Modulation de l'autophagie neuronale par la sérine protéase tPA en conditions ischémiques

Audrey Thiebaut

▶ **To cite this version:**

Audrey Thiebaut. Modulation de l'autophagie neuronale par la sérine protéase tPA en conditions ischémiques. Médecine humaine et pathologie. Normandie Université, 2019. Français. NNT : 2019NORMC420 . tel-02872877

HAL Id: tel-02872877

https://theses.hal.science/tel-02872877

Submitted on 18 Jun 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

Modulation de l'autophagie neuronale par la sérine protéase tPA en conditions ischémiques

Présentée et soutenue par
Audrey THIEBAUT

Thèse soutenue publiquement le 17/12/2019 devant le jury composé de		
M. FRANCK OURY	Chargé de recherche, Université Paris 5 Descartes	Rapporteur du jury
M. JULIEN PUYAL	Maître de conférences, Université de Lausanne UNIL	Rapporteur du jury
Mme CARINE ALI	Professeur des universités, Université Caen Normandie	Président du jury
Mme SOUMEYA BEKRI	Professeur des universités, UNIVERSITE ROUEN UFR MED ET PHARM	Membre du jury
Mme GERALDINE LIOT	Maître de conférences, Université Paris 11 Paris-Sud	Membre du jury
M. DAVID RUBINSZTEIN	Professeur, Université de Cambridge - Royaume Uni	Membre du jury
M. DENIS VIVIEN	Professeur des universités, Université Caen Normandie	Membre du jury
M. BENOIT ROUSSEL	Chargé de recherche, Université Caen Normandie	Directeur de thèse

Thèse dirigée par BENOIT ROUSSEL, Physiopathologie et imagerie des troubles neurologiques

UNIVERSITÉ CAEN NORMANDIE

ED 497 NBISE
Normande de Biologie Intégrative, Santé, Environnement

Inserm
La science pour la santé
From science to health

Remerciements

Je remercie Denis Vivien de m'avoir accueillie dans son laboratoire dès mon stage de M1. J'ai énormément appris durant toutes ces années. Je le remercie de nous donner les moyens de mener nos recherches dans un cadre exceptionnel.

Je remercie chaleureusement les deux rapporteurs de cette thèse, le Dr Franck Oury et le Dr Julien Puyal d'avoir accepté et pris le temps de juger ce travail. Un grand merci au Pr. Soumeya Bekri de présider ce jury de thèse. Je remercie également le Dr Géraldine Liot pour sa présence au sein de ce jury. And I would thank Pr. David Rubinsztein for being a part of this jury.

Un énorme merci à Carine pour sa présence, son aide, ses conseils et sa bienveillance. Tu as été d'une grande aide durant ces trois années, c'est pourquoi, je suis heureuse et honorée que tu sois présente dans mon jury pour ce jour si important.

Un immense merci à Ben pour m'avoir encadré durant mon master et durant cette thèse. Durant ces années, grâce à toi, j'ai appris à avoir plus confiance en moi et affirmer mes idées. Tu m'as laissé beaucoup d'autonomie tout en étant disponible quand j'avais besoin d'un conseil ou d'un avis. J'ai énormément appris durant ces années, un grand merci pour tout.

Je remercie tous les gens du bureau C047 : Sara, Michou, Lodie, Camille ma petite perruche, Fanny ma petite biche, ma petite Héloïse, Sylvaine et Guénie. Merci pour les fous rires, les chansons (au grand désespoir de Michou), les post-it et nos longues conversations ; mais aussi pour votre soutien, votre présence et votre écoute. Merci à Fanny et à Camille pour avoir pris le temps de relire ma thèse, pour m'avoir rassuré autour d'un petit café lors de mes moments de doutes et de stress.

Merci à tous les gens du labo pour votre bonne humeur et pour tous les bons moments partagés ensemble. Merci pour les fous rires, les petits verres au V&B, les verres au Trappist, les matchs au stade Malherbe, les blind-tests et les festivals. Vous avez rendu ces années intenses beaucoup plus agréable.

Merci à Vincent, Camille et Rhéda pour l'entraide durant la rédaction.

Merci à mes amis pour leur soutien et leur présence. Merci de m’avoir aidé à décompresser autour d’un verre le soir ou lors d’un petit week-end.

Et enfin, merci à ma famille pour leur soutien durant toutes ces années. Merci à mes parents de m’avoir toujours encouragé et soutenu dans ce que j’entreprenais. Merci à mon frère d’avoir relu une partie de ma thèse et merci pour tes conseils et ta présence.

Sommaire

Introduction _____ 1

A. L'accident vasculaire cérébral _____ 1

I. Généralités _____ 1

1. L'accident vasculaire cérébral hémorragique _____ 2

2. L'accident vasculaire cérébral ischémique _____ 2

II. Les facteurs de risque de l'AVC ischémique _____ 4

1. Les facteurs de risque modifiables _____ 4

2. Les facteurs de risque non modifiables _____ 6

III. Physiopathologie de l'accident vasculaire cérébral ischémique _____ 7

1. L'atteinte vasculaire _____ 7

2. Altération de la barrière hémato-encéphalique _____ 9

3. Atteinte tissulaire _____ 10

a. Défaillance énergétique et excitotoxicité _____ 10

b. Inflammation _____ 12

c. Apoptose _____ 14

d. Protéostasie : Rôle du réticulum endoplasmique et de l'autophagie _____ 16

B. L'activateur tissulaire du plasminogène _____ 19

I. Historique _____ 19

II. La structure du tPA _____ 20

III. Expression du tPA _____ 23

1. Dans la circulation _____ 23

2. Dans la périphérie _____ 24

3. Dans le système nerveux central _____ 24

IV. Les inhibiteurs du tPA _____ 26

V. Les fonctions du tPA_____ 30

1. Les fonctions du tPA vasculaire _____ 30

a. La fibrinolyse _____ 30

b. L'utilisation du tPA comme agent thrombolytique_____ 32

c. Le tPA et la barrière hémato-encéphalique _____ 36

2. Le rôle du tPA dans le système nerveux central _____ 37

a. Le tPA et modulation glutamatergique_____ 37

b. Le tPA dans le développement cérébral _____ 41

c. Le tPA et la plasticité synaptique _____ 42

d. Le tPA et l'apoptose _____ 44

e. Le tPA et l'inflammation _____ 45

f. Le tPA et les processus cognitifs _____ 46

g. Le tPA et la substance blanche _____ 47

C. L'autophagie_____ 49

I. Généralités _____ 49

II. Les différentes formes d'autophagie _____ 50

1. La micro-autophagie_____ 50

2. L'autophagie dépendante des protéines chaperonnes (CMA) _____ 50

3. La macro-autophagie _____ 52

III. Les mécanismes moléculaires de l'autophagie _____ 52

1. L'initiation _____ 52

a. Origine du phagophore _____ 52

b. Les complexes initiateurs de l'autophagie _____ 57

c. L'autophagie non canonique _____ 61

2. L'élongation _____ 62

a. Le système de conjugaison Atg12-Atg5 _____ 63

b. Le conjugué LC3-PE _____ 64

c. Les récepteurs autophagiques _____ 67

3. La maturation _____ 70

IV. La régulation de l'autophagie _____ 75

1. Les voies de régulation de l'autophagie _____ 75

a. La voie de régulation mTOR _____ 75

b. Le complexe PI3K de classe III _____ 76

c. La signalisation p53 _____ 77

2. Les signaux de stress régulant l'autophagie _____ 79

a. Le stress nutritionnel _____ 79

b. Les mitochondries endommagées _____ 80

c. Les pathogènes _____ 82

d. Le stress du réticulum endoplasmique (pour revue Thiebaut *et al.,* 2019) _____ 82

e. L'hypoxie _____ 85

D. L'autophagie dans l'AVC ischémique _____ 88

I. L'activation de l'autophagie dans l'AVC ischémique_____ 88

II. L'autophagie neuronale dans l'AVC ischémique _____ 91

1. Le rôle neuroprotecteur de l'autophagie neuronale dans l'AVC ischémique _____ 91

2. L'autophagie : un effecteur de mort neuronale_____ 93

a. Généralités : l'implication de l'autophagie dans la mort cellulaire _____ 93

b. L'autophagie et la mort cellulaire dans l'AVC ischémique _____ 100

III. L'autophagie dans les différentes cellules du parenchyme cérébral _____ 104

1. L'autophagie endothéliale dans l'AVC ischémique _____ 104

2. L'autophagie gliale dans l'AVC ischémique _____ 105

IV. La mitophagie dans l'AVC ischémique _____ 106

V. Le stress oxydatif, l'inflammation et l'autophagie dans l'AVC ischémique _____ 108

VI. Le stress du réticulum endoplasmique et de l'autophagie dans l'AVC ischémique _____ 109

Projet de thèse _____ 113

Résultats _____ 115

Article 1 _____ 115

Discussion _____ 151

Conclusion générale _____ 173

Autres travaux _____ 175

Article 2 _____ 175

Article 3 _____ 190

Article 4 _____ 203

Bibliographie_____ 217

Index des figures

Figure 1 : Illustrations d'un AVC hémorragique et d'un AVC ischémique. 1

Figure 2 : Carte représentant le pourcentage d'AVC attribuable à des facteurs de risque modifiables et tableau récapitulant les 16 facteurs de risque modifiables majeurs. 4

Figure 3 : Évolution du foyer ischémique et de sa pénombre. 8

Figure 4 : Schéma de la barrière hémato-encéphalique. 9

Figure 5 : Schéma de la physiopathologie de l'ischémie cérébrale. 11

Figure 6 : Schéma de l'inflammation cérébrale lors d'un AVC ischémique. 14

Figure 7 : Schéma de la voie apoptotique activée lors d'un AVC ischémique. 16

Figure 8 : Structure et fonction du tPA. 22

Figure 9 : Expression du tPA par les différentes cellules du SNC chez la souris adulte. 25

Figure 10 : Mode d'action des serpines. 27

Figure 11 : Mécanisme d'action de la fibrinolyse endogène. 30

Figure 12 : Les activateurs tissulaires du plasminogène classifiés selon leur forme eucaryote et leur forme recombinante. 31

Figure 13 : Effet du tPA dans l'AVC ischémique et dans l'AVC hémorragique. 36

Figure 14 : Rôle du tPA dans l'excitotoxicité, la mort neuronale et la neuroprotection. 40

Figure 15 : Effet de l'absence du tPA sur la migration neuronale. 42

Figure 16 : Élévation de la quantité d'ARN messagers du tPA suite à une activation neuronale chez le rat. 43

Figure 17 : Le tPA protège les neurones de l'apoptose induite par un sevrage en sérum. 44

Figure 18 : Effets du tPA actif et inactif (S478A tPA) sur la mort neuronale induite par une injection de kaïnate dans l'hippocampe et sur l'activation microgliale. 45

Figure 19 : Les trois types d'autophagie. 51

Figure 20 : Modèle de formation de l'autophagosome à partir de la membrane du RE. 53

Figure 21 : Schéma de la nucléation du phagophore *via* Atg9 et Atg16L1. 55

Figure 22 : Atg9 participe à la connexion entre la membrane plasmique, les endosomes et l'appareil de Golgi afin d'induire la formation du phagophore. 56

Figure 23 : Schéma des voies moléculaires impliquées dans l'initiation de l'autophagie. 58

Figure 24 : Régulation du complexe ULK1 par mTOR. 59

Figure 25 : Régulation et rôle du complexe PI3K de classe III. 60

Figure 26 : Le système de conjugaison Atg12-Atg5 64

Figure 27 : Le système de conjugaison LC3-PE 66

Figure 28 : Les deux premières étapes de l'autophagie : l'initiation et l'élongation 69

Figure 29 : Le transport des autophagosomes. 72

Figure 30 : Rôle des SNAREs dans la fusion autophagosome-lysosome. 74

Figure 31 : Le mécanisme de la mitophagie. 81

Figure 32 : Le stress du RE 83

Figure 33 : Les liens entre les trois voies de signalisation de l'UPR et l'autophagie. 85

Figure 34 : Les trois types de mort cellulaire programmée et leurs caractéristiques. 94

Figure 35 : Les trois types de mort autophagique. D'après Bialik *et al.*, 2018. 96

Figure 36 : Activation de l'apoptose par l'autophagie. 97

Figure 37 : La nécroptose et l'apoptose induites par les récepteurs de mort. 99

Figure 38 : La communication entre l'autophagie et la nécroptose. _____ 100

Figure 39 : Schéma récapitulatif de la mort cellulaire dépendante de l'autophagie dans l'AVC ischémique. _____ 103

Figure 40 : Effet de la rapamycine et de la torin1 sur l'autophagie. _____ 157

Figure 41 : Le sevrage en sérum induit de l'autophagie dans les neurones. _____ 158

Figure 42 : L'effet neuroprotecteur du tPA dans l'OGD_{reox} n'est pas dépendant des récepteurs NMDA contenant la sous-unités GluN2A ou GluN2B _____ 162

Figure 43 : L'OGD_{reox} induit une mort excitotoxique et une mort apoptotique _____ 163

Figure 44 : La structure des récepteurs EGFR et IGF-1R _____ 166

Figure 45 : Schéma de le neuroprotection du tPA dans l'$OGD_{réox}$ _____ 167

Liste des abréviations

3-MA	3-methyladenine
4HBD	4 *helical bundle domain*
acétyl-CoA	acétyl-coenzyme A
ACM	artère cérébrale moyenne
ADAMTS	*a desintegrin and metalloproteinase with thrombospondin motifs*
Ambra1	*activating molecule in beclin1 related autophagy protein* 1
AMPA	*alpha-amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionic acid*
AMPK	AMP- *activated protein kinase*
AP	acide phosphatidique
Apaf-1	*apoptotic protease activating factor* 1
ARNm	acides ribonucléiques messagers
ASIC1	*acid-sensing ion channels*
Asn	asparagine
ATF	*activating transcription factor*
ATG	*autophagy-related gene*
Atg	*autophagy-related protein*
ATP	adénosine triphosphate
AVC	accident vasculaire cérébral
Bcl-2	B-*cell lymphoma 2*
Bcl-XL	B-*cell lymphoma-extra large*
BDNF	*brain derived neurotrophic factor*
BH-3	Bcl-2 *homology*
BHE	barrière hémato-encéphalique
Bif-1	*endophilin* B1
BMVEC	*brain microvascular endothelial cells*
BNIP3	Bcl-2/*adenovirus* E1B 19-kDa *interacting protein* 3
BNIP3L	Bcl-2/*adenovirus* E1B 19-kDa *interacting protein* 3 *like*
CA	corne d'Ammon

CaMKII *calcium-calmodulin kinase* II

CHOP CCAAT-*enhancer-binding protein homologous protein*

CMA *chaperone-mediated autophagy*

CREB cAMP *response element binding protein*

CRF *corticotropin-releasing factor*

CSPG chondroitine sulphate protéoglycane

DAPK *death-associated protein kinase*

Deptor DEP *domain-containing* mTOR-*interacting protei*n

DFCP1 *double* FYVE *domain-containing protein*

DRAM *damage-regulated autophagy modulator*

Drp1 *dynamin-related protein* 1

DSC débit sanguin cérébral

EGF e*pidermal growth factor*

eNOS NOS endothélial

EPG5 *ectopic* P *granules protein* 5

ERAD ER-*associated degradation*

ERK1/2 *extracellular signal-regulated kinases* 1/2

ESCRT *endosomal sorting complex required for transport*

FADD *fas-associated protein with death domain*

FIP200 *focal adhesion kinase family interacting protein of* 200 kDa

FKBP12 *tacrolimus-binding protein* 12 kDa

FVW facteur de von Willebrand

FYCO1 FYVE *and coiled-coil domain-containing protein*

GABARAP g*amma-aminobutyric acid receptor-associated protein*

GBD *global burden of disease*

GFAP *glial fibrillary acidic protein*

GFP *green fluorescence protein*

Grp78 *glucose-related protein* 78

GTPase guanosine triphosphatase

HEK *human embryonic kidney*

HIF-1α *hypoxia inducible factor*-1α

HMGB-1 *high–mobility group box* 1

HOPS *homotypic fusion and vacuole protein sorting*

Hsc70 *heat shock cognate protein* 70

HTA hypertension artérielle

ICAM *intercellular adhesion molecule*

IGF *insulin growth factor*

IGFBP3 *insulin-like growth factor binding protein*-3

IL interleukine

iNOS NOS inductible

IPC pré-conditionnement ischémique

IRE1 *inositol-requiring enzyme* 1 α

JAK *janus kinase*

JNK1 c-*Jun* N-*terminal* 1

Kif *kinesin* family member

LAMP-2A *lysosome-associated membrane protein type* 2A

LBS *lysine-binding site*

LC3 *light chain* 3

LC3-PE *light chain* 3-*phophatidyl-ethanolamine*

LCR liquide céphalorachidien

LIR LC3-*interacting region*

LRP *low-density lipoprotein receptor–related protein*

LTP *long-term potentiation*

mGluR récepteurs métabotropiques du glutamate

MLKL *mixed-lineage kinase domain like*

mLST8 mTOR *associated protein LTS8 homolog*

mmHg millimètre de mercure

MMP métalloprotéinase matricielle

MPIO *micrometer-sized paramagnetic iron oxide*

mTOR *mammalian target of rapamycin*

Na^+/K^+ sodium/potassium

NAD nicotinamide adénine dinucléotide

NBR1 *neighbour of breast cancer* 1

NCCD *nomenclature committee on cell death*

NDP52 *nuclear dot protein* 52 kDa

NF-κB *nuclear factor*-kappa B

NIHSS *national institutes of health stroke scale*

NIX *nineteen* kD *interacting protein 3-like protein* X

NMDA N-méthyl-D-aspartate

nNOS NOS neuronal

NO *nitric oxide*

NOS *nitric oxide synthase*

NRBF2 *nuclear receptor binding factor* 2

NS neuroserpine

NTD *distal N-terminal domain*

OGD o*xygen and glucose deprivation*

OMS organisation mondiale de la santé

OPTN optineurine

ORP1L *oxysterol-binding protein-related protein* 1L

p70s6k *ribosomal protein* S6 *kinase*

PA pression artérielle

PAI-1 *plasminogen activator inhibitor* 1

PDGF-CC *platelet-derived growth factor-CC*

PERK *protein kinase RNA-like ER kinase*

PI3K phosphatidylinositol-3-Kinase

PINK1 PTEN-*induced putative kinase* 1

PIP3 phosphatidylinositol-3,4,5-triphosphate

PLEKHM1 *pleckstrin homology domain containing protein family member* 1

PolyQ72 *expanded polyglutamine* 72 *repeat*

PRAS40 *proline-rich* Akt *substrate of* 40 kDa

Raptor *regulatory associated protein of* mTOR

RCL reactive center loop

RE réticulum endoplasmique

RILP *Rab-interacting lysosomal protein*

RIPK *receptor-interacting protein kinase*

ROS *radical oxygen species*

Rubicon *run domain beclin1 interacting and cysteine-rich containing protein*

sc-tPA *single chain- tissue-type plasminogen activator*

Ser Sérine

SERCA *sarco(endo)plasmic reticulum* Ca2+-*transport* ATP*ase*

SLR p62/*sequestosome* 1-*like receptor*

SNARE *soluble N-éthylmaleimide-sensitive-factor attachment protein receptor*

SNC système nerveux cérébral

STAT *signal transducers and activators of transcription*

STX17 syntaxine 17

TAFI *thrombin-activatable fibrinolysis inhibitor*

TAX1BP1 *human T-cell leukemia virus type* I-*binding protein* 1

tc-tPA *two chain- tissue-type plasminogen activator*

TECPR1 *tectonin beta-propeller repeat-containing* 1

TEP tomographie par émission de positons

TNFR1 *tumor necrosis factor receptor* 1

TNF-α *tumor necrosis factor*-α

TOAST *trial of org* 10172 *in acute stroke treatment*

tPA *tissue-type plasminogen activator*

Trk-B *tropomyosin receptor kinase* B

TRP53 *transformation related protein* 53

TRPC *transient receptor potential channel*

TSC2 *tuberous sclerosis complex* 2

Tyr tyrosine

UBA *ubiquitin associated*

ULK1 UNC-51-*Like Kinases*

uPA *urokinase plasminogen activator*

UPR *unfolded protein-response*

UVRAG UV *irradiation resistance-associated gene*

VAMP3 *vesicle associated membrane protein*

VCAM-1 *vascular cell adhesion protein* 1

VIH-1 virus de l'immunodéficience humaine-1

VMP-1 *vacuole membrane protein* 1

VPS34 *vacuolar protein sorting* 34

WIPI2 WD-*repeated protein interacting with phosphoinositides*

WT *wildtype*

XBP1 X-*box Binding Protein* 1

XBP1s XBP1 *spliced*

Introduction

A. L'accident vasculaire cérébral

I. Généralités

L'accident vasculaire cérébral (AVC), aussi appelé infarctus cérébral, est, selon l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS), la deuxième cause de mortalité, après les maladies cardio-vasculaires, ainsi qu'une des causes principales de morbidité et de handicap acquis chez l'adulte. En 2016, sur les 13,7 millions de nouveaux cas rapportés, l'AVC a engendré près de 5,5 millions de décès dans le monde (10,2% du nombre de décès globaux) et représente une charge socio-économique des plus importantes (Johnson *et al.*, 2019). En France, chaque année, plus de 130 000 personnes sont victimes d'un AVC et environ 38 000 personnes perdent la vie. Un rapport remis au ministre de la Santé en 2009 indique qu'un quart des nouveaux cas survenus chaque année concerne des personnes de moins de 65 ans, la moitié des personnes de 65 à 84 ans et le quart restant des personnes de plus de 85 ans.

Il existe deux types d'AVC : les AVC hémorragiques et les AVC ischémiques. En 2016, malgré leur incidence beaucoup plus faible (15,6% des cas d'AVC), les AVC hémorragiques ont engendré significativement plus de morts (2,8 millions de morts) que les AVC ischémiques (2,7 millions de morts) (Figure 1; Johnson *et al.*, 2019).

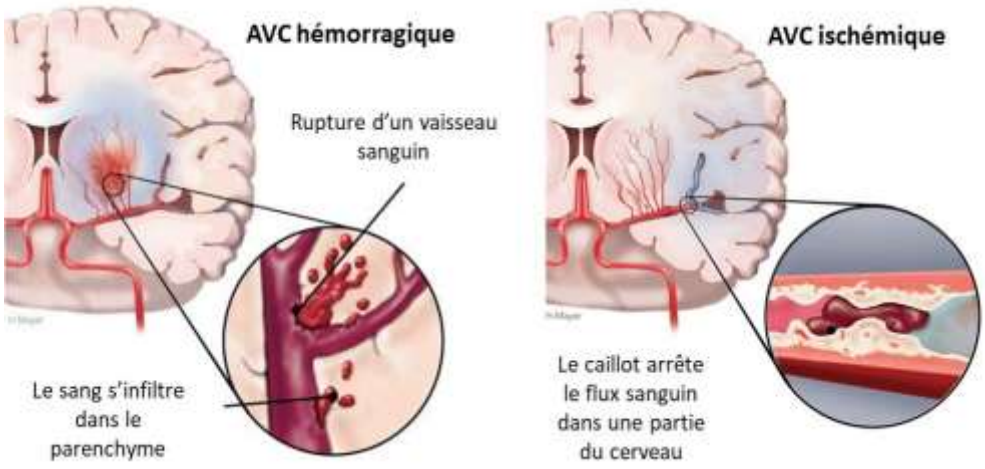


Figure 1 : Illustrations d'un AVC hémorragique et d'un AVC ischémique.
(D'après la fondation des maladies du cœur et de l'AVC du Canada).

1. L'accident vasculaire cérébral hémorragique

L'hémorragie cérébrale est une forme dévastatrice d'AVC, qui est associée à une forte mortalité et à des invalidités de longue durée. Elle est consécutive à la rupture d'une artère cérébrale (anévrisme ou malformation artério-veineuse) entraînant un saignement dans le parenchyme ainsi qu'une forte chute du débit sanguin dans la zone irriguée par l'artère atteinte. Ce type d'AVC est également associé à un fort risque de compression du volume cérébral et à une toxicité liée à la libération du contenu sanguin. L'AVC hémorragique, dont l'issue est fatale dans plus de 50% des cas, représente 5% à 20% des cas d'AVC (15,6 % en 2016), et son incidence varie selon l'âge et les régions géographiques (Johnson *et al.*, 2019).

On distingue deux grands types d'AVC hémorragiques en fonction de leur localisation :

- Les hémorragies intra-parenchymateuses résultant de la rupture d'une artériole distale, sont le plus souvent causées par une pathologie hypertensive et/ou une angiopathie amyloïde (Qureshi, 2009).

- Les hémorragies sous-arachnoïdiennes, causées dans 85% des cas par un anévrisme, résultent de la rupture d'un vaisseau entre la pie-mère et l'arachnoïde (van Gijn *et al.*, 2007).

En 2010, 5,3 millions de personnes ont fait un AVC hémorragique dans le monde, soit une augmentation de 63 % par rapport à 1990. Le vieillissement de la population, le manque de contrôle de l'hypertension dans certains pays, mais aussi une augmentation de la prévalence de certains facteurs de risque comme le tabagisme et la consommation nocive d'alcool semblent contribuer de manière importante à l'augmentation du nombre de cas d'AVC hémorragiques (Krishnamurthi *et al.*, 2014).

2. L'accident vasculaire cérébral ischémique

L'AVC ischémique, appelé aussi ischémie cérébrale, résulte de l'obstruction d'un vaisseau sanguin cérébral. Afin d'améliorer le diagnostic et le traitement, en 1993, Adams et collaborateurs ont répertorié selon leur étiologie les différents sous-types d'AVC ischémiques (Adams *et al.*, 1993). Ainsi, la classification TOAST (*trial of org* 10172 *in acute stroke treatment*) distingue cinq sous-types d'AVC ischémiques (Adams *et al.*, 1993) :

❖ Athérosclérose des artères : l'AVC dû à l'athérosclérose des grosses artères est la cause la plus commune d'AVC ischémique (environ 30 à 40% des cas) et correspond à l'occlusion d'une artère majeure par une plaque d'athérome instable qui va progressivement former un thrombus (Banerjee and Chimowitz, 2017; Chung *et al.*, 2014).

❖ Cardioembolisme : les embolies d'origine cardiaque sont à l'origine de 20 à 30% des AVC ischémiques. Les AVC cardioemboliques, plus sévères que les autres infarctus cérébraux, sont souvent associés à une mortalité élevée et à une forte récidive. En effet, dans ce type d'AVC les vaisseaux touchés sont souvent des grosses artères cérébrales, ce qui engendre des lésions ischémiques volumineuses dans des régions à la fois corticales et sous corticales (Chung *et al.*, 2014; O'Carroll and Barrett, 2017).

❖ Occlusion d'un petit vaisseau : environ un quart des AVC ischémiques concerne l'obstruction d'un petit vaisseau cérébral. Ces infarctus, appelés infarctus lacunaires, sont de petites tailles (2-20 mm de diamètre) et sont généralement situés dans la substance blanche profonde (Bamford and Warlow, 1988). La microathérosclérose (Fisher, 1982) et les embolies d'origine cardiaque, carotidienne et intracérébrale (Ay *et al.*, 1999; Uehara *et al.*, 1997) sont responsables de nombreux infarctus lacunaires. Cependant, la cause la plus fréquente d'infarctus lacunaire est la lipohyalinose des artères pénétrantes. Ce mécanisme, souvent associé à une hypertension artérielle, se traduit par une dégénérescence de la paroi des petites artères irriguant les zones profondes du cerveau (Jackson and Sudlow, 2005).

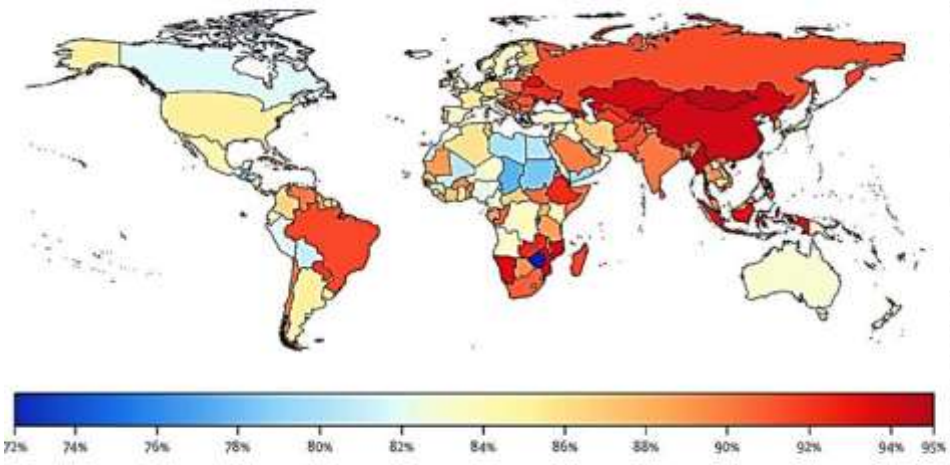
❖ Autres étiologies : cette catégorie TOAST regroupe un très grand nombre de causes d'AVC ischémiques parmi lesquelles on retrouve, la dissection artérielle, représentant près de la moitié des cas et touchant surtout les sujets jeunes. Les maladies hématologiques (hyperhomocystéinémie et thrombophilie) et la migraine sont aussi répertoriées comme des sources fréquentes d'infarctus cérébraux (Rolfs *et al.*, 2013; S. Schneider *et al.*, 2017).

❖ AVC d'origine indéterminée : Environ un quart des AVC est d'origine indéterminée (Chung *et al.*, 2014). Plusieurs groupes sont répertoriés dans cette catégorie : « les AVC avec deux causes ou plus », « les AVC avec un bilan étiologique négatif » et « les AVC avec un bilan étiologique incomplet ».

II. Les facteurs de risque de l'AVC ischémique

1. Les facteurs de risque modifiables

Selon l'étude GBD (*global burden of disease*), 90,5 % des AVC sont dépendants des facteurs de risques dits « modifiables » (Figure 2; Feigin *et al.*, 2016). Cette étude, s'étendant sur 188 pays et regroupant des données collectées entre 1990-2013, a mis en évidence trois contributeurs principaux : les facteurs comportementaux (le tabac, l'alimentation, l'alcool et l'absence d'activité physique), les facteurs métaboliques (l'hypertension, le cholestérol, le diabète) et les facteurs environnementaux (la pollution de l'air, l'exposition au plomb) (Feigin *et al.*, 2016). L'hypertension artérielle, responsable de près de la moitié des AVC, ressort comme le facteur de risque majeur (O'Donnell *et al.*, 2016).



1	Hypertension artérielle
2	Alimentation pauvre en fruits
3	Indice de masse corporel élevé
4	Alimentation riche en sodium
5	Tabagisme
6	Alimentation pauvre en légumes
7	Pollution de l'air aux particules fines
8	Pollution domestique due à des combustibles solides
9	Alimentation pauvre en fibres
10	Diabète
11	Faible activité physique
12	Insuffisance rénale
13	Consommation d'alcool
14	Exposition au plomb
15	Cholestérol élevé
16	Tabagisme passif

Figure 2 : Carte représentant le pourcentage d'AVC attribuable à des facteurs de risque modifiables et tableau récapitulant les 16 facteurs de risque modifiables majeurs. D'après Feigin *et al.,* 2016.

❖ <u>L'hypertension artérielle</u> (HTA) : L'HTA est définie par une pression artérielle (PA) systolique supérieure à 140 mm de mercure (mmHg) et/ou une PA diastolique supérieure à 90 mmHg. L'étude

GBD réalisée en 2016 suggère que 64,1% des AVC sont associés à une PA systolique élevée (PA systolique supérieure à 120 mmHg) (Feigin *et al.*, 2016), en comparaison l'étude INTERSTROKE réalisée en 2016 estime que l'HTA (PA systolique supérieure à 140 mmHg) est responsable de 47,9% des AVC (O'Donnell *et al.*, 2016). Le risque d'AVC dû à l'hypertension artérielle ne varie ni avec l'âge, ni avec le sexe (O'Donnell *et al.*, 2016). Différentes études rapportent qu'une baisse de la PA de 10 mmHg réduit, d'environ un tiers, le risque de développer un AVC (Lawes *et al.*, 2004). Finalement selon l'étude PROGRESS, une diminution de la PA, grâce à des antihypertenseurs, réduit le risque d'AVC de 43 % (PROGRESS Collaborative Group, 2001).

- La mauvaise alimentation et l'obésité : au cours des dernières années, le nombre d'AVC lié à un surpoids et à une mauvaise alimentation a augmenté significativement. L'étude GBD considère l'alimentation faible en fruit comme le deuxième facteur de risque majeur des AVC, s'ensuit l'obésité et l'alimentation riche en sodium (Feigin *et al.*, 2016). Selon les études, la consommation de fruits et de légumes est associée à une diminution du risque d'AVC. En effet, les individus mangeant plus de cinq portions de fruits et légumes par jour voient leur risque de développer un AVC diminuer de 26% par rapport aux individus en mangeant moins de trois portions (He *et al.*, 2006). L'obésité, définie par un indice de masse corporelle supérieur à 30 kg/m^2, est associé à une augmentation du risque d'AVC chez les hommes (Kurth *et al.*, 2002). Chez les femmes, les données sont contradictoires. Une étude montre une association entre l'obésité et le développement des infarctus ischémiques (Rexrode *et al.*, 1997) et d'autres non (Lindenstrøm *et al.*, 1993; Selmer and Tverdal, 1995).

- Le tabac : les fumeurs ont deux fois plus de risque de développer un AVC que les non-fumeurs (Shinton and Beevers, 1989). L'exposition à la fumée de cigarette (tabagisme passif) est également considérée comme un facteur de risque d'infarctus cérébral (You *et al.*, 1999).

- L'alcool : les individus consommant plus de 5 verres d'alcool par jour (soit plus de 60 g d'alcool/jour) voient leur risque de développer un AVC augmenter de 69% par rapport à des individus ne consommant aucun alcool (Reynolds *et al.*, 2003).

- Le diabète : selon les études, le risque relatif d'AVC lié au diabète est estimé entre 1,5 et 3 (Chen *et al.*, 2016). Le diabète de type II est considéré comme un facteur important d'infarctus lacunaire (Arauz *et al.*, 2003; Mast *et al.*, 1995). Cependant, le contrôle de l'hyperglycémie n'a pour

l'instant montré aucun bénéfice sur la mortalité, les déficits neurologiques et le handicap engendrés par l'ischémie cérébrale (Bellolio *et al.*, 2014). Le diabète est souvent associé à une hyperlipidémie. Il a été montré qu'une diminution du taux de cholestérol chez les patients diabétiques réduisait de 28% le risque de développer un AVC ischémique (Collins *et al.*, 2003).

Bien que tous ces facteurs puissent avoir une composante génétique, il est possible de les prendre en charge et de les traiter. Ainsi, des études ont montré qu'il était possible de réduire les risques d'AVC en adoptant, par exemple, une meilleure hygiène de vie. Dans ce but, de nombreuses campagnes de prévention sont mises en place chaque année (Pandian *et al.*, 2018).

2. Les facteurs de risque non modifiables

❖ Le vieillissement : l'âge est le facteur de risque « non modifiable » majeur : après 55 ans, et pour chaque tranche d'âge de 10 ans, les cas d'AVC sont multipliés par deux (Rothwell *et al.*, 2005). De surcroît, environ deux tiers des personnes déclarant un AVC ont plus de 70 ans (Feigin *et al.*, 2017). Les patients les plus âgés déclarant un AVC ont souvent des antécédents de fibrillations artérielles et d'hypertension. En outre, par rapport aux sujets jeunes, les patients âgés ont plus de mal à récupérer et ont également plus de risques de décéder à l'hôpital (Fonarow *et al.*, 2010).

❖ Le sexe : les hommes jeunes font plus d'AVC que les femmes du même âge. Cependant après 85 ans, l'incidence est plus importante chez les femmes (Rothwell *et al.*, 2005). Concernant la mortalité, la différence homme/femme dépend également de l'âge. Avant, 45 ans la mortalité est similaire entre les deux sexes, cependant les femmes âgées de 45 à 74 ans ont moins de risque de décéder d'un AVC. Au-delà de 85 ans la tendance s'inverse avec environ 12% de mortalité en plus chez les femmes (Reeves *et al.*, 2008).

❖ L'ethnicité : il existe une association entre l'origine ethnique et la prévalence des AVC. Aux États-Unis, le nombre d'AVC ischémiques est plus important chez les hispaniques et chez les afro-américains que chez les Caucasiens (Benjamin *et al.*, 2019). De plus, il semble que l'incidence des AVC soit plus élevée dans la population chinoise que dans la population caucasienne (C.-F. Tsai *et al.*, 2013).

❖ Les facteurs génétiques : En 2018, une méta-analyse regroupant plus de 520 000 individus a permis d'associer 32 régions génomiques au risque d'AVC. Jusqu'alors, seulement une dizaine de loci avaient été identifiés. Plus de la moitié des gènes impliqués dans le risque d'AVC sont aussi impliqués dans des pathologies vasculaires telles que l'hypertension artérielle (Malik *et al.*, 2018).

III. Physiopathologie de l'accident vasculaire cérébral ischémique

Au cours d'un AVC ischémique, différents compartiments vont être touchés. Le compartiment vasculaire est le premier affecté, suite à la formation d'un thrombus ou d'une embole induisant une diminution du débit sanguin cérébral (DSC). S'ensuit une altération de la barrière hémato-encéphalique (BHE) et l'apparition de dommages tissulaires.

1. L'atteinte vasculaire

L'activité métabolique cérébrale repose sur la phosphorylation oxydative, par conséquent, le cerveau a besoin d'un apport continu en oxygène et en glucose. Bien qu'il représente seulement 2 % du poids du corps, le cerveau consomme 20 % de l'oxygène et 25 % du glucose corporel. Le DSC peut recruter 15 à 20 % du débit cardiaque. On estime à 50 ml/100g/min un DSC normal (Amin et Schindler, 2017 Vascular Neurology Board Review : An Essential Study Guide). Lors d'un AVC ischémique, la formation d'un caillot entraîne une diminution du calibre de la lumière artérielle voire son obstruction totale, conduisant à une diminution du DSC. L'ischémie cérébrale se développe lorsque le DSC est inférieur à 22 ml/100g/min. En deçà de 8 ml/100g/min, les dommages deviennent irréversibles (Astrup *et al.*, 1981). Les patients ayant un DSC inférieur à 4,8 ml/100g/min ont 95 % de risque de développer un infarctus, a contrario, une valeur de DSC supérieure à 14,1 ml/100g/min aboutira à un infarctus dans moins de 5% des cas (Heiss *et al.*, 2001).

Des études utilisant la tomographie par émission de positons (TEP) ont montré que la diminution du DSC est hétérogène dans le territoire de l'occlusion artérielle (J. C. Baron *et al.*, 1981; Marchal *et al.*, 1996). Ainsi trois régions se distinguent (Figure 3; Heiss, 2014) :

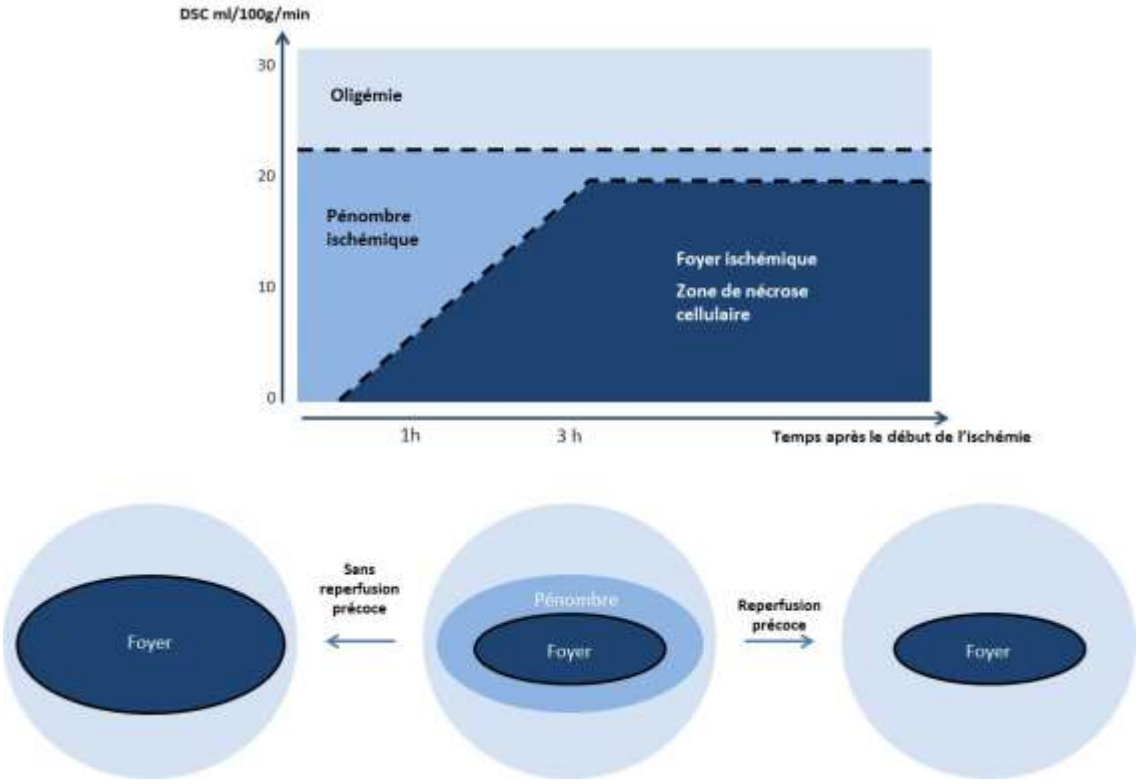


Figure 3 : **Évolution du foyer ischémique et de sa pénombre.**
La diminution du débit sanguin cérébral n'est pas homogène dans le territoire de l'occlusion ischémique, ainsi trois zones se distinguent : le foyer ischémique, la pénombre ischémique et l'oligémie. Dans le foyer ischémique, zone où le DSC est le plus faible, les neurones entrent rapidement en nécrose et les dommages sont irréversibles. Dans la pénombre, la chute du DSC est moindre, les neurones peuvent survivre plus longtemps mais si le DSC n'est pas rétabli, ils rentreront à leur tour en nécrose. L'oligémie est une région hypoperfusée qui ne présente cependant aucune mort cellulaire. D'après Heiss, 2014 : Furlan *et al.*, 1996.

❖ Le cœur ischémique (DSC < 10 ml/100g/min) est la région la plus touchée et présente une nécrose rapide des tissus (Furlan *et al.*, 1996; Heiss *et al.*, 2001). En effet, les neurones exposés plus de 45 minutes à un DSC inférieur ou égal à 14 ml/100g/min ont un faible taux de survie (Heiss and Rosner, 1983).

❖ La pénombre ischémique (DSC entre 10 et 22 ml/100g/min) bénéficie de l'apport des artères collatérales et a donc une altération moindre du DSC. Cette région hypoperfusée ne présente pas de dommages irréversibles mais son pronostic reste incertain. Malgré un DSC réduit, l'apport en oxygène est préservé à un niveau suffisant, assurant une survie des tissus pendant une période de temps limitée. Cette zone peut être sauvée mais si le DSC n'est pas rétabli, les neurones exposés vont finir par mourir (Furlan *et al.*, 1996; Astrup *et al.*, 1981).

❖ L'oligémie bénigne (DSC > 22 ml/100g/min) est une région hypoperfusée ne présentant pas de dommages et dans laquelle le métabolisme cellulaire est conservé (Furlan *et al.*, 1996).

2. Altération de la barrière hémato-encéphalique

La BHE, composée des cellules endothéliales cérébrales, des péricytes, de la glie et des neurones, participe au maintien de l'homéostasie cérébrale en contrôlant les échanges entre le sang et le parenchyme cérébral (Figure 4; Weiss *et al.*, 2009).

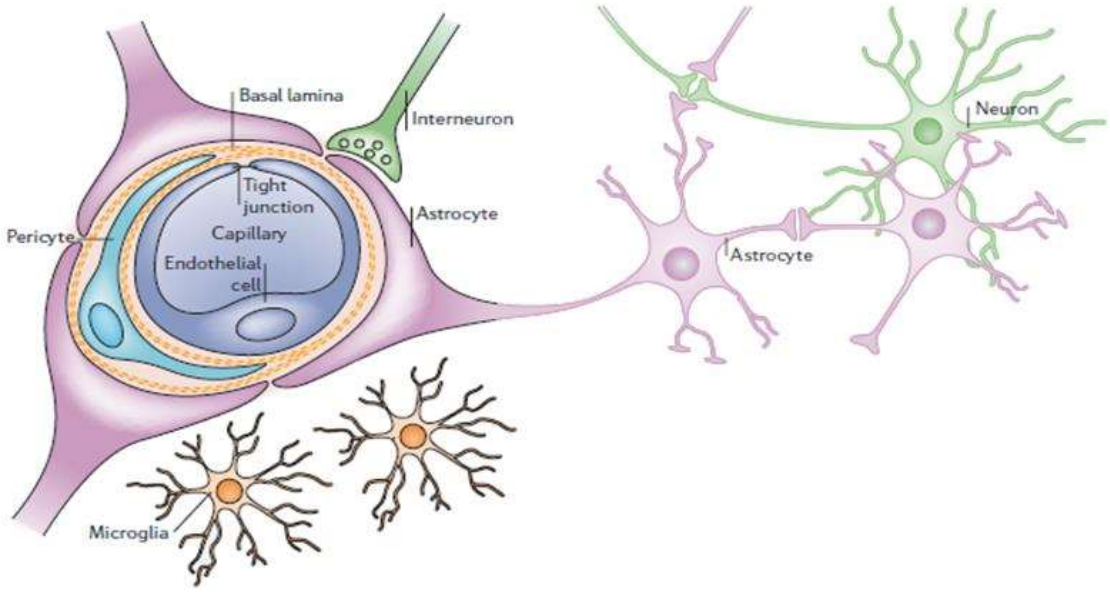


Figure 4 : Schéma de la barrière hémato-encéphalique.
La BHE est formée par les cellules endothéliales reliées par des jonctions serrées, une lame basale, les péricytes, et les pieds astrocytaires. D'après Abbott *et al.,* 2006.

En condition ischémique, la perméabilité de la BHE est attribuée, en partie, aux métalloprotéinases matricielles (MMPs) responsables de la dégradation des jonctions serrées et de la lame basale (Yang *et al.*, 2007).

Il est bien établi, que lors d'une l'ischémie cérébrale, l'ouverture de la BHE est bi-phasique (Kuroiwa *et al.*, 1985). La première altération a lieu dans les premières heures suivant l'ischémie (Rosenberg *et al.*, 1998). Cette première ouverture, réversible, est attribuée à une augmentation de l'expression de MMP-2 (Chang *et al.*, 2003; Nakaji *et al.*, 2006). Dans un second temps, entre 24 et 48 heures,

une infiltration leucocytaire et une activation de MMP-9, par les cytokines pro-inflammatoires et les radicaux libres, conduisent à une rupture irréversible de la BHE et à des dommages tissulaires sévères (Pun *et al.*, 2009; Rosenberg *et al.*, 1998; Rosenberg and Yang, 2007).

La rupture de la BHE induit un œdème vasogénique caractérisé par un passage d'eau du compartiment vasculaire vers le parenchyme cérébral (Rosenberg and Yang, 2007). Cet œdème est responsable d'une augmentation du volume cérébral associé à une augmentation de la pression intracrânienne et à des lésions d'ischémies-reperfusions (Klatzo, 1985). De plus, chez les patients, l'ouverture de la BHE est liée à un risque de transformation hémorragique et a un mauvais pronostic à long terme (Brouns *et al.*, 2011; Hjort *et al.*, 2008).

3. Atteinte tissulaire

a. Défaillance énergétique et excitotoxicité

Le cerveau est un organe ayant besoin d'un apport constant en oxygène et en glucose. En condition physiologique, il couvre une partie de ses besoins énergétiques par l'oxydation du glucose. Par conséquent, immédiatement après le début de l'ischémie, la chute du DSC va conduire à un arrêt des phosphorylations oxydatives, stoppant la production d'adénosine triphosphate (ATP).

La diminution de la production d'ATP est responsable d'une défaillance de la pompe sodium-potassium (Na^+/K^+) ATPase. La redistribution des ions Na^+ et K^+ de part et d'autre de la membrane n'est alors plus effectuée, engendrant une sortie massive de potassium dans l'espace extracellulaire et une entrée de sodium dans la cellule. S'ensuit une ouverture importante des canaux calciques voltages-dépendants, responsable d'une augmentation de la concentration intracellulaire de calcium (Figure 5; Martin *et al.*, 1994). Ce calcium intracellulaire se lie à la synaptotagmine, causant la fusion des vésicules synaptiques avec la membrane plasmique et la forte libération de glutamate dans la fente synaptique (Sekerdag *et al.*, 2018).

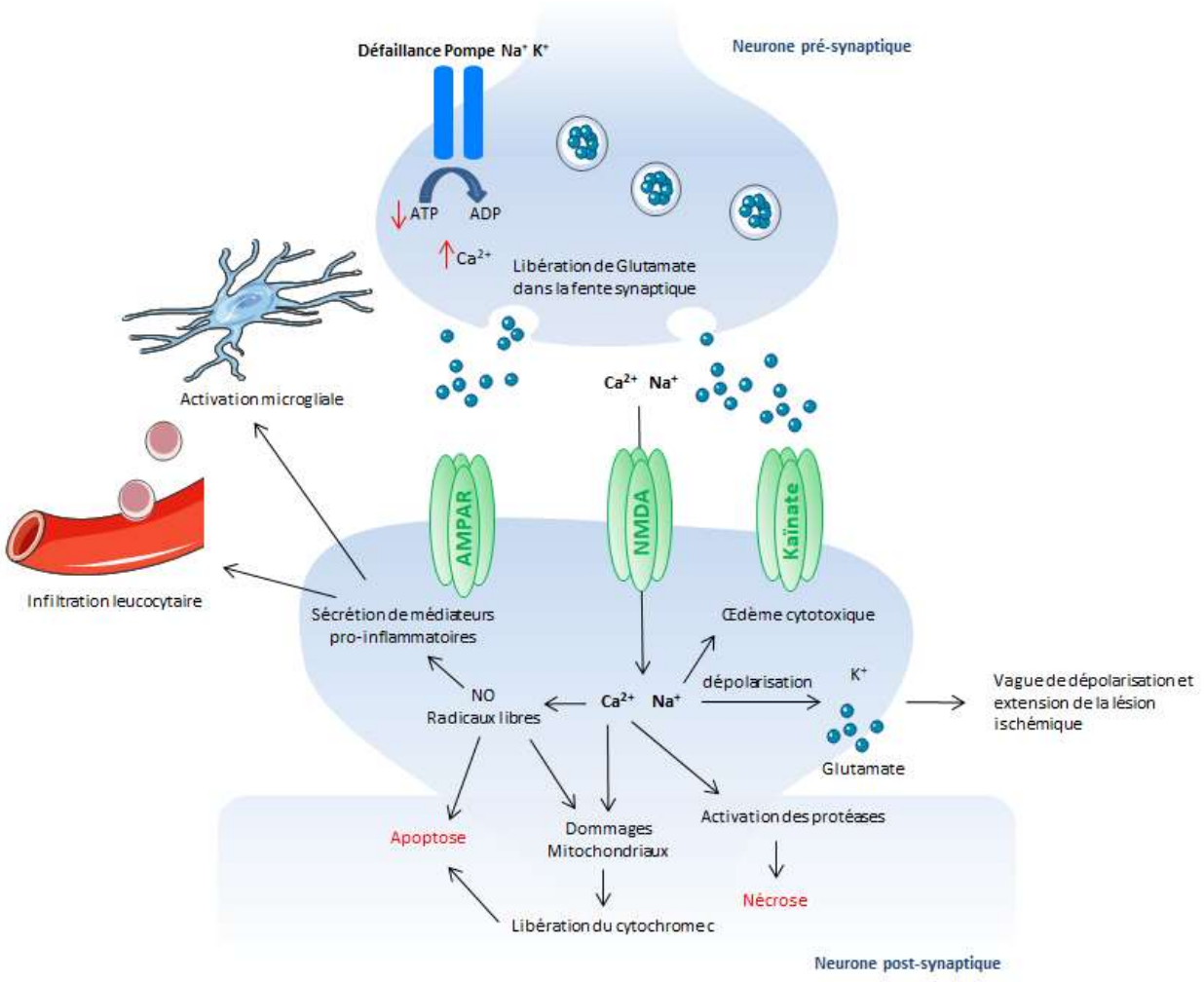


Figure 5 : Schéma de la physiopathologie de l'ischémie cérébrale.

La défaillance énergétique conduit au dysfonctionnement de la pompe Na^+/K^+, à l'entrée massive de calcium dans le neurone et à une libération importante de glutamate dans la fente synaptique. Le glutamate active les récepteurs (NMDA, AMPA et Kaïnate) post-synaptiques provoquant une entrée massive de Ca^{2+}, Na^+ et de Cl^- dans la cellule, alors que le K^+ en est expulsé. La diffusion du glutamate et du K+ dans l'espace extracellulaire propage la dépolarisation neuronale jusqu'à la pénombre. La perturbation ionique intracellulaire provoque un œdème vasogénique et l'éclatement des cellules. Le Ca^{2+}, une fois dans la cellule, active plusieurs systèmes enzymatiques (protéases, lipases, endonucléases…). Des radicaux libres sont générés, ce qui endommage les membranes, les mitochondries et l'ADN, et promeut l'inflammation *via* l'activation microgliale et l'infiltration leucocytaire dans le parenchyme.

Le relargage important de glutamate dans la fente synaptique, entraîne une hyperactivation des récepteurs « N-méthyl-D-aspartate » (NMDA), Kaïnate et « alpha-amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionic acid » (AMPA) post-synaptiques, causant une entrée de sodium et de calcium

dans les neurones et une dépolarisation massive. Ces événements en cascade provoquent une mort cellulaire post-synaptique de type nécrotique. De manière concomitante, les bouleversements ioniques engendrent une entrée importante d'eau dans la cellule provoquant un œdème cytotoxique. L'ensemble de ces mécanismes est responsable d'une vague de dépolarisation conduisant à une extension de la lésion cérébrale (Figure 5; Won *et al.*, 2002).

La concentration élevée de calcium intracellulaire dans le tissu ischémié favorise l'activation de la calpaïne, dont le rôle est de protéolyser des substrats cytosoliques. Cela conduit à une mort neuronale (Anagli *et al.*, 2009). Cet influx calcique induit également, la dépolarisation de la membrane mitochondriale ce qui cause une libération de radicaux libres oxygénés. S'ensuit une perméabilisation de la membrane mitochondriale, responsable de la libération de substances cytotoxiques tel que le cytochrome c (Figure 5; Liu *et al.*, 2002).

Par ailleurs, l'ischémie cérébrale, en plus du stress oxydant, entraîne un stress nitrant par l'activation de la voie *nitric oxide synthase* (NOS). Bien que la NOS endothéliale (eNOS) ait un effet vasodilatateur et améliore le débit sanguin (Huang *et al.*, 1996), la NOS neuronale (nNOS) et la NOS inductible (iNOS) vont être délétères. En effet, l'iNOS induit la production d'oxyde d'azote (NO) ce qui conduit à des dommages cérébraux durant la reperfusion ischémique (Danielisova *et al.*, 2011). De plus, elle entraîne une réponse inflammatoire en activant la sécrétion du facteur de nécrose tumorale-α (TNF-α) et de l'interleukine-1β (IL-1β) (Chen *et al.*, 2017; Khan *et al.*, 2005). Finalement, il a été montré qu'une inhibition de la nNOS réduisait l'excitotoxicité en diminuant l'activation de la calpaïne (Sun *et al.*, 2009).

Pour résumer, l'excitotoxicité est un processus déclencheur et exécuteur de la mort cellulaire à la suite de l'ischémie cérébrale. Les mécanismes excitotoxiques induisent une mort cellulaire rapide de type nécrotique, mais va aussi activer certaines voies de signalisation intracellulaires qui entraînent l'activation de gènes pro-inflammatoires (Sekerdag *et al.*, 2018), voire de l'apoptose (Liu *et al.*, 2002).

b. Inflammation

L'inflammation est caractérisée par le recrutement et l'activation de différents types cellulaires au sein de la zone ischémiée. En condition physiologique, les lymphocytes et les monocytes sont

présents dans la circulation tandis que la microglie et les astrocytes sont situés dans le parenchyme cérébral. Ces deux groupes de cellules sont séparés par la BHE. L'inflammation cérébrale consécutive à l'ischémie se traduit par une rapide activation des cellules résidentes, en particulier des cellules microgliales, suivie par une infiltration des cellules inflammatoires circulantes telles que les granulocytes, les neutrophiles, les lymphocytes T et les monocytes/macrophages (Figure 6; Gerhard *et al.*, 2000; Lindsberg *et al.*, 1996; Price *et al.*, 2004; Schilling *et al.*, 2003).

Durant la phase aigüe de l'AVC ischémique, les cellules résidentes présentes dans la zone ischémiée s'activent et participent à la sécrétion de cytokines et chimiokines pro-inflammatoires (Schilling *et al.*, 2003) impliquées dans l'infiltration de leucocytes au sein du parenchyme cérébral (Figure 6; Chen *et al.*, 2003).

Quelques heures après le début de l'ischémie, les cellules atteintes libèrent des médiateurs pro-inflammatoires tels que l'IL ou le TNF (Figure 6). Ces médiateurs induisent l'expression de molécules d'adhésion au niveau des cellules endothéliales cérébrales et des leucocytes, permettant l'infiltration de ces derniers dans le parenchyme par diapédèse (del Zoppo *et al.*, 1991). Finalement, l'utilisation de microparticules de fer (*micrometer-sized paramagnetic iron oxide*, MPIOs) couplées à des anticorps anti-VCAM-1 (molécule d'adhésion des cellules vasculaires) permettent une imagerie ultrasensible de l'inflammation cérébrovasculaire (Montagne *et al.*, 2012). Une étude réalisée au sein du laboratoire a utilisé cette méthode afin de mettre en évidence une surexpression de VCAM-1, 24 heures après une occlusion transitoire de l'artère cérébrale moyenne (ACM). Cette surexpression subsiste jusqu'à cinq jours après l'ischémie et est particulièrement importante dans la périphérie du cœur ischémique (Gauberti *et al.*, 2013). Le blocage, par l'utilisation d'un anticorps, de la molécule d'adhésion α_4-intégrine, inhibe la migration transendothéliale des monocytes et des lymphocytes et réduit la taille de la zone lésée chez le rat (Becker *et al.*, 2001). De la même manière, le blocage des molécules d'adhésion leucocytaires telles que la molécule d'adhésion intercellulaire (ICAM), la P-Sélectine ou la E-sélectine induit une diminution du volume de l'infarctus (Morikawa *et al.*, 1996; Suzuki *et al.*, 1999; Zhang *et al.*, 1994).

Dans la phase subaigüe de l'ischémie, les leucocytes infiltrés et les cellules résiduelles activées participent à la sécrétion de molécules pro-inflammatoires (Il-1β, IL-6, IL-8, IL-10, TNF-α), de radicaux libres et de protéases telles que les MMPs, prenant part ainsi à l'extension de la zone

ischémiée (Grilli *et al.*, 2000; Romanic *et al.*, 1998). Il a été montré qu'une inactivation des cytokines pro-inflammatoires, telles qu'IL-8 ou IL-1β, avait un effet neuroprotecteur et réduisait la taille de la lésion tissulaire (Loddick and Rothwell, 1996; Matsumoto *et al.*, 1997).

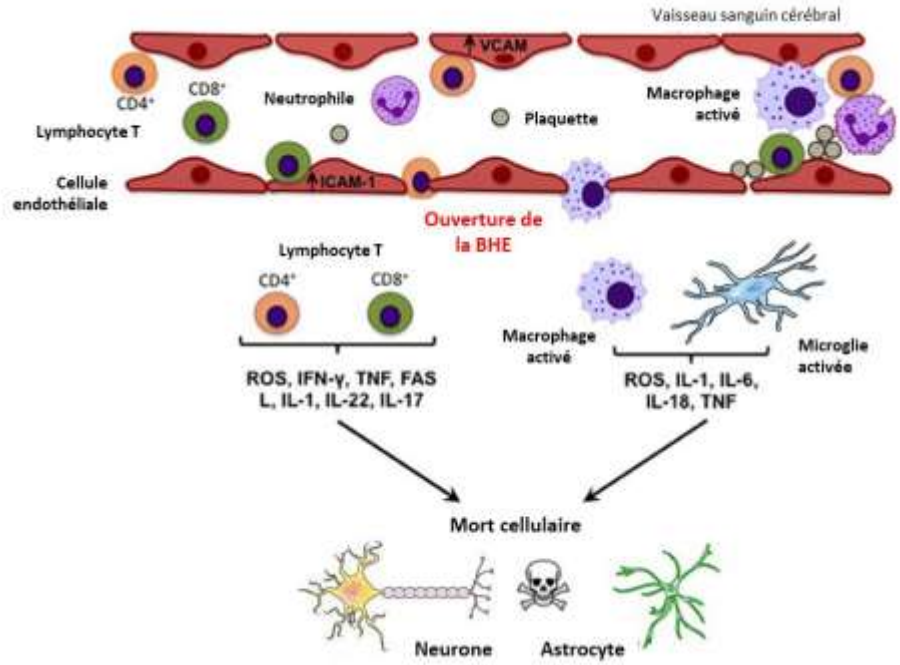


Figure 6 : Schéma de l'inflammation cérébrale lors d'un AVC ischémique.
La réponse inflammatoire post-ischémique se traduit par une activation de la microglie présente dans le parenchyme cérébral et par une infiltration des cellules immunitaires circulantes telles que les leucocytes (lymphocyte T) et les macrophages. L'ensemble de ces cellules participent à la mort neuronale et astrocytaire via la libération de médiateurs pro-inflammatoires. D'après Broughton *et al.,* 2012.

c. Apoptose

L'apoptose est une mort cellulaire programmée nécessitant de l'énergie, c'est pourquoi elle est prédominante dans la pénombre ischémique où la diminution d'apport énergétique est moindre. Certains auteurs ont rapporté qu'une exposition à une ischémie modérée entraînait les neurones vers une mort apoptotique alors qu'une atteinte plus sévère les entraînait vers une mort nécrotique (Bonfoco *et al.*, 1995; Nicotera and Lipton, 1999).

Parmi les facteurs déclencheurs de l'apoptose, on retrouve les récepteurs NMDA contenant la sous-unité GluN2B (Yitao Liu *et al.*, 2007) mais également des mécanismes indépendants des récepteurs

NMDA, impliquant des canaux ioniques activés par les protons extracellulaires. Cela inclut les canaux ioniques ASIC1a (*acid-sensing ion channels*) et les TRPC (*transient receptor potential channel*) (O'Bryant *et al.*, 2014; Simard *et al.*, 2007; Zhang and Liao, 2015). L'ensemble de ces médiateurs de l'apoptose contribue à l'augmentation du calcium intracellulaire.

L'ischémie entraîne la libération de médiateurs extracellulaires de l'apoptose qui peuvent activer des récepteurs de mort tels que Fas et les récepteurs au TNF. Ces récepteurs sont notamment impliqués dans le clivage de la pro-caspase 8 et dans la libération de sa forme active dans le cytosol (Locksley *et al.*, 2001). La molécule Bid, un membre de la famille Bcl-2 (B-*cell lymphoma 2*) à domaine BH3 (Bcl-2 *homology*), constitue un dialogue entre les récepteurs de mort et la voie mitochondriale. Un fragment de Bid engendré à la suite du clivage par la caspase 8 se lit à Bax, un autre membre pro-apoptotique de Bcl-2 (Luo *et al.*, 1998). Bax altère ensuite la membrane externe de la mitochondrie et induit la libération du cytochrome c (Guadagno *et al.*, 2013; Wilkins and Swerdlow, 2015). Le cytochrome c libéré va pouvoir se lier à l'Apaf-1 (*apoptotic protease activating factor* 1) et à la pro-caspase 9 et ainsi former un complexe qui activera la caspase-9. La caspase-9 active en retour la caspase 3 qui va promouvoir la fragmentation de l'ADN et la formation de corps apoptotique (Figure 7; Elena-Real *et al.*, 2018; Endo *et al.*, 2006; Gao *et al.*, 2010). De plus, l'augmentation du calcium intracellulaire entraîne une accumulation du calcium mitochondrial (Gincel *et al.*, 2001) responsable de la dépolarisation et de la perméabilisation de la membrane mitochondriale. Ainsi, la libération de radicaux libres de l'oxygène (*radical oxygen species*, ROS), de NO (Dugan *et al.*, 1995) et du cytochrome c dans le cytoplasme s'effectuera. La microglie activée libère également des ROS. Ces médiateurs de l'inflammation sont aussi responsables de la fragmentation de l'ADN et de l'apoptose cellulaire (Figure 7; Broughton *et al.*, 2009; Morita-Fujimura *et al.*, 2001; Sugawara and Chan, 2003).

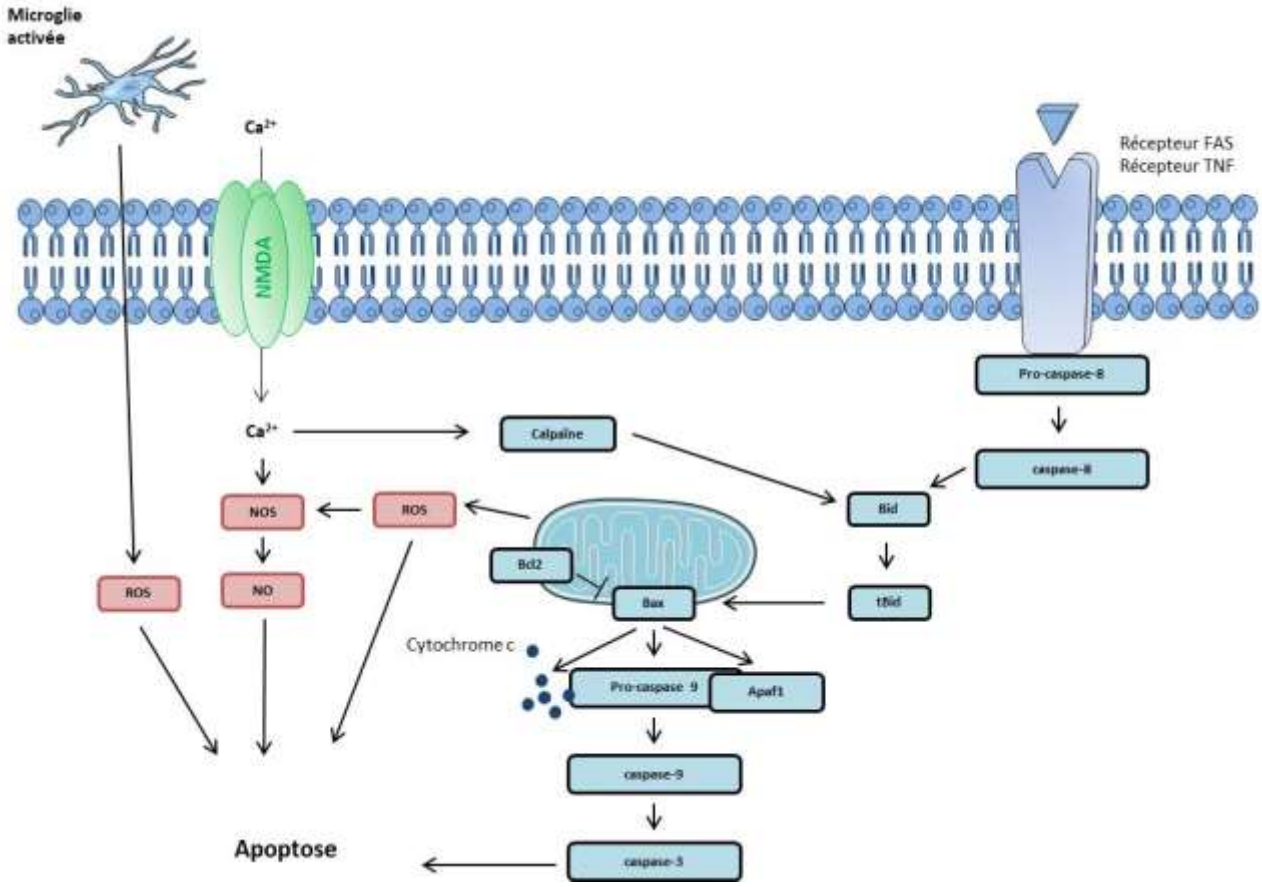


Figure 7 : Schéma de la voie apoptotique activée lors d'un AVC ischémique.
Les récepteurs FAS/TNF conduisent à l'activation de la caspase 8, qui clive le fragment Bid. Ce dernier interagit avec Bax induisant la libération du cytochrome c qui se lit à Apaf1 et à la pro-caspase9. Ce complexe nouvellement formé active la caspase 9, qui va en retour activer la caspase 3, induisant la fragmentation de l'ADN et la formation de corps apoptotique. En parallèle, la microglie activée et le calcium intracellulaire vont promouvoir la libération de ROS et de NO, responsables eux aussi de la fragmentation de l'ADN. Le calcium intracellulaire, *via* la calpaïne, induit également l'activation de la voie des caspases.

d. Protéostasie : Rôle du réticulum endoplasmique et de l'autophagie

La protéostasie est un terme porte-manteau des mots protéine et homéostasie, qui désigne les processus biologiques intervenant dans la biogenèse, le repliement, le trafic et la dégradation des protéines. Deux grands mécanismes sont impliqués dans la régulation de la protéostasie : la voie UPR (*unfolded protein-response*) et l'autophagie. L'ischémie cérébrale induit une altération de la protéostasie (Wang and Yang, 2019) ainsi qu'une activation de l'autophagie et du stress du réticulum endoplasmique (le RE) *via* la voie UPR (Thiebaut *et al.*, 2019).

Le RE est un organite important impliqué dans la synthèse, la conformation, les modifications post-traductionnelles et le transport des protéines. Il joue également un rôle dans la synthèse lipidique, dans l'homéostasie calcique (il s'agit de la principale réserve de calcium dans les cellules) et dans la mise en place de mécanismes de protection en réponse aux stress cellulaires (Hetz and Mollereau, 2014; Roussel *et al.*, 2013). Lors de l'ischémie cérébrale, le dysfonctionnement des pompes Ca^{2+} ATPase dû à l'arrêt de la production d'ATP contribue, d'une part, à une altération de la maturation des protéines et d'autre part, à une baisse énergétique responsable de la défaillance des pompes SERCA (*sarco(endo)plasmic reticulum* Ca2+-*transport* ATP*ase*). L'arrêt des pompes SERCA va engendrer une sortie du calcium du RE vers le cytosol (Doutheil *et al.*, 1999). Cet événement va avoir deux effets, le premier étant l'augmentation du calcium cytosolique exacerbant la neurotoxicité (Parsons *et al.*, 1999) et le second étant le disfonctionnement des protéines chaperonnes (Szydlowska and Tymianski, 2010; Thiebaut *et al.*, 2019).

De nombreux papiers ont mis en évidence une augmentation de l'autophagie neuronale après une ischémie cérébrale (Nitatori *et al.*, 1995; Rami *et al.*, 2008), cependant, son rôle (bénéfique ou délétère) reste encore très discuté. Il est intéressant de noter qu'il existe des interactions entre le stress du RE et l'autophagie, en particulier lorsque les protéines mal repliées s'accumulent dans le RE et que la voie PERK (*protein kinase* RNA-*like* ER *kinase*) active l'autophagie (Kouroku *et al.*, 2007). Des papiers montrent également une action de l'autophagie sur le stress du RE. En effet, une activation de l'autophagie avec la rapamycine induit une diminution du stress du RE chez des rats âgés de 7 jours ayant subi une hypoxie-ischémie cérébrale (Carloni *et al.*, 2014) (voir partie D. Autophagie dans l'AVC ischémique).

Pour résumer cette première partie, l'AVC est une pathologie pouvant se développer suite à l'obstruction d'un vaisseau cérébral (AVC ischémique) ou suite à la rupture d'un vaisseau cérébral (AVC hémorragique).

Lors de l'AVC ischémique, l'occlusion d'un vaisseau par un caillot va conduire à une diminution du débit sanguin cérébral créant, dans le parenchyme, un foyer ischémique au sein duquel l'apport en oxygène et en glucose est fortement diminué. En absence d'oxygène et glucose, les neurones n'ont plus d'énergie et meurent rapidement. Autour du foyer, la chute du débit sanguin cérébral est moins importante, les neurones sont en souffrance mais peuvent être sauvés. Cependant, si la circulation n'est pas rétablie, les cellules finiront par mourir et la lésion ischémique s'étendra.

Aujourd'hui, afin d'ôter le caillot obstruant le vaisseau plusieurs techniques sont utilisées : la thrombectomie (retrait chirurgical du caillot) et la thrombolyse (dissolution du caillot de fibrine par l'utilisation l'Actilyse®). Le principe actif d'Actilyse® est l'altéplase, un activateur tissulaire du plasminogène humain recombinant. Les propriétés et les rôles physiologique et pathologique de l'activateur tissulaire du plasminogène seront développés dans la seconde partie de l'introduction.

To summarize the first part, stroke is a pathology that can be classify into two categories: i) ischemic stroke, with the obstruction of a cerebral vessel by a clot, ii) haemorrhagic stroke, when a cerebral vessel breaks into the parenchyma.

During ischemic stroke, the occlusion of a vessel by a clot leads to a decrease in cerebral blood flow and a drop in oxygen and glucose supply. In this area, neurons have no energy and die quickly: this is called the ischemic core. Surrounding the core, the penumbra is an area where the decrease of cerebral blood flow is less important; neurons are suffering but can be saved. However, if the circulation is not restored, the cells will die and the ischemic injury extends.

Nowadays, to restore the cerebral blood flow, two techniques are used: thrombectomy (surgical removal of the clot) and thrombolysis (dissolution of the fibrin clot using Actilyse®). The active substance of Actilyse® is alteplase, a human recombinant tissue-type plasminogen activator. The physiological and pathological properties of tissue-type plasminogen activator will be developed in the second part of the introduction.

B. L'activateur tissulaire du plasminogène

L'activateur tissulaire du plasminogène (*tissue-type plasminogen activator*, tPA) est une glycoprotéine appartenant à la famille des sérines protéases synthétisée principalement par les cellules endothéliales et libérée dans la circulation sanguine. Le tPA est principalement connu pour son rôle dans la fibrinolyse, grâce à sa capacité à cliver le plasminogène inactif en plasmine active, dont le rôle est de dégrader les caillots de fibrine. Cette activité protéolytique, permettant la reperfusion des vaisseaux sanguins, est à l'origine de son utilisation comme traitement pharmacologique de la phase aigüe des AVC ischémiques (National Institute of Neurological Disorders and Stroke rt-PA Stroke Study Group, 1995). Le tPA est également exprimé par plusieurs types cellulaires du parenchyme cérébral (neurones, oligodendrocytes, microglie…) et de nombreuses données expérimentales montrent qu'il est capable d'interagir, *via* ses différents domaines, avec des protéines et récepteurs afin de jouer de nombreux rôles en condition physiologique mais aussi pathologique. Pour résumer, le tPA est une protéine pléiotrope capable d'exercer diverses fonctions dépendantes, ou non, de son activité catalytique (Thiebaut *et al.*, 2018).

I. Historique

En 1761, Morgagni note que le sang de patients subitement décédés ne coagule pas complètement (Morgagni, 1761). Près de deux siècles plus tard, Denis montre que le sang coagulé peut se liquéfier spontanément (Denis, 1838). Ces observations furent retrouvées en 1843, par Andral qui apporte les prémisses du système protéolytique (Andral, 1843). Mais ce n'est qu'en 1893, que des travaux mettent en évidence le phénomène protéolytique ainsi nommé fibrinolyse (Dastre, 1893).

En 1902, Conradi observa, pour la première fois, l'aptitude d'une enzyme à dissoudre les caillots sanguins par l'ajout d'extrait de divers organes (Conradi, 1902). Puis, Hedin démontra une activité protéolytique dans une fraction du sérum (Hedin, 1903), fraction qui fut identifiée plus tard comme étant celle contenant le précurseur de la plasmine : le plasminogène (Christensen and Macleod, 1945). Pour la première fois en 1952, Astrup et Stage parvinrent à isoler cette protéine fibrinolytique, alors nommée fibrikinase, à partir du tissu de cœur de porc (Astrup and Stage, 1952).

La fibrikinase fut purifiée pour la première fois en 1979 à partir de la circulation sanguine (Binder *et al.*, 1979) puis de l'utérus (Rijken *et al.*, 1979). Cependant, pour obtenir 1 mg de fibrikinase, 5 kg d'utérus humain furent nécessaires. C'est pourquoi la purification de la fibrikinase à partir de surnageant de cultures de mélanome humain fut élaborée. Cette enzyme fut alors renommée « activateur tissulaire du plasminogène » (Rijken and Collen, 1981).

La première administration de tPA chez l'homme a été réalisée en 1981 par W. Weimar aux Pays-Bas. Deux patients transplantés rénaux présentant une thrombose veineuse rénale ont été traités avec succès par perfusion intraveineuse de 5 ou 7,5 mg de tPA durant 24 heures (Weimar *et al.*, 1981). En 1983, le clonage du tPA et la production de son recombinant ont été lancés (Pennica *et al.*, 1983). Huit ans plus tard, Collen et Linjen ont démontré que le tPA a la capacité de favoriser la lyse de caillots en induisant une fibrinolyse dépendante du plasminogène (Collen and Lijnen, 1991). En 1995, le succès d'une étude clinique conduit à l'utilisation du tPA comme agent fibrinolytique lors de la phase aiguë de l'AVC ischémique (National Institute of Neurological Disorders and Stroke rt-PA Stroke Study Group, 1995).

Le tPA n'est pas le seul activateur du plasminogène présent chez l'Homme, l'activateur du plasminogène de type urokinase (*urokinase plasminogen activator,* uPA) est également capable de convertir le plasminogène en plasmine (Thiebaut *et al.*, 2018).

II. La structure du tPA

Le tPA est codé par le gène *plasminogen activator tissue type* (PLAT) se trouvant sur le chromosome 8 (Tripputi *et al.*, 1986). Il est synthétisé sous la forme d'une chaîne polypeptidique de 527 acides aminés ayant une masse moléculaire d'environ 69 kDa (Pennica *et al.*, 1983). Sa structure tridimensionnelle est maintenue par 17 ponts disulfures. Le tPA possède un site d'O-glycosylation sur la thréonine^{61} (Harris *et al.*, 1991) ainsi que trois sites de N-glycosylations dont deux sont constitutifs : un sur l'asparagine (Asn)^{117} et un autre sur l'Asn^{448}. La troisième N-glycosylation est variable et se situe sur l'Asn^{184}. En conséquence, il existe deux types de tPA : le tPA de type I avec trois N-glycosylations et le tPA de type II avec seulement les deux N-glycosylations constitutives (Figure 8; Mori *et al.*, 1995; Pohl *et al.*, 1984).

Le tPA est constitué de 5 domaines structuraux lui conférant ses propriétés fonctionnelles. La chaîne lourde située en amino-terminale contient les 4 domaines suivants (Figure 8) :

- Le domaine Finger, nommé ainsi par son analogie avec le domaine Finger de la fibronectine, est situé entre les résidus 4 à 50. Il permet au tPA de se lier à la fibrine formant ainsi un complexe tertiaire avec le plasminogène (Kagitani *et al.*, 1985). Ce domaine interagit également avec l'annexine II (Hajjar and Reynolds, 1994) et avec les récepteurs aux lipoprotéines de faible densité (*low-density lipoprotein receptor–related protein*, LRP) (Bu *et al.*, 1992).

- Le domaine EGF, situé entre les résidus 50 à 87, présente une forte homologie avec le facteur de croissance épidermique (*epidermal growth factor*, EGF). Il permet au tPA d'activer les récepteurs à l'EGF (Ortiz-Zapater *et al.*, 2007). Le site d'O-glycosylation, situé sur ce domaine, est associé à sa recapture et à sa dégradation par les cellules hépatiques (Hajjar and Reynolds, 1994).

- Le domaine Kringle 1, situé entre les résidus 87 à 176, contient un site ayant une forte affinité pour la lysine (*lysine binding site,* LBS). Ce site, formant une poche dans la structure tertiaire du tPA, est non-fonctionnel. Par conséquent, le rôle de ce domaine est mal connu. Une étude suggère son implication dans la recapture du tPA par les récepteurs au mannose présents sur les cellules endothéliales hépatiques, notamment grâce à la glycosylation de l'Asn^{117} (Kuiper *et al.*, 1996; Smedsrød *et al.*, 1988). Ce domaine serait aussi impliqué dans l'inhibition de la prolifération des cellules endothéliales (Kim *et al.*, 2003).

- Le domaine Kringle 2, situé sur les résidus 176 à 256, contient un site LBS actif permettant au tPA de se lier et d'activer de nombreuses protéines, telles que le plasminogène, la sous-unité GluN1 des récepteurs NMDA, le facteur de croissance dérivé des plaquettes (*platelet-derived growth factor-CC*, PDGF-CC) ou les protéines à haute mobilité du groupe box1 (*high–mobility group box* 1, HMGB-1) (Fredriksson *et al.*, 2004; Lopez-Atalaya *et al.*, 2008; Roussel *et al.*, 2011).

La chaîne légère du tPA est, quant à elle, composée d'un seul et unique domaine (Figure 8) :

- Le domaine protéase, est un domaine catalytique comportant 3 acides aminés (l'histidine^{322}, l'acide aspartique^{371} et la sérine^{478}) formant un site actif appelé la triade catalytique. Ce site confère au tPA son activité protéolytique grâce à sa capacité à convertir le plasminogène en plasmine (Pennica *et al.*, 1983).

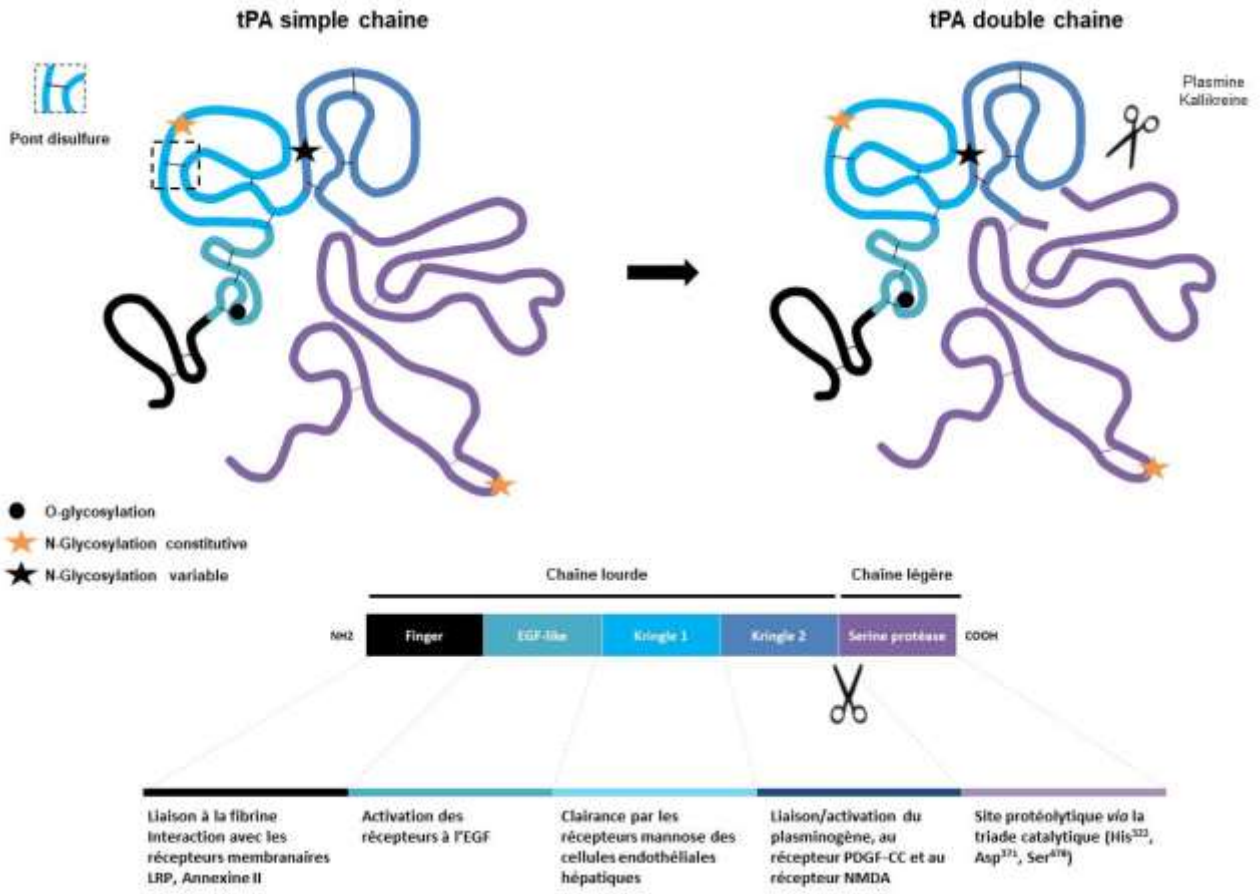


Figure 8 : Structure et fonction du tPA.
Le tPA est synthétisé sous forme simple chaîne (sc-tPA) et peut être clivé en forme double chaîne (tc-tPA). Le tPA comporte 5 domaines (Finger, EGF-like, Kringle 1, Kringle 2 et sérine protéase), 17 ponts disulfures, 3 sites de N-glycosylation et 1 site d'O'Glycosylation. D'après Chevilley *et al.,* 2015 ; Hébert *et al.,* 2016.

Le tPA est synthétisé sous sa forme simple-chaîne (*single chain* tPA, sc-tPA) et peut être clivé en forme double chaîne (*two chain* tPA, tc-tPA) (Rijken and Collen, 1981). La conversation du sc-tPA en tc-tPA s'effectue par hydrolyse de la liaison peptidique de l'arginine^{275}-isoleucine^{276} par différentes protéases telles que la plasmine ou les kallikréines (Ichinose *et al.*, 1984; Wallén *et al.*, 1982). Suite à ce clivage, la chaîne lourde (ou chaîne A) et la chaîne légère (ou chaîne B) restent liées l'une à l'autre grâce à un pont disulfure s'établissant entre la cystéine^{299} et la cystéine^{430} (Figure 8; Lamba *et al.*, 1996).

La majorité des sérines protéases sont synthétisées sous une forme simple chaîne zymogène, c'est-à-dire dépourvue d'activité enzymatique et ce n'est qu'à la suite de leur clivage en forme double chaîne qu'elles deviennent actives. Cependant, le tPA est une sérine protéase particulière car il est actif sous ses deux formes (Hoylaerts *et al.*, 1982). En présence de fibrine, le sc-tPA et tc-tPA ont une activité fibrinolytique identique. En revanche, en absence de fibrine, le tc-tPA présente une activité cinq fois supérieure (Boose *et al.*, 1989; Petersen *et al.*, 1988).

III. Expression du tPA

1. Dans la circulation

Le tPA est essentiellement synthétisé par les cellules endothéliales, il est donc retrouvé en grande majorité dans le compartiment vasculaire, en particulier dans les microvaisseaux (Levin and del Zoppo, 1994), sous sa forme simple chaîne où il circule à une concentration de 70 pM (Binder *et al.*, 1979; Rijken and Lijnen, 2009). Sa localisation précise au sein de la cellule endothéliale est mal connue. Plusieurs études le situent au sein des corps de Weibel-Palade, principalement connus pour contenir le facteur de von Willebrand (FVW) (Huber, 2002). Cependant, d'autres études laissent penser qu'il serait stocké dans un autre type de granules, plus denses et plus petites (Emeis *et al.*, 1997).

La libération du tPA par les cellules endothéliales peut se faire de deux façons: de manière continue (Angles-Cano *et al.*, 1985) ou en réponse à un stimulus spécifique. En effet, les cellules endothéliales peuvent stocker le tPA et le libérer en réponse à des stimuli tels que les facteurs de la cascade de la coagulation, l'hypoxie ou encore l'augmentation de la pression sur la paroi des vaisseaux (Diamond *et al.*, 1989; Emeis *et al.*, 1997).

Chez l'homme, la demi-vie du tPA dans la circulation sanguine est d'environ six minutes (Verstraete *et al.*, 1985). Sa clairance s'effectue par endocytose, grâce à des récepteurs membranaires situés sur les hépatocytes et sur les cellules endothéliales hépatiques. Plusieurs récepteurs sont impliqués dans cette recapture : les récepteurs au mannose (Kuiper *et al.*, 1988), les récepteurs LRP (Yepes *et al.*, 2003), ainsi qu'une voie dépendante des galectines (Nagaoka *et al.*, 2002).

2. Dans la périphérie

L'expression du tPA a d'abord été mise en évidence dans le sang. Depuis, une présence de son activité a été montrée dans de nombreux organes tels que l'utérus, les poumons, les muscles, le cœur ou les reins (Albrechtsen, 1957; Rouf *et al.*, 1996). Son expression est souvent associée à un remodelage des tissus et de leur vascularisation, comme lors de la mise en place de l'endomètre (Lockwood and Schatz, 1996).

3. Dans le système nerveux central

C'est en 1981, que la présence du tPA au sein du système nerveux central (SNC) a été mise en évidence pour la première fois. Soreq et Miskin ont démontré son expression dans les cellules endothéliales tapissant les vaisseaux cérébraux et dans les neurones à différents temps du développement, lui prédisant ainsi d'autres rôles que son implication dans la fibrinolyse (Soreq and Miskin, 1983). Puis en 1993, une étude a démontré sa synthèse par les neurones au sein de la plupart des structures cérébrales : cervelet, hippocampe, hypothalamus, cortex, striatum (Sappino *et al.*, 1993).

Chez l'homme, Teesalu et collaborateurs ont détecté par une technique d'hybridation *in situ*, des acides ribonucléiques messagers (ARNm) du tPA dans les régions cérébrales citées précédemment mais également dans d'autres nombreuses régions telles que les plexus choroïdes, le tronc cérébral, l'hypophyse, la moelle épinière et les différents noyaux thalamiques (Teesalu *et al.*, 2004). De récents travaux réalisés au sein du laboratoire ont permis d'identifier les différentes régions corticales murines capables d'exprimer le tPA. Parmi celles-ci, on retrouve le cortex rétrosplénial, somatosensoriel primaire, périrhinal et piriforme, avec environ 10 à 15% de neurones exprimant du tPA (Louessard *et al.*, 2016b).

À l'échelle cellulaire, le tPA est exprimé par la majorité des types cellulaires du SNC (Figure 9) : les neurones, les mastocytes, les péricytes, les cellules endothéliales, les épendymocytes (Louessard *et al.*, 2016b), les astrocytes (Toshniwal *et al.*, 1987), les oligodendrocytes (Correa *et al.*, 2011) et la microglie (Siao *et al.*, 2003).

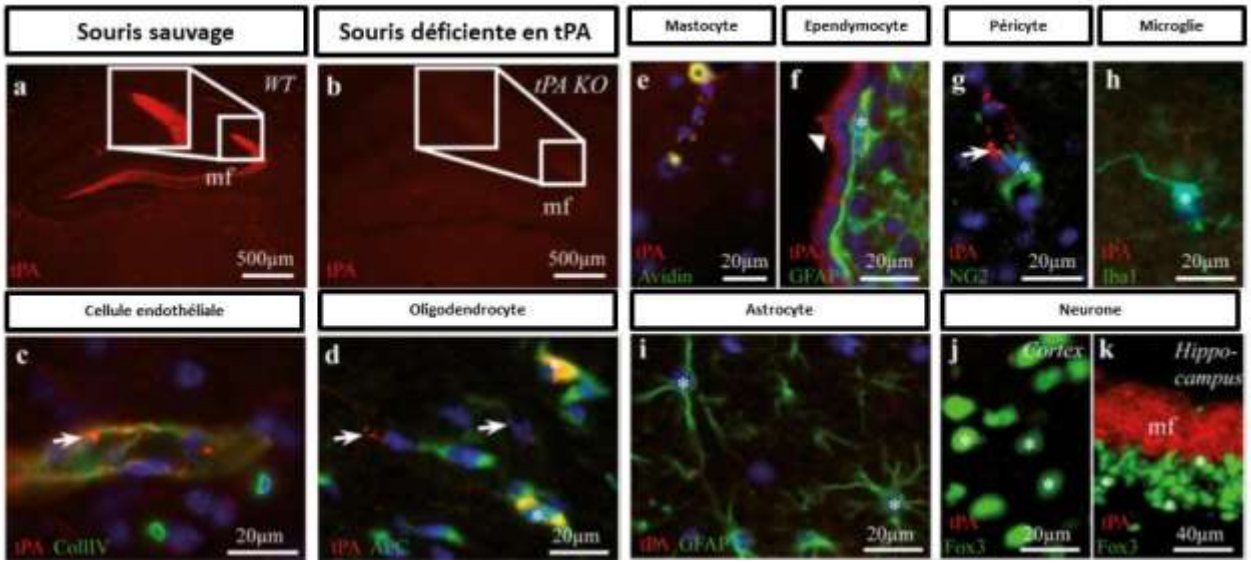


Figure 9 : Expression du tPA par les différentes cellules du SNC chez la souris adulte. Immunohistochimie sur la coupe de cerveau de souris après injection de colchicine (inhibiteur du transport neuronal). Le tPA (en rouge) est présent au niveau des mastocytes, des épendymocytes, des péricytes, de la microglie, des cellules endothéliales, des oligodendrocytes, des astrocytes et des neurones. D'après Louessard *et al.,* 2016.

❖ Les neurones : le tPA est synthétisé et localisé au sein des dendrites et des synapses (Shin *et al.*, 2004), où il est stocké dans des vésicules présynaptiques (Parmer *et al.*, 1997). Le tPA est ensuite transporté dans des vésicules de sécrétion le long des dendrites avant d'être libéré au niveau des cônes de croissance pour permettre l'élongation axonale (Lochner *et al.*, 1998). Des études ont montré que le tPA est contenu dans des vésicules à cœur dense situées dans les épines dendritiques, et qu'une dépolarisation neuronale conduisait à sa libération par une exocytose dépendante du calcium. Une fois à la synapse, le tPA peut interagir avec les récepteurs NMDA et moduler la potentialisation à long-terme (*long-term potentiation*, LTP) ainsi que les fonctions d'apprentissage et de mémoire (Baranes *et al.*, 1998; Lochner *et al.*, 2006). Il semble que tous les neurones ne soient pas capables d'exprimer du tPA, et que son expression soit réduite aux neurones glutamatergiques excitateurs pyramidaux. De plus, dans ces neurones, le tPA est stocké dans des vésicules synaptiques glutamatergiques positives à la synaptobrévine 2 (Louessard *et al.*, 2016b).

❖ Les astrocytes : la synthèse du tPA par les astrocytes a été mise en évidence chez la souris (Toshniwal *et al.*, 1987) et chez l'homme (Hultman *et al.*, 2008). De plus, une fois libéré dans la fente synaptique par les neurones, le tPA peut être recapturé par les astrocytes *via* les récepteurs LRP. Les

astrocytes seraient ensuite capables de libérer ce tPA endocytosé par un mécanisme impliquant la protéinase kinase C suite à l'activation des récepteurs kaïnates membranaires. Cet effet pourrait également être à l'origine de la clairance du tPA au sein du SNC (Casse *et al.*, 2012). Le tPA est majoritairement retrouvé dans les astrocytes activés suggérant son implication dans des processus pathologiques (Hultman *et al.*, 2008).

- Les oligodendrocytes : la présence de tPA dans les oligodendrocytes est confirmée par plusieurs études (Correa *et al.*, 2011; Leonetti *et al.*, 2017; Louessard *et al.*, 2016b). Il est retrouvé principalement dans les oligodendrocytes matures où son expression diminue au cours du vieillissement. De récents travaux ont montré que le tPA des oligodendrocytes est impliqué dans la migration des précurseurs oligodendrocytaires au cours du développement et durant la remyélinisation suite à une lésion de la substance blanche (Leonetti *et al.*, 2017).

- La microglie : elle est également capable de synthétiser du tPA. Ce tPA peut ensuite avoir un rôle dans son activation ainsi que dans des processus d'inflammation et de neurodégénération (Rogove *et al.*, 1999; Siao *et al.*, 2003; Tsirka *et al.*, 1995).

IV. Les inhibiteurs du tPA

En 1961, Brakman et Astrup postulaient l'existence d'un inhibiteur sanguin des activateurs du plasminogène (tPA et uPA) après avoir observé la présence d'un inhibiteur de la fibrinolyse qui n'agissait pas directement sur la plasmine (Brakman and Astrup, 1963). Puis, des études ont montré que le niveau de synthèse des ARNm du tPA ne corrèle pas toujours avec son activité enzymatique. Par exemple, bien que l'on retrouve des ARNm dans la totalité de l'hippocampe, aucune activité protéolytique n'est détectée dans la région CA1 (corne d'Ammon 1), ce qui suggère la présence d'un inhibiteur du tPA au sein du parenchyme cérébral (Sappino *et al.*, 1993). Ces inhibiteurs seront identifiés plus tard comme étant des molécules appartenant à la famille des serpines.

Les serpines sont des protéines monomériques glycosylées d'environ 350-400 acides aminés avec un poids moléculaire de 40 à 60 kDa. La caractéristique principale des serpines est de posséder une boucle, appelée boucle du centre réactif (*reactive center loop,* RCL), permettant leur fixation sur les protéases. Une fois fixées, les protéases clivent la RCL forgeant une liaison covalente entre les deux molécules. Ainsi, un complexe stable se forme permettant l'inhibition de l'activité de la protéase

(Figure 10). Les serpines peuvent aussi exister sous une forme latente, pour laquelle l'interaction avec la protéase n'est pas possible (Huntington *et al.*, 2000; Silverman *et al.*, 2001).

À l'heure actuelle, quatre serpines sont connues pour inhiber le tPA : l'inhibiteur du plasminogène de type I (*plasminogen activator inhibitor* 1, PAI-1), PAI-2, la neuroserpine (NS) et la protéase nexine-1 (Sprengers and Kluft, 1987). Dans le parenchyme cérébral, PAI-1 et la NS sont les principaux inhibiteurs du tPA.

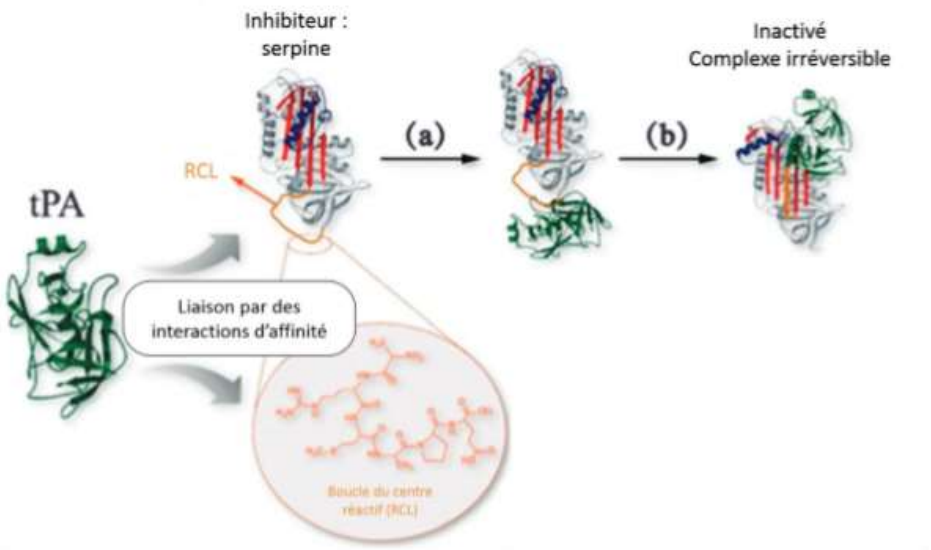


Figure 10 : Mode d'action des serpines.
Interaction avec le tPA au niveau de la RCL. (a) Le tPA va cliver la boucle, qui va alors aller s'insérer dans le feuillet β. (b) La protéase est entrainée au pôle opposé et un liaison covalente se forme antre la serpine et la protéase, inhibant cette dernière. D'après Tang *et al.,* 2015.

❖ La nexine-1 : Outre la thrombine qui est sa cible préférentielle, la nexine-1, aussi nommée SERPINE2, est capable d'inhiber les activateurs du plasminogène et la plasmine (Scott et al., 1985). Bien qu'elle soit impliquée dans l'hémostase, elle est à peine détectable dans le plasma. Elle est retrouvée dans de nombreux organes (les systèmes reproducteurs féminin et masculin, les reins, les poumons, la rate, le cœur) ainsi que dans les vaisseaux sanguins où elle est sécrétée par les cellules endothéliales, les cellules musculaires lisses et les plaquettes (Baker and Gronke, 1986; Bouton et al., 2012; Leroy-Viard et al., 1989). La nexine-1 plaquettaire a été démontrée comme ayant des propriétés antifibrinolytique et antithrombolytique (Boulaftali et al., 2011; Bouton et al., 2012).

Dans le parenchyme cérébral, cette serpine est exprimée par les cellules gliales et les neurones (Gloor et al., 1986; Simpson et al., 1994) et jouerait un rôle dans la LTP au sein de l'hippocampe. Une surexpression ou une absence de nexine-1 est à l'origine de phénomène épileptique *in vitro* et *in vivo* (Lüthi *et al.*, 1997; Meins *et al.*, 2001). La nexine-1 est aussi retrouvée en abondance autour des vaisseaux cérébraux et plus particulièrement au niveau des cellules musculaires lisses et des pieds astrocytaires. Ainsi, en cas d'ouverture de la BHE et d'extravasion de la thrombine et des sérines protéases sanguines délétères pour le parenchyme cérébral, la nexine-1 jouerait un rôle protecteur en inhibant ces dernières (Choi *et al.*, 1990).

- PAI-2 : Cette serpine, synthétisée par les cellules trophoblastiques, est capable d'inhiber les activateurs du plasminogène. Elle est majoritairement présente au niveau intracellulaire sous une forme non glycosylée. Seule une petite portion de PAI-2 (environ 20%) est glycosylée et sécrétée (Ny and Mikus, 1997). En condition physiologique, PAI-2 n'est pas détectable dans le plasma, cependant, lors de la grossesse, elle est sécrétée par les cellules trophoblastiques et libérée dans la circulation (Astedt *et al.*, 1998). Un taux faible de PAI-2 circulant semble corréler avec le risque de survenue d'une pré-éclampsie (Chappell *et al.*, 2002; Severens-Rijvers *et al.*, 2017).

- PAI-1 : Au niveau périphérique, la serpine PAI-1, aussi connue sous le nom de SERPINE1, est présente dans de nombreux organes ainsi que dans de nombreux types cellulaires. PAI-1 est retrouvée en abondance dans le plasma où elle est synthétisée par les cellules endothéliales, les cellules musculaires lisses et les plaquettes. Une fois sécrétée, elle peut se lier à une glycoprotéine de la matrice extracellulaire, la vitronectine, qui assure la stabilisation de son activité (Alessi *et al.*, 1988; Lindahl *et al.*, 1989). PAI-1 circule dans le plasma sous trois formes : une forme active liée à la vitronectine, une forme libre perdant spontanément son activité (demi-vie avoisinant les 90 minutes) et une forme inactive, liée au tPA (Lindahl *et al.*, 1989). PAI-1 est capable de se fixer aussi bien au sc-tPA qu'au tc-tPA (Rijken and Collen, 1981). Les complexes formés entre le tPA et PAI-1 sont très stables, ce qui rend l'inhibition du tPA presque définitive (Zhou *et al.*, 2001). De plus, l'association de PAI-1 avec le tPA ne gêne pas son élimination par le foie. En effet, la clairance du tPA par les hépatocytes peut se faire aussi bien sous forme libre que sous forme complexée à PAI-1 (Nagaoka *et al.*, 2002). Au sein du SNC, PAI-1 n'est exprimée qu'en très faible quantité par les astrocytes et les neurones (Bouton *et al.*, 2012; Hino *et al.*, 2001) mais en condition pathologique, lors d'un AVC par exemple, elle est surexprimée par de nombreux types cellulaires tels que les

macrophages périvasculaires et les astrocytes (Dietzmann *et al.*, 2000; Docagne *et al.*, 1999). Dans le parenchyme, PAI-1 est un inhibiteur puissant du tPA mais est moins efficace en présence de fibrine, contrairement à la nexine-1 qui est capable d'inhiber le tPA et la plasmine liée à la fibrine (Bouton *et al.*, 2012; Thelwell and Longstaff, 2007).

❖ La neuroserpine : Elle est exprimée presque exclusivement dans le SNC, toutefois de très faibles quantités sont retrouvées dans certains organes tels que les reins, le cœur, les testicules ou le pancréas. De nombreuses études ont démontré que la NS est absente dans la circulation et qu'elle n'avait donc aucun rôle sur le tPA vasculaire. Cependant, en 2011, une équipe a rapporté la présence de NS dans le sérum de patient ; cette NS sérique aurait des propriétés neuroprotectrices en inhibant notamment l'excitotoxicité et l'inflammation induites par l'AVC ischémique (Rodríguez-González *et al.*, 2011). Bien que les astrocytes puissent l'exprimer, la neuroserpine est synthétisée quasi exclusivement par les neurones (Docagne *et al.*, 1999; Osterwalder *et al.*, 1996; Schrimpf *et al.*, 1997). Dans le SNC, le tPA et la neuroserpine sont très souvent co-exprimés, renforçant l'idée que le tPA soit la cible physiologique de cette serpine (Teesalu *et al.*, 2004). Des études ont montré qu'elle pouvait inhiber les deux formes du tPA, bien qu'elle inhibe le tc-tPA de façon plus efficace (Osterwalder *et al.*, 1996). Cependant, la neuroserpine ne semble pas inhiber complètement le tPA, puisque des zymogènes ont révélé une activité fibrinolytique du tPA dans certaines structures cérébrales (Teesalu *et al.*, 2004). Des études ont rapporté que les complexes neuroserpine-tPA sont instables et se dissocient rapidement. Il est probable que le clivage de la RCL par le tPA conduise à la formation d'une boucle trop longue, empêchant le complexe de se stabiliser et induisant la libération du tPA. Les complexes neuroserpine-tPA ont une demi-vie avoisinant les dix minutes, comparativement aux autres complexes serpines-tPA ayant une demi-vie de plusieurs semaines (Carlson *et al.*, 2016; Ricagno *et al.*, 2009). Malgré que la neuroserpine inhibe préférentiellement le tc-tPA, les complexes qu'elles forment avec le sc-tPA sont plus stables. En effet, les complexes neuroserpine-tc-tPA ne sont stables qu'à pH acide (Carlson *et al.*, 2016).

V. Les fonctions du tPA

1. Les fonctions du tPA vasculaire

a. La fibrinolyse

La fibrinolyse est un mécanisme de coagulation permettant la dissolution des caillots de fibrine présents dans la circulation. Ce processus, très important pour le maintien de l'homéostasie vasculaire, s'articule autour d'une enzyme endogène, la plasmine, dont le rôle est d'hydrolyser la fibrine en fragments. La plasmine est une sérine protéase produite par le foie sous la forme d'une pro-enzyme inactive : le plasminogène (Figure 11; Collen and Lijnen, 1991).

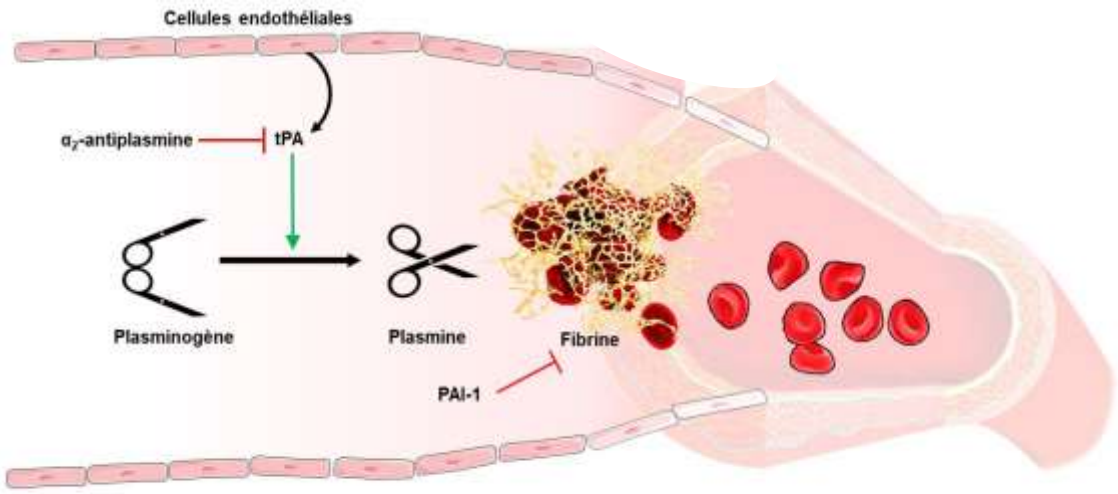


Figure 11 : Mécanisme d'action de la fibrinolyse endogène.
Le tPA est synthétisé et libéré par les cellules endothéliales dans la circulation où il est capable de cliver le plasminogène en plasmine au niveau des caillots de fibrine. La plasmine peut alors dégrader la fibrine et ainsi lyser les caillots. La régulation de la fibrinolyse s'effectue à deux niveaux : grâce à PAI-1 (inhibiteur du tPA) et avec l'α-2 antiplasmine (inhibiteur de la plasmine).

Comme décrit précédemment, il existe deux activateurs du plasminogène présents en condition physiologique chez l'homme: le tPA et l'uPA. Bien qu'ayant des caractéristiques différentes, leurs actions aboutissent toutes les deux à l'activation du plasminogène en plasmine. En absence de cofacteurs, le tPA est un mauvais activateur du plasminogène. Mais, en présence de fibrine, sa

capacité à activer le plasminogène en plasmine est multipliée par cent (Hoylaerts *et al.*, 1982). En effet, la fibrine contient deux sites proches, l'un permettant sa liaison avec le tPA, l'autre permettant sa liaison avec le plasminogène. Les trois acteurs forment ainsi un complexe tertiaire, au sein duquel la capacité du tPA à cliver son ligand est nettement augmentée. Ce complexe permet au tPA d'activer essentiellement le plasminogène présent au niveau du caillot de fibrine, en épargnant celui circulant. Il permet également de protéger la plasmine de ses inhibiteurs, lui permettant ainsi de jouer son rôle dans la fibrinolyse avant qu'elle ne soit inhibée (Chapin and Hajjar, 2015). Il existe deux inhibiteurs de la plasmine : l'α2-antiplasmine et la nexine-1. Ces inhibiteurs permettent la régulation de la fibrinolyse, principalement afin d'éviter une hyperfibrinolyse, qui en plus d'augmenter le risque d'hémorragie, provoque une altération de la BHE. La fibrinolyse peut également être inhibée par la diminution de la quantité de plasmine circulante, et donc par l'inactivation du tPA (Figure 11; Marcos-Contreras *et al.*, 2016; Roullet *et al.*, 2015).

Des formes recombinantes d'activateurs du plasminogène (natives ou modifiées), telles que la ténectéplase et la retéplase, ont été utilisées pour dégrader le(s) caillot(s) des patients atteints de maladies thromboemboliques comme les AVC ischémiques ou les infarctus du myocarde (Figure 12; Thiebaut *et al.*, 2018). Cependant, aujourd'hui, seule l'utilisation du tPA est approuvée pour le traitement des patients ayant subi un AVC ischémique aigu (National Institute of Neurological Disorders and Stroke rt-PA Stroke Study Group, 1995).

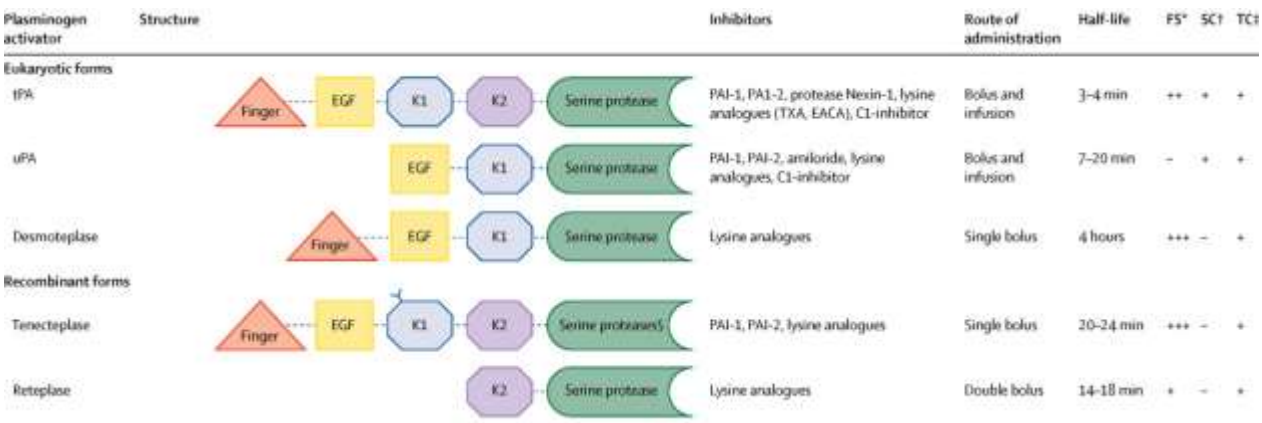


Figure 12 : Les activateurs tissulaires du plasminogène classifiés selon leur forme eucaryote et leur forme recombinante.
Les activateurs du plasminogènes ont des domaines, des inhibiteurs, des temps de demi-vie et des spécificités à la fibrine différents. En conséquence, le mode d'administration est variable. D'après Thiebaut *et al.,* 2018.

b. L'utilisation du tPA comme agent thrombolytique (pour revue Thiebaut *et al.*, 2018)

i. Dans l'AVC hémorragique

L'extension de l'hémorragie aux ventricules se produit dans environ 25% des cas d'hémorragie intracérébrale non traumatique et favorise l'obstruction de la sortie du liquide céphalorachidien (LCR) et, par conséquent, le développement de l'hydrocéphalie (Gaberel *et al.*, 2011). Ainsi, l'administration intraventriculaire d'activateurs du plasminogène pourrait prévenir l'obstruction du flux de LCR et accélérer la clairance du sang intraventriculaire. Dans une étude, 500 patients ont été assignés au hasard à un traitement au tPA ou à la mise en place d'un drain extraventriculaire. Le taux de mortalité était inférieur dans le groupe tPA (18%) par rapport au groupe placebo (29%). Cependant, les patients présentaient un taux d'incapacité plus élevé dans le groupe tPA que dans le groupe placebo. L'élimination plus importante du caillot par voie intraventriculaire a été associée à une amélioration des résultats, mais seuls 82 patients (33%) du groupe tPA ont atteint l'objectif d'une dissolution du caillot de 80 %, réduisant certainement le bénéfice clinique de la thrombolyse intraventriculaire (Figure 13; Hanley *et al.*, 2017).

Finalement, un essai clinique de phase 3 est en cours afin d'étudier l'efficacité de la fibrinolyse intraventriculaire par utilisation du tPA lors d'une hémorragie sous arachnoïdienne (ClinicalTrials.gov, NCT03187405).

ii. Dans l'AVC ischémique

Selon la dernière revue systématique Cochrane, 27 études cliniques ont testé des agents thrombolytiques dans le but de traiter des AVC ischémiques (Wardlaw *et al.*, 2014). Parmi ces agents thrombolytiques, on retrouve : la streptokinase (protéine synthétisée par plusieurs espèces de streptocoques ayant la propriété de se lier au plasminogène humain), le tPA recombinant, la pro-urokinase, l'urokinase et la desmotéplase (protéine issue de la salive de chauves-souris vampires capable d'activer le plasminogène) (Figure 12). Cependant, à l'heure actuelle, seule l'administration de tPA (0,9 mg/kg) par voie intraveineuse (bolus intraveineux puis perfusion sur 30 minutes) est autorisée comme intervention médicamenteuse (National Institute of Neurological Disorders and Stroke rt-PA Stroke Study Group, 1995). Néanmoins les principales limites de l'utilisation du tPA dans les AVC ischémiques sont (Figure 13) :

- ✓ La fenêtre thérapeutique étroite : 4 à 5 heures après le début des symptômes de l'AVC (Hacke *et al.*, 2008).
- ✓ Le faible taux de recanalisation du tPA (Bhatia *et al.*, 2010).
- ✓ Le risque d'hémorragie parenchymateuse symptomatique (National Institute of Neurological Disorders and Stroke rt-PA Stroke Study Group, 1995).

Selon une revue du Calgary Stroke Program, incluant 1341 patients, le taux de recanalisation aiguë dans les 2 heures suivant l'administration du tPA reste faible (moins de 35% des patients avaient une recanalisation aiguë) (Bhatia *et al.*, 2010). L'absence de recanalisation est associée à de nombreux facteurs tels qu'un délai trop long avant le traitement, une faible circulation collatérale ou une taille de thrombus supérieure à 8 mm (Riedel *et al.*, 2011).

La recanalisation aiguë étant un facteur de pronostique majeur, les stratégies thérapeutiques visant à améliorer le taux de recanalisation par thrombolyse intraveineuse constituent un grand intérêt clinique. Il existe différentes stratégies potentielles pour améliorer l'efficacité du tPA :

- ❖ Les stratégies basées sur la prévention de l'inhibition du tPA par des facteurs endogènes et sur l'augmentation de son activité protéolytique Cela a conduit au développement, par bio-ingénierie, de la ténecteplase, un tPA recombinant contenant trois mutations : deux dans le domaine Kringle 2 et une dans de le domaine sérine protéase. La ténectéplase présente une résistance accrue à PAI-1, une meilleure spécificité à la fibrine et une demi-vie plus élevée. L'efficacité de cette molécule est controversée. Une étude a révélé qu'il n'y a aucune différence en termes de mortalité et de récupération fonctionnelle entre les patients traités avec la ténectéplase et les patients traités avec le tPA (Logallo *et al.*, 2017). A contrario, une étude a montré que le taux de reperfusion est plus élevé (22% *versus* 10%) dans le groupe traité avec la ténectéplase par rapport au groupe traité avec le tPA. De plus, les patients ayant reçu la ténectéplase présentent une meilleure récupération fonctionnelle (Campbell *et al.*, 2018).

- ❖ Les stratégies basées sur l'inactivation des inhibiteurs du tPA. Pour accroitre l'efficacité du tPA et favoriser la fibrinolyse, une stratégie propose d'utiliser un « diabody » (un anticorps modifié ciblant deux protéines) afin de bloquer deux inhibiteurs du processus fibrinolytique : PAI-1 et un inhibiteur de la fibrinolyse activable par la thrombine (*thrombin-activatable fibrinolysis inhibitors,*

TAFI) (Wyseure *et al.*, 2015). Dans un modèle murin d'AVC ischémique, la co-administration de ce « diabody » améliore l'efficacité du tPA sans augmenter le risque d'hémorragie (Wyseure *et al.*, 2015). Un essai clinique testant un inhibiteur de TAFI est en cours de réalisation chez des patients qui ne sont pas éligibles à l'administration de tPA (ClinicalTrials.gov, NCT0258623). De nombreuses molécules inhibant PAI-1 ont été décrites, notamment des anticorps, des nanocorps et des petites molécules. Bien que des résultats prometteurs aient été obtenus sur des modèles animaux (Denorme *et al.*, 2016; Vaughan, 2011), aucune molécule inhibant PAI-1 n'a été testée chez des patients ayant subi un AVC ischémique à ce jour.

❖ Les stratégies basées sur la dégradation des autres constituants du thrombus. En effet, la fibrine ne représente qu'une partie du thrombus. De plus, le tPA a peu d'efficacité sur les thrombi riches en plaquettes et cela pourrait empêcher la recanalisation. Cependant, des essais cliniques (Adams *et al.*, 2008; Zinkstok and Roos, 2012) portant sur l'administration concomitante de tPA et d'un médicament antiplaquettaire ont montré une faible efficacité ainsi qu'un risque accru d'hémorragie. Chez l'animal, il a été démontré que l'agrégation plaquettaire dans les artères implique des récepteurs spécifiques ainsi que des protéines, qui ne sont pas indispensables à l'hémostase dans le cerveau, tels que le FVW et la glycoprotéine GpIb-α (Le Behot *et al.*, 2014; Momi *et al.*, 2013). Par conséquent, les stratégies qui ciblent spécifiquement les agrégats plaquettaires peuvent induire une recanalisation artérielle sans augmenter substantiellement le risque de transformation hémorragique (Le Behot *et al.*, 2014). Ainsi, les stratégies pharmacologiques qui ciblent le FVW et ADAMTS-13 (a *desintegrin and metalloproteinase with thrombospondin motifs*) (Denorme *et al.*, 2016) ou l'N-acétylcystéine (Martinez de Lizarrondo *et al.*, 2017) sont également prometteuses, d'autant plus que chez les patients ayant subi un AVC, les thrombi intracrâniens contiennent de grandes quantités de FVW (Le Behot *et al.*, 2014). De surcroît, les faibles concentrations plasmatiques d'ADAMTS-13 pourraient être un marqueur de l'échec d'un traitement avec le tPA (Bustamante *et al.*, 2018).

