



**HAL**  
open science

# Modulation de la signalisation glutamatergique par l'activateur tissulaire du plasminogène et le récepteur MET dans le système nerveux central

Élodie Hedou

► **To cite this version:**

Élodie Hedou. Modulation de la signalisation glutamatergique par l'activateur tissulaire du plasminogène et le récepteur MET dans le système nerveux central. Biologie cellulaire. Normandie Université, 2020. Français. NNT: 2020NORMC410 . tel-02989692

**HAL Id: tel-02989692**

**<https://theses.hal.science/tel-02989692v1>**

Submitted on 5 Nov 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 la signalisation glutamatergique par l'activateur tissulaire du plasminogène et le récepteur MET dans le système nerveux central**

**Présentée et soutenue par  
Elodie HEDOU**

**Thèse soutenue publiquement le 22/09/2020  
devant le jury composé de**

Mme TIZIANA CREPALDI	Professeur, Université de Turin - Italie	Rapporteur du jury
M. PIERRE GRESSENS	Directeur de recherche, UFR MED PARIS 7 DENIS DIDEROT	Rapporteur du jury
Mme CARINE ALI	Professeur des universités, Université Caen Normandie	Membre du jury
M. ALAIN BUISSON	Professeur des universités, Université Grenoble Alpes	Membre du jury
Mme ELOISE LEMARCHAND	Chercheur, Université de Manchester - Royaume Uni	Membre du jury
M. DENIS VIVIEN	Professeur des universités PraticienHosp, Université Caen Normandie	Président 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



Normandie de Biologie Intégrative,  
Santé, Environnement



La science pour la santé  
From science to health





## Remerciements

Je tiens tout d'abord à remercier Denis Vivien de m'avoir accueillie au sein du laboratoire dès mon Master 1 et de m'avoir permis de développer mon sujet de thèse. Merci de nous donner les moyens de réaliser nos projets.

Un grand merci à Benoit Roussel pour l'encadrement de cette thèse, pour ta disponibilité et tes connaissances scientifiques.

Je remercie chaleureusement les deux rapporteurs de cette thèse, le Pr Pierre Gressens et le Pr Tiziana Crepaldi d'avoir accepté et pris le temps d'évaluer ce travail de thèse. De la même façon, je remercie le Pr Alain Buisson, le Dr Eloise Lemarchand ainsi que le Pr Carine Ali pour leur présence au sein de ce jury.

Merci à l'ensemble des membres de l'unité PhIND et notamment à Yannick et Lolo ainsi que Marion et Jean-Michel pour votre aide et votre bonne humeur.

Merci à toutes les personnes du bureau CO47, Audrey (#team Roussel), Sara et Matthieu (Michou), Fanny, Sylvaine, Mervé ainsi que Camille et Guénie. Merci aux voisins de bureau, Anastasia, Alex, Jonathane, Quentin, Rhéda, Charly, Damien, Célia et Florent. Je vous remercie pour votre soutien morale et technique, nos conversations et rigolades tout au long de ces années. Une petite attention particulière pour Barbara avec qui j'ai partagé l'aventure de la thèse depuis mon Master 1.

Un grand merci à mes amis de longues dates, Hélène, Julie, Robin, Marion, Alex, Audrée, Fabien et Thomas ainsi qu'à mes anciennes colocs doctorantes Pauline et Tiphaine. Merci à vous pour votre soutien et pour tous les moments que nous avons partagé et ceux à venir.

Vincent, comme promis tu as ta place dans les remerciements. Je te remercie de m'avoir aussi bien soutenu, supporté et motivé durant la moitié de cette thèse. Un merci aussi à mes beaux-parents, qui m'ont accueilli pendant le confinement, et chez qui j'ai pu commencer la rédaction de mon manuscrit dans de très bonnes conditions.

Enfin, mes derniers remerciements reviennent à mes parents et à mes frères, pour leurs encouragements sans faille durant toutes mes années études.



# Sommaire

<b>Introduction .....</b>	<b>1</b>
A. Le récepteur NMDA.....	1
I. Composition .....	1
1. Structure.....	1
2. Les sous-unités .....	2
II. La signalisation du récepteur NMDA.....	3
1. Activation .....	3
2. Régulation .....	5
a. Adressage membranaire.....	5
b. Endocytose .....	6
c. Recyclage ou dégradation .....	7
d. Régulation par les mécanismes de phosphorylation .....	7
3. La localisation subcellulaire.....	9
III. Fonctions du récepteur NMDA .....	11
1. Au cours du développement cérébral.....	11
2. Plasticité synaptique .....	13
3. L'excitotoxicité .....	16
B. L'activateur tissulaire du plasminogène .....	18
I. Historique .....	18
II. La structure du tPA.....	19
III. Expression du tPA.....	22
1. Expression périphérique du tPA.....	22
2. Expression du tPA dans la circulation .....	22
3. Expression régionale du tPA dans le système nerveux central.....	22
4. Expression cellulaire du tPA dans le système nerveux central .....	24
IV. Régulation de l'expression du tPA .....	26
1. Dans le compartiment vasculaire.....	26
2. Dans le système nerveux central .....	26
a. La recapture astrocytaire.....	26
b. Les inhibiteurs du tPA.....	27
V. Les fonctions du tPA.....	28

1.	Les fonctions du tPA vasculaire .....	28
a.	La fibrinolyse.....	28
b.	Le tPA et la barrière hémato-encéphalique .....	30
2.	La thrombolyse pharmacologique du tPA dans l'infarctus cérébral.....	31
a.	Son principe .....	31
b.	Les essais cliniques .....	32
c.	Les limites de la thrombolyse pharmacologique.....	33
d.	La thrombectomie .....	34
3.	Les fonctions physiologiques du tPA dans le système nerveux central.....	35
a.	tPA et développement cérébral .....	35
i.	tPA et migration cellulaire .....	35
ii.	tPA et pousse neuritique .....	37
b.	Le tPA et la plasticité synaptique.....	38
c.	tPA et processus cognitifs.....	40
4.	Implications pathologiques du tPA dans le système nerveux central .....	40
a.	tPA et modulation glutamatergique.....	40
b.	tPA et apoptose .....	45
c.	tPA et inflammation.....	46
C.	Le récepteur MET et son ligand, l'HGF.....	49
I.	Généralités sur le récepteur MET .....	49
1.	Sa découverte.....	49
2.	Du gène à la structure de la protéine.....	49
II.	Généralités sur l'HGF/SF .....	51
1.	Sa découverte.....	51
2.	Du gène à la structure de la protéine.....	51
III.	La signalisation du couple MET/HGF.....	52
1.	L'activation du récepteur MET .....	52
a.	Interactions entre l'HGF et MET .....	52
b.	Les partenaires intracellulaires.....	54
2.	Les voies de signalisation .....	55
3.	La régulation du récepteur.....	57
a.	Internalisation de MET .....	57



b.	Dégradation et recyclage de MET .....	58
IV.	Les fonctions du couple MET/HGF .....	60
1.	Au cours du développement des organes périphériques .....	60
2.	Au cours du neurodéveloppement .....	61
3.	La dérégulation de MET dans la tumorigenèse.....	63
a.	Les différents types de dérégulation de l'HGF/MET .....	63
b.	Les stratégies thérapeutiques .....	65
V.	L'implication du récepteur MET et NMDA dans les troubles du spectre autistique	67
1.	Les troubles du spectre autistique .....	67
a.	Définition .....	67
b.	Prévalence, étiologie et facteur de risque.....	69
2.	Le gène humain <i>MET</i> , facteur de risque dans les TSA .....	71
3.	Association du gène humain <i>GRIN2B</i> avec les TSA .....	73
4.	Les modèles animaux dans les troubles du spectre autistique .....	76
	<b>Projet de thèse .....</b>	<b>80</b>
	<b>Résultats .....</b>	<b>81</b>
	<b>Article: "Tissue type plasminogen activator dependant crosstalk between MET and NMDA receptors containing GluN2B: possible involvement in autism spectrum disorders" .....</b>	<b>81</b>
	<b>Discussion.....</b>	<b>126</b>
I.	Implication du récepteur MET dans la signalisation glutamatergique .....	127
1.	Activation du récepteur MET par le tc-tPA .....	127
2.	Le couple de récepteurs MET et NMDA.....	131
3.	L'axe HGF/MET sur la signalisation glutamatergique .....	131
II.	Le tPA dans les troubles du spectre autistique .....	134
1.	Les données comportementales chez les tPA Null .....	134
2.	Le tPA et les symptômes associés au TSA .....	136
3.	Les données génétiques chez les tPA Null .....	137
III.	Influence du tPA sur la signalisation glutamatergique .....	139
1.	Rôle du sc-tPA et du tc-tPA sur la sous-unité GluN2B .....	139
2.	Effet pro-excitotoxique du tPA dans le contexte physiopathologique de l'AVC	140
	<b>Conclusion .....</b>	<b>144</b>
	<b>Autres travaux .....</b>	<b>145</b>

**Bibliographie .....160**

## Index des figures

Figure 1 : Structure du récepteur NMDA. ....	5
Figure 2 : Les principaux sites de phosphorylation des sous-unités GluN1, GluN2A et GluN2B des récepteurs NMDA. ....	9
Figure 3 : profil d'expression spatio-temporel de GluN1 et GluN2 chez le rat. ....	12
Figure 4 : Schéma simplifié de la LTP au sein d'une synapse glutamatergique. ....	15
Figure 5 : Structure et fonction du tPA. ....	21
Figure 6 : Localisation du tPA dans le SNC. ....	23
Figure 7 : Expression spatio-temporelle du tPA chez des embryons de souris. ....	24
Figure 8 : Expression du tPA par les différents types cellulaires du SNC chez la souris adulte. ....	25
Figure 9 : Mécanisme de la fibrinolyse endogène. ....	29
Figure 10 : Les différents activateurs du plasminogène. ....	33
Figure 11 : Evaluation fonctionnelle par l'échelle de Rankin chez des patients victimes d'AVC ischémique. ....	35
Figure 12 : Le tPA est un acteur de la corticogénèse. ....	37
Figure 13 : Synthèse d'ARN messenger du tPA à la suite d'une activation neuronale chez le rat. ....	39
Figure 14 : Premières preuves de l'implication du tPA dans l'excitotoxicité. ....	41
Figure 15 : Le tPA clive la sous-unité GluN1 au niveau de l'arginine 260. ....	42
Figure 16 : Le blocage de l'interaction du tPA avec les récepteurs NMDA réduit la mort neuronale in vivo et in vitro. ....	43
Figure 17 : Effet différentiel du sc-tPA et du tc-tPA sur la signalisation glutamatergique. ....	44
Figure 18 : Le tPA protège les neurones de l'apoptose induite par une privation de sérum. ....	46
Figure 19 : Représentation du récepteur MET. ....	50
Figure 20 : Représentation de l'HGF/SF. ....	52
Figure 21 : Base structurale de l'interaction HGF/MET. ....	53
Figure 22: Signalisation de l'HGF/MET et ces activités biologiques. ....	57
Figure 23 : Le récepteur MET : de sa signalisation à sa dégradation. ....	59
Figure 24 : Implication du couple HGF/MET au cours du développement embryonnaire et chez l'adulte. ....	61
Figure 25 : Profil d'expression de MET dans le neurodéveloppement. ....	63
Figure 26 : Principaux mécanismes de dérégulations de l'axe HGF/MET. ....	67
Figure 27 : La présence de l'allèle variant dans la séquence promotrice de MET est un facteur de risque des TSA. ....	73
Figure 28 : L'interactome de MET est un réseau enrichi à des protéines associées à des troubles neurodéveloppementaux. ....	75
Figure 29 : Tableau non-exhaustif des tests comportementaux en lien avec le phénotype autistique chez la souris. ....	78
Figure 30 : Conversion du pro-HGF en HGF mature. ....	127

Figure 31 : Effet de l'anticorps HGF bloquant sur la signalisation glutamatergique et la mort neuronale de type excitotoxique. ....	128
Figure 32 : Sensorgramme représentant la fixation de l'EGF, du sc-tPA et du tc-tPA sur le récepteur à l'EGF par la technique de SPR.....	129
Figure 33 : Interaction et proximité des récepteurs MET et NMDA à la surface neuronale.	131
Figure 34 : Effet de l'anticorps HGF bloquant sur la mort neuronale de type excitotoxique. ....	133
Figure 35 : Tests comportementaux chez les tPA Null pour évaluer les comportements répétés moteurs. ....	135
Figure 36 : Test des 3 chambres évaluant la sociabilité sur la souche de souris tPA Null. ....	136
Figure 37 : L'invalidation du gène du tPA révèle une densité synaptique plus importante dans l'amygdale. ....	139
Figure 38 : En OGD, le tPA diminue la mort neuronale, et l'ajout du Glunomab® accentue cet effet. ....	142

## Liste des abréviations

<b>ABD</b>	<i>agonist binding domain</i>
<b>ACM</b>	artère cérébrale moyenne
<b>ADAMTS-13</b>	<i>a desintegrin and metalloproteinase with thrombospondin motifs</i>
<b>ADN</b>	acide désoxyribonucléique
<b>AIF</b>	<i>apoptosis inducing factor</i>
<b>AMPA</b>	$\alpha$ -amino-3-hydroxy-5-methyl-isoxazole-4-propionique acide
<b>AP5</b>	d-2-amino-5-phosphovalerate
<b>Asn</b>	asparagine
<b>ATD</b>	<i>amino-terminal domain</i>
<b>ATF3</b>	<i>activating transcription factor 3</i>
<b>AVC</b>	accident vasculaire cérébral
<b>Bad</b>	<i>BCL2-associated agonist of cell death</i>
<b>BDNF</b>	<i>brain-derived neurotrophic factor</i>
<b>BHE</b>	barrière hémato-encéphalique
<b>CA1</b>	come d'Ammon 1
<b>CaMKII</b>	calmoduline kinase II
<b>CBL</b>	<i>casitas B-lineage lymphoma</i>
<b>CBNPC</b>	cancers bronchiques non à petites cellules
<b>Cdk5</b>	kinase cycline-dépendante 5
<b>CDC</b>	Centre de Prévention et de Contrôle des Maladies
<b>CIN85</b>	<i>CBL- interacting protein of 85kDa</i>
<b>CK2</b>	caséine kinase 2
<b>CLIP2</b>	<i>CAP-Gly domain containing linker protein 2</i>
<b>COSMIC</b>	<i>catalogue of somatic mutations in cancer</i>
<b>CREB</b>	<i>cAMP response element binding-protein</i>
<b>Crk</b>	<i>CT10 regulator kinase</i>
<b>CTD</b>	<i>carboxy-terminal domain</i>
<b>DSM</b>	Manuel diagnostique et statistique des troubles mentaux
<b>EC50</b>	concentration efficace à 50% ( <i>half maximal effective concentration</i> )
<b>EGF</b>	<i>epidermal growth factor</i>
<b>ESCRT</b>	<i>endosomal sorting complex required for transport</i>
<b>FDA</b>	<i>Food and Drug administration</i>
<b>Gab1</b>	<i>Grb2-associated binder 1</i>
<b>GGA3</b>	<i>golgi-localized <math>\gamma</math>-ear-containing Arf-binding protein3</i>
<b>GI</b>	gastro-intestinaux
<b>Grb2</b>	<i>growth factor receptor-bound protein 2</i>
<b>HEK</b>	<i>human embryonic kidney</i>
<b>HGF</b>	facteur de croissance des hépatocytes ( <i>hepatocyte growth factor</i> )
<b>HIF1 <math>\alpha</math></b>	<i>hypoxia inducible factor1 <math>\alpha</math></i>
<b>HRS</b>	<i>HGF regulated tyrosine kinase substrate</i>

<b>IC50</b>	concentration d'inhibition à 50% ( <i>half maximal inhibitory concentration</i> )
<b>IGF-1</b>	<i>insulin growth factor 1</i>
<b>IGFBP</b>	<i>insulin-like growth factor binding protein</i>
<b>IGF1-R</b>	<i>insulin growth factor 1 receptor</i>
<b>IPT</b>	<i>Immunoglobulin-like region in Plexin and Transcription factors</i>
<b>KA</b>	kaïnate
<b>LBD</b>	<i>Lysine Binding Domain</i>
<b>LBS</b>	<i>Lysine Binding Site</i>
<b>LRP</b>	<i>Low Density Lipoprotein Receptor-related Protein</i>
<b>LTD</b>	<i>Long Term Depression</i>
<b>LTP</b>	<i>Long Term Potentiation</i>
<b>MAGUK</b>	<i>Membrane-Associated Guanylate Kinase</i>
<b>MAPK</b>	<i>mitogen-activated protein kinase</i>
<b>MBD</b>	<i>MET binding domain</i>
<b>MDM2</b>	<i>murine double-minute p53 binding</i>
<b>MMP</b>	metalloproteinase
<b>mTOR</b>	<i>mammalian target of rapamycin</i>
<b>NGF</b>	<i>nerve growth factor</i>
<b>NMDA</b>	<i>N-Methyl-D-Aspartate</i>
<b>NS</b>	neuroserpine
<b>OGD</b>	<i>oxygen and glucose deprivation</i>
<b>PACSN1</b>	<i>protein kinase C and casein kinase substrate in neurons protein 1</i>
<b>PAI-1</b>	<i>plasminogen activator inhibitor 1</i>
<b>PDGF-CC</b>	<i>platelet-derived growth factor-CC</i>
<b>PI3K</b>	<i>phosphatidylinositol-3-kinase</i>
<b>PKA</b>	protéine kinase A
<b>PKB</b>	protéine kinase B
<b>PKC</b>	protéine kinase C
<b>PLA</b>	<i>proximity ligation assay</i>
<b>PLAT</b>	<i>plasminogen activator tissue type</i>
<b>PLC</b>	<i>phospholipase C</i>
<b>PSD-95</b>	<i>Post Synaptic Density 95</i>
<b>PSI</b>	<i>Plexins Semaphorins and Integrins</i>
<b>PTB</b>	<i>phosphotyrosine binding</i>
<b>PTK</b>	protéines tyrosine kinase
<b>PTP</b>	protéine tyrosine phosphatase
<b>PTP1B</b>	<i>protein-tyrosine phosphatase 1B</i>
<b>PTPRZ1</b>	<i>receptor-type tyrosine-protein phosphatase zeta 1</i>
<b>RE</b>	réticulum endoplasmique
<b>RTK</b>	récepteur tyrosine kinase
<b>SAP-102</b>	<i>synapse-associated protein102</i>

<b>sc-tPA</b>	<i>single chain tPA</i>
<b>SF</b>	facteur de dispersion ( <i>scatter factor</i> )
<b>SH2</b>	<i>Src homology-2</i>
<b>SHC</b>	<i>SH2 domain-containig transforming protein</i>
<b>SHP2</b>	<i>SRC homolgy 2 domain-containing phosphatase 2</i>
<b>SNC</b>	système nerveux central
<b>SNP</b>	polymorphisme de nucléotide simple ( <i>simple nucleotide polymorphism</i> )
<b>SOS</b>	<i>son of sevenless</i>
<b>SPH</b>	<i>serine protease homology</i>
<b>SPR</b>	résonance de surface plasmonique ( <i>surface plasmon resonance</i> )
<b>STAT3</b>	<i>signal transducer and activator of transcription 3</i>
<b>STEP</b>	<i>Striatal Enriched Tyrosine Phosphatase</i>
<b>tc-tPA</b>	<i>two chain tPA</i>
<b>TCPTP</b>	<i>T-cell phosphatase</i>
<b>TED</b>	troubles envahissants du développement
<b>TFG</b>	<i>Trk-fused gene</i>
<b>TKI</b>	inhibiteurs à l'activité tyrosine kinase ( <i>tyrosine kinase inhibitor</i> )
<b>tPA</b>	<i>tissue type plasminogen activator</i>
<b>TPR</b>	<i>Translocated Promoter Region</i>
<b>TSA</b>	troubles du spectre de l'autisme
<b>uPA</b>	<i>urokinase plasminogen activator</i>
<b>VWF</b>	<i>von Willebrand Factor</i>







# INTRODUCTION

## A. Le récepteur NMDA

La transmission synaptique est un processus clé dans le système nerveux central (SNC) pour permettre le traitement et le stockage d'informations. La synapse est une région spécialisée permettant la communication neuronale. La libération de neurotransmetteur par l'élément pré-synaptique active des récepteurs spécifiques sur l'élément post-synaptique du neurone. Dans le système cérébral des mammifères, la transmission synaptique excitatrice est principalement médiée par le glutamate. Ce dernier est un acide aminé non essentiel, synthétisé par l'organisme qui ne franchit pas la barrière hémato-encéphalique (BHE). Le glutamate active deux groupes différents de récepteur pré-nommés : les récepteurs métabotropiques et les récepteurs ionotropiques (Dingledine *et al.* 1999; Pin and Acher 2002). Les récepteurs métabotropiques sont plutôt responsables de la transmission synaptique dite lente, impliquant divers types de seconds messagers tels que la phospholipase C et l'inositol triphosphate qui activent des voies de signalisation. Par opposition, les récepteurs ionotropiques assurent la transmission synaptique dite rapide puisque ce sont des récepteurs canaux. Les récepteurs ionotropiques sont distingués par rapport à leurs propriétés pharmacologiques en 3 sous-groupes. On catégorise les récepteurs  $\alpha$ -amino-3-hydroxy-5-méthyl-isoxazole-4-propionique acide (AMPA), les récepteurs kaïnate (KA) et les récepteurs N-méthyl-D-aspartate (NMDA). Ce chapitre se focalise sur les récepteurs NMDA, décrits pour être impliqués dans de multiples processus biologiques comme la plasticité synaptique et l'excitotoxicité neuronale.

### I. Composition

#### 1. Structure

Le récepteur NMDA est un complexe tétramérique, c'est-à-dire qu'il résulte de l'assemblage de quatre protéines, chacune constituant un monomère du récepteur-canal (Traynelis *et al.* 2010). Ces monomères existent sous plusieurs formes, issues de l'expression de gènes distincts, qui sont appelés sous-unités. A ce jour, 3 grandes familles de sous-unités ont été identifiées : la sous-unité GluN1, GluN2 et GluN3 (Moriyoshi *et al.* 1991; Monyer *et al.* 1992). Ces sous-unités possèdent une structure de base commune. Pour que le récepteur soit fonctionnel, il nécessite l'assemblage obligatoire de deux sous-unités GluN1 associées à deux sous-unités GluN2 ou une combinaison de sous-unités GluN2 et GluN3 (Schorge and Colquhoun 2003; Ulbrich and Isacoff 2007; Ulbrich and Isacoff 2008). Le récepteur NMDA est constitué d'un domaine amino-terminal extracellulaire (ATD, *amino-terminal domain*) impliqué dans l'assemblage des sous-unités, d'un domaine de liaison à l'agoniste (ABD, *agonist binding domain*) où s'opère la liaison et la reconnaissance des agonistes. Il comporte

aussi un domaine de 4 segments transmembranaires (M1 à M4), dont le segment M2 forme une boucle réentrant qui constitue le canal ionique.

A l'extrémité C-terminale, il y a le domaine carboxy-terminal (CTD, *carboxy-terminal domain*) impliqué dans le trafic du récepteur (Mayer 2006; Paoletti and Neyton 2007). La sous-unité GluN1 contient le site de liaison des deux co-agonistes, la D-sérine et la glycine et la sous-unité GluN2 contient le site de liaison au glutamate (Kleckner and Dingledine 1988)(Figure 1).

## 2. Les sous-unités

La sous-unité GluN1 (autrefois dénommée NR1 ou  $\zeta 1$ ) est la première sous-unité à avoir été clonée (Moriyoshi *et al.* 1991). Elle est codée par un seul gène mais possède 3 sites d'épissages alternatifs, un à l'extrémité N-terminale (exon 5) et deux à l'extrémité C-terminale (exon 21 et exon 22). Ces 3 sites d'épissages alternatifs d'ARN messenger génèrent 8 isoformes de la sous-unité GluN1 toutes fonctionnelles (Dingledine *et al.* 1999). La sous-unité GluN1 est ubiquitaire puisque sa présence est nécessaire, bien que non suffisante pour former un récepteur fonctionnel. Au cours du développement et à l'âge adulte, il existe une expression régionalisée des isoformes de GluN1 (Laurie *et al.* 1995). Même si la sous-unité GluN1 est principalement exprimée dans le SNC, sa présence a aussi été détectée dans des régions et des types cellulaires non cérébrales comme le cœur, les reins, le pancréas, les cellules immunitaires et les cellules endothéliales (Inagaki *et al.* 1995; Leung *et al.* 2002; Sharp *et al.* 2003; Boldyrev 2005; Mashkina *et al.* 2010).

C'est en 1992 que les sous-unités GluN2 ont été clonées (Kutsuwada *et al.* 1992; Monyer *et al.* 1992). Les sous-unités GluN2 sont codées par 4 gènes différents, synthétisant les 4 isoformes GluN2A, GluN2B, GluN2C et GluN2D. Ces isoformes partagent 50% d'identité de séquence, et elles se distinguent de la sous-unité GluN1 par la longueur de leur extrémité C-terminale. Cette distinction des sous-unités GluN2 est associée à la faculté des récepteurs NMDA à interagir avec certains complexes intracellulaires qui dictent la mobilité membranaire et la localisation cellulaire du récepteur (Paoletti 2011). L'association de ces sous-unités GluN2 avec la sous-unité GluN1, leur confère des caractéristiques propres à chacune (activation, conductance, probabilité d'ouverture du canal...) (Gielen *et al.* 2009). Par ailleurs, suivant le stade de développement et la structure cérébrale concernée, les sous-unités GluN2 sont aussi exprimées différemment (Sanz-Clemente *et al.* 2013).

Enfin, les sous-unités GluN3A et GluN3B sont les dernières à avoir été clonées (Ciabarra *et al.* 1995). Ces deux sous-unités n'ont aucun site de liaison fonctionnel pour le glutamate, mais elles peuvent lier les co-agonistes usuels, et à l'instar des sous-unités GluN2, elles forment un récepteur hétéromérique fonctionnel en s'associant avec GluN1 et GluN2 (Chatterton *et al.* 2002; Yao and Mayer 2006). Cette sous-unité semble jouer un rôle important dans le développement car la sous-unité GluN3A est exprimée précocement (E15, 15<sup>ème</sup> jour de développement embryonnaire chez la souris) et son expression est maintenue jusqu'au stade

adulte (Ciabarra *et al.* 1995). En revanche, la sous-unité GluN3B a une expression plus localisée et est restreinte au stade adulte (Pachernegg *et al.* 2012).

## II. La signalisation du récepteur NMDA

### 1. Activation

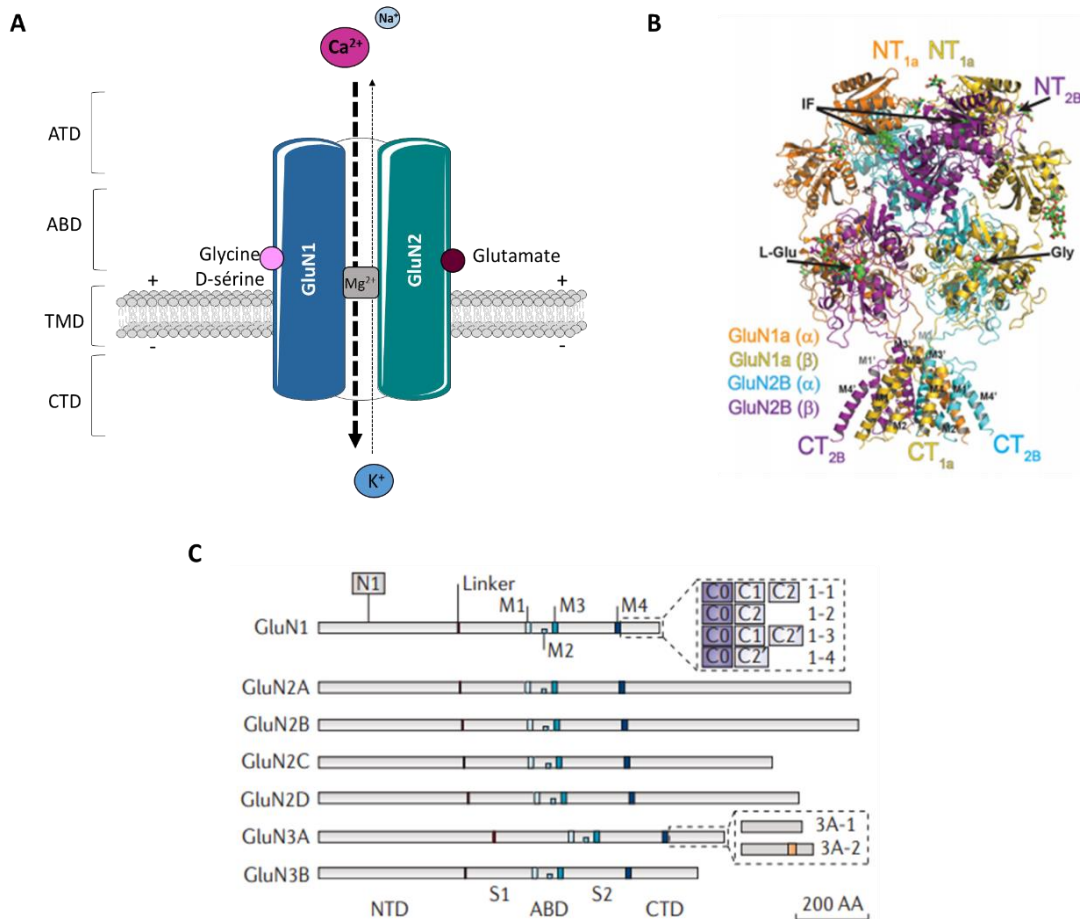
L'activation du récepteur NMDA requiert la liaison de deux molécules de glutamate, d'où sa dénomination de récepteur glutamatergique (Witt *et al.* 2004), et de deux co-agonistes au niveau des 4 domaines ABD (Paoletti *et al.* 2013). Deux acides aminés peuvent jouer cette fonction de co-agonistes d'un point de vue pharmacologique; la glycine et la D-sérine, qui se fixent sur le site glycine de la sous-unité GluN1 (Johnson and Ascher 1987; Kleckner and Dingledine 1988). Le récepteur NMDA se démarque aussi par le fait d'être sélectivement activé par le composé exogène qui lui a valu son nom : le N-méthyl D-aspartate. Au potentiel de repos, le récepteur est bloqué par l'ion magnésium ( $Mg^{2+}$ ) qui se trouve expulsé lors de la dépolarisation de la membrane (Crunelli & Mayer, 1984; Nowak *et al.*, 1984, **Figure 1**). Le récepteur NMDA est considéré comme un détecteur de coïncidence d'activité, se justifiant par la nécessité au préalable d'une dépolarisation membranaire (Seeburg *et al.* 1995).

L'activation du récepteur NMDA peut aboutir à l'ouverture d'un pore dans le récepteur (canal), permettant le passage sélectif de certains cations. Parmi ces cations, le récepteur NMDA est perméable aux ions  $Na^+$ ,  $K^+$  et  $Ca^{2+}$  (MacDermott *et al.* 1986). La perméabilité des récepteurs NMDA aux ions  $Ca^{2+}$  est une des plus élevées parmi les récepteurs ionotropiques (Mayer *et al.* 1984). En revanche, ils sont peu perméables aux ions  $Mg^{2+}$ , responsables d'une inhibition voltage dépendant. Le potentiel de repos d'un neurone est de -70mV (millivolt) alors que le potentiel d'équilibre de l'ion  $Mg^{2+}$  est proche de 0. Dès lors, au repos, l'ion  $Mg^{2+}$  bloque le pore du canal empêchant tout flux ionique et il n'est expulsé que lors d'une dépolarisation membranaire. Le blocage de  $Mg^{2+}$  et la perméabilité du  $Ca^{2+}$  sont tous les deux influencés par la composition en sous-unités. Les récepteurs composés de GluN2A et GluN2B sont plus sensibles au blocage de l'ion  $Mg^{2+}$  (concentration d'inhibition à 50% (IC50) aux environs de 15 $\mu$ M à -70mV) que ceux composés de GluN2C et GluN2D (IC50 = 80 $\mu$ M) (Paoletti *et al.* 2013).

Au sein de la synapse, le glutamate diffuse dans la fente synaptique et se fixe sur le site LBD (*lysine binding domain*) de la sous-unité GluN2. Le glutamate possède une forte affinité pour les récepteurs NMDA ( $EC_{50} < 5\mu$ M) (Paoletti *et al.* 2013), qui est supérieure à celle des récepteurs AMPA et kainate ( $EC_{50} > 100 \mu$ M) (Attwell and Gibb 2005). En outre, le type de sous-unité GluN2B influe sur l'affinité. Pour exemple, l'affinité pour le glutamate est meilleure lorsque la sous-unité GluN2B est présente par rapport à la sous-unité GluN2A (Paoletti *et al.* 2013). Concernant les deux co-agonistes, la glycine et la D-sérine, ils se fixent sur le domaine LBD de GluN1. Le site de liaison est nommé site glycine, puisque historiquement c'est la glycine qui a été décrite en premier comme co-agoniste (Johnson and Ascher 1987). Le récepteur est

plus affin pour la D-sérine ( $EC_{50} \sim 0.2\mu\text{M}$ ) et la glycine ( $EC_{50} \sim 0.05\text{-}0.5\mu\text{M}$ ) que pour le glutamate (Matsui *et al.* 1995; Priestley *et al.* 1995; Madry *et al.* 2007).

Enfin, l'activation du récepteur NMDA se clôture par une désactivation, c'est-à-dire que le canal ionique adopte une conformation fermée malgré la présence des ligands. Cette désactivation est assez lente et peut varier d'un facteur 30 en fonction de la sous-unité (GluN2A  $\tau_{\text{off}} = 10 \text{ ms}$  et GluN2B  $\tau_{\text{off}} = 300\text{ms}$ ) (Paoletti *et al.* 2013). Cette cinétique de désactivation est un paramètre important qui détermine la durée et le déroulement temporel des courants synaptiques générés par les récepteurs NMDA (Lester *et al.* 1990). Enfin, leur activité est sujette à de multiples modulations positives ou négatives par des composés extracellulaires. Il s'agit le plus souvent de petites molécules, voire d'ions, et certaines d'entre elles sont présentes de manière endogène dans le SNC, tels que les protons ( $\text{H}^+$ ) ou les ions zinc ( $\text{Zn}^{2+}$ ). Les récepteurs NMDA sont sujets à une inhibition partielle voltage-indépendante par les protons  $\text{H}^+$ , qui ne modifie pas l'affinité pour les agonistes principaux (Tang *et al.* 1990). L'ion zinc est le second inhibiteur allostérique, dont le site d'action se situe entre les deux lobes du domaine NTD des sous-unités GluN2 (Choi and Lipton 1999). Les récepteurs NMDA contenant la sous-unité GluN2A sont plus sensibles au ions  $\text{Zn}^{2+}$  ( $EC_{50} \sim 10\text{-}20\text{nM}$ ) que ceux contenant la sous-unité GluN2B ( $EC_{50} \sim 2\mu\text{M}$ ) (Williams 1996; Chen *et al.* 1997). A l'opposé, les polyamines modulent positivement l'activité des récepteurs NMDA en augmentant l'affinité du site co-agoniste pour ses ligands, permettant une potentialisation glycine-dépendante des réponses NMDA (Paoletti 2011).



**Figure 1 : Structure du récepteur NMDA.**

**A**, représentation schématique de la structure du récepteur NMDA qui se compose de 2 sous-unités présentant un domaine ATD (domaine amino-terminal), un domaine ABD (domaine de liaison de l'agoniste), plusieurs domaines transmembranaires (TMD) et du domaine C-terminal (CTD). **B**, structure cristallographique du récepteur NMDA composé dans cette figure de 2 sous-unités GluN1a et 2 sous-unités GluN2B. **C**, Sept sous-unités du récepteur NMDA ont été identifiées : GluN1, GluN2A-GluN2D et GluN3A et GluN3B. L'hétérogénéité des sous-unités est renforcée par l'épissage alternatif des sous-unités GluN1 et GluN3A. M1-M4 indiquent les segments membranaires. D'après Karakas & Furukawa, 2014 et Paoletti *et al.*, 2013

## 2. Régulation

### a. Adressage membranaire

La synthèse des récepteurs NMDA débute par des étapes de transcription et de traduction des différentes sous-unités. La synthèse de la sous-unité GluN1 est en excès, soutenant le fait que l'expression de surface des récepteurs NMDA cérébraux dépendrait donc de la biodisponibilité en sous-unités GluN2 (Chazot and Stephenson 1997; Prybylowski *et al.* 2002). Une fois traduites, l'assemblage des monomères s'opère dans le réticulum endoplasmique (RE) où des mécanismes empêchent l'exportation à la surface cellulaire de monomères ou de complexes incomplets.

Il semblerait que l'assemblage des sous-unités GluN1 aux sous-unités GluN2 induise des changements de conformation ou masque les motifs de rétention, ce qui favoriserait leur sortie du RE (Qiu *et al.* 2009). A la suite de leur sortie, les récepteurs NMDA sont exportés à la membrane plasmique par exocytose. Dans un premier temps, ces récepteurs sont en position extra-synaptiques (Rao *et al.* 1998), et ce n'est que dans un second temps qu'ils migreront à la synapse par diffusion latérale (Tovar and Westbrook 2002; Groc *et al.* 2004).

#### *b. Endocytose*

Avant la formation des synapses, les récepteurs NMDA migrent jusqu'à la surface cellulaire par des cycles d'exo- et d'endocytose (Washbourne *et al.* 2002). La dynamique de mouvement de ces récepteurs alterne constamment entre un état de mobilité et un état statique, qui dépend de l'agitation thermique, de la fixation d'éléments tels que les protéines d'échafaudage, et les protéines d'ancrage aux sites synaptiques et extrasynaptiques (Choquet and Triller 2013). L'endocytose des récepteurs NMDA implique la formation de vésicules clathrine dépendantes *via* l'association avec le complexe adaptateur AP-2 (Roche *et al.* 2001; Petralia *et al.* 2003). Cependant, l'internalisation des récepteurs NMDA par un mécanisme indépendant des vésicules à clathrine a également été montré (Swanwick *et al.* 2009). A savoir que l'internalisation des récepteurs NMDA peut être stimulée par le glutamate en synergie avec leur co-agoniste glycine (Nong *et al.* 2003). Cette stimulation d'internalisation entraîne une colocalisation du récepteur avec la machinerie cellulaire d'internalisation AP-2. La sous-unité  $\mu$  du complexe AP-2 reconnaît un signal basé sur une tyrosine Yxxp ou p correspond à une chaîne latérale hydrophobique (Ohno *et al.* 1995; Rapoport *et al.* 1997). L'interaction de GluN2A avec AP-2 se fait au niveau C-terminal (YKKM) et AP-2 reconnaît le site YEKL sur la tyrosine 1472 de GluN2B. Pour GluN2B, ce domaine est directement montré comme impliqué dans l'internalisation, puisque les mutations Y1472F et Y1472A empêchent l'interaction avec AP-2 et inhibe l'internalisation (Lavezzari *et al.* 2003). Concernant le site de GluN2A, il ne semble pas être responsable de l'internalisation, c'est un motif di-leucine qui occupe ce rôle (Bonifacino and Traub 2003). Les transcrits de la sous-unité GluN1 ayant le domaine C0 possèdent des séquences signales suffisantes à l'internalisation du récepteur (Snyder *et al.* 2001).

Le mécanisme d'endocytose impliqué pour les sous-unités GluN3 est médié par la PACSIN1 (*protein kinase C and casein kinase substrate in neurons protein 1*) et la syndapin1, une protéine spécifique aux neurones qui contrôle l'endocytose clathrine dépendante. PACSIN1 se fixe à l'extrémité C-terminale de GluN3A *via* son motif NPF (Pérez-Otaño *et al.* 2006).

### c. Recyclage ou dégradation

A la suite de l'internalisation, les protéines vont être soit dégradées, soit recyclées pour pouvoir retourner à la surface en empruntant les voies de trafic des endosomes (Grant and Donaldson 2009). L'utilisation de protéine chimérique TacGluN2, dans les lignées cellulaires Hela, a permis de mieux comprendre le rôle spécifique des sous-unités GluN2A et GluN2B dans le devenir des récepteurs après leur sortie des endosomes précoces. Les colocalisations avec des marqueurs spécifiques de l'endosome montre que la sous-unité GluN2A trafique préférentiellement vers les endosomes tardifs, menant à sa dégradation alors que GluN2B tend plus à être dans les endosomes de recyclage afin de retourner à la membrane (Lavezzari et al. 2004). L'information nécessaire à ce ciblage sélectif est portée par le domaine C-terminal de ces sous-unités. Cependant, les protéines impliquées dans les mécanismes de dégradation et de recyclage ne sont pas bien connues. La protéine GIPC contient un domaine PDZ qui lui permet de se fixer aux sous-unités GluN2A et GluN2B. L'étude de Yi en 2007 montre que GIPC peut s'internaliser avec les protéines chimériques TacGluN2 et colocalise avec le récepteur dans les endosomes de recyclage, augmentant ainsi l'expression du récepteur à la surface (Yi et al. 2007). La protéine SNAP-23, localisée dans les épines dendritiques est aussi impliquée dans le recyclage des récepteurs NMDA. Sur des cultures de neurones, l'utilisation d'ARN interférant ciblant SNAP23 induit une diminution du nombre de récepteurs NMDA et AMPA à la surface du neurone. Ces résultats peuvent s'expliquer par une diminution du processus de recyclage, impliquant alors la protéine SNAP-23 (Suh et al. 2010).

### d. Régulation par les mécanismes de phosphorylation

Les récepteurs NMDA peuvent subir des modifications post-traductionnelles à l'extrémité C-terminale qui vont jouer un rôle dans leur régulation. Une de ces modifications est la phosphorylation de résidus tyrosines et de résidus sérines/thréonines sur les sous-unités GluN2 et GluN1. Ces phosphorylations ont un rôle essentiel dans le trafic des récepteurs NMDA, en permettant l'interaction avec des protéines cytosoliques qui dictent le trafic intracellulaire, l'activité et la localisation des récepteurs. Ces phosphorylations peuvent être induites par de nombreuses protéines comme : la kinase cycline-dépendante 5 (cdk5), l'AMPC-dépendante de la protéine kinase A (PKA), B (PKB), et C (PKC), et la calmoduline kinase II (CaMKII). De nombreux sites de phosphorylations ciblant les tyrosines et les sérines/thréonines ont été identifiés sur les sous-unités des récepteurs NMDA (Sanz-Clemente et al. 2013; Wang et al. 2014).

❖ **GluN1** : ces sites de phosphorylations sont restreints aux résidus sérines (Lau and Huganir 1995). Parmi les différents sites présents sur GluN1, les résidus sérines S890 et S896 sont des cibles de phosphorylations pour les isoformes PKC, PKC $\alpha$  et PKC $\gamma$  (Sánchez-Pérez and Felipo 2005), et sont impliqués dans l'adressage membranaire (Scott et al. 2001). La phosphorylation de S890 modifie la répartition de GluN1 à la surface membranaire (Tingley et al. 1997). Quant aux résidus S896 et S897, une fois phosphorylés, ils entraînent une augmentation de l'adressage membranaire des récepteurs NMDA en masquant un motif de



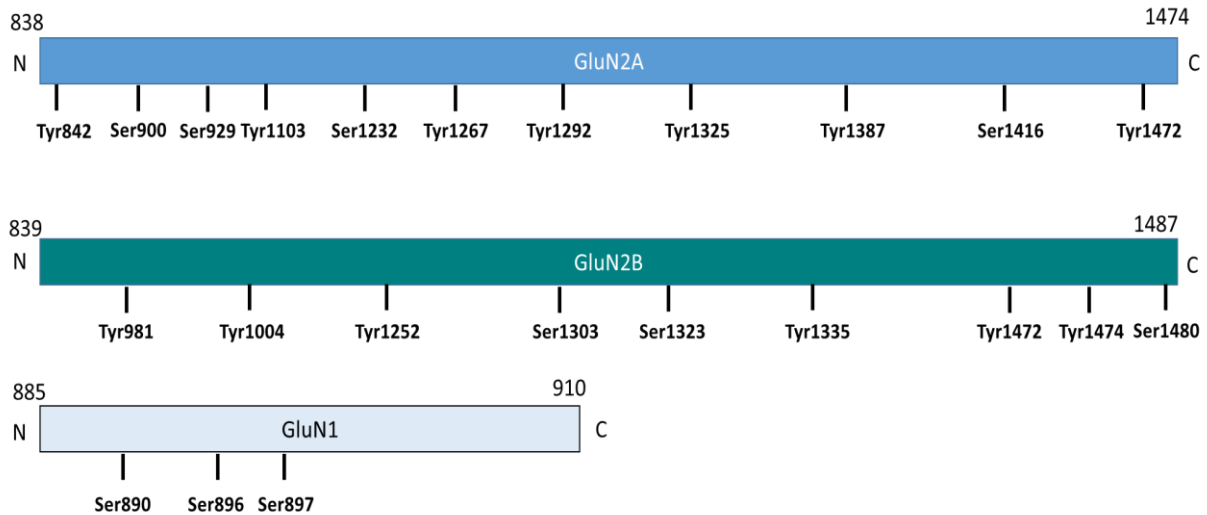
réétention dans le RE (Scott *et al.* 2003). La PKA peut phosphoryler la sous-unité GluN1 au niveau de la S897, ce qui potentialise les courants NMDA. Cet effet de potentialisation est induit par un adressage synaptique plus important des récepteurs NMDA et par une augmentation de leur perméabilité au  $\text{Ca}^{2+}$  (Skeberdis *et al.* 2006).

Parmi les diverses sous-unités des récepteurs au glutamate, les sous-unités GluN2A et GluN2B sont celles qui ont la plus longue extrémité C-terminale comptant respectivement 630 et 650 acides aminés avec 25 résidus tyrosines (Salter and Kalia 2004). Les résidus tyrosines sont les substrats des protéines tyrosine kinase (PTK). Parmi ces PTK, on retrouve Src et Fyn qui sont des protéines modulatrices des récepteurs NMDA.

❖ **GluN2A** : concernant les résidus sérines, elle possède 2 sites qui peuvent être phosphorylés par la PKA (S900 et S929), et un site par Cdk5 (S1232) (Gardoni *et al.*, 2001; Li *et al.*, 2001; Krupp *et al.*, 2002). La PKC peut potentialiser les courants des récepteurs NMDA composés de la sous-unité GluN2A en phosphorylant les résidus S1291 et S1312 (Jones and Leonard 2005). Les principaux sites tyrosines pouvant être phosphorylés sont à l'extrémité C-terminale de GluN2A : Y842, Y1292, Y1325 et Y1387 (Zheng *et al.* 1998; Yang and Leonard 2001). La déphosphorylation du site Y842 de GluN2A permet de réguler l'interaction des récepteurs NMDA avec l'adaptateur AP-2, le complexe protéique impliqué dans l'endocytose (Vissel *et al.* 2001).

❖ **GluN2B** : cette sous-unité est phosphorylable sur la S1303 par CAMKII et la S1480 est un site substrat pour la caséine kinase 2 (CK2) (Omkumar *et al.* 1996; Liao *et al.* 2001; Sanz-Clemente *et al.* 2010). La PKC potentialise aussi les courants des récepteurs contenant la sous-unité GluN2B en phosphorylant les sérines S1303 et S1323, qui sont des sites analogues à GluN2A (Liao *et al.* 2001). Les principaux sites tyrosines de GluN2B sont localisés à l'extrémité C-terminale : Y1252, Y1336 et Y1472. Ces sites peuvent tous les 3 être phosphorylés par Fyn (Nakazawa *et al.*, 2001, **Figure 2**). Fyn est connu pour être un régulateur majeur pour moduler les récepteurs NMDA contenant la sous-unité GluN2B (Trepanier *et al.* 2012). Y1472 est un site de phosphorylation important puisqu'il est contenu dans un motif d'internalisation (YEKL), qui se lie directement à l'adaptateur AP-2 (Roche *et al.* 2001; Lavezzari *et al.* 2003). La phosphorylation d'Y1472 perturbe sa liaison à l'AP-2, conduisant à l'inhibition de l'endocytose de GluN2B. De plus, STEP (*Striatal Enriched Tyrosine Phosphatase*) est une famille de protéine tyrosine phosphatase présente dans les synapses glutamatergiques, pouvant modifier les phosphorylations des résidus tyrosines de GluN2B (Salter and Kalia 2004). L'étude de Snyder en 2005 montre que l'activation des STEP induit une déphosphorylation de Y1472 sur GluN2B, amenant à une augmentation de l'endocytose (Snyder *et al.* 2005).

Par conséquent, le trafic des récepteurs NMDA est régulé à la fois par la phosphorylation des résidus sérines/thréonines et tyrosines. Ces phosphorylations vont affecter spécifiquement les récepteurs NMDA en fonction du site phosphorylé.



**Figure 2 :** Les principaux sites de phosphorylation des sous-unités GluN1, GluN2A et GluN2B des récepteurs NMDA.

Tyr : tyrosine, Ser : sérine, N : extrémité N-terminale, C : extrémité C-terminale.

Adaptée de [Salter & Kalia, 2004](#); [Wang \*et al.\*, 2014](#).

### 3. La localisation subcellulaire

Malgré quelques études qui rapportent que les sous-unités GluN2 sont présentes au niveau des sites présynaptiques ([Corlew \*et al.\* 2008](#)), les récepteurs NMDA sont communément localisés aux sites postsynaptiques dans le SNC. GluN2B a une affinité plus élevée pour le glutamate que GluN2A mais la libération de glutamate dans les neurones adultes résulte en une plus forte activation de GluN2A par rapport à GluN2B ([Paoletti \*et al.\* 2013](#)). Ces résultats a priori contradictoires sont probablement dus à une localisation subcellulaire distincte de ces sous-unités. L'activation de GluN2A est plutôt en faveur d'une localisation synaptique alors que GluN2B serait plutôt enrichi aux sites extrasynaptiques ([Groc \*et al.\* 2009](#)). Ce modèle s'appuie sur l'utilisation d'inhibiteurs sélectifs à GluN2B tels que l'ifenprodil, Ro-25-6981 ou CP101.606 ([Sanz-Clemente \*et al.\* 2013](#)). En effet, l'ifenprodil ne bloque que 30 % des courants postsynaptiques excitateurs médiés par les récepteurs NMDA, indiquant une prédominance de GluN2A aux sites synaptiques ([Sanz-Clemente \*et al.\* 2013](#)). Le blocage irréversible des récepteurs NMDA synaptiques par le MK801 démontre un pool de récepteurs NMDA encore actifs et sensibles à l'ifenprodil, appuyant encore la présence de GluN2B aux sites extrasynaptiques ([Kew \*et al.\* 1998](#)). Pour autant, certaines études remettent en cause cette répartition des sous-unités à la synapse, en montrant une sensibilité similaire à l'ifenprodil aux sites synaptiques et extrasynaptiques ([Harris and Pettit 2007](#)).

Sur des cultures de neurones, GluN2A a été rapporté comme étant à la membrane extrasynaptique (Thomas *et al.* 2006), et la présence GluN2B au niveau synaptique. Dans tous les cas, la répartition des sous-unités GluN2 à la membrane n'est pas aussi simple, aussi fixe, puisque ses sous-unités sont des structures dynamiques et mobiles, tout particulièrement la sous-unité GluN2B (Tovar and Westbrook 2002; Groc *et al.* 2006). GluN2B possède une mobilité latérale au niveau membranaire qui lui permet de diffuser du site extrasynaptique vers le site synaptique et vice-versa. Ce processus permet une régulation fine du nombre et de la composition des sous-unités à la membrane (Groc *et al.* 2006).

Cette localisation subcellulaire des sous-unités GluN2 peut être régulée par des interactions protéines-protéines au niveau de l'extrémité C-terminale des sous-unités GluN2. Par exemple, le motif de fixation PDZ présent sur la queue C-terminale de GluN2A et GluN2B permet la fixation des protéines de la famille MAGUK (*Membrane-Associated Guanylate Kinase*), qui sont des protéines d'échafaudage. La rétention de GluN2B à la synapse requiert la fixation à des protéines MAGUK alors que ce n'est pas le cas pour GluN2A (Prybylowski *et al.* 2005). Parmi ces protéines d'échafaudage, les plus fréquentes pour les récepteurs NMDA sont PSD-95 (*postsynaptic density 95*) et SAP-102 (*synapse-associated protein 102*) (Sans *et al.* 2000). La théorie d'une interaction différentielle entre les MAGUK et les sous-unités GluN2A et GluN2B est controversée (Bard *et al.* 2010). Cette hypothèse repose sur une association préférentielle de GluN2A avec PSD-95, et GluN2B avec SAP-102, ce qui déterminerait la localisation de ces sous-unités à la synapse (Sans *et al.* 2000; Al-Hallaq *et al.* 2007). Sur des cultures de neurones, les récepteurs contenant GluN2B sont plus mobiles, se déplacent plus facilement à la synapse que ceux contenant GluN2A (Groc *et al.* 2006). Une des explications envisagées serait une phosphorylation du site de fixation PDZ sur GluN2B, et pas sur GluN2A, par la CK2, ce qui empêcherait l'association avec des protéines d'échafaudage et permettrait à GluN2B d'être mobile (Chung *et al.* 2004; Sanz-Clemente *et al.* 2010). Cependant, la délétion du domaine PDZ sur la sous-unité GluN2A ne modifie pas les propriétés électrophysiologiques de ces récepteurs NMDA comparée à la sous-unité GluN2A sauvage (Barria and Malinow 2002; Prybylowski *et al.* 2005). En revanche, la délétion entière de l'extrémité C-terminale intracellulaire de GluN2A diminue l'expression synaptique de GluN2A (Steigerwald *et al.* 2000). Ainsi, la stabilisation de la sous-unité GluN2A à la synapse fait probablement intervenir d'autres domaines de fixation protéique, que le site PDZ seul. La sous-unité GluN2A se fixerait à des protéines de la famille MAGUK indépendamment du domaine PDZ (Cousins *et al.* 2009; Chen *et al.* 2011). De plus, le domaine extracellulaire des récepteurs peut aussi intervenir dans le contrôle de la localisation subcellulaire des récepteurs NMDA. Par exemple, on peut citer le récepteur éphrine, ou des composants de la matrice extracellulaire comme la reeline (Groc *et al.* 2007).

D'autre part, la ségrégation des récepteurs NMDA synaptiques et extrasynaptiques qui contiendraient respectivement les sous-unités GluN2A/GluN2C et GluN2B/GluN2D a suggéré que ceux-ci ont des fonctions différentielles selon leur localisation (Rumbaugh and Vicini 1999; Thomas *et al.* 2006). En 2002, les travaux de Hardingham et ses collaborateurs exposent un modèle selon lequel l'activation des récepteurs NMDA synaptiques est neuroprotectrice alors que celle des récepteurs extrasynaptiques conduit à la mort neuronale (Hardingham *et al.* 2002). L'activation des récepteurs synaptiques induit l'expression du facteur transcriptionnel CREB (*cyclic-AMP response element binding*), reconnu pour jouer un rôle dans la survie neuronale. Cette activation bloque la transcription de gènes pro-apoptotiques et oxydatifs (APAF1, Puma). *A contrario*, l'activation des récepteurs extrasynaptiques inclut une déphosphorylation de CREB et une activation de gènes pro-apoptotiques, un excès d'influx calcique à l'origine de la mort neuronale (Hardingham *et al.* 2002). Des études de Stanika et ses collaborateurs en 2009 ont montré qu'une activation sélective des récepteurs NMDA extrasynaptiques dans l'hippocampe permettait d'obtenir le même degré de mort cellulaire qu'une activation globale de toute la population de récepteurs (synaptiques et extrasynaptiques) (Stanika *et al.* 2009). Cette activation des récepteurs NMDA extrasynaptiques est impliquée dans des processus pathologiques telle que l'ischémie cérébrale. Toutefois, le rôle exact et la composition en sous-unités GluN2 dans l'effet délétère des récepteurs NMDA extraynaptiques n'est pas bien établi.

### III. Fonctions du récepteur NMDA

Au sein du SNC, les récepteurs NMDA ont une expression et une distribution ubiquitaire. Il n'est alors pas surprenant qu'ils soient impliqués dans des processus physiologiques clés comme la plasticité synaptique et qu'une dérégulation de leur activité soit responsable de processus pathologiques tels que l'excitotoxicité.

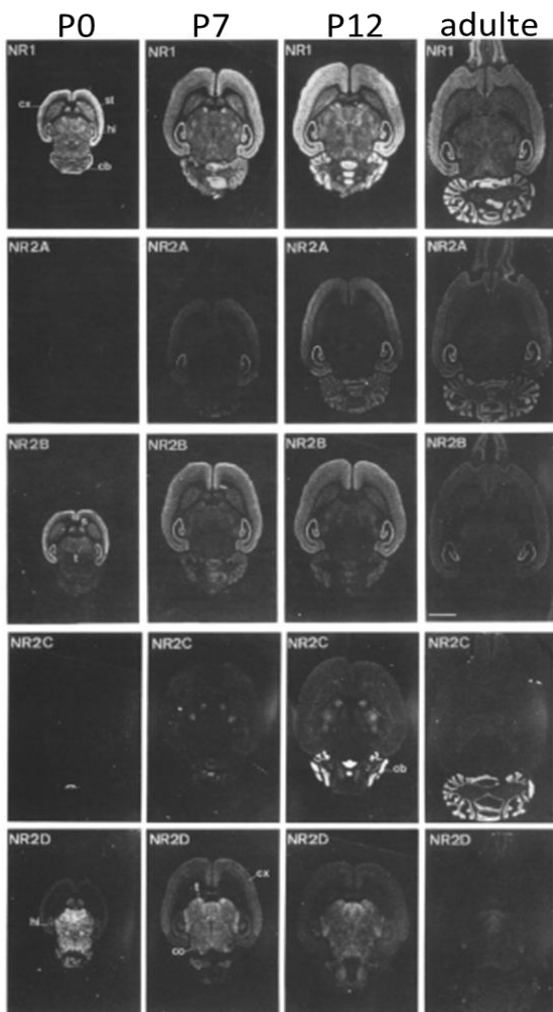
#### 1. Au cours du développement cérébral

Les récepteurs NMDA sont distribués dans tout le système nerveux central (SNC). Toutefois, l'expression individuelle des sous-unités dépend à la fois de la région cérébrale et du stade de développement. De fait, les sous-unités des récepteurs NMDA ont des profils d'expression distinct, qui se chevauchent souvent, et qui leur confèrent des fonctions spécifiques dépendantes de la région cérébrale et du stade de développement (**Figure 3**). L'expression de la sous-unité GluN1 débute à E14, et même si elle est exprimée uniformément dans le SNC après la naissance, il existe des différences d'expression entre les isoformes. Par exemple, l'isoforme GluN1 exprimant la cassette en N-terminale est restreinte au noyau caudé, au thalamus et au cervelet (Laurie and Seeburg 1994). Toutefois, la signification fonctionnelle de cette différence d'expression des isoformes GluN1 n'est pas bien connue.

Contrairement à GluN1, il y a 4 gènes qui codent les sous-unités GluN2 avec pour chacune des sous-unités un profil d'expression spatio-temporel unique. GluN2B est fortement

exprimée au stade embryonnaire, avec une expression maximale vers P5-10 puis elle diminue pour être restreinte à l'âge adulte au cerveau antérieur.

A l'inverse, à la naissance, l'expression de GluN2A jusqu'alors indétectable apparaît graduellement à partir de la seconde semaine postnatale (P7). GluN2A est présente dans le néocortex, l'hippocampe, les bulbes olfactifs et le cervelet, pour finalement être distribuée de manière ubiquitaire dans le SNC à l'âge adulte (Monyer *et al.* 1994). L'expression de GluN2C n'apparaît pas au stade embryonnaire ni postnatal précoce, mais n'est détectable qu'aux alentours de P10-P11. GluN2C est essentiellement retrouvée dans les cellules granulaires du cervelet et dans une moindre mesure dans les bulbes olfactifs (Sanz-Clemente *et al.* 2013). Enfin, GluN2D tout comme GluN2B, est exprimée dès le stade embryonnaire, avec un pic d'expression à P7. Son niveau d'expression diminue à l'âge adulte, GluN2D est confinée au niveau du diencephale, du mésencéphale et de la moelle épinière (Monyer *et al.* 1994; Watanabe *et al.* 1994; Wenzel *et al.* 1996; Sanz-Clemente *et al.* 2013). Les sous-unités GluN3 ont aussi un pattern d'expression différentiel. GluN3A a un pic d'expression dans les premiers jours post-natales et à l'âge adulte cette sous-unité n'est détectable que dans les bulbes olfactifs (Henson *et al.* 2010). L'expression de GluN3B augmente au cours du développement, notamment dans les motoneurones (Nishi *et al.* 2001), et dans l'hippocampe (Wee *et al.* 2008), et elle est aussi exprimée dans le cortex cérébral ainsi que le cervelet (Wee *et al.* 2008).



**Figure 3 : profil d'expression spatio-temporel de GluN1 et GluN2 chez le rat.**

Hybridation *in situ* sur des sections horizontales de cerveaux de rat à P0, P7, P12 et à l'âge adulte. Il s'agit des profils d'expression des sous-unités GluN1, GluN2A, GluN2B, GluN2C et GluN2D. D'après Sanz-Clemente *et al.*, 2013.

De plus, il existe des différences d'expression des sous-unités au niveau subcellulaire. Par exemple, la sous-unité GluN1 est répartie en 2 pools : une population située à la membrane plasmique qui s'assemble avec les sous-unités GluN2 et GluN3 et un second pool retenu dans le RE avec une courte demi-vie (Huh and Wenthold 1999). Les sous-unités GluN2 sont principalement localisées à la membrane plasmique.

Par ailleurs, l'activité des récepteurs NMDA semble être impliquée dans des formes de plasticité dites structurales ; et plus particulièrement dans la formation de nouveaux neurones et de nouvelles synapses. Plusieurs études suggèrent que l'activité des récepteurs NMDA serait couplée à la neurogenèse adulte, qui a lieu dans le gyrus denté de l'hippocampe (Cameron *et al.* 1995; Nacher and McEwen 2006). L'administration d'antagonistes de ces récepteurs *in vivo* entraîne une diminution du nombre de nouveaux neurones tandis que l'application de NMDA semble augmenter le taux de neurogenèse (Contestabile 2000). De plus, les récepteurs NMDA joueraient un rôle potentialisateur sur la migration des cellules nouvellement formées puisque leur blocage diminue drastiquement le taux de migration des cellules en grain du cervelet (Komuro and Rakic 1993) et des neurones corticaux (Hirai *et al.* 1999). L'origine et la nature des agonistes et co-agonistes qui permettent leur fonctionnalité restent en revanche inconnues.

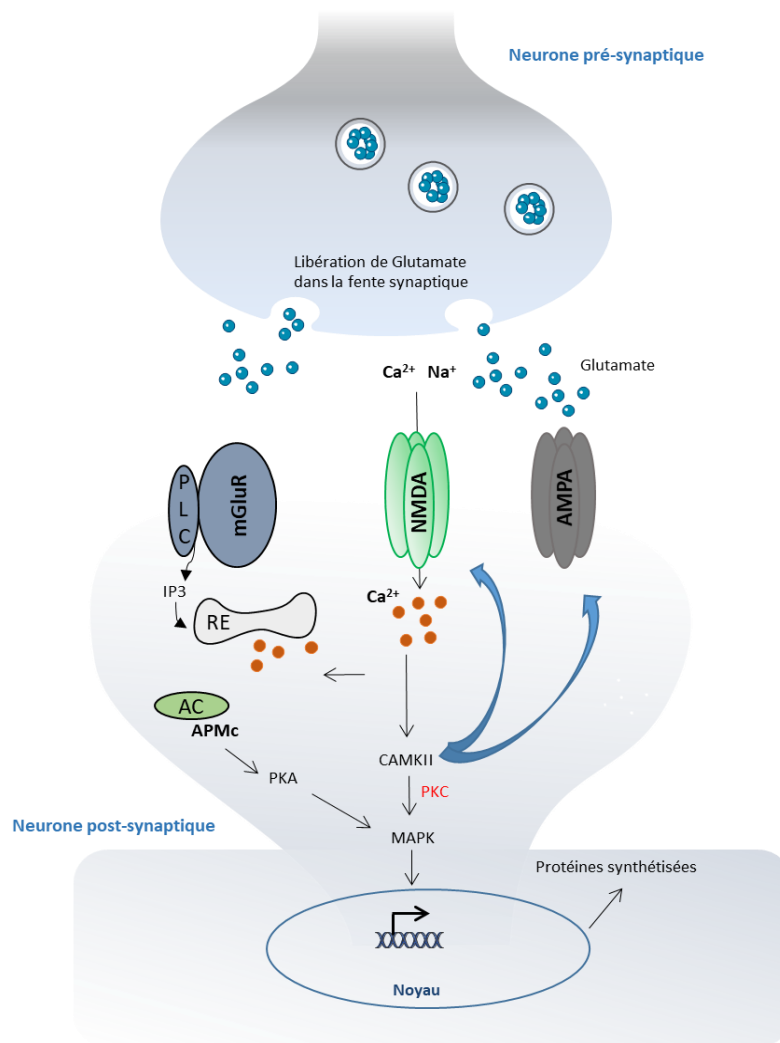
La synaptogenèse est un processus au cours duquel les neurones établissent des contacts synaptiques afin d'émettre des signaux vers d'autres neurones. Ce processus débute au cours du développement embryonnaire (à partir de E18) et se poursuit après la naissance. Très peu de données suggèrent une implication des récepteurs NMDA dans les étapes précoces de la synaptogenèse, telles que la mise en contact *per se* des neurites, mais ces récepteurs semblent nécessaires au raffinement et à la stabilisation des synapses. L'activité des récepteurs NMDA aiderait à l'émergence de protusions sur les dendrites en développement, ainsi qu'à la formation d'une forme précoce de densité post-synaptique (Brooks *et al.* 1991; Fukaya *et al.* 1999; Contestabile 2000).

## 2. Plasticité synaptique

Une des grandes capacités de notre cerveau est de pouvoir stocker des informations et de s'en souvenir, notamment grâce aux processus de mémoire et d'apprentissage. Ces phénomènes se traduisent par une augmentation importante et durable de l'efficacité synaptique aussi connue sous le nom de potentialisation à long terme (*Long Term Potentiation* ou LTP) (Nabavi *et al.* 2014). Une seconde forme de plasticité synaptique existe sous le terme de dépression à long terme (LTD, *Long Term Depression*). La LTP a été observée pour la première fois en 1973 sur des hippocampes de lapin (Bliss and Lomo 1973), puis sa présence a été démontrée au sein du cortex (Iriki *et al.* 1989), de l'amygdale et du striatum (Uno and Ozawa 1991).

Le récepteur NMDA est une des pièces maîtresses de la plasticité synaptique, processus considéré comme étant la base cellulaire de la mémoire et de l'apprentissage. Dès lors l'étude du fonctionnement de ce récepteur NMDA et des acteurs qui le régulent sont nécessaires pour appréhender au mieux ces phénomènes. La LTP et la LTD dépendant des récepteurs NMDA sont les formes les plus répandus de plasticité synaptique, même s'il existe d'autres formes de plasticité indépendante des récepteurs NMDA. On distingue deux types de LTP : la phase précoce de la LTP (*early-LTP*) et la phase tardive de la LTP (*late-LTP*). La phase précoce dure de quelques secondes à quelques heures et l'efficacité synaptique repose sur des mécanismes enzymatiques, mais sans intervention de synthèse protéique. La phase tardive persiste sur plusieurs jours et l'amélioration de l'efficacité synaptique repose sur la synthèse de protéines *de novo* (Bliss and Lomo 1973; Collingridge *et al.* 1983; Nicoll 2017).

Expérimentalement, l'induction de LTP nécessite l'application d'un protocole à haute fréquence par plusieurs trains de stimulations téaniques afin de stimuler les synapses glutamatergiques. A la suite de cette stimulation à haute fréquence, le neurone présynaptique libère une grande quantité de glutamate, qui à son tour active des récepteurs glutamatergiques postsynaptiques (ionotropiques et métabotropiques). Dans un premier temps, le glutamate active les récepteurs AMPA, provoquant une dépolarisation locale du neurone postsynaptique. Cette dépolarisation est suffisante pour expulser les ions magnésiums bloquant les récepteurs NMDA. Ces derniers s'activent et induisent une entrée de calcium et de sodium, ainsi qu'une sortie d'ions potassium dans l'élément postsynaptique. L'entrée d'ions calcium est un élément clé, responsable de l'induction de la LTP *via* une activation d'un ensemble de cascades moléculaires conduisant au renforcement synaptique. En effet, le fait de tamponner l'ion calcium par un chélateur de calcium tel que le BAPTA inhibe l'induction de la LTP (Lynch *et al.* 1983). A l'inverse, l'augmentation de la concentration en calcium permet d'induire une augmentation durable de la transmission synaptique. De plus, cette entrée de calcium active CAMKII (Lisman *et al.* 2002), et implique d'autres kinases comme la PKA, la PKC et les MAP (*mitogen-activated protein*) kinases (Figure 4; Hu *et al.*, 1987; Yasuda *et al.*, 2003; Malenka & Bear, 2004). L'implication du récepteur NMDA dans l'induction de la LTP a été révélée par l'utilisation d'antagonistes spécifiques de ces récepteurs, dont le d-2-amino-5-phosphovalérate (AP5 ou APV). L'application de ces antagonistes empêche l'induction de la LTP sans avoir aucun effet sur les potentiels post-synaptiques excitateurs évoqués à faibles fréquences (Collingridge *et al.* 1983).



**Figure 4 : Schéma simplifié de la LTP au sein d'une synapse glutamatergique.**

Lors d'une forte libération de glutamate, les récepteurs ionotropiques (NMDA et AMPA) et métabotropiques (mGluR) s'activent. L'ouverture du canal du récepteur NMDA provoque une entrée massive de  $\text{Ca}^{2+}$  et les récepteurs métabotropiques couplés à une protéine G provoquent la mobilisation du  $\text{Ca}^{2+}$  stocké dans le réticulum. La forte concentration intracellulaire de calcium active des protéines kinases (PKA, PKC, CAMKII) qui à terme permettent la synthèse de nouvelles protéines.

De nombreux groupes ont étudié l'influence des sous-types des récepteurs NMDA pour initier les processus de plasticité synaptique. Massey et collaborateurs suggèrent que la LTP dépendrait de l'activation des récepteurs NMDA constitués de la sous-unité GluN2A alors que la LTD serait sous-tendue par l'activation des récepteurs extrasynaptiques contenant GluN2B (Massey *et al.* 2004). A l'inverse, la LTP peut être induite chez des souris GluN2A<sup>-/-</sup> dans l'hippocampe, mais pas chez des souris GluN2B<sup>-/-</sup>, suggérant une induction de LTP plutôt sous le contrôle de GluN2B (Berberich *et al.* 2005; Weitlauf *et al.* 2005; Brigman *et al.* 2010). D'autres travaux n'ont pas pu mettre en évidence une sous-unité particulière et un des modèles potentiels pour induire la plasticité dépendrait du rapport synaptique GluN2A/GluN2B. L'étude de Xu montre que la diminution du rapport GluN2A/GluN2B favorise l'induction de la LTP alors qu'une augmentation de ce rapport l'inhibe (Xu *et al.* 2009).



Globalement, les données de la littérature ne permettent pas de déterminer le rôle exact des sous-unités GluN2A et GluN2B dans la LTP.

### 3. L'excitotoxicité

Cela fait plus de six décennies qu'il a été découvert que les injections systémiques de glutamate chez la souris pouvaient détruire les tissus de la rétine dans les couches internes (Lucas and Newhouse 1957), fournissant ainsi la première preuve des effets toxiques du glutamate. Ces lésions ne sont pas restreintes à la rétine, mais concernent également des structures centrales, le lien entre l'effet excitateur du glutamate et sa toxicité fait naître le concept d'excitotoxicité (Olney 1969). Ce terme appuyé par de nombreuses études menées *in vitro* et *in vivo* repose sur la toxicité induite par la libération massive et incontrôlée du glutamate. Cette excitotoxicité conduit à la mort de type nécrotique. Il s'agit d'une mort prématurée et non programmée, qui se caractérise morphologiquement par une augmentation du volume de la cellule, un gonflement et une dissolution des organelles. Il s'en suit une rupture des membranes nucléaires et cytoplasmiques concomitantes à la dégradation de l'acide désoxyribonucléique (ADN) par des endonucléases activées (Bicknell and Cohen 1995; Dong *et al.* 1997). Peu de temps après, l'équipe de Choi démontre que les entrées de calcium sont un médiateur clé de l'excitotoxicité du glutamate, et que l'afflux de calcium à travers les récepteurs glutamatergiques de type NMDA est la principale source de calcium « toxique » (Choi 1987; Choi 1988a; Choi 1988b). L'équipe de Tymianski confirme que l'entrée de calcium par les récepteurs NMDA est particulièrement efficace pour induire la mort neuronale par rapport à l'entrée *via* d'autres canaux (Tymianski *et al.* 1993).

L'excitotoxicité du glutamate est observée dans des situations aiguës, lors d'un traumatisme neurologique cérébral tel que l'ischémie cérébrale. La contribution des récepteurs NMDA a induit le développement d'antagonistes ciblant les récepteurs NMDA et notamment la sous-unité GluN2B. Malgré une amélioration de l'index thérapeutique, les antagonistes ciblant GluN2B n'ont pas encore été voués au succès en clinique (Mony *et al.* 2009). De plus, des niveaux élevés de glutamate de façon chronique pourraient contribuer à la perte de synapses et de neurones étant impliqués dans des pathologies dégénératives telles que la maladie d'Huntington, la maladie de Parkinson et d'Alzheimer. *A contrario*, une potentialisation de la signalisation NMDA serait bénéfique dans la schizophrénie (Moghaddam and Javitt 2012).

Le récepteur NMDA est un hétérotétramère composé de deux sous-unités GluN1 associées à des sous-unités GluN2 et GluN3. Son activation nécessite la liaison d'un agoniste, le glutamate, ou un agoniste de synthèse, le NMDA, ainsi que la liaison de co-agonistes, la glycine ou la D-sérine. A la suite d'une dépolarisation membranaire, l'ion  $Mg^{2+}$  est expulsé du pore du canal, permettant entre autres l'influx d'ions  $Ca^{2+}$ . Des mécanismes de dégradation et de recyclage permettent de réguler la présence des récepteurs à la membrane, et la phosphorylation des résidus tyrosines et sérines/thréonines sur les sous-unités permet de moduler l'activité des récepteurs NMDA.

Ces sous-unités sont exprimées différemment dans le temps et dans l'espace avec par exemple un switch d'expression de la sous-unité GluN2B au stade embryonnaire pour la sous-unité GluN2A au stade postnatal. Ces mêmes sous-unités seraient réparties de façon hétérogène à la membrane, avec la présence de la sous-unité GluN2A plutôt à la synapse et celle de GluN2B plutôt aux sites extrasynaptiques. Fonctionnellement, les récepteurs NMDA sont impliqués dans la plasticité synaptique et un excès d'influx calcique à travers ces récepteurs est responsable de la mort de type excitotoxique.

The NMDA receptor is a heterotetramer composed of two GluN1 subunits associated with GluN2 and GluN3 subunits. Its activation requires the binding of its natural agonist, glutamate, or a synthetic agonist, NMDA; and the binding of co-agonist such as glycine or D-serine. After membrane depolarization,  $Mg^{2+}$  is relieved from the pore, allowing  $Ca^{2+}$  influx through NMDA receptors among other ions. Degradation and recycling mechanisms regulate the presence of receptors at the membrane. Also, phosphorylation of tyrosine and serine/threonine residues on subunits is involved in the modulation of NMDA receptors activity.

These subunits are differentially expressed over time and space, with for example a switch of the expression of GluN2B subunit (expressed at embryonic stages) for GluN2A subunit (expressed at postnatal stages). There is also a heterogeneous distribution at the membrane with a GluN2A localization preferentially at the synapse and GluN2B localization at extrasynaptic sites. Functionally, NMDA receptors are involved in synaptic plasticity and a calcium influx excess through these receptors induces excitotoxic death.

## 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 découverte au 20<sup>ème</sup> siècle par sa présence dans la circulation sanguine. Elle a tout d'abord été étudiée pour sa propriété fibrinolytique, c'est-à-dire qu'elle permet de cliver le plasminogène inactif en plasmine permettant alors la dégradation du caillot de fibrine. Son activité protéolytique lui a valu d'être reconnue comme seul traitement pharmacologique pour la phase aiguë des accidents vasculaires cérébraux (AVC) ischémiques dès 1995 (NINDS 1995). Cette protéase siège physiologiquement dans le compartiment vasculaire mais aussi dans le parenchyme cérébral où elle est exprimée dans diverses structures cérébrales (hippocampe, cortex, amygdale...) ainsi que par de multiples types cellulaires (neurones, astrocytes...). Le tPA est une protéine pléiotrope, capable d'interagir avec de nombreux récepteurs, l'impliquant dans diverses fonctions physio-pathologiques qui seront développées dans cette seconde partie.

### I. Historique

La découverte des différentes protéines intervenant dans la cascade fibrinolytique endogène a permis de mettre au point la thrombolyse pharmacologique.

Durant la Grèce antique, Hippocrate avait déjà observé que le sang des personnes décédées n'était pas coagulé. Mais cette observation oubliée fut redécouverte en 1761 par Morgagni, qui nota lors de ses autopsies que le sang ne coagulait pas directement après le décès (Morgagni 1761). Ironiquement, il menait des travaux en parallèle sur l'apoplexie (terme médical historique de l'AVC) et ne pouvait se douter que de sa première observation naîtrait le traitement de référence sur les AVC deux cents ans plus tard. En 1838, Denis observa la dissolution spontanée du sang (Denis 1838) mais ce n'est qu'en 1844 qu'Andral avança l'idée que le sang se reliquéfiait ce qui a constitué les prémisses du système fibrinolytique (Andral 1845). En 1889, Denys et De Marbaix furent les premiers à postuler l'existence d'une enzyme fibrinolytique endogène « dormante » (Denys and de Marbaix 1889) et Dastre inventa le terme de fibrinolyse en 1893 (Dastre 1893).

Par la suite en 1902, Conradi démontra qu'il était possible de dégrader les caillots sanguins par l'ajout d'extrait de différents organes (Conradi 1902). Puis, Hedin identifia une activité protéolytique dans la fraction globuline du sérum, fraction qui fut identifiée plus tard comme contenant le plasminogène, précurseur de la plasmine (Hedin 1903; Christensen and Macleod 1945).

Pour la première fois, en 1952 Tage Astrup et Agnete Stage furent les premiers à isoler et solubiliser (partiellement) l'activateur tissulaire du plasminogène, le tPA (appelé alors « fibrinokinase ») (Astrup and Stage 1952). Cependant, la protéine fut difficile à purifier, et ce n'est qu'en 1979 que le tPA est purifié et caractérisé par les travaux de Binder à la fois dans la circulation sanguine, et dans l'utérus grâce aux travaux de Rijken, qui avait besoin de 5 kilos

d'utérus humain pour isoler et purifier 1mg de fibrinokinase (Binder *et al.* 1979; Rijken *et al.* 1979). Rebaptisé « activateur tissulaire du plasminogène », le tPA est alors purifié à partir de surnageants de cultures de cellules de mélanome humain grâce aux travaux conjoints de Collen et Rijken en 1981, permettant ainsi sa caractérisation (Rijken and Collen 1981).

La poursuite du progrès est telle que la première administration de tPA chez l'Homme est réalisée en 1981 par Weimar pour traiter deux patients victimes de thrombose de la veine rénale. Deux ans plus tard, en 1983, Pellica parvient à réussir le clonage du tPA, ouvrant la voie à la production de tPA recombinant par les cellules eucaryotes (Pennica *et al.* 1983). La production à grande échelle de tPA recombinant mise en place sur des lignées de cellules ovariennes de hamster chinois (CHO-*Chinese Hamster Ovaries*) a permis de réaliser les premiers essais cliniques. Ainsi, la même année, la première étude clinique est menée sur des patients souffrant d'infarctus du myocarde. En 1995, le succès d'une étude clinique conduit à l'utilisation du tPA comme agent fibrinolytique lors de la phase aiguë d'un AVC ischémique (NINDS 1995). Même après 25 ans, il reste le seul agent pharmacologique autorisé lors de la phase aiguë d'un AVC ischémique.

## II. La structure du tPA

Le tPA est la protéine issue de l'encodage du gène *plasminogen activator tissue type* (PLAT) situé sur le chromosome 8 chez l'Homme (Tripputi *et al.* 1986). Le premier transcrit issu de ce gène va engendrer trois ARNm dont seul un isoforme sera protéolytiquement actif.

Le tPA est une glycoprotéine qui appartient à la famille des sérines protéases. Celui-ci est synthétisé sous la forme d'une chaîne polypeptidique de 527 acides aminés avec une masse moléculaire de 69kDa (Pennica *et al.* 1983). L'accès à la séquence nucléotidique du tPA a permis d'identifier 17 ponts disulfures permettant le maintien de sa structure tridimensionnelle ainsi que des sites de glycosylations. En effet, le tPA possède un site d'O-glycosylation sur la thréonine<sup>61</sup> (Harris *et al.* 1991) ainsi que trois sites de N-glycosylations dont deux sont constitutifs : un sur l'asparagine (Asn)<sup>117</sup> et un autre sur l'Asn<sup>448</sup>. La troisième N-glycosylation est variable et se situe sur l'Asn<sup>184</sup>. De ces 3 sites résultent l'existence de deux glycoformes du tPA : le tPA de type I avec les trois N-glycosylations et le tPA de type II avec seulement les deux N-glycosylations constitutives (Pohl *et al.* 1984). La glycosylation sur l'Asn<sup>184</sup> (tPA de type I) diminue la capacité du tPA à cliver le plasminogène et à se lier à la fibrine (Berg *et al.* 1993).

Concernant sa structure, le tPA est constitué de cinq domaines répartis en une chaîne lourde (chaîne A) située en amino-terminale et une chaîne légère (chaîne B).

Chaîne lourde :

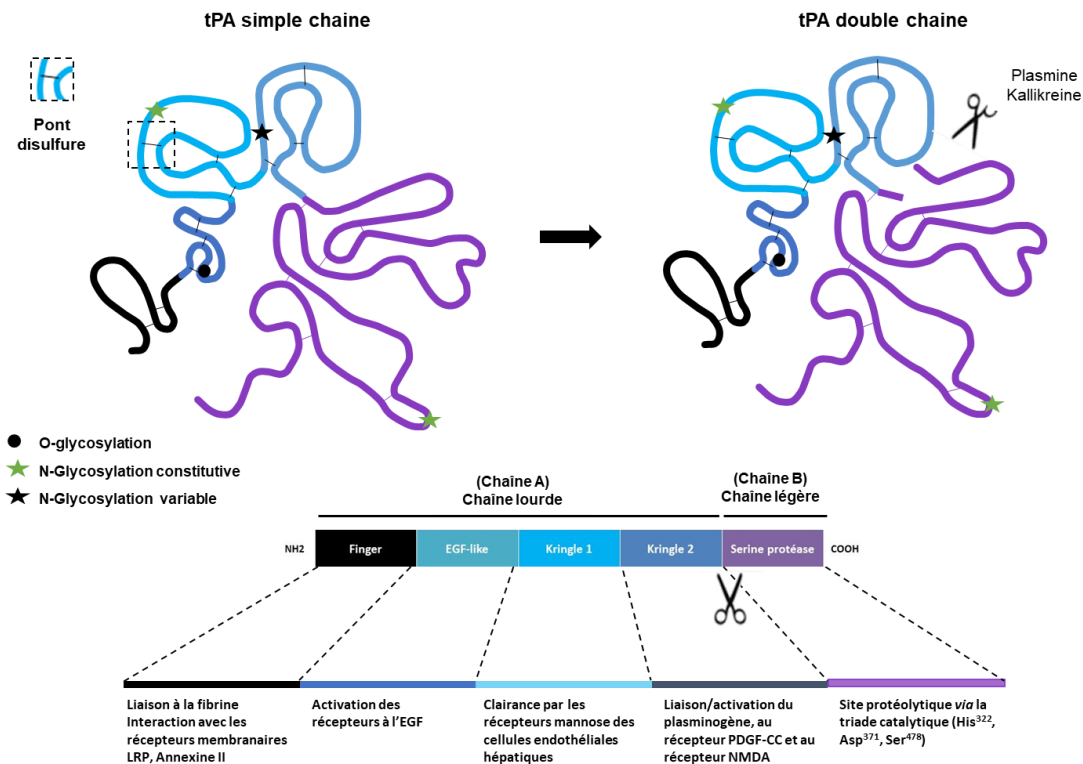
- ❖ Le domaine **Finger** est appelé ainsi par analogie au premier domaine Finger de la fibronectine. Il permet la fixation du tPA à la fibrine conduisant à la formation d'un complexe ternaire avec le plasminogène (Kagitani *et al.* 1985). Par ce domaine, le tPA se lie également à des récepteurs membranaires, notamment avec les récepteurs aux lipoprotéines de faible densité (*Low Density Lipoprotein Receptor-related Protein*, LRP) (Bu *et al.* 1992) et l'annexine II (Hajjar and Reynolds 1994).

