria terminalis regulates acoustic startle *Neuroscience* **135**, 715–722.
- Mcmenamin PG (1999) McMenamin-1999-Journal_of_Comparative_Neurology **562**, 553–562.
- Medcalf RL, and Stasinopoulos SJ (2005) The undecided serpin *FEBS J* **272**, 4858–4867.
- Medved L, and Nieuwenhuizen W (2003) Molecular mechanisms of initiation of fibrinolysis by fibrin *Thromb Haemost* **89**, 409–419.
- Mehra A, Ali C, Parcq J, Vivien D, and Docagne F (2016) The plasminogen activation system in neuroinflammation *Biochim Biophys Acta - Mol Basis Dis* **1862**, 395–402.
- Meyer G, Vicaut E, Danays T, Agnelli G, Becattini C, Beyer-Westendorf J, ... Konstantinides S V. (2014) Fibrinolysis for patients with intermediate-risk pulmonary embolism *N Engl J Med* **370**, 1402–1411.
- Miranda E, and Lomas DA (2006) Neuroserpin: A serpin to think about *Cell Mol Life Sci*.
- Monnot AD, and Zheng W (2013) Culture of choroid plexus epithelial cells and in vitro model of blood-CSF barrier *Methods Mol Biol* **945**, 13–29.
- Moore SA, and Oglesbee MJ (2012) Involvement of the choroid plexus in the inflammatory response after acute spinal cord injury in dogs: An immunohistochemical study *Vet Immunol Immunopathol* **148**, 348–352.
- Morotti A, and Goldstein JN (2016, November 1) Diagnosis and Management of Acute Intracerebral Hemorrhage *Emerg Med Clin North Am*. W.B. Saunders.

N

- Nabavi S, Fox R, Proulx CD, Lin JY, Tsien RY, and Malinow R (2014) Engineering a memory with LTD and LTP *Nature* **511**, 348–352.
- Nadarajah B, Alifragis P, Wong ROL, and Parnavelas JG (2003, June 1) Neuronal migration in the developing cerebral cortex: Observations based on real-time imaging *Cereb Cortex*.
- Nagahiro S, Goto S, Korematsu K, Sumi M, Takahashi M, and Ushio Y (1994) Disruption of the blood-cerebrospinal fluid barrier by transient cerebral ischemia *Brain Res* **633**, 305–311.
- Nagaoka MR, Strital E, Kouyoumdjian M, and Borges DR (2002) Participation of a galectin-dependent mechanism in the hepatic clearance of tissue-type plasminogen activator and plasma kallikrein. *Thromb Res* **108**, 257–62.

Bibliographie

- Naito S, Chang L, Pettigrew K, Ishihara S, and Brightman M (1995) Conditions That May Determine Blood Vessel Phenotype in Tissues Grafted to Brain *Exp Neurol* **134**, 230–243.
- Nathanson JA, and Chun LL (1989) Immunological function of the blood-cerebrospinal fluid barrier. *Proc Natl Acad Sci* **86**, 1684–1688.
- Nedergaard M (2013) Garbage truck of the brain. *Science* **340**, 1529–30.
- Nicole O, Docagne F, Ali C, Margail I, Carmeliet P, MacKenzie ET, ... Buisson A (2001) The proteolytic activity of tissue-plasminogen activator enhances NMDA receptor-mediated signaling. *Nat Med* **7**, 59–64.
- Nielsen CM, and Dymecki SM (2010) Sonic hedgehog is required for vascular outgrowth in the hindbrain choroid plexus *Dev Biol* **340**, 430–437.
- Nilsson C, Hultberg BM, and Gammeltoft S (1996) Autocrine role of insulin-like growth factor II secretion by the rat choroid plexus. *Eur J Neurosci* **8**, 629–35.
- NINDS (1995) Tissue Plasminogen Activator for Acute Ischemic Stroke *N Engl J Med* **333**, 1581–1588.
- Nogueira RG, Jadhav AP, Haussen DC, Bonafe A, Budzik RF, Bhuva P, ... Jovin TG (2017) Thrombectomy 6 to 24 Hours after Stroke with a Mismatch between Deficit and Infarct *N Engl J Med* **378**, 11–21.
- Noveletto F, Soares A V., Mello BA, Sevegnani CN, Eichinger FLF, Hounsell MDS, and Bertemes-Filho P (2018) Biomedical serious game system for balance rehabilitation of hemiparetic stroke patients *IEEE Trans Neural Syst Rehabil Eng* **26**, 2179–2188.