❖ Les stratégies couplant la thrombolyse intraveineuse et la thrombectomie. La thrombectomie mécanique consiste à retirer le caillot de fibrine en introduisant une sonde dans l'artère. Elle est réalisée chez les patients ayant subi une occlusion dans une grosse artère de la circulation antérieure (Jayaraman *et al.*, 2015). Selon les critères d'éligibilité utilisés, seulement 3% à 22% des patients sont admissibles pour ce traitement endovasculaire. Les principaux critères

d'éligibilité sont la fenêtre thérapeutique, la taille de la lésion, l'âge, la sévérité des symptômes et la localisation anatomique de l'occlusion (Mokin *et al.*, 2018, 2019; Rai *et al.*, 2017). L'étude clinique Mr CLEAN a montré que chez les patients ayant subi un AVC ischémique, causé par l'occlusion d'une artère intracrânienne de gros calibre de la circulation antérieure, une thrombectomie réalisée dans les 6 heures après le début des symptômes, précédée par un traitement au tPA, est plus efficace en termes d'évolution neurologique qu'un traitement pharmacologique seul (Berkhemer *et al.*, 2015). D'autres études cliniques ont conforté cet effet (Campbell *et al.*, 2015; Goyal *et al.*, 2015).

- Les stratégies basées sur la diminution des risques hémorragiques. Une méta-analyse de 27 études, incluant 2039 patients ayant subi un AVC, a révélé que les patients traités par streptokinase, tPA, urokinase ou desmotéplase, développaient quatre fois plus d'hémorragies cérébrales (Wardlaw, 2001) que les patients n'ayant reçu aucun traitement. Les hémorragies intracérébrales symptomatiques sont considérées comme la complication la plus sévère d'un traitement thrombolytique, avec une plus forte incidence dans les premières 24 heures et un taux de mortalité supérieure à 50% (Yaghi *et al.*, 2017). Contrairement au tPA, la ténectéplase ne change pas l'incidence des hémorragies intracérébrales (Campbell *et al.*, 2018). Une étude internationale a évalué l'incidence d'hémorragie intracérébrale symptomatique et l'évolution clinique chez 3297 patients, essentiellement asiatiques, ayant subi un AVC et ayant été traités avec une dose faible (0,6 mg/kg) ou une dose standard (0,9 mg/kg) de tPA. Cette étude a mis en évidence une différence de transformation hémorragique entre le groupe recevant une dose faible (1,0%) et le groupe recevant la dose standard (2,1%), indiquant alors que la prévalence de la transformation hémorragique est associée à la dose de tPA (Anderson *et al.*, 2016). En revanche, selon une méta-analyse de grande envergure, le délai de traitement n'est significativement pas associé au risque de transformation hémorragique (Demchuk *et al.*, 2012). Par ailleurs, l'étude TARGET-STROKE, impliquant 71 169 patients victimes d'un AVC ischémique aigu traité par injection intraveineuse de tPA, montre qu'une réduction du délai de traitement entraîne une baisse de la prévalence de la transformation hémorragique (Fonarow *et al.*, 2014).

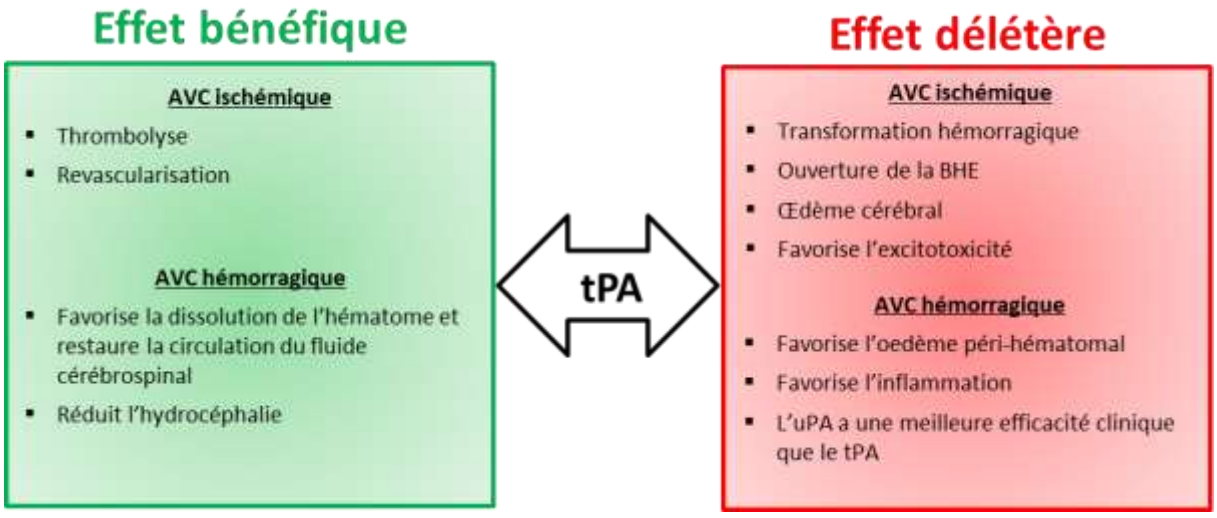


Figure 13 : Effet du tPA dans l'AVC ischémique et dans l'AVC hémorragique.
D'après Thiebaut *et al.,* 2018.

c. Le tPA et la barrière hémato-encéphalique

La transformation hémorragique après l'administration de tPA est un phénomène dynamique et sa physiopathologie reste incertaine. Cependant, des études sur des animaux ont montré que le tPA augmente la perméabilité de la BHE par le biais de multiples mécanismes et que ce phénomène serait impliqué dans les transformations hémorragiques.

Le tPA, *via* son domaine Finger, peut interagir avec les récepteurs LRP situés au niveau des astrocytes périvasculaires. Ce mécanisme mène au passage du tPA vasculaire vers le parenchyme et au décrochage des pieds astrocytaires de la lame basale. S'ensuit l'ouverture de la BHE. Ce phénomène participe à l'augmentation des risques hémorragiques (Benchenane *et al.*, 2005; Polavarapu *et al.*, 2007; Yepes *et al.*, 2003).

Avec son domaine Kringle 2 et son domaine catalytique, le tPA est capable d'interagir et d'activer le PDGF-CC. Le PDGF-CC active ensuite les récepteurs PDGF-α situés sur les péricytes et les astrocytes, conduisant à une altération de la BHE (Fredriksson *et al.*, 2004; Su *et al.*, 2008).

Les MMPs, dont le rôle est de dégrader la matrice extracellulaire, sont également à l'origine de l'ouverture de la BHE. Le tPA est capable d'activer MMP-9, 2 et 3, fragilisant les jonctions serrées et altérant la lame basale des vaisseaux cérébraux (Lijnen, 2001; Suzuki *et al.*, 2009). Une étude a

démontré, *in vitro* et *in vivo*, que le tPA active MMP-3 dans les cellules endothéliales, dépendamment de LRP et du facteur nucléaire kappa B (NF-κB) (Suzuki *et al.*, 2009). De plus, des études cliniques ont révélé qu'il existe une corrélation entre les taux plasmatiques de MMP-9 et le risque de transformations hémorragiques (Montaner *et al.*, 2001).

2. Le rôle du tPA dans le système nerveux central

Comme décrit précédemment, le tPA est exprimé par différentes cellules du SNC et est retrouvé dans différentes régions cérébrales. C'est une protéine pléiotrope capable d'interagir avec de multiples protéines et récepteurs à travers ses cinq domaines, induisant de nombreux effets aussi bien délétères que bénéfiques. De plus, sa forme simple chaîne et sa forme double chaîne ont parfois des rôles distincts dans le SNC, comme décrit ci-dessous.

a. Le tPA et modulation glutamatergique

Le glutamate est le principal neurotransmetteur excitateur du cerveau. Ainsi, à la majorité des synapses excitatrices, le glutamate diffuse dans la fente synaptique après sa libération vésiculaire par le neurone présynaptique *via* un mécanisme dépendant des ions calcium (Birnbaumer *et al.*, 1994). Lors de l'activité neuronale, il a été montré que la dépolarisation des neurones glutamatergiques provoque, en plus de la libération du glutamate dans la synapse, une exocytose de tPA (Gualandris *et al.*, 1996). Il existe deux grandes classes de récepteurs au glutamate : les récepteurs métabotropiques du glutamate (mGluR) couplés à des protéines G et les récepteurs ionotropiques parmi lesquels on retrouve les récepteurs NMDA, Kaïnate et AMPA.

Le glutamate est impliqué dans la migration et la différentiation neuronale au cours du développement cérébral ainsi que dans de nombreuses fonctions cérébrales telles que la mémoire et l'apprentissage. Cependant, le glutamate peut aussi induire une mort de type excitotoxique et être impliqué dans des processus de neurodégénération. En effet, lorsqu'il est en excès, il est responsable d'une activation trop importante des récepteurs NMDA et d'une entrée délétère de calcium dans les neurones. Le glutamate joue un rôle dans de nombreuses maladies du SNC telles que l'épilepsie, la maladie de Huntington, la maladie d'Alzheimer, la maladie de Parkinson, les traumas crâniens ou encore l'AVC (Lewerenz and Maher, 2015).

En 2001, une étude menée au laboratoire a montré que le tPA est capable de cliver le fragment N-terminal de la sous-unité GluN1 des récepteurs NMDA. Ce clivage, en présence de NMDA, induit une potentialisation de l'influx calcique (Nicole *et al.*, 2001). Quelques années plus tard, il a été mis en évidence que ce mécanisme nécessitait l'interaction du domaine Kringle 2 du tPA avec la sous-unité GluN1 (Lopez-Atalaya *et al.*, 2008). Parcq et collaborateurs ont montré que seul le sc-tPA (Parcq *et al.*, 2012) est capable d'induire ce clivage se situant au niveau de l'Arg^{260} (Fernández-Monreal *et al.*, 2004). De plus, le tPA clive préférentiellement les récepteurs NMDA contenant la sous-unité GluN2D (Obiang *et al.*, 2012).

L'activation du récepteur NMDA par le tPA conduit à l'induction de processus physiologiques comme la mémoire et l'apprentissage (Benchenane *et al.*, 2007; Obiang *et al.*, 2012) mais également à des processus pathologiques tels que l'excitotoxicité, la mort neuronale et l'épilepsie (Bertrand *et al.*, 2015; Nicole *et al.*, 2001; Parcq *et al.*, 2012; Qian *et al.*, 1993). En 1998, une équipe a montré que suite à une ischémie provoquée par une occlusion de l'ACM, les souris déficientes en tPA ont un volume de lésion 50% moins important que les souris sauvages. À l'inverse, une injection intraveineuse de tPA induisait une augmentation du volume de lésion (Wang *et al.*, 1998).

La capacité du tPA à cliver la sous-unité GluN1 des récepteurs NMDA n'est pas le seul mécanisme impliqué dans le rôle pro-excitotoxique du tPA (Figure 14; Parcq *et al.*, 2012). En effet, le tPA est capable d'activer la microglie et cette dernière participerait, par la suite, à la mort neuronale de type excitotoxique (Rogove and Tsirka, 1998). Le tPA pourrait également induire cet effet, *via* sa capacité à activer le plasminogène (Tsirka *et al.*, 1997). De plus, une étude réalisée au sein du laboratoire a montré que le tPA est capable d'induire un effet pro-excitotoxique en se liant à l'extrémité N-terminal (*distal N-terminal domain*, NTD) de la sous-unité GluN1 des récepteurs NMDA, au niveau de la $lysine^{178}$. Cette interaction est responsable, dans un premier temps, de l'augmentation de la dynamique des récepteurs NMDA extrasynaptiques à la membrane plasmatique et dans un second temps, d'un influx calcique délétère (Lesept *et al.*, 2016). L'utilisation d'un anticorps (Glunomab) dirigé contre la NTD des sous-unités GluN1 bloque l'effet pro-excitotoxique du tPA (Lesept *et al.*, 2016; Macrez *et al.*, 2016) sans affecter l'effet basal des récepteurs NMDA. Finalement, Samson et collaborateurs ont démontré que l'activation des récepteurs NMDA par le tPA peut aussi se faire de manière indirecte, celle-ci dépendrait de l'interaction entre le tPA et les récepteurs LRP présents sur les neurones (Figure 14; Samson *et al.*, 2008).

Une étude réalisée en 2013 par Wu et collaborateurs, a montré que le tPA peut diminuer la mort de type excitotoxique *in vitro* et *in vivo*. Ce mécanisme, indépendant de l'activité enzymatique du tPA, fait intervenir les récepteurs NMDA extra-synaptiques contenant la sous-unité Glun2A. Ces récepteurs sont responsables de l'activation la voie Erk1/2-CREB-ATF3 (*extracellular signal-regulated kinases* 1/2 - cAMP *response element binding protein* - *activating transcription factor* 3) (Wu *et al.*, 2013). De plus, à l'inverse des études montrant un effet neurotoxique du tPA, celles réalisées chez l'animal indiquent que le tPA favorise l'adaptation au stress métabolique (Wu *et al.*, 2012), promeut les mécanismes gérant la transmission synaptique excitatrice et inhibitrice (Jeanneret *et al.*, 2016) et protège la densité post-synaptique des effets délétères des lésions ischémiques (Jeanneret *et al.*, 2018).

Plus récemment, il a été démontré que le tPA module la protéostasie durant l'ischémie cérébrale. En effet, une étude *in vivo* a montré que le co-traitement avec un inhibiteur du protéasome renforce les effets bénéfiques du tPA (Zhang *et al.*, 2010). De plus, selon une étude *in vitro* réalisée au laboratoire, l'inhibition du stress du RE grâce à l'interaction du tPA avec Grp78 (*glucose-related protein* 78) membranaire, protège les neurones de la mort induite par un sevrage en oxygène et en glucose (OGD) (Louessard *et al.*, 2017). En outre, il a été montré que le tPA a également un effet neuroprotecteur *via* l'activation de la cible mammalienne de la rapamycine (*mammalian target of rapamycin*, mTOR), un inhibiteur de l'autophagie (Figure 14; Grummisch *et al.*, 2016; Wu *et al.*, 2012).

Les effets opposés du tPA sur la mort de type excitotoxique pourraient être expliqués par différents facteurs : le type de neurones étudiés, le modèle de mort ou la dose de tPA (Thiebaut *et al.*, 2018). De plus, il semblerait que le sc-tPA et le tc-tPA aient des effets opposés, le sc-tPA serait plutôt pro-excitotoxique alors que le tc-tPA, *via* son interaction avec le récepteur à l'EGF, diminuerait l'influx calcique dans les neurones et jouerait un rôle neuroprotecteur (Figure 14; Bertrand *et al.*, 2015; Parcq *et al.*, 2012).

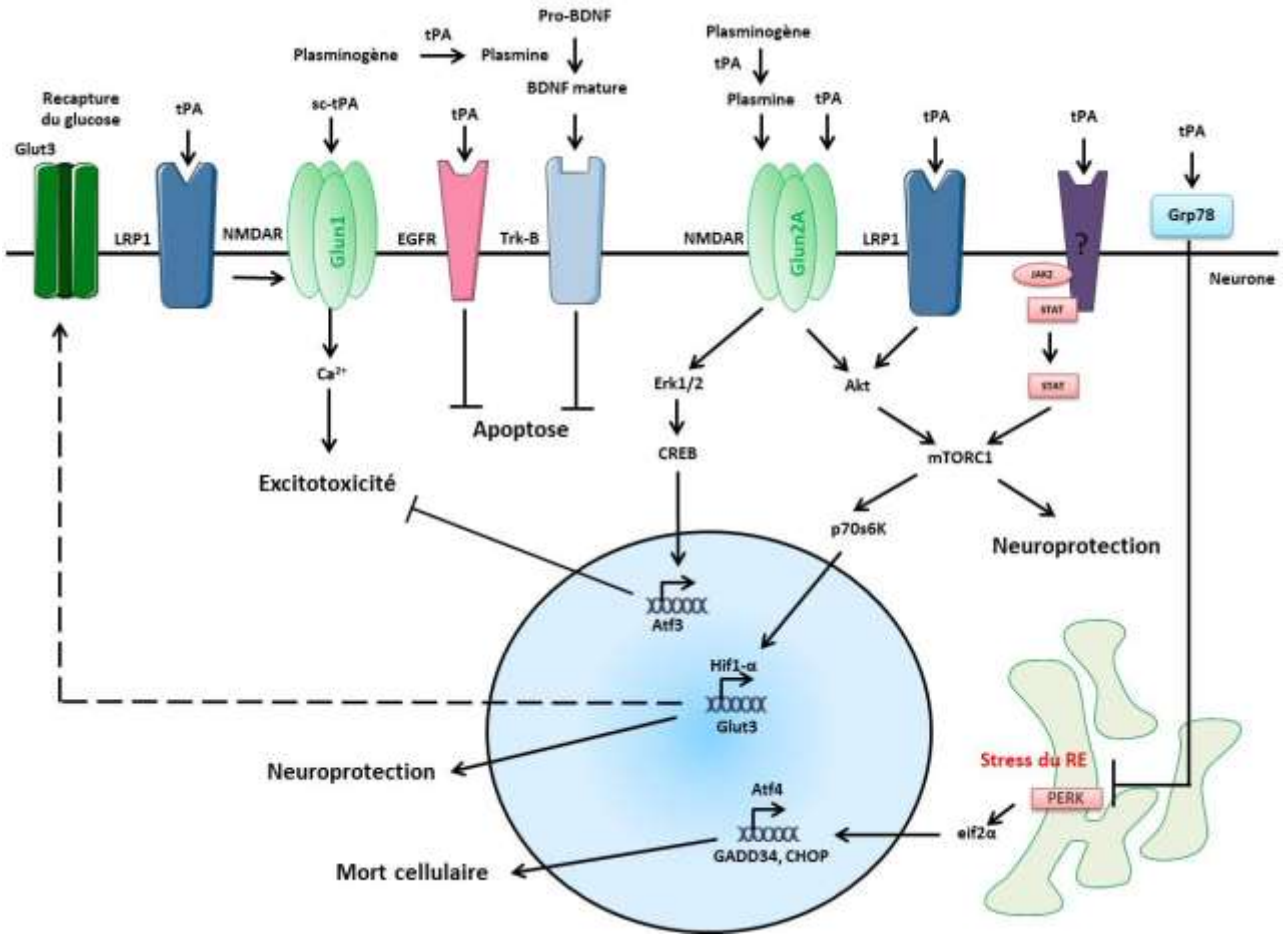


Figure 14 : Rôle du tPA dans l'excitotoxicité, la mort neuronale et la neuroprotection.
Le tPA peut induire un influx calcique et une mort de type excitotoxique, soit directement *via* son interaction avec la sous-unité GluN1 des récepteurs NMDA (N-méthyl-D-aspartate), soit indirectement *via* son interaction avec les récepteurs LRP1 (*low-density lipoprotein receptor–related protein)*, qui vont à leur tour activer les récepteurs NMDA.
A contrario, le tPA peut protéger les neurones de la mort, *via* les récepteurs NMDA contenant la sous-unité GluN2A et LRP1. Cet effet fait intervenir la voie Erk/CREB/Atf3 (*extracellular signal-regulated kinases* 1/2/cAMP *response element binding protein/activating transcription factor* 3) et la voie Akt/mTORC1/p70S6K (mammalian target of rapamycin/*ribosomal protein* S6 *kinase*). p70S6k favorise l'augmentation de HIF1-α (*hypoxia inducible factor*-1α) et la recapture du glucose *via* Glut3. tPA peut également activer la voie mTOR *via* le mécanisme JAK/STAT (*janus kinase/signal transducers and activators of transcription*). Le tPA peut interagir avec Grp78 (*glucose-related protein*) afin de diminuer le stress du RE et la mort neuronale induite par une OGD (*oxygen and glucose deprivation*). Le tPA peut également avoir un rôle anti-apoptotique de façon directe, *via* les récepteurs à l'EGF *(epidermal growth factor*) ou de façon indirecte *via* les récepteurs Trk-B (*tropomyosin receptor kinase* B). D'après Thiebaut *et al.,* 2018.

b. Le tPA dans le développement cérébral

Le développement cérébral s'articule autour d'un enchaînement complexe 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. La mise en place du réseau de connexions entre les neurones nécessite la dégradation de la matrice extracellulaire par diverses protéines telles que les MMPs, les désintégrines et certaines sérines protéases (Nadarajah *et al.*, 2002; Stiles and Jernigan, 2010; van den Ameele *et al.*, 2014). Une étude effectuée chez des souris à différents stades du développement embryonnaire a montré que le tPA est exprimé par un certain nombre de types cellulaires dans le SNC en développement, avec une forte expression dans les zones de migration neuronale et de remodelage tissulaire. Ce résultat suggère que le tPA est impliqué dans la migration cellulaire et dans le remodelage tissulaire du SNC en développement, en jouant un rôle dans la dégradation de la matrice extracellulaire (Fredriksson *et al.*, 2004).

En 1999, Seeds et collaborateurs ont montré que des souris déficientes en tPA présentent une migration neuronale retardée, se traduisant par une accumulation des cellules granulaires au sein de la couche moléculaire du cervelet (Figure 15; Seeds *et al.*, 1999). Plus récemment, deux études réalisées au sein du laboratoire ont montré l'implication du tPA dans la migration cellulaire au cours du développement embryonnaire. La première étude menée par Leonetti et collaborateurs a démontré que le tPA joue un rôle dans la migration des progéniteurs d'oligodendrocytes au cours du développement (Leonetti *et al.*, 2017). La seconde étude conduite par Pasquet et collaborateurs a permis de montrer qu'une absence de tPA conduit à un arrêt de la migration des neurones corticaux, au niveau de la zone intermédiaire, à 16 jours de développement embryonnaire. Dans cette étude, l'effet du tPA sur la corticogénèse est dépendant des récepteurs NMDA présents sur les cellules gliales radiaires (Pasquet *et al.*, 2019).

Le tPA est sécrété et retrouvé au niveau des cônes de croissance (Krystosek and Seeds, 1981; Verrall and Seeds, 1989). Localement, il peut activer le plasminogène et, à l'aide de la plasmine nouvellement formée et des MMPs, il peut dégrader la matrice extracellulaire et induire une pousse neuritique (García-Rocha *et al.*, 1994; Pittman *et al.*, 1989). L'inhibition du tPA ou l'absence de tPA induisent un blocage de pousse neuritique (Lee *et al.*, 2014; Pittman *et al.*, 1989). À l'inverse, la

surexpression de tPA promeut l'élongation des neurites (Lee *et al.*, 2007; Pittman *et al.*, 1989) *via* les récepteurs LRP (Lee *et al.*, 2014).

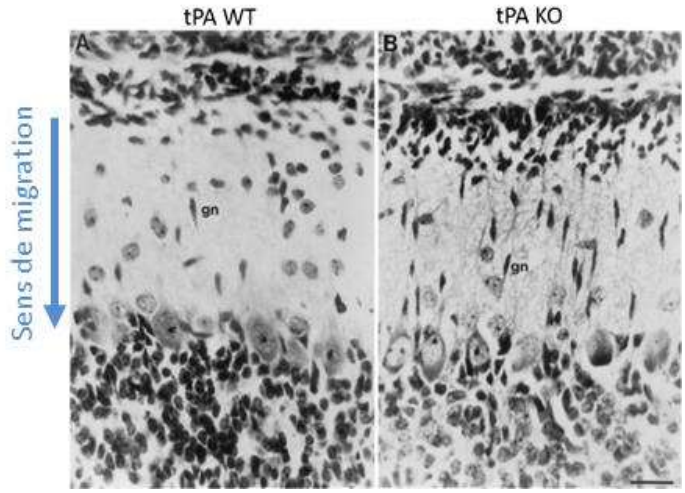


Figure 15 : Effet de l'absence du tPA sur la migration neuronale.
Microphotographies montrant l'accumulation des cellules granulaires dans la couche moléculaire du cervelet de souris (P10) déficientes en tPA (*knock-out*, KO) par rapport aux souris sauvages (*wildtype*, WT). D'après Seeds *et al.,* 1999.

c. Le tPA et la plasticité synaptique

L'amygdale et l'hippocampe sont deux régions qui jouent un rôle très important dans les processus d'apprentissage et de mémoire. Le mécanisme moléculaire principal impliqué dans ces processus est la LTP, caractérisée par une augmentation plus ou moins persistante de l'efficacité de la transmission synaptique après une stimulation excitatrice répétée (Nabavi *et al.*, 2014). Ce phénomène a été observé dans d'autres régions du cerveau comme le cortex moteur (Iriki *et al.*, 1989), l'amygdale et le striatum (Uno and Ozawa, 1991).

Le système glutamatergique joue un rôle central dans ce processus. Suite à une stimulation à haute fréquence, le neurone présynaptique libère une grande quantité de glutamate, qui va en retour activer les récepteurs glutamatergiques postsynaptiques. Les récepteurs AMPA sont les premiers activés, induisant une dépolarisation locale. Cette dépolarisation induit l'expulsion des ions magnésiums bloquant le canal des récepteurs NMDA, qui s'activent à leur tour, engendrant une entrée de potassium et de calcium dans les neurones postsynaptiques. Ce calcium induit des cascades moléculaires responsables du renforcement synaptique. La LTP se divise en deux phases. La phase précoce qui dure quelques heures et implique des mécanismes enzymatiques modulant l'efficacité synaptique. La phase tardive, qui persiste plusieurs jours et contribue à l'amélioration de

l'efficacité synaptique en se reposant sur la synthèse de protéines *de novo* (Bliss and Lomo, 1973; Collingridge *et al.*, 1983; Nicoll, 2017).

De manière intéressante, en condition physiologique, le tPA est fortement exprimé dans l'amygdale et l'hippocampe (Sappino *et al.*, 1993; Teesalu *et al.*, 2004). En 1993, Qian et collaborateurs ont mis en évidence une implication du tPA dans l'activation des neurones hippocampiques. En effet, une activation des neurones hippocampiques conduit à une augmentation rapide des ARNm codant le tPA (Figure 16; Qian *et al.*, 1993). Des études *in vitro* ont montré que l'utilisation d'un inhibiteur du tPA (PAI-1 ou tPA-stop) affecte la mise en place de la phase tardive de la LTP alors que l'ajout de tPA promeut ce processus (Baranes *et al.*, 1998). Les mêmes résultats ont été retrouvés chez des souris déficientes en tPA ou surexprimant le tPA. Ainsi, une surexpression *in vivo* du tPA, contribue à une augmentation de la LTP et à une amélioration des processus d'apprentissage et de mémorisation (Madani *et al.*, 1999). À l'inverse, les souris n'exprimant pas le tPA ont des déficits de mémorisation (Pawlak *et al.*, 2002).

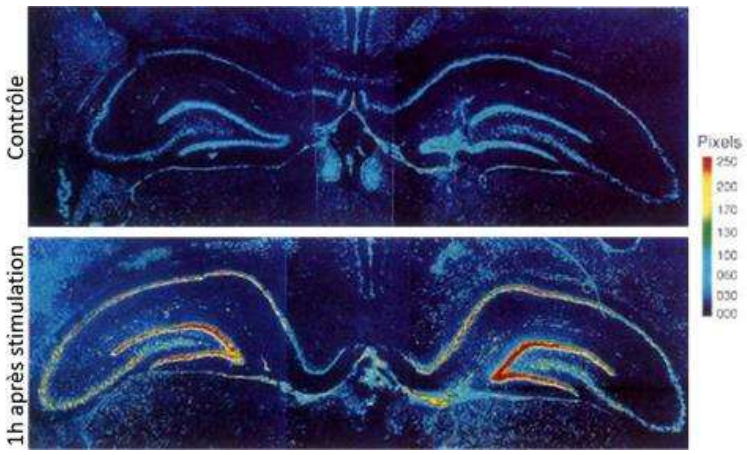


Figure 16 : Élévation de la quantité d'ARN messagers du tPA suite à une activation neuronale chez le rat. Hybridation *in situ* des ARNm du tPA dans l'hippocampe de rat en condition normale et 1h après stimulation électrique du gyrus denté. Qian et *al.*, 1993.

Il est important de noter qu'il existe un rôle différentiel du tPA sur la LTP en fonction de sa forme. En effet, une étude réalisée au sein du laboratoire a montré que seul le sc-tPA serait capable de moduler la LTP (Parcq *et al.*, 2012).

Il existe plusieurs mécanismes pouvant expliquer le rôle du tPA dans la LTP :

- ✓ Par son interaction avec les récepteurs NMDA (Qian *et al.*, 1993).

- ✓ Par son interaction avec les récepteurs LRP, ce qui pourrait faciliter la pousse neuritique et la formation de nouvelles synapses (Lee *et al.*, 2014; Zhuo *et al.*, 2000).
- ✓ Par la dégradation de la matrice extracellulaire, ce qui faciliterait la création de nouvelles synapses (Baranes *et al.*, 1998).
- ✓ Par sa capacité à activer le facteur neurotrophique issu du cerveau (*Brain derived neurotrophic factor,* BDNF) essentiel à la LTP (Pang *et al.*, 2004).
- ✓ Par sa capacité à cliver la réeline, une protéine importante dans la régulation des fonctions synaptiques (Trotter *et al.*, 2013).

d. Le tPA et l'apoptose

Le tPA joue un rôle dans l'apoptose des neurones et des oligodendrocytes. Quelques études prêtent un rôle pro-apoptotique au tPA. Par exemple, Flavin et collaborateurs ont montré *in vitro* que la microglie activée était capable de sécréter du tPA et que ce tPA était pro-apototique pour les neurones hippocampiques (Flavin *et al.*, 2000). D'autre part, une autre étude a révélé que le tPA potentialise l'apoptose dans les cellules endothéliales cérébrales humaines soumises à une hypoxie ainsi que dans les neurones corticaux de souris traitées avec du NMDA (Liu *et al.*, 2004).

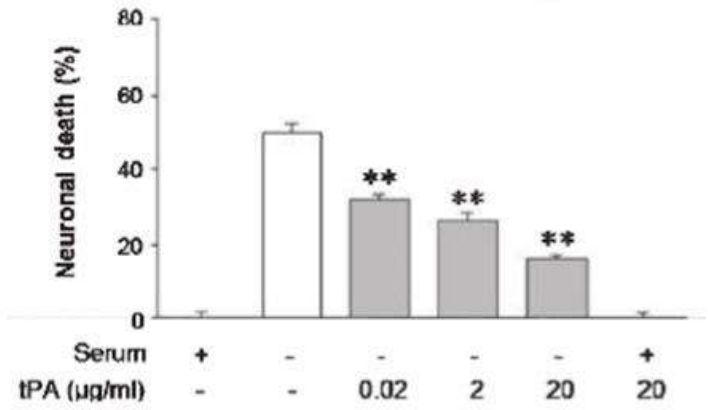


Figure 17 : Le tPA protège les neurones de l'apoptose induite par un sevrage en sérum.
Dose réponse de tPA sur des neurones corticaux âgés de 7 jours et mesure de la mort neuronale après un sevrage en sérum de 24 heures (Liot *et al.,* 2006).

Cependant, d'autres études reportent un effet anti-apoptotique du tPA dans différents modèles animaux. En 2006, une étude réalisée au sein du laboratoire a montré, *in vitro*, que le tPA protégeait les neurones corticaux de l'apoptose induite par un sevrage en sérum. Cet effet se traduit par une réduction de l'activité de la caspase 3, acteur majeur de la cascade apoptotique. Dans cette étude,

le tPA active la voie pro-survie phosphatidylinositol-3-Kinase (PI3K), indépendamment de son activité protéolytique (Figure 17; Liot *et al.*, 2006). De la même manière, le tPA active l'axe PI3K/Akt afin de protéger les oligodendrocytes de l'apoptose. Cet effet est dépendant de l'interaction du domaine EGF du tPA avec les récepteurs à l'EGF (Correa *et al.*, 2011).

Il semblerait que plusieurs récepteurs soient impliqués dans le rôle anti-apoptotique du tPA. En effet, certaines études démontrent l'implication de l'annexine II (Lee *et al.*, 2007), des récepteurs NMDA contenant la sous-unité GluN2A (Echeverry *et al.*, 2010), et du récepteur à l'EGF (Bertrand *et al.*, 2015; Henry *et al.*, 2013; Lemarchand *et al.*, 2016). Le tPA est aussi capable de cliver le plasminogène en plasmine, qui va à son tour cliver le pro-BDNF en BDNF mature, ce qui engendre une activation du récepteur Kinase à la tropomyosine B (*Tropomyosin receptor kinase* B, Trk-B) et une diminution de l'apoptose (Figure 14; Head *et al.*, 2009).

e. Le tPA et l'inflammation

Lors d'une lésion excitotoxique, les souris déficientes en tPA, en plus d'avoir une mort neuronale réduite, ont une activation microgliale diminuée (Figure 18; Rogove *et al.*, 1999). Depuis, d'autres études ont confirmé l'implication du tPA dans l'inflammation. Par ailleurs, il semblerait que le tPA agisse en deux temps.

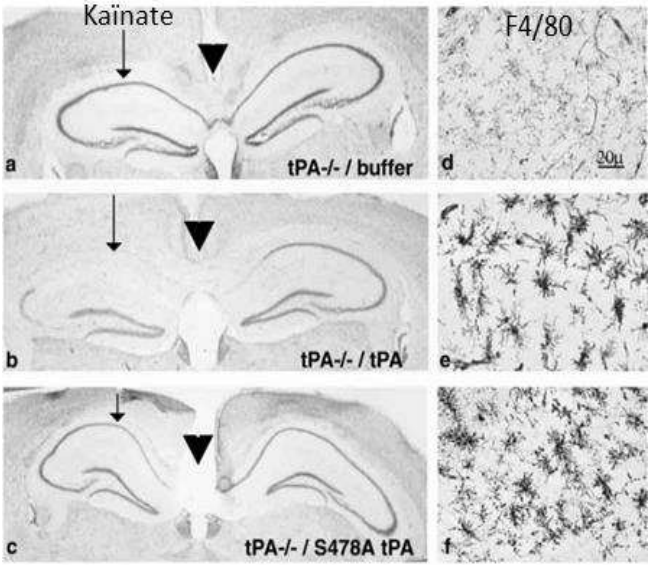


Figure 18 : Effets du tPA actif et inactif (S478A tPA) sur la mort neuronale induite par une injection de kaïnate dans l'hippocampe et sur l'activation microgliale.
(a) L'injection intra-hippocampique de kaïnate n'a pas d'effet sur la mort neuronale chez les souris déficientes en tPA (tPA -/-) et n'induit pas d'activation microgliale (d). L'injection de tPA et de kaïnate, chez des souris déficientes en tPA, induit une mort neuronale hippocampique (b) et une activation des cellules microgliales (e). L'injection de tPA inactif (S478A tPA) et de kaïnate chez des souris déficientes en tPA n'entraîne pas de mort neuronale hippocampique (c) mais engendre une activation des cellules microgliales (f). Rogove *et al.,* 1999.

Dans un premier temps, lors d'une lésion excitotoxique, le tPA est sécrété par les neurones et la microglie présents au niveau de la lésion cérébrale. Puis, grâce à la liaison de son domaine Finger sur l'annexine II, le tPA agit comme une cytokine et active la microglie (Flavin *et al.*, 2000; Siao *et al.*, 2003; Siao and Tsirka, 2002). Dans un second temps, cette microglie activée libère différents facteurs, parmi lesquels on retrouve des cytokines pro-inflammatoires mais également du tPA, impliqués dans des processus neurodégénératifs et dans la dégradation de la matrice extracellulaire (Siao *et al.*, 2003).

Une étude réalisée en 2009 propose que l'effet du tPA dans l'inflammation passe par son interaction avec les récepteurs LRP. En effet, suite à une ischémie cérébrale induite par une occlusion de l'ACM, des souris ne possédant pas de récepteurs LRP sur leurs cellules microgliales, ont un œdème cérébral réduit et une élévation du taux de MMP-9 moins importante. L'injection de tPA chez ces souris n'induit aucune augmentation de l'activation microgliale en comparaison à des souris sauvages (Zhang *et al.*, 2009).

f. Le tPA et les processus cognitifs

Comme nous l'avons vu précédemment, le tPA est impliqué dans la plasticité synaptique. Ce rôle lui confère une influence dans plusieurs types de comportements impliquant la mémoire (Calabresi *et al.*, 2000). Une absence de tPA chez la souris induit une altération des capacités d'apprentissage spatial (Benchenane *et al.*, 2007; Calabresi *et al.*, 2000). L'interaction entre le tPA et le récepteur NMDA dans l'hippocampe et le cortex entorhinal est nécessaire pour promouvoir l'apprentissage spatial (Benchenane *et al.*, 2007; Hébert *et al.*, 2016; Obiang *et al.*, 2012).

L'amygdale est connue pour jouer un rôle clé dans l'anxiété, la réponse au stress et la peur. Dans cette région, le tPA est impliqué dans le développement de l'anxiété suite à un stress, en favorisant le remodelage synaptique (Pawlak *et al.*, 2003) et en favorisant l'effet du facteur de libération de corticotrophines (*corticotropin-releasing factor*, CRF), un modulateur majeur du stress (Matys *et al.*, 2004). Dans la même structure, le tPA semble être crucial pour l'apprentissage et le rappel de la peur contextuelle (Calabresi *et al.*, 2000). Finalement, les souris déficientes en tPA ont un phénotype plus anxieux que les souris sauvages (Pawlak *et al.*, 2003).

g. Le tPA et la substance blanche

Dans le cadre de lésions de la substance blanche, le tPA est impliqué dans les processus de remyélinisation et de régénération axonale. En effet, dans un contexte inflammatoire, des dépôts de fibrine se forment au niveau des lésions aggravant la réponse inflammatoire et accentuant la dégénération axonale. Le tPA, par son action fibrinolytique, est capable de réduire les dépôts de fibrine, ce qui, en conséquence, réduit les dommages axonaux (Akassoglou *et al.*, 2000). A contrario, Minor et collaborateurs ont montré que la régénération axonale par le tPA est indépendante de sa capacité à cliver le plasminogène (Minor *et al.*, 2009).

Dans des conditions neuro-inflammatoires, comme lors de la sclérose en plaques, une diminution de tPA est accompagnée d'une augmentation de PAI-1, ce qui engendre, entre autres, l'augmentation de complexe tPA-PAI-1. De ce fait, l'efficacité du tPA à générer de la plasmine est réduite et le retrait des dépôts de fibrine est altéré conduisant à des dommages axonaux (Gveric *et al.*, 2003, 2005). Dans des modèles animaux de sclérose en plaques, les souris déficientes en tPA ont une plus grande accumulation de fibrine engendrant des symptômes de la maladie plus sévères ainsi qu'une récupération incomplète (East *et al.*, 2005). À l'inverse, dans le même modèle, l'inhibition de PAI-1 conduit à une diminution de la dégénération axonale et à une réduction de la démyélinisation (Pelisch *et al.*, 2015). Le tPA a également la capacité de promouvoir la migration et la survie des oligodendrocytes en cas de lésion de la substance blanche, *via* son domaine EGF (Correa *et al.*, 2011; Leonetti *et al.*, 2017).

Après une lésion de la moelle épinière, l'expression du tPA est augmentée. Ce dernier serait impliqué dans la dégradation des chondroitines sulphate protéoglycanes (CSPGs), des protéines de la matrice extracellulaire ayant un rôle inhibiteur sur la repousse axonale (Bukhari *et al.*, 2011). Une étude réalisée au sein du laboratoire a permis de démontrer que le tPA est capable d'activer ADAMTS-4, une protéase capable de dégrader les CSPGs afin d'améliorer la repousse axonale et la récupération fonctionnelle après un traumatisme de la moelle épinière (Lemarchant *et al.*, 2014). En condition physiologique, l'expression d'ADAMTS-4 par les oligodendrocytes contribue également au processus de myélinisation et aux capacités motrices (Pruvost *et al.*, 2017).

Pour résumer cette deuxième partie, le tPA est une sérine protéase aux multiples fonctions. À travers ses cinq domaines, le tPA peut interagir avec de nombreuses protéines/récepteurs et induire de nombreux effets en condition physiologique mais aussi en condition pathologique. Le tPA existe sous une forme simple-chaîne et sous une forme double-chaîne, ces deux formes sont enzymatiquement actives et ont parfois des rôles opposés.

Initialement, le tPA a été découvert dans le compartiment vasculaire. Synthétisé par les cellules endothéliales, il intervient dans la fibrinolyse grâce à sa capacité à cliver le plasminogène en plasmine. Cette propriété fait de lui un agent thrombolytique utilisé, entre autres, dans le traitement de l'AVC ischémique.

Le tPA est aussi synthétisé par les cellules du parenchyme cérébral. Dans le SNC, il est impliqué dans de nombreuses fonctions aussi bien bénéfiques (développement, apprentissage, mémoire…) que délétères (altération de la BHE, mort excitotoxique…).

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

To summarize the second part, tPA is a serine protease with multiple functions. Through its five domains, tPA can interact with many proteins to induce various effects in both physiological and pathological conditions. tPA exists under a single-chain form which can be cleave into a double-chain form. These two forms are enzymatically actives and can have opposite effects.

Initially, tPA was discovered in the vascular compartment. Synthesized by endothelial cells, it is involved in fibrinolysis due to its ability to cleave plasminogen into plasmin. This property has led to its use as a thrombolytic agent for the treatment of ischemic stroke.

tPA is also synthesized by brain parenchymal cells. In the CNS, it is involved in many beneficial functions (development, learning, memory ...) and many deleterious functions (alteration of the BBB, excitotoxic death ...).

At the neuronal level, tPA is considered as a glutamatergic neuromodulator. It is expressed and released by neurons following depolarization. Once in the synaptic cleft, it interacts with postsynaptic receptors (NMDA, EGFR, LRP) and can also be recaptured by astrocytes.

C. L'autophagie

I. Généralités

Historiquement, la découverte de l'autophagie débute avec celle du lysosome. Durant les années 1950, grâce à la séparation des différents compartiments cellulaires par une méthode de centrifugation, Christian de Duve démontre l'existence du lysosome et de sa fonction lytique permettant la dégradation intracellulaire des protéines (De Duve, 1957; De Duve and Wattiaux, 1966; Novikoff *et al.*, 1956). Pour cette découverte, il recevra, en 1974, le Prix Nobel de médecine. En 1962, Keith Porter, pionner de la microscopie électronique, et son étudiant Thomas Ashford observent dans des cellules hépatiques exposées au glucagon, une augmentation du nombre de lysosomes, ainsi qu'une séquestration de fragments cytoplasmiques en leur sein (Ashford and Porter, 1962). Le glucagon sera décrit plus tard comme étant un inducteur de l'autophagie (Deter and De Duve, 1967). Dans la continuité, De Duve observe, en microscopie électronique, un nouveau type de vésicule contenant des éléments du cytoplasme ainsi que des mitochondries à différents stades de digestion, laissant présager la contribution, dans la dégradation intracellulaire, d'un autre type de vésicule : l'autophagosome (De Duve, 1967).

En 1963, lors d'une conférence sur le lysosome, De Duve emploie pour la première fois le mot « autophagie ». Ce terme vient du grec et signifie se manger soi-même (« *phagos* » : manger ; « *auto* » : soi-même). Il décrit l'autophagie comme un processus aboutissant à la dégradation par le lysosome de constituants cellulaires (organites et macromolécules). Au milieu des années 1990, la découverte des gènes *ATG* (*autophagy-related genes*), chez la levure *Saccharomyces cerevisiae* a permis de mieux comprendre le fonctionnement et le rôle de l'autophagie (Klionsky *et al.*, 2003; Tsukada and Ohsumi, 1993). Les études ont permis d'identifier jusqu'alors, 41 gènes *ATG* chez la levure, et plusieurs d'entre eux ont un ou plusieurs homologues chez le mammifère. En outre, chez les mammifères, 16 gènes *ATG* sont conservés, et ces derniers régissent la formation des autophagosomes chez tous les eucaryotes (Klionsky *et al.*, 2016).

Aujourd'hui, l'autophagie est décrite comme un processus catabolique par lequel la cellule dégrade et recycle son matériel cytoplasmique, permettant le maintien de l'homéostasie. Les produits de la

dégradation lysosomale sont nécessaires à la synthèse de nouvelles macromolécules. La voie autophagique, impliquée dans la dégradation des protéines mal repliées, des organites endommagés et des protéines à longue durée de vie, est complémentaire à la voie du protéasome dont le rôle est de dégrader les protéines à demi-vie courte. En fonction du mode par lequel les éléments à dégrader vont être livrés au lysosome, on distingue trois formes d'autophagie (Figure 19) : la micro-autophagie, l'autophagie dépendante des protéines chaperonnes et la macro-autophagie (Klionsky *et al.*, 2016).

II. Les différentes formes d'autophagie

1. La micro-autophagie

La micro-autophagie est un processus de dégradation lysosomale non sélectif, décrit comme "l'engouffrement direct du matériel cytoplasmique dans le lysosome". Cette forme d'autophagie est induite en condition de stress, lors d'une hypoxie par exemple, et se traduit par une invagination aléatoire de la membrane afin de piéger des parties du cytosol et différents organites tels que les peroxysomes, les mitochondries et le noyau (Farré *et al.*, 2009). La micro-autophagie est connue pour jouer plusieurs rôles, tels que la régulation du ratio lipides/protéines à la surface lysosomale, le maintien de la taille des organites, la composition de la membrane et le métabolisme des lipides. Elle peut se produire simultanément avec la macro-autophagie ou simplement être une méthode constitutive pour dégrader les protéines à longue durée de vie et les protéines membranaires (Farré *et al.*, 2009; Li *et al.*, 2012; Mijaljica *et al.*, 2011).

2. L'autophagie dépendante des protéines chaperonnes (CMA)

La CMA (*chaperone-mediated autophagy*) est une forme sélective d'autophagie décrite uniquement chez les eucaryotes. Elle permet de délivrer les protéines au lysosome sans passer par l'intermédiaire de vésicules. Tous les substrats protéiques de la CMA possèdent un motif peptidique « KFERQ » spécifiquement reconnu par la chaperonne Hsc70 (*Heat Shock cognate protein* 70) (Chiang *et al.*, 1989). La chaperonne Hsc70 et le substrat vont se lier et former un complexe, permettant l'acheminement du substrat jusqu'au lysosome où il va être adressé à une protéine lysosomale transmembranaire LAMP-2A (*lysosome-associated membrane protein type* 2A). Sous sa

forme monomérique, LAMP-2A joue le rôle d'un récepteur aux substrats de la CMA. En revanche, son oligomérisation est requise pour la translocation des substrats dans la lumière du lysosome. Les substrats sont transférés un par un dans le lysosome, assistés par une chaperonne située dans la lumière lysosomale. La CMA contribue au contrôle de la qualité des protéines par l'élimination sélective des protéines altérées ou endommagées (Tekirdag and Cuervo, 2018).

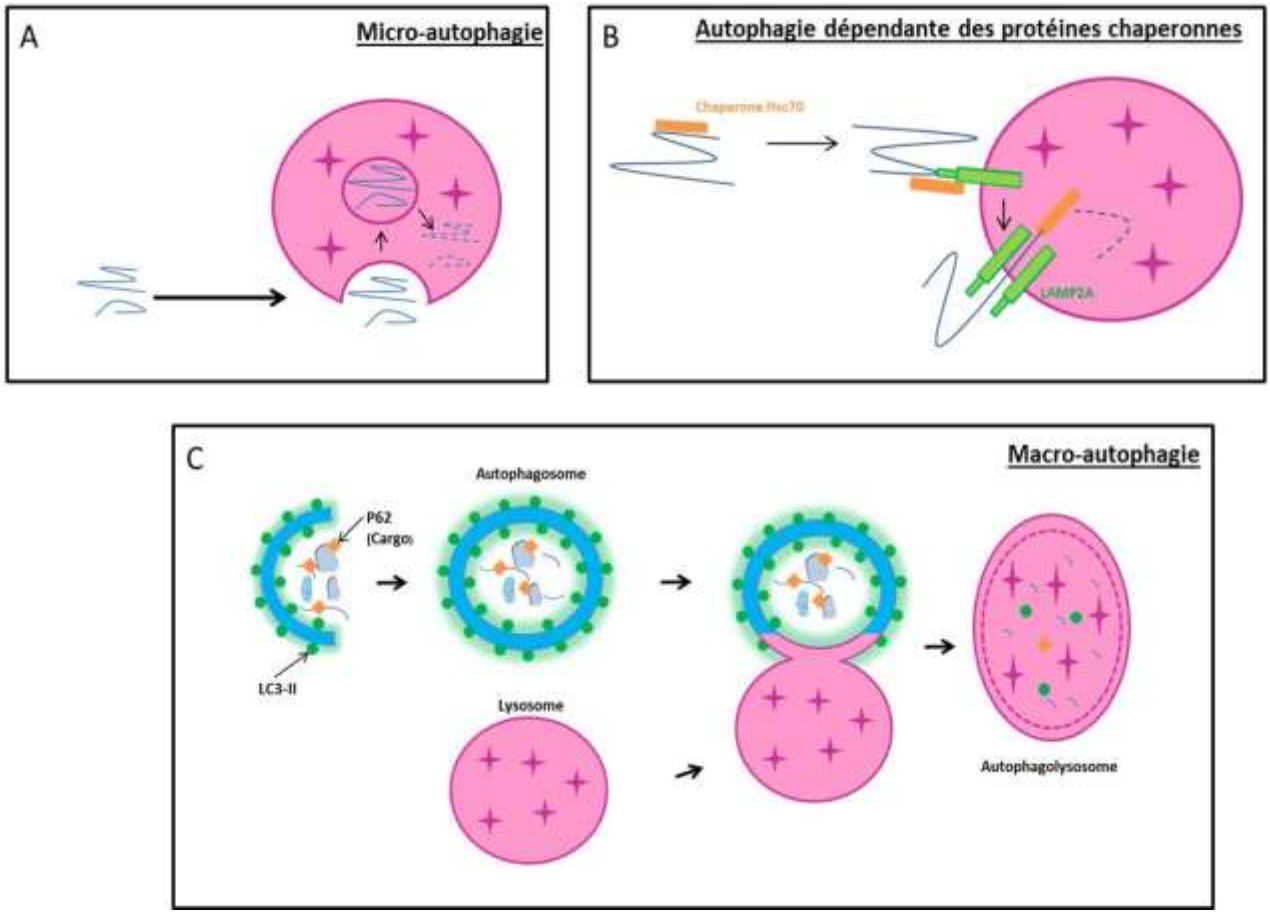


Figure 19 : Les trois types d'autophagie.

Il existe trois types d'autophagie, elles sont classées en fonction du mode par lequel les éléments cellulaires vont être délivrés à l'autophagosome afin d'y être dégradés par les hydrolases. **A.** La micro-autophagie : les protéines pénètrent dans le lysosome *via* une invagination de la membrane. **B.** L'autophagie dépendante des protéines chaperonnes : les protéines sont reconnues, grâce à un motif spécifique, par la chaperonne Hsc70, cette dernière permettra sa liaison à LAMP2 et sa translocation dans le lysosome. **C.** La macro-autophagie : un autophagosome, une vésicule à double membrane, emmagasine l'ensemble des éléments à dégrader avant de fusionner avec le lysosome. D'après Thiebaut *et al.,* 2019.

3. La macro-autophagie

La macro-autophagie est la forme d'autophagie la plus connue et la plus décrite dans la littérature. De manière générale, la macro-autophagie est communément appelé autophagie et c'est ainsi qu'elle sera nommée dans la suite du manuscrit. Contrairement à la micro-autophagie et à la CMA, l'autophagie permet la séquestration des substrats loin du lysosome. Cela nécessite la synthèse d'un autophagosome, une vésicule à double membrane, permettant le transport d'organites, de complexes protéiques de grande taille et de demi-vie longue, ainsi que d'acides nucléiques présents dans le cytoplasme. Les autophagosomes fusionnent ensuite avec les lysosomes pour former des autolysosomes, entraînant la dégradation simultanée d'un très grand nombre de composants cellulaires. Le matériel dégradé par les hydrolases lysosomales est ensuite libéré dans le cytoplasme afin de permettre la formation de nouvelles molécules (Feng *et al.*, 2014).

III. Les mécanismes moléculaires de l'autophagie

L'autophagie est un processus dynamique très conservé au cours de l'évolution, orchestré et régulé par les gènes *ATG* répartis en plusieurs complexes de signalisation. L'autophagie est divisée en plusieurs grandes étapes (Figure 19). Tout d'abord, une double membrane, nommée phagophore (ou membrane d'isolation) se forme : c'est l'initiation. Le phagophore va ensuite s'allonger, durant l'étape d'élongation pour former un autophagosome dans lequel seront séquestrés des éléments du cytoplasme. Finalement, l'autophagosome va fusionner avec le lysosome. Cette dernière étape, appelée la maturation, conduit à la formation d'un autolysosome (ou autophagolysosome) dans lequel le matériel séquestré sera dégradé par les hydrolases lysosomales, puis recyclé (Klionsky *et al.*, 2016).

1. L'initiation

a. Origine du phagophore

L'autophagie débute avec la formation d'un phagophore, une double membrane très riche en phosphatidylinositol-3-phosphate (PI3P). Chez la levure, les phagophores dérivent d'une membrane unique appelée le PAS (*pre-autophagosomal structure*) (Suzuki *et al.*, 2001). Bien que l'autophagie

ait été découverte depuis plus de 50 ans, l'origine de la membrane du phagophore chez les mammifères est encore sujette à débat. Toutefois, il semblerait que cette membrane ne soit pas synthétisée *de novo* mais provienne plutôt d'organites préexistants et que le processus de nucléation fasse intervenir des protéines Atg. Plusieurs compartiments intracellulaires ont été identifiés comme étant des donneurs de membrane, ce qui supporte l'hypothèse d'une origine multiple.

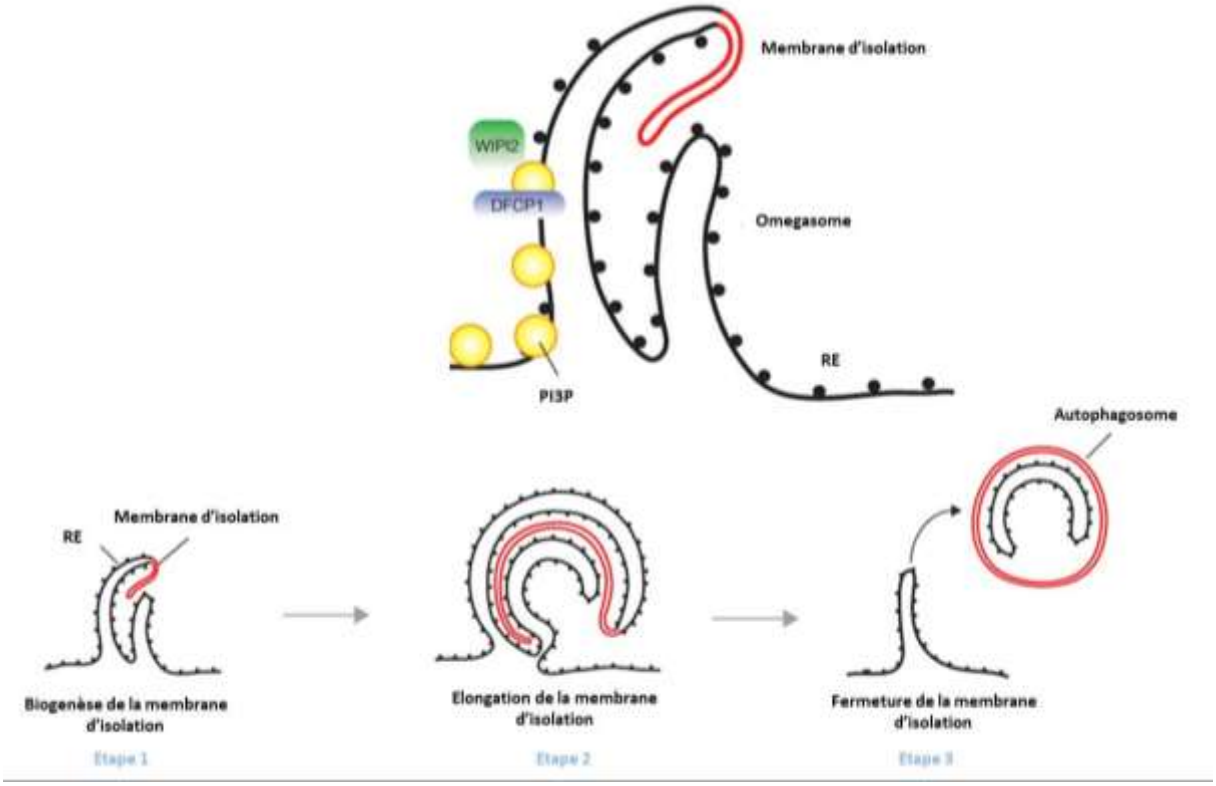


Figure 20 : Modèle de formation de l'autophagosome à partir de la membrane du RE.
Suite à une carence en acide aminés, des PI3P sont libérés en abondance au niveau de sites spécifiques de la membrane du RE appelés omégasomes. Suite au recrutement de WIPI2 (WD-*repeated protein interacting with phosphoinositides)* et DFCP1 (*double* FYVE *domain-containing protein*), l'omégasome s'étend et devient berceau de la formation du phagophore, ou membrane d'isolement (en rouge). Le phagophore s'allonge et se ferme sur lui- même pour former l'autophagosome, qui se détache de l'omégasome. D'après Tooze et Yoshimori, 2010.

❖ Le réticulum endoplasmique : La membrane du phagophore peut dériver d'une région particulière du RE riche en PI3P, ayant une forme proche de la lettre grecque « Ω » : l'omégasome. Axe et collaborateurs ont démontré que suite à une carence en acides aminés, un enrichissement localisé en PI3P a lieu, conduisant à une étendue de la membrane du RE pour former l'omégasome

(Axe *et al.*, 2008). Cette « plateforme PI3P » est le lieu de naissance de la membrane d'isolation. PI3P recrute la protéine DFCP1 (*double* FYVE *domain-containing protein* 1) et WIPI2 (WD-*repeated protein interacting with phosphoinositides*), grâce à son domaine FYVE, ce qui permet à la membrane d'isolation de s'étendre et de former le phagophore (Figure 20; Axe *et al.*, 2008; Polson *et al.*, 2010). Des observations en microscopie électronique ont montré des interactions entre le RE, les omégasomes et les phagophores (Hayashi-Nishino *et al.*, 2009; Ylä-Anttila *et al.*, 2009).

- La mitochondrie : L'autophagosome pourrait aussi se former le long de la mitochondrie. En effet, il a été démontré que certaines protéines autophagiques, Atg5 et LC3 (*Light chain* 3), co-localisent de manière transitoire avec des protéines de la membrane externe de la mitochondrie. De plus, il a été observé que des lipides fluorescents marquant spécifiquement les mitochondries étaient transloqués de la mitochondrie aux autophagosomes (Hailey *et al.*, 2010). Par ailleurs, il semblerait que les phagophores se forment au niveau des sites de contact RE-mitochondries, et cet effet serait dépendant du recrutement de la protéine Atg14 par la protéine SNARE (*soluble N-éthylmaleimide-sensitive-factor attachment protein receptor*) syntaxine 17 (STX17) (Hamasaki *et al.*, 2013).

- La membrane plasmique et les endosomes : L'équipe de Rubinsztein a démontré que la membrane plasmique peut participer à la biogenèse des phagophores *via* un mécanisme d'endocytose dépendant des clathrines (protéine structurelle constituant le manteau des vésicules). L'interaction de la protéine Atg16L1 avec la clathrine, génère une vésicule appelée « le précurseur autophagique » qui précède la formation du phagophore (Ravikumar *et al.*, 2010). Les endosomes, notamment les endosomes de recyclage, participent également à la formation du phagophore. La protéine Atg9 semble assurer le transport et la connexion entre les endosomes, l'appareil de Golgi et la membrane plasmique (K. Imai *et al.*, 2016; Puri *et al.*, 2014). Puri et collaborateurs ont noté que la membrane plasmique contribuait à la formation des phagophores par l'intermédiaire d'au moins 2 protéines Atg distinctes, Atg9 (qui est transloquée de la membrane plasmique aux endosomes de recyclage *via* des endosomes précoces) et Atg16L1 (qui est directement transportée de la membrane plasmique aux endosomes de recyclage). La fusion des vésicules contenant Atg9 et des vésicules contenant Atg16L1, grâce à une SNARE nommée VAMP3 (*vesicle associated membrane protein*), est cruciale pour la biogenèse des « précurseurs autophagiques » (Figure 21; Puri *et al.*, 2013).

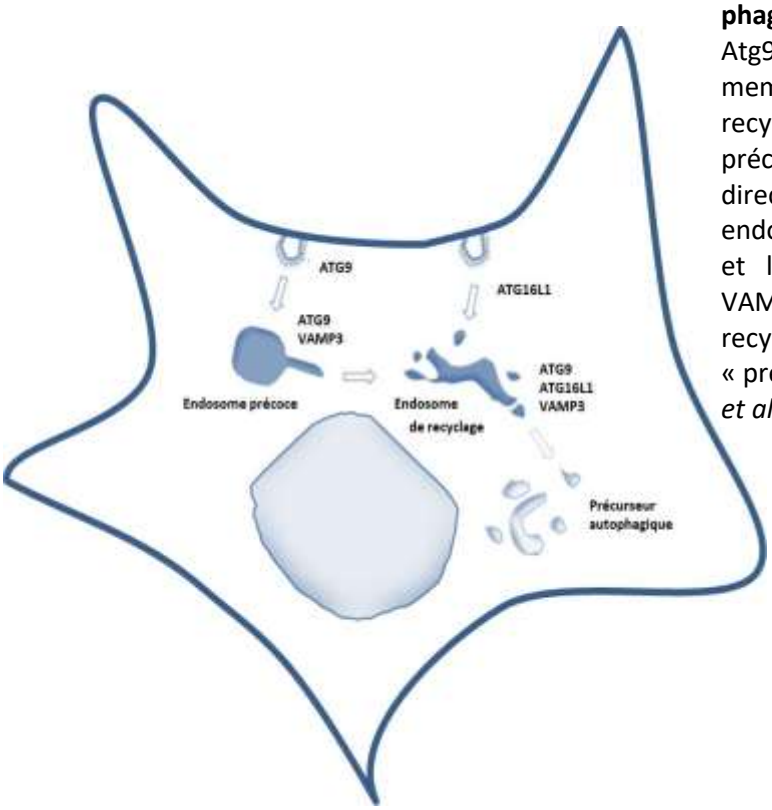


Figure 21 : Schéma de la nucléation du phagophore *via* Atg9 et Atg16L1.
Atg9 est transloquée, par endocytose, de la membrane plasmique aux endosomes de recyclage en passant par les endosomes précoces. Contrairement à Atg9, Atg16L1 est directement transportée dans les endosomes de recyclage. Les vésicules Atg9 et les vésicules Atg16L1 fusionnent, *via* VAMP3, au niveau des endosomes de recyclage, ce qui induit la genèse du « précurseur autophagique ». D'après *Puri et al.,* 2014.

❖ L'appareil de Golgi : L'appareil de Golgi, ainsi que le compartiment intermédiaire entre le RE et l'appareil de Golgi, sont une source pour la nucléation du phagophore (Ge *et al.*, 2013). En 2015, Biazik et collaborateurs ont mis en évidence une communication étroite entre le phagophore et l'appareil de Golgi (Biazik *et al.*, 2015). De plus, il a été montré qu'Atg9 effectuait des cycles entre le réseau trans-golgien et les endosomes (Figure 22; Imai *et al.*, 2016; Young *et al.*, 2006). Finalement, Yamamoto et collaborateurs ont montré que des vésicules contenant Atg9 sont transportées de l'appareil de Golgi à la membrane d'isolation où elles participent à la formation du phagophore (Figure 22; Imai *et al.*, 2016; Orsi *et al.*, 2012; Yamamoto *et al.*, 2012).

Comme nous avons pu le voir, la formation du phagophore s'articule autour de la protéine Atg9, la seule protéine transmembranaire de la machinerie de l'autophagie. Le rôle de cette protéine est peu connu, cependant, il semble qu'elle joue un rôle clé dans l'apport des membranes pour la formation des phagophores (Feng and Klionsky, 2017; Yamamoto *et al.*, 2012). En effet, au-delà du fait que les levures et les souris n'exprimant pas Atg9 soient déficientes en autophagie (Saitoh *et al.*, 2009; Yamamoto *et al.*, 2012), la suppression d'Atg9 dans des cellules humaines (cellules rénales

embryonnaires humaines, HEK) inhibe la formation des phagophores à des stades précoces de l'autophagie (Orsi *et al.*, 2012). De plus, Orsi et collaborateurs ont montré que le trafic d'Atg9, par l'intermédiaire de plusieurs organites, y compris l'appareil de Golgi et les endosomes recyclés, est essentiel à l'initiation et à la progression de l'autophagie. Cependant, plutôt que d'agir comme un composant structurel de l'autophagosome, Atg9 participe à la formation du phagophore (Figure 22; Orsi *et al.*, 2012). Récemment, il a été démontré que ce mécanisme nécessite la phosphorylation d'Atg9, au niveau de son domaine N-terminal (Tyr^{8}), par la Kinase src. Cette phosphorylation favorise l'interaction d'Atg9 avec le complexe AP1/2 5 (*adaptator protein*) et conduit à son déplacement dans la cellule. La kinase src pourrait être activée par les récepteurs à l'EGF (Zhou *et al.*, 2017).

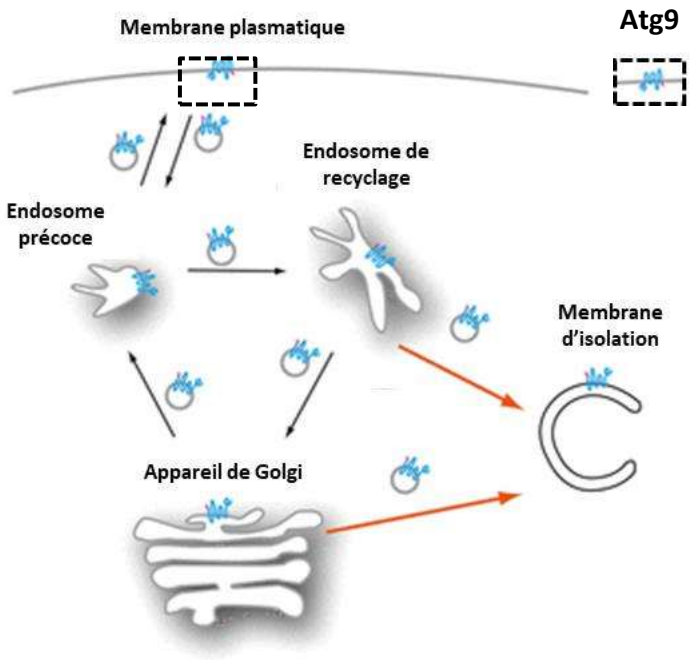


Figure 22 : Atg9 participe à la connexion entre la membrane plasmique, les endosomes et l'appareil de Golgi afin d'induire la formation du phagophore.

À des stades précoces du processus d'autophagie, Atg9, à travers un transport vésiculaire, fait des cycles entre la membrane plasmique, les endosomes et l'appareil de Golgi. Puis, Atg9 se retrouve au niveau de la membrane d'isolation où elle participe à la nucléation du phagophore. D'après Imai *et al.,* 2016.

b. Les complexes initiateurs de l'autophagie

L'initiation de l'autophagie requière un grand nombre d'acteurs regroupés en trois complexes qui interagissent entre eux afin de former le phagophore :

- Le complexe mTORC1 (mTOR *complex* 1) formé des sous-unités suivantes : la kinase mTOR, Raptor (*regulatory associated protein of* mTOR), mLST8 (mTOR *associated protein* LTS8 *homolog*), Deptor (DEP *domain-containing* mTOR-*interacting protei*n) et de PRAS40 (*proline-rich* Akt *substrate of* 40 kDa), ce dernier étant le régulateur négatif du complexe.

- Le complexe ULK1 (UNC-51-*Like Kinases*) composé des protéines ULK1/2 (homologue d'Atg1), Atg13, FIP200 (f*ocal adhesion kinase family interacting protein of* 200 kDa) et ATG101.

- Le complexe PI3K de classe III (PI3KC3) constitué de VPS34 (*vacuolar protein sorting* 34), VPS15, Beclin-1 (nommé Atg6 chez la levure), Atg14, p150 et d'Ambra1 (*activating molecule in beclin1 related autophagy protein* 1).

La voie mTORC1 (Figure 23) régule de nombreuses fonctions cellulaires fondamentales comme la synthèse de protéines et de lipides, mais aussi l'activité mitochondriale et l'organisation du cytosquelette. Au niveau cellulaire, mTOR forme deux types de complexes distincts : mTORC1 et mTORC2. L'activité de mTORC1 est modulée principalement par des récepteurs tyrosine kinase et par la disponibilité en nutriments et en acides aminés, l'état énergétique de la cellule et par les facteurs de croissance (Ma and Blenis, 2009). mTORC1 fait partie de la voie PI3K/Akt. L'activation de PI3K mène à l'accumulation au niveau de la membrane plasmique de phosphatidylinositol-3,4,5-triphosphate (PIP3), phospholipide participant au recrutement et l'activation d'Akt. Une fois activé, Akt phosphoryle et inhibe l'activité TSC2 (*tuberous sclerosis complex* 2), un régulateur négatif de mTORC1, permettant l'activation de mTORC1 par Rheb. Akt peut également activer directement mTORC1 en phosphorylant PRAS40 (Huang and Manning, 2009). En outre de la voie PI3K/Akt, mTORC1 peut être régulé par :

- ✓ Les kinases Erk qui l'activent en inhibant TSC2 (Carrière *et al.*, 2008).
- ✓ Les acides aminés qui l'activent indépendamment du complexe TSC1/2. En conséquence, lors d'une baisse d'apport énergétique, l'activité de mTORC1 est diminuée (Hara *et al.*, 1998; Wolfson and Sabatini, 2017).

- ✓ L'AMPK (AMP-*activated protein kinase*) qui est activée lorsque les niveaux énergétiques de la cellule sont insuffisants. C'est en phosphorylant TSC2 et Raptor, que l'AMPK diminue l'activité de mTORC1 (Egan *et al.*, 2011).

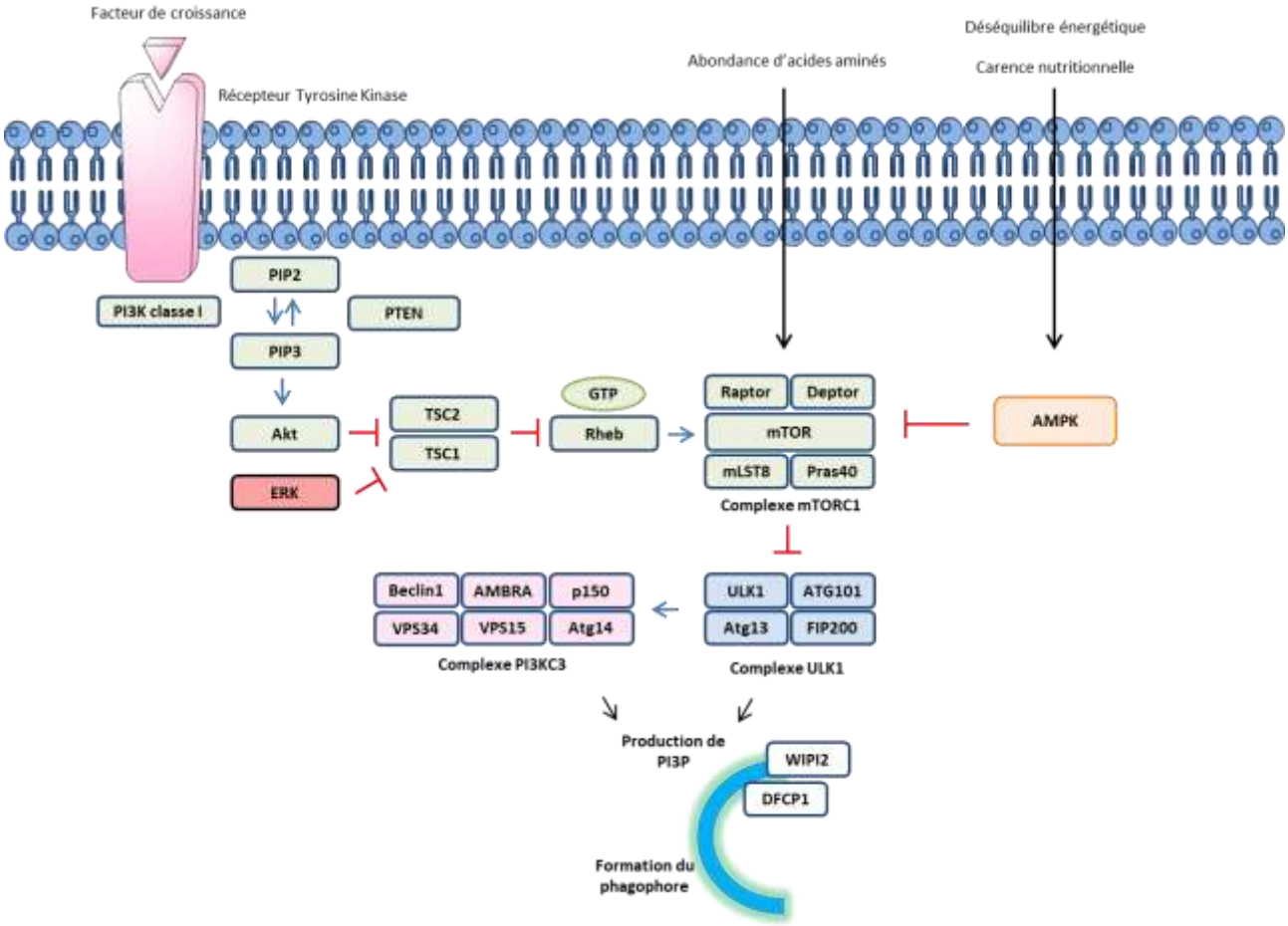


Figure 23 : Schéma des voies moléculaires impliquées dans l'initiation de l'autophagie.
Le complexe mTORC1 peut être activé par des facteurs de croissance *via* des récepteurs tyrosine kinase activant les PI3K de classe I. Ces derniers induisent la production de PIP3, des activateurs d'Akt. Lorsqu'Akt est phosphorylé, il peut inhiber TSC1/2. Le complexe ne pourra plus empêcher Rheb d'activer le complexe mTORC1. Erk peut agir comme Akt et inhiber TSC1/2. AMPK, activée en cas de déséquilibre ou de carence énergétiques inhibe mTORC1. L'inactivation de mTORC1 conduit à l'activation des complexes ULK1 et PI3KC3, impliqués dans la production de PI3P. Ce lipide est essentiel au recrutement de WIPI2 et DFCP1 et à la formation du phagophore.

Le complexe mTORC1 agit comme un senseur clé du statut énergétique de la cellule et permet la régulation des voies de l'autophagie. En condition physiologique, ce premier complexe interagit avec **le complexe ULK1** et inhibe son activité kinase, en phosphorylant les protéines ULK1/2 et Atg13. A contrario, lors d'une carence nutritionnelle, mTOR est inhibé, ce qui entraîne sa dissociation du complexe ULK1 et la déphosphorylation des protéines ULK1/2 et Atg13. L'activité kinase d'ULK1/2 est alors restaurée, permettant son autophosphorylation et la phosphorylation d'Atg13 et FIP200 (Figure 24; Egan *et al.*, 2011; Jung *et al.*, 2009; Kim *et al.*, 2011).

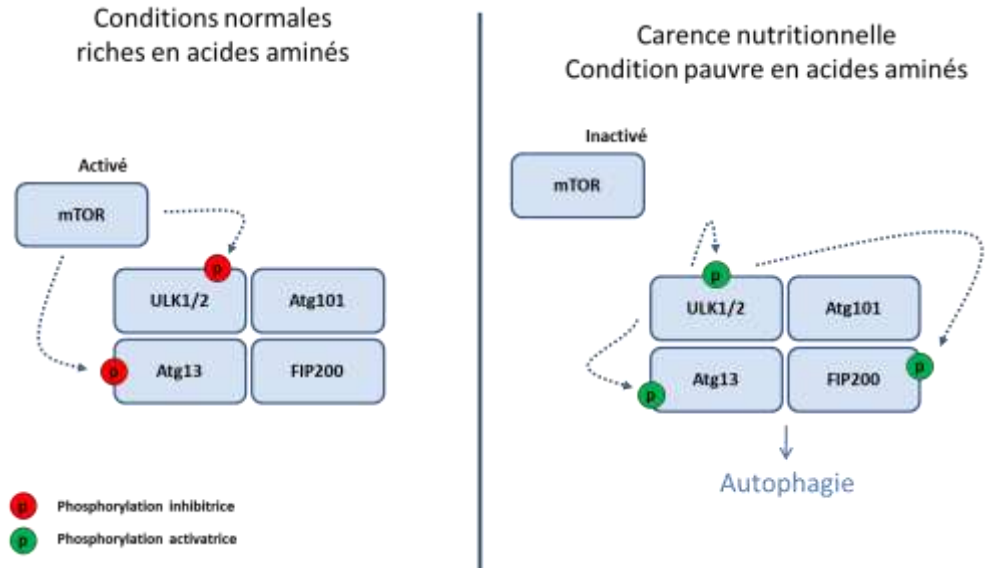


Figure 24 : Régulation du complexe ULK1 par mTOR.
En présence de nutriments, mTOR est activé et phosphoryle ULK1/2 et Atg13, inactivant ainsi leur activité kinase : l'autophagie est inhibée. En cas de carence en acides aminés, mTOR est inactivé et ne peut plus phosphoryler les protéines du complexe ULK1. En conséquence, ULK1/2 s'autophosphoryle et phosphoryle en retour Atg13 et FIP200 : l'autophagie est induite.

Le complexe ULK1 activé migre jusqu'au phagophore, où il active **le complexe PI3KC3**. Il a été montré que suite à une carence en acides aminés induisant l'inhibition de mTORC1, ULK1 est capable de phosphoryler directement Beclin-1 au niveau de la Ser^{14}. Cette phosphorylation conduit à l'augmentation de l'activité du complexe PI3KC3 (Russell *et al.*, 2013). Une étude plus récente a mis en évidence un autre site de phosphorylation sur Beclin1: la Ser^{30} (J.-M. Park *et al.*, 2018). Le complexe ULK1 est également capable de phosphoryler la protéine Ambra1, un des composants du complexe PI3KC3. Cette phosphorylation est indispensable à l'interaction entre Ambra1 et Beclin1 et

permet la libération du complexe PI3KC3 du moteur dynéine (Cianfanelli *et al.*, 2015; Nazio *et al.*, 2013). En 2001, l'équipe de Yoshimori a reporté que la phosphorylation de Beclin1 favorisait l'activité kinase de VSP34, induisant la libération de PI3P au niveau de site de formation du phagophore (Kihara *et al.*, 2001). Comme nous l'avons vu précédemment, cette molécule lipidique est essentielle à la formation des autophagosomes. En effet, elle permet le recrutement des protéines DFCP1 et WIPI2 et l'élongation de la membrane d'isolation (Figue 23 et 25; Axe *et al.*, 2008; Polson *et al.*, 2010).

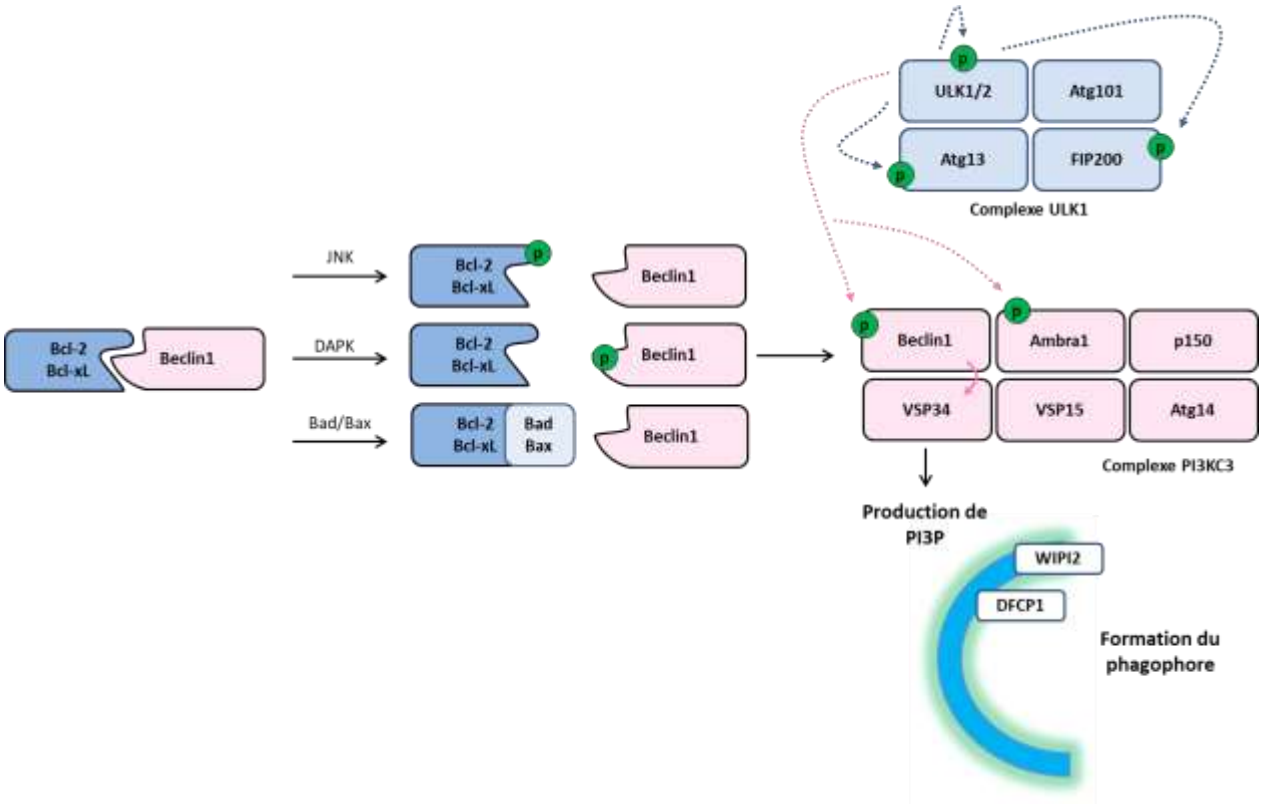


Figure 25 : Régulation et rôle du complexe PI3K de classe III.
Le complexe ULK1 activé phosphoryle Beclin1 et Ambra1. Cette dernière phosphorylation permet la stabilisation du complexe PI3KC3. La phosphorylation de Beclin1 favorise l'activité kinase de VSP34 induisant la production de PI3P. PI3P recrute WIPI2 et DFCP1 permettant la formation du phagophore. Beclin1 est aussi régulée *via* sa liaison à Bcl2 et à Bcl-xL, deux protéines anti-apoptotiques. Lorsque Beclin1 est lié à Bcl2/Bcl-xL, elle ne peut participer au processus de l'autophagie. La dissociation du complexe Bcl-2/Bcl-xL/Beclin1 peut être induite par JNK, DAPK et Bad/Bax. Une fois dissociée, Beclin1 peut être phosphorylé par ULK1/2 et participer à la formation du phagophore.

Par ailleurs, l'induction de l'autophagie *via* Beclin1 est également régulée négativement par Bcl-2 et Bcl-XL (B-*cell lymphoma-extra large*) (Figure 25). Au niveau basal, Beclin1 interagit avec le domaine

BH3 de la protéine anti-apoptotique Bcl-2, ce qui induit sa séquestration et l'empêche d'agir avec les PI3KC3 (Pattingre *et al.*, 2005). En condition d'autophagie, les kinases JNK1 (c-*Jun* N-*terminal* 1) et DAPK (*death-associated protein kinase*) vont respectivement phosphoryler Bcl-2 et Beclin1, induisant leur dissociation (Wei *et al.*, 2008; Eisenstein, *et al.*, 2009). Les protéines pro-apoptotiques Bad/Bax peuvent aussi se lier à Bcl2, induisant la libération de Beclin1 (Pedro *et al.*, 2015). La liaison d'UVRAG (UV *irradiation resistance-associated gene*), un onco-suppresseur, et/ou Bif-1 (*endophilin B1*) avec Beclin1 favorise l'activation du complexe PI3KC3 et l'initiation de l'autophagie (C. Liang *et al.*, 2006, 2008; Takahashi *et al.*, 2007).

c. L'autophagie non canonique

De nombreux groupes ont montré le rôle essentiel des complexes mTORC1, ULK1/2 et PI3KC3 dans l'initiation de la formation du phagophore. Cependant, des études récentes ont reporté une forme d'autophagie n'impliquant pas l'ensemble de ces complexes. Ce type d'autophagie non canonique peut être indépendante de :

- mTOR : Sarkar et collaborateurs ont montré que le lithium est capable d'induire une autophagie *via* un mécanisme indépendant de mTOR, suggérant l'implication d'une autre voie que mTOR dans la régulation de l'autophagie (Sarkar *et al.*, 2005). En parallèle, Yamamoto et collaborateurs ont montré, dans un modèle de maladie d'Huntington, que l'accumulation aberrante d'une protéine mutante induisait une autophagie indépendante de mTOR et permettait la clairance des agrégats protéiques (Yamamoto *et al.*, 2006). Plus récemment, une étude a montré que l'arrêt des communications entre le RE et la mitochondrie induit un déséquilibre énergétique ainsi qu'une augmentation de l'autophagie dans la cellule. Dans cette étude, l'induction de l'autophagie n'est pas commandée par la voie mTOR mais par AMPK (Ahumada-Castro *et al.*, 2019).

- ULK1/2 : Kundu et collaborateurs ont démontré que, chez les souris déficientes en ULK1, la clairance des organites (mitochondries et ribosomes) est altérée. Cependant, ces souris ont la capacité de survivre au-delà de la période néonatale, au moment où l'autophagie est essentielle pour le maintien d'un apport suffisant en acides aminés et en glucose dans le foie, le cœur et les muscles squelettiques. Cela suggère qu'ULK1 n'est pas nécessaire pour ce mécanisme d'autophagie, ou que son déficit est compensé par ULK2 (Kundu *et al.*, 2008). Cheong et collègues ont montré qu'un sevrage en glucose et une exposition à l'ammoniaque pouvaient induire une autophagie dans

des fibroblastes embryonnaires de souris n'exprimant ni ULK1 ni ULK2 (Cheong *et al.*, 2011). De la même manière, le poliovirus induit une autophagie indépendante du complexe ULK1 (Corona Velazquez *et al.*, 2018).

❖ Beclin1 : L'autophagie indépendante de Beclin1 semble être associée à une mort cellulaire (Sun *et al.*, 2015). En effet, l'autophagie indépendante de Beclin1 induite par une neurotoxine (le 1-méthyl-4-phénylpyridinium) est associée à une mort des cellules neuronales (Zhu *et al.*, 2007). En outre, le resvératrol induit une mort des cellules tumorales humaines corrélée à une autophagie indépendante de Beclin1 mais dépendante d'Atg7 et Atg12-Atg5 (Mauthe *et al.*, 2011; F Scarlatti *et al.*, 2008). De plus, d'autres composés pro-apoptotiques, tels que la staurosporine, le MK801 et l'étoposide, induisent une autophagie indépendante de Beclin1 contribuant à l'apoptose dans les neurones corticaux primaires (Grishchuk *et al.*, 2011). L'autophagie indépendante de Beclin1 semble également impliquée dans la différenciation cellulaire et dans l'absorption de toxines bactériennes (Arsov *et al.*, 2011; Mestre *et al.*, 2010). De façon intéressante, l'autophagie indépendante de Beclin1 n'exclut pas nécessairement l'activation du complexe PI3KC3 et le recrutement de la protéine WIPI (Gao *et al.*, 2010; Smith *et al.*, 2010).

2. L'élongation

Une fois le phagophore généré, sa membrane s'allonge et s'incurve autour du contenu cytoplasmique à dégrader afin de former une vésicule à double membrane : l'autophagosome. Cette structure close isole le contenu à dégrader du reste du contenu cytoplasmique.

Cette étape d'élongation s'articule autour de deux systèmes de conjugaison, analogues aux systèmes d'ubiquitination des protéines, appelés «*Ubiquitin-like conjugaison system*». Ce système est composé de trois classes de protéines, les enzymes activatrices E1, les enzymes de conjugaison E2 et des ligases E3. Dans le cas des systèmes de conjugaison de l'élongation, huit protéines de la famille Atg jouent le rôle des enzymes E1, E2 et E3 et forment deux conjugués distincts : Atg12-Atg5 et LC3-PE (LC3-*phophatidyl-ethanolamine*).

a. Le système de conjugaison Atg12-Atg5

Atg12 est une protéine apparentée à l'ubiquitine. Cependant, contrairement à l'ubiquitine, elle ne nécessite pas de maturation pour entrer dans le système de conjugaison puisque sa séquence se termine par un résidu glycine. Ce résidu situé en positon C-terminal permet à Atg7, agissant comme une enzyme d'activation E1, d'activer directement Atg12 (Tanida *et al.*, 1999). Cette activation, ATP-dépendante, conduit à la formation d'une liaison thio-ester entre la glycine^{186} C-terminale d'Atg12 et la cystéine^{507} d'Atg7 (Tanida *et al.*, 1999). La glycine^{186} C-terminale est alors transférée sur Atg10, formant une nouvelle liaison thio-esther et libérant Atg7 (Shintani *et al.*, 1999). Atg10 exerce alors une activité d'enzyme de conjugaison E2 et permet à la glycine^{186} C-terminale d'Atg12 de se lier de façon covalente à la lysine^{149} d'Atg5, induisant la formation du conjugué Atg12-Atg5 (Mizushima *et al.*, 1998). À ce jour, aucune ligase E3, n'est connue pour intervenir dans ce système (Figure 26).

Ce système de conjugaison très dynamique est présent en continu dans le cytoplasme, il n'a pas besoin de stimulus particulier pour être formé. Directement après leur synthèse, Atg5 et Atg12 se conjuguent. À ce jour, aucune protéase n'est connue pour cliver leur liaison. De ce fait, il est très rare de détecter Atg12 et Atg5 sous leur forme libre (Mizushima *et al.*, 1998).

La protéine Atg16L1 va se lier de manière non covalente à Atg5. Grâce à son domaine en superhélice, elle forme un dimère, lui permettant de s'associer à deux conjugués Atg12-Atg5. Le complexe formé est une macromolécule homo-oligomérisée d'environ 800 kDa (Kuma *et al.*, 2002) qui jouera ensuite le rôle d'enzyme E3 pour le second système de conjugaison LC3-PE (Fujioka *et al.*, 2010; Otomo *et al.*, 2013). L'association du conjugué Atg12-ATG5 à Atg16L1 conduit à la révélation sur Atg5 d'un site de liaison à la membrane, ce qui lui permet de se lier à la membrane externe des autophagosomes en formation. Le complexe participe à l'élongation du phagophore avant de se dissocier de l'autophagosome dès sa fermeture (Mizushima, 2003; Mizushima *et al.*, 1999).

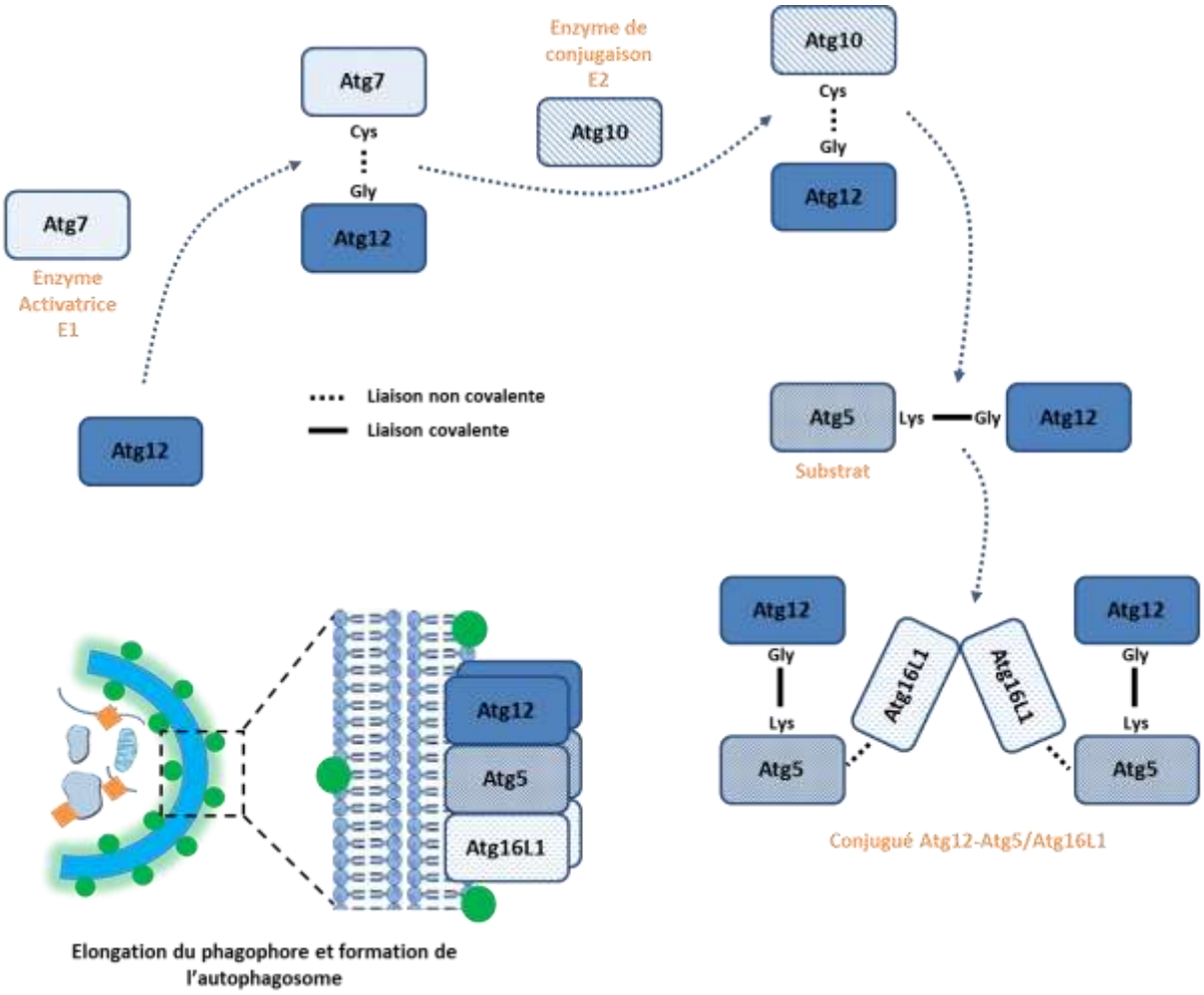


Figure 26 : Le système de conjugaison Atg12-Atg5

Atg12 est activé par Atg7 (Enzyme activatrice E1). Une liaison non covalente se forme entre une cystéine d'Atg7 et la glycine C-terminal d'Atg12. La glycine C-terminale d'Atg12 se lie ensuite de façon non covalente à une cystéine d'Atg10. Atg10 agit comme une enzyme de conjugaison E2 et crée une liaison covalente entre Atg12 et la protéine Atg5. Cette dernière joue le rôle du substrat. Finalement, le conjugué Atg12-Atg5 se lie au dimère Atg16L1. Le complexe Atg13-Atg5/Atg16L1 jouera le rôle d'enzyme E3 dans la formation du second conjugué LC3-PE.

b. Le conjugué LC3-PE

Ce deuxième système de conjugaison impliqué dans l'étape d'élongation du processus autophagique est unique car il est seul connu permettant la conjugaison d'une protéine (LC3 ou Atg8 chez la levure) avec un lipide (PE) (Ichimura *et al.*, 2000). Dans ce système, c'est la protéine LC3 qui joue le rôle de l'ubiquitine, mais contrairement à l'Atg12, elle doit maturer avant d'être activée. En effet, LC3 est initialement présente sous sa forme non mature, pro-LC3. Sa maturation, en LC3-I,

est assurée par la protéase Atg4, qui clive sa partie C-terminale (Arginine^{117}) (Agrotis *et al.*, 2019). Ce clivage permet l'exposition de la glycine^{116} qui peut alors être activée, en présence d'ATP par Atg7, qui joue une nouvelle fois le rôle de l'enzyme d'activation E1 (Ichimura *et al.*, 2000; Kirisako *et al.*, 2000). Atg7 transfert LC3-I vers Atg3 qui joue son rôle d'enzyme E2 et qui conjugue la glycine^{116} de LC3-I à un phospholipide membranaire. Le complexe Atg12-Atg5/Atg16L1, en plus d'augmenter l'activité d'Atg3, agit comme une ligase E3 et participe à la lipidation de la protéine LC3-I (Hanada *et al.*, 2007; Otomo *et al.*, 2013; Romanov *et al.*, 2012). Ce système donne naissance au conjugué LC3-PE, nommé aussi LC3-II (Figure 27).

La formation de ce conjugué peut être induite par des stimuli. Cependant, le type d'induction est dépendant du type cellulaire ou tissulaire. Contrairement au conjugué Atg12-Atg5 qui n'est présent qu'à la membrane externe, LC3-II se distribue de manière équitable entre les membranes externe et interne du phagophore et joue un rôle essentiel dans la formation de l'autophagosome. Il intervient dans la fermeture de l'autophagosome, et, à l'inverse du conjugué Atg12-Atg5, il ne se dissocie pas suite à la formation complète de la vésicule (Kabeya, 2004; Kabeya *et al.*, 2000a). En effet, bien que les protéines LC3-II fixées sur la membrane externe de l'autophagosome soient clivées par Atg4 et recyclées, celles présentes sur la membrane interne restent intactes jusqu'à ce qu'elles soient dégradées par les hydrolases lysosomales après la fusion de l'autophagosome avec le lysosome (Maruyama and Noda, 2017; Satoo *et al.*, 2009). L'augmentation de la conversion de LC3-I en LC3-II est souvent utilisée comme marqueur de la formation des autophagosomes (Klionsky *et al.*, 2016).

Chez les mammifères, au moins huit orthologues d'Atg8 ont été identifiés, répartis en deux sous familles, assurant la biogenèse des autophagosomes à différents stades (Shpilka *et al.*, 2011; Y. Xin *et al.*, 2001) : la famille LC3 constituée de LC3A, LC3B et LC3C et la famille GABARAP (*gamma-aminobutyric acid receptor-associated protein*) constituée de GABARAP1, GABARAP2, GABARAPL1, GABARAPL2/GATE-16 et GABARAPL3.

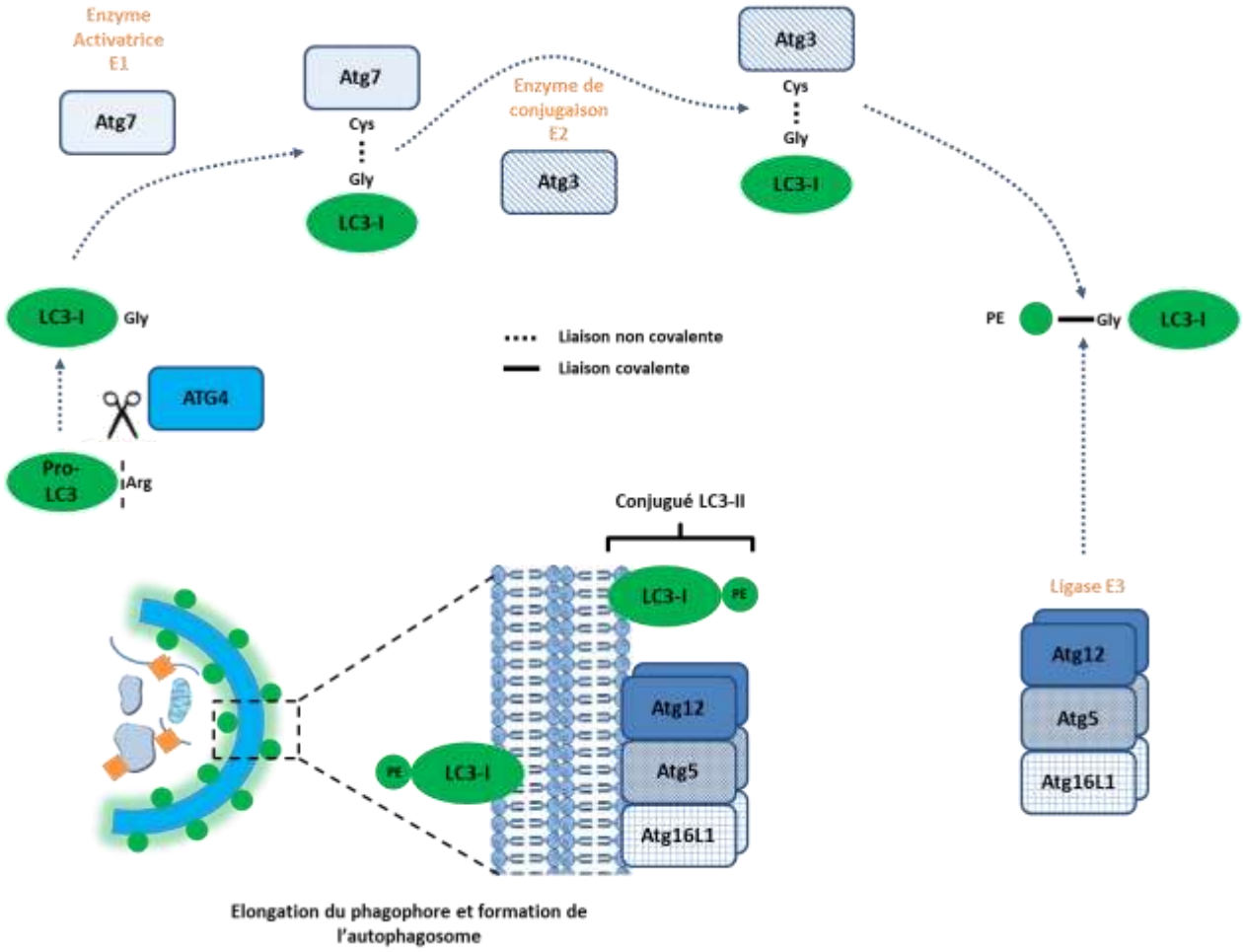


Figure 27 : Le système de conjugaison LC3-PE

Le pro-LC3 est clivé au niveau de son Arginine positionnée en C-terminal, révélant le résidu glycine. La forme mature LC3 est activée par Atg7 (Enzyme activatrice E1), une liaison non covalente se forme entre une cystéine d'Atg7 et la glycine C-terminale de LC3-I. La glycine C-terminale de LC3-I se lie ensuite de façon non covalente à une cystéine d'Atg3. Atg3 agit comme une enzyme de conjugaison E2 et crée une liaison covalente entre LC3 et un phospholipide (PE). La ligation entre PE et LC3-I se fait par le complexe Atg12-Atg5/Atg16L1, qui joue le rôle de ligase E3. Le conjugué LC3-PE (ou LC3-II) se lie aussi bien à la membrane externe qu'à la membrane interne du phagophore pour participer à son élongation et à la formation de l'autophagosome.

En plus de leur rôle dans la biogénèse des autophagosomes, les protéines de la famille LC3 ont un rôle important dans la reconnaissance et le recrutement spécifique des substrats à dégrader. Ce mécanisme fait intervenir des récepteurs autophagiques possédant une région LIR (LC3-*interacting region*). Ce domaine leur permet de se lier aux conjugués LC3-II présents au niveau de la membrane du phagophore et de séquestrer les éléments à dégrader (Padman *et al.*, 2019; Birgisdottir *et al.*,

2013). De nombreux substrats peuvent être reconnus de façon spécifique par ces récepteurs, tels que les substrats ubiquitinylés, les agrégats protéiques ou les mitochondries endommagées. Si l'autophagie a longtemps été considérée comme un processus non sélectif, ce mécanisme démontre que les substrats à dégrader peuvent être spécifiquement reconnu par les récepteurs autophagiques afin d'être acheminés dans l'autophagosome (Johansen and Lamark, 2019; Padman *et al.*, 2019; Zaffagnini *et al.*, 2018).

c. Les récepteurs autophagiques

La protéine p62 (également connu sous le nom de sequestosome 1) fut le premier récepteur autophagique à être identifié. p62 possède un domaine de reconnaissance à l'ubiquitine, nommé UBA (ub*iquitin associated*), ainsi qu'un domaine LIR, lui permettant de se lier à LC3-II dans l'autophagosome (Ichimura *et al.*, 2008; Pankiv *et al.*, 2007). Cette protéine cargo est notamment impliquée dans l'autophagie des agrégats protéiques (Pankiv *et al.*, 2007), des mitochondries (Yamada *et al.*, 2018), des peroxysomes (Kim *et al.*, 2008), des granules de zymogène (granules sécrétoires) (Grasso *et al.*, 2011), des virus (Mohamud *et al.*, 2019) et des bactéries (Chai *et al.*, 2019). p62 est dégradée par les hydrolases lysosomales en même temps que les substrats cellulaires. De ce fait, la dégradation de p62 est un bon marqueur de l'activité autophagique (Klionsky *et al.*, 2016). Aujourd'hui, d'autres récepteurs autophagiques assimilés à p62 ont été identifiés, on les appelle les SLRs (p62/*sequestosome* 1-*like receptors*). Ils incluent :

- ✓ NBR1 (*neighbour of breast cancer* 1), impliqué dans l'autophagie des agrégats protéiques et des peroxysomes (Deosaran *et al.*, 2013; Kirkin *et al.*, 2009).
- ✓ NDP52 (*nuclear dot protein* 52 kDa), impliqué dans l'autophagie des mitochondries, des lysosomes et des bactéries (Heo *et al.*, 2015; Maejima *et al.*, 2013; Padman *et al.*, 2019; Thurston *et al.*, 2009).
- ✓ TAX1BP1 (*human T-cell leukemia virus type* I-*binding protein* 1), impliqué dans l'autophagie des mitochondries et des bactéries (Heo *et al.*, 2015; Thurston *et al.*, 2009).
- ✓ OPTN (optineurine), impliqué dans l'autophagie des agrégats protéiques et des bactéries (Korac *et al.*, 2013; Padman *et al.*, 2019; Wild *et al.*, 2011).

Depuis la découverte de p62, de nombreux récepteurs autophagiques ont été identifiés. L'ensemble de ces récepteurs sont répertoriés ci-dessous, selon leur rôle autophagique :

Type d'autophagie	Substrat	Récepteurs autophagiques impliqués
Agréphagie	Agrégats protéiques	p62, NBR1, OPT
Mitophagie ubiquitine-dépendante	Mitochondrie	p62, NDP52, OPTN, TAX1BP1, AMBRA1
Mitophagie ubiquitine-indépendante	Mitochondrie	NIX, BNIP3, FUNDC1, Bcl2L13, FKBP8, PHB2, NLRX1, AMBRA1, cardiolipine, céramide
Pexophagie	Peroxysome	p62, NBR1
Lysophagie	Lysosome	p62, NBR1
Zymophagie	Granule de zymogène	p62
REphagie	RE	FAM134B, SEC62, RTN3, CCPG1, ATL3, TEX264
Ferritinophagie	Ferritine	NCO4A
Glycophagie	Glycogène	Stbd1
Autophagie de la lamina nucléaire	Lamina nucléaire	Lamine B1
Xenophagie	Bactérie	Stbd1
Virophagie	Virus	NDP52, p62, OPTN, TAX1BP1
Ribophagie	Ribosome	p62, TRIM5α
Autophagie des *midbody*	*midbody*	p62, NBR1, TRIM17

Tableau 1 : Les récepteurs de l'autophagie sélective répertoriés selon leurs substrats.

D'après Johansen and Lamark, 2019.

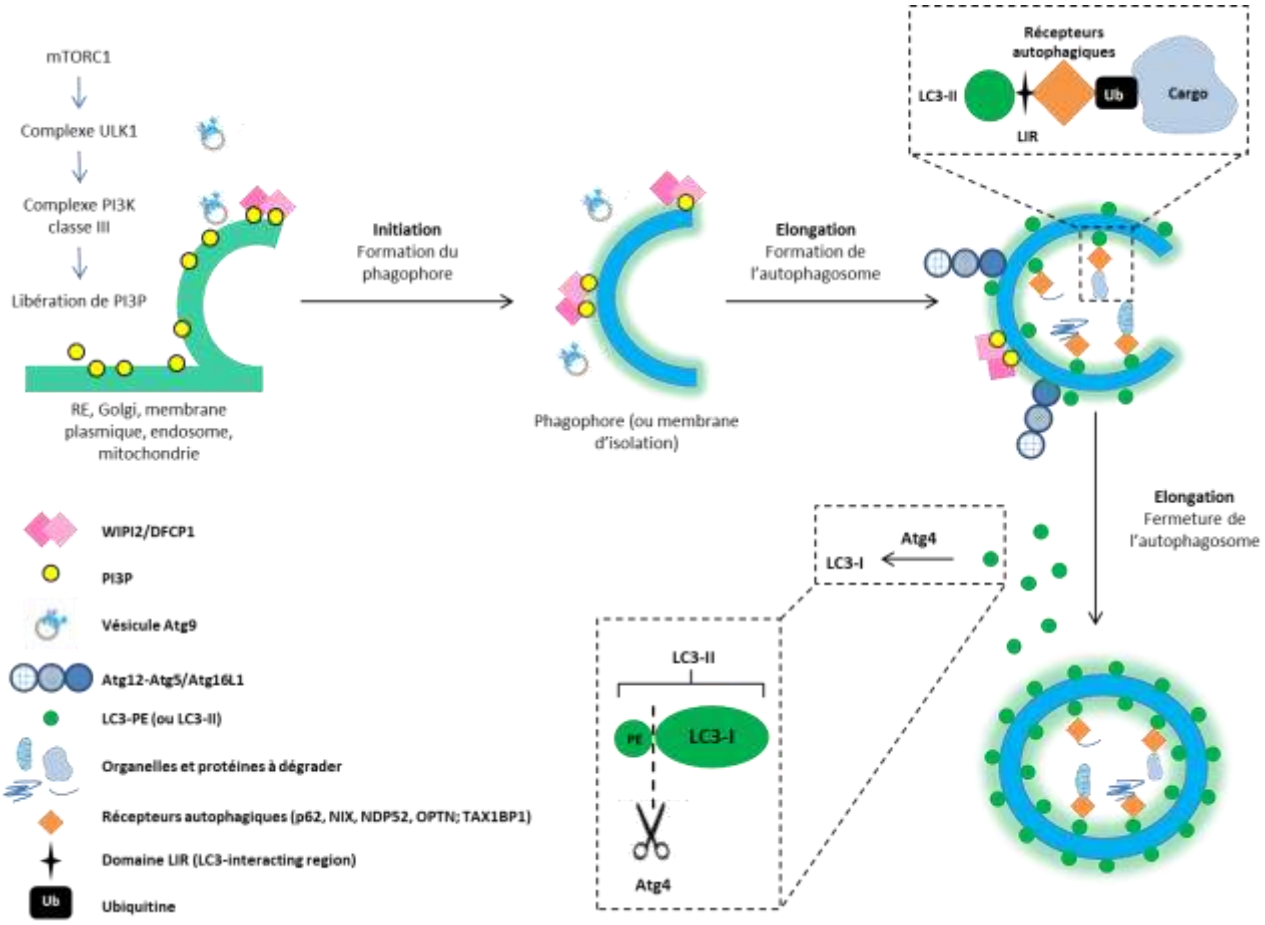


Figure 28 : Les deux premières étapes de l'autophagie : l'initiation et l'élongation

L'initiation a pour but de former une double membrane appelée phagophore. Cette étape commence par l'activation de mTORC1, qui active le complexe ULK1. Ce dernier active en retour le complexe PI3KC3, induisant la libération de PI3P. PI3P recrute WIPI2 et DFCP1 au niveau d'un organite qui va servir de source membranaire pour la biogenèse du phagophore. Cette étape fait également intervenir des vésicules Atg9 qui joueraient un rôle dans la communication entre les différents organites et dans l'apport de membrane.

Durant la seconde étape, la phagophore s'allonge et se referme afin de former un autophagosome dans lequel les substrats cellulaires, acheminés par les récepteurs autophagiques, sont séquestrés. Cette étape d'élongation fait intervenir deux conjugués : Atg12-Atg5/Atg16L1 et LC3-PE. Le premier est dissocié de la membrane externe de l'autophagosome après sa fermeture, le second reste sur la membrane du phagophore ou est recyclé par Atg4. Les récepteurs autophagiques lient les différents éléments à dégrader avant de se lier *via* leur domaine LIR à LC3-II.

3. La maturation

L'étape de maturation se traduit par la fusion de l'autophagosome avec le lysosome. Cette fusion permet la dégradation, par les hydrolases lysosomales, des substrats cellulaires séquestrés dans l'autophagosome.

La fusion de l'autophagosome avec le lysosome requiert une fermeture complète de l'autophagosome. En 2012, Yu et collaborateurs ont montré que la maturation du phagophore vers un autophagosome ayant la capacité de fusionner nécessite la dissociation par Atg4 du conjugué LC3-II présent sur la membrane externe du phagophore (Yu *et al.*, 2012). Cependant, en 2019, l'équipe de Robin Ketteler a démontré que la délipidation de LC3-II par Atg4 n'est pas essentielle à la fusion de l'autophagosome avec les lysosomes (Agrotis *et al.*, 2019). De nombreux papiers ont montré qu'une déficience du système de conjugaison des Atg conduisait à l'accumulation d'autophagosomes non fermés dans la cellule (Fujita *et al.*, 2008; Kishi-Itakura *et al.*, 2014; Noboru Mizushima *et al.*, 2001). Néanmoins, il semble que le système de conjugaison (Atg3, Atg5, Atg7) ne soit pas essentiel à la fusion autophagosome-lysosome, bien que le taux de formation d'autophagosome soit réduit d'environ 30% dans les cellules déficientes en Atg3, Atg5 ou Atg7 (Tsuboyama *et al.*, 2016). Par ailleurs, la fusion autophagosome-lysosome est compromise dans les cellules n'exprimant pas les protéines de la famille LC3 (Nguyen *et al.*, 2016).

L'autophagosome et le lysosome sont des compartiments bien distincts avec une distribution cellulaire différente. En effet, les autophagosomes sont générés dans le cytoplasme alors que les lysosomes et les endosomes tardifs sont principalement localisés dans la région péri-nucléaire, à côté du centre organisateur des microtubules, le centrosome (Jongsma *et al.*, 2016). En conséquence, une fois généré, l'autophagosome doit être délivré dans la région péri-nucléaire où il pourra fusionner avec le lysosome. En 2008, Kimura et collaborateurs ont montré que les autophagosomes utilisent des microtubules comme un « rail directionnel » et le complexe dynéine-dynactine comme moteur moléculaire pour se diriger vers les lysosomes (Kimura *et al.*, 2008). Le mouvement des autophagosomes est inhibé par la micro-injection d'anticorps anti-LC3, suggérant un rôle de LC3 au cours de ce processus (Kimura *et al.*, 2008). En 2010, Pankiv et collaborateurs ont montré que la petite GTPase (guanosine triphosphatase) Rab7, *via* son interaction avec FYCO1 (FYVE *and coiled-coil domain-containing protein*), permet de faire le lien entre les microtubules et

l'autophagosome. Ainsi, grâce à Rab7, l'autophagosome peut se déplacer vers la périphérie de la cellule par l'intermédiaire des kinésines (Pankiv *et al.*, 2007). À l'inverse, le mouvement des autophagosomes vers la région péri-nucléaire fait intervenir la dynactine et nécessite l'interaction de Rab7 avec RILP (*Rab-interacting lysosomal protein*) et ORP1L (*oxysterol-binding protein-related protein* 1L) (Figure 29; Ma *et al.*, 2018; Wijdeven *et al.*, 2016).

De manière intéressante, la localisation des lysosomes joue un rôle dans l'efficacité de la fusion. En effet, l'augmentation du nombre de lysosomes dans la zone péri-nucléaire, par une inhibition des kinésines Kif1B-β (*kinesin* family member 1B) et Kif2A, entraîne une augmentation de la fusion. Tandis que la dispersion des lysosomes à la périphérie *via* une surexpression de la kinésine 5B réduit le taux de fusion et conduit à l'accumulation des autophagosomes dans l'espace péri-nucléaire (Cardoso *et al.*, 2009; Korolchuk *et al.*, 2011).

Les neurones font face à des défis particuliers pour délivrer dans le soma les vacuoles autophagiques nouvellement générées. En effet, au niveau neuronal, les autophagosomes sont formés à la pointe distale de l'axone alors que les lysosomes sont principalement synthétisés dans le soma (Cai *et al.*, 2010; Maday and Holzbaur, 2014). Comme dans les autres types cellulaires, le transport des vacuoles autophagiques se fait *via* le moteur dynéine. Cependant, il nécessite l'intervention d'une protéine particulière : la snapine. La snapine agit comme un adaptateur recrutant le moteur dynéine pour le transport rétrograde de l'endosome tardif vers le soma (X.-T. Cheng *et al.*, 2015). Les endosomes tardifs accrochés au complexe snapine/dynéine fusionnent avec les autophagosomes pour former les amphisomes. Les amphisomes ainsi formés sont transportés dans le soma où ils fusionnent avec les lysosomes (Figure 29; Cheng *et al.*, 2015). La fusion ne dépend pas seulement du transport rétrograde des amphisomes. Par exemple, une étude récente a démontré que des lysosomes sont délivrés continuellement au niveau de l'axone distal afin de fusionner avec les autophagosomes/amphisomes axonaux. L'arrêt de la libération des lysosomes dans l'axone distal induit une accumulation aberrante d'autophagosomes et de protéines α-synucléines mutantes dans les axones des neurones du ganglion de la racine dorsale isolés de souris adultes. Cette étude suggère que le transport des lysosomes dans l'axone distal est nécessaire au maintien d'une autophagie et d'une clairance locale (X.-T. Cheng *et al.*, 2015).

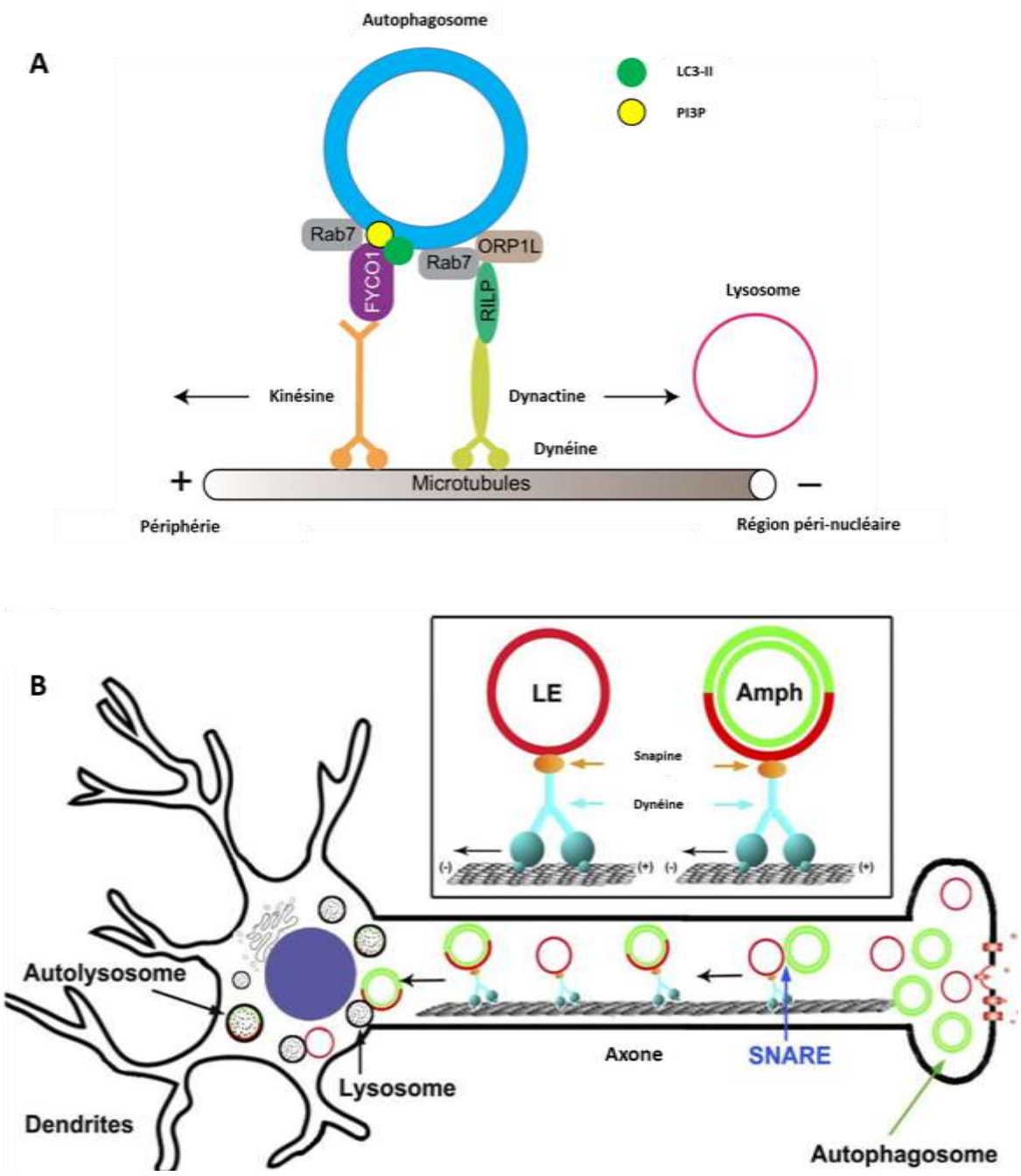


Figure 29 : Le transport des autophagosomes.