- ❖ Le domaine **EGF** présente une forte homologie avec le facteur de croissance épidermique (*epidermal growth factor*, EGF). Il peut par ce domaine 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 hépatocytes (Hajjar and Reynolds 1994).

- ❖ Le domaine **Kringle 1** se caractérise par la présence d'un site actif ayant une forte affinité pour la lysine (*Lysine Binding Site*, LBS) et possède deux sites aminés aromatiques (Tryptophane<sup>242</sup> et Tryptophane<sup>253</sup>) formant une poche dans la structure tertiaire du tPA. Le rôle exact du Kringle 1 est mal connu compte tenu de la non-fonctionnalité du site LBS. Ce domaine serait impliqué dans la recapture et la clairance du tPA par les cellules endothéliales hépatiques *via* le récepteur au mannose grâce à la glycosylation de l'Asn<sup>117</sup> (Kuiper *et al.* 1996). Il aurait également un rôle dans l'inhibition de la prolifération des cellules endothéliales (Kim *et al.* 2003).

- ❖ Le domaine **Kringle 2** dispose quant à lui un site de liaison à la lysine fonctionnel lui permettant de se lier et d'activer des 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) (Fredriksson *et al.* 2004; Lopez-Atalaya *et al.* 2008). Ce domaine peut également se fixer à la fibrine mais avec une affinité plus faible que le domaine Finger.

La chaîne légère ne possède qu'un seul domaine : le domaine catalytique. Ce dernier permet de convertir le plasminogène en plasmine grâce à la présence d'une triade catalytique actif contenant les acides aminés Histidine<sup>322</sup>, Aspartate<sup>371</sup> et Sérine<sup>478</sup> (**Figure 5**).



**Figure 5 : Structure et fonction du tPA.**

Le tPA est synthétisé sous une forme simple chaîne (sc-tPA) et peut être clivé sous une forme double chaîne (tc-tPA). Le tPA est constitué de 5 domaines répartis sur une chaîne lourde et une chaîne légère, 3 sites de glycosylations et 17 ponts disulfures. Adaptée d'après Hébert *et al.*, 2016.

Cette sérine protéase existe sous deux formes actives distinctes : une forme native, simple chaîne (*single chain tPA* ou sc-tPA) et une forme double chaîne (*two chain tPA* ou tc-tPA) (Rijken and Collen 1981). La conversion du sc-tPA en tc-tPA s'effectue par l'hydrolyse de la liaison peptidique reliant l'Arginine<sup>275</sup> à l'Isoleucine<sup>276</sup>, les deux parties de la protéine restant reliées l'une à l'autre par un pont disulfure établi entre les deux cystéines appartenant à chacune des deux chaînes (Lamba *et al.* 1996). Cette hydrolyse s'effectue par l'action d'autres protéases comme la plasmine (Wallén *et al.* 1982) ou les kallikréines (Ichinose *et al.* 1984).

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 elle est active sous ses deux formes (Hoylaerts *et al.* 1982). En présence de fibrine, les deux formes ont la même activité fibrinolytique (Thelwell and Longstaff 2007). Néanmoins, en absence de fibrine, le tc-tPA possède une activité cinq fois supérieure à celle du sc-tPA (Wallén *et al.* 1982; Petersen *et al.* 1988). D'autre part, le rôle différentiel de ces deux formes de tPA sera évoqué dans une prochaine partie.

### III. Expression du tPA

#### 1. Expression périphérique du tPA

Comme cela a été énoncé dans l'historique, le tPA a été identifié en premier lieu dans la circulation sanguine (Binder *et al.* 1979). Depuis, la présence d'une activité de tPA a été observée dans de nombreux organes tels que les reins, les poumons, le cœur, la prostate ainsi que l'utérus, organe à partir duquel il a été purifié dans les années 80 (Albrechtsen 1957; Rouf *et al.* 1996). Son expression est souvent associée à un remodelage tissulaire et vasculaire, comme lors de la mise en place de l'endomètre (Lockwood and Schatz 1996).

#### 2. Expression du tPA dans la circulation

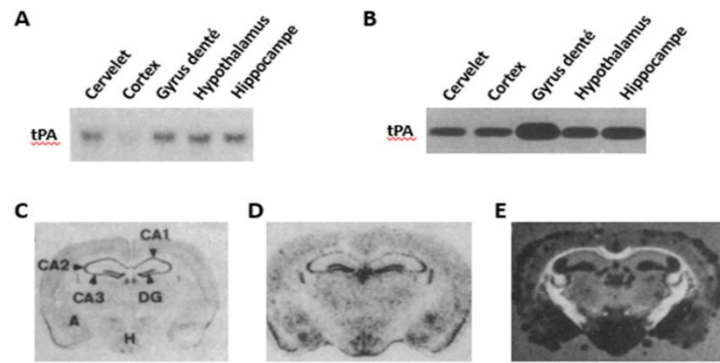
Dans le compartiment plasmatique, il est principalement synthétisé et libéré par les cellules endothéliales sous sa forme simple chaîne et circule à une concentration d'environ 70pM (Levin and Loskutoff 1982; Angles-Cano *et al.* 1985). Le tPA est retrouvé en grande partie dans les micro-vaisseaux (<100µm de diamètre) (Levin and del Zoppo 1994; Levin *et al.* 1997). Sa localisation précise au sein des cellules endothéliales n'est pas encore bien définie, mais des études ont montré que le tPA semble être stocké au sein des corps Weibel-Palade, siège connu pour contenir le facteur de von Willebrand (*von Willebrand Factor*, VWF) (Huber *et al.* 2002).

La libération du tPA par les cellules endothéliales peut se faire de deux façons : de manière constitutive ou en réponse à un stimulus spécifique. Cette sécrétion de tPA peut être stimulée par des facteurs de la cascade de la coagulation ou par l'hypoxie (Diamond *et al.* 1989; Emeis *et al.* 1997). Ce mécanisme physiologique est important notamment pour empêcher la formation d'un thrombus occlusif (Österlund *et al.* 2002).

#### 3. Expression régionale du tPA dans le système nerveux central

L'expression du tPA au sein du SNC est mise en évidence pour la première fois en 1981. Soreq et Miskin détectent du tPA chez les rongeurs, au niveau de l'endothélium vasculaire tapissant les vaisseaux cérébraux mais aussi dans des neurones (Soreq and Miskin 1983). Puis, en 1993, Sappino et collaborateurs caractérisent l'expression du tPA chez le rongeur et chez l'Homme, au cours du développement et à l'âge l'adulte.

Chez la souris adulte, ils rapportent que le tPA est présent au sein du cervelet, de l'hippocampe, du cortex et du striatum (Figure 6, Sappino *et al.*, 1993). De façon intéressante, le niveau de synthèse des ARNm 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 enzymatique n'est détectée dans la région CA1 (Come d'Ammon 1). Les auteurs suggèrent alors la présence d'inhibiteurs de l'activité protéolytique du tPA dans ces structures cérébrales.



**Figure 6 : Localisation du tPA dans le SNC.**

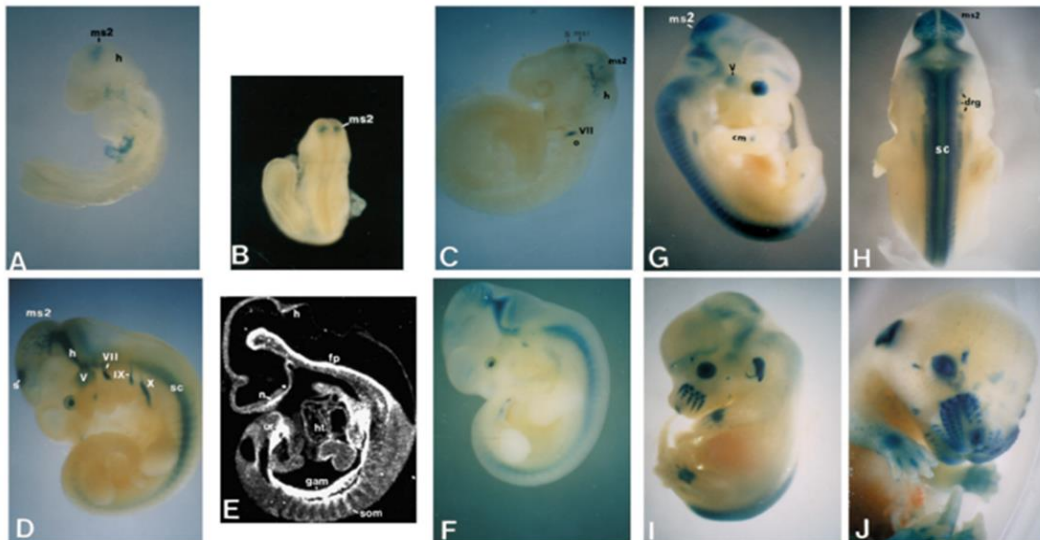
(A) Localisation des ARNm du tPA par northern blot dans différentes régions cérébrales chez la souris. (B) Activité protéolytique du tPA, détectée par zymographie *in situ*. (C) Coupe coronale d'un cerveau de souris coloré au crésyl violet. (D) Coupe coronale représentant l'ARNm du tPA détecté par hybridation *in situ*. (E) Activité protéolytique du tPA détectée par zymographie *in situ*, apparaît dans les zones noircies par la lyse du substrat dans l'hippocampe, l'hypothalamus, l'amygdale et les tissus méningés. (A : amygdale, H : hypothalamus ; DG : gyrus denté ; CA (1-2-3) : Come d'Ammon). Adaptée de Sappino *et al.*, 1993.

Chez l'embryon de souris, les quantités d'ARNm codant le tPA dans différentes régions (prosencephale, mésencéphale et rhombencéphale) varient au cours du développement. Par exemple, dans le cervelet l'expression des ARNm du tPA est faible pendant les 17 premiers jours de gestation (E17), puis un pic est observé durant la première semaine après la naissance (P1 à P7), pour revenir à des niveaux d'expression normale à l'âge l'adulte (Figure 7; Friedman & Seeds, 1995)

Chez l'Homme, Teesalu et collaborateurs ont détecté par une technique d'hybridation *in situ*, des ARNm du tPA dans les régions cérébrales citées précédemment mais également dans de nombreuses autres 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 dans ces régions (Louessard *et al.* 2016).



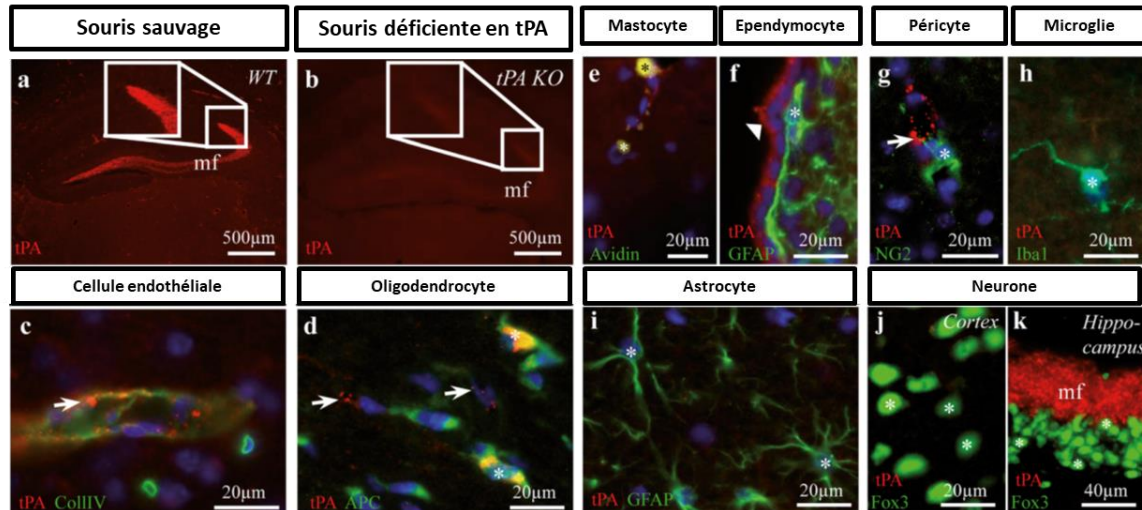


**Figure 7 : Expression spatio-temporelle du tPA chez des embryons de souris.**

Cette étude a été réalisée en utilisant des embryons de souris transgéniques sur lesquels le promoteur du tPA a été fusionné à la séquence bactérienne du gène de la  $\beta$ -galactosidase. L'expression de la  $\beta$ -galactosidase (en bleu) devient le rapporteur de l'expression du tPA. **(A)** Vue latérale, **(B)** vue dorsale d'embryons à 8,75 jours de vie embryonnaire (E8,75). A ce stade, la seule région exprimant du tPA est le mésencéphale, au niveau des neuromères (ms2). **(C)** Vue latérale à E9 avec une zone marquée au niveau du mésencéphale, du rhombencéphale (h) et des nerfs crâniens. **(D)** vue latérale, **(E)** section sagittale à E10,5 montrant l'expression des ARNm du tPA et aussi à **(F)** E11,5, **(G)** E12,5, **(H)** vue dorsale à E12,5, **(I)** vue latérale à E13,5, **(J)** vue frontale d'un embryon à E15,5. A ces différents stades, le tPA est exprimé au niveau du prosencéphale, du mésencéphale, du rhombencéphale, de la moelle épinière et des nerfs crâniens. h : rhombencéphale ; ms2 : neuromères du mésencéphale ; sc : moelle épinière ; s : prosencéphale ; V, VII, IX, X : crêtes neurales des nerfs trijumeaux (V), faciaux (VII), glossopharyngiens (IX) et vagues (X). D'après *Carroll et al., 1994*.

#### 4. Expression cellulaire du tPA dans le système nerveux central

A l'échelle cellulaire, le tPA est exprimé par la majorité des types cellulaires du SNC. En effet, la présence du tPA est observée au sein des neurones (*Salles and Strickland 2002*), des astrocytes (*Toshniwal et al. 1987*), des oligodendrocytes (*Correa et al. 2011*), et de la microglie (*Siao et al. 2003*). A ces différents types cellulaires s'ajoutent les mastocytes (*Sillaber et al. 1999*), les péricytes (*Yamamoto et al. 2005*), et les épendymocytes (**Figure 8**; *Ware et al., 1995*).



**Figure 8 : Expression du tPA par les différents types cellulaires du SNC chez la souris adulte.**

Immunohistochimie sur coupe de cerveau de souris après injection de colchicine (inhibiteur du transport neuronal). En rouge, il s'agit de l'immunomarquage positif du tPA présent au sein des fibres moussues de l'hippocampe chez des souris tPA Wt (**a**) et absent chez des souris déficientes en tPA (**b**). Le double marquage montre une expression du tPA au niveau des mastocytes, des épendymocytes, des péricytes, de la microglie, des cellules endothéliales, des oligodendrocytes, des astrocytes et des neurones. Adaptée de [Louessard et al., 2016](#).

❖ Les neurones : le tPA est synthétisé et localisé dans les dendrites et les synapses ([Shin et al. 2004](#)). Le tPA n'est pas sécrété de manière constitutive mais continu dans des vésicules à cœurs denses au niveau des épines dendritiques ([Parmer et al. 1997](#)). Une dépolarisation neuronale conduit à sa libération par un mécanisme d'exocytose dépendant du  $Ca^{2+}$  ([Pittman 1985](#)). Par ailleurs, il semble que le tPA ne soit pas exprimé dans tous les neurones. Une caractérisation neurochimique, par une technique d'électrophysiologie et de *single cell* PCR, a permis d'établir que 10% des neurones enregistrés sont caractérisés par la présence d'ARNm du tPA et à la fois des ARNm spécifiques aux neurones glutamatergiques. Plus précisément, la localisation de ces neurones « tPA-ergiques » sont au niveau des couches corticales IV et V/VI du cortex somatosensoriel ([Louessard et al. 2016](#)).

❖ Les astrocytes : une fois libéré dans la fente synaptique par les neurones, le tPA peut être recapturé par les astrocytes *via* les récepteurs LRP ([Cassé et al. 2012](#)). Les astrocytes synthétisent et libèrent du tPA précédemment capturé afin de réguler la quantité de glutamate présent à la synapse. Ce mécanisme est dépendant de la voie de signalisation de la PKC à la suite de l'activation des récepteurs kainates membranaires ([Cassé et al. 2012](#)). La clairance du tPA au sein du SNC pourrait être expliquée par ce mécanisme astrocytaire. Enfin, [Hultman et collaborateurs](#) ont montré que la libération du tPA a lieu lorsque les astrocytes sont activés, suggérant leur potentielle implication dans des processus pathologiques ([Hultman et al. 2008](#)).

❖ Les oligodendrocytes : l'expression du tPA dans les oligodendrocytes de corps calleux de souris jeunes (1-2 mois) a été mise en évidence par [Correa et collaborateurs](#) en 2011 ([Correa et al. 2011](#)), cependant il est principalement retrouvé dans les oligodendrocytes matures et son expression diminue au cours du vieillissement ([Correa et al., 2011](#)).

❖ La microglie : elle est également capable de synthétiser du tPA (Tsirka *et al.* 1995a; Rogove *et al.* 1999). La libération de ce dernier est impliquée dans l'activation microgliale engendrant alors des processus inflammatoires et des processus de neurodégénération (Siao *et al.* 2003).

## IV. Régulation de l'expression du tPA

### 1. Dans le compartiment vasculaire

Chez l'Homme, la demi-vie du tPA dans la circulation sanguine est de 3 à 6 minutes (Verstraete *et al.* 1985). Cette courte demi-vie s'explique par plusieurs mécanismes dont l'absorption rapide du tPA par le foie. Cette 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.* 1996), les récepteurs LRP (Yepes *et al.* 2003), ainsi qu'une voie dépendante des galectines (Nagaoka *et al.* 2002).

Le second mécanisme est l'inhibition rapide du tPA par l'inhibiteur de l'activateur du plasminogène de type I (PAI-1, *plasminogen activator inhibitor 1*). PAI-1 est considéré comme l'inhibiteur physiologique principal des deux activateurs tissulaires du plasminogène, le tPA et l'uPA (*urokinase plasminogen activator*). PAI-1 est exprimé dans les cellules endothéliales et peut aussi bien inhiber les formes simples chaînes que les formes doubles chaînes du tPA ( $K_i=10^6-10^7 \text{ M}^{-1} \cdot \text{S}^{-1}$ ; (Thelwell and Longstaff 2007). Cette inhibition se décompose en deux étapes; une étape de fixation stable au site catalytique et une étape de fixation aux domaines Kringle 2 et Finger bloquant alors l'interaction entre le tPA et la fibrine (Kaneko *et al.* 1992). De plus, au niveau hépatique les récepteurs au mannose interviennent dans l'élimination du tPA *via* une fixation sur son domaine Kringle 1 (Asn<sup>117</sup>) (Lucore *et al.* 1988; Noorman *et al.* 1998). Les récepteurs LRP ou les récepteurs de la macroglobuline- $\alpha 2$  se lient aussi au tPA *via* le domaine Finger et/ou EGF-*like*. Ces récepteurs reconnaissent le tPA libre mais aussi les complexes tPA-PAI-1 (Orth *et al.* 1992). Enfin, l'étude de Chandler montre que les complexes tPA-PAI-1 sont éliminés plus lentement de la circulation que le tPA libre (Chandler *et al.* 1997).

### 2. Dans le système nerveux central

#### a. La recapture astrocytaire

Parmi les mécanismes d'élimination du tPA cérébral, il a été suggéré que les astrocytes étaient responsables de la clairance du tPA extracellulaire dans le SNC par un processus de recapture (Fernández-Monreal *et al.* 2004). Les astrocytes internalisent le tPA extracellulaire de façon constitutive par un processus d'endocytose dépendant de la dynamine et de la clathrine. Cette endocytose implique l'interaction entre le domaine Finger du tPA et le récepteur d'endocytose LRP1. Ce tPA internalisé va être soit dégradé en transitant *via* les

lysosomes ou soit subir un processus de recyclage. En effet, les astrocytes peuvent libérer le tPA internalisé aux dépens du glutamate. Sur les astrocytes, la présence des récepteurs kaïnates agissent comme des senseurs de la régulation extracellulaire du glutamate et inhibent alors le recyclage du tPA en activant la PKC (Cassé *et al.* 2012).

#### b. Les inhibiteurs du tPA

Déjà mentionné précédemment, Sappino et collaborateurs en 1993 avaient détecté des ARNm du tPA dans l'hippocampe mais aucune activité protéolytique n'avait été retrouvée dans la région CA1, suggérant fortement la présence d'inhibiteurs de l'activité protéolytique dans cette région (Sappino *et al.* 1993). Plus tardivement, ces inhibiteurs ont été identifiés comme des molécules appartenant à la famille des serpinines.

Les serpinines sont des inhibiteurs dits « suicides » ou à usage unique et sont caractérisés par une boucle, appelée boucle du centre réactif (*reactive center loop*, RCL) qui permet la fixation sur les protéases. Elles peuvent être présentes sous une forme dite stable, inhibant l'activité de la protéase ou sous une forme latente, empêchant alors l'interaction (Huntington *et al.* 2000; Silverman *et al.* 2001).

Actuellement, les seules serpinines capables d'inhiber le tPA au niveau du SNC sont : PAI-1, la neuroserpine (NS), et la protéase nexine-1 (Sprengers and Kluft 1987).

Tout comme pour le compartiment vasculaire, la serpine PAI-1 est majoritairement responsable de la régulation du tPA dans le SNC. Les astrocytes sont la source majeure de PAI-1 et son expression astrocytaire a été mise en évidence aussi bien *in vitro* qu'*in vivo* (Presta *et al.* 1990; Buisson *et al.* 1998; Hino *et al.* 2001). Bien que débattu, PAI-1 est aussi exprimé au niveau neuronal (Hino *et al.* 2001). En conditions physiologiques, PAI-1 est exprimé à de très faibles concentrations dans les neurones et les astrocytes mais est surexprimé dans les astrocytes en conditions pathologiques. En effet, dans le cadre de modèles murins d'AVC, la production/libération accrue de PAI-1 tendrait à réduire la mort neuronale de type excitotoxique (Docagne *et al.* 1999).

Le second inhibiteur majeur du tPA dans le cerveau est la neuroserpine (NS). Contrairement à PAI-1, en conditions physiologiques celle-ci est présente en grande quantité, et est exprimée majoritairement par les neurones, bien que les astrocytes puissent aussi l'exprimer (Osterwalder *et al.* 1996; Docagne *et al.* 1999). 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). Le mécanisme d'inhibition de la NS n'est pas conventionnel puisque contrairement à PAI-1 qui forme des complexes très stables avec leur cible (demi-vie de plusieurs semaines), la demi-vie des complexes impliquant la NS est d'une dizaine de minutes (Ricagno *et al.* 2009). Après la formation du complexe NS/tPA, le tPA peut hydrolyser la boucle réactive (RCL) de la NS empêchant le complexe de se stabiliser et libérant alors le tPA qui retrouve son activité (Carlson *et al.* 2016).

La NS inhibe préférentiellement le tc-tPA contrairement à PAI-1 qui inhibe indifféremment les deux formes de tPA (Barker-Carlson *et al.* 2002). Ces études menées *in vitro*, montrent que la cinétique de formation des complexes tc-tPA/NS est plus rapide que celle des complexes sc-tPA-NS. Cependant, ces complexes sc-tPA/NS sont plus stables dans le temps (Hastings *et al.* 1997). A noter que la NS est très peu présente dans le compartiment sanguin, rendant son implication sur le tPA vasculaire négligeable. Ainsi, la NS peut être défini comme un inhibiteur transitoire de l'activité enzymatique de cette protéase.

La nexine-1 aussi nommée SERPINE2, est capable d'inhiber à la fois les activateurs du plasminogène (uPA et tPA) et la plasmine (Scott *et al.* 1985). Dans le parenchyme cérébral, cette serpine est exprimée par les cellules gliales et les neurones (Gloor *et al.* 1986) 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 (Junge *et al.* 2004).

## V. Les fonctions du tPA

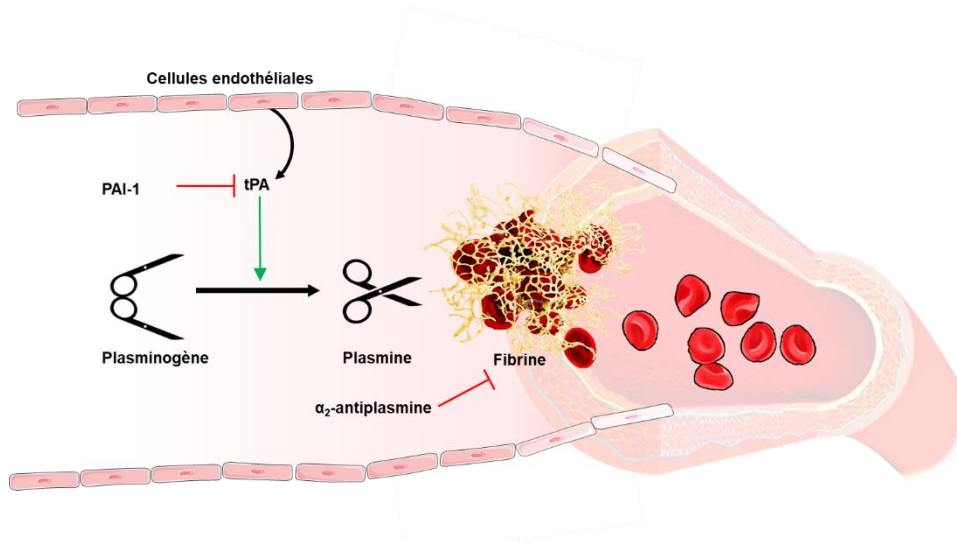
### 1. Les fonctions du tPA vasculaire

#### a. La fibrinolyse

Un mécanisme physiologique de l'hémostase, présent dans la circulation sanguine, permet d'empêcher l'installation mais surtout l'extension du caillot en détruisant les polymères de fibrine, il s'agit de la fibrinolyse. Ce processus clôtur la coagulation sanguine afin de reperméabiliser les vaisseaux sanguins réparés et d'éviter la formation de thromboses (Gebbink 2011).

L'enzyme clef de ce processus est la plasmine, qui est directement capable d'hydrolyser les chaînes de fibrine en fragments. La plasmine est une sérine protéase sécrétée par le foie sous la forme d'une pro-enzyme inactive : le plasminogène (Collen and Lijnen 1991). Une fois générée par le clivage protéolytique du plasminogène, la plasmine est rapidement inhibée par des serpines présentes en quantités importantes dans le plasma : l' $\alpha$ 2-antiplasmine, l' $\alpha$ 2-macroglobuline et nexine-1.

Ceci explique que l'injection intraveineuse de plasmine qui avait été initialement envisagée pour induire la thrombolyse n'est pas fonctionnée, car la plasmine injectée est directement neutralisée par ses inhibiteurs. De ce fait, les fibrinolytiques qui sont ou ont été utilisés reposent sur le même principe : activer le plasminogène en plasmine (Zorio *et al.* 2008).



**Figure 9 : Mécanisme de la fibrinolyse endogène.**

Le tPA est sécrété par les cellules endothéliales, et est ensuite libéré dans la circulation sanguine. Le tPA clive le plasminogène circulant en plasmine à proximité du caillot de fibrine. La plasmine peut alors dégrader la fibrine et ainsi lyser les caillots. La régulation de la fibrinolyse se fait grâce à l'inhibiteur de la plasmine ( $\alpha_2$ -antiplasmine) et PAI-1 (inhibiteur du tPA).

Physiologiquement chez l'Homme, il existe deux activateurs du plasminogène : le tPA (synthétisé principalement par les cellules endothéliales) et l'urokinase (uPA, initialement identifié dans l'urine où il est sécrété). *In fine*, leur action est identique mais chacune présente des caractéristiques différentes. En l'absence de cofacteurs, le tPA est un mauvais activateur du plasminogène mais en présence de fibrine, son activité est multipliée par 100 (Hoylaerts *et al.* 1982). En effet, la fibrine contient deux sites proches : l'un permettant la liaison avec le tPA via son domaine Finger et Kringle 2, l'autre site pouvant fixer un ou plusieurs domaines Kringle du plasminogène. Ces trois partenaires forment ainsi un complexe ternaire au sein duquel la capacité du tPA à cliver son ligand est nettement augmentée. Ce complexe permet d'activer le plasminogène spécifiquement au niveau du thrombus, en épargnant celui circulant. Par ce mécanisme, la plasmine est partiellement protégée de ses inhibiteurs et peut induire la fibrinolyse efficacement (Figure 9; Zorio *et al.*, 2008). De plus, la plasmine peut à son tour activer la forme simple chaîne du tPA en une forme double chaîne et comme décrit précédemment les deux formes ont une activité comparable en présence de fibrine (Rijken *et al.* 1982).

Par ailleurs, l'autre activateur du plasminogène, l'uPA possède une affinité moindre pour la fibrine par rapport au tPA. Des formes recombinantes d'activateurs du plasminogène (natives ou modifiées) ont été développées pour dissoudre les caillots et avoir une spécificité plus importante avec la fibrine que celle que possède le tPA.

Il s'agit notamment de la ténecteplase et de la rétéplase, qui ont été utilisées chez des patients atteints de maladies thromboemboliques telles que les infarctus du myocarde ou les AVC ischémiques (Thiebaut *et al.* 2018). Toutefois, à l'heure actuelle seule l'utilisation du tPA est approuvée pour le traitement des AVC ischémiques en phase aiguë (NINDS, 1995).

*b. Le tPA et la barrière hémato-encéphalique*

La barrière hémato-encéphalique (BHE) est une barrière physiologique sélective qui sert de filtre entre le compartiment sanguin et le parenchyme cérébral. La BHE se compose des cellules endothéliales cérébrales, des péricytes, de la glie et des neurones, participe au maintien de l'homéostasie cérébrale. Dans un contexte pathologique comme l'AVC ischémique, l'intégrité de la BHE est altérée, pouvant conduire à sa rupture de la BHE. La perméabilité de la BHE est en partie attribuée aux métalloprotéinases matricielles (MMPs), responsables de la dégradation des jonctions serrées et de la lame basale (Yang *et al.* 2007).

En conditions pathologiques, le tPA est un acteur qui modifie l'intégrité de la BHE. Le tPA en s'associant avec les récepteurs LRP situés sur les astrocytes périvasculaires induit une augmentation de la perméabilité de la BHE. Cette interaction provoque une rétraction des pieds astrocytaires de la lame basale et s'ensuit une ouverture de la BHE (Yepes *et al.* 2003; Polavarapu *et al.* 2007). Plus précisément, l'utilisation d'un antagoniste bloquant le récepteur LRP1 empêche l'extravasation du Bleu Evans dans le parenchyme cérébral, traduisant une BHE intacte et montrant que ce mécanisme est dépendant des récepteurs LRP1 (Yepes *et al.* 2003).

Les MMPs contribuent au remodelage tissulaire par la dégradation des protéines de la matrice extracellulaire et participent à l'ouverture de la BHE. Le tPA est capable d'activer les MMP-2,3 et 9, qui fragilisent les jonctions serrées, altèrent la lame basale et favorisent alors l'ouverture de la BHE (Lijnen 2001; Suzuki *et al.* 2009). De plus, sur des modèles d'ischémies cérébrales chez le rat, l'injection intraveineuse de tPA associée à un inhibiteur à large spectre des MMPs (le BB-94) réduit significativement l'incidence de transformation hémorragique (Sumii and Lo 2002). D'ailleurs, des études cliniques ont montré que chez l'Homme le taux de MMP-9 sanguin est corrélé au risque de transformation hémorragique après thrombolyse (Montaner *et al.* 2001).

Un second mécanisme d'ouverture de BHE implique l'interaction du tPA *via* son domaine Kringle 2 et son domaine catalytique avec le facteur de croissance PDGF-CC (*platelet derived growth factor*). Le tPA est capable de cliver le PDGF-CC qui devient actif et se fixe sur le récepteur PDGFR- $\alpha$  situé sur les péricytes et les astrocytes, conduisant à une ouverture de la BHE (Fredriksson *et al.* 2004; Su *et al.* 2008). Pour compléter, la co-injection de Gleevec® (Imatinib, un inhibiteur du récepteur PDGF) et de tPA réduit les risques de transformation hémorragique du tPA (Wahlgren *et al.* 2017).

## 2. La thrombolyse pharmacologique du tPA dans l'infarctus cérébral

### *a. Son principe*

Le déficit neurologique à la suite d'un AVC survient bien souvent sans symptômes avant-coureur (mais peut être précédé d'accidents vasculaires transitoires (AIT)), et ce déficit peut être directement maximal ou connaître une aggravation rapide (défaillance des collatérales artérielles, sténose artérielle pré-occlusive). Le patient va alors connaître une amélioration avec régression progressive de ses déficits ou une aggravation directe des déficits du tableau neurologique (accompagnée parfois de défaillance extra-neurologiques). Il existe un lien entre le déficit neurologique objectivé lors de l'examen clinique et le territoire cérébral en cause (corrélation anatomo-clinique). Les symptômes d'un AVC sont nombreux : perte de conscience, perte d'équilibre, engourdissement et affaiblissement d'une partie du visage, d'un bras, d'une jambe ou d'une partie du corps, difficulté à s'exprimer ou à comprendre...

Après les premiers symptômes d'un AVC, le patient est pris en charge aux urgences où la suspicion d'AVC va être confirmée ou non. Pour cela, l'imagerie par résonance magnétique (IRM) et la tomodensitométrie sont des outils de diagnostics, considérés comme les méthodes de référence en neuro-imagerie multimodale d'urgence (Smith and Rowland Hill 2018). L'IRM est l'examen le plus performant pour montrer précocement les signes d'ischémie récente et le protocole d'urgence convient d'utiliser des séquences courtes comme la diffusion, le FLAIR ou l'écho de gradient. L'imagerie permet d'identifier les patients susceptibles de bénéficier de la thrombolyse intraveineuse et/ou d'une seconde technique, la thrombectomie mécanique, tout en excluant les patients dont la forme d'atteinte n'est pas ischémique.

La thrombolyse pharmacologique consiste à lyser (désagréger) le thrombus/embolie qui obstrue les vaisseaux sanguins pour permettre une reperfusion. Ce traitement permet de reproduire artificiellement le phénomène physiologique de la fibrinolyse. Il s'agit d'injecter par voie intraveineuse du tPA sous forme recombinante (Actilyse®), pouvant être accompagné d'un traitement anticoagulant ou antiagrégant plaquettaire.

L'injection de tPA induit le clivage du plasminogène en plasmine, une enzyme endogène capable de dégrader la fibrine qui est le constituant majeur du caillot. Le plasminogène produit par le foie (principalement), une fois activé en plasmine est rapidement inhibée par des serpins présentes en grandes quantités dans le plasma : l' $\alpha$ 2-antiplasmine, l' $\alpha$ 2-macroglobuline et la nexin-1. Ainsi, les stratégies fibrinolytiques se sont basées sur l'activation du plasminogène en plasmine au contact du thrombus.





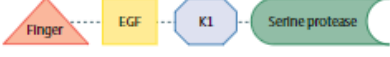

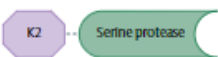
*b. Les essais cliniques*

Les tout premiers essais cliniques se sont focalisés à utiliser le tPA comme traitement lors d'infarctus du myocarde (Wilcox *et al.* 1988). En 1958, Sussman et Fitch ont montré l'efficacité de la plasmine pour désobstruer une artère carotide interne (Sussman and Fitch 1959). De nombreux agents thrombolytiques ont été testés parmi lesquels on peut citer : 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 le desmotéplase (protéine issue de la salive de chauves-souris vampires capable d'activer le plasminogène) (Figure 10).

En 1995, l'étude de la *National Institute of Neurological Disorders and Stroke* (NINDS 1995) a permis de montrer l'effet bénéfique de la thrombolyse par l'injection intraveineuse de tPA recombinant. L'étude comptait 333 patients qui reçurent soit un placebo soit le tPA recombinant à la dose encore utilisée actuellement de 0,9 mg/kg (ajustée au poids, 10% en bolus et 90% en infusion pendant 1 heure). Le traitement pouvait être administré dans les 3 heures après le début des symptômes, et le déficit des patients étaient réduit d'environ 11 à 13%. Toutefois, le tPA augmentait significativement le risque hémorragique cérébrale symptomatique de 6,4% chez les patients traités versus 0,6% chez les patients ayant reçu le placebo, sans pour autant modifier la mortalité à 3 mois (NINDS 1995). C'est à la suite de cet essai clinique que le tPA a été autorisé comme traitement de la phase aiguë lors d'AVC ischémiques dans la plupart des pays et dans les 3 heures après le début des symptômes. Cependant, son utilisation était limitée à certains critères dépendant de la sévérité de l'AVC, de paramètres biologiques (glycémie, pression artérielle) et de l'âge du patient (inférieur 80 ans).

En 2008, l'étude *European Cooperative Acute Stroke Study* (ECASS) III a permis d'étendre la fenêtre thérapeutique à 4h30 au lieu des 3 heures après le début des symptômes (Hacke *et al.* 2004). L'étude IST-3 démontre que les patients traités jusqu'à 6 heures après l'apparition des symptômes ont un effet bénéfique à 6 mois mais au prix d'une augmentation de la mortalité au 7<sup>ème</sup> jour après le traitement (IST-3 2012). Enfin, en 2019, l'essai clinique EXTEND a suggéré que l'utilisation du tPA seul pouvait être étendue jusqu'à 9 heures après le début de l'AVC ischémique (Campbell *et al.* 2019). Cependant, cette fenêtre thérapeutique reste à l'heure actuelle de 4h30.

**A**

Plasminogen activator	Structure	Inhibitors	Route of administration	Half-life	FS*	SC†	TC‡
<b>Eukaryotic forms</b>							
TPA		PAI-1, PAI-2, protease Nexin-1, lysine analogues (TXA, EACA), C1-inhibitor	Bolus and infusion	3-4 min	++	+	+
uPA		PAI-1, PAI-2, amiloride, lysine analogues, C1-inhibitor	Bolus and infusion	7-20 min	-	+	+
Desmoteplase		Lysine analogues	Single bolus	4 hours	+++	-	+
<b>Recombinant forms</b>							
Tenecteplase		PAI-1, PAI-2, lysine analogues	Single bolus	20-24 min	+++	-	+
Retepase		Lysine analogues	Double bolus	14-18 min	+	-	+

**Figure 10 : Les différents activateurs du plasminogène.**

Les activateurs du plasminogène sont classés selon leur forme eucaryote ou recombinante. Ils possèdent divers domaines de structures, d'inhibiteurs, de voies d'administrations et de temps de demi-vie. Ces activateurs peuvent être présents sous forme simple chaîne (SC), double chaîne (TC), avec une affinité plus ou moins importante avec la fibrine (FS).

K : domaine Kringle. TXA : acide tranexamique. EACA : acide  $\epsilon$ -aminocaproïque. (-) : pas d'affinité pour la fibrine. (+) affinité faible. (++) affinité modérée. (+++) affinité forte. D'après Thiebaut *et al.*, 2018.

### c. Les limites de la thrombolyse pharmacologique

Le traitement des AVC ischémiques par le tPA présente néanmoins certaines limites. En effet, le taux de recanalisation après traitement est globalement assez faible. Selon une revue du Calgary Stroke Program, incluant 1341 patients, le taux de recanalisation aiguë dans les 2 heures suivant l'administration du tPA est de moins de 35% (Bhatia *et al.* 2010). Ce faible taux dépend du délai d'administration, de la circulation des collatérales, de la localisation (distale ou proximale) du thrombus, de sa nature et de sa taille (s'il est supérieur à 8mm alors il a 3% de chance d'être lysé) (Riedel *et al.* 2011). Une des stratégies consiste à améliorer l'efficacité du tPA en réduisant l'action de ces inhibiteurs. Cela a conduit au développement du ténecteplase, un tPA recombinant muté qui a une demi-vie plus élevée et une meilleure résistance pour son inhibiteur PAI-I (Figure 10). L'étude de Campbell montre un meilleur taux de reperfusion chez les patients traités avec du ténecteplase comparé au tPA (22% versus 10%) alors que dans une autre étude, il n'y a pas de différence en terme d'efficacité, de mortalité et de récupération fonctionnelle entre les deux groupes traités (Logallo *et al.* 2017; Campbell *et al.* 2018).

L'utilisation du tPA augmente le risque d'hémorragie parenchymateux symptomatique (NINDS 1995). L'étude Wardlaw en 2001 a révélé que le risque d'hémorragies cérébrales était 4 fois plus élevé chez des patients traités avec du tPA, urokinase, streptokinase ou desmotéplase par rapport aux patients n'ayant reçu aucun traitement (Wardlaw 2001).

Certaines études ont cherché à diminuer le risque d'hémorragie induit par le tPA. Comme il a été décrit précédemment, le tPA peut déstabiliser et augmenter la perméabilité de la BHE et le risque d'hémorragie (Su *et al.*, 2008). Il a été montré que la prévalence de la transformation hémorragique dépend de la dose de tPA administrée. Une dose faible (0.6mg/kg) induit 1% de transformation hémorragique alors qu'une dose standard (0.9mg/kg) en entraîne 2,1% (Anderson *et al.* 2016). L'étude TARGET-STROKE montre qu'une réduction du délai d'administration du tPA réduit la prévalence de transformation hémorragique (Fonarow *et al.* 2014).

De plus, la composition des thrombi varie et contient pas seulement de la fibrine, ce qui peut expliquer l'inefficacité de la thrombolyse dans certains cas. En effet, les thrombi peuvent aussi être riches en plaquettes, ce qui a permis le développement de stratégies ciblant spécifiquement les protéines des agrégats plaquettaires (Le Behot *et al.* 2014). Parmi ces protéines, des stratégies thérapeutiques se sont focalisées sur ADAMTS-13 (a *desintegrin and metalloproteinase with thrombospondin motifs*) (Denorme *et al.* 2016) et le facteur de VWF en utilisant notamment la N-acétylcystéine pour cliver le VWF (Martinez de Lizarrondo *et al.* 2017).

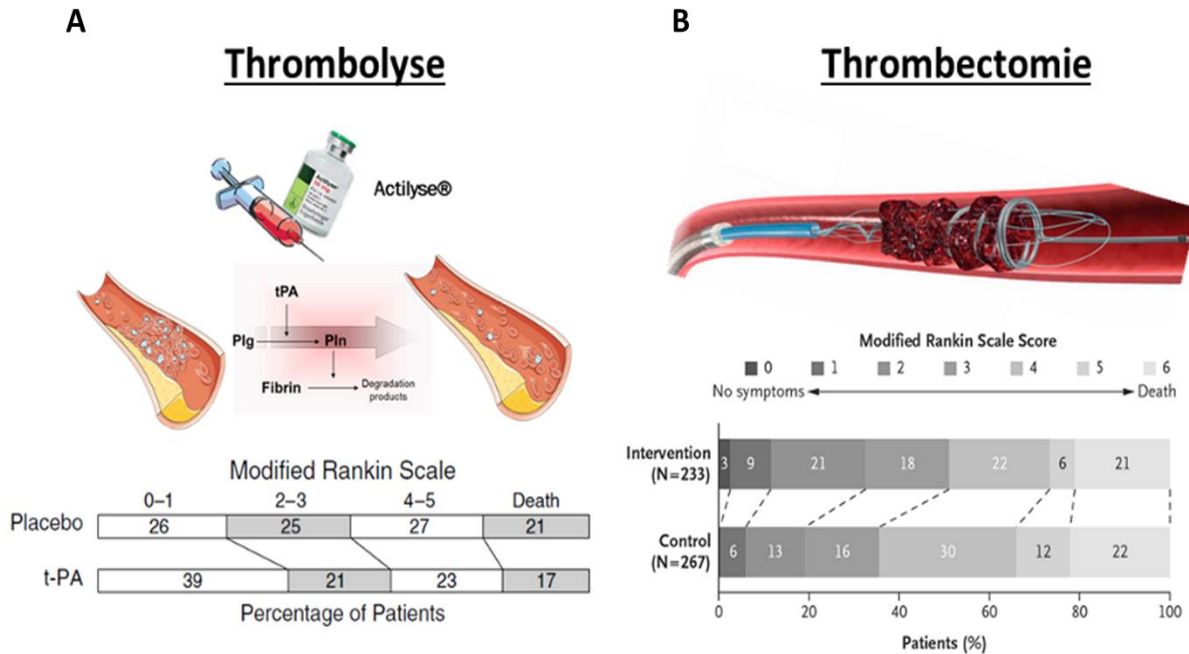
Enfin, une stratégie couplant la thrombolyse intraveineuse et la thrombectomie est utilisée à ce jour.

#### d. La thrombectomie

La thrombectomie est une technique endovasculaire qui consiste à retirer mécaniquement le thrombus. Sous contrôle radiologique, il est introduit un filament au bout duquel est fixé un stent (ressort métallique) qui remonte de l'artère fémorale jusqu'au vaisseau cérébral obstrué. Au moment du retrait, le stent s'ouvre et permet la capture du caillot pour qu'il soit ensuite retiré afin de permettre la recanalisation.

L'essai clinique de MR CLEAN en 2015 a montré un effet bénéfique de la thrombectomie seule ou précédée d'un traitement au tPA, modifiant alors la prise en charge des AVC ischémiques. Elle améliore l'efficacité du traitement au tPA qui peut alors être injecté jusqu'à 6 heures après le début des symptômes, avec une meilleure évolution neurologique que le traitement pharmacologique seul (Berkhemer *et al.* 2015). Une récente méta-analyse a confirmé que le double traitement réduisait la mortalité, permettait une meilleure recanalisation et récupération fonctionnelle en comparant au traitement tPA seul (Mistry *et al.* 2017). La thrombectomie est réalisée chez des patients dont l'occlusion est localisée dans une grosse artère de la circulation antérieure et selon les critères d'éligibilité utilisés, entre 3 et 22% des patients sont admissibles pour ce traitement endovasculaire (Figure 11; Rai *et al.*, 2017; Mokin *et al.*, 2019).

Pour conclure, la stratégie endovasculaire est devenu le traitement de référence depuis 2016 et le nombre de patients en bénéficiant a été multiplié par presque 4 entre 2011 et 2016 en France (1222 à 4589)(Bracard *et al.* 2016). Cependant, son utilisation est limitée à la taille des vaisseaux.



**Figure 11 : Evaluation fonctionnelle par l'échelle de Rankin chez des patients victimes d'AVC ischémique.**

L'échelle de Rankin est une échelle d'évaluation globale du handicap à 6 niveaux avec le 1<sup>er</sup> niveau correspondant à pas de handicap significatif en dehors de symptômes éventuels et le 6<sup>ème</sup> niveau au décès.

(A) La thrombolyse est induite par injection de tPA recombinant (Actilyse®) qui permet de dégrader le caillot sanguin. L'échelle compare l'effet de la thrombolyse induite par le tPA versus le placebo issu de l'étude NINDS. (B) L'échelle compare les patients ayant eu une thrombectomie versus le groupe témoin, issu de l'essai MR CLEAN. Adaptée de NINDS, 1995; Berkhemer *et al.*, 2015.

### 3. Les fonctions physiologiques du tPA dans le système nerveux central

#### a. tPA et développement cérébral

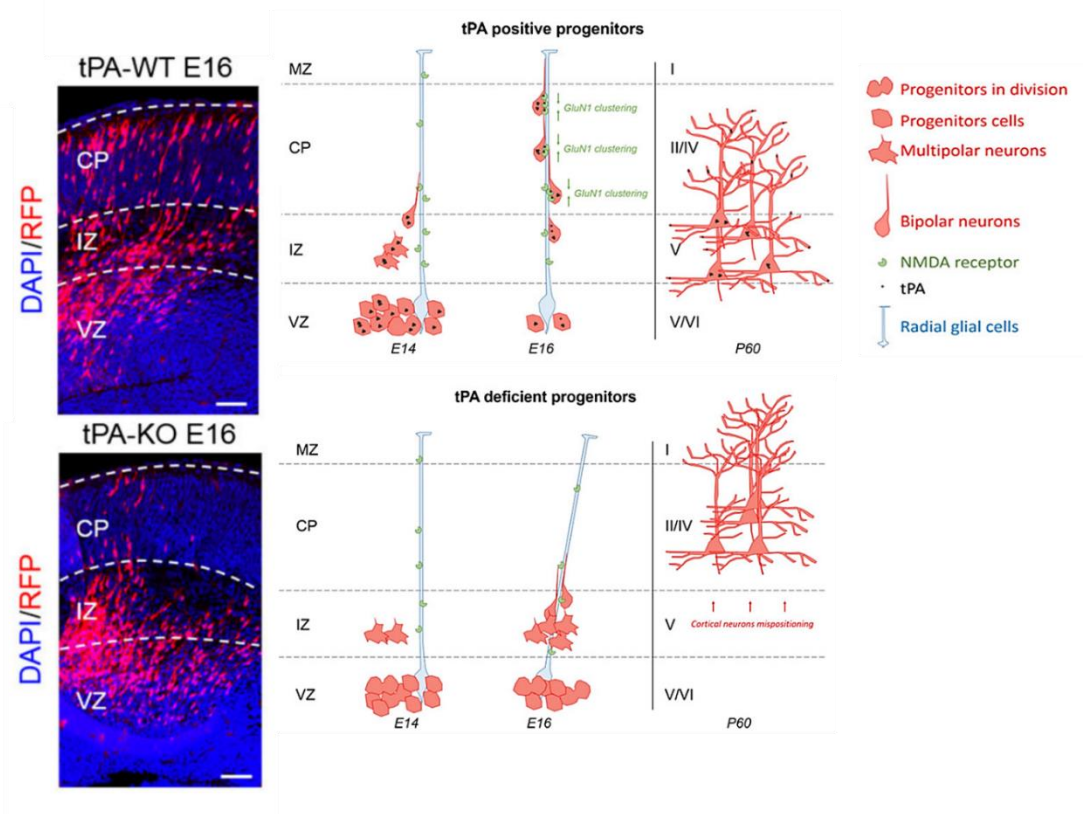
##### i. tPA et migration cellulaire

Au cours du développement cérébral, la migration des neurones immatures jusqu'à leur destination finale est un processus complexe et une étape critique pour la mise en place des circuits neuronaux (Hatten 1999). Ce processus finement régulé s'articule autour d'une étape de prolifération cellulaire, de différenciation et de migration. Si une de ces étapes est dérégulée, cela pourra induire des dysfonctionnements cérébraux (Rakic 1988).

Au niveau du cervelet, la mise en place des cellules granulaires immatures se fait durant les trois premières semaines après la naissance (Komuro and Yacubova 2003; Consalez and Hawkes 2013). Les neurones granulaires vont migrer de la couche granulaire externe vers la couche moléculaire en terminant par la couche granulaire interne.

Les travaux de Krytosek et Seeds ont montré que le tPA peut être sécrété au niveau des prolongements des cellules granulaires du cervelet au cours du développement (Krytosek and Seeds 1981). Dans cette même structure, les niveaux d'ARNm du tPA suivent une évolution parallèle à la migration neuronale avec une valeur élevée à sept jours postnataux et qui redescend lorsque les neurones ont atteint leur emplacement définitif (Friedman and Seeds 1995). L'effet du tPA sur la migration neuronale est mis en lumière par les travaux de Seeds et collaborateurs en 1999. Les souris déficientes en tPA présentent une accumulation de cellules granulaires dans la couche moléculaire du cervelet qui est la conséquence d'une migration neuronale retardée en comparaison à leurs homologues sauvages (Seeds *et al.* 1999). Les auteurs montrent également que l'ARNm du plasminogène est très exprimé dans les différentes couches composant le cervelet au cours du développement. Ils postulent alors que l'effet du tPA sur la migration neuronale cérébelleuse serait dépendante de l'activation de la plasmine et de sa capacité à dégrader la matrice extracellulaire (Seeds *et al.* 1999; Basham and Seeds 2001).

De plus, deux études menées au sein du laboratoire montrent également que le tPA influence la migration cellulaire (Leonetti *et al.* 2017; Pasquet *et al.* 2019). La première étude de Leonetti et collaborateurs montre que le tPA intervient dans la migration des progéniteurs d'oligodendrocytes au cours du développement, *via* un mécanisme dépendant de l'activation des récepteurs à l'EGF (Leonetti *et al.* 2017; Pasquet *et al.* 2019). La seconde étude montre que lors de la corticogenèse, chez des souris déficientes en tPA, il y a un retard de migration des progéniteurs de neurones à E16 qui s'accumulent alors dans la zone intermédiaire. Cet effet dépend de l'activation des récepteurs NMDA présents à la surface des cellules de la glie radiaire (Figure 12 ; Leonetti *et al.*, 2017; Pasquet *et al.*, 2019).



**Figure 12 : Le tPA est un acteur de la corticogenèse.**

A gauche, il s'agit d'images représentatives obtenues par microscopie confocale qui montrent la distribution des cellules neuronales électroporées (marquage RFP en rouge) avec un immunomarquage au DAPI (bleu) sur du cortex de souris tPA WT et tPA KO à E16. Le tPA produit est relâché par des progéniteurs de neurones, promeut la maturation des cellules de la glie radiaire *via* une activation des récepteurs NMDA exprimés à leur surface. L'absence de tPA neuronal affecte la disposition et l'orientation de la glie radiaire, sans impacter la fixation des pieds sur la surface piaie. Un déficit global en tPA ou une délétion conditionnelle du tPA neuronale à E14 conduit à un retard de migration principalement à E16. Ce phénomène induit une stratification altérée des couches corticales II-IV et V chez l'adulte. Adaptée de [Pasquet et al., 2019](#).

#### ii. tPA et pousse neuritique

Lors du développement du SNC, les neurones immatures commencent à établir des connexions entre eux et émettent des prolongements appelés cônes de croissance. L'élongation du cône de croissance, qui formera l'axone du neurone mature, est guidée par l'ensemble des signaux et interactions cellulaires présents au sein de son environnement. Le tPA semble être impliqué dans l'élongation de l'axone et la mise en place de l'arborisation dendritique.

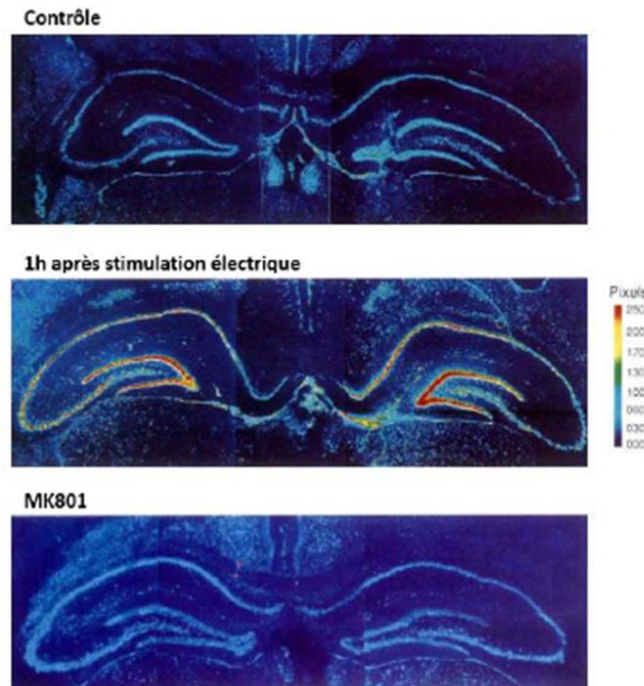
Au niveau du cône de croissance, le tPA est sécrété et active alors le plasminogène en plasmine ainsi que des MMPs. Ces protéases nouvellement formées détruisent localement la matrice extracellulaire, induisant la pousse neuritique ([Pittman et al. 1989](#); [García-Rocha et al. 1994](#)).

Des études ont montré que l'inhibition du tPA ou son absence induit un blocage de la croissance axonale, alors que l'addition de tPA exogène ou sa surexpression augmente la pousse neuritique (Pittman *et al.* 1989; Baranes *et al.* 1998; Lee *et al.* 2007). De plus, des travaux de Lee en 2014 ont montré qu'un traitement au tPA sur des cultures de neurosphères, entraînait une augmentation de la phosphorylation des récepteurs LRP5/LRP6 ainsi qu'une activation de la voie de signalisation Wnt- $\beta$ -caténine, induisant l'extension de neurites (Lee *et al.* 2014). Enfin, Li et collaborateurs ont démontré que le tPA régule le développement et la survie des cellules de Purkinje au niveau du cervelet. Chez un modèle de souris présentant des dégénérescences des neurones de Purkinje, un excès de tPA entraîne une dérégulation de l'épaisseur corticale, un défaut de mise en place des dendrites et une synaptogenèse anormale (Li *et al.* 2013).

#### *b. Le tPA et la plasticité synaptique*

Comme il a été décrit dans le chapitre précédent, la plasticité synaptique est un processus qui peut être régulé par les récepteurs NMDA. Des données de la littérature montrent que le tPA joue également un rôle dans la plasticité synaptique.

L'expression du tPA dans le cerveau adulte est plus localisée qu'au cours du développement, il se concentre dans l'hippocampe, l'amygdale, le cortex et le cervelet (Sappino *et al.*, 1993 ; Teesalu *et al.*, 2004). En 1993, Qian et collaborateurs montrent une augmentation des ARNm du tPA, à la suite d'une activation des neurones hippocampiques (après simulation haute fréquence ou exécution de tâches) (Figure 13; Qian *et al.*, 1993). L'implication de cette protéase dans la plasticité synaptique est renforcée par l'utilisation d'inhibiteurs et de souches de souris transgéniques. L'utilisation d'un inhibiteur du tPA (PAI-1 ou tPA-stop) affecte la mise en place de la LTP alors que l'ajout de tPA potentialise ce processus (Baranes *et al.* 1998). Des souris déficientes en tPA possèdent une diminution de la phase tardive de la LTP sans affecter la phase précoce ce qui se traduit par des déficits d'apprentissage (Frey *et al.* 1996; Pawlak *et al.* 2002). A l'inverse, *in vivo*, une surexpression de tPA dans les neurones améliore les performances dans les tests d'apprentissage et de mémorisation, en lien avec une augmentation de la LTP (Madani *et al.* 1999). De plus, il existe un rôle différentiel du tPA selon sa forme. En 2012, l'étude de Parcq et collaborateurs montre que seul le sc-tPA est capable d'induire de la LTP (Parcq *et al.* 2012).



**Figure 13 :** Synthèse d'ARN messager du tPA à la suite d'une activation neuronale chez le rat.

Hybridation *in situ* des ARNm du tPA dans l'hippocampe de rat en condition normale, après une stimulation électrique et après utilisation du MK801 (inhibiteur irréversible des récepteurs NMDA). D'après Qian *et al.*, 1993.

Plusieurs mécanismes ont été proposés pour expliquer l'influence du tPA dans les processus de LTP :

- ✓ Par son interaction avec les récepteurs NMDA (Qian *et al.* 1993).
- ✓ Par sa fixation sur les récepteurs LRP, et de façon préférentielle sur l'isoforme LRP1. Cette interaction contribuerait à l'établissement de la LTP en activant des voies de signalisation dépendantes de la PKA (Zhuo *et al.* 2000).
- ✓ Indirectement en convertissant le plasminogène en plasmine qui à son tour va :
  - dégrader la matrice extracellulaire favorisant la formation de nouvelles synapses (Baranes *et al.* 1998).
  - convertir le pro-BDNF (en anglais, *brain-derived neurotrophic factor*) en BDNF mature. Il s'agit d'un facteur neurotrophique nécessaire à l'établissement de la LTP. L'ajout de BDNF mature sur des tranches hippocampiques reverse les déficits en LTP tardive observés chez les souris déficientes en tPA (Pang and Lu 2004).
- ✓ Par sa capacité à cliver la protéine reeline au niveau de son domaine EGF-like. La reeline est co-exprimée avec le tPA dans l'hippocampe et elle intervient dans la régulation de l'activité synaptique (Krstic *et al.* 2012; Trotter *et al.* 2014).



### c. tPA et processus cognitifs

La mémoire représente la capacité à se souvenir d'expériences passées, l'apprentissage désigne un processus qui va modifier notre comportement et nous permettre de nous adapter à diverses situations en fonction de notre vécu. Cependant, à une échelle plus microscopique, le stockage ou le rappel d'un souvenir se fait grâce à l'établissement d'un réseau de neurones permettant de relier et d'activer différentes aires cérébrales entre elles.

Le tPA est exprimé dans l'hippocampe, qui est une région clé pour ces processus, où il a été démontré comme important dans la mémoire spatiale (Calabresi *et al.* 2000). Lors de tâches de reconnaissance d'objets et de places, les souris déficientes en tPA présentent des déficits d'exploration et de mémoire spatiale (Calabresi *et al.* 2000; Benchenane *et al.* 2007). L'interaction du tPA avec les récepteurs NMDA semble être la clé du mécanisme, puisqu'une immunisation contre la sous-unité GluN1 chez des souris sauvages montrent les mêmes déficits de mémoire spatiale que chez les souris déficientes en tPA (Benchenane *et al.* 2007). Plus précisément, l'inhibition de l'interaction entre le tPA la sous-unité GluN1 n'induit pas de déficit de mémoire spatiale chez des souris déficientes en GluN2D. Ces résultats démontrent que l'influence du tPA sur la mémoire spatiale implique une interaction avec les récepteurs NMDA associés spécifiquement à la sous-unité GluN2D (Obiang *et al.* 2012).

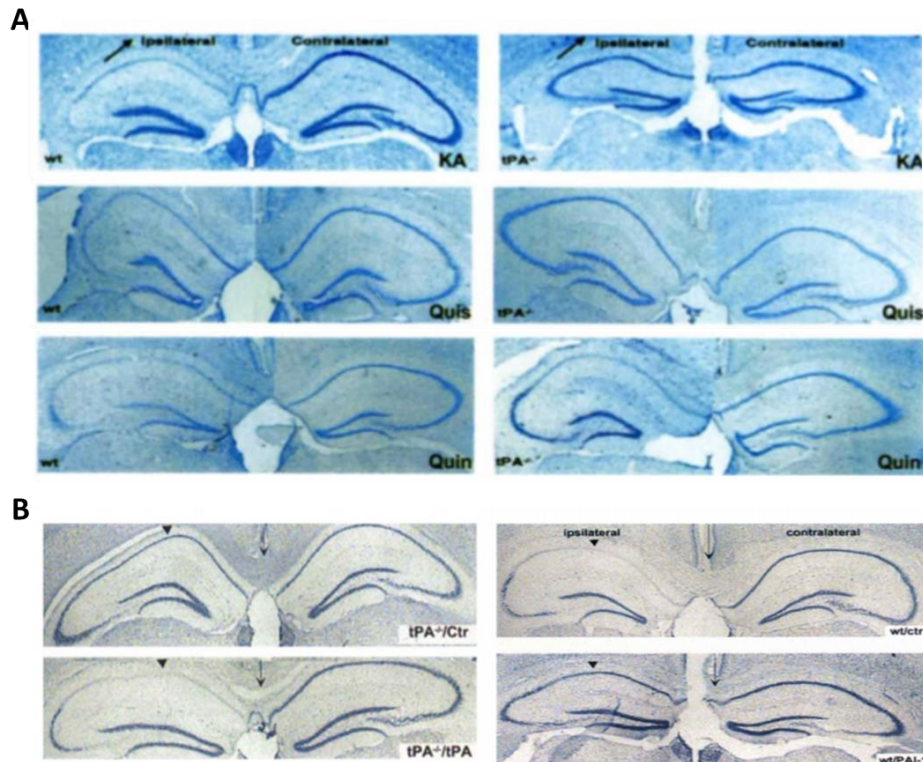
Le tPA est également exprimé dans l'amygdale qui est une structure importante dans l'anxiété, la réponse au stress et la peur. Plusieurs études montrent que les souris déficientes en tPA ont un comportement moins anxieux que les souris sauvages (Pawlak *et al.* 2003; Matys *et al.* 2004). Le tPA participe à l'acquisition et la rétention d'indices dans un contexte de peur (Huang *et al.* 1996; Calabresi *et al.* 2000). De plus, des souris déficientes en neuroserpine (inhibiteur du tPA cérébral) ont un comportement plus anxieux que leurs homologues sauvages (Madani *et al.* 2003).

## 4. Implications pathologiques du tPA dans le système nerveux central

### a. tPA et modulation glutamatergique

La première mise en évidence de l'implication du tPA dans l'excitotoxicité est établie par Tsirka en 1995. L'équipe révèle que le tPA induit une mort neuronale suite à l'injection intra-hippocampique dans les champs CA1, CA2 et CA3 d'agonistes glutamatergiques (acide kaïnique, agoniste des récepteurs KA ; acide quisqualique, agoniste des récepteurs AMPA ; acide quinolinique, agoniste des récepteurs NMDA). Les souris déficientes en tPA sont plus résistantes à la dégénération neuronale induite par ces agonistes glutamatergiques (Tsirka *et al.* 1995a). Dans un second temps, ils montrent que l'injection de tPA et ensuite d'acide kaïnique chez ces souris déficientes restaure la mort neuronale observée chez les souris sauvages. En revanche, un co-traitement d'acide kaïnique avec PAI-I (l'inhibiteur du tPA) protège les neurones d'une mort excitotoxique chez des souris sauvages (Figure 14; Tsirka *et al.*, 1996). Mais, l'équipe montre aussi que des souris déficientes en plasminogène sont résistantes à la neurodégénération induite par le kaïnate (Tsirka *et al.* 1997).

Leur hypothèse est que l'effet du tPA reposerait sur l'activation du plasminogène en plasmine, à l'origine de la neurodégénération observée dans l'hippocampe.

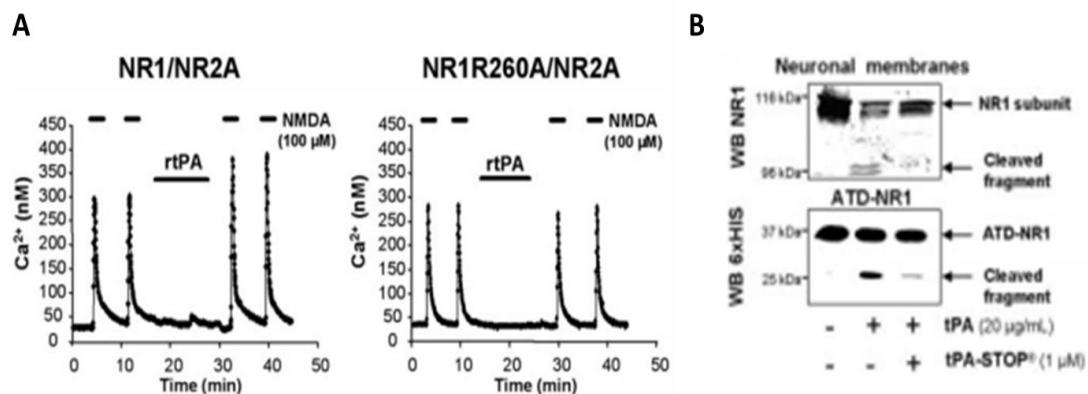


**Figure 14 : Premières preuves de l'implication du tPA dans l'excitotoxicité.**

(A) L'injection d'agoniste au système glutamatergique dans l'hippocampe n'induit pas de mort neuronale chez les souris déficientes en tPA (tPA<sup>-/-</sup>). KA : acide kaïnique ; Quis : acide quisqualique ; Quin : acide quinolinique. (B) La co-injection de tPA avec de l'acide kaïnique chez les souris déficientes en tPA (tPA<sup>-/-</sup>) restaure la mort neuronale. Mais, la co-injection de PAI-I avec l'acide kaïnique n'induit pas de dommages neuronaux chez des souris sauvages. Adaptée de *Tsirka et al., 1995, 1996*.

Les effets excitotoxiques observés étaient localisés dans l'hippocampe et à la suite d'une injection d'acide kaïnique. C'est en 2001, au sein de notre équipe que les premiers liens directs du tPA avec les récepteurs NMDA sont mis en évidence sur des cultures primaires de neurones corticaux. L'étude montre que le tPA est capable de cliver la sous-unité GluN1 des récepteurs NMDA. Ce clivage, induit une augmentation d'influx calcique et potentialise la mort neuronale induite par le NMDA. Cette étude conclut que l'augmentation d'influx calcique dépend de l'activité protéolytique du tPA et du clivage de la sous-unité GluN1 (*Nicole et al. 2001*). Plus précisément, en 2004, nous démontrons que ce clivage est localisé au niveau de l'arginine 260 de la sous-unité GluN1 (**Figure 15** ; *Fernández-Monreal et al., 2004*). L'utilisation de technique de cristallographie et de résonance de surface plasmonique (SPR) permet de suggérer que le tPA se fixe d'abord à une des sous-unités GluN1 du récepteur *via* le LBS de son domaine Kringle 2. Cela conduit à la présentation de son domaine catalytique à l'arginine 260 de la seconde sous-unité GluN1 et induit son clivage (*Lopez-Atalaya et al. 2008*). De plus, le

tPA se lie à l'extrémité N-terminal de la sous-unité GluN1 au niveau de lysine<sup>178</sup> (Lesept *et al.* 2016).



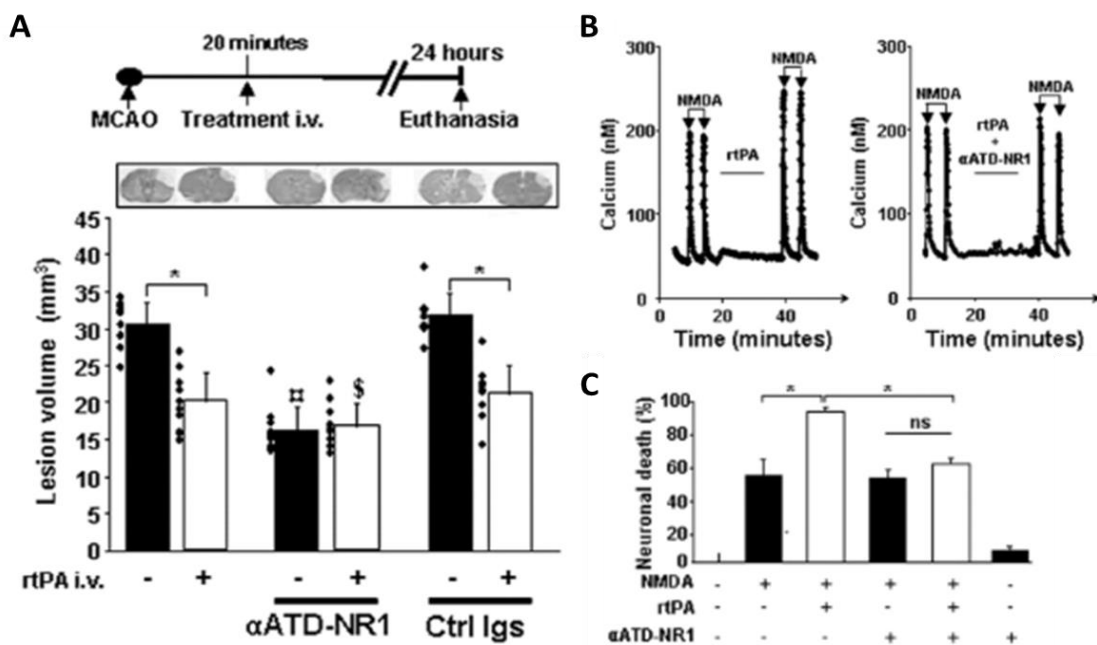
**Figure 15 : Le tPA clive la sous-unité GluN1 au niveau de l'arginine 260.**

(A) En imagerie calcique, sur des cellules HEK 293 transfectées avec la sous-unité GluN1 et la sous-unité GluN2A mutée ou non. En présence de la mutation de l'alanine 260 (NR1R260A) le tPA ne potentialise pas les récepteurs NMDA induit avec du NMDA. (B) Des préparations membranaires issues de cultures de neurones corticaux qui ont été incubées avec du domaine amino-terminal (ATD) de la sous-unité GluN1 et du tPA ou du tPA stop (domaine protéolytique inactif). Le tPA clive la sous-unité GluN1 aux dépends de l'activité protéolytique du tPA. D'après Fernández-Monreal *et al.*, 2004.

Des études se sont focalisées à déterminer la localisation et la composition des récepteurs NMDA, qui interviendraient dans l'effet pro-excitotoxique du tPA. Les travaux de Baron en 2010 ont démontré que le blocage des récepteurs NMDA avec du PPDA (inhibiteur spécifique de la sous-unité GluN2D) empêche l'effet délétère du tPA sur la mort neuronale induite par le NMDA. La pré-stimulation des récepteurs NMDA synaptiques n'induit pas l'effet potentialisateur du tPA, concluant alors que la sous-unité GluN2D est plutôt extrasynaptique (Baron *et al.* 2010). L'implication de la sous-unité GluN2D dans l'effet de potentialisation induite par du NMDA est également retrouvée par Jullienne et collaborateurs (Jullienne *et al.* 2011). Cependant, sur des cellules HEK transfectées avec les sous-unités GluN1 et GluN2A, l'effet potentialisateur du tPA sur l'influx calcique est toujours présent (Fernandez-Monreal *et al.*, 2004). Ainsi, il semblerait que ce soit la localisation extrasynaptique des récepteurs NMDA contenant la sous-unité GluN2 plutôt que la composition en sous-unité elle-même qui soit nécessaire à la potentialisation d'influx calcique. En 2016, une étude de notre équipe a montré que la fixation du tPA sur la lysine<sup>178</sup> de la sous-unité GluN1 induit une augmentation de la dynamique des récepteurs NMDA extrasynaptiques, responsables de l'influx calcique délétère du tPA en conditions de sur-activation du récepteur NMDA (Lesept *et al.*, 2016).

D'autre part, en condition ischémique, le tPA peut être une arme à double tranchant. Dans le compartiment intravasculaire, il participe à la lyse du thrombus alors que dans le compartiment intra-parenchymateux, le tPA potentialise la mort neuronale de type excitotoxique. En 1999, Wang et collaborateurs montrent qu'après une occlusion de l'artère cérébrale moyenne (ACM), les animaux déficients en tPA ont des volumes de lésions réduits

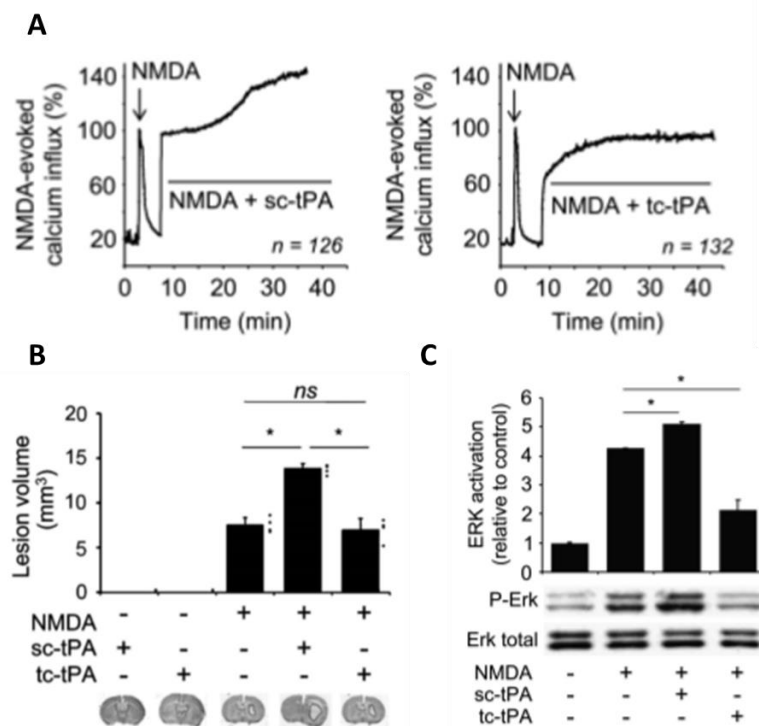
de 50% par rapport aux animaux sauvages. L'injection intra-parenchymateuse de tPA induit une augmentation du volume de lésion chez ces animaux (Wang *et al.* 1998). A l'inverse, l'étude de Wu et collaborateurs en 2013 montre *in vivo* et *in vitro* que le tPA diminue la mort neuronale de type excitotoxique. Ce mécanisme est indépendant de l'activité protéolytique du tPA et nécessite les récepteurs synaptiques contenant la sous-unité GluN2A qui active alors la voie Erk(1/2)-CREB-ATF3 (*cAMP response element binding-protein-activating transcription factor 3*) (Wu *et al.* 2013). Dans notre équipe, des stratégies ont été développées afin d'empêcher l'interaction du tPA avec les récepteurs NMDA. En effet, une stratégie d'immunothérapie avec un anticorps (Glunomab) dirigé contre le domaine N-terminal de la sous-unité GluN1 des récepteurs NMDA a été mise au point afin d'empêcher la fixation du tPA sur cette sous-unité. Dans un modèle d'ischémie thromboembolique, l'injection de cet anticorps par voie intraveineuse abolit les effets délétères du tPA et permet d'étendre la fenêtre thérapeutique de la thrombolyse (Figure 16; Macrez *et al.*, 2011). Au sein du même modèle, l'injection seule de l'anticorps Glunomab permet aussi de réduire le volume de lésion (Macrez *et al.* 2011). Il a également été mis au point un « tPA optimisé » ou tPA-K2\* qui a son site LBS modifié dans le domaine Kringle 2. Le tPA-K2\* ne peut pas interagir avec les récepteurs NMDA, et ne potentialise pas la mort neuronale induite par le NMDA *in vitro* (Parcq *et al.* 2013).



**Figure 16** : Le blocage de l'interaction du tPA avec les récepteurs NMDA réduit la mort neuronale *in vivo* et *in vitro*.

(A) Après une occlusion de l'ACM, l'injection intraveineuse de l'anticorps (αATD-NR1) dirigée contre l'ATD de la sous-unité GluN1 réduit le volume de lésion avec ou sans injection de tPA. (B) En imagerie calcique, le co-traitement de tPA et d'anticorps réduit l'influx calcique médié par le NMDA. (C) *In vitro*, l'anticorps bloque la mort neuronale de type excitotoxique. D'après Macrez *et al.*, 2011.

En 2012, une étude réalisée au laboratoire démontre que le sc-tPA et le tc-tPA exercent un effet différentiel sur la signalisation glutamatergique *in vivo* et *in vitro*. *In vivo*, le tc-tPA n'a pas d'effet pro-excitotoxique suite à l'injection intra-striatale de NMDA. *A contrario*, le sc-tPA en se fixant sur la sous-unité GluN1 potentialise l'influx calcique et la mort neuronale de type excitotoxique. De plus, sur des neurones corticaux, alors que le sc-tPA active la voie Erk(1/2), le tc-tPA diminue significativement cette activation (**Figure 17**; Parcq *et al.*, 2012). Par ailleurs, le sc-tPA et le tc-tPA peuvent activer les récepteurs à l'EGF. Cependant, l'utilisation de l'AG1478, un inhibiteur des récepteurs à l'EGF montre que seul le tc-tPA induit une diminution de l'influx calcique aux dépens de ces récepteurs (Bertrand *et al.*, 2015). Le mécanisme précis expliquant les effets opposés du sc-tPA et du tc-tPA sur la signalisation glutamatergique ne sont pas encore très bien compris. Cependant, certains facteurs comme la dose de tPA administrée, le type et le modèle de neurone étudié pourraient expliquer ces effets opposés.



**Figure 17 : Effet différentiel du sc-tPA et du tc-tPA sur la signalisation glutamatergique.**

(A) Etude en imagerie calcique sur des neurones corticaux que le sc-tPA induit une augmentation de l'influx calcique à travers les récepteurs NMDA alors que le tc-tPA ne potentialise pas les récepteurs NMDA. (B) Volume de lésion après une injection intra-hippocampique de NMDA montre que le tc-tPA diminue ce volume et donc diminue la mort excitotoxique. (C) Le sc-tPA active la voie erk(1/2) alors que le tc-tPA diminue son activation par rapport au NMDA seul. Adaptée de Parcq *et al.*, 2012.

L'activation des récepteurs NMDA par le tPA peut aussi s'effectuer indirectement, par le biais d'autres récepteurs comme les récepteurs LRP. Samson et collaborateurs montre que la potentialisation de la signalisation des récepteurs NMDA requiert le tPA actif protéolytiquement, mais n'implique pas le clivage de la sous-unité GluN1 ou encore la présence du plasminogène. Selon cette étude, la potentialisation induite par le tPA est médiée

par le récepteur LRP (Samson *et al.* 2008). Une seconde étude publiée aussi en 2008 précise que la suractivation des récepteurs NMDA par le tPA implique le récepteur LRP1. Sur des neurones hippocampiques et des cellules HT22, le tPA induit un influx de calcium mais cette réponse est supprimée lorsque les cellules sont prétraitées avec RAP (inhibiteur de LRP1). Ils proposent alors l'hypothèse que le tPA en activant LRP1 induit le recrutement de la protéine d'échafaudage PSD-95, formant un pont entre les récepteurs NMDA et LRP1. La mutation de PSD-95 diminue fortement la phosphorylation de Erk(1/2) et donc l'activation des récepteurs NMDA (Martin *et al.* 2008).

Certaines études rapportent que c'est la plasmine qui serait responsable du clivage de la sous-unité GluN1 (Samson *et al.* 2008). En bref, les données existantes de la littérature ne permettent pas d'établir le mécanisme précis par lequel le tPA potentialise l'influx calcique à travers les récepteurs NMDA (présence de cofacteurs, de certaines sous-unités et de leur localisation...). *A contrario*, l'injection intra-striatale de NMDA sur une souche de souris T4 exprimant faiblement le tPA diminue le volume de lésion par rapport à la souche sauvage. L'étude montre que le tPA protège de la mort excitotoxique induite par le NMDA. Cette neuroprotection serait *via* l'activation de la sous-unité GluN2A et de la voie Erk(1/2)/CREB/ATF3 (Wu *et al.* 2013). De plus, dans un contexte d'ischémie mais dans des modèles non exposés à une stimulation induite avec du NMDA, le tPA peut être neuroprotecteur. Par exemple, l'étude de Wu en 2012, montre que lorsque le tPA active la voie Akt/mTOR(*mammalian target of rapamycin*)/HIF1 $\alpha$  (*hypoxia inducible factor1  $\alpha$* ), il conduit à une neuroprotection et à une augmentation de la recapture du glucose (Wu *et al.* 2012). *In vitro*, sur un modèle de privation d'oxygène et de glucose, le tPA est neuroprotecteur en inhibant le stress du réticulum endoplasmique (Louessard *et al.* 2017). Sur un modèle d'occlusion de l'artère carotide commune, le tPA augmente l'épaisseur de la densité post-synaptique. De ce fait, le tPA pourrait promouvoir une réponse adaptative au stress métabolique et protéger la densité post-synaptique des effets néfastes de l'ischémie (Jeanneret *et al.* 2016). De plus, le phénomène de protéostasie (équilibre entre la synthèse protéique et la dégradation) est modulé par le tPA lors d'un AVC ischémique. L'utilisation d'un traitement tPA avec un inhibiteur du protéasome est neuroprotecteur sur un modèle d'ischémie focale chez le rat (Zhang *et al.* 2010). Ainsi, dans le contexte physiopathologique de l'AVC, l'impact précis de l'interaction du tPA sur les récepteurs NMDA et son effet pro-excitotoxique dans le parenchyme n'est pas complètement éclairci.