- O'Donnell MJ, Chin SL, Rangarajan S, Xavier D, Liu L, Zhang H, ... Yusuf S (2016) Global and regional effects of potentially modifiable risk factors associated with acute stroke in 32 countries (INTERSTROKE): a case-control study *Lancet* **388**, 761–775.
- Obiang P, Macrez R, Jullienne A, Bertrand T, Lesept F, Ali C, ... Agin V (2012) GluN2D subunit-containing NMDA receptors control tissue plasminogen activator-mediated spatial memory *J Neurosci* **32**, 12726–12734.
- Oh SB, Byun CJ, Yun JH, Jo DG, Carmeliet P, Koh JY, and Lee JY (2014) Tissue plasminogen activator arrests Alzheimer's disease pathogenesis *Neurobiol Aging* **35**, 511–519.
- Orset C, Macrez R, Young AR, Panthou D, Anglés-Cano E, Maubert E, ... Vivien D (2007) Mouse Model of In Situ Thromboembolic Stroke and Reperfusion *Stroke* **38**, 2771–2778.
- Orth K, Willnow T, Herz J, Gething MJ, and 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**, 21117–22.

Bibliographie

- Oshio K, Watanabe H, Song Y, Verkman AS, and Manley GT (2005) Reduced cerebrospinal fluid production and intracranial pressure in mice lacking choroid plexus water channel Aquaporin-1 *FASEB J* **19**, 76–78.
- Osterlund B, Andersson B, Haggmark S, Jern C, Johansson G, Seeman-Lodding H, and Biber B (2002) Myocardial ischemia induces coronary t-PA release in the pig *Acta Anaesthesiol Scand* **46**, 271–278.
- Osterwalder T, Contartese J, Stoeckli ET, Kuhn TB, and Sonderegger P (1996) Neuroserpin, an axonally secreted serine protease inhibitor. *EMBO J* **15**, 2944–2953.

P

- Parcq J, Bertrand T, Montagne A, Baron A, Macrez R, Billard JM, ... 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.
- Park L, Gallo EF, Anrather J, Wang G, Norris EH, Paul J, ... Iadecola C (2008) Key role of tissue plasminogen activator in neurovascular coupling *Proc Natl Acad Sci U S A* **105**, 1073–1078.
- Parmer RJ, Mahata M, Mahata S, Sebald MT, O'Connor DT, and Miles LA (1997) Tissue Plasminogen Activator (t-PA) Is Targeted to the Regulated Secretory Pathway *J Biol Chem* **272**, 1976–1982.
- Pasquet N, Douceau S, Naveau M, Lesept F, Louessard M, Lebouvier L, ... Bardou I (2019) Tissue-Type Plasminogen Activator Controlled Corticogenesis Through a Mechanism Dependent of NMDA Receptors Expressed on Radial Glial Cells *Cereb Cortex* **29**, 2482–2498.
- Pawlak R, Magarinos AM, Melchor J, McEwen BS, and Strickland S (2003) Tissue plasminogen activator in the amygdala is critical for stress-induced anxiety-like behavior *Nat Neurosci* **6**, 168–174.
- Pawlak R, Nagai N, Urano T, Napiorkowska-Pawlak D, Ihara H, Takada Y, ... 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 WE, Kohr WJ, Harkins RN, Vehar GA, Ward CA, ... Collen D (1983) Cloning and expression of human tissue-type plasminogen activator cDNA in E. coli *Nature* **301**, 214–221.
- Petersen LC, 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 - Protein Struct Mol Enzymol* **952**, 245–254.
- Pittman RN, and DiBenedetto AJ (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.