A. Rab7 *via* FYCO1 relie les autophagosomes à un moteur de microtubule pour faciliter le mouvement induit par la kinésine vers la périphérie cellulaire. FYCO1 a été identifié pour se lier à LC3, mais il se lie également au phospholipide PI3P, étant un composant de la membrane de l'autophagosome. Rab7 se lie également à RILP et à ORP1L afin de favoriser le mouvement induit par la dynéine et/ou la dynactine vers la région péri-nucléaire. D'après (Nakamura and Yoshimori, 2017). **B.** Les autophagosomes générés dans l'axone fusionnent avec les endosomes tardifs (LE), liés au complexe snapine/dynéine, afin de former l'amphisome (Amph). Ces amphisomes sont transportés, grâce au moteur dynéine vers le soma, où ils fusionneront avec les lysosomes. D'après Cheng *et al.,* 2015.

Ainsi, la co-localisation de l'autophagosome et du lysosome facilite leur fusion afin de former l'autolysosome. Cette fusion peut être précédée par la formation d'un amphisome, structure issue de la fusion d'un autophagosome et d'un endosome grâce aux protéines de la machinerie ESCRT (*endosomal sorting complex required for transport*). Des études suggèrent que l'amphisome est nécessaire à la formation de l'autolysosome. En effet, un déficit du système ESCRT peut induire, chez la drosophile et chez les mammifères, un blocage de la fusion des autophagosomes avec le système endosomal causant une accumulation des autophagosomes (Manil-Ségalen *et al.*, 2014; Tumbarello *et al.*, 2012).

La formation de l'autolysosome nécessite l'intervention de la machinerie Rab-SNARE couramment impliquée dans la fusion vésicule-vésicule (Figure 30). Le récepteur SNARE STX7, visible uniquement sur la membrane externe des autophagosomes fermés, se lie à SNAP29 (Itakura *et al.*, 2012). En parallèle, EPG5 (*ectopic* P *granules protein* 5) est recruté par les endosomes/lysosomes tardifs en interagissant avec Rab7 et VAMP8 (Wang *et al.*, 2016). EPG5 se lie ensuite à LC3 *via* son domaine LIR et au complexe STX7-SNAP29 présent sur les autophagosomes. EPG5 stabilise et facilite la formation du complexe SNARE, STX7-SNAP29-VAMP8, favorisant la fusion de l'autophagosome avec le lysosome (Itakura and Mizushima, 2013; Zheng Wang *et al.*, 2016). Une déficience en EPG5 cause une fusion anormale des autophagosomes avec diverses vésicules d'endocytose, en grande partie dûe à une augmentation du complexe STX17-SNAP25-VAMP8 (Wang *et al.*, 2016).

Le complexe HOPS (*homotypic fusion and vacuole protein sorting*) participe également au processus de fusion, en interagissant avec STX17 (Jiang *et al.*, 2014). De plus, Atg14L peut fonctionner comme un facteur « d'attache » en se liant directement au complexe binaire STX17-SNAP29 présent sur les autophagosomes, ce qui favorise la fusion des autophagosomes avec les lysosomes, de manière dépendante de STX17-SNAP29-VAMP8 (Diao *et al.*, 2015). Il semblerait que TECPR1 (*tectonin beta-propeller repeat-containing* 1), *via* sa liaison aux PI3P et à Atg5-Atg12, fonctionne également comme un facteur « d'attache » entre le lysosome et l'autophagosome (Chen *et al.*, 2012). Finalement, en 2015, McEwan et collaborateurs ont montré que la fusion est régulée par une protéine adaptatrice nommée PLEKHM1 (*pleckstrin homology domain containing protein family member* 1) grâce à l'interaction de son domaine LIR avec LC3 (McEwan *et al.*, 2015).

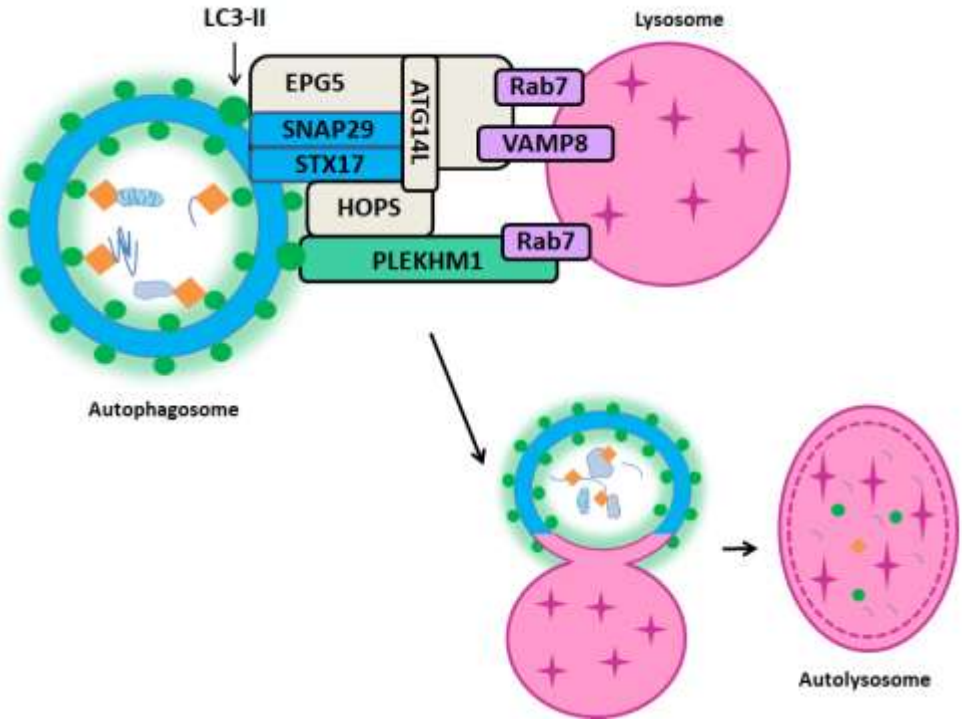


Figure 30 : Rôle des SNAREs dans la fusion autophagosome-lysosome.
EPG5 est recruté, *via* Rab7 et VAMP8, par les endosomes/lysosomes tardifs. Puis, il se lie à LC3 et à STX17-SNAP29 facilitant l'assemblage du complexe trans-SNARE pour la fusion. Contrairement à EPG5, Atg14L se lie aux complexes SNARE STX17-SNAP29 sur les autophagosomes, par l'intermédiaire de STX7, mais pas au complexe SNARE STX17-SNAP29-VAMP8, suggérant qu'Atg14L agit plus tôt qu'EPG5. PLEKHM1 est une protéine adaptatrice qui interagit avec les complexes Rab7, HOPS et les protéines LC3 afin de faciliter la fusion autophagosome-lysosome. Les complexes EPG5, Atg14L et HOPS jouent le rôle de facteurs « d'attache », mais leur relation exacte doit encore être clarifiée. Ces molécules interagissent entre elles afin de permettre la fusion autophagosome-lysosome et la formation de l'autolysosome. D'après Nakamura and Yoshimori, 2017.

Il existe un régulateur négatif de la formation des autophagolysosomes : la protéine Rubicon (*run domain beclin1 interacting and cysteine-rich containing protein*). Il a été montré qu'une diminution de l'expression de Rubicon augmentait la formation d'autolysosomes (Matsunaga *et al.*, 2009; Sun *et al.*, 2011). Rubicon est contrôlée par de nombreux facteurs tels que le récepteur à l'EGF (Tan *et al.*, 2015), Beclin1 acétylée (Sun *et al.*, 2015) ou UVRAG (Kim *et al.*, 2015). En condition physiologique, mTORC1 phosphoryle UVRAG qui peut alors se lier à Rubicon. A contrario, lors d'une carence en acides aminés, UVRAG n'est plus phosphorylé par mTORC1 et se lie à HOPS, favorisant la fusion autophagosome-lysosome (Kim *et al.*, 2015).

Enfin, l'ultime étape de ce mécanisme d'autophagie est la dégradation du contenu de l'autophagosome. Cette dernière requière la participation des hydrolases du lysosome. Ces hydrolases ne fonctionnent qu'à pH acide (pH compris entre 4,5 et 5,5). Ce sont les pompes V-ATPases présentes sur la membrane lysosomale qui permettent l'acidification de l'autolysosome et l'activité des hydrolases (Mauvezin *et al.*, 2015). Parmi ces hydrolases, on retrouve les lipases qui génèrent des acides gras à partir des lipides ; les protéases, qui dégradent les protéines en peptides; les peptidases, qui dégradent ces derniers en acides aminés, ainsi que les nucléases, qui dégradent les acides nucléiques en nucléosides. L'action des hydrolases lysosomales va aussi permettre la dégradation la membrane interne de l'autophagosome initial. Cet autolysosome pourra ensuite être utilisé pour former un nouveau lysosome. Une réactivation de la protéine kinase mTOR, régulateur négatif majeur de l'autophagie, serait alors nécessaire afin de recycler les lysosomes engagés dans la maturation de l'autophagosome (Yu *et al.*, 2010).

Le but principal de l'autophagie est de dégrader les éléments cytoplasmiques et de recycler les macromolécules issues de cette dégradation afin de synthétiser des composants essentiels et de surmonter diverses conditions de stress. En conséquence, les macromolécules doivent être libérées dans le cytosol pour être réutilisées. Cependant, ce processus est mal connu. Il semblerait toutefois qu'Atg22 joue un rôle dans l'efflux de la leucine issue de la dégradation autophagique (Yang *et al.*, 2006).

IV. La régulation de l'autophagie

En condition physiologique, l'autophagie est activée de manière constitutive. Cependant, son activité dépend de nombreux stimuli régulés par des voies de signalisation ou par des signaux de stress.

1. Les voies de régulation de l'autophagie

a. La voie de régulation mTOR

La voie majeure de régulation de l'autophagie est la signalisation mTOR. mTORC1 est un régulateur négatif de l'autophagie. La phosphorylation des protéines ULK1/2 et Atg13 par mTORC1

empêche la stabilisation et l'activité kinase du complexe ULK, inhibant l'autophagie (Jung *et al.*, 2009).

Comme décrit précédemment, le complexe mTORC1 est activé par la voie PI3K/Akt (Dibble and Cantley, 2015). Cette activation, dépendante des récepteurs tyrosine kinase, est régulée par les nutriments, dont le cholestérol (Castellano *et al.*, 2017) et les acides aminés (Hara *et al.*, 1998) tels que la leucine (Son *et al.*, 2019) et la glutamine (Tan *et al.*, 2017). Il a été démontré qu'une carence en nutriments était responsable de l'inhibition de mTORC1 et, par conséquent, d'une activation de l'autophagie. Cette inhibition peut se faire *via* l'activation d'AMPK (Egan *et al.*, 2011; Kim *et al.*, 2011) et *via* le recrutement de TSC1/2 par les lysosomes (Demetriades *et al.*, 2014). mTORC1 peut également être régulé par des facteurs de croissances tels que l'insuline (Inoki *et al.*, 2002).

mTOR a été identifié au milieu des années 1990 par isolement biochimique à l'aide d'un complexe rapamycine-FKBP12 (*tacrolimus-binding protein* 12 kDa). Ce complexe se lie spécifiquement à mTORC1 et inhibe, de manière allostérique, son activité kinase (Chiu *et al.*, 1994; Sabatini *et al.*, 1994; Sabers *et al.*, 1995). De ce fait, la rapamycine est une molécule très utilisée comme activateur de l'autophagie. Son effet pro-autophagique a notamment été montré chez la levure dans des conditions riches en nutriments (Noda and Ohsumi, 1998), dans des lignées cellulaires de gliome (U87-MG et T98G) (Takeuchi *et al.*, 2005), dans des modèles *in vitro* et *in vivo* de maladies neurodégénératives (Ravikumar *et al.*, 2002; Ravikumar *et al.*, 2004) et dans le système nerveux de souris (moelle épinière et cervelet) (Castillo *et al.*, 2013).

b. Le complexe PI3K de classe III

Le complexe PI3KC3 est impliqué dans la régulation positive de l'autophagie et il est nécessaire pour la formation du phagophore, sa nucléation et son élongation. La protéine Beclin1 joue le rôle de plateforme, recrutant des protéines activatrices ou inhibitrices de l'autophagie dans différents complexes. Parmi les protéines activatrices de l'autophagie on retrouve :

- ✓ UVRAG, qui se lie à Beclin1 et à Bif-1 (Liang *et al.*, 2006, 2008; Takahashi *et al.*, 2007) favorisant l'activité du complexe PI3KC3.
- ✓ La protéine NRBF2 (*nuclear receptor binding factor* 2) permettant l'assemblage du complexe PI3KC3 (Cao *et al.*, 2014; J. Lu *et al.*, 2014).

- ✓ La protéine VMP-1 (*vacuole membrane protein* 1) qui se lie à Beclin1 (Ropolo *et al.*, 2007).
- ✓ La protéine Ambra1, phosphorylée par ULK1, elle stabilise le complexe ULK1 et permet la libération de PI3KC3 du moteur dynéine qui peut alors se retrouver dans le RE pour induire la formation de l'autophagosome (Cianfanelli *et al.*, 2015; Di Bartolomeo *et al.*, 2010; Nazio *et al.*, 2013; Strappazzon *et al.*, 2015).
- ✓ L'oncoprotéine E1B19K de l'adénovirus qui interagit avec le domaine BH3 de Beclin1 (Piya *et al.*, 2011).

De nombreuses protéines régulent négativement l'autophagie en se liant à Beclin1 :

- ✓ Bcl2 se lie directement au domaine BH3 de Beclin1, entraînant son inactivation (Pattingre *et al.*, 2005).
- ✓ La protéine Rubicon rentre en compétition avec la protéine Atg14L1 pour interagir avec Beclin1 (Matsunaga *et al.*, 2009; Zhong *et al.*, 2009).
- ✓ Certaines protéines virales telles que la protéine ICP34.5 du virus de l'Herpès simplex (Orvedahl *et al.*, 2007), la protéine Nef du VIH-1 (virus de l'immunodéficience humaine-1) qui bloque la maturation des autophagosomes (Kyei *et al.*, 2009) et la protéine Matrix 2 du virus de la grippe qui bloque la fusion des autophagosomes avec les lysosomes (Gannagé *et al.*, 2009).

c. La signalisation p53

La protéine p53, découverte en 1979 (Kress *et al.*, 1979; Linzer and Levine, 1979), est un facteur de transcription qui régule l'expression de plusieurs centaines de gènes notamment impliqués dans la réparation des dommages cellulaires (Farmer *et al.*, 1992). p53 est un suppresseur de tumeur dont l'inactivation favorise le développement de nombreuses tumeurs. En effet, plus de 50 % des cancers présentent des mutations du gène TRP53 (*transformation related protein* 53) (Leroy *et al.*, 2014; Nigro *et al.*, 1989). De plus, p53 intervient dans de nombreuses voies métaboliques telles que la voie IGF (*insulin growth factor*)/PI3K/mTOR en réponse à des stress cellulaires variés tels que le stress oxydant, le stress du RE ou l'hypoxie (Feng *et al.*, 2007). p53 semble également être un facteur clé dans la régulation de l'autophagie.

En 2008, Tasdemir et collaborateurs ont démontré que p53 peut aussi bien promouvoir l'autophagie que l'inhiber et que cette dualité était dépendante de sa localisation cellulaire. Il apparait qu'au niveau nucléaire, p53 agit comme un facteur de transcription pro-autophagique alors la forme cytoplasmique de p53 inhibe l'autophagie (Tasdemir *et al.*, 2008). Cependant, une étude récente a montré que l'activité transcriptionnelle de p53 contribue aussi à l'inhibition de l'autophagie. En effet, la forme nucléaire de p53 est capable de réguler négativement l'expression de PINK1 (PTEN-*induced putative kinase* 1), une protéine clé de la mitophagie (dégradation sélective des mitochondries) (Goiran *et al.*, 2018). L'activation de l'autophagie par p53 est majoritairement dépendante de l'inhibition de la voie mTORC1 *via* la régulation transcriptionnelle des gènes :

- ✓ Codant les sous-unités β1 et β2 de l'AMPK (Feng *et al.*, 2007).
- ✓ Codant l'IGFBP3 (*insulin-like growth factor binding protein*-3), une molécule sécrétée capable de se lier aux facteurs de croissance de la famille de l'IGF, induisant l'inhibition de la voie IGF/PI3K/mTOR (Feng *et al.*, 2007) .
- ✓ Codant TSC2 et PTEN (Feng *et al.*, 2007; Stambolic *et al.*, 2001).
- ✓ Codant les protéines sestrines 1 et 2, impliquées dans l'inhibition de mTORC1 (Budanov and Karin, 2008; Budanov *et al.*, 2002).

La protéine p53 inhibe également la transcription des gènes codant des protéines de la famille Bcl-2, induisant une diminution du nombre de complexe Bcl-2-Beclin1 et favorisant la formation du complexe PI3KC3 (Toshiyuki and Reed, 1995). L'activation transcriptionnelle de la protéine DRAM (*damage-regulated autophagy modulator*) par p53, suite à des dommages de l'ADN, conduit à une activation des processus d'autophagie et d'apoptose (Crighton *et al.*, 2006). Les gènes ULK1/2, Atg7, Atg2b, Atg4a, Atg4c, Atg7, Atg10 et UVRAG sont également des cibles de p53 pour activer l'autophagie (Kenzelmann Broz *et al.*, 2013). Finalement, il a été montré que la protéine p53 régulait négativement LC3 dans les trophoblastes humains en différenciation (Gauster *et al.*, 2018) et dans les lignées HTC116 (lignée de cancer colique humain), contrôlant ainsi la balance autophagique (Scherz-Shouval *et al.*, 2010).

2. Les signaux de stress régulant l'autophagie

a. Le stress nutritionnel

L'autophagie permet la synthèse de nouvelles macromolécules et la production d'ATP à partir des produits issus de la dégradation lysosomale. Ainsi, lors d'une carence nutritionnelle, la cellule peut activer l'autophagie en quelques minutes afin de fournir les nutriments et l'énergie nécessaires à sa survie. Des études ont révélé une activation du processus autophagique dans différents types cellulaires suite à une carence nutritionnelle (Boya *et al.*, 2005; Russell *et al.*, 2013, 2014). De même, *in vivo*, il a été observé chez des souris à jeun depuis 48 heures, une forte augmentation de l'autophagie dans la plupart des tissus (Noboru Mizushima and Levine, 2010). La carence nutritionnelle est responsable d'une inhibition de mTOR, induisant, en conséquence, une activation du complexe ULK1. ULK1 activé se lie à Atg14L1 et phosphoryle Beclin1 au niveau de la Ser^{14} (Russell *et al.*, 2013).

En amont de mTOR se trouve AMPK étant considéré comme le senseur énergétique principal de la cellule. AMPK est sensible aux changements de rapport AMP/ATP dans la cellule. Lors d'un stress métabolique, la diminution de la production d'ATP active AMPK (Kim *et al.*, 2011), qui active à son tour TSC2, un inhibiteur de mTORC1 (Inoki *et al.*, 2003; Inoki *et al.*, 2002). De plus, en réponse à une carence nutritionnelle, AMPK peut, de façon directe ou indirecte, phosphoryler p53 au niveau de la Ser^{15}, induisant une inhibition de mTORC1. Ces effets sur mTORC1 ont pour conséquence une activation de l'autophagie (Feng *et al.*, 2005; Feng *et al.*, 2007; Jones *et al.*, 2005).

Suite à un stress nutritionnel, l'inhibition de mTORC1 peut se faire de manière indépendante de AMPK, notamment *via* p53 et/ou la voie IGF-1/Akt (Feng and Levine, 2010; Huang and Manning, 2009). De plus, l'acétyl-coenzyme A (acétyl-CoA) est l'un des principaux intégrateurs de l'état nutritionnel de la cellule. Un sevrage en nutriments induit une rapide diminution d'acétyl-CoA, associée à une réduction de l'acétylation des protéines cytoplasmiques et de l'expression de l'acétyltransférase EP300. Cette perte considérable d'acétylation protéique conduit à l'induction de l'autophagie (Mariño *et al.*, 2014).

b. Les mitochondries endommagées

Les mitochondries assurent de nombreuses fonctions indispensables à la survie cellulaire, notamment la production d'ATP. Dans la cellule, l'élimination des mitochondries endommagées est essentielle afin de prévenir l'accumulation de ROS, cette accumulation étant associée à plusieurs pathologies telles que les maladies neurodégénératives ou les cancers (Navarro-Yepes *et al.*, 2014). De nombreuses études ont montré que les ROS entraînent l'induction de l'autophagie dans différents types cellulaires, *via* l'activation d'AMPK (Xia *et al.*, 2018) et/ou *via* une inhibition de la voie PI3K/Akt/mTORC1 (Xu *et al.*, 2017; Zhang *et al.*, 2014). L'élimination des mitochondries endommagées par le mécanisme d'autophagie (aussi appelé mitophagie) est nécessaire à la survie cellulaire. En effet, une étude a montré qu'une forte concentration de glucose dans la cellule induisait une libération aberrante de ROS et, par conséquent, des dommages mitochondriaux. L'induction de l'autophagie par les ROS *via* la voie JNK permet la clairance cellulaire. À l'inverse, une inhibition de la mitophagie induit une accumulation de ROS dans la cellule favorisant l'apoptose (Li *et al.*, 2018). De la même manière, Sadhu et collaborateurs ont montré qu'un taux trop élevé de NO dans la cellule inhibait la mitophagie induite par les ROS et que ce phénomène favorisait la nécrose cellulaire (Sadhu *et al.*, 2019).

La mitophagie est un processus neuroprotecteur atténuant le stress oxydatif en prévenant l'accumulation de ROS dans la cellule (Li *et al.*, 2018; Sadhu *et al.*, 2019). Ce mécanisme (Figure 31) fait intervenir la sérine/thréonine kinase mitochondriale PINK1 et l'ubiquitine ligase E3 nommée Parkin. Des mutations des gènes codant ces protéines sont notamment impliquées dans une forme familiale de la maladie de Parkinson (Kitada *et al.*, 1998; Marder *et al.*, 2010; Valente *et al.*, 2004). En condition basale, PINK1 est une protéine située sur la membrane interne de la mitochondrie. En cas de dépolarisation de la membrane mitochondriale constitutive à l'accumulation de ROS, PINK1 est recrutée au niveau de la membrane externe, servant ainsi de senseur des dommages mitochondriaux (Harper *et al.*, 2018; Pickles *et al.*, 2018). PINK1 est stabilisée sur la membrane mitochondriale externe, où il recrute et phosphoryle Parkin. PINK1 phosphoryle également l'ubiquitine présente à la membrane. L'ubiquitine phosphorylée recrute ensuite davantage de Parkin, fournissant ainsi à PINK1 plus de Parkin pour la phosphorylation. Une fois activé, Parkin induit une accumulation de l'ubiquitine sur les substrats protéiques présents à la membrane plasmique externe de la mitochondrie.

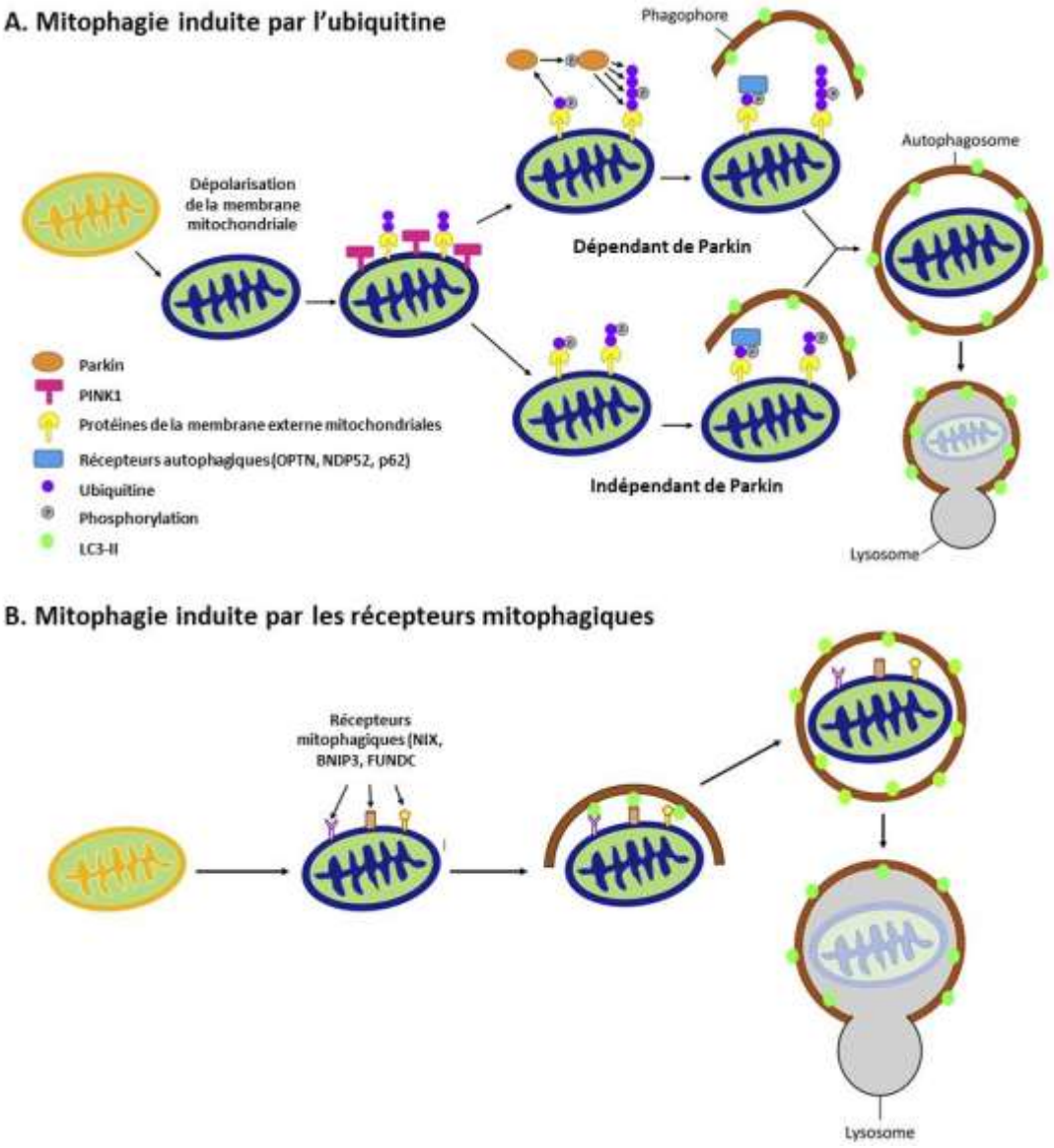


Figure 31 : Le mécanisme de la mitophagie.

A. Mitophagie induite par l'ubiquitine. En cas de perte du potentiel de la membrane mitochondriale, PINK1 est stabilisée sur la membrane mitochondriale externe, où elle recrute et phosphoryle Parkin. PINK1 phosphoryle également l'ubiquitine présente à la membrane. L'ubiquitine phosphorylée recrute ensuite davantage de Parkin, fournissant ainsi à PINK1 plus de Parkin pour la phosphorylation. Une fois activée par PINK1, Parkin induit une accumulation de l'ubiquitine sur les substrats protéiques présents à la membrane plasmique externe de la mitochondrie. Les récepteurs de l'autophagie (OPTN, NDP52, p62) se fixent sur l'ubiquitine facilitant la biogenèse d'un phagophore *via* le recrutement des protéines Atg. Les récepteurs de l'autophagie sont également recrutés, indépendamment de Parkin dans la mitochondrie endommagée *via* leur liaison à l'ubiquitine phosphorylée par PINK1. Le phagophore s'allonge et enferme la mitochondrie endommagée dans un autophagosome qui peut fusionner avec des lysosomes pour dégrader la cargaison. **B.** Mitophagie induite les récepteurs mitophagiques. Un certain nombre de récepteurs, notamment NIX, BNIP3 et FUNDC1, sont exprimés en réponse à différents stimuli et facilitent la mitophagie *via* leur liaison à LC3 sur le phagophore. D'après Harris et *al.,* 2018.

Les ubiquitines phosphorylées sont ensuite reconnues par les récepteurs autophagiques, OPTN, NDP52, p62 permettant l'emmagasinage des mitochondries dans les autophagosomes (Heo *et al.*, 2015; Lazarou *et al.*, 2015; Wong and Holzbaur, 2014).

Il existe une seconde voie de la mitophagie. Cette dernière ne fait pas intervenir le couple Parkin/PINK. Dans cette voie, LC3 serait capable d'interagir directement avec les protéines ubiquitinylées ou avec les récepteurs mitophagiques à la membrane mitochondriale (Harris *et al.*, 2018; Novak *et al.*, 2010; Strappazzon *et al.*, 2015). Ainsi, les mitochondries seraient emmagasinées dans les autophagosomes, sans faire intervenir l'ubiquitine. De plus, un autre mécanisme faisant intervenir l'ubiquitine ligase E3 HUWE1 a récemment été décrit (Di Rita *et al.*, 2018).

c. Les pathogènes

En 1984, Rikihisa décrit pour la première fois l'activation de l'autophagie en réponse à une infection. La dégradation spécifique des agents pathogènes tels que les bactéries, les virus ou les parasites, par la voie autophagique a été nommée xénophagie. Initialement étudiée au cours de l'infection par des bactéries comme *Streptococcus pyogenes* et *Mycobacterium tuberculosis*, la xénophagie est maintenant décrite dans un grand nombre d'infections bactériennes (Ju Huang and Brumell, 2014), parasitaires (Choi *et al.*, 2014; Ohshima *et al.*, 2014) et virales (Kyei *et al.*, 2009; Orvedahl *et al.*, 2007).

Les Atg participent aux mécanismes de défense de la souris. En effet, il a été montré dans de nombreuses études que des souris déficientes en certaines protéines Atg telles qu'Atg5, Atg7, Atg165L1 et LC3B ont une diminution des mécanismes de défense suite à une infection. Ces études soulignent le rôle majeur de l'autophagie dans l'élimination de pathogènes (Chen *et al.*, 2014; Choi *et al.*, 2014; Kimmey *et al.*, 2015; Maurer *et al.*, 2015).

d. Le stress du réticulum endoplasmique (pour revue Thiebaut *et al.*, 2019)

Durant le stress du RE, des protéines mal repliées s'accumulent, induisant une réponse adaptative connue sous le nom de l'UPR. Cette réponse est contrôlée par trois grands senseurs transmembranaires : IRE1 (*inositol-requiring enzyme* 1 α), PERK et ATF6 impliqués dans l'activation de voies de signalisation permettant de rétablir l'homéostasie dans le RE (Figure 32).

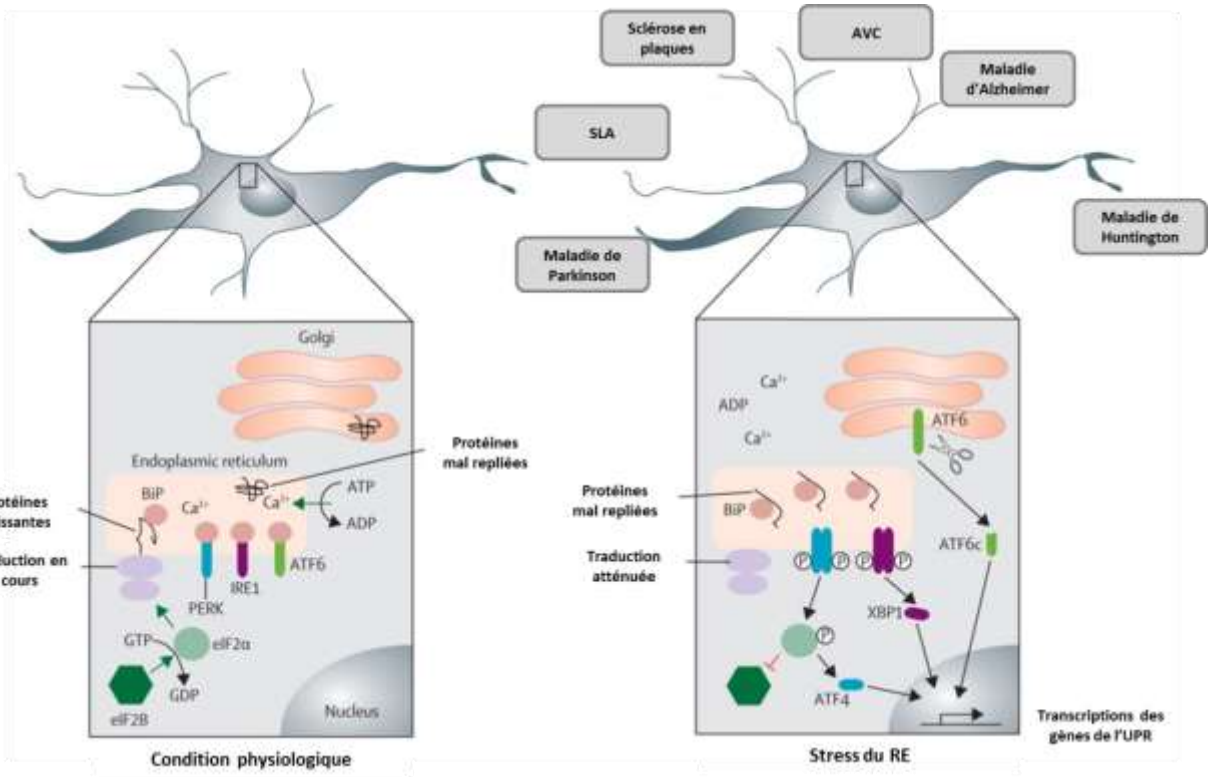


Figure 32 : Le stress du RE

En condition physiologique, les protéines nouvellement synthétisées sont transférées dans la lumière du RE et se replient à l'aide de chaperonnes. Lorsqu'elles sont reconnues correctement repliées, les protéines quittent le RE dans les vésicules. Dans ces conditions, les trois senseurs transmembranaires, IRE1, PERK et ATF6 sont inactivés par BiP (Grp78). Pendant le stress RE, les protéines mal repliées s'accumulent dans la lumière du RE et séquestrent BiP. BiP se détache des senseurs et PERK, IRE1 et ATF6 qui s'activent. Le PERK phosphoryle eIF2α, qui se lie à eIF2B et l'inhibe. Cette inhibition bloque la synthèse de nouvelles protéines sécrétoires et déclenche la réponse intégrée au stress *via* une augmentation de l'ATF4. L'activation d'IRE1 conduit à la génération de XBP1 actif et le clivage d'ATF6 génère ATF6c. Ces facteurs de transcription coopèrent pour induire la transcription de gènes cibles de la réponse UPR. SLA : sclérose latérale amyotrophique. D'après Roussel *et al.*, 2013.

Ces trois senseurs peuvent également être responsables de l'activation de l'autophagie (Figure 33) :

- PERK : Lorsque des protéines mal repliées s'accumulent dans le RE, PERK s'active et peut induire l'autophagie (Kouroku *et al.*, 2007). De plus, des cibles en aval de PERK, telles que ATF4 et CHOP (CCAAT-*enhancer-binding protein homologous protein*), induisent la transcription de gènes liés à l'autophagie en réponse à la fois au stress du RE et à une carence en acides aminés (B'chir *et al.*, 2013). Au cours de l'hypoxie, un stress du RE est induit et ATF4 est stabilisé. Ce dernier facilite l'élongation de l'autophagosome en augmentant l'expression de LC3B (Rzymski *et al.*, 2010). La voie

PERK/eIF2α est impliquée dans l'induction de l'autophagie dans un modèle murin de la maladie de Huntington. Il a été reporté que les agrégats de PolyQ72 (*expanded polyglutamine* 72 *repeat*) activent de la voie PERK/eIF2α, favorisant l'expression d'Atg12 et la conversion de LC3-I en LC3-II (Kouroku *et al.*, 2007).

❖ IRE1 : IRE1 semble essentiel à l'activation de l'autophagie et à la formation des autophagosomes (Fung and Liu, 2019; Ogata *et al.*, 2006). En effet, dans les cellules déficientes en IRE1, l'autophagie induite par le stress du RE est inhibée (Ogata *et al.*, 2006). IRE1 est capable d'activer la voie JNK (Chen *et al.*, 2014; Urano *et al.*, 2000) impliquée dans la dissociation de Beclin1/Bcl-2 (Cheng *et al.*, 2014; Wei *et al.*, 2008). A contrario, dans les cellules infectées par le coronavirus, IRE1 induit la formation des autophagosomes de manière indépendante de JNK et Beclin1. Ce mécanisme fait toutefois intervenir Atg5 (Fung and Liu, 2019). En outre, IRE1 induit également l'autophagie en activant AMPK en réponse à l'oxyde nitrique (Meares *et al.*, 2011). La cible la plus connue d'IRE1 est l'ARNm de XBP1 (X-*box Binding Protein* 1) qui subit un épissage conduisant à un décalage du cadre de lecture lors de la traduction de la protéine. Ainsi, l'ARNm est traduit en un facteur de transcription actif, XBP1s (s : *spliced*). L'activation de l'axe de signalisation IRE1/XBP1s induit l'expression d'un certain nombre de gènes cibles de l'UPR comme des gènes codant pour des protéines de la voie ERAD (ER-*associated degradation*) ou des chaperonnes (Calfon *et al.*, 2002). Il a été montré que l'interaction de XBP1 avec FoxO1 régule l'autophagie induite par le stress du RE (Kishino *et al.*, 2017). Dans les cellules endothéliales, XBP1s active l'autophagie en induisant la transcription de Beclin1 (Margariti *et al.*, 2013). De manière intéressante, un criblage génétique chez la Drosophile montre que la perte de fonction de XBP1 et la surexpression de XBP1s conduisent à l'induction de l'autophagie (Arsham et Neufeld, 2009).

❖ ATF6 : Ce senseur est également impliqué dans l'autophagie induite par le stress du RE. En augmentant l'expression de DAPK1 (Gade *et al.*, 2014), ATF6 favorise la dissociation de Beclin1 de Bcl2, conduisant à l'activation de l'autophagie (Zalckvar *et al.*, 2009).

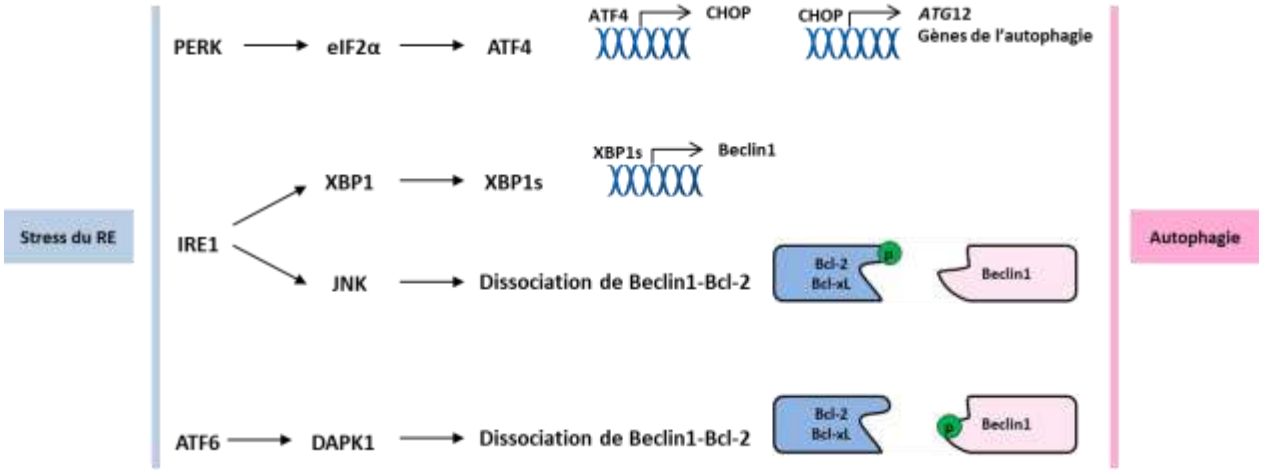


Figure 33 : Les liens entre les trois voies de signalisation de l'UPR et l'autophagie.
Le senseur PERK phosphoryle eIF2α qui active en retour ATF4. Le facteur de transcription ATF4 permet l'activation transcriptionnelle de CHOP impliqué dans la transcription de gènes de de l'autophagie. Le senseur IRE1 est impliqué dans l'épissage de XBP1. XBP1s induit la transcription de Beclin1. IRE1 peut aussi induire une autophagie en activant la voie JNK impliquée dans la dissociation de Beclin1 et de Bcl-2. De la même manière, ATF6 active DAPK1, responsable de la phosphorylation de Beclin1 et de son détachement de Bcl-2.

e. L'hypoxie

Comme il a été décrit précédemment, l'AMPK est considéré comme le senseur énergétique principal de la cellule. En conséquence, lors d'une hypoxie, AMPK est activée. Cette activation est responsable de l'inhibition de mTORC1 (Schneider *et al.*, 2008). Il a été montré *in vitro* qu'une hypoxie avec ou sans sevrage en glucose induisait une inhibition de mTORC1 et, par conséquent, une activation de l'autophagie (Ding *et al.*, 2018; Fletcher *et al.*, 2013; Li *et al.*, 2007; Lv *et al.*, 2017). Dans de nombreux types cellulaires, notamment dans fibroblastes embryonnaires de souris, l'autophagie induite par l'hypoxie semble être dépendante de HIF-1α (*hypoxia inducible factor*-1α). Ce facteur de transcription, activé par la voie mTORC1/p70S6k (p70 *ribosomal protein* S6 *kinase*), est stabilisé en condition d'hypoxie et induit l'expression de BNIP3 (Bcl-2/*adenovirus* E1B 19-kDa *interacting protein* 3) et BNIP3L (BNIP3 *like*, aussi nommé *nineteen* kD *interacting protein* 3-*like protein* X, NIX), des récepteurs possédant un domaine BH3. Grâce à ce domaine, ils se lient à Bcl-2/Bcl-xL et libèrent Beclin1, favorisant ainsi l'activation du complexe PI3KC3 (Bellot *et al.*, 2009; Zhang *et al.*, 2019).

L'hypoxie est une des conséquences de l'AVC ischémique. En effet, la chute de débit sanguin suite à l'obstruction d'un vaisseau cérébral conduit à une diminution de l'apport en oxygène et en glucose dans le parenchyme cérébral. Ainsi, lors d'une ischémie cérébrale, une activation de l'autophagie est observée dans le cerveau. Ce processus sera discuté dans la suite du manuscrit.

Pour résumer cette troisième partie, l'autophagie est un processus sélectif induit en condition de stress métabolique et nutritionnel permettant la dégradation des protéines et des organelles cellulaires.

L'autophagie est composée de trois grandes étapes. L'étape d'initiation conduit à la formation d'une double membrane, appelée phagophore. Une fois formé, le phagophore va s'allonger et se refermer pour créer l'autophagosome. Cette étape d'élongation fait intervenir deux conjugués: Atg12-Atg5 et LC3-II. Enfin, l'autophagosome, en utilisant les microtubules comme « rail directionnel » et le complexe dynéine-dynactine comme moteur, va transloquer dans la zone péri-nucléaire où il pourra fusionner avec un lysosome.

Le flux autophagique peut être étudié grâce à (i) la conversion de LC3-I en LC3-II, l'augmentation de LC3-II reflète une hausse du nombre d'autophagosomes (ii) l'expression protéique de p62, une diminution de p62 traduit une dégradation lysosomale (iii) l'expression des différentes protéines Atg notamment Atg5 et Atg12.

Pharmacologiquement, l'autophagie peut être activée par l'inhibition de mTORC1 en utilisant la rapamycine. Elle peut être inhibée en bloquant PI3KC3 (3-méthyladénine and Wortmannin) ou en bloquant la fusion autophagosome-lysosome (Chloroquine et Bafilomycine).

To summarize this third part, autophagy is a selective process induced under condition of metabolic and nutritional stress allowing the degradation and the recycling of proteins and cell organelles.

Autophagy is composed of three main stages. The initiation step leads to the formation of a double membrane, called phagophore. Once formed, the phagophore is going to extend and close to create the autophagosome. This elongation step involves two conjugates: Atg12-Atg5 and LC3-II. Finally, the autophagosome, using microtubules as "directional rail" and the dynein-dynatin complex as a motor, will translocate in the peri-nuclear zone where it will be able to fuse with a lysosome.

The autophagic flow can be studied by (i) the conversion of LC3-I into LC3-II, the increase of LC3-II reflects an increase in the number of autophagosomes (ii) the expression of p62, a decrease in p62 indicates a lysosomal degradation (iii) the expression of the different Atg proteins including Atg5 and Atg12.

Pharmacologically, autophagy can be activated by inhibition of mTORC1 using rapamycin. It can be inhibited by blocking PI3KC3 (3-methyladenine and Wortmannin) or by blocking autophagosome-lysosome fusion (Chloroquine and Bafilomycin).

D. L'autophagie dans l'AVC ischémique

I. L'activation de l'autophagie dans l'AVC ischémique

Nitatori et collègues ont été les premiers à démontrer, au microscope électronique, une augmentation du nombre de lysosomes dans les neurones pyramidaux CA1, trois jours après une ischémie cérébrale transitoire (Nitatori *et al.*, 1995). Ces lysosomes co-localisent en immunocytochimie avec la cathepsine-B, une protéase intervenant dans la dégradation lysosomale, suggérant que ces lysosomes ont déjà fusionnés avec un autophagosome (Nitatori *et al.*, 1995). Après une ischémie-hypoxie (ligature de l'artère carotide commune droite suivi d'une hypoxie de 2 heures 30), Beclin1 est activée dans les neurones de rats âgés de 7 jours. Cette activation est associée à une augmentation de LC3-II. Ce phénomène n'est observé que du côté ipsilatéral, au sein de l'hippocampe et du cortex (Carloni *et al.*, 2008). De la même manière, 6 heures après une occlusion permanente de l'ACM, Beclin1 et LC3 II sont augmentés dans la pénombre ischémique de rats adultes (Rami *et al.*, 2008).

Chez des ratons âgés de 7 jours, l'hypoxie-ischémie cérébrale induit une augmentation du nombre d'autophagosomes (augmentation de LC3-II), mais également de l'activité lysosomale, suggérant une hausse du flux autophagique. L'augmentation de l'activité lysosomale est mise en évidence par un enrichissement de l'expression de cathepsine-D et de LAMP-1, dans les neurones endommagés de l'hippocampe et du cortex (Ginet *et al.*, 2009). De la même manière, une autre étude confirme une hausse de l'autophagie (augmentation de l'expression de LC3-II et de cathepsine-D) chez des ratons âgés de 12 jours ayant subi une occlusion permanente de l'ACM (Puyal *et al.*, 2009). Par ailleurs, l'ischémie permanente chez le rat adulte favorise également la formation d'autophagosomes (augmentation de l'expression de LC3-II) et d'autolysosomes (augmentation du taux de protéines cathepsine-B) (Wen *et al.*, 2008).

Cependant, Liu et collaborateurs expliquent que, malgré son augmentation après un AVC ischémique, le processus d'autophagie est altéré et ne fonctionne pas de manière optimale (Liu *et al.*, 2010). En effet, l'utilisation d'un inhibiteur de l'autophagie bloquant la fusion autophagosome-lysosome : la chloroquine (Mauthe *et al.*, 2018) conduit à une hausse de l'expression de LC3-II dans

les neurones CA1 des animaux contrôles. A contrario, chez les animaux ayant subi une occlusion transitoire des deux artères carotides communes, la chloroquine n'a que très peu d'effet dans la zone ischémiée (CA1 et Gyrus denté). Cela suggère que la fusion des autophagosomes et des lysosomes est déjà altérée dans les neurones ischémiés. Les auteurs proposent l'idée qu'au moins une partie des agrégats protéiques observés après l'ischémie est due à un échec du flux autophagique (Liu *et al.*, 2010).

Néanmoins, de nombreuses publications soutiennent l'idée d'une activation de l'autophagie après un AVC ischémique (Carloni *et al.*, 2010; Ruan *et al.*, 2012; Sheng *et al.*, 2012; Shi *et al.*, 2012; Wang *et al.*, 2011; Zheng *et al.*, 2009). De plus, une étude réalisée sur 37 patients victimes d'un AVC ischémique aigu révèle que les concentrations de Beclin-1 et de LC3 dans le LCR et dans le sérum sont plus élevées chez les patients ischémiés que chez les individus sains (Li *et al.*, 2015). Par ailleurs, les taux de Beclin1 et de LC3 dans le LCR corrèlent positivement avec le volume de l'infarctus et la gravité du déficit neurologique (score NIHSS, *national institutes of health stroke scale*) et corrèlent négativement avec la récupération neurologique (échelle de Rankin modifiée). Cette relation n'est cependant pas retrouvée pour les taux sériques de Beclin1 et de LC3 (Li *et al.*, 2015). En outre, il a été rapporté que certains gènes de l'autophagie et de l'apoptose sont différentiellement exprimés chez les patients ayant subi un AVC ischémique en comparaison à des contrôles sains (Guo *et al.*, 2017). L'autophagie n'est pas seulement observée dans les neurones : elle est également exacerbée dans les cellules gliales (Pengyue *et al.*, 2017; Qin *et al.*, 2010; Yang *et al.*, 2015) et dans les cellules endothéliales (Han *et al.*, 2011; Haiying Li *et al.*, 2014) après une ischémie cérébrale.

En 2005, Zhu et ses collaborateurs ont étudié l'influence de l'âge sur l'activation de l'autophagie suite à une hypoxie-ischémie cérébrale. Bien qu'en condition physiologique, le nombre d'autophagosomes soit plus important dans le cerveau des souriceaux, après une hypoxie-ischémie, l'augmentation de LC3-II est plus prononcée dans le cerveau mature (souris âgées de 21 et 90 jours) que dans le cerveau immature (souris âgées de 5 et 9 jours) (Zhu *et al.*, 2005). En 2006, ces auteurs ont également évalué l'influence du sexe sur l'autophagie après une hypoxie-ischémie cérébrale, mais n'ont trouvé aucune différence sur les niveaux de LC3 (Zhu *et al.*, 2006).

Pour corroborer l'activation de l'autophagie en condition d'ischémie, de nombreuses voies de signalisation liées à l'autophagie sont également activées :

- La voie Akt/CREB : Lors de l'hypoxie-ischémie néonatale, Akt et CREB sont activées dans les neurones et phospho-Akt et phospho-CREB sont tous les deux co-localisés avec Beclin1. Dans ce modèle, l'effet neuroprotecteur de l'autophagie activée par la rapamycine, est associé à l'activation de l'axe PI3K/Akt/mTOR et à la phosphorylation du facteur de transcription CREB (Carloni *et al.*, 2010).

- La voie AMPK et mTORC1 : Comme décrit précédemment, au cours d'un AVC ischémique, la diminution d'ATP augmente le rapport AMP/ATP, activant AMPK. L'AMPK activé conduit à la phosphorylation de TSC1/2 et à l'inhibition de l'activité de mTORC1 *via* Rheb. Plusieurs groupes ont montré l'implication de la voie de signalisation AMPK dans l'activation de l'autophagie suite à une ischémie cérébrale (Dai *et al.*, 2017; Gabryel *et al.*, 2014; Jiang *et al.*, 2014; Wang *et al.*, 2012). En outre, une étude réalisée chez la souris a montré que l'inhibition d'AMPK restaure l'activité de mTORC1 et inhibe l'autophagie induite par une ischémie cérébrale focale (Fu *et al.*, 2016).

- HIF-1α : L'autophagie peut également être augmentée par HIF-1α. L'hypoxie provoquée par l'AVC ischémique serait responsable de la surexpression et de la stabilisation de ce facteur de transcription impliqué potentiellement dans la transcription de gènes régulant l'autophagie (Niu *et al.*, 2018; Xin *et al.*, 2011; Yang *et al.*, 2014)

- Le stress du RE : Dans l'AVC ischémique, l'autophagie peut être également induite par un stress du RE. Dans un modèle d'ischémie/reperfusion murin, le stress RE, induit par la tunicamycine et la thapsigargine, active l'autophagie et plus particulièrement la mitophagie. Cet effet est dépendant de l'axe eIF2α/ATF4 (Zhang *et al.*, 2014). En outre, une autre étude a montré que l'administration de mélatonine, avant l'ischémie, protège des lésions d'ischémie/reperfusion cérébrales en inhibant l'autophagie induite par le stress du RE. Dans ce modèle, le stress du RE agit sur l'autophagie *via* les voies PERK et IRE1 (Feng *et al.*, 2017).

II. L'autophagie neuronale dans l'AVC ischémique

Nitatori et collaborateurs ont observé, en microscopie électronique, la formation d'autophagosomes dans les neurones CA1 présents au sein de la lésion ischémique (Nitatori *et al.*, 1995). Suite à une occlusion de l'artère carotide commune droite, les neurones corticaux, situés dans le tissu ischémié, présentent de multiples vacuoles cytoplasmiques ainsi qu'une lyse des organites cellulaires (Adhami *et al.*, 2006). Plusieurs études corroborent ces résultats et confirment l'existence d'une autophagie neuronale (Carloni *et al.*, 2008; Ginet *et al.*, 2009; Puyal *et al.*, 2009; Rami *et al.*, 2008). Il semble que l'autophagie neuronale apparaisse dès le début de l'ischémie cérébrale. En effet, les autophagosomes et les autolysosomes sont observés, en microscopie électronique, seulement 1 heure après une occlusion de l'ACM et continuent d'augmenter 12 heures après l'ischémie (Wen *et al.*, 2008). Dans la lignée de ces résultats, Tian et collaborateurs, en utilisant de nouvelles souris transgéniques possédant une protéine LC3-GFP (*green fluorescence protein*), ont montré une augmentation du nombre d'autophagosomes dans les neurones du côté ipsilatéral à 1, 3 et 6 jours après une occlusion transitoire de l'ACM. Le pic du nombre d'autophagosomes se situait à 1 jour post-ischémie. De plus, les cellules positives pour la protéine GFP-LC3 étaient principalement des neurones plutôt que des astrocytes ou des cellules microgliales (Tian *et al.*, 2010).

Bien qu'il soit clairement établi que l'AVC ischémique est responsable d'une augmentation de l'autophagie dans les neurones situés dans la lésion, son rôle reste controversé. La grande question est la suivante: l'autophagie est-elle protectrice ou délétère dans l'ischémie cérébrale? En effet, de nombreuses études *in vitro* et *in vivo* démontrent parfois des effets opposés de l'autophagie.

1. Le rôle neuroprotecteur de l'autophagie neuronale dans l'AVC ischémique

Durant un AVC ischémique, les neurones situés au sein de la lésion ischémique présentent de nombreux agrégats protéiques. En effet, l'ischémie cérébrale épuise l'ATP et modifie l'homéostasie intracellulaire, désactivant ainsi les systèmes de contrôle qualité des protéines dépendant de l'ATP notamment les chaperonnes moléculaires et les enzymes de repliement (Hu *et al.*, 2001; Hu *et al.*, 2000). Ces altérations peuvent entraîner une surcharge de protéines mal repliées dans les neurones conduisant à un stress du RE (Louessard *et al.*, 2017; Roussel *et al.*, 2013). En conséquence, les

protéines mal repliées et les polypeptides naissants non traités, ainsi que les ribosomes et les chaperonnes, sont empilés et progressivement agrégés au cours de la phase post-ischémique. L'agrégation de protéines est un processus pratiquement irréversible contribuant à la mort neuronale (Zhang *et al.*, 2006). Par ailleurs, chez le rongeur, une occlusion de l'ACM suivie d'une reperfusion conduit à la formation d'agrégats de protéines majoritairement ubiquitinylées (Hochrainer *et al.*, 2012; Zhang *et al.*, 2006).

En se basant sur la capacité de l'autophagie à éliminer les agrégats protéiques et à protéger les cellules de la mort, certains groupes ont étudié l'effet de son activation dans des modèles d'AVC ischémique.

De nombreux groupes ont reporté un effet neuroprotecteur de l'autophagie *via* une activation de l'AMPK (Dai *et al.*, 2017; Jiang *et al.*, 2014). Dai et collaborateurs, ont, par exemple, montré dans un modèle *in vitro* d'AVC ischémique ; l'OGD ; l'effet neuroprotecteur de la sirtuine 1, une protéine mitochondriale impliquée dans la protection contre le stress oxydatif. La sirtuine réduit la mort neuronale en activant l'autophagie *via* la phosphorylation d'AMPK. À l'inverse, l'inhibition d'AMPK conduit à une diminution de l'autophagie et une hausse de la mort neuronale (Dai *et al.*, 2017). Une autre étude a révélé l'effet neuroprotecteur de la nicotinamide phosphoribosyltransférase (ou Nampt) dans l'AVC ischémique. Cette protéine est connue pour être impliquée dans la biosynthèse du NAD (nicotinamide adénine dinucléotide) et dans la réponse inflammatoire (Wang *et al.*, 2012). Il semble que Nampt diminue la mort neuronale en favorisant l'autophagie *via* une régulation de l'axe AMPK/TSC2/mTORC1 (Wang *et al.*, 2012).

L'effet pro-survie de l'autophagie neuronale semble nécessiter la régulation de la voie PI3K/Akt/mTOR et de l'axe Akt/CREB (Carloni *et al.*, 2010; Papadakis *et al.*, 2013). Carloni et collaborateurs ont reporté que l'autophagie, activée par la rapamycine, diminuait la mort neuronale de type nécrotique et réduisait la lésion cérébrale induite par une hypoxie-ischémie chez des ratons âgés de 7 jours (Carloni *et al.*, 2008). L'effet neuroprotecteur de la rapamycine a été confirmé dans différents modèles d'AVC ischémique *in vivo* (Buckley *et al.*, 2014; Chauhan *et al.*, 2011). Par exemple chez le rat, la rapamycine réduit significativement le volume de l'infarctus, l'œdème cérébral et les déficits moteurs induits par l'occlusion focale permanente d'un vaisseau cérébral (Sheng *et al.*, 2010).

De surcroit, le complexe PI3KC3 semble également être important dans l'effet neuroprotecteur de l'autophagie. Ainsi, l'inhibition de l'autophagie par la 3-methyladenine (3-MA), un inhibiteur de PI3KC3, conduit à une hausse de la nécrose neuronale dans un modèle néonatal d'hypoxie-ischémie (Carloni *et al.*, 2010). Un traitement à la 3-MA augmente également la taille de la lésion consécutive à une occlusion de l'ACM chez le rat (Wang *et al.*, 2012) et chez la souris (Zhang *et al.*, 2013). D'autre part, il a été montré que la β-arrestine 1 interagit avec Beclin1 et PI3KC3/Vsp34. En l'absence de cette protéine, l'activité du complexe PI3KC3 est diminuée, ce qui induit une diminution de l'autophagie et une mort des neurones par apoptose et nécrose, dans des modèles *in vitro* et *in vivo* d'AVC ischémique (Wang *et al.*, 2014). Par ailleurs, la Caveoline 1 est capable d'activer l'autophagie en se liant au complexe PI3KC3. Chez les souris n'exprimant pas la Caveoline 1, l'autophagie est altérée et, en conséquence, les dommages cérébraux induits par une occlusion de l'ACM sont aggravés (Nah *et al.*, 2017).

Les neurones corticaux primaires déficients en Atg7 ont une altération du processus d'autophagie et sont plus sensibles à l'OGD-reperfusion. En effet, en absence d'Atg7, la clairance mitochondriale n'est plus effectuée. Par conséquent, les neurones meurent par apoptose (Zhang *et al.*, 2013). Cette étude confirme l'importance de l'autophagie dans l'homéostasie et la survie neuronale lors d'un AVC ischémique. Finalement, l'induction de l'autophagie a été identifiée comme étant le mécanisme impliqué dans la neuroprotection de la mélatonine (Carloni *et al.*, 2017) et d'un inhibiteur de GSK-3b (Zhou *et al.*, 2011).

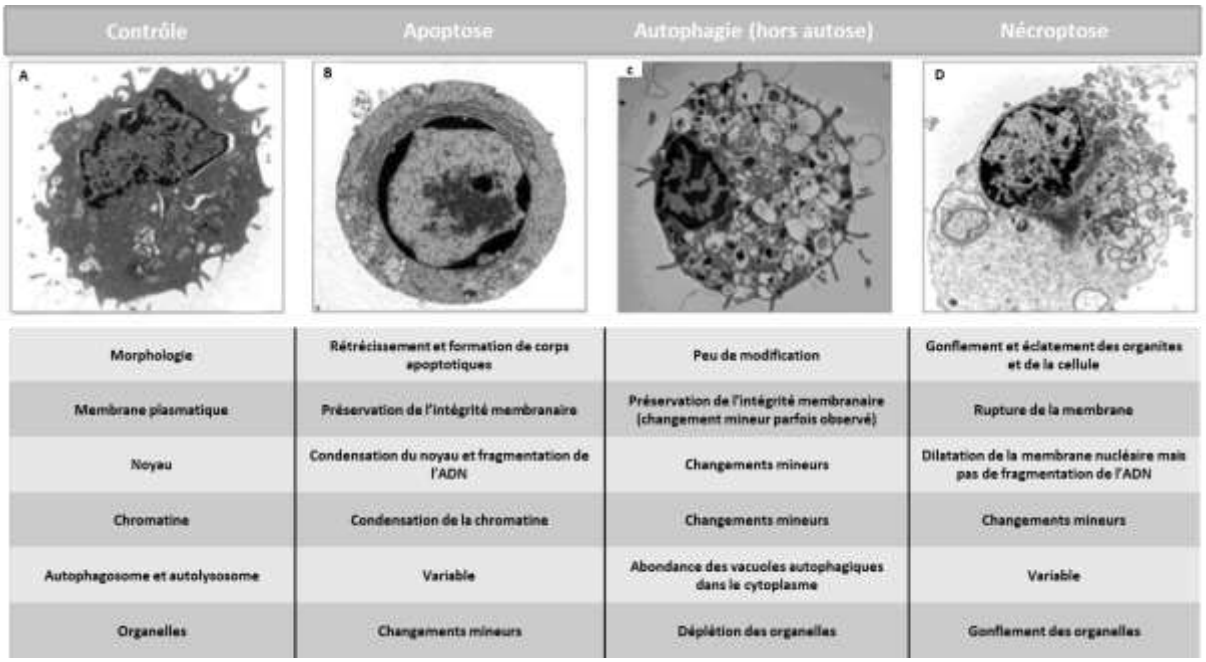
2. L'autophagie : un effecteur de mort neuronale

a. Généralités : l'implication de l'autophagie dans la mort cellulaire

L'autophagie peut être un effecteur de mort cellulaire. Elle peut induire la mort de trois manières principales : (i) de manière directe, c'est la mort cellulaire autophagique (ii) en communiquant avec la voie apoptotique (iii) en communiquant avec la voie de la nécroptose (nécrose programmée).

iii. La mort cellulaire autophagique

En 2004, deux groupes ont mis en évidence le rôle direct de l'autophagie dans la mort cellulaire. Dans un premier temps, Yu et collaborateurs ont montré que l'inhibition de la caspase-8, une protéine effectrice de l'apoptose, induit une mort cellulaire non-apoptotique dépendante d'Atg7 et de Beclin1 (Yu *et al.*, 2004). Dans un second temps, Shimozu et collaborateurs ont montré que des fibroblastes déficients pour les protéines pro-apoptotiques Bax et Bak présentent une mort cellulaire dépendante des protéines Atg5 et Beclin1, lorsqu'ils étaient traités avec des agents pro-apoptotiques. Cette mort cellulaire, associée à une forte abondance d'autophagosomes et d'autolysosomes dans le cytoplasme, est bloquée par des inhibiteurs de l'autophagie (Shimizu *et al.*, 2004). De la même manière, Fazi et collaborateurs ont montré en 2008, une mort cellulaire indépendante des caspases qui se caractérisait par une augmentation de l'expression de Beclin1 et une hausse du nombre d'autophagosomes et d'autolysosomes (Fazi *et al.*, 2008).



Morphologie	Rétrécissement et formation de corps apoptotiques	Peu de modification	Gonflement et éclatement des organites et de la cellule
Membrane plasmatique	Préservation de l'intégrité membranaire	Préservation de l'intégrité membranaire (changement mineur parfois observé)	Rupture de la membrane
Noyau	Condensation du noyau et fragmentation de l'ADN	Changements mineurs	Dilatation de la membrane nucléaire mais pas de fragmentation de l'ADN
Chromatine	Condensation de la chromatine	Changements mineurs	Changements mineurs
Autophagosome et autolysosome	Variable	Abondance des vacuoles autophagiques dans le cytoplasme	Variable
Organelles	Changements mineurs	Déplétion des organelles	Gonflement des organelles

Figure 34 : Les trois types de mort cellulaire programmée et leurs caractéristiques.
A. Une cellule normale observée en microscopie électronique B. Une cellule apoptotique C. Une cellule autophagique D. Une cellule nécroptotique.

Le comité de la nomenclature de la mort cellulaire (*nomenclature committee on cell death*, NCCD) considère la mort cellulaire autophagique comme la mort cellulaire pouvant être supprimée par des

inhibiteurs de l'autophagie (il est conseillé d'inhiber au moins deux protéines autophagiques distinctes) (Galluzzi *et al.*, 2012). La mort cellulaire autophagique (mort cellulaire de type II) fait partie, avec l'apoptose (mort cellulaire de type I) et la nécroptose (mort cellulaire de type II), des trois types de mort cellulaire programmée (Figure 34; Galluzzi *et al.*, 2012).

Il existe trois types de mort autophagique (Figure 35) :

- La mort autophagique due à un excès d'autophagie (Dasari *et al.*, 2017; Shi *et al.*, 2012). Dans ce cas, l'expression de Beclin1 et la conversion de LC3-I en LC3-II sont augmentés (Shi *et al.*, 2012). Cette forme d'autophagie est caractérisée par une accumulation importante de vacuoles autophagiques (autophagosomes et autolysosomes) dans le cytoplasme, une perte progressive des organites et une perturbation des membranes intracellulaires. Le noyau et la chromatine sont relativement bien conservés (Dasari *et al.*, 2017).

- La mort autophagique due à un excès de mitophagie (Reef *et al.*, 2006; Wang *et al.*, 2014; Zhang *et al.*, 2015). Caractérisé par une formation aberrante d'autophagosomes et d'autolysosomes, l'excès de mitophagie peut induire une clairance trop importante des mitochondries voire une déplétion complète de l'organite. Dans ce cas, la mitophagie induit une perte partielle ou complète de la fonction mitochondriale conduisant une altération de la respiration oxydative et de la production d'ATP. Cette défaillance énergétique peut être à l'origine de la mort cellulaire (Sentelle *et al.*, 2012).

- L'autose est une nouvelle forme de mort autophagique régulée par l'ATPase Na^+/K^+ (Liu *et al.*, 2013). Elle peut être induite par des peptides pro-autophagiques, une carence nutritionnelle ou une hypoxie/ischémie. Ce type de mort autophagique a été observé dans le foie de patients souffrant d'anorexie nerveuse (Kheloufi *et al.*, 2015) et dans les neurones de l'hippocampe de ratons âgés de 7 jours ayant subi une hypoxie-ischémie (Liu *et al.*, 2013). L'autose présente des caractéristiques morphologiques uniques telles qu'une augmentation du nombre d'autophagosomes et d'autolysosomes, une rupture de la membrane plasmique, une convolution nucléaire aux stades précoces, une condensation de la chromatine et un gonflement de l'espace péri-nucléaire aux stades avancés (Liu *et al.*, 2013).

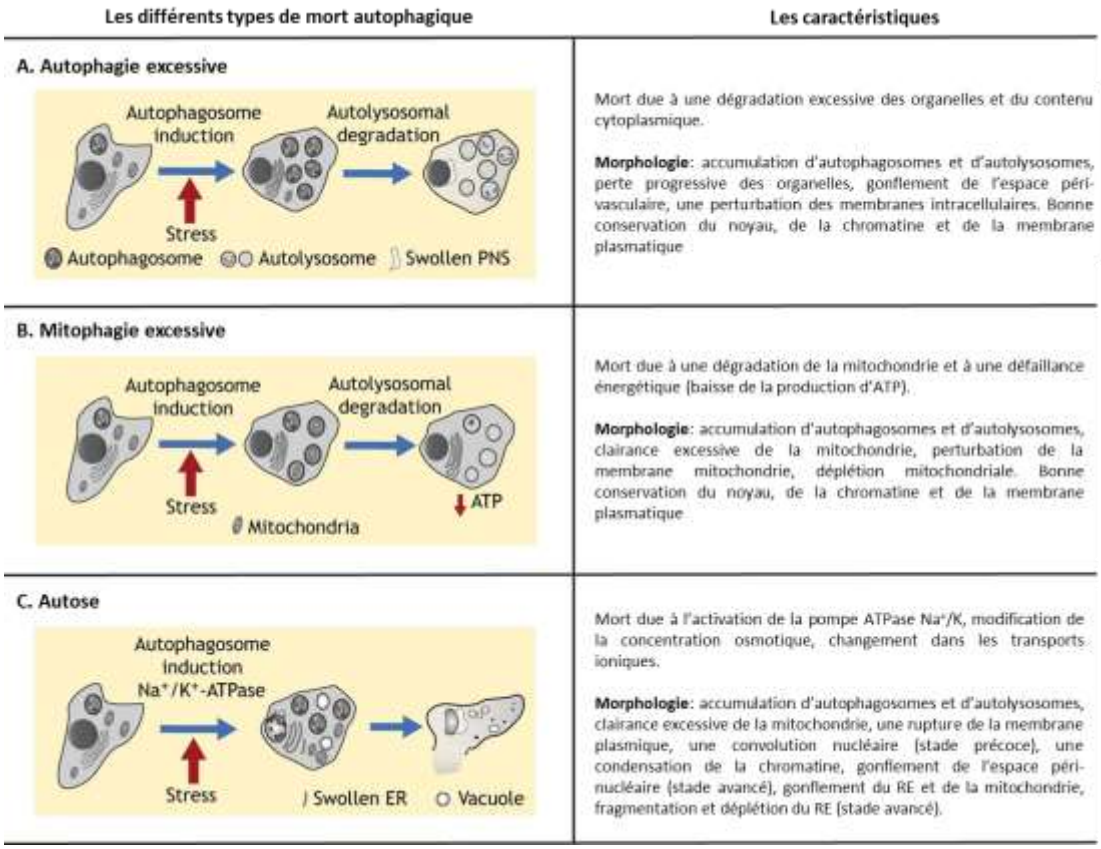


Figure 35 : Les trois types de mort autophagique. D'après Bialik *et al.*, 2018.

iv. La communication apoptose/autophagie

L'apoptose est considérée comme la mort cellulaire de type I (pour la description des mécanismes de l'apoptose, voir la partie A.III.3.c. Apoptose). L'apoptose est caractérisée par le rétrécissement de la cellule sur elle-même, une condensation du cytoplasme et de la chromatine, une fragmentation de l'ADN et du noyau, la formation de corps apoptotique. La membrane plasmique et les organites sont relativement bien conservés dans ce processus (Figure 34).

Il existe une forte communication entre l'apoptose et l'autophagie. Ils peuvent soit agir comme deux mécanismes opposés ou coopérer afin d'induire la mort cellulaire. De nombreuses études ont reporté une coopération entre l'autophagie et l'apoptose. Dans ce cas, les deux processus sont activés afin d'induire la mort cellulaire (Cao *et al.*, 2015; Wirawan *et al.*, 2010). L'autophagie et l'apoptose sont régulées par des médiateurs communs. Ainsi, l'autophagie peut activer l'apoptose à travers différents médiateurs (Figure 36).

Beclin1 est capable d'activer l'apoptose en favorisant l'activité de la caspase-9 (Furuya *et al.*, 2005) et en induisant la libération dans le cytosol de facteurs pro-apoptotiques tels que le cytochrome c (Wirawan *et al.*, 2010). De son côté, Atg5 peut interagir avec FADD (*fas-associated protein with death domain*), une protéine adaptatrice clé de l'apoptose qui, une fois liée aux récepteurs de mort, recrute et active la caspase-8. En conséquence, par l'intermédiaire de FADD, Atg5 active l'apoptose (Pyo *et al.*, 2005). Atg5 peut également être clivé par les calpaïnes afin de générer un fragment C-terminal de 24 kDa. Le petit fragment d'Atg5 est transloqué au niveau de la mitochondrie où il interagit avec Bcl-xL, levant son inhibition sur Bax. Bax ainsi activé favorise la perméabilisation de la membrane mitochondriale, la libération du cythochrome c et l'apoptose (Yousefi *et al.*, 2006). Atg12, de son côté, est capable de se lier, *via* son « BH3-*like* domain », à Bcl-2. Cette interaction conduit à l'inactivation de Bcl-2 qui ne peut plus inhiber Bax (Rubinstein *et al.*, 2011).

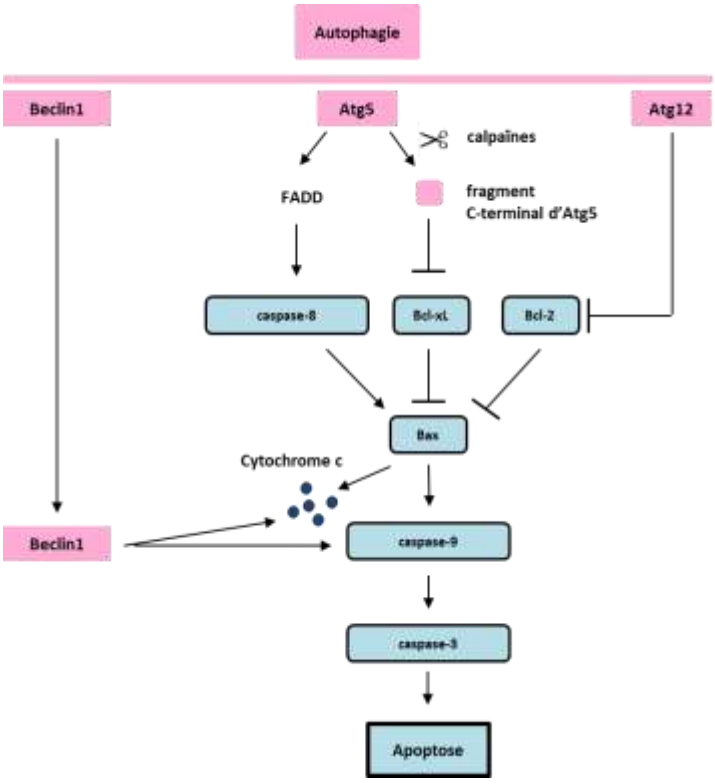


Figure 36 : Activation de l'apoptose par l'autophagie.
L'autophagie peut activer l'apoptose *via* Beclin1 qui active la caspase-9 et favorise la libération du cytochrome c. Atg5 active l'apoptose de deux manières, grâce à FADD qui active la caspase-8 ou grâce aux calpaïnes qui clive Atg5 en un petit fragment C-terminal. Ce fragment migre jusqu'à la mitochondrie pour inactiver Bcl-xL, qui ne peut alors plus exercer son inhibition sur Bax. En conséquence, Bax active les caspases et l'apoptose. Atg12 est capable d'inhiber Bcl-2, ce qui conduit également à l'activation de Bax.

v. La communication nécroptose/autophagie

Plusieurs études ont montré l'existence d'une nécrose programmée nommée nécroptose. Cette dernière est activée en réponse à des signaux multiples tels que des dommages de l'ADN, des toxines et des ligands des récepteurs de mort. Elle se caractérise morphologiquement par un gonflement des organites intracellulaires et une rupture de l'intégrité membranaire. Dans ce type de mort, le noyau et la chromatine restent relativement intacts (Figure 34). La nécroptose est principalement pro-inflammatoire dans le tissu. En effet, elle induit la sécrétion de nombreuses cytokines et médiateurs de l'inflammation. La nécroptose est déclenchée par des récepteurs de mort comme le TNFR1 (*tumor necrosis factor receptor* 1) conduisant à l'activation de deux kinases : RIPK1 (*receptor-interacting protein kinase*) et RIPK3 (Galluzzi *et al.*, 2011). Ces deux protéines, primordiales dans l'initiation de la nécroptose, sont phosphorylées et forment avec FADD le complexe IIb (nécrosome) (Y. Cho *et al.*, 2009). La caspase-8 active peut inhiber la nécroptose en clivant RIPK1 (Y Lin *et al.*, 1999; O'Donnell *et al.*, 2011). En conséquence, lors d'une activation de la caspase-8, la protéine RIPK1 n'induit plus la nécroptose, mais favorise l'apoptose cellulaire en participant au complexe IIa (apoptosome) (Amin *et al.*, 2018; Dillon *et al.*, 2012; Zhang *et al.*, 2019).

Suite à l'activation du complexe RIPK1-RIPK3, l'effecteur MLKL (*mixed-lineage kinase domain like*) est recruté au niveau du nécrosome où il est phosphorylé par RIPK3 (Wang *et al.*, 2014). Cela induit un changement dans sa conformation exposant son domaine N-terminal effecteur de mort (4 *helical bundle domain*, 4HBD). MLKL s'oligomérise avant d'être transloqué à la membrane plasmique où il se lie aux phosphatidylinositol phosphate afin de perméabiliser la membrane plasmique (Dondelinger *et al.*, 2014; Hildebrand *et al.*, 2014). Au niveau de la membrane plasmique, les oligomères de MLKL agiraient comme des canaux ioniques (Huang *et al.*, 2017; Xia *et al.*, 2016). Cependant, leur rôle pourrait être également indirect *via* le recrutement de canaux ioniques tels que TRPM7 (*transient receptor potential cation channel*, *subfamily* M, *member* 7) (Z. Cai *et al.*, 2014). De surcroit, le complexe RIPK1/RIPK3 peut induire la nécroptose en activant la voie JNK responsable de la perméabilisation de la membrane mitochondriale et de la libération de ROS (Jia *et al.*, 2018; Sun *et al.*, 2017). La nécroptose peut aussi être provoquée par l'accumulation de calcium cytosolique engendrant l'activation de CaMKII (*calcium-calmodulin kinase* II) (Figure 37, Nomura *et al.*, 2014).

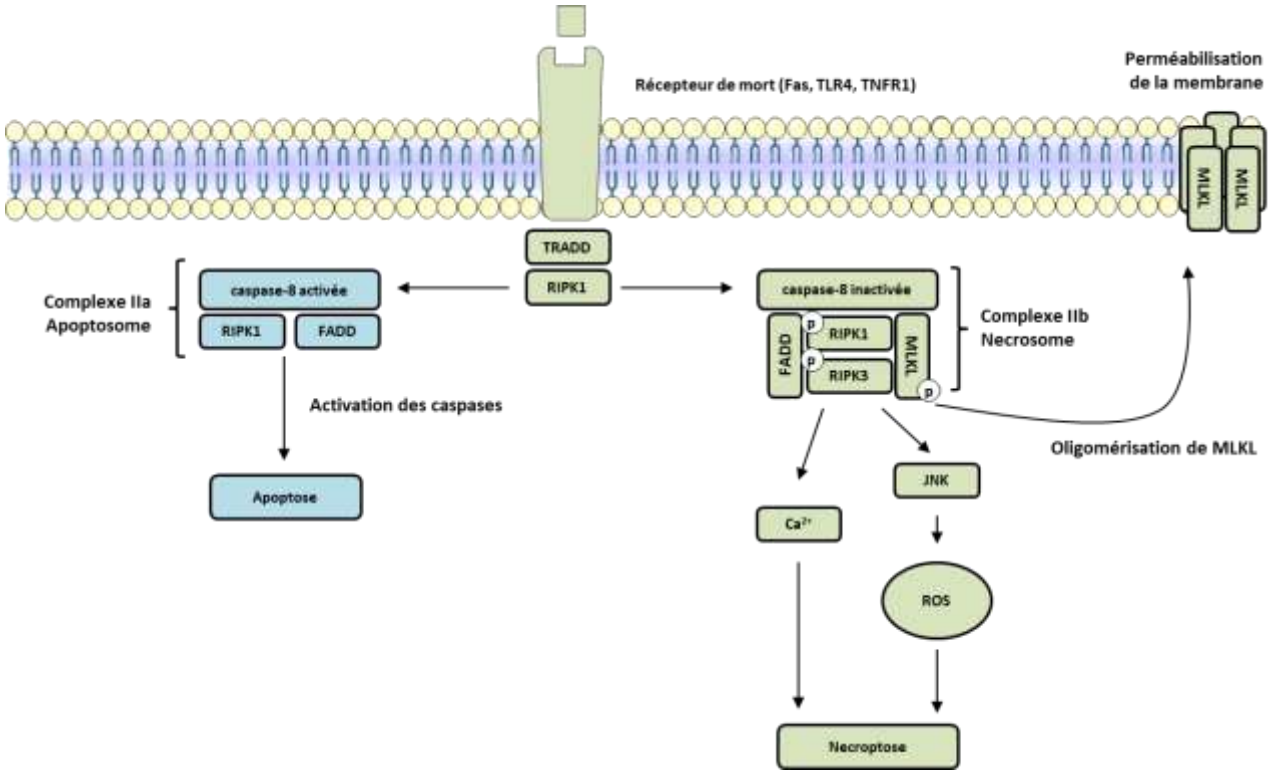


Figure 37 : La nécroptose et l'apoptose induites par les récepteurs de mort.
L'activation des récepteurs de mort induit l'activation de RIPK1 qui favorise l'apoptose en formant le complexe IIa (ou apoptosome) en présence d'une caspase-8 activée. Lorsque la caspase-8 est inactivée, RIPK1 forme avec RIPK3, MLKL et le FADD le complexe IIb (ou nécrosome). La nécrose peut être induite par la voie JNK/ROS ou par une accumulation cytosolique de Ca^{2+}. L'oligomérisation de MLKL joue également un rôle important dans la nécroptose : les oligomères de MLKL perméabilisent la membrane plasmique et favorise l'entrée d'ions dans la cellule conduisant à la nécroptose.

Dans certains cas, l'autophagie favorise la nécroptose cellulaire (Bonapace *et al.*, 2010; Khan *et al.*, 2012). En outre, l'autophagie induit la nécroptose *via* l'activation du complexe RIPK1-RIPK3 (Dey *et al.*, 2016). Par ailleurs, lors d'une suractivation des récepteurs de morts, p62 est capable de recruter le nécrosome *via* son interaction directe avec RIPK1. RIPK1-RIPK3 et l'effecteur MLKL sont ensuite transloqués au niveau de l'autophagosome où ils s'associent avec le conjugué Atg5-Atg12 afin d'induire la nécroptose (Goodall *et al.*, 2016). En l'absence de p62, la mort nécroptotique bascule vers une mort apoptotique, suggérant que l'autophagie joue un rôle de balance entre l'apoptose et la nécroptose (Figure 38; Goodall *et al.*, 2016).

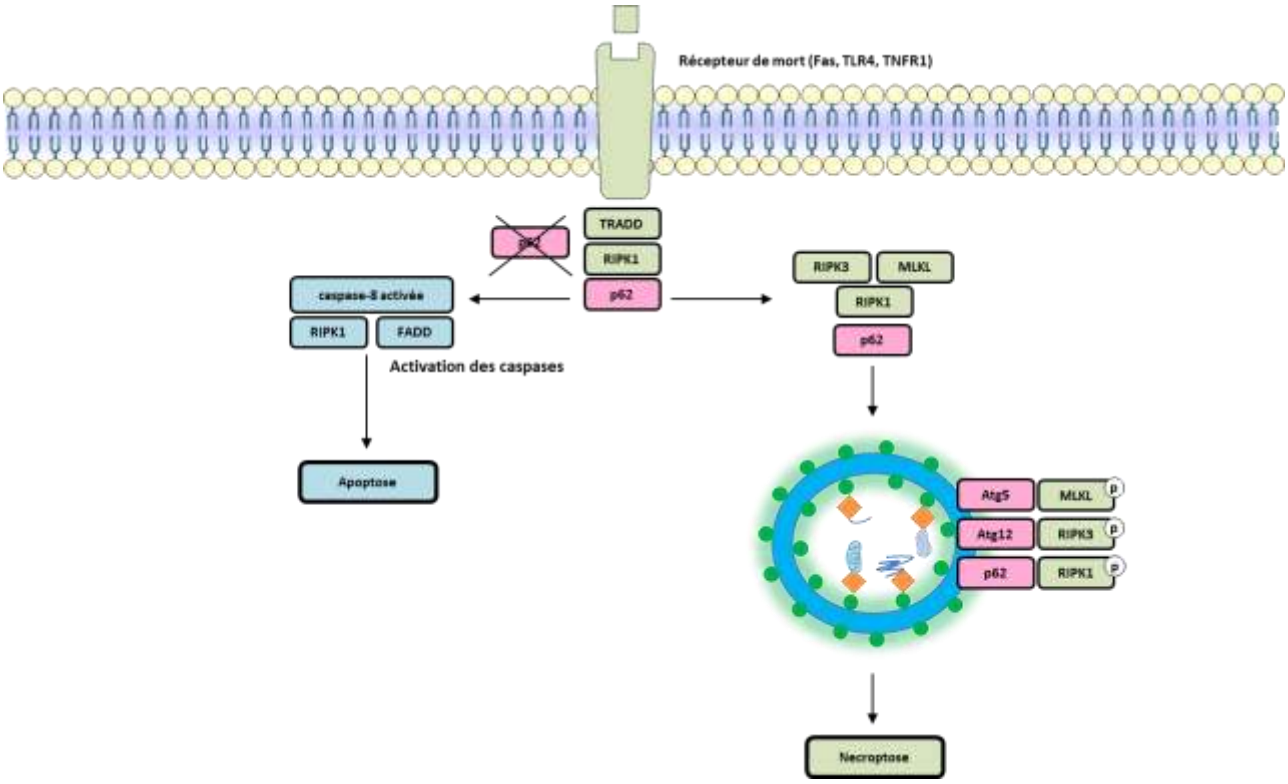


Figure 38 : La communication entre l'autophagie et la nécroptose.
La protéine cargo p62 peut recruter RIK1/RIP3/MLKL en interagissant de manière directe avec RIPK1. Les protéines du nécrosome sont phosphorylées et s'associent à la machinerie de l'autophagie (Atg5-Atg12 et LC3) au niveau de l'autophagosome afin d'induire la nécroptose. En cas de perte de p62, RIPK1 s'associe avec FADD et la caspase-8 active afin d'induire l'apoptose.

b. L'autophagie et la mort cellulaire dans l'AVC ischémique

i. La mort autophagique

Dans les cultures de neurones primaires et des cellules SH-SY5Y soumises à un sevrage en oxygène et en glucose, une augmentation de la mort cellulaire autophagique est observée. Cet effet est bloqué par un inhibiteur de l'autophagie, la 3-MA (Shi *et al.*, 2012). Bao et collaborateurs suggèrent que, dans l'OGD, la 3-MA diminue l'autophagie et la mort neuronale en réduisant l'expression des sous-unités GluR1, GluR2 et GluR3 des récepteurs AMPA. En effet il semblerait que ce soit les récepteurs AMPA qui contribuent à la mort des neurones hippocampiques en augmentant les taux de calcium intracellulaire ainsi que l'autophagie (Bao *et al.*, 2017). Puyal et ses collègues ont utilisé le même inhibiteur chez des rats âgés de 12 jours ayant subi une ischémie cérébrale focale transitoire. Ils ont montré que l'injection intra-ventriculaire post-ischémique de 3-MA, même 4

heures après le début de l'ischémie, réduit considérablement le volume de la lésion (près de 46% de réduction) alors qu'un inhibiteur de l'apoptose ne fournissait aucune protection (Puyal *et al.*, 2009).

De la même manière, la bafilomycine, un inhibiteur de la fusion autophagosome-lysosome reversent partiellement les effets induits par une d'occlusion permanente de l'ACM. Ces deux inhibiteurs agissent, d'une part, en augmentant l'expression de Bcl-2 et, d'autre part, en réduisant le nombre d'autophagosomes et d'autolysosomes, le volume de l'infarctus, l'œdème cérébral et les déficits moteurs (Wen *et al.*, 2008). Plusieurs publications soutiennent l'idée que, dans des modèles *in vitro* et *in vivo* d'AVC ischémique, la diminution de l'autophagie, par la 3-MA et par la bafilomycine, est neuroprotecteur (Cui *et al.*, 2013; Jiang *et al.*, 2017; Ryan *et al.*, 2018).

Dans les neurones primaires, l'inhibition de Beclin1 et Atg7, par l'utilisation de siRNA (*small interferent* RNA), réduit l'autophagie et la mort cellulaire excitotoxique induits par un traitement au kaïnate associés à une hypoxie (Ginet *et al.*, 2014). De plus, les souris déficientes en Atg7 présentent une protection presque complète contre une hypoxie-ischémie induisant une mort des neurones pyramidaux de l'hippocampe (Koike *et al.*, 2008). D'autre part, chez des souriceaux ayant subi une hypoxie-ischémie, une suppression sélective du gène *ATG*7 dans les neurones diminue l'autophagie et réduit de 42% le volume de l'infarctus (Xie *et al.*, 2016). Une diminution du niveau d'expression d'Atg5 contribue également à une réduction du volume de l'infarctus et à une baisse du déficit neurologique dans un modèle rongeur d'occlusion de l'ACM (Wang *et al.*, 2018).

En résumé, des études ont montré que l'inhibition de l'autophagie conduit à une diminution de la mort neuronale et du volume de l'infarctus dans différents modèles d'AVC ischémiques *in vitro* et *in vivo*. Cela suggère que l'autophagie est un processus responsable de la mort neuronale lors d'une ischémie cérébrale.

ii. L'autophagie et l'apoptose

Tian et collaborateurs ont observé, après une ischémie cérébrale, une augmentation du nombre de cellules présentant à la fois une fragmentation de l'ADN et une hausse de l'expression de LC3. L'augmentation de ces cellules est plus importante dans la zone de pénombre que dans le foyer ischémique (Tian *et al.*, 2010). De plus, 6 heures après une hypoxie-ischémie, de nombreux autophagosomes sont détectés au sein des neurones mourants chez des ratons âgés de 7 jours.

Certains neurones mourants présentent des caractéristiques de l'apoptose tels qu'une condensation de la chromatine et du cytoplasme et une préservation des organites. Cela suggère que dans la pénombre ischémique, les neurones en apoptose présentent une forte activation de l'autophagie (Ginet *et al.*, 2009). De façon intéressante, en absence d'autophagie, l'apoptose neuronale est diminuée et le volume de l'infarctus est réduit (Zheng *et al.*, 2009). De surcroît, en 2001, Uchiyama et collègues ont montré que lorsque l'autophagie est inhibée, les cellules PC12 différenciées sont protégées de l'apoptose consécutive à un sevrage en sérum (Uchiyama, 2001).

Il a été démontré que, dans l'AVC ischémique, Beclin1 est impliquée dans l'apoptose. En effet l'inhibition de Beclin1, par l'utilisation d'ARN interférent réduit à la fois l'autophagie et l'apoptose neuronale dans un modèle d'occlusion de l'ACM (Zheng *et al.*, 2009). De plus, l'inhibition de Beclin1 chez le rat bloque la formation des autophagosomes et atténue l'apoptose et les dommages neurodégénératifs dans le thalamus ipsilatéral après une occlusion de l'ACM (Xing *et al.*, 2012).

iii. L'autophagie et la nécroptose

L'apoptose n'est pas le seul mécanisme de mort cellulaire induite par l'ischémie. En 2005, une étude a montré qu'une injection intracérébroventriculaire de nécrostatine-1, un inhibiteur de la nécroptose, causait une diminution du volume de l'infarctus dans un modèle murin d'occlusion de l'ACM (Degterev *et al.*, 2005).

Des travaux récents ont démontré que la nécroptose contribue à la mort neuronale et astrocytaire induite par l'ischémie, *via* une activation de l'autophagie (Ni *et al.*, 2018). En outre, l'inhibition de la nécroptose par la nécrostatine-1 diminue le taux de LC3-II ainsi que l'autophagie (Ni *et al.*, 2018). D'autre part, une inhibition de l'autophagie par la 3-MA bloque la nécroptose neuronale dans un modèle d'ischémie cérébrale globale sévère (occlusion des 4 artères carotides communes durant 20 minutes) (Wang *et al.*, 2011). De la même manière dans un modèle d'ischémie/reperfusion, la bafilomycine, un inhibiteur de la fusion autophagosome-lysosome, diminue la nécroptose (Ryan *et al.*, 2018). L'ensemble de ces résultats suggèrent que, dans l'AVC ischémique, l'autophagie et la nécroptose sont liées, cependant le mécanisme sous-jacent reste inconnu. Toutefois l'équipe de Wang a montré en 2015 que suite à une ischémie cérébrale globale sévère, RIPK3 est surexprimé et transloqué du cytoplasme au noyau, des neurones de l'hippocampe CA1 (B. Yin *et al.*, 2015). La nécroptose ainsi activée conduit à la libération de la cathepsine-B par les lysosomes ; cette

libération étant un facteur de mort neuronale. Finalement, aussi bien l'inhibition de la nécroptose (nécrostatine-1) que l'inhibition de l'autophagie (3-MA) diminue la mort cellulaire en empêchant la libération de la cathepsine-B (Wang *et al.*, 2011; Yin *et al.*, 2015).

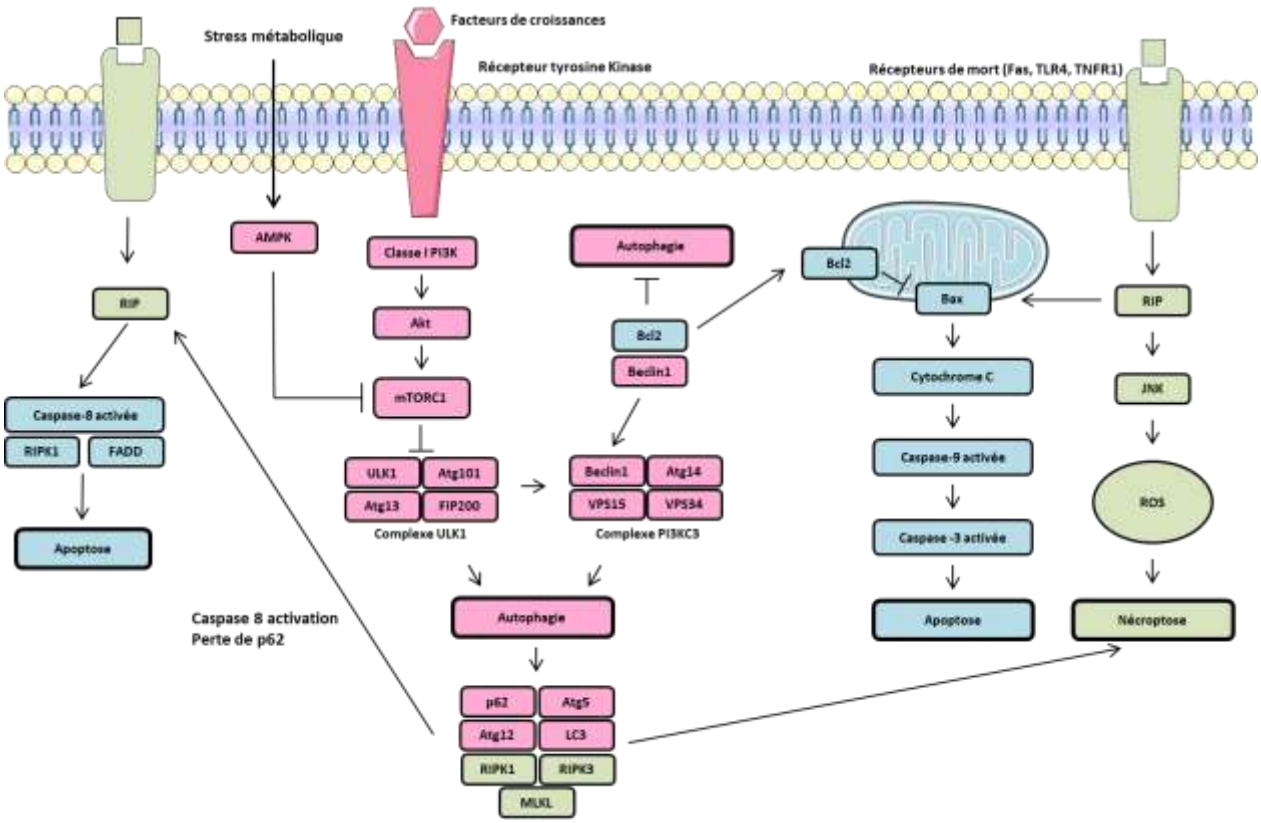


Figure 39 : Schéma récapitulatif de la mort cellulaire dépendante de l'autophagie dans l'AVC ischémique.

Lors d'un AVC ischémique, l'autophagie est activée par AMPK ou par la dissociation de Bcl-2 et de Beclin1. L'activation des protéines RIPK1/RIPK3 par des récepteurs de mort, tels que Fas, TLR4 et TNFR1, est responsable de l'activation de la voie de la JNK, de la libération de ROS et de la nécroptose. Le nécrosome (RIPK1, RIPK3, MLKL) interagit avec les protéines autophagiques afin de promouvoir la nécrose. RIPK1 interagit avec les protéines FADD et la caspase-8 activée pour induire une apoptose extrinsèque. RIPK1 est également impliqué dans l'apoptose intrinsèque (mitochondriale) *via* la libération du cytochrome c, qui active la caspase-9 et la capase-3. D'après Thiebaut *et al.,* 2019.

En conclusion, il est aujourd'hui clairement démontré que l'ischémie cérébrale induit de l'autophagie dans les neurones, Toutefois, son rôle reste débattu. En effet, certaines études démontrent dans des modèles d'AVC ischémique aussi bien *in vitro* et qu'*in vivo* que l'activation de l'autophagie est neuroprotectrice et diminue les lésions ischémiques. À l'opposé, certaines équipes démontrent que l'activation de l'autophagie favorise la mort neuronale et l'étendue des lésions ischémiques. Pour appuyer ces résultats, de nombreuses équipes ont inhibé l'autophagie et montré qu'une diminution de l'autophagie protégeait les neurones de la mort dans l'ischémie cérébrale. Ces résultats opposés nous empêchent aujourd'hui de mettre en lumière le rôle précis de l'autophagie dans l'AVC ischémique.

III. L'autophagie dans les différentes cellules du parenchyme cérébral

1. L'autophagie endothéliale dans l'AVC ischémique

En 2015, Engelhardt et collaborateurs ont publié une étude caractérisant la réponse des cellules de la BHE suite à une hypoxie et à une ischémie. Ils ont montré qu'une lignée de cellules endothéliales microvasculaires cérébrales (*brain microvascular endothelial cells*, BMVEC) présentait une réponse et une sensibilité plus accrue à l'OGD que les astrocytes et les péricytes. Cet effet est associé à la stabilisation de HIF-1α, à la perturbation précoce du cytosquelette cellulaire et à l'altération du métabolisme. De plus, contrairement aux cellules périvasculaires, les BMVECs sont incapables d'induire de l'autophagie. Ce travail a mis en lumière les réponses différentielles, des BMVECs et des cellules périvasculaires, à l'autophagie et à l'ischémie, ainsi que l'impact potentiel de cet effet sur la stabilité de la BHE (Engelhardt *et al.*, 2015).

Cependant, d'autres études réalisées sur des cultures primaires et non sur des lignées cellulaires contredisent ces résultats. Par exemple, Shi et collaborateurs ont observé une induction de l'autophagie dans les BMVECs primaires soumis à une OGD (Shi *et al.*, 2016). Cette équipe a également démontré que l'autophagie a un rôle neuroprotecteur dans un modèle rongeur d'ischémie/reperfusion. En résumé, l'histone désacétylase 9 atténue l'autophagie ce qui contribue à la mort des BMVECs. De surcroit, le déficit en autophagie conduit à une perte d'expression des jonctions serrées responsables d'une rupture de la BHE (Shi *et al.*, 2016). Une étude publiée en 2014 conforte ces résultats : dans un modèle d'occlusion de l'ACM, le renforcement de l'autophagie par la

rapamycine et le lithium augmente l'expression de la protéine des jonctions serrées Zonula occludens-1 (ZO-1) et limite la rupture de la BHE ainsi que l'œdème cérébral. À l'inverse, la 3-MA intensifie l'apoptose des BMVECs (Li *et al.*, 2014).

À l'opposé de tous ces résultats, Li et collègues ont montré que l'autophagie contribue à la perméabilisation de la BHE suite à une occlusion de l'ACM chez les souris. Cette perméabilisation est due à l'altération des jonctions serrées et à la mort des cellules vasculaires, et est associée à une augmentation de l'autophagie (Beclin1 et LC3). Dans ce modèle la 3-MA a un effet neuroprotecteur (Li *et al.*, 2013).

2. L'autophagie gliale dans l'AVC ischémique

Au cours de l'ischémie cérébrale, les cellules gliales, en particulier les astrocytes, jouent un rôle crucial. En effet, ils sont impliqués dans le transport de l'eau, l'homéostasie ionique, l'absorption du glutamate, la régulation du flux sanguin cérébral, l'inflammation cérébrale, le maintien de l'intégrité de la BHE, la modulation de la neuroplasticité et la sécrétion de facteurs neurotrophiques (Nedergaard *et al.*, 2003). Chez la souris, après une occlusion de l'ACM, les cellules positives pour GFP-LC3 sont des neurones plutôt que des astrocytes ou des cellules microgliales (Tian *et al.*, 2010), suggérant que les cellules gliales sont peut-être plus résistantes à l'autophagie induite par l'ischémie cérébrale.

Néanmoins, quelques groupes signalent que l'ischémie peut induire une augmentation de l'autophagie dans les astrocytes (Engelhardt *et al.*, 2015; Qin *et al.*, 2010; Zhang *et al.*, 2010). En 2010, Qui et collègues ont montré que les autophagosomes commencent à apparaître dans les astrocytes situés dans le cortex ischémié 1 heure après une occlusion de l'ACM. Le nombre de lysosomes augmente, quant à lui, de manière significative 6 heures après l'occlusion de l'ACM (Qin *et al.*, 2010). En outre, ils ont observé dans les astrocytes, une augmentation de l'expression de LC3-II, Beclin-1, LAMP2 et de la cathepsine-B lysosomale. Par ailleurs, la 3-MA et la Bafilomycine diminuent l'autophagie, l'apoptose et la nécrose induites par l'ischémie, ce qui suggère que les voies autophagiques induites par l'ischémie contribuent à la mort astrocytaire (Qin *et al.*, 2010). Les résultats obtenus par Ni et collaborateurs concordent bien avec l'effet délétère de l'autophagie astrocytaire dans l'AVC ischémique: une suppression de RIP1K ou un traitement à la nécrostatine-1

diminue l'autophagie et atténue la mort nécrotique astrocytaire dans le cortex ischémié. Lors d'un AVC ischémique, l'autophagie et la nécrose s'associent pour induire une mort astrocytaire (Ni *et al.*, 2018). De plus, suite à une occlusion de l'ACM, la breviscapine fournit une neuroprotection dans la pénombre en diminuant l'autophagie tant astrocytaire que neuronale (Pengyue *et al.*, 2017).

À l'opposé de ces résultats, Kasprowska et collaborateurs ont montré que l'autophagie astrocytaire est un mécanisme neuroprotecteur dans l'OGD. En effet, une inhibition de l'autophagie cause une apoptose après une OGD courte. À l'inverse, en absence d'autophagie, des temps longs d'OGD induisent une nécrose astrocytaire (Kasprowska *et al.*, 2017). Par ailleurs, l'inhibition d'AMPK, par l'utilisation de siRNA, atténue l'autophagie et diminue la viabilité des astrocytes soumis à une OGD (Gabryel *et al.*, 2014). L'utilisation d'un virus adéno-associé GFAP (*glial fibrillary acidic protein*)-Atg7 accentue l'autophagie dans les astrocytes et diminue l'apoptose neuronale dans une co-culture neurone/astrocyte exposée à une OGD. De la même manière, l'induction de l'autophagie chez la souris atténue les déficits neurologiques après une ischémie/reperfusion (Liu *et al.*, 2018).

En ce qui concerne les cellules microgliales et les oligodendrocytes, leur implication dans l'autophagie induite par une ischémie cérébrale n'est pas réellement claire. En fait, ceci ne fait l'objet que de quelques publications récentes. En 2014, Yang et collaborateurs ont montré que la sténose permanente de l'artère carotide commune accentue l'autophagie dans les cellules microgliales. L'inhibition de l'autophagie microgliale, par la 3-MA, pourrait atténuer les lésions de la substance blanche et améliorer la mémoire de travail (Yang *et al.*, 2014). De plus, chez la souris, la 3-MA diminue l'autophagie microgliale ainsi que la réponse inflammatoire provoquée par une occlusion de l'ACM (Yang *et al.*, 2015).

Il a été démontré que l'activation de l'autophagie dans les oligodendrocytes peut jouer un rôle crucial dans les lésions de la moelle épinière (Mei *et al.*, 2019), la démyélinisation (Smith *et al.*, 2013) et l'atrophie à systèmes multiples (Kaji *et al.*, 2018), mais son rôle dans l'ischémie cérébrale n'a encore jamais été étudié.

IV. La mitophagie dans l'AVC ischémique

Une dysfonction de la mitophagie est associée aux lésions cérébrales ischémiques. En 2013, Zhang et collègues ont montré, en microscopie électronique, que des mitochondries endommagées

étaient emmagasinées au sein des autophagosomes dans la pénombre ischémique à la suite d'une occlusion de l'ACM. Ils ont également montré que l'inhibition de la clairance mitochondriale, par une suppression de l'autophagie (3-MA et délétion d'Atg7), aggrave la mort neuronale induite par l'ischémie *in vivo* et *in vitro* (Zhang *et al.*, 2013).

Au cours de l'ischémie, la fragmentation des mitochondries est provoquée par la Drp1 (*dynamin-related protein* 1). En conséquence, l'inhibition de Drp1 perturbe la fission mitochondriale et contribue à l'accumulation de dommages mitochondriaux. Chez le rat, les mitochondries endommagées favorisent la génération de ROS, la libération du cytochrome c et l'activation de la caspase-3 contribuant à l'augmentation du volume de l'infarctus et à l'aggravation des lésions cérébrales (Zuo *et al.*, 2014).

Plusieurs études concluent en l'effet bénéfique de la clairance mitochondriale (Wang *et al.*, 2019; Zheng *et al.*, 2019). En outre, la rapamycine augmente significativement la mitophagie et réduit le volume de l'infarctus chez le rat (Li *et al.*, 2014). Une activation de la mitophagie dépendante de PARK2 permet, par ailleurs, une extension de la fenêtre de reperfusion (Shen *et al.*, 2017). À l'inverse, lors d'une ischémie cérébrale, la suppression de PARK2 aggrave la mort des cellules neuronales (Zhang *et al.*, 2013). L'ensemble de ces résultats suggère qu'en condition d'AVC ischémique, PARK2 joue un rôle essentiel dans l'effet neuroprotecteur de la mitophagie. Cependant, il semblerait qu'en cas d'ischémie cérébrale, le récepteur mitochondriale NIX (ou BNIP3L) soit capable d'induire la mitophagie de façon indépendante de PARK2. En effet, la phosphorylation de NIX (Ser^{81}) est responsable de la mitophagie induite par l'ischémie-reperfusion et de ses effets neuroprotecteurs (Yuan *et al.*, 2017).

À l'inverse, certains papiers reportent que la mitophagie peut être un mécanisme délétère lors d'une ischémie cérébrale. En outre, l'administration de carnosine inhibe la mitophagie et protège les cellules lors d'une occlusion de l'ACM. L'effet de carnosine passe par une diminution de la phosphorylation de Drp1 et par une baisse de l'expression de Parkin (Baek *et al.*, 2014). De ce fait, les récepteurs mitochondriaux BNIP3 et NIX sont responsables d'une mitophagie excessive lors d'une ischémie cérébrale. Leurs suppressions atténuent la mitophagie et l'apoptose neuronale (Shi *et al.*, 2014). Enfin, un flavonoïde : le kaempférol diminue la phosphorylation Drp1 *via* l'activation

d'Akt. En conséquence, la fission mitochondriale est diminuée protégeant ainsi les neurones des lésions ischémiques induites par le succinate dans les neurones exposés à l'OGD (Wu *et al.*, 2017).

V. Le stress oxydatif, l'inflammation et l'autophagie dans l'AVC ischémique

Le stress oxydatif est déclenché par une accumulation abondante de ROS dans la cellule et conduit à la transcription du facteur NF-κB et à la production de TNF-α et d'IL-6. Ces événements favorisent la réponse inflammatoire. A la suite d'une ischémie cérébrale, une réponse inflammatoire est observée et cette dernière est étroitement liée à l'induction de l'autophagie (Li *et al.*, 2017; Rodrigo *et al.*, 2013).

Une étude récente a montré que dans les cellules de la lignée myéloïde, l'autophagie joue un rôle crucial pendant l'ischémie cérébrale. Les souris ayant une déficience de l'autophagie dans ces cellules présentent une inflammation exacerbée et prolongée, conduisant à un volume d'infarctus plus important. La lésion initiale n'est cependant pas différente par rapport à des souris sauvages (Kotoda *et al.*, 2018).

Par ailleurs, la rapamycine, en augmentant l'autophagie, atténue le taux élevé de ROS et l'apoptose des BMVECs suite à une OGD et à une occlusion de l'ACM. À l'inverse, l'inhibition de l'autophagie favorise l'accumulation de ROS dans les BMVECs et la rupture de la BHE (Li *et al.*, 2014). Récemment, Dai et collaborateurs ont démontré que la sirtuine 3 protège du stress oxydatif en induisant l'autophagie par la régulation de la voie AMPK-mTOR (Dai *et al.*, 2017).

Un traitement anti-inflammatoire favorise également l'autophagie et la neuroprotection : la 2,4-diamino-6-hydroxy-pyrimidine (DAHP) et le triptolide (TP), connus pour leur propriété anti-inflammatoire, ont été utilisé comme prétraitement chez des souris ayant subi une occlusion de l'ACM. Les molécules ont entraîné une augmentation de Beclin1 et de Mcl-1 (*Induced myeloid leukemia cell differentiation protein*) ainsi qu'une réduction de l'apoptose et du volume de l'infarctus (Yang *et al.*, 2015). Enfin, le resvératrol, connu pour ses propriétés anti-inflammatoires et anti-oxydantes, renforce l'autophagie dépendante de la sirtuine 1 et protège contre l'ischémie/reperfusion cérébrale (He *et al.*, 2017). L'ensemble de ces données démontre l'effet protecteur dans l'AVC ischémique, de l'induction de l'autophagie par l'utilisation de molécules anti-inflammatoires et anti-oxydantes.

En revanche, il existe également des études sur les effets délétères de l'autophagie associé au stress oxydatif lors d'un AVC ischémique. En effet, dans les cultures de tranches d'hippocampe exposées à une OGD, l'activation de l'autophagie contribue à la mort cérébrale. Dans cette étude, l'autophagie est délétère en exacerbant le stress oxydatif (Lu *et al.*, 2015).

VI. Le stress du réticulum endoplasmique et de l'autophagie dans l'AVC ischémique

L'homéostasie protéique, essentielle pour le bon fonctionnement et la survie de la cellule, est principalement régulée par la voie UPR et l'autophagie. L'ischémie cérébrale est bien connue pour induire une altération de la protéostasie (Wang and Yang, 2019) ainsi qu'une activation de l'autophagie et du stress du réticulum endoplasmique *via* la voie UPR (Thiebaut *et al.*, 2019).

Lors d'un AVC ischémique, la dérégulation de l'homéostasie calcique dans le RE entraîne une altération de l'activité des chaperonnes et l'activation de l'UPR. Il a été montré dans de nombreux modèles que l'ischémie cérébrale induisait un stress du RE (Thiebaut *et al.*, 2019) responsable de l'arrêt de la traduction des protéines (Hayashi *et al.*, 2003; Kumar *et al.*, 2003). Ce mécanisme implique l'activation de PERK (Li *et al.*, 2005; Rissanen *et al.*, 2006) qui phosphoryle le facteur d'initiation de la traduction, eIF2α, ce qui atténue la synthèse de nouvelles protéines (Althausen *et al.*, 2001; Nakka *et al.*, 2010). En outre, l'expression de CHOP est aussi augmentée lors d'une ischémie cérébrale (Hayashi *et al.*, 2003; Osada *et al.*, 2009; Qi *et al.*, 2004). De la même manière, le senseur IRE1 est activé dans le cortex cérébral de souris ayant subi une occlusion de l'ACM (Morimoto *et al.*, 2007; Tajiri *et al.*, 2004). L'activation du troisième senseur, ATF6, reste aujourd'hui peu décrit (Kumar *et al.*, 2003; Rissanen *et al.*, 2006). L'activation du stress du RE et de l'UPR dans l'ischémie cérébrale est associée à une mort cellulaire (Benavides *et al.*, 2005; Louessard *et al.*, 2017; Tajiri *et al.*, 2004). En conséquence, l'inhibition du stress du RE semble être une cible thérapeutique potentielle pour diminuer la mort cellulaire induite par une ischémie cérébrale (Louessard *et al.*, 2017; Tajiri *et al.*, 2004).

Comme nous l'avons vu, il existe des liens importants entre le stress du RE et l'autophagie. En outre, le RE est une plateforme pour la formation des autophagosomes. Par ailleurs, le stress du RE, *via*

l'activation des différentes branches de l'UPR, peut induire l'autophagie (voir Partie C.IV.2.d. Le stress du réticulum endoplasmique).

Dans un modèle murin d'occlusion de l'ACM, les marqueurs du stress du RE et de l'autophagie augmentent, suggérant une double activation des deux processus (Feng *et al.*, 2017). Lors de l'étude de la protéostasie dans l'ischémie cérébrale, il semble donc important de prêter attention aux deux phénomènes.

Certaines études démontrent également une action de l'autophagie sur le stress du RE. En effet, l'inhibition de l'autophagie dans un modèle d'occlusion de l'ACM chez le rat modifie la réponse au stress du RE et conduit à la stimulation de l'apoptose et à l'élargissement de l'infarctus cérébral (Zhang *et al.*, 2018). De même, Carloni et collaborateurs montrent que l'activation de l'autophagie induit une réduction du stress du RE et une meilleure protection après une hypoxie-ischémie néonatale (Carloni *et al.*, 2014). Une explication possible pourrait être que CHOP induit la mort cellulaire en inhibant l'autophagie (Lei *et al.*, 2017). Cela a été démontré dans les cellules de carcinome hépatocellulaire, où un inducteur du stress du RE, la tunicamycine, augmente l'apoptose. À l'inverse, une activation de l'autophagie diminue l'apoptose induite par le stress du RE (Lei *et al.*, 2017). Cependant, cette hypothèse doit être confirmée dans des neurones soumis à une hypoxie/ischémie.

Enfin, il a été rapporté que le stress du RE provoquait la translocation des chaperonnes du RE à la membrane plasmique. Grp78 est la chaperonne la mieux décrite pour ce mécanisme. En effet, en cas de stress, Grp78 peut se retrouver à la surface de la cellule et agir comme un co-récepteur (Gonzalez-Gronow *et al.*, 2009), avec des rôles dans l'autophagie, le cancer et la neuroprotection (Casas, 2017). Fait intéressant, au niveau de la membrane plasmique, Grp78 peut réguler l'autophagie par au moins deux mécanismes: en activant la voie PI3K/Akt (Liu *et al.*, 2013); et en s'associant au récepteur α2-macroglobuline pour activer la signalisation mTOR (Misra and Pizzo, 2012). En condition d'OGD, Grp78 se trouve également à la surface neuronale et sa liaison au tPA entraîne une diminution de l'activation du stress du RE et une neuroprotection (Louessard *et al.*, 2017).

En résumé, lors d'une ischémie cérébrale, le tPA ,d'une part, favorise la conversion du plasminogène en plasmine et, d'autre part, diminue le stress du RE en interagissant avec Grp78 à la surface de la

cellule (Louessard *et al.*, 2017). Le rôle du tPA sur l'autophagie durant l'AVC ischémique n'a cependant pas encore été étudié. Par ailleurs, il a déjà été montré qu'en condition d'OGD, le tPA protégeait les neurones de la mort en activant l'axe mTORC1/p70S6k et en favorisant la capture du glucose par les neurones *via* GLUT3 (Wu *et al.*, 2012). De plus, Grummisch et collaborateurs ont montré que le tPA favorise la survie des neurones primaires de manière dépendante de mTOR et de JAK (*janus kinases*)-STAT (*signal transducers and activators of transcription*), un système de transduction de signal composé d'un récepteur trans-membranaire, couplé à une enzyme JAK et une protéine STAT (Grummisch *et al.*, 2016). En résumé, bien que le rôle du tPA dans l'autophagie n'ait pas été étudié, il a été montré qu'il était capable de moduler la signalisation mTOR, un axe important dans la régulation de l'autophagie.

De nombreuses études ont reporté une activation de l'autophagie dans les neurones et dans les cellules gliales du parenchyme ischémié. Aujourd'hui, malgré l'évidence de son activation, le rôle de l'autophagie dans l'ischémie cérébrale reste encore débattu.

Lors d'un AVC ischémique, l'autophagie peut être un mécanisme protecteur permettant la clairance de la cellule notamment en dégradant les agrégats protéiques et les mitochondries endommagées. Cependant, d'autres études démontrent un effet délétère de l'autophagie. Par exemple, dans de nombreux modèles animaux, suite à une occlusion de l'ACM, l'activation de l'autophagie exacerbe la mort cellulaire et augmente le volume de lésion. À l'inverse, l'inhibition de l'autophagie semble diminuer les dommages cérébraux. De plus, les animaux déficients pour certaines protéines Atg présentent des lésions ischémiques moins importantes que les souris sauvages.

Cette différence pourrait s'expliquer par les modèles utilisés. Par exemple, une ischémie modérée induirait une activation modérée de l'autophagie. Cette autophagie permettrait la clairance des protéines agrégées et des organites endommagés dans les cellules du parenchyme ischémié, protégeant ainsi les cellules de la mort. À l'inverse, dans des modèles où l'ischémie est trop sévère, l'activation de l'autophagie serait aberrante et induirait une dégradation trop importante des protéines et des organites, provoquant la mort cellulaire.

Numerous studies have been reported on the activation of autophagy in neurons and glial cells of ischemic parenchyma. Today, despite the evidence of its activation, the role of autophagy in cerebral ischemia is still debated.

In ischemic stroke, autophagy is a protective mechanism allowing the clearance of the cell by degrading damaged protein aggregates and mitochondria. However, other studies show a deleterious effect of autophagy. For example, in many animal models, following occlusion of the middle cerebral artery, activation of autophagy exacerbates cell death and increases lesion volume. Conversely, inhibition of autophagy appears to reduce brain damage. In addition, Atg knock out animals have less ischemic lesions than wild-type mice.

This difference could be explained by the different models used in the studies. For example, moderate ischemia would induce moderate activation of autophagy. This autophagy allowed the clearance of aggregated proteins and damaged organelles in ischemic parenchyma cells, thus protecting the cells from death. Inversely, in models with severe ischemia, autophagy activation would be aberrant and would induce too much degradation of proteins and organelles, causing cell death.

Projet de thèse

L'ischémie cérébrale induit une altération de la protéostasie qui se traduit par une activation de l'autophagie et par un stress du RE *via* l'activation de la voie UPR. Bien que la thrombolyse soit utilisée comme traitement dans la phase aigüe de l'AVC, son effet sur la protéostasie n'est pas décrit. Ainsi, une étude réalisée au laboratoire, en 2017 a étudié l'effet du tPA sur le stress du RE dans un modèle d'OGD (Louessard *et al.*, 2017).

L'étude "***Activation of cell surface Grp78 decreases endoplasmic reticulum stress and neuronal death***" a montré que :

- ✓ Le tPA protège les neurones de la mort induite par l'OGD.
- ✓ L'effet du tPA est dépendant de son interaction avec Grp78 à la membrane plasmatique.
- ✓ Le tPA en interagissant avec Grp78 est capable de réduire le stress du RE *via* une diminution de la phosphorylation d'eiF2α.

A l'instar du stress du RE, l'autophagie est activée lors de l'AVC ischémique, cependant, son rôle fait l'objet d'un débat. Certains groupes reportent un effet délétère de l'autophagie alors que d'autres groupes démontrent son rôle protecteur. L'effet du tPA sur ce processus n'a pas encore été décrit à ce jour. Néanmoins, des études ont démontré la capacité du tPA à protéger les neurones de la mort en activant la voie mTOR (Grummisch *et al.*, 2016; Wu *et al.*, 2012). Wu et collaborateurs ont, par exemple, montré, dans un modèle *in vitro* d'AVC ischémique (l'OGD), que le tPA diminuait la mort neuronale de type excitotoxique en activant mTOR. Le complexe mTORC1 activé favorise alors l'accumulation du facteur HIF1-α ainsi que la recapture du glucose *via* le transporteur GLUT3 (Wu *et al.*, 2012). De plus, la même équipe a démontré en 2012 la capacité du tPA à activer AMPK en cas de stress métabolique afin d'induire une recapture neuronale du glucose (Wu *et al.*, 2013). De manière intéressante, ces études démontrent que le tPA est capable d'activer AMPK et mTOR, deux protéines impliquées dans la régulation de l'autophagie.

Étant donné que l'autophagie est un processus important dans l'ischémie cérébrale et que le tPA est couramment utiliser comme traitement dans la phase aigüe de l'AVC ischémique, mes travaux de thèse visent à caractériser l'effet du tPA sur l'autophagie lors d'une ischémie cérébrale.