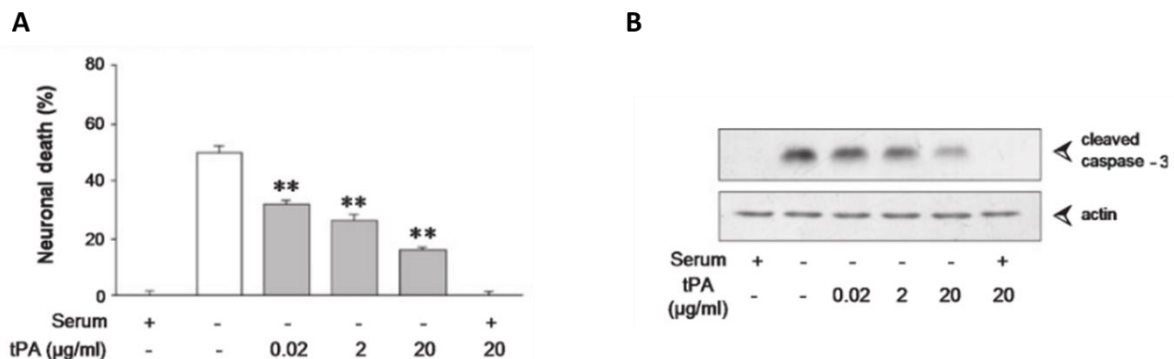
#### *b. tPA et apoptose*

En complément de la potentialisation de la mort excitotoxique, le tPA influence la mort de type apoptotique. Des études divergent quant au rôle plutôt pro ou anti-apoptotique du tPA. Selon l'étude de Liu en 2004, le tPA est pro-apoptotique sur des cellules endothéliales cérébrales soumises à une hypoxie ainsi que sur des neurones corticaux traités au NMDA (Liu *et al.* 2004). Il a également été montré qu'une activation microgliale conduit à la libération de tPA qui déclenche à son tour une cascade apoptotique neuronale. L'ajout d'inhibiteur

protéolytique du tPA, PAI-I ou tPA stop réduit la mort neuronale apoptotique (Flavin *et al.* 2000).

D'autres études suggèrent un rôle anti-apoptotique du tPA sur les neurones et les oligodendrocytes. Tout d'abord, en 2006, Liot et collaborateurs montrent sur des neurones corticaux que le tPA réduit la mort apoptotique induite par privation de sérum. Cet effet, est médié par une réduction du clivage de la caspase 3 (protéine majeure de l'apoptose), est indépendante de son activité protéolytique et des récepteurs LRP (Figure 18; Liot *et al.*, 2006). Il a également été rapporté que le tPA active la voie PI3K (*phosphatidylinositol-3-kinase*) /Akt afin de protéger les oligodendrocytes de l'apoptose : ce phénomène permettrait de réduire les dommages de la substance blanche (Correa *et al.* 2011). L'exposition de propofol sur des neurones hippocampiques induit de l'apoptose, et un prétraitement avec du tPA réduit l'apoptose neuronale induite (Liang *et al.* 2016). Enfin, l'inhibition endogène de tPA par la neuroserpine active la mort neuronale apoptotique après un traumatisme crânien (Zhao *et al.* 2019).

Il semblerait que différents récepteurs soient à l'origine de l'effet du tPA sur l'apoptose. Certaines études ont rapporté une activation des récepteurs à l'annexine II (Lee *et al.* 2007), des récepteurs NMDA contenant la sous-unité GluN2A (Echeverry *et al.* 2010). D'autres suggèrent plutôt une activation des récepteurs à l'EGF (Correa *et al.* 2011; Henry *et al.* 2013; Bertrand *et al.* 2015; Lemarchand *et al.* 2016).



**Figure 18 : Le tPA protège les neurones de l'apoptose induite par une privation de sérum.**

En (A), le pourcentage de mort neuronale sur des cultures de neurones corticaux âgés de 7 jours, suite à un sevrage de 24H et une dose réponse de tPA. En (B), western blot montrant que le tPA induit une diminution dose-dépendante du clivage de la caspase 3 (Liot *et al.*, 2006).

### c. tPA et inflammation

Le tPA peut également moduler la réponse inflammatoire en intervenant un peu comme une cytokine intracellulaire. Le tPA promeut l'activation microgliale en conditions excitotoxiques, indépendamment de son activité protéolytique (Rogove *et al.* 1999; Gravanis and Tsirka 2005). Lors d'une lésion excitotoxique, les animaux déficients en tPA présentent une mort neuronale réduite mais également une moindre réaction microgliale (Rogove *et al.*,

1999). Cet effet est médié par la liaison du tPA sur les récepteurs à l'annexine II microgliaux (Siao and Tsirka 2002). La microglie activée libère des cytokines inflammatoires et du tPA, amplifiant la réponse inflammatoire et la toxicité neuronale (Siao *et al.* 2003).

En 2009, le groupe de Zhang et Yepes suggère que l'effet du tPA sur l'activation microgliale est dû à une interaction avec les récepteurs LRP. Sur un modèle d'ischémie cérébrale, les souris déficientes en récepteurs LRP microgliaux ont un œdème cérébral réduit et un taux de MMP-9 moins élevé. L'administration exogène de tPA chez des souris tPA<sup>-/-</sup> augmente l'activation microgliale mais pas chez les souris déficientes en LRP, suggérant bien une implication de ces récepteurs sur la réponse inflammatoire en condition d'ischémie (Zhang *et al.* 2009).

Lors d'une inflammation, le tPA augmente aussi l'activation des neutrophiles. Le tPA peut promouvoir la transmigration des neutrophiles *via* l'activité de la MMP-9. Il peut induire la dégranulation des neutrophiles par une activation de la voie PI3K/Akt et la voie Erk(1/2), libérant des MMP-9, MMP-8, et de l'élastase (Rosell *et al.* 2008; Carbone *et al.* 2015). Mais le récepteur responsable de ces effets n'a pas été identifié.



Pour résumer cette seconde partie, le tPA est une protéase physiologiquement présente dans l'organisme, avec des fonctions diverses et parfois opposées qui dépendent de nombreux facteurs (types cellulaires, doses, modèles, ...). Elle est présente dans le système vasculaire, synthétisée essentiellement par les cellules endothéliales et dans le système nerveux central où elle est exprimée dans de multiples structures cérébrales (l'hippocampe, l'amygdale, le cortex...) et types cellulaires (neurones, astrocytes...).

Sous sa forme recombinante, le tPA est utilisé comme traitement pharmacologique pour sa propriété thrombolytique lors d'AVC ischémiques.

Dans le compartiment cérébral, le tPA est impliqué à la fois dans des processus physiologiques liés au développement cérébral et cognitif mais aussi dans des processus pathologiques en induisant entre autres des phénomènes inflammatoires, de la mort pro-excitotoxique, de la neuroprotection et une altération de la BHE.

Le tPA se comporte comme un modulateur de la neurotransmission glutamatergique de type NMDA avec des effets différentiels entre le sc-tPA et le tc-tPA. Enfin, le tPA peut interagir avec divers récepteurs post-synaptiques (LRP, NMDA, EGF) et être recapturé par les astrocytes.

To summarize this second part, tPA is a physiologic protease involved in many functions within the organism. It is expressed in the vascular system by endothelial cells, but is also found in the central nervous system where it is synthesized in multiple cerebral structures (hippocampus, amygdala, cortex...) and cellular types (neurons, astrocytes...).

Under its recombinant form, tPA is used as the pharmacologic treatment for ischemic stroke due to its fibrinolytic properties.

In the cerebral compartment, tPA is involved in both physiologic processes such as cerebral and cognitive development, and pathologic processes like inflammatory phenomena, pro-excitotoxic death, neuroprotection and the alteration of blood-brain-barrier.

tPA acts like a glutamatergic modulator of NMDA receptors. Moreover, the sc-tPA and the tc-tPA have differential effects on the glutamatergic neurotransmission. Finally, tPA can interact with several post-synaptic receptors (LRP, NMDA, EGF) and can be recaptured by astrocytes.

## C. Le récepteur MET et son ligand, l'HGF

### I. Généralités sur le récepteur MET

#### 1. Sa découverte

C'est en 1984 que l'équipe de Cooper décrit pour la première fois le récepteur MET. Ce dernier est découvert dans la lignée d'ostéosarcome humain HOS traitée par un carcinogène chimique (Cooper *et al.* 1984). À la suite de ce traitement, un réarrangement chromosomique induit la fusion du gène *TPR* (*Translocated Promoter Region*) avec le gène *MET*. La protéine issue de cette fusion possède le domaine kinase de MET et le site de dimérisation de TPR et induit l'activation constitutive de la protéine chimère. L'ADNc de ces cellules a permis d'isoler la séquence TPR-MET qui se caractérise par un réarrangement chromosomique entre le chromosome 1q25 codant le gène *TPR* et le chromosome 7 q21-31 codant une protéine jusqu'alors inconnue. Tandis que le gène *TPR* code une protéine du nucléopore avec un domaine de dimérisation, la protéine inconnue possède un domaine à activité tyrosine kinase, fortement similaire aux récepteurs tyrosine kinase (RTK). Le récepteur tire son nom de l'agent carcinogène qui a permis sa découverte : le N-**Methyl**-N'-nitro-N-nitrosoguanidine (Park *et al.* 1986).

#### 2. Du gène à la structure de la protéine

Le gène humain codant le récepteur MET est localisé sur le chromosome 7 (bande 7 q21-q31). Il a une longueur de 120 kDa contenant 21 exons entrecoupés de 20 introns (Lin *et al.* 1998). A la suite de sa traduction, le récepteur est présent sous la forme d'un précurseur de 150kDa. Puis, il va subir des modifications post-traductionnelles dont une N-glycosylation donnant un précurseur de 170kDa (Giordano *et al.* 1989). Pour terminer sa maturation, le précurseur est clivé par la furine donnant alors la protéine composée de deux sous-unités  $\alpha$  de 50 kDa et d'une sous-unité  $\beta$  de 140 kDa (Tempest *et al.* 1988).

Le récepteur MET est donc un hétérodimère transmembranaire dont les chaînes  $\alpha$  et  $\beta$  sont reliées par des ponts disulfures. L'extrémité extracellulaire contient la chaîne  $\alpha$  dans son intégralité, tandis que la chaîne  $\beta$  a une région extracellulaire en N-terminale, un domaine transmembranaire qui permet l'ancrage du récepteur ainsi qu'une région intracellulaire en C-terminale. Si on énumère les différents domaines du récepteur MET, il contient 6 domaines extracellulaires et un domaine intracellulaire.

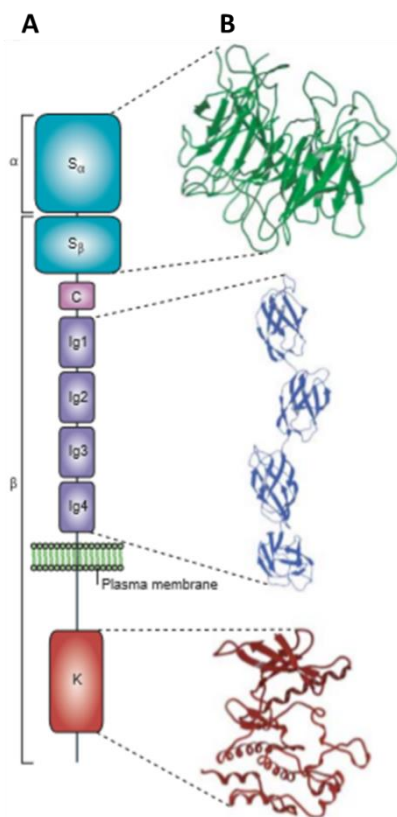
❖ Au sein de la région extracellulaire :

- Le domaine SEMA possède des homologies avec les domaines des sémaphorines et des plexines qui sont une famille de protéines sécrétées ou associées à la membrane décrites pour leur rôle dans le développement neuronal. C'est le seul domaine qui est formé de la chaîne  $\alpha$  et  $\beta$  (Stamos *et al.* 2004).
- Le domaine PSI (*Plexins Semaphorins and Integrins*) suit le domaine SEMA et il possède également des homologies de séquence avec le domaine des plexines, des

sémaphorines ainsi que des intégrines. Il est contenu dans la chaîne  $\beta$ . Ce domaine pourrait fonctionner comme un module de lien pour orienter correctement le domaine SEMA et permettre une fixation correcte du ligand.

- Les 4 domaines IPT (*Immunoglobulin-like region in Plexin and Transcription factors*) qui sont des domaines homologues aux immunoglobulines. Ces domaines sont connectés à l'hélice transmembranaire qui relie le domaine extracellulaire au domaine intracellulaire.

❖ La région intracellulaire est composée d'une partie juxtamembranaire qui a pour rôle de réguler négativement des sites de régulation comme la sérine 975. Il contient le domaine à activité tyrosine kinase qui se décompose en une région catalytique activant l'activité kinase et un site d'accueil multifonctionnel. La région catalytique contient les tyrosines 1234 et 1235 et le site d'accueil multifonctionnel contient les tyrosines 1349 et 1356 (**Figure 19**; Schiering *et al.*, 2003; Montagne *et al.*, 2014).



**Figure 19 : Représentation du récepteur MET.** (A) Les différents domaines de structures du récepteur MET. S : domaine SEMA ; C : domaine riche en cystéine ; Ig : domaine immunoglobuline ; K : domaine kinase. (B) Structure tridimensionnelle des domaines de MET. D'après Birchmeier *et al.*, 2003.

## II. Généralités sur l'HGF/SF

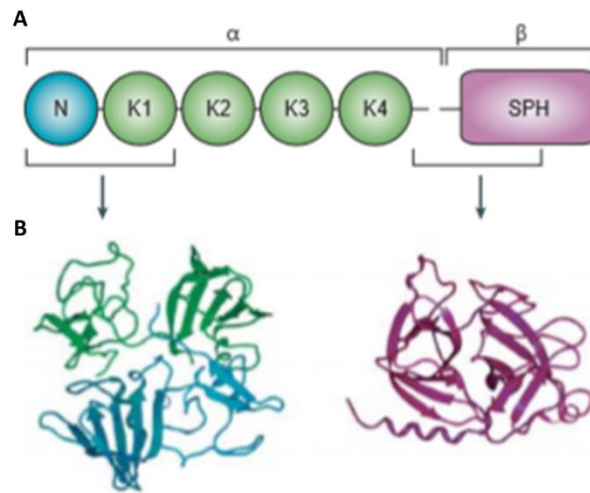
### 1. Sa découverte

La découverte de l'*hepatocyte growth factor* ou *scatter factor* (HGF/SF) a été faite par deux équipes différentes à 3 ans d'intervalle ce qui explique sa double nomination. En 1984, l'équipe de Nakamura a pu isoler un facteur mitogène à partir de plasma de rats partiellement hépatectomisés qui induit la prolifération des hépatocytes ; l'HGF (Nakamura *et al.* 1984).

Puis, en 1987, l'équipe de Stocker isole à partir de fibroblastes embryonnaires une protéine capable d'augmenter et de disperser les cellules épithéliales c'est à dire de dissocier les cellules pour qu'elles puissent ensuite migrer. Ainsi, cette cytokine se fait nommer facteur de dispersion (SF) (Stoker *et al.* 1987). Le récepteur MET est orphelin de son ligand jusqu'en 1991 où il est établi que ces deux facteurs sont en fait qu'un seul et même facteur (séquences codantes identiques, activités biologiques interchangeable...) et qu'ils agissent *via* un même récepteur, MET (Bottaro *et al.* 1991; Naldini *et al.* 1991; Weidner *et al.* 1991).

### 2. Du gène à la structure de la protéine

Le gène de l'HGF/SF est situé sur le chromosome 7 (bande q21.1) et couvre environ 70kb avec 18 exons et 17 introns (Seid *et al.* 1991). L'HGF/SF est une glycoprotéine d'abord sécrétée sous la forme d'un précurseur inactif simple chaîne, le pro-HGF. Pour devenir biologiquement actif, le pro-HGF est clivé au niveau de l'arginine 494 et la valine 495 (Naldini *et al.* 1992). Ce clivage peut être effectué par l'activateur de l'HGF (HGFa) qui est l'activateur le plus efficace, mais aussi par la matriptase, l'hepsine et le facteur de coagulation (XII $\alpha$ ) (Shimomura *et al.* 1995; Owen *et al.* 2010). La littérature diverge concernant le clivage du pro-HGF *via* les activateurs du plasminogène (uPA et tPA) (Mars *et al.* 1993; Zamolodchikov *et al.* 2019). Le clivage induit alors un hétérodimère fonctionnel composé d'une chaîne  $\alpha$  de 69 kDa et d'une chaîne  $\beta$  de 34 kDa reliée par un pont disulfure (Gherardi *et al.* 2012).



**Figure 20 : Représentation de l'HGF/SF.**

**(A)** Les domaines de structure de l'HGF/SF.  $\alpha$  et  $\beta$  font référence aux sous-unités qui sont présentes après le clivage protéolytique. N : domaine amino-terminal ; K1-K4 : domaine kringle 1 à 4 ; SPH : domaine homologue aux sérines protéases. **(B)** Structure cristallographique des 6 domaines de l'HGF/SF. D'après Birchmeier *et al.*, 2003.

L'analyse de la séquence HGF/SF a montré une homologie de séquence de 38% avec le plasminogène (Lokker *et al.* 1992). Cette protéine est composée de 6 domaines : à l'extrémité N-terminale est présente la sous-unité  $\alpha$  qui contient un domaine en épingle à cheveux (*Hairpin loop*) avec un site de liaison de haute affinité à l'héparine et 4 domaines Kringle (K1 à K4 stabilisés les uns aux autres par des ponts disulfures). La chaîne  $\beta$  est constituée à elle seule du domaine SPH (*serine protease homology*) à l'extrémité C-terminale. Ce domaine est apparenté au domaine catalytique des sérines protéases mais l'HGF/SF est dépourvu d'activité enzymatique à cause de mutation dans sa séquence génomique (Figure 20; Birchmeier *et al.*, 2003).

Pour une écriture plus simplifiée, il sera employé le terme HGF à la place de HGF/SF dans la suite du manuscrit.

### III. La signalisation du couple MET/HGF

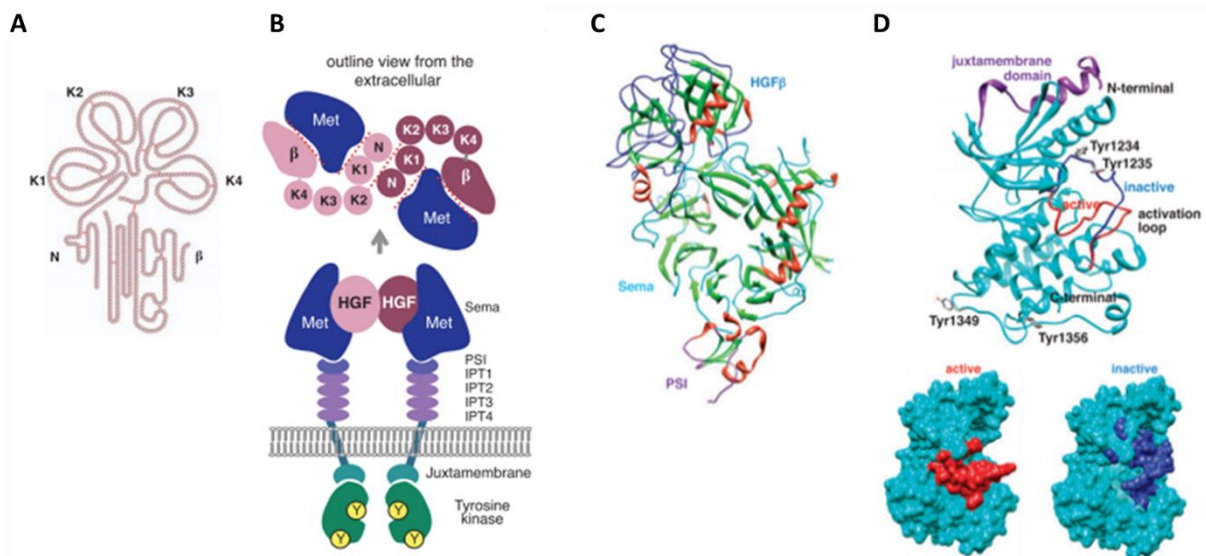
#### 1. L'activation du récepteur MET

##### *a. Interactions entre l'HGF et MET*

Le pro-HGF peut se lier au récepteur MET mais il est dans l'incapacité d'en induire son activation (Lokker *et al.* 1992). L'interaction de l'HGF sur le récepteur MET implique d'une part le domaine N-K1 et SPH de l'HGF, et d'autre part le domaine SEMA de MET (Stamos *et al.* 2004). Un second site potentiel de fixation a été décrit entre le domaine N-K1 de l'HGF et les domaines IPT3 et IPT4 de MET (Basilico *et al.* 2008). La liaison de l'HGF induit sa dimérisation grâce à une interaction tête-bêche mais également la dimérisation de MET et son activation

(**Figure 21**; Gherardi *et al.*, 2006). A noter, que l'HGF peut également se fixer sur les protéoglycanes avec une forte affinité, ce qui a pour conséquence de le piéger et limite sa biodisponibilité *in vivo* (Hartmann *et al.* 1998).

La dimérisation de MET provoque sa trans-autophosphorylation sur les tyrosines 1234 et 1235 situés dans le domaine kinase (Naldini *et al.* 1991; Longati *et al.* 1994). Ces tyrosines sont essentielles pour l'activation du récepteur et favorise la phosphorylation de deux tyrosines supplémentaires : tyrosine 1349 et 1356 localisées sur la partie C-terminale du récepteur. Ces deux tyrosines participent au recrutement de protéines adaptatrices qui sont indispensables pour la transduction du signal *in vitro* et *in vivo* (Maina *et al.* 1996a; Tulasne *et al.* 1999). Ces protéines adaptatrices possèdent un domaine *Src homology-2* (SH2), un domaine *phosphotyrosine binding* (PTB) ou un *MET binding domain* (MBD) (Pelicci *et al.* 1995; Schaeper *et al.* 2000). Ces domaines permettent la fixation de protéines à activité kinase et phosphatase, permettant de réguler la signalisation de MET. Après l'activation de MET, la tyrosine 1003 est phosphorylée au niveau de la région juxtamembranaire. Cette tyrosine est considérée comme inhibitrice puisqu'elle permet le recrutement d'une ubiquitine ligase responsable de la dégradation du récepteur MET. Le domaine juxtamembranaire contient un second site de régulation négative au niveau de la sérine 985. La phosphorylation de celle-ci diminue la phosphorylation des tyrosines du récepteur MET (Gandino *et al.* 1994). Enfin, d'autres tyrosines sont potentiellement phosphorylables : les tyrosines 1194, 1313 et 1365 (Maulik *et al.* 2002; Cristiani *et al.* 2005).



**Figure 21 : Base structurale de l'interaction HGF/MET.**

(**A**) Structure de l'HGF. (**B**) Représentation de l'interaction de l'HGF/MET engageant le domaine N et K1 et la sous-unité  $\beta$  de l'HGF ainsi que le domaine SEMA de MET. (**C**) Structure cristallographique de l'association entre la chaîne  $\beta$  de l'HGF et le domaine SEMA-PSI de MET. (**D**) Structure cristallographique du domaine kinase et d'une partie du domaine juxtamembranaire de MET. En rouge et bleu, il s'agit des changements structurels de la boucle d'activation entre son état actif (en rouge) et son état inactif (en bleu). D'après Sakai *et al.*, 2015.

### b. Les partenaires intracellulaires

Les tyrosines phosphorylées (Tyr 1349 et Tyr 1356) vont permettre la propagation du signal en recrutant des protéines adaptatrices qui vont amplifier le signal ou l'orienter, et induire l'activation de voies de signalisation spécifique. Les principales protéines partenaires sont : Grb2 (*growth factor receptor-bound protein 2*), Gab1 (*Grb2-associated binder 1*), SHC (*SH2 domain-containing transforming protein*), SHP2 (*SRC homology 2 domain-containing phosphatase 2*) STAT3 (*signal transducer and activator of transcription 3*) ou encore PI3K (**Figure 22** ; Trusolino *et al.*, 2010).

#### ❖ Gab1

Gab1 se fixe directement sur la Tyr 1349 du récepteur MET grâce à son domaine MBD ou il s'associe indirectement sur la Tyr 1356 *via* Grb2 (Lock *et al.* 2000). La protéine Gab1 une fois fixée, s'active par phosphorylation et sert de plateforme pour recruter d'autres protéines telles que PI3k, Crk (*CT10 regulator kinase*), PLC (*phospholipase C*), ou SHP2. Cette dernière reconnaît les tyrosines situées sur la partie C-terminale de Gab1. La protéine SHP2 se phosphoryle alors et active la voie Ras/MAPK qui est essentielle pour la morphogenèse de branchement (Maroun *et al.* 2000; Schaeper *et al.* 2000). Outre l'HGF, Gab1 est activé par de nombreux facteurs de croissance comme l'EGF, le NGF (*nerve growth factor*), l'insuline ou certaines interleukines (IL-3 et IL-6). La fonction de Gab1 semble essentielle dans la signalisation de MET car des embryons de souris déficientes en Gab1 présentent les mêmes différences phénotypiques que des embryons déficients en MET (taille de foie réduite et défaut de migration des cellules précurseurs de myoblastes) (Sachs *et al.* 2000).

#### ❖ Grb2

La protéine Grb2 est la seconde protéine adaptatrice importante dans la transmission du signal en aval de MET. Elle est composée d'un domaine SH2, qui se lie directement sur la Tyr 1356, encadré par 2 domaines SH3 essentiels pour le recrutement d'autres protéines de signalisation (Songyang *et al.* 1994). Grb2 a aussi la possibilité de se lier de façon indirecte à MET *via* la protéine SHC, elle-même recrutée au niveau des deux tyrosines 1349 et 1356 (Pelicci *et al.* 1995). SHC est considéré comme un amplificateur de réponse car il augmente les possibilités de Grb2 de se lier à MET (Pelicci *et al.* 1995). L'adaptateur Grb2 est connu pour s'associer au facteur d'échange de nucléotides SOS (*son of sevenless*), activant la voie Ras/MAPK. Cette protéine permet aussi le recrutement de la protéine Gab1 et de la protéine CBL (*Casitas B-cell lineage*) qui intervient dans l'internalisation du récepteur MET. De plus, Grb2 semble influencer dans la myogenèse tardive. En effet, alors que la mutation des tyrosines 1349 et 1356 est létale, l'étude de Maina montre que la mutation de la Tyr 1356 permet un développement du fœtus à terme mais avec une masse musculaire des membres réduite et un déficit généralisé des fibres secondaires aboutissant au décès peu de temps après la naissance (Maina *et al.* 1996b).

#### ❖ SHP2

SHP2 est une des protéines tyrosine phosphatase (PTP) impliquée dans la signalisation de MET. SHP2 se fixe indirectement sur MET par l'intermédiaire de Gab1, ce qui permet l'activation conformationnelle de SHP2 et l'induction des voies Ras et MAPK. Même si la présence de SHP2 n'est pas essentielle pour l'activation de ces voies, elle permet de maintenir leur activation (Maroun *et al.* 2000; Cunnick *et al.* 2002). Le mécanisme de cette activation maintenue serait dû à une inhibition de RasGAP, l'inhibiteur de la voie Ras (Montagner *et al.* 2005). Ainsi, SHP2 n'exerce pas d'activités inhibitrices sur la signalisation de MET, contrairement à ce que l'on pourrait attendre de par son potentiel tyrosine phosphatase. De plus, la voie Gab1/ SHP2 est décrite dans des processus biologiques tels que la morphogenèse et la régénération du foie (Bard-Chapeau *et al.* 2006). SHP2 est également considéré comme un oncogène puisque des mutations sporadiques ont été retrouvées dans certains cancers (Ostman *et al.* 2006). Parmi les autres PTP participant à la régulation de MET, il faut également citer : PTP1B (*protein-tyrosine phosphatase 1B*), la TCPTP (*T-cell phosphatase*) ou encore DEP-1 qui est un récepteur tyrosine phosphatase (Palka *et al.* 2003; Sangwan *et al.* 2008).

#### ❖ SHC

SHC est une protéine adaptatrice qui se fixe sur les deux tyrosines 1349 et 1356 phosphorylées du récepteur MET (Pelicci *et al.* 1995). SHC recrute le complexe Grb2/SOS et active la voie Ras/MAPK qui permet la prolifération cellulaire. De plus, SHC pourrait également recruter Gab1 et Gab2 (Gu *et al.* 2000; Ong *et al.* 2001). Le recrutement de SHC par la protéine fusion TPR/MET est nécessaire à son activité transformante (Saucier *et al.* 2002).

#### ❖ STAT3

La protéine STAT3 est également recrutée directement par son domaine SH2 sur la Tyr 1356 de MET ou indirectement *via* Gab1. STAT3 activé par phosphorylation se dimérise, se transloque dans le noyau et se comporte comme un facteur de transcription en favorisant la morphogenèse et la tumorigenèse (Boccaccio *et al.* 1998; Cramer *et al.* 2005; Kermorgant and Parker 2008).

Ainsi, dans cette partie, il est décrit une liste non exhaustive de protéines de signalisation intervenant directement ou indirectement après l'activation du récepteur MET. Mais, au sein de cette signalisation, certains partenaires protéiques vont être retrouvés de façon récurrente (Gab1 et Grb2) alors que d'autres ne vont être impliqués que dans un contexte cellulaire particulier.

## 2. Les voies de signalisation

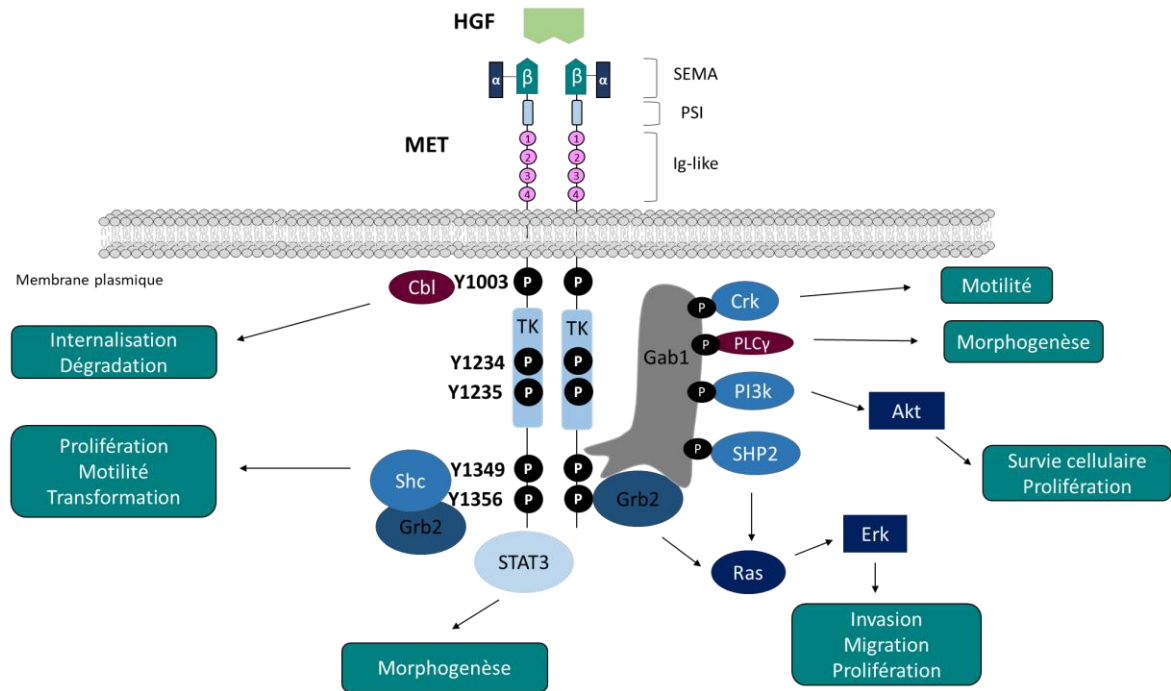
La réponse cellulaire suite à l'activation de MET repose sur une cascade de protéine de signalisation qui permettent l'activation de voies de signalisation dont les voies Ras/MAPK et PI3k/Akt (Trusolino *et al.* 2010).



**La voie Ras/MAPK** est la voie majeure activée dans la signalisation HGF/MET, celle-ci est très bien décrite dans la littérature. Cette voie peut être activée par de nombreux récepteurs, menant à l'activation de facteurs de transcription qui favorisent l'expression de gènes induisant la prolifération cellulaire. Après la fixation de Grb2 sur MET, cette protéine recrute à son tour la protéine SOS qui se fixe sur le domaine SH3 de Grb2. SOS stimule l'échange d'un GDP en GTP dans la boucle effectrice de la protéine Ras ce qui la stabilise et l'active, permettant le rapprochement de Raf à la membrane plasmique afin d'être activée par phosphorylation. Ainsi, Raf induit l'activation en cascade de Mek et de Erk, dernier maillon de la chaîne (McKay and Morrison 2007). Erk est transloqué dans le noyau et active des facteurs de transcription tels que Fos, Jun et Myc, régulant entre autres le cycle cellulaire et la prolifération (Paumelle *et al.* 2002; Turjanski *et al.* 2007).

**La voie PI3k/Akt** est la seconde voie majeure impliquée dans la signalisation de MET. PI3k est une enzyme composée d'une sous-unité catalytique (p110) et d'une sous-unité régulatrice (p85). PI3k se fixe directement à MET par la sous-unité p85 qui possède un domaine SH2, ou par l'intermédiaire de Gab1. PI3k une fois recrutée, permet la phosphorylation de phospho-inositols membranaires : PIP2 (PI,3,4-biphosphate) en PIP3 (PI3,4, 5 triphosphate). PIP3 sert de ligand pour recruter la protéine Akt à la membrane, une sérine/thréonine kinase qui intervient dans la survie et la prolifération cellulaire. En effet, Akt inhibe la protéine pro-apoptotique Bad (*BCL2-associated agonist of cell death*), et active MDM2 (*murine double-minute p53 binding*), une ubiquitine ligase qui va séquestrer p53 et s'opposer à l'arrêt du cycle cellulaire. La protéine Akt peut libérer le facteur NF- $\kappa$ B impliqué notamment dans la prolifération et l'angiogenèse (Furlan *et al.* 2011; Brotelle and Bay 2016).

Par ailleurs, les voies de signalisation sont interconnectées entre elles. Par exemple, la voie des MAPK peut aussi être activée par la PLC $\gamma$  qui est équipée d'un domaine SH2. Et Ras n'active pas exclusivement les MAPK mais peut activer également PI3k et PLC $\epsilon$  (phospholipase C $\epsilon$ ) (Hennessy *et al.* 2005).



**Figure 22: Signalisation de l'HGF/MET et ces activités biologiques.**

À la suite de l'activation du récepteur MET par son agoniste l'HGF, MET se dimérise et s'autophosphoryle au niveau de diverses tyrosines. Il s'en suit un recrutement de protéines adaptatrices comme Gab1 et Grb2 qui à leurs tours recrutent des partenaires protéiques (Shc, Crk, PI3k, PLC $\gamma$ , SHP2...) conduisant à des réponses biologiques telles que l'invasion, la migration ou encore la prolifération cellulaire.

### 3. La régulation du récepteur

#### a. Internalisation de MET

Après stimulation par l'HGF, le récepteur MET est rapidement internalisé par endocytose, une des étapes clé de la régulation avant la dégradation et/ou le recyclage. Le récepteur MET phosphorylé recrute une ubiquitine ligase E3, CBL qui va promouvoir l'ubiquitinylation du récepteur. Ce recrutement se fait soit directement par l'association du domaine kinase de CBL et de la Tyr 1003 de MET ou soit indirectement par son association à Grb2 *via* son domaine riche en proline (Peschard *et al.* 2001). Ce recrutement permet la formation d'un complexe entre MET, CBL, l'endophiline et CIN85 (*CBL-interacting protein of 85kDa*), initiant l'endocytose clathrine-dépendante (Petrelli *et al.* 2002). Ce complexe permet de modifier les phospholipides membranaires, d'induire une courbure de la membrane plasmique et de former le manteau de clathrine. Il s'en suit une invagination de la membrane qui forme la vésicule d'endocytose, initiant alors l'internalisation de MET (Petrelli *et al.* 2002). Par ailleurs, l'étude de Korhan en 2014 montre que le récepteur MET peut également être internalisé par une voie clathrine-indépendante, par l'intermédiaire de la cavéoline (Korhan *et al.* 2014).

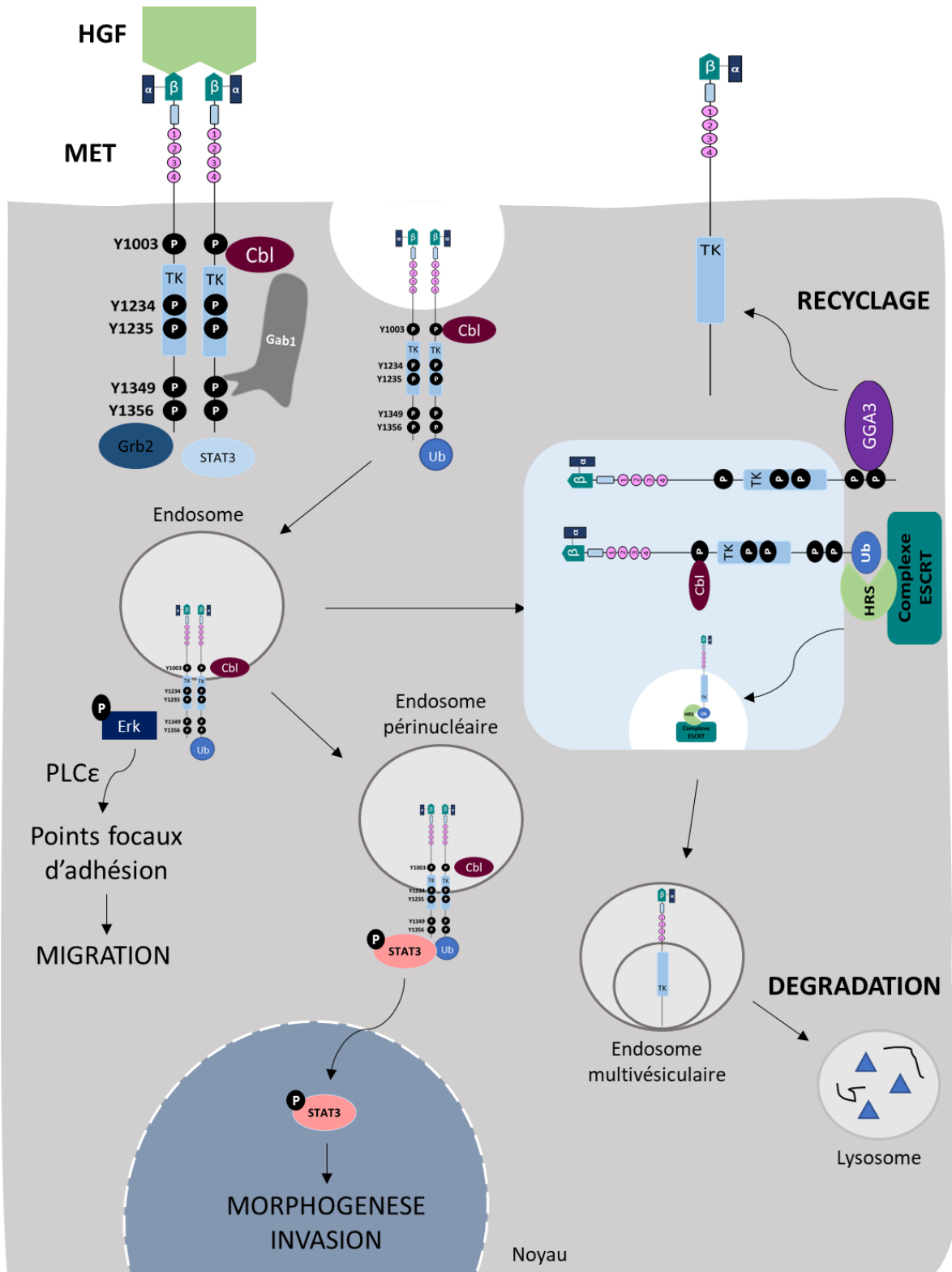
Au cours de son internalisation, MET continue d'activer certaines voies de signalisation. En effet, lorsque MET est présent dans les endosomes précoces, il active les protéines Erk1/2, leur relocalisation au niveau des points focaux d'adhésions, favorisant la migration (Kermorgant *et al.* 2004). Ensuite, lorsque MET est délocalisé dans les endosomes périnucléaires, il recrute et transloque STAT3 dans le noyau qui peut jouer son rôle de facteur de transcription. Fait intéressant, lorsque l'internalisation de MET est bloquée, cela provoque une inhibition de la phosphorylation de Erk et de STAT3 (Kermorgant and Parker 2008).

Alors que l'internalisation est traditionnellement décrite pour stopper la signalisation, dans l'exemple de MET, cette signalisation ne s'effectue pas seulement à la membrane plasmique mais se poursuit au cours de l'internalisation. Le recrutement préférentiel de certains effecteurs est à l'origine de la spécificité du signal de MET, au dépend de sa localisation (Kermorgant and Parker 2005).

#### *b. Dégradation et recyclage de MET*

A la suite de l'internalisation, le récepteur MET est dirigé vers les endosomes précoces où il recrute la protéine HRS (*HGF regulated tyrosine kinase substrate*), capable de reconnaître et d'interagir avec l'ubiquitine. La protéine HRS permet de guider le récepteur MET vers les différentes étapes de maturation de l'endosome et forme avec d'autres protéines le complexe ESCRT (*endosomal sorting complex required for transport*). Ce complexe permet la formation d'un endosome multivésiculaire qui évolue en endosome tardif. Ce dernier fusionne avec un lysosome dont l'acidité est nécessaire pour l'activité des enzymes qui induisent la dégradation du récepteur MET endocyté (Figure 23; Hammond *et al.*, 2003; Abella *et al.*, 2005).

Par opposition, dans le compartiment endosomal, le récepteur MET peut retourner à la membrane par un processus de recyclage. Dans les endosomes de tri, MET peut s'associer à la protéine GGA3 (*golgi-localized  $\gamma$ -ear-containing Arf-binding protein3*) via l'adaptateur Crk. L'extinction de la protéine GGA3 montre une inhibition du recyclage au profit d'une augmentation de la dégradation de MET. Cette extinction induit aussi une réduction de l'activité de Erk, qui résulte par une diminution de la migration cellulaire. Ainsi, le recyclage de MET participe aussi au contrôle de la signalisation du récepteur (Parachoniak *et al.* 2011; Lefebvre *et al.* 2012).



**Figure 23 : Le récepteur MET : de sa signalisation à sa dégradation.**

Après stimulation par son ligand l'HGF, MET se dimérise et s'autophosphoryle. Il recrute des protéines adaptatrices dont Gab1 et Grb2. La protéine CBL vient se fixer sur la Tyr 1003 pour permettre l'ubiquitinylation et ainsi l'internalisation de MET. Dans les endosomes, MET peut toujours activer les voies de signalisation. De la même manière dans les endosomes périnucléaires, MET favorise la translocation de STAT3. Dans les endosomes, MET peut suivre la voie de la dégradation induite par le lysosome ou la voie de recyclage en s'associant avec la protéine GGA3.

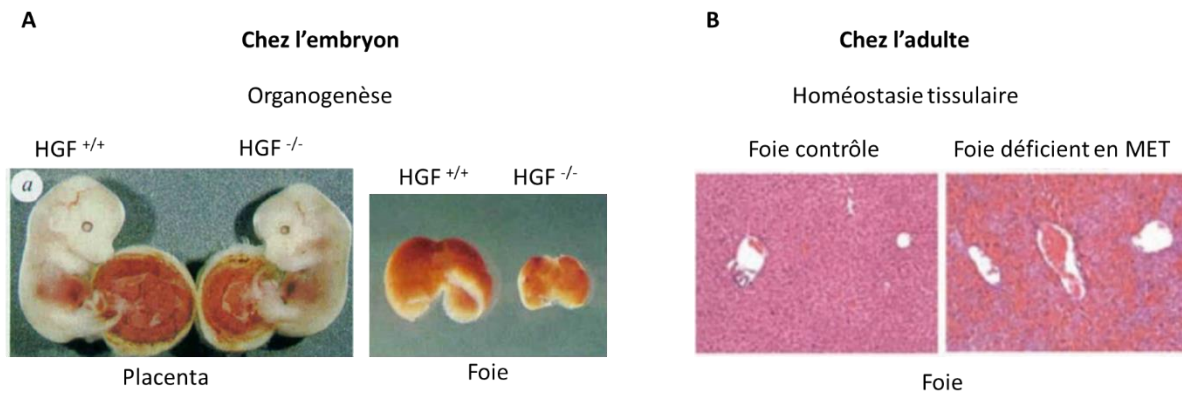
## IV. Les fonctions du couple MET/HGF

### 1. Au cours du développement des organes périphériques

L'expression de MET et de l'HGF au cours de l'embryogenèse révèle un schéma d'expression qui varie en fonction du stade du développement. Leur expression conjointe est retrouvée précocement pendant la gastrulation (6,5 à 7<sup>ème</sup> jour de développement) chez la souris au sein du mésoderme et de l'endoderme, suggérant un mode d'action autocrine. Par la suite, pendant l'organogenèse (8-10<sup>ème</sup> jour de développement) leur co-expression n'est retrouvée que dans de rares zones que sont le tube neural, les somites et le cœur. Dans le reste de l'embryon et jusqu'à la fin du développement, le patron d'expression de ces deux gènes est distinct : l'HGF est exprimé dans les tissus mésenchymateux alors que MET est exprimé dans les tissus épithéliaux, indiquant plutôt un mode d'action paracrine du récepteur (Jung *et al.* 1994). Ainsi, la signalisation de MET favorise la morphogenèse de plusieurs organes tels que le rein, le foie, le placenta, la glande mammaire, les testicules, le pancréas et les poumons. De plus, MET et l'HGF sont aussi importants dans le développement du système nerveux, par des effets de survie, de différenciation et de croissance axonale, mais aussi dans le développement du cervelet et la mise en place des muscles squelettiques antérieurs (Maina and Klein 1999; Ieraci *et al.* 2002; Prunotto *et al.* 2004).

Dans les années 1990, l'inactivation du gène *MET* ou de *HGF* a permis de confirmer que le couple joue un rôle essentiel dans les processus de développement embryonnaire et dans les interactions épithélium-mésenchyme. De fait, l'inactivation de ces gènes est létale *in utero* à 15 jours de développement et les embryons *MET*<sup>-/-</sup> et *HGF*<sup>-/-</sup> ont des altérations phénotypiques similaires. Les embryons présentent un défaut de développement du trophoblaste qui forme la partie fœtale du placenta, c'est ce qui est à l'origine de la létalité (Figure 24; Bladt *et al.*, 1995; Schmidt *et al.*, 1995; Uehara *et al.*, 1995). Leur taille de foie est aussi réduite s'expliquant par une baisse de la survie et de la prolifération des hépatocytes (Schmidt *et al.* 1995). Ils ont également une altération de la répartition des cellules musculaires, due à une baisse de la migration des précurseurs myoblastiques (Bladt *et al.* 1995; Schmidt *et al.* 1995).

Plus tardivement dans les années 2000, des expériences de knock-out (KO) conditionnelles de *MET* ont permis de mieux comprendre son implication au cours du développement. Par exemple, l'inactivation de MET inhibe le bon développement alvéolaire des poumons et réduit le nombre de néphrons ainsi que la taille du rein (Ishibe *et al.* 2009; Calvi *et al.* 2013). Au sein du SNC, son extinction génétique peut conduire à une perte d'un sous-groupe de motoneurones (Lamballe *et al.* 2011). Lors d'une hépatectomie partielle ou un rein abîmé, l'HGF stimule la morphogenèse de branchement dans le foie et le rein chez l'adulte (Balkovetz and Lipschutz 1999; Huh *et al.* 2004). Ainsi, au cours du développement, le couple HGF/MET est indispensable pour l'organogenèse et l'homéostasie tissulaire (foie, rein, poumon).



**Figure 24 : Implication du couple HGF/MET au cours du développement embryonnaire et chez l'adulte.**

En **A**, apparence externe d'embryon sauvage  $HGF^{+/+}$  et d'embryon  $HGF^{-/-}$  à E13.5 montrant les anomalies de formation du placenta. A droite, il s'agit d'une image représentative du foie issu des mêmes souches d'animaux avec une réduction de la taille du foie chez les embryons  $HGF^{-/-}$ . En **B**, l'extinction conditionnelle de *MET* dans le foie de souris adulte inhibe la régénération hépatique. D'après Schmidt *et al.*, 1995; Huh *et al.*, 2004.

## 2. Au cours du neurodéveloppement

L'étude de Jung en 1994 démontre par hybridation *in situ* que les transcrits de MET et de l'HGF sont exprimés dans le cerveau de souris adulte et en développement (Jung *et al.* 1994). L'expression de l'HGF et MET au sein du SNC débute à E12 et E13 respectivement (Jung *et al.* 1994; Achim *et al.* 1997). L'ARNm de l'HGF est principalement localisé dans les neurones de l'hippocampe, du cortex, et des cellules granulaires du cervelet, alors que l'ARNm de MET est plus spécifiquement restreint à l'aire CA1 de l'hippocampe, au cortex et au septum (Jung *et al.* 1994; Thewke and Seeds 1999; Korhonen *et al.* 2000). Fonctionnellement, les neurones répondent à la signalisation HGF/MET par une augmentation rapide de la transcription du gène c-Fos (Jung *et al.* 1994).

La carte d'expression du transcrit MET montre un faible niveau de son expression au stade prénatal (E16.5) puis son expression augmente à la naissance et atteint un pic d'expression à P7. Ensuite, l'expression de MET est relativement stable pendant la seconde semaine post-natale puis décline fortement à P21 pour se maintenir à de faibles niveaux d'expression à l'âge adulte (Figure 25; Judson *et al.*, 2009). L'étude révèle que les pics d'expression de MET coïncident avec les périodes de prolongement des neurites et de synaptogenèse, suggérant un rôle fonctionnel de MET dans le développement de la connectivité du cerveau. De plus, l'expression de MET pendant cette période est présente dans l'hippocampe, le néocortex et les régions limbiques sous-corticales (Judson *et al.* 2009). Dans ces régions, MET est exprimé par des neurones à projections excitateurs et *in vivo* il n'y a pas de preuve reportée de son expression dans les interneurones (Eagleson *et al.* 2011).

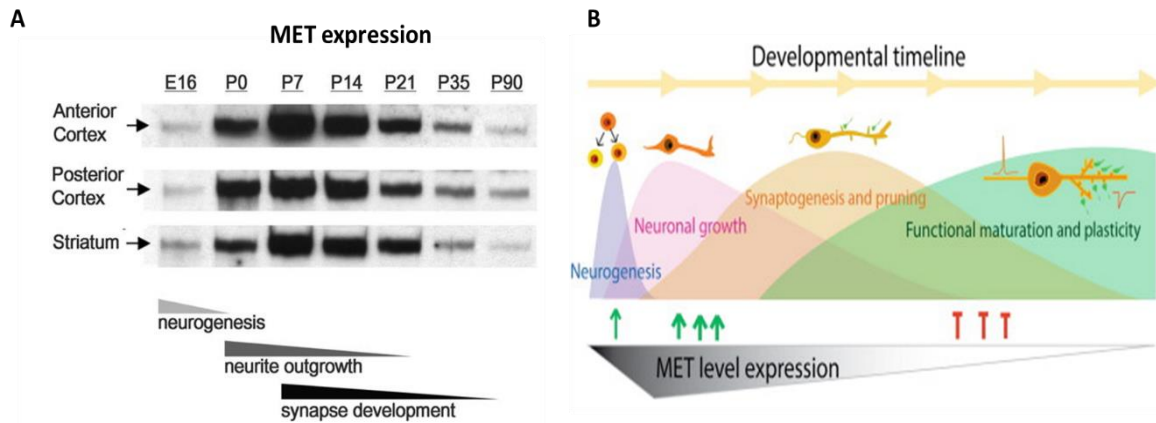
Ce couple influence différents événements neurodéveloppementaux, incluant l'induction neurale, la morphogenèse des neurones (synaptogenèse et développement des

dendrites) et le guidage axonal. La signalisation de MET module la croissance des dendrites et la formation des synapses. En effet, *in vitro*, sur des neurones hippocampiques, un traitement à l'HGF augmente la longueur des dendrites, le nombre de branchement et la densité synaptique (Eagleson *et al.* 2016). Cette activation de MET engage les voies Ras/MAPK et PI3k/Akt (Eagleson *et al.* 2016). Streit en 1995 montre que pendant la gastrulation, l'HGF est exprimé dans le nœud de Hensen d'embryons de poussins. Sur des cultures d'épiblastes issues d'embryons de poussins, le traitement à l'HGF permet à ces cellules d'adopter une morphologie neuronale et d'exprimer aussi des marqueurs neuronaux (Streit *et al.* 1995). Les auteurs suggèrent que l'HGF joue un rôle dans les premières étapes de l'induction neurale, probablement en induisant ou en maintenant la capacité de l'épiblaste à répondre aux signaux neuronaux.

Le développement du cervelet a principalement lieu après la naissance, impliquant des processus de prolifération cellulaire et de migration. L'HGF et MET sont co-exprimés lors du développement du cervelet (Ieraci *et al.* 2002). MET est localisé sur les précurseurs des cellules granulaires et la mise en culture de ces cellules montre une prolifération cellulaire induite par le traitement à l'HGF. L'utilisation d'une souche de souris *MET* mutée (incapable de fixer Grb2) met en évidence une réduction de la taille du cervelet et une diminution de la prolifération des cellules granulaires, démontrant l'implication de l'axe HGF/MET dans le développement du cervelet (Ieraci *et al.* 2002).

Par ailleurs, la signalisation MET semble influencer le système sensorimoteur. En effet, l'HGF promeut le développement de neurones sensoriels en coopérant avec le facteur NGF. Cette coopération permet d'activer la croissance axonale et d'augmenter le nombre de neurites des neurones sensoriels (Maina *et al.* 1997). De plus, l'HGF se comporte comme un facteur chemo-attractant qui permet de guider les axones des motoneurones et de promouvoir leur survie durant leur développement (Ebens *et al.* 1996). L'HGF agit comme un facteur neurotrophique pour les motoneurones, et un des mécanismes potentiels évoqué pour permettre une croissance optimale des axones des neurones ganglionnaires serait *via* un mécanisme autocrine de l'HGF (Judson *et al.*, 2009; Peng *et al.*, 2013).

L'expression spatio-temporelle de MET impacte donc sur les processus neurodéveloppementaux du système cérébral. La survenue d'altérations de l'expression de MET peut modifier le bon développement cérébral et conduire alors à divers troubles comportementaux et psychiatriques.



**Figure 25 : Profil d'expression de MET dans le neurodéveloppement.**

**A**, western blot représentant l'expression protéique de MET dans le cortex antérieur, postérieur et le cervelet chez des souris sauvages de E16 à l'âge adulte (P90). **B**, le profil d'expression de MET montre un pic pendant la période périnatale correspondant à la croissance neuronale et la synaptogenèse. Puis, la protéine MET est réduite pour permettre la maturation des circuits cérébraux et la plasticité synaptique. D'après Judson *et al.*, 2009; Peng *et al.*, 2013.

### 3. La dérégulation de MET dans la tumorigénèse

Malgré l'existence de mécanismes de régulation, la dérégulation de l'expression ou de la signalisation de MET et de l'HGF est une caractéristique décrite dans de nombreux types de cancers humains. Ses dérégulations sont multiples mais les principales causes sont : une mutation de MET, une surexpression de l'HGF ou l'activation constitutive du récepteur. Dans certains cancers, ses altérations sont associées à un mauvais pronostic.

#### a. Les différents types de dérégulation de l'HGF/MET

De nombreux types de cancers humains sont associés à une dérégulation de MET et de son ligand. Pour ne citer que les grandes catégories, il y a les carcinomes, les sarcomes de muscles squelettiques et de tissus mous ainsi que les leucémies (le site [www.vai.org/Met/](http://www.vai.org/Met/) répertorie la liste des cancers impliquant MET et l'HGF). Plus de 1200 mutations de MET ont été répertoriées et sont regroupées sur le site COSMIC (*catalogue of somatic mutations in cancer*). Cependant, même si ces mutations sont présentes dans certains cancers, toutes les mutations ne sont pas systématiquement impliquées dans les processus oncogéniques. Il est nécessaire de vérifier si ces mutations ont un rôle fonctionnel dans la tumorigénèse. Certains « hotspots » sont présents sur la séquence de MET, notamment au niveau du domaine kinase, juxtamembranaire et plus rarement dans le domaine extracellulaire.

C'est en 1997, dans un carcinome rénal papillaire héréditaire que la première mutation de MET est identifiée, reliant alors MET aux cancers (Schmidt *et al.* 1997). Puis, la présence de mutations du domaine kinase de MET dans les cancers des voies aérodigestives est démontrée (Jeffers *et al.* 1998). Il est fréquemment retrouvé certaines mutations telles que la D1228N, la Y1230C et la M1250T qui conduisent à une activation constitutive du



récepteur sans ligand (Jeffers *et al.* 1997; Joffre *et al.* 2011). Des travaux de knock-in chez des souris ont évalué le potentiel tumorigène de chaque mutation (Graveel *et al.* 2004). Il s'avère que chaque mutation conduit à un profil de tumeur différent, suggérant que chaque mutation affecte ses propres cibles cellulaires ou agit distinctement sur l'activité du récepteur. Il est aussi décrit des mutations dans la région juxtamembranaire, qui est une région importante dans la régulation des fonctions catalytiques. Les mutations les plus fréquentes sont R970C, P991S et T992I retrouvées dans 3 à 10% des cancers pulmonaires (Krishnaswamy *et al.* 2009; Tyner *et al.* 2010; Boland *et al.* 2013). Par ailleurs, le séquençage complet d'échantillons de cancers du poumon identifie le saut de l'exon 14 dans le transcrit de MET (Kong-Beltran *et al.* 2006). En 2015, l'équipe de Frampton analyse le génome de 38 028 tumeurs et en identifie 221 présentant un saut de l'exon 14 avec 126 séquences différentes (Frampton *et al.* 2015). L'exon 14 est situé dans la région juxtamembranaire de MET, le saut de cet exon induit une région tronquée et une endocytose compromise, qui mène à une accumulation du complexe HGF/MET à la surface et donc à une activation prolongée de la signalisation (Gherardi *et al.* 2012; Lee *et al.* 2014). La prévalence de ce saut d'exon est retrouvée dans 3% des adénosarcomes pulmonaires, 0,4% des gliomes cérébraux et divers autres types de cancer (Frampton *et al.* 2015). La présence du saut de l'exon 14 peut promouvoir à elle seule l'oncogenèse, ce qui en fait une cible thérapeutique (Frampton *et al.* 2015; Pilotto *et al.* 2017). La région extracellulaire n'est pas épargnée par des mutations, généralement localisées dans le domaine SEMA qui participe à la liaison de l'HGF. La mutation la plus fréquente est la N375S retrouvée dans les cancers bronchiques non à petites cellules (CBNPC). Toutefois, son implication dans la tumorigenèse est controversée. Cette mutation pourrait être issue d'un simple polymorphisme puisqu'elle existe aussi dans la population asiatique et n'est pas associée à un risque de cancer (Liu *et al.* 2012; Shieh *et al.* 2013).

Une autre dérégulation est la surexpression de MET, fréquemment observée dans certains cancers. Par exemple, MET est surexprimé dans 10 à 70% des cancers gastriques (Di Renzo *et al.* 1995; Huang *et al.* 2001; Tang *et al.* 2004; An *et al.* 2014), dans 20 à 70% des cancers du sein (Ghoussoub *et al.* 1998; Camp *et al.* 1999; Nakopoulou *et al.* 2000) et jusqu'à 80% dans les cancers rénaux (Natali *et al.* 1996). Cette surexpression peut être dû à une baisse de la dégradation et donc à une surexpression de MET à la membrane. Certains facteurs environnementaux peuvent induire une surexpression. Par exemple, en situation d'hypoxie, le facteur HIF1 $\alpha$  est libéré et se fixe sur la région promotrice de MET pour en augmenter son expression (Hara *et al.* 2006). D'autre part, la suractivation de MET est associée à une surexpression génique du récepteur (Cooper *et al.* 1984). Cette amplification génique peut être définie par un ratio MET/CEP7 (nombre de copies de MET/ nombre de copies sur le chromosome 7) supérieur à 2 (Burel-Vandenbos *et al.* 2017). De nombreuses lignées cellulaires ont cette surexpression qui est responsable d'une activation continue de l'activité kinase indépendamment de l'HGF (Smolen *et al.* 2006; Lutterbach *et al.* 2007). Cette dérégulation est souvent associée à un mauvais pronostic, dans les gliomes par exemple, l'amplification de MET n'est observée que dans tumeurs de grade IV (Kwak *et al.* 2015).

Le récepteur n'est pas le seul à subir des dérégulations, l'HGF est aussi retrouvé comme étant surexprimé dans divers cancers, et est également associé à un mauvais pronostic (Ujii *et al.* 2012). Le dosage de sérum de patients atteints de cancers tels que les gliomes ou les cancers du poumon montre une quantité importante d'HGF (Arrieta *et al.* 2002; Toiyama *et al.* 2009). L'HGF est sécrété par les cellules du stroma (action paracrine) mais il semble que dans le cas d'un environnement tumoral, la sécrétion de l'HGF puisse être autocrine. C'est le cas dans les lignées cellulaires issus de gliomes humains ; U87MG et U118 (Rosen *et al.* 1996; Koochekpour *et al.* 1997).

D'autre part, des réarrangements chromosomiques issus de la fusion entre le récepteur MET et une protéine ont été rapportés. En effet, en 2014, la fusion entre MET et le gène *PTPRZ1* (*receptor-type tyrosine-protein phosphatase zeta 1*) est découverte en séquençant l'ARN tumoral de patients atteints de glioblastomes (Bao *et al.* 2014). D'autres études sont venues étayer le nombre de protéines fusions ; MET-TFG (*Trk-fused gene*), MET-CLIP2 (*CAP-Gly domain containing linker protein 2*) pour n'en citer que deux (International Cancer Genome Consortium Pedbrain Tumor Project, 2016). Dans la plupart des fusions, le domaine kinase de MET fusionne avec l'extrémité N-terminale de la protéine, qui forment des protéines chimères constitutivement actives. Pour rappel, la découverte de MET est issue du réarrangement chromosomique responsable de la formation de l'oncogène TPR-MET (Cooper *et al.* 1984).

#### *b. Les stratégies thérapeutiques*

Diverses stratégies thérapeutiques ont pour cible de bloquer la signalisation induite par MET. Ces stratégies se focalisent sur le blocage de l'interaction HGF/MET, soit *via* des antagonistes ou des anticorps neutralisant l'HGF ou soit en bloquant l'activité kinase de MET par des inhibiteurs de tyrosine kinase (TKI, *tyrosine kinase inhibitor*) (Figure 26).

Les TKIs sont des petites molécules qui se fixent de manière compétitive sur les sites de liaison de l'ATP des récepteurs à activité tyrosine kinase ce qui bloque leur activation. Certains TKIs sont spécifiques à une seule cible alors que d'autres ont un spectre plus large (Scagliotti *et al.* 2013). C'est le cas du crizotinib, un TKI multi-cible spécifique à la fois de MET, du récepteur VEGF et de ROS1 (Camidge *et al.* 2014). Ce traitement a été approuvé par la FDA (*Food and Drug administration*) dans les CBNPC (Malik *et al.* 2014). Les tumeurs qui contiennent une mutation dans l'exon 14 de MET sont aussi sensibles au traitement TKIs, avec par exemple le capmatinib (Heist *et al.* 2016) et le glesatinib (Schrock *et al.* 2016). L'étude PROFILE-1001 montre une amélioration de la survie avec le crizotinib dans le cas de patient atteint d'un CBNPC accompagné de la présence du saut de l'exon 14 de MET. Des inhibiteurs sélectifs de MET sont également utilisés. C'est le cas du SU11274 qui est aussi un TKI. Il bloque la signalisation de MET et inhibe des événements biologiques comme la motilité cellulaire et la morphogenèse de branchement (Wang *et al.* 2003). Il inhibe spécifiquement MET et n'a pas d'effet sur l'EGFR, FGFR1 ou PDGFR $\beta$ . Le JNJ-38877605 est aussi un puissant inhibiteur sélectif de l'activité kinase de MET (Benvenuti *et al.* 2011). Il se fixe aux sites ATP de MET et il a démontré une activité antitumorale dans des modèles de glioblastomes et de cancers

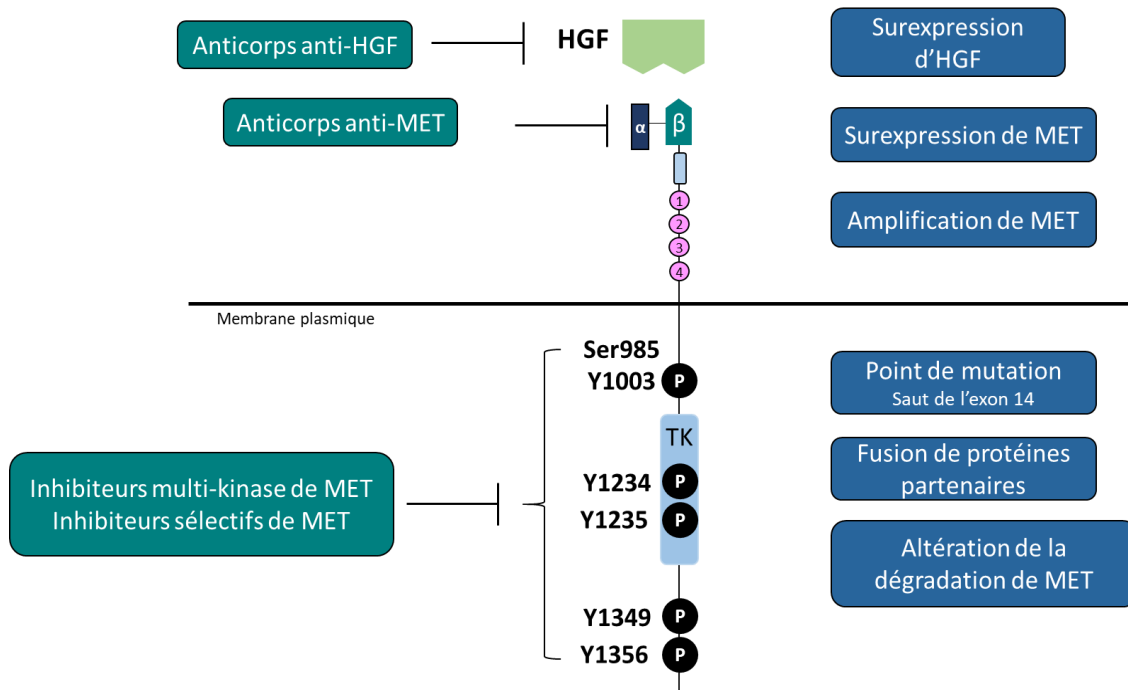
gastriques et de la prostate. Mais, il induit une toxicité rénale causée par la formation de métabolites (Lolkema *et al.* 2015). Ces 2 derniers inhibiteurs ont été utilisés dans mon étude.

Le récepteur MET et l'EGFR sont tous deux des récepteurs à activité tyrosine kinase qui partagent un réseau de signalisation similaire. Une amplification de MET est une forme de résistance dans les thérapies anticancéreuses ciblant l'EGFR avec des TKI (EGFR-TKI) (Bean *et al.* 2007; Engelman *et al.* 2007). L'activation de MET peut alors compenser l'inhibition de l'EGFR. Quand ces facteurs de croissance sont combinés, un effet additif sur la prolifération cellulaire est observé *in vitro* dans des cancers CBNPC (Puri and Salgia 2008). Ceci suggère qu'une combinaison avec des inhibiteurs de MET et de l'EGFR-TKI pourrait avoir des effets synergiques anti-tumoraux. Cette combinaison est appliquée en clinique spécifiquement chez des patients résistants à l'EGFR-TKI.

Il existe une variété d'inhibiteurs de MET incluant les anticorps monoclonaux, les TKIs, des molécules qui vont cibler le site d'interaction avec l'HGF ou encore l'activité kinase de MET. Parmi les anticorps anti-MET, on peut citer Onartuzumab (MetMab), un anticorps monoclonal humain qui reconnaît le domaine SEMA de MET et bloque sa liaison à l'HGF (Merchant *et al.* 2013). L'Emibetuzumab est un anticorps monoclonal anti-MET empêchant aussi la fixation de l'HGF sur MET mais il conduit à une internalisation et une dégradation de MET (Scagliotti *et al.* 2017). Le JNJ-61186372 se fixe sur le récepteur MET et l'EGFR pour bloquer la fixation de leur ligand. Il est utilisé dans essais clinique chez des patients ayant par exemple des mutations de l'EGFR ou une résistance à l'EGFR-TKI (Emdal *et al.* 2017).

De nombreuses études cliniques et précliniques ont développé des anticorps monoclonaux afin d'empêcher l'activation de l'HGF ou de neutraliser sa fixation sur MET. Le Rilotumab et le Ficlatusumab sont des anticorps qui se fixent à l'HGF sur la chaîne  $\beta$ . L'efficacité thérapeutique est évaluée dans des études cliniques en comparant un traitement déjà efficace à des traitements combinés. Par exemple, l'essai clinique en phase II évalue l'efficacité du ficlatusumab en comparant le gefitinib (inhibiteur de l'activité kinase de l'EGFR) seul ou combiné au ficlatusumab chez des patients ayant un CBNPC (Mok *et al.* 2016). De nombreuses études utilisent des traitements combinés notamment entre un traitement ciblant l'EGFR et un ciblant MET pour diminuer les phénomènes de compensation.

Ainsi, le récepteur MET est un oncogène impliqué dans de nombreux cancers chez l'Homme. De nombreuses thérapies combinent plusieurs traitements avec par exemple un traitement ciblant l'EGFR (EGFR-TKI) et un ciblant MET pour limiter les résistances thérapeutiques. Des résultats encourageants d'essais cliniques montrent la nécessité de développer des thérapies ciblées et « à la carte » sur des populations de patients sélectionnées.



**Figure 26 : Principaux mécanismes de dérégulations de l’axe HGF/MET.**

Les mécanismes variés de la dérégulation de l’axe HGF/MET comportent une surexpression de MET/HGF, une altération génique (point de mutation, amplification et fusion). De multiples molécules ont été développées ciblant MET (TKI, anticorps anti-MET, antagoniste) et l’HGF (anticorps anti-HGF). Adaptée de Liang & Wang, 2020.

## V. L’implication du récepteur MET et NMDA dans les troubles du spectre autistique

### 1. Les troubles du spectre autistique

#### a. Définition

Le mot autisme vient du grec ancien *autos* signifiant « soi-même ». En 1911, le psychiatre suisse Eugen Bleuler propose ce terme pour désigner l’état de repli des patients souffrant de schizophrénie. Le terme autisme réapparaît 30 ans plus tard, en 1943 à Baltimore par l’américain Leo Kanner. Ce dernier, utilise ce terme pour décrire un tableau clinique similaire, à savoir des comportements d’indifférence sociale et de troubles affectifs chez 11 enfants verbaux et non verbaux (Kanner 1943). A la même période, en 1944 mais de façon indépendante, le pédiatre autrichien Hans Asperger publie sa seconde thèse dans laquelle il décrit un groupe d’enfants et d’adolescents souffrant de déficits en communication ainsi qu’un schéma de comportement répétitif et restrictif (Asperger 1944). Même si le tableau clinique dépeint est similaire entre les deux, les enfants décrits par Asperger diffèrent de ceux de Kanner dans le fait qu’ils n’ont pas de retards dans le développement cognitif ou dans celui du langage. Asperger et Kanner sont considérés comme les deux pionniers de l’autisme.

Ce n'est qu'en 1980, que l'autisme infantile est apparu dans le Manuel diagnostique et statistique des troubles mentaux (DSM) en tant que catégorie diagnostique distincte (Pichot and Guelfi 1983) DSM-III ; Association américaine de psychiatrie (AAP) ou APA pour *Association psychiatry of America*, 1980). En 1994, la DSM-IV catégorise l'autisme de manière plus générale par des troubles envahissants du développement (TED) incluant aussi d'autres sous-catégories (Cooper 2001). La nouvelle publication du DSM-V en 2013 introduit deux modifications importantes pour le diagnostic d'autisme. Premièrement, des modifications dans la nomination et la nomenclature ont été apportées. En effet, la DSM-V élimine les sous-catégories de TED et introduit la notion de spectre. Les troubles du spectre de l'autisme (TSA) incluent le trouble autistique, le syndrome d'Asperger et le TED-non spécifié et excluent le syndrome de Rett et le trouble désintégratif (DSM-5 2015). La seconde modification est la définition des symptômes pour les critères de diagnostic. Sous la DSM-IV, les symptômes étaient répartis en 3 domaines et ils sont à présent divisés qu'en deux domaines.

Actuellement, selon l'AAP, les TSA se définissent par un déficit persistant de la communication sociale et l'interaction dans différents contextes ainsi que par des comportements répétitifs, ou encore, par des activités ou centres d'intérêts restreints. Si les manifestations surviennent habituellement pendant la petite enfance, elles peuvent également apparaître à un âge plus avancé, lorsque la demande sociale excède les capacités des personnes (Association 2013; DSM-5 2015).

Lorsqu'il est fait référence à une altération de la communication sociale, celle-ci peut se manifester par une difficulté dans la réciprocité sociale et émotionnelle. Par exemple, la personne a des difficultés à amorcer et suivre une conversation, une conduite sociale anormale, ou des troubles dans l'initiation sociale. Il peut également y avoir une altération dans les comportements de communication non verbale (langage expressif absent ou limité, usage rare ou nul des gestes appropriés). De plus, la personne peut présenter une difficulté à établir et à maintenir des relations sociales qui correspondent à son niveau de développement.

Le second domaine de symptômes fait référence aux centres d'intérêts restreints ou aux comportements répétitifs. Il peut s'agir entre autres, d'un discours ou de mouvements répétitifs ou stéréotypés, d'une adhérence inflexible à des règles, des actes routiniers. Il s'agit aussi de comportements ritualisés, d'un besoin excessif de constance, ils sont résistants au changement même insignifiant. Ils peuvent manifester un intérêt limité sur lequel la personne se focalise de façon anormalement intense, comme dans le cas d'une préoccupation ou d'un attachement pour un objet inhabituel. Il peut s'agir d'une hyper- ou d'une hyporéactivité sensorielle telle qu'une indifférence à la douleur ou une réponse inhabituelle à certains sons et textures. Enfin, il peut aussi être observé des attraits pour des aspects de l'environnement sensoriel, se manifestant par des comportements tels que toucher ou sentir des objets, une fascination pour la lumière et les objets qui tournent (Poirier and Rivières-Pigeon 2013).

Bien que les TSA ne comptent que deux domaines fonctionnels déficitaires, ces variations neurodéveloppementales peuvent s’exprimer par un large éventail de symptômes. Le tableau clinique du TSA varie en fonction des capacités cognitives de l’individu, du niveau de langage atteint et de l’âge. L’APA définit plutôt trois niveaux de sévérité selon le niveau de soutien dont a besoin l’individu présentant un TSA.

De plus, de multiples problèmes de santé sont liés au TSA, l’épilepsie qui est étudiée depuis longtemps pour vérifier sa relation causale ou son existence avec le trouble. Les problèmes gastro-intestinaux et la maladie cœliaque en font partie. L’hygiène de vie, incluant l’alimentation, l’obésité, et le sommeil sont des difficultés décrites chez les personnes ayant un TSA. Il est également rapporté que les troubles anxieux, le trouble déficitaire de l’attention avec ou sans hyperactivité ainsi que les troubles de l’humeur peuvent être associés au TSA. Enfin, la déficience intellectuelle, les troubles du comportement, la dysphasie et la dyspraxie peuvent l’accompagner. Les personnes présentant un TSA forment un groupe hétérogène tant par la variabilité dans la manifestation des symptômes et le degré de fonctionnement que par la présence ou l’absence de conditions médicales, psychologiques ou psychiatriques associées. A savoir qu’un TSA ne se guérit pas, il s’agit d’une condition neurodéveloppementale avec laquelle la personne évoluera toute sa vie (Poirier and Rivières-Pigeon 2013).

#### *b. Prévalence, étiologie et facteur de risque*

Ces dernières années, il y a eu un intérêt grandissant pour cette pathologie qui est probablement dû à l’augmentation du taux de la prévalence de ce trouble. Le nombre d’enfants diagnostiqués a fortement augmenté dans l’ensemble des pays industrialisés ces 20 dernières années. Au début des années 2000, environ 1 enfant sur 2000 recevait le diagnostic de TSA (Fombonne 2003). Aujourd’hui, la prévalence du TSA est estimée entre 1 à 2% de la population générale en fonction des études (Kim *et al.* 2011; Christensen *et al.* 2018). Aux Etats-Unis en 2014, les données du Centre de Prévention et de Contrôle des Maladies (CDC) estiment la prévalence à 1 enfant sur 68, quel que soit le groupe racial, ethnique ou socio-économique (basé sur les données de 2010 de 11 communautés américaines) (Maenner 2020). Cependant, la maladie est plus fréquente chez les garçons que chez les filles, avec 4 garçons atteints pour 1 fille (DSM-V, 2015; Maenner, 2020). En France, selon l’INSERM et le secrétariat d’Etat auprès du ministre chargé des personnes handicapées, la prévalence actuelle est de 1 naissance sur 100, et 650 000 personnes vivraient avec une condition du spectre de l’autisme. Le sexe-ratio est de 4 garçons pour 1 fille et environ la moitié des personnes présentent une déficience intellectuelle.

Les raisons de cette hausse de la prévalence sont débattues par la communauté scientifique. Elle peut s’expliquer par l’élargissement des critères diagnostiques, mais également par une connaissance croissante et une amélioration dans l’identification et la détection des individus présentant un TSA. Toutefois, la sous-estimation antérieure de personnes atteintes de TSA par manque de campagnes de prévention et d’information peut aussi être un facteur à prendre en compte.

L'ensemble des causes des troubles du spectre autistique demeure encore inconnu. Cependant, la recherche a pu fournir quelques pistes qui pourraient être associées au TSA. Tout d'abord, plusieurs études prouvent l'existence d'une base génétique (Miles 2011). Divers facteurs génétiques sont probablement en cause dans l'étiologie du TSA et de multiples marqueurs génétiques pourraient être associés aux diverses trajectoires phénotypiques du TSA. L'implication génétique dans ce trouble est apportée par l'étude des jumeaux. En effet, chez des jumeaux monozygotes, le taux de concordance du diagnostic est de 70 à 90% alors que ce taux est de 0 à 14% chez des jumeaux dizygotes (Lichtenstein *et al.* 2010). Ces résultats indiquent que l'apport de la génétique se situerait entre 70 et 90% et qu'il reste encore 10 à 30% de variance à expliquer. Une étude de 2010 estime que le taux de récurrence du TSA d'un individu dans une fratrie est de 10.9%, ce qui est largement au-dessus du taux de prévalence d'environ 1% dans la population générale (Constantino *et al.* 2010). Ces résultats appuient l'idée selon laquelle il n'y a pas un gène mais plusieurs gènes qui sont susceptibles d'être à l'origine du trouble. Les scientifiques s'entendent sur le fait que le TSA a pour origine un modèle complexe impliquant de multiples gènes qui interagissent avec l'environnement de plusieurs façons. Il s'agit de gènes candidats qui augmentent le risque d'apparition mais ne suffisent pas, à eux seuls, à causer le trouble (Cuccaro *et al.* 2003). Des études ont entrepris des analyses du génome pour identifier les gènes candidats susceptibles d'accroître le risque de TSA. Les aberrations chromosomiques retrouvées les plus fréquentes sont en position : 7q, 15q, 17q, 22q, 24q (Yang and Gill 2007). De nombreux gènes défectueux ont été identifiés comme étant impliqués dans les TSA ; parmi eux, il y a : *Neuroligines 3 et 4*, *Neurexin 1*, *SHANK 3*, *PTEN*, *MECP2* et *MET* (Campbell *et al.* 2008). Le site internet SFARI (*Simons Foundation Autism Research Initiative*) est une base de données qui répertorie et met à jour les gènes impliqués dans les TSA (sfari.org). Malgré la quantité de recherche dans le domaine et l'amélioration technologique, seul 6 à 15 % des personnes atteintes d'un TSA ont reçu un diagnostic génétique (Miles 2011).

Par ailleurs, bien que la base génétique soit appuyée par diverses études, il est probable que des facteurs environnementaux interagissent avec le génotype pour occasionner un TSA. Etant donné que ce dernier est un trouble développemental, caractérisé par un déclenchement précoce, l'influence des facteurs environnementaux se présente sûrement lors des périodes prénatales et périnatales. Les défis liés à l'environnement au cours de la grossesse sont la cause probable de modifications épigénétiques nocives pour le développement du cerveau du fœtus. Des études sont parvenues à identifier certains facteurs de risques prénataux et périnataux pour le TSA. Comme risque attribuable à l'enfant, on peut citer : sexe masculin, hypoxie néonatale, le fait d'être un premier né, un âge gestationnel de moins de 35 semaines et un faible poids à la naissance (Guinchat *et al.* 2012). Les facteurs attribuables aux parents sont entre autres : la rubéole maternelle, la réponse immunitaire prénatale atypique, l'âge avancé au moment de procréer (39 ans pour le père et 35 ans pour la mère), le fait pour la mère d'être fumeuse, de présenter ou d'avoir dans le passé une maladie auto-immune, une histoire d'allergie ou un diagnostic psychiatrique (Guinchat *et al.* 2012).

Malgré des progrès dans la compréhension des facteurs génétiques, environnementaux et développementaux qui sous-tendent au TSA, il existe toujours des zones d'ombre. Le défi principal reste l'hétérogénéité étiologique du TSA, qui contribue à la complexité de son tableau clinique.

## 2. Le gène humain *MET*, facteur de risque dans les TSA

Comme il a été évoqué dans le chapitre précédent, les TSA ont une composante génétique. Parmi les multiples gènes candidats, il y figure le gène *MET* et le gène *GRIN2B* (Campbell *et al.* 2006; Myers *et al.* 2011).

Le gène humain *MET* (OMIM 164860 ; chromosome 7q31) est reporté pour la première fois comme un facteur de risque de l'autisme par l'équipe de Campbell en 2006 en se basant sur des études d'association pangénomique. Ces études ont pour but d'identifier la surexpression de variations génétiques chez des individus atteints de TSA par rapport à une population contrôle (Campbell *et al.* 2006). En se basant sur les observations menées avant l'étude, *MET* s'est avéré être un gène candidat. Premièrement, le gène est localisé sur le chromosome humain 7q31, une zone d'intérêt dans les études du génome des TSA (IMGSAC 1998; Yonan *et al.* 2003). Ensuite, la signalisation MET médie la croissance et l'extension des neurites et contribue au développement cérébral (Maina *et al.* 1997; Gutierrez *et al.* 2004). Cette signalisation joue un rôle dans les fonctions immunitaires et la réparation gastrointestinale, qui sont toutes deux des fonctions altérées dans certains cas de TSA (Tahara *et al.* 2003; Arthur *et al.* 2004). Enfin, des études développementales convergentes indiquent un hypomorphisme (diminution de l'expression du gène) de *MET* et de sa signalisation dans le cortex, résultant en une migration anormale des interneurons, et une diminution de la prolifération des cellules granulaires du cervelet (Ieraci *et al.* 2002; Powell *et al.* 2003; Eagleson *et al.* 2005).

L'étude de Campbell analyse le gène *MET* chez plus de 1200 familles dont une des personnes est atteinte d'autisme. L'étude révèle une forte association génétique d'un allèle commun « C » sur un promoteur (rs1858830 « C ») au sein de la région régulatrice transcriptionnelle 5' du gène *MET* chez plus de 200 familles atteintes d'autisme (Campbell *et al.* 2006). Chez des familles dont plus d'un enfant est autiste, la modification allélique est encore plus importante. Toutefois, cette variation allélique est fonctionnelle, et est associée à des phénotypes spécifiques chez des individus atteints de TSA. Le polymorphisme de nucléotide simple « G » en « C » induit une diminution de 50% de l'activité promotrice de *MET* qui est corrélée au facteur de risque des TSA (Campbell *et al.* 2006). Les facteurs de transcription SP1 et PC4 (codant pour SUB1) se fixent spécifiquement à la séquence promotrice de *MET*, mais leur fixation serait altérée, ce qui diminuerait son activité transcriptionnelle (Campbell *et al.* 2006). En 2007, une seconde étude examine le niveau d'expression de *MET* sur du tissu post-mortem provenant du lobe temporal de personnes autistes et de personnes contrôles.