Bibliographie

- Pittman RN, Ivins J, and Buettner H (1989) Neuronal plasminogen activators: cell surface binding sites and involvement in neurite outgrowth *J Neurosci* **9**, 4269–4286.
- Polavarapu R, Gongora MC, Yi H, Ranganthan S, Lawrence DA, Strickland DK, and 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.
- Pollay M (2012) Overview of the CSF dual outflow system *Acta Neurochir Suppl* 47–50.
- Pruvost M, Lépine M, Leonetti C, Etard O, Naveau M, Agin V, ... Vivien D (2017) ADAMTS-4 in oligodendrocytes contributes to myelination with an impact on motor function. *Glia* **65**, 1961–1975.

Q

- Qian JY, Chopp M, and Liu Z (2016) Mesenchymal stromal cells promote axonal outgrowth alone and synergistically with astrocytes via tPA *PLoS One* **11**.
- Qian Z, Gilbert ME, Colicos MA, Kandel ER, and Kuhl D (1993) Tissue-plasminogen activator is induced as an immediate-early gene during seizure, kindling and long-term potentiation *Nature* **361**, 453–457.

R

- Radak D, Katsiki N, Resanovic I, Jovanovic A, Sudar-Milovanovic E, Zafirovic S, ... Isenovic ER (2017) Apoptosis and Acute Brain Ischemia in Ischemic Stroke. *Curr Vasc Pharmacol* **15**, 115–122.
- Reboldi A, Coisne C, Baumjohann D, Benvenuto F, Bottinelli D, Lira S, ... Sallusto F (2009) C-C chemokine receptor 6-regulated entry of TH-17 cells into the CNS through the choroid plexus is required for the initiation of EAE *Nat Immunol* **10**, 514–523.
- Reijerkerk A, Kooij G, van der Pol SMA, Leyen T, Lakeman K, Van Het Hof B, ... De Vries HE (2010) The NR1 subunit of NMDA receptor regulates monocyte transmigration through the brain endothelial cell barrier *J Neurochem* **113**, 447–453.
- Reijerkerk A, Kooij G, van der Pol SMA, Leyen T, van het Hof B, Couraud P-O, ... de Vries HE (2008) Tissue-Type Plasminogen Activator Is a Regulator of Monocyte Diapedesis through the Brain Endothelial Barrier *J Immunol* **181**, 3567–3574.
- Riehle KJ, Johnson MM, Johansson F, Bauer RL, Hayes BJ, Gilbertson DG, ... Campbell JS (2014) Tissue-type plasminogen activator is not necessary for platelet-derived growth factor-c activation *Biochim Biophys Acta - Mol Basis Dis* **1842**, 318–325.
- Rijken DC, and Collen D (1981) Purification and characterization of the plasminogen activator secreted by human melanoma cells in culture. *J Biol Chem* **256**, 7035–41.

Bibliographie

- Rijken DC, Hoylaerts M, and Collen D (1982) Fibrinolytic properties of one-chain and two-chain human extrinsic (tissue-type) plasminogen activator. *J Biol Chem* **257**, 2920–5.
- Rijken DC, and Lijnen HR (2009) New insights into the molecular mechanisms of the fibrinolytic system *J Thromb Haemost* **7**, 4–13.
- Rijken DC, Wijngaards G, Zaal-de Jong M, and Welbergen J (1979) Purification and partial characterization of plasminogen activator from human uterine tissue *Biochim Biophys Acta - Protein Struct* **580**, 140–153.
- Rogove AD, Siao C-J, Keyt B, Strickland S, and Tsirka SE (1999) Activation of microglia reveals a non-proteolytic cytokine function for tissue plasminogen activator in the central nervous system. *J Cell Sci* **112** (Pt 2), 4007–16.
- Rosenberg GA, and Yang Y (2008) Vasogenic edema due to tight junction disruption by matrix metalloproteinases in cerebral ischemia *Neurosurg Focus* **22**, 1–9.