Pour atteindre cet objectif, des neurones primaires d'embryons de souris sont soumis durant 1 heure à une OGD. La période d'OGD est suivie d'une période de réoxygénation durant laquelle neurones sont remis en condition de normoxie.

Ainsi le projet de ma thèse est de répondre aux questions suivantes:

- ✓ Est-ce que notre modèle d'OGD induit une activation de l'autophagie?
- ✓ Le tPA favorise-t-il ou inhibe-t-il l'autophagie? Si oui, quelles sont les voies impliquées?
- ✓ L'autophagie est-elle délétère ou protectrice dans notre modèle?

Ces travaux ont donné lieu à la rédaction d'une publication : "***The serine protease tPA protects neurons from cerebral ischemia by decreasing autophagy via IGF-1R/PI3K/mTOR pathway***" qui est en cours de préparation.

Résultats

Article 1: "An unsuspected partner for IGF-1R decreases ischemia-induced neuronal death by inhibiting autophagy"

Titre : La serine protéase tPA protège les neurones de l'ischémie en diminuant l'autophagie à travers la voie d'IGF-1R/PI3K/mTOR.

Contexte bibliographique : L'ischémie cérébrale est une pathologie complexe impliquant une cascade de mécanismes cellulaires qui conduisent, entre autres, à une augmentation de l'autophagie dans les neurones. Bien que l'activation de l'autophagie dans l'AVC ischémique soit aujourd'hui un fait avéré, le rôle de l'activateur tissulaire du plasminogène (tPA ; médicament utilisé dans la phase aigüe de l'AVC ischémique et neuromodulateur du système nerveux central) n'a jamais été décrit. Le tPA est une sérine protéase initialement découverte dans le compartiment vasculaire jouant un rôle important dans la fibrinolyse. Mais le tPA est aussi exprimé dans le parenchyme cérébral où il intervient dans le système glutamatergique, la plasticité synaptique et la survie neuronale. Ici, nous avons étudié l'effet moléculaire de l'activateur du plasminogène de type tissulaire (tPA, le médicament actif utilisé en clinique) sur l'autophagie et la mort neuronale.

Matériels et méthodes : Nous avons utilisé un modèle *in vitro* d'ischémie cérébrale consistant à sevrer en oxygène et en glucose (OGD) puis à réoxygéner des neurones corticaux primaires murins avec ou sans tPA.

Résultats : Nous avons montré, dans un premier temps, que l'OGD induisait de l'autophagie *via* une diminution de l'axe PI3K/Akt/mTORC1 ; ici l'autophagie est caractérisée par une augmentation de LC3-II (Light Chain 3-II) et une diminution du récepteur cargo p62. Nous avons ensuite étudié l'effet du tPA sur l'autophagie induite par l'OGD. Nos résultats démontrent que le tPA protège les neurones de la mort induite par l'OGD en réduisant l'autophagie *via* l'activation du récepteur du facteur de croissance à l'insuline (IGF-1R, un récepteur tyrosine kinase) et de la voie PI3K/Akt/mTOR.

Conclusion : Ces résultats montrent que le tPA protège les neurones de la mort cellulaire induite par OGD en diminuant l'autophagie *via* l'axe IGF-1R/PI3k/Akt/mTORC1.

An unsuspected partner for IGF-1R decreases ischemia-induced neuronal death by inhibiting autophagy.

Running title: tPA inhibits neuronal autophagy through IGF-1R/PI3K/AKT/mTOR signalling.

Audrey M Thiebaut[1], Elodie Hedou[1], Charlotte Lechevallier[1], Yannick Hommet[1], Laurent Lebouvier[1], Nicole Déglon[2,3], Denis Vivien[1,4], Benoit D Roussel[1].

1- Normandy University, UNICAEN, INSERM, UMR-S U1237, Physiopathology and Imaging of Neurological Disorders (PhIND), Caen, FRANCE

2- Department of Clinical Neurosciences, Laboratory of Neurotherapies and Neuromodulation, Lausanne University Hospital (CHUV) and University of Lausanne (UNIL), 1011 Lausanne, Switzerland;

3- Neurosciences Research Center (CRN), Laboratory of Neurotherapies and Neuromodulation, Lausanne University Hospital (CHUV) and University of Lausanne (UNIL), 1011 Lausanne, Switzerland.

4- CHU Caen, Caen University Hospital, Department of clinical research, Caen, France

Corresponding author: Dr Roussel Benoit: benoit.roussel@inserm.fr; +33231470213

ABSTRACT

Cerebral ischemia is a complex pathology involving a cascade of cellular mechanisms, leading to the deregulation of proteostasis and to neuronal death. Proteostasis refers to the equilibrium between protein synthesis, folding, transport, and protein degradation. Two important pathways are implicated in the regulation of proteostasis: the unfolded protein response (UPR) and autophagy. While it is now accepted that cerebral ischemia induces ER stress, autophagy activation and cell death, the effect of thrombolysis/energy recovery on proteostasis has been poorly described. Here, we investigated the molecular effect of tissue-type plasminogen activator (tPA, the gold standard thrombolytic agent for the acute phase of stroke) on autophagy and neuronal death. We used an *in vitro* model of cerebral ischemia, consisting in an oxygen and glucose deprivation (OGD) followed by reoxygenation, on murine primary cortical neurons with or without tPA. First, we reported that OGD induced both autophagy and neuronal death through the decrease of PI3K/Akt/mTOR pathways. Then, we investigated the effect of tPA on OGD-induced autophagy. We showed that tPA activates Insulin Growth Factor Receptor (IGF-1R, a tyrosine kinase receptor) and recruits a PI3K/Akt/mTOR pathway to inhibit neurotoxic autophagy. Furthermore, the inhibition of IGF-1R/PI3K/Akt/mTORC1 axis protects from OGD-induced neuronal death by decreasing autophagy. Altogether, these results show that OGD induces a deleterious activation of autophagy, and that tPA protects neurons from OGD-induced cell death by decreasing autophagy *via* an IGF-1R/PI3k/Akt/mTOR pathway.

Key words: stroke, autophagy, tPA, IGF-1R, mTOR

INTRODUCTION

Worldwide, stroke is the second leading cause of death and the most frequent cause of permanent disability in adults [21]. In 2016, there were 13.7 million new stroke cases, including 5.5 million deaths and 116.4 million DALYs (disability-adjusted life-years) [21]. With the increased lifespan and our modern lifestyle, stroke incidence will increase [12, 13]. Stroke can be subdivided into two main categories, with ischemic stroke as the main type, and 15% of haemorrhagic stroke [21]. To date, ischemic stroke can be acutely managed either by endovascular thrombectomy and/or by pharmacological thrombolysis with tPA (tissue-type plasminogen activator) [48]. However, each treatment has some limitations. Endovascular thrombectomy is restricted to large vessels occlusion [4], while thrombolysis with tPA has a short therapeutic window, a low recanalization rate, and a higher risk of haemorrhagic transformation [37, 48]. A better comprehension of ischemic stroke pathophysiology is required to improve prevention, brain protection and repair following the disease.

Ischemic stroke is a complex disease involving a cascade of cellular mechanisms, which deregulates proteostasis and leads to cell death [49]. A key mechanism involved in proteostasis regulation is autophagy [49]. Autophagy is a protein degradation/recycling system highly conserved in all eukaryotes. Autophagy is mandatory to restore or maintain cellular homeostasis under nutrient starvation and metabolic stress such as ischemic stroke [25, 49]. Three types of autophagy have been described: chaperone-mediated autophagy, a selective lysosomal degradative pathway; microautophagy, a non-selective pathway where cytoplasmic material is directly engulfed by lysosomes; and macroautophagy the most common form of autophagy [25]. Macroautophagy is characterized by the synthesis of a double-layered membrane structure called autophagosome-containing cargo targeted for degradation. Autophagosomes then fuse with lysosomes to form autolysosomes resulting in the degradation of their contents. As macroautophagy is the most abundant form of autophagy, we will refer to as “autophagy” in this following.

The main autophagy-regulating pathway is mTOR (mechanistic target of rapamycin). Under physiological conditions, mTORC1 (mTOR Complex1) is phosphorylated and associated with ULK1/2 (Unc-51 like autophagy activating kinase), allowing the phosphorylation of Atg13 and ULK1/2. This inhibits ULK1/2 kinase activity, leading to an inhibition of autophagy [22]. Under pathological

conditions, such as starvation or metabolic stress, mTORC1 is inactivated by dephosphorylation and the ULK1/2 kinase activity is restored. Under ischemic conditions, AMPK (AMP-activated protein kinase), the main energy-sensing kinase, is responsible for mTORC1 inactivation [11, 22, 24]. The activated Ulk1/2 autophosphorylates and phosphorylates both FIP200 and Atg13, which in turn lead to autophagy induction [24].

Stroke is well known to activate autophagy [49], with opposite consequences: a mild autophagy is often neuroprotective, while an overactivation in time is deleterious [41]. The thrombolytic drug tPA also displays opposite effects in the ischemic brain parenchyma (for review see [49]) and particpates in proteostasis by decreasing ischemia-induced ER stress [31]. Remarkably, tPA has been shown to increase neuronal survival in a JAK/STAT/mTOR-dependent manner [15] and tPA is involved in the detection and the adaption to metabolic stress [55]. However, the impact on neuronal autophagy and its consequences during cerebral ischemia have never been studied. Here, a RNAseq study highlights neuronal autophagy as an important pathway activated by ischemia. Accordingly, we found that autophagy is highly activated by both Erk and Akt pathways in an *in vitro* model of cerebral ischemia, contributing to an increase of ischemic death. Finally, we demonstrate that tPA is able to decrease autophagy by modulating the PI3K/Akt/mTORC1 pathway to mediate neuroprotection, and we identify Insulin Growth Factor Receptor (IGF-1R) as a new receptor implicated in autophagy modulation and tPA's interactions.

MATERIAL AND METHODS

Reagents

Dulbecco's modified eagle's medium (DMEM), poly-D-lysine, cytosine β-d-arabinoside, foetal bovine serum, horse serum, D-glucose, tween-20, phosphatase inhibitor cocktail, protease inhibitor cocktail, Triton-100X paraformaldehyde, Picropodophyllotoxin (PPP), Wortmannin, Akt1/2 kinase inhibitor (A6730) and TRI reagent were from Sigma-Aldrich (Saint-Quentin-Fallavier, France). Glutamine, laminin, glucose-free DMEM and Pierce ECL Plus were purchased from Fisher (Illkirch-Graffenstaden, France); AG1478 (N-(3-Chlorophenyl)-6,7-dimethoxy-4-quinazolinanine hydrochloride) and Chloroquine were from Tocris (Bristol, UK); bicinchoninic acid assay (BCA Protein Assay kit) from Pierce (Rockford, IL, USA); human recombinant tPA (rtPA actilyse) from Boehringer Ingelheim (Pacé, France); and Erk1/2 inhibitor (SCH772984) from Selleckchem (Souffelweyersheim, France).

Neuronal cell cultures

Primary cultures of cortical neurons were prepared from foetal mice (embryonic day 14) as previously described [42]. Briefly, cells were cultured on individual glass bottom Petri dishes (MatTek Corporation, Ashland, MA, USA) or 24-well plates, previously coated with poly-d-lysine (0.1 mg/ml) and laminin (0.02 mg/ml), in DMEM supplemented with 5% foetal bovine serum, 5% horse serum and 1 mM glutamine. Cultures were maintained at 37 °C in a humidified 5% CO_2 atmosphere. Cytosine β-D-arabinoside (10 µM) was added after 3 days in vitro (DIV) to inhibit glial proliferation in the 24-well plates.

Oxygen and glucose deprivation (OGD)

Neuronal cultures (12 DIV) were subjected for various times to OGD in a hypoxic chamber (IN VIVO2 500; Ruskinn, AWEL International, Blain, France) programmed at 0.2% O_2, 5% CO_2 and 37 °C in glucose/serum-free deoxygenated DMEM. For reoxygenation, media were switched to oxygenated DMEM completed with D-glucose (4.5 mg/l) under normoxic conditions. Controls were subjected to sham washes.

Neuronal death

Neuronal death was quantified 4 h after reoxygenation by measuring the lactate dehydrogenase (LDH) activity released from damaged cells into the bathing medium with a cytotoxicity detection kit (Roche Diagnostics, Meylan, France).

RNA sequencing

Three RNA-seq libraries per population (three biological replicates) were prepared using the TruSeq Stranded mRNA sample Prep kit (Illumina) and sequenced on an Illumina GAIIx sequencer as 75 bp paired reads by Hybrigenics-Helixio (Clermont-Ferrand, France). Samples were quantified with Qubit 2.0 Fluorometer (Thermo Scientific) and checked with Nanodrop ND-1000 (Thermo Scientific). Libraries were prepared with three kits: NEBNext Ultra II Directional Library prep Kit (New England Biolabs), NEBNext Poly(A) mRNA Isolation Module (New England Biolabs) and NEBNext Multiplex Oligos (New England Biolabs). Sequencing was done with NextSeq 500 (Illumina). Data were processed with Bcl2fastq (Illumina). Raw data were checked with FastQC (Babraham Institute).

Reads were mapped on reference genome (GRCm38, release 91) with TopHat (https://ccb.jhu.edu/software/tophat) and differential expression analysis is done with Cuffdiff (Cufflinks suite, https://github.com/cole-trapnell-lab/cufflinks). It performs tests between supplied conditions. FPKM values were calculated for each transcript in each sample (geometric library normalization, pooled dispersion method). It uses the reference annotation GTF file (GRCm38, release 91) and quantitates the expression values and differential regulation across BAM files.

CummeRbund (https://bioconductor.org/packages/release/bioc/html/cummeRbund.html) R package is designed to process global statistics and quality control.

Immunocytochemistry

After a brief wash in PBS, neuronal cultures grown on glass bottom Petri dishes were fixed during 5 min in 0.1 M PBS containing 4% paraformaldehyde and 5% sucrose. After PBS washes, cells were blocked for 1 h in PBS-Tween20 0.1% containing 2% BSA and then incubated overnight at 4 °C in blocking buffer containing primary antibodies (chicken anti-GFP, 1/1000 abcam ab13970; mouse anti-NeuN 1/800 Millipore MAB377). Primary antibodies were revealed using FITC or Alexa647-

coupled secondary F(ab')2 (1 : 800; Jackson ImmunoResearch). Confocal laser-scanning microscopy was performed using a Leica SP5 confocal microscope (Leica Microsystems SAS).

Immunoblotting

Cells were dissociated in ice-cold TNT buffer (50 mM Tris-HCl pH 7.4; 150 mM NaCl; 0.5% Triton X-100; phosphatase and protease inhibitors cocktails) and centrifuged (12,000 g, 4 °C, 15 min). Protein concentration was measured by BCA Protein Assay method, before migration on a SDS-PAGE gel (Bio-rad, Marnes-la-Coquette, France) and a transfer onto a polyvinylidene difluoride membrane. Membranes were blocked with PBS+0.1% tween-20, 5% milk and incubated overnight at 4 °C in blocking buffer containing primary antibodies. The following primary antibodies and dilutions were used: rabbit mTOR (1/1000, Cell Signalling #2983; Ozyme, Montigny-le-Bretonneux France), rabbit anti-phospho mTOR Ser^{2448} (1/1000; Cell Signalling #2971), rabbit anti-Phospho-mTOR Ser^{2481} (1/1000; Cell Signalling #2974), rabbit anti-Akt (1/1000; Cell Signalling #9272), rabbit anti-phospho Akt Ser^{473} (1/1000; Cell Signalling #9271), rabbit anti-ULK1 (1/1000; Cell Signalling #8054), rabbit anti-phospho ULK1 Ser^{757} (1/1000; Cell Signalling #6888), rabbit anti-p44/42 MAPK (Erk1/2) (1/1000; Cell Signalling #9102), rabbit anti-phospho p44/42 MAPK (Erk1/2) (Thr^{202}/Tyr^{204}) (1/1000; Cell Signalling #9101), mouse anti-SQSTM1/p62 (1/1000, abcam ab56416; Cambridge United Kingdom), rabbit anti-LC3B (1/1000; Sigma-Aldrich L7543), rabbit BECN1 (H-300) (1/1000; Santa-Cruz sc11427; Heidelberg, Germany). Membranes were then incubated with the corresponding peroxidase-conjugated secondary antibodies (1/25000-50000; Sigma-Aldrich) in blocking buffer, and visualized with an enhanced chemiluminescence Pierce ECL Plus kit.

Lentivirus

The pGFP-LC3 was obtained from [23] and cloned in the pENTR4 entry vector (Invitrogen). The GFL-LC3 was then transferred with the LR clonase recombination system in the SIN-cPPT-PGK-gateway vector-WPRE [8] to generate the SIN-cPPT-PGK-GFP-LC3-WPRE plasmid. The lentiviral vector was produced in 293T cells with a four-plasmid system, concentrated by ultracentrifugation and resuspended in phosphate-buffered saline (PBS)/1% bovine serum albumin (BSA) as previously reported [17].

RESULTS

Autophagy pathways are increased by oxygen and glucose deprivation in neurons.

We performed a RNAseq experiment followed by an enrichment pathways analysis (Helixio, Saint-Beauzire, France) on neurons subjected (OGD_{reox}) or not (Ctrl) to 1 hour of OGD followed by 4 hours of reoxygenation (OGD_{reox}) in the presence or not of tPA (300nM). In total 5383 genes are differentially expressed in the Ctrl *versus* OGD_{reox} condition, 5126 in the Ctrl *versus* OGD_{reox} + tPA condition and 229 in the OGD_{reox} *versus* OGD_{reox} + tPA condition (Figure 1A). The enrichment pathway analysis (Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes; KEGG analysis) shows 33 pathways differentially expressed between Ctrl / OGD_{reox} / OGD_{reox} + tPA (Table 1). Among them, 5 are linked to OGD_{reox} or hypoxia/ischemia (Table 1 in red) and 9 are linked to autophagy (Table 1 in green). There seems to be logic in the signalling pathways, as mTOR pathway is the leading regulator of autophagy, and PI3K/Akt and MAPK pathways are upstream regulators of the mTOR pathway. When focusing on these autophagy pathways in each condition, 98 genes are deregulated for PI3K-Akt pathway under OGD_{reox} condition compared to ctrl (Figure 1B), 95 genes in the MAPK pathway (Figure 1C), 57 genes in the mTOR pathway (Figure 1D) and 50 genes in the autophagy pathway (Figure 1E). When tPA is present during OGD_{reox}, only 83 genes are deregulated in the PI3K-Akt pathway compared to Ctrl (Figure 1B), 80 in the MAPK pathway (Figure 1C), 53 in the mTOR pathway (Figure 1D) and 47 in the autophagy pathway (Figure 1E). Furthermore the presence of tPA during OGD_{reox} modifies the expression of 15 genes in the PI3K-Akt pathway compared to OGD_{reox} condition (Figure 1B), 5 in the MAPK pathway (Figure 1C), 1 in the mTOR pathway (Figure 1D) and 1 in the autophagy pathway (Figure 1E). The results also show that, in OGD_{reox} condition with or without tPA, genes are both up-regulated and down-regulated in these four pathways compared to Ctrl (Figure 1F, 1G). Interestingly, the presence of tPA during OGD_{reox} induces the up-regulation of genes in PI3K-Akt and the MAPK pathway and the down-regulation of TSC1, an inhibitor of mTOR and autophagy (Figure 1H, 1G). Altogether these results show that autophagy and pathways leading to autophagy are strongly affected during OGD_{reox}, and it seems that tPA is able to decrease these deregulations.

tPA decreases OGD-induced autophagy in cortical neurons.

To confirm the pathway analysis, we studied autophagy in cortical neurons subjected to OGD_{reox} in the presence or not of tPA (Figure 2A). We studied the autophagic flux by measuring the levels of

both LC3-II (recruited to autophagosomal membranes) and p62 (autophagosome cargo protein that targets other proteins and organites for degradation in autolysosomes). As shown by western blots, the level of LC3-II increases following OGD_{reox} (106.7% increase compared to Ctrl; Figure 2B), reflecting an increase of autophagosome formation, while the level of p62 decreases (66.5% reduction compared to Ctrl; Figure 2C), reflecting an increase of degradation within autolysosomes. This increase of autophagic flux following OGD_{reox} is also confirmed by the use of lentivirus expressing LC3-GFP in neurons (Figure 2D, and quantifications Figure 2E), where puncta of LC3-GFP are increased in OGD_{reox} conditions (Figure 2E). This is also confirmed by the mean fluorescence intensity of LC3-GFP (143.9% increase compared to Ctrl; Figure 2E).

Interestingly, as suggested by the RNAseq analysis, tPA treatment decreases OGD_{reox}-induced autophagy. tPA decreases the number of autophagosomes as shown by LC3-II western blots (42.4% reduction compared to OGD_{reox}; Figure 2B). By using GFP-LC3 lentivirus, we also show a decrease of LC3-GFP puncta following tPA treatment (figure 2D), confirmed by the mean fluorescence intensity (40.1% reduction compared to OGD_{reox}; Figure 2E). This demonstrates that tPA decreases autophagosome formation in neurons following OGD_{reox}. During OGDreox, tPA also decreases organites/proteins degradation in autolysosomes as shown by the increase of p62 (71.6% increase compared to OGD_{reox}; Figure 2C). Several doses of tPA have been tested (from 0.3 to 300nM): only the high dose of tPA is able to inhibit both autophagosome formation and organites/proteins degradation induced by OGD_{reox} (Figure 2F, 2G). However, the lowest dose of tPA (0.3nM) decreases autophagosome formation as shown by LC3-II western blot (27.7% reduction compared to OGD_{reox}; Figure 2F), but has no effect on p62 levels.

OGD-induced autophagy is dependent of the mTOR pathway.

Two main signalling pathways lead to autophagy initiation: Beclin-1 and mTOR pathways [22, 43]. To study how neuronal autophagy is induced under OGD_{reox}, we controlled the level of phosphorylated mTOR. mTOR is a large multidomain protein that exists in two multiprotein complexes: mTORC1 (mTOR complex 1) associated to Raptor, and mTORC2 (mTOR complex 2) associated to Rictor [6]. mTORC1 blocks the initiation of autophagy: when phosphorylated, it inhibits ULK1 complex kinase activity by phosphorylating ULK1 Ser^{757}. ULK1 is a protein needed in the early steps of autophagosome biogenesis [22]. Conversely, when mTORC1 activity is low, under metabolic stress

for example, ULK1 Ser^{757} is dephosphorylated and ULK1 complex kinase activity is restored, conducing to autophagy activation [22, 24]. Here, we measured the levels of phosphorylated mTORC1 (Ser^{2448}; p-mTORC1) following OGD_{reox} (Figure 3A). We observe a decrease in p-mTORC1 under OGD_{reox} (62.4% reduction compared to Ctrl; Figure 3A) reflecting an increase of autophagy, as observed in Figure 2. OGD_{reox} also leads to a decrease of p-ULK1 (Ser^{757}) (57.8% reduction compared to Ctrl; Figure 3B). During OGD_{reox}, tPA prevents the decrease of p-mTORC1 (95.5% increase compared to OGD_{reox}; Figure 3A) and p-ULK1 decrease (82% increase compared to OGD_{reox}; Figure 3B), as shown by western blot analysis. Thus, it reinforces the fact that tPA prevents OGD-induced autophagy.

It is interesting to note that OGD_{reox} also induces a drop in the phosphorylation of mTORC2 (67.7% reduction compared to Ctrl; Figure 3C). However, the effect of tPA on p-mTORC2 seems weaker than its effect on p-mTORC1 as tPA partially prevents the drop of phosphorylation (58.2% increase compared to OGD_{reox}; Figure 3B).

Beclin1 is another signalling pathway able to promote autophagy [25, 43]. We then checked if the level of Beclin1 was impacted or not by OGD_{reox}. Our western blot analysis shows that levels of Beclin1 are not affected by OGD_{reox} or by tPA (Figure 3D), suggesting that only mTORC1 is implicated in the induction of autophagy during OGD_{reox}.

tPA decreases OGD-induced autophagy through the PI3K/Akt pathway.

mTORC1 is phosphorylated under the control of 2 pathways: Erk and PI3K/Akt [7, 18]. A decrease of both Erk and Akt have been previously demonstrated in several stroke models, both *in vivo* and *in vitro* [30]. Here, we confirm that OGD_{reox} leads to a decrease of both p-Erk (71.2% reduction compared to Ctrl; Figure 4A) and p-Akt (64% reduction compared to Ctrl; Figure 4B). This is in line with our previous observations showing that OGD_{reox} leads to autophagy activation by inhibiting mTORC1 (Figure 2 and 3). Interestingly, when tPA is present in the media, the decrease of both p-Erk and p-Akt are partially reversed (68.1% increase compared to OGD_{reox}; and 83.5% increase compared to OGD_{reox}; Figure 4A and 4B).

To establish a link between tPA and autophagy pathways, we used pharmacologic inhibitors of both Erk and Akt signalling: SCH772984 [36] and A6730 [58] respectively. As expected during OGD_{reox},

SCH77 alone (5 µM) does not modify the increase of autophagic flux as shown by the unchanged levels of increased LC3-II (non-significant compared to OGD_{reox}; and 99.6% increase compared to Ctrl; Figure 4C) and the unchanged levels of p62 degradation (non-significant compared to OGD_{reox}; and 48.4% reduction compared to Ctrl; Figure 4F). When added with tPA, SCH77 reverses neither the drop of LC3-II (non-significant compared to tPA; and 41.5% reduction compared to OGD_{reox}; Figure 4D), nor the increase of p62 (non-significant compared to tPA; and 38% increase compared to OGD_{reox}; Figure 4D).

Regarding Akt signalling, A6730 alone (10 µM) has no effects on both LC3-II (non-significant compared to OGD_{reox}; and 77.7% increase compared to Ctrl; Figure 4E) and p62 (non-significant compared to OGD_{reox}; and 66.7% decreased compared to Ctrl; Figure 4F) during OGD_{reox}. However when added with tPA, A6730 reverses the decrease of LC3-II (23.8% increase compared to tPA alone; and non-significant compared to OGD_{reox}; Figure 4E). Moreover, A6730 also reverses the increase of p62 induced by tPA during OGD_{reox} (46.6% reduction compared to tPA alone; and non-significant compared to OGD_{reox}; Figure 4F). Taken altogether, these data suggest that OGD_{reox} leads to the decrease of both p-Erk and p-Akt, leading to p-mTORC1 inhibition and autophagy activation during OGD_{reox}. While tPA decreases autophagy through mTORC1 activation by its capacity to prevent the drop of p-Akt.

This hypothesis is supported by the use of Wortmannin (Wort, 250 nM) a broad PI3K inhibitor. Our results demonstrate that Wort by itself does not modify autophagy flux as shown by the unchanged levels of increased LC3-II (non-significant compared to OGD_{reox}; and 91.1% increase compared to Ctrl; Figure 4G) and the unchanged levels of p62 degradation (non-significant compared to OGD_{reox}; and 61.6% reduction compared to Ctrl; Figure 4H). In the presence of tPA, Wort almost reverses the decrease of LC3-II (31.2% increase compared to tPA alone, p=0.051; and non-significant to OGD_{reox}; Figure 4G) and almost restores the degradation of p62 (26.8% reduction compared to tPA alone, p=0.055; and non-significant compared to OGD_{reox}; Figure 4H); thus reinforcing the implication of the PI3K/Akt pathway in the effect of tPA on mTORC1 and autophagy.

tPA decreases OGD-induced PI3K/Akt signalling through IGF-1R receptor.

We and others have already shown that tPA can activate PI3K/Akt signalling through various receptors [1, 10, 29]. Here, we identified IGF-1R (insulin-like growth factor 1 receptor), a tyrosine

kinase receptor, as the effector of tPA's effects during OGD_{reox} in neurons. We used cyclolignan picropodophyllin (PPP) as a selective inhibitor of the receptor tyrosine kinase activity of IGF-1R [9]. In neurons subjected to OGD_{reox} conditions, PPP (100 nM) slightly exacerbates the decrease of p-Akt (68.5% reduction compared to Ctrl; and 32.3% reduction compared to OGD_{reox}; Figure 5A). However, PPP has no effects by itself on mTORC1 (non-significant compared to OGD_{reox}; and 37.5% reduction compared to Ctrl; Figure 5B) and on autophagic flux, including LC3-II conversion (non-significant compared to OGD_{reox}; and 84.6% increase compared to Ctrl; Figure 5C) and p62 degradation (non-significant compared to OGD_{reox}; and 61.5% reduction compared to Ctrl; Figure 5D).

The strongest effect of PPP is in the presence of tPA, where it counteracts its effects on autophagy. Indeed, in the presence of PPP, tPA does not longer induce Akt signalling under OGD_{reox} conditions (55.2% reduction compared to tPA alone; Figure 5A). PPP also prevents from tPA to inhibit autophagy pathway, as shown by the lower phosphorylation level of mTORC1 (31.1% reduction compared to tPA alone; and no significant compared to OGD_{reox}; Figure 5B). This is also observed on the autophagic flux where LC3-II conversion is reversed (34.2% reduction compared to tPA alone; and non-significant compared to OGD_{reox}; Figure 5C) and p62 degradation is restored (34.4% reduction compared to tPA alone; and non-significant compared to OGD_{reox}; Figure 5D) in the presence of tPA and PPP.

As tPA is also able to activate EGFR (Epidermal Growth Factor Receptor) [5, 27, 39], a tyrosine kinase receptor promoting PI3K/Akt signalling, we tested the ability of AG1478 (an EGFR inhibitor) to prevent the effects of tPA on neuronal autophagy during OGD_{reox}. AG1478 alone reverses LC3-II conversion induced by OGD_{reox} (43.5% reduction compared to OGD_{reox}; and non-significant compared to Ctrl; Figure 5E) but has no effect on p62 level (non-significant compared to OGD_{reox}; and 54.4% reduction compared to Ctrl; Figure 5F). Unlike PPP, AG1478 is not able to reverse the inhibition of autophagic flux induced by tPA. When EGFR activity is blocked, tPA can always decrease LC3-II conversion (non-significant compared to tPA alone; and 23.7% reduction compared to OGD_{reox}; Figure 5E) and increase p62 level (tPA+AG1478: non-significant compared to tPA alone; 65.9% increase compared to OGD_{reox}; Figure 5F).

Taken altogether, our data show that tPA mediates its effects on autophagy through its ability to activate PI3K/Akt/mTORC1 signalling *via* IGF-1R.

tPA protects neurons from cell death by decreasing autophagy through IGF-1R/PI3k/Akt/mTORC1.

It is well known that OGD_{reox} induces neuronal death by several mechanisms, including necrosis, apoptosis, ER stress and autophagy [31, 49, 56]. The use of Chloroquine, an inhibitor of autophagy preventing the fusion between autophagosomes and lysosomes, supports the idea that autophagy is deleterious in OGD_{reox}. Our results show that autophagy inhibition with different dose of Chloroquine protects neurons from OGD_{reox}-induced cell death in a dose dependent manner (Chloroquine 50 µM: 14.7% reduction of cell death compared to OGD_{reox}; Chloroquine 100 µM: 19.4% reduction of cell death compared to OGD_{reox}; Chloroquine 200 µM: 33.5% reduction of cell death compared to OGD_{reox}; Figure 6A). Like Chloroquine, tPA protects neurons from OGD_{reox}-induced neuronal death (a mean of 17.2% reduction of cell death compared to OGD_{reox}; Figure 6B-E). This, combined to our previous results support the hypothesis that tPA protects neurons from autophagy-induced cell death.

Like we show in Figure 4, tPA decreased-autophagy is independent of p-Erk. As expected, Erk inhibition by SCH77 does not reverse the neuroprotection induced by tPA (tPA+SCH77 *versus* tPA : 45.1% of cell death versus 49.7% of cell death, non-significant; Figure 6A and 6B). However, Wortmannin (Wort), a PI3K inhibitor, reverses the effect of tPA on neuronal death (tPA+Wort *versus* tPA: 37.3% of cell death *versus* 27.6% of cell death; tPA+Wort *versus* OGD_{reox}: 37.3% of cell death *versus* 42.4% of cell death, non-significant; Figure 6C). Akt inhibition with A6730 also reverses tPA-induced neuroprotection (tPA+A6730 *versus* tPA: 43.1% of cell death *versus* 29.3% of cell death; tPA+A6730 *versus* OGD_{reox}: 43.1% of cell death *versus* 46.2% of cell death, non-significant; Figure 6D). These results confirm the idea that tPA protects neurons through PI3K/Akt.

Interestingly, PPP partially reverses the neuroprotection mediated by tPA (tPA+PPP *versus* tPA: 56.9% of cell death *versus* 44.6% of cell death; tPA+PPP *versus* OGD_{reox}: 56.9% of cell death *versus* 62.9% of cell death; Figure 6B). Altogether these results show that tPA mediated neuroprotection and autophagy decreased through IGF-1R/PI3K/Akt/mTORC1 pathway.

DISCUSSION

In this study, we demonstrate that autophagy and its upstream pathways are strongly activated in neurons in an *in vitro* model of cerebral ischemia: oxygen and glucose deprivation followed by reoxygenation (ODG_{reox}). We show that OGD_{reox} provokes a drop of both Erk and Akt signalling, leading to a decrease of phosphorylation of mTORC1, a key inhibitor of autophagy. Autophagy has often been associated with cell death during cerebral ischemia [49, 51, 53], here we confirm *in vitro* that OGD_{reox}-induced autophagy is deleterious in neurons. Interestingly, the serine protease tPA decreases autophagy through IGF-1R activation and mTORC1 phosphorylation to promote neuroprotection.

We identified autophagy and its upstream pathways by RNA sequencing in neurons subjected or not to OGD_{reox} and in the presence or not of tPA. It was first reassuring to see that clearly known OGD_{reox}-induced pathways were identified (table 1). Indeed, the AMPK pathway is the energy sensor, activated under low-energy level condition [11, 24]. The HIF1 pathway is the oxygen sensor activated under low-oxygen level condition [19, 57]. The GABAergic and glutamatergic synapse pathways are linked to excitotoxicity with a decrease of the GABAergic inhibitor system and an increase of the glutamatergic activator system [35, 45, 54]. The calcium-signalling pathway is often considered as the death mediator during ischemia [2, 3, 46]. On the other side, 9 out of 33 impacted pathways relate to autophagy (Table 1). The central regulating element mTOR pathway is modified by OGD_{reox}, and interestingly both upstream pathways (MAPK, PI3K/Akt) and downstream pathways (apoptosis, lysosome) are also deregulated.

We validated the RNA sequencing analysis by using different pharmacological approaches and western blot analysis. We found that under OGD_{reox} conditions, tPA is able to decrease autophagy by increasing the phosphorylation of mTORC1, through an increase of the PI3K/Akt pathway. Interestingly at a dose of 300 nM, tPA is able to decrease LC3-II and to increase p62 under OGD_{reox} condition. This means that only the highest dose of tPA tested decreases the degradation into autolysosomes (i.e. fusion between autophagosome and lysosome). That were already described that at this dose tPA has neuroprotective effect after OGD [27, 32] or NMDA treatment [32, 38]. However, this is the first time that we described a role of tPA on autophagy while, Wu and colleagues has described that tPA can protect neurons from ischemia through mTOR [56].

Our data show that Beclin1 is not involved in OGD_{reox}-induced autophagy (Figure 3D). Only mTORC1 is drastically decreased, leading to the activation of autophagy. It has already be shown that autophagy can be induced independently from Beclin1 [33, 44], interestingly this form of autophagy is associated to cell death [47, 59]. OGD_{reox} also decreases the phosphorylation of mTORC2. mTORC2 is characterized by the binding of mTOR to Rictor, which activates and phosphorylates Akt at Ser^{473} to promote cell survival [16, 20]. Thus, Akt also mediates mTORC1 signalling; mTORC2 could then indirectly activate mTORC1 through Akt. Here tPA slightly increases the phosphorylation of mTORC2 (Figure 3C), and could then participate to the neuroprotection observed during OGD_{reox}.

We also identified IGF-1R as the receptor responsible for the decrease of autophagy activation, through the phosphorylation of mTORC1, when treated with tPA. The natural ligand of IGF-1R is IGF-1 (insulin-like growth factor 1), that has been shown to be neuroprotective in many models of stroke [26]. Similarly, injection of circulating IGF-I is able to mediate neuroprotection in a rat stroke model, validating IGF-1R has an interesting target [14]. Our data demonstrate that IGF-1R reduces a deleterious activation of autophagy during stroke. It is well known that IGF-1R regulates autophagy through the PI3K/Akt/mTOR pathway [28, 50, 52]; but it has always been linked to the action of IGF-I on its receptor. Here we show that the serine protease tPA is able to mediate the activation of IGF-1R/PI3K/Akt/mTOR to decrease autophagy and subsequent neuronal death.

In non-stressed postnatal neurons, tPA has been shown to promote survival mainly by activating the mTOR cascade but without being linked to autophagy [15]. In this study, as neurons are not stressed, there is no reasons to have an (over)activation of autophagy. However, autophagy is not the only target of mTOR. Indeed, mTOR drives many pathway including HIF1α, lipid synthesis and glucose synthesis (for review [40]). As our experimental procedures include hypoxia and glucose privation, we cannot exclude the fact that tPA, by activating mTOR signalling, promotes HIF1α and glucose synthesis to mediate its neuroprotection. This is confirmed by a study showing that under hypoxic conditions, tPA promotes neuronal glucose uptake under the control of mTOR signalling [56]. However, the use of chloroquine in our study (Figure 6) demonstrate a real implication of autophagy in neuronal death, as it inhibits the fusion between autophagosomes and lysosomes, but not mTOR signalling [34].

Overall, we describe here a clear deleterious effect of neuronal autophagy overactivation in a model of ischemia. More importantly, we show that the neuromodulator tPA can activate the IGF-1R, leading to PI3K/Akt signalling and mTOR phosphorylation to decrease the autophagic flux and its toxic effects. Our study demonstrate a new function of the serine protease tPA and highlight the IGF-1R/PI3K/mTOR pathway as a potential therapeutic pathway to decrease autophagy in cerebral ischemia.

ACKNOWLEDGEMENTS

We thank Pr Carine Ali for constructive criticism of the manuscript. We thank Véronique Vidal and Béline Jesson from HELIXIO (Clermont-Ferrand, France) for technical assistance regarding the RNA sequencing. This project was supported by the Region Normandie and the Agence nationale pour la recherche.

REFERENCES

1. An J, Zhang C, Polavarapu R, Zhang X, Zhang X, Yepes M (2008) Tissue-type plasminogen activator and the low-density lipoprotein receptor-related protein induce Akt phosphorylation in the ischemic brain. Blood 112:2787–94. doi: 10.1182/blood-2008-02-141630

2. Anagli J, Han Y, Stewart L, Yang D, Movsisyan A, Abounit K, Seyfried D (2009) A novel calpastatin-based inhibitor improves postischemic neurological recovery. Biochem Biophys Res Commun 385:94–9. doi: 10.1016/j.bbrc.2009.04.141

3. Baron A, Montagne A, Cassé F, Launay S, Maubert E, Ali C, Vivien D (2010) NR2D-containing NMDA receptors mediate tissue plasminogen activator-promoted neuronal excitotoxicity. Cell Death Differ 17:860–871. doi: 10.1038/cdd.2009.172

4. Berkhemer OA, Fransen PSS, Beumer D, van den Berg LA, Lingsma HF, Yoo AJ, Schonewille WJ, Vos JA, Nederkoorn PJ, Wermer MJH, van Walderveen MAA, Staals J, Hofmeijer J, van Oostayen JA, Lycklama à Nijeholt GJ, Boiten J, Brouwer PA, Emmer BJ, de Bruijn SF, van Dijk LC, Kappelle LJ, Lo RH, van Dijk EJ, de Vries J, de Kort PLM, van Rooij WJJ, van den Berg JSP, van Hasselt BAAM, Aerden LAM, Dallinga RJ, Visser MC, Bot JCJ, Vroomen PC, Eshghi O, Schreuder THCML, Heijboer RJJ, Keizer K, Tielbeek A V., den Hertog HM, Gerrits DG, van den Berg-Vos RM, Karas GB, Steyerberg EW, Flach HZ, Marquering HA, Sprengers MES, Jenniskens SFM, Beenen LFM, van den Berg R, Koudstaal PJ, van Zwam WH, Roos YBWEM, van der Lugt A, van Oostenbrugge RJ, Majoie CBLM, Dippel DWJ (2015) A Randomized Trial of Intraarterial Treatment for Acute Ischemic Stroke. N Engl J Med 372:11–20. doi: 10.1056/NEJMoa1411587

5. Bertrand T, Lesept F, Chevilley A, Lenoir S, Aimable M, Briens A, Hommet Y, Bardou I, Parcq J, Vivien D (2015) Conformations of tissue plasminogen activator (tPA) orchestrate neuronal survival by a crosstalk between EGFR and NMDAR. Cell Death Dis 6:e1924. doi: 10.1038/cddis.2015.296

6. Bhaskar PT, Hay N (2007) The Two TORCs and Akt. Dev Cell 12:487–502. doi: 10.1016/j.devcel.2007.03.020

7. Carrière A, Cargnello M, Julien L-A, Gao H, Bonneil É, Thibault P, Roux PP (2008) Oncogenic MAPK Signaling Stimulates mTORC1 Activity by Promoting RSK-Mediated Raptor Phosphorylation. Curr Biol 18:1269–1277. doi: 10.1016/j.cub.2008.07.078

8. Drouet V, Perrin V, Hassig R, Dufour N, Auregan G, Alves S, Bonvento G, Brouillet E, Luthi-Carter R, Hantraye P, Déglon N (2009) Sustained effects of nonallele-specific *Huntingtin* silencing. Ann Neurol 65:276–285. doi: 10.1002/ana.21569

9. Duan Z, Choy E, Harmon D, Yang C, Ryu K, Schwab J, Mankin H, Hornicek FJ (2009) Insulin-like growth factor-I receptor tyrosine kinase inhibitor cyclolignan picropodophyllin inhibits proliferation and induces apoptosis in multidrug resistant osteosarcoma cell lines. Mol Cancer Ther 8:2122–2130. doi: 10.1158/1535-7163.MCT-09-0115

10. Echeverry R, Wu J, Haile WB, Guzman J, Yepes M (2010) Tissue-type plasminogen activator is a neuroprotectant in the mouse hippocampus. J Clin Invest 120:2194–2205. doi: 10.1172/JCI41722

11. Egan D, Kim J, Shaw RJ, Guan K-L (2011) The autophagy initiating kinase ULK1 is regulated via opposing phosphorylation by AMPK and mTOR. Autophagy 7:643–644. doi: 10.4161/auto.7.6.15123

12. Feigin VL, Norrving B, Mensah GA (2017) Global Burden of Stroke. Circ Res 120:439–448. doi: 10.1161/CIRCRESAHA.116.308413

13. Feigin VL, Roth GA, Naghavi M, Parmar P, Krishnamurthi R, Chugh S, Mensah GA, Norrving B, Shiue I, Ng M, Estep K, Cercy K, Murray CJL, 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. doi: 10.1016/S1474-4422(16)30073-4

14. De Geyter D, De Smedt A, Stoop W, De Keyser J, Kooijman R (2016) Central IGF-I Receptors in the Brain are Instrumental to Neuroprotection by Systemically Injected IGF-I in a Rat Model for Ischemic Stroke. CNS Neurosci Ther 22:611–6. doi: 10.1111/cns.12550

15. Grummisch JA, Jadavji NM, Smith PD (2016) tPA promotes cortical neuron survival via mTOR-dependent mechanisms. Mol Cell Neurosci 74:25–33. doi: 10.1016/j.mcn.2016.03.005

16. Guertin DA, Stevens DM, Thoreen CC, Burds AA, Kalaany NY, Moffat J, Brown M, Fitzgerald KJ, Sabatini DM (2006) Ablation in Mice of the mTORC Components raptor, rictor, or mLST8 Reveals that mTORC2 Is Required for Signaling to Akt-FOXO and PKCα, but Not S6K1. Dev Cell 11:859–871. doi: 10.1016/j.devcel.2006.10.007

17. Hottinger AF, Azzouz M, Déglon N, Aebischer P, Zurn AD (2000) Complete and long-term rescue of lesioned adult motoneurons by lentiviral-mediated expression of glial cell line-derived neurotrophic factor in the facial nucleus. J Neurosci 20:5587–93. doi: 10.1523/JNEUROSCI.20-15-05587.2000

18. Huang J, Manning BD (2009) A complex interplay between Akt, TSC2 and the two mTOR complexes: Figure 1. Biochem Soc Trans 37:217–222. doi: 10.1042/BST0370217

19. Iyer N V., Kotch LE, Agani F, Leung SW, Laughner E, Wenger RH, Gassmann M, Gearhart JD, Lawler AM, Yu AY, Semenza GL (1998) Cellular and developmental control of O2 homeostasis by hypoxia-inducible factor 1alpha. Genes Dev 12:149–162. doi: 10.1101/gad.12.2.149

20. Jacinto E, Facchinetti V, Liu D, Soto N, Wei S, Jung SY, Huang Q, Qin J, Su B (2006) SIN1/MIP1 Maintains rictor-mTOR Complex Integrity and Regulates Akt Phosphorylation and Substrate Specificity. Cell 127:125–137. doi: 10.1016/j.cell.2006.08.033

21. Johnson CO, Nguyen M, Roth GA, Nichols E, Alam T, Abate D, Abd-Allah F, Abdelalim A, Abraha HN, Abu-Rmeileh NM, Adebayo OM, Adeoye AM, Agarwal G, Agrawal S, Aichour AN, Aichour I, Aichour MTE, Alahdab F, Ali R, Alvis-Guzman N, Anber NH, Anjomshoa M, Arabloo J, Arauz A, Ärnlöv J, Arora A, Awasthi A, Banach M, Barboza MA, Barker-Collo SL, Bärnighausen TW, Basu S, Belachew AB, Belayneh YM, Bennett DA, Bensenor IM, Bhattacharyya K, Biadgo B, Bijani A, Bikbov B, Bin Sayeed MS, Butt ZA, Cahuana-Hurtado L, Carrero JJ, Carvalho F, Castañeda-Orjuela CA, Castro F, Catalá-López F, Chaiah Y, Chiang PPC, Choi JYJ, Christensen H, Chu DT, Cortinovis M, Damasceno AAM, Dandona L, Dandona R, Daryani A, Davletov K, de Courten B, De la Cruz-Góngora V, Degefa MG, Dharmaratne SD, Diaz D, Dubey M, Duken EE, Edessa D, Endres M, FARAON EJA, Farzadfar F, Fernandes E, Fischer F, Flor LS, Ganji M, Gebre AK, Gebremichael TG, Geta B, Gezae KE, Gill PS, Gnedovskaya E V., Gómez-Dantés H, Goulart AC, Grosso G, Guo Y, Gupta R, Haj-Mirzaian A, Haj-Mirzaian A, Hamidi S, Hankey GJ, Hassen HY, Hay SI, Hegazy MI, Heidari B, Herial NA, Hosseini MA, Hostiuc S, Irvani SSN, Islam SMS, Jahanmehr N, Javanbakht M, Jha RP, Jonas JB, Jozwiak JJ, Jürisson M, Kahsay A, Kalani R, Kalkonde Y, Kamil TA, Kanchan T, Karch A, Karimi N, Karimi-Sari H, Kasaeian A, Kassa TD, Kazemeini H, Kefale AT, Khader YS, Khalil IA, Khan EA, Khang YH, Khubchandani J, Kim D, Kim YJ, Kisa A, Kivimäki M, Koyanagi A, Krishnamurthi RK,

Kumar GA, Lafranconi A, Lewington S, Li S, Lo WD, Lopez AD, Lorkowski S, Lotufo PA, Mackay MT, Majdan M, Majdzadeh R, Majeed A, Malekzadeh R, Manafi N, Mansournia MA, Mehndiratta MM, Mehta V, Mengistu G, Meretoja A, Meretoja TJ, Miazgowski B, Miazgowski T, Miller TR, Mirrakhimov EM, Mohajer B, Mohammad Y, Mohammadoo-khorasani M, Mohammed S, Mohebi F, Mokdad AH, Mokhayeri Y, Moradi G, Morawska L, Moreno Velásquez I, Mousavi SM, Muhammed OSS, Muruet W, Naderi M, Naghavi M, Naik G, Nascimento BR, Negoi RI, Nguyen CT, Nguyen LH, Nirayo YL, Norrving B, Noubiap JJ, Ofori-Asenso R, Ogbo FA, Olagunju AT, Olagunju TO, Owolabi MO, Pandian JD, Patel S, Perico N, Piradov MA, Polinder S, Postma MJ, Poustchi H, Prakash V, Qorbani M, Rafiei A, Rahim F, Rahimi K, Rahimi-Movaghar V, Rahman M, Rahman MA, Reis C, Remuzzi G, Renzaho AMN, Ricci S, Roberts NLS, Robinson SR, Roever L, Roshandel G, Sabbagh P, Safari H, Safari S, Safiri S, Sahebkar A, Salehi Zahabi S, Samy AM, Santalucia P, Santos IS, Santos JV, Santric Milicevic MM, Sartorius B, Sawant AR, Schutte AE, Sepanlou SG, Shafieesabet A, Shaikh MA, Shams-Beyranvand M, Sheikh A, Sheth KN, Shibuya K, Shigematsu M, Shin MJ, Shiue I, Siabani S, Sobaih BH, Sposato LA, Sutradhar I, Sylaja PN, Szoeke CEI, Te Ao BJ, Temsah MH, Temsah O, Thrift AG, Tonelli M, Topor-Madry R, Tran BX, Tran KB, Truelsen TC, Tsadik AG, Ullah I, Uthman OA, Vaduganathan M, Valdez PR, Vasankari TJ, Vasanthan R, Venketasubramanian N, Vosoughi K, Vu GT, Waheed Y, Weiderpass E, Weldegwergs KG, Westerman R, Wolfe CDA, Wondafrash DZ, Xu G, Yadollahpour A, Yamada T, Yatsuya H, Yimer EM, Yonemoto N, Yousefifard M, Yu C, Zaidi Z, Zamani M, Zarghi A, Zhang Y, Zodpey S, Feigin VL, Vos T, 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. doi: 10.1016/S1474-4422(19)30034-1

22. Jung CH, Jun CB, Ro S-H, Kim Y-M, Otto NM, Cao J, Kundu M, Kim D-H (2009) ULK-Atg13-FIP200 Complexes Mediate mTOR Signaling to the Autophagy Machinery. Mol Biol Cell 20:1992–2003. doi: 10.1091/mbc.e08-12-1249

23. Kabeya Y (2004) LC3, GABARAP and GATE16 localize to autophagosomal membrane depending on form-II formation. J Cell Sci 117:2805–2812. doi: 10.1242/jcs.01131

24. Kim J, Kundu M, Viollet B, Guan K-L (2011) AMPK and mTOR regulate autophagy through direct phosphorylation of Ulk1. Nat Cell Biol 13:132–141. doi: 10.1038/ncb2152

25. Klionsky DJ, Abdelmohsen K, Abe A, Joynal Abedin M, Abeliovich H, Acevedo Arozena A, Adachi H, Adams CM, Adams PD, Adeli K, Adhihetty PJ, Adler SG, Agam G, Agarwal R, Aghi MK, Agnello M, …, Zughaier SM (2016) Guidelines for the use and interpretation of assays for monitoring autophagy (2 edition). doi: 10.1080/15548627.2015.1100356

26. Kooijman R, Sarre S, Michotte Y, De Keyser J (2009) Insulin-like growth factor I: a potential neuroprotective compound for the treatment of acute ischemic stroke? Stroke 40:e83-8. doi: 10.1161/STROKEAHA.108.528356

27. Lemarchand E, Maubert E, Haelewyn B, Ali C, Rubio M, Vivien D (2016) Stressed neurons protect themselves by a tissue-type plasminogen activator-mediated EGFR-dependent mechanism. Cell Death Differ 23:123–131. doi: 10.1038/cdd.2015.76

28. Lin Y, Deng W, Pang J, Kemper T, Hu J, Yin J, Zhang J, Lu M (2017) The microRNA-99 family modulates hepatitis B virus replication by promoting IGF-1R/PI3K/Akt/mTOR/ULK1 signaling-induced autophagy. Cell Microbiol 19:e12709. doi: 10.1111/cmi.12709

29. Liot G, Roussel BD, Lebeurrier N, Benchenane K, López-Atalaya JP, Vivien D, Ali C (2006) Tissue-type plasminogen activator rescues neurones from serum deprivation-induced apoptosis through

a mechanism independent of its proteolytic activity. J Neurochem 98:1458–64. doi: 10.1111/j.1471-4159.2006.03982.x

30. Liu R, Tang J-C, Pan M-X, Zhuang Y, Zhang Y, Liao H-B, Zhao D, Lei Y, Lei R-X, Wang S, Liu A-C, Qin X-P, Chen J, Zhang Z-F, Wan Q (2018) ERK 1/2 Activation Mediates the Neuroprotective Effect of BpV(pic) in Focal Cerebral Ischemia–Reperfusion Injury. Neurochem Res 43:1424–1438. doi: 10.1007/s11064-018-2558-z

31. Louessard M, Bardou I, Lemarchand E, Thiebaut AM, Parcq J, Leprince J, Terrisse A, Carraro V, Fafournoux P, Bruhat A, Orset C, Vivien D, Ali C, Roussel BD (2017) Activation of cell surface GRP78 decreases endoplasmic reticulum stress and neuronal death. Cell Death Differ 24:1518–1529. doi: 10.1038/cdd.2017.35

32. Louessard M, Lacroix A, Martineau M, Mondielli G, Montagne A, Lesept F, Lambolez B, Cauli B, Mothet J-P, Vivien D, Maubert E (2016) Tissue Plasminogen Activator Expression Is Restricted to Subsets of Excitatory Pyramidal Glutamatergic Neurons. Mol Neurobiol 53:5000–12. doi: 10.1007/s12035-015-9432-7

33. Mauthe M, Jacob A, Freiberger S, Hentschel K, Stierhof Y-D, Codogno P, Proikas-Cezanne T (2011) Resveratrol-mediated autophagy requires WIPI-1-regulated LC3 lipidation in the absence of induced phagophore formation. Autophagy 7:1448–1461. doi: 10.4161/auto.7.12.17802

34. Mauthe M, Orhon I, Rocchi C, Zhou X, Luhr M, Hijlkema K-J, Coppes RP, Engedal N, Mari M, Reggiori F (2018) Chloroquine inhibits autophagic flux by decreasing autophagosome-lysosome fusion. Autophagy 14:1435–1455. doi: 10.1080/15548627.2018.1474314

35. Monnerie H, Hsu F-C, Coulter DA, Le Roux PD (2010) Role of the NR2A/2B subunits of the N-methyl-d-aspartate receptor in glutamate-induced glutamic acid decarboxylase alteration in cortical GABAergic neurons in vitro. Neuroscience 171:1075–1090. doi: 10.1016/J.NEUROSCIENCE.2010.09.050

36. Morris EJ, Jha S, Restaino CR, Dayananth P, Zhu H, Cooper A, Carr D, Deng Y, Jin W, Black S, Long B, Liu J, DiNunzio E, Windsor W, Zhang R, Zhao S, Angagaw MH, Pinheiro EM, Desai J, Xiao L, Shipps G, Hruza A, Wang J, Kelly J, Paliwal S, Gao X, Babu BS, Zhu L, Daublain P, Zhang L, Lutterbach BA, Pelletier MR, Philippar U, Siliphaivanh P, Witter D, Kirschmeier P, Bishop WR, Hicklin D, Gilliland DG, Jayaraman L, Zawel L, Fawell S, Samatar AA (2013) Discovery of a Novel ERK Inhibitor with Activity in Models of Acquired Resistance to BRAF and MEK Inhibitors. Cancer Discov 3:742–750. doi: 10.1158/2159-8290.CD-13-0070

37. National Institute of Neurological Disorders and Stroke rt-PA Stroke Study Group (1995) Tissue Plasminogen Activator for Acute Ischemic Stroke. N Engl J Med 333:1581–1588. doi: 10.1056/NEJM199512143332401

38. Nicole O, Docagne F, Ali C, Margaill I, Carmeliet P, MacKenzie ET, Vivien D, Buisson A (2001) The proteolytic activity of tissue-plasminogen activator enhances NMDA receptor-mediated signaling. Nat Med 7:59–64. doi: 10.1038/83358

39. Parcq J, Bertrand T, Montagne A, Baron AF, Macrez R, Billard JM, Briens A, Hommet Y, Wu J, Yepes M, Lijnen HR, Dutar P, Anglés-Cano E, Vivien D (2012) Unveiling an exceptional zymogen: the single-chain form of tPA is a selective activator of NMDA receptor-dependent signaling and neurotoxicity. Cell Death Differ 19:1983–91. doi: 10.1038/cdd.2012.86

40. Perez-Alvarez MJ, Villa Gonzalez M, Benito-Cuesta I, Wandosell FG (2018) Role of mTORC1

Controlling Proteostasis after Brain Ischemia. Front Neurosci 12. doi: 10.3389/fnins.2018.00060

41. Rami A, Kögel D (2008) Apoptosis meets autophagy-like cell death in the ischemic penumbra: Two sides of the same coin? Autophagy 4:422–426. doi: 10.4161/auto.5778

42. Roussel BD, Mysiorek C, Rouhiainen A, Jullienne A, Parcq J, Hommet Y, Culot M, Berezowski V, Cecchelli R, Rauvala H, Vivien D, Ali C (2011) HMGB-1 promotes fibrinolysis and reduces neurotoxicity mediated by tissue plasminogen activator. J Cell Sci 124:2070–6. doi: 10.1242/jcs.084392

43. Russell RC, Tian Y, Yuan H, Park HW, Chang Y-Y, Kim J, Kim H, Neufeld TP, Dillin A, Guan K-L (2013) ULK1 induces autophagy by phosphorylating Beclin-1 and activating VPS34 lipid kinase. Nat Cell Biol 15:741–750. doi: 10.1038/ncb2757

44. Scarlatti F, Maffei R, Beau I, Codogno P, Ghidoni R (2008) Role of non-canonical Beclin 1-independent autophagy in cell death induced by resveratrol in human breast cancer cells. Cell Death Differ 15:1318–1329. doi: 10.1038/cdd.2008.51

45. Sekerdag E, Solaroglu I, Gursoy-Ozdemir Y (2018) Cell Death Mechanisms in Stroke and Novel Molecular and Cellular Treatment Options. Curr Neuropharmacol 16:1396–1415. doi: 10.2174/1570159X16666180302115544

46. Soria FN, Pérez-Samartín A, Martin A, Gona KB, Llop J, Szczupak B, Chara JC, Matute C, Domercq M (2014) Extrasynaptic glutamate release through cystine/glutamate antiporter contributes to ischemic damage. J Clin Invest 124:3645–3655. doi: 10.1172/JCI71886

47. Sun L, Liu N, Liu S-S, Xia W-Y, Liu M-Y, Li L-F, Gao J-X (2015) Beclin-1-independent autophagy mediates programmed cancer cell death through interplays with endoplasmic reticulum and/or mitochondria in colbat chloride-induced hypoxia. Am J Cancer Res 5:2626–42

48. Thiebaut AM, Gauberti M, Ali C, Martinez De Lizarrondo S, Vivien D, Yepes M, Roussel BD (2018) The role of plasminogen activators in stroke treatment: fibrinolysis and beyond. Lancet Neurol 17:1121–1132. doi: 10.1016/S1474-4422(18)30323-5

49. Thiebaut AM, Hedou E, Marciniak SJ, Vivien D, Roussel BD (2019) Proteostasis During Cerebral Ischemia. Front Neurosci 13:637. doi: 10.3389/fnins.2019.00637

50. Troncoso R, Vicencio JM, Parra V, Nemchenko A, Kawashima Y, del Campo A, Toro B, Battiprolu PK, Aranguiz P, Chiong M, Yakar S, Gillette TG, Hill JA, Abel ED, LeRoith D, Lavandero S (2012) Energy-preserving effects of IGF-1 antagonize starvation-induced cardiac autophagy. Cardiovasc Res 93:320–329. doi: 10.1093/cvr/cvr321

51. Wang N, Yang L, Zhang H, Lu X, Wang J, Cao Y, Chen L, Wang X, Cong L, Li J, Wang N, Liu Z, Wang L (2018) MicroRNA-9a-5p Alleviates Ischemia Injury After Focal Cerebral Ischemia of the Rat by Targeting ATG5-Mediated Autophagy. Cell Physiol Biochem 45:78–87. doi: 10.1159/000486224

52. Wang S, Gu K (2017) Insulin-like growth factor 1 inhibits autophagy of human colorectal carcinoma drug-resistant cells via the protein kinase B/mammalian target of rapamycin signaling pathway. Mol Med Rep 17:2952–2956. doi: 10.3892/mmr.2017.8272

53. Wen Y-D, Sheng R, Zhang L-S, Han R, Zhang X, Zhang X-D, Han F, Fukunaga K, Qin Z-H (2008) Neuronal injury in rat model of permanent focal cerebral ischemia is associated with activation of autophagic and lysosomal pathways. Autophagy 4:762–769. doi: 10.4161/auto.6412

54. Won SJ, Kim DY, Gwag BJ (2002) Cellular and molecular pathways of ischemic neuronal death. J

Biochem Mol Biol 35:67–86

55. Wu F, Echeverry R, Wu J, An J, Haile WB, Cooper DS, Catano M, Yepes M (2013) Tissue-type plasminogen activator protects neurons from excitotoxin-induced cell death via activation of the ERK1/2-CREB-ATF3 signaling pathway. Mol Cell Neurosci 52:9–19. doi: 10.1016/j.mcn.2012.10.001

56. Wu F, Wu J, Nicholson AD, Echeverry R, Haile WB, Catano M, An J, Lee AK, Duong D, Dammer EB, Seyfried NT, Tong FC, Votaw JR, Medcalf RL, Yepes M (2012) Tissue-type plasminogen activator regulates the neuronal uptake of glucose in the ischemic brain. J Neurosci 32:9848–58. doi: 10.1523/JNEUROSCI.1241-12.2012

57. Yang X, Zhong M, Chen J, Li T, Cheng Q, Dai Y (2018) HIF-1<alpha> Repression of PTEN Transcription Mediates Protective Effects of BMSCs on Neurons During Hypoxia. Neuroscience 392:57–65. doi: 10.1016/j.neuroscience.2018.09.024

58. Zheng Y, Gu S, Li X, Tan J, Liu S, Jiang Y, Zhang C, Gao L, Yang H-T (2017) Berbamine postconditioning protects the heart from ischemia/reperfusion injury through modulation of autophagy. Cell Death Dis 8:e2577. doi: 10.1038/CDDIS.2017.7

59. Zhu J, Horbinski C, Guo F, Watkins S, Uchiyama Y, Chu CT (2007) Regulation of Autophagy by Extracellular Signal-Regulated Protein Kinases During 1-Methyl-4-Phenylpyridinium-Induced Cell Death. Am J Pathol 170:75–86. doi: 10.2353/ajpath.2007.060524

LEGENDS

Table 1: RNAseq pathway analysis of neurons subjected or not to OGD*reox* +/- 300nM tPA. Pathways were analysed following the Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG pathway). Pathways linked to OGDreox or ischemia/hypoxia are highlighted in red; pathways linked to autophagy are highlighted in green.

Figure 1: Autophagy pathways are increased by oxygen and glucose deprivation in neurons.

(A) Venn Diagram of the comparison of differentially expressed genes in neurons subjected or not to OGD_{reox} with and without tPA (300nM) (data are represented as number of differentially regulated gene in OGD_{reox} *vs* Ctrl; OGD_{reox} + tPA *vs* Ctrl and OGD_{reox} + tPA *vs* OGD_{reox}; n=4 from 12 different experiments). **(B)** Venn Diagram of the comparison of differentially expressed genes for PI3K-Akt signalling pathway in neurons subjected or not to OGD_{reox} with and without tPA (300nM) (data are represented as number of differentially regulated gene in OGD_{reox} *vs* Ctrl; OGD_{reox} + tPA *vs* Ctrl and OGD_{reox} + tPA *vs* OGD_{reox}; n=4 from 12 different experiments). **(C)** Venn Diagram of the comparison of differentially expressed genes for MAPK signalling pathway in neurons subjected or not to OGD_{reox} with and without tPA (300nM) (data are represented as number of differentially regulated gene in OGD_{reox} *vs* Ctrl; OGD_{reox} + tPA *vs* Ctrl and OGD_{reox} + tPA *vs* OGD_{reox}; n=4 from 12 different experiments). **(D)** Venn Diagram of the comparison of differentially expressed genes for mTOR signalling pathway in neurons subjected or not to OGD_{reox} with and without tPA (300nM) (data are represented as number of differentially regulated gene in OGD_{reox} *vs* Ctrl; OGD_{reox} + tPA *vs* Ctrl and OGD_{reox} + tPA *vs* OGD_{reox}; n=4 from 12 different experiments). **(E)** Venn Diagram of the comparison of differentially expressed genes for Autophagy signalling pathway in neurons subjected or not to OGD_{reox} with and without tPA (300nM) (data are represented as number of differentially regulated gene in OGD_{reox} *vs* Ctrl; OGD_{reox} + tPA *vs* Ctrl and OGD_{reox} + tPA *vs* OGD_{reox}; n=4 from 12 different experiments). **(F)** Bar graphs depicting the number of gene changes in OGD_{reox} *vs* Ctrl for PI3K-Akt, MAPK, mTOR and Autophagy signalling, with colour coding indicating if genes are down-regulated (red), up-regulated (green) or non-regulated (white). **(G)** Bar graphs depicting the number of gene changes in OGD_{reox} + tPA *vs* Ctrl for PI3K-Akt, MAPK, mTOR and Autophagy signalling, with colour coding indicating if genes are down-regulated (red), up-regulated (green) or non-regulated (white). **(F)** Bar graphs depicting the number of gene changes in OGD_{reox} + tPA *vs* OGD_{reox} for PI3K-Akt, MAPK,

mTOR and Autophagy signalling, with colour coding indicating if genes are down-regulated (red), up-regulated (green) or non-regulated (white).

Figure 2: tPA decreases OGD-induced autophagy in cortical neurons

(A) Schematic representation of *in vitro* ischemic model consisting in 1h of OGD followed by 4h of reoxygenation (OGD_{reox}), on 12 days old murine primary cortical neurons in the presence or not treatments. **(B)** Ratio between LC3-II and actin; and representative western blot of neurons subjected or not to OGD_{reox} with and without tPA (300nM) (data are represented as mean±S.E.M. n=5 independent experiments; ##: $p<0.01$ compared to Ctrl; *: $p<0.05$ compared to OGD_{reox}; Mann–Whitney test). **(C)** Ratio between p62 and actin; and representative western blot of neurons subjected or not to OGD_{reox} with and without tPA (300nM) (data are represented as mean±S.E.M. n=6 independent experiments; ##: $p<0.01$ and #: $p<0.05$ compared to Ctrl; *: $p<0.05$ compared to OGD_{reox}; Mann–Whitney test). **(D)** Representative immunostaining against GFP (in green) and NeuN (in blue) of cultured neurons transduced with LC3-GFP lentivirus, and subjected or not to OGD_{reox} ±300 nM tPA. **(E)** Corresponding mean fluorescence intensity of LC3-GFP (data are represented as mean±S.E.M. n=7 for Ctrl; n=9 for OGD_{reox}; n=9 for OGD_{reox} + tPA; from 4 independent experiments; ###: $p<0.001$ compared to Ctrl; *: $p<0.05$ compared to OGD_{reox}; Mann–Whitney test). **(F)** Ratio between LC3-II and actin; and representative western blot of neurons subjected or not to OGD_{reox} in the presence of tPA 0 to 300nM (data are represented as mean±S.E.M. n=5 independent experiments; ##: $p<0.01$ and #: $p<0.05$ compared to Ctrl; **: $p<0.01$ and *: $p<0.05$ compared to OGD_{reox}; Mann–Whitney test). **(G)** Ratio between p62 and actin; and representative western blot of neurons subjected or not to OGD_{reox} in the presence of tPA 0 to 300nM (data are represented as mean±S.E.M. n=6 independent experiments; ##: $p<0.01$ compared to Ctrl; **: p<0..01 compared to OGD_{reox}; Mann–Whitney test).

Figure 3: OGD-induced autophagy is dependent of the mTOR pathway

(A) Ratio between p-mTORC1 (Ser^{2448}) and mTOR total; and representative western blot of neurons subjected or not to OGD_{reox} with and without tPA (300nM) (data are represented as mean±S.E.M. n=6 independent experiments; ##: $p<0.01$ and #: $p<0.05$ compared to Ctrl; **: $p<0.01$ compared to OGD_{reox}; Mann–Whitney test). **(B)** Ratio between p-ULK1 (Ser^{757}) and ULK1 total; and representative western blot of neurons subjected or not to OGD_{reox} with and without tPA (300nM) (data are

represented as mean±S.E.M. n=4 independent experiments; #: p<0.05 compared to Ctrl; *: p<0.05 compared to OGD_{reox}; Mann–Whitney test). **(C)** Ratio between p-mTORC2 (Ser^{2481}) and mTOR total; and representative western blot of neurons subjected or not to OGD_{reox} with and without tPA (300nM) (data are represented as mean±S.E.M. n=6 independent experiments; ##: p<0.01 compared to Ctrl; *: p<0.05 compared to OGD_{reox}; Mann–Whitney test). **(D)** Ratio between Beclin1 and actin; and representative western blot of neurons subjected or not to OGD_{reox} with and without tPA (300nM) (data are represented as mean±S.E.M. n=6 independent experiments; Mann–Whitney test)

Figure 4 : tPA decreases OGD-induced autophagy through the PI3K/Akt pathway

(A) Ratio between p-Erk 1/2 and Erk total; and representative western blot of neurons subjected or not to OGD_{reox} with and without tPA (300nM) (data are represented as mean±S.E.M. n=5 independent experiments; ##: p<0.01 compared to Ctrl; **: p<0.01 compared to OGD_{reox}; Mann–Whitney test). **(B)** Ratio between p-Akt and Akt total; and representative western blot of neurons subjected or not to OGD_{reox} with and without tPA (300nM) (data are represented as mean±S.E.M. n=5 independent experiments; ##: p<0.01 compared to Ctrl; *: p<0.05 compared to OGD_{reox}; Mann–Whitney test). **(C)** Ratio between LC3-II and actin; and representative western blot of neurons subjected or not to OGD_{reox} with and without tPA (300nM) in the presence or not of 5 μM SCH772984 (SCH77) (data are represented as mean±S.E.M. n=6 independent experiments; #: p<0.05 compared to Ctrl; **: p<0.01 and *: p<0.05 compared to OGD_{reox}; Mann–Whitney test). **(D)** Ratio between p62 and actin; and representative western blot of neurons subjected or not to OGD_{reox} with and without tPA (300nM) in the presence or not of 5 μM SCH772984 (SCH77) (data are represented as mean±S.E.M. n=6 independent experiments; ##: p<0.01 compared to Ctrl; **: p<0.01 and *: p<0.05 compared to OGD_{reox}; Mann–Whitney test). **(E)** Ratio between LC3-II and actin; and representative western blot of neurons subjected or not to OGD_{reox} with and without tPA (300nM) in the presence or not of 10 μM A6730 (data are represented as mean±S.E.M. n=6 independent experiments; ##: p<0.01 and #: p<0.05 compared to Ctrl; **: p<0.01 and *: p<0.05 compared to OGD_{reox}; Mann–Whitney test). **(F)** Ratio between p62 and actin; and representative western blot of neurons subjected or not to OGD_{reox} with and without tPA (300nM) in the presence or not of 10 μM A6730 (data are represented as mean±S.E.M. n=5 independent experiments; ##: p<0.01 compared to Ctrl; **: p<0.01 and *: p<0.05 compared to OGD_{reox}; Mann–Whitney test). **(G)** Ratio between LC3-

II and actin; and representative western blot of neurons subjected or not to OGD_{reox} with and without tPA (300nM) in the presence or not of 250 nM wortmannin (Wort) (data are represented as mean±S.E.M. n=6 independent experiments; ##: p<0.01 compared to Ctrl; *: p<0.05 compared to OGD_{reox}; Mann–Whitney test). **(H)** Ratio between p62 and actin; and representative western blot of neurons subjected or not to OGD_{reox} with and without tPA (300nM) in the presence or not of 250 nM wortmannin (Wort) (data are represented as mean±S.E.M. n=6 independent experiments; ##: p<0.01 compared to Ctrl; *: p<0.05 compared to OGD_{reox}; Mann–Whitney test).

Figure 5: tPA decreases OGD-induced PI3K/Akt signalling through IGF-1R receptor

(A) Ratio between p-Akt and Akt total; and representative western blot of neurons subjected or not to OGD_{reox} with and without tPA (300nM) in the presence or not of 100 nM Picropodophyllotoxin (PPP) (data are represented as mean±S.E.M. n=4 independent experiments; #: p<0.05 compared to Ctrl; *: p<0.05 compared to OGD_{reox}; Mann–Whitney test). **(B)** Ratio between mTORC1 (Ser^{2448}) and mTOR total; and representative western blot of neurons subjected or not to OGD_{reox} with and without tPA (300nM) in the presence or not of 100 nM Picropodophyllotoxin (PPP) (data are represented as mean±S.E.M. n=4 independent experiments; #: p<0.05 compared to Ctrl; *: p<0.05 compared to OGD_{reox}; Mann–Whitney test). **(C)** Ratio between LC3-II and actin; and representative western blot of neurons subjected or not to OGD_{reox} with and without tPA (300nM) in the presence or not of 100 nM Picropodophyllotoxin (PPP) (data are represented as mean±S.E.M. n=5 independent experiments; ##: p<0.01 compared to Ctrl; **: p<0.01 compared to OGD_{reox}; Mann–Whitney test). **(D)** Ratio between p62 and actin; and representative western blot of neurons subjected or not to OGD_{reox} with and without tPA (300nM) in the presence or not of 100 nM Picropodophyllotoxin (PPP) (data are represented as mean±S.E.M. n=6 independent experiments; ##: p<0.01 compared to Ctrl; **: p<0.01 compared to OGD_{reox}; Mann–Whitney test). **(E)** Ratio between LC3-II and actin; and representative western blot of neurons subjected or not to OGD_{reox} with and without tPA (300nM) in the presence or not of 5 μM AG1478 (data are represented as mean±S.E.M. n=4 independent experiments; #: p<0.05 compared to Ctrl; *: p<0.05 compared to OGD_{reox}; Mann–Whitney test). **(F)** Ratio between p62 and actin; and representative western blot of neurons subjected or not to OGD_{reox} with and without tPA (300nM) in the presence or not of 5 μM AG1478 (data are represented as mean±S.E.M. n=4 independent experiments; ##: p<0.01 compared to Ctrl; **: p<0.01 compared to OGD_{reox}; Mann–Whitney test).

Figure 6: tPA protects neurons from cell death by decreasing autophagy through IGF-1R/PI3k/Akt/mTORC1

(A) Neuronal death of pure cortical neurons assessed by LDH release after OGD_{reox} in the presence or not of 50, 100 or 200 μM of Chloroquine (data are represented as mean±S.E.M. n=25 from 6 independent experiments; ***: p<0.001, **: p<0.01 and *: p<0.05 compared to OGD_{reox}; Mann–Whitney test). **(B)** Neuronal death of pure cortical neurons assessed by LDH release after OGD_{reox} in the presence or not of tPA and 5 μM SCH772984 (SCH77) (data are represented as mean±S.E.M. n=20 from 5 independent experiments; ###: p<0.001 compared to Ctrl; ***: p<0.001 compared to OGD_{reox}; Mann–Whitney test). **(C)** Neuronal death of pure cortical neurons assessed by LDH release after OGD_{reox} in the presence or not of tPA and 250 nM Wortmannin (Wort) (data are represented as mean±S.E.M. n=20 for Ctrl; n=19 for OGD_{reox}; n=14 for tPA; n=14 for tPA-Wort; n=14 for Wort from 5 independent experiments; ###: p<0.001 compared to Ctrl; ***: p<0.001 and *: p<0.05 compared to OGD_{reox}; Mann–Whitney test). **(D)** Neuronal death of pure cortical neurons assessed by LDH release after OGD_{reox} in the presence or not of tPA and 10 μM A6730 (data are represented as mean±S.E.M. n=20 for Ctrl; n=19 for OGD_{reox}; n=18 for tPA; n=17 for tPA-Wort; n=19 for Wort from 5 independent experiments; ###: p<0.001 compared to Ctrl; ***: p<0.001 compared to OGD_{reox}; Mann–Whitney test). **(E)** Neuronal death of pure cortical neurons assessed by LDH release after OGD_{reox} in the presence or not of tPA and 100 nM Picropodophyllotoxin (PPP) (data are represented as mean±S.E.M. n=16 from 5 independent experiments; ###: p<0.001 compared to Ctrl; ***: p<0.001 and **: p<0.01 compared to OGD_{reox}; Mann–Whitney test).

AMPK signalling pathway	Apoptosis
Autophagy animal	Autophagy other
Calcium signalling pathway	cAMP signalling pathway
Cell cycle	EGFR tyrosine kinase inhibitor resistance
Endocytosis	ERBB signalling pathway
Focal adhesion	FOXO signalling pathway
GABAergic synapse	Glutamatergic synapse
HIF1 signalling pathway	JAK STAT signalling pathway
Long Term potentiation	Lysosome
MAPK signalling pathway	mTOR signalling pathway
Neuroactive ligand-receptor interaction	Neurotrophin signalling pathway
NFκB signalling pathway	P53 signalling pathway
Phagosome	Phosphatidylinositol signalling pathway
Phospholipas D signalling pathway	PI3K AKT signalling pathway
Protein processing in endoplasmic reticulum	RAP1 signalling pathway
Regulation of actin cytoskeleton	TGF-β signalling pathway
Toll-like receptor signalling pathway	

Table 1: RNAseq pathway analysis of neurons subjected or not to OGD*reox* +/- 300nM tPA. Pathways were analysed following the Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG pathway). Pathways linked to OGDreox or ischemia/hypoxia are highlighted in red; pathways linked to autophagy are highlighted in green.

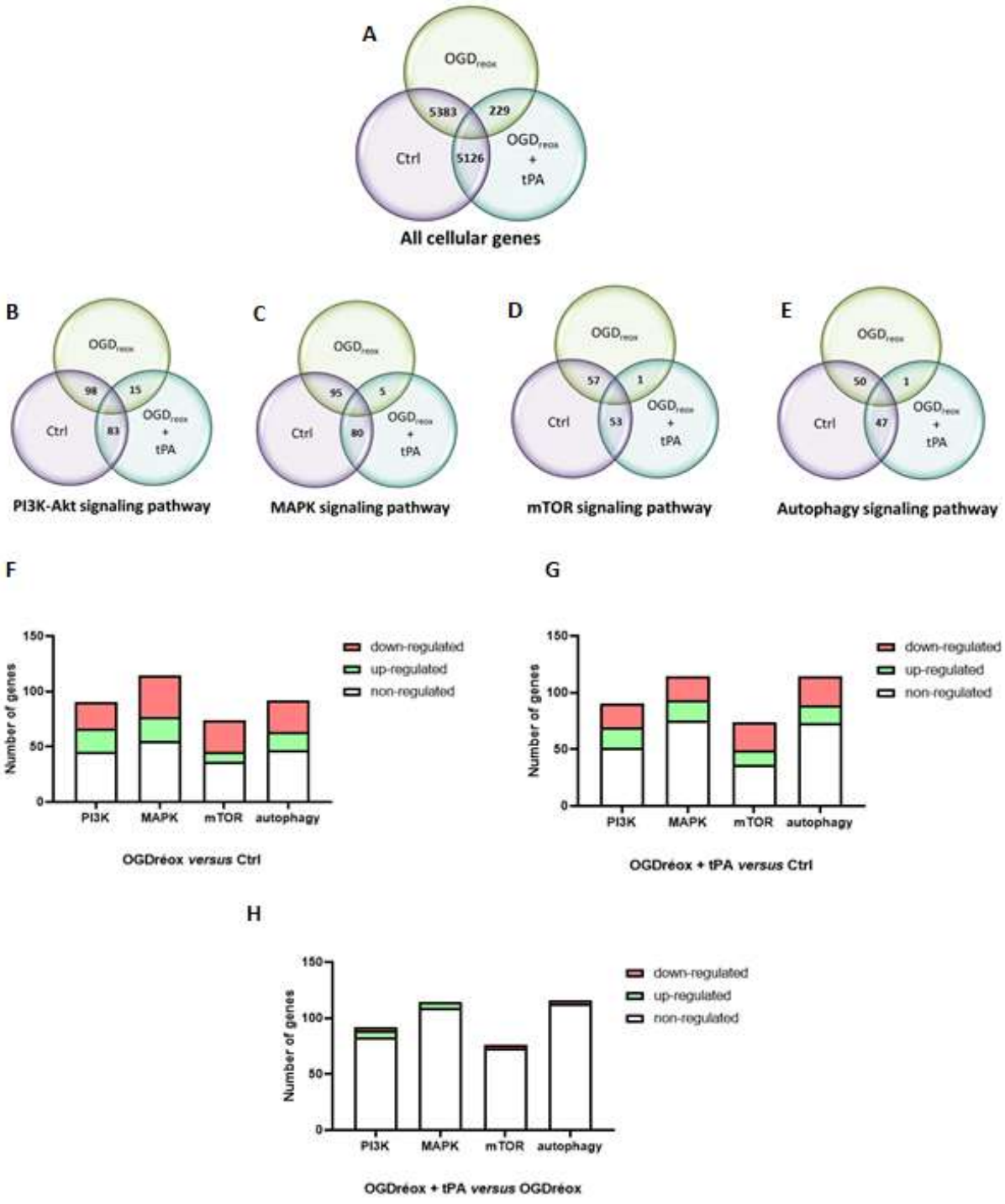


Figure 1: Autophagy pathways are increased by oxygen and glucose deprivation in neurons.

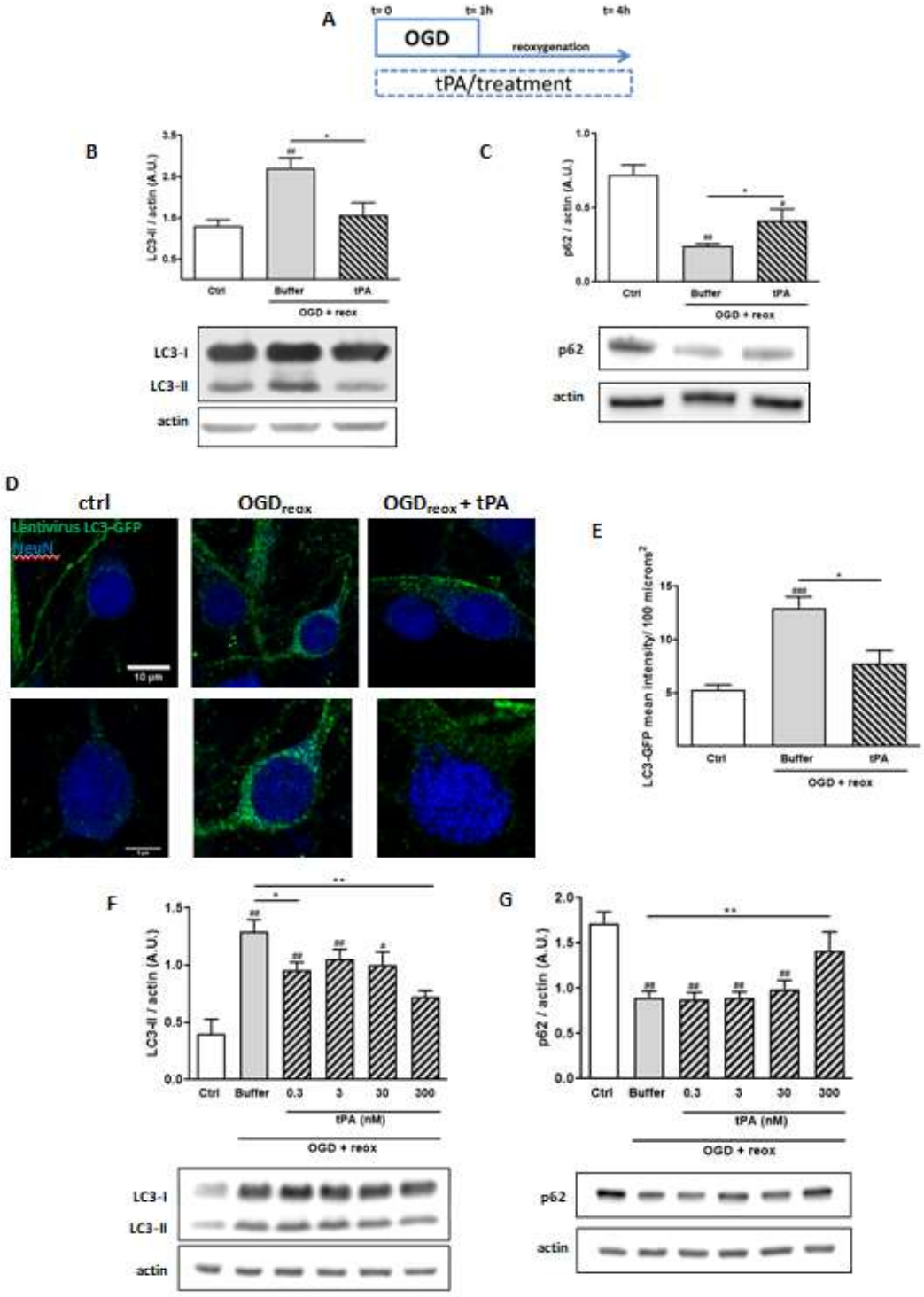


Figure 2: tPA decreases OGD-induced autophagy in cortical neurons independently from its proteolytic activity

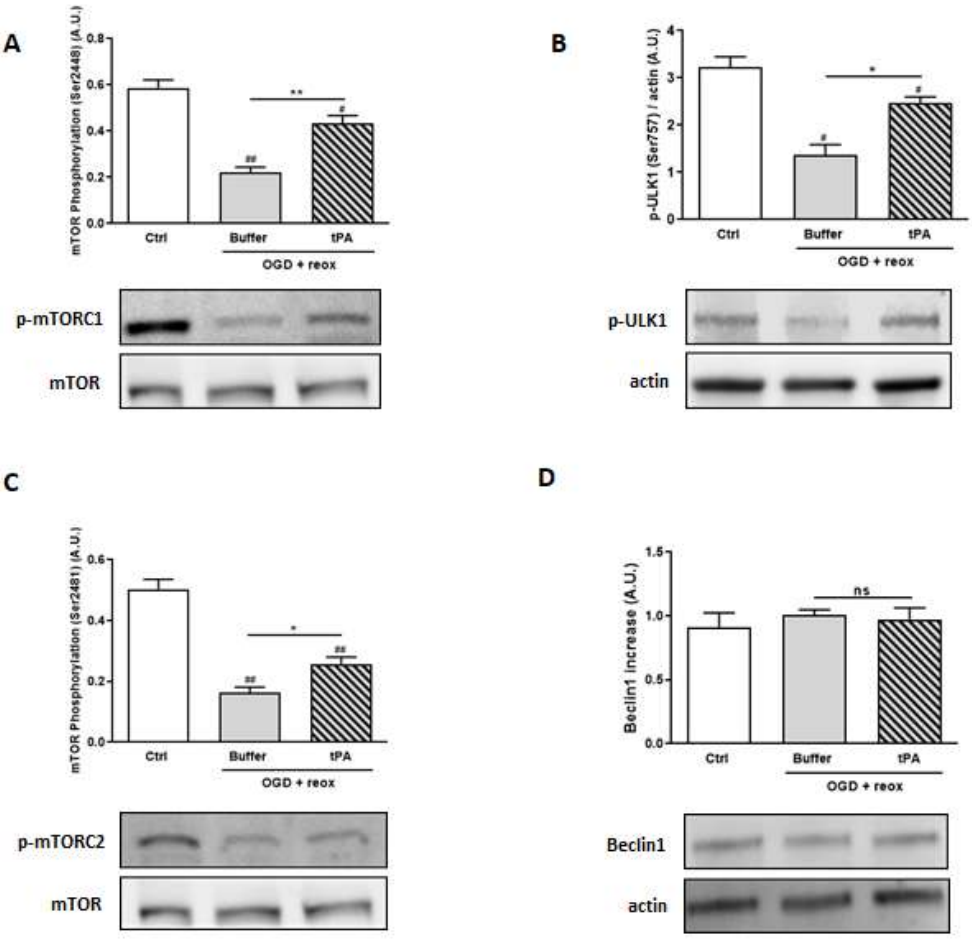


Figure 3: OGD-induced autophagy is dependent of the mTOR pathway

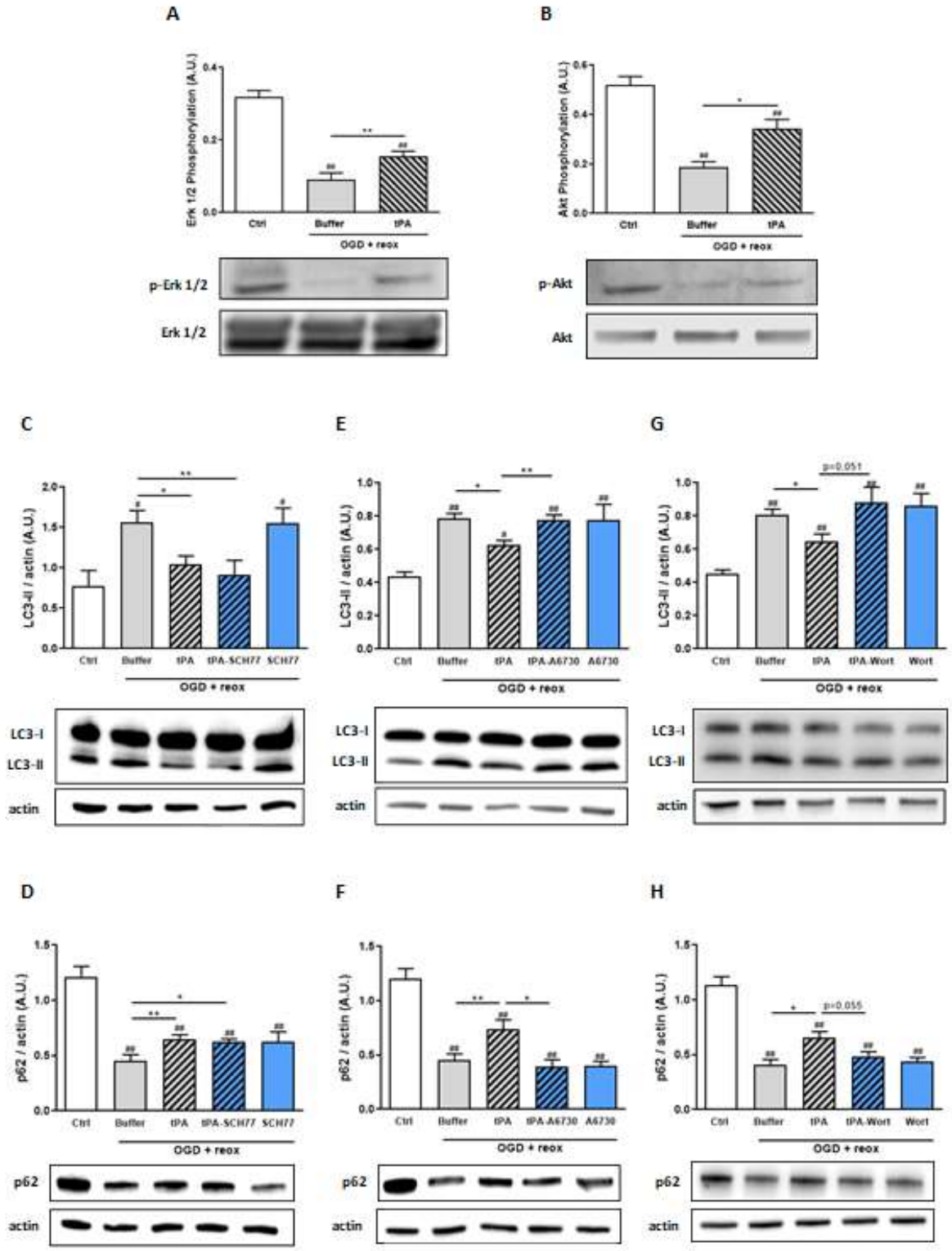


Figure 4: tPA decreases OGD-induced autophagy through the PI3K/Akt pathway

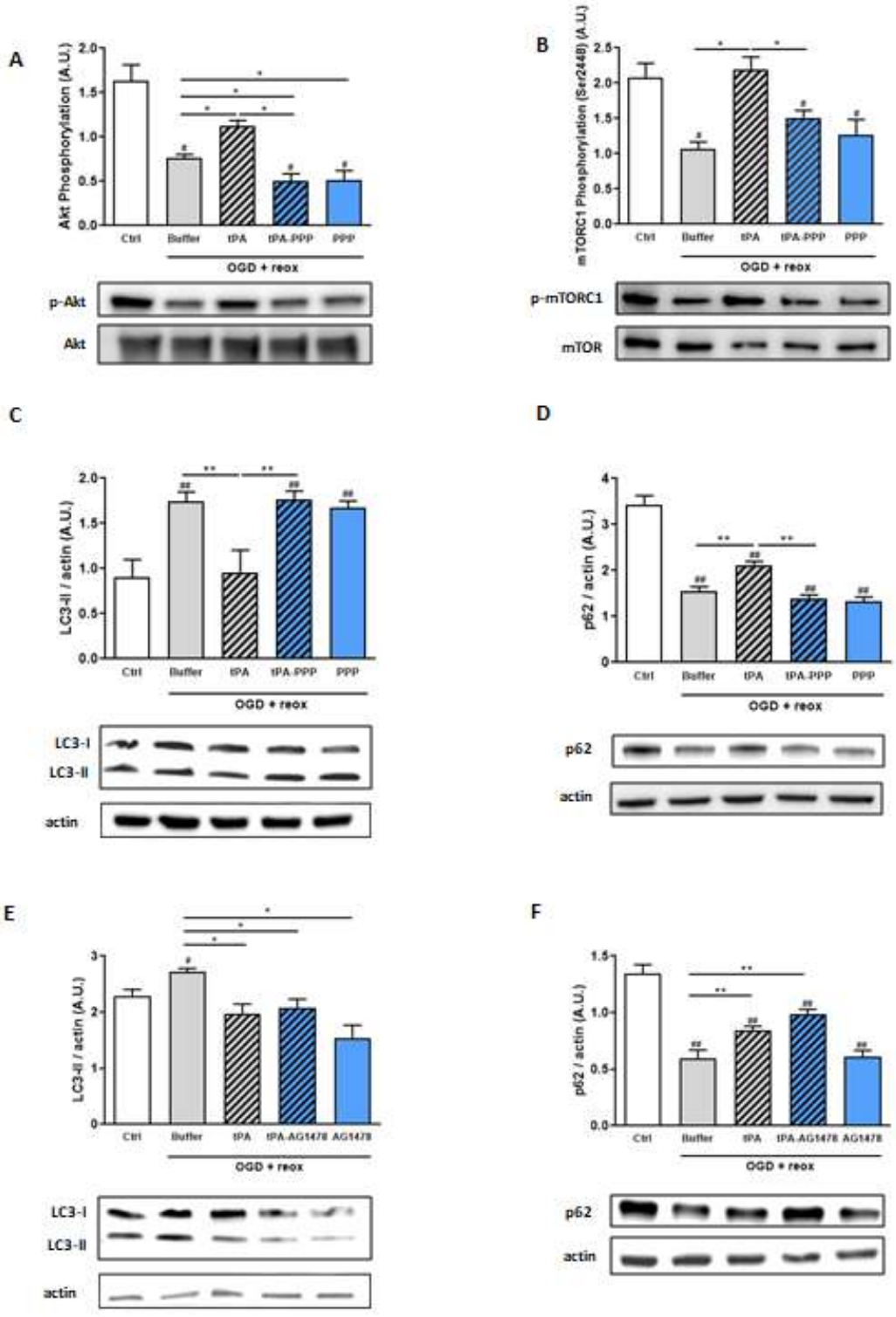


Figure 5: tPA decreases OGD-induced PI3K/Akt signalling through IGF1R receptor

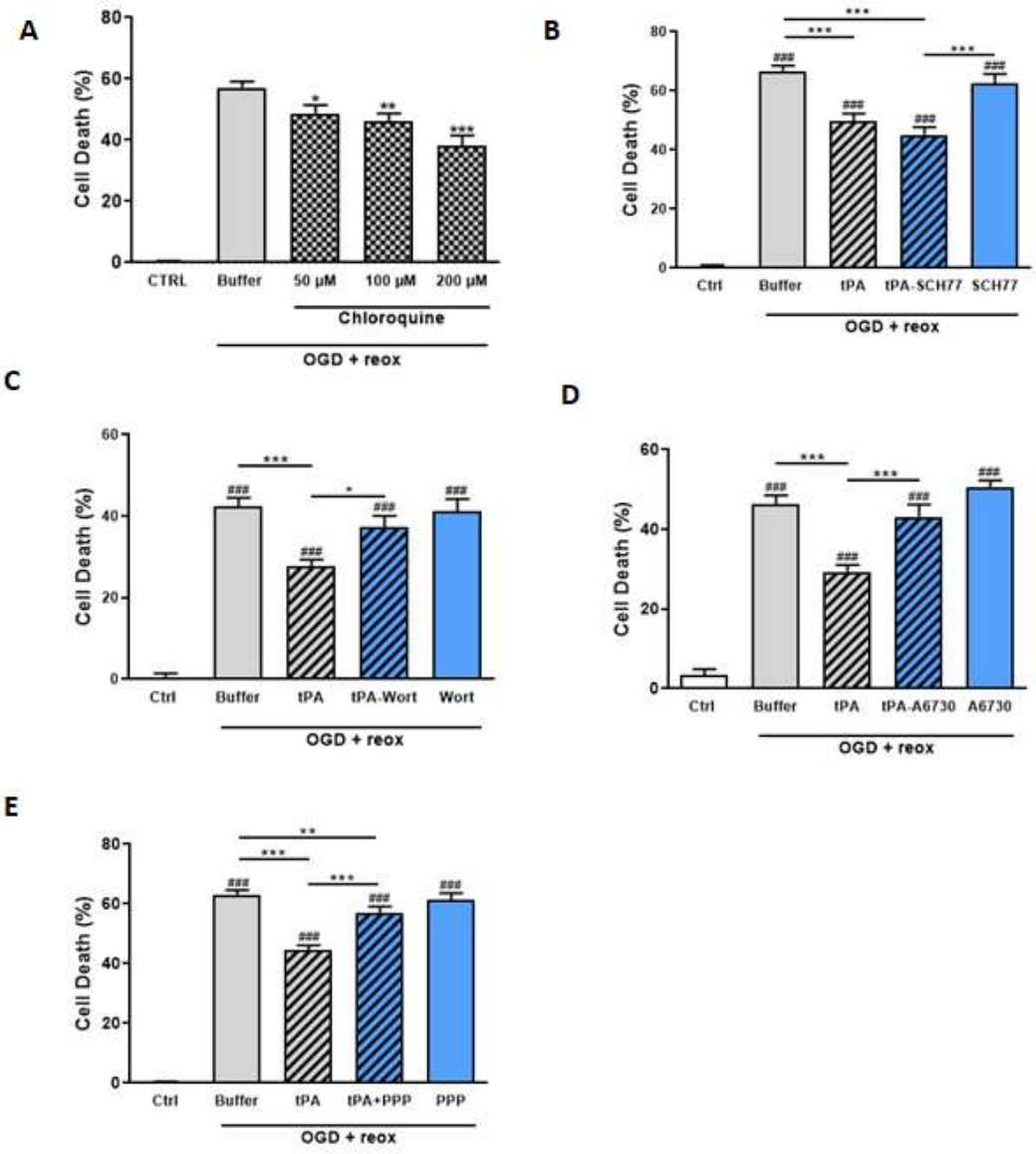


Figure 6: tPA protects neurons from cell death by decreasing autophagy through IGFR/PI3k/Akt/mTORC1

Discussion

Comme nous l'avons vu dans l'introduction, le tPA est couramment utilisé comme thrombolytique dans le traitement de la phase aiguë de l'AVC ischémique (Thiebaut *et al.,* 2018 ; voir autres travaux : Article 2). Durant cette phase aiguë, l'autophagie est fortement induite, cependant l'effet du tPA sur ce processus n'a jamais été étudié (effet propre et effet de la reperfusion). Les travaux menés durant cette thèse se sont donc attachés à comprendre **le rôle moléculaire du tPA sur l'autophagie neuronale induite par une ischémie cérébrale**.

Les résultats de l'article "The serine protease tPA decreases ischemia-induced neuronal death by inhibiting autophagy through IGF-1R/PI3K/mTOR pathway" démontrent que l'OGD suivie d'une période de réoxygénation ($OGD_{réox}$) provoque une diminution de la voie PI3K/Akt/mTOR conduisant à une activation de l'autophagie dans les neurones corticaux primaires de souris. J'ai également montré un rôle inattendu du tPA au niveau neuronal en identifiant un nouveau récepteur de ce neuromodulateur. En effet, le tPA peut activer le récepteur à l'IGF afin d'augmenter la signalisation PI3K/Akt et ainsi phosphoryler mTOR. En conditions ischémiques cela conduit à la phosphorylation de mTORC1 et à la diminution de l'autophagie afin de protéger les neurones.

◆ Activation de l'autophagie dans l'$OGD_{réox}$

Au cours des dernières années, l'utilisation de modèles *in vitro* et *in vivo* d'AVC ischémique, ont permis d'affirmer que l'ischémie cérébrale était responsable d'une augmentation de l'autophagie dans les neurones situés dans le parenchyme ischémié (Thiebaut *et al.*, 2019; voir autres travaux: Article 2). En effet, en cas d'ischémie, les neurones voient leur apport en oxygène et en glucose diminuer (Furlan *et al.*, 1996; Heiss *et al.*, 2001). C'est cette défaillance métabolique qui est à l'origine d'une exacerbation de l'autophagie dans les neurones.

Afin d'étudier l'autophagie, nous avons examiné par immuno-empreinte la lipidation de LC3-I conduisant à la formation du conjugué LC3-II. La conversion de LC3-I en LC3-II reflète une induction de l'autophagie ainsi qu'une augmentation de la formation des autophagosomes. LC3-II intervient dans l'élongation et la fermeture de l'autophagosome et n'est pas dissocié suite à la formation complète de la double membrane (Kabeya *et al.*, 2000; Kabeya, 2004). En effet, bien que les

protéines LC3-II fixées sur la membrane externe de l'autophagosome soient clivées par Atg4 et recyclées, celles présentes sur la membrane interne restent intactes jusqu'à ce qu'elles soient dégradées par les hydrolases lysosomales (Maruyama and Noda, 2017; Satoo *et al.*, 2009). Ainsi, lorsque l'autophagie est induite sur des temps courts, le taux de LC3-II est augmenté. Cependant, lorsque l'autophagie est activée sur des temps plus longs, l'expression de LC3-II est diminuée du fait de son élimination dans les lysosomes (Noboru Mizushima and Yoshimori, 2007). Dans notre étude, afin d'examiner la formation des autophagosomes, l'expression de LC3-II a été mesurée après seulement deux heures de réoxygénation. Étant donné que LC3-II a tendance à être plus sensible que LC3-I en immuno-empreinte, une simple comparaison de l'expression de LC3-I et de LC3-II n'est pas appropriée. À l'inverse, comparer la quantité de LC3-II dans les différents échantillons en utilisant comme contrôle une protéine de référence (l'actine par exemple), est une méthode plus précise (Klionsky *et al.*, 2016; Noboru Mizushima and Yoshimori, 2007).

Nos résultats montrent une augmentation de l'expression de LC3-II dans les neurones corticaux primaires suite à l'$OGD_{réox}$, reflétant une augmentation du nombre d'autophagosomes (Article 1 ; Figure 2B). Nous observons une augmentation de près de 107% par rapport au contrôle. Afin d'appuyer ces résultats, nous avons réalisé des immunocytochimies sur des cultures de neurones ayant été infectés par des lentivirus exprimant une protéine LC3-GFP. Suite à une $OGD_{réox}$, une hausse du nombre de ponctuas GFP (vert) est observée dans les neurones (Article 1 ; Figure 2D, 2E). Il a été démontré dans différents articles qu'une activation de l'autophagie, grâce à des agents pharmacologiques, conduisait à une hausse du nombre de ponctuas LC3-GFP, ces ponctuas reflétant une accumulation d'autophagosomes au sein de la cellule (Badr *et al.*, 2011; Kabeya *et al.*, 2000). Ainsi, nos résultats démontrent une hausse du nombre d'autophagosomes dans les neurones soumis à une $OGD_{réox}$. Une augmentation de l'expression de LC3-II dans les neurones ne suffit pas à démontrer une activation de l'autophagie (Klionsky *et al.*, 2016; Noboru Mizushima and Yoshimori, 2007). En effet, il est nécessaire de prouver que les autophagosomes formés fusionnent avec les lysosomes. Cette fusion étant nécessaire à la dégradation des protéines et des organites par les hydrolases lysosomales.

L'autophagie peut être un processus sélectif faisant intervenir des récepteurs autophagiques. Ces derniers agissent comme des protéines cargos fixant les éléments à dégrader et les transportant dans les autophagosomes où ils seront emmagasinés (Johansen and Lamark, 2019; Padman *et al.*,

2019; Zaffagnini *et al.*, 2018). Les récepteurs autophagiques sont eux-mêmes dégradés par les hydrolases lysosomales suite à la formation de l'autolysosome. La protéine p62 fut le premier récepteur autophagique décrit. Cette protéine cargo est notamment impliquée dans l'autophagie des agrégats protéiques (Pankiv *et al.*, 2007) et des mitochondries (Yamada *et al.*, 2018). p62 est dégradée par les hydrolases lysosomales en même temps que les substrats cellulaires. De ce fait, la dégradation de p62 est un bon marqueur de l'activité autophagique (Klionsky *et al.*, 2016; Noboru Mizushima and Yoshimori, 2007).

Nos résultats révèlent que l'expression protéique de p62 décroît en condition d'$OGD_{réox}$: on observe une diminution de 66.5% dans la condition $OGD_{réox}$ par rapport à la condition contrôle **(Article 1 ; Figure 2C)**. Ce résultat traduit une augmentation de la dégradation de p62 ainsi que des substrats protéiques dans l'autolysosome suite à l'$OGD_{réox}$.

L'ensemble de nos données démontrent que **l'$OGD_{réox}$ induit une augmentation du flux autophagique, en favorisant la formation des autophagosomes**. Il a déjà été montré que l'$OGD_{réox}$ induit de l'autophagie dans les cultures de lignées neuronales SH-SY5Y (Ding *et al.*, 2018), dans les cultures de neurones hippocampiques primaires de rats (Hwang *et al.*, 2017) et dans les cultures de neurones corticaux primaires de rats (Sun *et al.*, 2018). Notre modèle, montrant une augmentation de l'autophagie dans les neurones corticaux primaires de souris, concorde avec ceux de la littérature.

L'initiation de l'autophagie requiert un grand nombre d'acteurs regroupés en trois complexes qui interagissent entre eux afin de former le phagophore : le complexe mTORC1, le complexe ULK1 et le complexe PI3KC3.

Lorsqu'il est activé, le complexe mTORC1 interagit avec le complexe ULK1 et inhibe son activité kinase, en phosphorylant notamment la protéine ULK1 au niveau de la Ser^{757}. A contrario, lorsqu'il est inactivé mTORC1 se dissocie du complexe ULK1 entrainant, entre autre, la déphosphorylation de la Ser^{757} de ULK1. L'activité kinase d'ULK1/2 est alors restaurée, permettant son autophosphorylation (Egan *et al.*, 2011; Jung *et al.*, 2009; Kim *et al.*, 2011). Le complexe ULK1 activé migre jusqu'au phagophore, où il active le complexe PI3KC3 en phosphorylant la protéine Beclin1 au niveau de la Ser^{30} ou/et au niveau de la Ser^{14} (Park *et al.*, 2018; Russell *et al.*, 2013). La phosphorylation de Beclin1 n'est pas le seul reflet de l'activation du complexe PI3KC3. En outre, de

nombreuses études ont mis en évidence qu'une induction de l'autophagie conduisait à une augmentation de l'expression protéique de Beclin1 (Matsui *et al.*, 2007; Francesca Scarlatti *et al.*, 2004; Shibata *et al.*, 2006). Aujourd'hui, il est techniquement difficile d'étudier la phosphorylation de Beclin1 (Klionsky *et al.*, 2016) par immuno-empreinte, d'autant plus dans des cultures primaires. Afin de caractériser l'implication de Beclin1 dans l'initiation de l'autophagie, nous avons donc choisi de mesurer l'expression de Beclin1, et non sa phosphorylation.

Nos résultats montrent que l'$OGD_{réox}$ inhibe l'activité de mTORC1. Cela se traduit par une baisse de la phosphorylation de la Ser^{2448} **(Article 1; Figure 3A)**. En conséquence, nous observons, au niveau d'ULK1, une diminution de la phosphorylation inhibitrice exercée sur la Ser^{757} **(Article 1; Figure 3B)**. L'ensemble de ces résultats révèle que **l'autophagie induite par l'$OGD_{réox}$ résulte d'une inhibition de mTORC1.**

Concernant Beclin1, l'expression de la protéine n'est pas modifiée en condition d'$OGD_{réox}$ par rapport à la condition contrôle **(Article 1; Figure 3D)**. L'absence d'une hausse de Beclin1 en $OGD_{réox}$ laisse penser que l'ischémie cérébrale induit une autophagie indépendante de Beclin1. Pour appuyer ce résultat, nous avons montré que l'inhibition du complexe PI3KC3, *via* l'utilisation d'un inhibiteur de l'ensemble des PI3K : la wortmannin, ne modifie ni l'expression de LC3-II ni l'expression de p62 en condition d'$OGD_{réox}$ **(Article 1; Figure 4G, 4H)**. Ces données suggèrent que **l'$OGD_{réox}$ induit une autophagie non canonique indépendante de Beclin1**. Afin d'assurer ce résultat, il serait intéressant d'étudier, par une technique d'immuno-précipitation, les complexes Bcl2-Beclin1. La dissociation de ce complexe étant essentielle à l'induction de l'autophagie (Pattingre *et al.*, 2005).

De nombreux groupes ont montré le rôle essentiel des complexes mTORC1, ULK1/2 et PI3KC3 dans la formation du phagophore. Cependant, des études récentes ont reporté une forme d'autophagie n'impliquant pas l'ensemble de ces complexes. Ce type d'autophagie non canonique peut être indépendant, comme dans notre étude, de PI3KC3. Par exemple, Mauthe et collaborateurs ont montré en 2011 que le resvératrol induisait, dans différentes lignées cellulaires, une autophagie indépendante de Beclin1 mais dépendante d'Atg7 et Atg12-Atg5 (Mauthe *et al.*, 2011; Scarlatti *et al.*, 2008). Comme dans notre étude, Beclin1 n'est pas requis dans la conversion de LC3-I en LC3-II et la formation des autophagosomes. De façon intéressante, l'autophagie indépendante de Beclin1 est associée à une mort cellulaire (Sun *et al.*, 2015; Zhu *et al.*, 2007). Dans notre modèle, nous

observons que l'$OGD_{réox}$ induit à la fois une autophagie indépendante de Beclin1 et à la fois une mort neuronale. En conséquence, il se pourrait que cette mort neuronale soit corrélée avec l'autophagie induite **(Article 1; Figure 6)**.

◆ L'effet du tPA sur l'autophagie induite par l'$OGD_{réox}$

Pour la première fois nous avons démontré **la capacité du tPA à réduire l'autophagie induite par l'$OGD_{réox}$**. Nous avons testé plusieurs doses de tPA (0,3 ; 3 ; 30 ; 300 nM), et seul 300 nM de tPA permettent, à la fois de diminuer la conversion de LC3-I en LC3-II et la dégradation de p62 **(Article 1 ; Figure 2C, 2G)**.

Par ailleurs, le tPA protège les neurones de la mort induite par l'$OGD_{réox}$: à 300 nM il réduit la mort cellulaire de près de 20% **(Article 1 ; Figure 6B)**. L'effet anti-autophagique du tPA semble être associé à son rôle neuroprotecteur. En effet, nous avons montré que l'inhibition de l'autophagie, par l'utilisation de la chloroquine, protégeait les neurones de la mort induite par l'$OGD_{réox}$ **(Article 1 ; Figure 6A)**. Cette donnée démontre que l'autophagie est un acteur de la mort neuronale en $OGD_{réox}$ et que potentiellement **l'effet neuroprotecteur du tPA en $OGD_{réox}$ est lié à sa faculté à atténuer l'autophagie**. Des études réalisées au laboratoire ont déjà démontré que le tPA, utilisé à une concentration de 300 nM, protégeait les tranches hippocampiques d'embryons souris (Lemarchand *et al.*, 2016) et les neurones corticaux primaires de souris (Louessard *et al.*, 2016; voir autres travaux: Article 4) de la mort induite par l'$OGD_{réox}$; démontrant l'implication de la sérine protéase dans la protéostasie.

Dans l'étude de Lemarchand et collaborateurs, l'effet du tPA est dépendant des récepteurs à l'EGF. Par ailleurs, l'$OGD_{réox}$ réalisée sur les tranches d'hippocampes d'embryons de souris conduit principalement à une mort de type apoptotique (Chen et al., 1998; Cho et al., 2004), ce qui démontre dans ce modèle le caractère anti-apoptotique du tPA (Lemarchand *et al.*, 2016). Dans une étude que nous avons récemment publiée, nous avons démontré un effet neuroprotecteur du tPA dans l'$OGD_{réox}$ qui dépend de sa liaison à la protéine chaperonne Grp78 au niveau de la membrane plasmique. Cette interaction permet au tPA de diminuer le stress du RE et la mort neuronale (Louessard *et al.*, 2016; voir autres travaux: Article 4).

Dans notre étude nous montrons pour la première fois la capacité du tPA à diminuer à la fois l'autophagie et la mort neuronale provoquée par l'$OGD_{réox}$. Par ailleurs, l'équipe de Yepes, a publié en 2012 un article démontrant l'effet neuroprotecteur du tPA sur des cultures de neurones corticaux primaires de rats soumis à une $OGD_{réox}$ (Wu *et al.*, 2012). Contrairement aux études précédentes, le tPA est utilisé à une concentration de 5 nM, et son effet dépend de l'activation de mTORC1, complexe connu pour être un régulateur négatif de l'autophagie. Bien que cette étude ne démontre pas la capacité du tPA à contrôler l'autophagie, elle révèle sa faculté à activer mTORC1, un acteur clé dans l'inhibition de l'autophagie. Cependant, mTORC1 n'est jamais directement mesuré dans l'article : les auteurs s'intéressent à des cibles en amont de mTORC1 mais qui peuvent aussi être contrôlées par d'autres voies de signalisation.

Comme dans l'étude de Wu et collaborateurs, nous avons démontré qu'**en condition d'$OGD_{réox}$, le tPA était capable d'augmenter la phosphorylation de mTORC1 (Article 1; Figure 3A)**, ce qui restaure la phosphorylation inhibitrice située sur ULK1 **(Article 1; Figure 3B)**. Afin de voir si les effets neuroprotecteur et anti-autophagique du tPA dépendent de l'activation de mTORC1, nous avons décidé de bloquer l'activité du complexe en utilisant un inhibiteur bien connu: la rapamycine. Nous nous sommes rendu compte qu'aux concentrations normalement utilisées dans la littérature (autour de 10 nM), la rapamycine n'inhibait pas phospho-mTORC1 (Ser^{2448}) en condition contrôle. Nous avons donc testé plusieurs concentrations de rapamycine. Les données montrent que la rapamycine n'inhibe mTORC1 qu'à partir de 1 µM, soit 100 fois la dose standard. Cette inhibition reste cependant faible, avec 40% de diminution de phospho-mTORC1 (Ser^{2448}) par rapport au contrôle. De plus, cette dose, même après 24 heures, n'induit pas d'autophagie dans les neurones contrôles (Figure 40). De la même manière, la torin1, un autre inhibiteur connu de mTORC1, utilisé à 250 nM, n'induit pas d'autophagie.

La rapamycine est une molécule très utilisée comme activateur de l'autophagie. Son effet pro-autophagique a notamment été montré : chez la levure dans des conditions riches en nutriments (Noda and Ohsumi, 1998), dans des lignées cellulaires de gliome (U87-MG et T98G) (Takeuchi *et al.*, 2005), dans des modèles *in vitro* et *in vivo* de maladies neurodégénératives (Ravikumar *et al.*, 2002; Ravikumar *et al.*, 2004) et dans le système nerveux de souris (moelle épinière et cervelet) (Castillo *et al.*, 2013). Il est intéressant de noter que la rapamycine n'inhibe pas directement l'activité kinase de mTORC1. Son action dépend de sa liaison à FKBP12. Ce complexe se lie spécifiquement à mTORC1 et

inhibe de manière allostérique son activité kinase (Chiu *et al.*, 1994; Sabatini *et al.*, 1994; Sabers *et al.*, 1995).

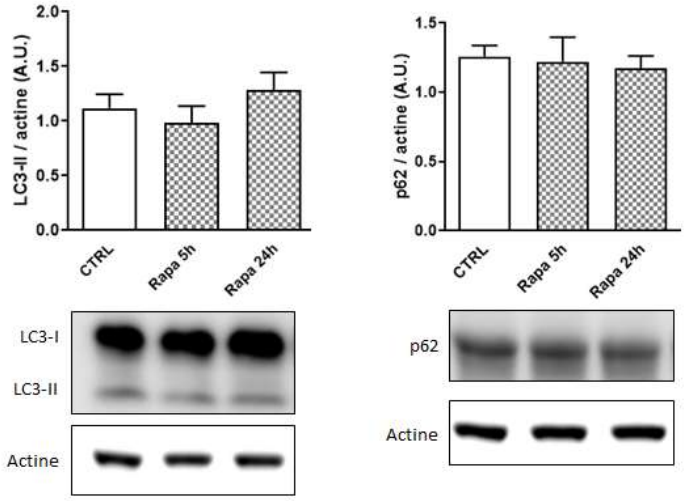


Figure 40 : Effet de la rapamycine et de la torin1 sur l'autophagie.
Immuno-empreinte, utilisant des anticorps dirigés contre les protéines LC3 et p62, réalisée sur des lysas des cultures de neurones corticaux primaires de souris traités ou non avec 1 µM de rapamycine. L'actine est utilisée comme contrôle. (Données représentées de la façon suivante: moyenne ± S.E.M. n=4 expériences ; Mann–Whitney test).

L'absence d'efficacité de la rapamycine pourrait s'expliquer par le fait qu'elle partage le même site de liaison que l'acide phosphatidique (AP) (Fang *et al.*, 2001; Veverka *et al.*, 2008). L'AP est un métabolite lipidique produit lors de la biogenèse des phospholipides membranaires, qui lie mTOR de manière compétitive et agit comme un antagoniste à la rapamycine. En effet, ce dernier, contrairement à la rapamycine, stabilise les complexes mTOR (Chen *et al.*, 2003; Fang *et al.*, 2001; Foster *et al.*, 2014). Les niveaux d'AP dans la cellule peuvent altérer la concentration de la rapamycine nécessaire pour supprimer mTOR (Foster, 2013; Toschi *et al.*, 2009). La compétition entre la rapamycine et l'AP pour mTOR semble expliquer la résistance des cellules cancéreuses à la rapamycine (Chen *et al.*, 2003).

Par ailleurs, le complexe mTORC2 est résistant à la rapamycine (Sarbassov *et al.*, 2004) et seulement un traitement prolongé avec des doses élevées permettrait un changement de conformation du complexe. En conséquence, lors d'un traitement à la rapamycine, mTORC2 continue de phosphoryler Akt au niveau de la Ser^{473} (O'Reilly *et al.*, 2006; Sarbassov *et al.*, 2005). L'Akt peut alors réactiver l'activité kinase de mTORC1, induisant un rétrocontrôle. Ainsi, il serait nécessaire d'utiliser

des doses avoisinant les 20 µM afin d'inhiber mTORC1 ainsi que ces voies cibles (p70s6K et 4E-BP1) (Yellen *et al.*, 2011). Dans notre modèle, il serait donc judicieux de mesurer le taux de PA afin de voir si ce dernier ne rentre pas en compétition avec la rapamycine et également traiter les neurones avec une concentration de rapamycine de 20 µM.

Lors d'une carence nutritionnelle, mTOR est inhibé, ce qui entraîne une initiation de l'autophagie. En conséquence, **sevrer les neurones en sérum semble être un bon modèle pour induire de l'autophagie *in vitro***. En 2006, Liot et collaborateurs ont utilisé ce modèle afin de montrer que le tPA protégeait les neurones de la mort apoptotique engendrée par un sevrage en sérum (Liot *et al.*, 2006). L'effet du tPA ne fait pas intervenir son activité protéolytique mais est dépendant de la voie des PI3K. De surcroît, Correa et collaborateurs ont rapporté que le tPA, *via* EGFR, protégeait les oligodendrocytes de l'apoptose induite par un sevrage en facteur trophique (Correa *et al.*, 2011). L'ensemble de ces résultats semblent dépeindre **un effet anti-apoptotique du tPA dans des modèles cellulaire de sevrage en nutriments**. Afin de voir si l'effet du tPA retrouvé dans ces études est dû à sa capacité à inhiber l'autophagie, nous avons étudié l'effet du sevrage en sérum sur l'expression de LC3-II et de p62 dans les neurones primaires corticaux de souris âgés de 7 jours *in vitro* (Figure 41).

