



HAL
open science

Influence de l'activateur tissulaire du plasminogène sur la lignée oligodendrocytaire et dans le processus de myélinisation

Barbara Delaunay

► **To cite this version:**

Barbara Delaunay. Influence de l'activateur tissulaire du plasminogène sur la lignée oligodendrocytaire et dans le processus de myélinisation. Biologie cellulaire. Normandie Université, 2020. Français. NNT : 2020NORMC411 . tel-03270898

HAL Id: tel-03270898

<https://theses.hal.science/tel-03270898>

Submitted on 25 Jun 2021

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

Influence de l'activateur tissulaire du plasminogène sur la lignée oligodendrocytaire et dans le processus de myélinisation

**Présentée et soutenue par
Barbara DELAUNAY**

**Thèse soutenue publiquement le 13/10/2020
devant le jury composé de**

Mme VERONIQUE MIRON	Directeur de recherche, Université Edinbourg	Rapporteur du jury
M. BRAHIM NAIT OUMESMAR	Directeur de recherche, Hôpital Pitié-Salpêtrière	Rapporteur du jury
Mme ISABELLE BARDOU	Maître de conférences, Université Caen Normandie	Membre du jury
Mme VALERIE BESSON	Maître de conférences HDR, Université Paris 5 Descartes	Membre du jury
M. DENIS VIVIEN	Professeur des universités PraticienHosp, Université Caen Normandie	Président du jury
M. ERIC MAUBERT	Maître de conférences HDR, Université Caen Normandie	Directeur de thèse

Thèse dirigée par ERIC MAUBERT, Physiopathologie et imagerie des troubles neurologiques



UNIVERSITÉ
CAEN
NORMANDIE



Normandie de Biologie Intégrative,
Santé, Environnement



La science pour la santé
From science to health

Résumé

L'activateur tissulaire du plasminogène (tPA) est une sérine protéase, impliquée dans de nombreux processus physiopathologiques au sein du système nerveux central (*e.g.* corticogenèse, rôle anti-apoptotique sur les oligodendrocytes). Des travaux du laboratoire ont montré que la migration oligodendrocytaire était retardée chez des souris déficientes en tPA comparativement à des souris sauvages au cours du développement embryonnaire. Les cellules précurseurs d'oligodendrocytes (OPCs) doivent se différencier en oligodendrocytes myélinisants afin d'enrouler leurs prolongements et de former une gaine de myéline. Mes travaux de thèse ont consisté à étudier les effets du tPA sur ces paramètres au cours du développement dans la moelle épinière chez la souris. Nos travaux montrent dans un premier temps, que le tPA est exprimé de façon transitoire au sein d'oligodendrocytes myélinisants. L'expression de tPA au sein de ces cellules est transitoire, atteignant un pic à 15 jours post-natal, qui correspond à la phase active de la myélinisation. Dans un second temps, dans un modèle de souris déficientes en tPA, un retard de différenciation des OPCs vers un phénotype d'oligodendrocytes matures au cours du développement embryonnaire est observé. Nous mettons également en évidence, un phénotype dysmyélinique chez les souris déficientes en tPA (myéline non compacte et anomalies ultrastructurelles de la myéline). Bien que ce phénotype ne présente ni des différences dans la tractographie des fibres détectables à l'IRM et ni de troubles dans la conduction nerveuse, des atteintes de la démarche ont pu être mises en évidence. Le tPA semble donc être un facteur déterminant dans la compaction de la gaine de myéline. Les souris déficientes en tPA pourraient être un modèle relevant pour étudier les pathologies dysmyélinisantes.

Abstract

Tissue-type plasminogen activator (tPA) is a serine protease involves in many central nervous system physiopathological processes (*e.g.* corticogenesis, anti-apoptotic effect on oligodendrocytes). Our laboratory has shown that oligodendrocyte migration was delayed in tPA-deficient mice during embryonic development. In order to become myelinating cells, oligodendrocyte precursors cells (OPCs) had to differentiate, and wrap their processes around axons to form a myelin sheath. My thesis work consisted in studying the effects of tPA on these parameters throughout development in mice spinal cord. First, we showed a transient expression of tPA in myelinating cells, reaching a peak at P15, which corresponds to active myelination. Secondly, we observed a delay in OPCs differentiation towards a myelinating phenotype. Furthermore, tPA-deficient mice displays a dysmyelination phenotype with uncompacted myelin and ultrastructure anomalies. Neither differences in fiber tractography of spinal cord tracts detectable on MRI, nor central conduction disorders were revealed in this phenotype. However, tPA-deficient mice displayed gait abnormalities. Consequently, tPA seems to be a important factor to drive myelin compaction and tPA-deficient mice could be a relevant model to study dysmyelinating disorders.

Table des matières

Introduction	
1 Historique.....	1
2 La myéline	3
2.1 <i>Composition de la myéline</i>	4
2.1.1 <i>Composition lipidique</i>	4
2.1.2 <i>Composition protéique</i>	4
2.2 <i>Rôles physiologiques attribués à la gaine de myéline</i>	7
2.2.1 <i>Conduction saltatoire du potentiel d'action</i>	7
2.2.2 <i>Maturation de l'axone</i>	7
2.2.3 <i>Support métabolique</i>	8
3 La myélinisation dans la moelle épinière	9
3.1 <i>Développement de la moelle épinière</i>	9
3.2 <i>Mise en place des populations neurales dans le tube neural</i>	11
3.3 <i>Mise en place des progéniteurs oligodendrocytaires</i>	12
3.4 <i>Prolifération et survie des cellules oligodendrocytaires</i>	15
3.5 <i>Migration des cellules oligodendrocytaires</i>	16
3.5.1 <i>Facteurs chimiotactiques</i>	16
3.5.2 <i>Matrice extracellulaire</i>	18
3.5.3 <i>Signaux d'arrêt</i>	19
3.6 <i>Différenciation des cellules de la lignée oligodendrocytaire</i>	20
3.6.1 <i>La lignée oligodendrocytaire</i>	20
3.6.2 <i>Régulations de la différenciation</i>	23
3.7 <i>Enroulement, segments et ultrastructure de la gaine de myéline</i>	26
3.7.1 <i>Enroulement de la gaine de myéline</i>	26

3.7.2	<i>Segments myéliniques et régions nodales</i>	28
3.7.3	<i>Ultrastructure de la gaine de myéline</i>	31
3.7.4	<i>Régulation du contact axo-gliale et enroulement</i>	32
4	Myélinisation au cours de la vie adulte	34
5	Pathologies dysmyélinisantes et modèles murins	36
5.1	<i>Maladie de Pelizaeus-Merzbacher</i>	37
5.1.1	<i>Historique</i>	37
5.1.2	<i>Formes cliniques</i>	37
5.2	<i>Paraplégie spastique liée au chromosome X</i>	38
5.3	<i>Modèles murins des PLP-pathies</i>	39
5.3.1	<i>Perte de fonction</i>	39
5.3.2	<i>Gain de fonction</i>	41
1	Historique	45
2	Structure du tPA	46
3	Distribution et expression du tPA dans le système nerveux central	48
3.1	<i>Dans l'encéphale</i>	48
3.2	<i>Dans la moelle épinière</i>	49
3.3	<i>Expressions cellulaires</i>	50
4	Implications physiologiques et pathologiques du tPA	52
4.1	<i>tPA : Mort apoptotique</i>	52
4.1.1	<i>Neurones</i>	52
4.1.2	<i>Oligodendrocytes</i>	53
4.2	<i>tPA : Stress du réticulum endoplasmique</i>	53
4.3	<i>tPA : Migration cellulaire</i>	54
4.3.1	<i>Migration neuronale et corticogenèse</i>	54
4.3.2	<i>Migration oligodendrocytaire et (re)myélinisation</i>	55

4.4	<i>tPA : Neuroinflammation et dommages de la substance blanche</i>	57
4.4.1	<i>Sclérose en plaques et encéphalomyélite auto-immune expérimentale</i>	57
4.4.2	<i>Lésion médullaire</i>	59
	Objectifs	61
	Résultats.....	65
	Discussion.....	109
1	Synthèse des résultats.....	113
2	Le tPA et le processus de myélinisation.....	113
2.1	<i>Le tPA et la spécification oligodendrocytaire</i>	113
2.2	<i>Expression du tPA dans les oligodendrocytes</i>	114
2.3	<i>tPA, un nouvel acteur de la myélinisation</i>	116
2.3.1	<i>Différenciation oligodendrocytaire</i>	116
2.3.2	<i>Profil de myélinisation des souris déficientes en tPA</i>	120
3	tPA et répercussions fonctionnelles	125
4	Expression transitoire du tPA	127
	Références bibliographiques	129
	Autres travaux	151

Index des figures

Figure 1	Portrait et illustration d'Andreas Vesalius.	1
Figure 2	Première description de la myéline.	2
Figure 3	Illustration d'un nœud de Ranvier.	3
Figure 4	Représentation schématique de la localisation des principales protéines de la myéline.	5
Figure 5	Neurulation chez les Vertébrés.	9
Figure 6	La fermeture du tube neural.	10
Figure 7	Spécification neurale au sein du tube neural.	12
Figure 8	Mise en évidence <i>in vitro</i> de l'origine ventrale des OPCs.	13
Figure 9	Expression génique de PDGFR α dans la moelle épinière de rat à E14.	13
Figure 10	La nétrine-1 participe à l'initiation de la migration des OPCs au sein de la moelle épinière.	17
Figure 11	CXCR4 est nécessaire pour la migration des OPCs vers la région dorsale de la moelle épinière.	17
Figure 12	Les OPCs migrent le long des vaisseaux sanguins.	18
Figure 13	L'arrêt de la migration oligodendrocytaire est médiée par CXCR2.	19
Figure 14	Illustrations des différentes cellules de la lignée oligodendrocytaire.	20
Figure 15	Représentation schématique des stades de développement de la lignée oligodendrocytaire.	21
Figure 16	Différentes sous-populations de la lignée oligodendrocytaire.	23
Figure 17	Expression des gènes codants pour les protéines de la myéline dans la moelle épinière en présence ou en l'absence de Sox10.	24
Figure 18	La surexpression de Sox17 induit une hypomyélinisation.	25
Figure 19	La suppression de Sox17 affecte la différenciation des oligodendrocytes et la myélinisation.	25
Figure 20	Modèle de biogenèse de la myéline dans le SNC, partie I.	27
Figure 21	Modèle de biogenèse de la myéline dans le SNC, partie II.	28
Figure 22	Représentation schématique de l'organisation des différents segments myéliniques bordant le nœud de Ranvier.	28
Figure 23	Représentation schématique des contacts neuro-gliaux au niveau des nœuds de Ranvier.	30
Figure 24	Illustration schématique de la structure de la gaine de myéline.	31
Figure 25	Formation de nouveaux internœuds et plasticité de la gaine de myéline au cours de la vie adulte.	36
Figure 26	Classification clinique des formes de « PLP-pathies ».	38
Figure 27	Composantes radiales vs composantes diagonales.	40
Figure 28	Les souris déficientes en PLP présentent un défaut de compaction de la gaine de myéline.	40
Figure 29	Localisations des différentes mutations présentes sur la protéine PLP dans les modèles de mutations spontanées ponctuelles.	41
Figure 30	Profil d'expression des protéines de myéline dans la moelle épinière cervicale entre les souris sauvages et jimpy au cours du développement.	42
Figure 31	Structure et implications physiologiques des différents domaines du tPA.	46

Figure 32 Expression spatio-temporelle du tPA lors du développement embryonnaire de la souris.	48
Figure 33 Expression et régulation du tPA au cours du développement cérébelleux.	49
Figure 34 Expression spatio-temporelle du tPA lors du développement embryonnaire de la souris.	49
Figure 35 Hybridation <i>in situ</i> révélant les ARNm codants pour le tPA dans la moelle épinière de rat.	50
Figure 36 Expression du tPA par les différentes cellules du SNC chez la souris adulte	50
Figure 37 L'activateur tissulaire du plasminogène joue un rôle clé dans la corticogénèse.	54
Figure 38 La migration de l'OPCs est retardée chez les souris tPA ^{-/-} pendant le développement de la moelle épinière.	55
Figure 39 Le tPA favorise la migration des oligodendrocytes le long des vaisseaux pendant le développement en période de migration intense.	56
Figure 40 La progression de l'EAE-MOG est moins sévère chez les souris déficientes en tPA.	58
Figure 41 La progression de l'EAE-MOG est plus sévère chez les souris déficientes en tPA.	58
Figure 42 L'expression de tPA est retrouvée très tôt au cours du développement embryonnaire au niveau de la moelle épinière.	114
Figure 43 L'expression des ARNs codant pour la M/neurosin est associée aux oligodendrocytes CNP et NG2.	115
Figure 44 Expression des transcrits de trois sérine protéases au sein de la lignée oligodendrocytaire.	116
Figure 45 Caractérisations morphologiques des cellules de la lignée oligodendrocytaire <i>in vitro</i> .	116
Figure 46 Quantification des oligodendrocytes selon des critères morphologiques ou immunocytochimiques.	117
Figure 47 La triiodothyronine favorise la différenciation des oligodendrocytes <i>in vitro</i> .	118
Figure 48 L'expression de tPA n'est pas associée aux oligodendrocytes à P0 chez le raton.	118
Figure 49 Profil de différenciation des oligodendrocytes dans un modèle <i>in vitro</i> en présence de nanofibres.	120
Figure 50 Photomicrographies représentatives du cordon dorsal de la moelle épinière à P15.	121
Figure 51 La ligne intrapériodique est altérée chez le souris déficientes en PLP.	121
Figure 52 Expression des transcrits et	123
Figure 53 Modèle hypothétique montrant comment l'élimination du glycocalyx démasque l'adhésivité de la PLP.	124
Figure 54 Les souris déficientes en tPA présentent une activité locomotrice accrue à P15.	126
Figure 55 Expression de tPA par les oligodendrocytes après dommage de la substance blanche.	127

Liste des abréviations

ADAMTS-4	<i>a disintegrin and metalloproteinase with thrombospondin motifs 4</i>
APC	<i>adenomatous polyposis coli</i>
Arp2/3	<i>actin-related protein 2/3</i>
AVC	accident vasculaire cerebral
bFGF	<i>basic fibroblast growth factor</i>
bHLH	<i>basic helix-loop-helix</i>
BMP	<i>bone morphogenetic protein</i>
Caspr	<i>contactin associated protein</i>
CCR4	<i>chemokine receptor 4</i>
CNP	<i>2',3'-cyclic nucleotide 3'-phosphodiesterase</i>
CNTF	<i>ciliary neurotrophin factor</i>
COPs	<i>differentiation committed oligodendrocyte precursor cells</i>
CS	<i>Carnegie stage</i>
CSPGs	chondroïtines sulfate protéoglycane
CST	<i>corticospinal tract</i>
CXCL12	<i>C-X-C motif ligand 12</i>
DC	<i>diagonal component</i>
E	jour embryonnaire
EAE	encéphalomyélite auto-immune expérimentale
EGF	<i>epidermal growth factor</i>
EGFR	<i>epidermal growth factor receptor</i>
FA	<i>fractional anisotropy</i>
FCN	ferricyanure
GalC ou GC	galactocérébroside
GFAP	<i>glial fibrillary acidic protein</i>
Golli	<i>gene associated with oligodendrocyte lineage</i>
GPR17	<i>G-protein coupled receptor 17</i>
HMGB	<i>high mobility group box</i>

HSP	<i>hereditary spastic paraplegia</i>
IGF-1	<i>insulin growth factor-1</i>
IPL	<i>intra-periodic line</i>
IRM	imagerie par résonance magnétique
jp	<i>jimpy</i>
KO	<i>knock-out</i>
LBS	<i>lysine binding site</i>
LINGO-1	<i>leucine rich repeat and immunoglobulin like domain containing protein 1</i>
LPC	<i>lysophosphatidylcholine</i>
LPS	<i>lipopolysaccharid</i>
LRP	<i>low density lipoprotein receptor related protein</i>
MAG	<i>myelin associated glycoprotein</i>
MBP	<i>myelin basic protein</i>
MDL	<i>major dense line</i>
MEC	matrice extracellulaire
MFOLs	<i>myelin forming oligodendrocytes</i>
MOG	<i>myelin oligodendrocyte glycoprotein</i>
MOLs	<i>mature oligodendrocytes</i>
msd	<i>myelin synthesis deficient</i>
Nav	canaux sodiques voltage-dépendants
NFOLs	<i>newly-formed oligodendrocytes</i>
NG2	<i>neuroglial antigen-2</i>
NMDA	N-methyl-D-aspartate
NT-3	<i>neurotrophin 3</i>
OGD	<i>oxygen glucose deprivation</i>
OLs	<i>oligodendrocytes</i>
OPCs	<i>oligodendrocyte precursor cells</i>
Os	osmium
P	post-natal

P27/Kip1	<i>cyclin-dependant kinase inhibitor 1B</i>
PDGF-CC	<i>platelet derived growth factor CC</i>
PDGFR α	<i>platelet derived growth factor receptor alpha</i>
PI3K	<i>phosphatidylinositol-3-kinase</i>
PKC	<i>protéine kinase C</i>
PLAT	<i>plasminogen activator tissue-type</i>
PLP	<i>proteolipid protein</i>
PMD	<i>Pelizaeus-Merzbacher disease</i>
pMN	<i>progenitor motoneurons</i>
PSA-NCAM	<i>polysialylated-neural cell adhesion molecule</i>
RC	<i>radial component</i>
RE	<i>réticulum endoplasmique</i>
RNP	<i>ribonucléoprotéique</i>
rsh	<i>rumpshaker</i>
sc-tPA	<i>single chain tPA</i>
SEP	<i>sclérose en plaques</i>
Shh	<i>sonic hedgehog</i>
SNC	<i>système nerveux central</i>
Sox	<i>Sex determining region Y-box</i>
SPG	<i>spastic paraplegia</i>
SRY	<i>Sex determining region</i>
T3	<i>triiodothyronine</i>
TAG1	<i>transient axonal glycoprotein 1</i>
tc-tPA	<i>two chain tPA</i>
tPA	<i>tissue-type plasminogen activator</i>
UPR	<i>unfolded protein response</i>
Wnt	<i>Wingless integration site</i>
WT	<i>wild-type</i>

Avant-propos

Le système nerveux central (SNC) est doté de 85 à 100 milliards de cellules nerveuses excitables : les neurones. Ces derniers, établissent chacun 1000 à 10 000 connexions et forment un véritable réseau couramment appelé « matière grise ». La propagation du potentiel d'action le long des axones, nécessite un système de transmission rapide qui est permise par la formation d'une gaine de myéline autour des axones entraînant une conduction saltatoire de l'influx nerveux. Ce réseau de fibres myélinisées constitue la substance blanche dont les gaines isolantes sont formées dans le SNC par des cellules gliales spécialisées nommées les oligodendrocytes. Chez les Vertébrés, cette étape cruciale que l'on nomme myélinisation, est apparue il y a environ 425 millions d'années chez les poissons à mâchoires ou placodermes (Zalc *et al.*,2008). Ce processus permet d'accélérer 50 à 100 fois la conduction nerveuse comparativement à celle de fibres non myélinisées chez les Invertébrés (Zalc *et al.*,2008). Les oligodendrocytes sont essentiels pour le fonctionnement et la survie des axones et ce indépendamment de la présence d'une gaine de myéline (Nave, 2010). Ils ont la capacité de détecter les besoins énergétiques des neurones et de leur fournir un soutien métabolique, en les réapprovisionnant en nutriments tels que le pyruvate ou le lactate (Saab *et al.*,2013).

Ces travaux de thèse étant centrés sur les processus conduisant à la myélinisation au sein de la moelle épinière au cours du développement ; cette première partie sera consacrée à la description des oligodendrocytes, à leur genèse dans le tube neural et à la formation de la gaine de myéline.