S

- Samson AL, Nevin ST, Croucher D, Niego B, Daniel PB, Weiss TW, ... Medcalf RL (2008) Tissue-type plasminogen activator requires a co-receptor to enhance NMDA receptor function *J Neurochem* **107**, 1091–1101.
- Sappino AP, Madani R, Huarte J, Belin D, Kiss JZ, Wohlwend A, and Vassalli JD (1993) Extracellular proteolysis in the adult murine brain. *J Clin Invest* **92**, 679–85.
- Schindelin J, Arganda-Carreras I, Frise E, Kaynig V, Longair M, Pietzsch T, ... Cardona A (2012, July) Fiji: An open-source platform for biological-image analysis *Nat Methods*.
- Seeds NW, Basham ME, and Haffke SP (1999) Neuronal migration is retarded in mice lacking the tissue plasminogen activator gene *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**, 14118–14123.
- Seeds NW, Williams BL, and Bickford PC (1995, December 22) Tissue plasminogen activator induction in purkinje neurons after cerebellar motor learning *Science* (80-). American Association for the Advancement of Science.
- Serot J-M, Béné M-C, Foliguet B, and Faure GC (2000) Monocyte-derived IL-10-secreting dendritic cells in choroid plexus epithelium *J Neuroimmunol* **105**, 115–119.
- Serot J-M, Foliguet B, Béné M-C, and Faure GC (1998) Intraepithelial and stromal dendritic cells in human choroid plexus *Hum Pathol* **29**, 1174.
- Shechter R, Miller O, Yovel G, Rosenzweig N, London A, Ruckh J, ... Schwartz M (2013) Recruitment of Beneficial M2 Macrophages to Injured Spinal Cord Is Orchestrated by Remote Brain Choroid Plexus *Immunity* **38**, 555–569.
- Shin CY (2004) Rapid, Activity-Induced Increase in Tissue Plasminogen Activator Is Mediated by Metabotropic Glutamate Receptor-Dependent mRNA Translation *J Neurosci*.
- Shuangshoti S, and Netsky MG (1966) Histogenesis of choroid plexus in man *Am J Anat* **118**, 283–315.

Bibliographie

- Siao C-J, Fernandez SR, and Tsirka SE (2003) Cell Type-Specific Roles for Tissue Plasminogen Activator Released by Neurons or Microglia after Excitotoxic Injury *J Neurosci* **23**, 3234–3242.
- Siao C-J, and Tsirka SE (2002) Tissue Plasminogen Activator Mediates Microglial Activation via Its Finger Domain through Annexin II *J Neurosci* **22**, 3352–3358.
- Silverman GA, Bird PI, Carrell RW, Church FC, Coughlin PB, Gettins PGW, ... Whisstock JC (2001) The Serpins Are an Expanding Superfamily of Structurally Similar but Functionally Diverse Proteins *J Biol Chem* **276**, 33293–33296.
- Smith DE, Streicher E, Milković K, and Klatzo I (1964) Observations on the transport of proteins by the isolated choroid plexus *Acta Neuropathol* **3**, 372–386.
- Smith EE, and Eichler F (2006) Cerebral Amyloid Angiopathy and Lobar Intracerebral Hemorrhage *Arch Neurol* **63**, 148.
- Soreq H, and Miskin R (1981) Plasminogen activator in the rodent brain *Brain Res* **216**, 361–374.
- Spector R, and Lorenzo A (1973) Ascorbic acid homeostasis in the central nervous system *Am J Physiol Content* **225**, 757–763.
- Sprengers ED, and Kluft C (1987) Plasminogen activator inhibitors. *Blood* **69**, 381–7.
- Stefanitsch C, Lawrence ALE, Olverling A, Nilsson I, and Fredriksson L (2015) tPA deficiency in mice leads to rearrangement in the cerebrovascular tree and cerebroventricular malformations *Front Cell Neurosci* **9**.
- Steffenach HA, Witter MP, Moser MB, and Moser EI (2005) Spatial memory in the rat requires the dorsolateral band of the entorhinal cortex *Neuron* **45**, 301–313.
- Steinmann U, Borkowski J, Wolburg H, Schröppel B, Findeisen P, Weiss C, ... Tenenbaum T (2013) Transmigration of polymorphnuclear neutrophils and monocytes through the human blood-cerebrospinal fluid barrier after bacterial infection in vitro *J Neuroinflammation* **10**.
- Su EJ, Fredriksson L, Geyer M, Folestad E, Cale J, Andrae J, ... Lawrence DA (2008) Activation of PDGF-CC by tissue plasminogen activator impairs blood-brain barrier integrity during ischemic stroke *Nat Med* **14**, 731–737.
- Sullivan KA, and Feldman EL (1994) Immunohistochemical localization of insulin-like growth factor-II (IGF-II) and IGF-binding protein-2 during development in the rat brain. *Endocrinology* **135**, 540–7.
- Suzuki Y, Nagai N, Umemura K, Collen D, and Lijnen HR (2007) Stromelysin-1 (MMP-3) is critical for intracranial bleeding after t-PA treatment of stroke in mice. *J Thromb Haemost* **5**, 1732–9.
- Suzuki Y, Nagai N, Yamakawa K, Kawakami J, Lijnen HR, and 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.