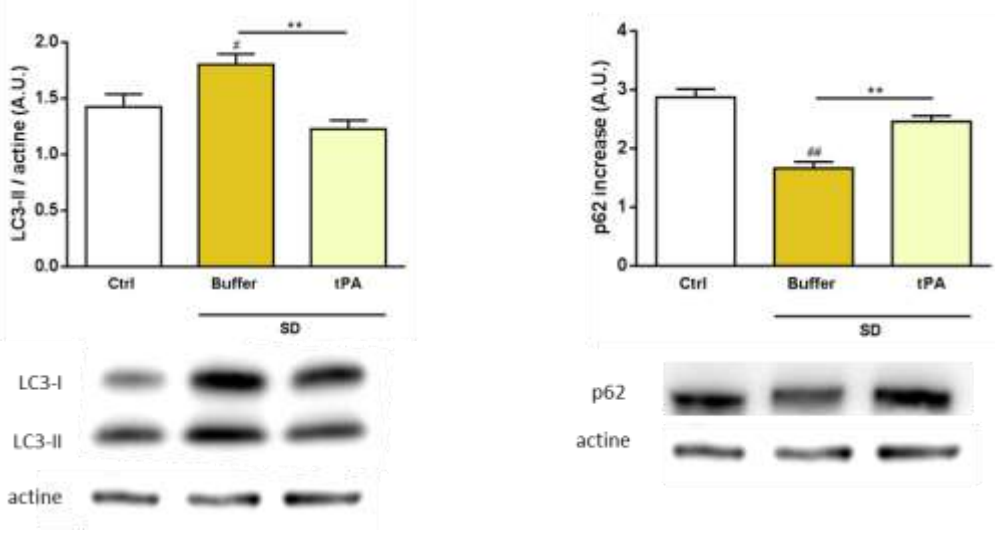


Figure 41 : Le sevrage en sérum induit de l'autophagie dans les neurones.
Immuno-empreinte, utilisant des anticorps dirigés contre les protéines LC3 et p62, réalisée sur des lysas des cultures de neurones corticaux primaires de souris traités ou non avec 1 µM de rapamycine. L'actine est utilisée comme contrôle. (Données représentées de la façon suivante: moyenne ± S.E.M. n=4 expériences ; Ctrl *vs* OGD : $^{\#}P<0.05$, $^{\#\#}P<0.01$; comparaison entre les conditions SD: $^{**}P<0.01$; Mann–Whitney).

Les résultats révèlent que le sevrage en sérum induit la conversion de LC3-I en LC3-II et la dégradation de p62 (Figure 41). Ce qui démontre que ce modèle induit de l'autophagie dans les neurones primaires. De façon intéressante, le tPA diminue l'autophagie induite par le sevrage en sérum. Ces données suggèrent, pour la première fois, que **le rôle anti-apoptotique du tPA dans les modèles de carence nutritionnelle est dû à sa capacité à diminuer l'autophagie**.

- **L'effet anti-autophagique du tPA dépend de la voie PI3K/Akt**

Le complexe mTORC1 peut être régulé par :

- ✓ Les kinases Erk qui l'activent (Carrière *et al.*, 2008).
- ✓ La voie PI3K/Akt qui l'active (Huang and Manning, 2009).
- ✓ L'AMPK (AMP-*activated protein kinase*) qui l'inhibe. AMPK est activée lorsque les niveaux énergétiques de la cellule sont insuffisants (Egan *et al.*, 2011).

L'activité de la kinase Erk est diminuée lors de l'AVC ischémique. Par conséquent, nous montrons de manière logique une baisse de sa phosphorylation en condition d'$OGD_{réox}$ **(Article 1 ; Figure 3A)**. Une étude a révélé qu'une activation de cette kinase protégeait les neurones de la mort induite par une $OGD_{réox}$ ou une ischémie focale chez le rat (Liu *et al.*, 2018). Par ailleurs, de nombreuses études démontrent la capacité du tPA à activer Erk dans les cultures primaires de neurones corticaux et dans les cultures primaires de neurones hippocampiques (Baron *et al.*, 2010; Medina *et al.*, 2005). Nos résultats affirment qu'en condition d'$OGD_{réox}$, le tPA favorise la phosphorylation d'Erk. Cependant, **le rôle anti-autophagique et neuroprotecteur du tPA ne dépend pas de l'activation de la protéine Erk**. En effet, en $OGD_{réox}$, l'utilisation d'un inhibiteur d'Erk, le SCH772984 (Morris *et al.*, 2013), ne réverse pas les effets du tPA sur l'autophagie et la mort neuronale **(Article 1 ; Figure 3C, 3D, 6B)**. Cet effet sur Erk est surement indirect : en diminuant l'autophagie et la mort, les niveaux de Erk sont plus élevés.

Tout comme Erk, les PI3Ks régulent l'activité de mTORC1. Il existe trois classes de PI3K. Comme nous avons pu le voir précédemment les classes III sont impliquées dans l'induction de l'autophagie. Les PI3Ks de classe I sont, quant à elles, impliquées dans la voie PI3K/Akt (Huang and Manning, 2009). Il a été démontré que l'activation de cette voie atténuait les dommages induits par l'ischémie cérébrale (He *et al.*, 2019; Hou *et al.*, 2018; Luan *et al.*, 2018).

Nous montrons dans notre étude que l'activité d'Akt est diminuée dans les neurones corticaux soumis à l'$OGD_{réox}$. En présence de tPA, cet effet est atténué, suggérant que le tPA active cette kinase **(Article 1 ; Figure 3B)**. La faculté du tPA à activer la voie PI3K/Akt a déjà été décrite (Correa *et al.*, 2011; Liot *et al.*, 2006). Cette information est d'autant plus intéressante que cet effet a été observé dans des modèles où l'effet anti-apoptotique du tPA est corrélé à une diminution de l'autophagie induite par un sevrage en nutriments (Correa *et al.*, 2011; Liot *et al.*, 2006). Ainsi, pour voir si comme dans ces études, le tPA diminue l'autophagie et la mort neuronale associée *via* l'axe PI3K/Akt, nous avons utilisé des inhibiteurs pharmacologiques.

L'inhibition pharmacologique de PI3K, présente une certaine difficulté car la plupart des inhibiteurs proposés dans le commerce aujourd'hui sont des inhibiteurs de l'ensemble des PI3K. Nous avons décidé d'utiliser le même inhibiteur que Liot et collaborateurs : la wortmannin (Liot *et al.*, 2006). Cet inhibiteur est connu pour être un inhibiteur de l'autophagie car il inhibe le complexe PI3KC3 (Blommaart *et al.*, 1997). Néanmoins, nous avons montré que l'autophagie induite dans notre modèle était indépendante de ce complexe et que l'utilisation de la wortmannin en $OGD_{réox}$ n'avait pas d'influence sur le flux autophagique. Ainsi, cet inhibiteur peut être utilisé comme un bloqueur spécifique de la voie PI3K/Akt. Tout comme Liot et collègues et Correa et collègues, nous avons montré que l'activité de la voie PI3K/Akt conditionnait l'effet neuroprotecteur du tPA **(Article 1 ; Figure 6C)**. L'utilisation de cet inhibiteur tend à diminuer l'effet anti-autophagique du tPA **(Article 1 ; Figure 3G, 3H)**. Cependant l'effet est non significatif: ceci peut s'expliquer par le manque de spécificité de l'inhibiteur, ou dans une moindre mesure à un échantillonnage trop faible.

En utilisant l'A6730 (Zheng *et al.*, 2017), nous avons montré que l'inhibition d'Akt empêchait le tPA de diminuer l'autophagie induite par l'$OGD_{réox}$ **(Article 1 ; Figure 3E, 3F)**, puis nous avons démontré que cette inhibition reversait également l'effet neuroprotecteur du tPA dans l'$OGD_{réox}$ **(Article 1 ; Figure 6D)**. Ainsi, nos données nous permettent de dire que **l'effet anti-autophagique et neuroprotecteur du tPA dans l'$OGD_{réox}$ dépend de la voie PI3K/Akt/mTORC1**.

Concernant le rôle d'AMPK dans l'$OGD_{réox}$, il est aujourd'hui bien décrit qu'AMPK est le senseur énergétique principal de la cellule et qu'il est sensible aux changements de rapport AMP/ATP. Lors d'un stress métabolique, la diminution de la production d'ATP active AMPK (Kim *et al.*, 2011), conduisant à l'inhibition de mTORC1 (Inoki *et al.*, 2003; Inoki *et al.*, 2002). L'activation d'AMPK a

déjà été décrite dans des neurones primaires soumis à une $OGD_{réox}$ et dans les neurones du tissu ischémié suite à une occlusion de l'ACM (Li *et al.*, 2007; McCullough *et al.*, 2005; Rousset *et al.*, 2015). Par ailleurs, l'augmentation de la phosphorylation d'AMPK est corrélée avec la perte synaptique et la mort neuronale (Domise *et al.*, 2019; Rousset *et al.*, 2015). En conséquence, une inhibition de la protéine est neuroprotectrice dans l'ischémie cérébrale (Li *et al.*, 2007; Rousset *et al.*, 2015).

Nous posant la question de l'effet du tPA sur AMPK, nous nous sommes penchés plus particulièrement sur une étude publiée en 2013 par l'équipe de Yepes révélant que le tPA était capable d'activer AMPK et de favoriser la recapture du glucose lors d'une ischémie cérébrale. De manière étonnante, dans leur modèle *in vivo* d'AVC ischémique, consistant à occlure de manière transitoire l'ACM chez la souris, l'activité de l'AMPK est inhibée (Wu *et al.*, 2013). Ainsi, selon leurs observations, en condition d'AVC ischémique, le tPA est un activateur d'AMPK. Cette information ne concorde pas avec notre modèle. En effet, si le tPA activait AMPK, une inhibition de mTORC1 en résulterait. Or, lorsque le tPA est présent en condition d'OGD_{reox}, nous observons une hausse de la phosphorylation de mTORC1 **(Article 1 ; Figure 3)**. Cependant, la même équipe a publié une seconde étude allant plus dans le sens de nos observations. Cette étude affirme que la capacité du tPA à recapturer le glucose en $OGD_{réox}$ dépend d'une activation de mTORC1 et non de son inhibition (Wu *et al.*, 2012). Ces données témoignent d'un lien complexe entre le tPA, l'AMPK et mTORC1 en condition d'AVC ischémique.

En conséquence, nous avons voulu étudier le rôle d'AMPK dans notre modèle, les anticorps dirigés contre la protéine AMPK ne permettaient pas d'avoir des résultats d'immuno-empreinte analysables. Ils seraient donc intéressants d'étudier l'implication de la protéine AMPK en utilisant des inhibiteurs pharmacologiques.

◆ L'effet du tPA dans l'$OGD_{réox}$ dépend du récepteur IGF-1R

Lorsque les oligodendrocytes sont sevrés en sérum, l'effet anti-apoptotique du tPA dépend de la voie PI3K/Akt mais aussi du récepteur à l'EGF (Correa *et al.*, 2011). Par ailleurs, le tPA protège également les tranches hippocampiques de l'apoptose induite par l'$OGD_{réox}$ en activant le récepteur à l'EGF (Lemarchand *et al.*, 2016).

Une étude récente que nous avons réalisée au laboratoire a montré qu'en condition d'$OGD_{réox}$, le tPA diminuait le stress du RE et la mort des neurones primaires corticaux, de manière indépendante du récepteur à l'EGF (Louessard *et al.*, 2016; voir autres travaux: Article 4). Tout comme dans les travaux de Louessard et collaborateurs, nous montrons qu'une inhibition du récepteur à l'EGF ne reversait pas l'atténuation du flux l'autophagique induite par le tPA. En conclusion, **dans l'$OGD_{réox}$, le récepteur à l'EGF n'intervient pas dans l'effet anti-autophagique et neuroprotecteur du tPA (Article 6 ; Figure 5E, EF)**.

Le tPA a été décrit comme interagissant avec de nombreux récepteurs au niveau neuronal, notamment avec les récepteurs NMDA. De manière intéressante, le tPA peut diminuer la mort de type excitotoxique en agissant *via* les récepteurs NMDA extra-synaptiques contenant la sous-unité GluN2A (Wu *et al.*, 2013). Selon l'équipe de Yepes, ces récepteurs interviennent également dans le rôle anti-apoptotique du tPA (Echeverry *et al.*, 2010) et dans sa faculté à favoriser la recapture du glucose et à diminuer les lésions induites par une ischémie cérébrale (Wu *et al.*, 2012). Afin de tester le rôle des récepteurs NMDA dans l'effet du tPA dans l'$OGD_{réox}$, nous avons utilisé deux inhibiteurs pharmacologiques (Figure 42) : le TCN201, un antagoniste spécifique et non-compétitif des récepteurs NMDA contenant la sous-unité GluN2A (Edman *et al.*, 2012) et l'ifenprodil (Ifen) un inhibiteur allostérique spécifique et non-compétitif des sous-unités GluN2B (Williams, 2001).

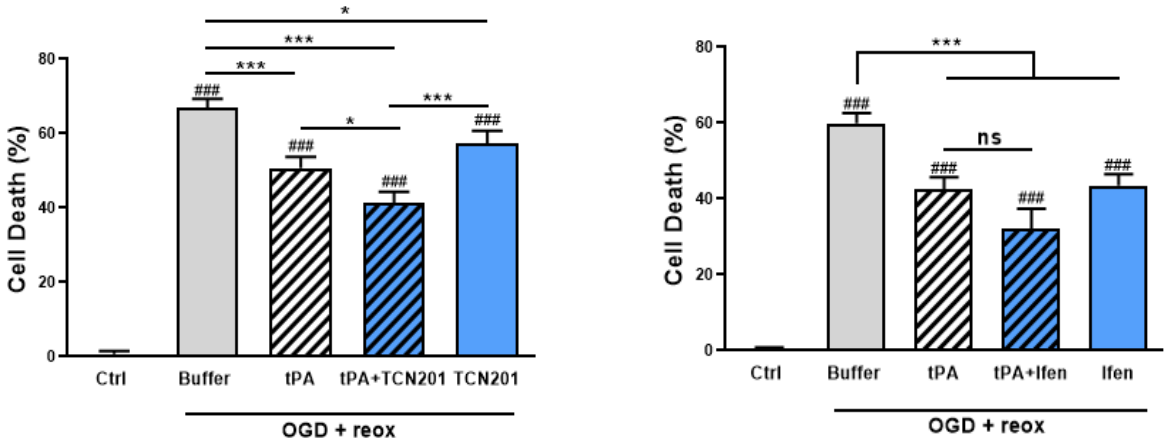


Figure 42 : L'effet neuroprotecteur du tPA dans l'OGD_{reox} n'est pas dépendant des récepteurs NMDA contenant la sous-unités GluN2A ou GluN2B

Mort cellulaire des neurones corticaux mesurée *via* la libération de LDH dans le milieu de culture après $OGD_{réox}$ en présence ou non de tPA et de TCN201 (10 μM) ou d'ifenprodil (Ifen ; 3 μM). (Données représentées de la façon suivante: moyenne±S.E.M. n=16 provenant de 4 expériences différentes ; Ctrl *vs* OGD : $^{###}P<0.01$; comparaison entre les conditions OGD_{reox}: $^{***}P<0.001$, $^{**}P<0.01$ et $^{*}P<0.05$; Mann–Whitney).

Nos travaux démontrent que l'inhibition des récepteurs NMDA, contenant la sous-unité GluN2A ou la sous-unité GluN2B, ne conditionne pas l'effet neuroprotecteur du tPA dans l'OGD_{reox} (Figure 42). Par ailleurs, les inhibiteurs ont un effet seul. On remarque, en effet, qu'en présence de TCN201 ou d'ifenprodil, la mort neuronale induite par l'OGD_{reox} est diminuée (Figure 42). En conséquence, un traitement combinant le TCN201 et le tPA conduit à un effet additif des deux traitements (Figure 42).

L'effet protecteur du TCN201 et de l'ifenprodil peuvent s'expliquer par le fait qu'une grande partie de la mort observée en OGD_{reox} résulte d'une excitotoxicité (Goldberg and Choi, 1993; Soria *et al.*, 2014; Taghibiglou *et al.*, 2009). L'excitotoxicité résulte d'une libération massive de glutamate dans la fente synaptique conduisant à une activation massive des récepteurs NMDA. L'activation continue d'un grand nombre de récepteurs NMDA (en particulier le sous-type GluN1/GluN2) entraîne une augmentation des charges de calcium intracellulaire et de l'activité des enzymes cataboliques, ce qui peut déclencher une cascade d'événements conduisant à la nécrose (Ndountse and Chan, 2009; Yang *et al.*, 2017; Yuan *et al.*, 2015) et à l'apoptose (Ndountse and Chan, 2009; Chen *et al.*, 2017). Nous avons pu notamment démontrer qu'un inhibiteur antagoniste non compétitif des récepteurs NMDA, le MK801 (Song *et al.*, 2018) et un inhibiteur de l'ensemble des caspases, le Z-VAD-FMK (Kim and Li, 2013; Park *et al.*, 2009) diminuaient, respectivement, l'excitotoxicité et la mort apoptotique induites par l'$OGD_{réox}$ (Figure 43). En outre, l'influx de calcium dans la cellule conduit à la génération de ROS ce qui pourrait favoriser l'autophagie (notamment la mitophagie).

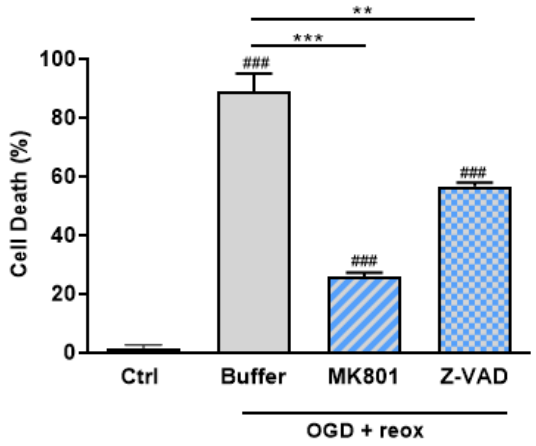


Figure 43 : L'OGD_{reox} induit une mort excitotoxique et une mort apoptotique

Mort cellulaire des neurones corticaux mesurée *via* la libération de LDH dans le milieu de culture après $OGD_{réox}$ en présence ou non de tPA et de MK801 (10 μM) ou Z-VAD-FMK (Z-VAD ; 20 μM). (Données représentées de la façon suivante: moyenne±S.E.M. n=16 provenant de 4 expériences différentes ; Ctrl *vs* OGD : $^{###}P<0.01$; comparaison entre les conditions OGD_{reox}: $^{***}P<0.001$, $^{**}P<0.01$ et $^{*}P<0.05$; Mann–Whitney).

Les récepteurs NMDA semblent donc être impliqués, en tant qu'effecteurs, dans la mort neuronale induite par l'$OGD_{réox}$ et non dans la neuroprotection induite par le tPA. Afin de trouver le récepteur responsable de l'effet du tPA dans l'$OGD_{réox}$, nous nous sommes intéressés à ceux décrits pour leur implication dans l'inhibition de l'autophagie. Le récepteur à l'IGF-1 a particulièrement retenu notre attention car l'analyse des « RNA sequençing » a révélé qu'il était régulé négativement lors d'une $OGD_{réox}$. De plus, ce dernier est connu pour activer la voie PI3K/Akt/mTORC1 et inhiber l'autophagie (Lin *et al.*, 2017; Troncoso *et al.*, 2012; Wang and Gu, 2017; Wu *et al.*, 2009). Cependant, l'effet d'IGF-1R dans l'autophagie reste controversé. Par exemple, Liu et collaborateurs ont montré en 2017 qu'IGF-1R favorisait l'autophagie en supprimant la voie PI3K/Akt/mTORC1 (Liu *et al.*, 2017).

De manière intéressante, tout comme le tPA, IGF-1R et son ligand IGF-1 jouent un rôle crucial dans le développement cérébral et dans la survie cellulaire. Il intervient particulièrement dans la neurogénèse et la synaptogénèse ainsi que dans la différentiation et la maturation des neurones au cours du développement du système nerveux central (pour revue: Nieto-Estévez *et al.*, 2016). L'IGF-1R est également un élément clé de la survie neuronale (Cheng *et al.*, 2001; Lunn *et al.*, 2015), en protégeant notamment les cellules neuronales après une lésion hypoxique/ischémique (Liu *et al.*, 2011). Il a été décrit qu'une injection d'IGF-1 dans des modèles animaux d'AVC ischémique était neuroprotectrice et favorisait la régénération du tissu neuronal (De Geyter *et al.*, 2016; Kooijman *et al.*, 2009). L'injection intracérébroventriculaire d'IGF-1 atténue également l'inflammation, la perméabilité de la BHE et le volume de lésion induits par une occlusion de l'ACM chez le rat. Dans cette étude, IGF-1 contribue, entre autres, à l'activation d'Akt et d'Erk (Bake *et al.*, 2014). Ce mécanisme pourrait s'expliquer par la faculté de l'IGF-1R à maintenir l'intégrité de la barrière endothéliale en stabilisant le complexe majeure des jonctions inter-endothéliales : VE-PTP (*vascular endothelial - protein tyrosine phosphatase*) / VE-cadhérine (Liang *et al.*, 2015). Finalement, des travaux ont démontré, qu'après une hypoxie/ischémie, IGF-1 est augmenté dans la région lésée, et plus particulièrement dans les astrocytes et la microglie (Gluckman *et al.*, 1992).

Aujourd'hui, six IGFBP humaines (IGFBP1-6) modulant l'activité biologique de l'IGF-1 ont été identifiées et près de 99% de l'IGF-1 circulant est lié à un IGFBP. Le complexe majoritairement retrouvé est un complexe tertiaire composé d'IGFBP-3, IGF-1 et d'une sous-unité « acide labile ». Après une ischémie cérébrale, le niveau d'expression sérique d'IGF-I et d'IGFBP3 est diminué (Schwab *et al.*, 1997), cela peut s'expliquer par le fait que leur sécrétion est régulée par les

hormones de croissance (Blum *et al.*, 1993). Au niveau cellulaire, IGFBP3 contrôle la biodisponibilité des IGF sécrétés localement, notamment en le séquestrant et en empêchant leur fixation sur IGF-1R (Blat *et al.*, 1994; Imai *et al.*, 2000; pour revue: Jogie-Brahim *et al.*, 2009). IGF-1 peut être libéré de ce complexe grâce à la dégradation d'IGFBP3 par des protéases telles que la plasmine, la thrombine, les MMP-1, les MMP-2 et les MMP-3 (Booth *et al.*, 1996; Fowlkes *et al.*, 1994). De manière intéressante, au cours de la grossesse, le tPA et l'uPA dégradent l'IGFBP3 circulant (Bang and Fielder, 1997). De surcroit, en 2012, Elzi et collaborateurs ont montré que le tPA, mais pas l'uPA, clive IGFBP3 dans une lignée de cellules tumorales mammaires (*human breast adenocarcinoma cell line,* MCF-7) et dans les cellules HEK. Cet effet est neutralisé par la serpine PAI-1 (Elzi *et al.*, 2012).

Nos résultats démontrent que l'effet neuroprotecteur du tPA est diminué en présence d'un inhibiteur pharmacologique spécifique de l'IGF-1R, le picropodophyllin (PPP ; 100 nM) (Girnita *et al.*, 2004) **(Article 1 ; Figure 6)**. De surcroît, en condition d'$OGD_{réox}$, le PPP empêche le tPA d'activer la voie PI3K/Akt/mTORC1 et de diminuer l'autophagie **(Article 1 ; Figure 5A, 5B, 5C et 5D)**.

En résumé, dans notre modèle *in vitro* d'AVC ischémique, le tPA protège les neurones de la mort en diminuant l'autophagie. Cet effet dépend de la faculté du tPA à activer la voie PI3K/Akt/mTORC1 *via* IGF-1R.

Nous devons, à présent, déterminer comment le tPA active IGF-1R. Pour répondre à cette question, trois hypothèses s'offrent à nous :

Hypothèse 1 : Le tPA active IGF-1R de manière directe. L'IGF-1R est un récepteur tyrosine kinase et il a été décrit que le tPA interagissait au niveau neuronal avec des récepteurs à activité tyrosine kinase tels que le récepteur à l'EGF. De plus, ces deux récepteurs présentent des homologies structurales notamment des domaines riches en cystéines (Figure 44). Pour vérifier cette hypothèse, nous sommes actuellement en train de réaliser une étude d'interaction ligand/récepteur reposant sur la spectroscopie des plasmons de surface.

Hypothèse 2 : L'activation d'IGF-1R pourrait se faire indirectement et pourrait dépendre du clivage d'IGFBP3 par le tPA. Comme il a été décrit précédemment, le tPA est capable de dégrader IGFBP3 et d'induire la libération d'IGF (Elzi *et al.*, 2012). Afin de vérifier cette hypothèse, il faudra incuber des

neurones avec du tPA en condition contrôle et en condition d'$OGD_{réox}$ puis récupérer le milieu afin d'étudier la dégradation d'IGFBP3 par technique d'immuno-empreinte.

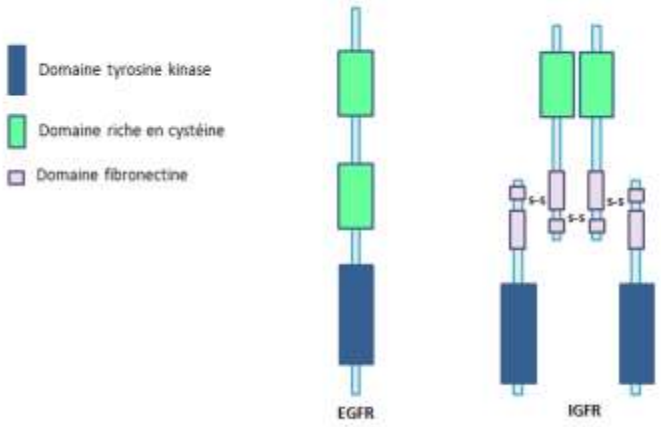


Figure 44 : La structure des récepteurs EGFR et IGF-1R

Hypothèse 3 : Le récepteur LRP6 serait capable de stabiliser le récepteur IGF-1R et de promouvoir son activité (Singh *et al.*, 2013). D'autre part, le tPA activerait LRP6 pour favoriser la pousse neuritique des progéniteurs neuronaux (Lee *et al.*, 2014). Le tPA pourrait donc activer IGF-1R *via* LRP6.

D'autre part, il serait intéressant d'étudier le rôle du facteur de transcription p53 dans l'$OGD_{réox}$. Ce dernier est régulateur de l'autophagie. Bien que certaines équipes démontrent son rôle pro-autophagique, (Tasdemir *et al.*, 2008) d'autres tentent de démontrer son rôle anti-autophagique (Goiran *et al.*, 2018). L'activation de l'autophagie par p53 est majoritairement dépendante de l'inhibition de la voie mTORC1 *via* la régulation transcriptionnelle des gènes codant l'IGFBP3 (Feng *et al.*, 2007). De plus, suite à un stress nutritionnel, l'inhibition de mTORC1 peut se faire de manière indépendante de AMPK, notamment *via* p53 et/ou la voie IGF-1/Akt (Feng and Levine, 2010; Huang and Manning, 2009).

◆ Le rôle de mTORC2 dans l'$OGD_{réox}$

Nous avons montré qu'à l'instar de mTORC1, mTORC2 est inhibé en $OGD_{réox}$ et son activité est partiellement restaurée en présence de tPA **(Article 1 ; Figure 3C)**. Le complexe mTORC2 contrôle la prolifération et la survie cellulaire en phosphorylant notamment la protéine kinase A (PKA), la PKC et

la PKG. Le rôle le plus important de mTORC2, cependant, est probablement la phosphorylation et l'activation d'Akt (Guertin *et al.*, 2006; Jacinto *et al.*, 2006). L'activation d'Akt contribue notamment à l'inhibition de TSC2, régulateur négatif de mTORC1 (Inoki *et al.*, 2002).

On pourrait émettre l'hypothèse qu'en présence de tPA l'effet pro-survie de mTORC2 est restauré. Afin de vérifier cette possibilité il serait intéressant d'étudier les protéines régulées par mTORC2 afin de protéger les cellules de la mort telles que FOXO3a (Feehan and Shantz, 2016), PCK1 (Khan *et al.*, 2015) et Akt (Wong, 2019). De plus, nous pourrions regarder si l'activation de mTORC2 favorise l'activité de mTORC1 en $OGD_{réox}$.

Un point marquant est que le récepteur mTORC2 est activé par des facteurs de croissances comme l'insuline et l'IGF-1 ainsi que par la voie PI3K/Akt (Gan *et al.*, 2011; Saxton and Sabatini, 2017; Sural-Fehr *et al.*, 2019). De surcroît, mTORC2 est capable d'activer IGF-1R (Yin *et al.*, 2016). Il serait donc nécessaire d'analyser l'effet d'IGF-1R sur l'activation de mTORC2, puis de voir si, en absence de mTORC2, le tPA promeut toujours l'activation d'IGF-1R (Figure 45).

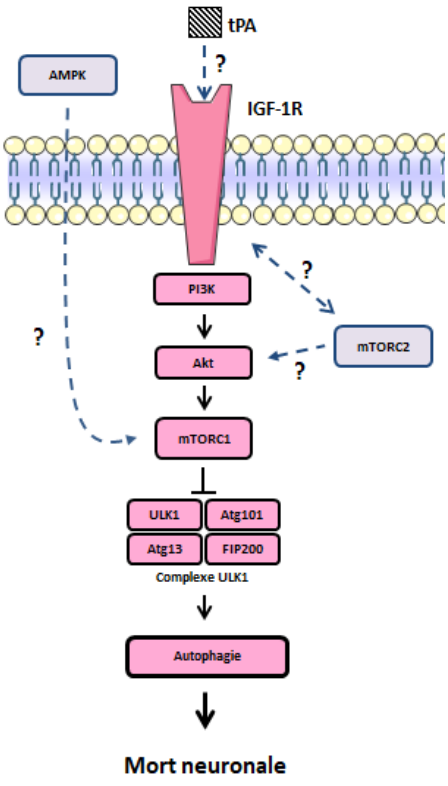


Figure 45 : Schéma de le neuroprotection du tPA dans

◆ L'autophagie neuronale dans l'ischémie cérébrale : protecteur ou délétère ?

L'effet de l'autophagie dans l'ischémie cérébrale est assez controversé. Certaines équipes démontrent son effet protecteur alors que d'autres équipes affirment que son rôle est délétère.

Ces différences pourraient d'abord s'expliquer par la non-spécificité des traitements utilisés. Par exemple, la wortmannin et la 3-MA sont des inhibiteurs de l'ensemble des PI3K. Sachant que les PI3K de classe I favorisent l'activation de mTORC1 et l'inhibition de l'autophagie et que les PI3K de classe III sont impliquées dans l'initiation de l'autophagie, utiliser ces inhibiteurs des PI3K pour inhiber l'autophagie ne semble pas être la meilleure stratégie. De plus, des protéines comme la Vps34 ou mTORC1 sont impliquées dans d'autres fonctions que l'autophagie, Vps34 est notamment un contrôleur essentiel du trafic membranaire (Rostislavleva *et al.*, 2015) et mTORC1 régule la prolifération cellulaire, la croissance et la survie cellulaire, la biosynthèse des protéines et la transcription (Ma and Blenis, 2009). L'inhibition de ces protéines peut donc affecter d'autres processus que l'autophagie et donc altérer les résultats. D'autre part, la dose et la méthode d'administration des agents pharmacologiques peuvent aussi influer les effets observés. Comme il a été décrit précédemment, les neurones peuvent être résistants à la rapamycine et seulement des doses importantes et prolongées augmenteraient le flux autophagique (Mukhopadhyay *et al.*, 2016).

Ensuite, les modèles utilisés peuvent aussi expliquer les différents résultats. Pour étudier l'autophagie dans l'AVC ischémique, de nombreux modèles animaux (l'électrocoagulation, photo-thrombose, l'occlusion des 4 artères carotides communes ou encore l'occlusion de l'ACM …) ont été utilisés et chaque modèle induit une lésion différente, ce qui peut expliquer la diversité des résultats (Fluri *et al.*, 2015). L'occlusion de l'ACM avec un filament est le modèle le plus utilisé dans les études. Ce modèle invasif peut induire des lésions de l'endothélium et une réaction inflammatoire exacerbée non observée chez l'Homme. De plus, l'occlusion de l'ACM peut être transitoire et en fonction du temps d'occlusion, le volume de lésion varie. Concernant les modèles *in vitro*, les différences observées pourraient s'expliquer déjà par l'utilisation de deux types cellulaires différents : les lignées cellulaires PC12 et les cultures de neurones primaires. En effet, en comparaison aux neurones primaires, les cellules PC12 n'expriment pas de récepteurs NMDA fonctionnels (Edwards *et al.*, 2007), ce qui pourrait modifier la réponse à l'OGD (Figure 43). De plus,

les neurones primaires pourraient répondre différemment à l'OGD en fonction de leur maturation *in vitro*.

En outre, il est difficile de répondre à la question « l'autophagie est-elle délétère ou protectrice ? ». Sur un plan théorique, l'autophagie devrait être un processus protecteur dans l'ischémie : l'AVC induit un stress important dans la cellule conduisant notamment à une accumulation de protéines mal repliées et à une dysfonction mitochondriale. L'autophagie permettrait alors de dégrader les agrégats protéiques et les mitochondries endommagées et de rétablir l'homéostasie cellulaire. Par ailleurs, lorsque la lésion ischémique est trop importante, l'autophagie pourrait être activée en excès et induire une perte progressive des organites et une perturbation des membranes intracellulaires (Dasari *et al.*, 2017; Shi *et al.*, 2012). De la même manière, un excès de mitophagie peut induire une clairance trop importante des mitochondries voire une déplétion complète de l'organite (Reef *et al.*, 2006; Wang *et al.*, 2014; Zhang *et al.*, 2015). Dans ce cas, la perte partielle ou complète de la fonction mitochondriale conduit à une altération de la respiration oxydative et de la production d'ATP. Également, cette défaillance énergétique peut être à l'origine de la mort cellulaire (Sentelle *et al.*, 2012).

Dans l'ischémie cérébrale, le basculement entre l'effet bénéfique et l'effet délétère dépendrait donc de l'intensité de l'autophagie.

Nous pouvons donc supposer que dans notre modèle, l'$OGD_{réox}$ provoque un excès d'autophagie conduisant à la mort cellulaire. Le tPA, lui, atténuerait l'autophagie afin de permettre une clairance plus adaptée, en ne dégradant que les mitochondries endommagées et les agrégats protéiques. Ainsi, les organites pourraient restés intactes et l'homéostasie cellulaire serait restaurée.

- **Existe-t-il des liens entre le stress du RE et l'autophagie en $OGD_{réox}$?**

En 2017, nous avons publié un article démontrant que l'$OGD_{réox}$ induisait un stress du RE, *via* une augmentation des voies de l'UPR, notamment l'axe PERK/eiF2α. L'activation de cet axe provoque notamment une augmentation des protéines en aval : ATF4, CHOP, GADD34 (Louessard *et al.*, 2016; voir autres travaux: Article 4).

Le stress du RE et l'autophagie sont deux processus très liés, d'une part parce que le RE sert de plateforme pour la formation des phagophores (Axe *et al.*, 2008) et d'autre part parce que le stress

du RE peut induire de l'autophagie *via* les voies de l'UPR (Thiebaut *et al.,* 2018 ; voir autres travaux : Article 2). Par exemple, lors d'une carence en nutriments provoquant un stress du RE, ATF4 et CHOP induisent la transcription de gènes liés à l'autophagie (B'chir *et al.*, 2013). De surcroît, au cours de l'hypoxie, ATF4 est stabilisé et peut faciliter l'élongation de l'autophagosome en augmentant l'expression de LC3-II (Rzymski *et al.*, 2010). Il a déjà été montré dans un modèle d'ischémie/reperfusion murin que l'induction pharmacologique d'un stress du RE activait l'autophagie (Zhang *et al.*, 2014).

Dans notre modèle, l'autophagie pourrait être le résultat d'une activation des voies de l'UPR. Pour vérifier cette hypothèse, nous pourrions inhiber pharmacologiquement le stress du RE ou la voie PERK/eiF2α et voir si une inhibition de l'autophagie en résulterait.

Dans les travaux de Louessard et collaborateurs, nous avons également démontré qu'en $OGD_{réox}$, le tPA, à travers sa liaison à Grp78 au niveau membranaire, diminuait l'activation d'eiF2α et l'expression d'ATF4, de CHOP et de GADD34 (Louessard *et al.*, 2016; voir autres travaux: Article 4). Le mécanisme impliqué dans cet effet reste cependant inconnu. L'analyse hydrophobique et protéique de la structure de Grp78 à la surface membranaire montre que la probabilité de transduction de signal est faible (Tsai *et al.*, 2015), suggérant ainsi la présence d'un co-récepteur. Fait intéressant, il a été décrit qu'IGFBP3 interagissait avec Grp78 pour induire de l'autophagie dans les lignées de cellules cancéreuses mammaires (Grkovic *et al.*, 2013). Cette interaction est également responsable d'une activation des voies de l'UPR (Grkovic *et al.*, 2013).

Nous pourrions donc supposer que dans notre étude, l'$OGD_{réox}$ favorise la translocation de Grp78 du RE à la membrane. Une fois à la membrane, la chaperonne se lie à IGFBP3 pour induire un stress du RE et de l'autophagie. En présence de tPA, IGFBP3 serait clivé par la protéase, dissociant Grp78 et IGF-1. Ce dernier pourrait alors activer IGF-1R et induire l'activation de la voie PI3K/Akt/mTORC1.

Dans le futur, nous étudierons donc les liens stress du RE/autophagie dans l'$OGD_{réox}$, afin de voir si ces deux mécanismes sont indépendants ou s'ils résultent d'un même stimulus, et notamment de la liaison Grp78/IGFBP3. Puis, nous étudierons si le tPA diminue le stress du RE *via* le même mécanisme que l'autophagie : IGF-1R/ PI3K/Akt/mTORC1.

◆ Les autres cellules du SNC

Les astrocytes jouent un rôle important dans l'AVC ischémique et il a été décrit qu'en cas d'ischémie l'autophagie augmentait dans ces cellules. Cependant, le rôle du processus n'est pas encore bien décrit. Il est donc important d'étudier l'impact du tPA sur l'autophagie et la survie astrocytaire, d'autant plus qu'après une hypoxie/ischémie, IGF-1 est augmenté dans les astrocytes et la microglie présents dans la lésion. La microglie est un acteur essentiel de l'inflammation dans l'AVC ischémique (Gluckman *et al.*, 1992). Il n'est aujourd'hui pas encore certain que l'ischémie cérébrale induise de l'autophagie dans les cellules microgliales. Nous pourrions donc soumettre des cellules primaires microgliales à une $OGD_{réox}$ et étudier, dans un premier temps, le flux autophagique.

Enfin, l'une des conséquences de la thrombolyse avec le tPA est la transformation hémorragique (Wardlaw, 2001), notamment due à une rupture de la BHE (Benchenane *et al.*, 2005; Polavarapu *et al.*, 2007; Yepes *et al.*, 2003). À l'instar de la microglie, l'induction de l'autophagie dans les cellules endothéliales n'est pas totalement claire. L'équipe d'Engelhardt a montré que l'OGD n'induisait pas d'autophagie dans une lignée de BMVECs (Engelhardt *et al.*, 2015). À l'inverse, Shi et collaborateurs ont montré une augmentation de l'autophagie dans les BMVECs primaires soumis à une OGD (Shi *et al.*, 2016). Bien que deux études démontrent un effet bénéfique de l'autophagie endothéliale dans l'ischémie cérébrale, Li et collaborateurs démontrent que l'autophagie contribue à la perméabilisation de la BHE suite à une occlusion de l'ACM chez les souris. Cette perméabilisation est due à l'altération des jonctions serrées et à la mort des cellules vasculaires (Li *et al.*, 2013).

Nous pourrions observer si l'$OGD_{réox}$ induit de l'autophagie dans les cellules BMVECs primaires et si cette autophagie favorise la mort cellulaire. Puis, nous pourrions étudier le rôle du tPA dans ce processus d'autant plus que l'injection intracérébroventriculaire d'IGF-1 atténue la perméabilité de la BHE induite par une occlusion de l'ACM chez le rat (Bake *et al.*, 2014) et qu'IGF-1R a la faculté de maintenir l'intégrité de la barrière endothéliale en stabilisant les jonctions inter-endothéliales : VE-PTP (*vascular endothelial - protein tyrosine phosphatase*) / VE-cadhérine (Liang *et al.*, 2015).

Conclusion générale

Cette étude avait pour but d'étudier l'effet du tPA sur les événements autophagiques dans un modèle *in vitro* d'ischémie cérébrale. Pour la première fois, nous démontrons, que la sérine protéase tPA, utilisée comme traitement dans la thrombolyse, est capable de réduire l'autophagie induite par un sevrage en oxygène et glucose, dans les neurones corticaux. Cette diminution d'autophagie est neuroprotectrice. Afin d'induire cet effet anti-autophagique et neuroprotecteur, le tPA agît *via* le récepteur IGF-1R et la voie PI3K/Akt/mTORC1. Jusqu'à aujourd'hui, il n'avait jamais été démontré que le tPA était capable d'induire un effet à travers ce récepteur tyrosine kinase. De manière intéressante, le tPA et IGF-1R sont exprimés dans les cellules du SNC et sont impliqués dans des processus communs tels que le développement cérébral et la survie cellulaire. La découverte d'un lien entre le tPA et IGF-1R dans notre étude ouvre des perspectives pour de futur travaux qui permettraient de mieux comprendre le rôle de ces deux protéines dans le parenchyme cérébral.

Bien que son rôle soit encore débattu, il est clairement établi que l'autophagie est exacerbée dans les neurones du parenchyme ischémié. Cet excès d'autophagie pourrait être à l'origine d'une dégradation trop importante des protéines et des organites cellulaires conduisant à une mort neuronale couramment observée dans les différents modèles d'AVC ischémiques. En outre, il semble qu'une atténuation du processus d'autophagie soit neuroprotecteur. Ainsi l'identification de la voie IGF-1R/PI3K/Akt/mTORC1 dans les effets anti-autophagique et neuroprotecteur du tPA ouvre un champ d'étude sur l'utilisation de cette voie de signalisation comme cible thérapeutique. Pour se faire, il serait intéressant de mieux comprendre le rôle de cette voie dans les différents types cellulaires du SNC ainsi que dans les différents processus mis en place lors de l'ischémie cérébrale (stress du RE, excitotoxicité, apoptose, inflammation…).

Autres travaux

Article 2: "*Proteostasis during cerebral ischemia*"

Audrey M. Thiebaut*, Elodie Hedou*, Stefan J. Marciniak, Denis Vivien, and Benoit D. Roussel.

Titre: La protéostasie dans l'ischémie cérébrale

Revue publiée en 2019 dans *Frontiers in Neuroscience*

Résumé : L'ischémie cérébrale est une pathologie complexe impliquant une cascade de mécanismes cellulaires qui dérégulent la protéostase et conduisent à la mort neuronale. La protéostasie fait référence à l'équilibre entre synthèse de la protéine, repliement, transport et dégradation de la protéine. Dans le cerveau, la protéostase joue un rôle clé dans l'apprentissage et la mémoire en contrôlant la synthèse et la dégradation des protéines. Deux voies importantes sont impliquées dans la régulation de la protéostase: l'UPR et la macro-autophagie (appelée ci-dessous autophagie). Les deux sont nécessaires à la survie des cellules. Cependant, leur durée d'activation excessive ou leur intensité peuvent conduire à la mort cellulaire. De plus, l'UPR et l'autophagie peuvent s'activer et se potentialiser mutuellement aggravant les lésions ischémiques. Une meilleure compréhension de l'autophagie et du stress du RE permettra d'élaborer des stratégies thérapeutiques pour les AVC, à la fois pendant la phase aiguë et pendant la période de récupération. Cette revue résume les dernières avancées thérapeutiques impliquant le stress du RE ou l'autophagie dans une ischémie cérébrale. Nous soutenons l'idée que lors de l'étude de l'ischémie cérébrale, il est important d'investiguer l'ensemble des processus régissant la protéostasie, plutôt que de se concentrer sur le stress du RE ou l'autophagie de manière isolée.

frontiers in Neuroscience

REVIEW
published: 19 June 2019
doi: 10.3389/fnins.2019.00637

Proteostasis During Cerebral Ischemia

Audrey M. Thiebaut[1†], Elodie Hedou[1†], Stefan J. Marciniak[2,3], Denis Vivien[1,4] and Benoit D. Roussel[1]*

[1] INSERM, INSERM UMR-S U1237, Physiopathology and Imaging of Neurological Disorders, University of Caen Normandy, Caen, France, [2] Cambridge Institute for Medical Research, University of Cambridge, Cambridge, United Kingdom, [3] Department of Medicine, Addenbrooke's Hospital, University of Cambridge, Cambridge, United Kingdom, [4] Department of Clinical Research, University of Caen Normandy, Caen, France

Cerebral ischemia is a complex pathology involving a cascade of cellular mechanisms, which deregulate proteostasis and lead to neuronal death. Proteostasis refers to the equilibrium between protein synthesis, folding, transport, and protein degradation. Within the brain proteostasis plays key roles in learning and memory by controlling protein synthesis and degradation. Two important pathways are implicated in the regulation of proteostasis: the unfolded protein response (UPR) and macroautophagy (called hereafter autophagy). Both are necessary for cell survival, however, their over-activation in duration or intensity can lead to cell death. Moreover, UPR and autophagy can activate and potentiate each other to worsen the issue of cerebral ischemia. A better understanding of autophagy and ER stress will allow the development of therapeutic strategies for stroke, both at the acute phase and during recovery. This review summarizes the latest therapeutic advances implicating ER stress or autophagy in cerebral ischemia. We argue that the processes governing proteostasis should be considered together in stroke, rather than focusing either on ER stress or autophagy in isolation.

Keywords: stroke, autophagy, ER stress, proteostasis, mTOR

OPEN ACCESS

Edited by:
Mathias Gelderblom, University Medical Center Hamburg-Eppendorf, Germany

Reviewed by:
Pedro Domingos, Institute of Chemical and Biological Technology, New University of Lisbon, Portugal
Maria Xilouri, Biomedical Research Foundation of the Academy of Athens, Greece

***Correspondence:**
Benoit D. Roussel
broussel@cyceron.fr

[†]These authors have contributed equally to this work

Specialty section:
This article was submitted to Neurodegeneration, a section of the journal Frontiers in Neuroscience

Received: *26 March 2019*
Accepted: *03 June 2019*
Published: *19 June 2019*

Citation:
Thiebaut AM, Hedou E, Marciniak SJ, Vivien D and Roussel BD (2019) Proteostasis During Cerebral Ischemia. Front. Neurosci. 13:637. doi: 10.3389/fnins.2019.00637

Abbreviations: 3-MA, 3-methyladenine; AMP, adenosine monophosphate; AMPAR, α-amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionic acid receptor; AMPK, AMP-activated protein kinase; ATF4, activating transcription factor 4; ATF6, activating transcription factor 6; Atg, autophagy-regulated; Atg16L1, Atg16-like 1; ATP, adenosine triphosphate; Baf, bafilomycin; BBB, blood-brain barrier; BCAo, Bilateral cerebral artery occlusion; Bcl-2, B cell lymphoma 2; BiP, binding immunoglobulin protein; BMVECs, brain microvascular endothelial cells; CA, cornu ammonis; CHOP, CCAT/enhancer homologous protein; CICR, calcium-induced calcium release; CMA, chaperone-mediated autophagy; CREB, cAMP response element binding protein; CSF, cerebrospinal fluid; DAPK1, death-associated protein kinase 1; eIF2α, eukaryotic translation initiation factor 2α; ER, endoplasmic reticulum; ERAD, ER-associated protein degradation; FIP200, focal adhesion kinase family interacting protein of 200 kDa; FOXO1, forkhead box O1; GABARAP, Ɣ-aminobutyric acid receptor-associated protein; GADD34, growth arrest and DNA damage inducible 34; GATE-16, Golgi-associated ATPase enhancer of 16 kDa; GFAP, glial fibrillary acidic protein; GFP, green fluorescence protein; Grp78, Glucose regulated protein 78; HI, hypoxia-ischemia; HIF-1α, hypoxia-inducible factor-1α; hsc70, heat-shock cognate protein of 70 kDa; IP3R, inositol trisphosphate receptor; IPC, ischemic preconditioning; IRE1, inositol-requiring enzyme 1; JNK1, Jun N-terminal kinase 1; LAMP2A, lysosomal-associated membrane protein 2A; LC3, light chain 3; miR-9a-5p, micro-RNA-9a-5p; mTOR, mammalian target of rapamycin; mTORC1, mammalian target of rapamycin complex 1; NF-κB, Nuclear factor-κB; NMDA, N-methyl-D-aspartate; OGD, oxygen and glucose deprivation; P70S6K, P70 ribosomal protein S6 kinase; PE, phosphatidylethanolamine; PERK, protein kinase R-like endoplasmic reticulum kinase; PI3K, phosphatidylinositol 3-kinase; PI3P, phosphatidylinositol 3-phosphate; pMCAO, permanent model of middle cerebral artery occlusion; Rheb, Ras homolog enriched in brain; RIP1K, receptor-interacting protein 1 kinase; SERCA, sarcoendoplasmic reticular calcium-ATPase; SGK, serum and glucocorticoid kinase; siRNA, small interfering RNA; SNAP29, synaptosomal-associated protein 29; SNARE, soluble N-ethylmaleimide-sensitive-factor attachment protein receptor; SQSTM1, sequestosome 1; STX17, syntaxin 17; tMCAo, transient MCAo; tPA, tissue-type plasminogen activator; TSC1/2, tuberous sclerosis complex 1 and 2; TSC2, tuberous sclerosis complex 2; ULK1, Unc-51-like kinase; UPR, unfolded protein response; VAMP8, vesicle-associated membrane protein 8; VPS15, vacuolar protein sorting 15; VPS34, vacuolar protein sorting 34; XBP1, X-box bonding protein 1.

INTRODUCTION

Cerebral ischemia is a major cause of adult mortality and disability in developed countries. It is characterized by a reduction of cerebral blood flow, leading to a dramatic drop of energetic supply, altered cellular homeostasis and finally cell death (Doyle et al., 2008; Yepes et al., 2009). Several pathways leading to neuronal death are activated during ischemic events. Historically, glutamate receptor-mediated excitotoxicity, apoptosis and inflammation have been shown to be important parts of ischemia-mediated neuronal death (Dirnagl et al., 1999). More recently, ER stress via the UPR (Roussel et al., 2013) and autophagy (Liu et al., 2010) pathways, either at the acute phase or during recovery, has received much attention in the stroke research field.

To date, only two therapeutic approaches are available to promote reperfusion during ischemic stroke: the recent mechanical clot removal (endovascular thrombectomy), and thrombolysis by tPA (Thiebaut et al., 2018). Of note, tPA administration is often combined with endovascular thrombectomy, especially in patients with large vessel occlusion (Berkhemer et al., 2015). However, both treatments have their own limits: tPA has a narrow therapeutic window (4.5 h after stroke onset) (Hacke et al., 2008), presents a risk of hemorrhagic transformation and has a low recanalisation rate (National Institute of Neurological Disorders and Stroke rt-Pa Stroke Study Group, 1995; Thiebaut et al., 2018); while endovascular thrombectomy is restricted to large vessel occlusions (Berkhemer et al., 2015). Several strategies of neuroprotection have been tested in stroke, but no clinical trials have demonstrated any beneficial effect in patients (Young et al., 2007). To overcome this challenge, better stroke models and trial designs are required, and integration of multiple complex signaling pathways will be necessary to provide a complete understanding of stroke (Karsy et al., 2017).

Among such pathways, those maintaining proteostasis appear especially relevant as they encompass many responses, from changes in protein synthesis and folding to secretion and degradation. Moreover, altered proteostasis is implicated in both the acute and recovery phases of stroke (Wang and Yang, 2018). The UPR, which is the proteostasis control system affecting the ER, maintains the balance between protein synthesis, folding and degradation within the organelle (Roussel et al., 2013). On the other hand, protein or organelle degradation during stroke is mainly driven by autophagy (with ubiquitination and SUMOylation), and more particularly, macroautophagy (called hereafter autophagy) (Liu et al., 2010).

AUTOPHAGY AND CEREBRAL ISCHEMIA

Autophagy is a protein degradation system highly conserved in all eukaryotes. Its name comes from Greek roots: "auto" which means "self" and "phagy" which means "eating." This self-protecting catabolic process is required for restoring cellular homeostasis under nutrient starvation or metabolic stress by degrading or recycling long-lived or misfolded proteins and damaged organelles (Klionsky et al., 2016). Depending on the mode of cargo delivery, three types of autophagy have been described: microautophagy, CMA and macroautophagy.

Microautophagy is a non-selective lysosomal degradative process referring to as the direct engulfment of cytoplasmic materials by the lysosome. In microautophagy, the lysosomal membrane is randomly invaginated to trap portions of the cytosol (**Figure 1A**). Microautophagy is known to play several roles, such as the regulation of the ratio of lipid to protein at the lysosomal surface, the maintenance of organelle size, the membrane composition and lipid metabolism. It can occur simultaneously with macroautophagy or simply be a constitutive method to degrade long-lived proteins and membrane proteins (Iwata et al., 2005; Krick et al., 2009).

Chaperone-mediated autophagy is a selective lysosomal degradative process requiring the presence within the substrate protein of a specific amino acid motif recognized by the chaperone hsc70. All cargo recognized by hsc70 are delivered to lysosomes where they bind to the LAMP2A (Bandyopadhyay et al., 2008; **Figure 1B**). Then, they are translocated one-by-one into lysosomes assisted by a chaperone located in the lysosomal lumen. CMA contributes to protein quality control through selective removal of altered or damaged proteins (Zhang and Cuervo, 2008).

In contrast to microautophagy and CMA, macroautophagy involves sequestration of the cargo away from the lysosome. Macroautophagy requires the synthesis of an autophagosome, a double-layered membrane structure, to transport cellular cargo targeted for degradation. Autophagosomes then fuse with lysosomes to form autophagolysosomes resulting in the degradation of their contents (**Figure 1C**). Because macroautophagy is the most abundant and characterized form of autophagy, our review will primarily focus on its mechanisms and effects in cerebral ischemia.

Autophagy occurs at a basal level in all mammalian cells and is regulated by conditions such as starvation, oxidative stress or hypoxia, and can also be triggered by obesity, diabetes, inflammation and cancer. The induction of autophagy appears as a promising therapeutic strategy for neurodegenerative diseases with protein misfolding and aggregation (Alzheimer's diseases, Parkinson's disease, Tauopathies, Huntington's disease, and various spinocerebellar ataxias) (Rubinsztein et al., 2012).

Autophagy Mechanisms in Physiopathological Conditions

Autophagy Processes and Signaling Pathway

The most common experimental approaches to induce autophagy are either nutrient starvation and or the use of rapamycin to inhibit the mTOR. Autophagy activates the ULK1 complex (ULK1, also known as Atg1 for intervention of autophagy-regulated 1), Atg13, and FIP200 (Noda and Ohsumi, 1998). The ULK1 complex also regulates the activation of a class III PI3K complex formed by Beclin-1, VPS34, and VPS15. When phosphorylated by ULK1, Beclin-1 promotes the generation of PI3P by VPS34, which upgrades autophagosomal

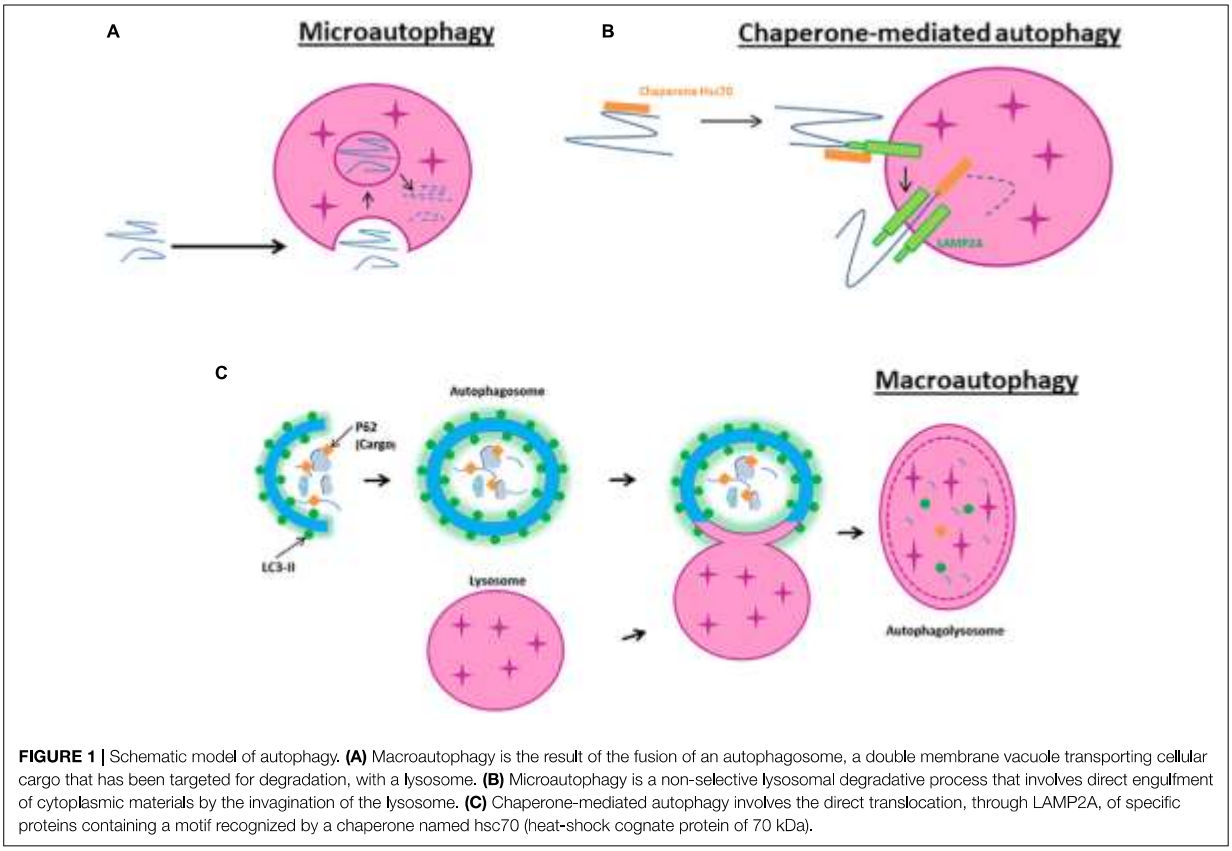


FIGURE 1 | Schematic model of autophagy. **(A)** Macroautophagy is the result of the fusion of an autophagosome, a double membrane vacuole transporting cellular cargo that has been targeted for degradation, with a lysosome. **(B)** Microautophagy is a non-selective lysosomal degradative process that involves direct engulfment of cytoplasmic materials by the invagination of the lysosome. **(C)** Chaperone-mediated autophagy involves the direct translocation, through LAMP2A, of specific proteins containing a motif recognized by a chaperone named hsc70 (heat-shock cognate protein of 70 kDa).

membrane nucleation (Russell et al., 2013; **Figure 2A**). On the other hand, Beclin-1 can bind to the anti-apoptotic protein Bcl-2 leading to the inhibition of autophagy (Pattingre et al., 2005). In response to starvation, JNK1 phosphorylates Bcl-2 allowing its release from Beclin-1 and the induction of autophagy (Pattingre et al., 2009; **Figure 2B**).

In addition to these two complexes, other Atg proteins are hierarchically required for the biogenesis of autophagosomes. Atg5 and Atg12, co-operate with Atg7, to promote the formation of an Atg5-Atg12- Atg16L1 complex, and thus facilitate the cargo recruitment and autophagosomes membrane elongation. The microtubule-associated protein light chain 3 (LC3, also named Atg8) is cleaved by Atg4 to yield LC3-I, then, LC3-I is conjugated to PE by Atg7 and Atg3 to become LC3-II (Mizushima et al., 2011). p62, also called SQSTM1, binds to ubiquitinated proteins, targeting them for degradation into autolysosomes through its binding to LC3-II in the autophagosome (Myeku and Figueiredo-Pereira, 2011). LC3-II is essential for phagophore formation, with the participation of GABARAP/GATE-16 subfamily members in later stages of autophagosome formation, in particular for phagophore elongation, closure and fusion (Weidberg et al., 2010). Autophagosome can acquire membranes from multiple sources including the ER, the Golgi apparatus, the plasma membrane and the mitochondrial outer membrane. This process requires the involvement of the only transmembrane Atg protein, Atg9, which is present in single-membrane vesicles providing membranes for early autophagosome formation (Yamamoto et al., 2012). The fusion between the autophagosome and the lysosome requires the recruitment from the ER and mitochondria of the SNARE protein STX17. STX17 interacts with SNAP29 and VAMP8 to form a *trans*-SNARE complex and mediates autophagosome-lysosomes fusion (Itakura et al., 2012).

Autophagy Activation in Brain Ischemia

Nitatori et al. (1995) were the first to demonstrate, by electron microscopy, an increase in cathepsin B-immunopositive lysosomes, in the CA1 pyramidal neurons 3 days after an ischemic insult. Since then, the evidence for activation of autophagy has continued to accumulate. For example, beclin 1 is activated and associated to a LC3-II increase following neonatal hypoxia-ischemia (HI) (Carloni et al., 2008) and focal cerebral ischemia (Rami et al., 2008). In neonatal cerebral HI, in addition to the increase in autophagosomal formation (characterized by an increase of LC3-II), there is also an increase of lysosomal activity in damaged cortical and CA3 neurons, suggesting an increase in the autophagic flux (Ginet et al., 2009). These results are confirmed in a pMCAO. Moreover, immunofluorescence shows strong co-localisation of autophagosomal puncta (LC3-II) and lysosomes (cathepsin D and LAMP1) (Puyal et al., 2009).

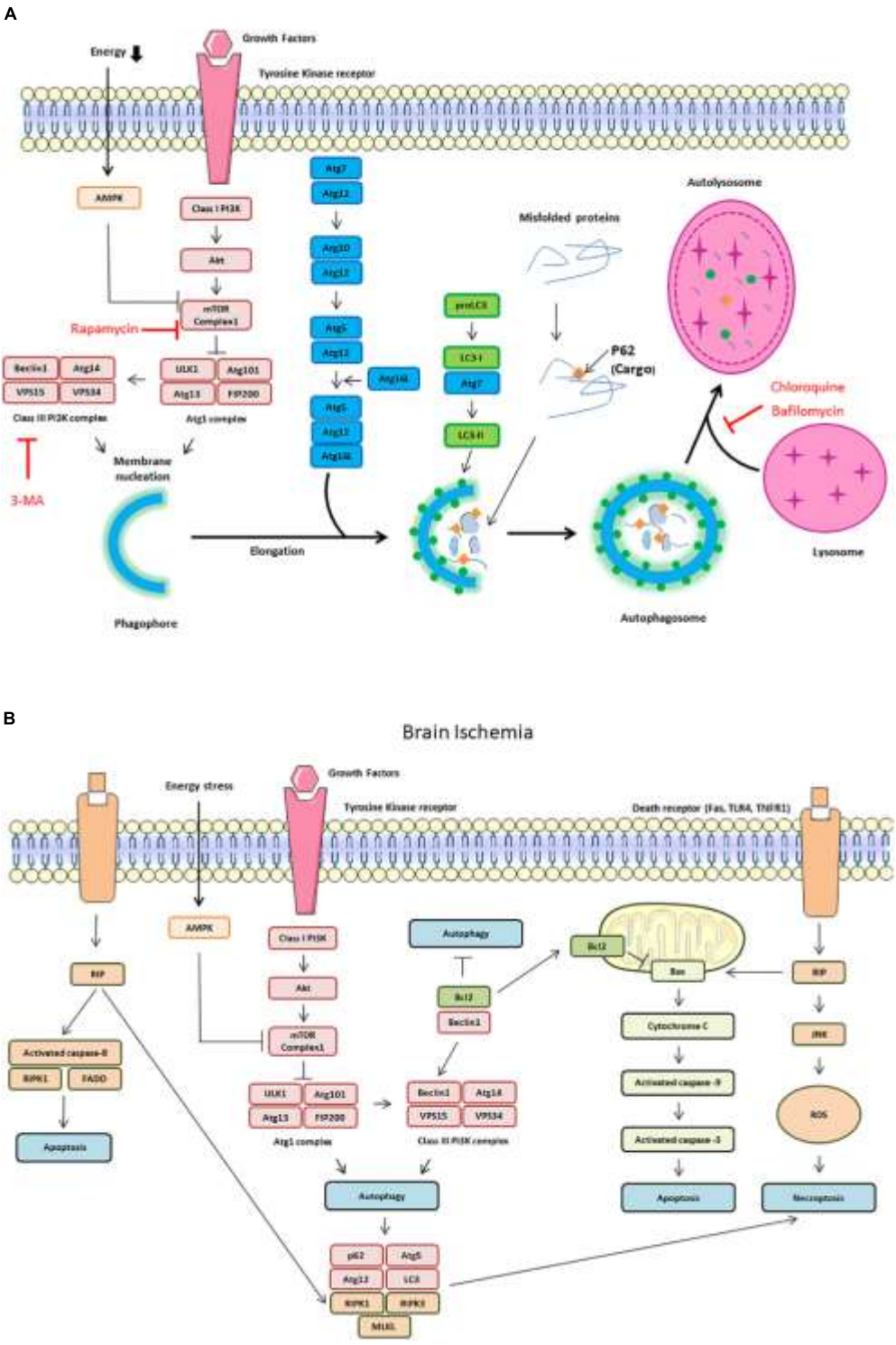


FIGURE 2 | Continued

FIGURE 2 | Autophagy signaling pathway. Autophagy is induced by an energetic stress, leading to AMPK activation; or by growth factors starvation, leading to the inhibition of the class I phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K)/Akt/mammalian target of rapamycin (mTOR) pathway. Two complexes can be involved in autophagy induction: ULK1 complex composed of autophagy-regulated 101 (Agt1), Atg101, FIP200, and ULK1 and class III PI3K complex form by Beclin-1, vacuolar protein sorting 34 (VPS34) and vacuolar protein sorting 15 (VPS15). **(A)** Schematic illustration of autophagy initiation and autophagosome formation. Different Atg proteins including Atg5-Atg12-Atg16L and the microtubule-associated protein LC3-II are involved in double membrane elongation and in autophagosome-lysosome fusion. P62 binds to ubiquitinated proteins targeting them for degradation in the autolysosomes. Rapamycin can activate autophagy by inhibiting mTOR Complex 1. Both 3-MA (3-methyladenine), chloroquine and Bafilomycin are autophagy inhibitors by, respectively, inhibiting Class III PI3K complex and autophagosome/lysosome fusion. **(B)** Schematic illustration of cross talk and interaction among autophagy, apoptosis and necroptosis during brain ischemia. The dissociation of Beclin1 and Bcl-2 is also responsible of autophagy increase. The receptor interacting protein (RIP) Kinase 1 activation by death receptors, such as Fas, TLR4 and TNFR1, is responsible of Jun N-terminal kinase 1 (JNK1) pathway activation, ROS (reactive oxygen species) release and necroptosis. RIP1 interacts with FADD (Fas-Associated protein with Death Domain) and TRADD (Tumor necrosis factor receptor type 1-associated DEATH domain protein) to induce extrinsic apoptosis. RIP1 is also involved in intrinsic (mitochondrial) apoptosis through cytochrome C release which activates caspase-9 and capase-3.

Furthermore, a study with 37 acute ischemic stroke patients revealed that CSF and serum levels of both Beclin-1 and LC3 are increased compared to control patients (Li et al., 2015), suggesting that autophagic cells die and release these markers in the circulation. Levels of Beclin1 and LC3 in CSF are positively correlated with infarct volumes and the severity of neurological deficits (NIHSS and Modified Rankin Scale) (Li et al., 2015). In addition, the expression of autophagic and apoptotic genes is increased in blood samples of ischemic stroke patients (Guo et al., 2017). However, Liu et al. (2010) reported that autophagy pathway is up-regulated after cerebral ischemia/reperfusion, but fails to operate correctly. They propose the idea that at least a part of the accumulation of protein aggregate-associated organelles seen following ischemia is due to the failure of autophagosomes to fuse with lysosomes (Liu et al., 2010).

After brain ischemia, autophagy-related signaling pathways are dramatically activated. In neonatal HI, Akt and CREB are activated in neurons and both phospho-Akt and phospho-CREB colocalized with Beclin-1. In this model, it has been shown that activation of autophagy activated by rapamycin was neuroprotective, and this was associated with the activation of Akt/CREB signaling (Carloni et al., 2010). During ischemia, a decrease in ATP concentration increases the AMP/ATP ratio and activates AMPK. Active AMPK leads to phosphorylation of TSC1/2 (tuberous sclerosis proteins 1 and 2) and inhibition of mTORC1 activity through Rheb. Several groups have reported the involvement of AMPK signaling pathway in the mediation of autophagy-related neuroprotection in brain ischemia (Wang et al., 2012; Gabryel et al., 2014; Jiang et al., 2014; Dai et al., 2017). Conversely, a study has shown that inhibition of AMPK activity inhibits autophagy and alleviates focal cerebral ischemia injury in mice by restoring mTORC1 activity (Fu et al., 2016). Autophagy may also be increased by the HIF-1α, a key transcription factor activated by the low oxygen conditions observed during cerebral ischemia (Xin et al., 2011; Yang et al., 2014; Zhang et al., 2018).

Role of Autophagy in Cerebral Ischemia

While brain ischemia is known to induce autophagy, its protective or deleterious role remains unclear. Indeed, *in vitro* and *in vivo* studies report contradictory effects of autophagy induction during ischemia.

Neuronal Autophagy in the Ischemia Brain

Neuronal autophagy occurs early during cerebral ischemia, with autophagosomes and autolysosomes detectable just 1 h after pMCAo, and increasing up to 12 h thereafter (Wen et al., 2008). In line with this, Tian et al. (2010) showed, using GFP-LC3 transgenic mice, increased levels of autophagosomes in the ipsilateral hemisphere at 1, 3, and 6 days following tMCAo, with a peak at 1 day. The cells containing GFP-LC3-punctae were mostly neurons (Tian et al., 2010). Indeed, during cerebral ischemia, autophagy is predominantly a neuronal phenomenon (Carloni et al., 2008; Rami et al., 2008; Ginet et al., 2009; Puyal et al., 2009).

Autophagy and Neuronal Death in Brain Ischemia

After cerebral ischemia, the number of GFP-LC3-punctae/TUNEL (terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated dUTP-digoxigenin nick end labeling) double-positive cells increases in both the core and the peri-ischemic area (Tian et al., 2010). In addition, dying neurons displaying intense vacuolisation and numerous autophagosomes are detected 6 h after HI in neonatal rats, with a peak at 24 h. These dying neurons display some features of apoptosis such as chromatin condensation, cytoplasmic shrinkage, and relatively well-preserved organelles, suggesting that autophagy could precede apoptosis (Ginet et al., 2009). Uchiyama (2001) have shown that inhibiting autophagy protects neuron-like differentiated PC12 cells from apoptosis following serum deprivation, suggesting that autophagy is involved in neuronal cell death *in vitro*. This association between neuronal death and autophagy has led to the term "autophagic death" (**Figure 2B**). Beclin 1 has been reported to be involved in autophagic death. RNAi against Beclin-1 reduces neuronal autophagy and apoptosis in tMCAo model (Zheng et al., 2009). In addition, Beclin 1 knockdown inhibits autophagosomal formation and alleviates apoptotic neurodegeneration in the ipsilateral thalamus following focal ischemia (Xing et al., 2012).

Apoptosis is not the only mechanism involved in ischemia-induced cell death. In 2005, a study shown that an intracerebroventricular injection of necrostatin-1, an inhibitor of necroptosis (programmed necrosis), decreases the infarct volume in a mouse MCAo model (Degterev et al., 2005). A recent work demonstrates in a pMCAo model, that the RIP1K-regulated necroptosis contribute to ischemia-mediated neuronal and astrocytic cell death through the activation of autophagic pathways (Ni et al., 2018). Furthermore, necrostatin-1 decreases LC3-II level and autophagy (Ni et al., 2018). On the other hand, pre-treatment with 3-MA, an inhibitor of autophagy and PI3K,

prevents neuronal necroptosis at 7 days of reperfusion in a severe model of global cerebral ischemia (Wang et al., 2011).

Despite controversial findings suggesting that ischemia induces autophagy only in the hippocampal CA1 region (Gao et al., 2015), it has been suggested that hippocampal CA1 and CA3 regions present a differential response to ischemia-induced autophagy, with CA1 neurons mostly undergoing apoptosis without autophagy, while CA3 neurons mostly undergo autophagic death (Ginet et al., 2009; Papadakis et al., 2013). The reasons for these subpopulation differences remain to be established.

Deleterious Autophagy in Brain Ischemia

In both primary cultures of neurons and SH-SY5Y cells subjected to OGD, autophagic cell death occurs and can be reversed by 3-MA, a PI3Ks inhibitor (Shi et al., 2012). Bao et al. (2017) suggest that this effect is dependent of autophagy-induced AMPAR subunits GluR1, GluR2, and GluR3 upregulation during OGD, leading to an increase of cytoplasmic Ca^{2+} levels. In rats subjected to transient focal cerebral ischemia, intraventricular injection of 3-MA dramatically reduces the lesion volume (by 46%) whereas an inhibitor of apoptosis does not provide protection (Puyal et al., 2009). Several inhibitors of autophagy (3-MA, bafilomycin, and the cathepsin B inhibitor Z-FA-fmk) significantly reduce the increase of autophagosome and autolysosome, the downregulation of Bcl2, infarct volume, brain oedema and motor deficits in a rat model of pMCAO (Wen et al., 2008). Thus, it seems that decreasing autophagy both *in vitro* and *in vivo* during cerebral ischemia is beneficial (Cui et al., 2013; Jiang et al., 2017; Ryan et al., 2018).

Knocking down Beclin1 and Atg7 with siRNA reduce autophagy and excitotoxic cell death induced by both kainate and hypoxia in primary neurons (Ginet et al., 2014). Atg7 deficient mice show nearly complete protection from HI-induced caspase-3 activation and hippocampal pyramidal neuronal death (Koike et al., 2008). Furthermore selective neuronal deletion of Atg7 reduces autophagy and infarct volume by 42% in neonatal mice subjected to HI (Xie et al., 2016). Overexpression of microRNA-9a-5p (miR-9a-5p) decreases Atg5 protein level, leading to a decrease of infarct volume and neurological deficit in a rat model of MCAo (Wang et al., 2018).

Protective Autophagy in Brain Ischemia

In Wang et al. (2012) have shown that 3-MA pre-treatment is deleterious in a rat model of MCAo. The inhibition of autophagy by 3-MA or wortmannin, both PI3Ks inhibitor, accelerates the progression toward necrotic cell death in neonatal HI model. Conversely, rapamycin, increases Beclin 1 expression and reduces necrotic cell death and brain damage (Carloni et al., 2008). Both ischemic preconditioning (IPC) and permanent focal ischemia induce autophagy activation by up-regulating LC3-II and Beclin-1. IPC treatment significantly reduces infarct volume, brain oedema and motor deficits, whereas 3-MA and bafilomycin suppress IPC-induced neuroprotection (Sheng et al., 2010). The neuroprotective action of rapamycin has been confirmed in several models of MCAo (Chauhan et al., 2011; Buckley et al., 2014). Finally, neuronal autophagy upon brain ischemia seems to be a part of pro-survival signaling pathway, that involves PI3K/Akt/TSC2 /mTOR/P70S6K signaling pathway (Wang et al., 2012; Papadakis et al., 2013) and Akt/CREB pathway (Carloni et al., 2010). IPC-induced autophagy is also neuroprotective and this effect has been suggested to be dependent of the amelioration of ER stress (Sheng et al., 2012). Inhibition of autophagy with Atg7 knock down increase ischemia-induced neuronal apoptosis in OGD and MCAo model. Mitochondrial clearance is reversed by 3-MA and Atg7 silencing, suggesting that mitophagy underlies the neuroprotection by autophagy (Zhang et al., 2013). Moreover, Atg7 silencing reverses the neuroprotection induced by an ER stress activator (Zhang et al., 2014). In fact both tunicamycin and thapsigargin protect against ischemic brain injury by activating mitochondrial autophagy during reperfusion. Interestingly, this effect is reversed by the inhibition of autophagy (Zhang et al., 2014). Knocking out arrestin-β1, which is upregulated after cerebral ischemia, protects neurons from OGD by impairing the interaction between Beclin-1 and PIK3 catalytic subunit type 3, thus decreasing autophagy (Wang et al., 2014). Beclin-1 seems central, as caveolin1, an integral membrane protein, is able to activate autophagy through its binding to Beclin-1/VPS34 complex: in Caveolin1 knock out mice, autophagy is impaired, leading to greater tMCAo-induced cerebral infarct (Nah et al., 2017).

Endothelial Autophagy in Brain Ischemia

In Engelhardt et al. (2015) have published a comparative study to characterize BBB-associated cells responses to HI. BMVECs exhibit greater responsiveness and sensitivity to OGD than astrocytes and pericytes. This is associated with the stabilization of HIF-1α, early disruption of cellular cytoskeleton and metabolism impairment, but unlike perivascular cells, BMVECs appear unable to induce autophagy. BMVECs are specialized endothelial cells, connected by tight junction and display intimate contact with supporting pericytes, astrocytes, microglia, and neurons in order to maintain the structural and functional integrity of the BBB. Brain ischemia and thrombolysis therapy with tPA induce BBB disruption, brain oedema and neuronal injury (Thiebaut et al., 2018). Several groups support the idea that autophagy induces endothelial cell injury and BBB disruption. Indeed focal ischemia, in NF-κB p50 knockout mice, induces autophagy like-injury in BMVECs together with a disruption of BBB integrity (Li et al., 2013). It appears that autophagy is beneficial for BMVECs and BBB integrity. In Li et al. (2014) shown that enhancing autophagy by rapamycin and lithium reverses OGD-induced collapsing of tight junction and decreases tMCAo-induced BBB leakage and brain oedema; while 3-MA intensifies BMVECs apoptosis. Supporting these results, the knockdown of Beclin-1 attenuates autophagy processes and reduces the viability of endothelial cells subjected to OGD, while treatment with rapamycin increases cell viability (Urbanek et al., 2014). Similarly, chloroquine-induced autophagy inhibition enhances BBB permeability during pMCAo in diabetic rats. By opposition to the results of Engelhart and collaborators, this group observed autophagy activation in BMVECs after ischemia (Fang et al., 2015).

Astrocytic Autophagy in Brain Ischemia

During brain ischemia, glial cells, especially astrocytes, play a crucial role. They are involved in water transport, ion homeostasis, glutamate uptake, cerebral blood flow regulation, cerebral inflammation, maintenance of the BBB integrity, modulation of neuroplasticity and the secretion of neurotrophic and neuroprotective factors (Nedergaard et al., 2003).

In Tian et al. (2010) have shown, in a mouse model of MCAo, that GFP-LC3-punctae positive cells were mostly neurons rather than astrocytes or microglial cells in the peri-ischemic area, suggesting that glial cells may be more resistant to brain ischemia-induced autophagy than neurons. Nonetheless, a few groups report that ischemia induces an increase of astrocytic autophagy (Qin et al., 2010; Zhang et al., 2010; Engelhardt et al., 2015). Autophagosomes start to appear in the cytoplasm of astrocytes within the ischemic cortex 1 h after pMCAo and in the cytoplasm of primary astrocytes 1 h after OGD, with a peak at 3 h (Qin et al., 2010). The number of lysosomes significantly increases 6 h after pMCAo and OGD. In addition, they observe an increase of LC3-II, Beclin-1, LAMP2 and lysosomal cathepsin B expression. 3-MA and bafilomycin decrease ischemia-induced autophagy, apoptosis and necrosis, suggesting that autophagic/lysosomal activation may contribute to ischemic injury of astrocytes (Qin et al., 2010). This is partially confirmed by the fact that RIP1K knockdown decreases autophagy, increases GFAP levels, and attenuates astrocytic necrotic cell death in the ischemic cortex (Ni et al., 2018). RIP1K-mediated necroptosis may play important roles in ischemia-induced neuronal and astrocytic cell death through the activation of autophagic-lysosomal pathway (Ni et al., 2018). In the same line, breviscapine provides neuroprotection in the penumbra by decreasing both astrocytic and neuronal autophagy induced by tMCAo (Pengyue et al., 2017).

In contrast, inhibition of AMPK, by siRNA targeting AMPKα1 or by a pharmacological inhibitor, attenuates autophagy and astrocyte viability following OGD. This work supports the idea that during ischemia AMPK is involved in the induction of protective autophagy in astrocytes (Gabryel et al., 2014). Furthermore, when the astrocytic autophagy is specifically enhanced, by using AAV-GFAP-ATG7, it leads to neuroprotection in astrocytes/neurons co-cultures exposed to OGD and improves neurological outcome following tMCAo (Liu et al., 2018).

It is important to mention that many inhibitors used in the autophagy field are not always selective. For example, 3-MA and wortmannin inhibit both class I and class III PI3K, and each class of PI3K has its own, and sometimes opposite, effect on autophagy (Petiot et al., 2000). Furthermore, the use of rapamycin to inhibit mTORC1 does not only affect autophagy, as mTORC1 is involved in cell growth, cell survival protein synthesis and ribosomes biogenesis (Boutouja et al., 2019). Rapamycin can also inhibit mTOR complex 2, a complex known to have pro-survival and pro-proliferation effect by increasing Akt and SGK (Boutouja et al., 2019). The use of these poorly selective autophagy inhibitors could explain some of the discrepancies observed in the literature.

ER STRESS AND CEREBRAL ISCHEMIA

Another important consequence of cerebral ischemia is ER stress. The ER is an important organelle for the folding of all secreted and membrane proteins. In stress conditions, such as ischemia, the ER cannot assume correctly its functions and triggers an adaptive program called the UPR, leading to two distinct actions: (i) an early inhibition of protein synthesis; (ii) a delayed upregulation of genes that promote protein folding and degradation (Marciniak and Ron, 2006).

In Def Webster and Ames (1965), it was first noted that neurons of the rabbit retinas show swelling of their ER when subjected to OGD. Although initially reversible, this change becomes irreversible when OGD lasts more than 30 min. Similar distension of the ER was subsequently reported in neurons in a rat model of MCAo reperfusion injury (Dietrich et al., 1989), implicating ER dysfunction in the complex process of ischemic neuronal damage.

The threat of ER is detected in cells by three sensors that are present at the ER membrane, PERK, IRE1, and ATF, each mediating a separate branch of the UPR (**Figure 3**).

The PERK branch: the inhibition of protein synthesis is an early response to ER stress mediated by PERK (PKR-like endoplasmic reticulum eIF2α kinase) (Harding et al., 1999). Under physiological conditions, PERK is held inactive by its binding to the chaperone BiP (binding immunoglobulin protein, also known as Grp78). Upon stress, the kinase is activated by the release of BiP and phosphorylates its sole cytoplasmic target, eIF2α (Marciniak et al., 2006). This is a regulator of the initiation of protein synthesis. In teleological terms, a "goal" of the PERK branch activation is to prevent the further accumulation of misfolded proteins (Roussel et al., 2013). However, despite a global shutdown of protein translation due to the phosphorylation of eIF2α, some mRNAs are translated more efficiently (Harding et al., 2003). This is the case of ATF4, leading to a transcriptional program of stress-responsive genes including CHOP (C/EBP homologous protein) (Harding et al., 2003). The observation that Chop−/− animals and cells are resistant to ER stress, led some to suggest CHOP functions to promote ER stress-induced cell death. This is not fully supported, however, by analysis of the genes regulated by CHOP (Marciniak et al., 2004). Instead, CHOP appears to regulate a program that promotes the recovery of protein synthesis and secretion following the recovery of ER stress. For example, CHOP induces expression of GADD34 (protein phosphatase 1 regulatory subunit 15A), which is responsible for the dephosphorylation of eIF2α and thus the recovery of normal protein translation (Roussel et al., 2013). In this light, the ATF4-CHOP-GADD34 axis can be viewed as a negative feedback loop opposing the effects of PERK. It is therefore likely that the apparent "pro-death" role that has been attributed to CHOP is too simplistic. The recovery of translation is essential for normal functioning of

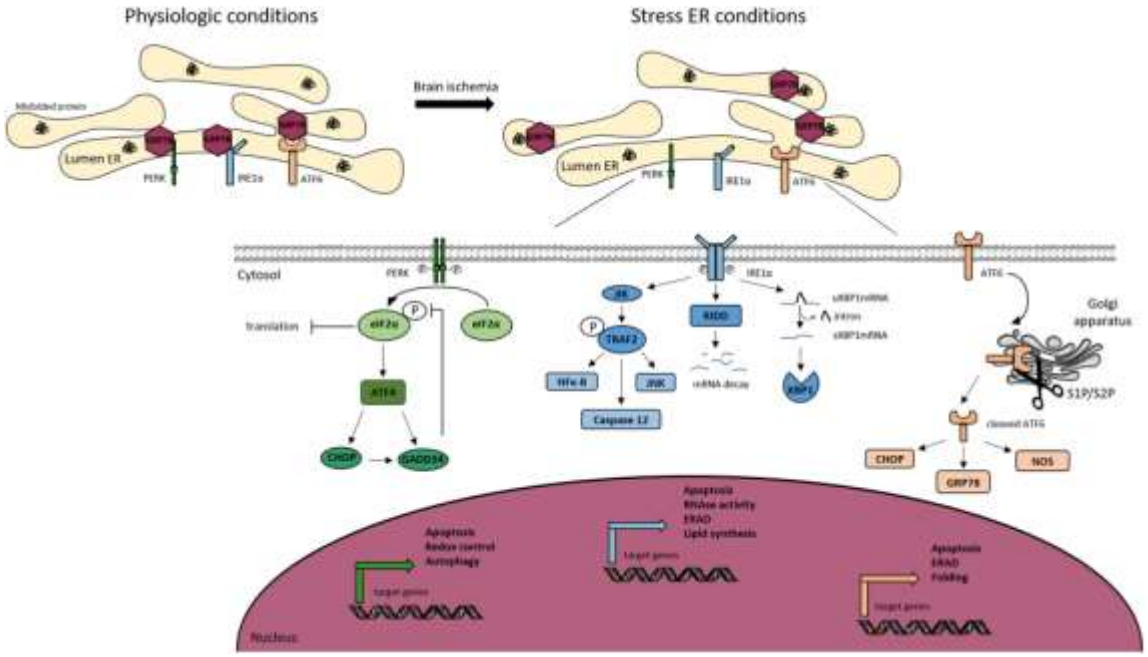


FIGURE 3 | Endoplasmic reticulum (ER) stress signaling. Under physiological conditions, the Glucose Related Protein 78 (GRP78) binds to the three ER transmembrane sensors; protein kinase RNA-like ER kinase (PERK), inositol-requiring kinase 1α (IRE1α) and activating transcription factor 6 (ATF6), and maintains them inactive. Ischemic stroke induces ER stress, leading to the activation of the UPR. Under stress conditions, GRP78 dissociates from the ER sensors to bind to misfolded proteins, allowing the *trans*-autophosphorylation of PERK. P-PERK phosphorylates the eukaryotic translation initiation factor 2α (eIF2α), which decreases the global protein translation. Paradoxically, P-eIF2α allows the transcription of activating transcription factor 4 (ATF4), CCAT/enhancer binding protein homologous protein (CHOP). Both P-eIF2α and CHOP can activate the translation of growth arrest and DNA damage inducible gene/protein 34 (GADD34). The latter creates a feedback mechanism by dephosphorylating eiF2α. PERK is associated to apoptosis, autophagy and redox control. IRE1α dimerizes and *trans*-autophosphorylates, to splice the unspliced mRNA XBP1 (uXBP1) into spliced XBP1 (sXBP1). IRE1α activates c-jun-N-terminal-inhibiting kinase (JIK) and allows the recruitment of TNF receptor-associated factor 2 (TRAF2), leading to the activation of nuclear factor κ-B (NFκ-B), caspase 12 and c-jun-N-terminal kinase (JNK) pathway. IRE1α activates Regulated IRE1-Dependent Decay (RIDD) leading to the degradation of selected mRNAs. IRE1α is also involved in apoptosis, ER-associated degradation (ERAD) and lipid synthesis. The activation of ATF6 is dependent of its cleavage by S1P and S2P endopeptidases in the Golgi apparatus. Cleaved ATF6 induces the transcription of GRP78, nitric oxide synthase (NOS) and CHOP. Moreover, cleaved ATF6 controls ERAD, apoptosis and protein folding.

the cell following mild ER stress, but perhaps in pathology, for example cerebral ischemia, there are benefits from disabling the normal rapid recovery of protein synthesis. This clearly has exciting therapeutic implications and many groups are currently developing approaches to antagonize the ATF4-CHOP-GADD34 axis for therapeutic benefit.

The ATF6 branch: like PERK, ATF6 is held inactive by the binding to BiP. Under stressed conditions, ATF6 is free to traffic to the Golgi apparatus where it is cleaved to release a soluble transcription factor for protein folding and degradation genes (Hillary and Fitzgerald, 2018).

The IRE1 branch: the activation of IRE1 is similar to that of ATF6 and PERK, but IRE1 is an endoribonuclease that triggers the splicing of the mRNA XBP1 (Calfon et al., 2002). The splicing induces a frameshift, allowing the active form of the protein. Proteins that fail to fold in the ER are eventually returned to the cytoplasm and targeted for degradation by the proteasome in process called ERAD. Many proteins of the ERAD machinery are induced by XBP1 (Yoshida et al., 2003). During intense ER stress, IRE1 also degrades many mRNAs located at the ER membrane through a mechanism called regulated IRE1-dependent decay (RIDD) (Hollien and Weissman, 2006). This helps further to reduce the load of new proteins entering the ER to be folded.

UPR in Cerebral Ischemia

The ER is the main storage site for intracellular calcium, a central second messenger mediating diverse physiological processes in neurons, including secretion, synaptic plasticity and cell death (Zundorf and Reiser, 2011). Molecular chaperones that reside within the ER require high calcium concentrations to function efficiently (Michalak et al., 2002). This high calcium environment is maintained by the constant pumping of calcium from the cytosol into the ER by the SERCA (Doutheil et al., 1999b). Release of calcium back into the cytosol happens through the IP3R channel, which can be triggered by extracellular signals, or by the ryanodine receptor, activated by cytosolic calcium itself during CICR. Both lead to signaling but, if sustained, they deplete ER calcium stores and can induce chaperone dysfunction (Szydlowska and Tymianski, 2010). During cerebral ischemia, the

influx of extracellular calcium via the NMDA receptor mediates glutamate-dependent neurotoxicity (Lopez-Atalaya et al., 2008). The rise in intracellular calcium triggers the release of ER calcium from ryanodine-sensitive stores, which is known to exacerbate CA1 hippocampal neuronal damage during global cerebral ischemia-reperfusion (Xing et al., 2004; Bull et al., 2008). Accordingly, inhibition of calcium release with the ryanodine receptor antagonist dantrolene decreases brain injury in animal models of both neonatal and adult HI (Wei and Perry, 1996; Gwak et al., 2008). While commonly attributed to the effects of cytosolic calcium, it is likely that effects on ER protein folding will also be important in these pathological conditions. Moreover, during cerebral ischemia, lack of ATP affects protein maturation (Kumar et al., 2003), and at the same time energy depletion leads to failure of the SERCA pumps (Doutheil et al., 1999b), contributing to the global ER calcium depletion and causing chaperone failure. Thus, the redistribution of calcium from ER to cytosol delivers a double blow to neurons, which exacerbates neurotoxicity (Paschen and Doutheil, 1999; Parsons et al., 1999).

The deregulation of ER-calcium homeostasis causing chaperone failure and activation of the UPR is readily apparent in many animal models of cerebral ischemia, including mice with BCAo (Kumar et al., 2001) or MCAo (Mengesdorf et al., 2002), rats with middle carotid artery occlusion with (Nakka et al., 2010) or without (Rissanen et al., 2006) reperfusion, cardiac arrest with reperfusion (Kumar et al., 2003) and a model of cortical spreading depression in rats (Schneeloch et al., 2004). This induction of ER stress during cerebral ischemia is responsible for the shutdown of protein translation seen during stroke (Burda et al., 1994; DeGracia et al., 1996; Hayashi et al., 2003; Kumar et al., 2003). It involves the activation of the stress-sensing PERK (Kumar et al., 2001; Li et al., 2005; Rissanen et al., 2006) that phosphorylates the translation initiation factor eIF2α, leading to the attenuation of new protein synthesis and disaggregation of polyribosomes (Althausen et al., 2001; Nakka et al., 2010).

Also, CHOP expression is elevated in several animal models of cerebral ischemia, including MCAo (Qi et al., 2004) and BCAo in mice (Tajiri et al., 2004; Osada et al., 2009), as well as MCAo and global ischemia in rats (Hayashi et al., 2005). Chop knockout (−/−) mice are more resistant to a BCAo type of ischemia than their wild-type littermates (Tajiri et al., 2004), and depletion of CHOP using RNA-interference in primary cultures of astrocytes partially prevents cell death in response to OGD (Benavides et al., 2005), suggesting that CHOP regulates a genetic program that is toxic in the context of cerebral ischemia. It has been shown that GADD34 is a target gene of CHOP responsible for some of the tissue damage seen in animal models of ER stress (Marciniak et al., 2004). This phosphatase is induced under conditions of cerebral ischemia (Doutheil et al., 1999a; Paschen et al., 2004; Li et al., 2005; Owen et al., 2005) and is detectable by immunostaining in the peri-infarct penumbra up to 24 h following the induction of stroke in rats (Imai et al., 2002; McCaig et al., 2005). As discussed already, it is therefore plausible that the toxicity attributed to CHOP is in fact the result of re-established protein translation mediated by GADD34 (Marciniak et al., 2004): it might be a mechanism implicated in reperfusion-mediated damage in cerebral ischemia. If this is the case, attenuation of protein translation should protect neurons from accumulating misfolded proteins. Consistent with this theory, salubrinal, a putative GADD34 inhibitor, has been shown to decrease ER stress and kainate-induced neurotoxicity *in vitro* (Sokka et al., 2007). However, the specificity of salubrinal has been questioned many times, since it was first demonstrated to work only *in vivo* (Boyce et al., 2005), and more recently its inhibitory effect has been shown to be really limited (Crespillo-Casado et al., 2017). IRE1, which splices the mRNA encoding the transcription factor XBP1, also shows activation during cerebral ischemia, for example in the cortex of mice after MCAo (Paschen et al., 2003; Morimoto et al., 2007) and BCAo (Tajiri et al., 2004). By contrast, ATF6 signaling remains a subject of debate: ATF6 expression was increased following MCAO in rats (Rissanen et al., 2006), but activation could not be demonstrated in an ischemia-reperfusion model by cardiac arrest in rats (Kumar et al., 2003).

CROSSTALK BETWEEN AUTOPHAGY AND ER STRESS

Autophagy and ER stress are important signaling pathways, but when dysregulated can lead to cell death, such like during cerebral ischemia. A well-balanced activation of these processes allow the maintenance or the recovery of proteostasis. However, their over-activation, by duration or intensity, tips the scale from a protective to a deleterious role (Roussel et al., 2013; Chen et al., 2014).

Although, as mentioned in the introduction, several interactions exist between ER stress and autophagy, in particular when misfolded proteins accumulate within the ER and activate PERK to induce autophagy (Kouroku et al., 2007). Moreover, downstream targets of PERK, like ATF4 and CHOP, induce the transcription of genes related to autophagy in response to both ER stress and amino acid starvation (B'Chir et al., 2013). During hypoxia, ATF4 facilitates autophagosome expansion through a binding to a cAMP response element-binding site within the *LC3b* promoter (Rzymski et al., 2010). Other sensors are also involved in autophagy induction, such as IRE1 by dissociating Beclin1 from its binding with Bcl2 (Wei et al., 2008). In addition, IRE1 also induces autophagy by activating AMPK in response to nitric oxide (Meares et al., 2011). XBP1, the mRNA processed by IRE1, is important for the negative feedback of ER stress-mediated autophagy, especially via its interaction with FOXO1 (Zhou et al., 2011). Interestingly, a genetic screen in *Drosophila* shows that both XBP1 loss of function and spliced-XBP1 overexpression lead to the induction of autophagy (Arsham and Neufeld, 2009). Finally, ATF6 has also been implicated in ER stress-mediated autophagy. By increasing the expression of DAPK1 (Gade et al., 2014), ATF6 promotes the dissociation of Beclin1 from Bcl2, leading to autophagy activation (Zalckvar et al., 2009).

In a mouse model of tMCAo, both ER stress and autophagy markers increase, suggesting a dual activation of ER stress and autophagy (Feng et al., 2017). It seems then important when

studying proteostasis in cerebral ischemia, to pay attention to both phenomena and not only ER stress or autophagy.

Some studies also demonstrate an action of autophagy on ER stress. Indeed, the use of 3MA in a rat model of MCAo alters the ER stress response and leads to the stimulation of apoptosis and the enlargement of the cerebral infarct (Zhang et al., 2018). Similarly, Carloni et al. (2014) show a reduced ER stress activation and a better protection after neonatal HI when they increase autophagy with rapamycin. A possible explanation might be that CHOP induces death by inhibiting autophagy (Lei et al., 2017). This has been demonstrated in hepatocellular carcinoma cells, where ER stress inducer increases apoptosis and autophagy, while autophagy inhibitor promotes apoptosis and autophagy activator decreases ER stress-induced apoptosis (Lei et al., 2017). However, this hypothesis needs to be confirmed in neurons under ischemic/hypoxic challenge.

Finally, ER stress has been reported to cause the translocation of ER chaperones to the cell surface. BiP is the best described chaperone at the cell surface, and can act as a general co-receptor (Gonzalez-Gronow et al., 2009), with roles in autophagy, cancer and neuroprotection (Casas, 2017). Interestingly, cell-surface BiP can regulate autophagy by at least two mechanisms: by activating the PI3K/AKT pathway (Liu et al., 2013); and by associating to α2-macroglobulin receptor to activate mTOR signaling (Misra and Pizzo, 2012). Under OGD conditions, BiP is also at the neuronal surface (Louessard et al., 2017), and its binding to tPA results in a decrease in ER stress activation and neuroprotection (Louessard et al., 2017). In another model of hypoxia-induced apoptosis, the activation of neuronal-surface BiP by a synthetic peptide is also protective (Goldenberg-Cohen et al., 2012), reinforcing its role in neuroprotection during cerebral ischemia.

CONCLUSION

Many neurological diseases, including cerebral ischemia, are associated with complete or partial activation of the UPR, perturbations in calcium homeostasis, autophagy dysfunctions, and finally cell death. Both an appreciation of the crucial role for ER homeostasis, the multiple forms that ER dysfunction can take, the regulation and the consequences of autophagy are now providing novel therapeutic strategies.

We propose a model in which proteostasis dysfunction spans a continuous spectrum from the UPR to autophagy, with probably a direct regulation of autophagy by the UPR as mentioned above. In cerebral ischemia, both pathways will be triggered to a greater or lesser degree, depending of stroke intensity, itself depending of the occlusion type and localisation. In each case, the relative contribution of each response and their interactions would need to be determined if rational approaches to therapy are to be developed.

Also, special attention should be given to studies using pharmacological approaches. As scientists, we all know that pharmacological treatments are really convenient, but we have to keep in mind that a "specific" drug has a lot of off targets actions. For example, it has been recently shown that GSK2606414, a PERK inhibitor, and KIRA6, an IRE1 inhibitor, are not only UPR specific (Mahameed et al., 2019). In fact they also inhibit KIT (also called CD117), a receptor tyrosine kinase involved in signal transduction pathways such as ERK and PI3K/AKT, upstream of mTOR and autophagy. In fact, many pharmacological activators and inhibitors are not as specific as they are supposed to be, and thus participate to discrepancies.

AUTHOR CONTRIBUTIONS

AT and EH did the research and wrote the autophagy and the ER stress part, respectively, and made the figures. SM has actively participated to the writing of the ER stress section and made useful comments on the whole manuscript. DV made corrections and comments on the manuscript. BR organized the review, wrote the introduction and the last section on the interactions between the autophagy and the ER stress, and made final corrections.

REFERENCES

Althausen, S., Mengesdorf, T., Mies, G., Olah, L., Nairn, A. C., Proud, C. G., et al. (2001). Changes in the phosphorylation of initiation factor eIF-2alpha, elongation factor eEF-2 and p70 S6 kinase after transient focal cerebral ischaemia in mice. *J. Neurochem.* 78, 779–787. doi: 10.1046/j.1471-4159.2001.00462.x

Arsham, A. M., and Neufeld, T. P. (2009). A genetic screen in *Drosophila* reveals novel cytoprotective functions of the autophagy-lysosome pathway. *PLoS One* 29:e6068. doi: 10.1371/journal.pone.0006068

Bandyopadhyay, U., Kaushik, S., Varticovski, L., and Cuervo, A. M. (2008). The chaperone-mediated autophagy receptor organizes in dynamic protein complexes at the lysosomal membrane. *Mol. Cell. Biol.* 28, 5747–5763. doi: 10.1128/MCB.02070-07

Bao, L., Li, R. H., Li, M., Jin, M. F., Li, G., Han, X., et al. (2017). Autophagy-regulated AMPAR subunit upregulation in in vitro oxygen glucose deprivation/reoxygenation-induced hippocampal injury. *Brain Res.* 1, 65–71. doi: 10.1016/j.brainres.2017.05.019

B'Chir, W., Maurin, A. C., Carraro, V., Averous, J., Jousse, C., Muranishi, Y., et al. (2013). The eIF2alpha/ATF4 pathway is essential for stress-induced autophagy gene expression. *Nucleic Acids Res.* 41, 7683–7699. doi: 10.1093/nar/gkt563

Benavides, A., Pastor, D., Santos, P., Tranque, P., and Calvo, S. (2005). CHOP plays a pivotal role in the astrocyte death induced by oxygen and glucose deprivation. *Glia* 52, 261–275. doi: 10.1002/glia.20242

Berkhemer, O. A., Fransen, P. S., Beumer, D., van den Berg, L. A., Lingsma, H. F., Yoo, A. J., et al. (2015). A randomized trial of intraarterial treatment for acute ischemic stroke. *N. Engl. J. Med.* 1, 11–20.

Boutouja, F., Stiehm, C. M., and Platta, H. W. (2019). mTOR: a cellular regulator interface in health and disease. *Cells* 2:8. doi: 10.3390/cells8010018

Boyce, M., Bryant, K. F., Jousse, C., Long, K., Harding, H. P., Scheuner, D., et al. (2005). A selective inhibitor of eIF2alpha dephosphorylation protects cells from ER stress. *Science* 11, 935–939. doi: 10.1126/science.1101902

Buckley, K. M., Hess, D. L., Sazonova, I. Y., Periyasamy-Thandavan, S., Barrett, J. R., Kirks, R., et al. (2014). Rapamycin up-regulation of autophagy reduces infarct size and improves outcomes in both permanent MCAL, and embolic MCAO, murine models of stroke. *Exp.Transl. Stroke Med.* 6:8. doi: 10.1186/2040-7378-6-8

Bull, R., Finkelstein, J. P., Galvez, J., Sanchez, G., Donoso, P., Behrens, M. I., et al. (2008). Ischemia enhances activation by Ca2+ and redox modification of ryanodine receptor channels from rat brain cortex. *J. Neurosci.* 17, 9463–9472. doi: 10.1523/JNEUROSCI.2286-08.2008

Burda, J., Martin, M. E., Garcia, A., Alcazar, A., Fando, J. L., and Salinas, M. (1994). Phosphorylation of the alpha subunit of initiation factor 2 correlates with the inhibition of translation following transient cerebral ischaemia in the rat. *Biochem J.* 302(Pt 2), 335–338. doi: 10.1042/bj3020335

Calfon, M., Zeng, H., Urano, F., Till, J. H., Hubbard, S. R., Harding, H. P., et al. (2002). IRE1 couples endoplasmic reticulum load to secretory capacity by processing the XBP-1 mRNA. *Nature* 3, 92–96. doi: 10.1038/415092a

Carloni, S., Albertini, M. C., Galluzzi, L., Buonocore, G., Proietti, F., and Balduini, W. (2014). Increased autophagy reduces endoplasmic reticulum stress after neonatal hypoxia-ischemia: role of protein synthesis and autophagic pathways. *Exp. Neurol.* 255, 103–112. doi: 10.1016/j.expneurol.2014.03.002

Carloni, S., Buonocore, G., and Balduini, W. (2008). Protective role of autophagy in neonatal hypoxia-ischemia induced brain injury. *Neurobiol. Dis.* 32, 329–339. doi: 10.1016/j.nbd.2008.07.022

Carloni, S., Girelli, S., Scopa, C., Buonocore, G., Longini, M., and Balduini, W. (2010). Activation of autophagy and Akt/CREB signaling play an equivalent role in the neuroprotective effect of rapamycin in neonatal hypoxia-ischemia. *Autophagy* 6, 366–377. doi: 10.4161/auto.6.3.11261

Casas, C. (2017). GRP78 at the Centre of the Stage in Cancer and Neuroprotection. *Front. Neurosci.* 11:177. doi: 10.3389/fnins.2017.00177

Chauhan, A., Sharma, U., Jagannathan, N. R., Reeta, K. H., and Gupta, Y. K. (2011). Rapamycin protects against middle cerebral artery occlusion induced focal cerebral ischemia in rats. *Behav. Brain Res.* 1, 603–609. doi: 10.1016/j.bbr.2011.08.035

Chen, W., Sun, Y., Liu, K., and Sun, X. (2014). Autophagy: a double-edged sword for neuronal survival after cerebral ischemia. *Neural Regener. Res.* 15, 1210–1216. doi: 10.4103/1673-5374.135329

Crespillo-Casado, A., Chambers, J. E., Fischer, P. M., Marciniak, S. J., and Ron, D. (2017). PPP1R15A-mediated dephosphorylation of eIF2alpha is unaffected by Sephin1 or Guanabenz. *eLife* 27:26109. doi: 10.7554/eLife.26109

Cui, D. R., Wang, L., Jiang, W., Qi, A. H., Zhou, Q. H., and Zhang, X. L. (2013). Propofol prevents cerebral ischemia-triggered autophagy activation and cell death in the rat hippocampus through the NF-kappaB/p53 signaling pathway. *Neuroscience* 29, 117–132. doi: 10.1016/j.neuroscience.2013.04.054

Dai, S. H., Chen, T., Li, X., Yue, K. Y., Luo, P., Yang, L. K., et al. (2017). Sirt3 confers protection against neuronal ischemia by inducing autophagy: involvement of the AMPK-mTOR pathway. *Free Radical Biol. Med.* 108, 345–353. doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2017.04.005

Def Webster, H., and Ames, A. (1965). Reversible and irreversible changes in the fine structure of nervous tissue during oxygen and glucose deprivation. *J. Cell Biol.* 1, 885–909. doi: 10.1083/jcb.26.3.885

DeGracia, D. J., Neumar, R. W., White, B. C., and Krause, G. S. (1996). Global brain ischemia and reperfusion: modifications in eukaryotic initiation factors associated with inhibition of translation initiation. *J. Neurochem.* 67, 2005–2012. doi: 10.1046/j.1471-4159.1996.67052005.x

Degterev, A., Huang, Z., Boyce, M., Li, Y., Jagtap, P., Mizushima, N., et al. (2005). Chemical inhibitor of nonapoptotic cell death with therapeutic potential for ischemic brain injury. *Nat. Chem. Biol.* 1, 112–119. doi: 10.1038/nchembio711

Dietrich, W. D., Nakayama, H., Watson, B. D., and Kanemitsu, H. (1989). Morphological consequences of early reperfusion following thrombotic or mechanical occlusion of the rat middle cerebral artery. *Acta Neuropathol.* 78, 605–614. doi: 10.1007/bf00691287

Dirnagl, U., Iaola, C., and Moskowitz, M. A. (1999). Pathobiology of ischaemic stroke: an integrated view. *Trends Neurosci.* 22, 391–397. doi: 10.1016/s0166-2236(99)01401-0

Doutheil, J., Althausen, S., Gissel, C., and Paschen, W. (1999a). Activation of MYD116 (gadd34) expression following transient forebrain ischemia of rat: implications for a role of disturbances of endoplasmic reticulum calcium homeostasis. *Brain Res. Mol. Brain Res.* 8, 225–232. doi: 10.1016/s0169-328x(98)00276-9

Doutheil, J., Treiman, M., Oschlies, U., and Paschen, W. (1999b). Recovery of neuronal protein synthesis after irreversible inhibition of the endoplasmic reticulum calcium pump. *Cell Calcium* 25, 419–428. doi: 10.1054/ceca.1999.0042

Doyle, K. P., Simon, R. P., and Stenzel-Poore, M. P. (2008). Mechanisms of ischemic brain damage. *Neuropharmacology* 55, 310–318. doi: 10.1016/j.neuropharm.2008.01.005

Engelhardt, S., Huang, S. F., Patkar, S., Gassmann, M., and Ogunshola, O. O. (2015). Differential responses of blood-brain barrier associated cells to hypoxia and ischemia: a comparative study. *Fluids Barriers CNS* 17:4. doi: 10.1186/2045-8118-12-4

Fang, L., Li, X., Zhong, Y., Yu, J., Yu, L., Dai, H., et al. (2015). Autophagy protects human brain microvascular endothelial cells against methylglyoxal-induced injuries, reproducible in a cerebral ischemic model in diabetic rats. *J. Neurochem.* 135, 431–440. doi: 10.1111/jnc.13277

Feng, D., Wang, B., Wang, L., Abraham, N., Tao, K., Huang, L., et al. (2017). Pre-ischemia melatonin treatment alleviated acute neuronal injury after ischemic stroke by inhibiting endoplasmic reticulum stress-dependent autophagy via PERK and IRE1 signalings. *J. Pineal Res.* 62:e12395. doi: 10.1111/jpi.12395

Fu, L., Huang, L., Cao, C., Yin, Q., and Liu, J. (2016). Inhibition of AMP-activated protein kinase alleviates focal cerebral ischemia injury in mice: interference with mTOR and autophagy. *Brain Res.* 1, 103–111. doi: 10.1016/j.brainres.2016.08.035

Gabryel, B., Kost, A., Kasprowska, D., Liber, S., Machnik, G., Wiaderkiewicz, R., et al. (2014). AMP-activated protein kinase is involved in induction of protective autophagy in astrocytes exposed to oxygen-glucose deprivation. *Cell Biol. Int.* 38, 1086–1097. doi: 10.1002/cbin.10299

Gade, P., Manjegowda, S. B., Nallar, S. C., Maachani, U. B., Cross, A. S., and Kalvakolanu, D. V. (2014). Regulation of the death-associated protein kinase 1 expression and autophagy via ATF6 requires apoptosis signal-regulating kinase 1. *Mol. Cell. Biol.* 34, 4033–4048. doi: 10.1128/MCB.00397-14

Gao, C., Cai, Y., Zhang, X., Huang, H., Wang, J., Wang, Y., et al. (2015). Ischemic Preconditioning Mediates Neuroprotection against Ischemia in Mouse Hippocampal CA1 Neurons by Inducing Autophagy. *PLoS One* 10:e0137146. doi: 10.1371/journal.pone.0137146

Ginet, V., Puyal, J., Clarke, P. G., and Truttmann, A. C. (2009). Enhancement of autophagic flux after neonatal cerebral hypoxia-ischemia and its region-specific relationship to apoptotic mechanisms. *Am. J. Pathol.* 175, 1962–1974. doi: 10.2353/ajpath.2009.090463

Ginet, V., Spiehlmann, A., Rummel, C., Rudinskiy, N., Grishchuk, Y., Luthi-Carter, R., et al. (2014). Involvement of autophagy in hypoxic-excitotoxic neuronal death. *Autophagy* 10, 846–860. doi: 10.4161/auto.28264

Goldenberg-Cohen, N., Raiter, A., Gaydar, V., Dratviman-Storobinsky, O., Goldstein, T., Weizman, A., et al. (2012). Peptide-binding GRP78 protects neurons from hypoxia-induced apoptosis. *Apoptosis* 17, 278–288. doi: 10.1007/s10495-011-0678-x

Gonzalez-Gronow, M., Selim, M. A., Papalas, J., and Pizzo, S. V. (2009). GRP78: a multifunctional receptor on the cell surface. *Antioxid. Redox Signal.* 11, 2299–2306. doi: 10.1089/ARS.2009.2568

Guo, Y., Ma, Y., Zhang, Y., Zhou, L., Huang, S., Wen, Y., et al. (2017). Autophagy-related gene microarray and bioinformatics analysis for ischemic stroke detection. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 15, 48–55. doi: 10.1016/j.bbrc.2017.05.099

Gwak, M., Park, P., Kim, K., Lim, K., Jeong, S., Baek, C., et al. (2008). The effects of dantrolene on hypoxic-ischemic injury in the neonatal rat brain. *Anesth. Analog.* 106, 227–233. doi: 10.1213/01.ane.0000287663.81050.38

Hacke, W., Kaste, M., Bluhmki, E., Brozman, M., Davalos, A., Guidetti, D., et al. (2008). Thrombolysis with alteplase 3 to 4.5 hours after acute ischemic stroke. *N. Engl. J. Med.* 25, 1317–1329.

Harding, H. P., Zhang, Y., and Ron, D. (1999). Protein translation and folding are coupled by an endoplasmic-reticulum-resident kinase. *Nature* 21, 271–274. doi: 10.1038/16729

Harding, H. P., Zhang, Y., Zeng, H., Novoa, I., Lu, P. D., Calfon, M., et al. (2003). An integrated stress response regulates amino acid metabolism and resistance to oxidative stress. *Mol. Cell* 11, 619–633. doi: 10.1016/s1097-2765(03)00105-9

Hayashi, T., Saito, A., Okuno, S., Ferrand-Drake, M., and Chan, P. H. (2003). Induction of GRP78 by ischemic preconditioning reduces endoplasmic reticulum stress and prevents delayed neuronal cell death. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* 23, 949–961. doi: 10.1097/01.wcb.0000077641.41248.ea

Hayashi, T., Saito, A., Okuno, S., Ferrand-Drake, M., Dodd, R. L., and Chan, P. H. (2005). Damage to the endoplasmic reticulum and activation of apoptotic

machinery by oxidative stress in ischemic neurons. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* 25, 41–53. doi: 10.1038/sj.jcbfm.9600005

Hillary, R. F., and Fitzgerald, U. (2018). A lifetime of stress: ATF6 in development and homeostasis. *J. Biomed. Sci.* 25:48. doi: 10.1186/s12929-018-0453-1

Hollien, J., and Weissman, J. S. (2006). ay of endoplasmic reticulum-localized mRNAs during the unfolded protein response. *Science* 7, 104–107. doi: 10.1126/science.1129631

Imai, H., Harland, J., McCulloch, J., Graham, D. I., Brown, S. M., and Macrae, I. M. (2002). Specific expression of the cell cycle regulation proteins, GADD34 and PCNA, in the peri-infarct zone after focal cerebral ischaemia in the rat. *Eur. J. Neurosci.* 15, 1929–1936. doi: 10.1046/j.1460-9568.2002.02025.x

Itakura, E., Kishi-Itakura, C., and Mizushima, N. (2012). The hairpin-type tail-anchored SNARE syntaxin 17 targets to autophagosomes for fusion with endosomes/lysosomes. *Cell* 7, 1256–1269. doi: 10.1016/j.cell.2012.11.001

Iwata, A., Christianson, J. C., Bucci, M., Ellerby, L. M., Nukina, N., Forno, L. S., et al. (2005). Increased susceptibility of cytoplasmic over nuclear polyglutamine aggregates to autophagic degradation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 13, 13135–13140. doi: 10.1073/pnas.0505801102

Jiang, T., Yu, J. T., Zhu, X. C., Wang, H. F., Tan, M. S., Cao, L., et al. (2014). Acute metformin preconditioning confers neuroprotection against focal cerebral ischaemia by pre-activation of AMPK-dependent autophagy. *Br. J. Pharmacol.* 171, 3146–3157. doi: 10.1111/bph.12655

Jiang, W. W., Huang, B. S., Han, Y., Deng, L. H., and Wu, L. X. (2017). Sodium hydrosulfide attenuates cerebral ischemia/reperfusion injury by suppressing overactivated autophagy in rats. *FEBS Open Biol.* 7, 1686–1695. doi: 10.1002/2211-5463.12301

Karsy, M., Brock, A., Guan, J., Taussky, P., Kalani, M. Y., and Park, M. S. (2017). Neuroprotective strategies and the underlying molecular basis of cerebrovascular stroke. *Neurosurg. Focus* 42:E3. doi: 10.3171/2017.1.FOCUS16522

Klionsky, D. J., Abdelmohsen, K., Abe, A., Abedin, M. J., Abeliovich, H., Acevedo Arozena, A., et al. (2016). Guidelines for the use and interpretation of assays for monitoring autophagy (3rd edition). *Autophagy* 12, 1–222.