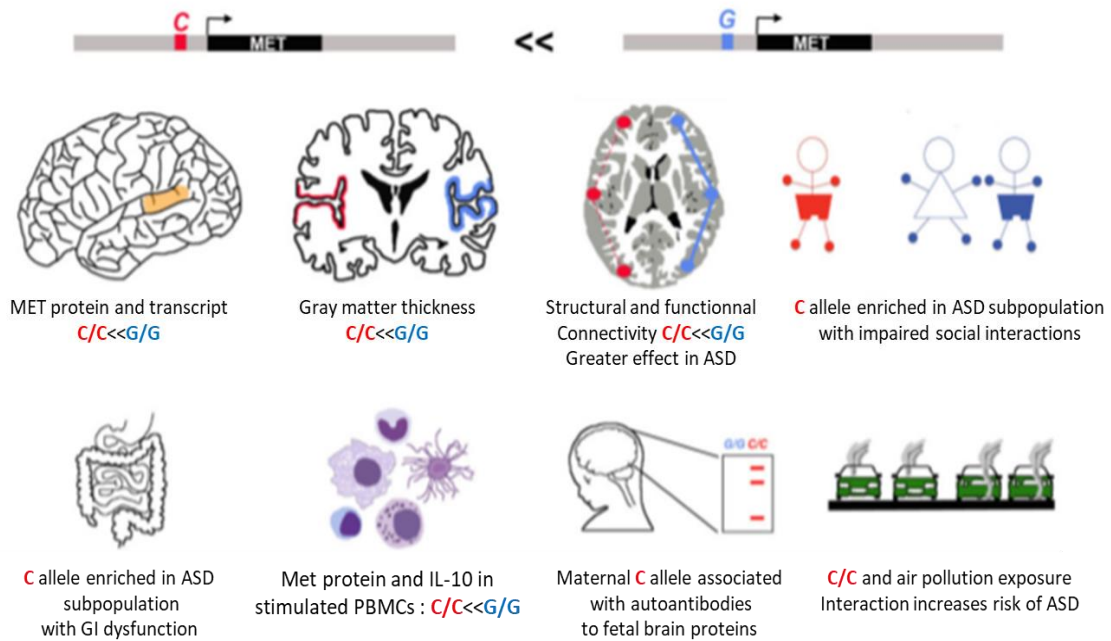


L'étude révèle une diminution du transcrit de *MET* et de son expression protéique chez les individus autistes comparés aux individus contrôles (Campbell *et al.* 2007).

Par la suite, d'autres études génétiques menées sur différentes populations confirment que le gène *MET* est un facteur de risque de l'autisme. En 2009, l'équipe de Sousa trouve une corrélation positive entre le promoteur rs38845 et les TSA. Cependant, l'étude ne montre pas de corrélation entre l'allèle variant « C » du promoteur rs1858830 et les TSA (Sousa *et al.* 2009). Une seconde étude se basant sur deux cohortes retrouve la présence de l'allèle variant « C » dans la cohorte TSA mais pas dans la cohorte de personnes présentant des troubles envahissants de développement (Jackson *et al.* 2009). Dans le même temps, une cohorte de TSA au sein d'une population japonaise révèle un autre polymorphisme de nucléotide simple (*simple nucleotide polymorphism*, SNP) localisé dans l'intron 1, rs38841, qui est associé au risque de TSA (Thanseem *et al.* 2010). Pour conclure, en combinant les résultats issus des différentes cohortes, les études démontrent toutes une association entre le gène *MET* et les TSA indépendamment de la variation génétique.

L'allèle « C » de *MET* est enrichi chez des enfants autistes qui ont également des troubles gastro-intestinaux (GI) (Campbell *et al.* 2009). Cette association TSA et troubles GI montre une altération plus importante de la communication sociale. Ces observations sont en accords avec une augmentation des déficits sociaux et des troubles du langage chez les personnes autistes (Campbell *et al.* 2009). Par ailleurs, certaines études montrent que les TSA sont associés à l'environnement extérieur. L'étude de Volk montre une interaction entre le génotype *MET* avec l'allèle variant « C », l'exposition à des niveaux élevés d'air pollué et le risque d'avoir des TSA. En effet, les enfants qui ont l'allèle variant et dont les mères ont été exposées pendant leur grossesse à un environnement fortement pollué ont un risque plus important d'être atteint de TSA (Figure 27; Volk *et al.*, 2014).

Toutes ces données supportent l'idée selon laquelle une réduction ou un hypomorphisme de *MET* constitue un facteur de risque des TSA. Cependant, la présence de l'allèle variant dans la région promotrice de *MET* ne suffit pas à diagnostiquer un TSA.



**Figure 27 : La présence de l'allèle variant dans la séquence promotrice de MET est un facteur de risque des TSA.**

Le polymorphisme nucléotidique simple du « G » en « C » dans la région promotrice de *MET* est responsable d'une diminution de 50% de l'activité du promoteur. Du haut à gauche, au bas à droite : chez le génotype C/C, il est retrouvé une réduction du transcrit et de la protéine MET dans le cortex temporal. Des études de neuroimagerie chez l'Homme montre une réduction de la densité de matière gris dans les zones corticales exprimant MET et une altération fonctionnelle et structurelle chez les individus possédant l'allèle C/C. L'examen comportemental de sous-groupes de TSA révèle un enrichissement en allèle C/C chez les enfants qui ont des troubles de communication sociale et des problèmes gastrointestinaux (GI). Dans le système immunitaire, chez les individus avec le génotype C/C, il y a une activation de certaines cellules immunes, induisant une réduction de l'expression de l'interleukine 10 (IL-10). De plus, l'allèle C/C est enrichi chez les mères qui produisent des anticorps reconnaissant des protéines cérébrales fœtales associées au TSA. Enfin, il y a une augmentation du risque de TSA chez les enfants ayant l'allèle C/C et dont les mères ont été exposées pendant la grossesse à des niveaux élevés de pollution de l'air. D'après [Eagleson et al., 2016](#).

### 3. Association du gène humain *GRIN2B* avec les TSA

Le gène *GRIN2B* (chromosome 12p13) codant la sous-unité GluN2B des récepteurs NMDA a été identifié comme un gène candidat pour la prédisposition au TSA en 2011. L'équipe de Myers cherche à identifier des variations génétiques rares chez 285 patients atteints de TSA et de schizophrénie ([Myers et al. 2011](#)). L'étude révèle 3 gènes *MAP1A*, *CACNA1F* et *GRIN2B* sur lesquels il est constamment retrouvé un excès de mutations non-sens dans une ou deux des cohortes (TSA et schizophrénie) ([Myers et al. 2011](#)). Plusieurs sites de mutation ont été rapportés sur *GRIN2B* dans différentes cohortes de TSA. L'équipe de Tarabeux est la première à identifier une mutation *de novo* de *GRIN2B* chez des personnes ayant un TSA ([Tarabeux et al. 2011](#)). Puis consécutivement, l'équipe de O'Roak identifie 3 mutations *de novo* entraînant une perte de fonction de la protéine et une mutation faux-sens sur *GRIN2B*. Une

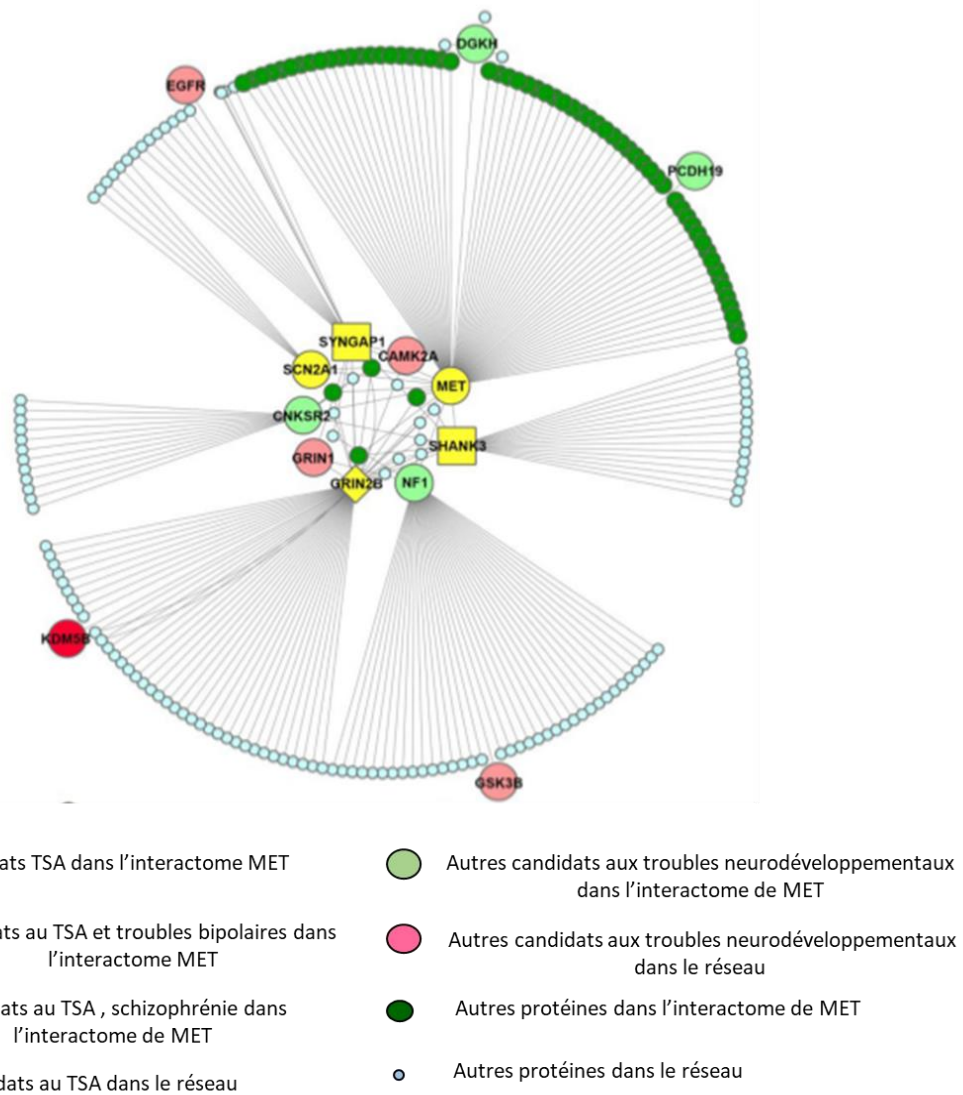
première étude s'intéresse à 209 familles présentant des cas de TSA sporadiques. Le séquençage de l'exome montre une mutation faux-sens affectant *GRIN2B* chez les cas de TSA (O'Roak *et al.* 2012b). La seconde étude séquence 44 gènes candidats dont le gène *GRIN2B* chez 2 446 personnes atteintes de TSA. Parmi ces gènes candidats, 6 gènes dont *GRIN2B* présentent des mutations récurrentes *de novo* chez la cohorte TSA comparé à 762 individus non TSA. En effet, le gène *GRIN2B* possède 4 sites de mutations dont 3 induisent une altération de la fonction pour la protéine GluN2B (O'Roak *et al.* 2012a).

D'autres populations ayant un TSA mettent en évidence une variation génétique de *GRIN2B*. Yoo et collaborateurs rapportent chez une population coréenne, 5 SNP situés sur le même haplotype de *GRIN2B* chez les personnes atteintes de TSA (Yoo *et al.* 2012). De plus, une cohorte familiale comprenant 1 945 sujets (TSA et contrôles) issue de la population chinoise démontre une association entre 19 SNP de *GRIN2B* et le risque de TSA. Parmi ces 19 SNP, 11 sont localisés dans la même zone sur le génome et 6 SNP ont le même haplotype GCGCG qui se retrouve fortement associé au TSA (Pan *et al.* 2015). Ces deux études différentes retrouvent 2 mêmes SNP variants (rs 1805247 et rs 1805522) sur *GRIN2B*. (Yoo *et al.* 2012; Pan *et al.* 2015). Le risque de TSA semble être associé aux variations génétiques communes chez les TSA qui pourraient être regroupées sur le même haplotype de *GRIN2B*.

Par ailleurs, à l'échelle cellulaire et moléculaire, l'étude de 3 variants de GluN2B à l'extrémité C-terminale (S1413L, L1422F et S1450F) chez le rongeur montre une dysfonction de fixation pour la protéine PSD-95. Le site S1413L correspond au S1415 chez l'Homme qui est un variant retrouvé chez certaines personnes atteintes de TSA et les sites L1422F et S1450F correspondent respectivement à L1424F et S1452F qui sont des variants présents chez certaines personnes schizophrènes (Myers *et al.* 2011; Tarabeux *et al.* 2011). Seule la mutation S1413L induit une diminution d'expression à la surface de GluN2B et une densité d'épines dendritiques moins importante (Liu *et al.* 2017). En revanche, les 3 mutations ne présentent pas de modifications des propriétés fonctionnelles des récepteurs NMDA suggérant que les déficits observés seraient dû à la réduction du trafic de GluN2B à la synapse. De plus, la sérine 1413 semble être importante pour la localisation ainsi que la régulation de l'activité de GluN2B (Liu *et al.* 2017).

Avant 2011, d'autres études avaient déjà mis en évidence des associations entre le gène *GRIN2B* et la schizophrénie (Ohtsuki *et al.*, 2001) ainsi que les troubles obsessionnels compulsifs (Arnold *et al.* 2004).

De façon intéressante, l'étude du réseau protéique de MET identifie 72 candidats en se basant sur des analyses d'immunoprécipitation et de spectrométrie de masse. Parmi ces 72 protéines, 9 sont des candidats associés à des troubles neurodéveloppementaux dont figure le gène *GRIN2B* (Figure 28; Xie *et al.*, 2016).



**Figure 28 : L'interactome de MET est un réseau enrichi à des protéines associées à des troubles neurodéveloppementaux.**

Au sein de l'interactome de MET, il y a 8 gènes candidats associés à des troubles neurodéveloppementaux dont la protéine GluN2B. Puis, il y a ensuite des protéines secondaires qui sont aussi en lien avec des troubles neurodéveloppementaux, parmi lesquels on retrouve le récepteur à l'EGF. Ces protéines ont été identifiées à partir de GeneMania. Adaptée de *Xie et al., 2016*.

#### 4. Les modèles animaux dans les troubles du spectre autistique

Le TSA est un trouble développemental persistant avec de multiples facteurs de risque. Parmi eux, des composantes génétiques et environnementales ont été suggérées sans pour autant connaître l'étiologie exacte. Toutefois, la forte concordance entre les jumeaux monozygotes suppose une importante part de composante génétique, encourageant le développement de modèles animaux, avec la souris et le rat pour sujets principaux. Ces modèles s'avèrent être des outils utiles afin de tester les découvertes épidémiologiques, d'améliorer les traitements et d'étudier les mécanismes biologiques sous-jacents aux comportements spécifiques du TSA. Une large variété de modèles sont décrits comme étant des modèles de TSA, et certains critères de validité sont utilisés pour juger de la pertinence d'un modèle ciblant les troubles psychiatriques. Premièrement, il s'agit de la validité apparente qui se réfère au degré de similarité phénoménologique entre le comportement du modèle animal et le symptôme d'intérêt humain. Puis, la validité constructive fait référence à la capacité du modèle animal à reproduire les processus dysfonctionnels cognitifs et/ou comportementaux du désordre psychiatrique (Robbins and Sahakian 1979; Belzung and Lemoine 2011). Le critère étiologique, qui peut être inclus dans la catégorie de validité constructive, définit l'existence d'étiologies identiques entre le phénomène humain et le modèle animal. Cette validité est difficile à vérifier car les causes d'une maladie psychiatrique sont bien souvent méconnues, le but du modèle étant justement de les établir. Le dernier critère est celui de la validité prédictive, se définissant comme la capacité du modèle à identifier des drogues pouvant avoir un potentiel thérapeutique pour traiter un désordre psychiatrique humain (Willner 1984).

Le modèle animal idéal de TSA doit inclure des analogies aux trois symptômes principaux, à savoir : des altérations d'interaction sociale, des déficits en communication et des comportements stéréotypés. Afin d'évaluer les comportements d'interaction sociale chez le rongeur, il peut être utilisé le test des 3 chambres, aussi connu comme le test d'interaction sociale de Crawley (Moy *et al.* 2004; Nadler *et al.* 2004). Il permet d'accéder de manière quantitative à la sociabilité et à la préférence à la nouveauté sociale. Dans un premier temps, ce test consiste à introduire une souris étrangère dans un des côtés de la chambre et de laisser le champ libre à la souris sujet de visiter les 3 compartiments de la chambre. On mesure alors le temps que la souris sujet passe avec la souris étrangère, comparé au temps passé dans la chambre vide. Une seconde souris étrangère est introduite dans le compartiment vide de la chambre, ce qui permet d'accéder au critère de préférence à la nouveauté sociale en mesurant le temps passé avec la seconde souris comparé à celui passé avec la souris familière (Iwata 2019). Le temps de « sniffing » est aussi un paramètre à quantifier, et celui-ci doit corrélérer avec le temps passé dans chacun des compartiments de la chambre.

Les déficits en communications et les troubles du langage sont des caractéristiques fondamentales dans le diagnostic des TSA. Bien que les rongeurs n'aient pas de facultés de langage, l'espèce présente néanmoins des mécanismes de communication sociale. En effet, les rongeurs sont capables d'émettre des signaux auditifs, incluant des vocalises à ultrasons,

des signaux sociaux olfactifs comme le dépôt de phéromones dans l'environnement. Une méthode bien caractérisée pour évaluer l'interaction en communication sociale est l'enregistrement des vocalises à ultrasons émises par les nouveau-nés lorsqu'ils sont en dehors du nid. En effet, ils émettent des appels de « détresse » correspondant à des ultrasons de l'ordre de 50 à 80kHz qui peuvent être détectés par leur parent. Le test standard consiste à séparer quelques minutes le nouveau-né entre P2 à P12 du nid, et d'enregistrer *via* un microphone ses vocalises à ultrasons afin de les quantifier. De faibles niveaux de vocalises chez le nouveau-né permet de détecter des déficits d'interaction en communication (Branchi *et al.* 1998; Baranek 2002). L'enregistrement des vocalises chez des souris adultes qui émettent peu ou pas de vocalises lors de la séparation avec leurs petits peut s'interpréter comme un déficit d'attachement. De plus, la seconde approche pour étudier la communication sociale chez les rongeurs est focalisée sur la communication olfactive. Des tests olfactifs d'habituation et de déshabitude permettent de mesurer l'intérêt à des nouveaux stimuli olfactifs et l'intérêt décroissant face aux mêmes stimuli répétés. L'utilisation d'un coton imbibé d'une litière sale contenant des souris étrangères est une des façons d'évaluer l'intérêt pour les odeurs, les phéromones sont en lien avec la communication et la sociabilité.

Les comportements stéréotypés peuvent être évalués par la piscine de Morris et le T-maze. La piscine de Morris est un test d'apprentissage consistant à localiser une plateforme cachée dans une piscine circulaire. La souris doit retrouver la localisation de la plateforme cachée et dans un second temps apprendre la localisation de la nouvelle plateforme. La difficulté à distinguer la nouvelle position de la plateforme nécessite des capacités d'apprentissage mais pourrait aussi être interprétée comme une résistance au changement. Pour le T-maze, il s'agit d'évaluer si la souris alterne bien entre les 3 bras du T-maze. S'il y a un défaut d'alternance entre les bras, cela peut signifier un déficit de mémoire de travail ou une certaine rigidité cognitive. Des tests d'actimétrie ou des tests quantifiant l'auto-toiletage, le « circling » ou encore les sauts permettent également d'évaluer les comportements stéréotypés moteurs chez la souris.

En complément de ces tests, de nombreux autres tests ciblant les symptômes associés au TSA peuvent être effectués. Parmi ces symptômes, il est fréquemment décrit de l'anxiété, de l'agressivité, des troubles du sommeil, des crises d'épilepsie dont certains tests correspondants sont récapitulés dans le tableau ci-dessous (Figure 29).

Déficits comportementaux principaux	Tests comportementaux
Déficit d'interaction social	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Approche social face à une souris étrangère/reconnaissance sociale/ préférence pour la nouveauté sociale : 3 chambres</li> <li>• Critère de nidation</li> <li>• Evaluer la sociabilité des souris juvéniles (P21)</li> </ul>
Déficit de communication sociale	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Vocalise à ultrasons (nouveau-nés et chez l'adulte)</li> <li>• Test olfactif</li> </ul>
Comportements stéréotypés et intérêts restreints	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Actimétrie</li> <li>• Y-Maze/T-maze (alternance spontanée)</li> <li>• Auto-toilettage</li> <li>• Circling/ Saut</li> </ul>
Symptômes associés	Tests comportementaux
Anxiété	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Openfield</li> <li>• O-maze</li> <li>• Barnes Maze</li> </ul>
Retard intellectuel	<ul style="list-style-type: none"> <li>• T-maze</li> <li>• Piscine de Morris</li> </ul>
Agressivité	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Resident-Intruder attack</li> <li>• Test du tube pour la dominance sociale</li> </ul>
Dépression	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Nage forcée</li> </ul>
Trouble du sommeil	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Observation en vidéo du temps de sommeil et de l'activité</li> </ul>
Réponses idiosyncrasiques à des stimuli sensoriels	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Sursaut de l'animal avec des tests sonores ou tactiles</li> <li>• Test du scotch ( défaut d'attention, de négligence)</li> </ul>

**Figure 29 : Tableau non-exhaustif des tests comportementaux en lien avec le phénotype autistique chez la souris.**

Puisque le TSA est une pathologie complexe, présentant des symptômes multiples et variés, force est d'admettre que certains symptômes tels que les déficits de langage ne peuvent pas être transposés chez les modèles de rongeur. Toutefois, de multiples analogies symptomatiques peuvent être étudiées dans des tests comportementaux chez la souris. Il est nécessaire d'étudier toutes les facettes du spectre de l'autisme avant de prétendre avoir un modèle relevant. Ces modèles animaux sont indispensables afin d'explorer d'anciennes et de nouvelles hypothèses dans le domaine des TSA.

Le récepteur MET est un récepteur à activité tyrosine kinase avec pour seul agoniste l'HGF. Cette liaison induit la dimérisation de MET et son auto-transphosphorylation sur des résidus tyrosines (Y1234 et Y1235). La propagation du signal permet le recrutement de protéines adaptatrices telles que Gab1 et Grb2. Il s'en suit alors l'activation des voies de signalisation Ras/MAPK et PI3k/Akt. Le couple MET/HGF est indispensable pour l'organogenèse et l'homéostasie tissulaire de certains organes périphériques mais il intervient aussi durant le développement.

La dérégulation de l'expression ou de la signalisation de MET et de l'HGF est une caractéristique décrite dans de nombreux types de cancers humains. Ainsi, des stratégies thérapeutiques sont développées afin de bloquer la signalisation de l'axe HGF/MET *via* des anticorps, des antagonistes et des TKIs.

Outre son implication en oncologie, le gène *MET* est reporté pour être un facteur de risque dans les troubles du spectre autistique, tout comme le gène *GRIN2B*. Concernant *MET*, c'est une mutation au sein de sa séquence promotrice, à l'origine d'un hypomorphisme du gène *MET* qui en fait un gène candidat au TSA. En ce qui concerne *GluN2B*, il s'agit de mutations génétiques qui sont retrouvés significativement chez des personnes atteintes d'un TSA.

MET is a tyrosine kinase receptor activated by its agonist, HGF. This binding induces MET dimerization and its auto-transphosphorylation on tyrosine (Y1234/1235) residues. This phosphorylation induces the recruitment of adaptor proteins such as Gab1 and Grb2, leading to the activation of Ras/MAPK and PI3k/Akt signaling pathways. The MET/HGF couple is involved in organogenesis and tissue homeostasis of some peripheral organs but also during development.

Dysregulations of its expression or signaling is described in many types of human cancers. Accordingly, some therapeutic strategies are developed in order to block the HGF/MET axis signaling *via* antibodies, antagonists and TKIs.

Besides its implication in oncology, *MET* gene is reported to be a risk factor in autism spectrum disorder (ASD), as the *GRIN2B* gene. Regarding *MET*, mutations present in its promoter sequence are responsible of *MET* hypomorphism, making it a strong candidate for ASD. About *GluN2B*, genetic mutations are found in patients affected by ASD



## PROJET DE THESE

Le TSA est un trouble neurodéveloppemental qui se définit par un déficit persistant de la communication sociale et de l'interaction dans différents contextes ainsi que par des comportements répétitifs, ou encore, par des activités ou centres d'intérêts restreints. L'étiologie de cette pathologie est encore inconnue mais l'existence d'une base génétique semble être une composante importante à étudier. Le gène *GRIN2B* et le gène *MET* sont deux gènes candidats figurant comme facteur de risque dans les TSA (Campbell *et al.* 2006; Myers *et al.* 2011).

L'HGF est le ligand du récepteur MET et partage 38% d'homologies avec le plasminogène (Lokker *et al.* 1992). La sérine protéase tPA active le plasminogène en plasmine. Toutefois, la littérature diverge quant à la capacité du tPA à convertir le pro-HGF en HGF mature (Mars *et al.* 1993; Zamolodchikov *et al.* 2019). Il a aussi été montré que le tPA peut activer des récepteurs à activité tyrosine kinase, les récepteurs à l'EGF (Bertrand *et al.* 2015). Ces derniers appartiennent également à la famille ErbB3, tout comme les récepteurs MET.

D'autre part, au sein du parenchyme cérébral, des travaux de notre équipe ont montré que le tPA augmente la signalisation calcique des récepteurs NMDA activés *via* une fixation et un clivage de la sous-unité GluN1 (Nicole *et al.* 2001; Fernández-Monreal *et al.* 2004; Lopez-Atalaya *et al.* 2008). Le tPA existe sous deux formes, une forme dite « simple chaîne » (sc-tPA) et une forme dite « double chaîne » (tc-tPA). L'étude de Parcq *et al.* a montré un effet différentiel de ces tPA sur la mort neuronale de type excitotoxique. En effet, contrairement au sc-tPA, le tc-tPA ne potentialise pas la mort neuronale de type excitotoxique induite par du NMDA (Parcq *et al.* 2012). De façon intéressante, les deux formes de tPA activent les récepteurs à l'EGF mais seul l'effet du tc-tPA sur la signalisation calcique serait aux dépends de ces récepteurs (Bertrand *et al.* 2015).

A la suite de ces travaux, les objectifs de ma thèse font suite à ces questions :

- Comment ces tPA modulent-ils différenciellement la signalisation glutamatergique ? Le récepteur MET est-il un partenaire impliqué dans ce mécanisme ?
- Si oui, quel est le mode d'action des deux formes de tPA sur ce partenaire ? De quelle(s) façon(s) le récepteur MET pourrait-il moduler la signalisation glutamatergique ?
- Des souris déficientes en tPA (tPA Null) ont été générées au laboratoire, quelles sont les caractéristiques comportementales et génétiques de ces souris tPA Null ? Présentent-elles des analogies phénotypiques avec les TSA ?

Ces travaux ont donné lieu à la rédaction d'une publication : « **Tissue type plasminogen activator dependant crosstalk between MET and NMDA receptors containing GluN2B : possible involment in autism spectrum disorders** ».

## RÉSULTATS

**ARTICLE:** “TISSUE TYPE PLASMINOGEN ACTIVATOR DEPENDANT CROSSTALK BETWEEN MET AND NMDA RECEPTORS CONTAINING GLUN2B: POSSIBLE INVOLVEMENT IN AUTISM SPECTRUM DISORDERS”.

**Titre :** L’activateur tissulaire du plasminogène module la signalisation NMDA en impliquant le récepteur à activité tyrosine kinase MET avec un possible rôle dans les troubles du spectre autistique.

**Contexte bibliographique :** Le tPA est une sérine protéase exprimée dans le SNC, couramment utilisée sous sa forme recombinante dans le traitement des AVC ischémiques à la phase aiguë. Son activité thérapeutique est basée sur l’activation du plasminogène en plasmine. En conditions physiologiques, le tPA est synthétisé et relâché sous sa forme simple chaîne (sc-tPA) et est converti en une forme double chaîne (tc-tPA). Outre, son rôle dans la conversion du plasminogène en plasmine, le tPA interfère avec de nombreux récepteurs incluant les récepteurs NMDA. De manière intéressante, il a été décrit un rôle différentiel entre ces deux formes de tPA. En effet, il a été rapporté sur des modèles expérimentaux que seul le sc-tPA est pro-excitotoxique en potentialisation l’influx calcique à travers les récepteurs NMDA. En parallèle, la fixation de l’HGF sur le récepteur MET induit une activation de type tyrosine kinase. La structure de l’HGF partage 38% d’homologies avec le plasminogène. *In vitro*, il a été reporté que l’uPA et le tPA peuvent convertir le pro-HGF en HGF mature. Toutefois, la littérature diverge quant à la capacité de conversion du tPA Nous avons étudié si l’axe HGF/MET interfère avec les deux formes de tPA et si cet axe peut moduler la signalisation des récepteurs NMDA.

**Matériels et méthodes :** Nous avons utilisé des cultures primaires de neurones corticaux (DIV 12-13) sur lesquelles nous avons réalisé des traitements au sc-tPA, au tc-tPA et à l’HGF afin d’étudier la signalisation neuronale.

**Résultats :** Nous avons montré que seul le tc-tPA active les récepteurs MET, conduisant à un rapprochement à la surface neuronale des récepteurs NMDA et MET. De plus, nous mettons en évidence que le tc-tPA induit une diminution de la phosphorylation de la sous-unité GluN2B et une dégradation de cette même sous-unité. Par ailleurs, nous avons observé sur des souris déficientes pour le tPA (tPA Null) des caractéristiques comportementales et génétiques en lien avec les troubles du spectre autistique.

**Conclusion :** Ces résultats permettent de mieux comprendre le rôle du tc-tPA sur la signalisation neuronale en impliquant dans ce mécanisme le récepteur MET.

## TISSUE TYPE PLASMINOGEN ACTIVATOR DEPENDANT CROSSTALK BETWEEN MET AND NMDA RECEPTORS CONTAINING GLUN2B: POSSIBLE INVOLVEMENT IN AUTISM SPECTRUM DISORDERS

Running title: MET and NMDA neuronal crosstalk

Élodie Hédou<sup>1</sup>, Sara Douceau<sup>1</sup>, Arnaud Chevilly<sup>1</sup>, Alexandre Varangot<sup>1</sup>, Hélène Party<sup>1</sup>, Audrey Thiebaut<sup>1</sup>, Eloise Lemarchand<sup>2</sup>, Mehdi Boudjadja<sup>2</sup>, Hortense Triniac<sup>1</sup>, Isabelle Bardou<sup>1</sup>, Carine Ali<sup>1</sup>, Mike Maillason<sup>3</sup>, Tiziana Crepaldi<sup>4</sup>, Paolo Comoglio<sup>4</sup>, Veronique Agin<sup>1</sup>, Benoit Roussel<sup>1\*</sup>, Denis Vivien<sup>1,5\*</sup>

<sup>1</sup> Normandie Univ, UNICAEN, INSERM U1237, Etablissement Français du Sang (EFS), Physiopathology and Imaging of Neurological Disorders (PhIND), Cyceron, Institut Blood and Brain @ Caen-Normandie (BB@C), 14000 Caen, France.

<sup>2</sup> University of Manchester, Faculty of Biology, Medicine and Health, Oxford Rd, Manchester M13 9PL, United Kingdom.

<sup>3</sup> Plateforme IMPACT Biogenouest, INSERM UMR 1232- Nantes University, Boulevard Benoni Goullin, 44200 Nantes, France.

<sup>4</sup> Candiolo Cancer Institute IRCCS-FPO, Candiolo, Turin, Italy.

<sup>5</sup> Department of clinical research, Caen-Normandie University Hospital, CHU, Avenue de la côte de Nacre, Caen, France.

Corresponding authors: Pr Denis Vivien, PhD; / Dr Benoit Roussel UMR-S Normandie Univ, UNICAEN, INSERM U1237, Etablissement Français du Sang (EFS), Physiopathology and Imaging of Neurological Disorders (PhIND), GIP CYCERON, Institut Blood and Brain @ Caen-Normandie (BB@C), Bvd Becquerel, BP 5229, 14074 Caen Cedex, France; Tel: + 33 2 31470166; Fax: + 33 2 31470222; E-mail: [vivien@cyceron.fr](mailto:vivien@cyceron.fr) / [broussel@cyceron.fr](mailto:broussel@cyceron.fr)

\*: authors with equal contribution

### Acknowledgments

This work was supported by grants from the INSERM (French National Institute for Health and Medical Research), the French Ministry for Research and upper Education, the Caen-Normandy University, the RHU project Marvelous (16-RHUS-0009), Fonds Européens de Développement Economique et Régional (FEDER) Normandie and AIRC IG n. 15572 to PC and the H2020-MSCA-ITN-2018. "ENTRAIN". ENdoThelium macRophage Alliance. We thank R.Albano for DO-24 mAb production and purification. There is no conflict of interest about the use of DO-24.

## ABSTRACT

We observed that tissue-type plasminogen activator (tPA)-deficient mice display reduced mRNA levels of the MET proto-oncogene tyrosine kinase receptor both in the entorhinal cortex and the amygdala, two brain structures implied in social and emotional behaviours. We then demonstrated in neurons, that only the two chains form of tPA (tc-tPA) activates MET receptors, leading to the formation of proximal complexes with *N*-Methyl-D-Aspartate receptors (NMDARs). By activating MET, tc-tPA leads to a selective endocytosis and proteasome-dependent degradation of GluN2B subunit-containing NMDARs. Accordingly, tc-tPA leads to a down regulation of neuronal NMDARs signalling, a process prevented by blockers of MET and mimicked by MET agonists. Interestingly, while MET and GluN2B are two genes candidate linked to autism spectrum disorders in human, we revealed that tPA-deficient mice display autistic-like features and *MET* deregulation. Altogether, these data propose that tc-tPA plays a key role in autistic-like behaviours by a mechanism involving a crosstalk between MET and GluN2B-containing NMDARs.

**Key words:** Autism spectrum disorders, tissue-type Plasminogen Activator, NMDA receptor, MET receptor

**Abbreviations:** DIV: days in vitro; GluN1: NMDA receptor subunit 1; HGF: hepatocyte growth factor; LTP: long term potentiation; NMDARs: N-methyl-D-Aspartate receptors; PLA: proximity ligation assay; sc-tPA: single-chain tissue-type Plasminogen Activator; tc-tPA: two-chain tissue-type Plasminogen Activator; ASD: autism spectrum disorders; RRSB: repetitive, restricted and stereotyped behaviours; USV: ultrasonic vocalizations; FST: forced swimming test.

## INTRODUCTION

Tissue-type plasminogen activator (tPA) is a widespread serine protease, expressed in the central nervous system (CNS)<sup>1,2</sup>, and is currently used under its recombinant form in the treatment of thromboembolic diseases including stroke<sup>3</sup>. Its therapeutic activity relies on the activation of plasminogen into active plasmin<sup>4</sup>. tPA is synthesized and released as a single-chain form (sc-tPA) that is processed into a two-chain form (tc-tPA) within the circulation<sup>5</sup>, however, both forms display the same fibrinolytic activity<sup>6</sup>. Extending its functions above the conversion of plasminogen into plasmin, tPA interferes with a variety of neuronal receptors, including *N*-Methyl-D-Aspartate receptors (NMDARs)<sup>7</sup>. Interestingly, only the sc-tPA was reported to promote NMDARs signalling in experimental models<sup>8,9</sup>. At the opposite, the tc-tPA was reported to decrease neuronal NMDARs signalling<sup>9</sup>.

Hepatocyte growth factor (HGF) and its receptor MET are present in the CNS<sup>10</sup>. Binding of HGF to MET results in tyrosine kinase activation<sup>11</sup>. The structure of HGF shares 38% of sequence homology with plasminogen<sup>12</sup>. The pro-HGF is converted to its active form by a plasmin-dependent extracellular proteolytic processing<sup>13</sup>. It has also been reported in vitro that both uPA and tPA, as well as factor XII, were able to activate pro-HGF<sup>14–16</sup>. However, a controversy is present in the literature about the capacity of tPA to activate pro-HGF into its active form<sup>17,18</sup>.

In cultured neuronal cells, HGF enhances neurite extension and branching, maturation of the dendritic spine and membrane translocation of NMDARs<sup>19,20</sup>. HGF induces phosphorylation of the GluN2B subunit of NMDARs<sup>20</sup> and endorses neuronal survival<sup>21</sup>. Interestingly, HGF enhances NMDA currents and synaptic plasticity in the hippocampus, as well as synaptic long-term potentiation (LTP) in the CA1 region of the hippocampus in vitro<sup>22,23</sup>. Accordingly, the HGF-MET axis contributes to the activity-dependent regulation of physiological learning and memory performance in the adult brain<sup>24</sup>.

Numbers of neurological and psychiatric diseases are linked to malfunction of NMDARs during brain development and in adulthood<sup>25</sup>. For instance, schizophrenia and autism spectrum disorders (ASD)<sup>26,27</sup> are associated with either the presence of NMDARs auto-antibodies and/or missense variants of its regulatory GluN2B subunit<sup>28–31</sup>. Mutations of other neuronal receptors have been reported to contribute to ASD, including MET<sup>32,33</sup>.

In the present study, we have observed that tPA-deficient mice displayed autism-like behaviours, a phenotype associated with reduced levels of MET mRNA in the amygdala and the entorhinal cortex, two brain structures involved in social and emotional behaviours<sup>34–36</sup>. To explain these observations, we revealed that tc-tPA is capable to activate neuronal MET leading to a proteasome dependent down-regulation of the GluN2B subunit-containing

NMDARs and subsequent signalling. All together, these data propose that the neuronal serine protease tPA may contribute to autistic-like behaviours by an original mechanism involving a tc-tPA-dependent crosstalk between NMDARs and MET.

## MATERIAL AND METHODS

### Ethical statement

Experiments were performed in accordance with French ethical laws (act no. 87–848; Ministère de l'Agriculture et de la Forêt) and European Communities Council Directives of September 22, 2010 (2010/63/UE) guidelines for the care and use of laboratory animals, and were approved by the local and regional ethics committees (authorisation code CENOMEXA 0113-03). All efforts were made to limit animal suffering. None of the experimental procedures induced animal mortality. All experiments were performed following the ARRIVE guidelines ([www.nc3rs.org.uk](http://www.nc3rs.org.uk)), including randomization for the administration of test substances as well as analyses that were performed in a blinded manner. Male mice were housed on a 12-h light (7 a.m.)/dark (7 p.m.) cycle with *ad libitum* access to water and rodent chow (10 mice per cage).

### Chemicals

(5*R*,10*S*)-(-)-5-Methyl-10,11-dihydro-5*H*-dibenzo[*a,d*]cyclohepten-5,10-iminemaleate (MK-801; 0924) and N-methyl-D-aspartate (NMDA; 0114) were purchased from Tocris (Pittsburgh, USA). Human tPA (Actilyse®) was from Boehringer Ingelheim (Paris, France). tPA buffer was 34.84 mg/mL arginine, 10.72 mg/mL phosphoric acid, 0.1 mg/mL Tween 80. Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM), poly-D-lysine, glutamine, cytosine β-D-arabinoside (Ara-C), glycine, foetal bovine serum, horse serum, sodium chloride (NaCl), HEPES, potassium chloride (KCl), calcium chloride (CaCl<sub>2</sub>), magnesium sulfate (MgSO<sub>4</sub>), sodium phosphate monobasic (NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>), D-glucose, sodium dodecyl sulfate (SDS), trizma base, trizma hydrochloride, paraformaldehyde, sucrose, bovine serum albumin (BSA), Triton X-100, anti-rabbit (A0545) peroxidase antibody, protease inhibitor cocktail (P8340), phosphatase inhibitor cocktail (P5726) and Lactacystin (CAS1258004) were from Sigma-Aldrich (Saint-Quentin Fallavier, France). Phosphate-buffered saline solution (PBS; 14190-094), Pierce BCA Protein Assay Kit (23225) ECL-Plus detection system (32132) and lipofectamine® 2000 reagent was purchased from Thermo Fisher Scientific (Illkirch-Graffenstaden, France). Lactate dehydrogenase (LDH) detection kit (11644793001) were purchased from Roche Diagnostics (Meylan, France). Series S CM5 sensor chips and HBS-EP buffer (10mM buffer with 2.7mM KCl, 150mM NaCl, 5mM EDTA and 0.05% surfactant P20, pH 7.4), Amine Coupling Kit [1-

ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl) carbodiimide hydrochloride (EDC) and *N*-hydroxysuccinimide (NHS); 1.0M ethanolamine (pH 8.5)], immobilization buffer (Maleate Buffer pH 6.5), regeneration solutions (Ethanolamine 1M pH 8.5, for analysis) were purchased from GE Healthcare Life Science (Uppsala, Sweden).

### RNA-sequencing

RNA-sequencing and analysis have been performed by the company Helixio (Saint-Beauzire, France). Three RNA-seq libraries per population (three biological replicates) were prepared using the TruSeq Stranded mRNA sample Prep kit (Illumina, San Diego, CA, USA) 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 Fischer) and checked with Nanodrop ND-1000 (Thermo Fisher). Libraries were prepared with three kits: NEBNext Ultra II Directional Library prep Kit (New England Biolabs, Ipswich, MA, USA), 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, Cambridge, UK). 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>). Tests have been performed between supplied conditions. FPKM values were calculated for each transcript in each sample (geometric library normalization, pooled dispersion method). Analyses 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.

### Preparation of sc-and tc-tPA

Sc- and tc-tPA were prepared from Actilyse® (Boehringer Ingelheim). Sc-tPA was obtained by dialysing the commercial solution in HEPES buffer (4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid, 0.3 M, pH 7.4, Sigma-Aldrich) using dialysis cassettes (Slide-A-Lyzer® 10K; ThermoScientific). Tc-tPA was prepared by overnight incubation of Actilyse® with plasmin-coupled Sepharose 4B at 37°C, followed by two hours of incubation with aprotinin-coupled Sepharose 4B at room temperature to eliminate traces of free plasmin. Then, tc-tPA was dialyzed in HEPES buffer (0.3 M, pH 7.4, Sigma-Aldrich) using the same dialysis cassettes as for sc-tPA preparation. Finally, sc-tPA (i.e. dialyzed Actilyse®) and tc-tPA preparations ratio were controlled by sodium dodecylsulphate polyacrylamide gel

electrophoresis (SDS-PAGE; 10% polyacrylamide gels) with coomassie blue staining, and the amyolytic activity has been checked by spectrozyme assay.

### **Neuronal cell cultures**

Culture of cortical neurons were prepared from foetal mice (embryonic day 14) as previously described<sup>101,102</sup>. Cortices were dissected and mechanically dissociated in DMEM, seeded on 24 well plates or on dishes previously coated with poly-D-lysine (0.1mg/mL; Sigma-Aldrich P6407) and laminin (0.02mg/mL; Life Technologies 23017-015). Cells were cultured in DMEM (Sigma-Aldrich D5671) supplemented with 5% foetal bovine serum (Sigma-Aldrich F9665), 5% horse serum (Sigma-Aldrich H1138) and 2 mM glutamine (Sigma-Aldrich G3156). Cultures were maintained at 37 °C in a humidified 5% CO<sub>2</sub> atmosphere. Cytosine β-D-arabinoside (10 μmol/l; Sigma-Aldrich C1768) was added after 3 day in vitro (DIV) to inhibit glial proliferation. Treatments were performed after 12–13 DIV for NMDA-mediated neurotoxicity assays, calcium imaging experiments, immunoblottings.

### **Astrocytes cultures**

Cortical astrocyte cell cultures were prepared from 1 to 3 days postnatal mice. Cerebral cortices were dissected and dissociated in DMEM. Then, cells were plated in DMEM supplemented with 10% fetal bovine serum, 10% horse serum and 2 mM glutamine on poly-D-lysine (0.1 mg/ml) and laminin (0.02 mg/ml)-coated T75 Flasks. The medium was changed two times weekly until the cell reach confluence, after cells were maintained in DMEM supplemented with 5% fetal bovine serum, 5% horse serum and 2 mM glutamine. To maintain neuronal cells without serum (glio-conditioned medium), astrocytes cultures are incubated over night with Neurobasal Medium supplemented with 0.4 mM glutamine, 2% B27 supplement 50X and penicillin streptomycin (10,000 IU/ml; 10,000 UG/ml).

### **Hypodense neuronal cultures**

Primary cultures of cortical neurons were prepared from fetal mice (embryonic day 14) as previously describe<sup>101,102</sup>. Cortices were dissected and dissociated in DMEM and plated (250 000 cell/ mL) on glass bottom microwell dishes (MatTek Corporation, P35G-1.5-14-C, Ashland, MA, USA) earlier coated with poly-D-lysine (0.1mg/ml) and laminin (0.02mg/ml). Cells were cultured in Neurobasal Medium supplemented with 0.4 mM of glutamine, 2% B27 supplement 50X, 10% horse serum and penicillin/streptomycin (10 000 IU/ml; 10 000 UG/ml). After 1 hour, media were replaced by conditioned medium (Neurobasal Medium supplemented with 0.4 glutamine, 2% B27 supplement 50X and penicillin/streptomycin (10 000 IU/ml; 10 000



UG/ml) obtained from primary cultures of astrocytes. Cultures were maintained at 37 °C in a humidified 5% CO<sub>2</sub> atmosphere. Cytosine β-D-arabinoside (10 μmol/l; Sigma-Aldrich C1768) was added after 3 DIV. Cultures have been used for neuronal transfection and immunocytochemistry.

### **Proximity ligation assay**

The proximity ligation assay was performed using the Duolink In Situ Kit (Olink Bioscience, Uppsala, Sweden) according to the manufacturer's instructions with the following modifications: cell dishes were treated with buffer, rHGF, sc-tPA and tc-tPA for 1 hour, then fixed with paraformaldehyde/4% sucrose. PLA probe incubation was 2 hours and amplification step was extended to 2 hours. Blocking (1 hour at room temperature) and primary antibody (overnight at 4 °C) incubations were performed in a 4% bovine serum albumin and 0.2% Triton X-100 solution. Goat anti-GluN1 (1:250; Santa-Cruz Biotechnology sc-1467, Dallas, TX, USA) and rabbit anti-MET (1:250; Santa-Cruz Biotechnology sc-161) were diluted in the blocking solution. The anti-rabbit (+) PLA probe (1:5) along with an anti-rat (-) probe (1:100) were diluted in the blocking solution. A Goat anti-rat (Jackson Immuno Research Inc., Suffolk, UK) was used to make a probe anti-rat according to the manufacturer's instructions using the Duolink Probemaker (Olink Bioscience, Uppsala, Sweden). Slides were mounted in a mounting medium containing DAPI (4',6-diamidino-2-phenylindole) and 0.1% deparaphenylene-diamine diluted in phosphate-buffered saline and glycerin. The negative control represents the PLA without primary antibodies. Ten stacks of picture (0.40 μm per section) were taken from 10 different areas of every well with a confocal inverted microscope (Leica SP5, Leica, Nanterre, France). Imaris-modeling: A "cell function" analysis was performed in order to label neuronal cell bodies, then the "spot" function was used to detect positive PLA puncta prior counting. This procedure was performed blinded by using a Z stack-projection from 10 independent areas per condition and per experiment of a total of 4 independent experiments. This procedure was performed blinded by using a Z stack-projection from 10 independent areas per condition and per experiment of a total of 4 independent experiments. Concerning the quantification, for each area, the quantity of punctua has been subtracted to the mean quantity of buffer.

### **Crossed immunoprecipitation assays**

Supernatants from TNT buffer (50 mM Tris-HCl, pH 7.4, 150 mM NaCl and 0.5% Triton X-100)-lysed cultured cortical neurons (13 DIV) (100 μg of total proteins) were incubated overnight at 4 °C with an antibody (raised against the GluN1 subunit of NMDAR (1μg, Santa-cruz Biotechnology, Dallas, USA, sc-1467). This antibody was coupled to protein G-sepharose beads as described by the manufacturer (GE Healthcare, Buc, France) for immunoprecipitation

procedures, including repeated washes in TNT buffer. Then, immunoprecipitated proteins were separated by 10% SDS-PAGE and immunoblots were revealed with either an antibody raised against total GluN1 (Santa-Cruz Biotechnology, sc-1467, diluted 1:1000) or an antibody raised against total MET (R&D systems, Noyal Châtillon sur Seiche, France, AF527, diluted 1: 1000) by following the procedure described above (see « Immunoblotting » section).

### Calcium video microscopy

Experiments were performed at room temperature on the stage of an inverted calcium microscope (Leica DMI6000B, Nanterre, France) equipped with a 150 W Xenon high stability lamp and a Leica 40x, 1.3 numerical aperture epifluorescence oil immersion objective. Fura-2 ratio images were acquired with a Digital CMOS camera (ORCA-Flash2.8 C11440-10C, Hamamatsu, Japan) and digitized (2048\*2048) using Metafluor® 6.1 software (Universal Imaging Corporation). Cultures were transferred into a serum-free HEPES-buffered saline solution (HBBSS: NaCl 116mM, KCl 5,4mM, CaCl<sub>2</sub> 1,8mM, MgSO<sub>4</sub> 0,8mM, HEPES 12mM, NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0,34mM, D-Glucose 5,5mM, NaHCO<sub>3</sub> 25mM, Glycine 10μM) at DIV 12 and loaded with Fura-2-AM (10μM; Invitrogen, Life Technologies F1201, Saint Aubin, France) diluted in pluronic acid (Life Technologies P-3000MP) for 45 min at 37°C. The Ca<sup>2+</sup> bound form of Fura-2 gets excited at 340nm, the Ca<sup>2+</sup> unbound form at 380nm and both recorded at 510nm. Neurons were washed with HBBSS flux and NMDA stimulations (2 X 25μM for 30s) were applied using a peristaltic pump. Prior a second run of NMDA stimulations, neurons were incubated for 45 min with either sc-tPA (300nM), tc-tPA (300nM), recombinant HGF (50ng/mL; rHGF; Gibco, Life Technologies PHG0254, Saint Aubin, France) , DO-24 antibody (50ng/mL; agonist of MET)<sup>103</sup>, JNJ-38877605 (500nM; antagonist of MET)<sup>104</sup> or SU11274 (2μM; inhibitor of MET activation; Selleckchem S1080, Houston, TX, USA)<sup>51</sup> or Glunomab® (antagonist of the action of tPA on the GluN1 subunit of NMDAR)<sup>59,105</sup> alone or in combination, as mentioned in the legend of the corresponding figures. For each cell, the area under curve (AUC) corresponding to the intracellular calcium influx induced by NMDA (ratio 340/380) was calculated before (AUCb) (mean of the two first NMDA stimulations) and after treatment (AUCa) (mean of the two second post-treatment stimulations). We then compared, for each cell, the amount of NMDA-induced calcium influx after treatment with the NMDA-induced calcium influx recorded before treatment. Thus, each cell is its own control with an expression of the modification of the NMDA-induced calcium influx due to the treatment or their excipient performed between the two rounds of stimulations, expressed as a percentage of response to treatments (% of responsiveness). % of responsiveness= [(AUC)a/(AUC)b]\*100 with (AUC)a : sum of area under curve of Fura-2 ratio during both NMDA stimulations after treatment and (AUC)b : sum of area under curve of Fura-2 ratio during NMDA stimulations before treatment.

### Surface plasmon resonance.

SPR experiments were performed on a Biacore T200 (GE Healthcare) at 25°C. HBS-EP buffer was filtered through a 0.45µm [membrane filter](#) and degassed prior to use. First, recombinant Human HGF R / MET Fc chimera were immobilized on the chip surface by amine coupling. Briefly, recombinant MET receptor was diluted to 20µg/mL in 5mM Maleate solution at pH 6.2. The diluted MET protein was soon covalently immobilized to a flow cell of CM5 sensor chip via primary amine group, using standard Amine Coupling Kit. HGF, sc-tpA, tc-tpA were then analyzed in a “Single Cycle kinetics” (SCK) models over the MET immobilized chip.

The affinity (KD) and kinetics parameters (ka and kd) of HGF, sc-tpA and tc-tpA over MET were determined by using series of proteins dilutions in a “Single Cycle Kinetics” (SCK) model. HGF, sc-tpA and tc-tpA, as the analytes, were diluted in HBS-EP buffer with concentrations ranging from 0.6nM to 50nM for HGF and from 25nm to 2000nM for sc-tpA and tc-tpA, which flowed over the immobilized MET and the obtained response units (RUs) were recorded. The flow rate was at 30µL/min with 120s for binding and 600s for dissociation. Then, the sensor chip surface was regenerated with Ethanolamine 1M, pH 8.5 for 30s. The dissociation equilibrium constant, KD, and kinetics parameters, kd and ka, were determined by direct curve fitting of the sensorgrams to a Langmuir 1:1 model of interaction.

### Neuronal transfection

Transfections were performed at 11 DIV on hypodense neuronal cultures. Neuronal cultures were washed with HEPES and Bicarbonate Buffered Salt Solution (HBBSS; composition in calcium video microscopy section) prior an 8 hours incubation in the presence of pCDNA5-GFP plasmid and lipofectamine® 2000 containing HBBSS. Then, HBBSS is replaced by regular media as described above (hypodense neuronal cultures section).

### Immunocytochemistry

Hypodense neuron cultures (13 DIV) were used to visualize neural extensions. Cultures treated with tc-tPA (300nM) for 10 or 30 min and washed with HBBSS. Neurons were fixed in paraformaldehyde 4% for 20min at room temperature, washed in PBS (0.1M) followed by a 1 hour blockage in PBS supplemented either with BSA 4% and 0.3% Triton X100 for the permeability conditions or either with BSA 4% for the surface experiments. A rabbit anti-GluN2B N-term antibody (Alomone Labs, AGC-003, diluted 1:500) was incubated overnight at 4°C. Neurons were subsequently rinsed 3 times with PBS (0.1M) and were incubated 1 hour at room temperature with an Alexa-Fluor 488-conjugated anti-rabbit secondary antibody (Jackson Immunoresearch, West Grove, PA, USA, 1:800). The specificity of the

immunoreactions was tested using a negative control procedure, i.e. the omission of primary or secondary antibodies. Immunocytochemistry were examined with a Leica TCS SP8 confocal /STED microscope 3x microscope with an oil-immersion 100x, 1.44-N.A objective and further processed using ImageJ software (NIH; Bethesda, MD, USA). The number of punctua per 100µm on dendrites was calculated with the plugin "Trackmate".

### **Immunoblotting.**

Immunoblottings were performed from treated-cortical neurons (DIV12/13). Cells were dissociated in ice-cold TNT buffer (50 mM Tris-HCl, pH 7.4, 150 mM NaCl, and 0.5% Triton X-100) supplemented with a cocktail of protease and phosphatase inhibitors. Debris were removed by centrifugation (12,000 × g at 4°C, 20min). Protein quantification was performed according to the BCA method. Proteins (20 µg) were resolved on polyacrylamide gel under denaturing conditions and transferred onto a polyvinylidene difluoride membrane. Membranes were blocked with Tris-buffered saline (10 mM Tris and 200 mM NaCl, pH 7.4) containing 0.1% Tween 20 and 1% BSA for 1h at room temperature. Blots were incubated overnight with primary antibodies at 4°C. The primary antibodies used were anti-phospho-MET (Y1234/1235) (Santa Cruz Biotechnology, sc-101736, diluted 1:1000), anti-Met (R&D systems, AF527, diluted 1:1000), anti-HGF (Invitrogen, SBF5, diluted 1:1000), anti-GluN2B (abcam, ab65783, diluted 1:1000), anti-phospho-GluN2B (Y1474) (abcam, ab194923, diluted 1:1000), anti-GluN2A (Y1325) (abcam, ab16646, diluted 1:1000), anti-GluN2A (abcam, ab14596, diluted 1:1000), anti-GluN1 (Santa-Cruz Biotechnology, sc1467, diluted 1:1000), anti-actin (Sigma-Aldrich, A2066, diluted 1:1000). This step was followed by incubation with the appropriate peroxidase-conjugated secondary antibody which were goat anti-rabbit (Sigma, A05445, diluted 1:50000), rabbit anti-goat (Sigma, A8919, diluted 1:160000). Immunoblots were revealed with an enhanced chemoluminescence ECL-Plus immunoblotting detection system and imaged in an Image Quant LAS 4000 Device (GE Healthcare, Orsay, France).

### **Generation of transgenic mice**

tPA<sup>lox/lox</sup> mice were generated as previously described (Pasquet et al., 2018). tPA Null mice were generated by the Mouse Clinical Institute (ICS, Illkirch, France). Briefly tPA<sup>lox/lox</sup> mice (C57BL6J background) in which exon 3 is flanked by loxP sites (see Pasquet et al., 2019) were crossed with CMV-Cre mice to induce cre-mediated excision of the third exon in germline. Mice were genotyped by PCR analysis and southern blots, using tail genomic DNA samples, for the presence of loxP sequences.

## Behavioural assays

C57BL/6J tPA Null mice and their corresponding WT littermates (tPA+/+) were used in this study. The mice were housed in standard polypropylene cages (22 x 37 x 19 cm, Charles River, L'Arbresle, France; 5 mice per cage) containing nesting material and cardboard tubes. These housing conditions were designed to meet animal welfare and to allow for the expression of natural behaviors. The mice were maintained in a temperature and humidity-controlled room (12-hour light/dark inverted cycle) and had free access to water and food (Animal care facilities: Centre Universitaire de Ressources Biologiques (CURB), Caen Normandy University, France; approval n° A14118015). All the experiments were performed between 8AM-5PM in a room with dim illumination (6 lx). All behavioural tests were performed by an investigator blinded of the genotype. Our experimental methodology consisted of investigating the major (social disabilities and RRSB) and associated (learning deficits, depressive-like behavior) autistic criteria by means of a range of behavioral tests: ultrasonic vocalizations recordings, actimetry, T-maze and forced swimming test (see below).

Ultrasonic vocalizations. Ultrasonic vocalizations (USV) from pups were recorded on postnatal days P2 to P12. Each pup was separated from its mother and placed in a soundproof chamber for 5 min (23 x 28 x 18 cm; Imetronic®, Pessac, France). The chamber was equipped with an ultrasound microphone (Avisoft Ultrasoundgate, condenser microphone capsule CM16/CMPA, Avisoft Bioacoustics, Germany) placed 20 cm above the floor, and sensitive to frequencies of 10-250 kHz. USV were recorded using Avisoft recorder software (version 4.2; sampling rate of 250 kHz, format 16 bit). For acoustical analysis (number and duration of calls), recordings were transferred to SASLab Pro software (version 5.2; Avisoft Bioacoustics) and a fast Fourier transformation was conducted (256 FFT-length, 100% frame, Hamming window, and 75% time window overlap).

Actimetry- Rearing activity was quantified by using a rack of eight activity cages equipped with vertical infrared beams located across the cage (Imetronic®). Mice were placed in individual acrylic chambers (30 x 20 x 20 cm) for 30 min. The number of vertical movements was determined by breaks in movement-sensitive photo-beams that were then converted into locomotor activity counts. The frequency of rearing is an indicator of motor repetitive behaviours<sup>107</sup>.

T-maze- To assess learning performance, we used a T-maze which required the use of distal landmarks to orientate properly<sup>45-47</sup>. The standard T-maze used in this study was constructed of white plastic with three identical arms (31 x 8 x 15 cm; BMP Chaudronnerie, Bretteville-sur-Odon, France). Extra-maze distal cues were suspended on the black curtains of the room walls at a distance of 123 cm from the maze (from the top of the cues to the center of the maze). The behavioral procedure consisted of an acquisition phase during which one randomly-chosen arm of the T-maze was closed with a guillotine door. Each mouse was then placed in the start arm, the head facing away from the center of the maze, and allowed to freely visit the accessible parts of the maze (Arm 1/Arm 2) for 5 min. Spatial performance was assessed through the comparison of the number of visits made in each arm (considered only when the mouse passed two-thirds of the arm). It has been shown that control mice examine the two arms equivalently, therefore indicating the built of a spatial representation of the environment by processing of remote spatial cues.

Forced swimming test (FST)- This test is the gold standard to screening depression-related behavior of rodents<sup>48,108</sup>. Mice were gently placed in a glass cylinder (9 cm in diameter, 30 cm high) filled with 20 cm of water ( $\pm 25^{\circ}\text{C}$ ) for a single 6-min exposure. After intense escape-directed behavior (i.e. swimming, climbing), animals stop struggling and show passive immobile behavior. Duration of immobility was recorded during the last 4 min of the test. This test reflects behavioral despair.

## Statistics

Data have been analysed with GraphPad Prism software. Shapiro-Wilk tests were used to ensure a normal distribution. Parametric data were analyzed for significance using one way or two-way ANOVA. Datasets with non-normal distributions were analysed using two-tailed Mann-Whitney U tests or Kruskal-Wallis tests. Significance levels were defined as \*  $P < 0.05$ , \*\*  $P < 0.01$ , \*\*\*  $P < 0.001$ , \*\*\*\*  $P < 0.0001$ .

## SUPPLEMENTARY

### PCR GENOTYPING

Mouse genomic DNA was isolated from tail biopsies following overnight digestion at 55°C in a solution of directPCR Lysis Reagent (Viagen Biotech), followed by heat inactivation. PCR was performed using the primer pairs to distinguish the tPA wild type and tPA Null mice. Sequence of primers used are : Lf/Lr: Lf 5'-GGGTTGAGGTTAAGAACCAGTTTGGG-3'; reverse Lr 5'-TCGGCACATGGCTAGTGGATTTAA-3' which generate a 0.219kb band; Lf/Lxr Lxr 5'-GTATAGCATACATTATACGAAGTTATCTGCAG-3' which generate a 0.217kb band; Lf/Er2 Er2 5'-GGTGAGAGCCCAGGAATACCTAGATGA-3' which generate a 1.3kb band.

### Excitotoxic neuronal death.

Neurons (12-13 DIV) were rinsed three times with serum-free medium (DMEM) supplemented with glycine (20 µM), excitotoxicity was induced by exposure to NMDA (10 µM) in serum-free DMEM supplemented with 20 µM of glycine for twenty-four hours (Roussel et al., 2011). NMDA was applied alone or in the presence of either sc-tPA (300nM), tc-tPA (300nM), recombinant HGF (50ng/mL; rHGF), anti-HGF blocking (50ng/mL; sc-1356)<sup>109</sup>, DO-24 antibody (50ng/mL; agonist of MET)<sup>103</sup>, JNJ-38877605 (500nM; antagonists of MET)<sup>104</sup> or SU11274 (2µM; inhibitor of MET activation)<sup>51</sup> alone or in combination, as mentioned in the legend of the corresponding figures. Twenty-four hours later, neuronal death was quantified by measurement of lactate dehydrogenase (LDH) released from damaged cells<sup>110</sup>.

## RESULTS

**Downregulation of MET in tPA Null mice.** tPA is known to interfere with a large number of signalling pathways, but translational investigations related to tPA effects are poor. Here, a new strain of tPA-deficient mice (tPA Null) has been used (see methods section). This strain was generated by targeting the exon-3 of the *Plat* (tPA) gene using a Cre-mediated deletion on a C57/BL6NTac background (supplementary 1) to avoid off-targeted mutations due to the 129-derived ES background previously described for the tPA-deficient mice used so far in the literature<sup>37</sup>. Using this new model of tPA-deficient mice, whole RNA sequencing and KEGG pathway analysis were performed from several brain structures (hippocampus, amygdala, prefrontal cortex, parietal cortex and entorhinal cortex) of adult mutant mice (8-10 weeks) and their wild-type (WT) littermates (Fig. 1). 62 genes were differentially expressed in the hippocampus between tPA Null mice and WT mice (18 up-regulated and 44 down-regulated; Fig. 1a,f  $n = 3$  tPA WT and tPA Null mice), 86 in the amygdala (39 up-regulated and 47 down-regulated; Fig. 1b,g,  $n = 3$  tPA WT and tPA Null mice), 110 in the prefrontal cortex (31 up-regulated and 79 down-regulated; Fig. 1c,h  $n = 3$  tPA WT and tPA Null mice), 154 in the parietal cortex (91 up-regulated and 63 down-regulated; Fig. 1d,i  $n = 3$  tPA WT and tPA Null mice) and 185 in the entorhinal cortex (29 up-regulated and 156 down-regulated; Fig. 1e,j  $n = 3$  tPA WT and tPA Null mice). Among these genes differentially expressed, one as retained our attention, MET, which was significantly down-regulated in both the amygdala (-31.71%,  $P = 0.00065$ ) and the entorhinal cortex (-29.33%,  $P = 0.0008$ ) (Fig. 1k), two structures reported to play key roles in psychiatric disorders<sup>38,39</sup>.

### tPA-deficient mice demonstrate autistic-like behaviours.

As MET is a candidate gene linked with ASD in human<sup>32</sup>, and because MET is deregulated in tPA null cerebral structures involved in ASD (Fig. 1), we sought to determine the ASD-like phenotype in these mice. ASD symptoms are a range of heterogeneous neurodevelopmental disorders but two-core affected domains are considered to be hallmarks of the disease<sup>40</sup>: i) impaired social communication and interaction, ii) repetitive, restricted and stereotyped behaviours (RRSB). In addition, individuals with ASD present, in some cases, associated symptoms such as mental retardation and mood disorders. We thus first assessed social abilities of our tPA null mice through scoring separation-induced ultrasonic vocalizations (USV) in pups on postnatal days 2 to 12. WT mouse pups showed USV with a normal developmental course<sup>41,42</sup>, emerging shortly after birth, peaking at around P8, and then decreasing at around P10 (Fig. 2a; tPA WT:  $P = 0.0091$ ). Interestingly, tPA Null pups emitted significantly fewer USV than tPA control pups along the tested postnatal period, especially between the postnatal days 2 and 6 (Fig. 2a; P2: -56 %,  $P = 0.0482$ , tPA WT:  $n = 20$ ; tPA Null:  $n = 20$ ; P6: -61.5%,  $P =$



0.015, tPA WT:  $n = 19$ , tPA Null:  $n = 20$ ). Moreover, mutant pups spent less time calling than their littermates control (Fig. 2b; P2: -64%,  $P = 0.0215$ , tPA WT:  $n = 20$ ; tPA Null:  $n = 20$ ; P4: -9%,  $P = 0.0227$ , tPA WT:  $n = 20$ , tPA Null:  $n = 20$  and P6: -66%,  $P = 0.0129$ , tPA WT:  $n = 19$ , tPA Null:  $n = 20$ ). These results show social disabilities in tPA Null mice, a recurrent feature of autistic-like phenotype (Fig. 2g). We then assessed RRSB in mice by scoring for the repetition of spontaneous behaviours using activity boxes. RRSB are considered as repetitive motor behaviours, apparently purposeless, with insistence on sameness<sup>42-44</sup>. We found a main effect of genotype on rearing behaviour, tPA Null mice displaying significantly higher number of vertical movements than control mice over the 30-minutes period of the test (Fig. 2c, at 10 minutes, +81.98 %  $P = 0.0196$ , at 30 minutes, +113.38%,  $P = 0.0274$ ; tPA WT:  $n = 12$ ; tPA Null:  $n = 15$ ). This prolonged rearing behaviour evidences perseverative phenotype in mutant mice, an important RRSB symptom exhibited by patients with ASD (Fig. 2g). To investigate whether associated symptoms such as mental retardation were also affected in tPA-deficient mice, we next assessed learning performance in our model by using a T-maze which required the use of distal landmarks<sup>45-47</sup>. Mice were placed in the “start” arm of the apparatus and allowed to visit the two accessible arms (arm 1, arm 2) for 5 min. A mouse with good spatial abilities analyses in a strictly similar way the different spaces of the maze to build a representation of the environment. Control animals visited the two accessible arms equally (Fig. 2d and 2e;  $P > 0.05$ ,  $n = 10$ ), therefore indicating good acquisition performance. On the contrary, tPA Null mice visited more often in the arm 1 relative to arm 2 (Fig. 2d; +21.41%,  $P = 0.0234$ ; tPA WT:  $n = 10$ ; tPA Null:  $n = 14$ ). In addition, they spent more time in the arm 1 than in the other arm (Fig. 2e; +144.14%,  $P = 0.002$ ; tPA WT:  $n = 10$ ; tPA Null:  $n = 14$ ). In other words, using two measures of acquisition performance, we found that mutant animals showed impaired learning capabilities (Fig. 2g), similarly to some autistic individuals. Finally, we subjected the animals to the forced swimming test (FST) to determine whether tPA Null mice have deficits in emotional behaviours. FST is a useful behavioural assay validated for assessing depression-related behaviour of rodents<sup>48,49</sup>. The FST revealed that mutant mice showed higher duration of immobility compared with WT mice (Fig. 2f; +27.46 %,  $P = 0.0418$ , tPA WT:  $n = 13$ ; tPA Null:  $n = 15$ ). These data imply that tPA Null mice show symptoms of depression (Fig. 2g), disorders also encountered in ASD. Overall, these behavioural tests demonstrate that tPA Null mice have social disabilities and RRSB, learning deficits and depressive disorders, all autistic-like features.

#### **tPA isoforms (sc-tPA and tc-tPA) differentially regulate MET neuronal activation.**

Because it was reported that the two forms of tPA, sc-tPA and tc-tPA may display differential neuronal functions<sup>8,9</sup>, we have here tested these two forms on MET signalling. Although tc-tPA induced the phosphorylation of MET (+156% of phosphoMET/ $\beta$ -actin,  $P = 0.0476$ ; +171% of

phospho/total,  $P = 0.0022$ ;  $n = 6$  from 6 independent treated cultures), sc-tPA slightly decreased it (-22% of phosphoMET/actin,  $P = 0.0476$ ; -22% of phospho/total,  $P = 0.0476$ ;  $n = 6$  from 6 independent treated cultures) (Fig. 3a,c). Control experiments confirmed the activation of MET under HGF exposure (+217% of phosphoMET/ $\beta$ -actin,  $P = 0.0022$ ; +284% of phospho/total,  $P = 0.0022$ ;  $n = 6$  from 6 independent treated cultures) (Fig. 3a,c). Importantly, we reversed HGF-induced MET phosphorylation with the specific inhibitor of MET activation, JNJ-38877605, (-68.15% compared to HGF of phosphoMET/ $\beta$ -actin,  $P = 0.0495$ , -69.02% compared to HGF of phospho/total,  $P = 0.0495$ ;  $n = 3$  from 3 independent experiments (Fig. 2d,f). To note, the expression of total MET did not vary with sc-, tc-tPA, and HGF treatments (98%, 88%, 90%, 104% of control for sc-tPA, tc-tPA, HGF, and HGF + JNJ respectively, ns = non-significant;  $n = 6$  and  $n = 3$  for HGF + JNJ) (Fig. 3b,e).

There is controversy in the literature about the conversion of pro-HGF into HGF by tPA<sup>18</sup>. Here we tested the abilities of the two forms of tPA (sc-tPA and tc-tPA) to induce the conversion of pro-HGF into HGF. As shown in batches (Fig. 4a), both forms of tPA are inefficient for activating the pro-HGF; while FXII, a positive control<sup>18</sup> does (representative blots of 3 independent experiments). We then tested if tPA could directly bind to MET by using Surface Resonance Plasmonic (SPR) (Fig 4b). Increasing doses of sc-tPA, tc-tPA, and HGF were used on immobilized MET receptors. HGF bound to MET in a dose dependent manner with a  $K_d = 2.5 \cdot 10^{-8}M$  as expected. There is no SPR signal with sc-tPA and tc-tPA. The data are inconsistent with the fact that they could trigger a biological activity through this receptor. Thus, up to now, we failed to identify exactly how tc-tPA can activate MET signalling.

**MET and NMDA receptors form complexes at the neuronal surface.** tPA has already been intensively described as interfering with NMDARs signalling<sup>8,50</sup>. Interestingly, the two forms of tPA have opposite effects on NMDARs signalling: while sc-tPA promotes it by increasing calcium influx, tc-tPA decreases it<sup>8</sup> (Fig. 8a). As only tc-tPA promotes MET signalling, we have investigated whether MET and NMDARs could form complexes. In order to demonstrate an interaction between the two receptors, we performed co-immunoprecipitation assays. The GluN1 subunit co-immunoprecipitated with MET receptor (Fig. 5a, representative blots of 3 independent experiments), confirming the presence of MET/NMDARs complexes under basal conditions. Then, we performed a proximity ligation assay (PLA) to determine whether MET/NMDARs complexes were present at the neuronal surface. PLA performed in cultured neurons showed a significant number of MET/NMDARs complexes (GluN1/MET) along neurites (Fig. 5b, representative pictures of 5 independent neuronal cultures). There was virtually no PLA signal in the absence of either primary antibody or the PLA probe. Next, we investigated whether treatment with sc-tPA or tc-tPA influenced the formation of MET/NMDARs complexes. PLA showed that tc-tPA, when added to the culture medium,

increased the number of MET/NMDARs complexes at the cell surface (+42%,  $P = 0.0456$  when compared to control and +119% when compared to sc-tPA,  $P < 0.0001$ ;  $n = 29$  for tPA buffer,  $n = 29$  for tc-tPA (300 nM) from 5 independent neuronal cultures). (Fig. 5b,c). On the contrary, sc-tPA significantly inhibited complex formation (-35%,  $P = 0.0127$ ;  $n = 29$  from 5 independent neuronal cultures) (Fig. 5b,c). Control experiments in the presence of HGF, also led to an increased formation of MET/NMDARs complexes (+138%,  $P = 0.0086$  when compared to control,  $n = 18$  for both HGF buffer and HGF from 5 independent neuronal cultures). (Fig. 5b,c).

**tc-tPA dependent MET signalling promotes the endocytosis and degradation of neuronal GluN2B-containing NMDA receptors.**

We have then investigated whether tPA isoforms may also differentially influence NMDARs signalling through MET receptor. Sc-tPA had no effect on GluN2B phosphorylation (Fig. 6a and corresponding densitometry Fig. 6b) (-1.2%, -21.4%, -15.2% of phospho-GluN2B compared to control at 10, 30, and 60 minutes respectively,  $P$ : ns;  $n = 5$  from 5 independent neuronal cultures), nor on total GluN2B (Fig. 6a and corresponding densitometry Fig. 6c) (-4%, -21.37%, -10.35% of total GluN2B compared to control at 10, 30, and 60 minutes respectively,  $P$ : ns;  $n = 5$  from 5 independent neuronal cultures). On the contrary, tc-tPA induced an early (from 10 minutes to 60 minutes) and dramatic down-regulation of phospho-GluN2B (Fig. 6d and corresponding densitometry Fig. 6e) (-44.26%, -53.18%, -46.61% of control at 10, 30, and 60 minutes respectively,  $P = 0.0139$ ;  $n = 4$  from 4 independent neuronal cultures) and total GluN2B subunits of NMDARs (Fig. 6d and corresponding densitometry Fig. 6f) (-53.69%, -27.84%, -49.54% of control of total GluN2B at 10, 30, and 60 minutes respectively,  $P = 0.0139$ ;  $n = 4$  from 4 independent neuronal cultures). Levels of both phosphorylated and total GluN2A subunits of NMDARs were not affected by tPA treatments (Fig. 6a-f). Also, a moderate but significant reduction of the common GluN1 subunit of NMDARs was also observed 10 minutes after tc-tPA exposure but was not significant at 30 and 60 minutes (Fig. 6d,f) (-9.46%, -2.78%, -21% of GluN1 at 10, 30, and 60 minutes respectively,  $P = 0.0139$ ;  $n = 4$  from 4 independent neuronal cultures). As expected sc-tPA did not influence GluN1 (Fig. 6a,c) (-0.9%, -0.8%, -22.2% of GluN1 at 10, 30, and 60 minutes respectively,  $P$ : ns;  $n = 5$  from 5 independent neuronal cultures). Importantly, the tc-tPA-induced down-regulation of phospho-GluN2B subunit-containing NMDARs is reversed (from 10 minutes) by the presence of the specific inhibitor of MET phosphorylation, JNJ-38877605 (Fig. 5g-h) (+35.2% of phospho-GluN2B compared to tc-tPA,  $P = 0.0433$ ;  $n = 4$  from 4 independent experiments). Altogether, these data suggest a tc-tPA dependent endocytosis and degradation of GluN2B-containing NMDARs, mediated by MET signalling. In order to validate this hypothesis, similar experiments were performed in the presence of the Lactacystin (5 $\mu$ M), an inhibitor of the proteasome (Fig. 7a). Our data reveal that tc-tPA led to a down-regulation of GluN2B-containing NMDARs (-30.95% of total GluN2B compared to control,  $P =$

0.0286) (Fig. 7a), an effect reversed by the presence of the Lactacystin, incubated 2 hours before tc-tPA treatment. (Lactacystin and tc-tPA: +24.49% of total GluN2B compared to tc-tPA alone,  $P < 0.0286$ ;  $n = 4$  from 4 independent experiments (Fig. 7a)). Parallel experiments using immunocytochemistry of surface versus total GluN2B, confirmed a tc-tPA dependent endocytosis and degradation of GluN2B-containing NMDARs. Experiments in permeabilized conditions with tc-tPA treatment decrease total GluN2B at 10 minutes (-77.39% compared to control,  $P < 0.0001$ ) and at 30 minutes (-51.42% compared to control,  $P = 0.0257$ ;  $n = 11$  neurons for control,  $n = 6$  neurons for tc-tPA at 10 minutes and  $n = 12$  neurons for tc-tPA at 30 minutes, from 3 independent neuronal cultures) (Fig 7e) (Experiments in no permeabilized conditions with tc-tPA and the same experiments for sc-tPA are in progress; (Fig. 7a-g *in preparation for final manuscript*)).

**tc-tPA-dependent MET signalling controls NMDA receptors-mediated calcium influx.** As previously reported<sup>9</sup>, addition of tc-tPA to neuronal cultures media decreased the NMDA-induced calcium influx (-10.66%,  $P < 0.001$ ;  $n = 98$  from 3 independent neuronal cultures), while sc-tPA treatment was stimulatory (+27.29%,  $P < 0.001$ ;  $n = 77$  from 3 independent neuronal cultures) (Fig. 8a and 8c; corresponding mean Fig. 8b and 8d). Interestingly, the specific MET inhibitor, JNJ-38877605, reversed the inhibitory effect of tc-tPA (-10.66%, for tc-tPA alone versus +26.6% for tc-tPA + JNJ-38877605,  $P < 0.001$ ;  $n = 98$  from 3 independent neuronal cultures) (Fig. 8a and corresponding mean Fig. 8b). Similar results were obtained with another MET inhibitor, SU11274, which competes with the ATP binding site within the MET activation loop<sup>51,52</sup> (-11.24% for tc-tPA alone versus +8.30% for tc-tPA + SU11274,  $P < 0.0001$ ) (supplementary 2). Accordingly, addition of rHGF (Fig. 8c and corresponding mean Fig. 8d) or DO-24 (a monoclonal antibody agonist of MET<sup>53</sup>) (supplementary 2) did not affect the action of tc-tPA, but reduced the stimulatory effect of sc-tPA on NMDARs signalling (+27.44% for sc-tPA alone versus +14.69% for sc-tPA + rHGF,  $P < 0,001$ ;  $n = 93$  for sc-tPA and  $n = 89$  for sc-tPA and rHGF from 3 independent neuronal cultures; Fig. 8c and 8d; and +31.57% for sc-tPA alone versus +3.30% for sc-tPA + DO24,  $P < 0,001$ ;  $n = 86$  for sc-tPA and  $n = 94$  for sc-tPA and DO-24 from 3 independent neuronal cultures; (supplementary 2). Altogether, these data demonstrate dual effects of tPA isoforms, with sc-tPA promoting NMDARs signalling while tc-tPA reduced it. Importantly, the effect of tc-tPA depends of MET and involves a downregulation of membrane GluN2B-containing NMDARs by a proteasomal degradation process. Similarly, rHGF prevented the potentiation of NMDA-mediated calcium influx by sc-tPA and the MET agonist DO-24 antibody completely blocked the stimulatory effect of sc-tPA (Supplementary 2). The blockage of MET activation by JNJ-38877605 (Fig. 8a,b) or SU11274 (Supplementary 2a and 2b) did not affect the potentiating effect of sc-tPA. To reinforce this concept of a differential effect of tPA isoforms on NMDAR signalling, we decided

to combine sc-tPA with increasing concentrations of tc-tPA and to evaluate the corresponding NMDA-induced neuronal calcium influx (Supplementary 3a and 3b). In agreement with our above data, tc-tPA counteracted the effect of sc-tPA on NMDAR signalling (-22.26% at 100nM of tc-tPA, -32.74% at 200nM of tc-tPA and -33.20% at 300nM of tc-tPA,  $P < 0.0001$ ). We then investigated whether the tc-tPA dependent MET signalling also influenced the NMDAR-mediated neuronal death. As previously reported<sup>8</sup>, sc-tPA promotes NMDA-induced excitotoxicity (+20.86%,  $P = 0.025$ ) and tc-tPA does not promote NMDA-induced excitotoxicity (-1.69%, ns) (Supplementary 4a). In agreement with the above data, inhibition of MET by the JNJ-38877605 (Supplementary 4b) and the SU11274 (Supplementary 4d), converted the slight but significant inhibitory effect of tc-tPA to pro-excitotoxic effects (+14.46% for tc-tPA + JNJ-38877605,  $P = 0.0253$  ( $n = 7$  from 7 independent experiments); +18.81% for tc-tPA + SU11274,  $P = 0.0472$ ;  $n = 5$  from 5 independent experiments). Thus, as expected, sc-tPA potentiated NMDA-induced excitotoxicity was also prevented by co-application of either rHGF (Supplementary 4a) (+20.86% for sc-tPA alone versus -3.73% for sc-tPA + rHGF,  $P = 0.0374$ ;  $n = 6$  from 6 independent experiments) or by the agonist MET antibody DO-24 (Supplementary 4c) (+25.31% for sc-tPA alone versus -0.73% for sc-tPA + DO-24,  $P = 0.0472$ ;  $n = 5$  from 5 independent experiments).

## DISCUSSION

We provide here the first demonstration that the neuronal serine protease tPA plays a role in autistic-like behaviours in mice, by controlling a crosstalk between MET and GluN2B subunit-containing NMDARs. We thus evidence of a novel function of tPA in the CNS, and particularly of the two-chains form, tc-tPA, that acts on two targets: MET and GluN2B-containing NMDARs; two genes reported by SFARI (Simons Foundation Autism Research Initiative) for their strong implication in ASD in human (<https://gene.sfari.org/database/gene-scoring>). We also demonstrate that this mechanism relies on the formation of proximal complexes between MET and NMDARs at the neuronal surface, a process promoted specifically by tc-tPA, that leads to a proteasomal degradation and to a subsequent down-regulation of the total number of surface GluN2B-containing NMDARs and finally to alterations of NMDARs signalling.

A number of studies demonstrated the physical interaction between NMDAR subunits and other receptors, including Dopamine D1 receptor (D1R)<sup>54</sup>, VEGF receptor (VEGFR2)<sup>55</sup>, and Ephrin-B2<sup>56,57</sup>. These complexes are dynamically regulated by ligands, which mutually modify receptor functions<sup>58,59</sup>. For example, uncoupling D1R/NMDAR complexes in the hippocampus impairs NMDARs-dependent LTP and working memory<sup>60</sup>. Ligand-dependent activation of VEGFR2 induces a rapid redistribution of GluN2B at synaptic sites influencing the consolidation of emotional memory<sup>55</sup>. In patients with encephalitis, anti-NMDARs antibodies alter the dynamic retention of synaptic receptors by reducing the interaction between the extracellular domains of the NMDARs and Ephrin-B2<sup>56</sup>. Here, we provide evidence that tc-tPA leads to a connection between NMDARs and MET at the neuronal surface, and that the dynamic of these interactions plays a critical role in the control of NMDARs signalling and neuronal fate. These data are in agreement with recent reports supporting that genes encoding for NMDARs subunits are part of the interactome of MET, with roles in the modulation of synapses formation<sup>61</sup>, and also associated with neurodevelopmental disorders such as ASD<sup>62,63</sup>. Accordingly, the NMDARs antagonist, DL-2-amino-5-phosphonopentanoic acid, was reported to interfere with the pro-survival effect of HGF on cultured neurons<sup>64</sup>.

Like all the members of the plasminogen activator family, the secreted sc-tPA is processed into tc-tPA by plasmin or kallikrein<sup>65,66</sup>. However, sc-tPA is an unusual zymogen that does not require proteolytic processing to be activated, but relies on the presence of an allosteric regulator, such as fibrin<sup>6</sup>. It has been reported that sc-tPA, but not tc-tPA, promotes NMDARs signalling and neurotoxicity in cortical neurons<sup>67,68</sup>. Here, we provide a mechanistic explanation of this differential function of the two forms of tPA. We demonstrate that, although tc-tPA prompts the formation of proximal complexes between MET and NMDARs, sc-tPA promotes their disruption. Interestingly, we also demonstrated that tc-tPA enhances MET signalling,

leading to an increased endocytosis and degradation of GluN2B-containing NMDARs and subsequent down-regulation of NMDARs-mediated signalling and excitotoxicity. Notably, recombinant HGF (or the MET agonist DO-24 antibody, mimicking the ligand), completely prevents sc-tPA-induced NMDAR signalling and neurotoxicity *in vitro*.