Bibliographie

Swetloff A, and Ferretti P (2005) Changes in E2F5 intracellular localization in mouse and human choroid plexus epithelium with development *Int J Dev Biol* **49**, 859–865.

T

Teesalu T, Kulla A, Simisker A, Sirén V, Lawrence DA, Asser T, and Vaheri A (2004) Tissue plasminogen activator and neuroserpin are widely expressed in the human central nervous system *Thromb Haemost* **92**, 358–368.

The NINDS t-PA Stroke Study Group (1997) Intracerebral Hemorrhage After Intravenous t-PA Therapy for Ischemic Stroke *Stroke* **28**, 2109–2118.

Thewke DP, and Seeds NW (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.

Tisserand M, Malherbe C, Turc G, Legrand L, Edjlali M, Labeyrie MA, ... Oppenheim C (2014) Is white matter more prone to diffusion lesion reversal after thrombolysis? *Stroke* **45**, 1167–1169.

Tsirka SE, Gualandris A, Amaral DG, and Strickland S (1995) Excitotoxin-induced neuronal degeneration and seizure are mediated by tissue plasminogen activator *Nature* **377**, 340–344.

U

Uno M, and 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.

V

van den Aamele J, Tiberi L, Vanderhaeghen P, and Espuny-Camacho I (2014) Thinking out of the dish: what to learn about cortical development using pluripotent stem cells *Trends Neurosci* **37**, 334–342.

Vercellino M, Votta B, Condello C, Piacentino C, Romagnolo A, Merola A, ... Cavalla P (2008) Involvement of the choroid plexus in multiple sclerosis autoimmune inflammation: a neuropathological study. *J Neuroimmunol* **199**, 133–41.

Verrall S, and Seeds NW (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, and Collen D (1985) Pharmacokinetics and systemic fibrinolytic effects of recombinant human tissue-type plasminogen activator (rt-PA) in humans. *J Pharmacol Exp Ther* **235**, 506–12.

Bibliographie

Voetmann E (1949) On the structure and surface area of the human choroid plexuses. *Acta Anat (Basel)* **111**, 1051.

von Frowein J, Wizenmann A, and Götz M (2006) The transcription factors Emx1 and Emx2 suppress choroid plexus development and promote neuroepithelial cell fate *Dev Biol* **296**, 239–252.

W

Wachs FP, Winner B, Couillard-Despres S, Schiller T, Aigner R, Winkler J, ... Aigner L (2006) Transforming growth factor- β 1 is a negative modulator of adult neurogenesis *J Neuropathol Exp Neurol* **65**, 358–370.

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 - Gen Subj* **719**, 318–328.

Wang X, Lee SR, Arai K, Lee SR, Tsuji K, Rebeck GW, and Lo EH (2003) Lipoprotein receptor-mediated induction of matrix metalloproteinase by tissue plasminogen activator *Nat Med* **9**, 1313–1317.

Wang YF, Tsirka SE, Strickland S, Stieg PE, Soriano SG, and Lipton SA (1998) Tissue plasminogen activator (tPA) increases neuronal damage after focal cerebral ischemia in wild-type and tPA-deficient mice. *Nat Med* **4**, 228–31.