Koike, M., Shibata, M., Tadakoshi, M., Gotoh, K., Komatsu, M., Waguri, S., et al. (2008). Inhibition of autophagy prevents hippocampal pyramidal neuron death after hypoxic-ischemic injury. *Am. J. Pathol.* 172, 454–469. doi: 10.2353/ajpath.2008.070876

Kouroku, Y., Fujita, E., Tanida, I., Ueno, T., Isoai, A., Kumagai, H., et al. (2007). ER stress (PERK/eIF2alpha phosphorylation) mediates the polyglutamine-induced LC3 conversion, an essential step for autophagy formation. *Cell Death Differ.* 14, 230–239. doi: 10.1038/sj.cdd.4401984

Krick, R., Muhe, Y., Prick, T., Bredschneider, M., Bremer, S., Wenzel, D., et al. (2009). Piecemeal microautophagy of the nucleus: genetic and morphological traits. *Autophagy* 5, 270–272. doi: 10.4161/auto.5.2.7639

Kumar, R., Azam, S., Sullivan, J. M., Owen, C., Cavener, D. R., Zhang, P., et al. (2001). Brain ischemia and reperfusion activates the eukaryotic initiation factor 2alpha kinase. *PERK. J. Neurochem.* 77, 1418–1421. doi: 10.1046/j.1471-4159.2001.00387.x

Kumar, R., Krause, G. S., Yoshida, H., Mori, K., and DeGracia, D. J. (2003). Dysfunction of the unfolded protein response during global brain ischemia and reperfusion. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* 23, 462–471. doi: 10.1097/01.wcb.0000056064.25434.ca

Lei, Y., Wang, S., Ren, B., Wang, J., Chen, J., Lu, J., et al. (2017). CHOP favors endoplasmic reticulum stress-induced apoptosis in hepatocellular carcinoma cells via inhibition of autophagy. *PLoS One* 12:e0183680. doi: 10.1371/journal.pone.0183680

Li, F., Hayashi, T., Jin, G., Deguchi, K., Nagotani, S., Nagano, I., et al. (2005). The protective effect of dantrolene on ischemic neuronal cell death is associated with reduced expression of endoplasmic reticulum stress markers. *Brain Res.* 28, 59–68. doi: 10.1016/j.brainres.2005.04.058

Li, H., Gao, A., Feng, D., Wang, Y., Zhang, L., Cui, Y., et al. (2014). Evaluation of the protective potential of brain microvascular endothelial cell autophagy on blood-brain barrier integrity during experimental cerebral ischemia-reperfusion injury. *Transl. Stroke Res.* 5, 618–626. doi: 10.1007/s12975-014-0354-x

Li, H., Qiu, S., Li, X., Li, M., and Peng, Y. (2015). Autophagy biomarkers in CSF correlates with infarct size, clinical severity and neurological outcome in AIS patients. *J. Transl. Med.* 14:359. doi: 10.1186/s12967-015-0726-3

Li, W. L., Yu, S. P., Chen, D., Yu, S. S., Jiang, Y. J., Genetta, T., et al. (2013). The regulatory role of NF-kappaB in autophagy-like cell death after focal cerebral ischemia in mice. *Neuroscience* 6, 16–30. doi: 10.1016/j.neuroscience.2013.03.045

Liu, C., Gao, Y., Barrett, J., and Hu, B. (2010). Autophagy and protein aggregation after brain ischemia. *J. Neurochem.* 115, 68–78. doi: 10.1111/j.1471-4159.2010.06905.x

Liu, R., Li, X., Gao, W., Zhou, Y., Wey, S., Mitra, S. K., et al. (2013). Monoclonal antibody against cell surface GRP78 as a novel agent in suppressing PI3K/AKT signaling, tumor growth, and metastasis. *Clin. Cancer Res.* 15, 6802–6811. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-13-1106

Liu, X., Tian, F., Wang, S., Wang, F., and Xiong, L. (2018). Astrocyte autophagy flux protects neurons against oxygen-glucose deprivation and ischemic/reperfusion injury. *Rejuvenation Res.* 21, 405–415. doi: 10.1089/rej.2017.1999

Lopez-Atalaya, J. P., Roussel, B. D., Levrat, D., Parcq, J., Nicole, O., Hommet, Y., et al. (2008). Toward safer thrombolytic agents in stroke: molecular requirements for NMDA receptor-mediated neurotoxicity. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* 28, 1212–1221. doi: 10.1038/jcbfm.2008.14

Louessard, M., Bardou, I., Lemarchand, E., Thiebaut, A. M., Parcq, J., Leprince, J., et al. (2017). Activation of cell surface GRP78 reases endoplasmic reticulum stress and neuronal death. *Cell Death Differ.* 24, 1518–1529. doi: 10.1038/cdd.2017.35

Mahameed, M., Wilhelm, T., Darawshi, O., Obiedat, A., Tommy, W. S., Chintha, C., et al. (2019). The unfolded protein response modulators GSK2606414 and KIRA6 are potent KIT inhibitors. *Cell Death Dis.* 1:300. doi: 10.1038/s41419-019-1523-3

Marciniak, S. J., Garcia-Bonilla, L., Hu, J., Harding, H. P., and Ron, D. (2006). Activation-dependent substrate recruitment by the eukaryotic translation initiation factor 2 kinase PERK. *J. Cell Biol.* 16, 201–209. doi: 10.1083/jcb.200508099

Marciniak, S. J., and Ron, D. (2006). Endoplasmic reticulum stress signaling in disease. *Physiol. Rev.* 86, 1133–1149. doi: 10.1152/physrev.00015.2006

Marciniak, S. J., Yun, C. Y., Oyadomari, S., Novoa, I., Zhang, Y., Greis, R., et al. (2004). CHOP induces death by promoting protein synthesis and oxidation in the stressed endoplasmic reticulum. *Genes Dev.* 15, 3066–3077. doi: 10.1101/gad.1250704

McCaig, D., Imai, H., Gallagher, L., Graham, D. I., Harland, J., Moira Brown, S., et al. (2005). Evolution of GADD34 expression after focal cerebral ischaemia. *Brain Res.* 9, 51–61. doi: 10.1016/j.brainres.2004.11.058

Meares, G. P., Hughes, K. J., Naatz, A., Papa, F. R., Urano, F., Hansen, P. A., et al. (2011). IRE1-dependent activation of AMPK in response to nitric oxide. *Mol. Cell. Biol.* 31, 4286–4297. doi: 10.1128/MCB.05668-11

Mengesdorf, T., Proud, C. G., Mies, G., and Paschen, W. (2002). Mechanisms underlying suppression of protein synthesis induced by transient focal cerebral ischemia in mouse brain. *Exp. Neurol.* 177, 538–546. doi: 10.1006/exnr.2002.8002

Michalak, M., Robert Parker, J. M., and Opas, M. (2002). Ca2+ signaling and calcium binding chaperones of the endoplasmic reticulum. *Cell Calcium* 32, 269–278. doi: 10.1016/s0143416002001884

Misra, U. K., and Pizzo, S. V. (2012). Receptor-recognized alpha(2)-macroglobulin binds to cell surface-associated GRP78 and activates mTORC1 and mTORC2 signaling in prostate cancer cells. *PLoS One* 7:e51735. doi: 10.1371/journal.pone.0051735

Mizushima, N., Yoshimori, T., and Ohsumi, Y. (2011). The role of Atg proteins in autophagosome formation. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 27, 107–132. doi: 10.1146/annurev-cellbio-092910-154005

Morimoto, N., Oida, Y., Shimazawa, M., Miura, M., Kudo, T., Imaizumi, K., et al. (2007). Involvement of endoplasmic reticulum stress after middle cerebral artery occlusion in mice. *Neuroscience* 29, 957–967. doi: 10.1016/j.neuroscience.2007.04.017

Myeku, N., and Figueiredo-Pereira, M. E. (2011). Dynamics of the degradation of ubiquitinated proteins by proteasomes and autophagy: association with sequestosome 1/p62. *J. Biol. Chem.* 24, 22426–22440. doi: 10.1074/jbc.M110.149252

Nah, J., Yoo, S. M., Jung, S., Jeong, E. I., Park, M., Kaang, B. K., et al. (2017). Phosphorylated CAV1 activates autophagy through an interaction with

BECN1 under oxidative stress. *Cell Death Dis.* 25:e2822. doi: 10.1038/cddis.2017.71

Nakka, V. P., Gusain, A., and Raghubir, R. (2010). Endoplasmic reticulum stress plays critical role in brain damage after cerebral ischemia/reperfusion in rats. *Neurotox Res.* 17, 189–202. doi: 10.1007/s12640-009-9110-5

National Institute of Neurological Disorders and Stroke rt-Pa Stroke Study Group (1995). Tissue plasminogen activator for acute ischemic stroke. *N. Engl. J. Med.* 14, 1581–1587.

Nedergaard, M., Ransom, B., and Goldman, S. A. (2003). New roles for astrocytes: redefining the functional architecture of the brain. *Trends Neurosci.* 26, 523–530. doi: 10.1016/j.tins.2003.08.008

Ni, Y., Gu, W. W., Liu, Z. H., Zhu, Y. M., Rong, J. G., Kent, T. A., et al. (2018). RIP1K Contributes to Neuronal and Astrocytic Cell Death in Ischemic Stroke via Activating Autophagic-lysosomal Pathway. *Neuroscience* 10, 60–74. doi: 10.1016/j.neuroscience.2017.10.038

Nitatori, T., Sato, N., Waguri, S., Karasawa, Y., Araki, H., Shibanai, K., et al. (1995). Delayed neuronal death in the CA1 pyramidal cell layer of the gerbil hippocampus following transient ischemia is apoptosis. *J. Neurosci.* 15, 1001–1011. doi: 10.1523/jneurosci.15-02-01001.1995

Noda, T., and Ohsumi, Y. (1998). Tor, a phosphatidylinositol kinase homologue, controls autophagy in yeast. *J. Biol. Chem.* 13, 3963–3966. doi: 10.1074/jbc.273.7.3963

Osada, N., Kosuge, Y., Kihara, T., Ishige, K., and Ito, Y. (2009). Apolipoprotein E-deficient mice are more vulnerable to ER stress after transient forebrain ischemia. *Neurochem. Int.* 54, 403–409. doi: 10.1016/j.neuint.2009.01.010

Owen, C. R., Kumar, R., Zhang, P., McGrath, B. C., Cavener, D. R., and Krause, G. S. (2005). PERK is responsible for the increased phosphorylation of eIF2alpha and the severe inhibition of protein synthesis after transient global brain ischemia. *J. Neurochem.* 94, 1235–1242. doi: 10.1111/j.1471-4159.2005.03276.x

Papadakis, M., Hadley, G., Xilouri, M., Hoyte, L. C., Nagel, S., McMenamin, M. M., et al. (2013). Tsc1 (hamartin) confers neuroprotection against ischemia by inducing autophagy. *Nat. Med.* 19, 351–357. doi: 10.1038/nm.3097

Parsons, J. T., Churn, S. B., and DeLorenzo, R. J. (1999). Global ischemia-induced inhibition of the coupling ratio of calcium uptake and ATP hydrolysis by rat whole brain microsomal Mg(2+)/Ca(2+) ATPase. *Brain Res.* 10, 32–41. doi: 10.1016/s0006-8993(99)01504-8

Paschen, W., Aufenberg, C., Hotop, S., and Mengesdorf, T. (2003). Transient cerebral ischemia activates processing of xbp1 messenger RNA indicative of endoplasmic reticulum stress. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* 23, 449–461. doi: 10.1097/00004647-200304000-00009

Paschen, W., and Doutheil, J. (1999). Disturbances of the functioning of endoplasmic reticulum: a key mechanism underlying neuronal cell injury? *J. Cereb. Blood Flow Metab.* 19, 1–18. doi: 10.1097/00004647-199901000-00001

Paschen, W., Hayashi, T., Saito, A., and Chan, P. H. (2004). GADD34 protein levels increase after transient ischemia in the cortex but not in the CA1 subfield: implications for post-ischemic recovery of protein synthesis in ischemia-resistant cells. *J. Neurochem.* 90, 694–701. doi: 10.1111/j.1471-4159.2004.02555.x

Pattingre, S., Bauvy, C., Carpentier, S., Levade, T., Levine, B., and Codogno, P. (2009). Role of JNK1-dependent Bcl-2 phosphorylation in ceramide-induced macroautophagy. *J. Biol. Chem.* 30, 2719–2728. doi: 10.1074/jbc.M805920200

Pattingre, S., Tassa, A., Qu, X., Garuti, R., Liang, X. H., Mizushima, N., et al. (2005). Bcl-2 antiapoptotic proteins inhibit Beclin 1-dependent autophagy. *Cell* 23, 927–939. doi: 10.1016/j.cell.2005.07.002

Pengyue, Z., Tao, G., Hongyun, H., Liqiang, Y., and Yihao, D. (2017). Breviscapine confers a neuroprotective efficacy against transient focal cerebral ischemia by attenuating neuronal and astrocytic autophagy in the penumbra. *Biomed. Pharmacother.* 90, 69–76. doi: 10.1016/j.biopha.2017.03.039

Petiot, A., Ogier-Denis, E., Blommaart, E. F., Meijer, A. J., and Codogno, P. (2000). Distinct classes of phosphatidylinositol 3'-kinases are involved in signaling pathways that control macroautophagy in HT-29 cells. *J. Biol. Chem.* 14, 992–998. doi: 10.1074/jbc.275.2.992

Puyal, J., Vaslin, A., Mottier, V., and Clarke, P. G. (2009). Postischemic treatment of neonatal cerebral ischemia should target autophagy. *Ann. Neurol.* 66, 378–389. doi: 10.1002/ana.21714

Qi, X., Okuma, Y., Hosoi, T., and Nomura, Y. (2004). Edaravone protects against hypoxia/ischemia-induced endoplasmic reticulum dysfunction. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 311, 388–393. doi: 10.1124/jpet.104.069088

Qin, A. P., Liu, C. F., Qin, Y. Y., Hong, L. Z., Xu, M., Yang, L., et al. (2010). Autophagy was activated in injured astrocytes and mildly reased cell survival following glucose and oxygen deprivation and focal cerebral ischemia. *Autophagy* 6, 738–753. doi: 10.4161/auto.6.6.12573

Rami, A., Langhagen, A., and Steiger, S. (2008). Focal cerebral ischemia induces upregulation of Beclin 1 and autophagy-like cell death. *Neurobiol. Dis.* 29, 132–141. doi: 10.1016/j.nbd.2007.08.005

Rissanen, A., Sivenius, J., and Jolkkonen, J. (2006). Prolonged bihemispheric alterations in unfolded protein response related gene expression after experimental stroke. *Brain Res.* 4, 60–66. doi: 10.1016/j.brainres.2006.02.095

Roussel, B. D., Kruppa, A. J., Miranda, E., Crowther, D. C., Lomas, D. A., and Marciniak, S. J. (2013). Endoplasmic reticulum dysfunction in neurological disease. *Lancet Neurol.* 12, 105–118. doi: 10.1016/s1474-4422(12)70238-7

Rubinsztein, D. C., Codogno, P., and Levine, B. (2012). Autophagy modulation as a potential therapeutic target for diverse diseases. *Nat. Rev. Drug Discov.* 11, 709–730. doi: 10.1038/nrd3802

Russell, R. C., Tian, Y., Yuan, H., Park, H. W., Chang, Y. Y., Kim, J., et al. (2013). ULK1 induces autophagy by phosphorylating Beclin-1 and activating VPS34 lipid kinase. *Nat. Cell Biol.* 15, 741–750. doi: 10.1038/ncb2757

Ryan, F., Khodagholi, F., Dargahi, L., Minai-Tehrani, D., and Ahmadiani, A. (2018). Temporal pattern and crosstalk of necroptosis markers with autophagy and apoptosis associated proteins in ischemic hippocampus. *Neurotox Res.* 34, 79–92. doi: 10.1007/s12640-017-9861-3

Rzymski, T., Milani, M., Pike, L., Buffa, F., Mellor, H. R., Winchester, L., et al. (2010). Regulation of autophagy by ATF4 in response to severe hypoxia. *Oncogene* 5, 4424–4435. doi: 10.1038/onc.2010.191

Schneeloch, E., Wenkel, S., Mies, G., and Paschen, W. (2004). Spreading depression activates unfolded protein response. *Neurosci. Lett.* 16, 37–40. doi: 10.1016/j.neulet.2004.06.061

Sheng, R., Liu, X. Q., Zhang, L. S., Gao, B., Han, R., Wu, Y. Q., et al. (2012). Autophagy regulates endoplasmic reticulum stress in ischemic preconditioning. *Autophagy* 8, 310–325. doi: 10.4161/auto.18673

Sheng, R., Zhang, L. S., Han, R., Liu, X. Q., Gao, B., and Qin, Z. H. (2010). Autophagy activation is associated with neuroprotection in a rat model of focal cerebral ischemic preconditioning. *Autophagy* 6, 482–494. doi: 10.4161/auto.6.4.11737

Shi, R., Weng, J., Zhao, L., Li, X. M., Gao, T. M., and Kong, J. (2012). Excessive autophagy contributes to neuron death in cerebral ischemia. *CNS Neurosci. Thera.* 18, 250–260. doi: 10.1111/j.1755-5949.2012.00295.x

Sokka, A. L., Putkonen, N., Mudo, G., Pryazhnikov, E., Reijonen, S., Khiroug, L., et al. (2007). Endoplasmic reticulum stress inhibition protects against excitotoxic neuronal injury in the rat brain. *J. Neurosci.* 24, 901–908. doi: 10.1523/jneurosci.4289-06.2007

Szydlowska, K., and Tymianski, M. (2010). Calcium, ischemia and excitotoxicity. *Cell Calcium* 47, 122–129. doi: 10.1016/j.ceca.2010.01.003

Tajiri, S., Oyadomari, S., Yano, S., Morioka, M., Gotoh, T., Hamada, J. I., et al. (2004). Ischemia-induced neuronal cell death is mediated by the endoplasmic reticulum stress pathway involving CHOP. *Cell Death Differ.* 11, 403–415. doi: 10.1038/sj.cdd.4401365

Thiebaut, A. M., Gauberti, M., Ali, C., Martinez De Lizarrondo, S., Vivien, D., Yepes, M., et al. (2018). The role of plasminogen activators in stroke treatment: fibrinolysis and beyond. *Lancet Neurol.* 17, 1121–1132. doi: 10.1016/S1474-4422(18)30323-5

Tian, F., Deguchi, K., Yamashita, T., Ohta, Y., Morimoto, N., Shang, J., et al. (2010). In vivo imaging of autophagy in a mouse stroke model. *Autophagy* 6, 1107–1114. doi: 10.4161/auto.6.8.13427

Uchiyama, Y. (2001). Autophagic cell death and its execution by lysosomal cathepsins. *Arch. Histol. Cytol.* 64, 233–246. doi: 10.1679/aohc.64.233

Urbanek, T., Kuczmik, W., Basta-Kaim, A., and Gabryel, B. (2014). Rapamycin induces of protective autophagy in vascular endothelial cells exposed to oxygen-glucose deprivation. *Brain Res.* 17, 1–11. doi: 10.1016/j.brainres.2014.01.017

Wang, J. Y., Xia, Q., Chu, K. T., Pan, J., Sun, L. N., Zeng, B., et al. (2011). Severe global cerebral ischemia-induced programmed necrosis of hippocampal CA1 neurons in rat is prevented by 3-methyladenine: a widely used inhibitor

of autophagy. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* 70, 314–322. doi: 10.1097/NEN.0b013e31821352bd

Wang, N., Yang, L., Zhang, H., Lu, X., Wang, J., Cao, Y., et al. (2018). MicroRNA-9a-5p alleviates ischemia injury after focal cerebral ischemia of the rat by targeting ATG5-mediated autophagy. *Cell. Physiol. Biochem.* 45, 78–87. doi: 10.1159/000486224

Wang, P., Guan, Y. F., Du, H., Zhai, Q. W., Su, D. F., and Miao, C. Y. (2012). Induction of autophagy contributes to the neuroprotection of nicotinamide phosphoribosyltransferase in cerebral ischemia. *Autophagy* 8, 77–87. doi: 10.4161/auto.8.1.18274

Wang, P., Xu, T. Y., Wei, K., Guan, Y. F., Wang, X., Xu, H., et al. (2014). ARRB1/beta-arrestin-1 mediates neuroprotection through coordination of BECN1-dependent autophagy in cerebral ischemia. *Autophagy* 10, 1535–1548. doi: 10.4161/auto.29203

Wang, Z., and Yang, W. (2018). Impaired capacity to restore proteostasis in the aged brain after ischemia: implications for translational brain ischemia research. *Neurochem. Int.* doi: 10.1016/j.neuint.2018.12.018 [Epub ahead of print].

Wei, H., and Perry, D. C. (1996). Dantrolene is cytoprotective in two models of neuronal cell death. *J. Neurochem.* 67, 2390–2398. doi: 10.1046/j.1471-4159.1996.67062390.x

Wei, Y., Pattingre, S., Sinha, S., Bassik, M., and Levine, B. (2008). JNK1-mediated phosphorylation of Bcl-2 regulates starvation-induced autophagy. *Mol. Cell* 20, 678–688. doi: 10.1016/j.molcel.2008.06.001

Weidberg, H., Shvets, E., Shpilka, T., Shimron, F., Shinder, V., and Elazar, Z. (2010). LC3 and GATE-16/GABARAP subfamilies are both essential yet act differently in autophagosome biogenesis. *EMBO J.* 2, 1792–1802. doi: 10.1038/emboj.2010.74

Wen, Y. D., Sheng, R., Zhang, L. S., Han, R., Zhang, X., Zhang, X. D., et al. (2008). Neuronal injury in rat model of permanent focal cerebral ischemia is associated with activation of autophagic and lysosomal pathways. *Autophagy* 4, 762–769. doi: 10.4161/auto.6412

Xie, C., Ginet, V., Sun, Y., Koike, M., Zhou, K., Li, T., et al. (2016). Neuroprotection by selective neuronal deletion of Atg7 in neonatal brain injury. *Autophagy* 12, 410–423. doi: 10.1080/15548627.2015.1132134

Xin, X. Y., Pan, J., Wang, X. Q., Ma, J. F., Ding, J. Q., Yang, G. Y., et al. (2011). 2-methoxyestradiol attenuates autophagy activation after global ischemia. *Can. J. Neurol. Sci.* 38, 631–638. doi: 10.1017/s031716710001218x

Xing, H., Azimi-Zonooz, A., Shuttleworth, C. W., and Connor, J. A. (2004). Caffeine releasable stores of Ca2+ show depletion prior to the final steps in delayed CA1 neuronal death. *J. Neurophysiol.* 92, 2960–2967. doi: 10.1152/jn.00015.2004

Xing, S., Zhang, Y., Li, J., Zhang, J., Li, Y., Dang, C., et al. (2012). Beclin 1 knockdown inhibits autophagic activation and prevents the secondary neurodegenerative damage in the ipsilateral thalamus following focal cerebral infarction. *Autophagy* 8, 63–76. doi: 10.4161/auto.8.1.18217

Yamamoto, H., Kakuta, S., Watanabe, T. M., Kitamura, A., Sekito, T., Kondo-Kakuta, C., et al. (2012). Atg9 vesicles are an important membrane source during early steps of autophagosome formation. *J. Cell Biol.* 23, 219–233. doi: 10.1083/jcb.201202061

Yang, Z., Zhao, T. Z., Zou, Y. J., Zhang, J. H., and Feng, H. (2014). Hypoxia Induces autophagic cell death through hypoxia-inducible factor 1alpha in microglia. *PLoS One* 9:e96509. doi: 10.1371/journal.pone.0096509

Yepes, M., Roussel, B. D., Ali, C., and Vivien, D. (2009). Tissue-type plasminogen activator in the ischemic brain: more than a thrombolytic. *Trends Neurosci.* 32, 48–55. doi: 10.1016/j.tins.2008.09.006

Yoshida, H., Matsui, T., Hosokawa, N., Kaufman, R. J., Nagata, K., and Mori, K. (2003). A time-dependent phase shift in the mammalian unfolded protein response. *Dev. Cell* 4, 265–271. doi: 10.1016/s1534-5807(03)00022-4

Young, A. R., Ali, C., Duretete, A., and Vivien, D. (2007). Neuroprotection and stroke: time for a compromise. *J. Neurochem.* 103, 1302–1309. doi: 10.1111/j.1471-4159.2007.04866.x

Zalckvar, E., Berissi, H., Mizrachy, L., Idelchuk, Y., Koren, I., Eisenstein, M., et al. (2009). DAP-kinase-mediated phosphorylation on the BH3 domain of beclin 1 promotes dissociation of beclin 1 from Bcl-XL and induction of autophagy. *EMBO Rep.* 10, 285–292. doi: 10.1038/embor.2008.246

Zhang, C., and Cuervo, A. M. (2008). Restoration of chaperone-mediated autophagy in aging liver improves cellular maintenance and hepatic function. *Nat. Med.* 14, 959–965. doi: 10.1038/nm.1851

Zhang, T., Liu, X., Li, Q., Wang, J., Jia, W., and Sun, X. (2010). Exacerbation of ischemia-induced amyloid-beta generation by diabetes is associated with autophagy activation in mice brain. *Neurosci. Lett.* 2, 215–220. doi: 10.1016/j.neulet.2010.05.064

Zhang, T., Lu, D., Yang, W., Shi, C., Zang, J., Shen, L., et al. (2018). HMG-CoA Reductase Inhibitors Relieve Endoplasmic Reticulum Stress by Autophagy Inhibition in Rats With Permanent Brain Ischemia. *Front. Neurosci.* 12:405. doi: 10.3389/fnins.2018.00405

Zhang, X., Yan, H., Yuan, Y., Gao, J., Shen, Z., Cheng, Y., et al. (2013). Cerebral ischemia-reperfusion-induced autophagy protects against neuronal injury by mitochondrial clearance. *Autophagy* 9, 1321–1333. doi: 10.4161/auto.25132

Zhang, X., Yuan, Y., Jiang, L., Zhang, J., Gao, J., Shen, Z., et al. (2014). Endoplasmic reticulum stress induced by tunicamycin and thapsigargin protects against transient ischemic brain injury: involvement of PARK2-dependent mitophagy. *Autophagy* 1, 1801–1813. doi: 10.4161/auto.32136

Zheng, Y. Q., Liu, J. X., Li, X. Z., Xu, L., and Xu, Y. G. (2009). RNA interference-mediated downregulation of Beclin1 attenuates cerebral ischemic injury in rats. *Acta Pharmacol. Sin.* 30, 919–927. doi: 10.1038/aps.2009.79

Zhou, Y., Lee, J., Reno, C. M., Sun, C., Park, S. W., Chung, J., et al. (2011). Regulation of glucose homeostasis through a XBP-1-FoxO1 interaction. *Nat. Med.* 17, 356–365. doi: 10.1038/nm.2293

Zundorf, G., and Reiser, G. (2011). Calcium dysregulation and homeostasis of neural calcium in the molecular mechanisms of neurodegenerative diseases provide multiple targets for neuroprotection. *Antioxid. Redox Signal.* 1, 1275–1288. doi: 10.1089/ars.2010.3359

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

Copyright © 2019 Thiebaut, Hedou, Marciniak, Vivien and Roussel. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (CC BY). The use, distribution or reproduction in other forums is permitted, provided the original author(s) and the copyright owner(s) are credited and that the original publication in this journal is cited, in accordance with accepted academic practice. No use, distribution or reproduction is permitted which does not comply with these terms.

Article 3: "*The role of plasminogen activators in stroke treatment: fibrinolysis and beyond*"

Audrey M. Thiebaut, Maxime Gauberti, Carine Ali, Sara Martinez De Lizarrondo, Denis Vivien, Manuel Yepes and Benoit D. Roussel.

Titre: Le rôle des activateurs du plasminogène dans le traitement de l'AVC : fibrinolyse et au-delà.

Revue publiée en 2019 dans *Lancet Neurology*

Résumé : Bien que les progrès techniques récents en matière de thrombectomie aient révolutionné le traitement de l'AVC aigu, la prévalence d'invalidité et de décès liés à l'AVC reste élevée. Par conséquent, les activateurs du plasminogène (formes eucaryotes, bactériennes ou modifiées) susceptibles de favoriser la fibrinolyse, en clivant le plasminogène en plasmine active et en facilitant la décomposition du caillot, sont encore couramment utilisés dans le traitement aigu des accidents ischémiques cérébraux. Par conséquent, les activateurs du plasminogène sont devenus un domaine crucial pour les études cliniques grâce à leur capacité à recanaliser les artères obstruées lors d'un AVC ischémique et à accélérer la clairance de l'hématome lors d'un AVC hémorragique. Cependant, des résultats incohérents, des preuves d'efficacité insuffisantes ou des effets secondaires dans les essais cliniques pourraient fortement réduire l'utilisation d'activateurs du plasminogène en pratique clinique. De plus, le mécanisme d'action des activateurs du plasminogène pourrait s'étendre au-delà de la lumière des vaisseaux et impliquer des processus indépendants du plasminogène, ce qui suggérerait que les activateurs du plasminogène ont également un rôle non fibrinolytique. Comprendre les mécanismes d'action complexes des activateurs du plasminogène peut guider les futures interventions thérapeutiques chez les patients ayant subi un AVC.

The role of plasminogen activators in stroke treatment: fibrinolysis and beyond

Audrey M Thiebaut, Maxime Gauberti, Carine Ali, Sara Martinez De Lizarrondo, Denis Vivien, Manuel Yepes, Benoit D Roussel

Although recent technical advances in thrombectomy have revolutionised acute stroke treatment, prevalence of disability and death related to stroke remain high. Therefore, plasminogen activators—eukaryotic, bacterial, or engineered forms that can promote fibrinolysis by converting plasminogen into active plasmin and facilitate clot breakdown—are still commonly used in the acute treatment of ischaemic stroke. Hence, plasminogen activators have become a crucial area for clinical investigation for their ability to recanalise occluded arteries in ischaemic stroke and to accelerate haematoma clearance in haemorrhagic stroke. However, inconsistent results, insufficient evidence of efficacy, or reports of side-effects in trial settings might reduce the use of plasminogen activators in clinical practice. Additionally, the mechanism of action for plasminogen activators could extend beyond the vessel lumen and involve plasminogen-independent processes, which would suggest that plasminogen activators have also non-fibrinolytic roles. Understanding the complex mechanisms of action of plasminogen activators can guide future directions for therapeutic interventions in patients with stroke.

Lancet Neurol 2018; 17: 1121–32

Normandie Université, UNICAEN, INSERM, INSERM UMR-S U1237, Physiopathology and Imaging of Neurological Disorders, Cyceron, Caen, France (A M Thiebaut MSc, M Gauberti PhD, Prof C Ali PhD, S Martinez De Lizarrondo PhD, Prof D Vivien PhD, B D Roussel PhD); **Department of Neurology and Center for Neurodegenerative Disease, Emory University School of Medicine, Division of Neuropharmacology and Neurologic Diseases, Yerkes National Primate Research Center, and Department of Neurology, Veterans Affairs Medical Center, Atlanta, GA, USA** (Prof M Yepes MD); **and Clinical Research Department, University Hospital Caen-Normandy, Caen, France** (Prof D Vivien)

Introduction

The fibrinolytic effect of various types of plasminogen activators for the acute treatment of ischaemic stroke has been explored by many clinical studies. However, tissue-type plasminogen activator (tPA) is the most commonly used plasminogen activator for treatment of patients with acute ischaemic stroke.[1] Thrombolysis with tPA after acute ischaemic stroke has been limited by the short recommended treatment window (time since onset of symptoms <4·5 h), although the 2018 Efficacy and Safety of MRI-based Thrombolysis in Wake-Up Stroke (WAKE-UP) trial[2] showed that an ischaemic lesion that is visible on diffusion-weighted MRI without brain parenchymal hyperintensity on fluid-attenuated inversion recovery can be used to successfully identify patients with acute stroke who would benefit from treatment with tPA even if the time of symptom onset is unknown.

To appreciate the clinical importance of plasminogen activators in treating brain ischaemia, it is pivotal to understand the neurovascular unit—a highly dynamic system composed of endothelial cells surrounded by pericytes and a basement membrane encircled by astrocytic endfeet processes that enter in contact with axonal projections from neighbouring neurons. Cerebral ischaemia induces a rapid release of plasminogen activators from the endothelial cells into the intravascular space, from perivascular astrocytes into the endothelial cell-basement membrane-astrocyte interphase, and from the presynaptic terminal into the synaptic cleft. The main role of plasminogen activators in the intravascular space is to maintain the patency of the blood vessel by promoting plasmin-induced lysis of occluding clots. In the endothelial cell-basement membrane-astrocyte interphase, plasminogen activators regulate the permeability of the blood–brain barrier (BBB),[3] and modulate the synaptic response to the ischaemic injury in the synaptic cleft.[4] Thus far, the rationale to treat patients with ischaemic stroke with plasminogen activators is based on their intravascular fibrinolytic effect. Paradoxically, the fibrinolytic properties of plasminogen activators are also used to clear clotted blood from the brain to treat haemorrhagic stroke. Historically, plasminogen activators were used to remove blood clots from the brain parenchyma, as blood signals were observed radiographically and found to persist for months in patients with intraventricular haemorrhage. However, no studies clearly describe the consequences on plasminogen-activator injection on the brain parenchyma, learning and memory, or neurotoxicity after

Panel 1: Ischaemic stroke and urokinase plasminogen activator

Urokinase plasminogen activator (uPA) is a serine protease with fibrinolytic properties, first identified in human urine.[6] uPA has been used to treat patients with acute limb ischaemia, pulmonary embolism, myocardial infarction, ischaemic stroke, and intracranial haemorrhage. In the rat brain, uPA expression is mostly neuronal[7] but it can also be found in astrocytes and oligodendrocytes.[8] uPA is synthesised as a single-chain pro-enzyme, and secreted in the extracellular space where it is cleaved by plasmin, kallikreins, and stromelysin into fully active two-chain uPA.[9] The cell surface receptor of uPA promotes the local activation of plasminogen into plasmin, but uPA receptor activation can also recruit signalling pathways, induce neuroprotection, neurogenesis, neuritogenesis, axonal growth, and neuronal migration, and promote dendritic spine recovery after ischaemic stroke (figure 1 and appendix).[10–12] The endogenous uPA–uPA receptor system has been shown to be involved in stroke pathophysiology. The bioactive soluble form of the uPA receptor (suPAR) has been described as a strong biomarker of carotid plaques burden and ischaemic stroke occurrence.[13] Elevated plasmatic levels of suPAR are also a predictor of 5-year mortality in patients with ischaemic stroke.[14] Observations in uPA receptor-knock-out and uPA-knock-out mice report that endothelial uPA receptors could be responsible for ischaemia-mediated brain damages independently of uPA,[15] suggesting the existence of another ligand for uPA receptor during cerebral ischaemia. The removal of uPA or uPA receptors (by using knock-out animals) does not influence the size of the ischaemic lesion but improves functional recovery.[16] Alternatively, another hypothesis is that uPA is released by injured neurons and that uPA receptors are recruited to the astrocytic cell surface to activate extracellular signal-regulated kinases (Erk) and signal transducer and activator of transcription (STAT), independently from plasmin generation, leading to astrocytic activation and synaptic recovery.[11]

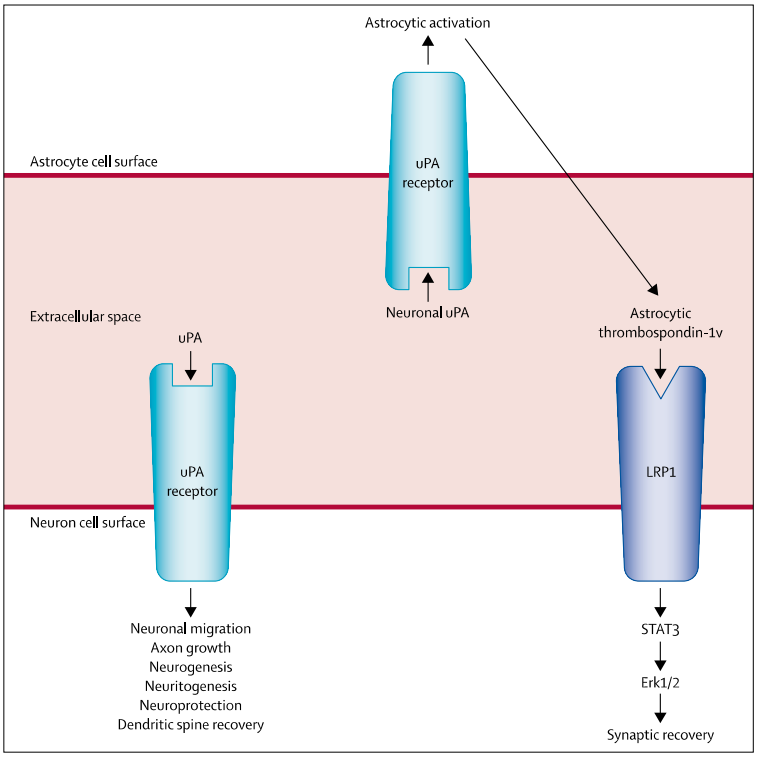


Figure 1: **Pathophysiology of urokinase plasminogen activators from in-vitro studies and animal models**
Urokinase plasminogen activator (uPA) can induce multiple effects in neurons through its receptor: neuronal migration, axon growth, neurogenesis, neuritogenesis, neuroprotection, and dendritic spine recovery.[7,10,16] uPA released by neurons can activate its receptor on the astrocyte cell surface, leading to astrocytic activation, which in turn releases astrocytic thrombospondin-1v into the extracellular space, which then interacts with LRP1 on dendritic spines to promote synaptic recovery via reorganisation of the actin cytoskeleton in the postsynaptic terminal.[11] Erk1/2=extracellular signal-regulated kinases 1 and 2. LRP1=LDL receptor-related protein 1. STAT=signal transducer and activator of transcription.

Correspondence to:
Dr B D Roussel, Normandie Université, UNICAEN, INSERM, INSERM UMR-S U1237, Physiopathology and Imaging of Neurological Disorders, Cyceron, 14000 Caen, France
broussel@cyceron.fr

See Online for appendix

blood-clot removal, despite a clear benefit of the technique for patients.[5]

In this Review, we describe the the pathophysiological effects of plasminogen activators and how, in the future, their non-fibrinolytic functions could be used for the treatment of patients with acute ischaemic and haemorrhagic stroke.

Tissue-type plasminogen activator

tPA and urokinase-type plasminogen activator (uPA; panel 1, figure 1) are the two main mammalian plasminogen activators that convert plasminogen into active plasmin, which can then degrade fibrin, although others (eg, desmoteplase) have been tested in humans and animals. Recombinant forms of plasminogen activators (native or engineered) such as tenecteplase and reteplase have been used to treat patients with thrombotic diseases such as acute ischaemic stroke[17] or myocardial infarction (figure 2 and appendix).[19] However, only tPA administration is approved for the treatment of patients with acute ischaemic stroke.[1]

Physiological functions of tPA

tPA was first identified in the blood and later in the brain.[20] It is synthesised as a single-chain protein and, in vitro, is converted into a two-chain form by plasmin or kallikreins,[21] although this conversion does not affect fibrinolytic efficacy of tPA.[22] In vivo, tPA is synthesised and released by endothelial cells in the blood-stream,[23] but it is also produced by brain cells such as neurons[24] and glial cells;[25] in vitro studies have shown tPA synaptic release[26] and endocytosis by astrocytes.[27] tPA controls many cerebral physiological events, such as neuronal migration,[28] neurite outgrowth,[29] glutamatergic neurotransmission,[30] long-term potentiation,[31] synaptic plasticity,[32] neurovascular coupling,[33] and anxiety,[34] through interactions with various receptors (figure 3).

Contrasting neurotoxic and neuroprotective effects of tPA

Since the pioneering work of Tsirka and colleagues[42] in 1995, several animal studies have supported the possibility that tPA might have a pro-neurotoxic effect under pathological conditions. Nowadays, this possibility remains uncertain because, in animal studies, tPA has been shown to promote both neuronal survival and death. The opposing roles of tPA in neuronal survival could depend on tPA dose, the type of neurons, or the experimental models of neuronal death, or a combination of these factors. For example, tPA increases NMDA-receptor (NMDAR) signalling to toxic levels in vitro.[30] Even though this finding was initially controversial,[43] it is now accepted by the research community. However, this toxic effect of NMDAR signalling could require a coreceptor such as LDL receptor-related protein 1 (LRP1).[37] In contrast with the studies that showed a neurotoxic effect of tPA, other animal studies indicate that tPA might promote synaptic adaptation to metabolic stress,[35] might induce homoeostatic plasticity,[4] and might protect the postsynaptic density from the harmful effects of ischaemic injury.[44] Proteostasis (ie, equilibrium between protein synthesis and degradation) is also emerging as a potential signalling pathway modulated by tPA during stroke. Indeed, an animal study[45] has shown that co-treatment with a proteasome inhibitor enhances the beneficial effects of tPA. These results are consistent with recent findings in mice[41] that inhibition by tPA of endoplasmic reticulum stress protects neurons from oxygen and glucose deprivation in vitro. Furthermore, other animal studies[35,46] have shown that tPA also has a neuroprotective effect via the activation of the mammalian target of rapamycin (mTOR), which is an inhibitor of autophagy.

Several questions relating to neurotoxicity remain: how strongly does the tPA–NMDAR interaction affect the pathophysiology of stroke? Is the stimulation of NMDAR sufficient to trigger the negative effects of tPA in stroke? Does tPA promote any effect in ischaemic brain tissue independent of its enzymatic activity? In oxygen and

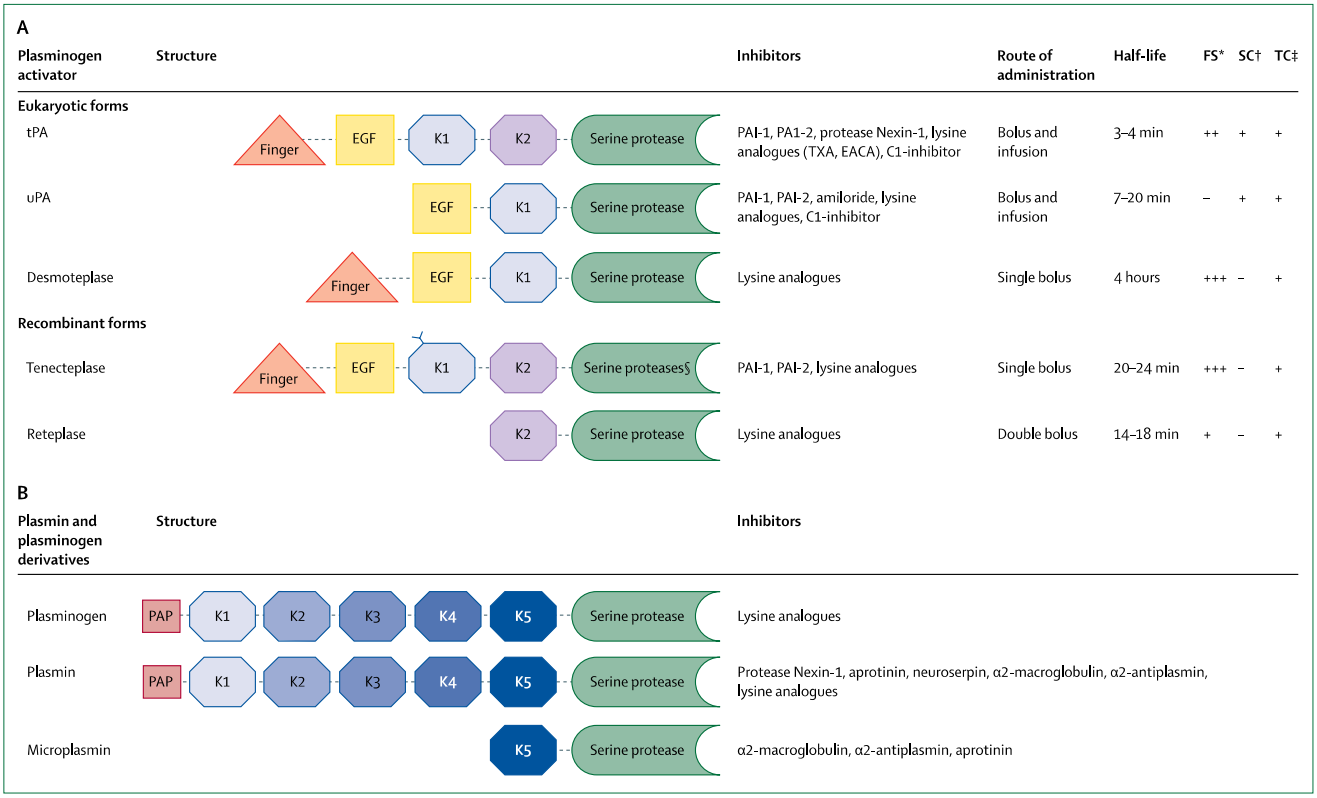


Figure 2: **Plasminogen activators and plasmin or plasminogen derivatives**
(A) Plasminogen activators are classified into eukaryotic forms and recombinant forms. They have various structural domains, inhibitors, and different specificities to fibrin; thus, their route of administration and half-life vary. Plasminogen activators can have a SC form, a TC form, or both.[18] (B) Plasmin or plasminogen derivatives before and after cleavage by plasminogen activators. Plasminogen activators convert plasminogen into active plasmin, which can then degrade fibrin. EACA=ε-aminocaproic acid. EGF=epithelial growth factor. Finger=finger domain. FN=fibronectin domain. FS=fibrin specificity. K=Kringle domain. PAI=plasminogen-activator inhibitor. PAP=pan apple domain. SC=single chain. TC=two chain. tPA=tissue-type plasminogen activator. TXA=tranexamic acid. uPA=urokinase plasminogen activator. *Plasminogen activator has no (-), low (+) moderate (++), or high (+++) fibrin specificity.[18] †Plasminogen activator has (+) or does not have (-) a SC form. ‡Plasminogen activator has (+) or does not have (-) a TC form. §Amino acid substitution in the serine protease domain: Lys296Ala, Hys297Ala, Arg298Ala, Arg299Ala.

glucose deprivation experiments in vitro, tPA protects neurons from death,[35,41] whereas in a mouse model[47] of thromboembolic stroke with tPA-mediated recanalisation, the injection of a specific antibody into circulation to inhibit the interaction between tPA and NMDAR is beneficial. However, an effect of the antibody on the neurovascular unit or the endothelial cells cannot be excluded, as suggested by the effect of this antibody in a mouse model of multiple sclerosis.[48]

Although these animal models provide valuable mechanistic information, clinical support for these models remains poor. One case-control registry study[49] suggested that thrombolysis using tPA was associated with epileptic seizures within 7 days of treatment (28 [1%] of 2327 patients with stroke compared with 100 controls with stroke who did not have seizures), independently of recanalisation or haemorrhagic transformation. However, neither a retrospective analysis[50] of 302 patients with stroke nor a meta-analysis[51] of 4362 participants who had a stroke identified an association between tPA and seizures after stroke. Nevertheless, a multicentre analysis[52] of 1004 patients who had a stroke and were treated with thrombolysis reported that people injected with a higher ratio of single-chain tPA than two-chain tPA are more likely to develop seizures soon after treatment, although functional outcome was not affected. One explanation is that the conflicting results regarding the benefits and adverse effects of tPA might arise from the differences between studies in animal models of stroke and clinical studies, in which the large benefits of reperfusion in humans might conceal the adverse effects of tPA.

Ischaemic stroke and tPA

tPA administration is combined with endovascular thrombectomy[53] in patients with large vessel occlusion (panel 2). There have been 27 trials of the use of thrombolytic agents in the treatment of ischaemic stroke according to the latest Cochrane database systematic review.[60] Four of these trials administered streptokinase

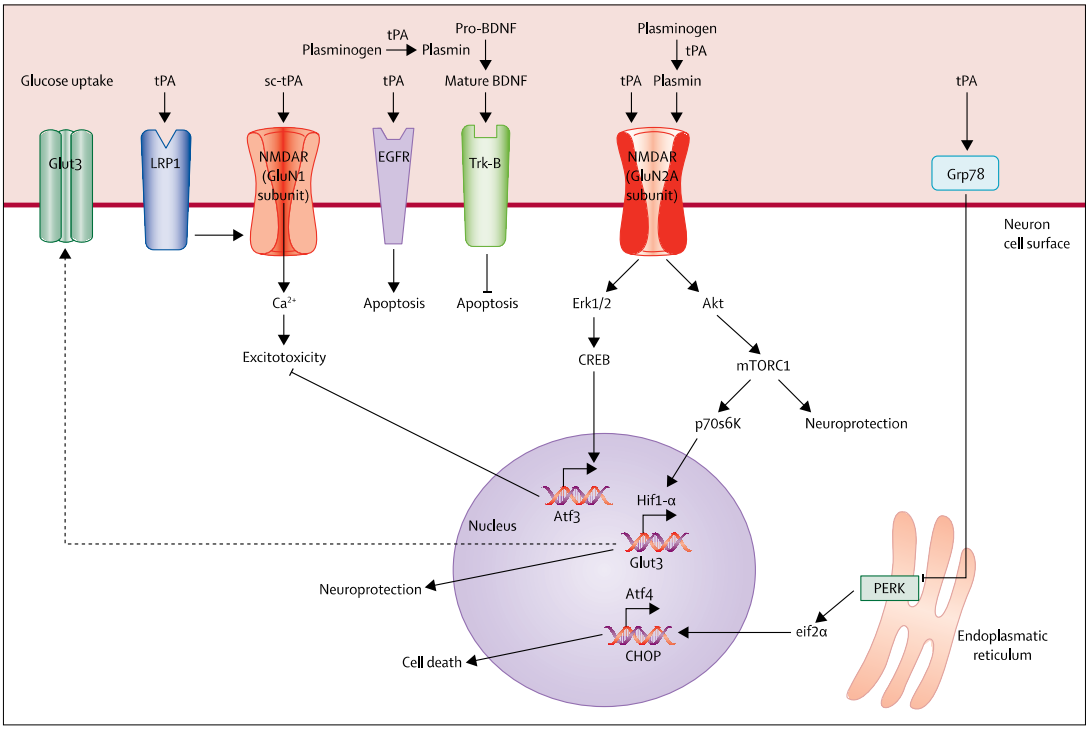


Figure 3: **Pathophysiology of tissue-type plasminogen activator from in-vitro studies and animal models**
At the neuronal cell surface, tissue-type plasminogen activator (tPA) interacts directly with NMDARs with opposite results reported in the scientific literature. When it interacts with the GluN2A subunit, tPA activates either the Akt/mTOR/p70S6K/HIF1α signalling pathway, leading to neuroprotection and to an increase of glucose uptake,[35] or the Erk1/2/CREB/ATF3 signalling pathway to decrease excitotoxicity.[36] sc-tPA also interacts with the GluN1 subunit of NMDAR either directly[30] or through LRP1,[37,38] and promotes excitotoxicity. This neurotoxic effect is mediated by the single-chain form of tPA, while both sc-tPA and tc-tPA interact with EGFR to inhibit apoptosis.[39] tPA also cleaves plasminogen into plasmin, leading to the cleavage of NMDAR GluN2A subunit and supporting cell survival, and activation of pro-BDNF into BDNF, which in turn activates Trk-B and protects from apoptosis.[40] Finally, the interaction of tPA and Grp78 is involved in decreasing endoplasmic reticulum stress through an inhibition of PERK/Eif2alpha/CHOP/Atf4 pathways.[41] Genes activated by each pathway are indicated above the arrows on the DNA segments. Akt=protein kinase B. Atf4=activating transcription factor 4. BDNF=brain-derived neurotrophic factor. CHOP=CCAAT-enhancer-binding protein homologous protein. CREB=C-AMP response element-binding protein. EGFR=EGF receptor. eif2α=eukaryotic translation initiation factor 2 α. Erk1/2=extracellular signal-regulated 1/2. Glut3=glucose transporter 3. Grp78= glucose-regulated protein 78 kDa. Hif1-α=hypoxia inducible factor 1. JAK2=JANUS kinase 2. LRP1=LDL receptor-related protein 1. mTORC1=mammalian target of rapamicyn complex 1. NMDAR= NMDA receptor. p70s6K=ribosomal protein S6 kinase beta-1. PERK=protein kinase RNA-like endoplasmic reticulum kinase. sc-tPA=single-chain tPA. STAT=signal transducer and activator of transcription. tc-tPA=two-chain tPA. Trk-B=tropomyosin receptor kinase B.

(at a dose of 1·5 MU), 12 administered recombinant tPA (at doses from 0·9 mg/kg to 1·1 mg/kg), six administered urokinase (at a dose of either 1·5 MU or 1·0 MU), two administered pro-urokinase (at doses of 6 mg and 9 mg), and three administered desmoteplase (at doses between 62 µg and 125 µg per kg of bodyweight).[60] These trials identified the main limitations of the use of tPA in ischaemic stroke to be the narrow therapeutic window (4·5 h after stroke symptom onset) of tPA,[61] its low rate of recanalisation, and the risk of symptomatic parenchymal haemorrhage.[17]

Rate of recanalisation and improved thrombolysis

The rate of acute recanalisation within 2 h after tPA administration remains low (<35% of patients had acute recanalisation, figure 4), according to a review[62] of the Calgary Stroke Program (2002–09), which included 1341 patients. Multiple variables, such as prolonged time to treatment, poor collaterals,[63] and thrombus size greater than 8 mm[64] are major predictive factors for unsuccessful tPA treatment. The low rate of recanalisation observed in patients treated with tPA prompted the ongoing investigation of the effect of different mechanical devices in removing the occluding clot from the intravascular space (panel 2).

Since acute recanalisation is a major prognostic factor for good functional outcome, therapeutic strategies that aim to improve the rate of recanalisation with intravenous thrombolysis remain of great clinical interest. Increasing the efficiency of tPA in degrading fibrin is one potential approach to improve the rate of recanalisation. There are different potential strategies to improve the efficiency of tPA, based either on the prevention of tPA inhibition by endogenous factors or on increasing the proteolytic

activity of tPA. One such strategy consists of bioengineering tPA through targeted mutagenesis to increase its resistance to inhibitors. This approach led to the development of tenecteplase (figure 2), a recombinant tPA that has increased resistance to plasminogen-activator inhibitor 1 (PAI-1), improved fibrin specificity, and enhanced half-life. A phase 3 randomised, open-label, blinded-endpoint trial[65] assessed functional outcome in 1107 patients enrolled within 4·5 h of onset of symptoms in 13 stroke units in Norway, 3 months after treatment with either tenecteplase or alteplase (tPA). These investigators found no difference in either mortality or functional outcome between groups.[65] By contrast, a subsequent multicentre, randomised, open-label, blinded-outcome trial[66] with 202 patients enrolled within 4·5 h of onset of stroke symptoms and treated with tenecteplase or alteplase showed reperfusion greater than 50% in 22 (22%) of 101 patients who received tenecteplase versus 10 (10%) of 101 treated with alteplase, and a better functional outcome at 90 days in tenecteplase-treated patients than in alteplase-treated patients.

Another strategy to increase the efficacy of tPA proposes to use a diabody (ie, an engineered antibody targeting two proteins) to block two inhibitors of the fibrinolytic process—PAI-1 and thrombin-activatable fibrinolysis inhibitor (TAFI)—to promote thrombolysis.[67] In a mouse model of thromboembolic stroke, co-administration of a diabody improved the efficacy of tPA, without promoting bleeding.[67] TAFI plasma concentrations affected the rate of recanalisation after tPA administration in 136 patients with stroke[68] and correlated with stroke severity and outcome[69] in 109 patients with stroke. Additionally, another study of 139 patients with ischaemic stroke[70] has shown that the presence of functional polymorphism on the genes that encode for TAFI and PAI-1 influenced tPA-induced recanalisation. An inhibitor of TAFIa is currently being tested in a placebo-controlled phase 1b/2 study (ClinicalTrials.gov, NCT02586233) of patients with ischaemic stroke who are not eligible to be administered tPA (>4·5 h after ischaemic stroke symptom onset). Numerous molecules which inhibit PAI-1 have been described, including antibodies, nanobodies, and small molecules.[71,72] Although promising results have been obtained in animal models, no PAI-1-inhibition molecule has been tested in patients with ischaemic stroke thus far. Boosting plasminogen activation has been shown to be achievable in rodents by injecting the soluble form of annexin A2 into the bloodstream. Annexin A2 forms complexes with both tPA and plasminogen, leading to an accelerated kinetics of plasmin formation. In a mouse model of cerebral ischaemia, both the fibrinolytic activity of tPA and its therapeutic window were increased by the injection of annexin A2.[73]

Another approach to increase efficacy of thrombolysis is to degrade thrombus constituents other than fibrin, which represents only a part of the thrombus volume. To test this approach, several predictive characteristics of the thrombus have been identified. For example, a higher proportion of red blood-cells in samples from retrieved thrombi is associated with an increased response to tPA and to improved clinical outcomes

Panel 2: Endovascular thrombectomy

The Mechanical Embolus Removal in Cerebral Ischaemia (MERCI) trial,[54] a prospective, single arm, multicentre study with 151 patients with large vessel stroke showed that a mechanical embolectomy device can safely restore vascular patency in patients presenting within 8 h of onset of an acute ischaemic stroke. More remarkably, this study showed a rate of recanalisation of 46% with the MERCI device alone, and 60·8% when combined with intra-arterial tissue-type plasminogen activator (tPA).[54] Despite these encouraging results, enthusiasm for the use of thrombectomy was temporarily diminished by the findings from several randomised controlled trials[55,56] that did not show improved efficacy of endovascular clot retrieval compared with intravenous tPA administration. However, important technical advances that allowed the use of new-generation stent-retriever devices led to several randomised controlled trials[53,57] that reported a consistent superiority of endovascular clot retrieval over standard medical care alone. Importantly, a post-hoc analysis[58] of 291 patients from two large multicentre prospective trials treated with mechanical thrombectomy or intravenous tPA, or both, found no benefit from intravenous thrombolysis in patients with acute ischaemic stroke undergoing mechanical thrombectomy. Finally, a multicentre, randomised, open-label study[59] with 206 patients who had occlusion of the intracranial internal carotid artery or proximal middle cerebral artery showed improved outcomes for disability at 90 days in patients with 6–24 h onset of symptoms treated with thrombectomy in addition to standard care (5 of whom were treated with tPA) compared with patients who received standard care alone (13 of whom received tPA).

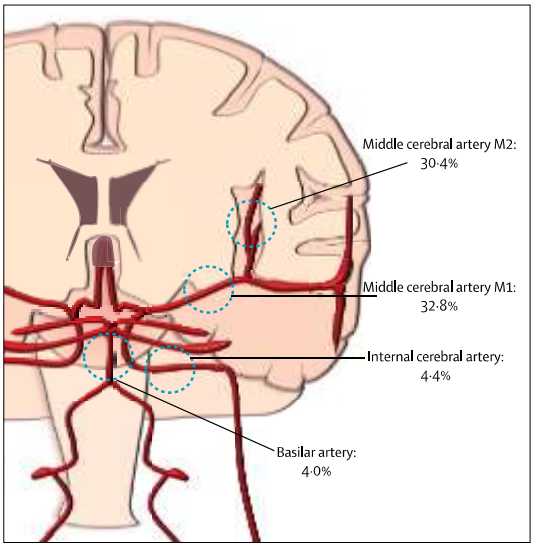


Figure 4: **Rates of tissue-type plasminogen activator-mediated recanalisation**
Rates of recanalisation within 2 h of tissue-type plasminogen activator (tPA) administration vary according to thrombus location. Data come from a review[62] of the Calgary Stroke Program (2002–09), which included 1341 patients with acute ischaemic stroke secondary to proximal vessel occlusions who received intravenous recombinant tPA. Acute rates of recanalisation were assessed using CT angiography. M1 and M2 are two of the four segments the middle cerebral artery is divided in.

compared with a lower proportion of red blood-cells.[74] Since red blood cell-rich thrombi modify the MRI signal (ie, presence of the susceptibility vessel sign), this biomarker enables the use of imaging for the prediction of tPA efficacy. Thrombi containing neutrophil extracellular traps—DNA extracellular networks produced by activated neutrophils—are also more resistant to mechanical or pharmacological reperfusion.[75] An analysis of 108 thrombi from patients with stroke found that neutrophil extracellular traps are present in all thrombi and might be responsible for reperfusion resistance.[75] Ex-vivo degradation of the thrombus is accelerated by the co-administration of tPA and DNase1. These findings have prompted a clinical trial of DNase1 (ClinicalTrials.gov, NCT02900833). The low efficacy of tPA on platelet-rich thrombi might also prevent recanalisation. However, clinical trials[76,77] investigating co-administration of tPA and an antiplatelet drug (eg, aspirin, anti-GpIIb/IIIa) showed low efficacy and increased bleeding risk. In animal studies,[78,79] platelet aggregation in arteries has been shown to involve specific receptors and proteins that are not essential for haemostasis in the brain, such as von Willebrand factor (VWF) and the glycoprotein GpIb-α. Therefore, strategies that specifically target platelet aggregates formed under conditions of arterial shear stress can induce arterial recanalisation without substantially increasing the risk of haemorrhagic transformation.[78] Thus, pharmacological strategies that target VWF with a disintegrin and metalloprotease with thrombospondin type-I motif, member-13 (ADAMTS-13)[80] or with N-acetylcysteine[81] are also promising, especially since intracranial thrombi in patients with stroke contain large amounts of VWF,[80] and low plasma concentrations of ADAMTS-13 might be a marker for unsuccessful treatment with tPA.[82]

Furthermore, clinical deterioration—possibly due to re-occlusion—occurs in at least 15% of patients treated with tPA. Thus, other strategies that aim to increase the speed of recanalisation and prevent re-occlusion to reduce the extent of infarction have been studied. In the ARTSS-2 randomised exploratory study[83] of 90 patients with stroke treated with tPA, adjunctive argatroban (a direct thrombin inhibitor) was not associated with an increased risk of symptomatic intracerebral haemorrhage. This finding provides the basis for a future efficacy trial combining tPA with an antigocoagulant.

tPA-mediated haemorrhagic transformation

A meta-analysis[84] of 27 trials with 10 239 patients with stroke treated with streptokinase, tPA, urokinase, or desmoteplase found a four-time increase in the incidence of symptomatic intracerebral haemorrhage among patients with stroke treated with any of these plasminogen activators. Remarkably, when these analyses were limited to 12 trials using tPA, there were 60 additional symptomatic intracerebral haemorrhages per 1000 treated patients. Symptomatic intracerebral haemorrhage has since been the most feared complication of tPA treatment, with a higher incidence within the first 24 h (median time ranging from 5 h to 10 h) than after 24 h, and almost 50% mortality.[85] In contrast to tPA, tenecteplase does not change the incidence of intracerebral haemorrhage.[66]

An international, multicentre, randomised, open-label trial[86] evaluated the incidence of symptomatic intracerebral haemorrhage and the clinical outcome in 3297 predominantly Asian patients with stroke treated within 4·5 h of the onset of symptoms with either low (0·6 mg/kg) or standard (0·9 mg/kg) doses of alteplase. This study showed a difference in haemorrhagic transformation between the low-dose group (1·0%) and the standard-dose group (2·1%), which indicates that the prevalence of haemorrhagic transformation is associated with the dose of tPA. Converesely, time-to-treatment is not significantly associated with haemorrhagic-transformation risk, according to a large meta-analysis.[87,88] By contrast, the TARGET-STROKE initiative reported in a study[89] of 71169 patients with acute ischaemic stroke treated with tPA that an intervention aiming to reduce the time-to-treatment delay also led to a reduction of the prevalence of haemorrhagic transformation.

Haemorrhagic transformation after tPA administration is a dynamic phenomenon, and its pathophysiology remains unclear. Indeed, animal studies have shown that tPA increases the permeability of the BBB through multiple mechanisms. For instance, tPA can bind to and cleave LRP1 at the astrocytic endfeet, resulting in BBB alterations.[90] The activation of platelet-derived growth factor-CC (PDGF-CC) by tPA in the brain has also been shown to lead to BBB leakage.[91] PDGF-CC plasma concentrations can be used to predict haemorrhagic transformation and severe cerebral oedema in patients with stroke treated with tPA.[92] A pilot study based on this finding has shown that imatinib (a PDGF-receptor inhibitor) might reduce the risk of haemorrhagic transformation in patients treated with tPA.[93]

tPA also induces the activation of matrix metalloproteinases (MMPs),[3] which are involved in the degradation of the extracellular matrix and in the promotion of BBB impairment. Results from an animal study[94] suggest that minocycline, a tetracycline antibiotic and an inhibitor of MMPs, prevents the increase in concentration of plasma MMP-9 associated with tPA administration in a rat model of thromboembolism. A minocycline dose-escalation study[95] (alone or in combination with tPA) was shown to be safe in 60 patients with ischaemic stroke. A meta-analysis of three studies[96] also reported that minocycline was safe, although statistically significant heterogeneity among the trials precludes conclusions about efficacy. Cytokines and growth factors could also counteract tPA-mediated haemorrhagic transformation. However, animal studies of granulocyte-colony stimulating factor have reported conflicting findings that the factor,

co-administrated with tPA during the acute phase of stroke, either protects against haemorrhagic transformation caused by delayed tPA treatment[97] or increases risk of haemorrhagic transformation.[98]

Brain oedema and mortality after tPA treatment

Several studies suggest an increased risk of early mortality with tPA treatment, especially as onset-to-treatment delay increases. In the IST-3 trial,[99] the mortality of tPA-treated patients increased by 60% in the first 7 days, compared with controls. This finding cannot be explained solely by the increase in haemorrhagic transformation[100] and suggests that other mechanisms might be at play. Notably, the prevalence of fatal brain oedema in the IST-3 trial increased in tPA-treated patients with stroke compared with controls, with an odds ratio of 1·89 (95% CI 1·14–3·14).[99] This finding was supported by the case-control ICARO study[101] of 506 patients with occlusion of the internal carotid artery, among whom the prevalence of fatal symptomatic brain oedema was 8·3% in 253 tPA-treated patients versus 3·1% in 253 controls. By comparison, the prevalence of fatal haemorrhagic transformation was only 2·8% in tPA-treated patients, suggesting that the contribution of symptomatic brain oedema to mortality could be greater than haemorrhagic transformation in this subset of patients with occlusion of a proximal artery. By contrast, other trials (ECASS-3,[61] for instance) reported a reduction in prevalence of symptomatic brain oedema after tPA treatment. These discrepancies between studies suggest that tPA has both pro-oedema and anti-oedema effects in patients with acute ischaemic stroke, with the anti-oedema effects being probably associated with the capacity of tPA to promote reperfusion and alleviate ischaemic damage.

The mechanisms by which tPA promotes infarct swelling remain poorly understood, although tPA promoted brain oedema in a mouse model of ischaemic stroke through activation of the contact phase,[102] which is a biochemical cascade responsible for the generation of bradykinin (a short pro-inflammatory peptide that increases vascular permeability). Furthermore, plasmatic concentration of bradykinin is increased in patients with ischaemic stroke after tPA administration.[103] It is believed that tPA-mediated generation of plasmin activates factor XII (a blood coagulation factor), which can in turn activate plasma kallikrein, the main enzyme responsible for bradykinin generation by cleavage of its precursor (ie, high molecular-weight kininogen).[102] Therefore, factor XII, plasma kallikrein, or bradykinin receptors are all potential therapeutic targets to prevent tPA-induced infarct swelling.[104] These clinical and animal data demonstrate that the effect of tPA administration in patients with stroke is not limited to the degradation of the fibrin clot. The diversity of effects offers the opportunity to improve the safety and efficacy of tPA treatment.

Haemorrhagic stroke

Haemorrhage is a devastating form of stroke, as it is associated with high mortality and long-term disability. Spontaneous haemorrhagic strokes are usually divided into intracerebral haemorrhage and subarachnoid haemorrhage, both of which are potentially associated with intraventricular haemorrhage.[105] In patients with haemorrhagic stroke, the mass effect of the haematoma and—in the case of subarachnoid or intraventricular bleeding—the interruption of CSF circulation are responsible for an increase in intracranial pressure and high mortality. Plasminogen activators could be used to mitigate the deleterious consequences of intracranial bleeding by promoting the dissolution of the haematoma and restoring CSF circulation.

Intracerebral haematoma

Intracerebral haemorrhage is characterised by parenchymal bleeding and accounts for approximately 10% of all strokes.[105] Since haematoma volume is a key prognostic factor after intracerebral haemorrhage, the development of surgical procedures for the evacuation of the haematoma is an ongoing effort. Open surgical evacuation of supratentorial haematoma—one of the first strategies to have been developed—has not shown any benefit in large clinical trials,[106] possibly because it is associated with iatrogenic tissue injury during surgery. Simple aspiration has been abandoned because it could only remove small amounts of the coagulated blood. To overcome this limitation, stereotactic aspiration of the liquefied haematoma after in-situ instillation of plasminogen activators has been investigated. The phase 2 MISTIE 2 trial[107] randomly assigned 96 patients to either standard care or minimally invasive haematoma aspiration using tPA instillation after documented interruption of haematoma growth. The trial confirmed the safety of thrombolytic aspiration despite an increased risk of asymptomatic bleeding in the treated group. When adjusted to baseline severity, the increase in the proportion of patients achieving a good outcome was significant, but these results should be interpreted with caution since this trial was not powered to show efficacy.[107] A phase 3 trial is ongoing (MISTIE 3; ClinicalTrials.gov, NCT01827046) and the results are expected soon.

During minimally invasive drainage of intracerebral haemorrhage, a potential concern is the effect of in situ instilled tPA on and around the BBB. In a porcine model of intracerebral haemorrhage,[108] in-situ fibrinolytic therapy with tPA without aspiration was associated with an increase in the perihaematomal oedema, as measured by MRI. In another study in pigs, this effect was mitigated by the co-administration of dizocilpine (MK-801), suggesting an NMDAR-dependent mechanism.[109] Accordingly, administration of PAI-1 reduces cerebral oedema following tPA treatment in the same model.[110] This noxious effect of tPA was confirmed in a rat model of intracerebral haemorrhage,[111] in which

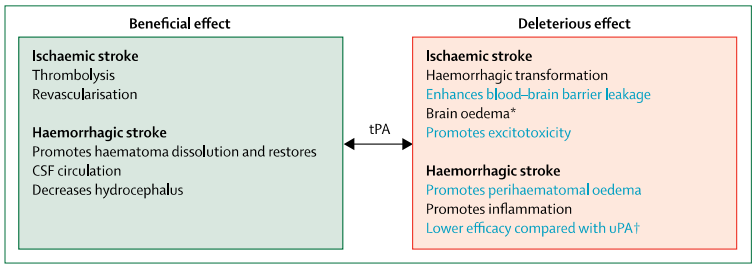


Figure 5: **Effects of tissue-type plasminogen activator in ischaemic and haemorrhagic stroke**
Beneficial[17,114,116,121] (green box) and deleterious[17,30,85,90,91,99,101,102,108,114,119,122] (red box) effects of tPA in both ischaemic and haemorrhagic stroke. Effects shown in clinical studies are indicated in black, and effects shown in animal models are indicated in blue. tPA=tissue-type plasminogen activator. uPA=urokinase plasminogen activator. *It is unclear whether brain oedema is present following thrombolysis by tPA in humans. †A preclinical study[114] has shown that uPA is better than tPA for the fibrinolysis of intraventricular haemorrhage.

administration of optimised tPA (an engineered non-proneurotoxic tPA variant) decreased perihaematomal neuronal death and subsequent oedema progression compared with administration of tPA. These animal data are contradicted by a secondary analysis of the MISTIE 2 trial,[112] which shows that instillation of tPA combined with stereotactic aspiration significantly reduces perihaematomal oedema. Moreover, a retrospective study[113] reported that uPA and tPA present similar efficacy and safety profiles for the drainage of basal ganglia haematoma, even though animal studies of uPA have not shown the same pro-excitotoxic effects as tPA.[114] Thus, there is no clinical evidence supporting a neurotoxic role for tPA in patients with intracerebral haemorrhage.

Intracerebral haemorrhage associated with intraventricular haemorrhage

Extension of haemorrhage to the ventricles occurs in approximately 25% of cases of non-traumatic intracerebral haemorrhage and promotes the obstruction of CSF outflow and, hence, the development of hydrocephalus.[115] Thus, intraventricular administration of plasminogen activators could prevent obstruction of the flow of CSF and accelerate clearance of the intraventricular blood. The phase 2 CLEAR IVH trial[116] in 48 patients reported preliminary results for safety and clot removal efficacy of recombinant tPA compared with placebo, which prompted the CLEAR 3 trial.[117] In this phase 3 trial, 500 patients were randomly assigned to thrombolytic removal of intraventricular haemorrhage using either alteplase or placement of an extraventricular drain. The proportion of patients in the alteplase group (117 [48%] of 246) who achieved good functional outcome was similar to the placebo group (110 [45%] of 245) at 6 months (risk ratio 1·06, 95% CI 0·88–1·28; p=0·554). The mortality rate was lower in the tPA group (46 [18%]) than in the placebo group (73 [29%]), but patients had higher disability rates in the tPA group (42 [17%]) than in the placebo group (21 [9%]).[117] Greater intraventricular clot removal was associated with improved outcome, but only 82 patients (33%) in the tPA group reached the objective of 80% clot dissolution (as assessed by CT scan), which might have reduced the clinical benefit of intraventricular thrombolysis. A randomised trial of 87 patients,[118] which investigated the efficacy of a strategy that combined intraventricular fibrinolysis with lumbar drain versus intraventricular fibrinolysis alone, showed that dual therapy significantly reduced the occurrence of permanent shunt dependency for post-intracerebral-haemorrhage hydrocephalus. Overall, these results suggest that there is still room to improve the intraventricular thrombolysis procedure in patients with intraventricular haemorrhage.

Another explanation for the neutral results of the CLEAR 3 study could be related to side-effects of tPA. Indeed, a mouse study[114] investigated drainage of intraventricular haematoma using tPA compared with uPA and reported that, although both fibrinolytics reduced hydrocephalus, only uPA improved functional recovery significantly, confirming the results of a meta-analysis[115] of intraventricular fibrinolysis in patients with intraventricular haemorrhage that found an improved clinical efficacy of uPA compared with tPA. These results could be explained by the fact that tPA promotes inflammation after intraventricular injection in both mice[114] and humans.[119] We cannot exclude that direct detrimental effects of tPA on the BBB are masked by the beneficial effects of haematoma drainage.

Subarachnoid haemorrhage

Besides restoring CSF outflow, the main aim of fibrinolytics as a potential therapy for subarachnoid haemorrhage is to reduce the risk and occurrence of delayed cerebral ischaemia by accelerating blood clearance from the subarachnoid space. A meta-analysis of 652 patients[120] that included predominantly non-randomised studies suggests a significant beneficial effect of intracisternal fibrinolysis in patients with subarachnoid haemorrhage. It has also been shown in a phase 2 randomised trial of 60 patients[121] that intraventricular fibrinolysis in combination with low-frequency head-rotation is a safe and effective way to accelerate haematoma clearance, although the prevalence of delayed cerebral ischaemia was not significantly reduced and functional outcome was not significantly improved. A phase 3 trial to study the efficacy of intraventricular fibrinolysis using tPA in subarachnoid haemorrhage is ongoing (ClinicalTrials.gov, NCT03187405). A small randomised study of 6 patients[122] showed that intraventricular tPA administration produces a transient local inflammatory response, which correlates with the degree of fibrinolysis, raising the possibility that the release of haematoma breakdown products, rather than tPA itself, is responsible for the pro-inflammatory effects. Overall, while plasminogen activators seem to have an acceptable safety profile to accelerate the clearance of intracranial haematoma in

Search strategy and selection criteria

We searched PubMed for all indexed articles published from Jan 1, 2013, to Aug 1, 2018, with the terms ("tPA" OR "uPA") AND ("ischemic stroke" OR "haemorrhagic stroke"). We included only articles published in English. Titles and abstracts were screened, and relevant papers were selected for detailed assessment. The bibliographies of the selected articles were also screened for additional sources. Whenever possible, priority was given to articles published in the past 5 years, except for landmark and historical papers or clinical trials. Additionally, the ClinicalTrials.gov database was screened to include ongoing trials regarding use of plasminogen activators in ischaemic or haemorrhagic stroke, with a specific focus on phases 3 and 4 trials.

some subtypes of haemorrhagic stroke, their efficacy remains uncertain.

Conclusions and future directions

Endovascular thrombectomy has revolutionised the treatment of patients presenting with occlusion of a proximal intracranial artery. The positive results of endovascular thrombectomy in patients presenting up to 24 h after stroke onset indicate that, if safe, recanalisation can still be beneficial in patients who meet the treatment criteria.[1,2,59] However, reperfusion of smaller arteries is not easily achievable, and many patients remain ineligible for reperfusion therapies. Thus, pharmacological thrombolytic strategies remain relevant for the treatment of patients with ischaemic stroke. The mismatch between the therapeutic windows of endovascular thrombectomy and tPA could reflect the deleterious effects of tPA on the neurovascular unit (figure 5). These deleterious effects should stimulate the development of safer thrombolytic strategies, with increased reperfusion. To this aim, further understanding of the biological effects of tPA on the neurovascular unit is necessary.

In haemorrhagic stroke, large clinical trials[116–118] showed that the use of tPA in intraventricular haemorrhage only slightly reduced mortality (figure 5). Based on the available information, these results are not directly attributed to the deleterious effects of in situ-instilled plasminogen activators on the neurovascular unit. However, consistent results in intraventricular haemorrhage and subarachnoid haemorrhage indicate that tPA could have a pro-inflammatory effect once injected in the ventricles, which might attenuate the beneficial effects of haematoma drainage. Further investigations into the mechanisms underlying this pro-inflammatory effect are needed to design safer thrombolytic strategies. Moreover, refinement of surgical techniques could also improve the efficacy of plasminogen activators to clear intracranial haematoma, especially in patients with intraventricular haemorrhage, in whom greater haematoma clearance is associated with improved functional outcome.

Contributors

All authors contributed equally to literature searches and to drafting and correcting the manuscript.

Declaration of interests

DV holds patents but does not receive royalties on Optimised tPA (licensed US9249406 B2), on Glunomab (issued PCT/WO2014187879) and on the TAFIa/PAI-1 diabody (licensed GB1404879). All other authors declare no competing interests.

Acknowledgments

We thank Thomas Gaberel (Caen University Hospital and INSERM U1237) for sharing his expertise on haemorrhagic stroke.

References

1 Powers WJ, Rabinstein AA, Ackerson T, et al, and the American Heart Association Stroke Council. 2018 guidelines for the early management of patients with acute ischemic stroke: a guideline for healthcare professionals from the American Heart Association/American Stroke Association. *Stroke* 2018; **49:** e46–110.

2 Thomalla G, Simonsen CZ, Boutitie F, et al, and the WAKE-UP Investigators. MRI-guided thrombolysis for stroke with unknown time of onset. *N Engl J Med* 2018; **379:** 611–22.

3 Yepes M, Sandkvist M, Moore EG, Bugge TH, Strickland DK, Lawrence DA. Tissue-type plasminogen activator induces opening of the blood-brain barrier via the LDL receptor-related protein. *J Clin Invest* 2003; **112:** 1533–40.

4 Jeanneret V, Wu F, Merino P, et al. Tissue-type plasminogen activator (tPA) modulates the postsynaptic response of cerebral cortical neurons to the presynaptic release of glutamate. *Front Mol Neurosci* 2016; **9:** 121.

5 Ziai WC, Tuhrim S, Lane K, et al. A multicenter, randomized, double-blinded, placebo-controlled phase III study of Clot Lysis Evaluation of Accelerated Resolution of Intraventricular Hemorrhage (CLEAR III). *Int J Stroke* 2014; **9:** 536–42

6 Appella E, Robinson EA, Ullrich SJ, et al. The receptor-binding sequence of urokinase. A biological function for the growth-factor module of proteases. *J Biol Chem* 1987; **262:** 4437–40.

7 Dent MA, Sumi Y, Morris RJ, Seeley PJ. Urokinase-type plasminogen activator expression by neurons and oligodendrocytes during process outgrowth in developing rat brain. *Eur J Neurosci* 1993; **5:** 633–47.

8 Lahtinen L, Lukasiuk K, Pitkänen A. Increased expression and activity of urokinase-type plasminogen activator during epileptogenesis. *Eur J Neurosci* 2006; **24:** 1935–45.

9 Schmitt M, Goretzki L, Jänicke F, et al. Biological and clinical relevance of the urokinase-type plasminogen activator (uPA) in breast cancer. *Biomed Biochim Acta* 1991; **50:** 731–41.

10 Semina E, Rubina K, Sysoeva V, et al. Urokinase and urokinase receptor participate in regulation of neuronal migration, axon growth and branching. *Eur J Cell Biol* 2016; **95:** 295–310.

11 Diaz A, Merino P, Manrique LG, et al. A cross talk between neuronal urokinase-type plasminogen activator (uPA) and astrocytic uPA receptor (uPAR) promotes astrocytic activation and synaptic recovery in the ischemic brain. *J Neurosci* 2017; **37:** 10310–22.

12 Merino P, Diaz A, Manrique LG, Cheng L, Yepes M. Urokinase-type plasminogen activator (uPA) promotes ezrin-mediated reorganization of the synaptic cytoskeleton in the ischemic brain. *J Biol Chem* 2018; **293:** 9234–47.

13 Persson M, Östling G, Smith G, et al. Soluble urokinase plasminogen activator receptor: a risk factor for carotid plaque, stroke, and coronary artery disease. *Stroke* 2014; **45:** 18–23.

14 Onatsu J, Taina M, Mustonen P, et al. Soluble urokinase-type plasminogen activator receptor predicts all-cause 5-year mortality in ischemic stroke and TIA. *In Vivo* 2017; **31:** 381–86.

15 Nagai N, Okada K, Kawao N, et al. Urokinase-type plasminogen activator receptor (uPAR) augments brain damage in a murine model of ischemic stroke. *Neurosci Lett* 2008; **432:** 46–49.

16 Wu F, Catano M, Echeverry R, et al. Urokinase-type plasminogen activator promotes dendritic spine recovery and improves neurological outcome following ischemic stroke. *J Neurosci* 2014; **34:** 14219–32.

17 National Institute of Neurological Disorders and Stroke rt-PA Stroke Study Group. Tissue plasminogen activator for acute ischemic stroke. *N Engl J Med* 1995; **333:** 1581–87.

18 Adivitiya, Khasa YP. The evolution of recombinant thrombolytics: current status and future directions. *Bioengineered* 2017; **8:** 331–358.

19 European Myocardial Infarction Project Group. Prehospital thrombolytic therapy in patients with suspected acute myocardial infarction. *N Engl J Med* 1993; **329:** 383–89.

20 Medcalf RL. Fibrinolysis: from blood to the brain. *J Thromb Haemost* 2017; **15:** 2089–98.

21 Rijken DC, Hoylaerts M, Collen D. Fibrinolytic properties of one-chain and two-chain human extrinsic (tissue-type) plasminogen activator. *J Biol Chem* 1982; **257:** 2920–25.

22 Parcq J, Bertrand T, Montagne A, et al. Unveiling an exceptional zymogen: the single-chain form of tPA is a selective activator of NMDA receptor-dependent signaling and neurotoxicity. *Cell Death Differ* 2012; **19:** 1983–91.

23 Angles-Cano E, Balaton A, Le Bonniec B, Genot E, Elion J, Sultan Y. Production of monoclonal antibodies to the high fibrin-affinity, tissue-type plasminogen activator of human plasma. Demonstration of its endothelial origin by immunolocalization. *Blood* 1985; **66:** 913–20.

24 Louessard M, Lacroix A, Martineau M, et al. Tissue plasminogen activator expression is restricted to subsets of excitatory pyramidal glutamatergic neurons. *Mol Neurobiol* 2016; **53:** 5000–12.

25 Correa F, Gauberti M, Parcq J, et al. Tissue plasminogen activator prevents white matter damage following stroke. *J Exp Med* 2011; **208:** 1229–42.

26 Lochner JE, Honigman LS, Grant WF, et al. Activity-dependent release of tissue plasminogen activator from the dendritic spines of hippocampal neurons revealed by live-cell imaging. *J Neurobiol* 2006; **66:** 564–77.

27 Cassé F, Bardou I, Danglot L, et al. Glutamate controls tPA recycling by astrocytes, which in turn influences glutamatergic signals. *J Neurosci* 2012; **32:** 5186–99.

28 Seeds NW, Basham ME, Haffke SP. Neuronal migration is retarded in mice lacking the tissue plasminogen activator gene. *Proc Natl Acad Sci USA* 1999; **96:** 14118–23.

29 Lee SH, Ko HM, Kwon KJ, et al. tPA regulates neurite outgrowth by phosphorylation of LRP5/6 in neural progenitor cells. *Mol Neurobiol* 2014; **49:** 199–215.

30 Nicole O, Docagne F, Ali C, et al. The proteolytic activity of tissue-plasminogen activator enhances NMDA receptor-mediated signaling. *Nat Med* 2001; **7:** 59–64.

31 Baranes D, Lederfein D, Huang YY, Chen M, Bailey CH, Kandel ER. Tissue plasminogen activator contributes to the late phase of LTP and to synaptic growth in the hippocampal mossy fiber pathway. *Neuron* 1998; **21:** 813–25.

32 Pang PT, Teng HK, Zaitsev E, et al. Cleavage of proBDNF by tPA/plasmin is essential for long-term hippocampal plasticity. *Science* 2004; **306:** 487–91.

33 Su EJ, Fredriksson L, Schielke GP, Eriksson U, Lawrence DA, and the Su EJ1. Tissue plasminogen activator-mediated PDGF signaling and neurovascular coupling in stroke. *J Thromb Haemost* 2009; **7** (suppl 1): 155–58.

34 Pawlak R, Magarinos AM, Melchor J, McEwen B, Strickland S. Tissue plasminogen activator in the amygdala is critical for stress-induced anxiety-like behavior. *Nat Neurosci* 2003; **6:** 168–74.

35 Wu F, Wu J, Nicholson AD, et al. Tissue-type plasminogen activator regulates the neuronal uptake of glucose in the ischemic brain. *J Neurosci* 2012; **32:** 9848–58.

36 Wu F, Echeverry R, Wu J, et al. Tissue-type plasminogen activator protects neurons from excitotoxin-induced cell death via activation of the ERK1/2-CREB-ATF3 signaling pathway. *Mol Cell Neurosci* 2013; **52:** 9–19.

37 Mantuano E, Lam MS, Gonias SL. LRP1 assembles unique co-receptor systems to initiate cell signaling in response to tissue-type plasminogen activator and myelin-associated glycoprotein. *J Biol Chem* 2013; **288:** 34009–18.

38 Samson AL, Nevin ST, Croucher D, et al. Tissue-type plasminogen activator requires a co-receptor to enhance NMDA receptor function. *J Neurochem* 2008; **107:** 1091–101.

39 Bertrand T, Lesept F, Chevilley A, et al. Conformations of tissue plasminogen activator (tPA) orchestrate neuronal survival by a crosstalk between EGFR and NMDAR. *Cell Death Dis* 2015; **6:** e1924.

40 Echeverry R, Wu J, Haile WB, Guzman J, Yepes M. Tissue-type plasminogen activator is a neuroprotectant in the mouse hippocampus. *J Clin Invest* 2010; **120:** 2194–205.

41 Louessard M, Bardou I, Lemarchand E, et al. Activation of cell surface GRP78 decreases endoplasmic reticulum stress and neuronal death. *Cell Death Differ* 2017; **24:** 1518–29.

42 Tsirka SE, Gualandris A, Amaral DG, Strickland S. Excitotoxin-induced neuronal degeneration and seizure are mediated by tissue plasminogen activator. *Nature* 1995; **377:** 340–44.

43 Matys T, Strickland S. Tissue plasminogen activator and NMDA receptor cleavage. *Nat Med* 2003; **9:** 371–72.

44 Jeanneret V, Ospina JP, Diaz A, et al. Tissue-type plasminogen activator protects the postsynaptic density in the ischemic brain. *J Cereb Blood Flow Metab* 2018; published online March 16. DOI:10.1177/0271678X18764495 (preprint).

45 Zhang L, Zhang ZG, Buller B, et al. Combination treatment with VELCADE and low-dose tissue plasminogen activator provides potent neuroprotection in aged rats after embolic focal ischemia. *Stroke* 2010; **41:** 1001–07.

46 Grummisch JA, Jadavji NM, Smith PD. tPA promotes cortical neuron survival via mTOR-dependent mechanisms. *Mol Cell Neurosci* 2016; **74:** 25–33.

47 Macrez R, Obiang P, Gauberti M, et al. Antibodies preventing the interaction of tissue-type plasminogen activator with N-methyl-D-aspartate receptors reduce stroke damages and extend the therapeutic window of thrombolysis. *Stroke* 2011; **42:** 2315–22.

48 Macrez R, Ortega MC, Bardou I, et al. Neuroendothelial NMDA receptors as therapeutic targets in experimental autoimmune encephalomyelitis. *Brain* 2016; **139:** 2406–19.

49 Alvarez V, Rossetti AO, Papavasileiou V, Michel P. Acute seizures in acute ischemic stroke: does thrombolysis have a role to play? *J Neurol* 2013; **260:** 55–61.

50 Keller L, Hobohm C, Zeynalova S, Classen J, Baum P. Does treatment with t-PA increase the risk of developing epilepsy after stroke? *J Neurol* 2015; **262:** 2364–72.

51 Lekoubou A, Awoumou JJ, Kengne AP. Incidence of seizure in stroke patients treated with recombinant tissue plasminogen activator: a systematic review and meta-analysis. *Int J Stroke* 2017; **12:** 923–31.

52 Leys D, Hommet Y, Jacquet C, et al, and the OPHELIE investigators and the STROKAVENIR network. Proportion of single-chain recombinant tissue plasminogen activator and outcome after stroke. *Neurology* 2016; **87:** 2416–26.

53 Berkhemer OA, Fransen PS, Beumer D, et al, and the MR CLEAN Investigators. A randomized trial of intraarterial treatment for acute ischemic stroke. *N Engl J Med* 2015; **372:** 11–20.

54 Smith WS, Sung G, Saver J, et al. Mechanical thrombectomy for acute ischemic stroke: final results of the Multi MERCI trial. *Stroke* 2008; **39:** 1205–12.

55 Broderick JP, Palesch YY, Demchuk AM, et al. Endovascular therapy after intravenous t-PA versus t-PA alone for stroke. *N Engl J Med* 2013; **368:** 893–903.

56 Ciccone A, Valvassori L. Endovascular treatment for acute ischemic stroke. *N Engl J Med* 2013; **368:** 2433–34.

57 Jovin TG, Chamorro A, Cobo E, et al. Thrombectomy within 8 hours after symptom onset in ischemic stroke. *N Engl J Med* 2015; **372:** 2296–306.

58 Coutinho JM, Liebeskind DS, Slater LA, et al. Combined intravenous thrombolysis and thrombectomy vs thrombectomy alone for acute ischemic stroke: a pooled analysis of the SWIFT and STAR studies. *JAMA Neurol* 2017; **74:** 268–74.

59 Nogueira RG, Jadhav AP, Haussen DC, et al. Thrombectomy 6 to 24 hours after stroke with a mismatch between deficit and infarct. *N Engl J Med* 2018; **378:** 11–21.

60 Wardlaw JM, Murray V, Berge E, del Zoppo GJ. Thrombolysis for acute ischaemic stroke. *Cochrane Database Syst Rev* 2014; **7:** CD000213.

61 Hacke W, Kaste M, Bluhmki E, et al, and the ECASS Investigators. Thrombolysis with alteplase 3 to 4.5 hours after acute ischemic stroke. *N Engl J Med* 2008; **359:** 1317–29.

62 Bhatia R, Hill MD, Shobha N, et al. Low rates of acute recanalization with intravenous recombinant tissue plasminogen activator in ischemic stroke: real-world experience and a call for action. *Stroke* 2010; **41:** 2254–58.

63 Mair G, von Kummer R, Adami A, et al, and the IST-3 Collaborative Group. Arterial Obstruction on Computed Tomographic or Magnetic Resonance Angiography and Response to Intravenous Thrombolytics in Ischemic Stroke. *Stroke* 2017; **48:** 353–60.

64 Riedel CH, Zimmermann P, Jensen-Kondering U, Stingele R, Deuschl G, Jansen O. The importance of size: successful recanalization by intravenous thrombolysis in acute anterior stroke depends on thrombus length. *Stroke* 2011; **42:** 1775–77.

65 Logallo N, Novotny V, Assmus J, et al. Tenecteplase versus alteplase for management of acute ischaemic stroke (NOR-TEST): a phase 3, randomised, open-label, blinded endpoint trial. *Lancet Neurol* 2017; **16:** 781–88.

66 Campbell BCV, Mitchell PJ, Churilov L, et al, and the EXTEND-IA TNK Investigators. Tenecteplase versus Alteplase before Thrombectomy for Ischemic Stroke. *N Engl J Med* 2018; **378:** 1573–82.

67 Wyseure T, Rubio M, Denorme F, et al. Innovative thrombolytic strategy using a heterodimer diabody against TAFI and PAI-1 in mouse models of thrombosis and stroke. *Blood* 2015; **125:** 1325–32.

68 Brouns R, Heylen E, Willemse JL, et al. The decrease in procarboxypeptidase U (TAFI) concentration in acute ischemic stroke correlates with stroke severity, evolution and outcome. *J Thromb Haemost* 2010; **8:** 75–80.

69 Alessi MC, Gaudin C, Grosjean P, et al. Changes in activated thrombin-activatable fibrinolysis inhibitor levels following thrombolytic therapy in ischemic stroke patients correlate with clinical outcome. *Cerebrovasc Dis* 2016; **42:** 404–14.

70 Fernandez-Cadenas I, Alvarez-Sabin J, Ribo M, et al. Influence of thrombin-activatable fibrinolysis inhibitor and plasminogen activator inhibitor-1 gene polymorphisms on tissue-type plasminogen activator-induced recanalization in ischemic stroke patients. *J Thromb Haemost* 2007; **5:** 1862–68.

71 Denorme F, Wyseure T, Peeters M, et al. Inhibition of Thrombin-Activatable Fibrinolysis Inhibitor and Plasminogen Activator Inhibitor-1 Reduces Ischemic Brain Damage in Mice. *Stroke* 2016; **47:** 2419–22.

72 Vaughan DE. PAI-1 antagonists: the promise and the peril. *Trans Am Clin Climatol Assoc* 2011; **122:** 312–25.

73 Zhu H, Fan X, Yu Z, et al. Annexin A2 combined with low-dose tPA improves thrombolytic therapy in a rat model of focal embolic stroke. *J Cereb Blood Flow Metab* 2010; **30:** 1137–46.

74 Choi MH, Park GH, Lee JS, et al. Erythrocyte fraction within retrieved thrombi contributes to thrombolytic response in acute ischemic stroke. *Stroke* 2018; **49:** 652–59.

75 Ducroux C, Di Meglio L, Loyau S, et al. Thrombus neutrophil extracellular traps content impair tPA-Induced thrombolysis in acute ischaemic stroke. *Stroke* 2018; **49:** 754–57.

76 Zinkstok SM, Roos YB, and the ARTIS investigators. Early administration of aspirin in patients treated with alteplase for acute ischaemic stroke: a randomised controlled trial. *Lancet* 2012; **380:** 731–37.

77 Adams HP Jr, Effron MB, Torner J, et al. Emergency administration of abciximab for treatment of patients with acute ischemic stroke: results of an international phase III trial: Abciximab in Emergency Treatment of Stroke Trial (AbESTT-II). *Stroke* 2008; **39:** 87–99.

78 Le Behot A, Gauberti M, Martinez De Lizarrondo S, et al. GpIbα-VWF blockade restores vessel patency by dissolving platelet aggregates formed under very high shear rate in mice. *Blood* 2014; **123:** 3354–63.

79 Momi S, Tantucci M, Van Roy M, Ulrichts H, Ricci G, Gresele P. Reperfusion of cerebral artery thrombosis by the GPIb-VWF blockade with the Nanobody ALX-0081 reduces brain infarct size in guinea pigs. *Blood* 2013; **121:** 5088–97.

80 Denorme F, Langhauser F, Desender L, et al. ADAMTS13-mediated thrombolysis of t-PA-resistant occlusions in ischemic stroke in mice. *Blood* 2016; **127:** 2337–45.

81 Martinez de Lizarrondo S, Gakuba C, Herbig BA, et al. Potent thrombolytic effect of *N*-Acetylcysteine on arterial thrombi. *Circulation* 2017; **136:** 646–60.

82 Bustamante A, Ning M, García-Berrocoso T, et al. Usefulness of ADAMTS13 to predict response to recanalization therapies in acute ischemic stroke. *Neurology* 2018; **90:** e995–1004.

83 Barreto AD, Ford GA, Shen L, et al, and the ARTSS-2 Investigators. Randomized, multicenter trial of ARTSS-2 (argatroban with recombinant tissue plasminogen activator for acute stroke). *Stroke* 2017; **48:** 1608–16.

84 Wardlaw JM. Overview of Cochrane thrombolysis meta-analysis. *Neurology* 2001; **57:** S69-76.

85 Yaghi S, Willey JZ, Cucchiara B, et al. Treatment and outcome of hemorrhagic transformation after intravenous alteplase in acute ischemic stroke: a scientific statement for healthcare professionals from the American Heart Association/American Stroke Association. *Stroke* 2017; **48:** e343–61.

86 Anderson CS, Robinson T, Lindley RI, et al. Low-dose versus standard-dose intravenous alteplase in acute ischemic stroke. *N Engl J Med* 2016; **374:** 2313–23.

87 Messé SR, Pervez MA, Smith EE, et al. Lipid profile, lipid-lowering medications, and intracerebral hemorrhage after tPA in get with the guidelines-stroke. *Stroke* 2013; **44:** 1354–59.

88 Demchuk AM, Dowlatshahi D, Rodriguez-Luna D, et al. Prediction of haematoma growth and outcome in patients with intracerebral haemorrhage using the CT-angiography spot sign (PREDICT): a prospective observational study *Lancet Neurol* 2012; **11:** 307–14.

89 Fonarow GC, Zhao X, Smith EE, et al. Door-to-needle times for tissue plasminogen activator administration and clinical outcomes in acute ischemic stroke before and after a quality improvement initiative. *JAMA* 2014; **311:** 1632–40.

90 An J, Zhang C, Polavarapu R, Zhang X, Zhang X, Yepes M. Tissue-type plasminogen activator and the low-density lipoprotein receptor-related protein induce Akt phosphorylation in the ischemic brain. *Blood* 2008; **112:** 2787–94.

91 Su EJ, Fredriksson L, Geyer M, et al. Activation of PDGF-CC by tissue plasminogen activator impairs blood-brain barrier integrity during ischemic stroke. *Nat Med* 2008; **14:** 731–37.

92 Rodríguez-González R, Blanco M, Rodríguez-Yáñez M, Moldes O, Castillo J, Sobrino T. Platelet derived growth factor-CC isoform is associated with hemorrhagic transformation in ischemic stroke patients treated with tissue plasminogen activator. *Atherosclerosis* 2013; **226:** 165–71.

93 Wahlgren N, Thorén M, Höjeberg B, et al. Randomized assessment of imatinib in patients with acute ischaemic stroke treated with intravenous thrombolysis. *J Intern Med* 2017; **281:** 273–83.

94 Murata Y, Rosell A, Scannevin RH, Rhodes KJ, Wang X, Lo EH. Extension of the thrombolytic time window with minocycline in experimental stroke. *Stroke* 2008; **39:** 3372–77.

95 Fagan SC, Waller JL, Nichols FT, et al. Minocycline to improve neurologic outcome in stroke (MINOS): a dose-finding study. *Stroke* 2010; **41:** 2283–87.

96 Kohler E, Prentice DA, Bates TR, et al. Intravenous minocycline in acute stroke: a randomized, controlled pilot study and meta-analysis. *Stroke* 2013; **44:** 2493–99.

97 dela Peña IC, Yoo A, Tajiri N, et al. Granulocyte colony-stimulating factor attenuates delayed tPA-induced hemorrhagic transformation in ischemic stroke rats by enhancing angiogenesis and vasculogenesis. *J Cereb Blood Flow Metab* 2015; **35:** 338–46.

98 Gautier S, Ouk T, Tagzirt M, et al. Impact of the neutrophil response to granulocyte colony-stimulating factor on the risk of hemorrhage when used in combination with tissue plasminogen activator during the acute phase of experimental stroke. *J Neuroinflammation* 2014; **11:** 96.

99 Sandercock P, Wardlaw JM, Lindley RI, et al, and the IST-3 collaborative group. The benefits and harms of intravenous thrombolysis with recombinant tissue plasminogen activator within 6 h of acute ischaemic stroke (the third international stroke trial [IST-3]): a randomised controlled trial. *Lancet* 2012; **379:** 2352–63.

100 Lees KR, Bluhmki E, von Kummer R, et al. Time to treatment with intravenous alteplase and outcome in stroke: an updated pooled analysis of ECASS, ATLANTIS, NINDS, and EPITHET trials. *Lancet* 2010; **375:** 1695–703.

101 Paciaroni M, Balucani C, Agnelli G, et al. Systemic thrombolysis in patients with acute ischemic stroke and Internal Carotid ARtery Occlusion: the ICARO study. *Stroke* 2012; **43:** 125–30.

102 Simão F, Ustunkaya T, Clermont AC, Feener EP. Plasma kallikrein mediates brain hemorrhage and edema caused by tissue plasminogen activator therapy in mice after stroke. *Blood* 2017; **129:** 2280–90.

103 Marcos-Contreras OA, Martinez de Lizarrondo S, Bardou I, et al. Hyperfibrinolysis increases blood-brain barrier permeability by a plasmin- and bradykinin-dependent mechanism. *Blood* 2016; **128:** 2423–34.

104 Gauberti M, Potzeha F, Vivien D, Martinez de Lizarrondo S. Impact of Bradykinin Generation During Thrombolysis in Ischemic Stroke. *Front Med (Lausanne)* 2018; **5:** 195.

105 Sonni S, Lioutas VA, Selim MH. New avenues for treatment of intracranial hemorrhage. *Curr Treat Options Cardiovasc Med* 2014; **16:** 277.

106 Prasad K, Mendelow AD, Gregson B. Surgery for primary supratentorial intracerebral haemorrhage. *Cochrane Database Syst Rev* 2008; (4): CD000200.

107 Hanley DF, Thompson RE, Muschelli J, et al, and the MISTIE Investigators. Safety and efficacy of minimally invasive surgery plus alteplase in intracerebral haemorrhage evacuation (MISTIE): a randomised, controlled, open-label, phase 2 trial. *Lancet Neurol* 2016; **15:** 1228–37.

108 Rohde V, Rohde I, Thiex R, et al. Fibrinolysis therapy achieved with tissue plasminogen activator and aspiration of the liquefied clot after experimental intracerebral hemorrhage: rapid reduction in hematoma volume but intensification of delayed edema formation. *J Neurosurg* 2002; **97:** 954–62.

109 Thiex R, Weis J, Krings T, et al. Addition of intravenous N-methyl-D-aspartate receptor antagonists to local fibrinolytic therapy for the optimal treatment of experimental intracerebral hemorrhages. *J Neurosurg* 2007; **106:** 314–20.

110 Keric N, Maier GS, Samadani U, et al. Tissue plasminogen activator induced delayed edema in experimental porcine intracranial hemorrhage: reduction with plasminogen activator inhibitor-1 administration. *Transl Stroke Res* 2012; **3:** 88–93.

111 Goulay R, Naveau M, Gaberel T, Vivien D, Parcq J. Optimised tPA: a non-neurotoxic fibrinolytic agent for the drainage of intracerebral hemorrhages. *J Cereb Blood Flow Metab* 2018; **38:** 1180–89.

112 Mould WA, Carhuapoma JR, Muschelli J, et al, and the MISTIE Investigators. Minimally invasive surgery plus recombinant tissue-type plasminogen activator for intracerebral hemorrhage evacuation decreases perihematomal edema. *Stroke* 2013; **44:** 627–34.

113 Li Y, Yang R, Li Z, et al. Urokinase vs Tissue-Type Plasminogen Activator for Thrombolytic Evacuation of Spontaneous Intracerebral Hemorrhage in Basal Ganglia. *Front Neurol* 2017; **8:** 371.

114 Gaberel T, Montagne A, Lesept F, et al. Urokinase versus for intraventricular hemorrhage fibrinolysis. *Neuropharmacology* 2014; **85:** 158–65.

115 Gaberel T, Magheru C, Parienti JJ, Huttner HB, Vivien D, Emery E. Intraventricular fibrinolysis versus external ventricular drainage alone in intraventricular hemorrhage: a meta-analysis. *Stroke* 2011; **42:** 2776–81.

116 Naff N, Williams MA, Keyl PM, et al. Low-dose recombinant tissue-type plasminogen activator enhances clot resolution in brain hemorrhage: the intraventricular hemorrhage thrombolysis trial. *Stroke* 2011; **42:** 3009–16.

117 Hanley DF, Lane K, McBee N, et al, and the CLEAR III Investigators. Thrombolytic removal of intraventricular haemorrhage in treatment of severe stroke: results of the randomised, multicentre, multiregion, placebo-controlled CLEAR III trial. *Lancet* 2017; **389:** 603–11.

118 Staykov D, Kuramatsu JB, Bardutzky J, et al. Efficacy and safety of combined intraventricular fibrinolysis with lumbar drainage for prevention of permanent shunt dependency after intracerebral hemorrhage with severe ventricular involvement: a randomized trial and individual patient data meta-analysis. *Ann Neurol* 2017; **81:** 93–103.

119 Fam MD, Zeineddine HA, Eliyas JK, et al. CSF inflammatory response after intraventricular hemorrhage. *Neurology* 2017; **89:** 1553–60.

120 Amin-Hanjani S, Ogilvy CS, Barker FG 2nd. Does intracisternal thrombolysis prevent vasospasm after aneurysmal subarachnoid hemorrhage? A meta-analysis. *Neurosurgery* 2004; **54:** 326–34, discussion 334–35.

121 Etminan N, Beseoglu K, Eicker SO, Turowski B, Steiger HJ, Hänggi D. Prospective, randomized, open-label phase II trial on concomitant intraventricular fibrinolysis and low-frequency rotation after severe subarachnoid hemorrhage. *Stroke* 2013; **44:** 2162–68.

122 Kramer AH, Jenne CN, Zygun DA, et al. Intraventricular fibrinolysis with tissue plasminogen activator is associated with transient cerebrospinal fluid inflammation: a randomized controlled trial. *J Cereb Blood Flow Metab* 2015; **35:** 1241–48.

© 2018 Elsevier Ltd. All rights reserved.

Article 4: "*Activation of cell surface GRP78 decreases endoplasmic reticulum stress and neuronal death*"

Louessard M, Bardou I, Lemarchand E, Thiebaut AM, Parcq J, Leprince J, Terrisse A, Carraro V, Fafournoux P, Bruhat A, Orset C, Vivien D, Ali C, Roussel BD.

Titre: L'activation de la protéine Grp78 membranaire diminue le stress du RE et la mort neuronale.

Etude publiée en 2017 dans *Cell Death and Differenciation*

Résumé : La réponse des protéines mal-repliées (UPR) est une réponse adaptative liée au stress du réticulum endoplasmique (RE) qui vise à protéger les cellules de la surcharge protéique. Cependant, lorsqu'elle est prolongée, l'activation de l'UPR est convertie en un signal de mort, qui repose sur sa branche PERK-eIF2α. L'activation exacerbée de l'UPR a été impliquée dans de nombreuses maladies neurologiques, notamment l'ischémie cérébrale. Ici, en utilisant un modèle d'accident vasculaire cérébral thromboembolique *in vivo* sur des souris reportrices du stress RE et des modèles neuronaux *in vitro* d'ischémie, nous démontrons que le stress ischémique conduit à l'activation délétère de la branche PERK-eiF2α. De plus, nous montrons que l'activateur du plasminogène de type tissulaire (tPA) peut se lier à Grp78 au niveau membranaire, entraînant une diminution de l'activation de la voie PERK, donc du facteur délétère CHOP, et favorise enfin la neuroprotection. Globalement, ces travaux mettent en évidence un nouveau rôle et un potentiel thérapeutique de la protéine chaperonne Grp78 en tant que récepteur membranaire du tPA afin de prévenir l'activation exacerbée du stress du RE.

Cell Death and Differentiation (2017) 24, 1518–1529
© 2017 Macmillan Publishers Limited, part of Springer Nature. All rights reserved 1350-9047/17
www.nature.com/cdd

Activation of cell surface GRP78 decreases endoplasmic reticulum stress and neuronal death

Morgane Louessard[1], Isabelle Bardou[1], Eloïse Lemarchand[1], Audrey M Thiebaut[1], Jérôme Parcq[1], Jérôme Leprince[2], Anne Terrisse[3], Valérie Carraro[3], Pierre Fafournoux[3], Alain Bruhat[3], Cyrille Orset[1], Denis Vivien[1,4], Carine Ali[1] and Benoit D Roussel[*,1]

The unfolded protein response (UPR) is an endoplasmic reticulum (ER) -related stress conserved pathway that aims to protect cells from being overwhelmed. However, when prolonged, UPR activation converts to a death signal, which relies on its PERK-eIF2α branch. Overactivation of the UPR has been implicated in many neurological diseases, including cerebral ischaemia. Here, by using an *in vivo* thromboembolic model of stroke on transgenic ER stress-reporter mice and neuronal *in vitro* models of ischaemia, we demonstrate that ischaemic stress leads to the deleterious activation of the PERK branch of the UPR. Moreover, we show that the serine protease tissue-type plasminogen activator (tPA) can bind to cell surface Grp78 (78 kD glucose-regulated protein), leading to a decrease of the PERK pathway activation, thus a decrease of the deleterious factor CHOP, and finally promotes neuroprotection. Altogether, this work highlights a new role and a therapeutic potential of the chaperone protein Grp78 as a membrane receptor of tPA capable to prevent from ER stress overactivation.
Cell Death and Differentiation (2017) **24,** 1518–1529; doi:10.1038/cdd.2017.35; published online 23 June 2017

The endoplasmic reticulum (ER) stress is a conserved cellular process that activates the unfolded protein response (UPR) that controls the correct functioning of the ER.[1] The UPR combines two responses: an early inhibition of protein synthesis, to avoid protein overload within the ER; and a later upregulation of genes that help protein folding, to clear the ER from native/aberrant proteins.[2] If prolonged, the UPR triggers death signals.[3]

Three sensors present at the ER membrane ensure a correct detection of ER stress: IRE1 (inositol-requiring protein-1); ATF6 (activating transcription factor 6); and PERK (protein kinase RNA (PKR)-like ER kinase). IRE1 and ATF6 are normally bound to, and thus inactivated by the ER chaperone Grp78 (78 kDa glucose-related protein, also called Bip for binding immunoglobulin protein). Under stress conditions, Grp78 disengages from IRE1 and ATF6, leading to their activation and the subsequent expression of UPR genes (chaperones, folding and ER proteins).[4] Like the other two sensors, PERK is held inactive by the binding of Grp78. Under stress conditions, PERK phosphorylates its unique substrate, eIF2α (eukaryotic translation initiation factor-2 α-subunit),[5] resulting in a global protein synthesis shutdown.[6] Paradoxically, PERK-mediated eIF2α phosphorylation also activates the transcription of specific genes, including ATF4 (activating transcription factor 4), which triggers a transcriptional programme of stress-responsive genes[7] and of the transcription factor CHOP (C/EBP homologous protein); in case of ER stress overactivation, CHOP will induce death signals.[8] Another target of ATF4 and CHOP, GADD34 (growth arrest and DNA damage-inducible protein 34, a protein phosphatase 1 regulatory subunit), serves as a negative feedback loop by dephosphorylating eIF2α, allowing the recovery of protein translation[4] (Figure 1a).

These molecular events have been implicated in many neurological diseases, including Alzheimer's disease, Parkinson's disease, Huntington's disease and stroke.[4,9] Many stroke models are known to activate the UPR.[10,11] This activation is likely due to the energetic failure and the attendant dysfunctions of calcium pumps, ER-calcium depletion, chaperone dysfunction and the eventual accumulation of misfolded proteins.[4,12] For example, activation of the PERK branch is evidenced by eIF2α phosphorylation in a model of hypoxia/ischaemia in mice.[13] Moreover, CHOP and GADD34 – the downstream targets of phosphorylated eIF2α (phospho-eIF2α) – are also increased during cerebral ischaemia.[14–17]

In our study, we investigated ER stress-induced neuronal death by using an *in vivo* model of stroke and two different models of ischaemia/reoxygenation (*ex vivo* and *in vitro*). We demonstrate that the PERK branch of the UPR can be controlled by the activation of translocated-ER-resident chaperone Grp78 to the neuronal surface by tissue-type plasminogen activator (tPA). Binding of tPA to Grp78 results in a decrease of PERK/eIF2α activation, and thus a decrease of the deleterious factor *CHOP*, leading to neuroprotection. For the first time, we describe an active role of cell surface Grp78 signalling in the control of ER stress, thus opening new therapeutic strategies for neurological diseases, especially during stroke.

[1]Normandie Univ, UNICAEN, INSERM, Physiopathology and Imaging of Neurological Disorders, Caen, France; [2]Normandie Univ, UNIROUEN, INSERM, Laboratoire Différenciation et Communication Neuronale et Neuroendocrine, Plate-forme de Recherche en Imagerie Cellulaire de Normandie (PRIMACEN), Rouen, France; [3]INRA, UMR 1019 Nutrition Humaine, Centre de Clermont-Ferrand-Theix, Saint Genès Champanelle, France and [4]Clinical Research Department, Medical Center, University Caen Normandy, Centre Hospitalo-Universitaire Caen Côte de Nacre, Caen, France
*Corresponding author: BD Roussel, GIP Cyceron-Caen Basse-Normandie University, INSERM U919, GIP Cyceron, Boulevard Becquerel, BP5229, Caen 14074, France. Tel: +33 2 31470213; Fax: +33 2 31470222; E-mail: broussel@cyceron.fr
Received 26.12.16; revised 20.2.17; accepted 23.2.17; Edited by N Bazan; published online 23.6.17

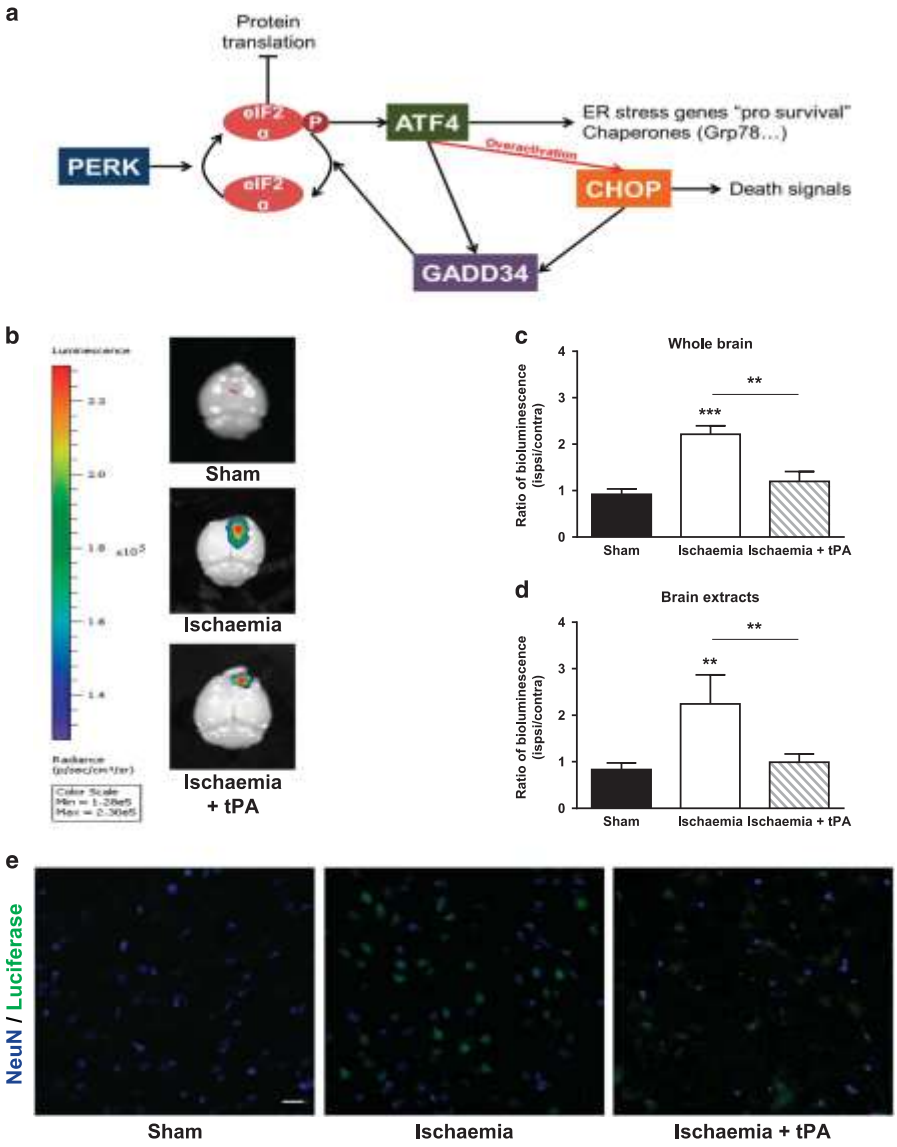


Figure 1 tPA protects neurones from ischaemia-induced ER stress in a thromboembolic model of stroke. (**a**) Diagram of the PERK branch of the UPR: PERK is an ER membrane-bound sensor activated under stress conditions. Once activated, it phosphorylates eIF2α leading to a global shutdown in protein translation. Paradoxically, phospho-eIF2α promotes ATF4 expression and subsequent protein-folding genes to restore ER homeostasis, including GADD34 to restore protein synthesis by dephosphorylating eIF2α. If ER stress is over-activated, ATF4 leads to the expression of CHOP, partially responsible of ER stress-mediated death. (**b**) Representative cerebral luminescence intensities following sham surgery, thromboembolic ischaemia alone or coupled to thrombolysis with tPA (10 mg/kg IV) ($n=9$ for sham animals and $n=10$ for ischaemia and ischaemia +tPA). (**c**) Mean ipsilateral/contralateral hemispheres *ex vivo* bioluminescence ($n=9$ for sham animals and $n=10$ for ischaemia and ischaemia+tPA). (**d**) Mean ipsilateral/contralateral cortical lysates bioluminescence (data are represented as mean $\pm$ S.E.M.; $n=9$ for sham animals and $n=10$ for ischaemia and ischaemia+tPA). (**e**) Representative immunostainings against luciferase (green) and NeuN (blue) in the peri-infarct area. (*$P<0.05$, **$P<0.01$, ***$P<0.001$; Mann–Whitney test; scale bar, 20 μm)

Results

Thromboembolic ischaemia induces activation of PERK/ATF4 branch of ER stress and is decreased by thrombolysis. CARE-Luciferase mice allow an *in vivo* detection of the activation of the PERK-eIF2α branch of the UPR[18] (Figure 1a). CARE-Luciferase mice were subjected to thromboembolic stroke, induced by the injection of thrombin within the middle cerebral artery.[19] This model allows thrombolysis by recombinant tPA in the same conditions than its use in clinic: a group of mice were thrombolysed with tPA 20 min after stroke induction (10 mg/kg iv; bolus and then infusion over 40 min) while sham group received saline. After 24 h, mice were perfused and brain were harvested to

measure *ex vivo* luciferase activity in the ischaemic (ipsilateral) and contralateral hemispheres. As shown on the images and on the quantifications (Figure 1b and c), ischaemic stroke increased by 2.4-fold the bioluminescent signal compared to sham conditions (ipsi/contralateral hemispheres) ($n=9$, $P<0.001$). Thrombolysis with tPA reduced by 46% ischaemia-induced luciferase signal ($n=9$; $P<0.01$). Concordant with the *ex vivo* findings, *in vitro* luciferase assays (Figure 1d) showed a strong ischaemia-induced luciferase activity (+270% *versus* sham mice; $n=9$; $P<0.01$) that was reduced by tPA-induced thrombolysis (56% reduction compared to ischaemia alone; $n=9$, $P<0.01$). Immunostainings against luciferase also highlighted in the peri-infarct cortical region a strong ischaemia-induced labelling which was reduced by thrombolysis (Figure 1e). However, because tPA can positively or negatively control neuronal survival through multiple pathways[20,21] in addition to its thrombolytic effects, we wondered if the decrease of ER stress observed after thrombolysis was only due to its vascular properties or not.

OGD/reoxygenation induces a deleterious activation of the PERK branch of ER stress that is counteracted by tPA. tPA is now considered as a neuromodulator.[20,22] Because it is complicated to decipher its parenchymal roles from its thrombolytic action, we decided to use a model of ischaemia where thrombolysis is not necessary: an *ex vivo* model of hippocampal slices subjected to 40 min of OGD followed by reoxygenation (OGD_{reox}) (Figure 2a). To ensure ER stress activation, we measured the level of eIF2*α* phosphorylation by western blots 24 h after the experiment. When compared to control, OGD_{reox} led to an increase of eIF2*α* phosphorylation (Figure 2b and quantification in Figure 2c, 2.5-fold increase, $P<0.01$), confirming the activation of ER stress. Interestingly, tPA prevented OGD_{reox}-mediated eIF2*α* phosphorylation (Figure 2d and quantification in Figure 2c, $n=6$, $P<0.05$) independently from its thrombolytic properties. We also assessed cell death, by propidium iodide staining (Figure 2d) and as observed *in vivo* after ischaemic stroke, tPA protected from OGD_{reox}-induced cell death (Figure 2e, 60% of protection, $n=5$, $P<0.01$). Taken together, these results show that during OGD_{reox}, tPA reduces the activation of the PERK-eIF2*α* branch of the UPR independently of its thrombolytic activity.

OGD/reoxygentation overactivates the PERK branch of ER stress in pure cortical neurones and is decreased by tPA. To study the mechanism of action of tPA, we next used cultures of pure cortical neurones subjected to OGD_{reox} (Figure 3a). In these conditions, the PERK-eIF2*α* branch was activated, as illustrated by immunostainings against phospho-eIF2*α* (Figure 3b). ER stress activation increased as a function of the duration of OGD, as shown by the extent of eIF2*α* phosphorylation ratio compared to the total form, after various time of OGD and followed by 4 h of reoxygenation (Figure 3c and densitometries in Figure 3d, 1.84-, 2.68- and 3.86-fold increase of eIF2*α* phosphorylation at 10, 40 and 60 min of OGD, respectively, $P<0.05$). In this neuronal model, tPA 300 nM also prevented the activation of the PERK branch as illustrated by immunostainings (Figure 3b) and immunoblots against phospho-eIF2*α* (Figure 3c and densitometries in Figure 3d, tPA reduces by 44%, 46% and 40% the phosphorylation of eIF2*α* after 10, 40 and 60 min of OGD_{reox}, respectively, $P<0.05$). We also studied by qPCR the transcriptional downstream targets of phospho-eIF2*α* (Figure 1a). OGD_{reox} increased mRNA levels of ATF4, CHOP, GADD34 and Grp78 (Figure 3e) by 2-, 1.6-, 1.54- and 1.6-fold, respectively. This ER stress activation measured by qPCR was totally prevented in the presence of tPA, except for Grp78 (Figure 3e). In parallel to these evidence of time-dependent activation of the PERK-eIF2*α* branch, we also found that OGD_{reox} induced a neuronal death of which the extent increased with the duration of OGD (Supplementary Figure 1; Spearman correlation test: $\rho=0.777$; $P<0.0001$) and that was correlated to the levels of phospho-eIF2*α* (Spearman correlation test: $\rho=0.671$; $P=0.026$). Co-treatment with tPA (300 nM) reduced by 38% the extent of neuronal loss induced by OGD_{reox} (40 min OGD followed by 4 h reoxygenation; Figure 3f, $P<0.01$), showing a neuroprotective action of tPA via an alleviation of the recruitment of the PERK branch of the UPR in ischaemic neurones.

The neuronal ER continuity is preserved under OGD/reoxygenation in the presence of tPA. ER dysfunction is often associated to ER swelling and fragmentation. To visualize the neuronal ER continuity/integrity in our experimental conditions, we performed live imaging of neurones with the cell-permeant dye ER tracker (Figure 4). Due to the use of glass bottom Petri dishes for the confocal acquisition, neurones need the presence of astrocytes to attach to the glass bottom part; we then adapted the protocol of OGD_{reox} to 1 h of OGD, in order to obtain the same level of cell death than 40 min OGD on pure cortical neurones. *Z*-stack acquisitions were performed to enable a 3D reconstruction by Imaris Software (Bitplane; Concord, MA, USA) (representative reconstruction Figure 4a, blue images). In control conditions (with or without 300 nm tPA), the ER continuity was preserved with an ER surrounding the nucleus and projecting in neurites (Figure 4a). However, after OGD_{reox} the ER continuity was lost, with an apparent swelling and an ER fragmentation (Figure 4a, blue images). When tPA was added during the OGD_{reox}, ER continuity was preserved. Neuronal swelling was estimated by measuring the somatic diameter of neurones (10 per condition, in five distinct microscopic fields; each individual neurones was recorded every hour) after staining with the ER tracker as illustrated on the images at 4 h (Figure 4a, green images). Under control conditions, tPA 300 nM alone did not modify the neuronal body diameter, while OGD_{reox} led to a 1.5-, 1.8-, 2.11-, 2.26- and 2.34-fold increase of neuronal body diameter at t0, t1, t2, t3 and t4 respectively, $^{***}P<0.001$ compared to control). When tPA is added during OGDreox, the neuronal body diameter increased over time (Figure 4b, 1.05-, 1.1-, 1.16- and 1.18-fold at to, t1, t2, t3 and t4 respectively; $^{**}P<0.01$, $^{***}P<0.001$ compared to control) but less than under OGD_{reox} alone (Figure 4b, 31%, 29%, 22%, 23% less than OGD_{reox} at to, t1, t2, t3 and t4, respectively; $P<0.001$ compared to OGD_{reox} alone). It demonstrates that tPA is able to maintain ER continuity and the neuronal morphology under OGD_{reox}.