Une seconde partie sera consacrée à l'activateur tissulaire du plasminogène, une sérine protéase plus communément connue sous le nom de tPA. La majorité des travaux au sein du laboratoire sont centrés sur les implications de cette protéine dans les processus physiopathologiques au sein du système nerveux central. Bien qu'initialement décrite pour son activité fibrinolytique et son expression au sein des cellules endothéliales, aujourd'hui il est établi que le tPA est exprimé par de nombreuses cellules gliales, dont les oligodendrocytes. Sa structure lui permet d'interagir avec de nombreux récepteurs, ce qui lui confère de nombreuses fonctions centrales. Parmi elles nous pouvons citer son implication dans la migration neuronale et au cours de la corticogenèse, ses propriétés anti-apoptotiques sur les oligodendrocytes et son influence sur la migration oligodendrocytaire dans un contexte développementale et pathologique. Cependant son implication dans la mise en place de la

myélinisation, notamment dans la différenciation, l'enroulement et la compaction de la gaine de myéline n'a pas encore été étudiée.

L'objectif de ce travail de thèse a donc été d'évaluer l'implication du tPA dans les processus de myélinisation au cours du développement de la moelle épinière. Les résultats de ces travaux seront présentés sous forme d'article. Pour finir, ces résultats seront commentés et mis en perspectives dans une discussion générale.

Introduction

Les oligodendrocytes et le processus de myélinisation

1 Historique

Le médecin Andreas Vesalius (1514-1564), considéré comme le père de l'anatomie moderne, s'est consacré à l'étude de l'encéphale dans son septième et dernier livre « *De humani corporis fabrica libri septem* » (plus communément appelé *La Fabrica*). Il fut alors le premier à distinguer la « matière grise » de la « matière blanche » du cerveau humain (**Figure 1**). « *Toute la substance du cerveau, n'est pas également blanche ; celle qui recouvre les circonvolutions est jaunâtre ou cendrée, et répandue partout en couches égales, tant sur les circonvolutions que dans les anfractuosités, de manière qu'elle a l'air d'en doubler les reliefs.* »

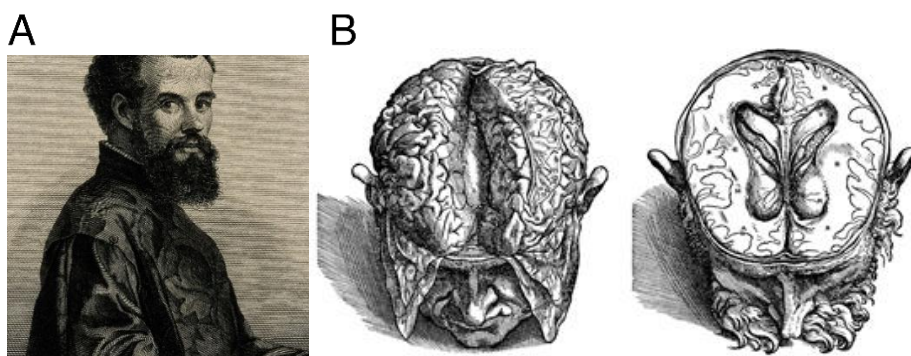


Figure 1 Portrait et illustration d'Andreas Vesalius.

Andreas Vesalius (1514-1564 ; A) ; Illustrations extraites du livre *De Humani Corporis Fabrica* (B).

La première description de fibres myélinisées associées à des axones revient à Antony van Leeuwenhoek (1632-1723) en 1717 ; il nomme ces structures « tubes nerveux » (**Figure 2 A-C**). En 1781, le physicien et naturaliste Felice Gaspar Fontana (1730-1805), observe qu'une structure cylindrique transparente composée de fils extrêmement fins enveloppait et doublait l'épaisseur de ces tubes nerveux, il introduit alors le terme de cylindre nerveux primitif : “*The nerve is composed of a large number of transparent, homogeneous, uniform, and very simple cylinders ... Each of these cylinders is endowed by an envelope in shape of outer sheath, which is composed of an immense number of winding threads*” (**Figure 2 D**).

L'avancée majeure dans la description de la myéline, fut faite en 1833 par Christian Gottfried Ehrenberg (1795–1876). Plus d'un siècle après la publication des travaux de van Leeuwenhoek, Ehrenberg démontre pour la première fois l'existence de ces fibres myélinisées dans la substance blanche du SNC (**Figure 2 E**). Ensuite, l'embryologiste Robert Remak (1815-1865), décrit en 1836 que l'acquisition de cette enveloppe autour des fibres nerveuses se fait durant le développement. Deux ans plus tard, il rapporte l'existence de deux types de fibres : les fibres myélinisées et les fibres amyéliniques.

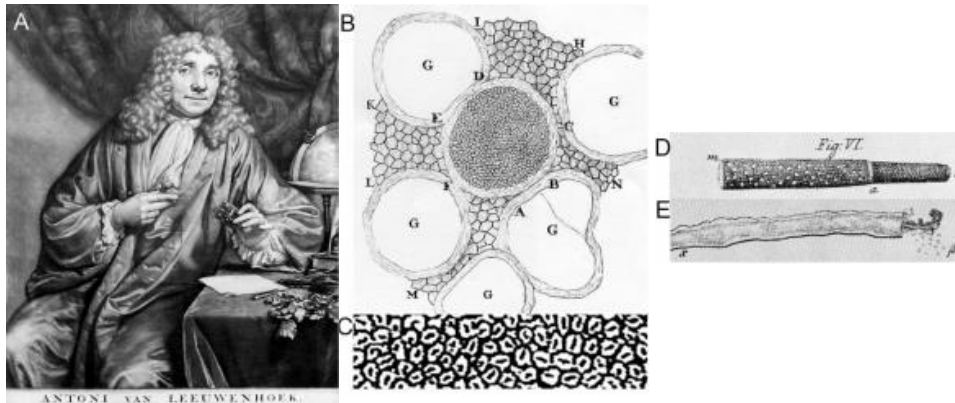


Figure 2 Première description de la myéline.

Antoni van Leeuwenhoek par le peintre Verkolje en 1686 (A). Illustration d'une section de nerfs de vache ou de mouton (B) avec le détail en (C) des patterns des fibres myélinisées (van Leeuwenhoek, 1719). « Cylindre nerveux primitif » partiellement dépouillé de sa gaine rugueuse à droite (Fontana, 1781 ; D). Fibre myélinisée vertébrale de grenouille : "un tube nerveux à double paroi contenant la moelle nerveuse proprement dite et le tube cérébral structuré transparent, émergeant en β" (pour revue Boullerne, 2016 ; E).

Ce n'est qu'en 1854 que le terme « myéline » a été introduit pour la première en fois par Rudolf Ludwig Virchow (1821-1902) ; ce terme dérive du grec *myelos* qui signifie moelle. Il la décrit comme une substance constituée par les mêmes éléments que ceux de la masse jaune des œufs de poule. En 1872, Louis-Antoine Ranvier (1835-1922) émet l'hypothèse que la myéline n'est pas continue sur toute la longueur de l'axone. Il écrit « *Si la myéline liquide était continue dans toute la longueur du tube nerveux, dans le nerf sciatique de l'Homme par exemple, qui, dans notre attitude habituelle, est disposé verticalement, elle descendrait par son propre poids jusque dans la partie la plus déclive, il n'en resterait plus rien à la partie supérieure du nerf* ». Il remarque la présence d'une gaine de myéline rétrécie à certains points, qu'il nomme « étranglements annulaires » et rapporte que l'espace se trouvant entre deux étranglements est dépourvu de myéline. Aujourd'hui cette partie amyélinique est connue comme étant les Nœuds de Ranvier (**Figure 3**).

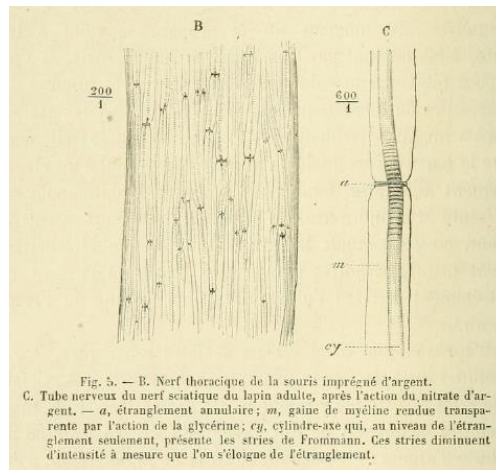


Figure 3 Illustration d'un nœud de Ranvier.

Tirée de l'ouvrage "Leçons sur l'histologie du système nerveux central" du Dr Louis-Antoine Ranvier (1878).

En 1899, en utilisant une longue imprégnation au platine, William Ford Robertson (1867-1923) révèle la présence de cellules ramifiées, dont la morphologie différait de celles des neurones et des astrocytes. Il les nomme les cellules mésogliales. C'est la première fois que les extensions cytoplasmiques des oligodendrocytes furent mises en évidence mais Robertson considéra que ces cellules mésogliales étaient une entité à part entière, distincte de la myéline. La découverte légitime des oligodendrocytes est attribuée à Pio del Río-Hortega (1882-1945) en 1921. En utilisant une coloration de carbonate d'argent, il a pu révéler que l'extension de la membrane plasmique des oligodendrocytes s'enroulait autour des axones.

2 La myéline

Afin de myéliniser différents axones, la majorité des oligodendrocytes peut générer entre 20 et 60 prolongements et réaliser une centaine de tours de leur membrane autour des axones (Matthews & Duncan, 1971; Hildebrand *et al.*, 1993). La longueur des segments myéliniques, que l'on nomme internœuds, varie entre 20 et 200 μm chez la souris (Chong *et al.*, 2012). Par conséquent, les oligodendrocytes doivent synthétiser une quantité importante de membrane, estimée entre 5 et $50 \cdot 10^3 \mu\text{m}^2$ de myéline par jour (Pfeiffer *et al.*, 1993). Cette formation intensive de myéline nécessite une synthèse accrue de protéines et de lipides, dont la composition singulière en fait une membrane biologique unique (Czopka *et al.*, 2013).

2.1 Composition de la myéline

La myéline est une membrane particulière. Contrairement aux autres membranes biologiques, elle est composée majoritairement de lipides (70%) et d'une faible proportion de protéines (30%).

2.1.1 Composition lipidique

La myéline est composée de trois principaux lipides : le cholestérol, les phospholipides (*e.g.* lécithine, sphingomyéline) et les glycosphingolipides (*e.g.* galactocérobroside ou GalC ou GC). La composition lipidique de la membrane constituant la myéline se distingue des autres membranes avec une quantité importante de cholestérol et une fraction enrichie de glycolipides avec un ratio de 40:40:20 (cholestérol, phospholipides et glycolipides respectivement) comparativement aux autres membranes biologiques (ratio de 25:65:10 ; O'Brien, 1965). Ces lipides ne sont pas répartis de façon homogène au sein de la membrane myélinique, mais ils forment en certains points des domaines dynamiques que l'on nomme des radeaux lipidiques ou rafts lipidiques. Ceux-ci sont caractérisés par de fortes concentrations en cholestérol et en GalC et présentent un faible taux de lécithine (Gielen *et al.*, 2006; Dupree & Pomicter, 2010). Ces lipides vont participer à la formation et à la stabilisation de la gaine de myéline grâce à l'intégration, l'extrusion et le trafic de protéines spécifiques au sein de la membrane (Lee, 2001). Bien que ces lipides ne soient pas exclusivement retrouvés dans la membrane myélinique, la GalC et son dérivé sulfaté sont considérés comme des lipides « caractéristiques » de la myéline. En effet, la GalC est retrouvée en abondance dans la myéline et elle a un rôle essentiel dans le maintien de sa stabilité (Morell & Quarles, 1999).

2.1.2 Composition protéique

Contrairement aux lipides, la myéline possède une composition protéique unique. À ce jour, on dénombre 1280 protéines associées à la myéline (Panfoli *et al.*, 2014). Dans cette sous-partie, nous nous intéresserons aux protéines les plus abondantes.

2.1.2.1 Myéline oligodendrocytaire protéine (MOG)

La MOG est une protéine transmembranaire retrouvée majoritairement à la surface extracellulaire de la gaine de myéline (Figure 4 ; Brunner *et al.*,1989). Son gène est localisé sur le chromosome 6 chez l'Homme et sur le chromosome 17 chez la souris (Pham-Dinh *et al.*,1993). Elle apparaît dans une population spécifique d'oligodendrocytes : les oligodendrocytes myélinisants (Solly *et al.*,1996). Son expression est détectée tardivement, un à deux jours après les protéines PLP et MBP (Scolding *et al.*,1989). Sa fonction n'est pas encore totalement élucidée à ce jour, mais sa localisation dans la surface la plus externe de la myéline laisse penser qu'elle pourrait avoir un rôle de protéine d'adhésion avec d'autres cellules, ou bien servir de récepteur (Peschl *et al.*,2017).

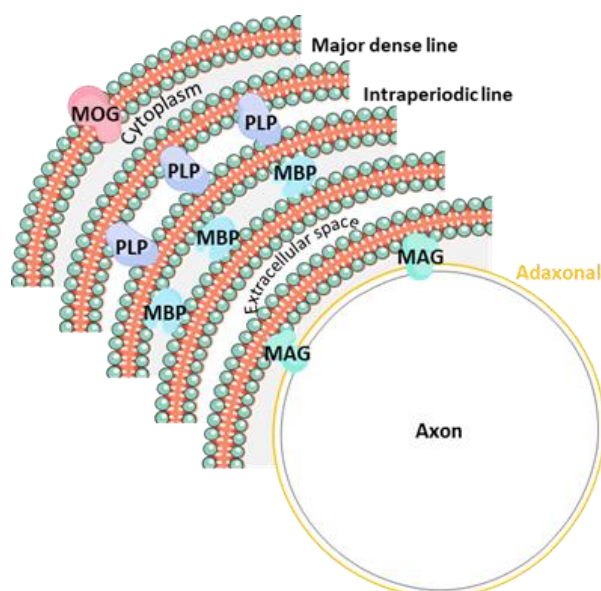


Figure 4 Représentation schématique de la localisation des principales protéines de la myéline.

La MAG se trouve au niveau adaxonal, tandis que la MOG se trouve à la face la plus externe de la myéline (abaxonale). La PLP permet l'accolement des faces externes de la myéline, nommée ligne intra-périodique. La MBP se trouve au niveau cytoplasmique des couches de myéline et forme la ligne dense majeure.

2.1.2.2 Protéolipide-protéine (PLP)

Le gène codant pour la protéine PLP est appelé *plp1* chez la souris et *PLP1* chez l'Homme. Situé sur le chromosome X chez ces deux espèces, ce gène est connu pour produire deux isoformes; la protéine PLP et la protéine DM20. L'isoforme DM20 est issue de l'épissage alternatif du gène et possède la particularité de faciliter le transport de la PLP et de réduire son accumulation au sein du réticulum endoplasmique. La PLP est une protéine transmembranaire

(Figure 4), dont la structure comprend 4 hélices α hydrophobes qui s'intègrent dans la bicouche lipidique de la membrane, 3 domaines cytoplasmiques et 2 domaines extracellulaires (Greer & Lees, 2002). Chez la souris, l'expression de la PLP débute pendant le développement embryonnaire et augmente lors des 3 premières semaines post-natales, c'est-à-dire au cours de la myélinisation. On peut souligner que la PLP est exprimée plus tardivement que la protéine DM20 (Wight & Dobretsova, 2004).

2.1.2.3 Protéine basique de la myéline (MBP)

Le gène *golli-mbp* (*gene expressed in oligodendrocyte lineage-mbp*) est localisé au niveau du chromosome 18 chez l'Homme et chez la souris. Il donnera plusieurs isoformes, produites par épissages alternatifs de l'ARNm. Chez l'Homme, il a été mis en évidence 4 isoformes : 17.2, 18.5, 20.2 et 21.5 kDa et chez la souris 6 isoformes : 14, 17.22, 17.24, 18.5, 20.2 et 21.5 kDa (Feng, 2007). Les isoformes appelées golli-MBP (14, 17.22, 17.24 et 20.2 kDa) sont exprimées très tôt au cours du développement et ne sont pas restreintes à la lignée oligodendrocytaire. En effet, leur expression est retrouvée au sein des neurones, ou bien encore dans les lymphocytes T et B situés dans la rate, les nœuds lymphatiques et le thymus (Tosic *et al.*, 2002; Marty *et al.*, 2002). Les isoformes 18.25 et 21.5 kDa de MBP, sont dites « classiques » et, sont exclusivement exprimées dans les oligodendrocytes (Wake *et al.*, 2011; Miller *et al.*, 2012). Cette protéine requiert une traduction localisée, ce qui implique que les ARNm de MBP soient transportés vers la membrane au sein de complexes ribonucléoprotéiques (RNPs) nommés granules (Kiebler & Bassell, 2006). Les RNPs sont ainsi véhiculés le long des microtubules jusqu'au niveau de la langue interne de la gaine de myéline où leur synthèse s'initiera (Kiebler & Bassell, 2006).

2.1.2.4 Glycoprotéine associée à la myéline (MAG).

La glycoprotéine MAG est un constituant mineur de la myéline représentant 1% des protéines totales. Le gène codant pour la MAG est localisé sur le chromosome 19 chez l'Homme et le chromosome 7 chez la souris (Baumann & Pham-Dinh, 2001). Contrairement aux protéines PLP et MBP, qui sont retrouvées au niveau de la myéline compacte (Figure 4 ; cf. § 6.3), la MAG ne se trouve qu'au niveau des régions non-compactes, dans la zone périaxonale (Figure 4). Bien

que sa fonction ne soit pas essentielle à la formation de la gaine de myéline, elle pourrait prévenir la myélinisation d'axones déjà préalablement myélinisés (Montag *et al.*,1994).

2.1.2.5 2',3'-cyclic nucleotide 3'-phosphodiesterase (CNP)

La CNP est l'une des protéines de la myéline possédant une activité enzymatique. Elle est codée par le gène *cnp1* localisé sur le chromosome 17 chez l'Homme et le chromosome 11 chez la souris (Baumann & Pham-Dinh, 2001). À l'instar de la MAG, la CNP est retrouvée exclusivement au niveau de la myéline non-compacte (Trapp *et al.*,1988). Récemment, une étude a montré que la CNP prévenait la compaction de la myéline (Snaidero *et al.*,2017).

2.2 Rôles physiologiques attribués à la gaine de myéline

2.2.1 Conduction saltatoire du potentiel d'action

Avant l'enroulement de la gaine de myéline, les canaux sodiques voltages dépendants sont distribués uniformément le long de l'axone. Lors de la myélinisation, ces canaux se regroupent au niveau des nœuds de Ranvier à une forte densité d'environ $12 \times 10^4/\text{mm}^2$. Après l'ouverture de ces canaux, l'entrée de sodium engendre la dépolarisation caractéristique du potentiel d'action (PA). La myéline qui couvre alors l'internœud présente une résistance élevée ainsi qu'une faible capacitance, empêchant la dépolarisation de la membrane qu'elle recouvre et permet ainsi au PA de se propager jusqu'au nœud suivant. Le PA ne se répercute pas sur les nœuds précédents car les Nav sont en phase d'inactivation engendrant la propagation des PA dans un seul sens. Cette conduction de nœud en nœud est appelée conduction saltatoire (Baumann & Pham-Dinh, 2001).