Weller RO, Sharp MM, Christodoulides M, Carare RO, and Møllgård K (2018, March 1) The meninges as barriers and facilitators for the movement of fluid, cells and pathogens related to the rodent and human CNS *Acta Neuropathol*. Springer Verlag.

Wimmer I, Zrzavy T, and Lassmann H (2018) Neuroinflammatory responses in experimental and human stroke lesions *J Neuroimmunol* **323**, 10–18.

Woolsey TA, Rovainen CM, Cox SB, Henegar MH, Liang GE, Liu D, ... Wei L (1996, September) Neuronal units linked to microvascular modules in cerebral cortex: Response elements for imaging the brain *Cereb Cortex*.

Wright BLC, Lai JTF, and Sinclair AJ (2012) Cerebrospinal fluid and lumbar puncture: A practical review *J Neurol* **259**, 1530–1545.

Y

Yamamoto C, Sugato M, Fujiwara Y, and 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.

Yang-Feng TL, Opdenakker G, Volckaert G, and Francke U (1986) Human tissue-type plasminogen activator gene located near chromosomal breakpoint in myeloproliferative disorder. *Am J Hum Genet* **39**, 79–87.

Bibliographie

- Yavuzer G, Senel A, Atay MB, and Stam HJ (2008) “Playstation eyetoy games” improve upper extremity-related motor functioning in subacute stroke: a randomized controlled clinical trial. *Eur J Phys Rehabil Med* **44**, 237–44.
- Yepes M, Sandkvist M, Moore EG, Bugge TH, Strickland DK, and Lawrence DA (2003) Tissue-type plasminogen activator induces opening of the blood-brain barrier via the LDL receptor-related protein *J Clin Invest* **112**, 1533–1540.
- Yu P, Venkat P, Chopp M, Zacharek A, Shen Y, Liang L, ... Chen J (2019) Deficiency of tPA Exacerbates White Matter Damage, Neuroinflammation, Glymphatic Dysfunction and Cognitive Dysfunction in Aging Mice *Aging Dis* **10**, 770.

Z

- Zhang C, An J, Strickland DK, and 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.
- Zhang LP, Takahara T, Yata Y, Furui K, Jin B, Kawada N, and Watanabe A (1999) Increased expression of plasminogen activator and plasminogen activator inhibitor during liver fibrogenesis of rats: role of stellate cells *J Hepatol* **31**, 703–711.
- Zheng Z, Nayak L, Wang W, Yurdagul A, Wang X, Cai B, ... Tabas I (2019) An ATF6-tPA pathway in hepatocytes contributes to systemic fibrinolysis and is repressed by DACH1 *Blood* **133**, 743–753.
- Ziegler AN, Schneider JS, Qin M, Tyler WA, Pintar JE, Fraidenraich D, ... Levison SW (2012) IGF-II promotes stemness of neural restricted precursors *Stem Cells* **30**, 1265–1276.

Les plexus choroïdes : une entrée au niveau cérébral pour l'activateur tissulaire du plasminogène (tPA)