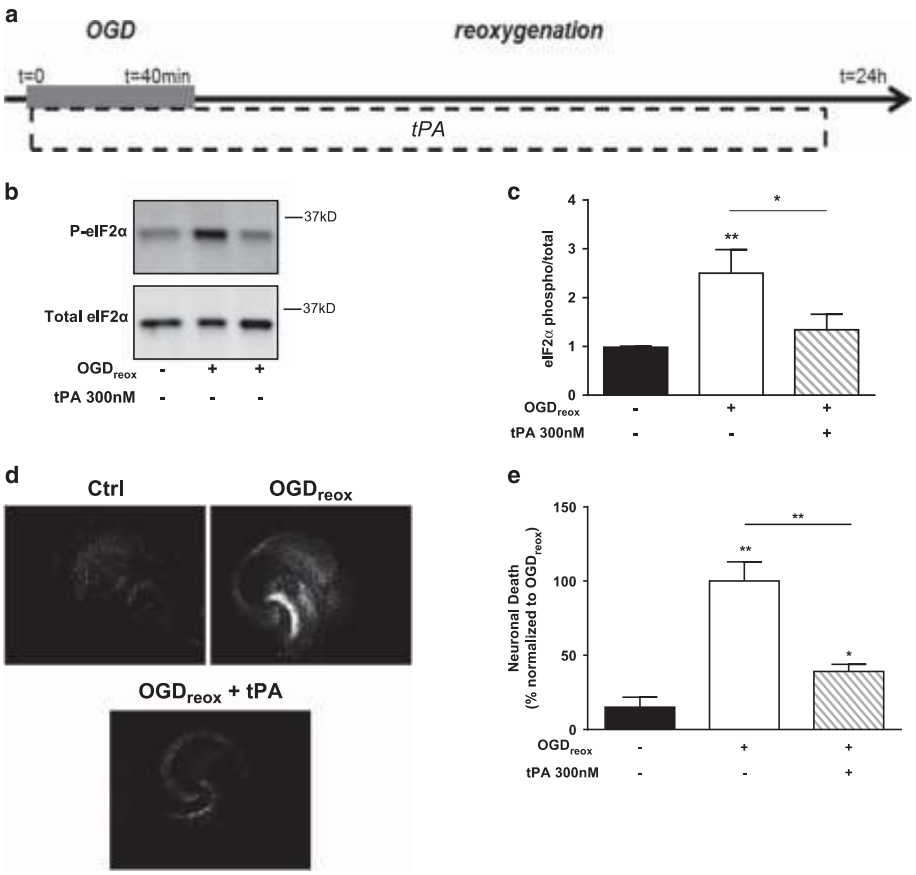


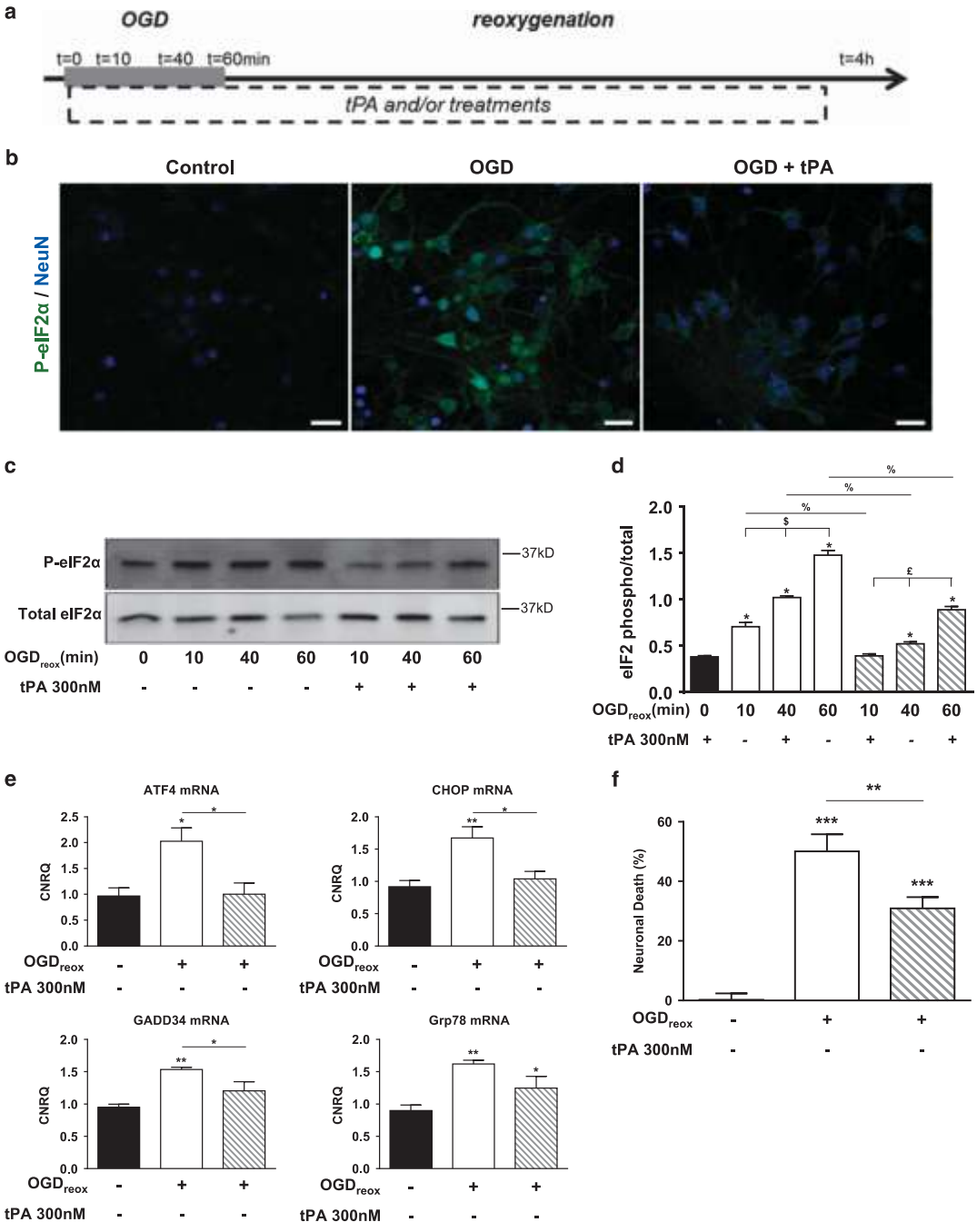
Figure 2 tPA protects hippocampal slices from OGD_{reox}-induced death by decreasing the PERK branch of the UPR. (**a**) Diagram of the OGD_{reox} protocol used on hippocampal slices. Slices were washed with OGD media and stayed under OGD conditions during 40 min, followed by a 24 h reoxygenation period. (**b**) Representative western blots against phosphor – and total eIF2α in hippocampal slices subjected or not to OGD_{reox} ± 300 nM tPA. (**c**) Corresponding ratio of the phosphorylated versus total form of eIF2α (data are represented as mean ± S.E.M. $n=6$, $^*P<0.05$; $^{**}P<0.01$; Mann–Whitney test). (**d**) Representative propidium iodide stainings of slices 24 h after 40 min of OGD (except Ctrl) in presence or not of 300 nM tPA (Scale bar, 10 μM). (**e**) Mean of propidium iodide-positive cells in slices 24 h after treatments and normalized to the OGD_{reox} condition (data are represented as mean ± S.E.M. $n=5$ independent experiments; $^*P<0.05$; $^{**}P<0.01$; Mann–Whitney test)

tPA decreases the PERK-eIF2α branch of the UPR by a mechanism dependent on its lysine-binding site. We then investigated the mechanisms by which tPA decreases the PERK branch of ER stress and death under OGD_{reox}. We first used a proteolytically inactive form of tPA (itPA: tPA-dGGACK; 300 nM) and showed that despite its lack of enzymatic activity, itPA remained able to confer neuroprotection (Figure 5a, 19% of neuronal death for itPA under OGD_{reox}; 50% for OGD_{reox} alone; and 31% for tPA and OGD_{reox}, $P<0.001$). The growth factor domain of tPA confers anti-apoptotic capacity through its binding to the EGF receptor.[23,24] However, AG1478 (5 μM), an EGFR tyrosine kinase inhibitor, did not prevent the beneficial effect of tPA during OGD_{reox} (Figure 5b, 31% of neuronal death for tPA under OGD_{reox}; 26% for tPA+AG1478 under OGD_{reox}), excluding a role for EGF receptor. tPA can also interact through its finger domain with LRP-1 (type 1 low-density lipoprotein receptor-related protein) to promote NFκB activation[25] and Akt phosphorylation.[26] The addition of RAP (receptor-associated protein) (500 nM), a competitive LRP-1 antagonist, did not reverse the protective effect of tPA (Figure 5c, 31% of neuronal death for tPA under OGD_{reox}; 38% for tPA+RAP under OGD_{reox}). The lysine-binding site (LBS) contained in the Kringle 2 domain of tPA is involved in the interaction of tPA with several partners (for review ref. 22). In order to compete with the binding of its LBS, we used the lysine analogue TXA (tranexamic acid) at the same concentration than tPA (300 nM). Interestingly, TXA reversed the protective effect of tPA during OGD_{reox} (Figure 5d, 27% of neuronal death for tPA under OGD_{reox}; 41% for tPA+TXA under OGD_{reox}, $P<0.05$), suggesting a role for the LBS contained within the Kringle 2 domain of tPA to mediate its action on neuroprotection during OGD_{reox}.

OGD/reoxygenation promotes cell surface Grp78, and its activation induces a beneficial decrease of ER stress. It is now well accepted that under ER stress conditions, the ER-resident chaperone Grp78 translocates to the cell

surface.[27,28] To confirm this in our OGD_{reox} conditions, we biotinylated membrane proteins before and after 40 min of OGD, and we performed an avidin pull-down followed by a western blotting against Grp78. We show an increase of cell surface Grp78 after OGD compared to control (Figure 6a), in favour of a translocation of Grp78 to the neuronal membrane.

We then checked the ability of tPA to be a cell surface Grp78 ligand. Immunoprecipitations (IP) were performed with both Grp78 and tPA antibodies on neurones subjected to OGD_{reox} and treated or not with 300 nM of tPA (Figure 6b). The pull-down with Grp78 antibodies revealed a Grp78 band by western blot as a positive control, and the tPA pull-down also



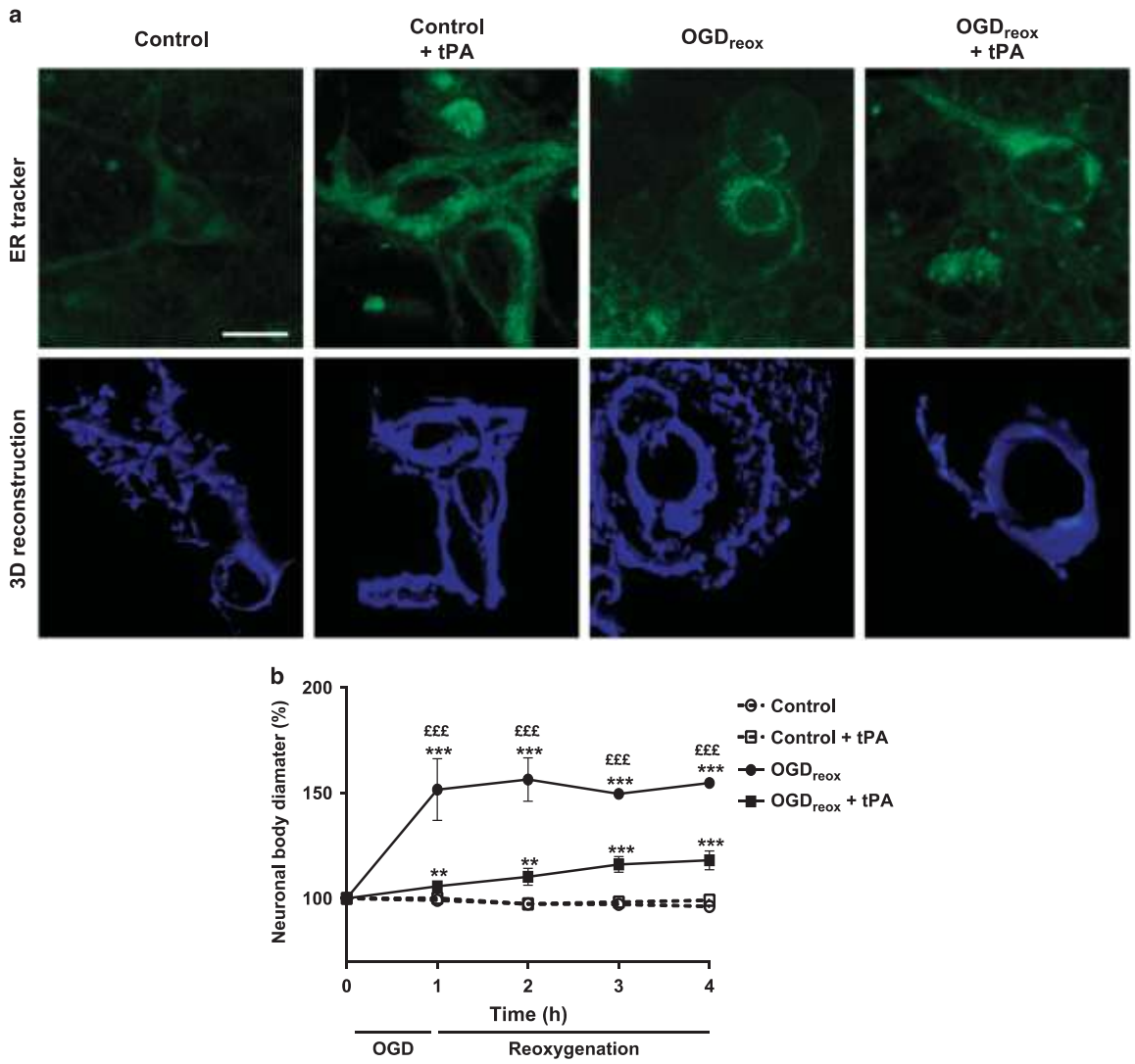


Figure 4 tPA preserves ER neuronal continuity after OGD_{reox}. (**a**) Representative pictures of neurones labelled with ER-tracker (in green) and 3D construction (in blue) after OGD_{reox} (1 h OGD+4 h of reoxygenation) or not and in the presence or not of 300 nM tPA (scale bars, 5 μM). (**b**) Neuronal body diameter at different time (before OGD: t0; after 1 h of OGD: t1; and after 1 h: t2, 2 h: t3 and 3 h: t4 of reoxygenation) in presence or not of 300 nM tPA (data are represented as mean $\pm$ S.E.M. $n=9$ independent experiments with 10 neurones counted in five different areas for each experiment and each time point; $^{**}P<0.01$; $^{***}P<0.001$; compared with control or control-tPA condition; $^{£££}P<0.001$; compared with OGD-tPA condition; Mann–Whitney tests)

Figure 3 tPA decreases the PERK branch of the UPR-mediated neuronal death under OGD_{reox} conditions. (**a**) Diagram of the OGD_{reox} protocol used on pure cortical neurones. Neurones were washed with OGD media and stayed under OGD conditions during 40 min followed by a 4 h reoxygenation period. (**b**) Representative immunostainings against phospho-eIF2α (in green) and NeuN (in blue) on cultured neurones subjected or not to 40 min of OGD $\pm$300 nM tPA (representative images of three independent experiments; scale bar, 20 μm). (**c**) Representative western blots against phosphor- and total eIF2α after various time of OGD (10, 40 and 60 min) followed by 4 h of reoxygenation, in the presence or not of 300 nM tPA. (**d**) Corresponding ratio of the phosphorylated versus total form of eIF2α (data are represented as mean $\pm$ S.E.M. $n=5$; $^{*}P<0.05$ *versus* Ctrl condition; $^{\$}P<0.05$ between OGDreox conditions; $^{£}P<0.05$ between OGDreox+tPA conditions; $^{\%}P<0.05$ between OGDreox *versus* OGDreox+tPA conditions; Mann–Whitney test). (**e**) qPCR analyses of ATF4, CHOP, GADD34 and Grp78 after OGD_{reox} in the presence or not of 300 nM tPA (data are represented as mean +/− S.E.M. $n=5$; $^{*}P<0.05$; $^{**}P<0.01$; Mann and Whitney test; CNRQ: calibrated normalized relative quantities). (*F*) Neuronal death assessed by LDH release after OGD_{reox} in the presence or not of 300 nM tPA (data are represented as mean $\pm$ S.E.M. Ctrl: $n=32$; OGD: $n=28$; OGD+tPA: $n=32$; from four independent experiments. $^{**}P<0.01$; $^{***}P<0.001$; Mann–Whitney test)

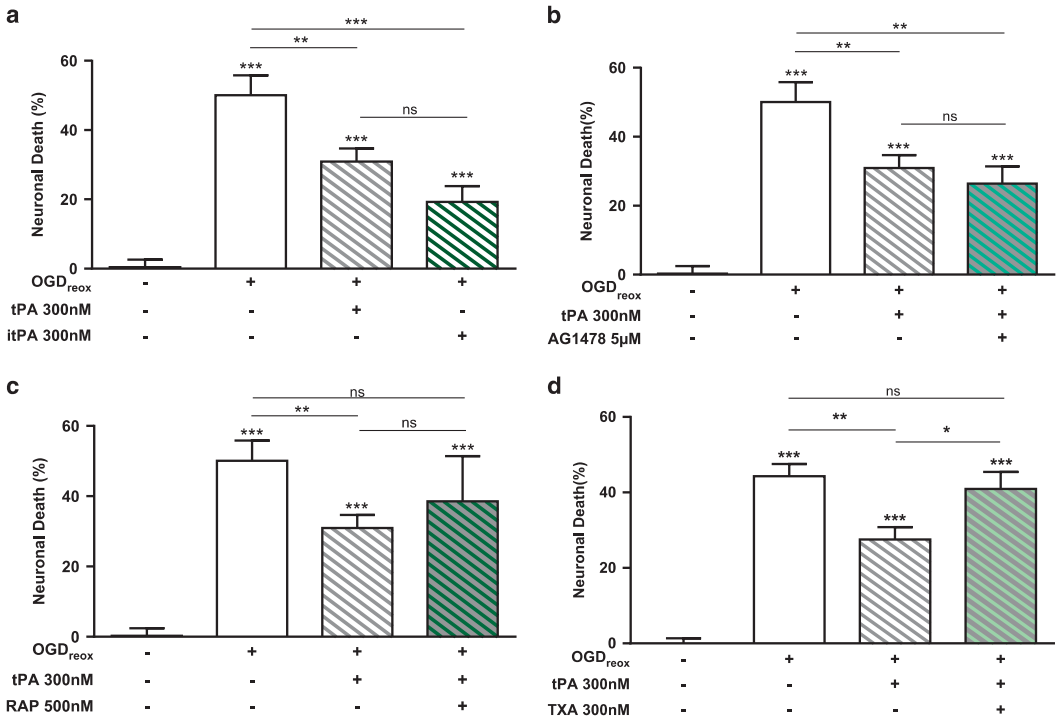


Figure 5 the LBS contained within the kringle 2 domain of tPA is involved in the decrease of the PERK branch of the UPR-mediated neuronal death during OGD_{reox}. (**a**) Neuronal death assessed by LDH release in the media after 40 min of OGD followed by 4 h of reoxygenation in the presence or not of 300 nM tPA, or in the presence of inactive tPA (itPA) 300 nM. tPA was also tested in addition to AG1478 5 μM (**b**), RAP (500 nM) (**c**) and TXA 300 nM (**d**), (data are represented as mean $\pm$ S.E.M. $n=30$ for ctrl, $n=28$ for OGD, $n=32$ for tPA, $n=22$ for itPA, $n=18$ for AG1478, $n=12$ for RAP, $n=16$ for TXA; from four independent experiments; $^{*}P<0.05$; $^{**}P<0.01$; $^{***}P<0.001$; Mann–Whitney test)

revealed a Grp78 band (Figure 6b), confirming tPA as a ligand. Indeed, the interaction between tPA and cell surface Grp78 has been reported in neuroblastoma cells.[29] The binding of tPA to Grp78 occurs on the amino acid sequence 98–115 (LIGRTWNDPSVQQDIKFL).[29] We thus synthetized a corresponding competitive peptide called $Grp78_{(98–115)}$, and confirmed its competitive nature in a plasminogen-like fluorogenic substrate assay. Recombinant Grp78 7.3 pM (equimolar to tPA concentration) or 10 times concentrated increased tPA fibrinolytic activity by 25 and 40% respectively (Supplementary Figure 2A, $P<0.001$). Interestingly, a tPA mutated in its LBS contained within the kringle 2 domain (tPA K2*: W253R mutation) is no longer able to interact with Grp78, as shown by the absence of increased tPA K2* activity (Supplementary Figure 2B). When co-incubated with $Grp78_{(98\text{-}115)}$ (7.3 or 73pM), Grp78 could no longer potentiate tPA fibrinolytic activity (Supplementary Figure 2A). A scramble peptide $Grp78_{(98\text{-}115)sc}$ had no action on the potentiation of tPA fibrinolytic activity by Grp78 (Supplementary Figure 2A; $P<0.01$). We then ensured the capacity of $Grp78_{(98\text{-}115)}$ to decrease the binding of tPA to cell surface Grp78 in living neurones. ^{35}S radiolabelled tPA (tPA*) was incubated on neurones after 40 min of OGD in the presence or not of $Grp78_{(98\text{-}115)}$ (10 μM) during 30 min at 4 °C (to avoid any active process of internalization). Our data demonstrate a decrease of tPA* at the neuronal membrane in the presence of $Grp78_{(98\text{-}115)}$ (Figure 6c, 49.2% decreased with $Grp78_{(98\text{-}115)}$; $P<0.001$), confirming the ability of our peptide to decrease the binding between tPA and cell surface Grp78 in neurones. We then tested the blocking peptide under OGD_{reox} conditions. After 40 min of OGD and 4 h of reoxygenation, $Grp78_{(98\text{-}115)}$ reversed tPA-mediated inhibition of the PERK branch, as shown by western blot against eIF2α phosphorylation (Figure 6d) and the corresponding densitometries (Figure 6e; ratio of 1.02 between the phosphorylated and the total form of eIF2α for tPA under OGD_{reox}; 1.52 for tPA +$Grp78_{(98\text{-}115)}$ under OGD_{reox}; $P<0.05$). Interestingly, $Grp78_{(98\text{-}115)}$ totally reversed the neuroprotective effect of tPA in cortical neurones (Figure 6f, 31% of neuronal death for tPA+$Grp78_{(98\text{-}115)}$ under OGD_{reox}, 12% for tPA under OGD_{reox}; $P<0.01$). To ensure our findings, we also tried the peptide on hippocampal slices subjected to OGD_{reox}. $Grp78_{(98\text{-}115)}$ also reversed tPA-mediated inhibition of the PERK branch as shown by western blot against eIF2α phosphorylation (Figure 6g and the densitometries Figure 6h; ratio of 1.02 between the phosphorylated and the total form of eIF2α for tPA under OGD_{reox}; 1.52 for tPA+$Grp78_{(98\text{-}115)}$ under OGD_{reox}; $P<0.05$). $Grp78_{(98\text{-}115)}$ also prevented the protection by tPA on hippocampal slices subjected to OGD_{reox} (Figure 6i, 61% of protection for tPA under OGD_{reox},

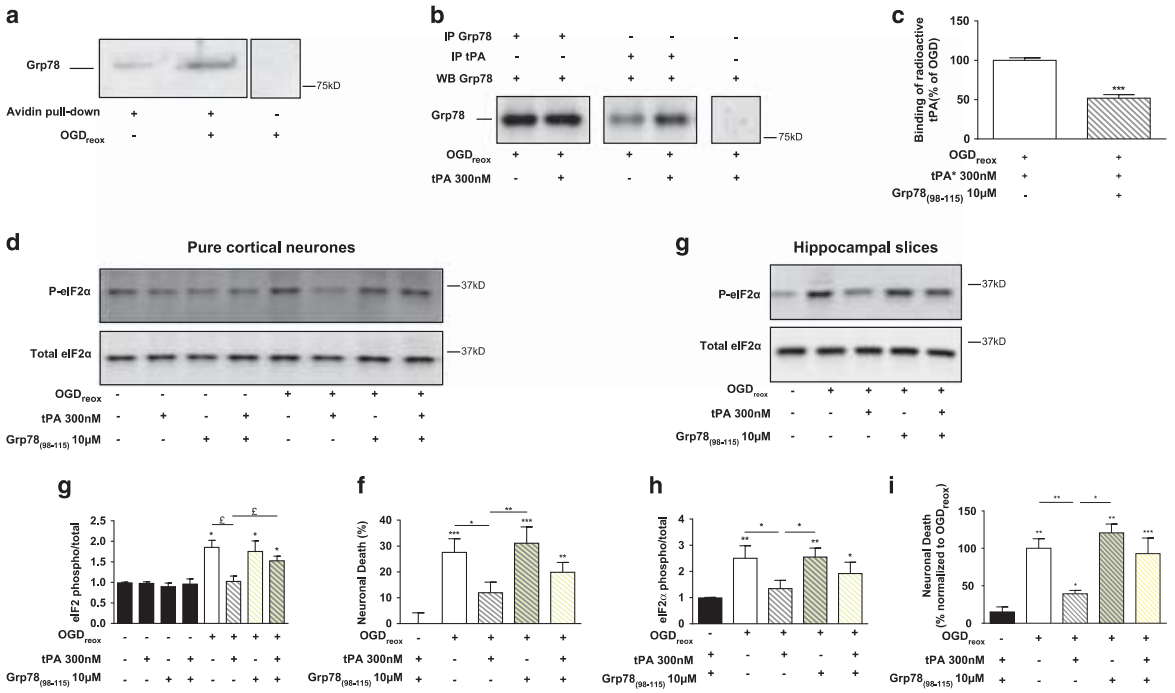


Figure 6 The interaction between tPA and cell surface Grp78 is responsible of the decrease of the PERK branch activation and the associated neuroprotection during OGD_{reox}. (**a**) Avidin pull-down and western blot against Grp78 on neurones subjected or not to 40 min of OGD, followed by the biotinylation of membrane protein at 4 °C (representative blot from $n=3$ independent experiments). (**b**) Immunoprecipitations with either Grp78 or tPA antibodies on neurones subjected to 40 min of OGD, and revealed by western blot against Grp78 (representative blot of three independent experiments). (**c**) Membrane-bound radioactivity after radioactive tPA (tPA*) incubation (30 min) at 4 °C following a 40 min OGD period in presence or not of 10 μM of $Grp78_{(98\text{-}115)}$ peptide (data are represented as mean ImmunoprecipitatioSEM $n=4$ independent experiments; $^{***}P<0.001$ Mann–Whitney test). (**d**) Representative western blots against phosphor- and total eIF2α and corresponding densitometries (**e**) from pure cortical neurones subjected to 40 min of OGD followed by 4 h of reoxygenation, in the presence or not of 300 nM tPA and 10 μM $Grp78_{(98\text{-}115)}$ (data are represented as mean ± S.E.M. $n=5$ independent experiments; $^{*}P<0.05$ compared to normoxia; $^{£}P<0.05$ compared between OGD_{reox} conditions). (**f**) Neuronal death of pure cortical neurones assessed by LDH release after 40 min of OGD followed by 4 h of reoxygenation in the presence or not of 300 nM tPA and 10 μM $Grp78_{(98\text{-}115)}$ (data are represented as mean ± S.E.M. $n=25$ for ctrl, $n=20$ for OGD_{reox}, $n=16$ for tPA, tPA+$Grp78_{(98\text{-}115)}$ and $Grp78_{(98\text{-}115)}$ from five independent experiments; $^{*}P<0.05$; $^{**}P<0.01$; $^{***}P<0.001$; Mann–Whitney test). (**g**) Representative western blots against phospho- and total eIF2α on hippocampal slices subjected to 40 min of OGD followed by 24 h of reoxygenation, in the presence or not of 300 nM tPA and 10 μM $Grp78_{(98\text{-}115)}$ and corresponding ratio of the phosphorylated versus total form of eIF2α (*H*) (data are represented as mean ± S.E.M. $n=6$; $^{*}P<0.05$; $^{**}P<0.01$; Mann–Whitney test). (**i**) Cell death assessed by counting of propidium iodide-positive cells in slices 24 h after treatments and normalized to the OGD_{reox} condition in the presence or not of 300 nM tPA and 10 μM $Grp78_{(98\text{-}115)}$ (data are represented as mean ± S.E.M. $n=12$ from four independent experiments; $^{*}P<0.05$, $^{**}P<0.01$, $^{***}P<0.001$, Mann–Whitney test)

totally reversed with the co-application of $Grp78_{(98\text{-}115)}$, $^{**}P<0.01$). Again, this effect was associated with a reversion of the inhibition of eIF2α phosphorylation by tPA (Figure 6g and h, ratio of 1.34 between the phosphorylated and the total form of eIF2α for tPA under OGD_{reox}, 2.55 for tPA+$Grp78_{(98\text{-}115)}$ under OGD_{reox}; $P<0.05$). Taken together, these data show that modulating cell surface Grp78 during intense ER stress is a new and interesting therapeutic target to prevent cell death from deleterious ER stress.

Discussion

In this study, we demonstrate for the first time that the binding of tPA to cell surface Grp78, triggers a signal that decreases detrimental ER stress overactivation in neurones, resulting in neuroprotection. We also show that ischaemic events lead to the translocation of the chaperone Grp78 from the ER to the neuronal surface, a mechanism described under ER stress activation and in cancer.[27,28] Interestingly, the serine protease tPA is able to bind to cell surface Grp78 leading to a decrease of the PERK/eIF2α axis of the UPR, and resulting in neuronal survey during cerebral ischaemia.

To study ER stress activation, we first subjected CARE-luciferase mice to thromboembolic ischaemia, alone or coupled to reperfusion by tPA in the same conditions than its clinical use.[19] We observed a strong activation of the eIF2α-ATF4 pathway after ischaemic stroke, a surrogate marker of the activation of the PERK-eIF2α branch of the UPR. Indeed, while kinases other than PERK can phosphorylate eIF2α (GCN2 (general control nonderepressible 2), HRI (haem-regulated eIF2α kinase) and PKR (Protein kinase RNA-activated), studies in genetically deficient mice revealed that during cerebral ischaemia, PERK is the only kinase responsible for eIF2α phosphorylation.[30,31]

We also demonstrated an increase of cell surface Grp78 at the neuronal surface after OGD_{reox} (Figure 6a). Grp78 is mostly known as an ER chaperone, belonging to the heat-shock protein family, but it has also been described at the cell

surface of cancer cells,[29,32] macrophages,[27] endothelial cells,[33,34] and cardiomyocytes.[32] Accordingly, Grp78 is now recognized as a receptor/co-receptor for different partners, including activated α2-macroglobulin,[35] plasminogen/microplasminogen,[36] some viruses,[37,38] major histocompatibility complex class I[38] and voltage-dependent anion channels.[36] Grp78 has also been shown to interact with tPA, resulting in an increase in plasmin formation.[29] Here, we demonstrate the presence of cell surface Grp78 in neurones, and we confirm the occurrence of the interaction between Grp78 and recombinant tPA (Figure 6b), but extend its functional impact to neuroprotection. To our knowledge, Grp78 has no intrinsic ability to convey intracellular signals, as demonstrated by analyses of its sequence and hydropathicity.[27] Rather, Grp78 would need co-receptors.[27] In our study, none of the classical neuronal receptors of tPA (NMDA receptor, LRP1, EGFR) seem to be involved in the effect observed (Figure 5).

Hypoxia/ischaemia[39] or ER stress[28,32] are known triggers of Grp78 translocation. However, how Grp78 translocates from the ER to the cell membrane remains unclear. In 293 T cells, thapsigargin treatment leads to a 12-fold increase of cell surface Grp78 that is different from its increase within the ER,[32] suggesting that ER stress promotes specific mechanism(s) to enhance cell surface localization of Grp78. Importantly, Grp78 is brought to the cell surface by a specific mechanism, as extracellular Grp78 originating from dead cells cannot stably attach to the cell surface.[32] In addition, a same signal induces or not Grp78 translocation in different cells. For instance, hypoxia enhances Grp78 at the membrane of neurones but not of astrocytes.[39]

Our study also describes a new role for the serine protease tPA. It remains the gold standard treatment for cerebral ischaemia despite its short therapeutic window.[40,41] But since several years, it is clearly admitted that tPA is more than a vascular enzyme with many roles in the cerebral physio pathology.[20] tPA has first been described as a pro-excitotoxic protein,[42] mainly by interacting with the GluN1 subunit of the NMDA receptor.[43] In the meantime, it has also been shown that cerebral tPA was anti-apoptotic.[44] Things seem more complex, as depending of its form, its dose, and its localization tPA can display pro-survival effects on neurones.[21,45] For example, tPA is neuroprotective in a model of glucose privation[46] and a model of cerebral ischaemia,[47] and this effect required NMDA receptors. At the first look, it could seem contradictory with previous findings where tPA interaction with NMDA receptors was detrimental in stroke.[43,48] But in fact it seems that protective effects of tPA are mediated by the activation of synaptic NMDA receptors,[47] while its activation of extrasynaptic receptors leads to excitotoxicity.[49] Here, we identified cell surface Grp78 as a new neuronal receptor of tPA. It's binding leads to negative feedback on the PERK branch activation, resulting in less eIF2α phosphorylation, and more importantly less *CHOP* induction, so less death during ischaemic events. Importance of Grp78 is confirmed by studies using AdoPep1, a peptide identified in the metalloproteinase domain of a disintegrin and metalloproteinase 15 protein (ADAM15), that binds to cell surface Grp78 and inhibits hypoxia-induced apoptosis in endothelial cells and increases Akt phosphorylation and ERK 1/2 activation.[34] Moreover, AdoPep1 also inhibits hypoxia-induced apoptosis in cardiomyocytes and protects cardiac cells during myocardial ischaemia,[50] and also prevents pancreatic β-cells from type 1 diabetes-induced apoptosis.[51] Another compound, BIX (BiP Inducer X), is able to induce the expression of Grp78 through the ATF6 pathway.[52] BIX has been shown to protect neuroblastoma cells from ER stress-induced cell death and to decrease infarct size in rodents following various models of cerebral ischaemia.[52,53] However, none of these studies have investigated the precise localization of the protein.

Overall, we describe here for the first time a PERK-eIF2α-negative feedback due to the activation of cell surface Grp78 by the serine protease tPA. We confirm the translocation of Grp78 from the ER to the neuronal surface, and we validate tPA as a ligand of Grp78. We demonstrate that tPA activation of cell surface Grp78 is capable to mediate beneficial effects on ER stress during cerebral ischaemia independently of its thrombolytic activity. Taken altogether, Grp78 represents an original therapeutic target to decrease the deleterious effects associated to ER stress.

Material and Methods

Reagents. Dulbecco's modified eagle's medium (DMEM), poly-D-lysine, cytosine β-D-arabinoside, fetal bovin serum, horse serum, D-glucose, trans-N,N′-1, 4-Cyclohexanediylbis[2-(4-chlorophenoxy)-acetamide (ISRIB), propidium iodide, tween-20, phosphatase inhibitor cocktail, protease inhibitor cocktail, guanabenz, Tris-HCl, NaCl, Triton-100X paraformaldehyde, sucrose, TRI reagent, hygromycin B, diisopropylethylamine (DIEA), piperidine, trifluoroacetic acid (TFA) and murine thrombin were from Sigma-Aldrich (Saint-Quentin-Fallavier, France). Beetle luciferin substrate was from Promega (Lyon, France). Glutamine, laminin, glucose-free DMEM, Roswell Park Memorial Institute 1640 medium (RPMI), MEM, Lipofectamine 2000, RIPA buffer, Pierce ECL Plus and M-MLV Reverse transcriptase were purchased from Fisher (Illkirch-Graffenstaden, France). AG1478 (N-(3-Chlorophenyl)-6,7-dimethoxy-4-quinazolinanine hydrochloride) was purchased from Tocris (Bristol, UK). Bicinchoninic acid assay (BCA Protein Assay kit) was purchased from Pierce (Rockford, IL, USA). Human recombinant tPA (rtPA actilyse) was from Boehringer Ingelheim (Pacé, France). Human Receptor Associated Protein (RAP) was from Gentaur (Paris, France). 1,5-Dansyl-L-glutamyl-L-glycyl-L-arginine chloromethylketone (dGGACK) and Salubrinal were from Calbiochem (Nottingham, UK). Fmoc-L-amino acid residues were purchased from Senn Chemicals (Dielsdorf, Switzerland). The preloaded 4-hydroxymethyl-phenoxymethyl-copolystyrene-1%-divinylbenzene (HMP) resins and *O*-benzotriazol-1-yl-*N,N,N′,N′*-tetramethyluronium hexafluorophosphate (HBTU) were purchased from Life Technologies (Villebon-sur-Yvette, France). Acetonitrile and *N*-methylpyrrolidone (NMP) were from Biosolve Chimie (Dieuze, France).

Thromboembolic model of stroke. Experiments were performed in accordance with French laws (act no. 87–848; Ministère de l'Agriculture et de la Forêt) and European Communities Council Directives of November 24, 1986 (86/609/EEC) guidelines, and have been approved by the local ethical committee. Experiments were performed following the ARRIVE guidelines (www.nc3rs.org.uk), including randomization and blind analyses. Mice were deeply anaesthetised with 5% isoflurane (Baxter, Paris, France, in a mixture of N_2O/O_2), placed in a stereotaxic device and maintained under anaesthesia for up to 2 h with 2% isoflurane in a 70/30 mixture of N_2O/O_2. Through a skin incision between the right eye and ear, the masseter muscle was excised, and a small craniotomy (diameter 1 mm) was performed on the parietal bone to expose the right middle cerebral artery. Thromboembolic stroke was induced as previously described.[19] Briefly, craniotomy was performed by using cooled drill, then the dura was excised and a pipette filled with murine thrombin (1 UI/μL) was directly inserted in the MCA lumen. One microliter of thrombin was injected to induce thrombus formation. Thrombolysis was induced by intravenous tPA (actilyse 10 mg/kg) administration (10% bolus, 90% over 40 min) 20 min after clot onset. Control animals received intravenous saline injection in the same conditions, and sham animals only had the surgical approach.

Bioluminescence imaging. CARE-Luciferase mice expressing the luciferase reporter gene under the control of the thymidine kinase promoter activated by two Trb3 (tribbles pseudokinase 3) sequences containing the three CARE (C/EBP (CCAAT/enhancer binding protein)—ATF response element) sequences of recognition (black circles on Supplementary Figure 3A) were previously described.[18] Control experiments were performed after a local injection of tunicamycin (a well-known inducer of ER stress, 0.05 μg/g) in their abdomen. As expected, the luciferase signal measured 6 h after the injection of tunicamycin was increased by 20-fold when compared to control non-injected mice (representative images Supplementary Figure 3B and corresponding means Supplementary Figure 3C; $n=6$; $P<0.01$).

Post-stroke bioluminescence imaging was performed using the IVIS Spectrum (PerkinElmer, Villebon-sur-Yvette, France) imaging scanner coupled to the Living Image Software (PerkinElmer). Briefly, 100 mg/kg of *in vivo* luciferase substrate (beetle luciferin substrate, Promega) were injected intraperitoneally into each CARE-Luciferase mouse. Mice were then anaesthetised with isofluorane- and scanned 10 min after luciferin injection. The abdominal cavity was shaved to allow accurate collection of bioluminescence signals. Light emission was quantified with imaging software from constant regions of interest (ROI) drawn manually. Photon emission was measured as radiance in ps-1cm-2sr-1. The sensitivity of the imaging scanner was tested weekly with commercially available positive sources of bioluminescence. Excised brains were imaged immediately after euthanasia using the IVIS Spectrum (PerkinElmer) imaging scanner coupled to the Living Image software (PerkinElmer).

Luciferase biochemical assay. Luciferase assays were performed as previously described.[54] Luciferase activities measured in brain extracts were normalized to protein content (RLU/mg protein) and expressed as fold induction relative to the control condition.

Organotypic hippocampal slice cultures. Seven-day-old mouse pups of either sex were decapitated and their brain collected in PBS containing 5 mg of glucose. Hippocampal slices (400 µm) were prepared using a McIlwain tissue chopper (Brinkmann Instruments, World Precision Instruments, Hitchin, UK) and placed on 0.4 µm Millicell culture inserts (Millipore, Guyancourt, France), as previously described.[24] Slices were maintained in a humidified incubator with 5% CO_2 at 37 °C with 1 ml of MEM containing 20% horse serum, supplemented with 10 mM HEPES and insulin, pH 7.2–7.3.

Neuronal cell cultures. Primary cultures of cortical neurones were prepared from foetal mice (embryonic day 14) as previously described.[55] Cells were cultured on individual glass bottom Petri dishes (MatTek Corporation, Ashland, MA, USA) or 24-well plates, previously coated with poly-D-lysine (0.1 mg/ml) and laminin (0.02 mg/ml), in DMEM supplemented with 5% foetal bovine serum, 5% horse serum and 1 mM glutamine. Cultures were maintained at 37 °C in a humidified 5% CO2 atmosphere. Cytosine β-D-arabinoside (10 μM) was added after 3 days *in vitro* (DIV) to inhibit glial proliferation in the 24-well plates. Oxygen and glucose deprivation was performed after 11-12 DIV.

Oxygen and glucose deprivation (OGD). Hippocampal slices (7 DIV) or neuronal cultures (11-12 DIV) were subjected for various times to OGD in a hypoxic chamber (IN VIVO2 500; Ruskinn, AWEL International, Blain, France) programmed at 1% O_2, 5% CO_2 and 37 °C in glucose/serum-free deoxygenated DMEM. For reoxygenation, media were switched to oxygenated DMEM completed with D-glucose (4.5 mg/l) under normoxic conditions. Controls were subjected to sham washes.

Neuronal death. For hippocampal slices, neuronal death was assessed 24 h after reoxygenation by propidium iodide fluorescence. Propidium iodide (50 μg/μl) was added for 30 min in the medium, washed in PBS and then immersed in fixative buffer during 1 h (4% of paraformaldehyde in 0.1 M PBS, pH 7.4). Images were digitally captured using a Leica SP5 confocal microscope (Leica Microsystems SAS, Nanterre, France) and visualized with LAS AF lite software (Leica) and further quantified using ImageJ 1.45r software (National Institute of Health, Bethesda, MD, USA).

For cortical neurones, neuronal death was quantified 4 h after reoxygenation by measuring the lactate dehydrogenase activity released from damaged cells into the bathing medium with a cytotoxicity detection kit (Roche Diagnostics, Meylan, France).

Immunoblotting. Cells were dissociated in ice-cold TNT buffer (50 mM Tris-HCl pH 7.4; 150 mM NaCl; 0.5% Triton X-100; phosphatase and protease inhibitors cocktails) and centrifuged (12,000 g, 4 °C, 15 min). Protein concentration was measured by BCA Protein Assay method. Proteins (20 µg) were resolved on a 10% SDS-PAGE gel (Bio-rad, Marnes-la-Coquette, France) and transferred onto a polyvinylidene difluoride membrane. Membranes were blocked with PBS+0.1% tween-20, 5% milk and incubated overnight at 4 °C in blocking buffer containing primary antibodies. The following primary antibodies and dilutions were used: mouse anti-elf2α (1/1000; Cell Signaling L57A5; Ozyme, Montigny-le-Bretonneux France), rabbit anti-Phospho-elf2α (1/1000 Cell Signaling 119A11), goat anti-tPA (1/1000; sc5239; Santa-Cruz, Heidelberg, Germany). Membranes were then incubated with the corresponding peroxidase-conjugated secondary antibodies (1/25000; Sigma-Aldrich) in blocking buffer, and visualized with an enhanced chemiluminescence Pierce ECL Plus kit.

Quantitative real-time PCR. Total RNA was isolated from neuronal culture with TRI reagent according to the manufacturer instructions. Total RNA was treated with TURBO DNase (Ambion, Saint Aubin, France) to avoid DNA contamination and quantified by spectrophotometry (NanoDrop Technologies, Wilmington, DE, USA). One µg of total RNA was reverse-transcribed by using the M-MLV Reverse transcriptase according to the manufacturer's instructions with the following cycle conditions: 42 °C (90 min); 85 °C (5 min). RT-qPCR was performed from 1:20 diluted cDNA in iQ SYBR Green Supermix (Bio-Rad; Marnes-la-Coquette, France) containing 500 nM of each primer. Based on mRNA-coding sequences (www.ensembl.org), mouse-specific primers were designed by using the Primer3Plus software (http://www.bioinformatics.nl/cgi-bin/primer3plus/ primer3plus.cgi)[56] (sequences are in Table 1). Assays were run in triplicate on the CFX96 real-time system c1000 thermal cycler (Bio-Rad), with the following cycle conditions: 95 °C (3 min); (95 °C (2 s), 60 °C (20 s)) × 39; 70 °C (30 s). Normalization was performed according to the results of the geNorm analysis (QBase+ software, Biogazelle, Zwijnaarde, Belgium) (Supplementary Figure 4) as previously described.[57]

Immunohistochemistry. Twenty-four hours after ischaemia mice were deeply anaesthetised and transcardially perfused with 0.9% NaCl heparinized followed by a mixture of 4% paraformaldehyde in 0.1 M PBS, pH 7.4 (150 ml). Brains were removed, washed in PBS buffer containing 20% sucrose and frozen in Tissue-Tek (Miles Scientific, Naperville, IL, USA). Coronal sections (10 μm) were cut on a cryostat (Leica CM3050, Leica Microsystems SAS), collected on poly-D-lysine slides, and stored at − 80 °C. Sections were incubated overnight at room temperature with a goat anti-luciferase antibody (1/200; ab81823, Abcam, Cambridge, UK). The secondary F(ab')2 coupled to fluorescein isothiocyanate (FITC; 1:600; Jackson ImmunoResearch, West Grove, PA, USA) was used for visualization under epifluorescence. Washed sections were coverslipped with

Table 1 qPCR primer sequences

Name	Primer (5'–3')	Forward (5'–3')
ATF4	TCCTGAACAGCGAAGTGTTG	ACCCATGAGGTTTCAAGTGC
CHOP	CTGCCTTTCACCTTGGAGAC	CGTTTCCTGGGGATGAGATA
GADD34	AGGACCCCGAGATTCCTCTA	CTTCGATCTCGTGCAAACTG
Grp78	ATAAACCCCGATGAGGCTGT	GGGGACAAACATCAAGCAGT
ActinB	GCAGCTCCTTCGTTGCCGGT	TACAGCCCGGGGAGCATCGT
RPII3A	TACGCTGTGAAGGCATCAAC	GGGAGGGGTTGGTATTCATC

Abbreviation: qPCR, quantitative PCR.

antifade medium containing DAPI. Sections were examined with a microscope (DM6000; Leica Microsystems SAS). Images were digitally captured using a camera (Flash 4.0, Hamamatsu, Iwata, Japan). Images were visualized with Metamorph software (Molecular Devices, Sunnyvale, CA, USA).

Immunocytochemistry. After a brief wash in PBS, neuronal cultures grown on glass bottom Petri dishes were fixed during 5 min in 0.1 M PBS containing 4% paraformaldehyde and 5% sucrose. After PBS washes, cells were blocked for 1 h in PBS-Tween 20 0.1% containing 1% BSA and then incubated overnight at 4 °C in blocking buffer containing primary antibodies (rabbit anti-Phospho-elf2α; 1/50; Cell Signaling #3597, Ozyme; mouse anti-NeuN (Fox3); 1/50; Millipore #MAB377). Primary antibodies were revealed using FITC-coupled secondary F(ab') 2 (1 : 600; Jackson ImmunoResearch). Confocal laser-scanning microscopy was performed using a Leica SP5 confocal microscope (Leica Microsystems SAS).

ER tracker. Cortical neurones in glass bottom Petri dishes at 11 DIV were loaded (30 min at 37 °C) with ER Tracker Blue (10 μM Molecular Probes) before OGD, then washed with fresh serum-free DMEM and observed with LEICA SP5 confocal microscope (Leica Microsystems SAS), visualized with LAS AF lite software (Leica) and analysed with ImageJ 1.45r software (NIH) or Imaris software (Bitplane, Zurich, Switzerland).

Peptide synthesis. Grp78 (Leu^{98}-Leu^{115}) ($Grp78_{(98\text{-}115)}$; LIGRTWNDPSVQGDIKFL) and scramble ($Grp78_{(98\text{-}115)sc}$; GTNKSQDLWIPQLRDVFI) peptides were synthesized (0.1 mmol scale) on Fmoc-Leu-HMP and Fmoc-Ile-HMP resins, respectively, using an Applied Biosystems model 433A automatic peptide synthesizer (Life Technologies; Villebon-sur-Yvette, France) and the standard procedures, as previously described.[58,59] All Fmoc-amino acids (1 mmol, 10 eq.) were coupled by *in situ* activation with HBTU (1.25 mmol, 12.5 eq.) and DIEA (2.5 mmol, 25 eq.) in NMP. Reactive side-chains were protected as follows: Arg, pentamethyldihydrobenzofuran (Pbf) sulfonylamide; Asn and Gln, trityl (Trt) amide; Ser, Thr and Tyr, tert-butyl (tBu) ether; Asp and Glu, *O*-tert-butyl (OtBu) ester; Lys and Trp, tert-butyloxycarbonyl (Boc) carbamate. Peptides were deprotected and cleaved from the resin by trifluoroacetic acid (TFA) as previously described.[60] Crude peptides were purified by reversed-phase HPLC (RP-HPLC) on a Vydac 218TP1022 C18 column (2.2 × 25 cm; Grace Discovery Sciences Alltech, Templemars, France) using a linear gradient (10–60% over 60 min for $Grp78_{(98\text{-}115)sc}$; 10–50% over 55 min for $Grp78_{(98\text{-}115)}$ of acetonitrile/TFA (99.9:0.1, v/v) at a flow rate of 10 ml/min. Peptides were analysed by RP-HPLC on a Vydac 218TP54 C18 column (0.46 × 25 cm; Grace Discovery Sciences Alltech) using a linear gradient (10–60% over 25 min) of acetonitrile/TFA (99.9:0.1, v/v) at a flow rate of 1 ml/min. The purity of peptides was higher than 99.9%. Peptides were characterized by MALDI-TOF mass spectrometry on a Voyager DE-PRO (Applera, France) in the reflector mode with α-cyano-4-hydroxycinnamic acid as a matrix.

Production of radioactive tPA. A human tPA pcDNA5/FRT vector was constructed using a PCR strategy from the pUC19–HutPA vector kindly gifted by Prof. HR Lijnen and checked by automating sequencing. HEK-FlpIn cells (Life Technologies), grown in RPMI 1640 medium supplemented with 10% foetal bovine serum and 2 mM glutamine, were transfected with Lipofectamine 2000. Positive clones were isolated by hygromycin B selection. The quality of the transfection was assessed by quantitative RT-PCR. Transfected HEK cells were grown T300 flasks in the presence of radioactive medium mix (RPMI-1640 medium, 5% foetal bovine serum, 2 mM glutamine, EXPRESS Protein Labelling Mix containing 35S-methionine and 35S-cysteine) during 7 days. Radioactive tPA (tPA*) secreted in the supernatants was purified using a nickel–nitrilotriacetic acid metal-affinity chromatography matrix (Qiagen, Courtaboeuf, France). tPA* was then conditioned in HEPES buffer (0.35 M, pH 7.4) and stored at − 20 °C. Immunoblottings to check tPA production were performed using a polyclonal sheep antiserum raised against human tPA (1:5000) prepared at the National institute for agronomic research (INRA, Clermont-Theix, France), followed by incubation with the appropriate peroxydase-conjugated secondary antibody (Supplementary Figure 5A). Immunoblots were revealed with an enhanced chemoluminescence ECL Plus immunoblotting detection system (PerkinElmer-NEN, Paris, France). To ensure the incorporation of radioactivity, the blotting membrane was revealed by autoradiography by using Cyclone Imager (PerkinElmer) (Supplementary Figure 5B). Importantly, the procedure did not alter the enzymatic amidolytic activity of tPA*, as evidenced by a fluorogenic assay (Spectrofluor FL444, American Diagnostica, Neuville sur Oise, data not shown).

Immunoprecipitation. Cells were lysed in RIPA buffer and lysates were pre-cleared with goat IgG bound to 50% (v/v) Protein G-Sepharose for 1 h at 4 °C. Grp78 or tPA were immunoprecipitated overnight at 4 °C with specific antibodies pre-bound to protein G-sepharose (50% (v/v) protein G-sepharose plus 1 µg of purified antibody at 4 °C for 2 h). The following day, immunocomplexes were washed four times with cold PBS and once with RIPA buffer. Immunocomplexes proteins were recovered in SDS-PAGE loading buffer by heating for 5 min at 90 °C, separated on 10% w/v gel and detected by western blot analysis using antibodies against Grp78 (goat anti-Grp78; 200 μg/ml; Santa Cruz #SC1050).

tPA proteolytic activity assay. tPA* was incubated in the presence of a fluorogenic substrate (5 μM) (Spectrofluor FL444, American Diagnostica). The reaction was carried out at 37 °C in 50 mM Tris (pH 8.0) containing 150 mM NaCl in a total volume of 100 μl. The amidolytic activity was measured as the change in fluorescence emission at 440 nm (excitation at 360 nm).

Statistics. Mean ± S.E.M. were represented on graphs, and analysed with the Mann–Whitney test (GraphPad Prism software).

Conflict of Interest

The authors declare no conflict of interest.

Acknowledgements. This project was supported by the Region Basse-Normandie and the AXA postdoctoral fellowship program, the INSERM, and the university of Caen. We thank Mr Gilbert Pigrée and Mr Maxime Lemarchand for their help with the production of radioactive tPA (IMOGERE platform, University of Caen, France). Thanks to Dr Mario Gonzalez-Gronow for the gift of recombinant Grp78.

1. Ron D, Walter P. Signal integration in the endoplasmic reticulum unfolded protein response. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2007; **8**: 519–529.
2. Walter P, Ron D. The unfolded protein response: from stress pathway to homeostatic regulation. *Science* 2011; **334**: 1081–1086.
3. Szegezdi E, Logue SE, Gorman AM, Samali A. Mediators of endoplasmic reticulum stress-induced apoptosis. *EMBO Rep* 2006; **7**: 880–885.
4. Roussel BD, Kruppa AJ, Miranda E, Crowther DC, Lomas DA, Marciniak SJ. Endoplasmic reticulum dysfunction in neurological disease. *Lancet Neurol* 2013; **12**: 105–118.
5. Harding HP, Zhang Y, Ron D. Protein translation and folding are coupled by an endoplasmic-reticulum-resident kinase. *Nature* 1999; **397**: 271–274.
6. Marciniak SJ, Garcia-Bonilla L, Hu J, Harding HP, Ron D. Activation-dependent substrate recruitment by the eukaryotic translation initiation factor 2 kinase PERK. *J Cell Biol* 2006; **172**: 201–209.
7. Harding HP, Zhang Y, Zeng H, Novoa I, Lu PD, Calfon M *et al.* An integrated stress response regulates amino acid metabolism and resistance to oxidative stress. *Mol Cell* 2003; **11**: 619–633.
8. Marciniak SJ, Yun CY, Oyadomari S, Novoa I, Zhang Y, Jungreis R *et al.* CHOP induces death by promoting protein synthesis and oxidation in the stressed endoplasmic reticulum. *Genes Dev* 2004; **18**: 3066–3077.
9. Mollereau B, Rzechorzek NM, Roussel BD, Sedru M, Van den Brink DM, Bailly-Maitre B *et al.* Adaptive preconditioning in neurological diseases - therapeutic insights from proteostatic perturbations. *Brain Res* 2016; **1648**: 603–616.
10. Rissanen A, Sivenius J, Jolkkonen J. Prolonged bihemispheric alterations in unfolded protein response related gene expression after experimental stroke. *Brain Res* 2006; **1087**: 60–66.
11. Nakka VP, Gusain A, Raghubir R. Endoplasmic reticulum stress plays critical role in brain damage after cerebral ischemia/reperfusion in rats. *Neurotox Res* 2010; **17**: 189–202.
12. Szydlowska K, Tymianski M. Calcium, ischemia and excitotoxicity. *Cell Calcium* 2010; **47**: 122–129.
13. Qi X, Okuma Y, Hosoi T, Nomura Y. Edaravone protects against hypoxia/ischemia-induced endoplasmic reticulum dysfunction. *J Pharmacol Exp Ther* 2004; **311**: 388–393.
14. Tajiri S, Oyadomari S, Yano S, Morioka M, Gotoh T, Hamada JI *et al.* Ischemia-induced neuronal cell death is mediated by the endoplasmic reticulum stress pathway involving CHOP. *Cell Death Differ* 2004; **11**: 403–415.
15. Hayashi T, Saito A, Okuno S, Ferrand-Drake M, Dodd RL, Chan PH. Damage to the endoplasmic reticulum and activation of apoptotic machinery by oxidative stress in ischemic neurons. *J Cereb Blood Flow Metab* 2005; **25**: 41–53.
16. Paschen W, Hayashi T, Saito A, Chan PH. GADD34 protein levels increase after transient ischemia in the cortex but not in the CA1 subfield: implications for post-ischemic recovery of protein synthesis in ischemia-resistant cells. *J Neurochem* 2004; **90**: 694–701.
17. McCaig D, Imai H, Gallagher L, Graham DI, Harland J, Moira Brown S *et al.* Evolution of GADD34 expression after focal cerebral ischaemia. *Brain Res* 2005; **1034**: 51–61.

18. Chaveroux C, Carraro V, Canaple L, Averous J, Maurin AC, Jousse C *et al. In vivo* imaging of the spatiotemporal activity of the eIF2alpha-ATF4 signaling pathway: Insights into stress and related disorders. *Sci Signal* 2015; **8**: rs5.
19. Orset C, Macrez R, Young AR, Panthou D, Angles-Cano E, Maubert E *et al.* Mouse model of *in situ* thromboembolic stroke and reperfusion. *Stroke* 2007; **38**: 2771–2778.
20. Chevilley A, Lesept F, Lenoir S, Ali C, Parcq J, Vivien D. Impacts of tissue-type plasminogen activator (tPA) on neuronal survival. *Front Cell Neurosci* 2015; **9**: 415.
21. Yepes M. Tissue-type plasminogen activator is a neuroprotectant in the central nervous system. *Front Cell Neurosci* 2015; **9**: 304.
22. Yepes M, Roussel BD, Ali C, Vivien D. Tissue-type plasminogen activator in the ischemic brain: more than a thrombolytic. *Trends Neurosci* 2009; **32**: 48–55.
23. Correa F, Gauberti M, Parcq J, Macrez R, Hommet Y, Obiang P *et al.* Tissue plasminogen activator prevents white matter damage following stroke. *J Exp Med* 2011; **208**: 1229–1242.
24. Lemarchand E, Maubert E, Haelewyn B, Ali C, Rubio M, Vivien D. Stressed neurons protect themselves by a tissue-type plasminogen activator-mediated EGFR-dependent mechanism. *Cell Death Differ* 2015.
25. Zhang X, Polavarapu R, She H, Mao Z, Yepes M. Tissue-type plasminogen activator and the low-density lipoprotein receptor-related protein mediate cerebral ischemia-induced nuclear factor-kappaB pathway activation. *Am J Pathol* 2007; **171**: 1281–1290.
26. An J, Zhang C, Polavarapu R, Zhang X, Yepes M. Tissue-type plasminogen activator and the low-density lipoprotein receptor-related protein induce Akt phosphorylation in the ischemic brain. *Blood* 2008; **112**: 2787–2794.
27. Gonzalez-Gronow M, Selim MA, Papalas J, Pizzo SV. GRP78: a multifunctional receptor on the cell surface. *Antioxid Redox Signal* 2009; **11**: 2299–2306.
28. Tsai YL, Zhang Y, Tseng CC, Stanciauskas R, Pinaud F, Lee AS. Characterization and mechanism of stress-induced translocation of 78-kilodalton glucose-regulated protein (GRP78) to the cell surface. *J Biol Chem* 2015; **290**: 8049–8064.
29. Gonzalez-Gronow M, Gomez CF, de Ridder GG, Ray R, Pizzo SV. Binding of tissue-type plasminogen activator to the glucose-regulated protein 78 (GRP78) modulates plasminogen activation and promotes human neuroblastoma cell proliferation *in vitro*. *J Biol Chem* 2014; **289**: 25166–25176.
30. Kumar R, Azam S, Sullivan JM, Owen C, Cavener DR, Zhang P *et al.* Brain ischemia and reperfusion activates the eukaryotic initiation factor 2alpha kinase, PERK. *J Neurochem* 2001; **77**: 1418–1421.
31. Owen CR, Kumar R, Zhang P, McGrath BC, Cavener DR, Krause GS. PERK is responsible for the increased phosphorylation of eIF2alpha and the severe inhibition of protein synthesis after transient global brain ischemia. *J Neurochem* 2005; **94**: 1235–1242.
32. Zhang Y, Liu R, Ni M, Gill P, Lee AS. Cell surface relocalization of the endoplasmic reticulum chaperone and unfolded protein response regulator GRP78/BiP. *J Biol Chem* 2010; **285**: 15065–15075.
33. Hardy B, Battler A, Weiss C, Kudasi O, Raiter A. Therapeutic angiogenesis of mouse hind limb ischemia by novel peptide activating GRP78 receptor on endothelial cells. *Biochem Pharmacol* 2008; **75**: 891–899.
34. Raiter A, Weiss C, Bechor Z, Ben-Dor I, Battler A, Kaplan B *et al.* Activation of GRP78 on endothelial cell membranes by an ADAM15-derived peptide induces angiogenesis. *J Vasc Res* 2010; **47**: 399–411.
35. Misra UK, Gonzalez-Gronow M, Gawdi G, Hart JP, Johnson CE, Pizzo SV. The role of Grp 78 in alpha 2-macroglobulin-induced signal transduction. Evidence from RNA interference that the low density lipoprotein receptor-related protein is associated with, but not necessary for, GRP 78-mediated signal transduction. *J Biol Chem* 2002; **277**: 42082–42087.
36. Gonzalez-Gronow M, Kaczowka SJ, Payne S, Wang F, Gawdi G, Pizzo SV. Plasminogen structural domains exhibit different functions when associated with cell surface GRP78 or the voltage-dependent anion channel. *J Biol Chem* 2007; **282**: 32811–32820.
37. Jindadamrongwech S, Thepparit C, Smith DR. Identification of GRP 78 (BiP) as a liver cell expressed receptor element for dengue virus serotype 2. *Arch Virol* 2004; **149**: 915–927.
38. Triantafilou K, Fradelizi D, Wilson K, Triantafilou M. GRP78, a coreceptor for coxsackievirus A9, interacts with major histocompatibility complex class I molecules which mediate virus internalization. *J Virol* 2002; **76**: 633–643.
39. Goldenberg-Cohen N, Raiter A, Gaydar V, Dratviman-Storobinsky O, Goldstein T, Weizman A *et al.* Peptide-binding GRP78 protects neurons from hypoxia-induced apoptosis. *Apoptosis* 2012; **17**: 278–288.
40. Tissue plasminogen activator for acute ischemic stroke. The National Institute of Neurological Disorders and Stroke rt-PA Stroke Study Group. *N Engl J Med* 1995; **333**: 1581–1587.
41. Kim JT, Fonarow GC, Smith EE, Reeves MJ, Navalkele DD, Grotta JC *et al.* Treatment with TPA in the "Golden Hour" and the shape of the 4.5 hour time-benefit curve in the National US Get With The Guidelines-Stroke Population. *Circulation* 2016; **135**: 128–139.
42. Tsirka SE, Gualandris A, Amaral DG, Strickland S. Excitotoxin-induced neuronal degeneration and seizure are mediated by tissue plasminogen activator. *Nature* 1995; **377**: 340–344.
43. Nicole O, Docagne F, Ali C, Margaill I, Carmeliet P, MacKenzie ET *et al.* The proteolytic activity of tissue-plasminogen activator enhances NMDA receptor-mediated signaling. *Nat Med* 2001; **7**: 59–64.
44. Liot G, Roussel BD, Lebeurrier N, Benchenane K, Lopez-Atalaya JP, Vivien D *et al.* Tissue-type plasminogen activator rescues neurones from serum deprivation-induced apoptosis through a mechanism independent of its proteolytic activity. *J Neurochem* 2006; **98**: 1458–1464.
45. Parcq J, Bertrand T, Montagne A, Baron AF, Macrez R, Billard JM *et al.* Unveiling an exceptional zymogen: the single-chain form of tPA is a selective activator of NMDA receptor-dependent signaling and neurotoxicity. *Cell Death Differ* 2012; **19**: 1983–1991.
46. Wu F, Nicholson AD, Haile WB, Torre E, An J, Chen C *et al.* Tissue-type plasminogen activator mediates neuronal detection and adaptation to metabolic stress. *J Cereb Blood Flow Metab* 2013; **33**: 1761–1769.
47. Wu F, Echeverry R, Wu J, An J, Haile WB, Cooper DS *et al.* Tissue-type plasminogen activator protects neurons from excitotoxin-induced cell death via activation of the ERK1/2-CREB-ATF3 signaling pathway. *Mol Cell Neurosci* 2013; **52**: 9–19.
48. Wang YF, Tsirka SE, Strickland S, Stieg PE, Soriano SG, Lipton SA. Tissue plasminogen activator (tPA) increases neuronal damage after focal cerebral ischemia in wild-type and tPA-deficient mice. *Nat Med* 1998; **4**: 228–231.
49. Lesept F, Chevilley A, Jezequel J, Ladepeche L, Macrez R, Aimable M *et al.* Tissue-type plasminogen activator controls neuronal death by raising surface dynamics of extrasynaptic NMDA receptors. *Cell Death Dis* 2016; **7**: e2466.
50. Hardy B, Raiter A. Peptide-binding heat shock protein GRP78 protects cardiomyocytes from hypoxia-induced apoptosis. *J Mol Med (Berl)* 2010; **88**: 1157–1167.
51. Raiter A, Tenenbaum A, Yackobovitch-Gavan M, Battler A, Hardy B. Peptide binding glucose regulated protein 78 improves type 1 diabetes by preventing pancreatic beta cell apoptosis. *Exp Clin Endocrinol Diabetes* 2016; **124**: 239–245.
52. Kudo T, Kanemoto S, Hara H, Morimoto N, Morihara T, Kimura R *et al.* A molecular chaperone inducer protects neurons from ER stress. *Cell Death Differ* 2008; **15**: 364–375.
53. Oida Y, Hamanaka J, Hyakkoku K, Shimazawa M, Kudo T, Imaizumi K *et al.* Post-treatment of a BiP inducer prevents cell death after middle cerebral artery occlusion in mice. *Neurosci Lett* 2010; **484**: 43–46.
54. B'Chir W, Maurin AC, Carraro V, Averous J, Jousse C, Muranishi Y *et al.* The eIF2alpha/ATF4 pathway is essential for stress-induced autophagy gene expression. *Nucleic Acids Res* 2013; **41**: 7683–7699.
55. Baron A, Montagne A, Casse F, Launay S, Maubert E, Ali C *et al.* NR2D-containing NMDA receptors mediate tissue plasminogen activator-promoted neuronal excitotoxicity. *Cell Death Differ* 2010; **17**: 860–871.
56. Rozen S, Skaletsky H. Primer3 on the WWW for general users and for biologist programmers. *Methods Mol Biol* 2000; **132**: 365–386.
57. Bruckert G, Vivien D, Docagne F, Roussel BD. Normalization of reverse transcription quantitative PCR data during ageing in distinct cerebral structures. *Mol Neurobiol* 2015; **53**: 1540–1550.
58. Leprince J, Gandolfo P, Thoumas JL, Patte C, Fauchere JL, Vaudry H *et al.* Structure-activity relationships of a series of analogues of the octadecaneuropeptide ODN on calcium mobilization in rat astrocytes. *J Med Chem* 1998; **41**: 4433–4438.
59. Leprince J, Oulyadi H, Vaudry D, Masmoudi O, Gandolfo P, Patte C *et al.* Synthesis, conformational analysis and biological activity of cyclic analogs of the octadecaneuropeptide ODN. Design of a potent endozepine antagonist. *Eur J Biochem* 2001; **268**: 6045–6057.
60. Chatenet D, Dubessy C, Boularan C, Scalbert E, Pfeiffer B, Renard P *et al.* Structure-activity relationships of a novel series of urotensin II analogues: identification of a urotensin II antagonist. *J Med Chem* 2006; **49**: 7234–7238.

Supplementary Information accompanies this paper on Cell Death and Differentiation website (http://www.nature.com/cdd)

Bibliographie

A

Adams H P, 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.

Adams Harold P, Effron MB, Torner J, Dávalos A, Frayne J, Teal P, … AbESTT-II Investigators (2008) Emergency administration of abciximab for treatment of patients with acute ischemic stroke: results of an international phase III trial: Abciximab in Emergency Treatment of Stroke Trial (AbESTT-II). *Stroke* **39**, 87–99.

Adhami F, Liao G, Morozov YM, Schloemer A, Schmithorst VJ, Lorenz JN, … Kuan C-Y (2006) Cerebral ischemia-hypoxia induces intravascular coagulation and autophagy. *Am J Pathol* **169**, 566–83.

Agrotis A, Pengo N, Burden JJ, and Ketteler R (2019) Redundancy of human ATG4 protease isoforms in autophagy and LC3/GABARAP processing revealed in cells *Autophagy* **15**, 976–997.

Ahumada-Castro U, Silva-Pavez E, Lovy A, Pardo E, Molgó J, and Cárdenas C (2019) MTOR-independent autophagy induced by interrupted endoplasmic reticulum-mitochondrial Ca $^{2+}$ communication: a dead end in cancer cells *Autophagy* **15**, 358–361.

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.

Albrechtsen OK (1957) The fibrinolytic activity of animal tissues. *Acta Physiol Scand* **39**, 284–90.

Alessi MC, Declerck PJ, De Mol M, Nelles L, and Collen D (1988) Purification and characterization of natural and recombinant human plasminogen activator inhibitor-1 (PAI-1). *Eur J Biochem* **175**, 531–40.

Althausen S, Mengesdorf T, Mies G, Oláh L, Nairn AC, Proud CG, and Paschen W (2001) Changes in the phosphorylation of initiation factor eIF-2α, elongation factor eEF-2 and p70 S6 kinase after transient focal cerebral ischaemia in mice *J Neurochem* **78**, 779–787.

Amin P, Florez M, Najafov A, Pan H, Geng J, Ofengeim D, … Yuan J (2018) Regulation of a distinct activated RIPK1 intermediate bridging complex I and complex II in TNFα-mediated apoptosis *Proc Natl Acad Sci* **115**, E5944–E5953.

Anagli J, Han Y, Stewart L, Yang D, Movsisyan A, Abounit K, and Seyfried D (2009) A novel calpastatin-based inhibitor improves postischemic neurological recovery *Biochem Biophys Res Commun* **385**, 94–99.

Anderson CS, Robinson T, Lindley RI, Arima H, Lavados PM, Lee T-H, … Chalmers J (2016) Low-Dose versus Standard-Dose Intravenous Alteplase in Acute Ischemic Stroke *N Engl J Med* **374**, 2313–2323.

Angles-Cano E, Balaton A, Le Bonniec B, Genot E, Elion J, and Sultan Y (1985) Production of monoclonal antibodies to the high fibrin-affinity, tissue-type plasminogen activator of human plasma. Demonstration of its endothelial origin by immunolocalization. *Blood* **66**, 913–20.

Arauz A, Murillo L, Cantú C, Barinagarrementeria F, and Higuera J (2003) Prospective study of single and multiple lacunar infarcts using magnetic resonance imaging: risk factors, recurrence, and outcome in 175 consecutive cases. *Stroke* **34**, 2453–8.

Arsov I, Adebayo A, Kucerova-Levisohn M, Haye J, MacNeil M, Papavasiliou FN, … Ortiz BD (2011) A Role for Autophagic Protein Beclin 1 Early in Lymphocyte Development *J Immunol* **186**, 2201–2209.

Ashford TP, and Porter KR (1962) Cytoplasmic components in hepatic cell lysosomes. *J Cell Biol* **12**, 198–202.

Astedt B, Lindoff C, and Lecander I (1998) Significance of the plasminogen activator inhibitor of placental type (PAI-2) in pregnancy. *Semin Thromb Hemost* **24**, 431–5.

Astrup J, Siesjö BK, and Symon L (n.d.) Thresholds in cerebral ischemia - the ischemic penumbra. *Stroke* **12**, 723–5.

Astrup T, and Stage A (1952) Isolation of a soluble fibrinolytic activator from animal tissue. *Nature* **170**, 929.

Axe EL, Walker SA, Manifava M, Chandra P, Roderick HL, Habermann A, … Ktistakis NT (2008) Autophagosome formation from membrane compartments enriched in phosphatidylinositol 3-phosphate and dynamically connected to the endoplasmic reticulum. *J Cell Biol* **182**, 685–701.

Ay H, Oliveira-Filho J, Buonanno FS, Ezzeddine M, Schaefer PW, Rordorf G, … Koroshetz WJ (1999) Diffusion-weighted imaging identifies a subset of lacunar infarction associated with embolic source. *Stroke* **30**, 2644–50.

B

B'chir W, Maurin A-C, Carraro V, Averous J, Jousse C, Muranishi Y, … Bruhat A (2013) The eIF2α/ATF4 pathway is essential for stress-induced autophagy gene expression. *Nucleic Acids Res* **41**, 7683–99.

Badr CE, Wurdinger T, Nilsson J, Niers JM, Whalen M, Degterev A, and Tannous BA (2011) Lanatoside C sensitizes glioblastoma cells to tumor necrosis factor–related apoptosis-inducing ligand and induces an alternative cell death pathway *Neuro Oncol* **13**, 1213–1224.

Baek S-H, Noh AR, Kim K-A, Akram M, Shin Y-J, Kim E-S, … Bae O-N (2014) Modulation of mitochondrial function and autophagy mediates carnosine neuroprotection against ischemic brain damage. *Stroke* **45**, 2438–2443.

Bake S, Selvamani A, Cherry J, and Sohrabji F (2014) Blood Brain Barrier and Neuroinflammation Are Critical Targets of IGF-1-Mediated Neuroprotection in Stroke for Middle-Aged Female Rats *PLoS One* **9**, e91427.

Baker JB, and Gronke RS (1986) Protease nexins and cellular regulation. *Semin Thromb Hemost* **12**, 216–20.

Bamford JM, and Warlow CP (1988) Evolution and testing of the lacunar hypothesis. *Stroke* **19**, 1074–82.

Banerjee C, and Chimowitz MI (2017) Stroke Caused by Atherosclerosis of the Major Intracranial Arteries. *Circ Res* **120**, 502–513.

Bang P, and Fielder PJ (1997) Human Pregnancy Serum Contains at Least Two Distinct Proteolytic Activities with the Ability To Degrade Insulin-Like Growth Factor Binding Protein-3 [1] *Endocrinology* **138**, 3912–3917.

Bao L, Li R-H, Li M, Jin M-F, Li G, Han X, … Feng X (2017) Autophagy-regulated AMPAR subunit upregulation in in vitro oxygen glucose deprivation/reoxygenation-induced hippocampal injury. *Brain Res* **1668**, 65–71.

Baranes D, Lederfein D, Huang YY, 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**, 813–25.

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.

Baron JC, Bousser MG, Comar D, Soussaline F, and Castaigne P (1981) Noninvasive tomographic study of cerebral blood flow and oxygen metabolism in vivo. Potentials, limitations, and clinical applications in cerebral ischemic disorders. *Eur Neurol* **20**, 273–84.

Becker K, Kindrick D, Relton J, Harlan J, and Winn R (2001) Antibody to the alpha4 integrin decreases infarct size in transient focal cerebral ischemia in rats. *Stroke* **32**, 206–11.

Bellolio MF, Gilmore RM, and Ganti L (2014) Insulin for glycaemic control in acute ischaemic stroke *Cochrane Database Syst Rev*.

Bellot G, Garcia-Medina R, Gounon P, Chiche J, Roux D, Pouysségur J, and Mazure NM (2009) Hypoxia-induced autophagy is mediated through hypoxia-inducible factor induction of BNIP3 and BNIP3L via their BH3 domains. *Mol Cell Biol* **29**, 2570–81.

Benavides A, Pastor D, Santos P, Tranque P, and Calvo S (2005) CHOP plays a pivotal role in the astrocyte death induced by oxygen and glucose deprivation *Glia* **52**, 261–275.

Benchenane K, Berezowski V, Fernández-Monreal M, Brillault J, Valable S, Dehouck M-P, … 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**, 1065–70.

Benchenane K, Castel H, Boulouard M, Bluthé R, Fernandez-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**, 578–85.

Benjamin EJ, Muntner P, Alonso A, Bittencourt MS, Callaway CW, Carson AP, … American Heart Association Council on Epidemiology and Prevention Statistics Committee and Stroke Statistics Subcommittee (2019) Heart Disease and Stroke Statistics—2019 Update: A Report From the American Heart Association *Circulation* **139**, e56–e528.

Berkhemer OA, Fransen PSS, Beumer D, van den Berg LA, Lingsma HF, Yoo AJ, … Dippel DWJ (2015) A Randomized Trial of Intraarterial Treatment for Acute Ischemic Stroke *N Engl J Med* **372**, 11–20.

Bertrand T, Lesept F, Chevilley 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**, e1924.

Bhatia R, Hill MD, Shobha N, Menon B, Bal S, Kochar P, … Demchuk AM (2010) Low Rates of Acute Recanalization With Intravenous Recombinant Tissue Plasminogen Activator in Ischemic Stroke *Stroke* **41**, 2254–2258.

Biazik J, Ylä-Anttila P, Vihinen H, Jokitalo E, and Eskelinen E-L (2015) Ultrastructural relationship of the phagophore with surrounding organelles. *Autophagy* **11**, 439–51.

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.

Birgisdottir ÅB, Lamark T, and Johansen T (2013) The LIR motif - crucial for selective autophagy *J Cell Sci* **126**, 3237–3247.

Birnbaumer L, Campbell KP, Catterall WA, Harpold MM, Hofmann F, Horne WA, … Tanabe T (1994) The naming of voltage-gated calcium channels. *Neuron* **13**, 505–6.

Blat C, Villaudy J, and Binoux M (1994) In vivo proteolysis of serum insulin-like growth factor (IGF) binding protein-3 results in increased availability of IGF to target cells. *J Clin Invest* **93**, 2286–2290.

Bliss T V, 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* **232**, 331–56.

Blommaart EFC, Krause U, Schellens JPM, Vreeling-Sindelarova H, and Meijer AJ (1997) The Phosphatidylinositol 3-Kinase Inhibitors Wortmannin and LY294002 Inhibit Autophagy in Isolated Rat Hepatocytes *Eur J Biochem* **243**, 240–246.

Blum WF, Albertsson-Wikland K, Rosberg S, and Ranke MB (1993) Serum levels of insulin-like growth factor I (IGF-I) and IGF binding protein 3 reflect spontaneous growth hormone secretion. *J Clin Endocrinol Metab* **76**, 1610–1616.

Bonapace L, Bornhauser BC, Schmitz M, Cario G, Ziegler U, Niggli FK, … Bourquin J-P (2010) Induction of autophagy-dependent necroptosis is required for childhood acute lymphoblastic leukemia cells to overcome glucocorticoid resistance *J Clin Invest* **120**, 1310.

Bonfoco E, Krainc D, Ankarcrona M, Nicotera P, and Lipton SA (1995) Apoptosis and necrosis: two distinct events induced, respectively, by mild and intense insults with N-methyl-D-aspartate or nitric oxide/superoxide in cortical cell cultures. *Proc Natl Acad Sci U S A* **92**, 7162–6.

Boose JA, Kuismanen E, Gerard R, Sambrook J, and Gething MJ (1989) The single-chain form of tissue-type plasminogen activator has catalytic activity: studies with a mutant enzyme that lacks the cleavage site. *Biochemistry* **28**, 635–43.

Booth BA, Boes M, and Bar RS (1996) IGFBP-3 proteolysis by plasmin, thrombin, serum: heparin binding, IGF binding, and structure of fragments *Am J Physiol Metab* **271**, E465–E470.

Boulaftali Y, Ho-Tin-Noe B, Pena A, Loyau S, Venisse L, François D, … Bouton M-C (2011) Platelet protease nexin-1, a serpin that strongly influences fibrinolysis and thrombolysis. *Circulation* **123**, 1326–34.

Bouton M-C, Boulaftali Y, Richard B, Arocas V, Michel J-B, and Jandrot-Perrus M (2012) Emerging role of serpinE2/protease nexin-1 in hemostasis and vascular biology *Blood* **119**, 2452–2457.

Boya P, Gonzalez-Polo R-A, Casares N, Perfettini J-L, Dessen P, Larochette N, … Kroemer G (2005) Inhibition of Macroautophagy Triggers Apoptosis *Mol Cell Biol* **25**, 1025–1040.

Brakman P, and Astrup T (1963) Selective inhibition in human pregnancy blood of urokinase induced fibrinolysis. *Scand J Clin Lab Invest* **15**, 603–9.

Broughton BRS, Reutens DC, and Sobey CG (2009) Apoptotic mechanisms after cerebral ischemia. *Stroke* **40**, e331-9.

Brouns R, Wauters A, De Surgeloose D, Mariën P, and De Deyn PP (2011) Biochemical Markers for Blood-Brain Barrier Dysfunction in Acute Ischemic Stroke Correlate with Evolution and Outcome *Eur Neurol* **65**, 23–31.

Bu G, Morton PA, and Schwartz AL (1992) Identification and partial characterization by chemical cross-linking of a binding protein for tissue-type plasminogen activator (t-PA) on rat hepatoma cells. A plasminogen activator inhibitor type 1-independent t-PA receptor. *J Biol Chem* **267**, 15595–602.

Buckley KM, Hess DL, Sazonova IY, Periyasamy-Thandavan S, Barrett JR, Kirks R, … Hill WD (2014) Rapamycin up-regulation of autophagy reduces infarct size and improves outcomes in both permanent MCAL, and embolic MCAO, murine models of stroke. *Exp Transl Stroke Med* **6**, 8.

Budanov A V., and Karin M (2008) p53 Target Genes Sestrin1 and Sestrin2 Connect Genotoxic Stress and mTOR Signaling *Cell* **134**, 451–460.

Budanov A V, Shoshani T, Faerman A, Zelin E, Kamer I, Kalinski H, … Feinstein E (2002) Identification of a novel stress-responsive gene Hi95 involved in regulation of cell viability *Oncogene* **21**, 6017–6031.

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.

Bustamante A, Ning M, García-Berrocoso T, Penalba A, Boada C, Simats A, … Montaner J (2018) Usefulness of ADAMTS13 to predict response to recanalization therapies in acute ischemic stroke *Neurology* **90**, e995–e1004.

C

Cai Q, Lu L, Tian J-H, Zhu Y-B, Qiao H, and Sheng Z-H (2010) Snapin-regulated late endosomal transport is critical for efficient autophagy-lysosomal function in neurons. *Neuron* **68**, 73–86.

Cai Z, Jitkaew S, Zhao J, Chiang H-C, Choksi S, Liu J, … Liu Z-G (2014) Plasma membrane translocation of trimerized MLKL protein is required for TNF-induced necroptosis *Nat Cell Biol* **16**, 55–65.

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**, 1002–12.

Calfon M, Zeng H, Urano F, Till JH, Hubbard SR, Harding HP, … Ron D (2002) IRE1 couples endoplasmic reticulum load to secretory capacity by processing the XBP-1 mRNA *Nature* **415**, 92–96.

Campbell BCV, Mitchell PJ, Kleinig TJ, Dewey HM, Churilov L, Yassi N, … Davis SM (2015) Endovascular Therapy for Ischemic Stroke with Perfusion-Imaging Selection *N Engl J Med* **372**, 1009–1018.

Campbell BC V, Mitchell PJ, Churilov L, Yassi N, Kleinig TJ, Dowling RJ, … EXTEND-IA TNK Investigators (2018) Tenecteplase versus Alteplase before Thrombectomy for Ischemic Stroke. *N Engl J Med* **378**, 1573–1582.

Cao B, Li J, Zhou X, Juan J, Han K, Zhang Z, … Mao X (2015) Clioquinol induces pro-death autophagy in leukemia and myeloma cells by disrupting the mTOR signaling pathway *Sci Rep* **4**, 5749.

Cao Y, Wang Y, Abi Saab WF, Yang F, Pessin JE, and Backer JM (2014) NRBF2 regulates macroautophagy as a component of Vps34 Complex I *Biochem J* **461**, 315–322.

Cardoso CMP, Groth-Pedersen L, Høyer-Hansen M, Kirkegaard T, Corcelle E, Andersen JS, … Nylandsted J (2009) Depletion of Kinesin 5B Affects Lysosomal Distribution and Stability and Induces Peri-Nuclear Accumulation of Autophagosomes in Cancer Cells *PLoS One* **4**, e4424.

Carloni S, Albertini MC, Galluzzi L, Buonocore G, Proietti F, and Balduini W (2014) Increased autophagy reduces endoplasmic reticulum stress after neonatal hypoxia-ischemia: role of protein synthesis and autophagic pathways. *Exp Neurol* **255**, 103–12.

Carloni S, Buonocore G, and Balduini W (2008) Protective role of autophagy in neonatal hypoxia-ischemia induced brain injury. *Neurobiol Dis* **32**, 329–39.

Carloni S, Girelli S, Scopa C, Buonocore G, Longini M, and Balduini W (2010) Activation of autophagy and Akt/CREB signaling play an equivalent role in the neuroprotective effect of rapamycin in neonatal hypoxia-ischemia. *Autophagy* **6**, 366–77.

Carloni S, Riparini G, Buonocore G, and Balduini W (2017) Rapid modulation of the silent information regulator 1 by melatonin after hypoxia-ischemia in the neonatal rat brain. *J Pineal Res* **63**, e12434.

Carlson K-SB, Nguyen L, Schwartz K, Lawrence DA, and Schwartz BS (2016) Neuroserpin Differentiates Between Forms of Tissue Type Plasminogen Activator via pH Dependent Deacylation. *Front Cell Neurosci* **10**, 154.

Carrière A, Cargnello M, Julien L-A, Gao H, Bonneil É, Thibault P, and Roux PP (2008) Oncogenic MAPK Signaling Stimulates mTORC1 Activity by Promoting RSK-Mediated Raptor Phosphorylation *Curr Biol* **18**, 1269–1277.

Casas C (2017) GRP78 at the Centre of the Stage in Cancer and Neuroprotection *Front Neurosci* **11**, 177.

Casse F, Bardou I, Danglot L, Briens A, Montagne A, Parcq J, … Docagne F (2012) Glutamate Controls tPA Recycling by Astrocytes, Which in Turn Influences Glutamatergic Signals *J Neurosci* **32**, 5186–5199.

Castellano BM, Thelen AM, Moldavski O, Feltes M, van der Welle REN, Mydock-McGrane L, … Zoncu R (2017) Lysosomal cholesterol activates mTORC1 via an SLC38A9-Niemann-Pick C1 signaling complex. *Science* **355**, 1306–1311.

Castillo K, Valenzuela V, Matus S, Nassif M, Oñate M, Fuentealba Y, … Hetz C (2013) Measurement of autophagy flux in the nervous system in vivo *Cell Death Dis* **4**, e917–e917.

Chai Q, Wang X, Qiang L, Zhang Y, Ge P, Lu Z, … Liu CH (2019) A Mycobacterium tuberculosis surface protein recruits ubiquitin to trigger host xenophagy *Nat Commun* **10**, 1973.

Chang D-I, Hosomi N, Lucero J, Heo J-H, Abumiya T, Mazar AP, and del Zoppo GJ (2003) Activation systems for latent matrix metalloproteinase-2 are upregulated immediately after focal cerebral ischemia. *J Cereb Blood Flow Metab* **23**, 1408–19.

Chapin JC, and Hajjar KA (2015) Fibrinolysis and the control of blood coagulation *Blood Rev* **29**, 17–24.

Chappell LC, Seed PT, Briley A, Kelly FJ, Hunt BJ, Charnock-Jones DS, … Poston L (2002) A longitudinal study of biochemical variables in women at risk of preeclampsia *Am J Obstet Gynecol* **187**, 127–136.

Chauhan A, Sharma U, Jagannathan NR, Reeta KH, and Gupta YK (2011) Rapamycin protects against middle cerebral artery occlusion induced focal cerebral ischemia in rats. *Behav Brain Res* **225**, 603–9.

Chen D, Fan W, Lu Y, Ding X, Chen S, and Zhong Q (2012) A Mammalian Autophagosome Maturation Mechanism Mediated by TECPR1 and the Atg12-Atg5 Conjugate *Mol Cell* **45**, 629–641.

Chen J, Nagayama T, Jin K, Stetler RA, Zhu RL, Graham SH, and Simon RP (1998) Induction of caspase-3-like protease may mediate delayed neuronal death in the hippocampus after transient cerebral ischemia. *J Neurosci* **18**, 4914–28.

Chen Jianhao, Du H, Zhang Y, Chen H, Zheng M, Lin P, … Liu N (2017) Netrin-1 Prevents Rat Primary Cortical Neurons from Apoptosis via the DCC/ERK Pathway *Front Cell Neurosci* **11**, 387.

Chen L, Xu S, Liu L, Wen X, Xu Y, Chen J, and Teng J (2014) Cab45S inhibits the ER stress-induced IRE1-JNK pathway and apoptosis via GRP78/BiP. *Cell Death Dis* **5**, e1219.

Chen M, Hong MJ, Sun H, Wang L, Shi X, Gilbert BE, … Wang J (2014) Essential role for autophagy in the maintenance of immunological memory against influenza infection *Nat Med* **20**, 503–510.

Chen R, Ovbiagele B, and Feng W (2016) Diabetes and Stroke: Epidemiology, Pathophysiology, Pharmaceuticals and Outcomes *Am J Med Sci* **351**, 380–386.

Chen Yong, Hallenbeck JM, Ruetzler C, Bol D, Thomas K, Berman NEJ, and Vogel SN (2003) Overexpression of monocyte chemoattractant protein 1 in the brain exacerbates ischemic brain injury and is associated with recruitment of inflammatory cells. *J Cereb Blood Flow Metab* **23**, 748–55.

Chen Yuhong, Zheng Y, and Foster DA (2003) Phospholipase D confers rapamycin resistance in human breast cancer cells *Oncogene* **22**, 3937–3942.

Chen Z, Mou R, Feng D, Wang Z, and Chen G (2017) The role of nitric oxide in stroke *Med Gas Res* **7**, 194.

Cheng CM, Cohen M, Tseng V, and Bondy CA (2001) Endogenous IGF1 enhances cell survival in the postnatal dentate gyrus *J Neurosci Res* **64**, 341–347.

Cheng X-T, Zhou B, Lin M-Y, Cai Q, and Sheng Z-H (2015) Axonal autophagosomes recruit dynein for retrograde transport through fusion with late endosomes. *J Cell Biol* **209**, 377–86.

Cheng X, Liu H, Jiang C-C, Fang L, Chen C, Zhang X-D, and Jiang Z-W (2014) Connecting endoplasmic reticulum stress to autophagy through IRE1/JNK/beclin-1 in breast cancer cells *Int J Mol Med* **34**, 772–781.

Cheong H, Lindsten T, Wu J, Lu C, and Thompson CB (2011) Ammonia-induced autophagy is independent of ULK1/ULK2 kinases *Proc Natl Acad Sci* **108**, 11121–11126.

Chiang HL, Terlecky SR, Plant CP, and Dice JF (1989) A role for a 70-kilodalton heat shock protein in lysosomal degradation of intracellular proteins. *Science* **246**, 382–5.

Chiu MI, Katz H, and Berlin V (1994) RAPT1, a mammalian homolog of yeast Tor, interacts with the FKBP12/rapamycin complex. *Proc Natl Acad Sci U S A* **91**, 12574–8.

Cho S, Liu D, Fairman D, Li P, Jenkins L, McGonigle P, and Wood A (2004) Spatiotemporal evidence of apoptosis-mediated ischemic injury in organotypic hippocampal slice cultures *Neurochem Int* **45**, 117–127.

Cho Y, Challa S, Moquin D, Genga R, Ray TD, Guildford M, and Chan FK-M (2009) Phosphorylation-Driven Assembly of the RIP1-RIP3 Complex Regulates Programmed Necrosis and Virus-Induced Inflammation *Cell* **137**, 1112–1123.

Choi BH, Suzuki M, Kim T, Wagner SL, and Cunningham DD (1990) Protease nexin-1. Localization in the human brain suggests a protective role against extravasated serine proteases. *Am J Pathol* **137**, 741–7.

Choi J, Park S, Biering SB, Selleck E, Liu CY, Zhang X, … Virgin HW (2014) The Parasitophorous Vacuole Membrane of Toxoplasma gondii Is Targeted for Disruption by Ubiquitin-like Conjugation Systems of Autophagy *Immunity* **40**, 924–935.

Christensen LR, and Macleod CM (1945) A proteolytic enzyme of serum: characterization, activation, and reaction with inhibitors. *J Gen Physiol* **28**, 559–83.

Chung J-W, Park SH, Kim N, Kim W-J, Park JH, Ko Y, … Bae H-J (2014) Trial of ORG 10172 in Acute Stroke Treatment (TOAST) classification and vascular territory of ischemic stroke lesions diagnosed by diffusion-weighted imaging. *J Am Heart Assoc* **3**.

Cianfanelli V, Fuoco C, Lorente M, Salazar M, Quondamatteo F, Gherardini PF, … Cecconi F (2015) AMBRA1 links autophagy to cell proliferation and tumorigenesis by promoting c-Myc dephosphorylation and degradation *Nat Cell Biol* **17**, 20–30.

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.

Collins R, Armitage J, Parish S, Sleigh P, Peto R, and Heart Protection Study Collaborative Group (2003) MRC/BHF Heart Protection Study of cholesterol-lowering with simvastatin in 5963 people with diabetes: a randomised placebo-controlled trial. *Lancet (London, England)* **361**, 2005–16.

Corona Velazquez A, Corona AK, Klein KA, and Jackson WT (2018) Poliovirus induces autophagic signaling independent of the ULK1 complex *Autophagy* **14**, 1201–1213.

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.

Crighton D, Wilkinson S, O'Prey J, Syed N, Smith P, Harrison PR, … Ryan KM (2006) DRAM, a p53-Induced Modulator of Autophagy, Is Critical for Apoptosis *Cell* **126**, 121–134.

Cui DR, Wang L, Jiang W, Qi AH, Zhou QH, and Zhang XL (2013) Propofol prevents cerebral ischemia-triggered autophagy activation and cell death in the rat hippocampus through the NF-κB/p53 signaling pathway. *Neuroscience* **246**, 117–32.

D

Dai S-H, Chen T, Li X, Yue K-Y, Luo P, Yang L-K, … Jiang X-F (2017) Sirt3 confers protection against neuronal ischemia by inducing autophagy: Involvement of the AMPK-mTOR pathway *Free Radic Biol Med* **108**, 345–353.

Danielisova V, Burda J, Nemethova M, and Gottlieb M (2011) Aminoguanidine administration ameliorates hippocampal damage after middle cerebral artery occlusion in rat. *Neurochem Res* **36**, 476–86.

Dasari SK, Bialik S, Levin-Zaidman S, Levin-Salomon V, Merrill AH, Futerman AH, and Kimchi A (2017) Signalome-wide RNAi screen identifies GBA1 as a positive mediator of autophagic cell death *Cell Death Differ* **24**, 1288–1302.

De Duve C (1967) Lysosomes and phagosomes. The vacuolar apparatus. *Protoplasma* **63**, 95–8.

DE DUVE C (n.d.) [The lysosomes: a novel group of cytoplasmic granules]. *J Physiol (Paris)* **49**, 113–5.

De Duve C, and Wattiaux R (1966) Functions of lysosomes. *Annu Rev Physiol* **28**, 435–92.

De Geyter D, De Smedt A, Stoop W, De Keyser J, and Kooijman R (2016) Central IGF-I Receptors in the Brain are Instrumental to Neuroprotection by Systemically Injected IGF-I in a Rat Model for Ischemic Stroke. *CNS Neurosci Ther* **22**, 611–6.

Degterev A, Huang Z, Boyce M, Li Y, Jagtap P, Mizushima N, … Yuan J (2005) Chemical inhibitor of nonapoptotic cell death with therapeutic potential for ischemic brain injury. *Nat Chem Biol* **1**, 112–9.

del Zoppo GJ, Schmid-Schönbein GW, Mori E, Copeland BR, and Chang CM (1991) Polymorphonuclear leukocytes occlude capillaries following middle cerebral artery occlusion and reperfusion in baboons. *Stroke* **22**, 1276–83.

Demchuk AM, Dowlatshahi D, Rodriguez-Luna D, Molina CA, Blas YS, Dzialowski I, … Aviv RI (2012) Prediction of haematoma growth and outcome in patients with intracerebral haemorrhage using the CT-angiography spot sign (PREDICT): a prospective observational study *Lancet Neurol* **11**, 307–314.

Demetriades C, Doumpas N, and Teleman AA (2014) Regulation of TORC1 in response to amino acid starvation via lysosomal recruitment of TSC2. *Cell* **156**, 786–99.

Denorme F., Langhauser F, Desender L, Vandenbulcke A, Rottensteiner H, Plaimauer B, … De Meyer SF (2016) ADAMTS13-mediated thrombolysis of t-PA-resistant occlusions in ischemic stroke in mice *Blood* **127**, 2337–2345.

Denorme Frederik, Wyseure T, Peeters M, Vandeputte N, Gils A, Deckmyn H, … De Meyer SF (2016) Inhibition of Thrombin-Activatable Fibrinolysis Inhibitor and Plasminogen Activator Inhibitor-1 Reduces Ischemic Brain Damage in Mice *Stroke* **47**, 2419–2422.

Deosaran E, Larsen KB, Hua R, Sargent G, Wang Y, Kim S, … Kim PK (2013) NBR1 acts as an autophagy receptor for peroxisomes *J Cell Sci* **126**, 939–952.

Deter RL, and De Duve C (1967) Influence of glucagon, an inducer of cellular autophagy, on some physical properties of rat liver lysosomes. *J Cell Biol* **33**, 437–49.

Dey A, Mustafi SB, Saha S, Kumar Dhar Dwivedi S, Mukherjee P, and Bhattacharya R (2016) Inhibition of BMI1 induces autophagy-mediated necroptosis *Autophagy* **12**, 659–670.

Di Bartolomeo S, Corazzari M, Nazio F, Oliverio S, Lisi G, Antonioli M, … Fimia GM (2010) The dynamic interaction of AMBRA1 with the dynein motor complex regulates mammalian autophagy *J Cell Biol* **191**, 155–168.

Di Rita A, Peschiaroli A, D'Acunzo P, Strobbe D, Hu Z, Gruber J, … Cecconi F (2018) HUWE1 E3 ligase promotes PINK1/PARKIN-independent mitophagy by regulating AMBRA1 activation via IKKα *Nat Commun* **9**, 3755.

Diamond SL, Eskin SG, and McIntire L V (1989) Fluid flow stimulates tissue plasminogen activator secretion by cultured human endothelial cells. *Science* **243**, 1483–5.

Diao J, Liu R, Rong Y, Zhao M, Zhang J, Lai Y, … Zhong Q (2015) ATG14 promotes membrane tethering and fusion of autophagosomes to endolysosomes *Nature* **520**, 563–566.

Dibble CC, and Cantley LC (2015) Regulation of mTORC1 by PI3K signaling *Trends Cell Biol* **25**, 545–555.

Dietzmann K, von Bossanyi P, Krause D, Wittig H, Mawrin C, and Kirches E (2000) Expression of the plasminogen activator system and the inhibitors PAI-1 and PAI-2 in posttraumatic lesions of the CNS and brain injuries following dramatic circulatory arrests: an immunohistochemical study. *Pathol Res Pract* **196**, 15–21.

Dillon CP, Oberst A, Weinlich R, Janke LJ, Kang T-B, Ben-Moshe T, … Green DR (2012) Survival function of the FADD-CASPASE-8-cFLIP(L) complex. *Cell Rep* **1**, 401–7.

Ding C, Zhang J, Li B, Ding Z, Cheng W, Gao F, … Zhang S (2018) Cornin protects SH-SY5Y cells against oxygen and glucose deprivation-induced autophagy through the PI3K/Akt/mTOR pathway. *Mol Med Rep* **17**, 87–92.

Docagne F, Nicole O, Marti HH, MacKenzie ET, Buisson A, and Vivien D (1999) Transforming growth factor-beta1 as a regulator of the serpins/t-PA axis in cerebral ischemia. *FASEB J* **13**, 1315–24.

Domise M, Sauvé F, Didier S, Caillerez R, Bégard S, Carrier S, … Vingtdeux V (2019) Neuronal AMP-activated protein kinase hyper-activation induces synaptic loss by an autophagy-mediated process *Cell Death Dis* **10**, 221.

Dondelinger Y, Declercq W, Montessuit S, Roelandt R, Goncalves A, Bruggeman I, … Vandenabeele P (2014) MLKL Compromises Plasma Membrane Integrity by Binding to Phosphatidylinositol Phosphates *Cell Rep* **7**, 971–981.

Dos D. Sarbassov DD, Ali SM, Kim D-H, Guertin DA, Latek RR, Erdjument-Bromage H, … Sabatini DM (2004) Rictor, a Novel Binding Partner of mTOR, Defines a Rapamycin-Insensitive and Raptor-Independent Pathway that Regulates the Cytoskeleton *Curr Biol* **14**, 1296–1302.

Doutheil J, Treiman M, Oschlies U, and Paschen W (1999) Recovery of neuronal protein synthesis after irreversible inhibition of the endoplasmic reticulum calcium pump. *Cell Calcium* **25**, 419–28.

Dugan LL, Sensi SL, Canzoniero LM, Handran SD, Rothman SM, Lin TS, … Choi DW (1995) Mitochondrial production of reactive oxygen species in cortical neurons following exposure to N-methyl-D-aspartate. *J Neurosci* **15**, 6377–88.

E

East E, Baker D, Pryce G, Lijnen HR, Cuzner ML, and Gverić D (2005) A role for the plasminogen activator system in inflammation and neurodegeneration in the central nervous system during experimental allergic encephalomyelitis. *Am J Pathol* **167**, 545–54.

Echeverry R, Wu J, Haile WB, Guzman J, and Yepes M (2010) Tissue-type plasminogen activator is a neuroprotectant in the mouse hippocampus *J Clin Invest* **120**, 2194–2205.

Edman S, McKay S, MacDonald LJ, Samadi M, Livesey MR, Hardingham GE, and Wyllie DJA (2012) TCN 201 selectively blocks GluN2A-containing NMDARs in a GluN1 co-agonist dependent but non-competitive manner *Neuropharmacology* **63**, 441–449.

Edwards MA, Loxley RA, Williams AJ, Connor M, and Phillips JK (2007) Lack of functional expression of NMDA receptors in PC12 cells *Neurotoxicology* **28**, 876–885.

Egan D, Kim J, Shaw RJ, and Guan K-L (2011) The autophagy initiating kinase ULK1 is regulated via opposing phosphorylation by AMPK and mTOR *Autophagy* **7**, 643–644.

Elena-Real CA, Díaz-Quintana A, González-Arzola K, Velázquez-Campoy A, Orzáez M, López-Rivas A, … Díaz-Moreno I (2018) Cytochrome c speeds up caspase cascade activation by blocking 14-3-3ε-dependent Apaf-1 inhibition *Cell Death Dis* **9**, 365.

Elzi DJ, Lai Y, Song M, Hakala K, Weintraub ST, and Shiio Y (2012) Plasminogen activator inhibitor 1 - insulin-like growth factor binding protein 3 cascade regulates stress-induced senescence *Proc Natl Acad Sci* **109**, 12052–12057.

Emeis JJ, van den Eijnden-Schrauwen Y, van den Hoogen CM, de Priester W, Westmuckett A, and Lupu F (1997) An endothelial storage granule for tissue-type plasminogen activator. *J Cell Biol* **139**, 245–56.

Endo H, Kamada H, Nito C, Nishi T, and Chan PH (2006) Mitochondrial translocation of p53 mediates release of cytochrome c and hippocampal CA1 neuronal death after transient global cerebral ischemia in rats. *J Neurosci* **26**, 7974–83.

Engelhardt S, Huang S-F, Patkar S, Gassmann M, and Ogunshola OO (2015) Differential responses of blood-brain barrier associated cells to hypoxia and ischemia: a comparative study. *Fluids Barriers CNS* **12**, 4.

F

Fang Y, Vilella-Bach M, Bachmann R, Flanigan A, and Chen J (2001) Phosphatidic Acid-Mediated Mitogenic Activation of mTOR Signaling *Science (80-)* **294**, 1942–1945.

Farmer G, Bargonetti J, Zhu H, Friedman P, Prywes R, and Prives C (1992) Wild-type p53 activates transcription in vitro *Nature* **358**, 83–86.

Farré J-C, Krick R, Subramani S, and Thumm M (2009) Turnover of organelles by autophagy in yeast *Curr Opin Cell Biol* **21**, 522–530.

Fazi B, Bursch W, Fimia GM, Nardacci R, Piacentini M, Di Sano F, and Piredda L (2008) Fenretinide induces autophagic cell death in caspase-defective breast cancer cells *Autophagy* **4**, 435–441.

Feehan RP, and Shantz LM (2016) Negative regulation of the FOXO3a transcription factor by mTORC2 induces a pro-survival response following exposure to ultraviolet-B irradiation *Cell Signal* **28**, 798–809.

Feigin VL, Norrving B, and Mensah GA (2017) Global Burden of Stroke *Circ Res* **120**, 439–448.

Feigin VL, Roth GA, Naghavi M, Parmar P, Krishnamurthi R, 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.

Feng D, Wang B, Wang L, Abraham N, Tao K, Huang L, … Qu Y (2017) Pre-ischemia melatonin treatment alleviated acute neuronal injury after ischemic stroke by inhibiting endoplasmic reticulum stress-dependent autophagy via PERK and IRE1 signalings. *J Pineal Res* **62**, e12395.

Feng Y, He D, Yao Z, and Klionsky DJ (2014) The machinery of macroautophagy. *Cell Res* **24**, 24–41.

Feng Y, and Klionsky DJ (2017) Autophagic membrane delivery through ATG9 *Cell Res* **27**, 161–162.

Feng Z., Zhang H, Levine AJ, and Jin S (2005) The coordinate regulation of the p53 and mTOR pathways in cells *Proc Natl Acad Sci* **102**, 8204–8209.

Feng Zhaohui, Hu W, de Stanchina E, Teresky AK, Jin S, Lowe S, and Levine AJ (2007) The Regulation of AMPK β1, TSC2, and PTEN Expression by p53: Stress, Cell and Tissue Specificity, and the Role of These Gene Products in Modulating the IGF-1-AKT-mTOR Pathways *Cancer Res* **67**, 3043–3053.

Feng Zhaohui, and Levine AJ (2010) The regulation of energy metabolism and the IGF-1/mTOR pathways by the p53 protein. *Trends Cell Biol* **20**, 427–34.

Fernández-Monreal M, López-Atalaya JP, Benchenane K, Cacquevel M, Dulin F, Le Caer J-P, … Vivien D (2004) Arginine 260 of the amino-terminal domain of NR1 subunit is critical for tissue-type plasminogen activator-mediated enhancement of N-methyl-D-aspartate receptor signaling. *J Biol Chem* **279**, 50850–6.

Fisher CM (1982) Lacunar strokes and infarcts: A review *Neurology* **32**, 871–871.

Flavin MP, Zhao G, and Ho LT (2000) Microglial tissue plasminogen activator (tPA) triggers neuronal apoptosis in vitro. *Glia* **29**, 347–54.

Fletcher L, Evans TM, Watts LT, Jimenez DF, and Digicaylioglu M (2013) Rapamycin Treatment Improves Neuron Viability in an In Vitro Model of Stroke *PLoS One* **8**, e68281.

Fluri F, Schuhmann MK, and Kleinschnitz C (2015) Animal models of ischemic stroke and their application in clinical research. *Drug Des Devel Ther* **9**, 3445–54.

Fonarow GC, Reeves MJ, Zhao X, Olson DM, Smith EE, Saver JL, and Schwamm LH (2010) Age-Related Differences in Characteristics, Performance Measures, Treatment Trends, and Outcomes in Patients With Ischemic Stroke *Circulation* **121**, 879–891.

Fonarow GC, Zhao X, Smith EE, Saver JL, Reeves MJ, Bhatt DL, … Schwamm LH (2014) Door-to-Needle Times for Tissue Plasminogen Activator Administration and Clinical Outcomes in Acute Ischemic Stroke Before and After a Quality Improvement Initiative *JAMA* **311**, 1632.

Foster DA (2013) Phosphatidic acid and lipid-sensing by mTOR *Trends Endocrinol Metab* **24**, 272–278.

Foster DA, Salloum D, Menon D, and Frias MA (2014) Phospholipase D and the Maintenance of Phosphatidic Acid Levels for Regulation of Mammalian Target of Rapamycin (mTOR) *J Biol Chem* **289**, 22583–22588.

Fowlkes JL, Enghild JJ, Suzuki K, and Nagase H (1994) Matrix metalloproteinases degrade insulin-like growth factor-binding protein-3 in dermal fibroblast cultures. *J Biol Chem* **269**, 25742–6.

Fredriksson L, Li H, Fieber C, Li X, and Eriksson U (2004) Tissue plasminogen activator is a potent activator of PDGF-CC. *EMBO J* **23**, 3793–802.

Fu L, Huang L, Cao C, Yin Q, and Liu J (2016) Inhibition of AMP-activated protein kinase alleviates focal cerebral ischemia injury in mice: Interference with mTOR and autophagy. *Brain Res* **1650**, 103–111.

Fujioka Y, Noda NN, Nakatogawa H, Ohsumi Y, and Inagaki F (2010) Dimeric coiled-coil structure of Saccharomyces cerevisiae Atg16 and its functional significance in autophagy. *J Biol Chem* **285**, 1508–15.

Fujita N, Hayashi-Nishino M, Fukumoto H, Omori H, Yamamoto A, Noda T, and Yoshimori T (2008) An Atg4B Mutant Hampers the Lipidation of LC3 Paralogues and Causes Defects in Autophagosome Closure *Mol Biol Cell* **19**, 4651–4659.

Fung TS, and Liu DX (2019) The ER stress sensor IRE1 and MAP kinase ERK modulate autophagy induction in cells infected with coronavirus infectious bronchitis virus *Virology* **533**, 34–44.

Furlan M, Marchal G, Viader F, Derlon JM, and Baron JC (1996) Spontaneous neurological recovery after stroke and the fate of the ischemic penumbra. *Ann Neurol* **40**, 216–26.

Furuya D, Tsuji N, Yagihashi A, and Watanabe N (2005) Beclin 1 augmented cis-diamminedichloroplatinum induced apoptosis via enhancing caspase-9 activity *Exp Cell Res* **307**, 26–40.

G

Gaberel T, Magheru C, Parienti J-J, Huttner HB, Vivien D, and Emery E (2011) Intraventricular fibrinolysis versus external ventricular drainage alone in intraventricular hemorrhage: a meta-analysis. *Stroke* **42**, 2776–81.

Gabryel B, Kost A, Kasprowska D, Liber S, Machnik G, Wiaderkiewicz R, and Łabuzek K (2014) AMP-activated protein kinase is involved in induction of protective autophagy in astrocytes exposed to oxygen-glucose deprivation. *Cell Biol Int* **38**, 1086–97.

Gade P, Manjegowda SB, Nallar SC, Maachani UB, Cross AS, and Kalvakolanu D V. (2014) Regulation of the Death-Associated Protein Kinase 1 Expression and Autophagy via ATF6 Requires Apoptosis Signal-Regulating Kinase 1 *Mol Cell Biol* **34**, 4033–4048.

Galluzzi L, Vitale I, Abrams JM, Alnemri ES, Baehrecke EH, Blagosklonny M V, … Kroemer G (2012) Molecular definitions of cell death subroutines: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2012 *Cell Death Differ* **19**, 107–120.

Galluzzi Lorenzo, Vanden Berghe T, Vanlangenakker N, Buettner S, Eisenberg T, Vandenabeele P, … Kroemer G (2011) Programmed Necrosis In *International review of cell and molecular biology* (Vol. 289, pp. 1–35).

Gan X, Wang J, Su B, and Wu D (2011) Evidence for direct activation of mTORC2 kinase activity by phosphatidylinositol 3,4,5-trisphosphate. *J Biol Chem* **286**, 10998–1002.

Gannagé M, Dormann D, Albrecht R, Dengjel J, Torossi T, Rämer PC, … Münz C (2009) Matrix Protein 2 of Influenza A Virus Blocks Autophagosome Fusion with Lysosomes *Cell Host Microbe* **6**, 367–380.

Gao P, Bauvy C, Souquère S, Tonelli G, Liu L, Zhu Y, … Mehrpour M (2010) The Bcl-2 Homology Domain 3 Mimetic Gossypol Induces Both Beclin 1-dependent and Beclin 1-independent Cytoprotective Autophagy in Cancer Cells *J Biol Chem* **285**, 25570–25581.

Gao Y, Liang W, Hu X, Zhang W, Stetler RA, Vosler P, … Chen J (2010) Neuroprotection Against Hypoxic-Ischemic Brain Injury by Inhibiting the Apoptotic Protease Activating Factor-1 Pathway *Stroke* **41**, 166–172.

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**, 123–6.

Gauberti M, Montagne A, Marcos-Contreras OA, Le Béhot A, Maubert E, and Vivien D (2013) Ultra-Sensitive Molecular MRI of Vascular Cell Adhesion Molecule-1 Reveals a Dynamic Inflammatory Penumbra After Strokes *Stroke* **44**, 1988–1996.

Gauster M, Maninger S, Siwetz M, Deutsch A, El-Heliebi A, Kolb-Lenz D, … Prokesch A (2018) Downregulation of p53 drives autophagy during human trophoblast differentiation *Cell Mol Life Sci* **75**, 1839–1855.

Ge L, Melville D, Zhang M, and Schekman R (2013) The ER–Golgi intermediate compartment is a key membrane source for the LC3 lipidation step of autophagosome biogenesis *Elife* **2**, e00947.

Gerhard A, Neumaier B, Elitok E, Glatting G, Ries V, Tomczak R, … Reske SN (2000) In vivo imaging of activated microglia using [11C]PK11195 and positron emission tomography in patients after ischemic stroke. *Neuroreport* **11**, 2957–60.

Gincel D, Zaid H, and Shoshan-Barmatz V (2001) Calcium binding and translocation by the voltage-dependent anion channel: a possible regulatory mechanism in mitochondrial function. *Biochem J* **358**, 147–55.

Ginet V, Puyal J, Clarke PGH, and Truttmann AC (2009) Enhancement of autophagic flux after neonatal cerebral hypoxia-ischemia and its region-specific relationship to apoptotic mechanisms. *Am J Pathol* **175**, 1962–74.

Ginet V, Spiehlmann A, Rummel C, Rudinskiy N, Grishchuk Y, Luthi-Carter R, … Puyal J (2014) Involvement of autophagy in hypoxic-excitotoxic neuronal death. *Autophagy* **10**, 846–60.

Girnita A, Girnita L, del Prete F, Bartolazzi A, Larsson O, and Axelson M (2004) Cyclolignans as inhibitors of the insulin-like growth factor-1 receptor and malignant cell growth. *Cancer Res* **64**, 236–42.

Gloor S, Odink K, Guenther J, Nick H, and Monard D (1986) A glia-derived neurite promoting factor with protease inhibitory activity belongs to the protease nexins. *Cell* **47**, 687–93.

Gluckman P, Klempt N, Guan J, Mallard C, Sirimanne E, Dragunow M, … Nikolics K (1992) A role for IGF-1 in the rescue of CNS neurons following hypoxic-ischemic injury *Biochem Biophys Res Commun* **182**, 593–599.

Goiran T, Duplan E, Rouland L, el Manaa W, Lauritzen I, Dunys J, … Alves da Costa C (2018) Nuclear p53-mediated repression of autophagy involves PINK1 transcriptional down-regulation *Cell Death Differ* **25**, 873–884.

Goldberg MP, and Choi DW (1993) Combined oxygen and glucose deprivation in cortical cell culture: calcium-dependent and calcium-independent mechanisms of neuronal injury. *J Neurosci* **13**, 3510–24.

Gonzalez-Gronow M, Selim MA, Papalas J, and Pizzo S V (2009) GRP78: a multifunctional receptor on the cell surface. *Antioxid Redox Signal* **11**, 2299–306.

Goodall ML, Fitzwalter BE, Zahedi S, Wu M, Rodriguez D, Mulcahy-Levy JM, … Thorburn A (2016) The Autophagy Machinery Controls Cell Death Switching between Apoptosis and Necroptosis *Dev Cell* **37**, 337–349.

Goyal M, Demchuk AM, Menon BK, Eesa M, Rempel JL, Thornton J, … Hill MD (2015) Randomized Assessment of Rapid Endovascular Treatment of Ischemic Stroke *N Engl J Med* **372**, 1019–1030.

Grasso D, Ropolo A, Lo Ré A, Boggio V, Molejón MI, Iovanna JL, … Vaccaro MI (2011) Zymophagy, a novel selective autophagy pathway mediated by VMP1-USP9x-p62, prevents pancreatic cell death. *J Biol Chem* **286**, 8308–24.

Grilli M, Barbieri I, Basudev H, Brusa R, Casati C, Lozza G, and Ongini E (2000) Interleukin-10 modulates neuronal threshold of vulnerability to ischaemic damage. *Eur J Neurosci* **12**, 2265–72.

Grishchuk Y, Ginet V, Truttmann AC, Clarke PGH, and Puyal J (2011) Beclin 1-independent autophagy contributes to

apoptosis in cortical neurons *Autophagy* **7**, 1115–1131.

Grkovic S, O'Reilly VC, Han S, Hong M, Baxter RC, and Firth SM (2013) IGFBP-3 binds GRP78, stimulates autophagy and promotes the survival of breast cancer cells exposed to adverse microenvironments *Oncogene* **32**, 2412–2420.

Grummisch JA, Jadavji NM, and Smith PD (2016) tPA promotes cortical neuron survival via mTOR-dependent mechanisms *Mol Cell Neurosci* **74**, 25–33.

Guadagno J, Xu X, Karajgikar M, Brown A, and Cregan SP (2013) Microglia-derived TNFα induces apoptosis in neural precursor cells via transcriptional activation of the Bcl-2 family member Puma *Cell Death Dis* **4**, e538–e538.

Gualandris A, Rusnati M, Belleri M, Nelli EE, Bastaki M, Molinari-Tosatti MP, … Presta M (1996) Basic fibroblast growth factor overexpression in endothelial cells: an autocrine mechanism for angiogenesis and angioproliferative diseases. *Cell Growth Differ* **7**, 147–60.

Guertin DA, Stevens DM, Thoreen CC, Burds AA, Kalaany NY, Moffat J, … Sabatini DM (2006) Ablation in Mice of the mTORC Components raptor, rictor, or mLST8 Reveals that mTORC2 Is Required for Signaling to Akt-FOXO and PKCα, but Not S6K1 *Dev Cell* **11**, 859–871.

Guo Y, Ma Y, Zhang Y, Zhou L, Huang S, Wen Y, … Cheng J (2017) Autophagy-related gene microarray and bioinformatics analysis for ischemic stroke detection. *Biochem Biophys Res Commun* **489**, 48–55.

Gveric D, Herrera B, Petzold A, Lawrence DA, and Cuzner ML (2003) Impaired fibrinolysis in multiple sclerosis: a role for tissue plasminogen activator inhibitors. *Brain* **126**, 1590–8.

Gveric D, Herrera BM, and Cuzner ML (2005) tPA receptors and the fibrinolytic response in multiple sclerosis lesions. *Am J Pathol* **166**, 1143–51.

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.

Hailey DW, Rambold AS, Satpute-Krishnan P, Mitra K, Sougrat R, Kim PK, and Lippincott-Schwartz J (2010) Mitochondria Supply Membranes for Autophagosome Biogenesis during Starvation *Cell* **141**, 656–667.

Hajjar KA, and Reynolds CM (1994) alpha-Fucose-mediated binding and degradation of tissue-type plasminogen activator by HepG2 cells. *J Clin Invest* **93**, 703–10.

Hamasaki M, Furuta N, Matsuda A, Nezu A, Yamamoto A, Fujita N, … Yoshimori T (2013) Autophagosomes form at ER–mitochondria contact sites *Nature* **495**, 389–393.

Han F, Chen Y-X, Lu Y-M, Huang J-Y, Zhang G-S, Tao R-R, … Qin Z-H (2011) Regulation of the ischemia-induced autophagy-lysosome processes by nitrosative stress in endothelial cells. *J Pineal Res* **51**, 124–35.