2.2.2 Maturation de l'axone

Dès 1951, Rushton a suggéré que la vitesse de conduction serait dépendante à la fois du diamètre de l'axone et de l'épaisseur de la gaine de myéline. Il a ensuite été démontré que les oligodendrocytes et la myéline jouent un rôle dans l'organisation de la structure axonale et donc du calibre de l'axone. En effet, les oligodendrocytes sont capables de favoriser la

croissance en largeur des axones en induisant l'accumulation de neurofilaments qui influencent en retour le calibre final de l'axone. Ce mécanisme est indépendamment de la formation de myéline. Enfin, l'effet propre de la myéline a été mis en évidence en comparant le diamètre axonal de régions myélinisées et non myélinisées, montrant que l'absence de myéline implique une réduction du calibre et de l'espacement des neurofilaments (Baumann & Pham-Dinh, 2001).

2.2.3 Support métabolique

Les oligodendrocytes ont également une fonction de soutien métabolique à l'axone. En effet, les neurones ont un besoin considérable d'énergie pour maintenir le gradient de sodium à travers la membrane axonale et assurer les transports antérogrades et rétrogrades de molécules. Les oligodendrocytes sont couplés aux astrocytes *via* des jonctions communicantes leur fournissant un accès direct au système vasculaire et donc un support nutritif (Tress *et al.*, 2012). Le glucose étant rapidement phosphorylé en entrant dans les cellules, il n'est pas délivré aux neurones en tant que tel. En revanche, les produits de la glycolyse comme le lactate et le pyruvate peuvent être transportés jusqu'à l'axone *via* des transporteurs monocarboxylates présents sur l'axone et les oligodendrocytes (Fünfschilling *et al.*, 2012; Rinholm & Bergersen, 2014). Ainsi, le réseau entre les astrocytes et les oligodendrocytes constitue une source principale d'énergie pour les axones puisqu'il a été montré que ceux-ci utilisent préférentiellement le lactate comme substrat oxydatif, et non le glucose (Wyss *et al.*, 2011). Ce dernier serait principalement utilisé pour maintenir un statut antioxydant plutôt qu'à des fins bioénergétiques (Saab *et al.*, 2013).

3 La myélinisation dans la moelle épinière

3.1 Développement de la moelle épinière

L'initiation de la formation du SN au cours du développement embryonnaire est nommé la neurulation. Chez l'Homme, la neurulation débute à la fin de la 3^{ème} semaine de développement (stade Carnegie 10 ou CS10) et chez la souris elle débute au 8,5^{ème} jour embryonnaire (E8,5 ; (O'Rahilly & Müller, 2002; Copp *et al.*,2003). Tout d'abord, la plaque neurale se forme, puis s'épaissit et commence à s'invaginer au niveau de la ligne médiane (Figure 5a). Ensuite, elle s'élève formant la gouttière neurale (Figure 5b) et se trouve flanquée par deux replis, les bourrelets neuraux. Puis, les parois de la gouttière neurale se rapprochent (Figure 5c) et fusionnent formant ainsi le tube neural (Figure 5d). La formation de ce dernier se fait en deux temps. La neurulation primaire donnera les régions cervico-thoraciques de la moelle épinière, tandis que les régions lombaires et sacrées seront formées lors de la neurulation secondaire (Douarin *et al.*, 2004).

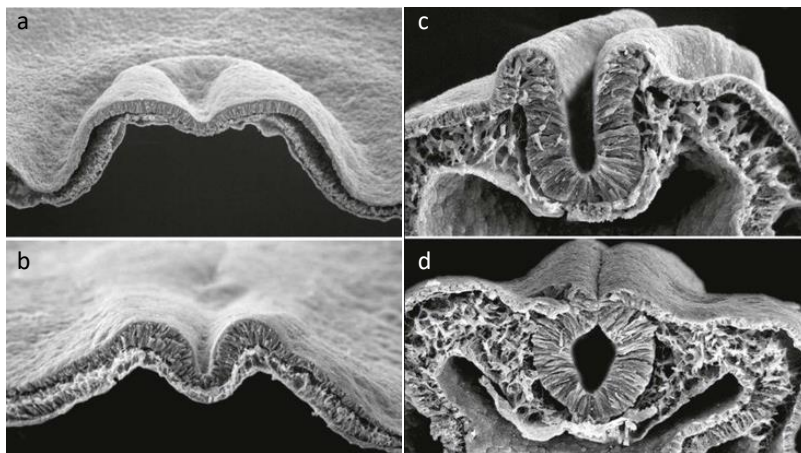


Figure 5 Neurulation chez les Vertébrés.

Photographies en microscopie électronique à balayage de coupes transversales à travers l'ectoderme dorsal de l'embryon de poulet illustrant les grandes étapes de formation du tube neural(a-d). Formation de la plaque neurale (a). Formation de la gouttière neurale (b). Rapprochement des bourrelets neuraux (c). Fusion des bourrelets neuraux et formation du tube neural (adapté de Schoenwolf, 1991; d).

La fermeture du tube neural n'a pas lieu de façon simultanée le long de l'axe antéro-postérieur de l'embryon, elle se fait de façon bidirectionnelle (Figure 6). Elle s'initie au niveau de la limite entre le rhombencéphale et la partie cervicale de la future moelle épinière (Copp *et al.*, 2003). Les régions rostrales et caudales restent ouvertes et forment les neuropores rostral (ou antérieur) et caudal (ou postérieur). La fermeture du neuropore rostral se fait au 29^{ème} jour (CS11) chez l'embryon humain et à E9.5 chez l'embryon de souris ; tandis que la fermeture caudale se fait plus tardivement (respectivement au 30^{ème} jour (CS12) et E10.5 chez l'embryon humain et de souris).

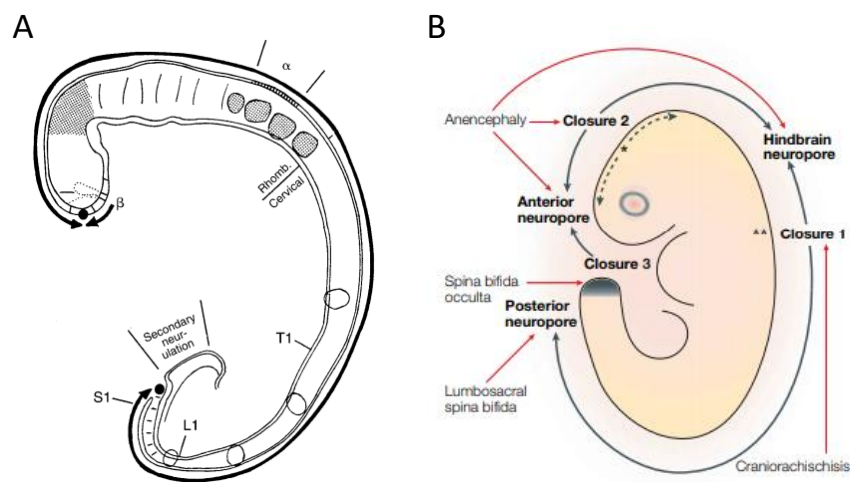


Figure 6 La fermeture du tube neural.

Représentation schématique de la fermeture du tube neural chez l'embryon humain au stade CS12. Les flèches indiquent la direction de la fermeture et les points noirs indiquent la position des deux neuropores (antérieur et postérieur). La fusion des plis neuraux commence d'abord au site α puis au site β . Au niveau du site α , la fermeture se propage dans les deux directions (O'Rahilly & Müller, 2002); A). Représentation schématique de la fermeture du tube neural chez l'embryon de souris. Le simple astérisque représente le site de fermeture entre le prosencéphale et le mésencéphale. Les doubles astérisques représentent le site de fermeture entre le rhombencéphale et la région cervicale de la moelle épinière. Les flèches indiquent la direction de la fermeture (Copp *et al.*, 2003 ; B).

Parallèlement à la formation du tube neural, une structure sous-jacente nommée la notochorde se développe (Jurand, 1974). Des études impliquant une transplantation ou l'ablation de la notochorde au cours du développement embryonnaire, montrent que cette dernière est essentielle à la formation de la partie ventrale du tube neural : la plaque du plancher (*floor plate* ; Placzek *et al.*, 1991; Yamada *et al.*, 1991). Chez la souris, l'induction de la plaque du plancher par la notochorde se produit à E8,5 sous l'influence d'un facteur morphogénique connu sous le nom de *Sonic hedgehog* (Shh). En réaction, des cellules de la plaque du plancher se mettent également à sécréter la protéine Shh à partir de E9,5 (Chamberlain *et al.*, 2008).

3.2 Mise en place des populations neurales dans le tube neural

Une des caractéristiques du SNC est sa grande diversité de cellules neuronales et gliales. Ce processus à l'origine de cette diversité est permis grâce à l'acquisition d'une identité cellulaire spécifique nommée la spécification neurale. Ainsi, l'identité phénotypique des progéniteurs neuraux, caractérisée par l'expression du facteur Sox2 (*sex determining region Y-box2* ou SRY), dépend de l'expression de combinaisons spécifiques de facteurs de transcription qui sont activés et/ou réprimés en fonction de leur position le long de l'axe dorsoventral (Briscoe & Small, 2015). Cette spécification est dépendante de gradients de concentrations de trois morphogènes : la Shh, la protéine morphogénique de l'os (*bone morphogenic protein* ou BMP) et la protéine Wnt (*Wingless integration site*). Via la voie de signalisation Shh, la notochorde et la plaque du plancher seront impliqués dans la régionalisation et la spécification de la partie ventrale du tube neural. Dans le même temps, l'ectoderme dorsal (ou plaque du toit) secrète les protéines BMP/Wnt, qui régiront la spécification de la partie dorsale du tube neural. Ces facteurs morphogéniques, diffusant depuis des zones opposées, seront à l'origine de la régionalisation dorso-ventrale des populations neurales de la moelle épinière.

Comme l'illustre la figure 7, les gradients de morphogènes subdivisent le tube neural de la future moelle épinière en 11 domaines distincts : cinq domaines ventraux (p3, domaine des progéniteurs de motoneurones ou domaine pMN, p2-p0) et six domaines dorsaux (pd1-pd6). Chacun de ses domaines générera des sous-types spécifiques de motoneurones et d'interneurones au moment de la différenciation neurale. Dans la partie ventrale, l'expression du facteur de transcription Nkx2.2 est uniquement retrouvée dans le domaine p3 qui génère des interneurones de type V3. Les progéniteurs neuraux du domaine pMN, expriment le facteur de transcription Olig2 et généreront des motoneurones et les cellules précurseurs d'oligodendrocytes (*oligodendrocyte precursor cells* ou OPCs ; **Figure 7** ; Briscoe & Small, 2015).

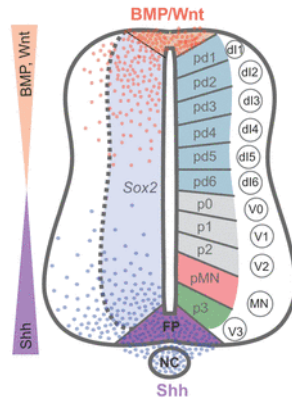


Figure 7 Spécification neurale au sein du tube neural.

Les gradients opposés de Shh (sécrétés par les cellules de la plaque de plancher (FP) et la notochorde (NC)), et de BMP / Wnt (dérivés de la plaque du toit) induisent la spécification des cellules précurseurs neurales le long de l'axe dorsoventral (D-V) de façon dose-dépendante. Ces gradients de morphogènes permettent la subdivision du tube neural en cinq domaines ventraux distincts (p3, pMN, p2-p0) et six domaines dorsaux distincts (pd1-pd6 ; Briscoe & Small, 2015).

3.3 Mise en place des progéniteurs oligodendrocytaires

Afin de déterminer l'origine des OPCs au sein de la moelle épinière, Warf et ses collaborateurs ont mis en culture des explants de moelle épinière d'embryons de rats à E14, provenant de la région ventrale (**Figure 8 A-C**) ou de la région dorsale (**Figure 8 D-F**) de la moelle épinière. Ils ont ainsi pu constater que les explants de moelle épinière dorsale donnent exclusivement naissance à des cellules astrocytaires immunopositives pour la GFAP (*glial fibrillary acidic protein*) (**Figure 8 B**) et, aucune cellule immunomarquée pour la GalC n'est détectée (**Figure 8 C**). Seuls les explants provenant de la région ventrale donnent naissance à la fois à des cellules astrocytaires (**Figure 8 E**) et des cellules oligodendrocytaires associées au marqueur GalC (**Figure 8 F**). A partir de ces expériences *in vitro*, les auteurs ont suggéré que les OPCs apparaissent exclusivement au niveau ventral de la moelle épinière (Warf *et al.*, 1991).

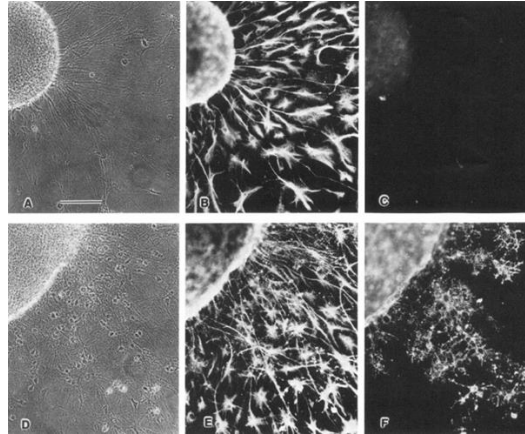


Figure 8 Mise en évidence *in vitro* de l'origine ventrale des OPCs.

Cultures d'explants dérivés de la moelle épinière dorsale (A-C) ou ventrale (D-F) à E14 après 9 jours de culture. Les cultures ont été examinées en contraste de phase (A et D) et après un immunomarquage avec des anticorps anti-glial fibrillary acidic protein (GFAP ; B et E) ou des anticorps anti-galactocérébroside (GC ; C et F). Barre d'échelle : 100 μ m (Warf *et al.*, 1991).

Peu de temps après, Pringle et ses collaborateurs ont confirmé ces résultats *in situ*. Ils ont ainsi montré que l'expression du récepteur α du facteur de croissance dérivé des plaquettes (*Platelet Derived Growth Factor Receptor α* ou PDGFR α), caractérisait uniquement les OPCs (Pringle *et al.*, 1992), et que cette expression était restreinte au niveau de la région ventrale de la moelle épinière d'embryons de rat à E14 (Figure 9, Pringle & Richardson, 1993). Ces données convergentes ont ainsi mené à l'hypothèse suivante : l'origine embryonnaire des OPCs est restreinte à une partie ventrale de la moelle épinière, au niveau du domaine pMN, à partir de E12,5 (Richardson *et al.*, 2000).

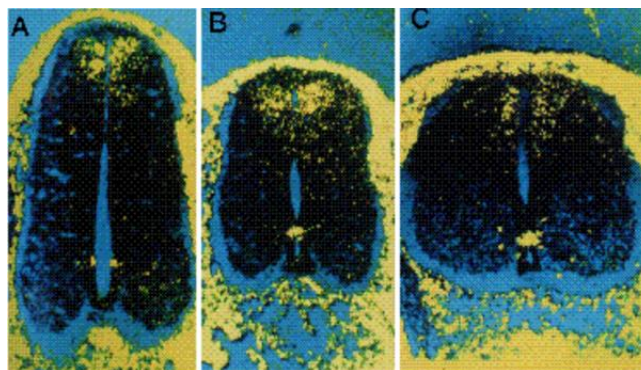


Figure 9 Expression génique de PDGFR α dans la moelle épinière de rat à E14.

Coupes transversales de moelle épinière de rat à E14 traitées en hybridation *in situ* pour visualiser l'ARNm de PDGFR α (jaune). Illustration des sections lombaire (A), thoracique (B) et cervicale (C) du tube neural (côté dorsal en haut). À ce stade, les ARNm de PDGFR α sont fortement exprimés dans les tissus entourant la moelle épinière, dans des précurseurs neuronaux de la région dorsale de la moelle épinière et dans un petit foyer de cellules (précurseurs d'oligodendrocytes) situé dans la partie ventrale (Pringle and Richardson, 1993).

Au sein des progéniteurs neuraux, les facteurs de transcription de type hélice-boucle-hélice (*basic helix-loop-helix* ou bHLH), Olig 1 et Olig2 sont co-exprimés. Leur expression apparaît dans la région ventrale entre E8,5-E9,5 (Lu *et al.*, 2000). Olig1 favorise la différenciation des oligodendrocytes, tandis qu'Olig2 est essentiel pour l'engagement des cellules dans la lignée oligodendrocytaire. Initialement, Olig2 est présent sous sa forme phosphorylée et assure la production des motoneurones. C'est seulement à partir d'E12.5 qu'il se retrouve dans sa forme déphosphorylée coïncidant avec la transition phénotypique des motoneurones vers les oligodendrocytes (Li *et al.*, 2011). Il devient alors un marqueur spécifique des cellules de la lignée oligodendrocytaire (Li *et al.*, 2011).

Un autre facteur de transcription, la protéine à homéodomaine Nkx6.1 est retrouvée dans le domaine pMN. Il est déterminant pour la spécification des progéniteurs neuraux vers un profil oligodendrocytaire. En effet, chez les souris déficientes en Nkx6.1, le nombre de cellules Olig2⁺ est drastiquement diminué au sein du domaine pMN à E13.5 et seul un petit nombre de cellules Olig2⁺ est retrouvé à E15.5 (Liu *et al.*, 2003). Cependant, au cours du développement périnatal, le nombre de cellules Olig2⁺ est rattrapé chez les souris mutantes Nkx6.1, possiblement dû à une prolifération accrue des OPCs. Ces données tendent à montrer que la spécification et la production d'OPCs sont diminuées et retardées chez les souris déficientes en Nkx6.1 (Liu *et al.*, 2003).

Ce n'est que quelques années plus tard, que la découverte d'une seconde source de progéniteurs donnant naissance à de futures cellules de la lignée oligodendrocytaire fut faite. Celle-ci, dont la spécification n'est pas dépendante de la voie Shh émerge à E14,5-E15,5 chez la souris (Cai *et al.*, 2005; Vallstedt *et al.*, 2005). En effet, Cai et ses collaborateurs, ont pu mettre en évidence l'existence d'un petit groupe d'OPCs émergent de la région dorsale de la moelle épinière, chez des souris déficientes en Nkx6.1 ; mais également chez des souris déficientes en Shh (Cai *et al.*, 2005). Ainsi, dans la moelle épinière, 85 à 90% des oligodendrocytes dérivent du domaine pMN à E12.5 et la seconde vague d'OPCs issus de la région dorsale à E14,5, contribue à la production de 10-15% des oligodendrocytes (Cai *et al.*, 2005; Vallstedt *et al.*, 2005; Tripathi *et al.*, 2011).

3.4 Prolifération et survie des cellules oligodendrocytaires

Afin de coloniser l'intégralité du SNC, un grand nombre d'OPCs est généré au cours du développement. Le principal facteur mitogène des OPCs est le PDGF-AA synthétisé par les astrocytes et les neurones (Baumann and Pham-Dinh, 2001). Le PDGF-AA ainsi relargué interagit avec les récepteurs PDGFR α complexés à l'intégrine $\alpha\beta 3$ présente sur les OPCs. Cette interaction entraîne l'activation de la voie de signalisation phosphatidylinositol-3-kinase et de la protéine kinase C (PI3K/PKC) qui favorise la réponse proliférative des OPCs en limitant leur différenciation vers un phénotype plus mature (Baron *et al.*, 2002). De plus, l'expression des récepteurs PDGFR α est maintenue à un niveau élevé grâce à un deuxième facteur mitogène appartenant à la famille des facteurs de croissance des fibroblastes (*fibroblast growth factor*, FGF), le bFGF (*basic FGF* ou FGF-2 ; McKinnon *et al.*, 1990). Le bFGF permet de prolonger la période pendant laquelle les OPCs et les pré-oligodendrocytes (pré-OLs) sont capables de répondre au PDGF-AA (McKinnon *et al.*, 1990; Butts *et al.*, 2008).