Since MET has been discovered, many signalling pathways and assembling proteins have been identified downstream of the receptor. It is now well described that MET can directly binds<sup>69</sup>, or indirectly through the protein Gab1<sup>70</sup>, to Shp2: a non-receptor tyrosine phosphatase. Interestingly, mutations in Shp2 gene *PTPN11* are linked to cognitive impairment, such as memory deficit. A possible explanation of this, could be the important role of the regulation of Src-family kinases (SFKs) by Shp2<sup>71</sup>. Indeed, SFKs are crucial for controlling NMDARs-mediated synaptic transmission and plasticity<sup>72</sup>, thus learning and memory. In fact, disrupting the balance of Shp2 (gain or loss of function, such as in Noonan and Leopard syndromes) will affect memory and NMDARs signalling and functions<sup>73</sup>. This is confirmed in Shp2 deficient mice, where the addition of a Src family kinase inhibitor reversed the phosphorylation of GluN2B, restored basal synaptic transmission, and rescued the contextual fear memory deficit of the deficient animals<sup>74</sup>. Our results are in line with these findings, where activation of MET by tc-tPA leads to a downregulation of GluN2B-containing NMDARs signalling by targeting and degrading them. We also identified a cognitive impairment in our tPA deficient mice, associated to a reduction of MET expression in the amygdala and the entorhinal cortex. This is also in frame with data showing that SFKs are important triggers of the reduction of GluN2B-containing NMDARs surface expression and synaptic plasticity in the brain.

tPA is known to mediate signalling through a set of receptors and/or binding proteins including the Low Density Lipoprotein Related Receptors (LRPs), annexin-II, Epidermal Growth Factor Receptor (EGFR) and NMDARs, among others<sup>75</sup>. Although there is a consensus about the capacity of tPA to modulate NMDAR signalling and functions, some opposite results are reported in the literature<sup>50,76</sup>. When it interacts with the GluN2A subunit, tPA activates either the Akt/mTOR/p70S6K/HIF1 $\alpha$  signalling pathway, leading to neuroprotection and to an increase of glucose uptake<sup>77</sup> or the Erk1/2/CREB/ATF3 signalling pathway to decrease excitotoxicity<sup>78</sup>. tPA was also reported to interact<sup>79</sup> and possibly cleave the GluN2B subunit of NMDAR leading to change its pharmacological properties. GluN2B-dependent effects were associated with influence of tPA on acute stress<sup>80</sup> and on seizures induced by alcohol withdrawal<sup>79</sup>. The sc-tPA was reported to interact with the GluN1 subunit of NMDARs either directly<sup>50</sup> or through LRP1<sup>81</sup> to promote NMDARs signalling and excitotoxicity. Our present study may reconcile all these data. Indeed, we evidence here that sc-tPA and tc-tPA differentially influence NMDARs signalling, with the sc-tPA leading, as previously reported<sup>67</sup>, to a broad activation of NMDARs, due to its ability to bind the common GluN1 subunit<sup>50</sup>, and

the tc-tPA leading to a specific down-regulation of GluN2B-containing NMDARs, a mechanism dependent of MET activation.

MET is a susceptibility gene for ASD<sup>82</sup>. Accordingly, genetically altered mice with a kinase-inactive MET display autistic like behaviours associated with profound deficits in neural development, synaptic transmission, and plasticity<sup>83,84</sup>. Interestingly, variants of *GRIN2B* gene encoding the GluN2B subunit of the NMDARs have been also reported in neurodevelopmental disorders, including language, motor and learning deficits, and in autistic patients<sup>31,85</sup>. Although clinical phenotypes have shown *GRIN2A* variants (GluN2A) associated with an epileptic phenotype, *GRIN2B* variants were more often associated with neurodevelopmental disorders<sup>86,87</sup>. ASDs are also associated with mutations of neurobeachin (NBEA), a protein involved with KIF21B in local recycling of GluN2B-containing NMDARs<sup>88</sup>. To determine the possible role of tPA in ASD, we investigated the functional consequences of the tPA deletion by using a behavioral screening system based on a battery of tests believed to reflect autistic-like behaviors in rodents<sup>43</sup>. We first show reductions of USV in the mutant pup mice. Similar social defects have been reported in other ASD models<sup>89</sup>. USV are important markers of mother-pup social interaction and communication in response, for example, to maternal separation, as well as indicators of early neurobehavioural development<sup>90,91</sup>. Our results thus demonstrate deep early deficits in social relations when tPA is lacking, indicating a major autistic-like feature in tPA Null mice. We then examined the possible presence in these mice of another major diagnostic symptom of autism, namely the repetitive motor behaviors<sup>40</sup>. The tPA Null mice exhibited exacerbated rearing behavior relative to their WT littermates. The frequency of rearing is an indicator of spontaneous motor activity and arousal state, which normally decreases in the course of the environmental familiarization<sup>92,93</sup>. The phenotype exhibited by our mutant mice that abnormally over-explored the environment indicates perseverative behavior, a hallmark diagnostic symptom of ASD. Mutant mice also recapitulate two other associated symptoms of ASD, learning disabilities and depressive-like behavior. Indeed, tPA Null mice showed acquisition impairment of the characteristics of the selective spaces of the maze, indicating a failure in the built of spatial representation of the environment by processing of remote spatial cues. Such cognitive dysfunction has previously been found with other learning tasks in ASD models<sup>94,95</sup>. Deletion of tPA also induced behavioural despair in the forced swimming test. This behavior, classically conceptualized as a depressive-like behavior in mice<sup>96</sup>, is in line with reports of depression in some autistic individuals<sup>97</sup>. In sum, our behavioural analysis demonstrate an autistic-like phenotype in tPA Null mice characterized by aberrant social communication, expression of repetitive behaviors and associated symptoms such as learning defects and depressive-like behavior. Not only observed



symptoms are multiple and in addition, they include mandatory core criteria diagnostic like in humans, providing face validity of the tPA Null mouse model.

The expression of tPA has been described in many regions of the brain parenchyma, including the amygdala<sup>80,98,99</sup>, with tPA involved in mechanisms controlling anxiety-like behaviour<sup>80,100</sup>. When present in the entorhinal cortex, tPA is known to control spatial learning, especially when landmarks are distal versus proximal<sup>46</sup>. In this study, we reveal in mice lacking tPA decreased levels of MET, specifically in these two brain areas.

Altogether, our preclinical data reveal a new function of tPA with possible involvement in the control of autistic-like behaviors, the consequence of a differential role of its sc and tc forms, with the tc-tPA capables to activate MET, thus promoting the formation of complexes with GluN2B-containing NMDARs, their endocytosis and proteosomal down regulation of the neuronal surface, and subsequent reduced signaling.

## REFERENCES

1. Teesalu, T. *et al.* Tissue plasminogen activator and neuroserpin are widely expressed in the human central nervous system. *Thrombosis and haemostasis* **92**, 358–368 (2004).
2. Louessard, M. *et al.* Tissue Plasminogen Activator Expression Is Restricted to Subsets of Excitatory Pyramidal Glutamatergic Neurons. *Mol. Neurobiol.* **53**, 5000–5012 (2016).
3. Minnerup, J. *et al.* Outcome After Thrombectomy and Intravenous Thrombolysis in Patients With Acute Ischemic Stroke. *Stroke: a journal of cerebral circulation* **47**, 1584–1592 (2016).
4. Collen, D. & Lijnen, H. R. Tissue-type plasminogen activator: a historical perspective and personal account. *Journal of thrombosis and haemostasis* **2**, 541–546 (2004).
5. Rijken, D. C. & Collen, D. Purification and characterization of the plasminogen activator secreted by human melanoma cells in culture. *Journal of biological chemistry* **256**, 7035–41 (1981).
6. Thelwell, C. & Longstaff, C. The regulation by fibrinogen and fibrin of tissue plasminogen activator kinetics and inhibition by plasminogen activator inhibitor 1. *Journal of thrombosis and haemostasis* **5**, 804–811 (2007).
7. Nicole, O. *et al.* The proteolytic activity of tissue-plasminogen activator enhances NMDA receptor-mediated signaling. *Nature medicine* **7**, 59–64 (2001).
8. Parcq, J. *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.* **19**, 1983–1991 (2012).
9. Bertrand, T. *et al.* Conformations of tissue plasminogen activator (tPA) orchestrate neuronal survival by a crosstalk between EGFR and NMDAR. *Cell Death Dis* **6**, e1924 (2015).
10. Jung, W. *et al.* Expression and functional interaction of hepatocyte growth factor-scatter factor and its receptor c-met in mammalian brain. *J. Cell Biol.* **126**, 485–494 (1994).
11. Naldini, L. *et al.* Scatter factor and hepatocyte growth factor are indistinguishable ligands for the MET receptor. *EMBO J.* **10**, 2867–2878 (1991).
12. Nakamura, T. *et al.* Molecular cloning and expression of human hepatocyte growth factor. *Nature* **342**, 440–443 (1989).
13. Naka, D. *et al.* Activation of hepatocyte growth factor by proteolytic conversion of a single chain form to a heterodimer. *J. Biol. Chem.* **267**, 20114–20119 (1992).
14. Mars, W. M., Zarnegar, R. & Michalopoulos, G. K. Activation of hepatocyte growth factor by the plasminogen activators uPA and tPA. *Am. J. Pathol.* **143**, 949–958 (1993).
15. Miyazawa, K., Shimomura, T. & Kitamura, N. Activation of Hepatocyte Growth Factor in the Injured Tissues Is Mediated by Hepatocyte Growth Factor Activator. *J. Biol. Chem.* **271**, 3615–3618 (1996).
16. Naldini, L. *et al.* Extracellular proteolytic cleavage by urokinase is required for activation of hepatocyte growth factor/scatter factor. *The EMBO journal* **11**, 4825–4833 (1992).
17. Shimomura, T. *et al.* Activation of Hepatocyte Growth Factor by two Homologous Proteases, Blood-Coagulation Factor XIIIa and Hepatocyte Growth Factor Activator. *European Journal of Biochemistry* **229**, 257–261 (1995).
18. Zamolodchikov, D. *et al.* A Short Isoform of Coagulation Factor XII mRNA Is Expressed by Neurons in the Human Brain. *Neuroscience* **413**, 294–307 (2019).
19. Tyndall, S. J. & Walikonis, R. S. Signaling by hepatocyte growth factor in neurons is induced by pharmacological stimulation of synaptic activity. *Synapse* **61**, 199–204 (2007).
20. Akita, H. *et al.* Hepatocyte growth factor improves synaptic localization of the NMDA receptor and intracellular signaling after excitotoxic injury in cultured hippocampal neurons. *Experimental neurology* **210**, 83–94 (2008).
21. Ishihara, N. *et al.* Inhibition of apoptosis-inducing factor translocation is involved in protective effects of hepatocyte growth factor against excitotoxic cell death in cultured hippocampal neurons. *Journal of neurochemistry* **95**, 1277–1286 (2005).

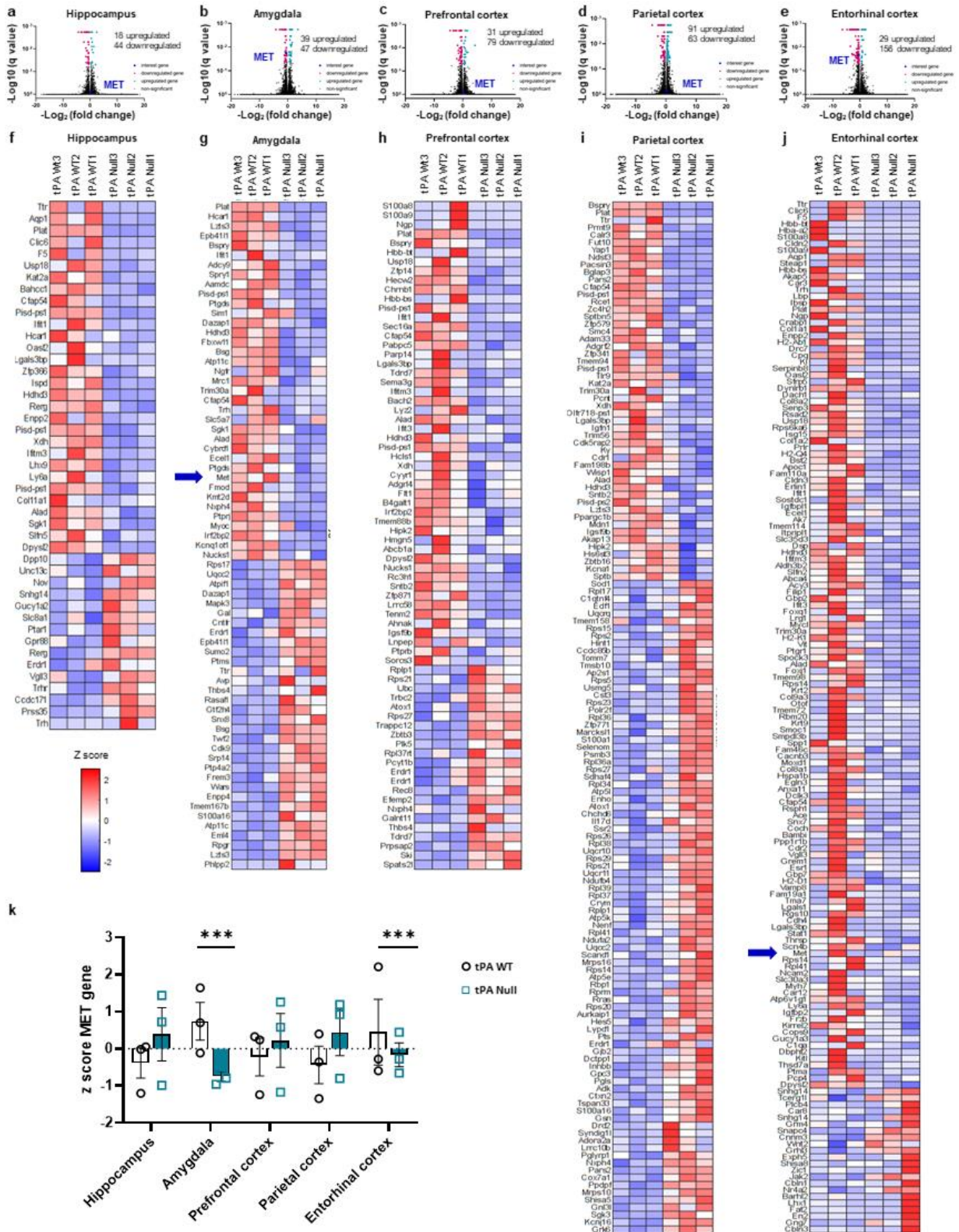
22. Akimoto, M. *et al.* Hepatocyte growth factor as an enhancer of nmda currents and synaptic plasticity in the hippocampus. *Neuroscience* **128**, 155–162 (2004).
23. Qiu, S. *et al.* GluA1 phosphorylation contributes to postsynaptic amplification of neuropathic pain in the insular cortex. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* **34**, 13505–13515 (2014).
24. Kato, T. *et al.* Hepatocyte growth factor overexpression in the nervous system enhances learning and memory performance in mice. *Journal of neuroscience research* **90**, 1743–1755 (2012).
25. Uzunova, G., Hollander, E. & Shepherd, J. The role of ionotropic glutamate receptors in childhood neurodevelopmental disorders: autism spectrum disorders and fragile x syndrome. *Curr Neuropsychopharmacol* **12**, 71–98 (2014).
26. Zhang, Y., Li, P., Feng, J. & Wu, M. Dysfunction of NMDA receptors in Alzheimer’s disease. *Neurol Sci* **37**, 1039–1047 (2016).
27. Lee, E.-J., Choi, S. Y. & Kim, E. NMDA receptor dysfunction in autism spectrum disorders. *Current Opinion in Pharmacology* **20**, 8–13 (2015).
28. Tarabeux, J. *et al.* Rare mutations in N-methyl-D-aspartate glutamate receptors in autism spectrum disorders and schizophrenia. *Translational Psychiatry* **1**, e55–e55 (2011).
29. Creten, C. *et al.* Late onset autism and anti-NMDA-receptor encephalitis. *Lancet* **378**, 98 (2011).
30. Pollak, T. A., McCormack, R., Peakman, M., Nicholson, T. R. & David, A. S. Prevalence of anti-N-methyl-D-aspartate (NMDA) receptor [corrected] antibodies in patients with schizophrenia and related psychoses: a systematic review and meta-analysis. *Psychol Med* **44**, 2475–2487 (2014).
31. Sceniak, M. P. *et al.* An autism-associated mutation in GluN2B prevents NMDA receptor trafficking and interferes with dendrite growth. *J. Cell. Sci.* **132**, (2019).
32. Campbell, D. B. *et al.* A genetic variant that disrupts MET transcription is associated with autism. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **103**, 16834–16839 (2006).
33. Campbell, D. B. *et al.* Disruption of cerebral cortex MET signaling in autism spectrum disorder. *Annals of neurology* **62**, 243–250 (2007).
34. Yaniv, D., Vouimba, R. M., Diamond, D. M. & Richter-Levin, G. Simultaneous induction of long-term potentiation in the hippocampus and the amygdala by entorhinal cortex activation: mechanistic and temporal profiles. *Neuroscience* **120**, 1125–1135 (2003).
35. LeDoux, J. E. Emotion circuits in the brain. *Annu. Rev. Neurosci.* **23**, 155–184 (2000).
36. Martens-Mantai, T., Speckmann, E.-J. & Gorji, A. Propagation of cortical spreading depression into the hippocampus: The role of the entorhinal cortex. *Synapse* **68**, 574–584 (2014).
37. Szabo, R., Samson, A. L., Lawrence, D. A., Medcalf, R. L. & Bugge, T. H. Passenger mutations and aberrant gene expression in congenic tissue plasminogen activator-deficient mouse strains. *Journal of Thrombosis and Haemostasis* **14**, 1618–1628 (2016).
38. Lebow, M. A. & Chen, A. Overshadowed by the amygdala: the bed nucleus of the stria terminalis emerges as key to psychiatric disorders. *Molecular Psychiatry* **21**, 450–463 (2016).
39. Hamazaki, K., Hamazaki, T. & Inadera, H. Abnormalities in the fatty acid composition of the postmortem entorhinal cortex of patients with schizophrenia, bipolar disorder, and major depressive disorder. *Psychiatry Research* **210**, 346–350 (2013).
40. American Psychiatric Association. *Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders*. (American Psychiatric Association, 2013). doi:10.1176/appi.books.9780890425596.
41. Scattoni, M. L., Crawley, J. & Ricceri, L. Ultrasonic vocalizations: a tool for behavioural phenotyping of mouse models of neurodevelopmental disorders. *Neurosci Biobehav Rev* **33**, 508–515 (2009).
42. Pasciuto, E. *et al.* Autism Spectrum Disorders: Translating human deficits into mouse behavior. *Neurobiol Learn Mem* **124**, 71–87 (2015).
43. Crawley, J. N. Mouse behavioral assays relevant to the symptoms of autism. *Brain Pathol.* **17**, 448–459 (2007).

44. Cuccaro, M. L. *et al.* Behavioral comparisons in autistic individuals from multiplex and singleton families. *J Autism Dev Disord* **33**, 87–91 (2003).
45. Dellu, F., Contarino, A., Simon, H., Koob, G. F. & Gold, L. H. Genetic differences in response to novelty and spatial memory using a two-trial recognition task in mice. *Neurobiol Learn Mem* **73**, 31–48 (2000).
46. Hébert, M. *et al.* Distant Space Processing is Controlled by tPA-dependent NMDA Receptor Signaling in the Entorhinal Cortex. *Cereb. Cortex* **27**, 4783–4796 (2017).
47. Party, H. *et al.* Plasminogen Activator Inhibitor-1 (PAI-1) deficiency predisposes to depression and resistance to treatments. *Acta Neuropathol Commun* **7**, 153 (2019).
48. Castagné, V., Moser, P., Roux, S. & Porsolt, R. D. Rodent Models of Depression: Forced Swim and Tail Suspension Behavioral Despair Tests in Rats and Mice. *Current Protocols in Pharmacology* **49**, 5.8.1-5.8.14 (2010).
49. Porsolt, R. D., Bertin, A. & Jalfre, M. Behavioral despair in mice: a primary screening test for antidepressants. *Arch Int Pharmacodyn Ther* **229**, 327–336 (1977).
50. Nicole, O. *et al.* The proteolytic activity of tissue-plasminogen activator enhances NMDA receptor-mediated signaling. *Nat. Med.* **7**, 59–64 (2001).
51. Sattler, M. *et al.* A Novel Small Molecule Met Inhibitor Induces Apoptosis in Cells Transformed by the Oncogenic TPR-MET Tyrosine Kinase. *Cancer research* **63**, 5462–5469 (2003).
52. Wang, X. *et al.* Potent and selective inhibitors of the Met [hepatocyte growth factor/scatter factor (HGF/SF) receptor] tyrosine kinase block HGF/SF-induced tumor cell growth and invasion. *Molecular cancer therapeutics* **2**, 1085–1092 (2003).
53. Prat, M., Crepaldi, T., Pennacchietti, S., Bussolino, F. & Comoglio, P. M. Agonistic monoclonal antibodies against the Met receptor dissect the biological responses to HGF. *Journal of Cell Science* **111**, 237–247 (1998).
54. Cahill, E. *et al.* D1R/GluN1 complexes in the striatum integrate dopamine and glutamate signalling to control synaptic plasticity and cocaine-induced responses. *Molecular psychiatry* **19**, 1295–1304 (2014).
55. De Rossi, P. *et al.* A critical role for VEGF and VEGFR2 in NMDA receptor synaptic function and fear-related behavior. *Molecular psychiatry* (2016) doi:10.1038/mp.2015.195.
56. Mikasova, L. *et al.* Disrupted surface cross-talk between NMDA and Ephrin-B2 receptors in anti-NMDA encephalitis. *Brain : a journal of neurology* **135**, 1606–16521 (2012).
57. Planagumà, J. *et al.* Ephrin-B2 prevents N-methyl-D-aspartate receptor antibody effects on memory and neuroplasticity. *Annals of neurology* (2016) doi:10.1002/ana.24721.
58. Zhu, S., Stroebel, D., Yao, C. A., Taly, A. & Paoletti, P. Allosteric signaling and dynamics of the clamshell-like NMDA receptor GluN1 N-terminal domain. *Nature structural and molecular biology* **20**, 477–485 (2013).
59. Lesept, F. *et al.* Tissue-type plasminogen activator controls neuronal death by raising surface dynamics of extrasynaptic NMDA receptors. *Cell death and disease* (2016) doi:10.1038/cddis.2016.279.
60. Nai, Q. *et al.* Uncoupling the D1-N-Methyl-D-Aspartate (NMDA) Receptor Complex Promotes NMDA-Dependent Long-Term Potentiation and Working Memory. *Biological psychiatry* **67**, 246–254 (2010).
61. Qiu, S., Lu, Z. & Levitt, P. MET Receptor Tyrosine Kinase Controls Dendritic Complexity, Spine Morphogenesis, and Glutamatergic Synapse Maturation in the Hippocampus. *Journal of Neuroscience* **34**, (2014).
62. Xie, Z. *et al.* Receptor Tyrosine Kinase MET Interactome and Neurodevelopmental Disorder Partners at the Developing Synapse. *Biological psychiatry* **80**, 933–942 (2016).
63. Xie, Z., Eagleson, K. L., Wu, H.-H. & Levitt, P. Hepatocyte Growth Factor Modulates MET Receptor Tyrosine Kinase and  $\beta$ -Catenin Functional Interactions to Enhance Synapse Formation. *eneuro* **3**, e0074 (2016).
64. Tyndall, S. J., Patel, S. J. & Walikonis, R. S. Hepatocyte growth factor-induced enhancement of dendritic branching is blocked by inhibitors of N-methyl-D-aspartate receptors and

- calcium/calmodulin-dependent kinases. *Journal of neuroscience research* **85**, 2343–2351 (2007).
65. Wallén, P., Bergsdorf, N. & Rånby, M. Purification and identification of two structural variants of porcine tissue plasminogen activator by affinity adsorption on fibrin. *Biochimica et biophysica acta* **719**, 318–28 (1982).
  66. Ichinose, A., Kisiel, W. & Fujikawa, K. Proteolytic activation of tissue plasminogen activator by plasma and tissue enzymes. *FEBS letters* **175**, 412–418 (1984).
  67. Parcq, J. *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 and differentiation* **19**, 1983–1991 (2012).
  68. Bertrand, T. *et al.* Conformations of tissue plasminogen activator (tPA) orchestrate neuronal survival by a crosstalk between EGFR and NMDAR. *Cell death and disease* **6**, e1924 (2015).
  69. Koch, A., Mancini, A., El Bounkari, O. & Tamura, T. The SH2-domain-containing inositol 5-phosphatase (SHIP)-2 binds to c-Met directly via tyrosine residue 1356 and involves hepatocyte growth factor (HGF)-induced lamellipodium formation, cell scattering and cell spreading. *Oncogene* **24**, 3436–3447 (2005).
  70. Schaeper, U. *et al.* Coupling of Gab1 to c-Met, Grb2, and Shp2 mediates biological responses. *J. Cell Biol.* **149**, 1419–1432 (2000).
  71. Zhang, S. Q. *et al.* Shp2 regulates SRC family kinase activity and Ras/Erk activation by controlling Csk recruitment. *Mol. Cell* **13**, 341–355 (2004).
  72. Lu, Y. M., Roder, J. C., Davidow, J. & Salter, M. W. Src activation in the induction of long-term potentiation in CA1 hippocampal neurons. *Science* **279**, 1363–1367 (1998).
  73. Cesarini, L. *et al.* Cognitive profile of disorders associated with dysregulation of the RAS/MAPK signaling cascade. *Am. J. Med. Genet. A* **149A**, 140–146 (2009).
  74. Yan, X. *et al.* Increased Src Family Kinase Activity Disrupts Excitatory Synaptic Transmission and Impairs Remote Fear Memory in Forebrain Shp2-Deficient Mice. *Mol. Neurobiol.* **54**, 7235–7250 (2017).
  75. Thiebaut, A. M. *et al.* The role of plasminogen activators in stroke treatment: fibrinolysis and beyond. *Lancet Neurol* **17**, 1121–1132 (2018).
  76. Matys, T. & Strickland, S. Tissue plasminogen activator and NMDA receptor cleavage. *Nat. Med.* **9**, 371–372; author reply 372–373 (2003).
  77. Wu, F. *et al.* Tissue-type plasminogen activator regulates the neuronal uptake of glucose in the ischemic brain. *J. Neurosci.* **32**, 9848–9858 (2012).
  78. Wu, F. *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.* **52**, 9–19 (2013).
  79. Pawlak, R., Melchor, J. P., Matys, T., Skrzypiec, A. E. & Strickland, S. Ethanol-withdrawal seizures are controlled by tissue plasminogen activator via modulation of NR2B-containing NMDA receptors. *PNAS* **102**, 443–448 (2005).
  80. Pawlak, R., Magarinos, A. M., Melchor, J., McEwen, B. & Strickland, S. Tissue plasminogen activator in the amygdala is critical for stress-induced anxiety-like behavior. *Nat. Neurosci.* **6**, 168–174 (2003).
  81. Samson, A. L. *et al.* Tissue-type plasminogen activator requires a co-receptor to enhance NMDA receptor function. *J. Neurochem.* **107**, 1091–1101 (2008).
  82. Campbell, D. B. *et al.* A genetic variant that disrupts MET transcription is associated with autism. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **103**, 16834–16839 (2006).
  83. Tang, S. *et al.* Altered Forebrain Functional Connectivity and Neurotransmission in a Kinase-Inactive Met Mouse Model of Autism. *Mol Imaging* **18**, 1536012118821034 (2019).
  84. Ma, X. & Qiu, S. Control of cortical synapse development and plasticity by MET receptor tyrosine kinase, a genetic risk factor for autism. *Journal of Neuroscience Research* **n/a**, (2019).
  85. Hu, C., Chen, W., Myers, S. J., Yuan, H. & Traynelis, S. F. Human GRIN2B variants in neurodevelopmental disorders. *Journal of Pharmacological Sciences* **132**, 115–121 (2016).

86. Liu, S. *et al.* A Rare Variant Identified Within the GluN2B C-Terminus in a Patient with Autism Affects NMDA Receptor Surface Expression and Spine Density. *J. Neurosci.* **37**, 4093–4102 (2017).
87. Myers, S. J. *et al.* Distinct roles of GRIN2A and GRIN2B variants in neurological conditions. *F1000Res* **8**, (2019).
88. Gromova, K. V. *et al.* Neurobeachin and the Kinesin KIF21B Are Critical for Endocytic Recycling of NMDA Receptors and Regulate Social Behavior. *Cell Rep* **23**, 2705–2717 (2018).
89. Wöhr, M., Rouillet, F. I. & Crawley, J. N. Reduced Scent Marking and Ultrasonic Vocalizations in the BTBR T+tf/J Mouse Model of Autism. *Genes Brain Behav* **10**, 35–43 (2011).
90. Ricceri, L., Moles, A. & Crawley, J. Behavioral phenotyping of mouse models of neurodevelopmental disorders: relevant social behavior patterns across the life span. *Behav. Brain Res.* **176**, 40–52 (2007).
91. Branchi, I., Santucci, D., Vitale, A. & Alleva, E. Ultrasonic vocalizations by infant laboratory mice: a preliminary spectrographic characterization under different conditions. *Dev Psychobiol* **33**, 249–256 (1998).
92. Scattoni, M. L. *et al.* Progressive behavioural changes in the spatial open-field in the quinolinic acid rat model of Huntington's disease. *Behav. Brain Res.* **152**, 375–383 (2004).
93. Thiel, C. M., Müller, C. P., Huston, J. P. & Schwarting, R. K. High versus low reactivity to a novel environment: behavioural, pharmacological and neurochemical assessments. *Neuroscience* **93**, 243–251 (1999).
94. Rutter, M. Cognitive deficits in the pathogenesis of autism. *Child Psychology & Psychiatry & Allied Disciplines* **24**, 513–531 (1983).
95. Velikonja, T., Fett, A.-K. & Velthorst, E. Patterns of Nonsocial and Social Cognitive Functioning in Adults With Autism Spectrum Disorder: A Systematic Review and Meta-analysis. *JAMA Psychiatry* **76**, 135–151 (2019).
96. Yankelevitch-Yahav, R., Franko, M., Huly, A. & Doron, R. The forced swim test as a model of depressive-like behavior. *J Vis Exp* (2015) doi:10.3791/52587.
97. Gegelashvili, M. AUTISM AND DEPRESSION (REVIEW). *Georgian Med News* 54–56 (2019).
98. Pawlak, R. *et al.* Rapid, specific and active site-catalyzed effect of tissue-plasminogen activator on hippocampus-dependent learning in mice. *Neuroscience* **113**, 995–1001 (2002).
99. Teesalu, T. *et al.* Tissue plasminogen activator and neuroserpin are widely expressed in the human central nervous system. *Thromb. Haemost.* **92**, 358–368 (2004).
100. Bennur, S. *et al.* Stress-induced spine loss in the medial amygdala is mediated by tissue-plasminogen activator. *Neuroscience* **144**, 8–16 (2007).
101. Rose, K., Goldberg, M. & Choi, D. Cytotoxicity in murine neocortical cell culture. in *In vitro biological methods. Methods in Toxicology* **1**, 46 – 60 (1993).
102. Baron, A. *et al.* NR2D-containing NMDA receptors mediate tissue plasminogen activator-promoted neuronal excitotoxicity. *Cell death and differentiation* **17**, 860–871 (2010).
103. Prat, M., Crepaldi, T., Pennacchietti, S., Bussolino, F. & Comoglio, P. M. Agonistic monoclonal antibodies against the Met receptor dissect the biological responses to HGF. *Journal of cell science* **111**, 237–247 (1998).
104. Perera, T. *et al.* JNJ-38877605: a selective Met kinase inhibitor inducing regression of Met-driven tumor models. *Cancer research* **68**, (2008).
105. Macrez, R. *et al.* Neuroendothelial NMDA receptors as therapeutic targets in experimental autoimmune encephalomyelitis. *Brain : a journal of neurology* **139**, 2406–2419 (2016).
106. Pasquet, N. *et al.* Tissue-Type Plasminogen Activator Controlled Corticogenesis Through a Mechanism Dependent of NMDA Receptors Expressed on Radial Glial Cells. *Cereb. Cortex* **29**, 2482–2498 (2019).
107. McCarson, K. E., Winter, M. K., Abrahamson, D. R., Berman, N. E. & Smith, P. G. Assessing complex movement behaviors in rodent models of neurological disorders. *Neurobiology of Learning and Memory* **165**, 106817 (2019).

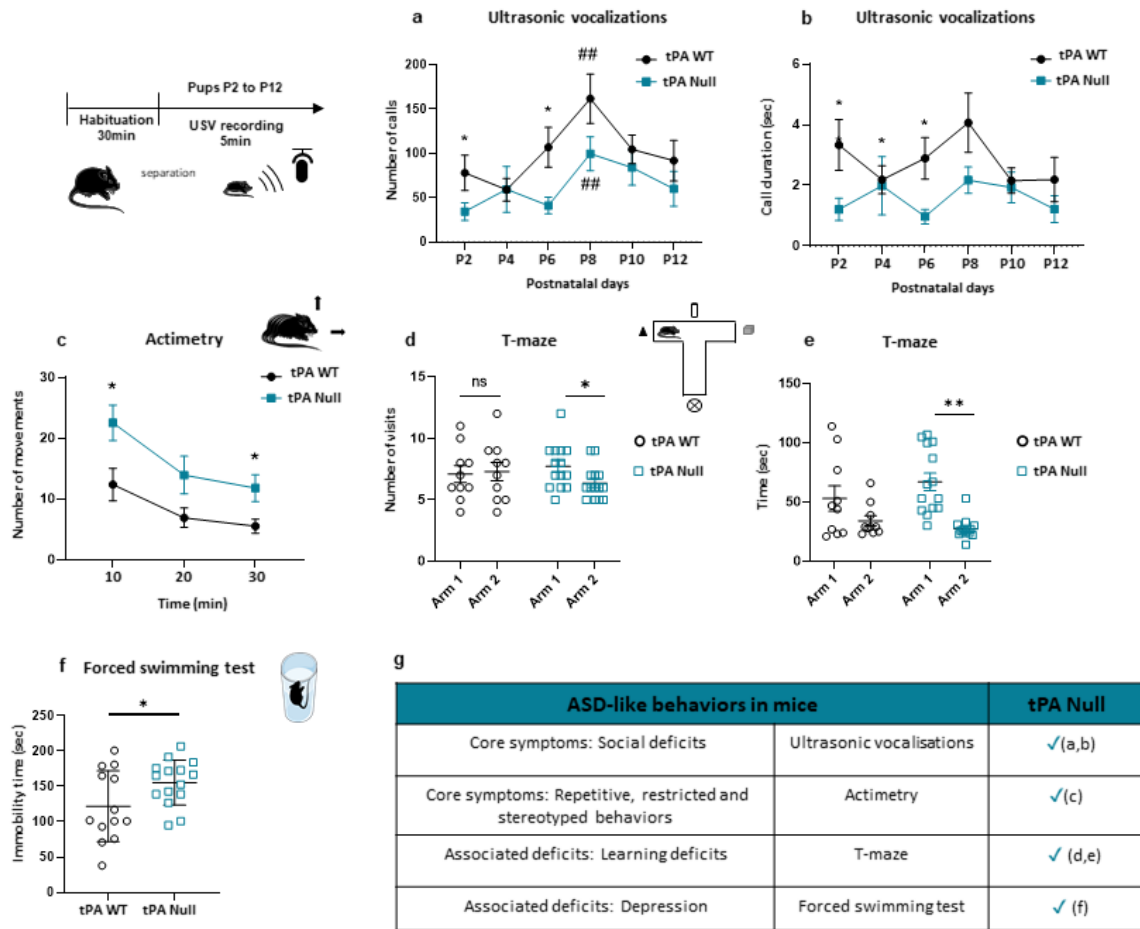
108. Mineur, Y. S., Belzung, C. & Crusio, W. E. Effects of unpredictable chronic mild stress on anxiety and depression-like behavior in mice. *Behavioural Brain Research* **175**, 43–50 (2006).
109. Trapp, T. *et al.* Hepatocyte growth factor/c-MET axis-mediated tropism of cord blood-derived unrestricted somatic stem cells for neuronal injury. *The journal of biological chemistry* **283**, 32244–32253 (2008).
110. Koh, J. Y. & Choi, D. W. Quantitative determination of glutamate mediated cortical neuronal injury in cell culture by lactate dehydrogenase efflux assay. *Journal of neuroscience methods* **20**, 83–90 (1987).





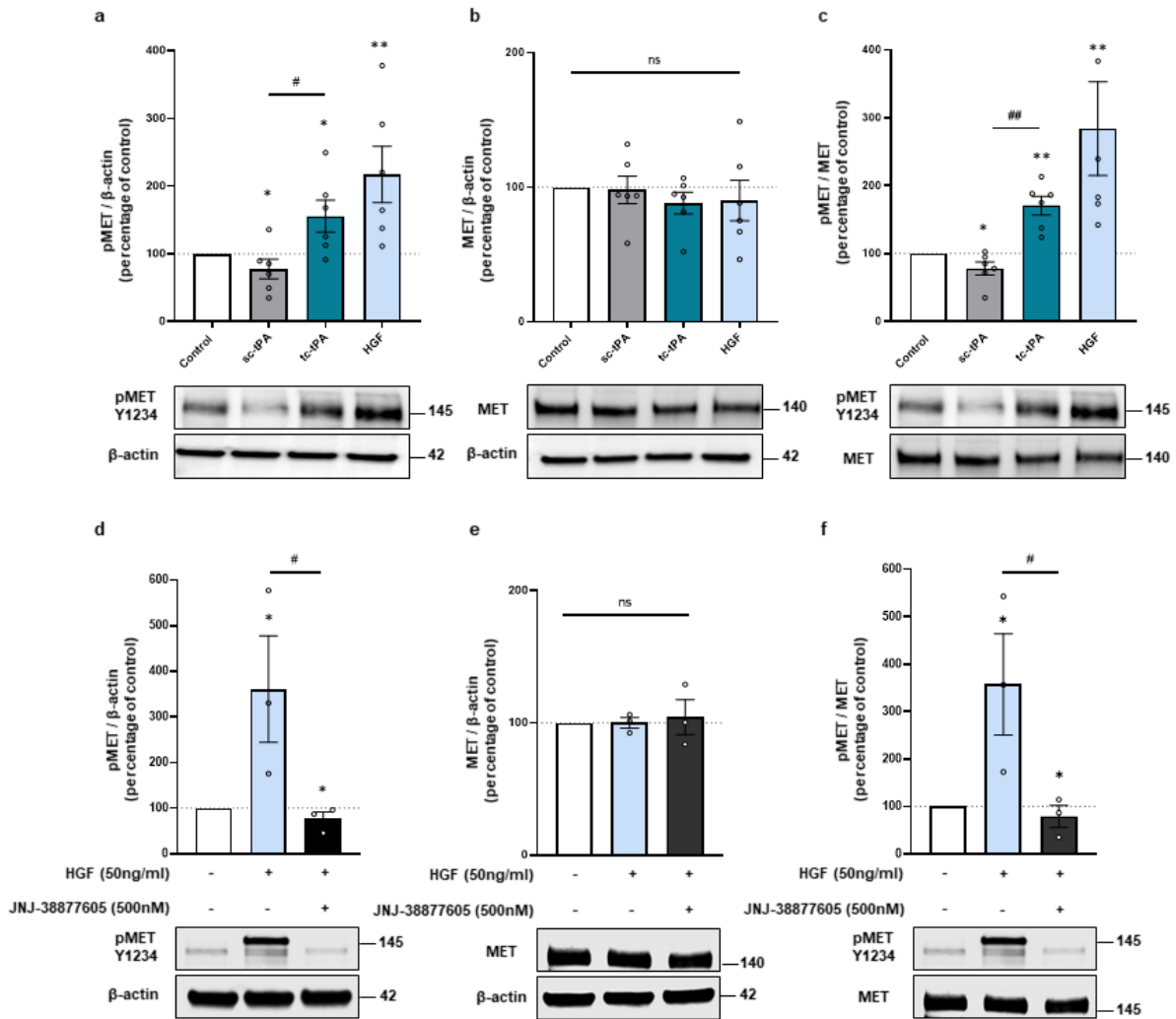
**Figure 1. RNA sequencing analysis demonstrates downregulation of *MET* gene from tPA Null.**

(**a-e**), Volcano plot of  $\log_2$  fold change versus significance ( $-\log_{10}(\text{q-value})$ ) for a pairwise comparison of transcripts between tPA WT and tPA Null mice within 5 cerebral structures. **a**, hippocampus with 18 genes up-regulated and 44 genes down-regulated. **b**, amygdala with 39 genes up-regulated and 47 genes down-regulated. **c**, prefrontal cortex with 31 genes up-regulated and 79 genes down-regulated. **d**, parietal cortex with 91 genes up-regulated and 63 genes down-regulated, **e**, entorhinal cortex with 29 genes up-regulated and 156 genes down-regulated. Heatmaps representing RNA sequencing gene expression which are up and down-regulated by using a z-score scale in **f** hippocampus, **g** amygdala, **h** prefrontal cortex, **i** parietal cortex, **j** entorhinal cortex. **k**, Representation of z score of *MET* gene in 5 cerebral structures shows a significant downregulation of *MET* gene in amygdala and entorhinal cortex in tPA Null mice. RNA-sequencing experiments originate from 3 tPA WT animals and 3 tPA Null. Analysis and statistical analysis were performed by Helixio. Data are represented as mean  $\pm$  SEM; \*  $P < 0.05$ , \*\*  $P < 0.01$ , \*\*\*  $P < 0.001$  indicate significantly different between tPA WT and tPA Null.



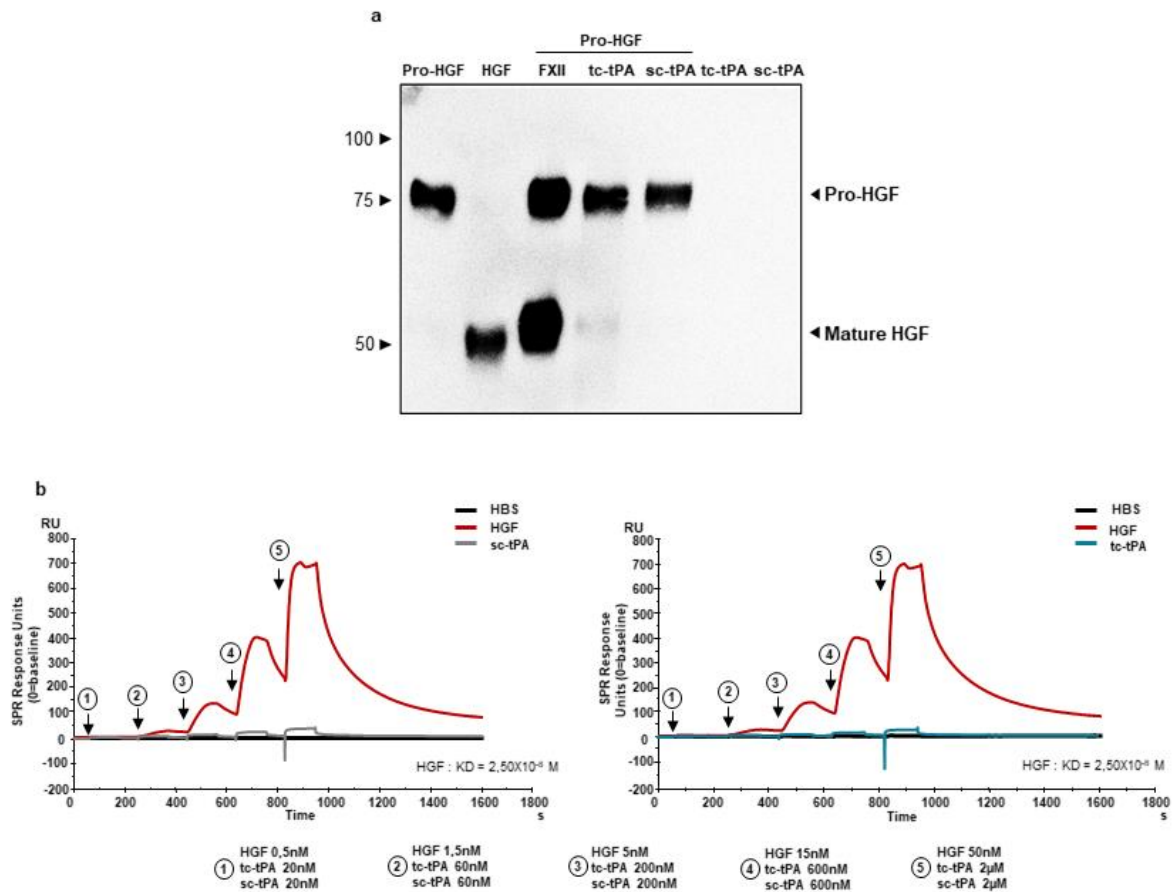
**Figure 2. tPA Null mice demonstrate autistic-like behaviors.**

**a**, Evaluation of the behavioral phenotype of tPA knockout mice (tPA Null) and of their wild-type littermates (tPA WT). **(a, b)**, Ultrasonic vocalization recordings:  $n_{tPA WT} = 19$ ;  $n_{tPA Null} = 20$ . **c**, Actimetry:  $n_{tPA WT} = 12$ ;  $n_{tPA Null} = 15$ . **(d, e)**, T-maze:  $n_{tPA WT} = 10$ ;  $n_{tPA Null} = 14$ . **f**, Forced swimming test:  $n_{tPA WT} = 13$ ;  $n_{tPA Null} = 15$ . **g**, Summary of autistic-like features in tPA Null mice. Friedman test **(a)**, Mann-Whitney U-tests **(a-c)**, Wilcoxon signed-rank tests **(d-e)**, Unpaired t-test **(f)**. Data are represented as mean  $\pm$  SEM, \*  $P < 0.05$ , \*\*  $P < 0.01$ , ###  $P < 0.01$ .



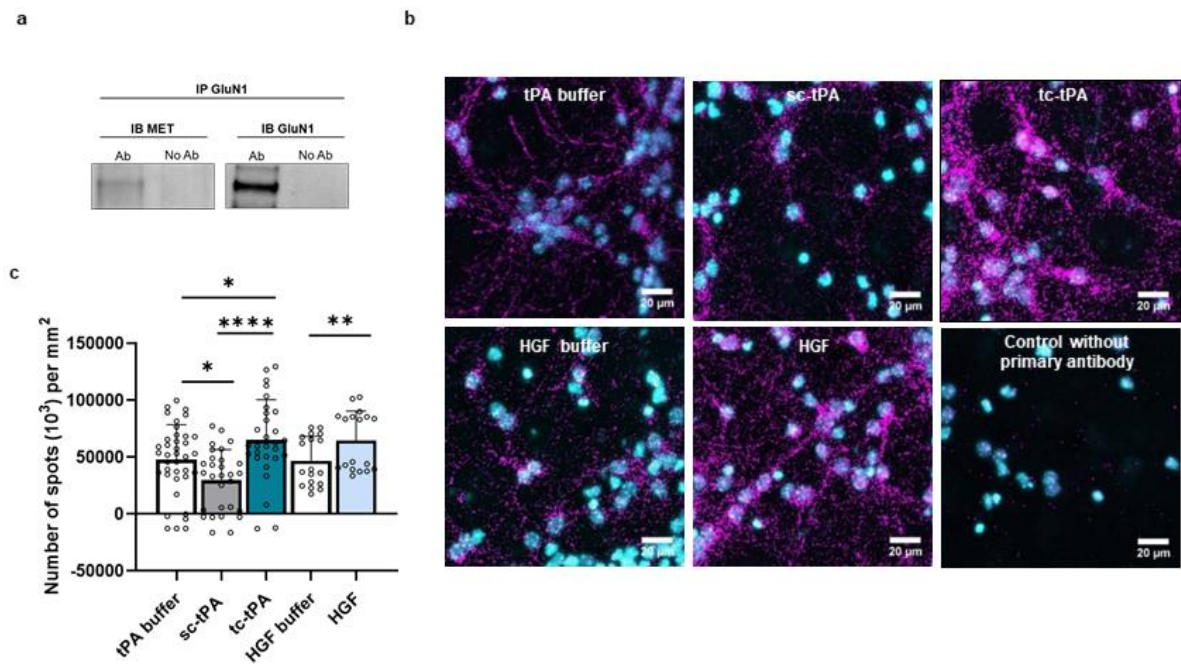
**Figure 3. The tc-tPA activates MET receptors.**

(a, b, c), Representative and quantification of western blot from primary cultures of cortical neurons (12-13 DIV) were subjected to 1 hour either sc-tPA or tc-tPA (300nM) or HGF (50ng/ml) prior immunoblotting with antibodies directing against phospho-MET Y1234 and total MET. **a**, Quantification of corresponding ratio of phospho-MET on actin. **b**, Quantification of corresponding ratio of total MET on actin. **c**, Quantification of corresponding ratio of phospho-MET on total MET. **(d,e,f)** Representative and quantification of western blot from primary cultures of cortical neurons (12-13 DIV) were subjected to 1 hour either HGF (50ng/ml) alone or either with JNJ-38877605 (500nM) prior immunoblotting with antibodies raised against phospho-MET Y1234 and total MET. **d**, Quantification of corresponding ratio of phospho-MET on actin. **(e)** Quantification of corresponding ratio of total MET on actin. **f**, Quantification of corresponding ratio of phospho-MET on total MET. Data are represented as mean  $\pm$  SEM  $n = 6$  (a, b, c) and  $n = 3$  (d,e,f), \*  $P < 0.05$ ; \*\*  $P < 0.01$  indicate significantly different from the corresponding control by Mann-Whitney test, #  $P < 0.05$ ; ##  $P < 0.01$  indicate significantly different between treatments with Mann-Whitney test.



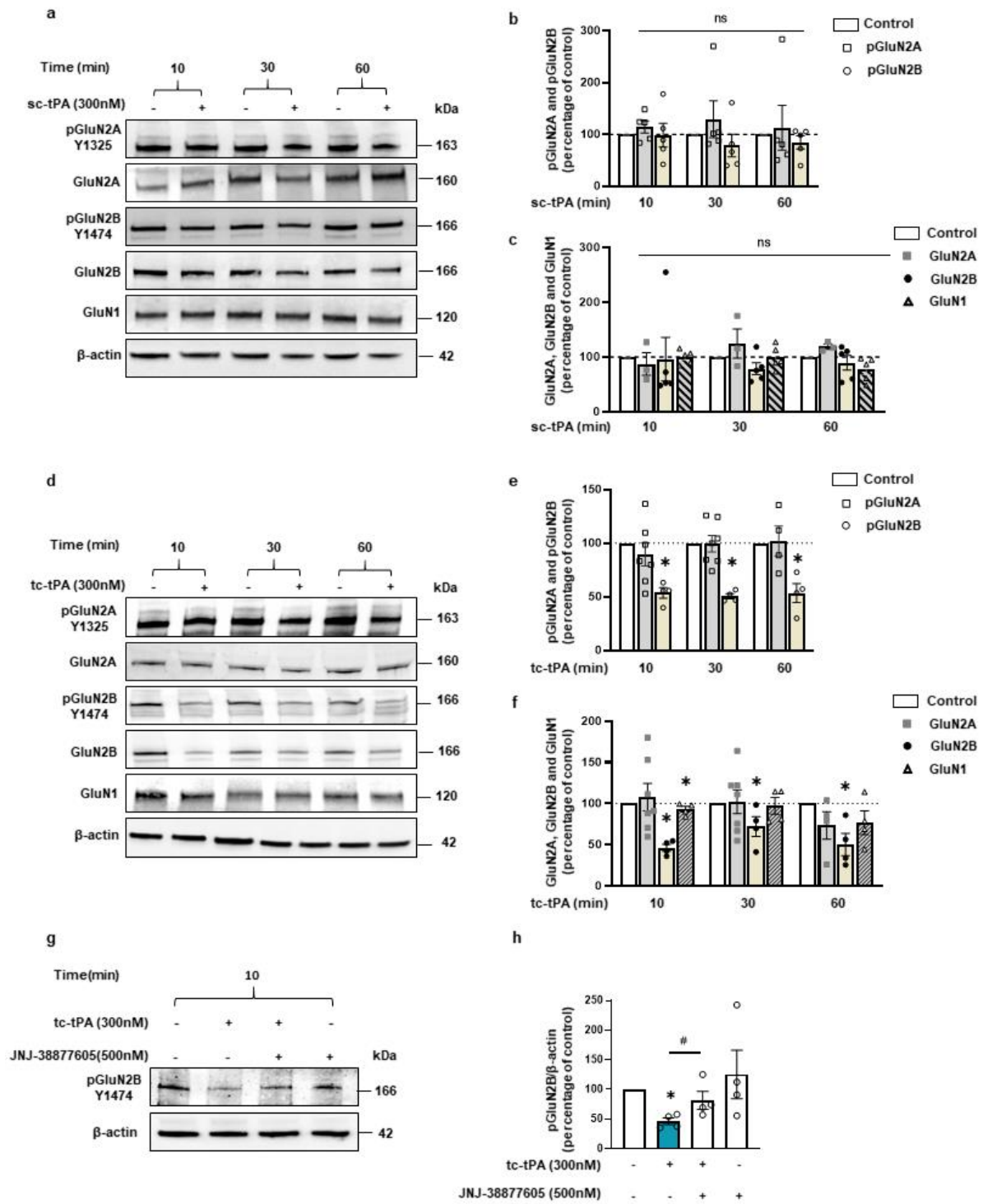
**Figure 4. The tc-tPA activates MET receptors independently of Hepatocyte Growth Factor (HGF) conversion.**

**a**, tc-tPA does not convert Pro-HGF in mature HGF. Pro-HGF (150 nM) was incubated at 37°C for 4 h without proteases (lane 1) or with 5,2 nM FXIIa (internal control), 150nM tc-tPA and 150nM sc-tPA. Immunodetection of αHGF after incubation. Representative images of three independent experiments are presented. **b**, Resonance surface plasmon does not reveal of interaction of sc-tPA and tc-tPA on MET receptor. Five increasing doses (20nM, 60nM, 200nM, 600nM, 2µM) of sc-tPA and tc-tPA have been applied on fixed MET receptor and no SPR signal have been detected. HBS is the buffer used for the immobilization of MET receptor. Recombinant HGF has been used as control (0,5nM, 1,5nM, 5nM, 15nM, 50nM) showing an increase of SPR signal with an affinity (Kd) of 2,5x10<sup>-8</sup>M.



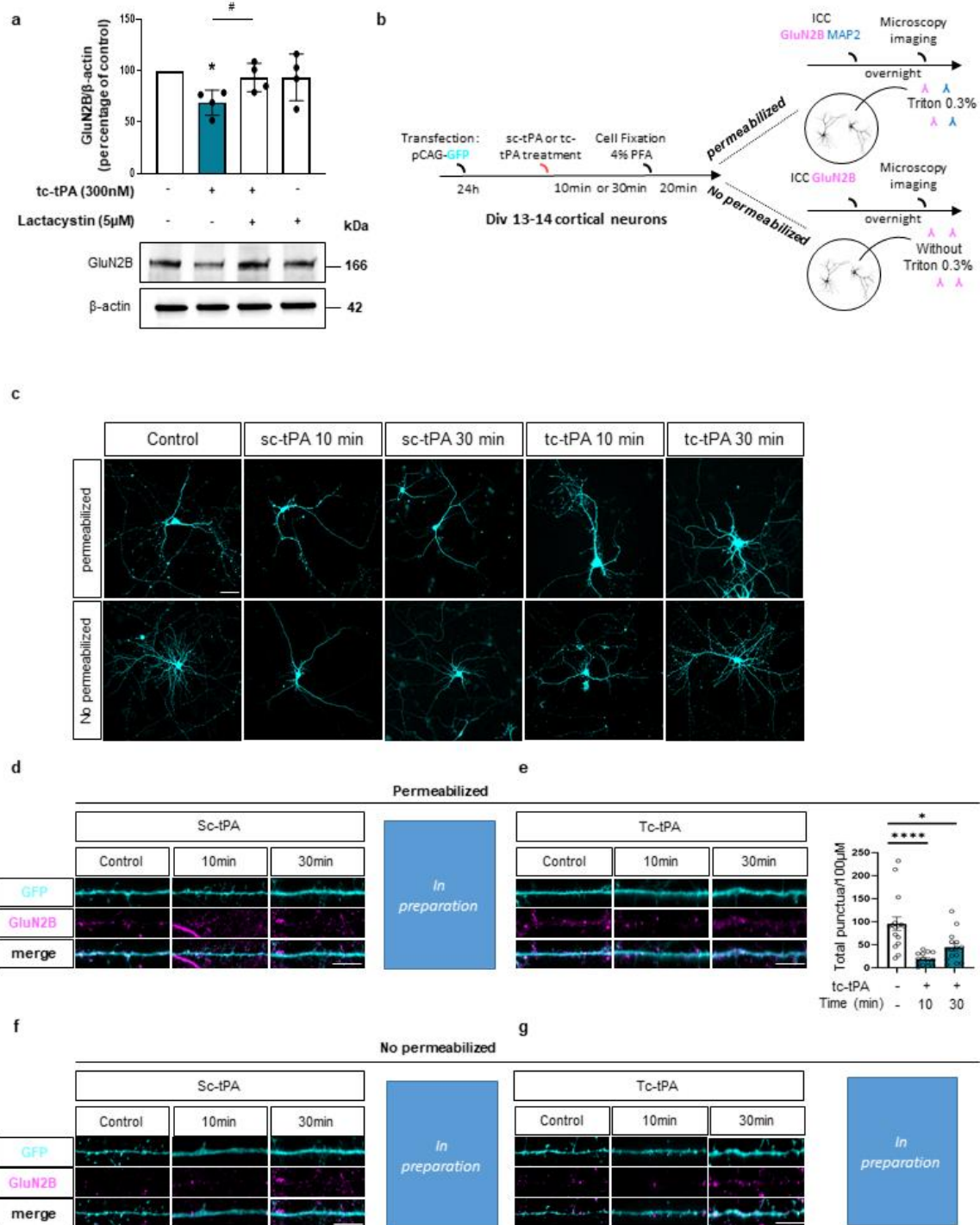
**Figure 5. NMDAR and MET form complexes at the neuronal surface modulating by sc-tPA, tc-tPA and HGF.**

**a**, Immunoprecipitations with GluN1 antibody revealed by western blot against either MET or GluN1 antibodies on primary cultures of cortical neurones (representative blot of three independent experiments). **b**, Representative confocal microscopy images of PLA staining on primary cultures of cortical neurones treated tPA buffer, HGF buffer, sc-tPA (300nM), tc-tPA (300nM) and recombinant HGF (50ng/ml) for 45min. Magenta fluorescent profiles represent regions of PLA signal amplifications denoting MET and NMDAR proximity. **c**, Quantitative analysis of MET/NMDAR PLA signals.  $N = 18$  concerning conditions HGF buffer and HGF  $N = 18$  and for tPA buffer, sc-tPA (300nM), tc-tPA (300nM)  $N = 29$  from five independent cultures. (Data are represented as mean  $\pm$  SEM; \*  $P < 0.05$ , \*\*  $P < 0.01$  and \*\*\*\*  $P < 0.0001$  indicate significantly different from the corresponding control by Kruskal-Wallis and Mann-Whitney tests).



**Figure 6. The tc-tPA (300nM) induces a decrease on GluN2B phosphorylation (Y1474) and total GluN2B involving MET receptor.**

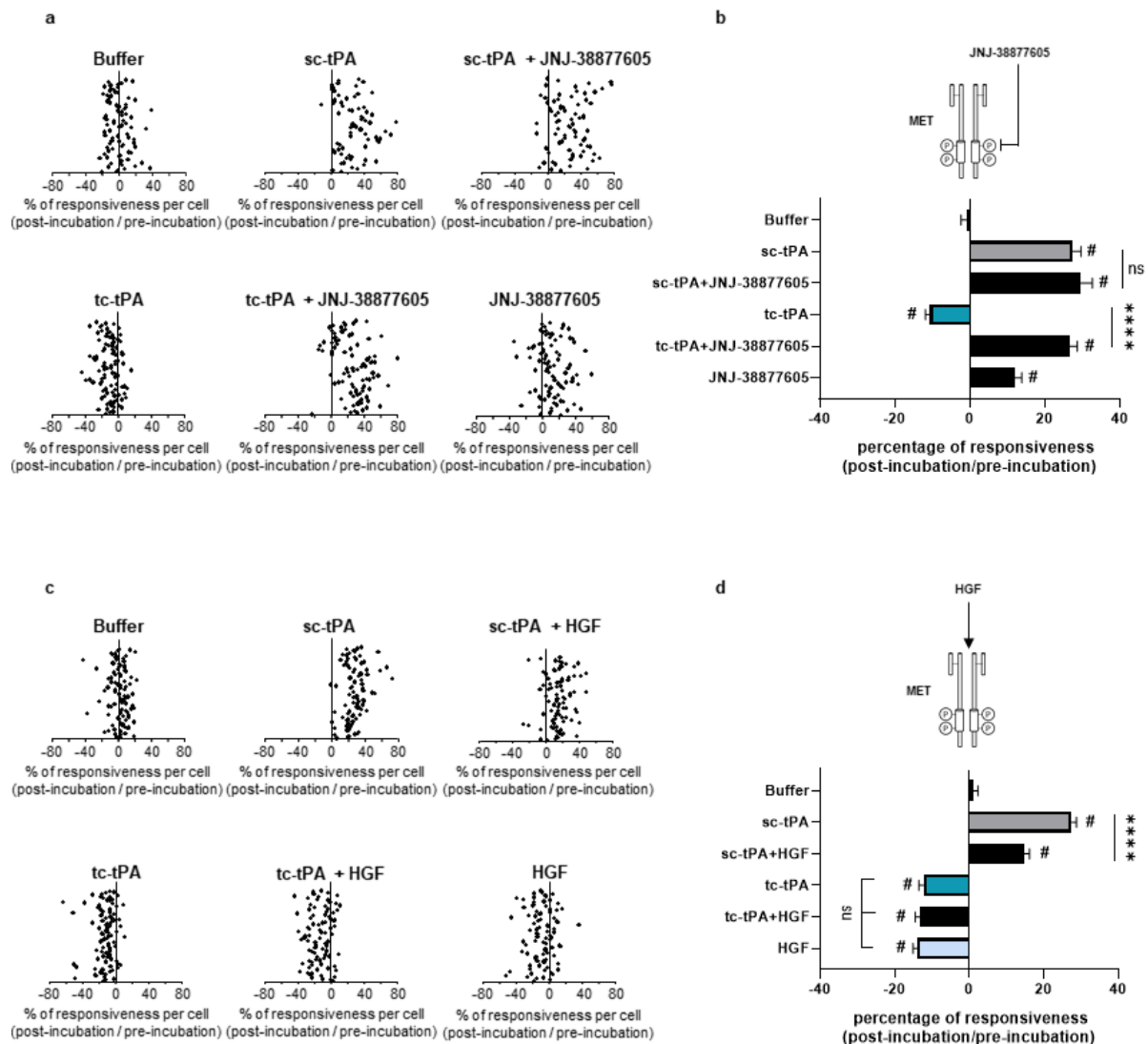
**a**, Representative western blot **b**, and analysis mean density of the band for pGluN2A (Y1325) and pGluN2B (Y1474) on cultures of cortical neurons incubated with sc-tPA (300nM) on time-dependent (10-30-60 minutes;  $n = 5$  independent experiments). No significant difference with sc-tPA. **c**, Analysis mean density of the band for total GluN2A, total GluN2B and total GluN1 ( $n = 5$  independent experiments for GluN2B and GluN1,  $n = 3$  for GluN2A). No significant difference with sc-tPA. **d**, Representative western blot. **e**, Analysis mean density of the band for pGluN2A (Y1325) and pGluN2B (Y1474) on cultures of cortical neurons incubated with with tc-tPA (300nM) on time-dependent (10-30-60 minutes;  $n = 4$  independent experiments for GluN2B (Y1474) and  $n = 7$  for pGluN2A (Y1325) at 10-30minutes and  $n = 4$  at 60minutes). The analysis reveals that tc-tPA induces a decrease of pGluN2B (Y1474) at 10-30 and 60 minutes. **f**, Analysis mean density of the band for total GluN2A, total GluN2B and total GluN1 ( $n = 4$  independent experiments for GluN2B and GluN1,  $n = 7$  for GluN2A at 10-30minutes and  $n = 4$  at 60minutes). tc-tPA significantly decreases total GluN2B at 10-30 and 60 minutes and total GluN1 at 10 minutes. **g**, Representative western blot (**h**), and analysis mean density of the band for pGluN2B (Y1474) after treatment on cortical neurons with tc-tPA (300nM) for 10 min alone or in combination with JNJ-38877605 (500nM). JNJ-38877605 significantly reverses the level of pGluN2B (Y1474) ( $n = 4$  independent experiments for pGluN2B (Y1474)). All data are represented as mean  $\pm$  SEM, \*  $P < 0.05$  compared to corresponding control and #  $P < 0.05$  compared to treatments; Mann-Whitney test. ns = non-significant.





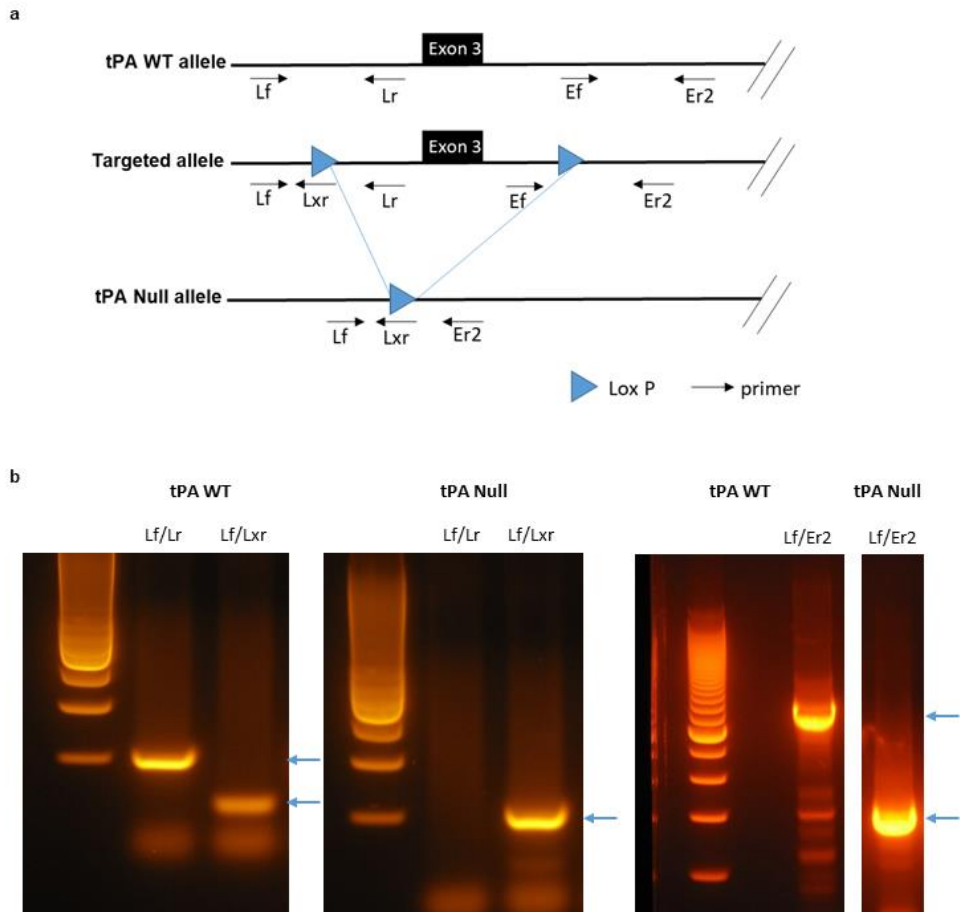
**Figure 7: The tc-tPA induces an early degradation of GluN2B**

Pre-treatment for 2 hours with the Lactacystin (5 $\mu$ M) on cortical neurons (13 DIV) and 10 minutes of tc-tPA (300nM) treatment with or without Lactacystin. **a**, Representative western blot, and analysis mean density of the band for total GluN2B. The tc-tPA with Lactacystin significantly reverse the level of GluN2B compared to tc-tPA alone.  $n = 4$  independent experiments. All data are represented as mean  $\pm$  SEM, \*  $P < 0.05$ ; indicate significantly different from the corresponding control by Mann-Whitney test. #  $P < 0.05$  indicate significantly different between treatments by Mann-Whitney test. **b**, Timeline of the immunocytochemistry experiments. **c**, Representative images of cortical neurons (13 DIV) using for immunocytochemistry experiments. Scale bar = 50 $\mu$ M. **d**, *in preparation*. **e**, tc-tPA (300nM) significantly decreases total GluN2B in permeabilized conditions at 10 and 30 minutes.  $n = 11$  neurons and 16 dendrites for control,  $n = 6$  neurons and 14 dendrites for tc-tPA 10 minutes and  $n = 12$  neurons and 15 dendrites for tc-tPA 30 minutes. \*  $P < 0.05$ ; \*\*\*\*  $P < 0.0001$  indicate significantly different from the corresponding control by Kruskal-Wallis test. **f** and **g**, *in preparation*. Scale bar = 10 $\mu$ M.



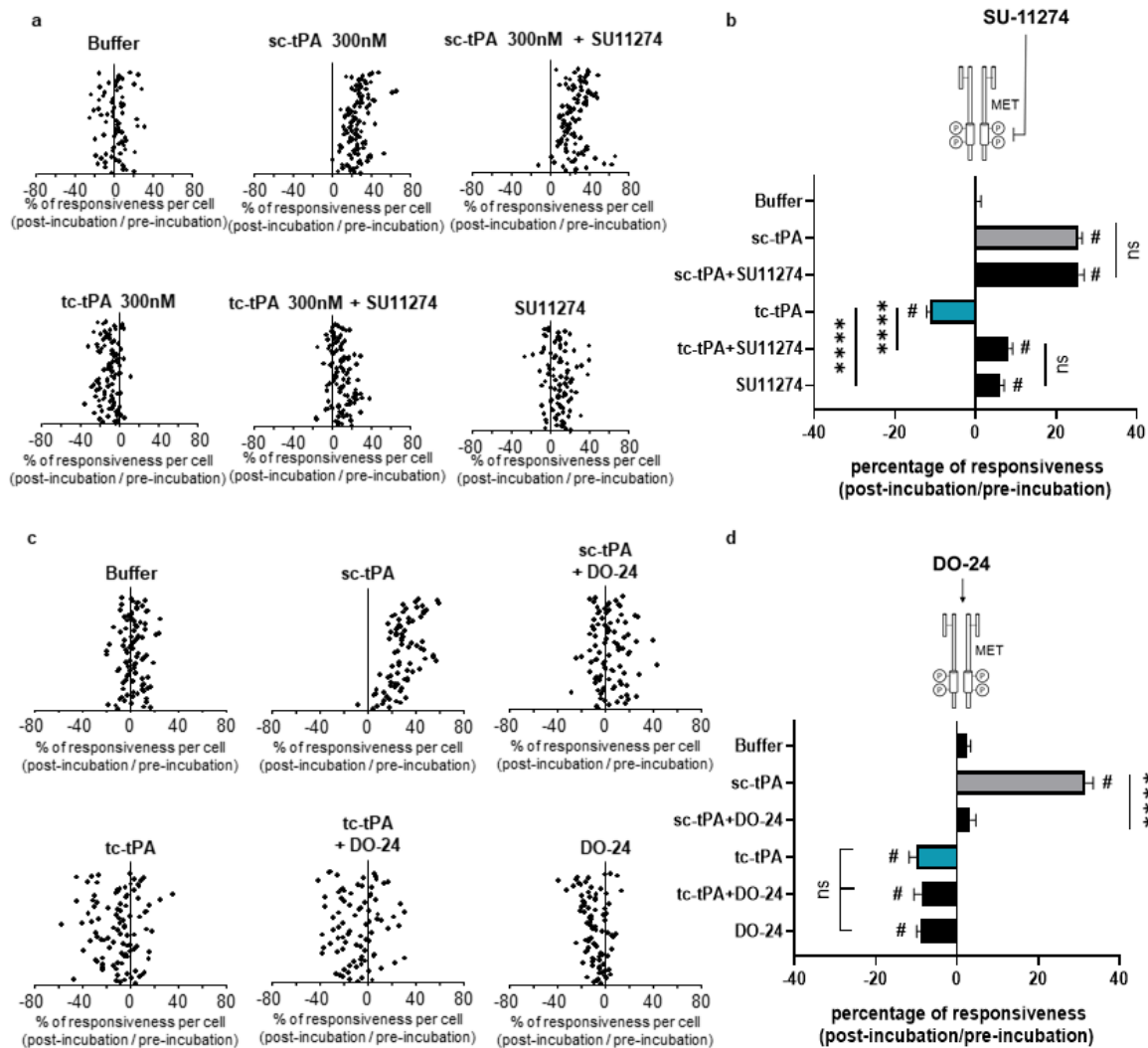
**Figure 8. Inhibition or activation of the HGF-MET axis controls the tPA-dependent NMDA receptor-mediated neuronal calcium influx.**

Calcium video imaging performed on primary cultures of cortical neurons (13 DIV). After control NMDA stimulations (25 mM) used as baseline, neurons were incubated for 45min with **(a,b)** JNJ-38877605 buffer + tPA buffer (control,  $n = 88$  cells), JNJ-38877605 (500nM;  $n = 91$  cells), sc-tPA (300nM;  $n = 77$  cells) and tc-tPA (300nM;  $n = 98$  cells) alone or combined with JNJ-38877605 ( $n = 82$  cells and  $n = 98$  cells respectively). **(c,d)**, HGF buffer + tPA buffer (control,  $n = 96$  cells), rHGF (50ng/mL;  $n = 91$  cells), sc-tPA (300nM;  $n = 93$  cells) and tc-tPA (300nM;  $n = 100$  cells) alone or combined with rHGF ( $n = 89$  cells and  $n = 88$  respectively). Percentage of stimulation or inhibition after incubation were calculated for each individual cell and reported as the percentages of responsiveness for each group ( $n = 3$  independent experiments, mean  $\pm$  SEM). #, indicates significant difference for the comparison of pre- and post-incubation responses by Wilcoxon signed-rank test ( $P < 0.0001$ ). \*\*\*\*, indicates significantly different from the corresponding control by Kruskal-Wallis and Mann-Whitney tests ( $P < 0.0001$ ).



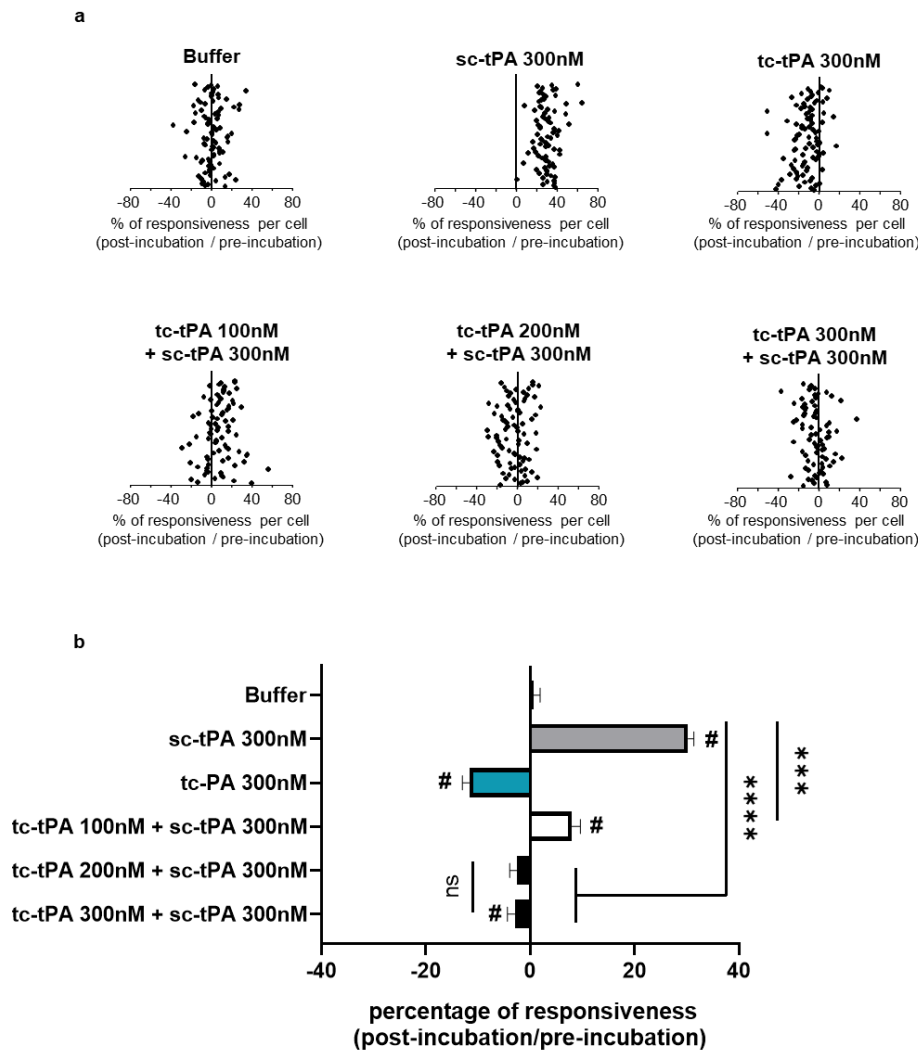
### Supplementary 1: Genetic validation of tPA Null mice.

**a**, Generation of tPA Null mice leads to a deletion of exon 3 which is the first coding exon for *tPA* gene. **b**, Genetic validation of tPA gene deletion by PCR genotyping. A Lox P site is surrounded of Lf and Lr primers which generate a PCR fragment of 219 base pairs concerning tPA WT allele and which is absent for tPA Null allele. No modification for the size of PCR fragments between Lf and Lxr primers. PCR fragments between Lf and Er2 primers are of 1303 base pairs concerning tPA WT allele and 411 base pairs for tPA Null allele.



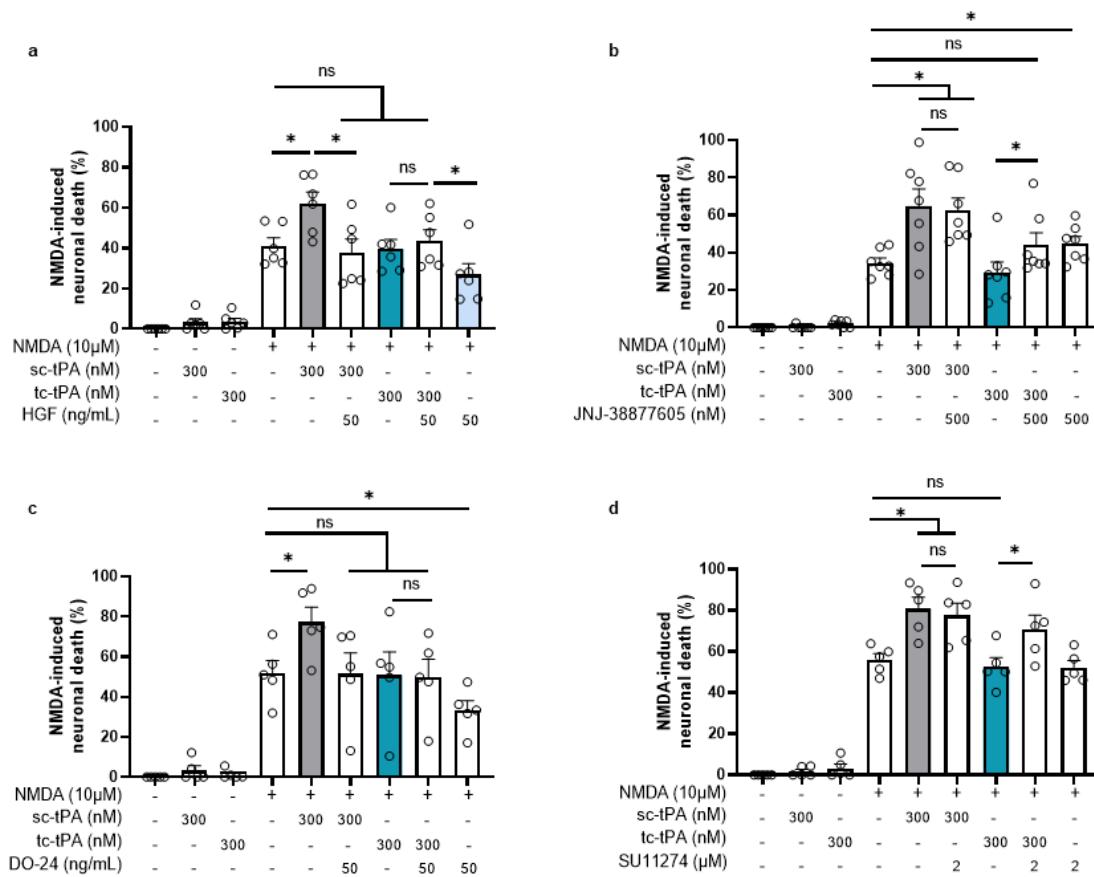
**Supplementary 2: Activation with DO-24 or the inhibition with SU11274 of the HGF-MET axis controls the tPA-dependent NMDA receptor-mediated neuronal calcium influx.**

Calcium video imaging performed on primary cultures of cortical neurons (12 DIV). After control NMDA stimulations used as baseline, neurons were incubated for 45min with (a,b), SU11274 buffer + tPA buffer (control,  $n = 78$  cells), SU11274 ( $2\mu\text{M}$ ;  $n = 93$  cells), sc-tPA ( $300\text{nM}$ ;  $n = 118$  cells) and tc-tPA ( $300\text{nM}$ ;  $n = 108$  cells) alone or in combination ( $n = 111$  cells and  $n = 121$  cells respectively). Each dot represents one cell. (c, d), DO-24 buffer + tPA buffer (control,  $n = 95$  cells), DO-24 ( $50\text{ng/mL}$ ;  $n=88$  cells), sc-tPA ( $300\text{nM}$ ;  $n=86$  cells) and tc-tPA ( $300\text{nM}$ ;  $n = 100$  cells) alone or combined with DO-24 ( $n = 94$  cells and  $n = 86$  cells respectively). Each dot represents one cell. (b,d), Percentage of stimulation or inhibition after incubation were calculated for each individual cell and reported as the percentages of responsiveness for each group ( $n = 3$  independent experiments, mean  $\pm$  SEM). #, indicates significant difference for the comparison of pre- and post-incubation responses by Wilcoxon signed-rank test ( $P < 0.0001$ ). \*\*\*, indicates significantly different from the corresponding control by Kruskal-Wallis and Mann-Whitney tests ( $P < 0.0001$ ).



### Supplementary 3: sc-tPA and tc-tPA activate two different and opposite signaling pathways..

(a,b), Calcium video imaging performed on primary cultures of cortical neurons (12-13 DIV). **a**, After control NMDA stimulations used as baseline, neurons were incubated for 45min with buffers of tPAs ( $n = 90$  cells), sc-tPA and tc-tPA (300nM;  $n = 83$  cells and  $n = 92$  cells respectively) or with sc-tPA (300nM) combined with tc-tPA (100nM,  $n = 82$  cells; 200nM,  $n = 82$  cells buffer; 300nM,  $n = 77$  cells). Each dot represents one cell. **b**, Percentage of stimulation or inhibition after incubation were calculated for each individual cell and reported as the percentages of responsiveness for each group ( $n = 3$  independent experiments, mean  $\pm$  SEM) (+30.23% for sc-tPA, -11.65% for tc-tPA and +7.97% for sc-tPA + tc-tPA 100nM, -2.51% for sc-tPA + tc-tPA 200nM and -2.97% for sc-tPA + tc-tPA 300nM). #, indicates significant difference for the comparison of pre- and post-incubation responses by Wilcoxon signed-rank test ( $P < 0.0001$ ). \*\*\*\*, indicates significantly different from the corresponding control by Kruskal-Wallis and Mann-Whitney tests ( $P < 0.0001$ ).