Hanada T, Noda NN, Satomi Y, Ichimura Y, Fujioka Y, Takao T, … Ohsumi Y (2007) The Atg12-Atg5 Conjugate Has a Novel E3-like Activity for Protein Lipidation in Autophagy *J Biol Chem* **282**, 37298–37302.

Hanley DF, Lane K, McBee N, Ziai W, Tuhrim S, Lees KR, … CLEAR III Investigators (2017) Thrombolytic removal of intraventricular haemorrhage in treatment of severe stroke: results of the randomised, multicentre, multiregion, placebo-controlled CLEAR III trial. *Lancet (London, England)* **389**, 603–611.

Hara K, Yonezawa K, Weng Q-P, Kozlowski MT, Belham C, and Avruch J (1998) Amino Acid Sufficiency and mTOR Regulate p70 S6 Kinase and eIF-4E BP1 through a Common Effector Mechanism *J Biol Chem* **273**, 14484–

14494.

Harper JW, Ordureau A, and Heo J-M (2018) Building and decoding ubiquitin chains for mitophagy *Nat Rev Mol Cell Biol* **19**, 93–108.

Harris J, Deen N, Zamani S, and Hasnat MA (2018) Mitophagy and the release of inflammatory cytokines *Mitochondrion* **41**, 2–8.

Harris RJ, Leonard CK, Guzzetta AW, and Spellman MW (1991) Tissue plasminogen activator has an O-linked fucose attached to threonine-61 in the epidermal growth factor domain. *Biochemistry* **30**, 2311–4.

Hayashi-Nishino M, Fujita N, Noda T, Yamaguchi A, Yoshimori T, and Yamamoto A (2009) A subdomain of the endoplasmic reticulum forms a cradle for autophagosome formation *Nat Cell Biol* **11**, 1433–1437.

Hayashi T, Saito A, Okuno S, Ferrand-Drake M, and Chan PH (2003) Induction of GRP78 by Ischemic Preconditioning Reduces Endoplasmic Reticulum Stress and Prevents Delayed Neuronal Cell Death *J Cereb Blood Flow Metab* **23**, 949–961.

He F, Zhang N, Lv Y, Sun W, and Chen H (2019) Low-dose lipopolysaccharide inhibits neuronal apoptosis induced by cerebral ischemia/reperfusion injury via the PI3K/Akt/FoxO1 signaling pathway in rats *Mol Med Rep* **19**, 1443–1452.

He FJ, Nowson CA, and MacGregor GA (2006) Fruit and vegetable consumption and stroke: meta-analysis of cohort studies *Lancet* **367**, 320–326.

He Q, Li Z, Wang Y, Hou Y, Li L, and Zhao J (2017) Resveratrol alleviates cerebral ischemia/reperfusion injury in rats by inhibiting NLRP3 inflammasome activation through Sirt1-dependent autophagy induction. *Int Immunopharmacol* **50**, 208–215.

Head BP, Patel HH, Niesman IR, Drummond JC, Roth DM, and Patel PM (2009) Inhibition of p75 neurotrophin receptor attenuates isoflurane-mediated neuronal apoptosis in the neonatal central nervous system. *Anesthesiology* **110**, 813–25.

Hébert M, Anfray A, Chevilley A, Martinez de Lizarrondo S, Quenault A, Louessard M, … Agin V (2016) Distant Space Processing is Controlled by tPA-dependent NMDA Receptor Signaling in the Entorhinal Cortex *Cereb Cortex*.

Hedin SG (1903) On the presence of a proteolytic enzyme in the normal serum of the ox. *J Physiol* **30**, 195–201.

Heiss W.-D. (2014) Radionuclide Imaging in Ischemic Stroke *J Nucl Med* **55**, 1831–1841.

Heiss WD, and Rosner G (1983) Functional recovery of cortical neurons as related to degree and duration of ischemia. *Ann Neurol* **14**, 294–301.

Heiss Wolf-Dieter, Kracht LW, Thiel A, Grond M, and Pawlik G (2001) Penumbral probability thresholds of cortical flumazenil binding and blood flow predicting tissue outcome in patients with cerebral ischaemia *Brain* **124**, 20–29.

Henry VJ, Lecointre M, Laudenbach V, Ali C, Macrez R, Jullienne A, … Leroux P (2013) High t-PA release by neonate brain microvascular endothelial cells under glutamate exposure affects neuronal fate *Neurobiol Dis* **50**, 201–208.

Heo J-M, Ordureau A, Paulo JA, Rinehart J, and Harper JW (2015) The PINK1-PARKIN Mitochondrial Ubiquitylation Pathway Drives a Program of OPTN/NDP52 Recruitment and TBK1 Activation to Promote Mitophagy. *Mol Cell* **60**, 7–20.

Hetz C, and Mollereau B (2014) Disturbance of endoplasmic reticulum proteostasis in neurodegenerative diseases.

Nat Rev Neurosci **15**, 233–49.

Hildebrand JM, Tanzer MC, Lucet IS, Young SN, Spall SK, Sharma P, … Silke J (2014) Activation of the pseudokinase MLKL unleashes the four-helix bundle domain to induce membrane localization and necroptotic cell death *Proc Natl Acad Sci* **111**, 15072–15077.

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**, 105–8.

Hjort N, Wu O, Ashkanian M, Sølling C, Mouridsen K, Christensen S, … Østergaard L (2008) MRI Detection of Early Blood-Brain Barrier Disruption *Stroke* **39**, 1025–1028.

Hochrainer K, Jackman K, Anrather J, and Iadecola C (2012) Reperfusion Rather than Ischemia Drives the Formation of Ubiquitin Aggregates After Middle Cerebral Artery Occlusion *Stroke* **43**, 2229–2235.

Hou Y, Wang K, Wan W, Cheng Y, Pu X, and Ye X (2018) Resveratrol provides neuroprotection by regulating the JAK2/STAT3/PI3K/AKT/mTOR pathway after stroke in rats. *Genes Dis* **5**, 245–255.

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.

Hu B-R, Janelidze S, Ginsberg MD, Busto R, Perez-Pinzon M, Sick TJ, … Liu CL (2001) Protein Aggregation after Focal Brain Ischemia and Reperfusion *J Cereb Blood Flow Metab* **21**, 865–875.

Hu BR, Martone ME, Jones YZ, and Liu CL (2000) Protein aggregation after transient cerebral ischemia. *J Neurosci* **20**, 3191–9.

Huang D, Zheng X, Wang Z, Chen X, He W, Zhang Y, … Han J (2017) The MLKL Channel in Necroptosis Is an Octamer Formed by Tetramers in a Dyadic Process *Mol Cell Biol* **37**.

Huang Jingxiang, and Manning BD (2009) A complex interplay between Akt, TSC2 and the two mTOR complexes: Figure 1 *Biochem Soc Trans* **37**, 217–222.

Huang Ju, and Brumell JH (2014) Bacteria–autophagy interplay: a battle for survival *Nat Rev Microbiol* **12**, 101–114.

Huang Z, Huang PL, Ma J, Meng W, Ayata C, Fishman MC, and Moskowitz MA (1996) Enlarged infarcts in endothelial nitric oxide synthase knockout mice are attenuated by nitro-L-arginine. *J Cereb Blood Flow Metab* **16**, 981–7.

Huber D (2002) Tissue-type plasminogen activator (t-PA) is stored in Weibel-Palade bodies in human endothelial cells both in vitro and in vivo *Blood* **99**, 3637–3645.

Hultman K, Tjärnlund-Wolf A, Fish RJ, Wilhelmsson U, Rydenhag B, Pekny M, … Jern C (2008) Retinoids and activation of PKC induce tissue-type plasminogen activator expression and storage in human astrocytes. *J Thromb Haemost* **6**, 1796–803.

Huntington JA, Read RJ, and Carrell RW (2000) Structure of a serpin-protease complex shows inhibition by deformation. *Nature* **407**, 923–6.

Hwang J-Y, Gertner M, Pontarelli F, Court-Vazquez B, Bennett MVL, Ofengeim D, and Zukin RS (2017) Global ischemia induces lysosomal-mediated degradation of mTOR and activation of autophagy in hippocampal neurons destined to die *Cell Death Differ* **24**, 317–329.

I

Ichimura Y, Kirisako T, Takao T, Satomi Y, Shimonishi Y, Ishihara N, … Ohsumi Y (2000) A ubiquitin-like system mediates protein lipidation *Nature* **408**, 488–492.

Ichimura Y, Kumanomidou T, Sou Y, Mizushima T, Ezaki J, Ueno T, … Komatsu M (2008) Structural Basis for Sorting Mechanism of p62 in Selective Autophagy *J Biol Chem* **283**, 22847–22857.

Ichinose A, Kisiel W, and Fujikawa K (1984) Proteolytic activation of tissue plasminogen activator by plasma and tissue enzymes. *FEBS Lett* **175**, 412–8.

Imai K, Hao F, Fujita N, Tsuji Y, Oe Y, Araki Y, … Yoshimori T (2016) Atg9A trafficking through the recycling endosomes is required for autophagosome formation *J Cell Sci* **129**, 3781–3791.

Imai Y, Moralez A, Andag U, Clarke JB, Busby WH, and Clemmons DR (2000) Substitutions for Hydrophobic Amino Acids in the N-terminal Domains of IGFBP-3 and -5 Markedly Reduce IGF-I Binding and Alter Their Biologic Actions *J Biol Chem* **275**, 18188–18194.

Inoki K., Li Y, Xu T, and Guan K-L (2003) Rheb GTPase is a direct target of TSC2 GAP activity and regulates mTOR signaling *Genes Dev* **17**, 1829–1834.

Inoki Ken, Li Y, Zhu T, Wu J, and Guan K-L (2002) TSC2 is phosphorylated and inhibited by Akt and suppresses mTOR signalling *Nat Cell Biol* **4**, 648–657.

Iriki A, Pavlides C, Keller A, and Asanuma H (1989) Long-term potentiation in the motor cortex. *Science* **245**, 1385–7.

Itakura E, Kishi-Itakura C, and Mizushima N (2012) The Hairpin-type Tail-Anchored SNARE Syntaxin 17 Targets to Autophagosomes for Fusion with Endosomes/Lysosomes *Cell* **151**, 1256–1269.

Itakura E, and Mizushima N (2013) Syntaxin 17 *Autophagy* **9**, 917–919.

J

Jacinto E, Facchinetti V, Liu D, Soto N, Wei S, Jung SY, … Su B (2006) SIN1/MIP1 Maintains rictor-mTOR Complex Integrity and Regulates Akt Phosphorylation and Substrate Specificity *Cell* **127**, 125–137.

Jackson C, and Sudlow C (2005) Are lacunar strokes really different? A systematic review of differences in risk factor profiles between lacunar and nonlacunar infarcts. *Stroke* **36**, 891–901.

Jayaraman M V, Hussain MS, Abruzzo T, Albani B, Albuquerque FC, Alexander MJ, … Rasmussen P (2015) Embolectomy for stroke with emergent large vessel occlusion (ELVO): report of the Standards and Guidelines Committee of the Society of NeuroInterventional Surgery: Table 1 *J Neurointerv Surg* **7**, 316–321.

Jeanneret V, Ospina JP, Diaz A, Manrique LG, Merino P, Gutierrez L, … Yepes M (2018) Tissue-type plasminogen activator protects the postsynaptic density in the ischemic brain *J Cereb Blood Flow Metab* **38**, 1896–1910.

Jeanneret V, Wu F, Merino P, Torre E, Diaz A, Cheng L, and Yepes M (2016) Tissue-type Plasminogen Activator (tPA) Modulates the Postsynaptic Response of Cerebral Cortical Neurons to the Presynaptic Release of Glutamate *Front Mol Neurosci* **9**, 121.

Jia Y, Wang F, Guo Q, Li M, Wang L, Zhang Z, … Zheng S (2018) Curcumol induces RIPK1/RIPK3 complex-dependent

necroptosis via JNK1/2-ROS signaling in hepatic stellate cells *Redox Biol* **19**, 375–387.

Jiang P, Nishimura T, Sakamaki Y, Itakura E, Hatta T, Natsume T, and Mizushima N (2014) The HOPS complex mediates autophagosome–lysosome fusion through interaction with syntaxin 17 *Mol Biol Cell* **25**, 1327–1337.

Jiang T, Yu J-T, Zhu X-C, Wang H-F, Tan M-S, Cao L, … Tan L (2014) Acute metformin preconditioning confers neuroprotection against focal cerebral ischaemia by pre-activation of AMPK-dependent autophagy. *Br J Pharmacol* **171**, 3146–57.

Jiang W-W, Huang B-S, Han Y, Deng L-H, and Wu L-X (2017) Sodium hydrosulfide attenuates cerebral ischemia/reperfusion injury by suppressing overactivated autophagy in rats. *FEBS Open Bio* **7**, 1686–1695.

Jogie-Brahim S, Feldman D, and Oh Y (2009) Unraveling insulin-like growth factor binding protein-3 actions in human disease. *Endocr Rev* **30**, 417–37.

Johansen T, and Lamark T (2019) Selective Autophagy: ATG8 Family Proteins, LIR Motifs and Cargo Receptors *J Mol Biol*.

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.

Jones RG, Plas DR, Kubek S, Buzzai M, Mu J, Xu Y, … Thompson CB (2005) AMP-Activated Protein Kinase Induces a p53-Dependent Metabolic Checkpoint *Mol Cell* **18**, 283–293.

Jongsma MLM, Berlin I, Wijdeven RHM, Janssen L, Janssen GMC, Garstka MA, … Neefjes J (2016) An ER-Associated Pathway Defines Endosomal Architecture for Controlled Cargo Transport *Cell* **166**, 152–166.

Jung CH, Jun CB, Ro S-H, Kim Y-M, Otto NM, Cao J, … Kim D-H (2009) ULK-Atg13-FIP200 Complexes Mediate mTOR Signaling to the Autophagy Machinery *Mol Biol Cell* **20**, 1992–2003.

K

Kabeya Y (2004) LC3, GABARAP and GATE16 localize to autophagosomal membrane depending on form-II formation *J Cell Sci* **117**, 2805–2812.

Kabeya Y, Mizushima N, Ueno T, Yamamoto A, Kirisako T, Noda T, … Yoshimori T (2000) LC3, a mammalian homologue of yeast Apg8p, is localized in autophagosome membranes after processing *EMBO J* **19**, 5720–5728.

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**, 145–9.

Kaji S, Maki T, Kinoshita H, Uemura N, Ayaki T, Kawamoto Y, … Takahashi R (2018) Pathological Endogenous α-Synuclein Accumulation in Oligodendrocyte Precursor Cells Potentially Induces Inclusions in Multiple System Atrophy. *Stem Cell Reports* **10**, 356–365.

Kasprowska D, Machnik G, Kost A, and Gabryel B (2017) Time-Dependent Changes in Apoptosis Upon Autophagy Inhibition in Astrocytes Exposed to Oxygen and Glucose Deprivation *Cell Mol Neurobiol* **37**, 223–234.

Kenzelmann Broz D, Spano Mello S, Bieging KT, Jiang D, Dusek RL, Brady CA, … Attardi LD (2013) Global genomic profiling reveals an extensive p53-regulated autophagy program contributing to key p53 responses *Genes Dev* **27**, 1016–1031.

Khan MJ, Rizwan Alam M, Waldeck-Weiermair M, Karsten F, Groschner L, Riederer M, … Malli R (2012) Inhibition of Autophagy Rescues Palmitic Acid-induced Necroptosis of Endothelial Cells *J Biol Chem* **287**, 21110–21120.

Khan Mushfiquddin, Sekhon B, Giri S, Jatana M, Gilg AG, Ayasolla K, … Singh I (2005) S-Nitrosoglutathione reduces inflammation and protects brain against focal cerebral ischemia in a rat model of experimental stroke. *J Cereb Blood Flow Metab* **25**, 177–92.

Khan MW, Biswas D, Ghosh M, Mandloi S, Chakrabarti S, and Chakrabarti P (2015) mTORC2 controls cancer cell survival by modulating gluconeogenesis *Cell Death Discov* **1**, 15016.

Kheloufi M, Boulanger CM, Codogno P, and Rautou P-E (2015) Autosis occurs in the liver of patients with severe anorexia nervosa *Hepatology* **62**, 657–658.

Kihara A, Kabeya Y, Ohsumi Y, and Yoshimori T (2001) Beclin-phosphatidylinositol 3-kinase complex functions at the *trans* -Golgi network *EMBO Rep* **2**, 330–335.

Kim H-K, Lee SY, Oh H-K, Kang B-H, Ku H-J, Lee Y, … Joe YA (2003) Inhibition of endothelial cell proliferation by the recombinant kringle domain of tissue-type plasminogen activator. *Biochem Biophys Res Commun* **304**, 740–6.

Kim J, Kundu M, Viollet B, and Guan K-L (2011) AMPK and mTOR regulate autophagy through direct phosphorylation of Ulk1 *Nat Cell Biol* **13**, 132–141.

Kim PK, Hailey DW, Mullen RT, and Lippincott-Schwartz J (2008) Ubiquitin signals autophagic degradation of cytosolic proteins and peroxisomes *Proc Natl Acad Sci* **105**, 20567–20574.

Kim SJ, and Li J (2013) Caspase blockade induces RIP3-mediated programmed necrosis in Toll-like receptor-activated microglia *Cell Death Dis* **4**, e716–e716.

Kim Y-M, Jung CH, Seo M, Kim EK, Park J-M, Bae SS, and Kim D-H (2015) mTORC1 Phosphorylates UVRAG to Negatively Regulate Autophagosome and Endosome Maturation *Mol Cell* **57**, 207–218.

Kimmey JM, Huynh JP, Weiss LA, Park S, Kambal A, Debnath J, … Stallings CL (2015) Unique role for ATG5 in neutrophil-mediated immunopathology during M. tuberculosis infection *Nature* **528**, 565–569.

Kimura S, Noda T, and Yoshimori T (2008) Dynein-dependent movement of autophagosomes mediates efficient encounters with lysosomes. *Cell Struct Funct* **33**, 109–22.

Kirisako T, Ichimura Y, Okada H, Kabeya Y, Mizushima N, Yoshimori T, … Ohsumi Y (2000) The Reversible Modification Regulates the Membrane-Binding State of Apg8/Aut7 Essential for Autophagy and the Cytoplasm to Vacuole Targeting Pathway *J Cell Biol* **151**, 263–276.

Kirkin V, Lamark T, Sou Y-S, Bjørkøy G, Nunn JL, Bruun J-A, … Johansen T (2009) A Role for NBR1 in Autophagosomal Degradation of Ubiquitinated Substrates *Mol Cell* **33**, 505–516.

Kishi-Itakura C, Koyama-Honda I, Itakura E, and Mizushima N (2014) Ultrastructural analysis of autophagosome organization using mammalian autophagy-deficient cells *J Cell Sci* **127**, 4089–4102.

Kishino A, Hayashi K, Hidai C, Masuda T, Nomura Y, and Oshima T (2017) XBP1-FoxO1 interaction regulates ER stress-induced autophagy in auditory cells *Sci Rep* **7**, 4442.

Kitada T, Asakawa S, Hattori N, Matsumine H, Yamamura Y, Minoshima S, … Shimizu N (1998) Mutations in the parkin gene cause autosomal recessive juvenile parkinsonism *Nature* **392**, 605–608.

Klatzo I (1985) Brain oedema following brain ischaemia and the influence of therapy. *Br J Anaesth* **57**, 18–22.

Klionsky DJ, Abdelmohsen K, Abe A, Joynal Abedin M, Abeliovich H, Acevedo Arozena A, … Zughaier SM (2016) Guidelines for the use and interpretation of assays for monitoring autophagy (2 edition).

Klionsky DJ, Cregg JM, Dunn WA, Emr SD, Sakai Y, Sandoval I V, … Ohsumi Y (2003) A unified nomenclature for yeast autophagy-related genes. *Dev Cell* **5**, 539–45.

Koike M, Shibata M, Tadakoshi M, Gotoh K, Komatsu M, Waguri S, … Uchiyama Y (2008) Inhibition of autophagy prevents hippocampal pyramidal neuron death after hypoxic-ischemic injury. *Am J Pathol* **172**, 454–69.

Kooijman R, Sarre S, Michotte Y, and De Keyser J (2009) Insulin-like growth factor I: a potential neuroprotective compound for the treatment of acute ischemic stroke? *Stroke* **40**, e83-8.

Korac J, Schaeffer V, Kovacevic I, Clement AM, Jungblut B, Behl C, … Dikic I (2013) Ubiquitin-independent function of optineurin in autophagic clearance of protein aggregates *J Cell Sci* **126**, 580–592.

Korolchuk VI, Saiki S, Lichtenberg M, Siddiqi FH, Roberts EA, Imarisio S, … Rubinsztein DC (2011) Lysosomal positioning coordinates cellular nutrient responses *Nat Cell Biol* **13**, 453–460.

Kotoda M, Furukawa H, Miyamoto T, Korai M, Shikata F, Kuwabara A, … Hashimoto T (2018) Role of Myeloid Lineage Cell Autophagy in Ischemic Brain Injury. *Stroke* **49**, 1488–1495.

Kouroku Y, Fujita E, Tanida I, Ueno T, Isoai A, Kumagai H, … Momoi T (2007) ER stress (PERK/eIF2alpha phosphorylation) mediates the polyglutamine-induced LC3 conversion, an essential step for autophagy formation. *Cell Death Differ* **14**, 230–9.

Kress M, May E, Cassingena R, and May P (1979) Simian virus 40-transformed cells express new species of proteins precipitable by anti-simian virus 40 tumor serum. *J Virol* **31**, 472–83.

Krishnamurthi R V., Moran AE, Forouzanfar MH, Bennett DA, Mensah GA, Lawes CMM, … Feigin VL (2014) The Global Burden of Hemorrhagic Stroke *Glob Heart* **9**, 101–106.

Krystosek A, and Seeds NW (1981) Plasminogen activator release at the neuronal growth cone. *Science* **213**, 1532–4.

Kuiper J, Otter M, Rijken DC, and van Berkel TJ (1988) Characterization of the interaction in vivo of tissue-type plasminogen activator with liver cells. *J Biol Chem* **263**, 18220–4.

Kuiper J, Van't Hof A, Otter M, Biessen EA, Rijken DC, and van Berkel TJ (1996) Interaction of mutants of tissue-type plasminogen activator with liver cells: effect of domain deletions. *Biochem J* **313 (Pt 3)**, 775–80.

Kuma A, Mizushima N, Ishihara N, and Ohsumi Y (2002) Formation of the ~350-kDa Apg12-Apg5·Apg16 Multimeric Complex, Mediated by Apg16 Oligomerization, Is Essential for Autophagy in Yeast *J Biol Chem* **277**, 18619–18625.

Kumar R, Krause GS, Yoshida H, Mori K, and DeGracia DJ (2003) Dysfunction of the Unfolded Protein Response during Global Brain Ischemia and Reperfusion *J Cereb Blood Flow Metab* **23**, 462–471.

Kundu M, Lindsten T, Yang C-Y, Wu J, Zhao F, Zhang J, … Thompson CB (2008) Ulk1 plays a critical role in the autophagic clearance of mitochondria and ribosomes during reticulocyte maturation. *Blood* **112**, 1493–502.

Kuroiwa T, Cahn R, Juhler M, Goping G, Campbell G, and Klatzo I (1985) Role of extracellular proteins in the dynamics of vasogenic brain edema. *Acta Neuropathol* **66**, 3–11.

Kurth T, Gaziano JM, Berger K, Kase CS, Rexrode KM, Cook NR, … Manson JE (2002) Body Mass Index and the Risk of Stroke in Men *Arch Intern Med* **162**, 2557.

Kyei GB, Dinkins C, Davis AS, Roberts E, Singh SB, Dong C, … Deretic V (2009) Autophagy pathway intersects with HIV-1 biosynthesis and regulates viral yields in macrophages. *J Cell Biol* **186**, 255–68.

L

Lamba D, Bauer M, Huber R, Fischer S, Rudolph R, Kohnert U, and Bode W (1996) The 2.3 A crystal structure of the catalytic domain of recombinant two-chain human tissue-type plasminogen activator. *J Mol Biol* **258**, 117–35.

Lawes CMM, Bennett DA, Feigin VL, and Rodgers A (2004) Blood pressure and stroke: an overview of published reviews. *Stroke* **35**, 776–85.

Lazarou M, Sliter DA, Kane LA, Sarraf SA, Wang C, Burman JL, … Youle RJ (2015) The ubiquitin kinase PINK1 recruits autophagy receptors to induce mitophagy *Nature* **524**, 309–314.

Le Behot A, Gauberti M, Martinez De Lizarrondo S, Montagne A, Lemarchand E, Repesse Y, … Vivien D (2014) GpIbα-VWF blockade restores vessel patency by dissolving platelet aggregates formed under very high shear rate in mice. *Blood* **123**, 3354–63.

Lee H-Y, Hwang I-Y, Im H, Koh J-Y, and Kim Y-H (2007) Non-proteolytic neurotrophic effects of tissue plasminogen activator on cultured mouse cerebrocortical neurons. *J Neurochem* **101**, 1236–47.

Lee SH, Ko HM, Kwon KJ, Lee J, Han S-H, Han DW, … Shin CY (2014) tPA regulates neurite outgrowth by phosphorylation of LRP5/6 in neural progenitor cells. *Mol Neurobiol* **49**, 199–215.

Lei Y, Wang S, Ren B, Wang J, Chen J, Lu J, … Tan J (2017) CHOP favors endoplasmic reticulum stress-induced apoptosis in hepatocellular carcinoma cells via inhibition of autophagy *PLoS One* **12**, e0183680.

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**, 123–31.

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.

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.

Leroy-Viard K, Jandrot-Perrus M, Tobelem G, and Guillin MC (1989) Covalent binding of human thrombin to a human endothelial cell-associated protein. *Exp Cell Res* **181**, 1–10.

Leroy B, Anderson M, and Soussi T (2014) TP53 Mutations in Human Cancer: Database Reassessment and Prospects for the Next Decade *Hum Mutat* **35**, 672–688.

Lesept F, Chevilley 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**, e2466–e2466.

Levin EG, and del Zoppo GJ (1994) Localization of tissue plasminogen activator in the endothelium of a limited number of vessels. *Am J Pathol* **144**, 855–61.

Lewerenz J, and Maher P (2015) Chronic Glutamate Toxicity in Neurodegenerative Diseases—What is the Evidence? *Front Neurosci* **9**.

Li F, Hayashi T, Jin G, Deguchi K, Nagotani S, Nagano I, … Abe K (2005) The protective effect of dantrolene on ischemic neuronal cell death is associated with reduced expression of endoplasmic reticulum stress markers *Brain Res* **1048**, 59–68.

Li Haiying, Gao A, Feng D, Wang Y, Zhang L, Cui Y, … Chen G (2014) Evaluation of the protective potential of brain microvascular endothelial cell autophagy on blood-brain barrier integrity during experimental cerebral ischemia-reperfusion injury. *Transl Stroke Res* **5**, 618–26.

Li Honghong, Qiu S, Li X, Li M, and Peng Y (2015) Autophagy biomarkers in CSF correlates with infarct size, clinical severity and neurological outcome in AIS patients. *J Transl Med* **13**, 359.

Li J, Zeng Z, Viollet B, Ronnett G V., and McCullough LD (2007) Neuroprotective Effects of Adenosine Monophosphate- Activated Protein Kinase Inhibition and Gene Deletion in Stroke *Stroke* **38**, 2992–2999.

Li L, Chen J, Sun S, Zhao J, Dong X, and Wang J (2017) Effects of Estradiol on Autophagy and Nrf-2/ARE Signals after Cerebral Ischemia. *Cell Physiol Biochem* **41**, 2027–2036.

Li Q, Yin Y, Zheng Y, Chen F, and Jin P (2018) Inhibition of autophagy promoted high glucose/ROS-mediated apoptosis in ADSCs *Stem Cell Res Ther* **9**, 289.

Li Q, Zhang T, Wang J, Zhang Z, Zhai Y, Yang G-Y, and Sun X (2014) Rapamycin attenuates mitochondrial dysfunction via activation of mitophagy in experimental ischemic stroke. *Biochem Biophys Res Commun* **444**, 182–8.

Li W-L, Yu SP, Chen D, Yu SS, Jiang Y-J, Genetta T, and Wei L (2013) The regulatory role of NF-κB in autophagy-like cell death after focal cerebral ischemia in mice. *Neuroscience* **244**, 16–30.

Li Weimin, Petrimpol M, Molle KD, Hall MN, Battegay EJ, and Humar R (2007) Hypoxia-Induced Endothelial Proliferation Requires Both mTORC1 and mTORC2 *Circ Res* **100**, 79–87.

Li Wen-wen, Li J, and Bao J (2012) Microautophagy: lesser-known self-eating *Cell Mol Life Sci* **69**, 1125–1136.

Liang C, Feng P, Ku B, Dotan I, Canaani D, Oh B-H, and Jung JU (2006) Autophagic and tumour suppressor activity of a novel Beclin1-binding protein UVRAG *Nat Cell Biol* **8**, 688–698.

Liang C, Lee J, Inn K-S, Gack MU, Li Q, Roberts EA, … Jung JU (2008) Beclin1-binding UVRAG targets the class C Vps complex to coordinate autophagosome maturation and endocytic trafficking *Nat Cell Biol* **10**, 776–787.

Liang M, Woodard LE, Liang A, Luo J, Wilson MH, Mitch WE, and Cheng J (2015) Protective Role of Insulin-Like Growth Factor-1 Receptor in Endothelial Cells against Unilateral Ureteral Obstruction–Induced Renal Fibrosis *Am J Pathol* **185**, 1234–1250.

Lijnen HR (2001) Plasmin and matrix metalloproteinases in vascular remodeling. *Thromb Haemost* **86**, 324–33.

Lin Y, Devin A, Rodriguez Y, and Liu ZG (1999) Cleavage of the death domain kinase RIP by caspase-8 prompts TNF-induced apoptosis. *Genes Dev* **13**, 2514–26.

Lin Yong, Deng W, Pang J, Kemper T, Hu J, Yin J, … Lu M (2017) The microRNA-99 family modulates hepatitis B virus replication by promoting IGF-1R/PI3K/Akt/mTOR/ULK1 signaling-induced autophagy *Cell Microbiol* **19**, e12709.

Lindahl TL, Sigurdardottir O, and Wiman B (1989) Stability of plasminogen activator inhibitor 1 (PAI-1). *Thromb Haemost* **62**, 748–51.

Lindenstrøm E, Boysen G, and Nyboe J (1993) Lifestyle factors and risk of cerebrovascular disease in women. The Copenhagen City Heart Study. *Stroke* **24**, 1468–72.

Lindsberg PJ, Carpe´n O, Paetau A, Karjalainen-Lindsberg M-L, and Kaste M (1996) Endothelial ICAM-1 Expression Associated With Inflammatory Cell Response in Human Ischemic Stroke *Circulation* **94**, 939–945.

Linzer DIH, and Levine AJ (1979) Characterization of a 54K Dalton cellular SV40 tumor antigen present in SV40-transformed cells and uninfected embryonal carcinoma cells *Cell* **17**, 43–52.

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**, 1458–64.

Liu C, Gao Y, Barrett J, and Hu B (2010) Autophagy and protein aggregation after brain ischemia. *J Neurochem* **115**, 68–78.

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**, 1379–83.

Liu D, Lu C, Wan R, Auyeung WW, and Mattson MP (2002) Activation of mitochondrial ATP-dependent potassium channels protects neurons against ischemia-induced death by a mechanism involving suppression of Bax translocation and cytochrome c release. *J Cereb Blood Flow Metab* **22**, 431–43.

Liu Q, Guan J-Z, Sun Y, Le Z, Zhang P, Yu D, and Liu Y (2017) Insulin-like growth factor 1 receptor-mediated cell survival in hypoxia depends on the promotion of autophagy via suppression of the PI3K/Akt/mTOR signaling pathway. *Mol Med Rep* **15**, 2136–2142.

Liu R., Li X, Gao W, Zhou Y, Wey S, Mitra SK, … Gill PS (2013) Monoclonal Antibody against Cell Surface GRP78 as a Novel Agent in Suppressing PI3K/AKT Signaling, Tumor Growth, and Metastasis *Clin Cancer Res* **19**, 6802–6811.

Liu Rui, Tang J-C, Pan M-X, Zhuang Y, Zhang Y, Liao H-B, … Wan Q (2018) ERK 1/2 Activation Mediates the Neuroprotective Effect of BpV(pic) in Focal Cerebral Ischemia–Reperfusion Injury *Neurochem Res* **43**, 1424–1438.

Liu W, D'Ercole JA, and Ye P (2011) Blunting type 1 insulin-like growth factor receptor expression exacerbates neuronal apoptosis following hypoxic/ischemic injury *BMC Neurosci* **12**, 64.

Liu X, Tian F, Wang S, Wang F, and Xiong L (2018) Astrocyte Autophagy Flux Protects Neurons Against Oxygen-Glucose Deprivation and Ischemic/Reperfusion Injury. *Rejuvenation Res* **21**, 405–415.

Liu Y., Shoji-Kawata S, Sumpter RM, Wei Y, Ginet V, Zhang L, … Levine B (2013) Autosis is a Na+,K+-ATPase-regulated form of cell death triggered by autophagy-inducing peptides, starvation, and hypoxia-ischemia *Proc Natl Acad Sci* **110**, 20364–20371.

Liu Yitao, Wong TP, Aarts M, Rooyakkers A, Liu L, Lai TW, … Wang YT (2007) NMDA receptor subunits have differential roles in mediating excitotoxic neuronal death both in vitro and in vivo. *J Neurosci* **27**, 2846–57.

Lochner J E, 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**, 2463–76.

Lochner Janis E, Honigman LS, Grant WF, Gessford SK, Hansen AB, Silverman MA, and Scalettar BA (2006) Activity-dependent release of tissue plasminogen activator from the dendritic spines of hippocampal neurons revealed by live-cell imaging. *J Neurobiol* **66**, 564–77.

Locksley RM, Killeen N, and Lenardo MJ (2001) The TNF and TNF receptor superfamilies: integrating mammalian biology. *Cell* **104**, 487–501.

Lockwood CJ, and Schatz F (n.d.) A biological model for the regulation of peri-implantational hemostasis and menstruation. *J Soc Gynecol Investig* **3**, 159–65.

Loddick SA, and Rothwell NJ (1996) Neuroprotective effects of human recombinant interleukin-1 receptor antagonist in focal cerebral ischaemia in the rat. *J Cereb Blood Flow Metab* **16**, 932–40.

Logallo N, Novotny V, Assmus J, Kvistad CE, Alteheld L, Rønning OM, … Thomassen L (2017) Tenecteplase versus alteplase for management of acute ischaemic stroke (NOR-TEST): a phase 3, randomised, open-label, blinded endpoint trial *Lancet Neurol* **16**, 781–788.

Lopez-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* **28**, 1212–21.

Louessard M, Bardou I, Lemarchand E, Thiebaut AM, Parcq J, Leprince J, … Roussel BD (2017) Activation of cell surface GRP78 decreases endoplasmic reticulum stress and neuronal death. *Cell Death Differ* **24**, 1518–1529.

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.

Lu J, He L, Behrends C, Araki M, Araki K, Jun Wang Q, … Yue Z (2014) NRBF2 regulates autophagy and prevents liver injury by modulating Atg14L-linked phosphatidylinositol-3 kinase III activity *Nat Commun* **5**, 3920.

Lu Q, Harris VA, Kumar S, Mansour HM, and Black SM (2015) Autophagy in neonatal hypoxia ischemic brain is associated with oxidative stress. *Redox Biol* **6**, 516–523.

Luan Q, Pan L, He D, Gong X, and Zhou H (2018) SC79, the AKT Activator Protects Cerebral Ischemia in a Rat Model of Ischemia/Reperfusion Injury. *Med Sci Monit* **24**, 5391–5397.

Lunn JS, Sakowski SA, McGinley LM, Pacut C, Hazel TG, Johe K, and Feldman EL (2015) Autocrine Production of IGF-I Increases Stem Cell-Mediated Neuroprotection *Stem Cells* **33**, 1480–1489.

Luo X, Budihardjo I, Zou H, Slaughter C, and Wang X (1998) Bid, a Bcl2 interacting protein, mediates cytochrome c release from mitochondria in response to activation of cell surface death receptors. *Cell* **94**, 481–90.

Lüthi A, Van der Putten H, Botteri FM, Mansuy IM, Meins M, Frey U, … Monard D (1997) Endogenous serine protease inhibitor modulates epileptic activity and hippocampal long-term potentiation. *J Neurosci* **17**, 4688–99.

Lv B, Hua T, Li F, Han J, Fang J, Xu L, … Jiang X (2017) Hypoxia-inducible factor 1 α protects mesenchymal stem cells against oxygen-glucose deprivation-induced injury via autophagy induction and PI3K/AKT/mTOR signaling pathway. *Am J Transl Res* **9**, 2492–2499.

M

Ma X, Liu K, Li J, Li H, Li J, Liu Y, … Liang H (2018) A non-canonical GTPase interaction enables ORP1L-Rab7-RILP complex formation and late endosome positioning. *J Biol Chem* **293**, 14155–14164.

Ma XM, and Blenis J (2009) Molecular mechanisms of mTOR-mediated translational control. *Nat Rev Mol Cell Biol* **10**, 307–18.

Macrez R, Ortega MC, Bardou I, Mehra A, Fournier A, Van der Pol SMA, … Docagne F (2016) Neuroendothelial NMDA receptors as therapeutic targets in experimental autoimmune encephalomyelitis *Brain* **139**, 2406–2419.

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**, 3007–12.

Maday S, and Holzbaur ELF (2014) Autophagosome biogenesis in primary neurons follows an ordered and spatially regulated pathway. *Dev Cell* **30**, 71–85.

Maejima I, Takahashi A, Omori H, Kimura T, Takabatake Y, Saitoh T, … Yoshimori T (2013) Autophagy sequesters damaged lysosomes to control lysosomal biogenesis and kidney injury *EMBO J* **32**, 2336–2347.

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.

Manil-Ségalen M, Culetto E, Legouis R, and Lefebvre C (2014) Interactions Between Endosomal Maturation and Autophagy In *Methods in enzymology* (Vol. 534, pp. 93–118).

Marchal G, Beaudouin V, Rioux P, de la Sayette V, Le Doze F, Viader F, … Baron JC (1996) Prolonged persistence of substantial volumes of potentially viable brain tissue after stroke: a correlative PET-CT study with voxel-based data analysis. *Stroke* **27**, 599–606.

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.

Marder KS, Tang MX, Mejia-Santana H, Rosado L, Louis ED, Comella CL, … Clark LN (2010) Predictors of parkin mutations in early-onset Parkinson disease: the consortium on risk for early-onset Parkinson disease study. *Arch Neurol* **67**, 731–8.

Margariti A, Li H, Chen T, Martin D, Vizcay-Barrena G, Alam S, … Zeng L (2013) *XBP1* mRNA Splicing Triggers an Autophagic Response in Endothelial Cells through *BECLIN-1* Transcriptional Activation *J Biol Chem* **288**, 859–872.

Mariño G, Pietrocola F, Eisenberg T, Kong Y, Malik SA, Andryushkova A, … Kroemer G (2014) Regulation of Autophagy by Cytosolic Acetyl-Coenzyme A *Mol Cell* **53**, 710–725.

Martin RL, Lloyd HG, and Cowan AI (1994) The early events of oxygen and glucose deprivation: setting the scene for neuronal death? *Trends Neurosci* **17**, 251–7.

Martinez de Lizarrondo S, Gakuba C, Herbig BA, Repessé Y, Ali C, Denis C V., … Gauberti M (2017) Potent Thrombolytic Effect of *N* -Acetylcysteine on Arterial Thrombi *Circulation* **136**, 646–660.

Maruyama T, and Noda NN (2017) Autophagy-regulating protease Atg4: structure, function, regulation and inhibition *J Antibiot (Tokyo)*.

Mast H, Thompson JL, Lee SH, Mohr JP, and Sacco RL (1995) Hypertension and diabetes mellitus as determinants of multiple lacunar infarcts. *Stroke* **26**, 30–3.

Matsui Y, Takagi H, Qu X, Abdellatif M, Sakoda H, Asano T, … Sadoshima J (2007) Distinct Roles of Autophagy in the Heart During Ischemia and Reperfusion *Circ Res* **100**, 914–922.

Matsumoto T, Ikeda K, Mukaida N, Harada A, Matsumoto Y, Yamashita J, and Matsushima K (1997) Prevention of cerebral edema and infarct in cerebral reperfusion injury by an antibody to interleukin-8. *Lab Invest* **77**, 119–25.

Matsunaga K, Saitoh T, Tabata K, Omori H, Satoh T, Kurotori N, … Yoshimori T (2009) Two Beclin 1-binding proteins, Atg14L and Rubicon, reciprocally regulate autophagy at different stages *Nat Cell Biol* **11**, 385–396.

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 U S*

A **101**, 16345–50.

Maurer K, Reyes-Robles T, Alonzo F, Durbin J, Torres VJ, and Cadwell K (2015) Autophagy Mediates Tolerance to Staphylococcus aureus Alpha-Toxin *Cell Host Microbe* **17**, 429–440.

Mauthe M, Jacob A, Freiberger S, Hentschel K, Stierhof Y-D, Codogno P, and Proikas-Cezanne T (2011) Resveratrol-mediated autophagy requires WIPI-1-regulated LC3 lipidation in the absence of induced phagophore formation *Autophagy* **7**, 1448–1461.

Mauthe M, Orhon I, Rocchi C, Zhou X, Luhr M, Hijlkema K-J, … Reggiori F (2018) Chloroquine inhibits autophagic flux by decreasing autophagosome-lysosome fusion *Autophagy* **14**, 1435–1455.

Mauvezin C, Nagy P, Juhász G, and Neufeld TP (2015) Autophagosome–lysosome fusion is independent of V-ATPase-mediated acidification *Nat Commun* **6**, 7007.

McCullough LD, Zeng Z, Li H, Landree LE, McFadden J, and Ronnett G V. (2005) Pharmacological Inhibition of AMP-activated Protein Kinase Provides Neuroprotection in Stroke *J Biol Chem* **280**, 20493–20502.

McEwan DG, Popovic D, Gubas A, Terawaki S, Suzuki H, Stadel D, … Dikic I (2015) PLEKHM1 Regulates Autophagosome-Lysosome Fusion through HOPS Complex and LC3/GABARAP Proteins *Mol Cell* **57**, 39–54.

Meares GP, Hughes KJ, Naatz A, Papa FR, Urano F, Hansen PA, … Corbett JA (2011) IRE1-Dependent Activation of AMPK in Response to Nitric Oxide *Mol Cell Biol* **31**, 4286–4297.

Medina MG, Ledesma MD, Domínguez JE, Medina M, Zafra D, Alameda F, … Navarro P (2005) Tissue plasminogen activator mediates amyloid-induced neurotoxicity via Erk1/2 activation *EMBO J* **24**, 1706–1716.

Mei X, Wang H, Zhang H, Liu C, Guo Z, Wang Y, … Tang P (2019) Blockade of receptor for advanced glycation end products promotes oligodendrocyte autophagy in spinal cord injury. *Neurosci Lett* **698**, 198–203.

Meins M, Piosik P, Schaeren-Wiemers N, Franzoni S, Troncoso E, Kiss JZ, … Monard D (2001) Progressive neuronal and motor dysfunction in mice overexpressing the serine protease inhibitor protease nexin-1 in postmitotic neurons. *J Neurosci* **21**, 8830–41.

Mestre MB, Fader CM, Sola C, and Colombo MI (2010) α-hemolysin is required for the activation of the autophagic pathway in *Staphylococcus aureus* infected cells *Autophagy* **6**, 110–125.

Mijaljica D, Prescott M, and Devenish RJ (2011) Microautophagy in mammalian cells: revisiting a 40-year-old conundrum. *Autophagy* **7**, 673–82.

Minor K, Phillips J, and Seeds NW (2009) Tissue plasminogen activator promotes axonal outgrowth on CNS myelin after conditioned injury *J Neurochem* **109**, 706–715.

Misra UK, and Pizzo S V. (2012) Receptor-Recognized α2-Macroglobulin Binds to Cell Surface-Associated GRP78 and Activates mTORC1 and mTORC2 Signaling in Prostate Cancer Cells *PLoS One* **7**, e51735.

Mizushima N. (2003) Mouse Apg16L, a novel WD-repeat protein, targets to the autophagic isolation membrane with the Apg12-Apg5 conjugate *J Cell Sci* **116**, 1679–1688.

Mizushima Noboru, and Levine B (2010) Autophagy in mammalian development and differentiation *Nat Cell Biol* **12**, 823–830.

Mizushima Noboru, Noda T, and Ohsumi Y (1999) Apg16p is required for the function of the Apg12p–Apg5p conjugate in the yeast autophagy pathway *EMBO J* **18**, 3888–3896.

Mizushima Noboru, Sugita H, Yoshimori T, and Ohsumi Y (1998) A New Protein Conjugation System in Human *J Biol Chem* **273**, 33889–33892.

Mizushima Noboru, Yamamoto A, Hatano M, Kobayashi Y, Kabeya Y, Suzuki K, … Yoshimori T (2001) Dissection of Autophagosome Formation Using Apg5-Deficient Mouse Embryonic Stem Cells *J Cell Biol* **152**, 657–668.

Mizushima Noboru, and Yoshimori T (2007) How to Interpret LC3 Immunoblotting *Autophagy* **3**, 542–545.

Mohamud Y, Qu J, Xue YC, Liu H, Deng H, and Luo H (2019) CALCOCO2/NDP52 and SQSTM1/p62 differentially regulate coxsackievirus B3 propagation *Cell Death Differ* **26**, 1062–1076.

Mokin M, Ansari SA, McTaggart RA, Bulsara KR, Goyal M, Chen M, and Fraser JF (2019) Indications for thrombectomy in acute ischemic stroke from emergent large vessel occlusion (ELVO): report of the SNIS Standards and Guidelines Committee *J Neurointerv Surg* **11**, 215–220.

Mokin M, Pendurthi A, Ljubimov V, Burgin WS, Siddiqui AH, Levy EI, and Primiani CT (2018) ASPECTS, Large Vessel Occlusion, and Time of Symptom Onset: Estimation of Eligibility for Endovascular Therapy *Neurosurgery* **83**, 122–127.

Momi S, Tantucci M, Van Roy M, Ulrichts H, Ricci G, and Gresele P (2013) Reperfusion of cerebral artery thrombosis by the GPIb-VWF blockade with the Nanobody ALX-0081 reduces brain infarct size in guinea pigs *Blood* **121**, 5088–5097.

Montagne A, Gauberti M, Macrez R, Jullienne A, Briens A, Raynaud J-S, … Maubert E (2012) Ultra-sensitive molecular MRI of cerebrovascular cell activation enables early detection of chronic central nervous system disorders *Neuroimage* **63**, 760–770.

Montaner J, Alvarez-Sabín J, Molina CA, Anglés A, Abilleira S, Arenillas J, and Monasterio J (2001) Matrix metalloproteinase expression is related to hemorrhagic transformation after cardioembolic stroke. *Stroke* **32**, 2762–7.

Mori K, Dwek RA, Downing AK, Opdenakker G, and Rudd PM (1995) The activation of type 1 and type 2 plasminogen by type I and type II tissue plasminogen activator. *J Biol Chem* **270**, 3261–7.

Morikawa E, Zhang SM, Seko Y, Toyoda T, and Kirino T (1996) Treatment of focal cerebral ischemia with synthetic oligopeptide corresponding to lectin domain of selectin. *Stroke* **27**, 951–5; discussion 956.

Morimoto N, Oida Y, Shimazawa M, Miura M, Kudo T, Imaizumi K, and Hara H (2007) Involvement of endoplasmic reticulum stress after middle cerebral artery occlusion in mice *Neuroscience* **147**, 957–967.

Morita-Fujimura Y, Fujimura M, Yoshimoto T, and Chan PH (2001) Superoxide During Reperfusion Contributes to Caspase-8 Expression and Apoptosis After Transient Focal Stroke *Stroke* **32**, 2356–2361.

Morris EJ, Jha S, Restaino CR, Dayananth P, Zhu H, Cooper A, … Samatar AA (2013) Discovery of a Novel ERK Inhibitor with Activity in Models of Acquired Resistance to BRAF and MEK Inhibitors *Cancer Discov* **3**, 742–750.

Mukhopadhyay S, Frias MA, Chatterjee A, Yellen P, and Foster DA (2016) The Enigma of Rapamycin Dosage *Mol Cancer Ther* **15**, 347–353.

N

Nabavi S, Fox R, Proulx CD, Lin JY, Tsien RY, and Malinow R (2014) Engineering a memory with LTD and LTP. *Nature* **511**, 348–52.

Nadarajah B, Alifragis P, Wong ROL, and Parnavelas JG (2002) Ventricle-directed migration in the developing cerebral cortex. *Nat Neurosci* **5**, 218–24.

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.

Nah J, Yoo S-M, Jung S, Jeong E Il, Park M, Kaang B-K, and Jung Y-K (2017) Phosphorylated CAV1 activates autophagy through an interaction with BECN1 under oxidative stress. *Cell Death Dis* **8**, e2822.

Nakaji K, Ihara M, Takahashi C, Itohara S, Noda M, Takahashi R, and Tomimoto H (2006) Matrix metalloproteinase-2 plays a critical role in the pathogenesis of white matter lesions after chronic cerebral hypoperfusion in rodents. *Stroke* **37**, 2816–23.

Nakamura S, and Yoshimori T (2017) New insights into autophagosome-lysosome fusion. *J Cell Sci* **130**, 1209–1216.

Nakka VP, Gusain A, and Raghubir R (2010) Endoplasmic Reticulum Stress Plays Critical Role in Brain Damage After Cerebral Ischemia/Reperfusion in Rats *Neurotox Res* **17**, 189–202.

National Institute of Neurological Disorders and Stroke rt-PA Stroke Study Group (1995) Tissue Plasminogen Activator for Acute Ischemic Stroke *N Engl J Med* **333**, 1581–1588.

Navarro-Yepes J, Burns M, Anandhan A, Khalimonchuk O, del Razo LM, Quintanilla-Vega B, … Franco R (2014) Oxidative Stress, Redox Signaling, and Autophagy: Cell Death *Versus* Survival *Antioxid Redox Signal* **21**, 66–85.

Nazio F, Strappazzon F, Antonioli M, Bielli P, Cianfanelli V, Bordi M, … Cecconi F (2013) mTOR inhibits autophagy by controlling ULK1 ubiquitylation, self-association and function through AMBRA1 and TRAF6 *Nat Cell Biol* **15**, 406–416.

Ndountse LT, and Chan HM (2009) Role of N-methyl-D-aspartate receptors in polychlorinated biphenyl mediated neurotoxicity *Toxicol Lett* **184**, 50–55.

Nedergaard M, Ransom B, and Goldman SA (2003) New roles for astrocytes: redefining the functional architecture of the brain. *Trends Neurosci* **26**, 523–30.

Nguyen TN, Padman BS, Usher J, Oorschot V, Ramm G, and Lazarou M (2016) Atg8 family LC3/GABARAP proteins are crucial for autophagosome-lysosome fusion but not autophagosome formation during PINK1/Parkin mitophagy and starvation. *J Cell Biol* **215**, 857–874.

Ni Y, Gu W-W, Liu Z-H, Zhu Y-M, Rong J-G, Kent TA, … Zhang H-L (2018) RIP1K Contributes to Neuronal and Astrocytic Cell Death in Ischemic Stroke via Activating Autophagic-lysosomal Pathway. *Neuroscience* **371**, 60–74.

Nicole O, Docagne F, Ali C, Margaill 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.

Nicoll RA (2017) A Brief History of Long-Term Potentiation *Neuron* **93**, 281–290.

Nicotera P, and Lipton SA (1999) Excitotoxins in neuronal apoptosis and necrosis. *J Cereb Blood Flow Metab* **19**, 583–91.

Nieto-Estévez V, Defterali Ç, and Vicario-Abejón C (2016) IGF-I: A Key Growth Factor that Regulates Neurogenesis and Synaptogenesis from Embryonic to Adult Stages of the Brain. *Front Neurosci* **10**, 52.

Nigro JM, Baker SJ, Preisinger AC, Jessup JM, Hosteller R, Cleary K, … Vogelstein B (1989) Mutations in the p53 gene occur in diverse human tumour types *Nature* **342**, 705–708.

Nitatori T, Sato N, Waguri S, Karasawa Y, Araki H, Shibanai K, … Uchiyama Y (1995) Delayed neuronal death in the CA1 pyramidal cell layer of the gerbil hippocampus following transient ischemia is apoptosis. *J Neurosci* **15**, 1001–11.

Niu G, Zhu D, Zhang X, Wang J, Zhao Y, and Wang X (2018) Role of Hypoxia-Inducible Factors 1α (HIF1α) in SH-SY5Y Cell Autophagy Induced by Oxygen-Glucose Deprivation. *Med Sci Monit* **24**, 2758–2766.

Noda T, and Ohsumi Y (1998) Tor, a Phosphatidylinositol Kinase Homologue, Controls Autophagy in Yeast *J Biol Chem* **273**, 3963–3966.

Nomura M, Ueno A, Saga K, Fukuzawa M, and Kaneda Y (2014) Accumulation of Cytosolic Calcium Induces Necroptotic Cell Death in Human Neuroblastoma *Cancer Res* **74**, 1056–1066.

Novak I, Kirkin V, McEwan DG, Zhang J, Wild P, Rozenknop A, … Dikic I (2010) Nix is a selective autophagy receptor for mitochondrial clearance *EMBO Rep* **11**, 45–51.

Novikoff AB, Beaufay H, and De duve C (1956) Electron microscopy of lysosomerich fractions from rat liver. *J Biophys Biochem Cytol* **2**, 179–84.

Ny T, and Mikus P (1997) Plasminogen activator inhibitor type-2. A spontaneously polymerizing serpin that exists in two topological forms. *Adv Exp Med Biol* **425**, 123–30.

O'Bryant Z, Vann KT, and Xiong Z-G (2014) Translational strategies for neuroprotection in ischemic stroke--focusing on acid-sensing ion channel 1a. *Transl Stroke Res* **5**, 59–68.

O'Carroll CB, and Barrett KM (2017) Cardioembolic Stroke. *Continuum (Minneap Minn)* **23**, 111–132.

O'Donnell MA, Perez-Jimenez E, Oberst A, Ng A, Massoumi R, Xavier R, … Ting AT (2011) Caspase 8 inhibits programmed necrosis by processing CYLD *Nat Cell Biol* **13**, 1437–1442.

O'Donnell MJ, Chin SL, Rangarajan S, Xavier D, Liu L, Zhang H, … INTERSTROKE investigators (2016) Global and regional effects of potentially modifiable risk factors associated with acute stroke in 32 countries (INTERSTROKE): a case-control study. *Lancet (London, England)* **388**, 761–75.

O'Reilly KE, Rojo F, She Q-B, Solit D, Mills GB, Smith D, … Rosen N (2006) mTOR Inhibition Induces Upstream Receptor Tyrosine Kinase Signaling and Activates Akt *Cancer Res* **66**, 1500–1508.

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.

Ogata M, Hino S, Saito A, Morikawa K, Kondo S, Kanemoto S, … Imaizumi K (2006) Autophagy is activated for cell survival after endoplasmic reticulum stress. *Mol Cell Biol* **26**, 9220–31.

Ohshima J, Lee Y, Sasai M, Saitoh T, Su Ma J, Kamiyama N, … Yamamoto M (2014) Role of Mouse and Human Autophagy Proteins in IFN-γ–Induced Cell-Autonomous Responses against *Toxoplasma gondii J Immunol* **192**, 3328–3335.

Orsi A, Razi M, Dooley HC, Robinson D, Weston AE, Collinson LM, and Tooze SA (2012) Dynamic and transient interactions of Atg9 with autophagosomes, but not membrane integration, are required for autophagy. *Mol Biol Cell* **23**, 1860–73.

Ortiz-Zapater E, Peiró S, Roda O, Corominas JM, Aguilar S, Ampurdanés C, … Navarro P (2007) Tissue plasminogen activator induces pancreatic cancer cell proliferation by a non-catalytic mechanism that requires extracellular signal-regulated kinase 1/2 activation through epidermal growth factor receptor and annexin A2. *Am J Pathol* **170**, 1573–84.

Orvedahl A, Alexander D, Tallóczy Z, Sun Q, Wei Y, Zhang W, … Levine B (2007) HSV-1 ICP34.5 Confers Neurovirulence by Targeting the Beclin 1 Autophagy Protein *Cell Host Microbe* **1**, 23–35.

Osada N, Kosuge Y, Kihara T, Ishige K, and Ito Y (2009) Apolipoprotein E-deficient mice are more vulnerable to ER stress after transient forebrain ischemia *Neurochem Int* **54**, 403–409.

Osterwalder T, Contartese J, Stoeckli ET, Kuhn TB, and Sonderegger P (1996) Neuroserpin, an axonally secreted serine protease inhibitor. *EMBO J* **15**, 2944–53.

Otomo C, Metlagel Z, Takaesu G, and Otomo T (2013) Structure of the human ATG12~ATG5 conjugate required for LC3 lipidation in autophagy *Nat Struct Mol Biol* **20**, 59–66.

P

Padman BS, Nguyen TN, Uoselis L, Skulsuppaisarn M, Nguyen LK, and Lazarou M (2019) LC3/GABARAPs drive ubiquitin-independent recruitment of Optineurin and NDP52 to amplify mitophagy *Nat Commun* **10**, 408.

Pandian JD, Gall SL, Kate MP, Silva GS, Akinyemi RO, Ovbiagele BI, … Thrift AG (2018) Prevention of stroke: a global perspective. *Lancet (London, England)* **392**, 1269–1278.

Pang PT, Teng HK, Zaitsev E, Woo NT, Sakata K, Zhen S, … Lu B (2004) Cleavage of proBDNF by tPA/plasmin is essential for long-term hippocampal plasticity. *Science* **306**, 487–91.

Pankiv S, Clausen TH, Lamark T, Brech A, Bruun J-A, Outzen H, … Johansen T (2007) p62/SQSTM1 Binds Directly to Atg8/LC3 to Facilitate Degradation of Ubiquitinated Protein Aggregates by Autophagy *J Biol Chem* **282**, 24131–24145.

Papadakis M, Hadley G, Xilouri M, Hoyte LC, Nagel S, McMenamin MM, … Buchan AM (2013) Tsc1 (hamartin) confers neuroprotection against ischemia by inducing autophagy. *Nat Med* **19**, 351–7.

Parcq J, Bertrand T, Montagne A, Baron AF, 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 J-M, Seo M, Jung CH, Grunwald D, Stone M, Otto NM, … Kim D-H (2018) ULK1 phosphorylates Ser30 of BECN1 in association with ATG14 to stimulate autophagy induction *Autophagy* **14**, 584–597.

Park YH, Kim SH, Kim SZ, and Park WH (2009) Anti-apoptotic effects of pan-caspase inhibitor (Z-VAD), SOD or catalase on antimycin A-induced HeLa cell death *Mol Med Rep* **2**, 307–11.

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. Catecholamine storage vesicles as a reservoir for the rapid release of t-PA. *J Biol Chem* **272**, 1976–82.

Parsons JT, Churn SB, and DeLorenzo RJ (1999) Global ischemia-induced inhibition of the coupling ratio of calcium uptake and ATP hydrolysis by rat whole brain microsomal Mg2+/Ca2+ ATPase *Brain Res* **834**, 32–41.

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.

Pattingre S, Tassa A, Qu X, Garuti R, Liang XH, Mizushima N, … Levine B (2005) Bcl-2 Antiapoptotic Proteins Inhibit Beclin 1-Dependent Autophagy *Cell* **122**, 927–939.

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.

Pawlak Robert, Magarinos AM, Melchor J, McEwen B, and Strickland S (2003) Tissue plasminogen activator in the amygdala is critical for stress-induced anxiety-like behavior. *Nat Neurosci* **6**, 168–74.

Pedro JMB-S, Wei Y, Sica V, Maiuri MC, Zou Z, Kroemer G, and Levine B (2015) BAX and BAK1 are dispensable for ABT-737-induced dissociation of the BCL2-BECN1 complex and autophagy *Autophagy* **11**, 452–459.

Pelisch N, Dan T, Ichimura A, Sekiguchi H, Vaughan DE, van Ypersele de Strihou C, and Miyata T (2015) Plasminogen Activator Inhibitor-1 Antagonist TM5484 Attenuates Demyelination and Axonal Degeneration in a Mice Model of Multiple Sclerosis *PLoS One* **10**, e0124510.

Pengyue Z, Tao G, Hongyun H, Liqiang Y, and Yihao D (2017) Breviscapine confers a neuroprotective efficacy against transient focal cerebral ischemia by attenuating neuronal and astrocytic autophagy in the penumbra. *Biomed Pharmacother* **90**, 69–76.

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**, 214–21.

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* **952**, 245–54.

Pickles S, Vigié P, and Youle RJ (2018) Mitophagy and Quality Control Mechanisms in Mitochondrial Maintenance *Curr Biol* **28**, R170–R185.

Pittman RN, Ivins JK, and Buettner HM (1989) Neuronal plasminogen activators: cell surface binding sites and involvement in neurite outgrowth. *J Neurosci* **9**, 4269–86.

Piya S, White EJ, Klein SR, Jiang H, McDonnell TJ, Gomez-Manzano C, and Fueyo J (2011) The E1B19K Oncoprotein Complexes with Beclin 1 to Regulate Autophagy in Adenovirus-Infected Cells *PLoS One* **6**, e29467.

Pohl G, Källström M, Bergsdorf N, Wallén P, and Jörnvall H (1984) Tissue plasminogen activator: peptide analyses confirm an indirectly derived amino acid sequence, identify the active site serine residue, establish glycosylation sites, and localize variant differences. *Biochemistry* **23**, 3701–7.

Polavarapu R, Gongora MC, Yi H, Ranganthan S, Lawrence DA, Strickland D, 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**, 3270–8.

Polson HEJ, de Lartigue J, Rigden DJ, Reedijk M, Urbé S, Clague MJ, and Tooze SA (2010) Mammalian Atg18 (WIPI2) localizes to omegasome-anchored phagophores and positively regulates LC3 lipidation *Autophagy* **6**, 506–522.

Price CJS, Menon DK, Peters AM, Ballinger JR, Barber RW, Balan KK, … Warburton EA (2004) Cerebral neutrophil recruitment, histology, and outcome in acute ischemic stroke: an imaging-based study. *Stroke* **35**, 1659–64.

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.

Pun PBL, Lu J, and Moochhala S (2009) Involvement of ROS in BBB dysfunction *Free Radic Res* **43**, 348–364.

Puri C, Renna M, Bento CF, Moreau K, and Rubinsztein DC (2013) Diverse Autophagosome Membrane Sources Coalesce in Recycling Endosomes *Cell* **154**, 1285–1299.

Puri C, Renna M, Bento CF, Moreau K, and Rubinsztein DC (2014) ATG16L1 meets ATG9 in recycling endosomes: additional roles for the plasma membrane and endocytosis in autophagosome biogenesis. *Autophagy* **10**, 182–4.

Puyal J, Vaslin A, Mottier V, and Clarke PGH (2009) Postischemic treatment of neonatal cerebral ischemia should target autophagy. *Ann Neurol* **66**, 378–89.

Pyo J-O, Jang M-H, Kwon Y-K, Lee H-J, Jun J-I, Woo H-N, … Jung Y-K (2005) Essential Roles of Atg5 and FADD in Autophagic Cell Death *J Biol Chem* **280**, 20722–20729.

Q

Qi X, Okuma Y, Hosoi T, and Nomura Y (2004) Edaravone Protects against Hypoxia/Ischemia-Induced Endoplasmic Reticulum Dysfunction *J Pharmacol Exp Ther* **311**, 388–393.

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**, 453–7.

Qin A-P, Liu C-F, Qin Y-Y, Hong L-Z, Xu M, Yang L, … Zhang H-L (2010) Autophagy was activated in injured astrocytes and mildly decreased cell survival following glucose and oxygen deprivation and focal cerebral ischemia. *Autophagy* **6**, 738–53.

Qureshi AI (2009) Intracerebral haemorrhage Adnan **373**, 1632–1644.

R

Rai AT, Seldon AE, Boo S, Link PS, Domico JR, Tarabishy AR, … Carpenter JS (2017) A population-based incidence of acute large vessel occlusions and thrombectomy eligible patients indicates significant potential for growth of endovascular stroke therapy in the USA *J Neurointerv Surg* **9**, 722–726.

Rami A, Langhagen A, and Steiger S (2008) Focal cerebral ischemia induces upregulation of Beclin 1 and autophagy-like cell death. *Neurobiol Dis* **29**, 132–41.

Randomised trial of a perindopril-based blood-pressure-lowering regimen among 6105 individuals with previous stroke or transient ischaemic attack (2001) *Lancet* **358**, 1033–1041.

Ravikumar B., Duden R, and Rubinsztein DC (2002) Aggregate-prone proteins with polyglutamine and polyalanine expansions are degraded by autophagy *Hum Mol Genet* **11**, 1107–1117.

Ravikumar Brinda, Moreau K, Jahreiss L, Puri C, and Rubinsztein DC (2010) Plasma membrane contributes to the formation of pre-autophagosomal structures *Nat Cell Biol* **12**, 747–757.

Ravikumar Brinda, Vacher C, Berger Z, Davies JE, Luo S, Oroz LG, … Rubinsztein DC (2004) Inhibition of mTOR induces autophagy and reduces toxicity of polyglutamine expansions in fly and mouse models of Huntington disease *Nat Genet* **36**, 585–595.

Reef S, Zalckvar E, Shifman O, Bialik S, Sabanay H, Oren M, and Kimchi A (2006) A Short Mitochondrial Form of p19ARF Induces Autophagy and Caspase-Independent Cell Death *Mol Cell* **22**, 463–475.

Reeves MJ, Bushnell CD, Howard G, Gargano JW, Duncan PW, Lynch G, … Lisabeth L (2008) Sex differences in stroke: epidemiology, clinical presentation, medical care, and outcomes *Lancet Neurol* **7**, 915–926.

Rexrode KM, Hennekens CH, Willett WC, Colditz GA, Stampfer MJ, Rich-Edwards JW, … Manson JE (1997) A Prospective Study of Body Mass Index, Weight Change, and Risk of Stroke in Women *JAMA J Am Med Assoc* **277**, 1539.

Reynolds K, Lewis B, Nolen JDL, Kinney GL, Sathya B, and He J (2003) Alcohol Consumption and Risk of Stroke *JAMA* **289**, 579.

Ricagno S, Caccia S, Sorrentino G, Antonini G, and Bolognesi M (2009) Human Neuroserpin: Structure and Time-Dependent Inhibition *J Mol Biol* **388**, 109–121.

Riedel CH, Zimmermann P, Jensen-Kondering U, Stingele R, Deuschl G, and Jansen O (2011) The Importance of Size *Stroke* **42**, 1775–1777.

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.

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* **580**, 140–53.

Rissanen A, Sivenius J, and Jolkkonen J (2006) Prolonged bihemispheric alterations in unfolded protein response related gene expression after experimental stroke *Brain Res* **1087**, 60–66.

Rodrigo R, Fernández-Gajardo R, Gutiérrez R, Matamala JM, Carrasco R, Miranda-Merchak A, and Feuerhake W (2013) Oxidative stress and pathophysiology of ischemic stroke: novel therapeutic opportunities. *CNS Neurol Disord Drug Targets* **12**, 698–714.

Rodríguez-González R, Sobrino T, Rodríguez-Yáñez M, Millán M, Brea D, Miranda E, … Castillo J (2011) Association between neuroserpin and molecular markers of brain damage in patients with acute ischemic stroke *J Transl Med* **9**, 58.

Rogove AD, Siao C, 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 22)**, 4007–16.

Rogove AD, and Tsirka SE (1998) Neurotoxic responses by microglia elicited by excitotoxic injury in the mouse hippocampus. *Curr Biol* **8**, 19–25.

Rolfs A, Fazekas F, Grittner U, Dichgans M, Martus P, Holzhausen M, … Kopacevic L (2013) Acute cerebrovascular disease in the young: the Stroke in Young Fabry Patients study. *Stroke* **44**, 340–9.

Romanic AM, White RF, Arleth AJ, Ohlstein EH, and Barone FC (1998) Matrix metalloproteinase expression increases after cerebral focal ischemia in rats: inhibition of matrix metalloproteinase-9 reduces infarct size. *Stroke* **29**, 1020–30.

Romanov J, Walczak M, Ibiricu I, Schüchner S, Ogris E, Kraft C, and Martens S (2012) Mechanism and functions of membrane binding by the Atg5-Atg12/Atg16 complex during autophagosome formation *EMBO J* **31**, 4304–4317.

Ropolo A, Grasso D, Pardo R, Sacchetti ML, Archange C, Re A Lo, … Vaccaro MI (2007) The Pancreatitis-induced Vacuole Membrane Protein 1 Triggers Autophagy in Mammalian Cells *J Biol Chem* **282**, 37124–37133.

Rosenberg G A, Estrada EY, and Dencoff JE (1998) Matrix metalloproteinases and TIMPs are associated with blood-brain barrier opening after reperfusion in rat brain. *Stroke* **29**, 2189–95.

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

Rostislavleva K, Soler N, Ohashi Y, Zhang L, Pardon E, Burke JE, … Williams RL (2015) Structure and flexibility of the endosomal Vps34 complex reveals the basis of its function on membranes *Science (80-)* **350**, aac7365–aac7365.

Rothwell PM, Coull AJ, Silver LE, Fairhead JF, Giles MF, Lovelock CE, … Oxford Vascular Study (2005) Population-based study of event-rate, incidence, case fatality, and mortality for all acute vascular events in all arterial territories (Oxford Vascular Study). *Lancet (London, England)* **366**, 1773–83.

Rouf SA, Moo-Young M, and Chisti Y (1996) Tissue-type plasminogen activator: characteristics, applications and production technology. *Biotechnol Adv* **14**, 239–66.

Roullet S, Freyburger G, Labrouche S, Morisse E, Stecken L, Quinart A, … Sztark F (2015) Hyperfibrinolysis during liver transplantation is associated with bleeding *Thromb Haemost* **113**, 1145–1148.

Roussel BD, Kruppa AJ, Miranda E, Crowther DC, Lomas DA, and Marciniak SJ (2013) Endoplasmic reticulum dysfunction in neurological disease. *Lancet Neurol* **12**, 105–18.

Roussel BD, Mysiorek C, Rouhiainen A, Jullienne A, Parcq J, Hommet Y, … Ali C (2011) HMGB-1 promotes fibrinolysis and reduces neurotoxicity mediated by tissue plasminogen activator. *J Cell Sci* **124**, 2070–6.

Rousset CI, Leiper FC, Kichev A, Gressens P, Carling D, Hagberg H, and Thornton C (2015) A dual role for AMP-activated protein kinase (AMPK) during neonatal hypoxic-ischaemic brain injury in mice *J Neurochem* **133**, 242–252.

Ruan Y-W, Han X-J, Shi Z-S, Lei Z-G, and Xu ZC (2012) Remodeling of synapses in the CA1 area of the hippocampus after transient global ischemia. *Neuroscience* **218**, 268–77.

Rubinstein AD, Eisenstein M, Ber Y, Bialik S, and Kimchi A (2011) The Autophagy Protein Atg12 Associates with Antiapoptotic Bcl-2 Family Members to Promote Mitochondrial Apoptosis *Mol Cell* **44**, 698–709.

Russell RC, Tian Y, Yuan H, Park HW, Chang Y-Y, Kim J, … Guan K-L (2013) ULK1 induces autophagy by phosphorylating Beclin-1 and activating VPS34 lipid kinase *Nat Cell Biol* **15**, 741–750.

Russell RC, Yuan H-X, and Guan K-L (2014) Autophagy regulation by nutrient signaling *Cell Res* **24**, 42–57.

Ryan F, Khodagholi F, Dargahi L, Minai-Tehrani D, and Ahmadiani A (2018) Temporal Pattern and Crosstalk of Necroptosis Markers with Autophagy and Apoptosis Associated Proteins in Ischemic Hippocampus. *Neurotox Res* **34**, 79–92.

Rzymski T, Milani M, Pike L, Buffa F, Mellor HR, Winchester L, … Harris AL (2010) Regulation of autophagy by ATF4 in response to severe hypoxia *Oncogene* **29**, 4424–4435.

S

Sabatini DM, Erdjument-Bromage H, Lui M, Tempst P, and Snyder SH (1994) RAFT1: A mammalian protein that binds to FKBP12 in a rapamycin-dependent fashion and is homologous to yeast TORs *Cell* **78**, 35–43.

Sabers CJ, Martin MM, Brunn GJ, Williams JM, Dumont FJ, Wiederrecht G, and Abraham RT (1995) Isolation of a Protein Target of the FKBP12-Rapamycin Complex in Mammalian Cells *J Biol Chem* **270**, 815–822.

Sadhu A, Moriyasu Y, Acharya K, and Bandyopadhyay M (2019) Nitric oxide and ROS mediate autophagy and

regulate Alternaria alternata toxin-induced cell death in tobacco BY-2 cells *Sci Rep* **9**, 8973.

Saitoh T, Fujita N, Hayashi T, Takahara K, Satoh T, Lee H, … Akira S (2009) Atg9a controls dsDNA-driven dynamic translocation of STING and the innate immune response *Proc Natl Acad Sci* **106**, 20842–20846.

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*.

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.

Sarbassov DD, Guertin DA, Ali SM, and Sabatini DM (2005) Phosphorylation and regulation of Akt/PKB by the rictor-mTOR complex. *Science* **307**, 1098–101.

Sarkar S, Floto RA, Berger Z, Imarisio S, Cordenier A, Pasco M, … Rubinsztein DC (2005) Lithium induces autophagy by inhibiting inositol monophosphatase *J Cell Biol* **170**, 1101–1111.

Satoo K, Noda NN, Kumeta H, Fujioka Y, Mizushima N, Ohsumi Y, and Inagaki F (2009) The structure of Atg4B–LC3 complex reveals the mechanism of LC3 processing and delipidation during autophagy *EMBO J* **28**, 1341–1350.

Saxton RA, and Sabatini DM (2017) mTOR Signaling in Growth, Metabolism, and Disease. *Cell* **168**, 960–976.

Scarlatti F, Maffei R, Beau I, Codogno P, and Ghidoni R (2008) Role of non-canonical Beclin 1-independent autophagy in cell death induced by resveratrol in human breast cancer cells *Cell Death Differ* **15**, 1318–1329.

Scarlatti Francesca, Bauvy C, Ventruti A, Sala G, Cluzeaud F, Vandewalle A, … Codogno P (2004) Ceramide-mediated Macroautophagy Involves Inhibition of Protein Kinase B and Up-regulation of Beclin 1 *J Biol Chem* **279**, 18384–18391.

Scherz-Shouval R, Weidberg H, Gonen C, Wilder S, Elazar Z, and Oren M (2010) p53-dependent regulation of autophagy protein LC3 supports cancer cell survival under prolonged starvation *Proc Natl Acad Sci* **107**, 18511–18516.

Schilling M, Besselmann M, Leonhard C, Mueller M, Ringelstein EB, and Kiefer R (2003) Microglial activation precedes and predominates over macrophage infiltration in transient focal cerebral ischemia: a study in green fluorescent protein transgenic bone marrow chimeric mice. *Exp Neurol* **183**, 25–33.

Schneider A, Younis RH, and Gutkind JS (2008) Hypoxia-induced energy stress inhibits the mTOR pathway by activating an AMPK/REDD1 signaling axis in head and neck squamous cell carcinoma. *Neoplasia* **10**, 1295–302.

Schneider S, Kornejeva A, Vibo R, and Kõrv J (2017) Risk Factors and Etiology of Young Ischemic Stroke Patients in Estonia. *Stroke Res Treat* **2017**, 8075697.

Schrimpf SP, Bleiker AJ, Brecevic L, Kozlov S V, Berger P, Osterwalder T, … Sonderegger P (1997) Human neuroserpin (PI12): cDNA cloning and chromosomal localization to 3q26. *Genomics* **40**, 55–62.

Schwab S, Spranger M, Krempien S, Hacke W, and Bettendorf M (1997) Plasma Insulin-like Growth Factor I and IGF Binding Protein 3 Levels in Patients With Acute Cerebral Ischemic Injury *Stroke* **28**, 1744–1748.

Scott RW, Bergman BL, Bajpai A, Hersh RT, Rodriguez H, Jones BN, … Baker JB (1985) Protease nexin. Properties and a modified purification procedure. *J Biol Chem* **260**, 7029–34.

Seeds NW, Basham ME, and Haffke SP (1999) Neuronal migration is retarded in mice lacking the tissue plasminogen activator gene *Proc Natl Acad Sci* **96**, 14118–14123.

Sekerdag E, Solaroglu I, and Gursoy-Ozdemir Y (2018) Cell Death Mechanisms in Stroke and Novel Molecular and

Cellular Treatment Options *Curr Neuropharmacol* **16**, 1396–1415.

Selmer R, and Tverdal A (1995) Body mass index and cardiovascular mortality at different levels of blood pressure: a prospective study of Norwegian men and women. *J Epidemiol Community Health* **49**, 265–70.

Sentelle RD, Senkal CE, Jiang W, Ponnusamy S, Gencer S, Panneer Selvam S, … Ogretmen B (2012) Ceramide targets autophagosomes to mitochondria and induces lethal mitophagy *Nat Chem Biol* **8**, 831–838.

Severens-Rijvers CAH, Al-Nasiry S, Ghossein-Doha C, Marzano S, Ten Cate H, Winkens B, … Peeters LLH (2017) Circulating Fibronectin and Plasminogen Activator Inhibitor-2 Levels as Possible Predictors of Recurrent Placental Syndrome: An Exploratory Study *Gynecol Obstet Invest* **82**, 355–360.

Shen Z, Zheng Y, Wu J, Chen Y, Wu X, Zhou Y, … Zhang X (2017) PARK2-dependent mitophagy induced by acidic postconditioning protects against focal cerebral ischemia and extends the reperfusion window *Autophagy* **13**, 473–485.

Sheng R, Liu X-Q, Zhang L-S, Gao B, Han R, Wu Y-Q, … Qin Z-H (2012) Autophagy regulates endoplasmic reticulum stress in ischemic preconditioning. *Autophagy* **8**, 310–25.

Sheng R, Zhang L-S, Han R, Liu X-Q, Gao B, and Qin Z-H (2010) Autophagy activation is associated with neuroprotection in a rat model of focal cerebral ischemic preconditioning. *Autophagy* **6**, 482–94.

Shi R-Y, Zhu S-H, Li V, Gibson SB, Xu X-S, and Kong J-M (2014) BNIP3 interacting with LC3 triggers excessive mitophagy in delayed neuronal death in stroke. *CNS Neurosci Ther* **20**, 1045–55.

Shi R, Weng J, Zhao L, Li X-M, Gao T-M, and Kong J (2012) Excessive autophagy contributes to neuron death in cerebral ischemia. *CNS Neurosci Ther* **18**, 250–60.

Shi W, Wei X, Wang Z, Han H, Fu Y, Liu J, … Yi F (2016) HDAC9 exacerbates endothelial injury in cerebral ischaemia/reperfusion injury *J Cell Mol Med* **20**, 1139–1149.

Shibata M, Lu T, Furuya T, Degterev A, Mizushima N, Yoshimori T, … Yuan J (2006) Regulation of Intracellular Accumulation of Mutant Huntingtin by Beclin 1 *J Biol Chem* **281**, 14474–14485.

Shimizu S, Kanaseki T, Mizushima N, Mizuta T, Arakawa-Kobayashi S, Thompson CB, and Tsujimoto Y (2004) Role of Bcl-2 family proteins in a non-apoptotic programmed cell death dependent on autophagy genes *Nat Cell Biol* **6**, 1221–1228.

Shin CY, Kundel M, and Wells DG (2004) Rapid, activity-induced increase in tissue plasminogen activator is mediated by metabotropic glutamate receptor-dependent mRNA translation. *J Neurosci* **24**, 9425–33.

Shintani T, Mizushima N, Ogawa Y, Matsuura A, Noda T, and Ohsumi Y (1999) Apg10p, a novel protein-conjugating enzyme essential for autophagy in yeast *EMBO J* **18**, 5234–5241.

Shinton R, and Beevers G (1989) Meta-analysis of relation between cigarette smoking and stroke. *BMJ* **298**, 789–94.

Shpilka T, Weidberg H, Pietrokovski S, and Elazar Z (2011) Atg8: an autophagy-related ubiquitin-like protein family *Genome Biol* **12**, 226.

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**, 3234–42.

Siao C-J, and Tsirka SE (2002) Tissue plasminogen activator mediates microglial activation via its finger domain through annexin II. *J Neurosci* **22**, 3352–8.

Silverman GA, Bird PI, Carrell RW, Church FC, Coughlin PB, Gettins PG, … Whisstock JC (2001) The serpins are an expanding superfamily of structurally similar but functionally diverse proteins. Evolution, mechanism of

inhibition, novel functions, and a revised nomenclature. *J Biol Chem* **276**, 33293–6.

Simard JM, Tarasov K V, and Gerzanich V (2007) Non-selective cation channels, transient receptor potential channels and ischemic stroke. *Biochim Biophys Acta* **1772**, 947–57.

Simpson CS, Johnston HM, and Morris BJ (1994) Neuronal expression of protease-nexin 1 mRNA in rat brain. *Neurosci Lett* **170**, 286–90.

Singh R, De Aguiar RB, Naik S, Mani S, Ostadsharif K, Wencker D, … Mani A (2013) LRP6 Enhances Glucose Metabolism by Promoting TCF7L2-Dependent Insulin Receptor Expression and IGF Receptor Stabilization in Humans *Cell Metab* **17**, 197–209.

Smedsrød B, Einarsson M, and Pertoft H (1988) Tissue plasminogen activator is endocytosed by mannose and galactose receptors of rat liver cells. *Thromb Haemost* **59**, 480–4.

Smith CM, Mayer JA, and Duncan ID (2013) Autophagy promotes oligodendrocyte survival and function following dysmyelination in a long-lived myelin mutant. *J Neurosci* **33**, 8088–100.

Smith DM, Patel S, Raffoul F, Haller E, Mills GB, and Nanjundan M (2010) Arsenic trioxide induces a beclin-1-independent autophagic pathway via modulation of SnoN/SkiL expression in ovarian carcinoma cells *Cell Death Differ* **17**, 1867–1881.

Son SM, Park SJ, Lee H, Siddiqi F, Lee JE, Menzies FM, and Rubinsztein DC (2019) Leucine Signals to mTORC1 via Its Metabolite Acetyl-Coenzyme A *Cell Metab* **29**, 192-201.e7.

Song X, Jensen MØ, Jogini V, Stein RA, Lee C-H, Mchaourab HS, … Gouaux E (2018) Mechanism of NMDA receptor channel block by MK-801 and memantine *Nature* **556**, 515–519.

Soreq H, and Miskin R (1983) Plasminogen activator in the developing rat cerebellum: biosynthesis and localization in granular neurons. *Brain Res* **313**, 149–58.

Soria FN, Pérez-Samartín A, Martin A, Gona KB, Llop J, Szczupak B, … Domercq M (2014) Extrasynaptic glutamate release through cystine/glutamate antiporter contributes to ischemic damage *J Clin Invest* **124**, 3645–3655.

Sprengers ED, and Kluft C (1987) Plasminogen activator inhibitors. *Blood* **69**, 381–7.

Stambolic V, MacPherson D, Sas D, Lin Y, Snow B, Jang Y, … Mak TW (2001) Regulation of PTEN transcription by p53. *Mol Cell* **8**, 317–25.

Stiles J, and Jernigan TL (2010) The Basics of Brain Development *Neuropsychol Rev* **20**, 327–348.

Strappazzon F, Nazio F, Corrado M, Cianfanelli V, Romagnoli A, Fimia GM, … Cecconi F (2015) AMBRA1 is able to induce mitophagy via LC3 binding, regardless of PARKIN and p62/SQSTM1 *Cell Death Differ* **22**, 419–432.

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.

Sugawara T, and Chan PH (2003) Reactive Oxygen Radicals and Pathogenesis of Neuronal Death After Cerebral Ischemia *Antioxid Redox Signal* **5**, 597–607.

Sun B, Ou H, Ren F, Huan Y, Zhong T, Gao M, and Cai H (2018) Propofol inhibited autophagy through Ca2+/CaMKKβ/AMPK/mTOR pathway in OGD/R-induced neuron injury *Mol Med* **24**, 58.

Sun L, Liu N, Liu S-S, Xia W-Y, Liu M-Y, Li L-F, and Gao J-X (2015) Beclin-1-independent autophagy mediates programmed cancer cell death through interplays with endoplasmic reticulum and/or mitochondria in colbat chloride-induced hypoxia. *Am J Cancer Res* **5**, 2626–42.

Sun M, Zhao Y, Gu Y, and Xu C (2009) Inhibition of nNOS reduces ischemic cell death through down-regulating calpain and caspase-3 after experimental stroke *Neurochem Int* **54**, 339–346.

Sun Q, Zhang J, Fan W, Wong KN, Ding X, Chen S, and Zhong Q (2011) The RUN Domain of Rubicon Is Important for hVps34 Binding, Lipid Kinase Inhibition, and Autophagy Suppression *J Biol Chem* **286**, 185–191.

Sun T, Li X, Zhang P, Chen W-D, Zhang H, Li D-D, … Zhu X-F (2015) Acetylation of Beclin 1 inhibits autophagosome maturation and promotes tumour growth *Nat Commun* **6**, 7215.

Sun W, Wu X, Gao H, Yu J, Zhao W, Lu J-J, … Chen X (2017) Cytosolic calcium mediates RIP1/RIP3 complex-dependent necroptosis through JNK activation and mitochondrial ROS production in human colon cancer cells *Free Radic Biol Med* **108**, 433–444.

Sural-Fehr T, Singh H, Cantuti-Catelvetri L, Zhu H, Marshall MS, Rebiai R, … Bongarzone ER (2019) Inhibition of the IGF-1-PI3K-Akt-mTORC2 pathway in lipid rafts increases neuronal vulnerability in a genetic lysosomal glycosphingolipidosis. *Dis Model Mech* **12**, dmm036590.

Suzuki H, Hayashi T, Tojo SJ, Kitagawa H, Kimura K, Mizugaki M, … Abe K (1999) Anti-P-selectin antibody attenuates rat brain ischemic injury. *Neurosci Lett* **265**, 163–6.

Suzuki K, Kirisako T, Kamada Y, Mizushima N, Noda T, and Ohsumi Y (2001) The pre-autophagosomal structure organized by concerted functions of APG genes is essential for autophagosome formation *EMBO J* **20**, 5971–5981.

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**, 3352–8.

Szydlowska K, and Tymianski M (2010) Calcium, ischemia and excitotoxicity. *Cell Calcium* **47**, 122–9.

T

Taghibiglou C, Martin HGS, Lai TW, Cho T, Prasad S, Kojic L, … Wang YT (2009) Role of NMDA receptor–dependent activation of SREBP1 in excitotoxic and ischemic neuronal injuries *Nat Med* **15**, 1399–1406.

Tajiri S, Oyadomari S, Yano S, Morioka M, Gotoh T, Hamada J-I, … Mori M (2004) Ischemia-induced neuronal cell death is mediated by the endoplasmic reticulum stress pathway involving CHOP *Cell Death Differ* **11**, 403–415.

Takahashi Y, Coppola D, Matsushita N, Cualing HD, Sun M, Sato Y, … Wang H-G (2007) Bif-1 interacts with Beclin 1 through UVRAG and regulates autophagy and tumorigenesis *Nat Cell Biol* **9**, 1142–1151.

Takeuchi H, Kondo Y, Fujiwara K, Kanzawa T, Aoki H, Mills GB, and Kondo S (2005) Synergistic Augmentation of Rapamycin-Induced Autophagy in Malignant Glioma Cells by Phosphatidylinositol 3-Kinase/Protein Kinase B Inhibitors *Cancer Res* **65**, 3336–3346.

Tan HWS, Sim AYL, and Long YC (2017) Glutamine metabolism regulates autophagy-dependent mTORC1 reactivation during amino acid starvation *Nat Commun* **8**, 338.

Tan X, Thapa N, Sun Y, and Anderson RA (2015) A Kinase-Independent Role for EGF Receptor in Autophagy Initiation *Cell* **160**, 145–160.

Tanida I, Mizushima N, Kiyooka M, Ohsumi M, Ueno T, Ohsumi Y, and Kominami E (1999) Apg7p/Cvt2p: A Novel Protein-activating Enzyme Essential for Autophagy *Mol Biol Cell* **10**, 1367–1379.

Tasdemir E, Maiuri MC, Galluzzi L, Vitale I, Djavaheri-Mergny M, D'Amelio M, … Kroemer G (2008) Regulation of autophagy by cytoplasmic p53 *Nat Cell Biol* **10**, 676–687.

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**, 358–68.

Tekirdag K, and Cuervo AM (2018) Chaperone-mediated autophagy and endosomal microautophagy: Jointed by a chaperone *J Biol Chem* **293**, 5414–5424.

Thelwell C, and Longstaff C (2007) The regulation by fibrinogen and fibrin of tissue plasminogen activator kinetics and inhibition by plasminogen activator inhibitor 1. *J Thromb Haemost* **5**, 804–11.

Thiebaut AM, Gauberti M, Ali C, Martinez De Lizarrondo S, Vivien D, Yepes M, and Roussel BD (2018) The role of plasminogen activators in stroke treatment: fibrinolysis and beyond *Lancet Neurol* **17**, 1121–1132.

Thiebaut AM, Hedou E, Marciniak SJ, Vivien D, and Roussel BD (2019) Proteostasis During Cerebral Ischemia *Front Neurosci* **13**.

Thurston TLM, Ryzhakov G, Bloor S, von Muhlinen N, and Randow F (2009) The TBK1 adaptor and autophagy receptor NDP52 restricts the proliferation of ubiquitin-coated bacteria *Nat Immunol* **10**, 1215–1221.

Tian F, Deguchi K, Yamashita T, Ohta Y, Morimoto N, Shang J, … Abe K (2010) In vivo imaging of autophagy in a mouse stroke model. *Autophagy* **6**, 1107–14.

Toschi A, Lee E, Xu L, Garcia A, Gadir N, and Foster DA (2009) Regulation of mTORC1 and mTORC2 Complex Assembly by Phosphatidic Acid: Competition with Rapamycin *Mol Cell Biol* **29**, 1411–1420.

Toshiyuki M, and Reed JC (1995) Tumor suppressor p53 is a direct transcriptional activator of the human bax gene *Cell* **80**, 293–299.

Toshniwal PK, Tiku ML, Tiku K, and Skosey JL (1987) Secretion of plasminogen activator by cerebral astrocytes and its modulation. *J Neurol Sci* **80**, 307–21.

Tripputi P, Blasi F, Ny T, Emanuel BS, Letosfsky J, and Croce CM (1986) Tissue-type plasminogen activator gene is on chromosome 8. *Cytogenet Cell Genet* **42**, 24–8.

Troncoso R, Vicencio JM, Parra V, Nemchenko A, Kawashima Y, del Campo A, … Lavandero S (2012) Energy-preserving effects of IGF-1 antagonize starvation-induced cardiac autophagy *Cardiovasc Res* **93**, 320–329.

Trotter J, Lee GH, Kazdoba TM, Crowell B, Domogauer J, Mahoney HM, … D'Arcangelo G (2013) Dab1 Is Required for Synaptic Plasticity and Associative Learning *J Neurosci* **33**, 15652–15668.

Tsai C-F, Thomas B, and Sudlow CLM (2013) Epidemiology of stroke and its subtypes in Chinese vs white populations: A systematic review *Neurology* **81**, 264–272.

Tsai Y-L, Zhang Y, Tseng C-C, Stanciauskas R, Pinaud F, and Lee AS (2015) Characterization and Mechanism of Stress-induced Translocation of 78-Kilodalton Glucose-regulated Protein (GRP78) to the Cell Surface *J Biol Chem* **290**, 8049–8064.

Tsirka SE, Bugge TH, Degen JL, and Strickland S (1997) Neuronal death in the central nervous system demonstrates a non-fibrin substrate for plasmin. *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**, 9779–81.

Tsirka SE, Gualandris A, Amaral DG, and Strickland S (1995) Excitotoxin-induced neuronal degeneration and seizure are mediated by tissue plasminogen activator. *Nature* **377**, 340–4.

Tsuboyama K, Koyama-Honda I, Sakamaki Y, Koike M, Morishita H, and Mizushima N (2016) The ATG conjugation systems are important for degradation of the inner autophagosomal membrane. *Science* **354**, 1036–1041.

Tsukada M, and Ohsumi Y (1993) Isolation and characterization of autophagy-defective mutants of Saccharomyces cerevisiae. *FEBS Lett* **333**, 169–74.

Tumbarello DA, Waxse BJ, Arden SD, Bright NA, Kendrick-Jones J, and Buss F (2012) Autophagy receptors link myosin VI to autophagosomes to mediate Tom1-dependent autophagosome maturation and fusion with the lysosome *Nat Cell Biol* **14**, 1024–1035.

u

Uchiyama Y (2001) Autophagic cell death and its execution by lysosomal cathepsins. *Arch Histol Cytol* **64**, 233–46.

Uehara T, Tabuchi M, and Mori E (1997) [Occlusive lesions of carotid and intracranial arteries in patients with symptomatic lacunar infarction--evaluation by MR angiography]. *Rinsho Shinkeigaku* **37**, 796–801.

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**, 251–62.

Urano F, Wang X, Bertolotti A, Zhang Y, Chung P, Harding HP, and Ron D (2000) Coupling of Stress in the ER to Activation of JNK Protein Kinases by Transmembrane Protein Kinase IRE1 *Science (80-)* **287**, 664–666.

v

Valente EM, Abou-Sleiman PM, Caputo V, Muqit MMK, Harvey K, Gispert S, … Wood NW (2004) Hereditary Early-Onset Parkinson's Disease Caused by Mutations in PINK1 *Science (80-)* **304**, 1158–1160.

van den Ameele 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.

van Gijn J, Kerr RS, and Rinkel GJ (2007) Subarachnoid haemorrhage *Lancet* **369**, 306–318.

Vaughan DE (2011) PAI-1 antagonists: the promise and the peril. *Trans Am Clin Climatol Assoc* **122**, 312–25.

Velasco-Miguel S, Buckbinder L, Jean P, Gelbert L, Talbott R, Laidlaw J, … Kley N (1999) PA26, a novel target of the p53 tumor suppressor and member of the GADD family of DNA damage and growth arrest inducible genes *Oncogene* **18**, 127–137.

Verrall S, and Seeds NW (1989) Characterization of 125I-tissue plasminogen activator binding to cerebellar granule neurons. *J Cell Biol* **109**, 265–71.

Verstraete M, Bounameaux H, de Cock F, Van de Werf F, and Collen D (1985) Pharmacokinetics and systemic fibrinogenolytic effects of recombinant human tissue-type plasminogen activator (rt-PA) in humans. *J Pharmacol Exp Ther* **235**, 506–12.

Veverka V, Crabbe T, Bird I, Lennie G, Muskett FW, Taylor RJ, and Carr MD (2008) Structural characterization of the interaction of mTOR with phosphatidic acid and a novel class of inhibitor: compelling evidence for a central role of the FRB domain in small molecule-mediated regulation of mTOR *Oncogene* **27**, 585–595.

W

Wallén P, Bergsdorf N, and Rånby M (1982) Purification and identification of two structural variants of porcine tissue plasminogen activator by affinity adsorption on fibrin. *Biochim Biophys Acta* **719**, 318–28.

Wang Huanyuan, Chen S, Zhang Y, Xu H, and Sun H (2019) Electroacupuncture ameliorates neuronal injury by Pink1/Parkin-mediated mitophagy clearance in cerebral ischemia-reperfusion *Nitric Oxide* **91**, 23–34.

Wang Huayi, Sun L, Su L, Rizo J, Liu L, Wang L-F, … Wang X (2014) Mixed Lineage Kinase Domain-like Protein MLKL Causes Necrotic Membrane Disruption upon Phosphorylation by RIP3 *Mol Cell* **54**, 133–146.

Wang J-Y, Xia Q, Chu K-T, Pan J, Sun L-N, Zeng B, … Luo B-Y (2011) Severe global cerebral ischemia-induced programmed necrosis of hippocampal CA1 neurons in rat is prevented by 3-methyladenine: a widely used inhibitor of autophagy. *J Neuropathol Exp Neurol* **70**, 314–22.

Wang N, Yang L, Zhang H, Lu X, Wang J, Cao Y, … Wang L (2018) MicroRNA-9a-5p Alleviates Ischemia Injury After Focal Cerebral Ischemia of the Rat by Targeting ATG5-Mediated Autophagy. *Cell Physiol Biochem* **45**, 78–87.

Wang P, Guan Y-F, Du H, Zhai Q-W, Su D-F, and Miao C-Y (2012) Induction of autophagy contributes to the neuroprotection of nicotinamide phosphoribosyltransferase in cerebral ischemia. *Autophagy* **8**, 77–87.

Wang P, Xu T-Y, Guan Y-F, Tian W-W, Viollet B, Rui Y-C, … Miao C-Y (2011) Nicotinamide phosphoribosyltransferase protects against ischemic stroke through SIRT1-dependent adenosine monophosphate-activated kinase pathway *Ann Neurol* **69**, 360–374.

Wang P, Xu T-Y, Wei K, Guan Y-F, Wang X, Xu H, … Miao C-Y (2014) ARRB1/β-arrestin-1 mediates neuroprotection through coordination of BECN1-dependent autophagy in cerebral ischemia *Autophagy* **10**, 1535–1548.

Wang S, and Gu K (2017) Insulin-like growth factor 1 inhibits autophagy of human colorectal carcinoma drug-resistant cells via the protein kinase B/mammalian target of rapamycin signaling pathway *Mol Med Rep* **17**, 2952–2956.

Wang W, Wang Y, Chen H, Xing Y, Li F, Zhang Q, … Wu Q (2014) Orphan nuclear receptor TR3 acts in autophagic cell death via mitochondrial signaling pathway *Nat Chem Biol* **10**, 133–140.

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.

Wang Zheng, Miao G, Xue X, Guo X, Yuan C, Wang Z, … Zhang H (2016) The Vici Syndrome Protein EPG5 Is a Rab7 Effector that Determines the Fusion Specificity of Autophagosomes with Late Endosomes/Lysosomes *Mol Cell* **63**, 781–795.

Wang Zhuoran, and Yang W (2019) Impaired capacity to restore proteostasis in the aged brain after ischemia: Implications for translational brain ischemia research *Neurochem Int* **127**, 87–93.

Wardlaw J M (2001) Overview of Cochrane thrombolysis meta-analysis. *Neurology* **57**, S69-76.

Wardlaw Joanna M, Murray V, Berge E, and del Zoppo GJ (2014) Thrombolysis for acute ischaemic stroke *Cochrane Database Syst Rev*.

Wei Y, Sinha S, and Levine B (2008) Dual role of JNK1-mediated phosphorylation of Bcl-2 in autophagy and apoptosis regulation. *Autophagy* **4**, 949–51.

Weimar W, Stibbe J, van Seyen AJ, Billiau A, De Somer P, and Collen D (1981) Specific lysis of an iliofemoral thrombus by administration of extrinsic (tissue-type) plasminogen activator. *Lancet (London, England)* **2**, 1018–20.

Weiss N, Miller F, Cazaubon S, and Couraud P-O (2009) The blood-brain barrier in brain homeostasis and neurological diseases *Biochim Biophys Acta - Biomembr* **1788**, 842–857.

Wen Y-D, Sheng R, Zhang L-S, Han R, Zhang X, Zhang X-D, … Qin Z-H (2008) Neuronal injury in rat model of permanent focal cerebral ischemia is associated with activation of autophagic and lysosomal pathways *Autophagy* **4**, 762–769.

Wijdeven RH, Janssen H, Nahidiazar L, Janssen L, Jalink K, Berlin I, and Neefjes J (2016) Cholesterol and ORP1L-mediated ER contact sites control autophagosome transport and fusion with the endocytic pathway *Nat Commun* **7**, 11808.

Wild P, Farhan H, McEwan DG, Wagner S, Rogov V V., Brady NR, … Dikic I (2011) Phosphorylation of the Autophagy Receptor Optineurin Restricts Salmonella Growth *Science (80-)* **333**, 228–233.

Wilkins HM, and Swerdlow RH (2015) TNFα in cerebral ischemia: another stroke against you? *J Neurochem* **132**, 369–372.

Williams K (2001) Ifenprodil, a Novel NMDA Receptor Antagonist : Site and Mechanism of Action *Curr Drug Targets* **2**, 285–298.

Wirawan E, Vande Walle L, Kersse K, Cornelis S, Claerhout S, Vanoverberghe I, … Vandenabeele P (2010) Caspase-mediated cleavage of Beclin-1 inactivates Beclin-1-induced autophagy and enhances apoptosis by promoting the release of proapoptotic factors from mitochondria *Cell Death Dis* **1**, e18–e18.

Wolfson RL, and Sabatini DM (2017) The Dawn of the Age of Amino Acid Sensors for the mTORC1 Pathway *Cell Metab* **26**, 301–309.

Won SJ, Kim DY, and Gwag BJ (2002) Cellular and molecular pathways of ischemic neuronal death. *J Biochem Mol Biol* **35**, 67–86.

Wong W (2019) Surviving energetic stress with mTORC2 *Science (80-)* **364**, 1043.15-1045.

Wong YC, and Holzbaur ELF (2014) Optineurin is an autophagy receptor for damaged mitochondria in parkin-mediated mitophagy that is disrupted by an ALS-linked mutation. *Proc Natl Acad Sci U S A* **111**, E4439-48.

Wu B, Luo H, Zhou X, Cheng C-Y, Lin L, Liu B-L, … Yang H (2017) Succinate-induced neuronal mitochondrial fission and hexokinase II malfunction in ischemic stroke: Therapeutical effects of kaempferol. *Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis* **1863**, 2307–2318.

Wu F, Echeverry R, Wu J, An J, Haile WB, Cooper DS, … Yepes M (2013) Tissue-type plasminogen activator protects neurons from excitotoxin-induced cell death via activation of the ERK1/2-CREB-ATF3 signaling pathway. *Mol Cell Neurosci* **52**, 9–19.

Wu F, Nicholson AD, Haile WB, Torre E, An J, Chen C, … Yepes M (2013) Tissue-type plasminogen activator mediates neuronal detection and adaptation to metabolic stress. *J Cereb Blood Flow Metab* **33**, 1761–9.

Wu F, Wu J, Nicholson AD, Echeverry R, Haile WB, Catano M, … Yepes M (2012) Tissue-type plasminogen activator regulates the neuronal uptake of glucose in the ischemic brain. *J Neurosci* **32**, 9848–58.

Wu Y-T, Tan H-L, Huang Q, Ong C-N, and Shen H-M (2009) Activation of the PI3K-Akt-mTOR signaling pathway promotes necrotic cell death via suppression of autophagy *Autophagy* **5**, 824–834.

Wyseure T, Rubio M, Denorme F, Martinez de Lizarrondo S, Peeters M, Gils A, … Declerck PJ (2015) Innovative thrombolytic strategy using a heterodimer diabody against TAFI and PAI-1 in mouse models of thrombosis and stroke *Blood* **125**, 1325–1332.

X

Xia B, Fang S, Chen X, Hu H, Chen P, Wang H, and Gao Z (2016) MLKL forms cation channels *Cell Res* **26**, 517–528.

Xia G, Zhu T, Li X, Jin Y, Zhou J, and Xiao J (2018) ROS-mediated autophagy through the AMPK signaling pathway protects INS-1 cells from human islet amyloid polypeptide-induced cytotoxicity. *Mol Med Rep* **18**, 2744–2752.

Xie C, Ginet V, Sun Y, Koike M, Zhou K, Li T, … Zhu C (2016) Neuroprotection by selective neuronal deletion of Atg7 in neonatal brain injury. *Autophagy* **12**, 410–23.

Xin X-Y, Pan J, Wang X-Q, Ma J-F, Ding J-Q, Yang G-Y, and Chen S-D (2011) 2-methoxyestradiol attenuates autophagy activation after global ischemia. *Can J Neurol Sci* **38**, 631–8.

Xin Y, Yu L, Chen Z, Zheng L, Fu Q, Jiang J, … Zhao S (2001) Cloning, Expression Patterns, and Chromosome Localization of Three Human and Two Mouse Homologues of GABAA Receptor-Associated Protein *Genomics* **74**, 408–413.

Xing S, Zhang Y, Li J, Zhang J, Li Y, Dang C, … Zeng J (2012) Beclin 1 knockdown inhibits autophagic activation and prevents the secondary neurodegenerative damage in the ipsilateral thalamus following focal cerebral infarction *Autophagy* **8**, 63–76.

Xu J, Wu Y, Lu G, Xie S, Ma Z, Chen Z, … Xia D (2017) Importance of ROS-mediated autophagy in determining apoptotic cell death induced by physapubescin B *Redox Biol* **12**, 198–207.

Y

Yaghi S, Willey JZ, Cucchiara B, Goldstein JN, Gonzales NR, Khatri P, … Schwamm LH (2017) Treatment and Outcome of Hemorrhagic Transformation After Intravenous Alteplase in Acute Ischemic Stroke: A Scientific Statement for Healthcare Professionals From the American Heart Association/American Stroke Association *Stroke* **48**.

Yamada T, Murata D, Adachi Y, Itoh K, Kameoka S, Igarashi A, … Sesaki H (2018) Mitochondrial Stasis Reveals p62-Mediated Ubiquitination in Parkin-Independent Mitophagy and Mitigates Nonalcoholic Fatty Liver Disease *Cell Metab* **28**, 588-604.e5.

Yamamoto A, Cremona ML, and Rothman JE (2006) Autophagy-mediated clearance of huntingtin aggregates triggered by the insulin-signaling pathway *J Cell Biol* **172**, 719–731.

Yamamoto H, Kakuta S, Watanabe TM, Kitamura A, Sekito T, Kondo-Kakuta C, … Ohsumi Y (2012) Atg9 vesicles are an important membrane source during early steps of autophagosome formation *J Cell Biol* **198**, 219–233.

Yang X-S, Yi T-L, Zhang S, Xu Z-W, Yu Z-Q, Sun H-T, … Cheng S-X (2017) Hypoxia-inducible factor-1 alpha is involved in RIP-induced necroptosis caused by in vitro and in vivo ischemic brain injury *Sci Rep* **7**, 5818.

Yang Yang, Gao K, Hu Z, Li W, Davies H, Ling S, … Fang M (2015) Autophagy upregulation and apoptosis downregulation in DAHP and triptolide treated cerebral ischemia. *Mediators Inflamm* **2015**, 120198.

Yang Yi, Estrada EY, Thompson JF, Liu W, and Rosenberg GA (2007) Matrix metalloproteinase-mediated disruption

of tight junction proteins in cerebral vessels is reversed by synthetic matrix metalloproteinase inhibitor in focal ischemia in rat. *J Cereb Blood Flow Metab* **27**, 697–709.

Yang Zhao, Zhang N, Shen H, Lin C, Lin L, and Yuan B (2014) Microglial activation with reduction in autophagy limits white matter lesions and improves cognitive defects during cerebral hypoperfusion. *Curr Neurovasc Res* **11**, 223–9.

Yang Zhao, Zhao T-Z, Zou Y-J, Zhang JH, and Feng H (2014) Hypoxia Induces autophagic cell death through hypoxia-inducible factor 1α in microglia. *PLoS One* **9**, e96509.

Yang Zhao, Zhong L, Zhong S, Xian R, and Yuan B (2015) Hypoxia induces microglia autophagy and neural inflammation injury in focal cerebral ischemia model. *Exp Mol Pathol* **98**, 219–24.

Yang Zhifen, Huang J, Geng J, Nair U, and Klionsky DJ (2006) Atg22 Recycles Amino Acids to Link the Degradative and Recycling Functions of Autophagy *Mol Biol Cell* **17**, 5094–5104.

Yellen P, Saqcena M, Salloum D, Feng J, Preda A, Xu L, … Foster DA (2011) High-dose rapamycin induces apoptosis in human cancer cells by dissociating mTOR complex 1 and suppressing phosphorylation of 4E-BP1 *Cell Cycle* **10**, 3948–3956.

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**, 1533–40.

Yin B, Xu Y, Wei R, He F, Luo B, and Wang J (2015) Inhibition of receptor-interacting protein 3 upregulation and nuclear translocation involved in Necrostatin-1 protection against hippocampal neuronal programmed necrosis induced by ischemia/reperfusion injury *Brain Res* **1609**, 63–71.

Yin Y, Hua H, Li M, Liu S, Kong Q, Shao T, … Jiang Y (2016) mTORC2 promotes type I insulin-like growth factor receptor and insulin receptor activation through the tyrosine kinase activity of mTOR. *Cell Res* **26**, 46–65.

Ylä-Anttila P, Vihinen H, Jokitalo E, and Eskelinen E-L (2009) 3D tomography reveals connections between the phagophore and endoplasmic reticulum *Autophagy* **5**, 1180–1185.

You RX, Thrift AG, McNeil JJ, Davis SM, and Donnan GA (1999) Ischemic stroke risk and passive exposure to spouses' cigarette smoking. Melbourne Stroke Risk Factor Study (MERFS) Group. *Am J Public Health* **89**, 572–575.

Young ARJ, Chan EYW, Hu XW, Köchl R, Crawshaw SG, High S, … Tooze SA (2006) Starvation and ULK1-dependent cycling of mammalian Atg9 between the TGN and endosomes *J Cell Sci* **119**, 3888–3900.

Yousefi S, Perozzo R, Schmid I, Ziemiecki A, Schaffner T, Scapozza L, … Simon H-U (2006) Calpain-mediated cleavage of Atg5 switches autophagy to apoptosis *Nat Cell Biol* **8**, 1124–1132.

Yu L., Alva A, Su H, Dutt P, Freundt E, Welsh S, … Lenardo MJ (2004) Regulation of an ATG7-beclin 1 Program of Autophagic Cell Death by Caspase-8 *Science (80-)* **304**, 1500–1502.

Yu Li, McPhee CK, Zheng L, Mardones GA, Rong Y, Peng J, … Lenardo MJ (2010) Termination of autophagy and reformation of lysosomes regulated by mTOR. *Nature* **465**, 942–6.

Yu Z-Q, Ni T, Hong B, Wang H-Y, Jiang F-J, Zou S, … Xie Z (2012) Dual roles of Atg8−PE deconjugation by Atg4 in autophagy *Autophagy* **8**, 883–892.

YUAN L, WANG Z, LIU L, and JIAN X (2015) Inhibiting histone deacetylase 6 partly protects cultured rat cortical neurons from oxygen-glucose deprivation-induced necroptosis *Mol Med Rep* **12**, 2661–2667.

Yuan Y, Zheng Y, Zhang X, Chen Y, Wu X, Wu J, … Chen Z (2017) BNIP3L/NIX-mediated mitophagy protects against

ischemic brain injury independent of PARK2. *Autophagy* **13**, 1754–1766.

Z

Zaffagnini G, Savova A, Danieli A, Romanov J, Tremel S, Ebner M, … Martens S (2018) p62 filaments capture and present ubiquitinated cargos for autophagy. *EMBO J* **37**.

Zalckvar E, Berissi H, Eisenstein M, and Kimchi A (2009) Phosphorylation of Beclin 1 by DAP-kinase promotes autophagy by weakening its interactions with Bcl-2 and Bcl-X $_L$ *Autophagy* **5**, 720–722.

Zalckvar E, Berissi H, Mizrachy L, Idelchuk Y, Koren I, Eisenstein M, … Kimchi A (2009) DAP-kinase-mediated phosphorylation on the BH3 domain of beclin 1 promotes dissociation of beclin 1 from Bcl-XL and induction of autophagy *EMBO Rep* **10**, 285–292.

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 E, and Liao P (2015) Brain transient receptor potential channels and stroke *J Neurosci Res* **93**, 1165–1183.

Zhang F, Liu CL, and Hu BR (2006) Irreversible aggregation of protein synthesis machinery after focal brain ischemia *J Neurochem* **98**, 102–112.

Zhang H, Lei Y, Yuan P, Li L, Luo C, Gao R, … Sun J (2014) ROS-Mediated Autophagy Induced by Dysregulation of Lipid Metabolism Plays a Protective Role in Colorectal Cancer Cells Treated with Gambogic Acid *PLoS One* **9**, e96418.

Zhang J, Zhang C, Jiang X, Li L, Zhang D, Tang D, … Huang Y (2019) Involvement of autophagy in hypoxia-BNIP3 signaling to promote epidermal keratinocyte migration *Cell Death Dis* **10**, 234.

Zhang L, Zhang ZG, Buller B, Jiang J, Jiang Y, Zhao D, … Chopp M (2010) Combination Treatment With VELCADE and Low-Dose Tissue Plasminogen Activator Provides Potent Neuroprotection in Aged Rats After Embolic Focal Ischemia *Stroke* **41**, 1001–1007.

Zhang Q, Kuang H, Chen C, Yan J, Do-Umehara HC, Liu X, … Liu J (2015) The kinase Jnk2 promotes stress-induced mitophagy by targeting the small mitochondrial form of the tumor suppressor ARF for degradation *Nat Immunol* **16**, 458–466.

Zhang RL, Chopp M, Li Y, Zaloga C, Jiang N, Jones ML, … Ward PA (1994) Anti-ICAM-1 antibody reduces ischemic cell damage after transient middle cerebral artery occlusion in the rat. *Neurology* **44**, 1747–51.

Zhang Tao, Lu D, Yang W, Shi C, Zang J, Shen L, … Xu A (2018) HMG-CoA Reductase Inhibitors Relieve Endoplasmic Reticulum Stress by Autophagy Inhibition in Rats With Permanent Brain Ischemia *Front Neurosci* **12**, 405.

Zhang Ting, Liu X, Li Q, Wang J, Jia W, and Sun X (2010) Exacerbation of ischemia-induced amyloid-beta generation by diabetes is associated with autophagy activation in mice brain. *Neurosci Lett* **479**, 215–20.

Zhang Xiangnan, Yan H, Yuan Y, Gao J, Shen Z, Cheng Y, … Chen Z (2013) Cerebral ischemia-reperfusion-induced autophagy protects against neuronal injury by mitochondrial clearance. *Autophagy* **9**, 1321–33.

Zhang Xiangnan, Yuan Y, Jiang L, Zhang J, Gao J, Shen Z, … Chen Z (2014) Endoplasmic reticulum stress induced by tunicamycin and thapsigargin protects against transient ischemic brain injury: Involvement of PARK2-dependent mitophagy. *Autophagy* **10**, 1801–13.

Zhang Xuhua, Dowling JP, and Zhang J (2019) RIPK1 can mediate apoptosis in addition to necroptosis during embryonic development *Cell Death Dis* **10**, 245.

Zheng Y-Q, Liu J-X, Li X-Z, Xu L, and Xu Y-G (2009) RNA interference-mediated downregulation of Beclin1 attenuates cerebral ischemic injury in rats. *Acta Pharmacol Sin* **30**, 919–27.

Zheng Yanjun, Gu S, Li X, Tan J, Liu S, Jiang Y, … Yang H-T (2017) Berbamine postconditioning protects the heart from ischemia/reperfusion injury through modulation of autophagy *Cell Death Dis* **8**, e2577.

Zheng Yanrong, Wu X, Chen Z, and Zhang X (2019) Come and eat: mitochondrial transport guides mitophagy in ischemic neuronal axons *Autophagy* **15**, 1483–1484.

Zheng Yong-qiu, Liu J, Li X, Xu L, and Xu Y (2009) RNA interference-mediated downregulation of Beclin1 attenuates cerebral ischemic injury in rats *Acta Pharmacol Sin* **30**, 919–927.

Zhong Y, Wang QJ, Li X, Yan Y, Backer JM, Chait BT, … Yue Z (2009) Distinct regulation of autophagic activity by Atg14L and Rubicon associated with Beclin 1–phosphatidylinositol-3-kinase complex *Nat Cell Biol* **11**, 468–476.

Zhou A, Carrell RW, and Huntington JA (2001) The serpin inhibitory mechanism is critically dependent on the length of the reactive center loop. *J Biol Chem* **276**, 27541–7.

Zhou C, Ma K, Gao R, Mu C, Chen L, Liu Q, … Chen Q (2017) Regulation of mATG9 trafficking by Src- and ULK1-mediated phosphorylation in basal and starvation-induced autophagy. *Cell Res* **27**, 184–201.

Zhou X, Zhou J, Li X, Guo C, Fang T, and Chen Z (2011) GSK-3β inhibitors suppressed neuroinflammation in rat cortex by activating autophagy in ischemic brain injury *Biochem Biophys Res Commun* **411**, 271–275.

Zhu C, Wang X, Xu F, Bahr BA, Shibata M, Uchiyama Y, … Blomgren K (2005) The influence of age on apoptotic and other mechanisms of cell death after cerebral hypoxia-ischemia. *Cell Death Differ* **12**, 162–76.

Zhu Changlian, Xu F, Wang X, Shibata M, Uchiyama Y, Blomgren K, and Hagberg H (2006) Different apoptotic mechanisms are activated in male and female brains after neonatal hypoxia-ischaemia *J Neurochem* **96**, 1016–1027.

Zhu J, Horbinski C, Guo F, Watkins S, Uchiyama Y, and Chu CT (2007) Regulation of Autophagy by Extracellular Signal-Regulated Protein Kinases During 1-Methyl-4-Phenylpyridinium-Induced Cell Death *Am J Pathol* **170**, 75–86.

Zhuo M, Holtzman DM, Li Y, Osaka H, DeMaro J, Jacquin M, and Bu G (2000) Role of tissue plasminogen activator receptor LRP in hippocampal long-term potentiation. *J Neurosci* **20**, 542–9.

Zinkstok SM, and Roos YB (2012) Early administration of aspirin in patients treated with alteplase for acute ischaemic stroke: a randomised controlled trial *Lancet* **380**, 731–737.

Zuo W, Zhang S, Xia C-Y, Guo X-F, He W-B, and Chen N-H (2014) Mitochondria autophagy is induced after hypoxic/ischemic stress in a Drp1 dependent manner: the role of inhibition of Drp1 in ischemic brain damage. *Neuropharmacology* **86**, 103–15.

Résumé

L'ischémie cérébrale est une pathologie complexe impliquant une cascade de mécanismes cellulaires qui conduisent, entre autres, à une augmentation de l'autophagie dans les neurones. Bien que l'activation de l'autophagie dans l'AVC ischémique soit aujourd'hui un fait avéré, le rôle de l'activateur tissulaire du plasminogène (tPA ; médicament utilisé dans la phase aigüe de l'AVC ischémique et neuromodulateur du système nerveux central) n'a jamais été décrit. Le tPA est une sérine protéase initialement découverte dans le compartiment vasculaire jouant un rôle important dans la fibrinolyse. Mais le tPA est aussi exprimé dans le parenchyme cérébral où il intervient dans le système glutamatergique, la plasticité synaptique et la survie neuronale. Afin de mieux comprendre les effets moléculaires du tPA dans l'autophagie, nous avons utilisé un modèle *in vitro* d'ischémie cérébrale consistant à sevrer en oxygène et en glucose (OGD) puis à réoxygéner des neurones corticaux primaires murins avec ou sans tPA. Nous avons confirmé, dans un premier temps, que l'OGD induit une autophagie délétère *via* une diminution de l'axe PI3K/Akt/mTORC1. Nous avons ensuite étudié l'effet du tPA sur l'autophagie induite par l'OGD. Nos résultats démontrent que le tPA protège les neurones de la mort induite par l'OGD en réduisant l'autophagie *via* l'activation du récepteur du facteur de croissance à l'insuline (IGF-1R, un récepteur tyrosine kinase) et de la voie PI3K/Akt/mTOR. Ce travail de thèse a donc permis de décrire le rôle neuroprotecteur et anti-autophagique du tPA, et d'identifier un nouveau récepteur cible du tPA : IGF-1R.

Mots clés: AVC ischémique, ischémie cérébrale, tPA, IGF-1R, mTOR

Abstract

Cerebral ischemia is a complex pathology involving a cascade of cellular mechanisms leading, among other things, to an increase of neuronal autophagy. The activation of autophagy in ischemic stroke conditions is now well accepted, but the role of tissue-type plasminogen activator (tPA, a drug used in the acute phase of ischemic stroke, and a neuromodulator) on this pathway has never been studied. tPA is a serine protease originally discovered in the vascular compartment, that plays an important role in fibrinolysis. Interestingly, tPA is also expressed in the cerebral parenchyma where it is involved in the glutamatergic neurotransmission, synaptic plasticity and neuronal survival. To better understand molecular effects of tPA on autophagy, we used an *in vitro* model of cerebral ischemia consisting in an oxygen and glucose deprivation (OGD) followed by reoxygenation, on murine primary cortical neurons with or without tPA. First we reported that OGD enhances deleterious autophagy through the decrease of PI3K/Akt/mTOR pathways. Then, we investigated the effect of tPA on OGD-induced autophagy. Our results demonstrate that tPA protects neurons from OGD-induced death by reducing autophagy through Insulin Growth Factor Receptor (IGF-1R, a tyrosine kinase receptor) and an increase of PI3K/Akt/mTOR pathways. This thesis has made it possible to describe the neuroprotective and anti-autophagic effect of tPA, and to identify a new target receptor for tPA: IGF-1R.

Key words: Ischemic stroke, cerebral ischemia, tPA, IGF-1R, mTOR