Les OPCs possèdent une grande capacité proliférative, mais leur nombre est finement régulé afin d'obtenir une densité appropriée dans le SNC et permettre aux cellules de commencer leur différenciation (Raff *et al.*, 2001; Hughes *et al.*, 2013). Ils possèdent un programme intrinsèque spécifique qui définit leur sortie du cycle cellulaire, dont l'un des principaux éléments est la protéine inhibitrice des kinases-cyclines-dépendantes p27/Kip1 (*cyclin-dependent kinase inhibitor 1B* ou p27/Kip1) (Raff *et al.*, 2001). Gao et ses collaborateurs ont constaté *in vitro* qu'un arrêt précoce du cycle cellulaire était corrélé avec un taux de p27/Kip1 plus élevé dans les OPCs (Durand *et al.*, 1997). Cependant, l'accumulation progressive de p27/Kip1 au sein des cellules n'est pas suffisante, à elle seule, pour engager la sortie du cycle cellulaire (Durand *et al.*, 1997). En effet, la sortie du cycle cellulaire requiert des signaux extracellulaires, tels que l'hormone thyroïdienne : triiodothyronine (T3) (Durand & Raff, 2000).

Il faut souligner que les OPCs sont générés en excès au cours du développement et seul un nombre précis est nécessaire pour myéliniser entièrement une population donnée d'axones. Dans le nerf optique par exemple, seuls 50% des oligodendrocytes produits survivent. Les autres subissent une mort cellulaire programmée de type apoptotique, qui est déclenchée deux à trois jours après leur genèse (Barres *et al.*, 1992; Raff *et al.*, 1993). La majorité des oligodendrocytes qui restent en vie au-delà de 3 jours, survivront au cours de la vie adulte. La survie des OPCs dépend également de facteurs axonaux trophiques tels que le facteur de

croissance à l'insuline (*insulin growth factor 1* ou IGF-1), le facteur neurotrophique ciliaire (*ciliary neurotrophic factor* ou CNTF) ou bien encore la neurotrophine-3 (NT-3 ; Barres & Raff, 1993; Barres *et al.*, 1993, 1994). Cependant, ces facteurs axonaux étant présents en quantité limitée, les OPCs vont se retrouver en compétition pour avoir accès à ces signaux de survie garantissant un nombre final d'oligodendrocytes précis et adapté au nombre d'axones nécessitant une myélinisation (Barres & Raff, 1999).

3.5 Migration des cellules oligodendrocytaires

Les OPCs issus des différentes niches neurogéniques entament leur migration à travers toute la moelle épinière, afin d'être distribués uniformément dans le tissu. Cette migration est dépendante : 1) de facteurs chimiotactiques, qui possèdent la capacité d'attirer ou de repousser les OPCs ; 2) des interactions avec des molécules de la matrice extracellulaire (MEC) ; et 3) de signaux d'arrêts. Dans chacune des sous-parties suivantes, je développerai le rôle d'un acteur clé impliqué dans ces différents aspects de la migration des cellules oligodendrocytaires.

3.5.1 Facteurs chimiotactiques

3.5.1.1 Facteurs chimio-répulsifs

Plusieurs travaux ont rapporté l'expression de la nétrine-1 au sein des cellules de la plaque du plancher et au niveau de la ligne médiane de la moelle épinière au cours du développement embryonnaire (Kennedy *et al.*, 1994; Jarjour *et al.*, 2003). Chez la souris, l'expression de la nétrine-1 est détectée dès E9.5 (Dominici *et al.*, 2017). Étant donné que la migration des OPCs s'opère depuis la ligne médiane ventrale, il a été suggéré que la nétrine-1 agissait comme un facteur chimio-répulsif pour les OPCs et qu'elle pourrait initier la migration oligodendrocytaire (Jarjour *et al.*, 2003; Tsai *et al.*, 2003). Ainsi, chez des souris déficientes en nétrine-1, il a été observé une mauvaise dispersion des OPCs qui restaient concentrés au niveau de la ligne médiane ventrale (**Figure 10** ; Tsai *et al.*, 2006). Ces données indiquent que la nétrine-1 est nécessaire pour l'initiation de la migration des OPCs.

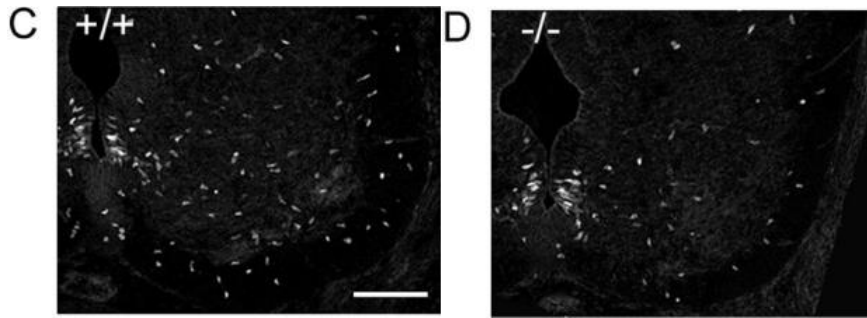


Figure 10 La nétrine-1 participe à l'initiation de la migration des OPCs au sein de la moelle épinière.

Photomicrographies de moelle épinière à E13.5 chez les souris sauvages (+/+) (C) et les souris déficientes en nétrine-1 (-/-) (D) immunomarquées avec le marqueur Olig2 (gris). La migration des OPCs est retardée dans la moelle épinière chez les souris déficientes en nétrine-1 (Tsai *et al.*, 2006).

3.5.1.2 Facteurs chimio-attractants

Les chimiokines ou chemokines sont des cytokines chimio-attractantes impliquées, entre autres, dans la régulation de la migration leucocytaire. Dans le SNC, elles sont sécrétées par diverses cellules gliales, comme les astrocytes et les cellules microgliales. Elles peuvent moduler la migration oligodendrocytaire au cours du développement (Tsai *et al.*, 2002; Miron, 2017). Plusieurs études ont suggéré que l'interaction de la chemokine (C-X-C motif) ligand 12 (CXCL12) avec son récepteur CXCR4 favorisait, *in vitro* et *in vivo*, la migration des OPCs vers la région dorsale de la moelle épinière au cours du développement (Figure 11 ; Dziembowska *et al.*, 2005; Maysami *et al.*, 2006).

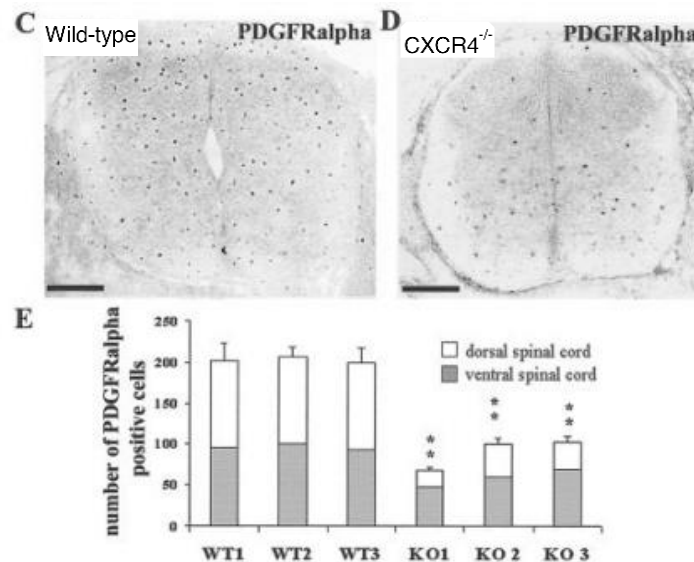


Figure 11 CXCR4 est nécessaire pour la migration des OPCs vers la région dorsale de la moelle épinière.

Hybridation *in situ* des ARNm codants le PDGFRα dans la moelle épinière de souris sauvages (wild-type ; C) et de souris déficientes en récepteur CXCR4 (CXCR4^{-/-} ; D) Ces illustrations montrent un nombre réduit d'OPCs au sein de la région dorsale de la moelle épinière à E14 chez les souris déficientes en CXCR4 comparativement aux souris sauvages. Barre d'échelle : 100 μm). (E) Quantification du nombre d'OPCs PDGFRα⁺ (moyenne + s.e.m) dans la moelle cervico-thoracique à E14, dans la région ventrale (gris) et la région dorsale (blanc) chez des souris sauvages (WT1-3) et des souris déficientes en récepteur CXCR4 (KO1-3). ** p<0.001 (Dziembowska *et al.*, 2005).

En 2016, Tsai et ses collaborateurs ont identifié une nouvelle voie de migration des OPCs, *via* les vaisseaux sanguins. En effet, afin de migrer sur de longues distances pour atteindre leur emplacement final, les OPCs migrent le long des vaisseaux sanguins du SNC (**Figure 12**) selon deux modalités : soit en rampant (*crawling*) soit en sautant de vaisseaux en vaisseaux (*jumping* ; Tsai *et al.*, 2016). Lorsque le corps cellulaire des OPCs est en interaction avec la face abluminale des cellules endothéliales, on parle alors de « *crawling* ». Afin de se déplacer en « *jumping* », les OPCs étendent un de leur prolongement pour atteindre un vaisseau adjacent, puis se déplacent et apposent leur corps cellulaire sur le nouveau vaisseau (Tsai *et al.*, 2016). De plus, ils ont montré que l'expression de la chemokine CXCL12 par les cellules endothéliales, se lie aux récepteurs CXCR4 présents sur les OPCs. Ceci conduit à l'activation de la voie Wnt, favorisant l'attraction des OPCs vers les vaisseaux, leur migration le long de ces derniers et leur distribution au sein des différentes régions du SNC (Tsai *et al.*, 2016).

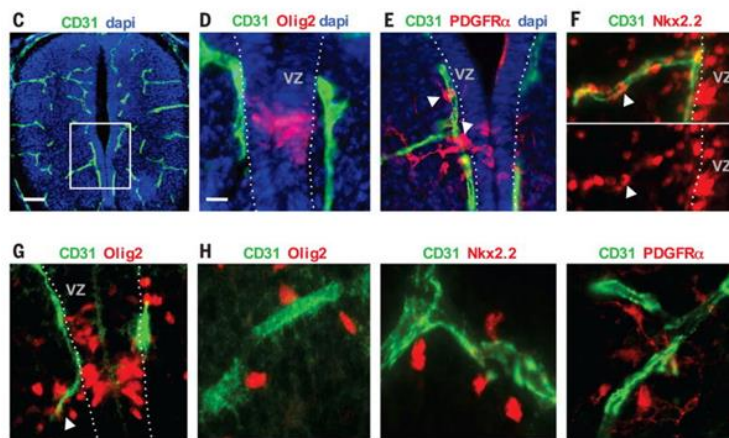


Figure 12 Les OPCs migrent le long des vaisseaux sanguins.

Photomicrographie d'une moelle épinière à E12 (l'encadré montre le domaine pMN : (C). Les OPCs exprimant Olig2 (rouge) définissent le domaine pMN de la zone ventriculaire (VZ) de la moelle épinière à E12 (D). Les premiers OPCs exprimant PDGFR α et Nkx2.2 (pointes de flèches) quittent le domaine pMN et migrent le long du système vasculaire adjacent (cellules CD31⁺ en vert ; E-F). Les OPCs quittent le domaine pMN à E14 le long de vaisseaux (tête de flèche en G) ; ces cellules (Olig2⁺, Nkx2.2⁺ et PDGFR α ⁺) poursuivent ensuite leur migration le long de l'arbre vasculaire (Tsai *et al.*, 2016 ; G-H).

3.5.2 Matrice extracellulaire

Parmi les protéines de la MEC impliquées dans la migration des OPCs on peut citer la laminine, la fibronectine et la ténascine-C. La fibronectine et la laminine favorisent la migration des oligodendrocytes, en agissant seules ou en combinaison avec le facteur chemoattractant PDGF-AA. Pour ce qui est de la ténascine-C, elle inhibe à la fois l'adhésion à la matrice extracellulaire et la migration oligodendrocytaire. Par exemple, de fort taux de ténascine-C sont retrouvés au niveau de la jonction du nerf optique et de la rétine, afin de prévenir la

myélinisation de la rétine (Bartsch *et al.*, 1994). Ainsi, les interactions des molécules matricielles ont, à l'instar des différentes protéines précitées, des rôles prépondérants lors de la migration des oligodendrocytes.

3.5.3 Signaux d'arrêt

La localisation finale des OPCs au sein de la moelle épinière dépend également de l'arrêt de leur migration. Aujourd'hui, un certain nombre de signaux d'arrêt ont été identifiés. Parmi eux, la chemokine CXCL1, synthétisée par une population astrocytaire, se lie aux récepteurs CXCR2 présents sur les OPCs. En agissant sur son récepteur, cette protéine inhibe la migration des OPCs. En effet, chez les souris déficientes en CXCR2, et malgré la présence du ligand CXCL1, les OPCs ne s'arrêtent pas au niveau de la substance blanche proximale et continuent de migrer vers la périphérie de la moelle épinière (Figure 13 ; Tsai *et al.*, 2002).

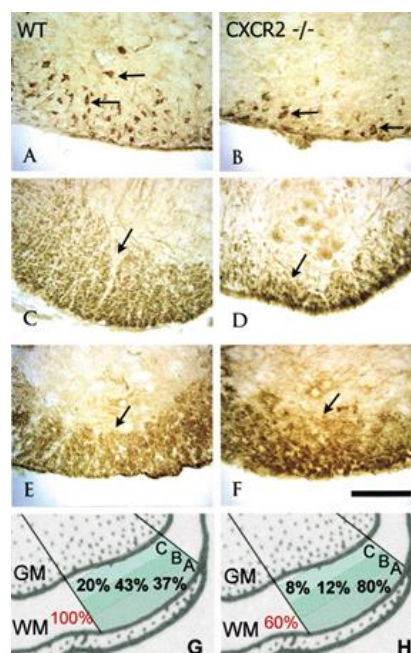


Figure 13 L'arrêt de la migration oligodendrocytaire est médiée par CXCR2.

Photomicrographies de moelle épinière lombaire à P7 chez les souris sauvages (WT) et déficientes en récepteur CXCR2 (CXCR2^{-/-}). Distribution des oligodendrocytes matures (marqueur CC1 ; A-B), de la myéline (marqueur MBP ; C-D), des axones (marqueur neurofilament ; E-F). Quantification relative des oligodendrocytes matures dans la région ventrale de la moelle épinière. La substance blanche est divisée en 3 sous-régions : A région sous-piale, B région intermédiaire et C interface substance blanche/grise (G-H ; Tsai *et al.*, 2002).

3.6 Différenciation des cellules de la lignée oligodendrocytaire

3.6.1 La lignée oligodendrocytaire

En 1928, del Río-Hortega publia dans son mémoire « *Tercera aportación al conocimiento morfológico e interpretación funcional de la oligodendroglía* » une première classification des cellules oligodendrocytaires. Il distingue quatre types d'oligodendrocytes selon leur morphologie (Figure 14 ; Rio-Hortega, 1928):

- ❖ Type I ou “cellules de Robertson” (polydendrocytes) qui possèdent un petit corps cellulaire (15-20 µm de diamètre). Ces oligodendrocytes présentent de nombreux prolongements fins qui enroulent les axones de petit diamètre.
- ❖ Type II ou les « oligodendrocytes de Cajal » qui ont une morphologie cuboïde ou polygonale (20-40 µm de diamètre). Leurs prolongements sont plus fins et moins nombreux que les oligodendrocytes de type I. Ils sont enroulés de façon longitudinale par rapport à l'axone.
- ❖ Type III ou les “oligodendrocytes de Paladino”. Ils sont moins abondants que les oligodendrocytes de type I et II. Ils sont caractérisés par la présence de seulement un à quatre prolongements provenant d'un corps cellulaire volumineux.
- ❖ Type IV ou les “oligodendrocytes Schwannoid” sont très allongés et entourent plusieurs axones de moyen et gros diamètre.

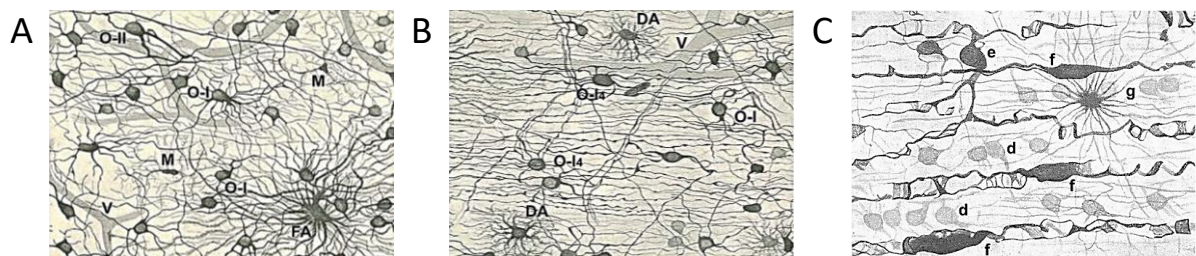


Figure 14 Illustrations des différentes cellules de la lignée oligodendrocytaire.

Illustrations schématiques des différentes catégories d'oligodendrocytes issus de la substance blanche corticale (A, B) et de la substance blanche de la moelle épinière (C) après coloration avec la méthode de Golgi-Hortega. (B) Oligodendrocytes de type I (O-I) ou avec de longs processus qui suivent les axones (O-I4), et deux astrocytes (DA). (C) Illustration des oligodendrocytes du premier (d) ; troisième (e) et quatrième type (f) ainsi qu'un astrocyte fibreux (g) (d'après (Pérez-Cerdá *et al.*, 2015).

En accord avec les travaux d'Hortega, une classification a été proposée par Baumann et en 2001. Ces auteurs définissent quatre stades de différenciation des oligodendrocytes : les OPCs, les pré-oligodendrocytes, les oligodendrocytes matures (ou pré-myélinisants) et les oligodendrocytes myélinisants (Figure 15). Cette classification repose à la fois sur des critères morphologiques et l'expression de marqueurs spécifiques (Baumann and Pham-Dinh, 2001).

❖ Les OPCs sont caractérisés par une morphologie bipolaire et par l'expression de PDGFR α , du ganglioside A2B5, du protéoglycane neuro-gliale 2 (*neural/gliale antigen 2*, NG2) et de la molécule d'adhésion de l'acide polysialique des cellules neurales (*polysialylated-neural cell adhesion molecule*, PSA-NCAM) (Pringle *et al.*, 1992; Grinspan & Franceschini, 1995; Nishiyama *et al.*, 1996).

❖ Au cours de la différenciation, les OPCs deviennent des pré-oligodendrocytes et la plupart des marqueurs des stades précoces sont maintenus à ce stade. Ces pré-oligodendrocytes sont également multipolaires avec de courts prolongements. Cette transition est accompagnée de l'expression du sulfatide reconnu par l'anticorps anti-O4 qui persiste jusqu'au stade d'oligodendrocyte mature.

❖ La perte de l'expression de A2B5 engage le stade oligodendrocytes matures. Ces oligodendrocytes commencent à exprimer la protéine GalC (Sommer & Schachner, 1981; Yu *et al.*, 1994). A ce moment, les oligodendrocytes deviennent matures, post-mitotiques et présentent de longs prolongements ramifiés (Armstrong *et al.*, 1992).

❖ L'expression de la protéine *Adenomatous Polyposis Coli* (APC ; également dénommée CC1), de la CNP ainsi que l'apparition séquentielle des protéines constitutives de la myéline telles que la MBP, la PLP et la MAG marque le stade final de maturation qui se finalise par l'expression de la MOG et le début de la myélinisation (Solly *et al.*, 1996; Zhang, 2001).