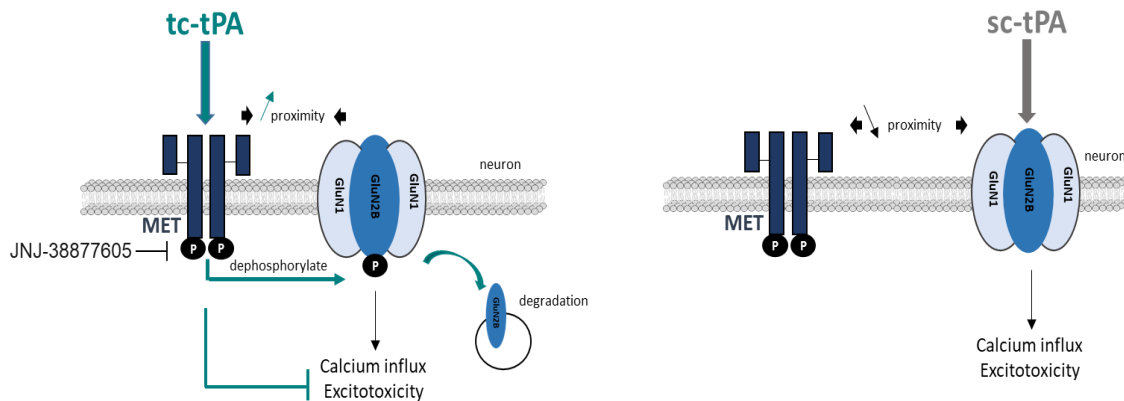


**Supplementary 4: The blockage or the MET activation affects the potentiation of NMDA-mediated neuronal death.**

Neuronal death was assessed on primary cultured cortical neurons (12-14 DIV) by measuring LDH release in the bathing media after 24 hours exposure to NMDA (10 $\mu$ M), sc-tPA (300nM) and tc-tPA (300nM) alone or combined with **a**, rHGF (50ng/mL;  $n = 6$ , mean  $\pm$  SEM) or **b**, JNJ-38877605 (500nM;  $n = 7$ , mean  $\pm$  SEM), **c**, DO-24 (50ng/mL;  $n = 5$ , mean  $\pm$  SEM), **d**, SU11274 (2 $\mu$ M;  $n = 5$ , mean  $\pm$  SEM). \*, indicates significantly different from the corresponding control by Kruskal-Wallis and Mann-Whitney tests ( $P < 0.05$ ).

## DISCUSSION

**Article: Tissue type plasminogen activator dependent crosstalk between MET and NMDA receptors containing GluN2B: possible involvement in autism spectrum disorders.**



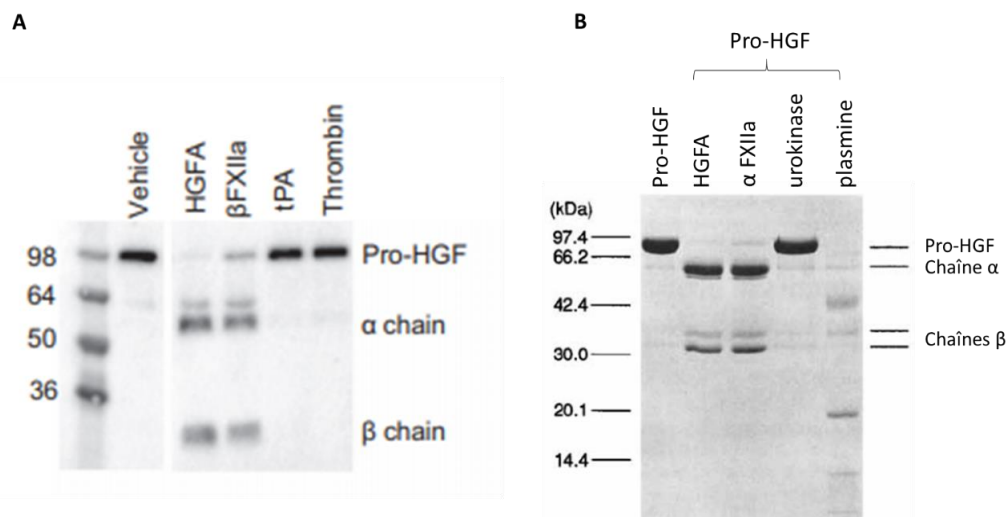
L'étude de Parcq et collaborateurs a été la première à décrire des effets différentiels entre le sc-tPA et le tc-tPA sur la signalisation glutamatergique. Au cours de ce travail de thèse, nous avons pu identifier un nouveau récepteur partenaire au tPA, le récepteur MET. En effet, sur des cultures primaires de neurones corticaux, seul le tc-tPA active les récepteurs MET, a priori indépendamment d'une conversion du pro-HGF en HGF. Le tc-tPA et l'HGF recrutent massivement le récepteur MET à la membrane, à proximité des récepteurs NMDA. A l'inverse, le sc-tPA diminue la proximité entre ces deux récepteurs. De plus, le tc-tPA induit une diminution de la phosphorylation de GluN2B (Y1474) dépendante de l'activation du récepteur MET. Il est également responsable d'une dégradation précoce de la sous-unité GluN2B.

D'autre part, l'étude transcriptomique menée sur des souris déficientes en tPA (tPA Null) a révélé une diminution du nombre de transcrits MET dans l'amygdale et le cortex entorhinal. De façon intéressante, les gènes codant la sous-unité GluN2B et le récepteur MET sont deux gènes candidats identifiés comme facteur de risque dans les TSA. L'étude comportementale sur les souris tPA Null montre des déficits comportementaux caractéristiques des TSA.

## I. Implication du récepteur MET dans la signalisation glutamatergique

### 1. Activation du récepteur MET par le tc-tPA

La conversion du pro-HGF en HGF mature par le tPA est initiée en 1993 par l'équipe de Mars et collaborateurs. En radiomarquant du pro-HGF avec de l'iode 125, ils montrent que le tPA et l'uPA convertissent le pro-HGF en HGF après une heure d'incubation à 37°C (Mars *et al.* 1993). En revanche, nos résultats n'ont pas permis de démontrer cette conversion en présence de sc-tPA et de tc-tPA après 4 heures d'incubation à 37°C. Nos données sont en accord avec la littérature récente, et notamment avec la publication de l'équipe de Zamolodchikov en 2019. Dans leur étude, la technique utilisée est celle que nous avons employée. Celle-ci repose sur l'incubation à 37°C de pro-HGF recombinant en présence de tPA, spécifiquement de tc-tPA, durant 18 heures. Comme le montre la figure ci-dessous, aucune forme mature d'HGF n'est détectée (Figure 30, Zamolodchikov *et al.* 2019). A partir de ces résultats, différentes hypothèses peuvent être suggérées pour expliquer l'activation du récepteur MET par le tc-tPA. Premièrement, comme il a été évoqué dans l'introduction, les deux formes de tPA sont capables de convertir le plasminogène en plasmine, possédant à titre de rappel 38% d'homologies avec l'HGF (Lokker *et al.* 1992). L'hypothèse aurait été que le tc-tPA clive le plasminogène en plasmine, qui lui clive à son tour le pro-HGF. Mais, comme prouvé en 1995 par l'équipe de Shimomura, la plasmine ne convertit pas le pro-HGF en HGF, mais elle est capable d'induire un clivage protéolytique du pro-HGF en de multiples fragments, aboutissant à sa dégradation (Shimomura *et al.* 1995).

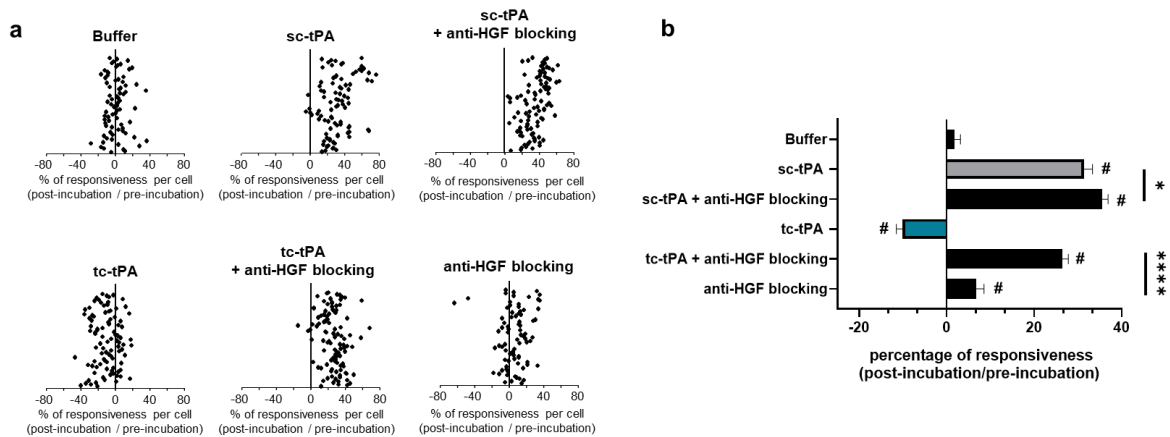


**Figure 30 : Conversion du pro-HGF en HGF mature.**

En **A**, représentation d'un western blot montrant que l'HGF activateur (HGFA) et le  $\beta$ FXIIa peuvent convertir le pro-HGF en HGF. En présence de tc-tPA (tPA dans la figure) et de thrombine, le pro-HGF n'est pas converti (Zamolodchikov *et al.* 2019). En **B**, il s'agit d'un western blot représentant aussi la conversion du pro-HGF en HGF en présence de l'HGF activateur (HGFA) et de l' $\alpha$ FXIIa. L'urokinase ne montre pas de conversion et la plasmine clive protéolytiquement le pro-HGF en plusieurs fragments (Shimomura *et al.* 1995).



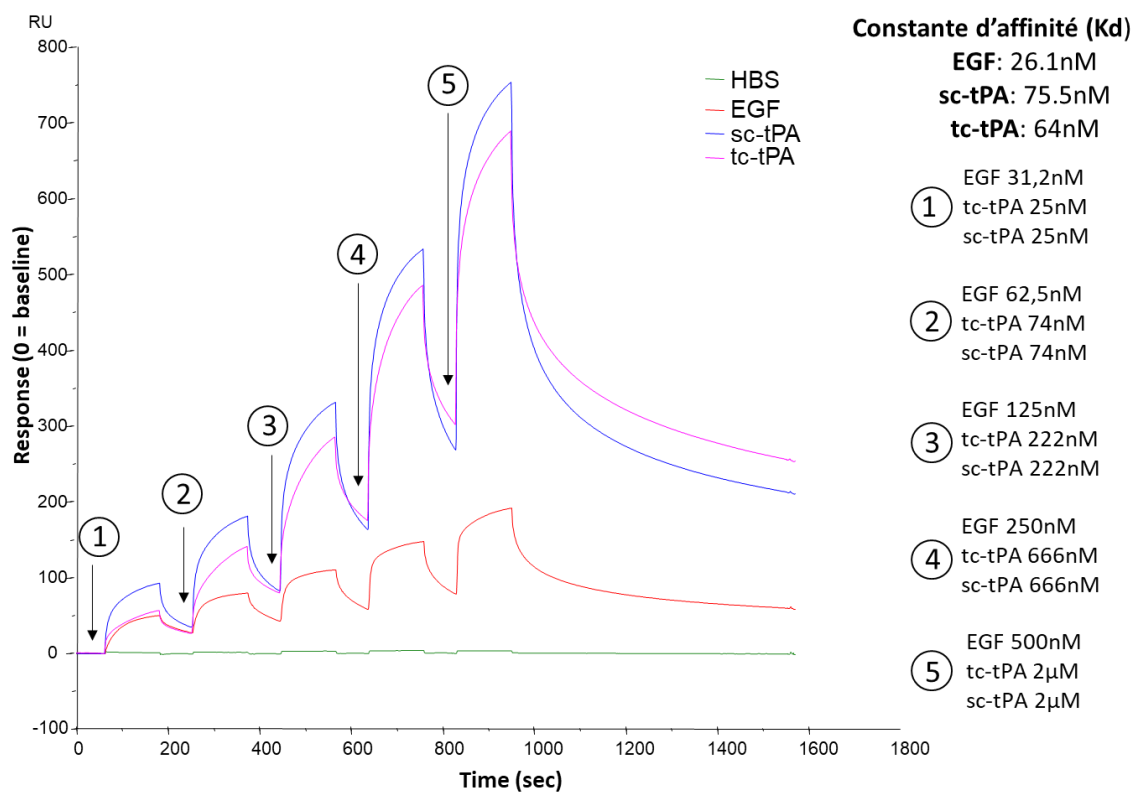
Il est également possible que le mécanisme dépende d'un troisième partenaire, que le tc-tPA activerait et qui cliverait le pro-HGF. En imagerie calcique, l'utilisation d'un anticorps bloquant de l'HGF avec du tc-tPA potentialise l'influx calcique, réversant alors l'effet exercé par le tc-tPA seul (**Figure 31**). Des tests de conversion en incubant du pro-HGF et du tc-tPA sur nos neurones corticaux vont être réalisés. Nous récupérerons ensuite le surnageant et évaluerons par immunoempreinte la présence d'HGF. Il est possible que le tc-tPA ait besoin d'une surface d'activation ou d'un autre partenaire pour convertir le pro-HGF.



**Figure 31** : Effet de l'anticorps HGF bloquant sur la signalisation glutamatergique et la mort neuronale de type excitotoxique.

**a, b**, en imagerie calcique sur des cultures de neurones corticaux (DIV 12), après une stimulation contrôlée avec du NMDA (25 $\mu$ M) utilisée comme baseline, les neurones sont incubés pendant 45 min avec soit le buffer (n=76), l'anticorps HGF bloquant (50ng/ml ; n=80), le sc-tPA (300nM ; n=96), le tc-tPA (300nM ; n=96) seul ou combiné avec l'anticorps HGF bloquant (50ng/ml ; n=99 et n=106 respectivement). Les résultats montrent que l'HGF bloquant n'influe pas sur le sc-tPA mais reverse l'effet du tc-tPA seul sur la signalisation glutamatergique \*p<0.05, \*\*\*\*p<0.0001 indique la différence significative par rapport au contrôle avec le test de Mann-Whitney.

Par ailleurs, notre seconde hypothèse se base sur l'action du tc-tPA sur un premier récepteur, qui à son tour activerait le récepteur MET. Un candidat potentiel est le récepteur à l'EGF, appartenant aussi à la famille des tyrosines kinases, et les deux récepteurs sont des membres de la famille ERBB et plus spécifiquement ERBB2 et ERBB3 (Engelman *et al.* 2007). La coopération entre ces deux récepteurs est déjà établie dans la littérature, essentiellement en utilisant des cultures de lignées cancéreuses. Yamamoto et collaborateurs ont observé que la phosphorylation du récepteur MET peut se faire par l'une des tyrosines kinases du récepteur à l'EGF, la protéine adaptatrice SHC. Il s'agirait d'une activation directe du récepteur MET par le récepteur à l'EGF par transphosphorylation (Yamamoto *et al.* 2006). Une seconde étude suggère que les protéines signalétiques MAPK activées par le récepteur à l'EGF augmente le recrutement de MET à la membrane et active sa phosphorylation (Breindel *et al.* 2013). Il s'agirait donc dans cette étude d'une activation indirecte du récepteur MET par le récepteur à l'EGF (Breindel *et al.* 2013). Nous savons que le sc-tPA et le tc-tPA possèdent un domaine EGF-like et nous avons montré par la technique de SPR que les deux formes de tPA peuvent se fixer sur le récepteur à l'EGF avec une affinité (Kd) légèrement plus importante pour le tc-tPA (Figure 32)



**Figure 32 : Sensorgramme représentant la fixation de l'EGF, du sc-tPA et du tc-tPA sur le récepteur à l'EGF par la technique de SPR.**

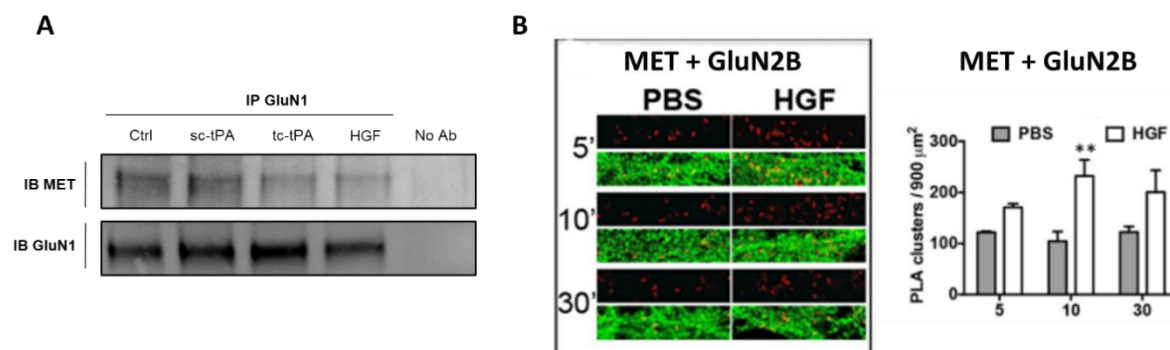
Mesure d'interaction à 5 concentrations différentes d'EGF, de sc-tPA, de tc-tPA sur le récepteur à l'EGF immobilisé. La solution d'HBS sert de contrôle négatif.

En se basant sur la même hypothèse, un second récepteur à activité tyrosine kinase, l'IGF-1R (*insulin growth factor 1 receptor*) serait également une piste éventuelle. En effet, ce récepteur partage des homologies structurales avec le récepteur à l'EGF notamment des domaines riches en cystéines (Garrett *et al.* 1998). Des études essentiellement dans le domaine de la cancérologie montrent une coopération de la signalisation de MET et de la signalisation d'IGF-1R. Par exemple, dans les cellules du carcinome pancréatique, il est retrouvé une surexpression de ces deux récepteurs et les co-traitements avec leurs agonistes respectifs (l'HGF et l'IGF-1 (*insulin growth factor 1*)) agissent en synergie pour induire la migration et l'invasion tumorale. Une « down-regulation » de MET inhibe quasi complètement les effets de migration et d'invasion médiés par l'IGF-1 seul (Bauer *et al.* 2006). L'agoniste de l'IGF-1R est l'IGF-1 dont l'activité biologique est modulée par six IGFBP humaines (*insulin-like growth factor binding protein*). Le complexe majoritairement retrouvé est un complexe tertiaire composé d'IGFBP-3, IGF-1 et d'une sous-unité « acide labile ». De manière intéressante, 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*) et dans les cellules HEK (*human embryonic kidney*) (Elzi *et al.* 2012). Une étude non publiée de notre laboratoire retrouve également ce clivage sur des cultures de neurones corticaux en présence de tPA mais sous sa forme simple chaîne. On ignore si le tc-tPA est en mesure de cliver IGFBP3, et s'il s'avère que ce soit effectivement le cas, cela n'expliquerait pas la différence d'activation entre les deux formes de tPA sur le récepteur MET.

Ainsi, malgré ces différentes hypothèses, nous ne pouvons pas déterminer actuellement par quel mécanisme le tc-tPA active le récepteur MET.

## 2. Le couple de récepteurs MET et NMDA

Notre étude a mis en évidence par co-immunoprécipitation que les récepteurs MET et NMDA peuvent former des complexes à la surface neuronale (**Papier ; Figure 5a**). Cependant, le nombre de ces complexes semble relativement faible et ne varie pas en fonction des traitements (sc-tPA, tc-tPA et HGF) (**Figure 33**). En revanche, l'utilisation de la technique de PLA (*proximity ligation assay*) met en évidence une augmentation de la proximité des récepteurs NMDA et MET à la membrane après traitement au tc-tPA et à l'HGF (**Papier ; Figure 5b et c**). A l'inverse, le sc-tPA diminue la proximité de ces récepteurs (**Papier ; Figure 5b et c**). La PLA s'est focalisée sur la sous-unité GluN1, et a donc ciblé tous les récepteurs NMDA. Fait intéressant, sur des cultures de neurones hippocampiques, le récepteur MET est retrouvé dans les synapses excitatrices et colocalise avec la sous-unité GluN2B et la protéine adaptatrice PSD-95. Un traitement à l'HGF augmente l'expression à la synapse de GluN2B, de CAMKII et de la sous-unité GluA1 des récepteurs AMPA (**Tyndall and Walikonis 2006**). Sur des cultures de neurones (DIV 14), il a été montré *via* l'utilisation de la PLA, une augmentation de la proximité des récepteurs MET et NMDA contenant la sous-unité GluN2B après 10 minutes de traitement à l'HGF (**Figure 33 ; Xie et al. 2016**).



**Figure 33** : Interaction et proximité des récepteurs MET et NMDA à la surface neuronale.

En **A**, sur des cultures primaires de neurones corticaux (DIV 13), il a été effectué une co-immunoprécipitation (IP) après traitement au sc-tPA (300nM), tc-tPA (300nM) et à l'HGF (50ng/ml) pendant 1 heure. Les complexes entre les récepteurs MET et NMDA sont déjà présents en condition basale. No ab : *no antibody* correspond au contrôle négatif pour lequel il n'y a eu aucun ajout d'anticorps. En **B**, image représentative et quantification de PLA sur des neurones corticaux (DIV 14) ciblant le récepteur MET et la sous-unité GluN2B après traitement à l'HGF à 5, 10 et 30 minutes. A 10 minutes, l'HGF augmente significativement la proximité entre les récepteurs NMDA contenant la sous-unité GluN2B et les récepteurs MET. **B**, d'après **Xie et al. 2016**.

## 3. L'axe HGF/MET sur la signalisation glutamatergique

Au sein des neurones corticaux les récepteurs MET et NMDA forment des complexes en conditions basales, mais peuvent également se rapprocher physiquement en fonction de certains stimuli comme à la suite d'un traitement à l'HGF ou au tc-tPA. **Mais quelle en est l'implication ?**

Nos résultats montrent que le tc-tPA (300nM) diminue la phosphorylation de GluN2B sur la tyrosine 1474 (**Papier ; Figure 6d et e**). Puisque les récepteurs MET sont des récepteurs à activité tyrosine kinase, nous souhaitons déterminer si cet effet était dépendant de MET. L'utilisation de tc-tPA avec le JNJ-38877605, inhibiteur sélectif de MET, réverse le niveau de phosphorylation de GluN2B par rapport au tc-tPA seul. **Quel serait le mécanisme permettant cette déphosphorylation ?**

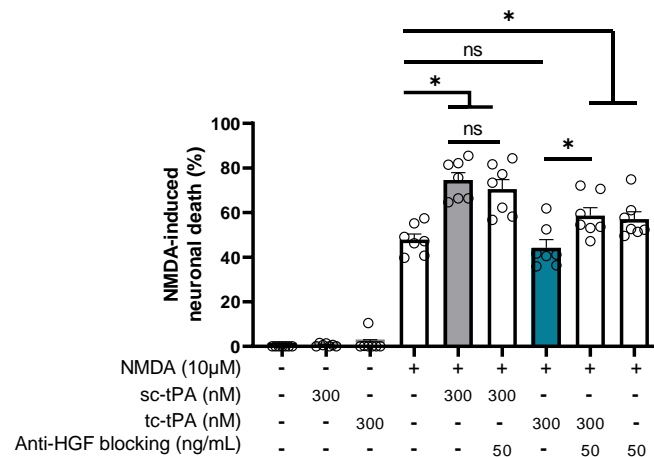
Pour rappel, l'activation du récepteur MET induit la phosphorylation des résidus tyrosines 1234/1235 situés dans le domaine kinase et favorise la phosphorylation de deux tyrosines supplémentaires : Tyr1349 et Tyr1356. Ces dernières permettent le recrutement de protéines adaptatrices dont des protéines tyrosines phosphatases telles que SHP2 qui se fixe indirectement sur MET, par l'intermédiaire de la protéine adaptatrice Gab1 (**Maroun et al. 2000**). Il faut mentionner que la régulation des récepteurs NMDA peut dépendre de kinases de la famille SRC pouvant être à leurs tours activées par SHP2 (**Zhang et al. 2004**). De manière intéressante, la perturbation de l'équilibre de SHP2 (gain ou perte de fonction) affecterait la mémoire et la signalisation des récepteurs NMDA (**Cesarini et al. 2009**). Chez des souris déficientes en SHP2, l'ajout d'un inhibiteur kinase de la famille SRC réverse la phosphorylation de GluN2B, restaure la transmission synaptique basale et abolit le déficit de mémoire de peur contextuel présent chez les animaux déficients en SHP2 (**Yan et al. 2017**). En lien avec ces données, nous pourrions envisager de déterminer par immunoempreinte si cette tyrosine phosphatase intervient dans notre signalisation neuronale après traitement au tc-tPA.

Par ailleurs, une hypothèse qui n'a pas été réfutée serait que le tc-tPA interagisse directement avec les récepteurs NMDA. D'après les données de Fernández-Monreal et ses collaborateurs, le mécanisme d'action du sc-tPA qui est proposé est une fixation primaire *via* son domaine Kringle 2, sur la lysine<sup>178</sup> de la sous-unité GluN1 du récepteur NMDA. Après la fixation, le sc-tPA présente son domaine catalytique à l'arginine 260 de la seconde sous-unité GluN1 et induit le clivage (**Fernández-Monreal et al. 2004; Lopez-Atalaya et al. 2008; Lesept et al. 2016**). Nous pourrions envisager que le tc-tPA puisse se fixer sur la lysine<sup>178</sup> mais de par une conformation tridimensionnelle différente de celle du sc-tPA ne puisse pas présenter son domaine catalytique. L'action du tc-tPA reposerait alors sur l'activation des récepteurs MET et sa fixation sur les récepteurs NMDA avec pour finalité un effet biologique commun qui est l'absence de potentialisation des récepteurs NMDA induite par le tc-tPA.

**Par ailleurs, est-ce que le récepteur MET peut moduler la signalisation glutamatergique ?** En imagerie calcique, l'utilisation du JNJ-38877605 et d'un second inhibiteur, le SU11274 induit la potentialisation de la signalisation des récepteurs NMDA et réverse alors l'effet du tc-tPA seul (**Figure 8b et Supplementary 2d**). Il est intéressant de mentionner que la présence individuelle de ces 2 inhibiteurs potentialise les récepteurs NMDA par rapport à la condition contrôle (**Figure 8b et Supplementary 2d**). Ces résultats pourraient signifier que le récepteur MET exerce un tonus inhibiteur en condition physiologique. La présence des complexes MET/NMDA aurait pour fonction de diminuer l'influx calcique. Les récepteurs MET pourraient influencer par exemple sur les propriétés biophysiques des récepteurs NMDA, comme la

probabilité d'ouverture et de fermeture, leur conductance, la sensibilité envers leurs agonistes et co-agonistes... Dans notre étude, le récepteur MET est neuroprotecteur puisqu'il intervient dans le mécanisme d'action du tc-tPA. De plus, le tc-tPA en présence de JNJ-38877605 augmente la mort neuronale excitotoxique induite par le NMDA en comparant au traitement tc-tPA seul (**Supplementary 4**).

En imagerie calcique, l'HGF ne potentialise pas l'influx calcique, tout comme le tc-tPA (**Figure 8d**). La présence du tc-tPA et de l'HGF n'induit pas d'effet synergique, suggérant alors un mécanisme d'action similaire. Le tc-tPA serait un composant HGF-like. Un co-traitement avec du sc-tPA et de l'HGF diminue significativement l'effet pro-excitotoxique du sc-tPA, mettant en évidence deux mécanismes distincts pouvant intervenir sur la signalisation glutamatergique. De plus, l'utilisation d'un anticorps bloquant de l'HGF a tendance à potentialiser les récepteurs NMDA, de la même façon que le JNJ-38877605 et le SU11274. L'ajout de cet anticorps bloquant en présence de tc-tPA augmente l'influx calcique et la mort neuronale de type excitotoxique (**Figure 31 ; Figure 34**)



**Figure 34 : Effet de l'anticorps HGF bloquant sur la mort neuronale de type excitotoxique.**

Sur des cultures de neurones corticaux, la mort neuronale est mesurée *via* la libération de LDH dans le milieu après 24 heures d'exposition à 10µM de NMDA, (n=7 expériences indépendantes). L'anticorps HGF-bloquant n'influence pas la mort de type excitotoxique induite par le sc-tPA mais augmente la mort par rapport au tc-tPA. \*p<0.05 indique la différence significative par rapport au contrôle avec le test de Mann-Whitney.

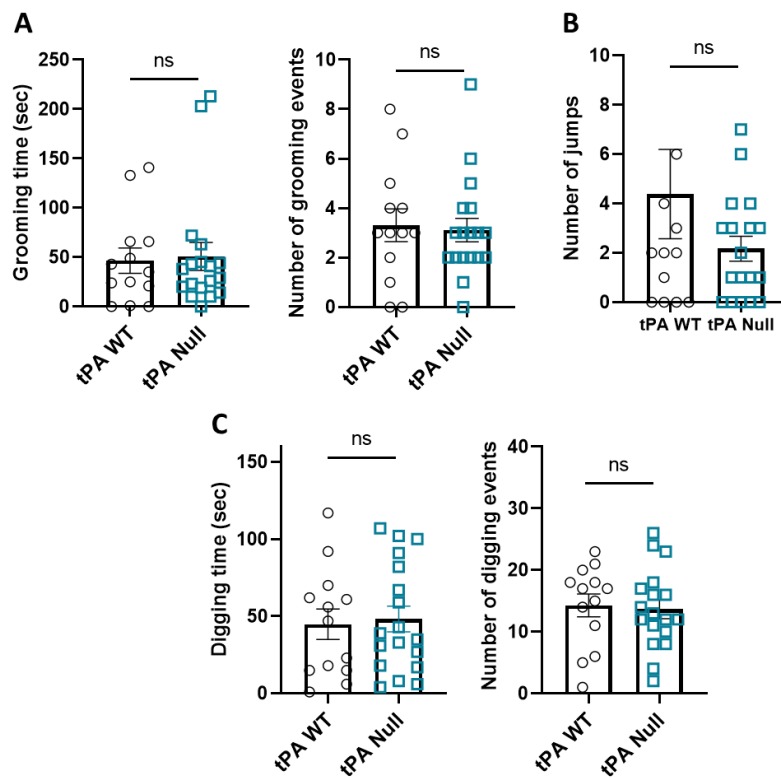
Ces résultats, pour lesquels l'HGF exercerait un rôle protecteur contre l'excitotoxicité sont en accord avec la littérature, En 2002, l'équipe de Hossain montre que le traitement à l'HGF sur des neurones granulaires augmente leur viabilité face à l'excitotoxicité induite par le NMDA en activant la voie PI3K/Akt (**Hossain et al. 2002**). Une seconde étude montre également une neuroprotection de l'HGF contre l'excitotoxicité induite par du NMDA sur des neurones hippocampiques. L'effet de l'HGF serait dû au blocage partiel de l'activation de la caspase 3, protéine pro-apoptotique, et de l'inhibition de la translocation de l'AIF (*apoptosis inducing factor*) dans le noyau (**Ishihara et al. 2005**).

## II. Le tPA dans les troubles du spectre autistique

### 1. Les données comportementales chez les tPA Null

L'étude comportementale menée sur les animaux tPA Null révèle divers déficits comportementaux. Premièrement, le test des vocalises à ultrasons montre un déficit de communication précoce chez les tPA Null qui est mis en évidence par une durée et un nombre d'appels réduits par rapport à leurs homologues sauvages. Les nouveau-nés tPA Null seraient moins sensibles lorsqu'ils sont séparés de leur mère, ces résultats seraient également en lien avec un trouble de l'attachement. Si l'on souhaite transposer chez l'Homme, certains parents dont les enfants sont atteints de TSA ont déclaré avoir eu des bébés dits « faciles » qui pleuraient très peu (Frith 1991).

Un second critère essentiel caractéristique au TSA est la présence de comportements restreints et stéréotypés. Le test d'actimétrie permet d'évaluer de nombreux paramètres et a montré un nombre plus important de mouvements verticaux pouvant être interprétés comme des comportements spontanés à caractère répété. Nous avons également étudié le toilettage, la fouille et le saut, qui sont des paramètres pouvant être évalués afin de mettre en évidence des comportements répétitifs et stéréotypés. Toutefois, nous n'avons observé aucune différence significative pour ces différents paramètres (Figure 35). Mais, chez les personnes atteintes de TSA, il a été rapporté une large variété de comportements répétitifs moteurs comme le fait de se gratter, d'agiter le bras ou encore de se balancer. De ce fait, chez les souris tPA Null, il semblerait que leur stéréotypie motrice se caractérise par une activité verticale plus importante. Ces données soulignent l'intérêt de réaliser des tests comportementaux différents afin de s'assurer de la présence ou de l'absence d'un trait comportemental.



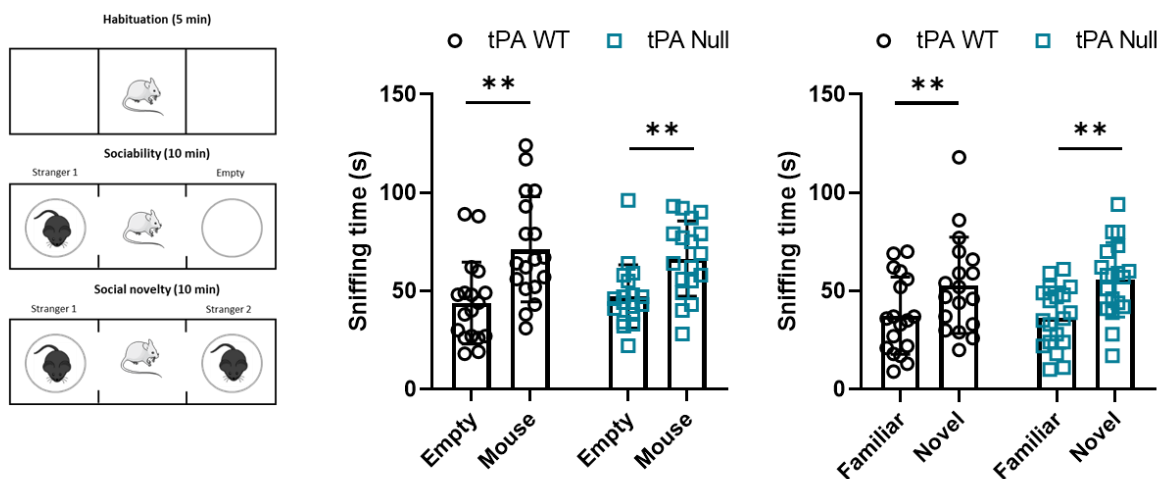
**Figure 35 :** Tests comportementaux chez les tPA Null pour évaluer les comportements répétés moteurs.

Nous avons introduit les deux souches de souris dans une nouvelle litière durant 5 min afin de d'enregistrer leur comportement par caméra GoPro. En **A**, le test d'auto-toilettage (grooming) ne montre aucune différence entre les deux génotypes. La même conclusion s'impose concernant le nombre de saut (**B**) ainsi que la fouille (digging) au sein de la litière non-familière (**C**). N=13 tPA WT ; N=18 tPA Null, ns=non significatif en utilisant un test de Mann-Whitney.

D'autre part, parmi l'éventail de symptômes du spectre autistique, les animaux tPA Null ne présentent que certaines caractéristiques. En effet, le trouble de sociabilité est un critère essentiel dans la symptomatologie du TSA et peut être évalué chez le rongeur grâce au test des 3 chambres (évoqué dans l'introduction).

Nous avons évalué le temps de « sniffing » et montré que les animaux tPA Null n'ont pas de déficit de sociabilité, ils présentent un intérêt social et une préférence pour la nouveauté sociale (**Figure 36**).





**Figure 36** : Test des 3 chambres évaluant la sociabilité sur la souche de souris tPA Null.

Après 5 minutes d'habituation, il est introduit une souris étrangère dans un des compartiments de la chambre et on évalue le temps de « sniffing » pendant les 5 premières minutes du sujet. Puis, dans le compartiment vide, il est introduit une nouvelle souris étrangère et on mesure aussi le temps de « sniffing » afin de déterminer si la souris discrimine bien le second étranger. De la même façon, les deux génotypes ont un temps de « sniffing » plus important dans la phase de sociabilité ainsi que dans la phase de préférence à la nouveauté sociale. N=18 tPA WT ; N=18 tPA Null avec un test de Wilcoxon : \*\* p < 0,01.

## 2. Le tPA et les symptômes associés au TSA

En complément, nos résultats ont montré des déficits associés au TSA comprenant un déficit d'apprentissage et un comportement à caractère dépressif (Figure 2). En effet, ce sont deux symptômes associés présents chez certaines personnes atteintes de TSA (Steinhausen and Metzke 2004; Gegelashvili 2019).

Parmi les nombreux symptômes associés au TSA, l'épilepsie est un des facteurs de risque dont le lien avec les TSA a été bien étudié. Chez les sujets atteints de TSA, la prévalence de l'épilepsie est évaluée selon les études entre 5 et 40% (Canitano 2007). Ces taux sont nettement supérieurs à ceux observés dans la population générale qui sont proches de 1 à 2% (Christensen *et al.* 2018). La relation entre les deux est complexe et la signification physiopathologique de leur association reste peu claire. De manière intéressante, au cours de leur étude sur la plasticité synaptique en 1993, Qian et collaborateurs ont observé une surexpression de tPA au niveau de l'hippocampe, 1 heure après l'induction de crises d'épilepsie (Qian *et al.* 1993). De plus, il a été observé que les souris déficientes en tPA sont protégées de l'apparition de convulsions après l'administration systémique de pentylènetétrazole ou d'acide kaïnique (Tsirka *et al.* 1995b). Ces résultats suggèrent fortement que l'activité du tPA régule l'excitabilité neuronale de manière à modifier la sensibilité aux crises. Les travaux de Yepes ont démontré par la suite que le tPA endogène est impliqué dans la généralisation des crises épileptiques induites chez les rongeurs après une

injection d'acide kaïnique au niveau de l'amygdale et que cette activité est indépendante du plasminogène (Yepes *et al.* 2002). Les auteurs ont également montré que l'activité du tPA ainsi que l'expression de NS sont augmentées au niveau de l'amygdale dans les 10 minutes après l'administration d'acide kaïnique. Lorsque la NS est injectée dans l'hippocampe avant l'administration d'acide kaïnique dans l'amygdale, la progression et la généralisation des crises sont atténuées. La NS étant un inhibiteur du tPA au niveau du parenchyme, ces résultats soutiennent donc l'hypothèse selon laquelle le tPA serait impliqué dans la propagation des convulsions. Ces données pourraient mettre en avant que le tPA est en lien avec un 3<sup>ème</sup> symptôme associé au TSA.

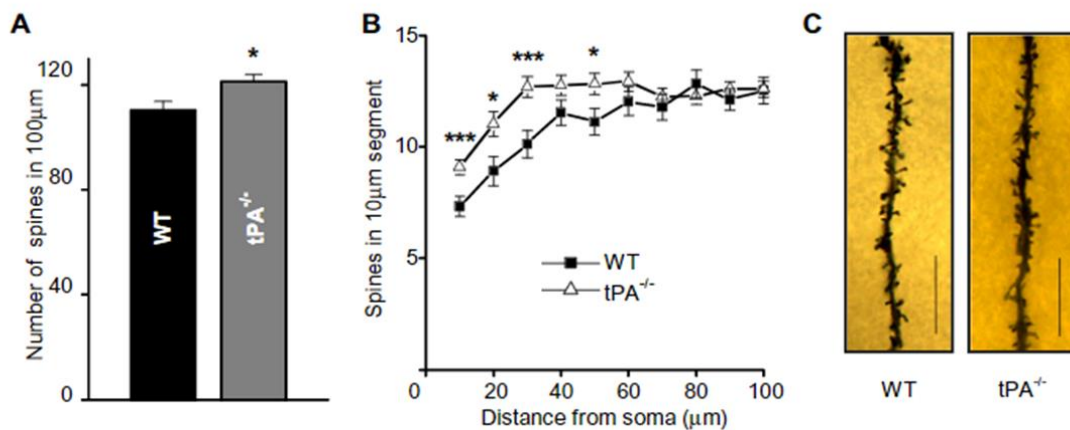
En complément, de nombreux autres tests pourraient être entrepris afin d'approfondir les repères neurodéveloppementaux des nouveau-nés tPA Null. Par exemple, nous pourrions réaliser le réflexe de retournement qui se définit comme la capacité motrice pour un nouveau-né à être en mesure de se retourner sur ses pattes. L'âge moyen d'apparition de ce réflexe chez les rongeurs est P5 (Feather-Schussler and Ferguson 2016). L'apparition de l'ouverture bilatérale des yeux chez le nouveau-né permet de s'assurer de l'éveil de l'animal (Feather-Schussler and Ferguson 2016).

### 3. Les données génétiques chez les tPA Null

Puisque de nombreuses données soutiennent l'implication de facteurs génétiques dans l'étiologie du TSA, nous avons souhaité étudier les gènes pouvant être dérégulés au sein de notre souche de souris tPA Null (Constantino *et al.* 2010; Iossifov *et al.* 2012). Notre étude a permis de révéler de nombreux gènes « up » et « down » régulés grâce à l'analyse du séquençage d'ARN sur les animaux tPA Null (Papier, Figure 1). Cette analyse a été menée sur les 5 structures cérébrales suivantes : l'hippocampe, le cortex entorhinal, l'amygdale, le cortex préfrontal et le cortex pariétal. Le gène *MET* ressort significativement comme étant « down » régulé dans le cortex entorhinal et l'amygdale. En revanche, le séquençage d'ARN ne montre pas de variation du nombre de transcrit pour le gène *GRIN2B* parmi ces 5 structures. Pour autant, cela ne signifie pas obligatoirement que le gène *GRIN2B* n'est pas impacté. En effet, l'analyse a été effectuée sur 3 animaux de chaque souche âgée de 8 semaines. Cependant, la variation du transcrit peut être présente à un stade plus précoce, en stade prénatal par exemple, étant donné que la protéine GluN2B est fortement présente dès le stade embryonnaire (Monyer *et al.* 1994). Puisque les nouveau-nés tPA Null ont un déficit de communication qui est présent dès le 2<sup>ème</sup> jour post-natal (Papier, Figure 2a,b), il serait intéressant d'étudier le niveau protéique de GluN2B et de MET en immunoempreinte du stade embryonnaire jusqu'à P12. Ces données nous permettraient de savoir si la sous-unité GluN2B et/ou le récepteur MET sont impliqués en complément du tPA dans ce déficit.

Le TSA est une pathologie neurodéveloppementale qui peut intervenir lors des processus de neurogenèse et de synaptogenèse. Des données de la littérature ont montré que le récepteur MET et GluN2B peuvent influencer ces processus. A titre d'exemple, une étude de 2008 montre qu'un traitement à l'HGF sur des cultures de neurones hippocampiques augmente la longueur des dendrites primaires (Lim and Walikonis 2008). L'étude de Qiu en 2014 a rapporté que la signalisation du récepteur MET est impliquée dans la croissance neuronale et la maturation fonctionnelle des synapses glutamatergiques. Il est montré que la perte de fonction de MET altère le développement des synapses en diminuant le nombre de dendrites, leur longueur et la densité des épines dendritiques (Qiu *et al.* 2014). De plus, la délétion génétique de MET accélère la maturation développementale en induisant un switch plus rapide de la sous-unité GluN2B en GluN2A (Qiu *et al.* 2014). De façon similaire, la sous-unité GluN2B peut jouer un rôle sur la morphologie des neurones. L'étude d'un variant de GluN2B retrouvé chez des personnes atteintes de TSA (S1415L correspondant à S1413L chez la souris) montre une réduction du nombre d'épines dendritiques (Liu *et al.* 2017). La délétion conditionnelle cortico-hippocampique de GluN2B montre aussi une réduction d'épines dendritiques et est associée à un déficit d'apprentissage (mémoire de travail et de référence dans l'espace) (Brigman *et al.* 2010).

Afin d'approfondir les résultats en lien avec les TSA, et après avoir révélé des déficits fonctionnels, il serait intéressant d'étudier si les tPA Null ont également des modifications neuronales structurelles. Similairement aux études sur MET et GluN2B dans des cultures de neurones tPA Null transfectés avec un plasmide GFP, nous pourrions étudier la morphologie des neurones (le nombre de synapses, de dendrites et leur longueur, la morphologie des épines...). Sur des souches déficientes en tPA différentes de la souche tPA Null, il a déjà été montré dans l'amygdale, que les souris déficientes en tPA ont un nombre plus important d'épines et que cet effet est plus prononcé lorsque les souris sont soumises à un stress (Bennur *et al.* 2007)(Figure 37). Cette différence de densité pourrait être un indicateur de mauvaises connections synaptiques engendrant des déficits de connectivité ou des problèmes d'inhibitions. De plus, des enregistrements en électrophysiologie pourraient également être réalisés sur des neurones tPA Null et leurs homologues sauvages dans le but de comparer leurs propriétés électrophysiologiques.



**Figure 37** : L'invalidation du gène du tPA révèle une densité synaptique plus importante dans l'amygdale.

(A) Le graphique montre un nombre de synapse plus élevé chez les tPA<sup>-/-</sup>. (B) L'analyse segmentaire du nombre d'épines présent tous les 10µm du soma neuronal jusqu'à la fin de la branche dendritique révèle une augmentation de la proportion d'épines proches du soma chez les tPA<sup>-/-</sup>. (C) Image représentant un segment issu d'une branche primaire d'une dendrite chez les tPA WT et <sup>-/-</sup>. D'après [Bennur et al., 2007](#).

Pour résumer, la caractérisation comportementale des animaux tPA Null a permis de révéler des déficits de communication précoce et un comportement stéréotypé moteur, qui sont au cœur des symptômes définissant le TSA. L'originalité de notre étude est que nous ne nous sommes pas focalisés uniquement sur un gène qui serait impliqué dans les TSA mais notre mécanisme implique 2 gènes reconnus *MET* et *GRIN2B* (base SFARI) pour être des candidats à risque dans les TSA ([Campbell et al. 2006](#); [Iossifov et al. 2015](#)). Pour autant, nous savons que notre modèle d'animaux tPA Null ne constitue pas un modèle parfait des TSA mais il n'en demeure pas moins qu'il possède à la fois des données comportementales et génétiques qui sont en analogies avec cette pathologie neurodéveloppementale.

### III. Influence du tPA sur la signalisation glutamatergique

#### 1. Rôle du sc-tPA et du tc-tPA sur la sous-unité GluN2B

Sur des cultures de neurones corticaux, notre étude montre que le tc-tPA diminue le niveau de phosphorylation de GluN2B sur la tyrosine 1474 ainsi que le niveau de GluN2B total, cet effet est présent dès 10 minutes de traitement. En revanche, nous n'avons pas mis en évidence de différence concernant les niveaux de phosphorylation de GluN2A pour le tc-tPA ([Figure 6d,e](#)). Concernant le sc-tPA, aucune différence n'a été détectée pour GluN2A et GluN2B ([Figure 6a,b,c](#)). Notre étude s'est limitée à un seul site de phosphorylation pour les sous-unités GluN2A et GluN2B.

Toutefois, comme il a été décrit dans la partie NMDA de l'introduction, de nombreux autres sites tyrosines peuvent être phosphorylés sur ces deux sous-unités, pouvant être associées à des effets différents.

Sachant que le sc-TPA interagit avec les récepteurs NMDA et possède un effet pro-excitotoxique, on aurait pu s'attendre à avoir une modification des niveaux de phosphorylation des sous-unités GluN2. D'ailleurs, l'étude de Wu en 2013 a montré une augmentation de la phosphorylation de GluN2A (Tyr 1325) à 1H dès 5nM de tPA (simple chaîne) qui est le même site de phosphorylation que nous avons étudié. La même étude montre également que le tPA (simple chaîne) augmente la phosphorylation de GluN2B sur la tyrosine 1472 de façon dose dépendante à partir de 200nM après 1heure de traitement (Wu *et al.* 2013). Ce site tyrosine qui est proche du site que nous avons étudié contient le motif d'internalisation YEKL. Il serait alors intéressant d'envisager de regarder si les deux formes de tPA influent sur le niveau de phosphorylation de ce site tyrosine. Puisque nos résultats mettent en évidence une dégradation de GluN2B et donc une endocytose de ce récepteur, de manière cohérente, nous devrions avoir une différence de phosphorylation.

D'autre part, dans un contexte d'exposition chronique à l'alcool, le tPA et les récepteurs NMDA sont surexprimés au sein du système limbique (Pawlak *et al.* 2005). L'injection de tPA chez les souris 'alcoolisées' et déficientes en tPA augmente la gravité des crises d'épilepsie. Cet effet est bloqué par l'administration d'ifenprodil, un inhibiteur spécifique de la sous-unité GluN2B du récepteur NMDA. Dans cette étude, une co-immunoprécipitation issue d'homogénats de cultures hippocampiques montre une interaction du tPA spécifiquement avec la sous-unité GluN2B.

Dans notre étude, le tc-TPA induit une dégradation de la sous-unité GluN2B et nous savons que le tc-TPA ne potentialise pas l'influx calcique à travers les récepteurs NMDA. Cependant, notre étude ne démontre pas directement si l'effet du tc-TPA sur la signalisation glutamatergique est le fruit d'une diminution de la phosphorylation de GluN2B. Pour cela, de la mutagenèse dirigée ciblant la tyrosine 1474 de la sous-unité GluN2B en réalisant ensuite de l'imagerie calcique pourrait être envisagée. En effet, cela nous permettrait d'évaluer si l'absence de potentialisation de la signalisation glutamatergique induite par le tc-TPA implique spécifiquement la sous-unité GluN2B *via* un mécanisme de déphosphorylation de la tyrosine 1474. Il est intéressant de mentionner que sur des cellules HEK transfectées avec la sous-unité GluN1 et GluN2A, le sc-TPA maintient son augmentation d'influx calcique à travers les récepteurs (Fernández-Monreal *et al.* 2004). Il serait alors plausible que l'effet du tc-TPA sur la sous-unité GluN2B ait une fonction neuronale que nous n'avons pas encore mise en lumière.

## 2. Effet pro-excitotoxique du tPA dans le contexte physiopathologique de l'AVC

Lors d'un AVC ischémique, l'excitotoxicité est une des composantes de la cascade délétère. La défaillance énergétique à la suite de l'ischémie conduit au dysfonctionnement cérébral de la pompe  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ , à l'entrée massive de calcium dans le neurone et à une libération

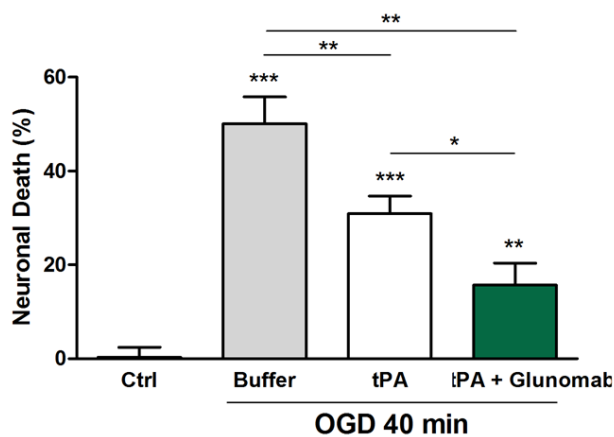
importante de glutamate dans la fente synaptique. Le relargage important de glutamate dans la fente synaptique entraîne une hyperactivation des récepteurs NMDA, AMPA et kaïnate post-synaptiques, causant une entrée de calcium dans les neurones et une dépolarisation massive. Ces événements en cascade provoquent une mort cellulaire de type nécrotique et apoptotique (Ndountse and Chan 2009).

Lors d'un AVC ischémique, l'administration de tPA recombinant a permis de montrer un effet bénéfique grâce à son action fibrinolytique (NINDS 1995). Il a également été montré *in vitro* par application de NMDA sur des cultures de neurones corticaux que le tPA est pro-excitotoxique (Nicole *et al.* 2001). Cet effet reposerait sur le clivage de la sous-unité GluN1 par le tPA, responsable d'une augmentation d'influx calcique et de la potentialisation de la mort neuronale induite par le NMDA (Nicole *et al.* 2001). Ces données de la littérature amènent à se poser différentes questions : *in vivo*, comment l'interaction du tPA avec les récepteurs NMDA affecte la pathophysiologie de l'AVC ? Est-ce que la suractivation des récepteurs NMDA est suffisante pour induire les effets négatifs/positifs du tPA dans l'AVC ?

Autant de questions dont les réponses peuvent varier en fonction des modèles animaux et expérimentaux utilisés, des doses de tPA administrées ou une combinaison de ces facteurs. Notre modèle d'excitotoxicité repose sur un traitement avec du NMDA sur nos cultures pendant 24 heures, suivi d'un dosage de la lactate déshydrogénase afin d'évaluer la mort neuronale. C'est sur ce type de modèle qu'il a été mis en évidence l'effet pro-excitotoxique du sc-tPA et l'effet différentiel entre le sc-tPA et le tc-tPA (Nicole *et al.* 2001; Parcq *et al.* 2012). Cependant, il convient d'être prudent sur l'extrapolation des données de ce modèle à la physiopathologie de l'ischémie cérébrale. En effet, ce modèle provoque une sur-activation d'un seul type de récepteur glutamatergique, ne prend pas en compte l'activation d'autres récepteurs et voies de signalisation. Or, ce modèle est réalisé uniquement sur des neurones et donc l'effet physiologique d'élimination du tPA et de sa recapture par les astrocytes est masqué (Cassé *et al.* 2012). De plus, nous avons étudié le tPA à une forte dose de 300nM et uniquement sur des neurones corticaux.

Sur un modèle *in vitro* d'ischémie cérébrale consistant à sevrer en oxygène et en glucose (OGD, *oxygen and glucose deprivation*) les neurones, le tPA protège les neurones de la mort en diminuant le stress du réticulum endoplasmique (Louessard *et al.* 2017) et en permettant une recapture du glucose (Wu *et al.* 2012). Dans l'étude de Wu et collaborateurs, l'effet neuroprotecteur du tPA en OGD est dépendant de l'activation d'HIF-1 $\alpha$  et de mTOR, un répresseur de l'autophagie (Wu *et al.* 2012). *In vivo*, sur un modèle d'ischémie thromboembolique, l'injection de tPA diminue le volume de lésion. Mais sur le même modèle, l'injection de l'anticorps Glunomab<sup>®</sup> dans la circulation, bloquant spécifiquement l'interaction du tPA avec la sous-unité GluN1, réduit le volume de lésion et bloque les effets délétères du tPA tout en permettant d'étendre la fenêtre thérapeutique de la thrombolyse (Macrez *et al.* 2011). De plus, dans un modèle d'encéphalite auto-immune expérimentale, l'injection de Glunomab<sup>®</sup> en intraveineux diminue l'ouverture de la BHE et l'infiltration des cellules inflammatoires. On peut alors se demander si l'effet protecteur observé du Glunomab<sup>®</sup> dans

le modèle d'ischémie cérébrale n'est pas dépendant de la BHE en impliquant les récepteurs NMDA des cellules endothéliales (Macrez *et al.* 2016). Si la part délétère du tPA sur les récepteurs NMDA neuronaux n'est qu'une faible composante par rapport à son implication sur les autres récepteurs et acteurs cellulaires environnants. Les modèles *in vitro* et *in vivo* rapportant un effet délétère du tPA *via* les récepteurs NMDA sont basés soit sur une injection intra-striatale de NMDA au préalable ou une stimulation des neurones avec du NMDA (Nicole *et al.* 2001; Parcq *et al.* 2012; Wu *et al.* 2013). On peut donc se questionner quant à la composante excitotoxique du récepteur NMDA seul dans l'ischémie ? *In vitro*, dans le modèle d'excitotoxicité induit par du NMDA, le tPA est pro-excitotoxique. *In vivo*, dans un modèle thromboembolique, l'injection de Glunomab® en présence de tPA est protectrice en diminuant le volume de lésion (Nicole *et al.* 2001; Macrez *et al.* 2011). *In vitro*, en OGD, le tPA diminue la mort neuronale et un co-traitement avec du Glunomab® et du tPA accentue d'autant plus cet effet neuroprotecteur (Figure 38).



**Figure 38 :** En OGD, le tPA diminue la mort neuronale, et l'ajout du Glunomab® accentue cet effet.

Mort cellulaire des neurones corticaux mesurée *via* la libération de LDH dans le milieu de culture après une OGD de 40min en présence de tPA (300nM) et/ou de Glunomab® (10µg/ml). Données représentant la moyenne ± SEM. n=32 pour les conditions Control, Buffer et tPA et n=16 pour la condition tPA/Glunomab®

\*p<0.01, \*\* p<0,01, \*\*\*p<0.001 avec un t-test.

De plus, il faut souligner que *in vivo* le clivage de la sous-unité GluN1 par le tPA n'a jamais été montré. Toutefois, ces modèles animaux apportent des informations mécanistiques utiles, alors que les données cliniques restent encore amoindries et contradictoires. En effet, une étude cas-témoins incluant 2327 personnes victimes d'AVC montre une association de la thrombolyse *via* le tPA et la survenue de crise d'épilepsie chez 1,2% des patients dans les 7 premiers jours après leur AVC (Alvarez *et al.* 2013). Cependant, cette association n'est pas retrouvée dans toutes les études. Par exemple, ni l'analyse rétrospective de 302 patients et ni la méta-analyse comptabilisant 4362 personnes ayant eu un AVC n'a identifié d'association entre le tPA et l'épilepsie à la suite d'un AVC (Keller *et al.* 2015; Lekoubou *et al.* 2017). En complément, la différence entre le sc-tPA et le tc-tPA sur la signalisation glutamatergique a justifié la mise en place de l'étude clinique OPHELIE. Cette étude réalisée dans 13 centres en France, a permis d'inclure 1004 patients victimes d'AVC ischémiques et ayant bénéficié de la thrombolyse par le tPA (Leys *et al.* 2016). L'intérêt de l'étude était de mettre en relation le devenir clinique des patients en fonction du ratio sc/ (sc+tc) des formes de tPA qu'ils leur avaient été administrées lors de la thrombolyse. Les résultats n'ont pas corrélé le ratio sc/(sc+tc) reçu à la mortalité ou au handicap à trois mois de l'ischémie. Le ratio ne modifiait

pas l'apparition des crises d'épilepsie mais l'analyse post-hoc menée sur les patients ayant eu une crise d'épilepsie a montré qu'ils avaient reçu un haut ratio sc/(sc+tc) (supérieur à 80.5%). Les patients ayant reçus les plus bas ratios étaient plus sujets aux transformations hémorragiques (Leys *et al.* 2016). En l'absence d'études cliniques supplémentaires pour appuyer celle d'Alvarez et ses collaborateurs, il semblerait que la thrombolyse induite avec le tPA ne soit pas associée à l'épilepsie.

En réunissant les différents résultats, il semble donc qu'il y ait bien une composante tPA et récepteurs NMDA qui soit pro-excitotoxique *in vitro*. Mais, ce modèle *in vitro* ne prend pas en compte les autres effets des récepteurs NMDA et la fonction du tPA sur les autres acteurs moléculaires et cellulaires. Dans le cadre de l'ischémie, cette composante pro-excitotoxique est présente mais ne semble pas être un effet majoritaire au regard de l'important bénéfice de la reperfusion induite par le tPA. Toutefois, l'utilisation d'un anticorps bloquant cette interaction montre que l'on peut toujours améliorer l'effet du tPA dans le contexte ischémique. Enfin, puisque les cellules endothéliales expriment le tPA et les récepteurs NMDA, il serait intéressant de savoir si le mécanisme décrit sur les neurones corticaux est transposable sur ce type cellulaire, ce qui ouvrirait de nouvelles perspectives d'études.



## CONCLUSION

L'ensemble de mes travaux de thèse a contribué à mieux comprendre le mécanisme d'action des deux formes de tPA au niveau neuronal en impliquant un nouveau partenaire, le récepteur MET.

Cette étude nous permet de montrer que seul la forme double chaîne du tPA active la signalisation du récepteur à activité tyrosine kinase, MET. Cette activation est indépendante d'une fixation directe sur le récepteur MET et d'une conversion du pro-HGF en HGF mature mais nous n'avons pas encore élucidé par quel mécanisme cette activation se produit-elle. Nous montrons que l'effet du tc-tPA sur la signalisation glutamatergique est dépendante de MET grâce à l'utilisation d'inhibiteurs sélectifs. De plus, nous révélons une proximité des récepteurs NMDA et MET à la surface neuronale pouvant être régulée par les deux formes de tPA ainsi que l'HGF. Le tc-tPA diminue le niveau de phosphorylation de GluN2B et induit une dégradation de cette même sous-unité. En revanche, nous ne mettons pas en évidence d'effet du sc-tPA sur les sous-unités GluN2A et GluN2B.

En parallèle à cette signalisation, l'étude comportementale menée sur des souris déficientes en tPA (tPA Null) a révélé des déficits comportementaux caractéristiques dans les TSA. En complément, l'étude génétique et la signalisation du tc-tPA impliquent deux cibles : MET et GluN2B, dont leurs gènes sont reportés dans la base SFARI pour être des gènes considérés comme facteurs de risque dans cette pathologie neurodéveloppementale. Notre étude ouvre des perspectives pour de futurs travaux afin de mieux décrire et comprendre le rôle du tPA dans les TSA.

## AUTRES TRAVAUX

### **Revue : «*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 dérèglent la protéostasie 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 protéostasie 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 protéostasie: l'UPR et la macroautophagie (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.



# Proteostasis During Cerebral Ischemia

Audrey M. Thiebaut<sup>1†</sup>, Elodie Hedou<sup>1†</sup>, Stefan J. Marciniak<sup>2,3</sup>, Denis Vivien<sup>1,4</sup> and Benoit D. Roussel<sup>1\*</sup>

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

## 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

<sup>†</sup> 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

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

**Abbreviations:** 3-MA, 3-methyladenine; AMP, adenosine monophosphate; AMPAR,  $\alpha$ -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; eIF2 $\alpha$ , eukaryotic translation initiation factor 2 $\alpha$ ; ER, endoplasmic reticulum; ERAD, ER-associated protein degradation; FIP200, focal adhesion kinase family interacting protein of 200 kDa; FOXO1, forkhead box O1; GABARAP,  $\gamma$ -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-1 $\alpha$ , hypoxia-inducible factor-1 $\alpha$ ; 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- $\kappa$ B, Nuclear factor- $\kappa$ B; 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, sarcoplasmic 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).

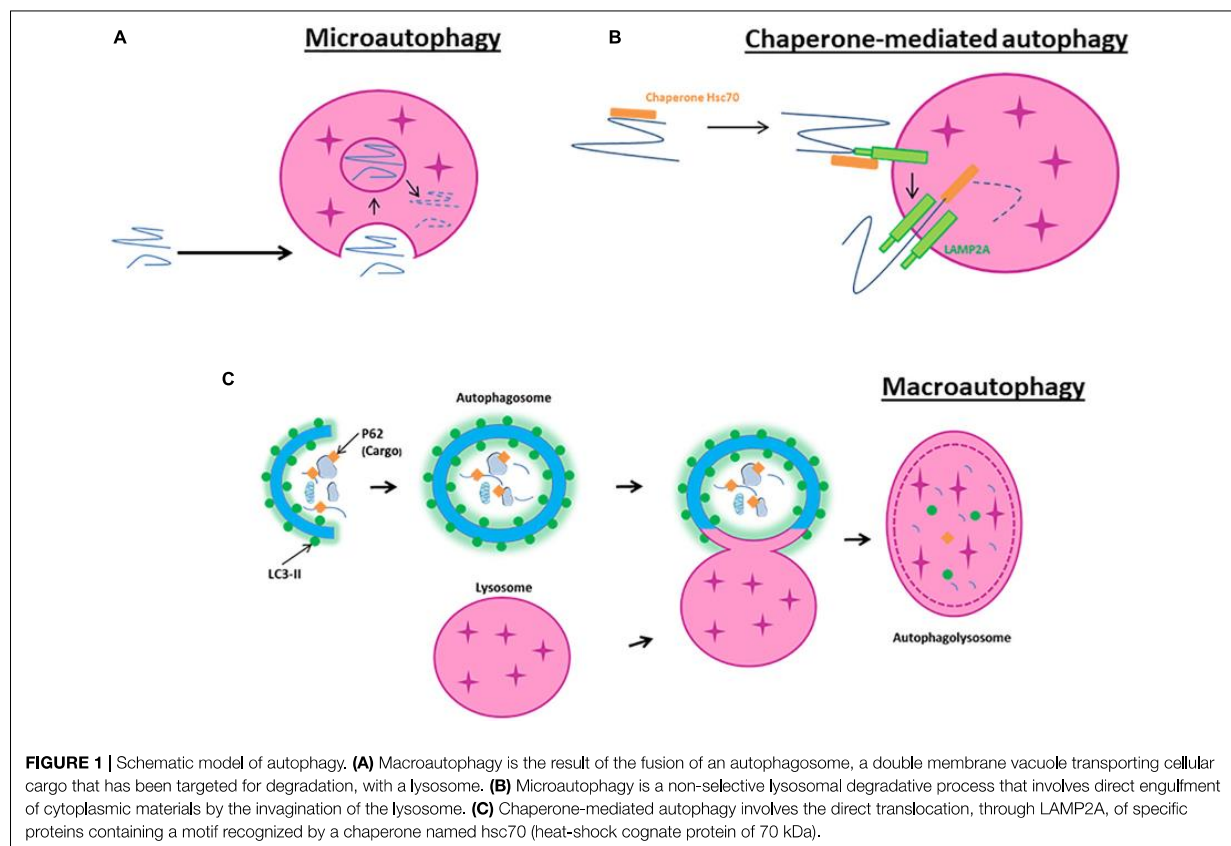
In contrast to microautophagy and CMA, macroautophagy involves sequestration of the cargo away from the lysosome. Macroautophagy requires the synthesis of an autophagosome, a double-layered membrane structure, to transport cellular cargo targeted for degradation. Autophagosomes then fuse with lysosomes 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



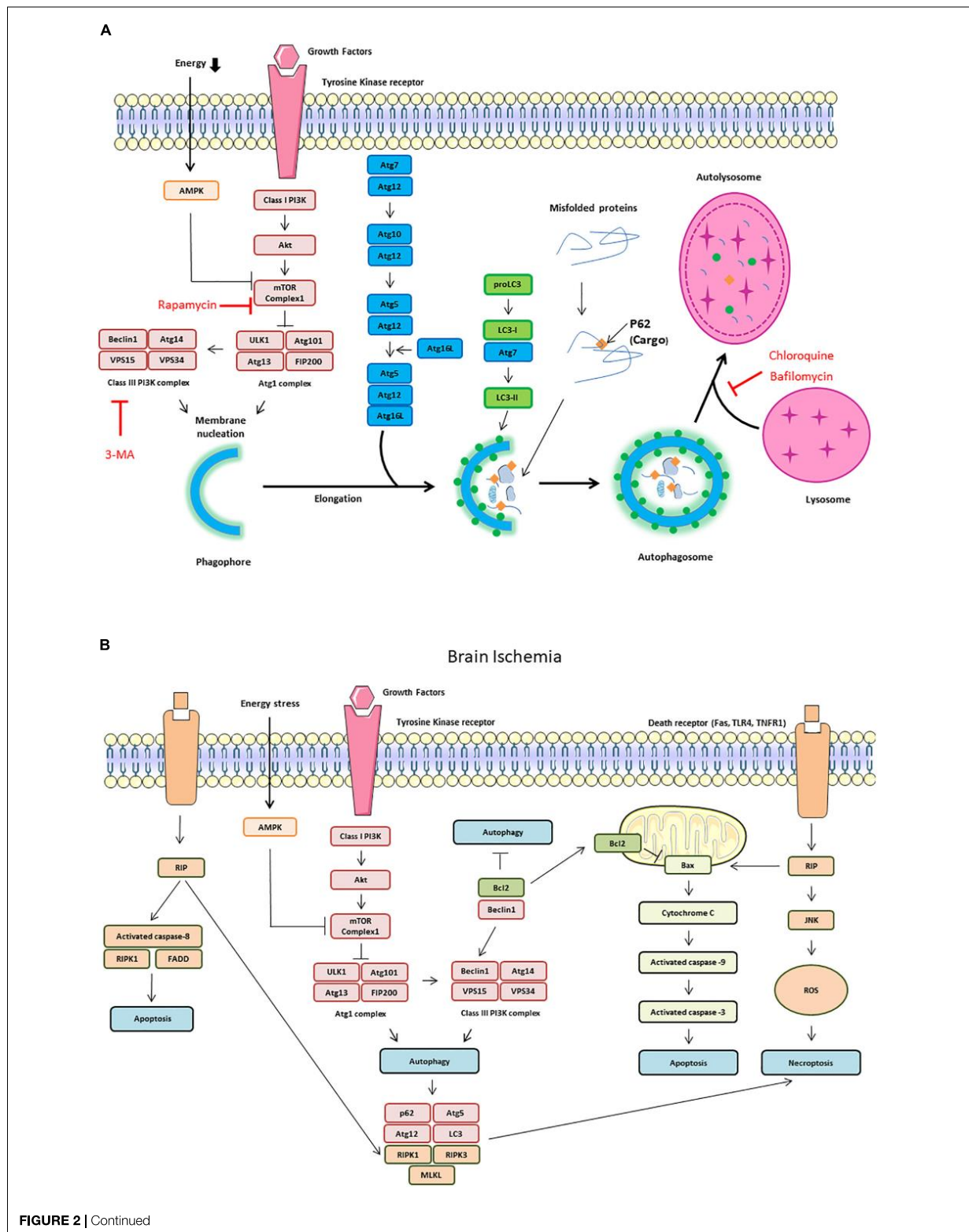
membrane nucleation (Russell et al., 2013; **Figure 2A**). On the other hand, Beclin-1 can bind to the anti-apoptotic protein Bcl-2 leading to the inhibition of autophagy (Pattingre et al., 2005). In response to starvation, JNK1 phosphorylates Bcl-2 allowing its release from Beclin-1 and the induction 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 |** 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 caspase-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-1 $\alpha$ , 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 autophagy 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- $\beta$ 1, which is upregulated after cerebral ischemia, protects neurons from OGD by impairing the interaction between Beclin-1 and PI3K 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-1 $\alpha$ , 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- $\kappa$ B 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 AMPK $\alpha$ 1 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.

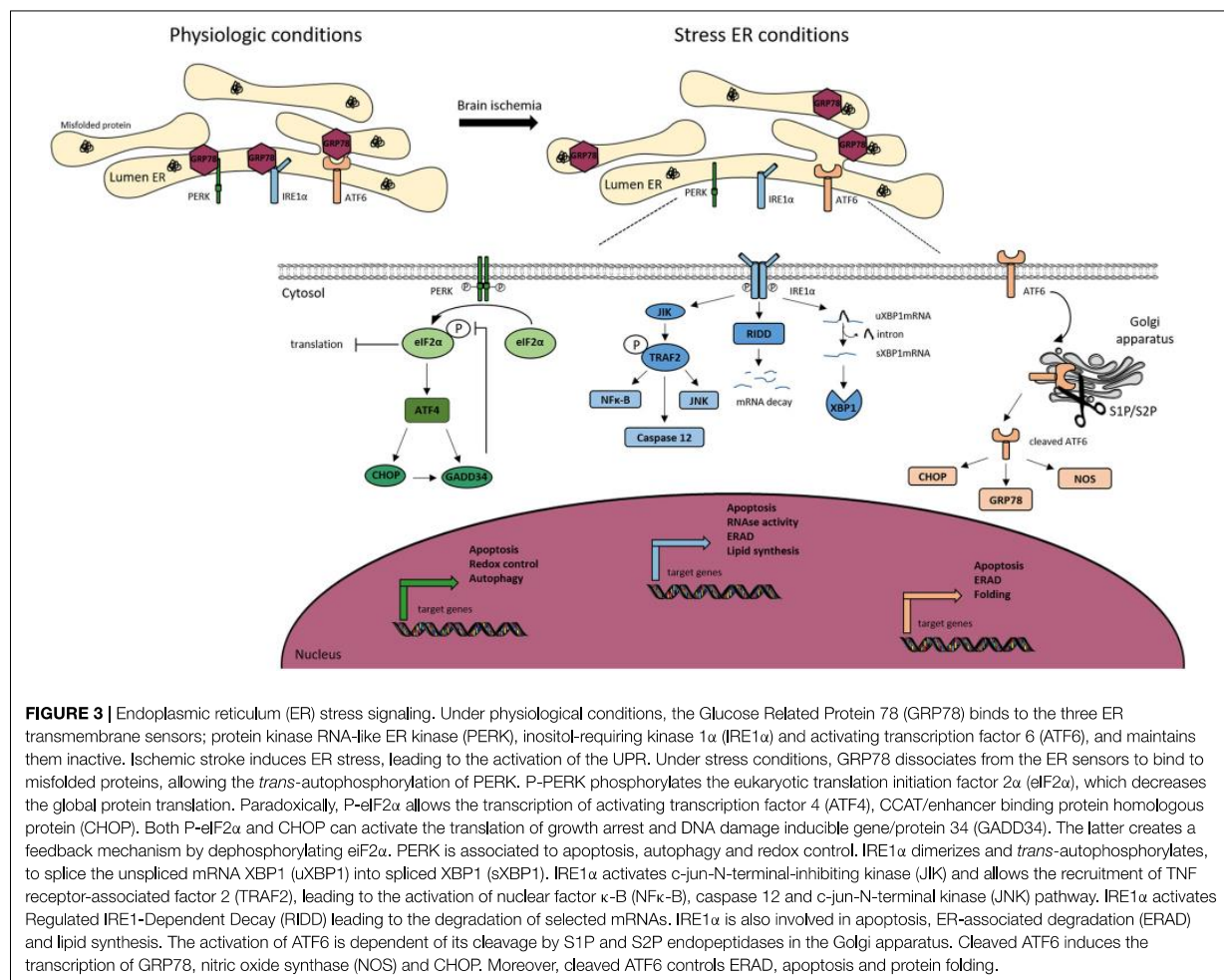
## ER STRESS AND CEREBRAL ISCHEMIA

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 eIF2 $\alpha$  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, eIF2 $\alpha$  (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 eIF2 $\alpha$ , 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 eIF2 $\alpha$  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



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 (Calton 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 (Szydłowska 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 eIF2 $\alpha$ , 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 (Kouyama 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 (Rzymiski 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  $\alpha$ 2-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 MCAO, 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 Ca<sup>2+</sup> 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 Regen. 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
- Douthel, 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
- Douthel, 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., Wiaderekiewicz, 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., Manjgowda, 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. Analg.* 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., Buccì, 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 Arozana, 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., Oyamomari, 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). Ca<sup>2+</sup> 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 Raghurir, 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). RPIK 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., Shibana, 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 eIF2 $\alpha$  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., Blommaert, 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 reared 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., Khodaghali, 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
- Rzysmiak, T., Milani, M., Pike, L., Buffa, F., Mellor, H. R., Winchester, L., et al. (2010). Regulation of autophagy by ATP4 in response to severe hypoxia. *Oncogene* 5, 4424–4435. doi: 10.1038/nc.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. Ther.* 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
- Sztydlowska, 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
- King, H., Azimi-Zonooz, A., Shuttlesworth, C. W., and Connor, J. A. (2004). Caffeine releasable stores of Ca<sup>2+</sup> show depletion prior to the final steps in delayed CA1 neuronal death. *J. Neurophysiol.* 92, 2960–2967. doi: 10.1152/jn.00015.2004
- King, 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.