Résumé

L'activateur tissulaire du plasminogène (tPA) est une protéase initialement découverte dans le sang pour son rôle fibrinolytique. C'est pour cette fonction que le tPA recombinant est utilisé pour traiter la phase aiguë de l'accident vasculaire cérébral (AVC) ischémique, même s'il présente quelques limites. Le tPA exogène peut passer du compartiment vasculaire au parenchyme cérébral où il peut influencer des processus physiologiques, et participer au devenir neuronal, notamment aggraver la mort neuronale lors d'un AVC ischémique. Le laboratoire a montré que le tPA peut traverser la barrière-hémato-encéphalique (BHE), par transcytose au travers des cellules endothéliales de la BHE et cela sous le contrôle des récepteurs LRP1 (Low density lipoprotein receptor-related protein 1). D'autres barrières existent au sein du système nerveux central notamment la barrière sang-liquide cérébrospinal (BSLCS), formée par les plexus choroïdes (PCs). Les PCs sont une route de migration pour les cellules inflammatoires et le LCS peut véhiculer des solutés, via les espaces péri-artériels, vers le parenchyme cérébral. Ainsi, dans notre première étude, nous avons testé l'hypothèse d'un passage du tPA vasculaire par les PCs. Pour cela, nous avons produit un tPA traçable in vivo et in vitro. Nous avons commencé par étudier la distribution du tPA suite à une injection intraveineuse (IV) avec comme focus les PCs et le LCS. Nos résultats montrent que le tPA exogène, suite à une injection IV, est retrouvé de manière séquentielle dans les PCs puis dans le LCS. Le tPA est donc capable de traverser les PCs. Nous avons alors développé un modèle de culture primaire de cellules épithéliales de PCs (CPECs) de souris pour disséquer le(s) mécanisme(s) sous-jacents à l'internalisation du tPA par les CPECs. Ce modèle nous a permis de montrer que l'internalisation du tPA par les CPECs est un phénomène actif, médié par un membre de la famille des récepteurs LRP, mais qui n'est ni LRP1, ni LRP2. Nous avons également mis en évidence la nécessité du domaine Finger du tPA pour son internalisation par les CPECs. Une étude préliminaire dans un modèle d'AVC suggère que l'ischémie modifie la cinétique de passage du tPA, puisqu'il y a plus de tPA dans les PCs des souris ischémisées que les souris non ischémisées.

Dans une deuxième étude nous nous sommes intéressés à l'effet du tPA endogène sur les PCs. Nous montrons que l'absence de tPA endogène n'influence ni la morphologie des PCs, ni la diffusion du LCS. De plus, nous montrons que cette absence de tPA n'influence pas le nombre de macrophages et de lymphocytes T dans les PCs en conditions basales.

Mots Clefs : Plexus choroïdes, Accident vasculaire cérébral, Activateur tissulaire du plasminogène.

Abstract

Tissue-type plasminogen activator (tPA) is a protease initially discovered in the blood for its fibrinolytic role. Accordingly, recombinant tPA has become the gold standard to treat the acute phase of ischemic stroke, despite some limitations. Exogenous tPA can switch from the vascular compartment to the brain parenchyma, where it can influence physiological processes, and participate in neuronal fate, including a worsening of neuronal death during ischemic stroke. In the team, it has been shown that tPA can cross the blood-brain barrier (BBB), by a transcytosis through BBB endothelial cells, under the control of LRP1 receptors (Low density lipoprotein receptor-related protein 1). The central nervous system has other barriers, including the blood-cerebrospinal fluid barrier (BCSFB), that relies on choroid plexuses (CPs). CPs are a migration route for inflammatory cells and a major source of CSF, which carries solutes to the cerebral parenchyma, via peri-arterial spaces. Thus, in a first study, we tested the hypothesis of a passage of vascular tPA through CPs. We thus produced a fluorescent tPA that can be tracked in vivo and in vitro. We first studied the distribution of tPA following intravenous (IV) injection, focusing on CPs and CSF. We show that after an IV injection, exogenous tPA is sequentially found in the CPs and then in the CSF. tPA is therefore able to cross the CPs. We then developed a model of primary culture of mouse choroid plexus epithelial cells (CPECs) to dissect the mechanism (s) underlying the internalization of tPA. This model allowed us to demonstrate that the internalization of tPA by CPECs is an active phenomenon, mediated by a member of the family of LRP receptors, but which is neither LRP1 nor LRP2. We also highlight the requirement for the Finger domain of tPA for its internalization by CPECs. A preliminary study in a murine stroke model suggests that ischemia alters the tPA passage kinetics, since there is more tPA in ischemic CPs than non-ischemic CPs.

In a second study, we investigated the effect of endogenous tPA on CPs. We show that the absence of endogenous tPA influences neither CPs morphology nor CSF diffusion. Moreover we show that the absence of tPA does not influence the number of macrophages and T cells in the stroma of CPs under basal conditions.

Keywords: Choroid plexus, Stroke, Tissue-type plasminogen activator.