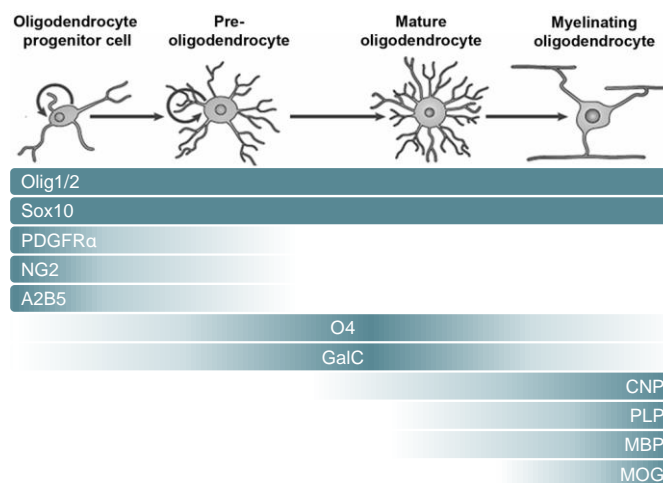


Figure 15 Représentation schématique des stades de développement de la lignée oligodendrocytaire.

Les caractéristiques morphologiques (en haut) et antigéniques (dont l'apparition et/ou l'expression est schématisée par un gradient de couleur) des OPCs, des pré-OLs, des OLs matures et des OLs myélinisants sont présentées (D'après Traiffort *et al.*, 2016).

Grâce aux techniques de séquençage des ARN, de nouvelles populations de cellules de la lignée oligodendrocytaire ont pu être identifiées. Une étude de 2016, menée par Marques et ses collaborateurs, ont ainsi pu identifier 12 populations de cellules oligodendrocytaires différentes (**Figure 16**). On retrouve les :

- ❖ Cellules précurseurs d'oligodendrocytes (OPCs) comme premier stade de la lignée oligodendrocytaire. Cette population est caractérisée par la co-expression de *Pdgfra* et de *Cspg4* (protéoglycane sulfate de chondroïtine 4) et de différents gènes associés aux astrocytes et à la glie radiaire tels que *Fabp7* et *Tmem100* (Zeisel *et al.*, 2015).

- ❖ Précurseurs d'oligodendrocytes engagés dans la différenciation (*differentiation-committed oligodendrocyte precursors* ou COPs), caractérisés par la perte d'expression de *Pdgfra* et *Cspg4* et par l'expression de gènes impliqués dans les processus de migration (*Tns3*, *Fyn* ; (Marques *et al.*, 2016).

- ❖ Oligodendrocytes nouvellement formés (*newly formed oligodendrocytes* ou NFOLs), subdivisés en 2 groupes, les NFOL1 et NFOL 2. Dans cette population, des gènes impliqués dans la différenciation oligodendrocytaire comme *Tcf712* et *Casr* sont fortement exprimés alors qu'une baisse d'expression de *Gpr17*, connu comme un facteur inhibiteur de la différenciation est observée (Cahoy *et al.*, 2008; Chen *et al.*, 2009; Zhang *et al.*, 2014).

- ❖ Oligodendrocytes formant de la myéline (*myelin-forming oligodendrocytes* ou MFOLs) divisés en 2 sous-groupes, les MFOL1 et les MFOL2. Ces cellules expriment des gènes impliqués dans la formation de la myéline, tels que *Plp1*, *Mog*, *Opalin*, *Serinc5* (Marques *et al.*, 2016).

- ❖ Oligodendrocytes matures (*mature oligodendrocytes* ou MOLs) subdivisés en 6 sous-groupes de MOL1 à MOL6. Parmi ces cellules, sont retrouvés des gènes impliqués dans la différenciation tardive des oligodendrocytes (tels que *Klk6* et *Apod* ; Cahoy *et al.*, 2008). Chaque sous-population peut être retrouvée de façon préférentielle dans certaines régions du SNC. Par exemple, la sous-population MOL5 est retrouvée chez la souris juvénile seulement au niveau de la corne dorsale de la moelle épinière où la différenciation des oligodendrocytes est achevée. En revanche, dans le corps calleux la différenciation prend fin seulement au stade adulte (P60) et c'est seulement à ce stade que la sous-population MOL5 sera retrouvée (Marques *et al.*, 2016).

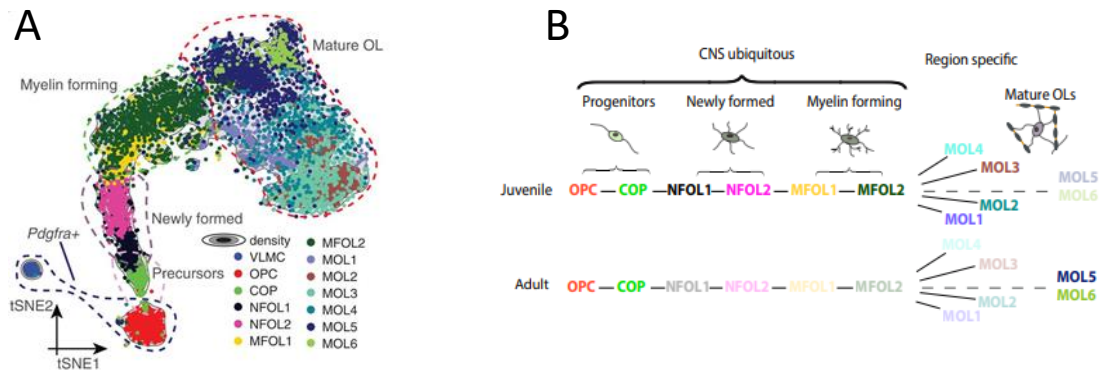


Figure 16 Différentes sous-populations de la lignée oligodendrocytaire.

Représentation graphique de la distribution des différents sous-types d'OLs chez la souris à différents stades (A). Le processus de différenciation des oligodendrocytes est séquentiel, continu et uniforme dans tout le SNC. Les populations matures (MOL) présentent une hétérogénéité et une spécificité régionale (Marques *et al.*, 2016 ; B).

3.6.2 Régulations de la différenciation

Les étapes de différenciation sont hautement régulées par des facteurs épigénétiques ainsi que par des facteurs extrinsèques et/ou intrinsèques (Emery & Lu, 2015). Parmi ces facteurs intrinsèques, on retrouve les protéines Sox, de la famille des facteurs de transcription *High Mobility Group Box* (HMGB). Ces protéines sont impliquées dans divers processus du développement de la lignée oligodendrocytaire. Par exemple, le facteur de transcription Sox9 est impliqué dans la spécification des cellules souches neurales en OPCs ; Sox10, quant à lui, est essentiel à la différenciation des oligodendrocytes vers le stade myélinisant (Stolt *et al.*, 2002, 2003). Sox10 est l'un des rares facteurs de transcription à être restreint à la lignée oligodendrocytaire. Son expression débute à E11.5 chez la souris dans le domaine pMN, dans les cellules qui donneront par la suite les cellules oligodendrocytaires. À 12.5, Sox10 est retrouvé dans les OPCs (PDGFR α), et le nombre de cellules Sox10⁺ augmentent au cours du développement. À E14.5 et E16.5, les cellules Sox10⁺ sont réparties dans toute la substance grise, et ce n'est qu'à partir de E18.5 que ces cellules s'accumulent dans la future substance blanche (Stolt *et al.*, 2002). Le facteur de transcription Sox10 est un facteur essentiel à la différenciation terminale des oligodendrocytes et à la myélinisation. En effet, chez les souris déficientes en Sox10, aucun immunomarquage des différentes protéines de la myéline telles que MBP, PLP ou encore MAG n'est détecté aux stades embryonnaires. Ces immunomarquages apparaissent en faible proportion (<5%) chez les nouveau-nés comparativement à la souche sauvage (Figure 17 ; Stolt *et al.*, 2002).

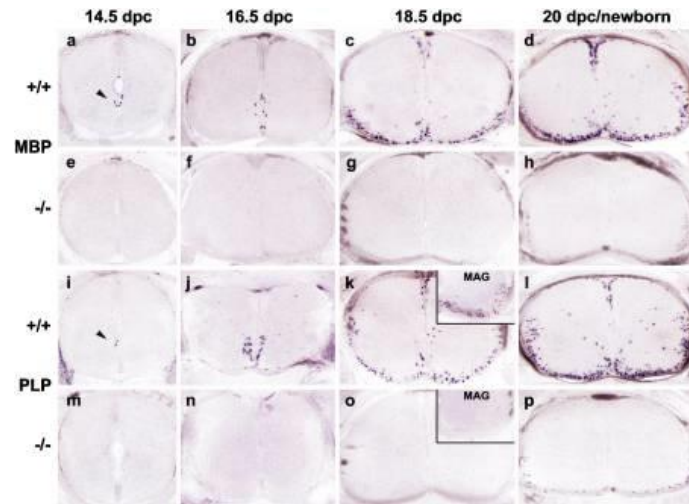


Figure 17 Expression des gènes codants pour les protéines de la myéline dans la moelle épinière en présence ou en l'absence de Sox10.

Hybridation *in situ* des ARNm codants la MBP (a-h) et la PLP (i-p) dans la moelle épinière de souris sauvages (+/+) et de souris déficientes en Sox10 (-/-). Ces illustrations montrent une hypomyélinisation chez les souris^{-/-} comparativement aux souris^{+/+} (Stolt *et al.*,2002).

Un autre facteur de cette famille, le facteur Sox17, a été identifié comme étant un nouveau régulateur de la différenciation de la lignée oligodendrocytaire. Celui-ci est retrouvé dans toutes les cellules de la lignée oligodendrocytaire, mais son pic d'expression est associé aux oligodendrocytes pré-myélinisants laissant suggérer qu'il est impliqué dans la transition des oligodendrocytes immatures vers un phénotype mature au cours du développement (Sohn *et al.*,2006). De plus, des études *in vitro*, montrent que ce facteur régule la sortie du cycle cellulaire des oligodendrocytes et favorise la différenciation oligodendrocytaire (Sohn *et al.*,2006). Cependant, son implication dans la différenciation des oligodendrocytes *in vivo* ne fait pas l'unanimité. En 2018, une étude s'est intéressée au rôle de Sox17 *in vivo*, en utilisant un système de surexpression inductible de Sox17 (système Tet-Off) sous le contrôle du promoteur Sox10 (TetSox17:Sox10^{rtTA/+} ; Ludwig *et al.*,2004). Leurs données suggèrent que la surexpression de Sox17 inhibe la différenciation des oligodendrocytes Sox10⁺ en réprimant l'expression des principaux gènes de la myéline (*cnp1*, *plp1*, *mbp*, *mag* et *mog*) conduisant à une hypomyélinisation transitoire (Figure 18 ; Fauveau *et al.*,2018).

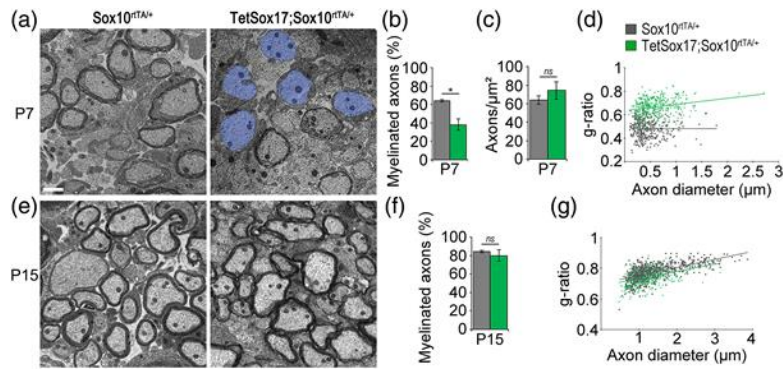


Figure 18 La surexpression de Sox17 induit une hypomyélinisation.

Analyse ultrastructurale de la substance blanche ventrale de moelle épinière de souris sauvages (Sox10^{rtTA/+}) et surexprimant Sox17 (TetSox17:Sox10^{rtTA/+}), à P7 (a-d) ou P15 (e-g). Les axones non myélinisés sont pseudo-colorés en bleu chez les souris P7 TetSox17 ; Sox10^{rtTA/+} (a). Pourcentage d'axones myélinisés (b). Analyse de la densité axonale. (c) g-ratio par rapport au diamètre axonal, à P7 (d). Quantification des axones myélinisés chez les souris Sox10^{rtTA/+} (gris) et TetSox17:Sox10^{rtTA/+} (vert) à P15 (e). Pourcentage d'axones myélinisés (f). Analyse du g-ratio, à P15 (g). Barre d'échelle : 1 μm (Fauveau *et al.*, 2018).

Au contraire, une récente étude menée par Chew et ses collaborateurs montre que Sox17 favorise la différenciation oligodendrocytaire *in vivo* (Chew *et al.*, 2019). En utilisant un modèle de souris déficientes en Sox17 sous le contrôle du promoteur *Cnp*, ils ont pu mettre en évidence un retard de différenciation des oligodendrocytes à partir de P30. Ce retard se traduit par une baisse d'expression des protéines de la myéline (Figure 19 G). Ils rapportent également un nombre réduit d'axones myélinisés accompagnés d'une épaisseur de gaine de myéline plus fine (Figure 19 H-J ; Chew *et al.*, 2019). Cette hypomyélinisation se traduit par des troubles de la coordination motrice (Figure 19 K ; Chew *et al.*, 2019).

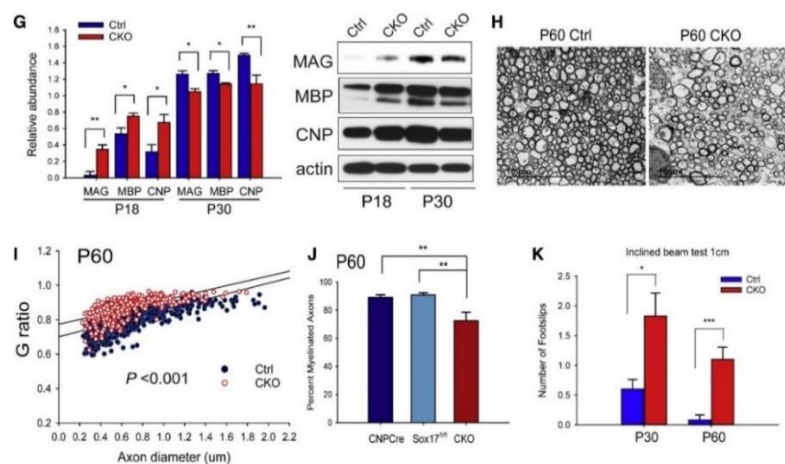


Figure 19 La suppression de Sox17 affecte la différenciation des oligodendrocytes et la myélinisation.

Quantification relative et western blot des protéines de la myéline chez les souris sauvages (Ctrl) et déficientes en Sox17 (CKO) à P18 et P30 (G). Photomicrographies en microscopie électronique à transmission de souris sauvages et déficientes en Sox17 à P60 montrant une hypomyélinisation chez souris déficientes en Sox17 comparativement aux souris sauvages. Barre d'échelle : 10 μm (H). Analyse du g-ratio (I). Quantification des axones myélinisés à P60 chez des souris contrôles (CNP-Cre, Sox17^{fl/fl}) et CKO (J). Analyse du comportement en utilisant le test de la poutre inclinée (K). *** p < 0,001, ** p < 0,005, * p < 0,05, test t de Student, moyenne ± SEM. (Chew *et al.*, 2019).

Bien qu'aujourd'hui de nombreux facteurs soient connus pour favoriser la différenciation des cellules oligodendrocytaires vers un phénotype mature myélinisant, il existe également des inhibiteurs de celle-ci. Parmi eux, nous pouvons citer LINGO-1 (*leucine rich repeat and immunoglobulin-like domain-containing protein 1*), qui est une protéine exprimée dans les neurones et les oligodendrocytes. LINGO-1 inhibe la différenciation des oligodendrocytes en augmentant l'activité de la kinase Fyn et en diminuant l'activité de RhoA (Mi *et al.*, 2005), voie impliquée dans la différenciation des oligodendrocytes (Liang *et al.*, 2004).

GPR17 (*G-protein coupled receptor 17*) a également été caractérisé comme étant un inhibiteur de la différenciation des oligodendrocytes (Chen *et al.*, 2009). GPR17 est un récepteur spécifique des oligodendrocytes et est exprimé de façon transitoire entre le stade d'OPCs et d'oligodendrocyte mature (Cahoy *et al.*, 2008; Chen *et al.*, 2009; Fumagalli *et al.*, 2011). La surexpression de GPR17 inhibe la différenciation oligodendrocytaire à la fois *in vitro* et *in vivo* (Chen *et al.*, 2009). Inversement, une myélinisation précoce est retrouvée chez les souris déficientes en GPR17 comparativement aux souris sauvages (Chen *et al.*, 2009).

Ainsi, les étapes de différenciation des oligodendrocytes doivent être finement régulées afin de contrôler le bon déroulement de la myélinisation au cours du développement. Une connaissance plus détaillée de ces processus de régulation contribuerait à mieux définir les étapes limitantes qui surviennent dans les maladies démyélinisantes et dysmyélinisantes.

3.7 Enroulement, segments et ultrastructure de la gaine de myéline

3.7.1 Enroulement de la gaine de myéline

Les mécanismes permettant l'enroulement et la compaction de la gaine de myéline sont encore aujourd'hui mal connus. Plusieurs modèles ont été proposés depuis plusieurs décennies. Ce phénomène est souvent décrit comme une succession de 5 étapes cruciales : (1) une extension des *lamellipodia* et des *filopodia* ; (2) le contact entre le prolongement oligodendrocytaire et l'axone et l'initiation de l'enroulement ; (3) l'enroulement en spirale autour de l'axone sous les enveloppes précédentes ; (4) l'extension latérale de la gaine et ; (5) la compaction du cytoplasme pour former une gaine de myéline mature et fonctionnelle (Simons and Nave, 2015).

Au cours de ces étapes, les cellules subissent de conséquents changements morphologiques nécessitant une réorganisation de leur cytosquelette, notamment de l'actine (Zuchero *et al.*, 2015).

Une étude s'est intéressée au complexe Arp2/3 (*Actin Related Protein 2/3*) qui joue un rôle majeur dans la régulation du cytosquelette d'actine. Les auteurs ont montré que les complexes cytosquelettiques d'actine contrôlaient dynamiquement la myélinisation. L'assemblage des filaments d'actine, régulé par le complexe Arp2/3, permet aux prolongements de s'accroître. Cependant, l'enroulement de la gaine de myéline nécessite le désassemblage de l'actine. Ce processus de désassemblage serait régulé par la MBP, mais les mécanismes impliqués sont encore mal connus à ce jour (Zuchero *et al.*, 2015).

Selon les modèles actuels, la membrane plasmique de forme triangulaire possède deux faces : une face interne (*inner tongue*) en contact avec l'axone et une face externe (*outer tongue*) en contact avec le corps cellulaire (Figure 20). L'extension de la membrane plasmique se fait au niveau de la face interne puis les différentes couches de myéline s'enroulent sous les couches précédentes (Figure 20). La croissance des lamelles se déroule sur la face la plus interne de la myéline, tandis que la compaction débute sur la face la plus externe de la myéline (Snaidero & Simons, 2014).