## BIBLIOGRAPHIE

## A

- Abella, J. V., Peschard, P., Naujokas, M. A., Lin, T., Saucier, C., Urbé, S., and Park, M. (2005). Met/Hepatocyte growth factor receptor ubiquitination suppresses transformation and is required for Hrs phosphorylation. *Molecular and Cellular Biology* **25**, 9632–9645. doi:10.1128/MCB.25.21.9632-9645.2005
- Achim, C. L., Katyal, S., Wiley, C. A., Shiratori, M., Wang, G., Oshika, E., Petersen, B. E., Li, J. M., and Michalopoulos, G. K. (1997). Expression of HGF and cMet in the developing and adult brain. *Brain Research. Developmental Brain Research* **102**, 299–303. doi:10.1016/s0165-3806(97)00108-9
- Albrechtsen, O. K. (1957). The Fibrinolytic Activity of Animal Tissues. *Acta Physiologica Scandinavica* **39**, 284–290. doi:10.1111/j.1748-1716.1957.tb01429.x
- Al-Hallaq, R. A., Conrads, T. P., Veenstra, T. D., and Wenthold, R. J. (2007). NMDA di-heteromeric receptor populations and associated proteins in rat hippocampus. *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience* **27**, 8334–8343. doi:10.1523/JNEUROSCI.2155-07.2007
- Alvarez, V., Rossetti, A. O., Papavasileiou, V., and Michel, P. (2013). Acute seizures in acute ischemic stroke: does thrombolysis have a role to play? *Journal of Neurology* **260**, 55–61. doi:10.1007/s00415-012-6583-6
- An, X., Wang, F., Shao, Q., Wang, F.-H., Wang, Z.-Q., Wang, Z.-Q., Chen, C., Li, C., Luo, H.-Y., Zhang, D.-S., Xu, R.-H., and Li, Y.-H. (2014). MET amplification is not rare and predicts unfavorable clinical outcomes in patients with recurrent/metastatic gastric cancer after chemotherapy. *Cancer* **120**, 675–682. doi:10.1002/cncr.28454
- Anderson, C. S., Robinson, T., Lindley, R. I., Arima, H., Lavados, P. M., Lee, T.-H., Broderick, J. P., Chen, X., Chen, G., Sharma, V. K., Kim, J. S., Thang, N. H., Cao, Y., Parsons, M. W., Levi, C., Huang, Y., Olavarría, V. V., Demchuk, A. M., Bath, P. M., Donnan, G. A., Martins, S., Pontes-Neto, O. M., Silva, F., Ricci, S., Roffe, C., Pandian, J., Billot, L., Woodward, M., Li, Q., Wang, X., Wang, J., Chalmers, J., and ENCHANTED Investigators and Coordinators (2016). Low-Dose versus Standard-Dose Intravenous Alteplase in Acute Ischemic Stroke. *The New England Journal of Medicine* **374**, 2313–2323. doi:10.1056/NEJMoa1515510
- Andral, G. (1845). 'Essai d'hématologie pathologique' Paris, Fortin, Masson.
- 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**, 913–920.
- Arnold, P. D., Rosenberg, D. R., Mundo, E., Tharmalingam, S., Kennedy, J. L., and Richter, M. A. (2004). Association of a glutamate (NMDA) subunit receptor gene (GRIN2B) with obsessive-compulsive disorder: a preliminary study. *Psychopharmacology* **174**, 530–538. doi:10.1007/s00213-004-1847-1
- Arrieta, O., Garcia, E., Guevara, P., Garcia-Navarrete, R., Ondarza, R., Rembao, D., and Sotelo, J. (2002). Hepatocyte growth factor is associated with poor prognosis of malignant gliomas and is a predictor for recurrence of meningioma. *Cancer* **94**, 3210–3218. doi:10.1002/cncr.10594

- Arthur, L. G., Schwartz, M. Z., Kuenzler, K. A., and Birbe, R. (2004). Hepatocyte growth factor treatment ameliorates diarrhea and bowel inflammation in a rat model of inflammatory bowel disease. *Journal of Pediatric Surgery* **39**, 139–143. doi:10.1016/j.jpedsurg.2003.10.001
- Asperger, H. (1944). Die „Autistischen Psychopathen“ im Kindesalter. *Archiv für Psychiatrie und Nervenkrankheiten* **117**, 76–136. doi:10.1007/BF01837709
- Association, A. P. (2013). ‘Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders (DSM-5®)’. (American Psychiatric Pub.)
- Astrup, T., and Stage, A. (1952). Isolation of a soluble fibrinolytic activator from animal tissue. *Nature* **170**, 929. doi:10.1038/170929a0
- Attwell, D., and Gibb, A. (2005). Neuroenergetics and the kinetic design of excitatory synapses. *Nature Reviews. Neuroscience* **6**, 841–849. doi:10.1038/nrn1784

## B

- Balkovetz, D. F., and Lipschutz, J. H. (1999). Hepatocyte growth factor and the kidney: it is not just for the liver. *International Review of Cytology* **186**, 225–260. doi:10.1016/s0074-7696(08)61055-4
- Bao, Z.-S., Chen, H.-M., Yang, M.-Y., Zhang, C.-B., Yu, K., Ye, W.-L., Hu, B.-Q., Yan, W., Zhang, W., Akers, J., Ramakrishnan, V., Li, J., Carter, B., Liu, Y.-W., Hu, H.-M., Wang, Z., Li, M.-Y., Yao, K., Qiu, X.-G., Kang, C.-S., You, Y.-P., Fan, X.-L., Song, W. S., Li, R.-Q., Su, X.-D., Chen, C. C., and Jiang, T. (2014). RNA-seq of 272 gliomas revealed a novel, recurrent PTPRZ1-MET fusion transcript in secondary glioblastomas. *Genome Research* **24**, 1765–1773. doi:10.1101/gr.165126.113
- Baranek, G. T. (2002). Efficacy of sensory and motor interventions for children with autism. *Journal of Autism and Developmental Disorders* **32**, 397–422. doi:10.1023/a:1020541906063
- Baranes, D., Lederfein, D., Huang, Y. Y., Chen, M., Bailey, C. H., and Kandel, E. R. (1998). Tissue plasminogen activator contributes to the late phase of LTP and to synaptic growth in the hippocampal mossy fiber pathway. *Neuron* **21**, 813–825. doi:10.1016/s0896-6273(00)80597-8
- Bard, L., Sainlos, M., Bouchet, D., Cousins, S., Mikasova, L., Breillat, C., Stephenson, F. A., Imperiali, B., Choquet, D., and Groc, L. (2010). Dynamic and specific interaction between synaptic NR2-NMDA receptor and PDZ proteins. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **107**, 19561–19566. doi:10.1073/pnas.1002690107
- Bard-Chapeau, E. A., Yuan, J., Droin, N., Long, S., Zhang, E. E., Nguyen, T. V., and Feng, G.-S. (2006). Concerted functions of Gab1 and Shp2 in liver regeneration and hepatoprotection. *Molecular and Cellular Biology* **26**, 4664–4674. doi:10.1128/MCB.02253-05
- Barker-Carlson, K., Lawrence, D. A., and Schwartz, B. S. (2002). Acyl-enzyme complexes between tissue-type plasminogen activator and neuroserpin are short-lived in vitro. *The Journal of Biological Chemistry* **277**, 46852–46857. doi:10.1074/jbc.M207740200
- 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 & Differentiation* **17**, 860–871. doi:10.1038/cdd.2009.172
- Barria, A., and Malinow, R. (2002). Subunit-specific NMDA receptor trafficking to synapses. *Neuron* **35**, 345–353. doi:10.1016/s0896-6273(02)00776-6

- Basham, M. E., and Seeds, N. W. (2001). Plasminogen expression in the neonatal and adult mouse brain. *Journal of Neurochemistry* **77**, 318–325. doi:10.1046/j.1471-4159.2001.t01-1-00239.x
- Basilico, C., Arnesano, A., Galluzzo, M., Comoglio, P. M., and Michieli, P. (2008). A high affinity hepatocyte growth factor-binding site in the immunoglobulin-like region of Met. *The Journal of Biological Chemistry* **283**, 21267–21277. doi:10.1074/jbc.M800727200
- Bauer, T. W., Somcio, R. J., Fan, F., Liu, W., Johnson, M., Lesslie, D. P., Evans, D. B., Gallick, G. E., and Ellis, L. M. (2006). Regulatory role of c-Met in insulin-like growth factor-I receptor-mediated migration and invasion of human pancreatic carcinoma cells. *Molecular Cancer Therapeutics* **5**, 1676–1682. doi:10.1158/1535-7163.MCT-05-0175
- Bean, J., Brennan, C., Shih, J.-Y., Riely, G., Viale, A., Wang, L., Chitale, D., Motoi, N., Szoke, J., Broderick, S., Balak, M., Chang, W.-C., Yu, C.-J., Gazdar, A., Pass, H., Rusch, V., Gerald, W., Huang, S.-F., Yang, P.-C., Miller, V., Ladanyi, M., Yang, C.-H., and Pao, W. (2007). MET amplification occurs with or without T790M mutations in EGFR mutant lung tumors with acquired resistance to gefitinib or erlotinib. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **104**, 20932–20937. doi:10.1073/pnas.0710370104
- Belzung, C., and Lemoine, M. (2011). Criteria of validity for animal models of psychiatric disorders: focus on anxiety disorders and depression. *Biology of Mood & Anxiety Disorders* **1**, 9. doi:10.1186/2045-5380-1-9
- Benchenane, K., Castel, H., Boulouard, M., Bluthé, R., Fernandez-Monreal, M., Roussel, B. D., Lopez-Atalaya, J. P., Butt-Gueulle, S., Agin, V., Maubert, E., Dantzer, R., Touzani, O., Dauphin, F., Vivien, D., and Ali, C. (2007). Anti-NR1 N-terminal-domain vaccination unmasks the crucial action of tPA on NMDA-receptor-mediated toxicity and spatial memory. *Journal of Cell Science* **120**, 578–585. doi:10.1242/jcs.03354
- Bennur, S., Shankaranarayana Rao, B. S., Pawlak, R., Strickland, S., McEwen, B. S., and Chattarji, S. (2007). Stress-induced spine loss in the medial amygdala is mediated by tissue-plasminogen activator. *Neuroscience* **144**, 8–16. doi:10.1016/j.neuroscience.2006.08.075
- Benvenuti, S., Lazzari, L., Arnesano, A., Li Chiavi, G., Gentile, A., and Comoglio, P. M. (2011). Ron kinase transphosphorylation sustains MET oncogene addiction. *Cancer Research* **71**, 1945–1955. doi:10.1158/0008-5472.CAN-10-2100
- Berberich, S., Punnakkal, P., Jensen, V., Pawlak, V., Seeburg, P. H., Hvalby, Ø., and Köhr, G. (2005). Lack of NMDA receptor subtype selectivity for hippocampal long-term potentiation. *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience* **25**, 6907–6910. doi:10.1523/JNEUROSCI.1905-05.2005
- Berg, D. T., Burck, P. J., Berg, D. H., and Grinnell, B. W. (1993). Kringle glycosylation in a modified human tissue plasminogen activator improves functional properties. *Blood* **81**, 1312–1322.
- Berkhemer, O. A., Fransen, P. S. S., Beumer, D., van den Berg, L. A., Lingsma, H. F., Yoo, A. J., Schonewille, W. J., Vos, J. A., Nederkoorn, P. J., Wermer, M. J. H., van Walderveen, M. A. A., Staals, J., Hofmeijer, J., van Oostayen, J. A., Lycklama à Nijeholt, G. J., Boiten, J., Brouwer, P. A., Emmer, B. J., de Bruijn, S. F., van Dijk, L. C., Kappelle, L. J., Lo, R. H., van Dijk, E. J., de Vries, J., de Kort, P. L. M., van Rooij, W. J. J., van den Berg, J. S. P., van Hasselt, B. A. A. M., Aerden, L. A. M., Dallinga, R. J., Visser, M. C., Bot, J. C. J., Vroomen, P. C., Eshghi, O., Schreuder, T. H. C. M. L., Heijboer, R. J. J., Keizer, K., Tielbeek, A. V., den Hertog, H. M., Gerrits, D. G., van den Berg-Vos, R. M., Karas, G. B., Steyerberg, E. W., Flach, H. Z., Marquering, H. A., Sprengers, M. E. S., Jenniskens, S. F. M., Beenen, L. F. M., van den Berg, R., Koudstaal, P. J., van Zwam, W. H., Roos, Y. B. W. E. M., van der Lugt, A., van Oostenbrugge, R. J., Majoie, C. B. L. M., Dippel, D. W. J., and MR CLEAN Investigators (2015). A randomized trial of

- intraarterial treatment for acute ischemic stroke. *The New England Journal of Medicine* **372**, 11–20. doi:10.1056/NEJMoa1411587
- Bertrand, T., Lesept, F., Chevilly, A., Lenoir, S., Aimable, M., Briens, A., Hommet, Y., Bardou, I., Parcq, J., and Vivien, D. (2015). Conformations of tissue plasminogen activator (tPA) orchestrate neuronal survival by a crosstalk between EGFR and NMDAR. *Cell Death & Disease* **6**, e1924. doi:10.1038/cddis.2015.296
- Bhatia, R., Hill, M. D., Shobha, N., Menon, B., Bal, S., Kochar, P., Watson, T., Goyal, M., and Demchuk, A. M. (2010). Low rates of acute recanalization with intravenous recombinant tissue plasminogen activator in ischemic stroke: real-world experience and a call for action. *Stroke* **41**, 2254–2258. doi:10.1161/STROKEAHA.110.592535
- Bicknell, G. R., and Cohen, G. M. (1995). Cleavage of DNA to large kilobase pair fragments occurs in some forms of necrosis as well as apoptosis. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **207**, 40–47. doi:10.1006/bbrc.1995.1150
- Binder, B. R., Spragg, J., and Austen, K. F. (1979). Purification and characterization of human vascular plasminogen activator derived from blood vessel perfusates. *The Journal of Biological Chemistry* **254**, 1998–2003.
- Birchmeier, C., Birchmeier, W., Gherardi, E., and Vande Woude, G. F. (2003). Met, metastasis, motility and more. *Nature Reviews. Molecular Cell Biology* **4**, 915–925. doi:10.1038/nrm1261
- Bladt, F., Riethmacher, D., Isenmann, S., Aguzzi, A., and Birchmeier, C. (1995). Essential role for the c-met receptor in the migration of myogenic precursor cells into the limb bud. *Nature* **376**, 768–771. doi:10.1038/376768a0
- 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. *The Journal of Physiology* **232**, 331–356. doi:10.1113/jphysiol.1973.sp010273
- Boccaccio, C., Andò, M., Tamagnone, L., Bardelli, A., Michieli, P., Battistini, C., and Comoglio, P. M. (1998). Induction of epithelial tubules by growth factor HGF depends on the STAT pathway. *Nature* **391**, 285–288. doi:10.1038/34657
- Boland, J. M., Jang, J. S., Li, J., Lee, A. M., Wampfler, J. A., Erickson-Johnson, M. R., Soares, I., Yang, P., Jen, J., Oliveira, A. M., and Yi, E. S. (2013). MET and EGFR mutations identified in ALK-rearranged pulmonary adenocarcinoma: molecular analysis of 25 ALK-positive cases. *Journal of Thoracic Oncology: Official Publication of the International Association for the Study of Lung Cancer* **8**, 574–581. doi:10.1097/JTO.0b013e318287c395
- Boldyrev, A. A. (2005). Homocysteinic acid causes oxidative stress in lymphocytes by potentiating toxic effect of NMDA. *Bulletin of Experimental Biology and Medicine* **140**, 33–37. doi:10.1007/s10517-005-0404-1
- Bonifacino, J. S., and Traub, L. M. (2003). Signals for sorting of transmembrane proteins to endosomes and lysosomes. *Annual Review of Biochemistry* **72**, 395–447. doi:10.1146/annurev.biochem.72.121801.161800
- Bottaro, D. P., Rubin, J. S., Falletto, D. L., Chan, A. M., Kmieciak, T. E., Vande Woude, G. F., and Aaronson, S. A. (1991). Identification of the hepatocyte growth factor receptor as the c-met proto-oncogene product. *Science (New York, N.Y.)* **251**, 802–804. doi:10.1126/science.1846706

- Bracard, S., Ducrocq, X., Mas, J. L., Soudant, M., Oppenheim, C., Moulin, T., Guillemin, F., and THRACE investigators (2016). Mechanical thrombectomy after intravenous alteplase versus alteplase alone after stroke (THRACE): a randomised controlled trial. *The Lancet. Neurology* **15**, 1138–1147. doi:10.1016/S1474-4422(16)30177-6
- Branchi, I., Santucci, D., Vitale, A., and Alleva, E. (1998). Ultrasonic vocalizations by infant laboratory mice: a preliminary spectrographic characterization under different conditions. *Developmental Psychobiology* **33**, 249–256. doi:10.1002/(sici)1098-2302(199811)33:3<249::aid-dev5>3.0.co;2-r
- Breindel, J. L., Haskins, J. W., Cowell, E. P., Zhao, M., Nguyen, D. X., and Stern, D. F. (2013). EGF receptor activates MET through MAPK to enhance non-small cell lung carcinoma invasion and brain metastasis. *Cancer Research* **73**, 5053–5065. doi:10.1158/0008-5472.CAN-12-3775
- Brigman, J. L., Wright, T., Talani, G., Prasad-Mulcare, S., Jinde, S., Seabold, G. K., Mathur, P., Davis, M. I., Bock, R., Gustin, R. M., Colbran, R. J., Alvarez, V. A., Nakazawa, K., Delpire, E., Lovinger, D. M., and Holmes, A. (2010). Loss of GluN2B-containing NMDA receptors in CA1 hippocampus and cortex impairs long-term depression, reduces dendritic spine density, and disrupts learning. *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience* **30**, 4590–4600. doi:10.1523/JNEUROSCI.0640-10.2010
- Brooks, W. J., Petit, T. L., Leboutillier, J. C., and Lo, R. (1991). Rapid alteration of synaptic number and postsynaptic thickening length by NMDA: An electron microscopic study in the occipital cortex of postnatal rats. *Synapse* **8**, 41–48. doi:10.1002/syn.890080107
- Brotelle, T., and Bay, J.-O. (2016). La voie de signalisation PI3K-AKT-mTOR : description, développement thérapeutique, résistances, marqueurs prédictifs/pronostiques et applications thérapeutiques en cancérologie. *Bulletin du Cancer* **103**, 18–29. doi:10.1016/j.bulcan.2015.09.011
- Bu, G., Morton, P. A., and Schwartz, A. L. (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. *The Journal of Biological Chemistry* **267**, 15595–15602.
- Buisson, A., Nicole, O., Docagne, F., Sartelet, H., Mackenzie, E. T., and Vivien, D. (1998). Up-regulation of a serine protease inhibitor in astrocytes mediates the neuroprotective activity of transforming growth factor beta1. *FASEB journal: official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* **12**, 1683–1691.
- Burel-Vandenbos, F., Ngo-Mai, M., Dadone, B., Di Mauro, I., Gimet, S., Saada-Bouazid, E., Bourg, V., Almairac, F., Fontaine, D., Virolle, T., and Pedeutour, F. (2017). MET immunolabelling is a useful predictive tool for MET gene amplification in glioblastoma. *Neuropathology and Applied Neurobiology* **43**, 252–266. doi:10.1111/nan.12320

## C

- Calabresi, P., Napolitano, M., Centonze, D., Marfia, G. A., Gubellini, P., Teule, M. A., Berretta, N., Bernardi, G., Frati, L., Tolu, M., and Gulino, A. (2000). Tissue plasminogen activator controls multiple forms of synaptic plasticity and memory. *The European Journal of Neuroscience* **12**, 1002–1012. doi:10.1046/j.1460-9568.2000.00991.x
- Calvi, C., Podowski, M., Lopez-Mercado, A., Metzger, S., Misono, K., Malinina, A., Dikeman, D., Poonyagariyon, H., Ynalvez, L., Derakhshandeh, R., Le, A., Merchant, M., Schwall, R., and Neptune, E. R. (2013). Hepatocyte growth factor, a determinant of airspace homeostasis in the murine lung. *PLoS genetics* **9**, e1003228. doi:10.1371/journal.pgen.1003228

- Cameron, H., McEwen, B., and Gould, E. (1995). Regulation of adult neurogenesis by excitatory input and NMDA receptor activation in the dentate gyrus. *The Journal of Neuroscience* **15**, 4687–4692. doi:10.1523/JNEUROSCI.15-06-04687.1995
- Camidge, D. R., Ou, S.-H. I., Shapiro, G., Otterson, G. A., Villaruz, L. C., Villalona-Calero, M. A., Iafrate, A. J., Varella-Garcia, M., Dacic, S., Cardarella, S., Zhao, W., Tye, L., Stephenson, P., Wilner, K. D., James, L. P., and Socinski, M. A. (2014). Efficacy and safety of crizotinib in patients with advanced c-MET-amplified non-small cell lung cancer (NSCLC). *Journal of Clinical Oncology* **32**, 8001–8001. doi:10.1200/jco.2014.32.15\_suppl.8001
- Camp, R. L., Rimm, E. B., and Rimm, D. L. (1999). Met expression is associated with poor outcome in patients with axillary lymph node negative breast carcinoma. *Cancer* **86**, 2259–2265. doi:10.1002/(sici)1097-0142(19991201)86:11<2259::aid-cnrc13>3.0.co;2-2
- Campbell, B. C. V., Ma, H., Ringleb, P. A., Parsons, M. W., Churilov, L., Bendszus, M., Levi, C. R., Hsu, C., Kleinig, T. J., Fatar, M., Leys, D., Molina, C., Wijeratne, T., Curtze, S., Dewey, H. M., Barber, P. A., Butcher, K. S., De Silva, D. A., Bladin, C. F., Yassi, N., Pfaff, J. A. R., Sharma, G., Bivard, A., Desmond, P. M., Schwab, S., Schellinger, P. D., Yan, B., Mitchell, P. J., Serena, J., Toni, D., Thijs, V., Hacke, W., Davis, S. M., Donnan, G. A., and EXTEND, ECASS-4, and EPITHET Investigators (2019). Extending thrombolysis to 4·5–9 h and wake-up stroke using perfusion imaging: a systematic review and meta-analysis of individual patient data. *Lancet (London, England)* **394**, 139–147. doi:10.1016/S0140-6736(19)31053-0
- Campbell, B. C. V., Mitchell, P. J., Churilov, L., Yassi, N., Kleinig, T. J., Dowling, R. J., Yan, B., Bush, S. J., Dewey, H. M., Thijs, V., Scroop, R., Simpson, M., Brooks, M., Asadi, H., Wu, T. Y., Shah, D. G., Wijeratne, T., Ang, T., Miteff, F., Levi, C. R., Rodrigues, E., Zhao, H., Salvaris, P., Garcia-Esperon, C., Bailey, P., Rice, H., de Villiers, L., Brown, H., Redmond, K., Leggett, D., Fink, J. N., Collecutt, W., Wong, A. A., Muller, C., Coulthard, A., Mitchell, K., Clouston, J., Mahady, K., Field, D., Ma, H., Phan, T. G., Chong, W., Chandra, R. V., Slater, L.-A., Krause, M., Harrington, T. J., Faulder, K. C., Steinfort, B. S., Bladin, C. F., Sharma, G., Desmond, P. M., Parsons, M. W., Donnan, G. A., Davis, S. M., and EXTEND-IA TNK Investigators (2018). Tenecteplase versus Alteplase before Thrombectomy for Ischemic Stroke. *The New England Journal of Medicine* **378**, 1573–1582. doi:10.1056/NEJMoa1716405
- Campbell, D. B., Buie, T. M., Winter, H., Bauman, M., Sutcliffe, J. S., Perrin, J. M., and Levitt, P. (2009). Distinct genetic risk based on association of MET in families with co-occurring autism and gastrointestinal conditions. *Pediatrics* **123**, 1018–1024. doi:10.1542/peds.2008-0819
- Campbell, D. B., D’Oronzio, R., Garbett, K., Ebert, P. J., Mirnics, K., Levitt, P., and Persico, A. M. (2007). Disruption of cerebral cortex MET signaling in autism spectrum disorder. *Annals of Neurology* **62**, 243–250. doi:10.1002/ana.21180
- Campbell, D. B., Li, C., Sutcliffe, J. S., Persico, A. M., and Levitt, P. (2008). Genetic Evidence Implicating Multiple Genes in the MET Receptor Tyrosine Kinase Pathway in Autism Spectrum Disorder. *Autism research: official journal of the International Society for Autism Research* **1**, 159–168. doi:10.1002/aur.27
- Campbell, D. B., Sutcliffe, J. S., Ebert, P. J., Militerni, R., Bravaccio, C., Trillo, S., Elia, M., Schneider, C., Melmed, R., Sacco, R., Persico, A. M., and Levitt, P. (2006). A genetic variant that disrupts MET transcription is associated with autism. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **103**, 16834–16839. doi:10.1073/pnas.0605296103
- Canitano, R. (2007). Epilepsy in autism spectrum disorders. *European Child & Adolescent Psychiatry* **16**, 61–66. doi:10.1007/s00787-006-0563-2

- Carbone, F., Vuilleumier, N., Bertolotto, M., Burger, F., Galan, K., Roversi, G., Tamborino, C., Casetta, I., Seraceni, S., Trentini, A., Dallegrì, F., da Silva, A. R., Pende, A., Artom, N., Mach, F., Coen, M., Fainardi, E., and Montecucco, F. (2015). Treatment with recombinant tissue plasminogen activator (r-TPA) induces neutrophil degranulation in vitro via defined pathways. *Vascular Pharmacology* **64**, 16–27. doi:10.1016/j.vph.2014.11.007
- Carlson, K.-S. B., Nguyen, L., Schwartz, K., Lawrence, D. A., and Schwartz, B. S. (2016). Neuroserpin Differentiates Between Forms of Tissue Type Plasminogen Activator via pH Dependent Deacylation. *Frontiers in Cellular Neuroscience* **10**. doi:10.3389/fncel.2016.00154
- Carroll, P. M., Tsirka, S. E., Richards, W. G., Frohman, M. A., and Strickland, S. (1994). The mouse tissue plasminogen activator gene 5' flanking region directs appropriate expression in development and a seizure-enhanced response in the CNS. *Development (Cambridge, England)* **120**, 3173–3183.
- Cassé, F., Bardou, I., Danglot, L., Briens, A., Montagne, A., Parcq, J., Alahari, A., Galli, T., Vivien, D., and Docagne, F. (2012). Glutamate Controls tPA Recycling by Astrocytes, Which in Turn Influences Glutamatergic Signals. *Journal of Neuroscience* **32**, 5186–5199. doi:10.1523/JNEUROSCI.5296-11.2012
- Cesarini, L., Alfieri, P., Pantaleoni, F., Vasta, I., Cerutti, M., Petrangeli, V., Mariotti, P., Leoni, C., Ricci, D., Vicari, S., Selicorni, A., Tartaglia, M., Mercuri, E., and Zampino, G. (2009). Cognitive profile of disorders associated with dysregulation of the RAS/MAPK signaling cascade. *American Journal of Medical Genetics. Part A* **149A**, 140–146. doi:10.1002/ajmg.a.32488
- Chandler, W. L., Alessi, M. C., Aillaud, M. F., Henderson, P., Vague, P., and Juhan-Vague, I. (1997). Clearance of tissue plasminogen activator (TPA) and TPA/plasminogen activator inhibitor type 1 (PAI-1) complex: relationship to elevated TPA antigen in patients with high PAI-1 activity levels. *Circulation* **96**, 761–768. doi:10.1161/01.cir.96.3.761
- Chatterton, J. E., Awobuluyi, M., Premkumar, L. S., Takahashi, H., Talantova, M., Shin, Y., Cui, J., Tu, S., Sevarino, K. A., Nakanishi, N., Tong, G., Lipton, S. A., and Zhang, D. (2002). Excitatory glycine receptors containing the NR3 family of NMDA receptor subunits. *Nature* **415**, 793–798. doi:10.1038/nature715
- Chazot, P. L., and Stephenson, F. A. (1997). Biochemical evidence for the existence of a pool of unassembled C2 exon-containing NR1 subunits of the mammalian forebrain NMDA receptor. *Journal of Neurochemistry* **68**, 507–516. doi:10.1046/j.1471-4159.1997.68020507.x
- Chen, B.-S., Thomas, E. V., Sanz-Clemente, A., and Roche, K. W. (2011). NMDA receptor-dependent regulation of dendritic spine morphology by SAP102 splice variants. *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience* **31**, 89–96. doi:10.1523/JNEUROSCI.1034-10.2011
- Chen, N., Moshaver, A., and Raymond, L. A. (1997). Differential Sensitivity of Recombinant of recombinant -Methyl-d-Aspartate Receptor Subtypes to Zinc Inhibition. *Molecular Pharmacology* **51**, 1015–1023. doi:10.1124/mol.51.6.1015
- Choi, D. W. (1988a). Calcium-mediated neurotoxicity: relationship to specific channel types and role in ischemic damage. *Trends in Neurosciences* **11**, 465–469. doi:10.1016/0166-2236(88)90200-7
- Choi, D. W. (1988b). Glutamate neurotoxicity and diseases of the nervous system. *Neuron* **1**, 623–634. doi:10.1016/0896-6273(88)90162-6
- Choi, D. W. (1987). Ionic dependence of glutamate neurotoxicity. *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience* **7**, 369–379.

- Choi, Y. B., and Lipton, S. A. (1999). Identification and mechanism of action of two histidine residues underlying high-affinity Zn<sup>2+</sup> inhibition of the NMDA receptor. *Neuron* **23**, 171–180. doi:10.1016/s0896-6273(00)80763-1
- Choquet, D., and Triller, A. (2013). The dynamic synapse. *Neuron* **80**, 691–703. doi:10.1016/j.neuron.2013.10.013
- Christensen, D. L., Braun, K. V. N., Baio, J., Bilder, D., Charles, J., Constantino, J. N., Daniels, J., Durkin, M. S., Fitzgerald, R. T., Kurzius-Spencer, M., Lee, L.-C., Pettygrove, S., Robinson, C., Schulz, E., Wells, C., Wingate, M. S., Zahorodny, W., and Yeargin-Allsopp, M. (2018). Prevalence and Characteristics of Autism Spectrum Disorder Among Children Aged 8 Years - Autism and Developmental Disabilities Monitoring Network, 11 Sites, United States, 2012. *Morbidity and Mortality Weekly Report. Surveillance Summaries (Washington, D.C.: 2002)* **65**, 1–23. doi:10.15585/mmwr.ss6513a1
- Christensen, L. R., and Macleod, C. M. (1945). A PROTEOLYTIC ENZYME OF SERUM: CHARACTERIZATION, ACTIVATION, AND REACTION WITH INHIBITORS. *The Journal of General Physiology* **28**, 559–583. doi:10.1085/jgp.28.6.559
- Chung, H. J., Huang, Y. H., Lau, L.-F., and Huganir, R. L. (2004). Regulation of the NMDA receptor complex and trafficking by activity-dependent phosphorylation of the NR2B subunit PDZ ligand. *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience* **24**, 10248–10259. doi:10.1523/JNEUROSCI.0546-04.2004
- Ciabarra, A. M., Sullivan, J. M., Gahn, L. G., Pecht, G., Heinemann, S., and Sevarino, K. A. (1995). Cloning and characterization of chi-1: a developmentally regulated member of a novel class of the ionotropic glutamate receptor family. *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience* **15**, 6498–6508.
- Collen, D., and Lijnen, H. R. (1991). Basic and clinical aspects of fibrinolysis and thrombolysis. *Blood* **78**, 3114–3124.
- Collingridge, G. L., Kehl, S. J., and McLennan, H. (1983). Excitatory amino acids in synaptic transmission in the Schaffer collateral-commissural pathway of the rat hippocampus. *The Journal of Physiology* **334**, 33–46. doi:10.1113/jphysiol.1983.sp014478
- Conradi, H. (1902). Über die Beziehung der Autolyse zur Blutgerinnung. *Beitr. Chem. Physiol. Path* **1**.
- Consalez, G. G., and Hawkes, R. (2013). The compartmental restriction of cerebellar interneurons. *Frontiers in Neural Circuits* **6**. doi:10.3389/fncir.2012.00123
- Constantino, J. N., Zhang, Y., Frazier, T., Abbacchi, A. M., and Law, P. (2010). Sibling recurrence and the genetic epidemiology of autism. *The American Journal of Psychiatry* **167**, 1349–1356. doi:10.1176/appi.ajp.2010.09101470
- Contestabile, A. (2000). Roles of NMDA receptor activity and nitric oxide production in brain development. *Brain Research. Brain Research Reviews* **32**, 476–509. doi:10.1016/s0165-0173(00)00018-7
- Cooper, C. S., Park, M., Blair, D. G., Tainsky, M. A., Huebner, K., Croce, C. M., and Vande Woude, G. F. (1984). Molecular cloning of a new transforming gene from a chemically transformed human cell line. *Nature* **311**, 29–33. doi:10.1038/311029a0
- Cooper, J. (2001). Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders (4th edn, text revision) (DSM–IV–TR) Washington, DC: American Psychiatric Association 2000. 943 pp. £39.99 (hb). ISBN 0 89042 025 4. *The British Journal of Psychiatry* **179**, 85–85. doi:10.1192/bjp.179.1.85-a



- Corlew, R., Brasier, D. J., Feldman, D. E., and Philpot, B. D. (2008). Presynaptic NMDA receptors: newly appreciated roles in cortical synaptic function and plasticity. *The Neuroscientist: A Review Journal Bringing Neurobiology, Neurology and Psychiatry* **14**, 609–625. doi:10.1177/1073858408322675
- Correa, F., Gauberti, M., and Parcq J, Macrez R, Hommet Y, Obiang P, Hernangómez M, Montagne A, Liot G, Guaza C, Maubert E, Ali C, Vivien D, Docagne F. (2011). Tissue plasminogen activator prevents white matter damage following stroke. - PubMed - NCBI. Available at: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21576385> [accessed 25 March 2020]
- Cousins, S. L., Kenny, A. V., and Stephenson, F. A. (2009). Delineation of additional PSD-95 binding domains within NMDA receptor NR2 subunits reveals differences between NR2A/PSD-95 and NR2B/PSD-95 association. *Neuroscience* **158**, 89–95. doi:10.1016/j.neuroscience.2007.12.051
- Cramer, A., Kleiner, S., Westermann, M., Meissner, A., Lange, A., and Friedrich, K. (2005). Activation of the c-Met receptor complex in fibroblasts drives invasive cell behavior by signaling through transcription factor STAT3. *Journal of Cellular Biochemistry* **95**, 805–816. doi:10.1002/jcb.20459
- Cristiani, C., Rusconi, L., Perego, R., Schiering, N., Kalisz, H. M., Knapp, S., and Isacchi, A. (2005). Regulation of the wild-type and Y1235D mutant Met kinase activation. *Biochemistry* **44**, 14110–14119. doi:10.1021/bi051242k
- Crunelli, V., and Mayer, M. L. (1984). Mg<sup>2+</sup> dependence of membrane resistance increases evoked by NMDA in hippocampal neurones. *Brain Research* **311**, 392–396. doi:10.1016/0006-8993(84)90107-0
- Cuccaro, M. L., Shao, Y., Bass, M. P., Abramson, R. K., Ravan, S. A., Wright, H. H., Wolpert, C. M., Donnelly, S. L., and Pericak-Vance, M. A. (2003). Behavioral comparisons in autistic individuals from multiplex and singleton families. *Journal of Autism and Developmental Disorders* **33**, 87–91. doi:10.1023/a:1022286622534
- Cunnick, J. M., Meng, S., Ren, Y., Desponts, C., Wang, H.-G., Djeu, J. Y., and Wu, J. (2002). Regulation of the mitogen-activated protein kinase signaling pathway by SHP2. *The Journal of Biological Chemistry* **277**, 9498–9504. doi:10.1074/jbc.M110547200

## D

- Dastre, A. (1893). Fibrinolyse dans le sang.
- Denis, P. (1838). 'Essai de l'application de la chimie à l'étude physiologique du sang de l'homme et à l'étude physiologico-phatologique, hygiénique et thérapeutique des maladies de cette humeur'.
- Denorme, F., Langhauser, F., Desender, L., Vandenbulcke, A., Rottensteiner, H., Plaimauer, B., François, O., Andersson, T., Deckmyn, H., Scheiflinger, F., Kleinschnitz, C., Vanhoorelbeke, K., and De Meyer, S. F. (2016). ADAMTS13-mediated thrombolysis of t-PA-resistant occlusions in ischemic stroke in mice. *Blood* **127**, 2337–2345. doi:10.1182/blood-2015-08-662650
- Denys, J., and de Marbaix, H. (1889). 'Les peptonisations provoquées par le chloroforme.' *Cellule*.
- Di Renzo, M. F., Olivero, M., Giacomini, A., Porte, H., Chastre, E., Mirossay, L., Nordlinger, B., Bretti, S., Bottardi, S., and Giordano, S. (1995). Overexpression and amplification of the met/HGF receptor gene during the progression of colorectal cancer. *Clinical Cancer Research: An Official Journal of the American Association for Cancer Research* **1**, 147–154.

- Diamond, S. L., Eskin, S. G., and McIntire, L. V. (1989). Fluid flow stimulates tissue plasminogen activator secretion by cultured human endothelial cells. *Science (New York, N.Y.)* **243**, 1483–1485. doi:10.1126/science.2467379
- Dingledine, R., Borges, K., Bowie, D., and Traynelis, S. F. (1999). The glutamate receptor ion channels. *Pharmacological Reviews* **51**, 7–61.
- Docagne, F., Nicole, O., Marti, H. H., MacKenzie, E. T., Buisson, A., and Vivien, D. (1999). Transforming growth factor-beta1 as a regulator of the serpins/t-PA axis in cerebral ischemia. *FASEB journal: official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* **13**, 1315–1324. doi:10.1096/fasebj.13.11.1315
- Dong, Z., Saikumar, P., Weinberg, J. M., and Venkatachalam, M. A. (1997). Internucleosomal DNA cleavage triggered by plasma membrane damage during necrotic cell death. Involvement of serine but not cysteine proteases. *The American Journal of Pathology* **151**, 1205–1213.
- DSM-5 (2015). 'DSM-V- Manuel diagnostique et statistique d... | Elsevier Masson' Elsevier Masson. Available at: <https://www.elsevier-masson.fr/dsm-5-manuel-diagnostique-et-statistique-des-troubles-mentaux-9782294743382.html> [accessed 16 May 2020]

## E

- Eagleson, K. L., Bonnin, A., and Levitt, P. (2005). Region- and age-specific deficits in gamma-aminobutyric acidergic neuron development in the telencephalon of the uPAR(-/-) mouse. *The Journal of Comparative Neurology* **489**, 449–466. doi:10.1002/cne.20647
- Eagleson, K. L., Campbell, D. B., Thompson, B. L., Bergman, M. Y., and Levitt, P. (2011). The autism risk genes MET and PLAU differentially impact cortical development. *Autism Research: Official Journal of the International Society for Autism Research* **4**, 68–83. doi:10.1002/aur.172
- Eagleson, K. L., Lane, C. J., McFadyen-Ketchum, L., Solak, S., Wu, H.-H., and Levitt, P. (2016). Distinct intracellular signaling mediates C-MET regulation of dendritic growth and synaptogenesis. *Developmental Neurobiology* **76**, 1160–1181. doi:10.1002/dneu.22382
- Ebens, A., Brose, K., Leonardo, E. D., Jr, M. G. H., Bladt, F., Birchmeier, C., Barres, B. A., and Tessier-Lavigne, M. (1996). Hepatocyte Growth Factor/Scatter Factor Is an Axonal Chemoattractant and a Neurotrophic Factor for Spinal Motor Neurons. *Neuron* **17**, 1157–1172. doi:10.1016/S0896-6273(00)80247-0
- Echeverry, R., Wu, J., Haile, W. B., Guzman, J., and Yepes, M. (2010). Tissue-type plasminogen activator is a neuroprotectant in the mouse hippocampus. *The Journal of Clinical Investigation* **120**, 2194–2205. doi:10.1172/JCI41722
- Elzi, D. J., Lai, Y., Song, M., Hakala, K., Weintraub, S. T., and Shiio, Y. (2012). Plasminogen activator inhibitor 1--insulin-like growth factor binding protein 3 cascade regulates stress-induced senescence. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **109**, 12052–12057. doi:10.1073/pnas.1120437109
- Emdal, K. B., Dittmann, A., Reddy, R. J., Lescarbeau, R. S., Moores, S. L., Laquerre, S., and White, F. M. (2017). Characterization of In Vivo Resistance to Osimertinib and JNJ-61186372, an EGFR/Met Bispecific Antibody, Reveals Unique and Consensus Mechanisms of Resistance. *Molecular Cancer Therapeutics* **16**, 2572–2585. doi:10.1158/1535-7163.MCT-17-0413

- Emeis, J. J., van den Eijnden-Schrauwen, Y., van den Hoogen, C. M., de Priester, W., Westmuckett, A., and Lupu, F. (1997). An endothelial storage granule for tissue-type plasminogen activator. *The Journal of Cell Biology* **139**, 245–256. doi:10.1083/jcb.139.1.245
- Engelman, J. A., Zejnullahu, K., Mitsudomi, T., Song, Y., Hyland, C., Park, J. O., Lindeman, N., Gale, C.-M., Zhao, X., Christensen, J., Kosaka, T., Holmes, A. J., Rogers, A. M., Cappuzzo, F., Mok, T., Lee, C., Johnson, B. E., Cantley, L. C., and Jänne, P. A. (2007). MET amplification leads to gefitinib resistance in lung cancer by activating ERBB3 signaling. *Science (New York, N.Y.)* **316**, 1039–1043. doi:10.1126/science.1141478
- F**
- Feather-Schussler, D. N., and Ferguson, T. S. (2016). A Battery of Motor Tests in a Neonatal Mouse Model of Cerebral Palsy. *Journal of Visualized Experiments: JoVE*. doi:10.3791/53569
- Fernández-Monreal, M., López-Atalaya, J. P., Benchenane, K., Cacquevel, M., Dulin, F., Le Caer, J.-P., Rossier, J., Jarrige, A.-C., Mackenzie, E. T., Colloc'h, N., Ali, C., and 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. *The Journal of Biological Chemistry* **279**, 50850–50856. doi:10.1074/jbc.M407069200
- Flavin, M. P., Zhao, G., and Ho, L. T. (2000). Microglial tissue plasminogen activator (tPA) triggers neuronal apoptosis in vitro. *Glia* **29**, 347–354.
- Fombonne, E. (2003). Epidemiological surveys of autism and other pervasive developmental disorders: an update. *Journal of Autism and Developmental Disorders* **33**, 365–382. doi:10.1023/a:1025054610557
- Fonarow, G. C., Zhao, X., Smith, E. E., Saver, J. L., Reeves, M. J., Bhatt, D. L., Xian, Y., Hernandez, A. F., Peterson, E. D., and Schwamm, L. H. (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**, 1632–1640. doi:10.1001/jama.2014.3203
- Frampton, G. M., Ali, S. M., Rosenzweig, M., Chmielecki, J., Lu, X., Bauer, T. M., Akimov, M., Bufill, J. A., Lee, C., Jentz, D., Hoover, R., Ou, S.-H. I., Salgia, R., Brennan, T., Chalmers, Z. R., Jaeger, S., Huang, A., Elvin, J. A., Erlich, R., Fichtenholtz, A., Gowen, K. A., Greenbowe, J., Johnson, A., Khaira, D., McMahon, C., Sanford, E. M., Roels, S., White, J., Greshock, J., Schlegel, R., Lipson, D., Yelensky, R., Morosini, D., Ross, J. S., Collisson, E., Peters, M., Stephens, P. J., and Miller, V. A. (2015). Activation of MET via diverse exon 14 splicing alterations occurs in multiple tumor types and confers clinical sensitivity to MET inhibitors. *Cancer Discovery* **5**, 850–859. doi:10.1158/2159-8290.CD-15-0285
- Fredriksson, L., Li, H., Fieber, C., Li, X., and Eriksson, U. (2004). Tissue plasminogen activator is a potent activator of PDGF-CC. *The EMBO journal* **23**, 3793–3802. doi:10.1038/sj.emboj.7600397
- Frey, U., Müller, M., and Kuhl, D. (1996). A different form of long-lasting potentiation revealed in tissue plasminogen activator mutant mice. *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience* **16**, 2057–2063.
- Friedman, G. C., and Seeds, N. W. (1995). Tissue plasminogen activator mRNA expression in granule neurons coincides with their migration in the developing cerebellum. *The Journal of Comparative Neurology* **360**, 658–670. doi:10.1002/cne.903600410
- Frith, U. (1991). Asperger and his syndrome. In 'Autism and Asperger Syndrome'. (Ed U. Frith.) pp. 1–36. (Cambridge University Press: Cambridge.) doi:10.1017/CBO9780511526770.001

- Fukaya, M., Ueda, H., Yamauchi, K., Inoue, Y., and Watanabe, M. (1999). Distinct spatiotemporal expression of mRNAs for the PSD-95/SAP90 protein family in the mouse brain. *Neuroscience Research* **33**, 111–118. doi:10.1016/S0168-0102(98)00120-5
- Furlan, A., Stagni, V., Hussain, A., Richelme, S., Conti, F., Prodosmo, A., Destro, A., Roncalli, M., Barilà, D., and Maina, F. (2011). Abl interconnects oncogenic Met and p53 core pathways in cancer cells. *Cell Death and Differentiation* **18**, 1608–1616. doi:10.1038/cdd.2011.23
- G**
- Gandino, L., Longati, P., Medico, E., Prat, M., and Comoglio, P. M. (1994). Phosphorylation of serine 985 negatively regulates the hepatocyte growth factor receptor kinase. *The Journal of Biological Chemistry* **269**, 1815–1820.
- 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. *Neuroscience Letters* **180**, 123–126. doi:10.1016/0304-3940(94)90502-9
- Gardoni, F., Bellone, C., Cattabeni, F., and Di Luca, M. (2001). Protein kinase C activation modulates alpha-calmodulin kinase II binding to NR2A subunit of N-methyl-D-aspartate receptor complex. *The Journal of Biological Chemistry* **276**, 7609–7613. doi:10.1074/jbc.M009922200
- Garrett, T. P., McKern, N. M., Lou, M., Frenkel, M. J., Bentley, J. D., Lovrecz, G. O., Elleman, T. C., Cosgrove, L. J., and Ward, C. W. (1998). Crystal structure of the first three domains of the type-1 insulin-like growth factor receptor. *Nature* **394**, 395–399. doi:10.1038/28668
- Gebbink, M. F. B. G. (2011). Tissue-type plasminogen activator-mediated plasminogen activation and contact activation, implications in and beyond haemostasis. *Journal of thrombosis and haemostasis: JTH* **9 Suppl 1**, 174–181. doi:10.1111/j.1538-7836.2011.04278.x
- Gegelashvili, M. (2019). AUTISM AND DEPRESSION (REVIEW). *Georgian Medical News*, 54–56.
- Gherardi, E., Birchmeier, W., Birchmeier, C., and Vande Woude, G. (2012). Targeting MET in cancer: rationale and progress. *Nature Reviews. Cancer* **12**, 89–103. doi:10.1038/nrc3205
- Gherardi, E., Sandin, S., Petoukhov, M. V., Finch, J., Youles, M. E., Ofverstedt, L.-G., Miguel, R. N., Blundell, T. L., Vande Woude, G. F., Skoglund, U., and Svergun, D. I. (2006). Structural basis of hepatocyte growth factor/scatter factor and MET signalling. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **103**, 4046–4051. doi:10.1073/pnas.0509040103
- Ghousoub, R. A., Dillon, D. A., D'Aquila, T., Rimm, E. B., Fearon, E. R., and Rimm, D. L. (1998). Expression of c-met is a strong independent prognostic factor in breast carcinoma. *Cancer* **82**, 1513–1520. doi:10.1002/(sici)1097-0142(19980415)82:8<1513::aid-cnrc13>3.0.co;2-7
- Gielen, M., Siegler Retchless, B., Mony, L., Johnson, J. W., and Paoletti, P. (2009). Mechanism of differential control of NMDA receptor activity by NR2 subunits. *Nature* **459**, 703–707. doi:10.1038/nature07993
- Giordano, S., Di Renzo, M. F., Narsimhan, R. P., Cooper, C. S., Rosa, C., and Comoglio, P. M. (1989). Biosynthesis of the protein encoded by the c-met proto-oncogene. *Oncogene* **4**, 1383–1388.
- 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**, 687–693. doi:10.1016/0092-8674(86)90511-8

- Grant, B. D., and Donaldson, J. G. (2009). Pathways and mechanisms of endocytic recycling. *Nature Reviews. Molecular Cell Biology* **10**, 597–608. doi:10.1038/nrm2755
- Gravanis, I., and Tzirka, S. E. (2005). Tissue plasminogen activator and glial function. *Glia* **49**, 177–183. doi:10.1002/glia.20115
- Graveel, C., Su, Y., Koeman, J., Wang, L.-M., Tessarollo, L., Fiscella, M., Birchmeier, C., Swiatek, P., Bronson, R., and Vande Woude, G. (2004). Activating Met mutations produce unique tumor profiles in mice with selective duplication of the mutant allele. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **101**, 17198–17203. doi:10.1073/pnas.0407651101
- Groc, L., Bard, L., and Choquet, D. (2009). Surface trafficking of N-methyl-D-aspartate receptors: physiological and pathological perspectives. *Neuroscience* **158**, 4–18. doi:10.1016/j.neuroscience.2008.05.029
- Groc, L., Choquet, D., Stephenson, F. A., Verrier, D., Manzoni, O. J., and Chavis, P. (2007). NMDA receptor surface trafficking and synaptic subunit composition are developmentally regulated by the extracellular matrix protein Reelin. *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience* **27**, 10165–10175. doi:10.1523/JNEUROSCI.1772-07.2007
- Groc, L., Heine, M., Cognet, L., Brickley, K., Stephenson, F. A., Lounis, B., and Choquet, D. (2004). Differential activity-dependent regulation of the lateral mobilities of AMPA and NMDA receptors. *Nature Neuroscience* **7**, 695–696. doi:10.1038/nn1270
- Groc, L., Heine, M., Cousins, S. L., Stephenson, F. A., Lounis, B., Cognet, L., and Choquet, D. (2006). NMDA receptor surface mobility depends on NR2A-2B subunits. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **103**, 18769–18774. doi:10.1073/pnas.0605238103
- Gu, H., Maeda, H., Moon, J. J., Lord, J. D., Yoakim, M., Nelson, B. H., and Neel, B. G. (2000). New role for Shc in activation of the phosphatidylinositol 3-kinase/Akt pathway. *Molecular and Cellular Biology* **20**, 7109–7120. doi:10.1128/mcb.20.19.7109-7120.2000
- Guinchat, V., Thorsen, P., Laurent, C., Cans, C., Bodeau, N., and Cohen, D. (2012). Pre-, peri- and neonatal risk factors for autism. *Acta Obstetrica Et Gynecologica Scandinavica* **91**, 287–300. doi:10.1111/j.1600-0412.2011.01325.x
- Gutierrez, H., Dolcet, X., Tolcos, M., and Davies, A. (2004). HGF regulates the development of cortical pyramidal dendrites. *Development (Cambridge, England)* **131**, 3717–3726. doi:10.1242/dev.01209

## H

- Hacke, W., Donnan, G., Fieschi, C., Kaste, M., von Kummer, R., Broderick, J. P., Brott, T., Frankel, M., Grotta, J. C., Haley, E. C., Kwiatkowski, T., Levine, S. R., Lewandowski, C., Lu, M., Lyden, P., Marler, J. R., Patel, S., Tilley, B. C., Albers, G., Bluhmki, E., Wilhelm, M., Hamilton, S., ATLANTIS Trials Investigators, ECASS Trials Investigators, and NINDS rt-PA Study Group Investigators (2004). Association of outcome with early stroke treatment: pooled analysis of ATLANTIS, ECASS, and NINDS rt-PA stroke trials. *Lancet (London, England)* **363**, 768–774. doi:10.1016/S0140-6736(04)15692-4
- Hajjar, K. A., and Reynolds, C. M. (1994). alpha-Fucose-mediated binding and degradation of tissue-type plasminogen activator by HepG2 cells. *The Journal of Clinical Investigation* **93**, 703–710. doi:10.1172/JCI117023

- Hammond, D. E., Carter, S., McCullough, J., Urbé, S., Vande Woude, G., and Clague, M. J. (2003). Endosomal dynamics of Met determine signaling output. *Molecular Biology of the Cell* **14**, 1346–1354. doi:10.1091/mbc.e02-09-0578
- Hara, S., Nakashiro, K.-I., Klosek, S. K., Ishikawa, T., Shintani, S., and Hamakawa, H. (2006). Hypoxia enhances c-Met/HGF receptor expression and signaling by activating HIF-1alpha in human salivary gland cancer cells. *Oral Oncology* **42**, 593–598. doi:10.1016/j.oraloncology.2005.10.016
- Hardingham, G. E., Fukunaga, Y., and Bading, H. (2002). Extrasynaptic NMDARs oppose synaptic NMDARs by triggering CREB shut-off and cell death pathways. *Nature Neuroscience* **5**, 405–414. doi:10.1038/nn835
- Harris, A. Z., and Pettit, D. L. (2007). Extrasynaptic and synaptic NMDA receptors form stable and uniform pools in rat hippocampal slices. *The Journal of Physiology* **584**, 509–519. doi:10.1113/jphysiol.2007.137679
- Harris, R. J., Leonard, C. K., Guzzetta, A. W., and Spellman, M. W. (1991). Tissue plasminogen activator has an O-linked fucose attached to threonine-61 in the epidermal growth factor domain. *Biochemistry* **30**, 2311–2314. doi:10.1021/bi00223a004
- Hartmann, G., Prospero, T., Brinkmann, V., Ozcelik, C., Winter, G., Hepple, J., Batley, S., Bladt, F., Sachs, M., Birchmeier, C., Birchmeier, W., Gherardi, E., and Ozcelik, O. (1998). Engineered mutants of HGF/SF with reduced binding to heparan sulphate proteoglycans, decreased clearance and enhanced activity in vivo. *Current biology: CB* **8**, 125–134. doi:10.1016/s0960-9822(98)70059-4
- Hastings, G. A., Coleman, T. A., Haudenschild, C. C., Stefansson, S., Smith, E. P., Barthlow, R., Cherry, S., Sandkvist, M., and Lawrence, D. A. (1997). Neuroserpin, a brain-associated inhibitor of tissue plasminogen activator is localized primarily in neurons. Implications for the regulation of motor learning and neuronal survival. *The Journal of Biological Chemistry* **272**, 33062–33067. doi:10.1074/jbc.272.52.33062
- Hatten, M. E. (1999). Central nervous system neuronal migration. *Annual Review of Neuroscience* **22**, 511–539. doi:10.1146/annurev.neuro.22.1.511
- Hedin, S. G. (1903). On the presence of a proteolytic enzyme in the normal serum of the ox. *The Journal of Physiology* **30**, 195–201. doi:10.1113/jphysiol.1903.sp000989
- Heist, R. S., Shim, H. S., Gingipally, S., Mino-Kenudson, M., Le, L., Gainor, J. F., Zheng, Z., Aryee, M., Xia, J., Jia, P., Jin, H., Zhao, Z., Pao, W., Engelman, J. A., and Iafrate, A. J. (2016). MET Exon 14 Skipping in Non-Small Cell Lung Cancer. *The Oncologist* **21**, 481–486. doi:10.1634/theoncologist.2015-0510
- Hennessy, B. T., Smith, D. L., Ram, P. T., Lu, Y., and Mills, G. B. (2005). Exploiting the PI3K/AKT pathway for cancer drug discovery. *Nature Reviews. Drug Discovery* **4**, 988–1004. doi:10.1038/nrd1902
- Henry, V. J., Lecointre, M., Laudenbach, V., Ali, C., Macrez, R., Jullienne, A., Berezowski, V., Carmeliet, P., Vivien, D., Marret, S., Gonzalez, B. J., and Leroux, P. (2013). High t-PA release by neonate brain microvascular endothelial cells under glutamate exposure affects neuronal fate. *Neurobiology of Disease* **50**, 201–208. doi:10.1016/j.nbd.2012.10.020
- Henson, M. A., Roberts, A. C., Pérez-Otaño, I., and Philpot, B. D. (2010). Influence of the NR3A subunit on NMDA receptor functions. *Progress in Neurobiology* **91**, 23–37. doi:10.1016/j.pneurobio.2010.01.004

- 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. *Neuroscience Letters* **297**, 105–108. doi:10.1016/s0304-3940(00)01679-7
- Hirai, K., Yoshioka, H., Kihara, M., Hasegawa, K., Sakamoto, T., Sawada, T., and Fushiki, S. (1999). Inhibiting neuronal migration by blocking NMDA receptors in the embryonic rat cerebral cortex: a tissue culture study. *Developmental Brain Research* **114**, 63–67. doi:10.1016/S0165-3806(99)00019-X
- Hossain, M. A., Russell, J. C., Gomez, R., Laterra, J., and Gomes, R. (2002). Neuroprotection by scatter factor/hepatocyte growth factor and FGF-1 in cerebellar granule neurons is phosphatidylinositol 3-kinase/akt-dependent and MAPK/CREB-independent. *Journal of Neurochemistry* **81**, 365–378. doi:10.1046/j.1471-4159.2002.00837.x
- Hoylaerts, M., Rijken, D. C., Lijnen, H. R., and Collen, D. (1982). Kinetics of the activation of plasminogen by human tissue plasminogen activator. Role of fibrin. *The Journal of Biological Chemistry* **257**, 2912–2919.
- Hu, G.-Y., Hvalby, Ø., Walaas, S. I., Albert, K. A., Skjeflo, P., Andersen, P., and Greengard, P. (1987). Protein kinase C injection into hippocampal pyramidal cells elicits features of long term potentiation. *Nature* **328**, 426–429. doi:10.1038/328426a0
- Huang, T. J., Wang, J. Y., Lin, S. R., Lian, S. T., and Hsieh, J. S. (2001). Overexpression of the c-met protooncogene in human gastric carcinoma--correlation to clinical features. *Acta Oncologica (Stockholm, Sweden)* **40**, 638–643. doi:10.1080/028418601750444204
- Huang, Y. Y., Bach, M. E., Lipp, H. P., Zhuo, M., Wolfer, D. P., Hawkins, R. D., Schoonjans, L., Kandel, E. R., Godfraind, J. M., Mulligan, R., Collen, D., and Carmeliet, P. (1996). Mice lacking the gene encoding tissue-type plasminogen activator show a selective interference with late-phase long-term potentiation in both Schaffer collateral and mossy fiber pathways. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **93**, 8699–8704. doi:10.1073/pnas.93.16.8699
- Huber, D., Cramer, E. M., Kaufmann, J. E., Meda, P., Massé, J.-M., Kruithof, E. K. O., and Vischer, U. M. (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. doi:10.1182/blood.v99.10.3637
- Huh, C.-G., Factor, V. M., Sánchez, A., Uchida, K., Conner, E. A., and Thorgeirsson, S. S. (2004). Hepatocyte growth factor/c-met signaling pathway is required for efficient liver regeneration and repair. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **101**, 4477–4482. doi:10.1073/pnas.0306068101
- Huh, K.-H., and Wenthold, R. J. (1999). Turnover Analysis of Glutamate Receptors Identifies a Rapidly Degraded Pool of the N-Methyl-d-aspartate Receptor Subunit, NR1, in Cultured Cerebellar Granule Cells. *Journal of Biological Chemistry* **274**, 151–157. doi:10.1074/jbc.274.1.151
- Hultman, K., Tjärnlund-Wolf, A., Fish, R. J., Wilhelmsson, U., Rydenhag, B., Pekny, M., Kruithof, E. K. O., and Jern, C. (2008). Retinoids and activation of PKC induce tissue-type plasminogen activator expression and storage in human astrocytes. *Journal of thrombosis and haemostasis: JTH* **6**, 1796–1803. doi:10.1111/j.1538-7836.2008.03084.x
- Huntington, J. A., Read, R. J., and Carrell, R. W. (2000). Structure of a serpin-protease complex shows inhibition by deformation. *Nature* **407**, 923–926. doi:10.1038/35038119

- Ichinose, A., Kisiel, W., and Fujikawa, K. (1984). Proteolytic activation of tissue plasminogen activator by plasma and tissue enzymes. *FEBS letters* **175**, 412–418. doi:10.1016/0014-5793(84)80779-6
- Ieraci, A., Forni, P. E., and Ponzetto, C. (2002). Viable hypomorphic signaling mutant of the Met receptor reveals a role for hepatocyte growth factor in postnatal cerebellar development. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **99**, 15200–15205. doi:10.1073/pnas.222362099
- IMGSAC (1998). A full genome screen for autism with evidence for linkage to a region on chromosome 7q. International Molecular Genetic Study of Autism Consortium. *Human Molecular Genetics* **7**, 571–578. doi:10.1093/hmg/7.3.571
- Inagaki, N., Kuromi, H., Gonoj, T., Okamoto, Y., Ishida, H., Seino, Y., Kaneko, T., Iwanaga, T., and Seino, S. (1995). Expression and role of ionotropic glutamate receptors in pancreatic islet cells. *FASEB journal: official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* **9**, 686–691.
- Iossifov, I., Ronemus, M., Levy, D., Wang, Z., Hakker, I., Rosenbaum, J., Yamrom, B., Lee, Y., Narzisi, G., Leotta, A., Kendall, J., Grabowska, E., Ma, B., Marks, S., Rodgers, L., Stepansky, A., Troge, J., Andrews, P., Bekritsky, M., Pradhan, K., Ghiban, E., Kramer, M., Parla, J., Demeter, R., Fulton, L. L., Fulton, R. S., Magrini, V. J., Ye, K., Darnell, J. C., Darnell, R. B., Mardis, E. R., Wilson, R. K., Schatz, M. C., McCombie, W. R., and Wigler, M. (2012). De Novo Gene Disruptions in Children on the Autistic Spectrum. *Neuron* **74**, 285–299. doi:10.1016/j.neuron.2012.04.009
- Iriki, A., Pavlides, C., Keller, A., and Asanuma, H. (1989). Long-term potentiation in the motor cortex. *Science (New York, N.Y.)* **245**, 1385–1387. doi:10.1126/science.2551038
- Ishibe, S., Karihaloo, A., Ma, H., Zhang, J., Marlier, A., Mitobe, M., Togawa, A., Schmitt, R., Czyczk, J., Kashgarian, M., Geller, D. S., Thorgeirsson, S. S., and Cantley, L. G. (2009). Met and the epidermal growth factor receptor act cooperatively to regulate final nephron number and maintain collecting duct morphology. *Development (Cambridge, England)* **136**, 337–345. doi:10.1242/dev.024463
- Ishihara, N., Takagi, N., Niimura, M., Takagi, K., Nakano, M., Tanonaka, K., Funakoshi, H., Matsumoto, K., Nakamura, T., and Takeo, S. (2005). Inhibition of apoptosis-inducing factor translocation is involved in protective effects of hepatocyte growth factor against excitotoxic cell death in cultured hippocampal neurons. *Journal of Neurochemistry* **95**, 1277–1286. doi:10.1111/j.1471-4159.2005.03446.x
- IST-3 (2012). 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. *The Lancet* **379**, 2352–2363. doi:10.1016/S0140-6736(12)60768-5
- Iwata, K. (2019). Characterization of an Animal Model of Autism and Social Interaction. *Methods in Molecular Biology (Clifton, N.J.)* **1916**, 149–155. doi:10.1007/978-1-4939-8994-2\_14

## J

- Jackson, P. B., Boccuto, L., Skinner, C., Collins, J. S., Neri, G., Gurrieri, F., and Schwartz, C. E. (2009). Further evidence that the rs1858830 C variant in the promoter region of the MET gene is associated with autistic disorder. *Autism Research: Official Journal of the International Society for Autism Research* **2**, 232–236. doi:10.1002/aur.87
- 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. *Frontiers in Molecular Neuroscience* **9**, 121. doi:10.3389/fnmol.2016.00121
- Jeffers, M., Fiscella, M., Webb, C. P., Anver, M., Koochekpour, S., and Woude, G. F. V. (1998). The mutationally activated Met receptor mediates motility and metastasis. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **95**, 14417–14422. doi:10.1073/pnas.95.24.14417
- Jeffers, M., Schmidt, L., Nakaigawa, N., Webb, C. P., Weirich, G., Kishida, T., Zbar, B., and Vande Woude, G. F. (1997). Activating mutations for the met tyrosine kinase receptor in human cancer. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **94**, 11445–11450. doi:10.1073/pnas.94.21.11445
- Joffre, C., Barrow, R., Ménard, L., Calleja, V., Hart, I. R., and Kermorgant, S. (2011). A direct role for Met endocytosis in tumorigenesis. *Nature Cell Biology* **13**, 827–837. doi:10.1038/ncb2257
- Johnson, J. W., and Ascher, P. (1987). Glycine potentiates the NMDA response in cultured mouse brain neurons. *Nature* **325**, 529–531. doi:10.1038/325529a0
- Jones, M. L., and Leonard, J. P. (2005). PKC site mutations reveal differential modulation by insulin of NMDA receptors containing NR2A or NR2B subunits. *Journal of Neurochemistry* **92**, 1431–1438. doi:10.1111/j.1471-4159.2004.02985.x
- Judson, M. C., Bergman, M. Y., Campbell, D. B., Eagleson, K. L., and Levitt, P. (2009). Dynamic gene and protein expression patterns of the autism-associated met receptor tyrosine kinase in the developing mouse forebrain. *The Journal of Comparative Neurology* **513**, 511–531. doi:10.1002/cne.21969
- Jullienne, A., Montagne, A., Orset, C., Lesept, F., Jane, D. E., Monaghan, D. T., Maubert, E., Vivien, D., and Ali, C. (2011). Selective inhibition of GluN2D-containing N-methyl-D-aspartate receptors prevents tissue plasminogen activator-promoted neurotoxicity both in vitro and in vivo. *Molecular Neurodegeneration* **6**, 68. doi:10.1186/1750-1326-6-68
- Jung, W., Castren, E., Odenthal, M., Vande Woude, G. F., Ishii, T., Dienes, H. P., Lindholm, D., and Schirmacher, P. (1994). Expression and functional interaction of hepatocyte growth factor-scatter factor and its receptor c-met in mammalian brain. *The Journal of Cell Biology* **126**, 485–494. doi:10.1083/jcb.126.2.485
- Junge, C. E., Lee, C. J., Hubbard, K. B., Zhang, Z., Olson, J. J., Hepler, J. R., Brat, D. J., and Traynelis, S. F. (2004). Protease-activated receptor-1 in human brain: localization and functional expression in astrocytes. *Experimental Neurology* **188**, 94–103. doi:10.1016/j.expneurol.2004.02.018

## K

- Kagitani, H., Tagawa, M., Hatanaka, K., Ikari, T., Saito, A., Bando, H., Okada, K., and Matsuo, O. (1985). Expression in *E. coli* of finger-domain lacking tissue-type plasminogen activator with high fibrin affinity. *FEBS letters* **189**, 145–149. doi:10.1016/0014-5793(85)80860-7
- Kaneko, M., Sakata, Y., Matsuda, M., and Mimuro, J. (1992). Interactions between the finger and kringle-2 domains of tissue-type plasminogen activator and plasminogen activator inhibitor-1. *Journal of Biochemistry* **111**, 244–248. doi:10.1093/oxfordjournals.jbchem.a123744
- Kanner, L. (1943). Autistic disturbances of affective contact. *Nervous Child* **2**, 217–250.

- Keller, L., Hobohm, C., Zeynalova, S., Classen, J., and Baum, P. (2015). Does treatment with t-PA increase the risk of developing epilepsy after stroke? *Journal of Neurology* **262**, 2364–2372. doi:10.1007/s00415-015-7850-0
- Kermorgant, S., and Parker, P. J. (2005). c-Met signalling: spatio-temporal decisions. *Cell Cycle (Georgetown, Tex.)* **4**, 352–355. doi:10.4161/cc.4.3.1519
- Kermorgant, S., and Parker, P. J. (2008). Receptor trafficking controls weak signal delivery: a strategy used by c-Met for STAT3 nuclear accumulation. *The Journal of Cell Biology* **182**, 855–863. doi:10.1083/jcb.200806076
- Kermorgant, S., Zicha, D., and Parker, P. J. (2004). PKC controls HGF-dependent c-Met traffic, signalling and cell migration. *The EMBO journal* **23**, 3721–3734. doi:10.1038/sj.emboj.7600396
- Kew, J. N., Richards, J. G., Mutel, V., and Kemp, J. A. (1998). Developmental changes in NMDA receptor glycine affinity and ifenprodil sensitivity reveal three distinct populations of NMDA receptors in individual rat cortical neurons. *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience* **18**, 1935–1943.
- Kim, H.-K., Lee, S. Y., Oh, H.-K., Kang, B.-H., Ku, H.-J., Lee, Y., Shin, J.-Y., Hong, Y.-K., and Joe, Y. A. (2003). Inhibition of endothelial cell proliferation by the recombinant kringle domain of tissue-type plasminogen activator. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **304**, 740–746. doi:10.1016/s0006-291x(03)00656-9
- Kim, Y. S., Leventhal, B. L., Koh, Y.-J., Fombonne, E., Laska, E., Lim, E.-C., Cheon, K.-A., Kim, S.-J., Kim, Y.-K., Lee, H., Song, D.-H., and Grinker, R. R. (2011). Prevalence of autism spectrum disorders in a total population sample. *The American Journal of Psychiatry* **168**, 904–912. doi:10.1176/appi.ajp.2011.10101532
- Kleckner, N. W., and Dingledine, R. (1988). Requirement for glycine in activation of NMDA-receptors expressed in *Xenopus* oocytes. *Science* **241**, 835–837. doi:10.1126/science.2841759
- Komuro, H., and Rakic, P. (1993). Modulation of neuronal migration by NMDA receptors. *Science (New York, N.Y.)* **260**, 95–97. doi:10.1126/science.8096653
- Komuro, H., and Yacubova, E. (2003). Recent advances in cerebellar granule cell migration. *Cellular and Molecular Life Sciences CMLS* **60**, 1084–1098. doi:10.1007/s00018-003-2248-z
- Kong-Beltran, M., Seshagiri, S., Zha, J., Zhu, W., Bhawe, K., Mendoza, N., Holcomb, T., Pujara, K., Stinson, J., Fu, L., Severin, C., Rangell, L., Schwall, R., Amler, L., Wickramasinghe, D., and Yauch, R. (2006). Somatic mutations lead to an oncogenic deletion of met in lung cancer. *Cancer Research* **66**, 283–289. doi:10.1158/0008-5472.CAN-05-2749
- Koochekpour, S., Jeffers, M., Rulong, S., Taylor, G., Klineberg, E., Hudson, E. A., Resau, J. H., and Vande Woude, G. F. (1997). Met and hepatocyte growth factor/scatter factor expression in human gliomas. *Cancer Research* **57**, 5391–5398.
- Korhan, P., Erdal, E., Kandemiş, E., Cokaklı, M., Nart, D., Yılmaz, F., Can, A., and Atabey, N. (2014). Reciprocal activating crosstalk between c-Met and caveolin 1 promotes invasive phenotype in hepatocellular carcinoma. *PloS One* **9**, e105278. doi:10.1371/journal.pone.0105278
- Korhonen, L., Sjöholm, U., Takei, N., Kern, M. A., Schirmacher, P., Castrén, E., and Lindholm, D. (2000). Expression of c-Met in developing rat hippocampus: evidence for HGF as a neurotrophic factor for calbindin D-expressing neurons. *The European Journal of Neuroscience* **12**, 3453–3461. doi:10.1046/j.1460-9568.2000.00260.x

- Krishnaswamy, S., Kanteti, R., Duke-Cohan, J. S., Loganathan, S., Liu, W., Ma, P. C., Sattler, M., Singleton, P. A., Ramnath, N., Innocenti, F., Nicolae, D. L., Ouyang, Z., Liang, J., Minna, J., Kozloff, M. F., Ferguson, M. K., Natarajan, V., Wang, Y.-C., Garcia, J. G. N., Vokes, E. E., and Salgia, R. (2009). Ethnic differences and functional analysis of MET mutations in lung cancer. *Clinical Cancer Research: An Official Journal of the American Association for Cancer Research* **15**, 5714–5723. doi:10.1158/1078-0432.CCR-09-0070
- Krstic, D., Rodriguez, M., and Knuesel, I. (2012). Regulated proteolytic processing of Reelin through interplay of tissue plasminogen activator (tPA), ADAMTS-4, ADAMTS-5, and their modulators. *PLoS One* **7**, e47793. doi:10.1371/journal.pone.0047793
- Krupp, J. J., Vissel, B., Thomas, C. G., Heinemann, S. F., and Westbrook, G. L. (2002). Calcineurin acts via the C-terminus of NR2A to modulate desensitization of NMDA receptors. *Neuropharmacology* **42**, 593–602. doi:10.1016/s0028-3908(02)00031-x
- Krystosek, A., and Seeds, N. W. (1981). Plasminogen activator secretion by granule neurons in cultures of developing cerebellum. Available at: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC349361/> [accessed 2 April 2020]
- Kuiper, J., Van't Hof, A., Otter, M., Biessen, E. A., Rijken, D. C., and van Berkel, T. J. (1996). Interaction of mutants of tissue-type plasminogen activator with liver cells: effect of domain deletions. *Biochemical Journal* **313**, 775–780.
- Kutsuwada, T., Kashiwabuchi, N., Mori, H., Sakimura, K., Kushiya, E., Araki, K., Meguro, H., Masaki, H., Kumanishi, T., and Arakawa, M. (1992). Molecular diversity of the NMDA receptor channel. *Nature* **358**, 36–41. doi:10.1038/358036a0
- Kwak, Y., Kim, S.-I., Park, C.-K., Paek, S. H., Lee, S.-T., and Park, S.-H. (2015). C-MET overexpression and amplification in gliomas. *International Journal of Clinical and Experimental Pathology* **8**, 14932–14938.

## L

- Lamba, D., Bauer, M., Huber, R., Fischer, S., Rudolph, R., Kohnert, U., and Bode, W. (1996). The 2.3 Å crystal structure of the catalytic domain of recombinant two-chain human tissue-type plasminogen activator. *Journal of Molecular Biology* **258**, 117–135. doi:10.1006/jmbi.1996.0238
- Lamballe, F., Genestine, M., Caruso, N., Arce, V., Richelme, S., Helmbacher, F., and Maina, F. (2011). Pool-specific regulation of motor neuron survival by neurotrophic support. *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience* **31**, 11144–11158. doi:10.1523/JNEUROSCI.2198-11.2011
- Lau, L. F., and Huganir, R. L. (1995). Differential tyrosine phosphorylation of N-methyl-D-aspartate receptor subunits. *The Journal of Biological Chemistry* **270**, 20036–20041. doi:10.1074/jbc.270.34.20036
- Laurie, D. J., Putzke, J., Zieglgänsberger, W., Seeburg, P. H., and Tólle, T. R. (1995). The distribution of splice variants of the NMDAR1 subunit mRNA in adult rat brain. *Molecular Brain Research* **32**, 94–108. doi:10.1016/0169-328X(95)00067-3
- Laurie, D. J., and Seeburg, P. H. (1994). Regional and developmental heterogeneity in splicing of the rat brain NMDAR1 mRNA. *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience* **14**, 3180–3194.

- Lavezzari, G., McCallum, J., Dewey, C. M., and Roche, K. W. (2004). Subunit-specific regulation of NMDA receptor endocytosis. *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience* **24**, 6383–6391. doi:10.1523/JNEUROSCI.1890-04.2004
- Lavezzari, G., McCallum, J., Lee, R., and Roche, K. W. (2003). Differential binding of the AP-2 adaptor complex and PSD-95 to the C-terminus of the NMDA receptor subunit NR2B regulates surface expression. *Neuropharmacology* **45**, 729–737. doi:10.1016/S0028-3908(03)00308-3
- Le Behot, A., Gauberti, M., Martinez De Lizarrondo, S., Montagne, A., Lemarchand, E., Repesse, Y., Guillou, S., Denis, C. V., Maubert, E., Orset, C., and Vivien, D. (2014). Gplb $\alpha$ -VWF blockade restores vessel patency by dissolving platelet aggregates formed under very high shear rate in mice. *Blood* **123**, 3354–3363. doi:10.1182/blood-2013-12-543074
- 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. *Journal of Neurochemistry* **101**, 1236–1247. doi:10.1111/j.1471-4159.2007.04417.x
- Lee, S. H., Ko, H. M., Kwon, K. J., Lee, J., Han, S.-H., Han, D. W., Cheong, J. H., Ryu, J. H., and Shin, C. Y. (2014). tPA regulates neurite outgrowth by phosphorylation of LRP5/6 in neural progenitor cells. *Molecular Neurobiology* **49**, 199–215. doi:10.1007/s12035-013-8511-x
- Lefebvre, J., Ancot, F., Leroy, C., Muharram, G., Lemièrre, A., and Tulasne, D. (2012). Met degradation: more than one stone to shoot a receptor down. *The FASEB Journal* **26**, 1387–1399. doi:10.1096/fj.11-197723
- Lekoubou, A., Awoumou, J. J., and Kengne, A. P. (2017). Incidence of seizure in stroke patients treated with recombinant tissue plasminogen activator: A systematic review and meta-analysis. *International Journal of Stroke* **12**, 923–931. doi:10.1177/1747493017729239
- 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 and Differentiation* **23**, 123–131. doi:10.1038/cdd.2015.76
- Leonetti, C., Macrez, R., Pruvost, M., Hommet, Y., Bronsard, J., Fournier, A., Perrigault, M., Machin, I., Vivien, D., Clemente, D., De Castro, F., Maubert, E., and Docagne, F. (2017). Tissue-type plasminogen activator exerts EGF-like chemokinetic effects on oligodendrocytes in white matter (re)myelination. *Molecular Neurodegeneration* **12**, 20. doi:10.1186/s13024-017-0160-5
- Lesept, F., Chevilly, A., Jezequel, J., Ladépêche, L., Macrez, R., Aimable, M., Lenoir, S., Bertrand, T., Rubrecht, L., Galea, P., Lebouvier, L., Petersen, K.-U., Hommet, Y., Maubert, E., Ali, C., Groc, L., and Vivien, D. (2016). Tissue-type plasminogen activator controls neuronal death by raising surface dynamics of extrasynaptic NMDA receptors. *Cell Death & Disease* **7**, e2466. doi:10.1038/cddis.2016.279
- Lester, R. A., Clements, J. D., Westbrook, G. L., and Jahr, C. E. (1990). Channel kinetics determine the time course of NMDA receptor-mediated synaptic currents. *Nature* **346**, 565–567. doi:10.1038/346565a0
- Leung, J. C., Travis, B. R., Verlander, J. W., Sandhu, S. K., Yang, S.-G., Zea, A. H., Weiner, I. D., and Silverstein, D. M. (2002). Expression and developmental regulation of the NMDA receptor subunits in the kidney and cardiovascular system. *American Journal of Physiology. Regulatory, Integrative and Comparative Physiology* **283**, R964–971. doi:10.1152/ajpregu.00629.2001
- Levin, E. G., and Loskutoff, D. J. (1982). Cultured bovine endothelial cells produce both urokinase and tissue-type plasminogen activators. *The Journal of Cell Biology* **94**, 631–636. doi:10.1083/jcb.94.3.631

- Levin, E. G., Santell, L., and Osborn, K. G. (1997). The expression of endothelial tissue plasminogen activator in vivo: a function defined by vessel size and anatomic location. *Journal of Cell Science* **110 ( Pt 2)**, 139–148.
- Levin, E. G., and del Zoppo, G. J. (1994). Localization of tissue plasminogen activator in the endothelium of a limited number of vessels. *The American Journal of Pathology* **144**, 855–861.
- Leys, D., Hommet, Y., Jacquet, C., Moulin, S., Sibon, I., Mas, J.-L., Moulin, T., Giroud, M., Sagnier, S., Cordonnier, C., Medeiros de Bustos, E., Turc, G., Ronzière, T., Bejot, Y., Detante, O., Ouk, T., Mendyk, A.-M., Favrole, P., Zuber, M., Triquenot-Bagan, A., Ozkul-Wermester, O., Montoro, F. M., Lamy, C., Faivre, A., Lebouvier, L., Potey, C., Poli, M., Hénon, H., Renou, P., Dequatre-Ponchelle, N., Bodenant, M., Debruxelles, S., Rossi, C., Bordet, R., Vivien, D., and OPHÉLIE investigators and the STROKAVENIR network (2016). Proportion of single-chain recombinant tissue plasminogen activator and outcome after stroke. *Neurology* **87**, 2416–2426. doi:10.1212/WNL.0000000000003399
- Li, B. S., Sun, M. K., Zhang, L., Takahashi, S., Ma, W., Vinade, L., Kulkarni, A. B., Brady, R. O., and Pant, H. C. (2001). Regulation of NMDA receptors by cyclin-dependent kinase-5. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **98**, 12742–12747. doi:10.1073/pnas.211428098
- Li, J., Yu, L., Gu, X., Ma, Y., Pasqualini, R., Arap, W., Snyder, E. Y., and Sidman, R. L. (2013). Tissue plasminogen activator regulates Purkinje neuron development and survival. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **110**, E2410–2419. doi:10.1073/pnas.1305010110
- Liang, C., Ding, M., Du, F., Cang, J., and Xue, Z. (2016). Tissue plasminogen activator (tPA) attenuates propofol-induced apoptosis in developing hippocampal neurons. *SpringerPlus* **5**, 475. doi:10.1186/s40064-016-2091-y
- Liang, H., and Wang, M. (2020). MET Oncogene in Non-Small Cell Lung Cancer: Mechanism of MET Dysregulation and Agents Targeting the HGF/c-Met Axis. *OncoTargets and Therapy* **13**, 2491–2510. doi:10.2147/OTT.S231257
- Liao, G. Y., Wagner, D. A., Hsu, M. H., and Leonard, J. P. (2001). Evidence for direct protein kinase-C mediated modulation of N-methyl-D-aspartate receptor current. *Molecular Pharmacology* **59**, 960–964. doi:10.1124/mol.59.5.960
- Lichtenstein, P., Carlström, E., Råstam, M., Gillberg, C., and Anckarsäter, H. (2010). The genetics of autism spectrum disorders and related neuropsychiatric disorders in childhood. *The American Journal of Psychiatry* **167**, 1357–1363. doi:10.1176/appi.ajp.2010.10020223
- Lijnen, H. R. (2001). Plasmin and matrix metalloproteinases in vascular remodeling. *Thrombosis and Haemostasis* **86**, 324–333.
- Lim, C. S., and Walikonis, R. S. (2008). Hepatocyte growth factor and c-Met promote dendritic maturation during hippocampal neuron differentiation via the Akt pathway. *Cellular signalling* **20**, 825–835. doi:10.1016/j.cellsig.2007.12.013
- Lin, J. C., Naujokas, M., Zhu, H., Nolet, S., and Park, M. (1998). Intron-exon structure of the MET gene and cloning of an alternatively-spliced Met isoform reveals frequent exon-skipping of a single large internal exon. *Oncogene* **16**, 833–842. doi:10.1038/sj.onc.1201599
- Liot, G., Roussel, B. D., Lebeurrier, N., Benchenane, K., López-Atalaya, J. P., 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. *Journal of Neurochemistry* **98**, 1458–1464. doi:10.1111/j.1471-4159.2006.03982.x
- Lisman, J., Schulman, H., and Cline, H. (2002). The molecular basis of CaMKII function in synaptic and behavioural memory. *Nature Reviews. Neuroscience* **3**, 175–190. doi:10.1038/nrn753
- Liu, D., Cheng, T., Guo, H., Fernández, J. A., Griffin, J. H., Song, X., and Zlokovic, B. V. (2004). Tissue plasminogen activator neurovascular toxicity is controlled by activated protein C. *Nature Medicine* **10**, 1379–1383. doi:10.1038/nm1122
- Liu, S., Zhou, L., Yuan, H., Vieira, M., Sanz-Clemente, A., Badger, J. D., Lu, W., Traynelis, S. F., and Roche, K. W. (2017). A Rare Variant Identified Within the GluN2B C-Terminus in a Patient with Autism Affects NMDA Receptor Surface Expression and Spine Density. *Journal of Neuroscience* **37**, 4093–4102. doi:10.1523/JNEUROSCI.0827-16.2017
- Liu, Y., Zhang, Q., Ren, C., Ding, Y., Jin, G., Hu, Z., Xu, Y., and Shen, H. (2012). A germline variant N375S in MET and gastric cancer susceptibility in a Chinese population. *Journal of Biomedical Research* **26**, 315–318. doi:10.7555/JBR.26.20110087
- Lock, L. S., Royal, I., Naujokas, M. A., and Park, M. (2000). Identification of an atypical Grb2 carboxyl-terminal SH3 domain binding site in Gab docking proteins reveals Grb2-dependent and -independent recruitment of Gab1 to receptor tyrosine kinases. *The Journal of Biological Chemistry* **275**, 31536–31545. doi:10.1074/jbc.M003597200
- Lockwood, C. J., and Schatz, F. (1996). A biological model for the regulation of peri-implantational hemostasis and menstruation. *Journal of the Society for Gynecologic Investigation* **3**, 159–165.
- Logallo, N., Novotny, V., Assmus, J., Kvistad, C. E., Altheheld, L., Rønning, O. M., Thommessen, B., Amthor, K.-F., Ihle-Hansen, H., Kurz, M., Tobro, H., Kaur, K., Stankiewicz, M., Carlsson, M., Morsund, Å., Idicula, T., Aamodt, A. H., Lund, C., Næss, H., Waje-Andreassen, U., and Thomassen, L. (2017). Tenecteplase versus alteplase for management of acute ischaemic stroke (NOR-TEST): a phase 3, randomised, open-label, blinded endpoint trial. *The Lancet. Neurology* **16**, 781–788. doi:10.1016/S1474-4422(17)30253-3
- Lokker, N. A., Mark, M. R., Luis, E. A., Bennett, G. L., Robbins, K. A., Baker, J. B., and Godowski, P. J. (1992). Structure-function analysis of hepatocyte growth factor: identification of variants that lack mitogenic activity yet retain high affinity receptor binding. *The EMBO journal* **11**, 2503–2510.
- Lolkema, M. P., Bohets, H. H., Arkenau, H.-T., Lampo, A., Barale, E., de Jonge, M. J. A., van Doorn, L., Hellemans, P., de Bono, J. S., and Eskens, F. A. L. M. (2015). The c-Met Tyrosine Kinase Inhibitor JNJ-38877605 Causes Renal Toxicity through Species-Specific Insoluble Metabolite Formation. *Clinical Cancer Research: An Official Journal of the American Association for Cancer Research* **21**, 2297–2304. doi:10.1158/1078-0432.CCR-14-3258
- Longati, P., Bardelli, A., Ponzetto, C., Naldini, L., and Comoglio, P. M. (1994). Tyrosines1234-1235 are critical for activation of the tyrosine kinase encoded by the MET proto-oncogene (HGF receptor). *Oncogene* **9**, 49–57.
- Lopez-Atalaya, J. P., Roussel, B. D., Levrat, D., Parcq, J., Nicole, O., Hommet, Y., Benchenane, K., Castel, H., Leprince, J., To Van, D., Bureau, R., Rault, S., Vaudry, H., Petersen, K.-U., Santos, J. S. O., Ali, C., and Vivien, D. (2008). Toward safer thrombolytic agents in stroke: molecular requirements for NMDA receptor-mediated neurotoxicity. *Journal of Cerebral Blood Flow and Metabolism: Official Journal of the International Society of Cerebral Blood Flow and Metabolism* **28**, 1212–1221. doi:10.1038/jcbfm.2008.14

- Louessard, M., Bardou, I., Lemarchand, E., Thiebaut, A. M., Parcq, J., Leprince, J., Terrisse, A., Carraro, V., Fafournoux, P., Bruhat, A., Orset, C., Vivien, D., Ali, C., and Roussel, B. D. (2017). Activation of cell surface GRP78 decreases endoplasmic reticulum stress and neuronal death. *Cell Death and Differentiation* **24**, 1518–1529. doi:10.1038/cdd.2017.35
- Louessard, M., Lacroix, A., Martineau, M., Mondielli, G., Montagne, A., Lesept, F., Lambolez, B., Cauli, B., Mothet, J.-P., Vivien, D., and Maubert, E. (2016). Tissue Plasminogen Activator Expression Is Restricted to Subsets of Excitatory Pyramidal Glutamatergic Neurons. *Molecular Neurobiology* **53**, 5000–5012. doi:10.1007/s12035-015-9432-7
- Lucas, D. R., and Newhouse, J. P. (1957). The toxic effect of sodium L-glutamate on the inner layers of the retina. *A.M.A. Archives of Ophthalmology* **58**, 193–201. doi:10.1001/archophth.1957.00940010205006
- Lucore, C., Fry, E., Nachowiak, D., and Sobel, B. (1988). Biochemical determinants of clearance of tissue-type plasminogen activator from the circulation. - PubMed - NCBI. Available at: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3127078> [accessed 25 March 2020]
- Lüthi, A., Van der Putten, H., Botteri, F. M., Mansuy, I. M., Meins, M., Frey, U., Sansig, G., Portet, C., Schmutz, M., Schröder, M., Nitsch, C., Laurent, J. P., and Monard, D. (1997). Endogenous serine protease inhibitor modulates epileptic activity and hippocampal long-term potentiation. *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience* **17**, 4688–4699.
- Lutterbach, B., Zeng, Q., Davis, L. J., Hatch, H., Hang, G., Kohl, N. E., Gibbs, J. B., and Pan, B.-S. (2007). Lung cancer cell lines harboring MET gene amplification are dependent on Met for growth and survival. *Cancer Research* **67**, 2081–2088. doi:10.1158/0008-5472.CAN-06-3495
- Lynch, G., Larson, J., Kelso, S., Barrionuevo, G., and Schottler, F. (1983). Intracellular injections of EGTA block induction of hippocampal long-term potentiation. *Nature* **305**, 719–721. doi:10.1038/305719a0
- M**
- MacDermott, A. B., Mayer, M. L., Westbrook, G. L., Smith, S. J., and Barker, J. L. (1986). NMDA-receptor activation increases cytoplasmic calcium concentration in cultured spinal cord neurones. *Nature* **321**, 519–522. doi:10.1038/321519a0
- Macrez, R., Obiang, P., Gauberti, M., Roussel, B., Baron, A., Parcq, J., Cassé, F., Hommet, Y., Orset, C., Agin, V., Bezin, L., Berrocoso, T. G., Petersen, K. U., Montaner, J., Maubert, E., Vivien, D., and Ali, C. (2011). Antibodies preventing the interaction of tissue-type plasminogen activator with N-methyl-D-aspartate receptors reduce stroke damages and extend the therapeutic window of thrombolysis. *Stroke* **42**, 2315–2322. doi:10.1161/STROKEAHA.110.606293
- Macrez, R., Ortega, M. C., Bardou, I., Mehra, A., Fournier, A., Van der Pol, S. M. A., Haelewyn, B., Maubert, E., Lesept, F., Chevilly, A., de Castro, F., De Vries, H. E., Vivien, D., Clemente, D., and Docagne, F. (2016). Neuroendothelial NMDA receptors as therapeutic targets in experimental autoimmune encephalomyelitis. *Brain* **139**, 2406–2419. doi:10.1093/brain/aww172
- Madani, R., Hulo, S., Toni, N., Madani, H., Steimer, T., Muller, D., and Vassalli, J. D. (1999). Enhanced hippocampal long-term potentiation and learning by increased neuronal expression of tissue-type plasminogen activator in transgenic mice. *The EMBO journal* **18**, 3007–3012. doi:10.1093/emboj/18.11.3007
- Madani, R., Kozlov, S., Akhmedov, A., Cinelli, P., Kinter, J., Lipp, H.-P., Sonderegger, P., and Wolfer, D. P. (2003). Impaired explorative behavior and neophobia in genetically modified mice lacking or