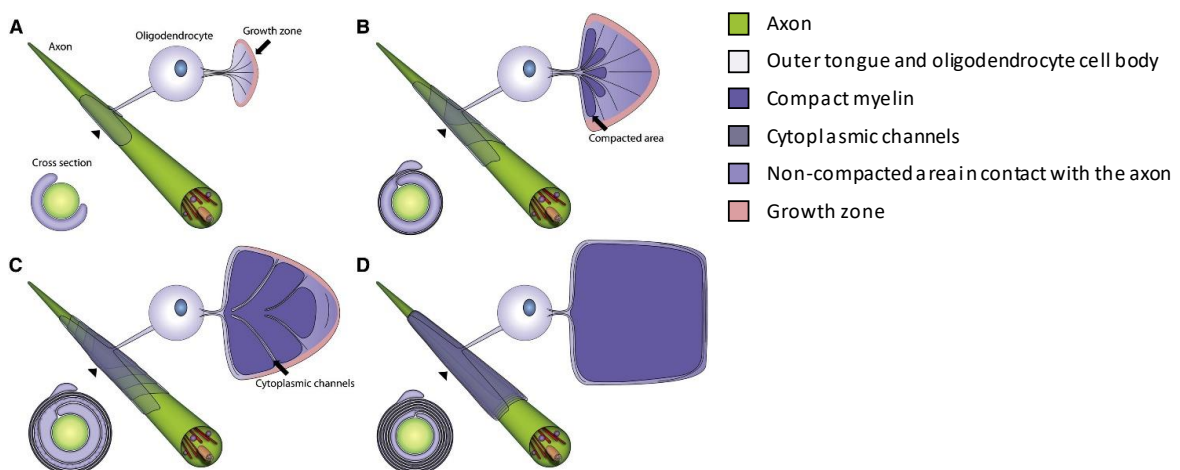


Figure 20 Modèle de biogenèse de la myéline dans le SNC, partie I.

Modèle d'une gaine de myéline en formation, illustrant la chronologie des principales étapes dans une vue en coupe, enveloppée et non-enveloppée (A-D). La représentation non-enveloppée montre la géométrie, le développement de la gaine (violet) et la localisation des canaux cytoplasmiques (gris), qui relient le corps cellulaire et la zone de croissance à la langue interne. La zone de croissance est colorée en rose et la myéline compactée en violet foncé. La représentation enveloppée montre la position des couches lorsqu'elles sont enroulées autour de l'axone. Les coupes transversales montrent l'état de compactage pendant la croissance de la myéline (Snaidero *et al.*, 2014).

Les couches s’étendent par la suite de façon latérale, jusqu’à ce que chaque lamelle de myéline compacte s’ouvre en boucles paranodales (Figure 21 ; Snaidero *et al.*, 2014). Ces boucles paranodales (*paranodal loop*) s’ancrent à l’axone grâce à des jonctions « de type septée » (*septate-like junctions*).

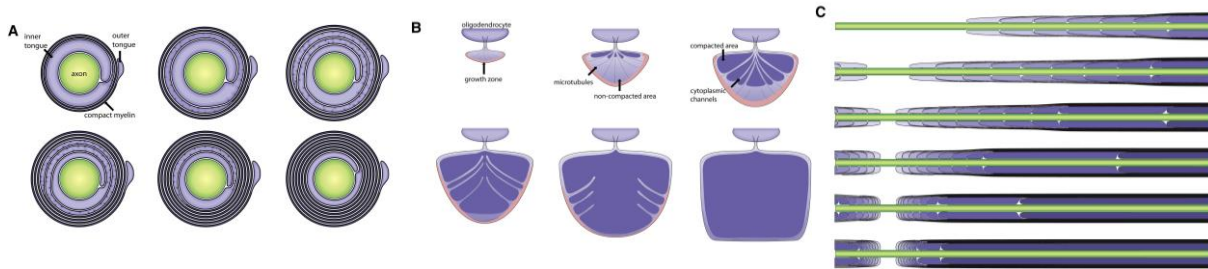


Figure 21 Modèle de biogenèse de la myéline dans le SNC, partie II.

Modèle de compaction de la gaine de myéline au cours de sa croissance. Le taux de croissance de la langue interne à l'avant ainsi que les niveaux de MBP et de CNP déterminent l'étendue du compactage de la membrane (A). Développement de la gaine de myéline représentée dans une vue non enveloppée montrant la zone de croissance (rose), la zone non compactée (bleu), la membrane compactée (zones violettes), l'agencement et la fermeture des canaux cytoplasmiques pendant la formation de la myéline (B). Modèle de formation des boucles paranodales par l'extension latérale des différentes couches de myéline (Snaidero *et al.*, 2014 ; C).

3.7.2 Segments myéliniques et régions nodales

Comme nous l’avons vu précédemment, la myéline est une structure multi-lamellaire organisée de façon segmentaire, définissant des régions distinctes comprenant : l’internœud qui correspond à la partie myélinique, le juxtapanœud, une région intermédiaire faisant la jonction avec le paranœud qui représente la fin de la myéline et le commencement du nœud de Ranvier (Figure 22).

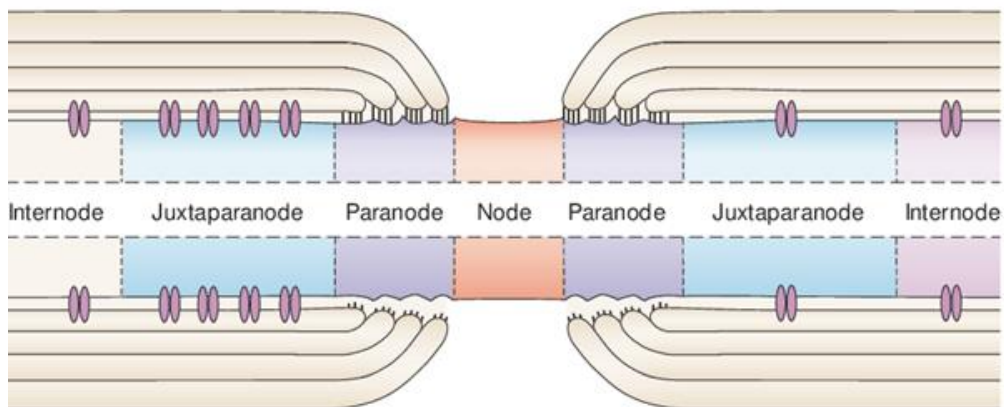


Figure 22 Représentation schématique de l’organisation des différents segments myéliniques bordant le nœud de Ranvier. (Poliak & Peles, 2003).

Le segment initial de l'axone (AIS) est une région spécialisée non myélinisée à l'extrémité proximale de l'axone myélinisé où les potentiels d'action sont initiés. Au niveau de l'AIS, de nombreux canaux ioniques, tels que des canaux sodiques voltage-dépendants (Na_v) et des canaux potassiques sont retrouvés dans l'axolemmes (Duménieu *et al.*, 2017). La propagation rapide et saltatoire du potentiel d'action est possible grâce à l'organisation particulière de la gaine de myéline.

Les segments myéliniques sont composés de domaines fonctionnels distincts, ainsi chaque région internodale est séparée de la suivante par plusieurs domaines spécialisés :

❖ Les nœuds de Ranvier correspondent à une région amyélinique d'environ 1 à 2 μm . Ils sont espacés à des intervalles d'environ 100 fois le diamètre axonal et sont caractérisés par la présence de Na_v (Salzer, 2003). L'importante densité de ces canaux ($>1200/\mu m^2$) est essentielle pour la propagation du potentiel d'action et la conduction saltatoire. Au sein du SNC, trois principaux sous-types de canaux sodiques sont retrouvés : $Na_v1.1$, $Na_v1.2$ et $Na_v1.6$. Le sous-type $Na_v1.1$ est retrouvé principalement au niveau des dendrites alors que les deux autres formes de canaux sodiques sont retrouvées au niveau axonal. Le sous-type $Na_v1.2$ est présent très précocement au cours du développement, tandis que le sous-type $Na_v1.6$ est prédominant chez l'adulte (Rios *et al.*, 2003). La maturation des nœuds de Ranvier est accompagnée d'une réorganisation de ces canaux sodiques. En effet, le sous-type $Na_v1.2$ est associé aux Nœuds de Ranvier immature, mais lorsque la myélinisation est en cours, $Na_v1.6$ prend place. Seul le canal ionique $Na_v1.6$ est présent dans les fibres présentant une myéline compacte (Boiko *et al.*, 2001). Le regroupement des Na_v se déroulant en amont de la mise en place de la myéline, constituerait un mécanisme précoce pour accélérer la vitesse de conduction. En effet, la présence précoce de clusters de Na_v est associée à une conduction micro-saltatoire permettant ainsi d'assurer une propagation plus rapide de l'influx nerveux (Rama *et al.*, 2018).

De récents travaux ont suggéré l'importance de l'espace périaxonal dans la propagation rapide et saltatoire de l'influx nerveux. Les auteurs proposent un modèle à « double câble », dans lequel la gaine de myéline (possédant une faible capacité électrique) est combinée à une sous-couche de myéline conductrice. Cette modélisation reproduirait le profil spatio-temporel de la conduction saltatoire de l'influx nerveux (Cohen *et al.*, 2020).

Au niveau des domaines nodaux, il existe de nombreux contacts avec les cellules gliales environnantes, ce qui conduit à l'hypothèse que les nœuds de Ranvier pourraient servir de

point de communication ou “*hub*” entre les neurones et les cellules gliales (Lubetzki *et al.*, 2020). Ainsi, il est bien établi que l’on retrouve, au niveau des nœuds de Ranvier, des astrocytes périnodaux, voire, comme cela a été révélé récemment, des prolongements de cellules microgliales (Figure 23 ; Lubetzki *et al.*, 2020 ; Desmazières *et al.*, *unpublished work*). De plus, comme l’illustre la figure 23 ci-après, des prolongements de précurseurs d’oligodendrocytes participent également à ce “*hub*” de communications intercellulaires.

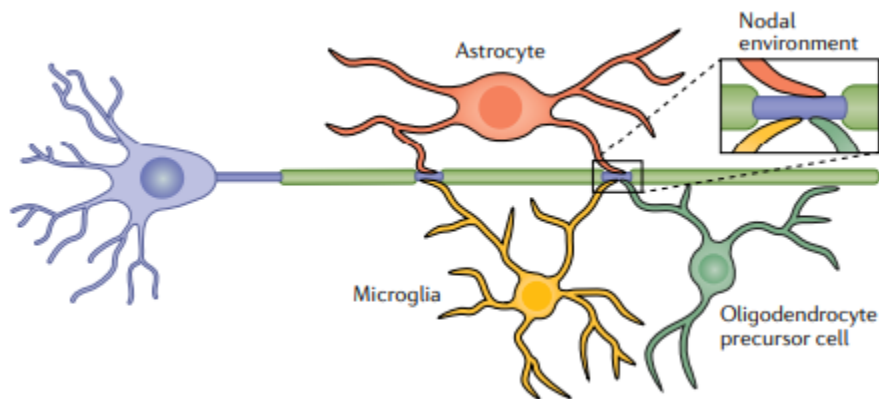


Figure 23 Représentation schématique des contacts neuro-gliaux au niveau des nœuds de Ranvier.

Au niveau de la région nodale, il a été montré que les astrocytes périnodaux, les OPCs et récemment les cellules microgliales étaient en contact avec l’axone (Desmazières *et al.*, *unpublished work*). Ce modèle reste hypothétique, étant donné que les connaissances actuelles ne permettent pas de savoir si les interactions entre ces trois types cellulaires se déroule de manière constante et simultanée (Lubetzki *et al.*, 2020).

❖ Le paranode : cette région qui flanque de part et d’autre les nœuds de Ranvier est la zone d’ancrage de la gaine de myéline à l’axolemme. C’est une structure composée de séries de boucles contenant du cytoplasme : les boucles paranodales (*paranodal loop*). Ces dernières sont en étroite interaction avec l’axone (Poliak & Peles, 2003; Rios *et al.*, 2003). Ces boucles sont caractérisées par la présence de jonctions étroites cloisonnées entre l’axolemme et l’oligodendrocyte. Ces jonctions sont de type septée (*septate-like junctions*), de par leur forte ressemblance aux jonctions retrouvées entre les cellules épithéliales des Invertébrés (Faivre-Sarrailh, 2020). Elles permettent ainsi de jouer un rôle de barrière physique et d’empêcher la diffusion latérale des canaux ioniques entre les domaines nodaux et juxta-paranodaux. Ces jonctions axo-gliales sont permises grâce à l’interaction du complexe axonal Caspr (*Contactin associated protein*) / contactine-1 avec l’isoforme 155kDa de la neurofascine (NF-155) qui est présente à la surface de la membrane oligodendrocytaire (Trapp & Kidd, 2000; Lubetzki *et al.*, 2003).

❖ Le juxtapanode : cette région est comprise entre le paranode et l'internœud. La jonction axo-gliale formée par l'interaction entre l'hétérodimère axonal Caspr2/TAG-1 (*transient axonal glycoprotein-1*) et TAG-1 présente à la membrane de l'oligodendrocyte, permet de regrouper tous les canaux potassiques de type $K_v1.1/K_v1.2$ dans cette région. Ces canaux permettent de réguler l'excitabilité neuronale (Thaxton & Bhat, 2009).

3.7.3 Ultrastructure de la gaine de myéline

La gaine de myéline est une membrane hautement polarisée composée de plusieurs lamelles de membrane en spirales serrées et sans cytoplasme, appelées myéline compacte et retrouvées dans l'internœud et le juxtapanœud. Cependant, elle est également constituée de boucles paranodales non compacte reliant la gaine à l'axolemne.

❖ La myéline compacte est retrouvée au niveau des internœuds et juxtapanœuds. Les descriptions à l'échelle de la microscopie électronique montrent qu'elle est composée d'une structure bien particulière, résultant de l'apposition de deux couches d'une périodicité de 12 nm (Aggarwal *et al.*, 2011). On retrouve 1) une double ligne intrapériodique, qui représente l'apposition de deux feuillettes externes de la membrane plasmique et 2) une ligne dense majeure, formée par l'apposition de deux feuillettes internes de membranes plasmiques (Figure 24).

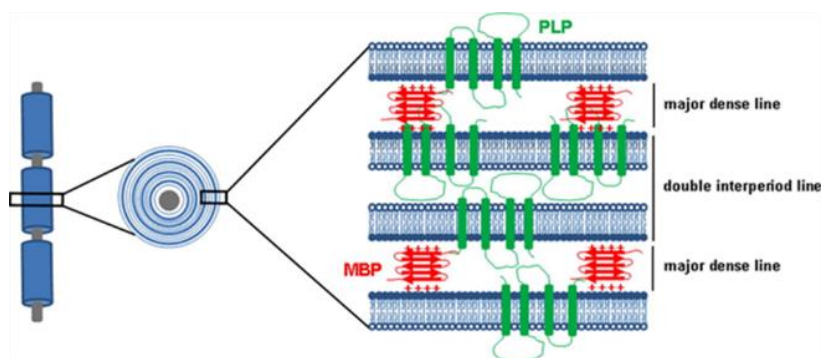


Figure 24 Illustration schématique de la structure de la gaine de myéline.

La myéline compacte est formée par l'apposition des feuillettes externes de la membrane (formant la double ligne intrapériodique), et l'apposition des feuillettes internes (formant la ligne dense majeure ; Baron & Hoekstra ; 2010).

➤ La double ligne intrapériodique (IDL) est composée majoritairement de la protéine PLP. Cette protéine est essentielle pour la stabilisation de l'ultrastructure de la gaine de myéline, cependant son rôle dans la compaction de la gaine de myéline ne fait pas l'unanimité

(Klugmann *et al.*, 1997; Nadon & West, 1998). Le rôle de la PLP dans la compaction de la gaine de myéline diffère selon le modèle de délétion du gène codant pour la PLP utilisé. Elle est ainsi considérée comme une protéine jouant un rôle de « zip ». Des mutations sur le gène PLP1 sont à l'origine de plusieurs leucodystrophies dysmyélinisantes, que l'on regroupe sous le terme de « PLP-pathies ». Les PLP-pathies englobent toutes les formes de la maladie de Pelizaeus-Merzbacher (PMD ; Saugier-Veber *et al.*, 1994; Cambi *et al.*, 1996). Cette pathologie et ses modèles murins feront l'objet du §6 de cette partie.

➤ La ligne dense majeure (MDL) est composée de l'accolement des feuillettes internes des prolongements oligodendrocytaires enroulés autour de l'axone où est retrouvée la protéine MBP. Une fois synthétisée, la MBP est acheminée vers les couches externes de la myéline, où elle se polymérise rapidement pour former un réseau fibreux et permettre l'extrusion du cytoplasme de la gaine nouvellement formée. Cela lui donnera sa stabilité physique et initiera la compaction de la gaine de myéline (Aggarwal *et al.*, 2011). La MBP joue un rôle fondamental dans les processus de myélinisation comme le prouve le mutant *shiverer*. Ces souris ont une durée de vie d'environ 90-150 jours et présentent différents symptômes tels que des tremblements et des crises épileptiques. L'analyse du SNC de ces animaux révèle une gaine de myéline quasi inexistante, avec une absence totale de ligne dense majeure sur le peu de myéline formée (Privat *et al.*, 1979).

❖ La myéline non compacte est quant à elle retrouvée au niveau de la région paranodale. Cette région est enrichie en CNP, elle permet de prévenir la compaction de la gaine de myéline et de maintenir les régions cytoplasmiques riches en canaux sodiques (Trapp *et al.*, 1988; Snaidero *et al.*, 2017).

3.7.4 Régulation du contact axo-gliale et enroulement

Les facteurs axonaux sont nécessaires aux différentes étapes de la myélinisation et peuvent être divisés en deux groupes : ceux qui vont initier et favoriser la myélinisation et ceux qui vont l'inhiber (Piaton *et al.*, 2010). La balance entre ces facteurs dicte l'orchestration spatio-temporelle de la myélinisation (Piaton *et al.*, 2010).

3.7.4.1 Facteurs qui régulent positivement la myélinisation

3.7.4.1.1 Facteurs axonaux médiés par le contact

Les axones commencent à être myélinisés une fois qu'ils commencent à s'élargir. En effet, seuls les axones avec un diamètre supérieur à 0.2 μm sont myélinisés dans le SNC (Baumann & Pham-Dinh, 2001). De plus, le nombre de tours d'enroulement est corrélé avec le diamètre axonal (Friede *et al.*, 1972). Plusieurs facteurs sécrétés par les axones favorisent le contact des oligodendrocytes avec celui-ci, telle que la laminine $\alpha 2$ qui interagit avec l'intégrine $\beta 1$ présente au niveau des oligodendrocytes (Câmara *et al.*, 2009). Lorsque les oligodendrocytes possèdent une mutation de l'intégrine $\beta 1$, seuls les axones de larges diamètres sont myélinisés pendant la fenêtre temporelle normale. Cela suggère que cette intégrine contribuerait à la détection de la taille des axones (Câmara *et al.*, 2009).

3.7.4.1.2 Activité électrique

La possibilité que l'activité électrique neuronale soit un prérequis pour initier la myélinisation a été pour la première fois suggéré en 1963. Gyllensten et Malmfors ont pu constater une hypomyélinisation des nerfs optiques de souris élevées dans le noir, qui de plus débutait plus tardivement que chez les souris élevées en conditions normales (Gyllensten & Malmfors, 1963). En outre, l'utilisation de neurotoxines bloquant les canaux sodiques, telle que la tétrodothine, a montré une inhibition de la myélinisation (Demerens *et al.*, 1996).

3.7.4.2 Facteurs qui régulent négativement la myélinisation

3.7.4.2.1 PSA-NCAM

Plusieurs observations indirectes indiquent que la PSA-NCAM (*polysialic acid neural cell adhesion molecule*) agit comme un régulateur négatif de l'interaction cellule-cellule au cours du développement (Doherty *et al.*, 1990; Kiss *et al.*, 1994). Dans la moelle épinière, au cours du développement post-natal chez la souris, le gradient d'expression de la PSA-NCAM est inversement corrélé avec le gradient de myélinisation, et l'expression de PSA-NCAM diminue parallèlement avec la progression de la myélinisation (Oumesmar *et al.*, 1995). De manière similaire, durant le développement cérébral chez l'embryon humain, l'expression de PSA-NCAM diminue lorsque la MBP est exprimée (Jakovcevski *et al.*, 2007).

3.7.4.2.2 Nogo-A

Initialement décrit comme étant un facteur inhibiteur de la croissance neuritique, aujourd'hui Nogo-A est également connu comme un inhibiteur de la myélinisation (Scholze & Barres, 2012). Chen et ses collaborateurs, se sont interrogés sur l'existence de facteurs membranaires répulsifs entre oligodendrocytes, permettant de réguler l'extension et/ou la rétraction des projections gliales voisines. Pour étudier cela, ils ont recouvert des billes de polystyrène avec des membranes d'OPCs et/ou d'oligodendrocytes. En comparant avec des billes contrôles, ils ont pu constater que le nombre d'internœuds formés par cellule était diminué de deux fois, lorsque les billes étaient recouvertes de membrane oligodendrocytaire. En revanche, des billes recouvertes avec des membranes provenant d'autres cellules gliales telles que les astrocytes, n'entraîne pas de modification dans le nombre d'internœuds formés. Afin d'identifier ces signaux oligodendrocytaires liés à la membrane, les auteurs ont effectué un criblage de facteurs connus pour inhiber la repousse axonale. Parmi ces facteurs, seul Nogo-A s'est montré suffisant et nécessaire pour diminuer le nombre d'internœuds formés par cellule *in vitro* (Chen *et al.*, 2000). Les auteurs ont également montré qu'il en était de même *in vivo*. En effet, le nombre d'internœuds formés par cellule, se trouve augmenter chez les souris déficientes en Nogo A comparativement à des souris sauvages (Chen *et al.*, 2000).

4 Myélinisation au cours de la vie adulte

Alors que l'on pensait auparavant que la myélinisation était en grande partie statique après le développement, de récentes observations soulignent un remodelage de la myéline dépendante de l'activité, de l'expérience et de l'apprentissage. En effet, grâce à l'imagerie par résonance magnétique (IRM), une étude a mis en évidence chez l'Homme, que la pratique d'une performance de haut niveau était corrélée à des changements structuraux de la substance blanche de la région cérébrale impliquée dans la réalisation de cette tâche (Sampaio-Baptista & Johansen-Berg, 2017). Par exemple chez les pianistes, l'anisotropie fractionnelle (FA) de la capsule interne est positivement corrélée au nombre d'heures pratiquées au cours de l'enfance (Bengtsson *et al.*, 2005). Ces changements sont le reflet d'une plasticité dynamique de la substance blanche, qui contribue aux processus d'apprentissage durant la vie adulte (Sampaio-Baptista & Johansen-Berg, 2017). L'ensemble de ces observations a mené au concept de myélinisation adaptative et commence à être reconnu comme une nouvelle forme de plasticité cérébrale (Fields & Bukalo, 2020).

Plusieurs interrogations subsistent quant au(x) sous-type(s) d'oligodendrocyte(s) impliqué(s) dans ce processus. Nous avons vu précédemment, que sous l'influence de facteurs intrinsèques et extrinsèques, les OPCs se différencient pour devenir des oligodendrocytes myélinisants. Cependant, une grande proportion de ces cellules reste dans un état quiescent au cours de la vie adulte et n'entame pas le processus de différenciation. Ces cellules partagent plusieurs marqueurs communs avec les OPCs pré-nataux et péri-nataux, tels que la protéoglycane NG2, PDGFR α , et Olig1/2 (Fancy *et al.*, 2004). Les OPCs adultes ou connus aussi comme "*NG2-glia*" possèdent la capacité de proliférer, migrer et se différencier en oligodendrocytes myélinisants. Ils représentent la plus grande population mitotique parmi les cellules neurales. Par exemple, chez l'Homme les OPCs représentent 10 à 15% des cellules totales du SNC, et ne constitueraient que 5% des cellules chez le rongeur adulte (Dawson *et al.*, 2003; Staugaitis & Trapp, 2009). Néanmoins, l'implication de ces cellules dans le remodelage de la myéline pourrait être espèce-dépendante (Sampaio-Baptista & Johansen-Berg, 2017). Chez l'Homme, ce sont les oligodendrocytes préexistants qui seraient impliqués dans la formation continue de la myéline au cours de la vie adulte (Yeung *et al.*, 2014). En revanche, chez le rongeur, ce processus serait assuré par des oligodendrocytes nouvellement formés (Rivers *et al.*, 2008).

Cependant, des questions majeures demeurent sur la façon dont les cellules nouvellement générées s'intègrent dans un réseau neuronal déjà établi, ou bien encore si la distribution des internœuds le long des axones est maintenue au cours de la vie adulte et du vieillissement. De récents travaux réalisés chez la souris se sont intéressés à ces questions. Hill et ses collaborateurs ont montré l'existence d'une plasticité structurelle de la myéline, où un remodelage continu et l'ajout de nouveaux internœuds s'opéraient et se maintenaient le long de la vie adulte (Figure 25 ; Hill *et al.*, 2018).

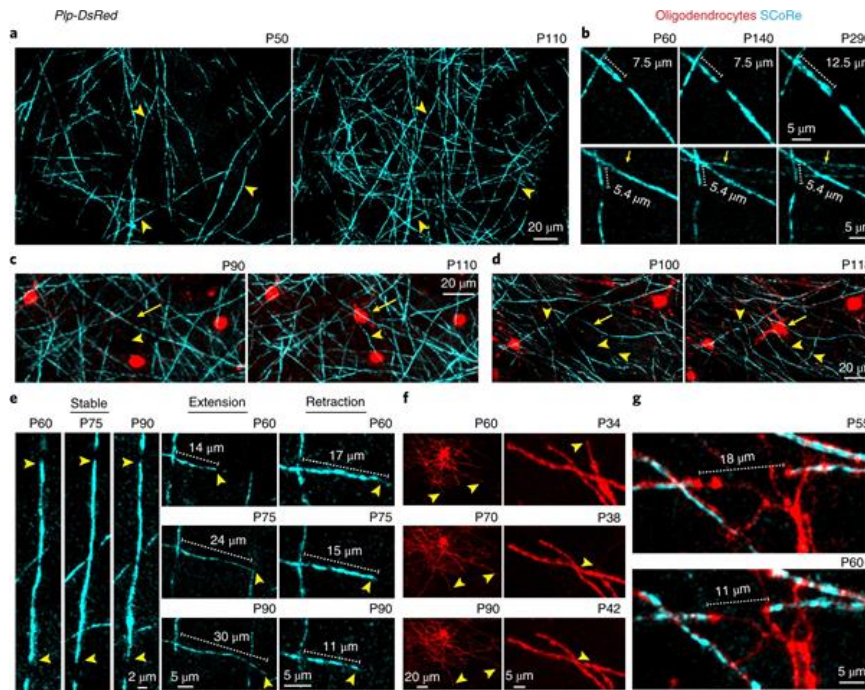


Figure 25 Formation de nouveaux internœuds et plasticité de la gaine de myéline au cours de la vie adulte.

Imagerie biphotonique *in vivo* à différents âges montrant l'apparition de nouveaux internœuds grâce à la visualisation de la myéline par la technique spectral confocal reflectance (SCoRe ; bleu). Les pointes de flèches indiquent la localisation des mêmes axones à différents temps (a). Imagerie biphotonique *in vivo* montrant l'ajout de nouveaux internœuds (flèches jaunes) et la plasticité des nœuds de Ranvier dû au changement de longueur d'internœud (b). Imagerie biphotonique *in vivo* montrant l'apparition de nouveaux oligodendrocytes matures (flèches jaunes ; rouge) corrélé avec l'apparition de nouveaux internœuds (pointe de flèche jaune ; c-d). Acquisition en time-lapse montrant la dynamique régissant la longueur des internœuds (stabilité, extension et rétraction). Les pointes de flèches indiquent la fin des segments myéliniques, et la ligne pointillée la longueur de l'internœud (e). Acquisition en time-lapse d'oligodendrocytes matures (rouge) montrant les changements de longueur d'internœud (pointe de flèches jaunes) à différents âges (f). Imagerie biphotonique *in vivo* d'internœuds se rapprochant au cours du temps (Hill *et al.*, 2018 ; g).

5 Pathologies dysmyélinisantes et modèles murins

Parmi les pathologies portant atteinte à la myéline, deux grands types impliquant des mécanismes physiopathologiques différents peuvent être distingués : d'une part les maladies dites démyélinisantes et, d'autres part, celles dites dysmyélinisantes. Les pathologies dites démyélinisantes impliquent que la gaine de myéline est correctement formée lors du développement de l'individu, mais par la suite, elle ou bien les cellules qui la forment se trouvent altérées. Elles peuvent être classifiées en différentes catégories selon leur étiologie : démyélinisation virale, démyélinisation provoquée par un processus inflammatoire, par hypoxie/ischémie ou dû à un défaut métabolique (Love, 2006). Les pathologies dites dysmyélinisantes impliquent des anomalies dans la formation ou le maintien de la gaine de myéline. Dans ce paragraphe, nous nous intéresserons exclusivement aux maladies dysmyélinisantes.

Parmi ces leucodystrophies, on retrouve les « PLP-pathies », résultant de différentes mutations du gène *PLP1*, conduisant à des formes sévères de la maladie de Pelizaeus-Merzbacher (PMD) ou à des formes modérées et tardives de paraplégie spastique liée au chromosome X (SPG2). Cependant, pour 20% des patients souffrant de PMD et de SPG2, l'implication du gène *PLP1* n'a pas pu être montrée, ces patients sont dénommés PMLD (Pelizaeus-Merzbacher like-disease ; Schiffmann & Boespflug-Tanguy, 2001).

5.1 Maladie de Pelizaeus-Merzbacher

5.1.1 Historique

Cette maladie a été décrite pour la première fois en 1888, par Friedrich Pelizaeus. Il rapporta un tableau clinique dont seuls les individus masculins au sein d'une même famille étaient touchés. Ces jeunes garçons présentaient des mouvements oscillatoires involontaires des yeux, une spasticité des membres et un retard développemental cognitif (Inoue, 2005). En 1910, Ludwig Merzbacher, déduit que cette maladie est transmise de façon récessive et est liée au chromosome X. Il fit également l'observation d'une atteinte myélinique chez ces patients (Inoue, 2005). En 1964, Zeman émet l'hypothèse qu'un déficit de la PLP est à l'origine de la PMD (Zeman *et al.*, 1964). La découverte de la localisation du gène *PLP1* sur le chromosome X étaye cette hypothèse (Willard & Riordan, 1985). Peu de temps après, l'identification de mutations ponctuelles faux-sens de PLP, responsables de formes sévères de PMB sont faites par plusieurs auteurs (Gencic *et al.*, 1989; Hudson *et al.*, 1989). Puis, l'observation d'une délétion complète du gène *PLP1* responsable d'une forme modérée de PMD fut faite en 1991 (Raskind *et al.*, 1991).

5.1.2 Formes cliniques

La PMD est une maladie à large spectre clinique. Une classification basée à la fois sur les symptômes cliniques et les caractéristiques neuropathologiques a été proposée par Seitelberger. Ainsi, les formes de PMD sont catégorisées selon deux formes : une forme néonatale dite « sévère » et une forme transitoire dite « classique » (Seitelberger, 1995; Inoue, 2005). Une nouvelle classification a été proposée au vu de l'hétérogénéité des formes cliniques. Basée sur des critères d'atteintes motrices, elle permet de définir trois formes de PMD : forme 0 (aucune acquisition motrice), forme 1 (tenue de la tête), forme 2 (tenue en position assise, forme 3 (tenue debout avec assistance ; **Figure 26** ; Inoue, 2019). Une quatrième forme existe, mais appartient au tableau clinique de la SPG2 (Cailloux *et al.*, 2000).

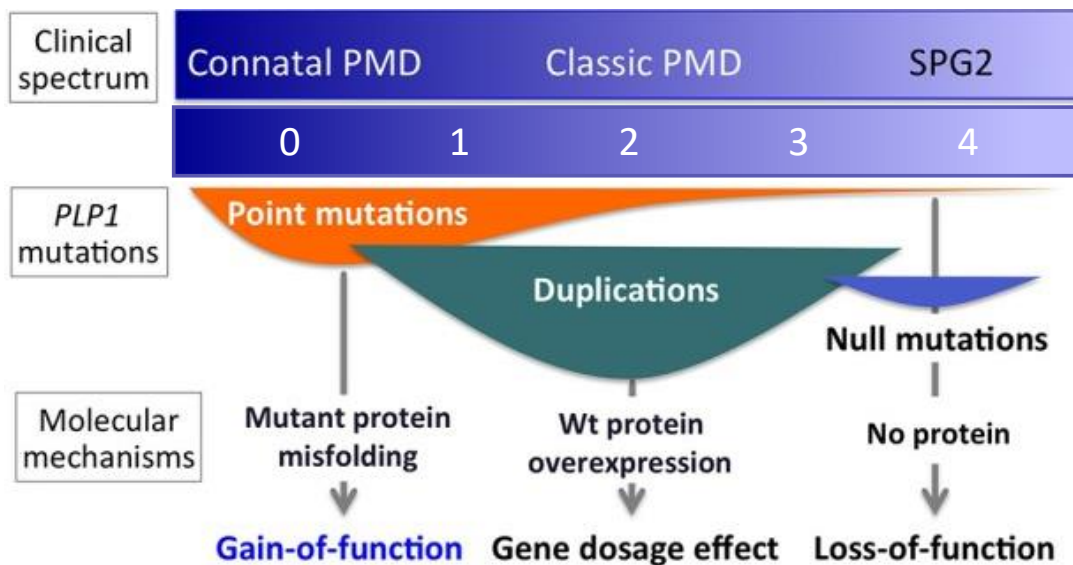


Figure 26 Classification clinique des formes de « PLP-pathies ».

Le rectangle supérieur montre la classification historique établie par Seitelberger, qui contraste avec la classification numérique actuelle (de 0 à 4) selon Boespflug-Tanguy. En dessous, un schéma montrant la distribution chevauchante des mutations PLP1 associées à chaque phénotype. Il est essentiel de noter que chaque type de mutation peut causer plusieurs phénotypes, ainsi la mutation impliquée ne peut être prédite à partir des signes cliniques. Les conséquences moléculaires des différentes mutations sont représentées en bas de ce schéma et sont associées à chaque forme de la maladie (d'après Inoue, 2019).

5.2 Paraplégie spastique liée au chromosome X

La SPG2 fait part de la nosologie des paraplégies spastique héréditaire (*hereditary spastic paraplegia* ou HSP), dont la caractéristique essentielle de la pathologie est une dégénérescence progressive des voies cortico-spinales (CST), voies motrices descendantes majeures. La SPG2 ou PLP-pathie de forme 4 représente la forme la plus modérée des PMD. Les patients présentent un développement moteur normal ou légèrement décalé durant la première année de vie. L'acquisition d'une démarche stable se déroule avant l'âge de 18 mois, attestant d'une bonne dynamique de myélinisation. Elle survient progressivement vers l'âge de 2 ans, se traduisant par une faiblesse et une spasticité des membres inférieurs, et évolue très rapidement au moment de l'adolescence. Cependant elle est associée à une survie normale. Elle est caractérisée par la dégénérescence progressive des voies cortico-spinales, voies motrices majeures.

5.3 Modèles murins des PLP-pathies

Les mutations géniques induisant la dysmyélinisation sont diverses. Elles peuvent engendrer une perte de fonction de la protéine PLP liée à son absence d'expression ou bien un gain de fonction toxique induit par des mutations ponctuelles ou par la présence de copies surnuméraires du gène. Les modèles murins modélisant ces pathologies ont largement contribué à la compréhension des mécanismes impliqués dans ces différentes formes de « PLP-pathies ».

5.3.1 Perte de fonction

La perte d'expression de la PLP induit la forme la plus modérée des « PLP-pathies » : la SPG2. Chez une lignée de souris transgénique abolissant l'expression de la PLP : Plp^{null} , les oligodendrocytes se développent de manière normale, se différencient et myélinisent correctement le SNC (Klugmann *et al.*, 1997). Aucun défaut de compaction de la gaine de myéline, ni de troubles moteurs ne sont constatés (Klugmann *et al.*, 1997). L'observation de la myéline compacte du SNC en microscopie électronique dépend de la méthode de préparation des échantillons. Classiquement, les échantillons sont fixés avec des aldéhydes et post-fixés avec de l'osmium (Os). Ainsi, la ligne dense majeure est le composant le plus visible, et généralement la ligne intrapériodique apparaît comme une seule ligne mince souvent discontinue de densité beaucoup plus faible. Le ferricyanure (FCN), lorsqu'il est ajouté à la post-fixation avec l'Os, agit comme un traceur extracellulaire et se retrouve piégé dans les espaces entre les couches de myéline. Rosenbluth et ses collaborateurs ont ainsi utilisé cette méthode afin de caractériser davantage les anomalies subtiles présentes chez les souris Plp^{null} . Leurs résultats démontrent que les souris mutantes présentent un défaut dans l'alignement des « composants radiaux » (radial component ou RC), structure spécialisée au sein de la myéline du SNC qui est censée stabiliser l'apposition des membranes dans l'internœud (Peters, 1961; Kosaras & Kirschner, 1990). Leurs observations montrent que ces composants forment des empilements diagonaux orientés selon un angle de $\sim 45^\circ$ au lieu de 90° ; nommés « composants diagonaux » (diagonal component ou DC), suggérant que la PLP joue un rôle dans l'organisation de cette structure (Figure 27 ; Rosenbluth *et al.*, 2006).

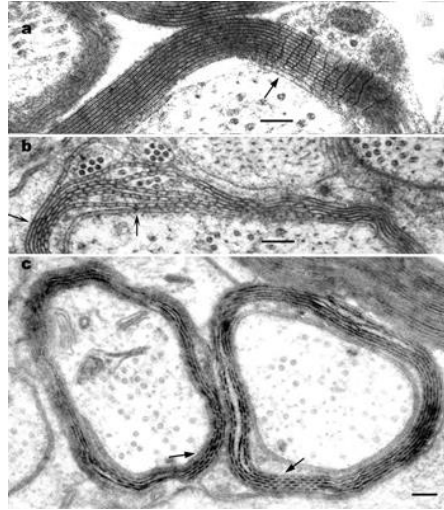


Figure 27 Composantes radiales vs composantes diagonales.

Myéline normale post-fixée avec Os (pas de FCN) et colorée avec du permanganate de magnésium (KMnO₄) et de l'acétate d'uranyle (UA). Les lignes denses majeures de myéline compacte (MDL) compacte sont d'épaisseur uniforme et régulièrement espacées. Juste sous la languette extérieure de la gaine, la composante radiale apparaît sous la forme d'une série de 12 « lignes » (flèche) à peu près perpendiculaire aux MDL (a). Fibre myélinisée P₀^{null}, préparée comme ci-dessus, montrant une composante diagonale (flèche oblique, extrême gauche ; b) Deux fibres finement myélinisées du nerf optique de souris P₀^{null} post-fixées avec Os/FCN et contrastées avec UA. Les flèches indiquent l'angle fait par les éléments DC par rapport aux lamelles de myéline. (Rosenbluth *et al.*, 2006 ; c).

Cependant, dans d'autres modèles de délétion du gène *plp1* des anomalies de compaction sont retrouvées et sont couplées à une dégénérescence axonale progressive (Griffiths *et al.*, 1998). Par exemple, dans un modèle d'altération ciblée du gène *plp1*, où l'exon III se trouve délété et une cassette anti-sens de néomycine insérée (DM20/P₀^{neo}), la compaction de la ligne dense majeure n'est pas affectée, tandis que la ligne intrapériodique est complètement absente (Figure 28 ; Boison & Stoffel, 1994; Spörkel *et al.*, 2002).