- overexpressing the extracellular serine protease inhibitor neuroserpin. *Molecular and Cellular Neurosciences* **23**, 473–494. doi:10.1016/s1044-7431(03)00077-0
- Madry, C., Mesic, I., Betz, H., and Laube, B. (2007). The N-terminal domains of both NR1 and NR2 subunits determine allosteric Zn<sup>2+</sup> inhibition and glycine affinity of N-methyl-D-aspartate receptors. *Molecular Pharmacology* **72**, 1535–1544. doi:10.1124/mol.107.040071
- Maenner, M. J. (2020). Prevalence of Autism Spectrum Disorder Among Children Aged 8 Years — Autism and Developmental Disabilities Monitoring Network, 11 Sites, United States, 2016. *MMWR. Surveillance Summaries* **69**. doi:10.15585/mmwr.ss6904a1
- Maina, F., Casagrande, F., Audero, E., Simeone, A., Comoglio, P. M., Klein, R., and Ponzetto, C. (1996a). Uncoupling of Grb2 from the Met receptor in vivo reveals complex roles in muscle development. *Cell* **87**, 531–542. doi:10.1016/s0092-8674(00)81372-0
- Maina, F., Casagrande, F., Audero, E., Simeone, A., Comoglio, P. M., Klein, R., and Ponzetto, C. (1996b). Uncoupling of Grb2 from the Met receptor in vivo reveals complex roles in muscle development. *Cell* **87**, 531–542. doi:10.1016/s0092-8674(00)81372-0
- Maina, F., Hilton, M. C., Ponzetto, C., Davies, A. M., and Klein, R. (1997). Met receptor signaling is required for sensory nerve development and HGF promotes axonal growth and survival of sensory neurons. *Genes & Development* **11**, 3341–3350. doi:10.1101/gad.11.24.3341
- Maina, F., and Klein, R. (1999). Hepatocyte growth factor, a versatile signal for developing neurons. *Nature Neuroscience* **2**, 213–217. doi:10.1038/6310
- Malenka, R. C., and Bear, M. F. (2004). LTP and LTD: an embarrassment of riches. *Neuron* **44**, 5–21. doi:10.1016/j.neuron.2004.09.012
- Malik, S. M., Maher, V. E., Bijwaard, K. E., Becker, R. L., Zhang, L., Tang, S. W., Song, P., Liu, Q., Marathe, A., Gehrke, B., Helms, W., Hanner, D., Justice, R., and Pazdur, R. (2014). U.S. Food and Drug Administration approval: crizotinib for treatment of advanced or metastatic non-small cell lung cancer that is anaplastic lymphoma kinase positive. *Clinical Cancer Research: An Official Journal of the American Association for Cancer Research* **20**, 2029–2034. doi:10.1158/1078-0432.CCR-13-3077
- Maroun, C. R., Naujokas, M. A., Holgado-Madruga, M., Wong, A. J., and Park, M. (2000). The tyrosine phosphatase SHP-2 is required for sustained activation of extracellular signal-regulated kinase and epithelial morphogenesis downstream from the met receptor tyrosine kinase. *Molecular and Cellular Biology* **20**, 8513–8525. doi:10.1128/mcb.20.22.8513-8525.2000
- Mars, W. M., Zarnegar, R., and Michalopoulos, G. K. (1993). Activation of hepatocyte growth factor by the plasminogen activators uPA and tPA. *The American Journal of Pathology* **143**, 949–958.
- Martin, A. M., Kuhlmann, C., Trossbach, S., Jaeger, S., Waldron, E., Roebroek, A., Luhmann, H. J., Laatsch, A., Weggen, S., Lessmann, V., and Pietrzik, C. U. (2008). The functional role of the second NPXY motif of the LRP1 beta-chain in tissue-type plasminogen activator-mediated activation of N-methyl-D-aspartate receptors. *The Journal of Biological Chemistry* **283**, 12004–12013. doi:10.1074/jbc.M707607200
- Martinez de Lizarrondo, S., Gakuba, C., Herbig, B. A., Repessé, Y., Ali, C., Denis, C. V., Lenting, P. J., Touzé, E., Diamond, S. L., Vivien, D., and Gauberti, M. (2017). Potent Thrombolytic Effect of N-Acetylcysteine on Arterial Thrombi. *Circulation* **136**, 646–660. doi:10.1161/CIRCULATIONAHA.117.027290



- Mashkina, A. P., Cizkova, D., Vanicky, I., and Boldyrev, A. A. (2010). NMDA receptors are expressed in lymphocytes activated both in vitro and in vivo. *Cellular and Molecular Neurobiology* **30**, 901–907. doi:10.1007/s10571-010-9519-7
- Massey, P. V., Johnson, B. E., Moulton, P. R., Auberson, Y. P., Brown, M. W., Molnar, E., Collingridge, G. L., and Bashir, Z. I. (2004). Differential roles of NR2A and NR2B-containing NMDA receptors in cortical long-term potentiation and long-term depression. *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience* **24**, 7821–7828. doi:10.1523/JNEUROSCI.1697-04.2004
- Matsui, T., Sekiguchi, M., Hashimoto, A., Tomita, U., Nishikawa, T., and Wada, K. (1995). Functional comparison of D-serine and glycine in rodents: the effect on cloned NMDA receptors and the extracellular concentration. *Journal of Neurochemistry* **65**, 454–458. doi:10.1046/j.1471-4159.1995.65010454.x
- Matys, T., Pawlak, R., Matys, E., Pavlides, C., McEwen, B. S., and Strickland, S. (2004). Tissue plasminogen activator promotes the effects of corticotropin-releasing factor on the amygdala and anxiety-like behavior. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **101**, 16345–16350. doi:10.1073/pnas.0407355101
- Maulik, G., Madhiwala, P., Brooks, S., Ma, P. C., Kijima, T., Tibaldi, E. V., Schaefer, E., Parmar, K., and Salgia, R. (2002). Activated c-Met signals through PI3K with dramatic effects on cytoskeletal functions in small cell lung cancer. *Journal of Cellular and Molecular Medicine* **6**, 539–553. doi:10.1111/j.1582-4934.2002.tb00453.x
- Mayer, M. L. (2006). Glutamate receptors at atomic resolution. *Nature* **440**, 456–462. doi:10.1038/nature04709
- Mayer, M. L., Westbrook, G. L., and Guthrie, P. B. (1984). Voltage-dependent block by Mg<sup>2+</sup> of NMDA responses in spinal cord neurones. *Nature* **309**, 261–263. doi:10.1038/309261a0
- McKay, M. M., and Morrison, D. K. (2007). Integrating signals from RTKs to ERK/MAPK. *Oncogene* **26**, 3113–3121. doi:10.1038/sj.onc.1210394
- Meins, M., Piosik, P., Schaeren-Wiemers, N., Franzoni, S., Troncoso, E., Kiss, J. Z., Brösamle, C., Schwab, M. E., Molnár, Z., and Monard, D. (2001). Progressive neuronal and motor dysfunction in mice overexpressing the serine protease inhibitor protease nexin-1 in postmitotic neurons. *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience* **21**, 8830–8841.
- Merchant, M., Ma, X., Maun, H. R., Zheng, Z., Peng, J., Romero, M., Huang, A., Yang, N., Nishimura, M., Greve, J., Santell, L., Zhang, Y.-W., Su, Y., Kaufman, D. W., Billeci, K. L., Mai, E., Moffat, B., Lim, A., Duenas, E. T., Phillips, H. S., Xiang, H., Young, J. C., Vande Woude, G. F., Dennis, M. S., Reilly, D. E., Schwall, R. H., Starovasnik, M. A., Lazarus, R. A., and Yansura, D. G. (2013). Monovalent antibody design and mechanism of action of onartuzumab, a MET antagonist with anti-tumor activity as a therapeutic agent. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **110**, E2987–2996. doi:10.1073/pnas.1302725110
- Miles, J. H. (2011). Autism spectrum disorders—A genetics review. *Genetics in Medicine* **13**, 278–294. doi:10.1097/GIM.0b013e3181ff67ba
- Mistry, E. A., Mistry, A. M., Nakawah, M. O., Chitale, R. V., James, R. F., Volpi, J. J., and Fusco, M. R. (2017). Mechanical Thrombectomy Outcomes With and Without Intravenous Thrombolysis in Stroke Patients: A Meta-Analysis. *Stroke* **48**, 2450–2456. doi:10.1161/STROKEAHA.117.017320

- Moghaddam, B., and Javitt, D. (2012). From revolution to evolution: the glutamate hypothesis of schizophrenia and its implication for treatment. *Neuropsychopharmacology: Official Publication of the American College of Neuropsychopharmacology* **37**, 4–15. doi:10.1038/npp.2011.181
- Mok, T. S. K., Geater, S. L., Su, W.-C., Tan, E.-H., Yang, J. C.-H., Chang, G.-C., Han, M., Komarnitsky, P., Payumo, F., Garrus, J. E., Close, S., and Park, K. (2016). A Randomized Phase 2 Study Comparing the Combination of Ficlazumab and Gefitinib with Gefitinib Alone in Asian Patients with Advanced Stage Pulmonary Adenocarcinoma. *Journal of Thoracic Oncology: Official Publication of the International Association for the Study of Lung Cancer* **11**, 1736–1744. doi:10.1016/j.jtho.2016.05.038
- Mokin, M., Ansari, S. A., McTaggart, R. A., Bulsara, K. R., Goyal, M., Chen, M., Fraser, J. F., and Society of NeuroInterventional Surgery (2019). Indications for thrombectomy in acute ischemic stroke from emergent large vessel occlusion (ELVO): report of the SNIS Standards and Guidelines Committee. *Journal of Neurointerventional Surgery* **11**, 215–220. doi:10.1136/neurintsurg-2018-014640
- Montagne, R., Furlan, A., Kherrouche, Z., and Tulasne, D. (2014). [Thirty years of Met receptor research: from the discovery of an oncogene to the development of targeted therapies]. *Medecine Sciences: M/S* **30**, 864–873. doi:10.1051/medsci/20143010013
- Montagner, A., Yart, A., Dance, M., Perret, B., Salles, J.-P., and Raynal, P. (2005). A novel role for Gab1 and SHP2 in epidermal growth factor-induced Ras activation. *The Journal of Biological Chemistry* **280**, 5350–5360. doi:10.1074/jbc.M410012200
- Montaner, J., Alvarez-Sabín, J., Molina, C. A., Anglés, A., Abilleira, S., Arenillas, J., and Monasterio, J. (2001). Matrix metalloproteinase expression is related to hemorrhagic transformation after cardioembolic stroke. *Stroke* **32**, 2762–2767. doi:10.1161/hs1201.99512
- Mony, L., Kew, J. N. C., Gunthorpe, M. J., and Paoletti, P. (2009). Allosteric modulators of NR2B-containing NMDA receptors: molecular mechanisms and therapeutic potential. *British Journal of Pharmacology* **157**, 1301–1317. doi:10.1111/j.1476-5381.2009.00304.x
- Monyer, H., Burnashev, N., Laurie, D. J., Sakmann, B., and Seeburg, P. H. (1994). Developmental and regional expression in the rat brain and functional properties of four NMDA receptors. *Neuron* **12**, 529–540. doi:10.1016/0896-6273(94)90210-0
- Monyer, H., Sprengel, R., Schoepfer, R., Herb, A., Higuchi, M., Lomeli, H., Burnashev, N., Sakmann, B., and Seeburg, P. H. (1992). Heteromeric NMDA receptors: molecular and functional distinction of subtypes. *Science (New York, N.Y.)* **256**, 1217–1221. doi:10.1126/science.256.5060.1217
- Morgagni, J. B. (1761). 'de sedibus, et causis Morborum per Anatomen Indagatis' Venezia:Remondini.
- Moriyoshi, K., Masu, M., Ishii, T., Shigemoto, R., Mizuno, N., and Nakanishi, S. (1991). Molecular cloning and characterization of the rat NMDA receptor. *Nature* **354**, 31–37. doi:10.1038/354031a0
- Moy, S. S., Nadler, J. J., Perez, A., Barbaro, R. P., Johns, J. M., Magnuson, T. R., Piven, J., and Crawley, J. N. (2004). Sociability and preference for social novelty in five inbred strains: an approach to assess autistic-like behavior in mice. *Genes, Brain, and Behavior* **3**, 287–302. doi:10.1111/j.1601-1848.2004.00076.x
- Myers, R. A., Casals, F., Gauthier, J., Hamdan, F. F., Keebler, J., Boyko, A. R., Bustamante, C. D., Piton, A. M., Spiegelman, D., Henrion, E., Zilversmit, M., Hussin, J., Quinlan, J., Yang, Y., Lafrenière, R. G., Griffing, A. R., Stone, E. A., Rouleau, G. A., and Awadalla, P. (2011). A Population Genetic Approach to Mapping Neurological Disorder Genes Using Deep Resequencing. *PLoS Genetics* **7**. doi:10.1371/journal.pgen.1001318



- Nabavi, S., Fox, R., Proulx, C. D., Lin, J. Y., Tsien, R. Y., and Malinow, R. (2014). Engineering a memory with LTD and LTP. *Nature* **511**, 348–352. doi:10.1038/nature13294
- Nacher, J., and McEwen, B. S. (2006). The role of N-methyl-D-aspartate receptors in neurogenesis. *Hippocampus* **16**, 267–270. doi:10.1002/hipo.20160
- Nadler, J. J., Moy, S. S., Dold, G., Trang, D., Simmons, N., Perez, A., Young, N. B., Barbaro, R. P., Piven, J., Magnuson, T. R., and Crawley, J. N. (2004). Automated apparatus for quantitation of social approach behaviors in mice. *Genes, Brain, and Behavior* **3**, 303–314. doi:10.1111/j.1601-183X.2004.00071.x
- Nagaoka, M. R., Strital, E., Kouyoumdjian, M., and Borges, D. R. (2002). Participation of a galectin-dependent mechanism in the hepatic clearance of tissue-type plasminogen activator and plasma kallikrein. *Thrombosis Research* **108**, 257–262. doi:10.1016/s0049-3848(02)00393-6
- Nakamura, T., Nawa, K., and Ichihara, A. (1984). Partial purification and characterization of hepatocyte growth factor from serum of hepatectomized rats. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **122**, 1450–1459. doi:10.1016/0006-291x(84)91253-1
- Nakazawa, T., Komai, S., Tezuka, T., Hisatsune, C., Umemori, H., Semba, K., Mishina, M., Manabe, T., and Yamamoto, T. (2001). Characterization of Fyn-mediated tyrosine phosphorylation sites on GluR epsilon 2 (NR2B) subunit of the N-methyl-D-aspartate receptor. *The Journal of Biological Chemistry* **276**, 693–699. doi:10.1074/jbc.M008085200
- Nakopoulou, L., Gakiopoulou, H., Keramopoulos, A., Giannopoulou, I., Athanassiadou, P., Mavrommatis, J., and Davaris, P. S. (2000). c-met tyrosine kinase receptor expression is associated with abnormal beta-catenin expression and favourable prognostic factors in invasive breast carcinoma. *Histopathology* **36**, 313–325. doi:10.1046/j.1365-2559.2000.00847.x
- Naldini, L., Tamagnone, L., Vigna, E., Sachs, M., Hartmann, G., Birchmeier, W., Daikuhara, Y., Tsubouchi, H., Blasi, F., and Comoglio, P. M. (1992). Extracellular proteolytic cleavage by urokinase is required for activation of hepatocyte growth factor/scatter factor. *The EMBO Journal* **11**, 4825–4833.
- Naldini, L., Weidner, K. M., Vigna, E., Gaudino, G., Bardelli, A., Ponzetto, C., Narsimhan, R. P., Hartmann, G., Zarnegar, R., and Michalopoulos, G. K. (1991). Scatter factor and hepatocyte growth factor are indistinguishable ligands for the MET receptor. *The EMBO journal* **10**, 2867–2878.
- Natali, P. G., Prat, M., Nicotra, M. R., Bigotti, A., Olivero, M., Comoglio, P. M., and Di Renzo, M. F. (1996). Overexpression of the met/HGF receptor in renal cell carcinomas. *International Journal of Cancer* **69**, 212–217. doi:10.1002/(SICI)1097-0215(19960621)69:3<212::AID-IJC11>3.0.CO;2-9
- Ndountse, L. T., and Chan, H. M. (2009). Role of N-methyl-D-aspartate receptors in polychlorinated biphenyl mediated neurotoxicity. *Toxicology Letters* **184**, 50–55. doi:10.1016/j.toxlet.2008.10.013
- Nicole, O., Docagne, F., Ali, C., Margail, I., Carmeliet, P., MacKenzie, E. T., Vivien, D., and Buisson, A. (2001). The proteolytic activity of tissue-plasminogen activator enhances NMDA receptor-mediated signaling. *Nature Medicine* **7**, 59–64. doi:10.1038/83358
- Nicoll, R. A. (2017). A Brief History of Long-Term Potentiation. *Neuron* **93**, 281–290. doi:10.1016/j.neuron.2016.12.015

- NINDS (1995). Tissue plasminogen activator for acute ischemic stroke. *The New England Journal of Medicine* **333**, 1581–1587. doi:10.1056/NEJM199512143332401
- Nishi, M., Hinds, H., Lu, H. P., Kawata, M., and Hayashi, Y. (2001). Motoneuron-specific expression of NR3B, a novel NMDA-type glutamate receptor subunit that works in a dominant-negative manner. *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience* **21**, RC185.
- Nong, Y., Huang, Y.-Q., Ju, W., Kalia, L. V., Ahmadian, G., Wang, Y. T., and Salter, M. W. (2003). Glycine binding primes NMDA receptor internalization. *Nature* **422**, 302–307. doi:10.1038/nature01497
- Noorman, F., Barrett-Bergshoeff, M. M., Bos, R., Biessen, E. A. L., Barbé, E., Emeis, J. J., and Rijken, D. C. (1998). The mannose receptor, localization and role in the clearance of tissue-type plasminogen activator. *Fibrinolysis and Proteolysis* **12**, 241–250. doi:10.1016/S0268-9499(98)80017-9
- Nowak, L., Bregestovski, P., Ascher, P., Herbet, A., and Prochiantz, A. (1984). Magnesium gates glutamate-activated channels in mouse central neurones. *Nature* **307**, 462–465. doi:10.1038/307462a0

## O

- Obiang, P., Macrez, R., Jullienne, A., Bertrand, T., Lesept, F., Ali, C., Maubert, E., Vivien, D., and Agin, V. (2012). GluN2D subunit-containing NMDA receptors control tissue plasminogen activator-mediated spatial memory. *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience* **32**, 12726–12734. doi:10.1523/JNEUROSCI.6202-11.2012
- Ohno, H., Stewart, J., Fournier, M. C., Bosshart, H., Rhee, I., Miyatake, S., Saito, T., Gallusser, A., Kirchhausen, T., and Bonifacino, J. S. (1995). Interaction of tyrosine-based sorting signals with clathrin-associated proteins. *Science (New York, N.Y.)* **269**, 1872–1875. doi:10.1126/science.7569928
- Olney, J. W. (1969). Brain lesions, obesity, and other disturbances in mice treated with monosodium glutamate. *Science (New York, N.Y.)* **164**, 719–721. doi:10.1126/science.164.3880.719
- Omkumar, R. V., Kiely, M. J., Rosenstein, A. J., Min, K. T., and Kennedy, M. B. (1996). Identification of a phosphorylation site for calcium/calmodulin-dependent protein kinase II in the NR2B subunit of the N-methyl-D-aspartate receptor. *The Journal of Biological Chemistry* **271**, 31670–31678. doi:10.1074/jbc.271.49.31670
- Ong, S. H., Dilworth, S., Hauck-Schmalenberger, I., Pawson, T., and Kiefer, F. (2001). ShcA and Grb2 mediate polyoma middle T antigen-induced endothelial transformation and Gab1 tyrosine phosphorylation. *The EMBO journal* **20**, 6327–6336. doi:10.1093/emboj/20.22.6327
- O’Roak, B. J., Vives, L., Fu, W., Egertson, J. D., Stanaway, I. B., Phelps, I. G., Carvill, G., Kumar, A., Lee, C., Ankenman, K., Munson, J., Hiatt, J. B., Turner, E. H., Levy, R., O’Day, D. R., Krumm, N., Coe, B. P., Martin, B. K., Borenstein, E., Nickerson, D. A., Mefford, H. C., Doherty, D., Akey, J. M., Bernier, R., Eichler, E. E., and Shendure, J. (2012a). Multiplex targeted sequencing identifies recurrently mutated genes in autism spectrum disorders. *Science (New York, N.Y.)* **338**, 1619–1622. doi:10.1126/science.1227764
- O’Roak, B. J., Vives, L., Girirajan, S., Karakoc, E., Krumm, N., Coe, B. P., Levy, R., Ko, A., Lee, C., Smith, J. D., Turner, E. H., Stanaway, I. B., Vernot, B., Malig, M., Baker, C., Reilly, B., Akey, J. M., Borenstein, E., Rieder, M. J., Nickerson, D. A., Bernier, R., Shendure, J., and Eichler, E. E. (2012b). Sporadic autism exomes reveal a highly interconnected protein network of de novo mutations. *Nature* **485**, 246–250. doi:10.1038/nature10989

- Orth, K., Madison, E. L., Gething, M. J., Sambrook, J. F., and Herz, J. (1992). Complexes of tissue-type plasminogen activator and its serpin inhibitor plasminogen-activator inhibitor type 1 are internalized by means of the low density lipoprotein receptor-related protein/alpha 2-macroglobulin receptor. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **89**, 7422–7426. doi:10.1073/pnas.89.16.7422
- Ortiz-Zapater, E., Peiró, S., Roda, O., Corominas, J. M., Aguilar, S., Ampurdanés, C., Real, F. X., and 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. *The American Journal of Pathology* **170**, 1573–1584. doi:10.2353/ajpath.2007.060850
- Österlund, B., Andersson, B., Häggmark, S., Jern, C., Johansson, G., Seeman-Lodding, H., and Biber, B. (2002). Myocardial ischemia induces coronary t-PA release in the pig. *Acta Anaesthesiologica Scandinavica* **46**, 271–278. doi:10.1034/j.1399-6576.2002.t01-1-460308.x
- Osterwalder, T., Contartese, J., Stoeckli, E. T., Kuhn, T. B., and Sonderegger, P. (1996). Neuroserpin, an axonally secreted serine protease inhibitor. *The EMBO journal* **15**, 2944–2953.
- Ostman, A., Hellberg, C., and Böhmer, F. D. (2006). Protein-tyrosine phosphatases and cancer. *Nature Reviews. Cancer* **6**, 307–320. doi:10.1038/nrc1837
- Owen, K. A., Qiu, D., Alves, J., Schumacher, A. M., Kilpatrick, L. M., Li, J., Harris, J. L., and Ellis, V. (2010). Pericellular activation of hepatocyte growth factor by the transmembrane serine proteases matriptase and hepsin, but not by the membrane-associated protease uPA. *The Biochemical Journal* **426**, 219–228. doi:10.1042/BJ20091448

## P

- Pachernegg, S., Strutz-Seeböhm, N., and Hollmann, M. (2012). GluN3 subunit-containing NMDA receptors: not just one-trick ponies. *Trends in Neurosciences* **35**, 240–249. doi:10.1016/j.tins.2011.11.010
- Palka, H. L., Park, M., and Tonks, N. K. (2003). Hepatocyte growth factor receptor tyrosine kinase met is a substrate of the receptor protein-tyrosine phosphatase DEP-1. *The Journal of Biological Chemistry* **278**, 5728–5735. doi:10.1074/jbc.M210656200
- Pan, Y., Chen, J., Guo, H., Ou, J., Peng, Y., Liu, Q., Shen, Y., Shi, L., Liu, Y., Xiong, Z., Zhu, T., Luo, S., Hu, Z., Zhao, J., and Xia, K. (2015). Association of genetic variants of GRIN2B with autism. *Scientific Reports* **5**, 1–5. doi:10.1038/srep08296
- Pang, P. T., and Lu, B. (2004). Regulation of late-phase LTP and long-term memory in normal and aging hippocampus: role of secreted proteins tPA and BDNF. *Ageing Research Reviews* **3**, 407–430. doi:10.1016/j.arr.2004.07.002
- Paoletti, P. (2011). Molecular basis of NMDA receptor functional diversity. *The European Journal of Neuroscience* **33**, 1351–1365. doi:10.1111/j.1460-9568.2011.07628.x
- Paoletti, P., Bellone, C., and Zhou, Q. (2013). NMDA receptor subunit diversity: impact on receptor properties, synaptic plasticity and disease. *Nature Reviews. Neuroscience* **14**, 383–400. doi:10.1038/nrn3504
- Paoletti, P., and Neyton, J. (2007). NMDA receptor subunits: function and pharmacology. *Current Opinion in Pharmacology* **7**, 39–47. doi:10.1016/j.coph.2006.08.011

- Parachoniak, C. A., Luo, Y., Abella, J. V., Keen, J. H., and Park, M. (2011). GGA3 functions as a switch to promote Met receptor recycling, essential for sustained ERK and cell migration. *Developmental Cell* **20**, 751–763. doi:10.1016/j.devcel.2011.05.007
- Parcq, J., Bertrand, T., Baron, A. F., Hommet, Y., Anglès-Cano, E., and Vivien, D. (2013). Molecular requirements for safer generation of thrombolytics by bioengineering the tissue-type plasminogen activator A chain. *Journal of thrombosis and haemostasis: JTH* **11**, 539–546. doi:10.1111/jth.12128
- Parcq, J., Bertrand, T., Montagne, A., Baron, A. F., Macrez, R., Billard, J. M., Briens, A., Hommet, Y., Wu, J., Yepes, M., Lijnen, H. R., Dutar, P., Anglès-Cano, E., and 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 and Differentiation* **19**, 1983–1991. doi:10.1038/cdd.2012.86
- Park, M., Dean, M., Cooper, C. S., Schmidt, M., O'Brien, S. J., Blair, D. G., and Vande Woude, G. F. (1986). Mechanism of met oncogene activation. *Cell* **45**, 895–904. doi:10.1016/0092-8674(86)90564-7
- Parmer, R. J., Mahata, M., Mahata, S., Sebald, M. T., O'Connor, D. T., and Miles, L. A. (1997). Tissue plasminogen activator (t-PA) is targeted to the regulated secretory pathway. Catecholamine storage vesicles as a reservoir for the rapid release of t-PA. *The Journal of Biological Chemistry* **272**, 1976–1982. doi:10.1074/jbc.272.3.1976
- Pasquet, N., Douceau, S., Naveau, M., Lesept, F., Louessard, M., Lebouvier, L., Hommet, Y., Vivien, D., and Bardou, I. (2019). Tissue-Type Plasminogen Activator Controlled Corticogenesis Through a Mechanism Dependent of NMDA Receptors Expressed on Radial Glial Cells. *Cerebral Cortex (New York, N.Y.: 1991)* **29**, 2482–2498. doi:10.1093/cercor/bhy119
- Paumelle, R., Tulashe, D., Kherrouche, Z., Plaza, S., Leroy, C., Reveneau, S., Vandebunder, B., and Fafeur, V. (2002). Hepatocyte growth factor/scatter factor activates the ETS1 transcription factor by a RAS-RAF-MEK-ERK signaling pathway. *Oncogene* **21**, 2309–2319. doi:10.1038/sj.onc.1205297
- Pawlak, R., Magarinos, A. M., Melchor, J., McEwen, B., and Strickland, S. (2003). Tissue plasminogen activator in the amygdala is critical for stress-induced anxiety-like behavior. *Nature Neuroscience* **6**, 168–174. doi:10.1038/nn998
- Pawlak, R., Melchor, J. P., Matys, T., Skrzypiec, A. E., and Strickland, S. (2005). Ethanol-withdrawal seizures are controlled by tissue plasminogen activator via modulation of NR2B-containing NMDA receptors. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **102**, 443–448. doi:10.1073/pnas.0406454102
- Pawlak, R., Nagai, N., Urano, T., Napiorkowska-Pawlak, D., Ihara, H., Takada, Y., Collen, D., and Takada, A. (2002). Rapid, specific and active site-catalyzed effect of tissue-plasminogen activator on hippocampus-dependent learning in mice. *Neuroscience* **113**, 995–1001. doi:10.1016/s0306-4522(02)00166-5
- Pellicci, G., Giordano, S., Zhen, Z., Salcini, A. E., Lanfrancone, L., Bardelli, A., Panayotou, G., Waterfield, M. D., Ponzetto, C., and Pellicci, P. G. (1995). The mitogenic and mitogenic responses to HGF are amplified by the Shc adaptor protein. *Oncogene* **10**, 1631–1638.
- Peng, Y., Huentelman, M., Smith, C., and Qiu, S. (2013). Chapter Five - MET Receptor Tyrosine Kinase as an Autism Genetic Risk Factor. In 'International Review of Neurobiology'. (Ed G. Konopka.) *Neurobiology of Autism*. pp. 135–165. (Academic Press.) doi:10.1016/B978-0-12-418700-9.00005-8

- Pennica, D., Holmes, W. E., Kohr, W. J., Harkins, R. N., Vehar, G. A., Ward, C. A., Bennett, W. F., Yelverton, E., Seeburg, P. H., Heyneker, H. L., Goeddel, D. V., and Collen, D. (1983). Cloning and expression of human tissue-type plasminogen activator cDNA in *E. coli*. *Nature* **301**, 214–221. doi:10.1038/301214a0
- Pérez-Otaño, I., Luján, R., Tavalin, S. J., Plomann, M., Modregger, J., Liu, X.-B., Jones, E. G., Heinemann, S. F., Lo, D. C., and Ehlers, M. D. (2006). Endocytosis and synaptic removal of NR3A-containing NMDA receptors by PACSIN1/syndapin1. *Nature Neuroscience* **9**, 611–621. doi:10.1038/nn1680
- Peschard, P., Fournier, T. M., Lamorte, L., Naujokas, M. A., Band, H., Langdon, W. Y., and Park, M. (2001). Mutation of the c-Cbl TKB domain binding site on the Met receptor tyrosine kinase converts it into a transforming protein. *Molecular Cell* **8**, 995–1004. doi:10.1016/s1097-2765(01)00378-1
- Petersen, L. C., Johannessen, M., Foster, D., Kumar, A., and Mulvihill, E. (1988). The effect of polymerised fibrin on the catalytic activities of one-chain tissue-type plasminogen activator as revealed by an analogue resistant to plasmin cleavage. *Biochimica Et Biophysica Acta* **952**, 245–254. doi:10.1016/0167-4838(88)90123-9
- Petralia, R. S., Wang, Y.-X., and Wenthold, R. J. (2003). Internalization at glutamatergic synapses during development. *European Journal of Neuroscience* **18**, 3207–3217. doi:10.1111/j.1460-9568.2003.03074.x
- Petrelli, A., Gilestro, G. F., Lanzardo, S., Comoglio, P. M., Migone, N., and Giordano, S. (2002). The endophilin-CIN85-Cbl complex mediates ligand-dependent downregulation of c-Met. *Nature* **416**, 187–190. doi:10.1038/416187a
- Pichot, P., and Guelfi, J. (1983). 'DSM III - MANUEL DIAGNOSTIQUE ET STATISTIQUE DES TROUBLES MENTAUX - AMERICAN PSYCHIATRIC ASSOCIATION.' Masson. Available at: <https://www.abebooks.fr/DSM-III-MANUEL-DIAGNOSTIQUE-STATISTIQUE-TROUBLES/16070737033/bd> [accessed 16 May 2020]
- Pilotto, S., Gkoutakos, A., Carbognin, L., Scarpa, A., Tortora, G., and Bria, E. (2017). MET exon 14 juxtamembrane splicing mutations: clinical and therapeutical perspectives for cancer therapy. *Annals of Translational Medicine* **5**, 2. doi:10.21037/atm.2016.12.33
- Pin, J.-P., and Acher, F. (2002). The metabotropic glutamate receptors: structure, activation mechanism and pharmacology. *Current drug targets. CNS and neurological disorders* **1**, 297–317. doi:10.2174/1568007023339328
- Pittman, R. N. (1985). Release of plasminogen activator and a calcium-dependent metalloprotease from cultured sympathetic and sensory neurons. *Developmental Biology* **110**, 91–101. doi:10.1016/0012-1606(85)90067-3
- Pittman, R. N., Ivins, J. K., and Buettner, H. M. (1989). Neuronal plasminogen activators: cell surface binding sites and involvement in neurite outgrowth. *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience* **9**, 4269–4286.
- Pohl, G., Källström, M., Bergsdorf, N., Wallén, P., and Jörnvall, H. (1984). Tissue plasminogen activator: peptide analyses confirm an indirectly derived amino acid sequence, identify the active site serine residue, establish glycosylation sites, and localize variant differences. *Biochemistry* **23**, 3701–3707. doi:10.1021/bi00311a020
- Poirier, N., and Rivières-Pigeon, C. des (2013). 'Le trouble du spectre de l'autisme: État des connaissances'. (PUQ.)

- Polavarapu, R., Gongora, M. C., Yi, H., Ranganthan, S., Lawrence, D. A., 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**, 3270–3278. doi:10.1182/blood-2006-08-043125
- Powell, E. M., Campbell, D. B., Stanwood, G. D., Davis, C., Noebels, J. L., and Levitt, P. (2003). Genetic disruption of cortical interneuron development causes region- and GABA cell type-specific deficits, epilepsy, and behavioral dysfunction. *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience* **23**, 622–631.
- Presta, M., Ennas, M. G., Torelli, S., Ragnotti, G., and Gremo, F. (1990). Synthesis of Urokinase-Type Plasminogen Activator and of Type- 1 Plasminogen Activator Inhibitor in Neuronal Cultures of Human Fetal Brain: Stimulation by Phorbol Ester. *Journal of Neurochemistry* **55**, 1647–1654. doi:10.1111/j.1471-4159.1990.tb04951.x
- Priestley, T., Laughton, P., Myers, J., Le Bourdellés, B., Kerby, J., and Whiting, P. J. (1995). Pharmacological properties of recombinant human N-methyl-D-aspartate receptors comprising NR1a/NR2A and NR1a/NR2B subunit assemblies expressed in permanently transfected mouse fibroblast cells. *Molecular Pharmacology* **48**, 841–848.
- Prunotto, C., Crepaldi, T., Forni, P. E., Ieraci, A., Kelly, R. G., Tajbakhsh, S., Buckingham, M., and Ponzetto, C. (2004). Analysis of Mlc-lacZ Met mutants highlights the essential function of Met for migratory precursors of hypaxial muscles and reveals a role for Met in the development of hyoid arch-derived facial muscles. *Developmental Dynamics: An Official Publication of the American Association of Anatomists* **231**, 582–591. doi:10.1002/dvdy.20177
- Prybylowski, K., Chang, K., Sans, N., Kan, L., Vicini, S., and Wenthold, R. J. (2005). The synaptic localization of NR2B-containing NMDA receptors is controlled by interactions with PDZ proteins and AP-2. *Neuron* **47**, 845–857. doi:10.1016/j.neuron.2005.08.016
- Prybylowski, K., Z, F., G, L., Lm, H., J, L., K, C., Rj, W., and S, V. (2002). Relationship between availability of NMDA receptor subunits and their expression at the synapse. *The Journal of Neuroscience: the Official Journal of the Society for Neuroscience* **22**, 8902–8910. doi:10.1523/jneurosci.22-20-08902.2002
- Puri, N., and Salgia, R. (2008). Synergism of EGFR and c-Met pathways, cross-talk and inhibition, in non-small cell lung cancer. *Journal of Carcinogenesis* **7**. doi:10.4103/1477-3163.44372

## Q

- Qian, Z., Gilbert, M. E., Colicos, M. A., Kandel, E. R., and Kuhl, D. (1993). Tissue-plasminogen activator is induced as an immediate-early gene during seizure, kindling and long-term potentiation. *Nature* **361**, 453–457. doi:10.1038/361453a0
- Qiu, S., Lu, Z., and Levitt, P. (2014). MET receptor tyrosine kinase controls dendritic complexity, spine morphogenesis, and glutamatergic synapse maturation in the hippocampus. *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience* **34**, 16166–16179. doi:10.1523/JNEUROSCI.2580-14.2014
- Qiu, S., Zhang, X., Cao, J., Yang, W., Yan, Y., Shan, L., Zheng, J., and Luo, J. (2009). An Endoplasmic Reticulum Retention Signal Located in the Extracellular Amino-terminal Domain of the NR2A Subunit of N-Methyl-d-aspartate Receptors. *The Journal of Biological Chemistry* **284**, 20285–20298. doi:10.1074/jbc.M109.004960





- Rai, A. T., Seldon, A. E., Boo, S., Link, P. S., Domico, J. R., Tarabishy, A. R., Lucke-Wold, N., and Carpenter, J. S. (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. *Journal of Neurointerventional Surgery* **9**, 722–726. doi:10.1136/neurintsurg-2016-012515
- Rakic, P. (1988). Defects of neuronal migration and the pathogenesis of cortical malformations. *Progress in Brain Research* **73**, 15–37. doi:10.1016/s0079-6123(08)60494-x
- Rao, A., Kim, E., Sheng, M., and Craig, A. M. (1998). Heterogeneity in the molecular composition of excitatory postsynaptic sites during development of hippocampal neurons in culture. *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience* **18**, 1217–1229.
- Rapoport, I., Miyazaki, M., Boll, W., Duckworth, B., Cantley, L. C., Shoelson, S., and Kirchhausen, T. (1997). Regulatory interactions in the recognition of endocytic sorting signals by AP-2 complexes. *The EMBO Journal* **16**, 2240–2250. doi:10.1093/emboj/16.9.2240
- Ricagno, S., Caccia, S., Sorrentino, G., Antonini, G., and Bolognesi, M. (2009). Human neuroserpin: structure and time-dependent inhibition. *Journal of Molecular Biology* **388**, 109–121. doi:10.1016/j.jmb.2009.02.056
- Riedel, C. H., Zimmermann, P., Jensen-Kondering, U., Stingele, R., Deuschl, G., and Jansen, O. (2011). The importance of size: successful recanalization by intravenous thrombolysis in acute anterior stroke depends on thrombus length. *Stroke* **42**, 1775–1777. doi:10.1161/STROKEAHA.110.609693
- Rijken, D. C., and Collen, D. (1981). Purification and characterization of the plasminogen activator secreted by human melanoma cells in culture. *The Journal of Biological Chemistry* **256**, 7035–7041.
- Rijken, D. C., Hoylaerts, M., and Collen, D. (1982). Fibrinolytic properties of one-chain and two-chain human extrinsic (tissue-type) plasminogen activator. *The Journal of Biological Chemistry* **257**, 2920–2925.
- Rijken, D. C., Wijngaards, G., Zaal-de Jong, M., and Welbergen, J. (1979). Purification and partial characterization of plasminogen activator from human uterine tissue. *Biochimica Et Biophysica Acta* **580**, 140–153. doi:10.1016/0005-2795(79)90205-8
- Robbins, T. W., and Sahakian, B. J. (1979). ‘Paradoxical’ effects of psychomotor stimulant drugs in hyperactive children from the standpoint of behavioural pharmacology. *Neuropharmacology* **18**, 931–950. doi:10.1016/0028-3908(79)90157-6
- Roche, K. W., Standley, S., McCallum, J., Dune Ly, C., Ehlers, M. D., and Wenthold, R. J. (2001). Molecular determinants of NMDA receptor internalization. *Nature Neuroscience* **4**, 794–802. doi:10.1038/90498
- Rogove, A. D., Siao, C., Keyt, B., Strickland, S., and Tsirka, S. E. (1999). Activation of microglia reveals a non-proteolytic cytokine function for tissue plasminogen activator in the central nervous system. *Journal of Cell Science* **112 ( Pt 22)**, 4007–4016.
- Rosell, A., Cuadrado, E., Ortega-Aznar, A., Hernández-Guillamon, M., Lo, E. H., and Montaner, J. (2008). MMP-9-positive neutrophil infiltration is associated to blood-brain barrier breakdown and basal lamina type IV collagen degradation during hemorrhagic transformation after human ischemic stroke. *Stroke* **39**, 1121–1126. doi:10.1161/STROKEAHA.107.500868

- Rosen, E. M., Laterra, J., Joseph, A., Jin, L., Fuchs, A., Way, D., Witte, M., Weinand, M., and Goldberg, I. D. (1996). Scatter factor expression and regulation in human glial tumors. *International Journal of Cancer* **67**, 248–255. doi:10.1002/(SICI)1097-0215(19960717)67:2<248::AID-IJC16>3.0.CO;2-7
- Rouf, S. A., Moo-Young, M., and Chisti, Y. (1996). Tissue-type plasminogen activator: characteristics, applications and production technology. *Biotechnology Advances* **14**, 239–266. doi:10.1016/0734-9750(96)00019-5
- Rumbaugh, G., and Vicini, S. (1999). Distinct Synaptic and Extrasynaptic NMDA Receptors in Developing Cerebellar Granule Neurons. *The Journal of Neuroscience* **19**, 10603–10610. doi:10.1523/JNEUROSCI.19-24-10603.1999

## S

- Sachs, M., Brohmann, H., Zechner, D., Müller, T., Hülsken, J., Walther, I., Schaeper, U., Birchmeier, C., and Birchmeier, W. (2000). Essential role of Gab1 for signaling by the c-Met receptor in vivo. *The Journal of Cell Biology* **150**, 1375–1384. doi:10.1083/jcb.150.6.1375
- Salles, F. J., and Strickland, S. (2002). Localization and regulation of the tissue plasminogen activator-plasmin system in the hippocampus. *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience* **22**, 2125–2134.
- Salter, M. W., and Kalia, L. V. (2004). Src kinases: a hub for NMDA receptor regulation. *Nature Reviews. Neuroscience* **5**, 317–328. doi:10.1038/nrn1368
- Samson, A. L., Nevin, S. T., Croucher, D., Niego, B., Daniel, P. B., Weiss, T. W., Moreno, E., Monard, D., Lawrence, D. A., and Medcalf, R. L. (2008). Tissue-type plasminogen activator requires a co-receptor to enhance NMDA receptor function. *Journal of Neurochemistry* **107**, 1091–1101. doi:10.1111/j.1471-4159.2008.05687.x
- Sánchez-Pérez, A. M., and Felipe, V. (2005). Serines 890 and 896 of the NMDA receptor subunit NR1 are differentially phosphorylated by protein kinase C isoforms. *Neurochemistry International* **47**, 84–91. doi:10.1016/j.neuint.2005.04.011
- Sangwan, V., Paliouras, G. N., Abella, J. V., Dubé, N., Monast, A., Tremblay, M. L., and Park, M. (2008). Regulation of the Met receptor-tyrosine kinase by the protein-tyrosine phosphatase 1B and T-cell phosphatase. *The Journal of Biological Chemistry* **283**, 34374–34383. doi:10.1074/jbc.M805916200
- Sans, N., Petralia, R. S., Wang, Y. X., Blahos, J., Hell, J. W., and Wenthold, R. J. (2000). A developmental change in NMDA receptor-associated proteins at hippocampal synapses. *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience* **20**, 1260–1271.
- Sanz-Clemente, A., Matta, J. A., Isaac, J. T. R., and Roche, K. W. (2010). Casein kinase 2 regulates the NR2 subunit composition of synaptic NMDA receptors. *Neuron* **67**, 984–996. doi:10.1016/j.neuron.2010.08.011
- Sanz-Clemente, A., Nicoll, R. A., and Roche, K. W. (2013). Diversity in NMDA receptor composition: many regulators, many consequences. *The Neuroscientist: A Review Journal Bringing Neurobiology, Neurology and Psychiatry* **19**, 62–75. doi:10.1177/1073858411435129
- Sappino, A. P., Madani, R., Huarte, J., Belin, D., Kiss, J. Z., Wohlwend, A., and Vassalli, J. D. (1993). Extracellular proteolysis in the adult murine brain. *The Journal of Clinical Investigation* **92**, 679–685. doi:10.1172/JCI116637

- Saucier, C., Papavasiliou, V., Palazzo, A., Naujokas, M. A., Kremer, R., and Park, M. (2002). Use of signal specific receptor tyrosine kinase oncoproteins reveals that pathways downstream from Grb2 or Shc are sufficient for cell transformation and metastasis. *Oncogene* **21**, 1800–1811. doi:10.1038/sj.onc.1205261
- Scagliotti, G. V., Moro-Sibilot, D., Kollmeier, J., Favaretto, A. G., Cho, E. K., Grosch, H., Kimmich, M., Girard, N., Tsai, C.-M., Hsia, T.-C., Brighenti, M., Schumann, C., Wang, X. A., Wijayawardana, S. R., Gruver, A. M., Wallin, J., Mansouri, K., Wacheck, V., and Chang, G.-C. (2017). A randomized, controlled, open label phase II study of erlotinib (E) with or without the MET antibody emibetuzumab (Emi) as first-line treatment for EGFRmt non-small cell lung cancer (NSCLC) patients who have disease control after an 8-week lead-in treatment with erlotinib. *Journal of Clinical Oncology* **35**, 9019–9019. doi:10.1200/JCO.2017.35.15\_suppl.9019
- Scagliotti, G. V., Novello, S., and von Pawel, J. (2013). The emerging role of MET/HGF inhibitors in oncology. *Cancer Treatment Reviews* **39**, 793–801. doi:10.1016/j.ctrv.2013.02.001
- Schaeper, U., Gehring, N. H., Fuchs, K. P., Sachs, M., Kempkes, B., and Birchmeier, W. (2000). Coupling of Gab1 to c-Met, Grb2, and Shp2 mediates biological responses. *The Journal of Cell Biology* **149**, 1419–1432. doi:10.1083/jcb.149.7.1419
- Schiering, N., Knapp, S., Marconi, M., Flocco, M. M., Cui, J., Perego, R., Rusconi, L., and Cristiani, C. (2003). Crystal structure of the tyrosine kinase domain of the hepatocyte growth factor receptor c-Met and its complex with the microbial alkaloid K-252a. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **100**, 12654–12659. doi:10.1073/pnas.1734128100
- Schmidt, C., Blatt, F., Goedecke, S., Brinkmann, V., Zschiesche, W., Sharpe, M., Gherardi, E., and Birchmeier, C. (1995). Scatter factor/hepatocyte growth factor is essential for liver development. *Nature* **373**, 699–702. doi:10.1038/373699a0
- Schmidt, L., Duh, F. M., Chen, F., Kishida, T., Glenn, G., Choyke, P., Scherer, S. W., Zhuang, Z., Lubensky, I., Dean, M., Allikmets, R., Chidambaram, A., Bergerheim, U. R., Feltis, J. T., Casadevall, C., Zamarron, A., Bernues, M., Richard, S., Lips, C. J., Walther, M. M., Tsui, L. C., Geil, L., Orcutt, M. L., Stackhouse, T., Lipan, J., Slife, L., Brauch, H., Decker, J., Niehans, G., Hughson, M. D., Moch, H., Storkel, S., Lerman, M. I., Linehan, W. M., and Zbar, B. (1997). Germline and somatic mutations in the tyrosine kinase domain of the MET proto-oncogene in papillary renal carcinomas. *Nature Genetics* **16**, 68–73. doi:10.1038/ng0597-68
- Schorge, S., and Colquhoun, D. (2003). Studies of NMDA receptor function and stoichiometry with truncated and tandem subunits. *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience* **23**, 1151–1158.
- Schrock, A. B., Frampton, G. M., Suh, J., Chalmers, Z. R., Rosenzweig, M., Erlich, R. L., Halmos, B., Goldman, J., Forde, P., Leuenberger, K., Peled, N., Kalemkerian, G. P., Ross, J. S., Stephens, P. J., Miller, V. A., Ali, S. M., and Ou, S.-H. I. (2016). Characterization of 298 Patients with Lung Cancer Harboring MET Exon 14 Skipping Alterations. *Journal of Thoracic Oncology: Official Publication of the International Association for the Study of Lung Cancer* **11**, 1493–1502. doi:10.1016/j.jtho.2016.06.004
- Scott, D. B., Blanpied, T. A., and Ehlers, M. D. (2003). Coordinated PKA and PKC phosphorylation suppresses RXR-mediated ER retention and regulates the surface delivery of NMDA receptors. *Neuropharmacology* **45**, 755–767. doi:10.1016/s0028-3908(03)00250-8
- Scott, D. B., Blanpied, T. A., Swanson, G. T., Zhang, C., and Ehlers, M. D. (2001). An NMDA receptor ER retention signal regulated by phosphorylation and alternative splicing. *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience* **21**, 3063–3072.

- Scott, R. W., Bergmann, B. L., Bajpai, A., R. T. Hersh", Henry Rodriguez", and Barry N. Jonesd, Carlos Barredad, Sherry Watts", and Joffre B. Bakera (1985). Protease nexin. Properties and a modified purification procedure. - PubMed - NCBI. Available at: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3997857> [accessed 25 March 2020]
- Seeburg, P. H., Burnashev, N., Köhr, G., Kuner, T., Sprengel, R., and Monyer, H. (1995). The NMDA receptor channel: molecular design of a coincidence detector. *Recent Progress in Hormone Research* **50**, 19–34. doi:10.1016/b978-0-12-571150-0.50006-8
- Seeds, N. W., Basham, M. E., and Haffke, S. P. (1999). Neuronal migration is retarded in mice lacking the tissue plasminogen activator gene. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **96**, 14118–14123. doi:10.1073/pnas.96.24.14118
- Seid, T., Hagiya, M., Shimonishi, M., Nakamura, T., and Shimizu, S. (1991). Organization of the human hepatocyte growth factor-encoding gene. *Gene* **102**, 213–219. doi:10.1016/0378-1119(91)90080-U
- Sharp, C. D., Hines, I., Houghton, J., Warren, A., Jackson, T. H., Jawahar, A., Nanda, A., Elrod, J. W., Long, A., Chi, A., Minagar, A., and Alexander, J. S. (2003). Glutamate causes a loss in human cerebral endothelial barrier integrity through activation of NMDA receptor. *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology* **285**, H2592–H2598. doi:10.1152/ajpheart.00520.2003
- Shieh, J.-M., Tang, Y.-A., Yang, T.-H., Chen, C.-Y., Hsu, H.-S., Tan, Y.-H. C., Salgia, R., and Wang, Y.-C. (2013). Lack of association of C-Met-N375S sequence variant with lung cancer susceptibility and prognosis. *International Journal of Medical Sciences* **10**, 988–994. doi:10.7150/ijms.5944
- Shimomura, T., Miyazawa, K., Komiyama, Y., Hiraoka, H., Naka, D., Morimoto, Y., and Kitamura, N. (1995). Activation of Hepatocyte Growth Factor by two Homologous Proteases, Blood-Coagulation Factor XIIIa and Hepatocyte Growth Factor Activator. *European Journal of Biochemistry* **229**, 257–261. doi:10.1111/j.1432-1033.1995.02571.x
- Shin, Y. C., Kundel, M., and Wells, D. G. (2004). Rapid, Activity-Induced Increase in Tissue Plasminogen Activator Is Mediated by Metabotropic Glutamate Receptor-Dependent mRNA Translation | Journal of Neuroscience. Available at: <https://www.jneurosci.org/content/24/42/9425> [accessed 25 March 2020]
- Siao, C.-J., Fernandez, S. R., and Tsirka, S. E. (2003). Cell type-specific roles for tissue plasminogen activator released by neurons or microglia after excitotoxic injury. *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience* **23**, 3234–3242.
- Siao, C.-J., and Tsirka, S. E. (2002). Tissue plasminogen activator mediates microglial activation via its finger domain through annexin II. *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience* **22**, 3352–3358. doi:20026281
- Sillaber, C., Baghestanian, M., Bevec, D., Willheim, M., Agis, H., Kapiotis, S., Füreder, W., Bankl, H. C., Kiener, H. P., Speiser, W., Binder, B. R., Lechner, K., and Valent, P. (1999). The mast cell as site of tissue-type plasminogen activator expression and fibrinolysis. *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)* **162**, 1032–1041.
- Silverman, G. A., Bird, P. I., Carrell, R. W., Church, F. C., Coughlin, P. B., Gettins, P. G., Irving, J. A., Lomas, D. A., Luke, C. J., Moyer, R. W., Pemberton, P. A., Remold-O'Donnell, E., Salvesen, G. S., Travis, J., and Whisstock, J. C. (2001). The serpins are an expanding superfamily of structurally similar but functionally diverse proteins. Evolution, mechanism of inhibition, novel functions, and a revised nomenclature. *The Journal of Biological Chemistry* **276**, 33293–33296. doi:10.1074/jbc.R100016200

- Skeberdis, V. A., Chevaleyre, V., Lau, C. G., Goldberg, J. H., Pettit, D. L., Suadicani, S. O., Lin, Y., Bennett, M. V. L., Yuste, R., Castillo, P. E., and Zukin, R. S. (2006). Protein kinase A regulates calcium permeability of NMDA receptors. *Nature Neuroscience* **9**, 501–510. doi:10.1038/nn1664
- Smith, A. G., and Rowland Hill, C. (2018). Imaging assessment of acute ischaemic stroke: a review of radiological methods. *The British Journal of Radiology* **91**. doi:10.1259/bjr.20170573
- Smolen, G. A., Sordella, R., Muir, B., Mohapatra, G., Barmettler, A., Archibald, H., Kim, W. J., Okimoto, R. A., Bell, D. W., Sgroi, D. C., Christensen, J. G., Settleman, J., and Haber, D. A. (2006). Amplification of MET may identify a subset of cancers with extreme sensitivity to the selective tyrosine kinase inhibitor PHA-665752. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **103**, 2316–2321. doi:10.1073/pnas.0508776103
- Snyder, E. M., Nong, Y., Almeida, C. G., Paul, S., Moran, T., Choi, E. Y., Nairn, A. C., Salter, M. W., Lombroso, P. J., Gouras, G. K., and Greengard, P. (2005). Regulation of NMDA receptor trafficking by amyloid- $\beta$ . *Nature Neuroscience* **8**, 1051–1058. doi:10.1038/nn1503
- Snyder, E. M., Philpot, B. D., Huber, K. M., Dong, X., Fallon, J. R., and Bear, M. F. (2001). Internalization of ionotropic glutamate receptors in response to mGluR activation. *Nature Neuroscience* **4**, 1079–1085. doi:10.1038/nn746
- Songyang, Z., Shoelson, S. E., McGlade, J., Olivier, P., Pawson, T., Bustelo, X. R., Barbacid, M., Sabe, H., Hanafusa, H., and Yi, T. (1994). Specific motifs recognized by the SH2 domains of Csk, 3BP2, fps/fes, GRB-2, HCP, SHC, Syk, and Vav. *Molecular and Cellular Biology* **14**, 2777–2785. doi:10.1128/mcb.14.4.2777
- Soreq, H., and Miskin, R. (1983). Plasminogen activator in the developing rat cerebellum: biosynthesis and localization in granular neurons. *Brain Research* **313**, 149–158. doi:10.1016/0165-3806(83)90212-2
- Sousa, I., Clark, T. G., Toma, C., Kobayashi, K., Choma, M., Holt, R., Sykes, N. H., Lamb, J. A., Bailey, A. J., Battaglia, A., Maestrini, E., Monaco, A. P., and International Molecular Genetic Study of Autism Consortium (IMGSA) (2009). MET and autism susceptibility: family and case-control studies. *European journal of human genetics: EJHG* **17**, 749–758. doi:10.1038/ejhg.2008.215
- Sprengers, E. D., and Kluft, C. (1987). Plasminogen activator inhibitors. *Blood* **69**, 381–387.
- Stamos, J., Lazarus, R. A., Yao, X., Kirchofer, D., and Wiesmann, C. (2004). Crystal structure of the HGF beta-chain in complex with the Sema domain of the Met receptor. *The EMBO journal* **23**, 2325–2335. doi:10.1038/sj.emboj.7600243
- Stanika, R. I., Pivovarova, N. B., Brantner, C. A., Watts, C. A., Winters, C. A., and Andrews, S. B. (2009). Coupling diverse routes of calcium entry to mitochondrial dysfunction and glutamate excitotoxicity. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **106**, 9854–9859. doi:10.1073/pnas.0903546106
- Steigerwald, F., Schulz, T. W., Schenker, L. T., Kennedy, M. B., Seeburg, P. H., and Köhr, G. (2000). C-Terminal truncation of NR2A subunits impairs synaptic but not extrasynaptic localization of NMDA receptors. *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience* **20**, 4573–4581.
- Steinhausen, H.-C., and Metzke, C. W. (2004). Differentiating the behavioural profile in autism and mental retardation and testing of a screener. *European Child & Adolescent Psychiatry* **13**, 214–220. doi:10.1007/s00787-004-0400-4

- Stoker, M., Gherardi, E., Perryman, M., and Gray, J. (1987). Scatter factor is a fibroblast-derived modulator of epithelial cell mobility. *Nature* **327**, 239–242. doi:10.1038/327239a0
- Streit, A., Stern, C. D., Théry, C., Ireland, G. W., Aparicio, S., Sharpe, M. J., and Gherardi, E. (1995). A role for HGF/SF in neural induction and its expression in Hensen's node during gastrulation. *Development (Cambridge, England)* **121**, 813–824.
- Su, E. J., Fredriksson, L., Geyer, M., Folestad, E., Cale, J., Andrae, J., Gao, Y., Pietras, K., Mann, K., Yepes, M., Strickland, D. K., Betsholtz, C., Eriksson, U., and Lawrence, D. A. (2008). Activation of PDGF-CC by tissue plasminogen activator impairs blood-brain barrier integrity during ischemic stroke. *Nature Medicine* **14**, 731–737. doi:10.1038/nm1787
- Suh, Y. H., Terashima, A., Petralia, R. S., Wenthold, R. J., Isaac, J. T. R., Roche, K. W., and Roche, P. A. (2010). A neuronal role for SNAP-23 in postsynaptic glutamate receptor trafficking. *Nature Neuroscience* **13**, 338–343. doi:10.1038/nn.2488
- Sumii, T., and Lo, E. H. (2002). Involvement of matrix metalloproteinase in thrombolysis-associated hemorrhagic transformation after embolic focal ischemia in rats. *Stroke* **33**, 831–836. doi:10.1161/hs0302.104542
- Sussman, B. J., and Fitch, T. S. (1959). Thrombolysis with fibrinolysis in cerebral arterial occlusion; the role of angiography. *Angiology* **10**, 268–282. doi:10.1177/000331975901000413
- Suzuki, Y., Nagai, N., Yamakawa, K., Kawakami, J., Lijnen, H. R., and Umemura, K. (2009). Tissue-type plasminogen activator (t-PA) induces stromelysin-1 (MMP-3) in endothelial cells through activation of lipoprotein receptor-related protein. *Blood* **114**, 3352–3358. doi:10.1182/blood-2009-02-203919
- Swanwick, C. C., Shapiro, M. E., Yi, Z., Chang, K., and Wenthold, R. J. (2009). NMDA receptors interact with flotillin-1 and -2, lipid raft-associated proteins. *FEBS letters* **583**, 1226–1230. doi:10.1016/j.febslet.2009.03.017

## T

- Tahara, Y., Ido, A., Yamamoto, S., Miyata, Y., Uto, H., Hori, T., Hayashi, K., and Tsubouchi, H. (2003). Hepatocyte growth factor facilitates colonic mucosal repair in experimental ulcerative colitis in rats. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* **307**, 146–151. doi:10.1124/jpet.103.054106
- Tang, C. M., Dichter, M., and Morad, M. (1990). Modulation of the N-methyl-D-aspartate channel by extracellular H<sup>+</sup>. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **87**, 6445–6449.
- Tang, Z., Zhao, M., Ji, J., Yang, G., Hu, F., He, J., Shen, H., Gao, Z., Zhao, A., Li, J., and Lu, Y. (2004). Overexpression of gastrin and c-met protein involved in human gastric carcinomas and intestinal metaplasia. *Oncology Reports* **11**, 333–339.
- Tarabeux, J., Kebir, O., Gauthier, J., Hamdan, F. F., Xiong, L., Piton, A., Spiegelman, D., Henrion, É., Millet, B., Fathalli, F., Joober, R., Rapoport, J. L., DeLisi, L. E., Fombonne, É., Mottron, L., Forget-Dubois, N., Boivin, M., Michaud, J. L., Drapeau, P., Lafrenière, R. G., Rouleau, G. A., and Krebs, M.-O. (2011). Rare mutations in N-methyl-D-aspartate glutamate receptors in autism spectrum disorders and schizophrenia. *Translational Psychiatry* **1**, e55–e55. doi:10.1038/tp.2011.52

- Teesalu, T., Kulla, A., Simisker, A., Sirén, V., Lawrence, D. A., Asser, T., and Vaheri, A. (2004). Tissue plasminogen activator and neuroserpin are widely expressed in the human central nervous system. *Thrombosis and Haemostasis* **92**, 358–368. doi:10.1160/TH02-12-0310
- Tempest, P. R., Stratton, M. R., and Cooper, C. S. (1988). Structure of the met protein and variation of met protein kinase activity among human tumour cell lines. *British Journal of Cancer* **58**, 3–7. doi:10.1038/bjc.1988.150
- Thanseem, I., Nakamura, K., Miyachi, T., Toyota, T., Yamada, S., Tsujii, M., Tsuchiya, K. J., Anitha, A., Iwayama, Y., Yamada, K., Hattori, E., Matsuzaki, H., Matsumoto, K., Iwata, Y., Suzuki, K., Suda, S., Kawai, M., Sugihara, G.-I., Takebayashi, K., Takei, N., Ichikawa, H., Sugiyama, T., Yoshikawa, T., and Mori, N. (2010). Further evidence for the role of MET in autism susceptibility. *Neuroscience Research* **68**, 137–141. doi:10.1016/j.neures.2010.06.014
- Thelwell, C., and Longstaff, C. (2007). The regulation by fibrinogen and fibrin of tissue plasminogen activator kinetics and inhibition by plasminogen activator inhibitor 1. *Journal of thrombosis and haemostasis: JTH* **5**, 804–811. doi:10.1111/j.1538-7836.2007.02422.x
- Thewke, D. P., and Seeds, N. W. (1999). The expression of mRNAs for hepatocyte growth factor/scatter factor, its receptor c-met, and one of its activators tissue-type plasminogen activator show a systematic relationship in the developing and adult cerebral cortex and hippocampus. *Brain Research* **821**, 356–367. doi:10.1016/s0006-8993(99)01115-4
- Thiebaut, A. M., Gauberti, M., Ali, C., Martinez De Lizarrondo, S., Vivien, D., Yepes, M., and Rousset, B. D. (2018). The role of plasminogen activators in stroke treatment: fibrinolysis and beyond. *The Lancet. Neurology* **17**, 1121–1132. doi:10.1016/S1474-4422(18)30323-5
- Thomas, C. G., Miller, A. J., and Westbrook, G. L. (2006). Synaptic and extrasynaptic NMDA receptor NR2 subunits in cultured hippocampal neurons. *Journal of Neurophysiology* **95**, 1727–1734. doi:10.1152/jn.00771.2005
- Tingley, W. G., Ehlers, M. D., Kameyama, K., Doherty, C., Ptak, J. B., Riley, C. T., and Huganir, R. L. (1997). Characterization of protein kinase A and protein kinase C phosphorylation of the N-methyl-D-aspartate receptor NR1 subunit using phosphorylation site-specific antibodies. *The Journal of Biological Chemistry* **272**, 5157–5166. doi:10.1074/jbc.272.8.5157
- Toiyama, Y., Miki, C., Inoue, Y., Okugawa, Y., Tanaka, K., and Kusunoki, M. (2009). Serum hepatocyte growth factor as a prognostic marker for stage II or III colorectal cancer patients. *International Journal of Cancer* **125**, 1657–1662. doi:10.1002/ijc.24554
- Toshniwal, P. K., Tiku, M. L., Tiku, K., and Skosey, J. L. (1987). Secretion of plasminogen activator by cerebral astrocytes and its modulation. *Journal of the Neurological Sciences* **80**, 307–321. doi:10.1016/0022-510x(87)90165-1
- Tovar, K. R., and Westbrook, G. L. (2002). Mobile NMDA receptors at hippocampal synapses. *Neuron* **34**, 255–264. doi:10.1016/s0896-6273(02)00658-x
- Traynelis, S. F., Wollmuth, L. P., McBain, C. J., Menniti, F. S., Vance, K. M., Ogden, K. K., Hansen, K. B., Yuan, H., Myers, S. J., and Dingledine, R. (2010). Glutamate receptor ion channels: structure, regulation, and function. *Pharmacological Reviews* **62**, 405–496. doi:10.1124/pr.109.002451
- Trepanier, C. H., Jackson, M. F., and MacDonald, J. F. (2012). Regulation of NMDA receptors by the tyrosine kinase Fyn. *The FEBS journal* **279**, 12–19. doi:10.1111/j.1742-4658.2011.08391.x

- Tripputi, P., Blasi, F., Ny, T., Emanuel, B. S., Letosfsky, J., and Croce, C. M. (1986). Tissue-type plasminogen activator gene is on chromosome 8. *Cytogenetics and Cell Genetics* **42**, 24–28. doi:10.1159/000132245
- Trotter, J. H., Lussier, A. L., Psilos, K. E., Mahoney, H. L., Sponaugle, A. E., Hoe, H.-S., Rebeck, G. W., and Weeber, E. J. (2014). Extracellular proteolysis of reelin by tissue plasminogen activator following synaptic potentiation. *Neuroscience* **274**, 299–307. doi:10.1016/j.neuroscience.2014.05.046
- Trusolino, L., Bertotti, A., and Comoglio, P. M. (2010). MET signalling: principles and functions in development, organ regeneration and cancer. *Nature Reviews. Molecular Cell Biology* **11**, 834–848. doi:10.1038/nrm3012
- Tsirka, S. E., Gualandris, A., Amaral, D. G., and Strickland, S. (1995a). Excitotoxin-induced neuronal degeneration and seizure are mediated by tissue plasminogen activator. *Nature* **377**, 340–344. doi:10.1038/377340a0
- Tsirka, S. E., Gualandris, A., Amaral, D. G., and Strickland, S. (1995b). Excitotoxin-induced neuronal degeneration and seizure are mediated by tissue plasminogen activator. *Nature* **377**, 340–344. doi:10.1038/377340a0
- Tsirka, S. E., Rogove, A. D., Bugge, T. H., Degen, J. L., and Strickland, S. (1997). An extracellular proteolytic cascade promotes neuronal degeneration in the mouse hippocampus. *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience* **17**, 543–552.
- Tsirka, S. E., Rogove, A. D., and Strickland, S. (1996). Neuronal cell death and tPA. *Nature* **384**, 123–124. doi:10.1038/384123b0
- Tulasne, D., Paumelle, R., Weidner, K. M., Vandenbunder, B., and Fafeur, V. (1999). The Multisubstrate Docking Site of the MET Receptor Is Dispensable for MET-mediated RAS Signaling and Cell Scattering. *Molecular Biology of the Cell* **10**, 551–565.
- Turjanski, A. G., Vaqué, J. P., and Gutkind, J. S. (2007). MAP kinases and the control of nuclear events. *Oncogene* **26**, 3240–3253. doi:10.1038/sj.onc.1210415
- Tymianski, M., Charlton, M., Carlen, P., and Tator, C. (1993). Source specificity of early calcium neurotoxicity in cultured embryonic spinal neurons. *The Journal of Neuroscience* **13**, 2085–2104. doi:10.1523/JNEUROSCI.13-05-02085.1993
- Tyndall, S. J., and Walikonis, R. S. (2006). The Receptor Tyrosine Kinase Met and Its Ligand Hepatocyte Growth Factor are Clustered at Excitatory Synapses and Can Enhance Clustering of Synaptic Proteins. *Cell Cycle* **5**, 1560–1568. doi:10.4161/cc.5.14.2918
- Tyner, J. W., Fletcher, L. B., Wang, E. Q., Yang, W. F., Rutenberg-Schoenberg, M. L., Beadling, C., Mori, M., Heinrich, M. C., Deininger, M. W., Druker, B. J., and Loriaux, M. M. (2010). MET receptor sequence variants R970C and T992I lack transforming capacity. *Cancer Research* **70**, 6233–6237. doi:10.1158/0008-5472.CAN-10-0429

## U

- Uehara, Y., Minowa, O., Mori, C., Shiota, K., Kuno, J., Noda, T., and Kitamura, N. (1995). Placental defect and embryonic lethality in mice lacking hepatocyte growth factor/scatter factor. *Nature* **373**, 702–705. doi:10.1038/373702a0



- Ujii, H., Tomida, M., Akiyama, H., Nakajima, Y., Okada, D., Yoshino, N., Takiguchi, Y., and Tanzawa, H. (2012). Serum hepatocyte growth factor and interleukin-6 are effective prognostic markers for non-small cell lung cancer. *Anticancer Research* **32**, 3251–3258.
- Ulbrich, M. H., and Isacoff, E. Y. (2008). Rules of engagement for NMDA receptor subunits. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **105**, 14163–14168. doi:10.1073/pnas.0802075105
- Ulbrich, M. H., and Isacoff, E. Y. (2007). Subunit counting in membrane-bound proteins. *Nature Methods* **4**, 319–321. doi:10.1038/nmeth1024
- 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. *Neuroscience Research* **12**, 251–262. doi:10.1016/0168-0102(91)90115-f

## V

- Verstraete, M., Bounameaux, H., de Cock, F., Van de Werf, F., and Collen, D. (1985). Pharmacokinetics and systemic fibrinolytic effects of recombinant human tissue-type plasminogen activator (rt-PA) in humans. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* **235**, 506–512.
- Vissel, B., Krupp, J. J., Heinemann, S. F., and Westbrook, G. L. (2001). A use-dependent tyrosine dephosphorylation of NMDA receptors is independent of ion flux. *Nature Neuroscience* **4**, 587–596. doi:10.1038/88404
- Volk, H. E., Kerin, T., Lurmann, F., Hertz-Picciotto, I., McConnell, R., and Campbell, D. B. (2014). Interaction of the MET Receptor Tyrosine Kinase Gene and Air Pollution Exposure in Autism Spectrum Disorder. *Epidemiology (Cambridge, Mass.)* **25**, 44–47. doi:10.1097/EDE.0000000000000030

## W

- Wahlgren, N., Thorén, M., Höjeberg, B., Käll, T.-B., Laska, A.-C., Sjöstrand, C., Höjjer, J., Almqvist, H., Holmin, S., Lilja, A., Fredriksson, L., Lawrence, D., Eriksson, U., and Ahmed, N. (2017). Randomized assessment of imatinib in patients with acute ischaemic stroke treated with intravenous thrombolysis. *Journal of Internal Medicine* **281**, 273–283. doi:10.1111/joim.12576
- 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. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects* **719**, 318–328. doi:10.1016/0304-4165(82)90105-2
- Wang, J. Q., Guo, M.-L., Jin, D.-Z., Xue, B., Fibuch, E. E., and Mao, L.-M. (2014). Roles of subunit phosphorylation in regulating glutamate receptor function. *European journal of pharmacology* **728**, 183–187. doi:10.1016/j.ejphar.2013.11.019
- Wang, X., Le, P., Liang, C., Chan, J., Kiewlich, D., Miller, T., Harris, D., Sun, L., Rice, A., Vasile, S., Blake, R. A., Howlett, A. R., Patel, N., McMahon, G., and Lipson, K. E. (2003). Potent and selective inhibitors of the Met [hepatocyte growth factor/scatter factor (HGF/SF) receptor] tyrosine kinase block HGF/SF-induced tumor cell growth and invasion. *Molecular Cancer Therapeutics* **2**, 1085–1092.
- Wang, Y. F., Tsirka, S. E., Strickland, S., Stieg, P. E., Soriano, S. G., and Lipton, S. A. (1998). Tissue plasminogen activator (tPA) increases neuronal damage after focal cerebral ischemia in wild-type and tPA-deficient mice. *Nature Medicine* **4**, 228–231. doi:10.1038/nm0298-228

- Wardlaw, J. (2001). Overview of Cochrane thrombolysis meta-analysis. *Neurology* **57**, S69-76.
- Ware, J. H., Dibenedetto, A. J., and Pittman, R. N. (1995). Localization of tissue plasminogen activator mRNA in adult rat brain. *Brain Research Bulletin* **37**, 275–281. doi:10.1016/0361-9230(95)00008-3
- Washbourne, P., Bennett, J. E., and McAllister, A. K. (2002). Rapid recruitment of NMDA receptor transport packets to nascent synapses. *Nature Neuroscience* **5**, 751–759. doi:10.1038/nn883
- Watanabe, M., Mishina, M., and Inoue, Y. (1994). Distinct distributions of five NMDA receptor channel subunit mRNAs in the brainstem. *The Journal of Comparative Neurology* **343**, 520–531. doi:10.1002/cne.903430403
- Wee, K. S.-L., Zhang, Y., Khanna, S., and Low, C.-M. (2008). Immunolocalization of NMDA receptor subunit NR3B in selected structures in the rat forebrain, cerebellum, and lumbar spinal cord. *The Journal of Comparative Neurology* **509**, 118–135. doi:10.1002/cne.21747
- Weidner, K. M., Arakaki, N., Hartmann, G., Vandekerckhove, J., Weingart, S., Rieder, H., Fonatsch, C., Tsubouchi, H., Hishida, T., and Daikuhara, Y. (1991). Evidence for the identity of human scatter factor and human hepatocyte growth factor. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **88**, 7001–7005.
- Weitlauf, C., Honse, Y., Auberson, Y. P., Mishina, M., Lovinger, D. M., and Winder, D. G. (2005). Activation of NR2A-containing NMDA receptors is not obligatory for NMDA receptor-dependent long-term potentiation. *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience* **25**, 8386–8390. doi:10.1523/JNEUROSCI.2388-05.2005
- Wenzel, A., Villa, M., Mohler, H., and Benke, D. (1996). Developmental and regional expression of NMDA receptor subtypes containing the NR2D subunit in rat brain. *Journal of Neurochemistry* **66**, 1240–1248. doi:10.1046/j.1471-4159.1996.66031240.x
- Wilcox, R. G., von der Lippe, G., Olsson, C. G., Jensen, G., Skene, A. M., and Hampton, J. R. (1988). Trial of tissue plasminogen activator for mortality reduction in acute myocardial infarction. Anglo-Scandinavian Study of Early Thrombolysis (ASSET). *Lancet (London, England)* **2**, 525–530. doi:10.1016/s0140-6736(88)92656-6
- Williams, K. (1996). Separating dual effects of zinc at recombinant N-methyl-d-aspartate receptors. *Neuroscience Letters* **215**, 9–12. doi:10.1016/S0304-3940(96)12924-4
- Willner, P. (1984). The validity of animal models of depression. *Psychopharmacology* **83**, 1–16. doi:10.1007/BF00427414
- Witt, A., Macdonald, N., and Kirkpatrick, P. (2004). Memantine hydrochloride. *Nature Reviews. Drug Discovery* **3**, 109–110. doi:10.1038/nrd1311
- Wu, F., Echeverry, R., Wu, J., An, J., Haile, W. B., Cooper, D. S., Catano, M., and Yepes, M. (2013). Tissue-type plasminogen activator protects neurons from excitotoxin-induced cell death via activation of the ERK1/2-CREB-ATF3 signaling pathway. *Molecular and Cellular Neurosciences* **52**, 9–19. doi:10.1016/j.mcn.2012.10.001
- Wu, F., Wu, J., Nicholson, A. D., Echeverry, R., Haile, W. B., Catano, M., An, J., Lee, A. K., Duong, D., Dammer, E. B., Seyfried, N. T., Tong, F. C., Votaw, J. R., Medcalf, R. L., and Yepes, M. (2012). Tissue-type plasminogen activator regulates the neuronal uptake of glucose in the ischemic brain. *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience* **32**, 9848–9858. doi:10.1523/JNEUROSCI.1241-12.2012

## X

- Xie, Z., Li, J., Baker, J., Eagleson, K. L., Coba, M. P., and Levitt, P. (2016). Receptor Tyrosine Kinase MET Interactome and Neurodevelopmental Disorder Partners at the Developing Synapse. *Biological Psychiatry* **80**, 933–942. doi:10.1016/j.biopsych.2016.02.022
- Xu, Z., Chen, R.-Q., Gu, Q.-H., Yan, J.-Z., Wang, S.-H., Liu, S.-Y., and Lu, W. (2009). Metaplastic regulation of long-term potentiation/long-term depression threshold by activity-dependent changes of NR2A/NR2B ratio. *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience* **29**, 8764–8773. doi:10.1523/JNEUROSCI.1014-09.2009

## Y

- Yamamoto, C., Sugato, M., Fujiwara, Y., and Kaji, T. (2005). Selective promotion of plasminogen activator inhibitor-1 secretion by activation of proteinase-activated receptor-1 in cultured human brain microvascular pericytes: comparison with endothelial cells. *Biological & Pharmaceutical Bulletin* **28**, 208–211. doi:10.1248/bpb.28.208
- Yamamoto, N., Mammadova, G., Song, R. X.-D., Fukami, Y., and Sato, K. -i. (2006). Tyrosine phosphorylation of p145met mediated by EGFR and Src is required for serum-independent survival of human bladder carcinoma cells. *Journal of Cell Science* **119**, 4623–4633. doi:10.1242/jcs.03236
- Yan, X., Zhang, B., Lu, W., Peng, L., Yang, Q., Cao, W., Lin, S., Yu, W., Li, X., Ke, Y., Li, S., Yang, W., and Luo, J. (2017). Increased Src Family Kinase Activity Disrupts Excitatory Synaptic Transmission and Impairs Remote Fear Memory in Forebrain Shp2-Deficient Mice. *Molecular Neurobiology* **54**, 7235–7250. doi:10.1007/s12035-016-0222-7
- Yang, M., and Leonard, J. P. (2001). Identification of mouse NMDA receptor subunit NR2A C-terminal tyrosine sites phosphorylated by coexpression with v-Src. *Journal of Neurochemistry* **77**, 580–588. doi:10.1046/j.1471-4159.2001.00255.x
- Yang, M. S., and Gill, M. (2007). A review of gene linkage, association and expression studies in autism and an assessment of convergent evidence. *International Journal of Developmental Neuroscience* **25**, 69–85. doi:10.1016/j.ijdevneu.2006.12.002
- Yang, Y., Estrada, E. Y., Thompson, J. F., Liu, W., and Rosenberg, G. A. (2007). Matrix metalloproteinase-mediated disruption of tight junction proteins in cerebral vessels is reversed by synthetic matrix metalloproteinase inhibitor in focal ischemia in rat. *Journal of Cerebral Blood Flow and Metabolism: Official Journal of the International Society of Cerebral Blood Flow and Metabolism* **27**, 697–709. doi:10.1038/sj.jcbfm.9600375
- Yao, Y., and Mayer, M. L. (2006). Characterization of a soluble ligand binding domain of the NMDA receptor regulatory subunit NR3A. *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience* **26**, 4559–4566. doi:10.1523/JNEUROSCI.0560-06.2006
- Yasuda, H., Barth, A. L., Stellwagen, D., and Malenka, R. C. (2003). A developmental switch in the signaling cascades for LTP induction. *Nature Neuroscience* **6**, 15–16. doi:10.1038/nn985
- Yepes, M., Sandkvist, M., Moore, E. G., Bugge, T. H., Strickland, D. K., and Lawrence, D. A. (2003). Tissue-type plasminogen activator induces opening of the blood-brain barrier via the LDL receptor-related protein. *The Journal of Clinical Investigation* **112**, 1533–1540. doi:10.1172/JCI19212

- Yi, Z., Petralia, R. S., Fu, Z., Swanwick, C. C., Wang, Y.-X., Prybylowski, K., Sans, N., Vicini, S., and Wenthold, R. J. (2007). The role of the PDZ protein GIPC in regulating NMDA receptor trafficking. *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience* **27**, 11663–11675. doi:10.1523/JNEUROSCI.3252-07.2007
- Yonan, A. L., Alarcón, M., Cheng, R., Magnusson, P. K. E., Spence, S. J., Palmer, A. A., Grunn, A., Juo, S.-H. H., Terwilliger, J. D., Liu, J., Cantor, R. M., Geschwind, D. H., and Gilliam, T. C. (2003). A genomewide screen of 345 families for autism-susceptibility loci. *American Journal of Human Genetics* **73**, 886–897. doi:10.1086/378778
- Yoo, H. J., Cho, I. H., Park, M., Yang, S. Y., and Kim, S. A. (2012). Family based association of GRIN2A and GRIN2B with Korean autism spectrum disorders. *Neuroscience Letters* **512**, 89–93. doi:10.1016/j.neulet.2012.01.061

## Z

- Zamolodchikov, D., Bai, Y., Tang, Y., McWhirter, J. R., Macdonald, L. E., and Alessandri-Haber, N. (2019). A Short Isoform of Coagulation Factor XII mRNA Is Expressed by Neurons in the Human Brain. *Neuroscience* **413**, 294–307. doi:10.1016/j.neuroscience.2019.05.040
- Zhang, C., An, J., Strickland, D. K., and Yepes, M. (2009). The low-density lipoprotein receptor-related protein 1 mediates tissue-type plasminogen activator-induced microglial activation in the ischemic brain. *The American Journal of Pathology* **174**, 586–594. doi:10.2353/ajpath.2009.080661
- Zhang, L., Zhang, Z. G., Buller, B., Jiang, J., Jiang, Y., Zhao, D., Liu, X., Morris, D., and 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. doi:10.1161/STROKEAHA.109.577288
- Zhang, S. Q., Yang, W., Kontaridis, M. I., Bivona, T. G., Wen, G., Araki, T., Luo, J., Thompson, J. A., Schraven, B. L., Philips, M. R., and Neel, B. G. (2004). Shp2 regulates SRC family kinase activity and Ras/Erk activation by controlling Csk recruitment. *Molecular Cell* **13**, 341–355. doi:10.1016/s1097-2765(04)00050-4
- Zhao, J.-J., Liu, Z.-W., Wang, B., Huang, T.-Q., Guo, D., Zhao, Y.-L., and Song, J.-N. (2019). Inhibiting endogenous tissue plasminogen activator enhanced neuronal apoptosis and axonal injury after traumatic brain injury. *Neural Regeneration Research* **15**, 667–675. doi:10.4103/1673-5374.266914
- Zheng, F., Gingrich, M. B., Traynelis, S. F., and Conn, P. J. (1998). Tyrosine kinase potentiates NMDA receptor currents by reducing tonic zinc inhibition. *Nature Neuroscience* **1**, 185–191. doi:10.1038/634
- Zhuo, M., Holtzman, D. M., Li, Y., Osaka, H., DeMaro, J., Jacquin, M., and Bu, G. (2000). Role of tissue plasminogen activator receptor LRP in hippocampal long-term potentiation. *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience* **20**, 542–549.
- Zorio, E., Gilabert-Estellés, J., España, F., Ramón, L. A., Cosín, R., and Estellés, A. (2008). Fibrinolysis: the key to new pathogenetic mechanisms. *Current Medicinal Chemistry* **15**, 923–929. doi:10.2174/092986708783955455

## Modulation de la signalisation glutamatergique par l'activateur tissulaire du plasminogène et le récepteur MET dans le système nerveux central

### Résumé

L'activateur tissulaire du plasminogène (tPA) est une sérine protéase initialement découverte dans le compartiment vasculaire, qui constitue la molécule active de l'Actilyse®, médicament utilisé en clinique dans la phase aiguë de l'AVC ischémique pour ses propriétés fibrinolytiques. Le tPA est également exprimé dans le parenchyme cérébral où il peut moduler la neurotransmission glutamatergique de type NMDA (N-Méthyl-D-Aspartate). Cette protéase existe sous deux formes actives : une forme simple chaîne (sc-tPA) et une forme double chaîne (tc-tPA). Malgré une activité fibrinolytique similaire, ces deux formes de tPA ont des rôles distincts. En effet, seul le sc-tPA peut potentialiser la mort neuronale de type excitotoxique induite par du NMDA. Ainsi, afin de mieux comprendre ces différences de signalisation entre les deux formes de tPA, nous avons utilisé des cultures primaires de neurones corticaux traitées avec du sc-tPA et du tc-tPA. Nos résultats ont mis en évidence l'implication d'un nouveau récepteur partenaire, le récepteur MET au sein de la signalisation glutamatergique de type NMDA. Nous avons montré que seul le tc-tPA active les récepteurs MET, conduisant à une augmentation de la proximité des récepteurs NMDA et MET à la surface neuronale. De plus, le tc-tPA diminue la phosphorylation de GluN2B et dégrade cette même sous-unité. En imagerie calcique, l'utilisation d'inhibiteurs sélectifs de MET reverse l'effet du tc-tPA sur la signalisation des récepteurs NMDA. En parallèle, l'étude transcriptomique menée sur des souris déficientes en tPA (tPA Null) a révélé une diminution du nombre de transcrits MET dans l'amygdale et le cortex entorhinal ainsi que des déficits comportementaux caractéristiques des troubles du spectre autistique.

Mots clés : tPA, excitotoxicité, récepteur NMDA, récepteur MET, troubles du spectre autistique

## Modulation of glutamatergic signaling by tissue-type plasminogen activator and MET receptor in the central nervous system

### Abstract

Tissue-type plasminogen activator (tPA) is a serine protease originally discovered in the vascular compartment. It is the active compound of Actilyse®, the only-approved drug for the clinical treatment of the acute phase of ischemic stroke thanks to its fibrinolytic properties. tPA is also expressed in the cerebral parenchyma where it modulates the NMDA (N-Methyl-D-aspartate) glutamatergic neurotransmission. This protease exists in two active forms: a single chain tPA form (sc-tPA) and a two chain tPA form (tc-tPA). Despite a similar fibrinolytic activity, these two forms have different roles within the parenchyma. Indeed, only sc-tPA potentiates excitotoxic neuronal death induced by NMDA. In order to better understand the signalling pathways involved by each forms of tPA, we used primary cultures of cortical neurons treated with sc-tPA or tc-tPA. Our results have highlighted the implication of a new partner receptor, MET, within NMDA glutamatergic signalling. We have shown that only tc-tPA activates MET receptors, leading to an increase of the proximity between MET and NMDA receptors at the neuronal surface. Moreover, tc-tPA decreases the GluN2B phosphorylation and allows the degradation of this subunit. By using calcium imaging, MET inhibitors reverses the effect of tc-tPA on NMDA receptors signalling. In parallel, a transcriptomic study realized on tPA-deficient mice (tPA Null) revealed a decrease of *MET* gene in two cerebral structures: amygdala and entorhinal cortex in addition to behavioural deficits which are features of autism spectrum disorder.

Keywords: tPA, excitotoxicity, NMDA receptor, MET receptor, autism spectrum disorder