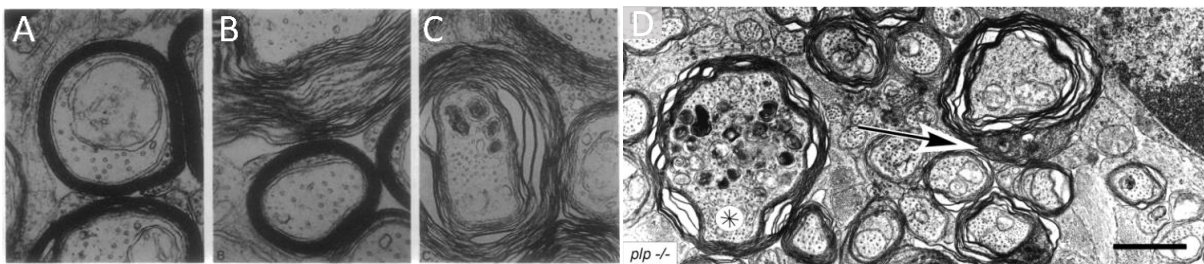


Figure 28 Les souris déficientes en PLP présentent un défaut de compaction de la gaine de myéline.

Photomicrographies de coupes transversales de nerf optique en microscopie électronique de souris DM20/PLP^{neo} (A-C) et *plp*^{-/-} (D). Les gaines de myéline présentent une compaction normale chez les souris sauvages (A), une compaction lâche chez un mutant hétérozygote (B) et une déformation et sont non-compactées chez un mutant hémizygote (C ; Boison and Stoffel, 1994). Une myéline mal compactée est également observée chez des souris *plp*^{-/-}, la présence de cytoplasme au sein de la myéline compacte (flèche) montre le début de la dégénérescence de la gaine de myéline (Spörkel *et al.*, 2002).

5.3.2 Gain de fonction

5.3.2.1 Duplications

La présence de copies surnuméraires du gène *PLP1* chez les patients se traduit par une forme « classique » de la maladie. Lorsque le gène se trouve en triplicat, voire en quintuplat, la forme de PDM est encore plus sévère (Wolf *et al.*, 2005). Dans les modèles murins, les souris peuvent présenter entre 2 et 14 copies supplémentaires du gène. L'incorporation de copies supplémentaires induit ainsi une surexpression de PLP. Cette augmentation d'expression induit une mort cellulaire programmée de type apoptotique des oligodendrocytes (Cerghet *et al.*, 2001).

5.3.2.2 Mutations ponctuelles

Les mutations ponctuelles présentes dans les régions codantes de *plp1* sont capables d'altérer la conformation de la protéine, conduisant à un gain de fonction toxique pour les oligodendrocytes. Il existe plusieurs modèles de souris, ayant des mutations spontanées localisées à des endroits différents de la protéine : les souris "*jimpy*" (jp), "*jimpy-myelin synthesis deficient*" (msd) et "*jimpy-rumpshaker*" (rsh ; **Figure 29**). Les modèles jp et msd modélisent les formes les plus sévères de PMD et se caractérisent par la mort massive des oligodendrocytes alors que les souris rsh modélisent la forme modérée SPG2 (Griffiths *et al.*, 1990).

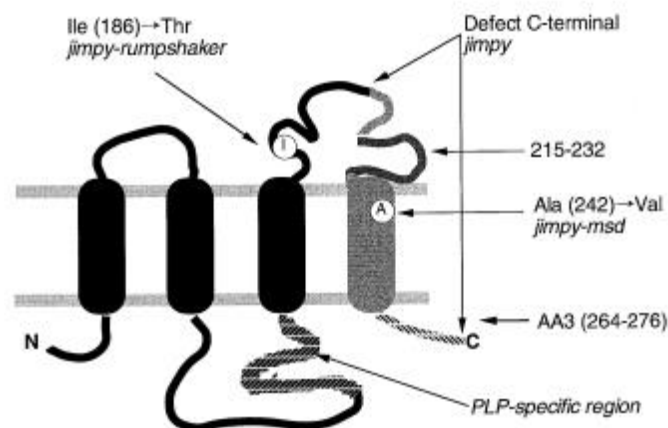


Figure 29 Localisations des différentes mutations présentes sur la protéine PLP dans les modèles de mutations spontanées ponctuelles.

(Yamada *et al.*, 2001)

Dans le modèle *jimpy*, la mutation ponctuelle se trouve au niveau de l'exon 5, induisant une perte de 74 paires de bases (pb) de l'ARNm (Figure 29). Ceci résulte en un défaut de la séquence C-terminale des protéines PLP/DM20 formées (Nave *et al.*, 1986; Hudson *et al.*, 1987). Les souris présentent une hypomyélinisation, dû à une importante mort oligodendrocytaire (Figure 30). Cette hypomyélinisation est accompagnée d'un défaut de compaction au niveau des lignes intrapériodiques, ainsi que des anomalies axonales avec la présence de vacuoles (Duncan *et al.*, 1989; Thomson *et al.*, 1999). Ce trouble dysmyélinique se traduit par une vitesse de conduction réduite, des tremblements et des troubles de la coordination motrice (Omlin & Anders, 1983; Nave *et al.*, 1986; Boison & Stoffel, 1994; Thomson *et al.*, 1999).

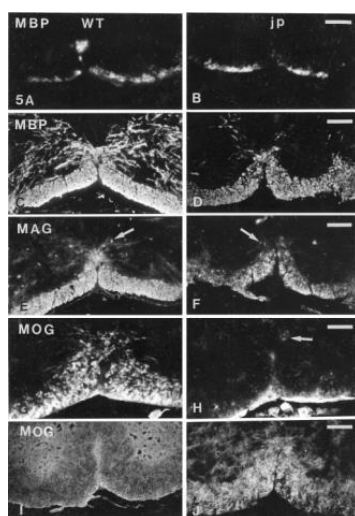


Figure 30 Profil d'expression des protéines de myéline dans la moelle épinière cervicale entre les souris sauvages et jimpy au cours du développement.

Hybridation *in situ* au niveau de la partie ventrale de la moelle épinière entre des souris sauvages (colonne de gauche) et des souris jimpy (colonne de droite) pour la protéine MBP à P1 (A, B) et à P5 (C, D); de la protéine MAG à P5 (E, F) et de la protéine MOG à P5 (G-H) et à P20 (I, J ; Thomson *et al.*, 1999).

Le modèle *jimpy-msd*, présente un phénotype proche à celui des souris *jimpy*. La mutation ponctuelle est localisée dans l'exon 6, il en résulte un changement d'acide aminé dans un des domaines transmembranaires de protéines PLP/DM20 (Figure 29 ; Gencic & Hudson, 1990).

Le modèle "*jimpy-rumpshaker*" fut caractérisé en 1990 comme un modèle avec un phénotype modéré, marqué des tremblements transitoires et une survie normale. La survie oligodendrocytaire n'est pas affecté dans ce modèle, et la quantité de myéline est également normale (Griffiths *et al.*, 1990; McLaughlin *et al.*, 2006, 2007). Dans ce modèle, les animaux sont porteurs d'une mutation ponctuelle au sein de l'exon 4, induisant un changement d'acide aminé dans une des boucles extracellulaires des protéines PLP/DM20 (Figure 29). La mutation retrouvée dans ce modèle est semblable à celle retrouvée chez les patients atteints des formes modérées de SPG2 (Svenstrup *et al.*, 2010).

Des études *in vitro*, ont montré que le trafic des protéines PLP/DM20 était perturbé dans un contexte de PMD. Les protéines s'accumulent au sein du réticulum endoplasmique (RE) et ne s'acheminent pas vers la membrane plasmique. Le défaut de trafic est corrélé avec la sévérité des symptômes cliniques : dans les formes sévères de PMD, le trafic est complètement arrêté, tandis que dans les formes modérées (*i.e.* SPG2), seule la PLP s'accumule dans le RE. Cette accumulation entraîne l'activation de la réponse appelé UPR (*unfolded protein response*) ou encore stress du RE. Cette réponse est un mécanisme permettant l'homéostasie cellulaire entre la synthèse, l'utilisation et la dégradation protéique.

Comme nous l'avons vu, les différentes étapes de la myélinisation requièrent une régulation complexe de nombreux facteurs intrinsèques et extrinsèques au cours du développement. Historiquement, notre laboratoire s'est toujours intéressé aux implications de la sérine protéase tPA (activateur tissulaire du plasminogène) au sein du SNC. Ainsi, il a été montré que le tPA favorise la migration oligodendrocytaire au cours du développement mais également lors des processus de remyélinisation (Leonetti *et al.*, 2017). Étant donné que mes travaux de thèse se sont focalisés sur les implications de cette sérine protéase dans les processus de myélinisation, cette deuxième partie récapitulera les connaissances actuelles sur le tPA et ses implications physio-pathologiques dans le SNC.

L'activateur tissulaire du plasminogène (tPA)

1 Historique

Durant la Grèce antique, Hippocrate avait déjà observé que le sang des personnes décédées n'était pas coagulé. C'est en 1844 qu'Andral met en avant l'hypothèse que le sang coagulé peut se liquéfier à nouveau offrant à la communauté scientifique les prémisses du système fibrinolytique (Andral, 1844). En 1893, Denys, Marbaix et Dastre déterminent que ce résultat est la conséquence d'un mécanisme protéolytique qu'ils nomment fibrinolyse (pour fibrine et lyse ; Denys & De Marbaix, 1889; Dastre, 1893). Cette activité protéolytique est retrouvée dans une fraction de sérum (Hedin, 1904) dont les composants furent identifiés quelques années plus tard. Christensen and Macleod ont ainsi identifié le plasminogène, précurseur de la plasmine, principale enzyme responsable de la dégradation de la fibrine (Christensen & Macleod, 1945). En 1947, Astrup et Permin parvinrent à montrer la présence d'un activateur fibrinolytique au sein du tissu animal, ils nommèrent cette substance la fibrinokinase (Astrup & Permin, 1947). Ce n'est qu'en 1952 qu'Astrup et Stage réussirent à isoler la fibrinokinase, à partir du tissu de cœur de porc (Astrup & Stage, 1952). La fibrinokinase fut purifiée pour la première fois en 1979 à partir de la circulation sanguine (Binder *et al.*, 1979) et fut renommée activateur tissulaire du plasminogène ou tPA.

La première administration du tPA chez l'Homme a été réalisée en 1981 à Rotterdam par W. Weimar chez deux patients présentant une thrombose veineuse rénale suite à une transplantation (Weimar *et al.*, 1981). Deux ans plus tard, le clonage du tPA ainsi que sa production sous sa forme recombinante sont lancés (Pennica *et al.*, 1983). En 1991, Collen et Lijnen démontrent que la lyse de caillots est favorisée par le tPA, de par sa capacité à induire une fibrinolyse dépendante du plasminogène (Collen & Lijnen, 1991). Le succès d'une étude clinique conduit à l'utilisation du tPA comme agent fibrinolytique pour le traitement de la phase aiguë de l'accident vasculaire cérébral ischémique (National Institute of Neurological Disorders and Stroke rt-PA, Stroke Study Group, 1995).

2 Structure du tPA

Le tPA est la protéine issue de l'expression du gène *Plat* localisé sur le chromosome 8 chez l'Homme et chez la souris. C'est une glycoprotéine qui appartient à la famille des sérine protéases. Il est synthétisé sous la forme d'une chaîne polypeptidique continue de 527 acides aminés ayant une masse moléculaire d'environ 69kDa (Pennica *et al.*, 1983). Sa configuration tridimensionnelle est maintenue par 17 ponts disulfures. Le tPA existe sous deux formes : une forme native, simple chaîne (*single chain* ou sc-tPA) et une forme double chaîne (*two chain* ou tc-tPA). Le clivage de la forme sc-tPA donne la formation d'une chaîne légère et d'une chaîne lourde qui restent liées par un pont disulfure établi entre deux cystéines appartenant à chacune des deux chaînes (Figure 31). Que ce soit dans sa conformation simple ou double chaîne, ces deux formes de tPA sont actives et assurent toutes deux la conversion du plasminogène en plasmine (Rijken *et al.*, 1982).

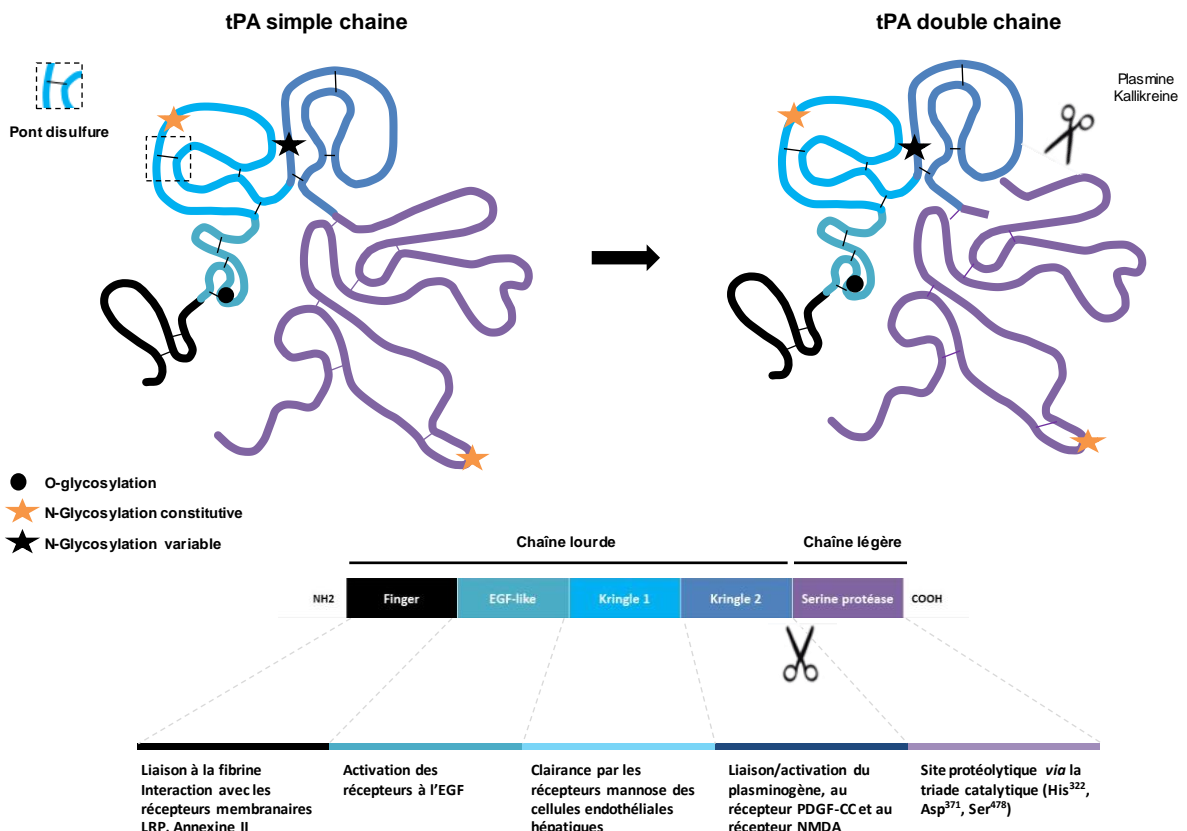


Figure 31 Structure et implications physiologiques des différents domaines du tPA.

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

Sa structure tridimensionnelle est maintenue par 17 ponts disulfures. Le tPA est composé de cinq domaines, lui permettant d'interagir avec diverses protéines mais également d'être impliqué dans diverses fonctions qui seront développées dans le paragraphe suivant. La chaîne lourde située en amino-terminale contient les 4 domaines suivants :

❖ Le domaine **Finger**, appelé ainsi par analogie au premier domaine Finger de la fibronectine. Celui-ci est impliqué dans la liaison du tPA avec la fibrine, résultant de la formation d'un complexe avec le plasminogène (Kagitani *et al.*, 1985). *Via* ce domaine, le tPA peut également interagir avec des récepteurs membranaires incluant le récepteur aux lipoprotéines de faibles densités (*Low Density Lipoprotein Receptor-related Protein* ou LRP) ainsi qu'avec l'annexine II (Bu *et al.*, 1992; Hajjar & Krishnan, 1999).

❖ Le domaine **EGF-like** (*epidermal growth factor-like domain*, EGF). Il permet au tPA d'interagir et d'activer les récepteurs à l'EGF (Ortiz-Zapater *et al.*, 2007). Ce domaine est également impliqué dans la clairance du tPA par les hépatocytes (Camani & Kruithof, 1995).

❖ Le domaine **Kringle 1**, ce site forme une poche hydrophobe au sein de la structure tertiaire de la protéine. Il serait impliqué dans la recapture et la clairance du tPA par les cellules endothéliales du foie *via* le récepteur au mannose (Kuiper *et al.*, 1996).

❖ Le domaine **Kringle 2**, contient un site de liaison à lysine (*lysine binding site* ou LBS) lui permettant d'interagir avec divers substrats et/ou récepteurs tels que le plasminogène, le facteur de croissance dérivé des plaquettes (*Platelet Derived Growth Factor-CC* ou PDGF-CC), le récepteur NMDA (*N-methyl-D-aspartate receptor*) ou bien encore les protéines de la famille des HMGB1 (Fredriksson *et al.*, 2004; Lopez-Atalaya *et al.*, 2008; Roussel *et al.*, 2011).

La chaîne légère du tPA n'est composée que d'un seul domaine:

❖ Le domaine **protéase**, dont le site actif est formé par la triade catalytique composée de l'histidine³²², l'acide aspartique³⁷¹ et la sérine⁴⁷⁸. Ce domaine catalytique permet la conversion du plasminogène en plasmine (Pennica *et al.*, 1983).

3 Distribution et expression du tPA dans le système nerveux central

3.1 Dans l'encéphale

Ce n'est qu'en 1981 que l'expression de tPA au sein du SNC fut mis en évidence pour la première fois. Bien que l'expression endothéliale du tPA était connue depuis plusieurs années dans les vaisseaux périphériques, Soreq et Miskin ont démontré son expression au sein des cellules endothéliales tapissant les vaisseaux cérébraux ainsi que dans les neurones (Soreq & Miskin, 1981). Sa distribution et son niveau d'expression ont été décrits durant le développement et chez l'adulte, à la fois chez l'animal et chez l'Homme (Vassalli *et al.*, 1991; Sappino *et al.*, 1993; Teesalu *et al.*, 2002).

Chez l'embryon de souris, les quantités d'ARNm codants pour le tPA dans différentes régions cérébrales (prosencephale, mésencéphale et rhombencéphale), varient fortement au cours du développement et sont souvent transitoires (Carroll *et al.*, 1994 ; [Figure 32](#)).

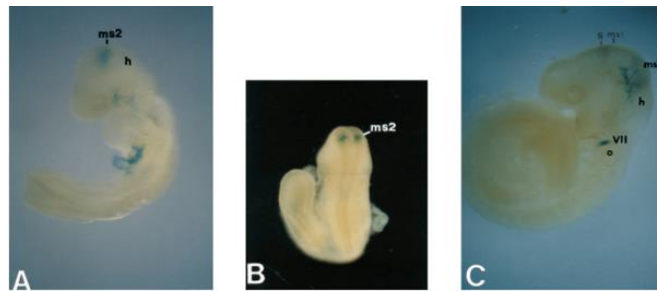


Figure 32 Expression spatio-temporelle du tPA lors du développement embryonnaire de la souris.

Cette étude a été réalisée en utilisant des embryons de souris transgéniques dans lesquels le promoteur du tPA a été fusionné à la séquence bactérienne du gène de la β -galactosidase. L'expression de la β -galactosidase (en bleu) devient ainsi le rapporteur de l'expression de tPA. Vue latérale (A) et ventrale (B) à 8,5 jours de développement embryonnaire (E8,5) montrant l'activité de la β -galactosidase. A ce stade du développement, la seule région du SNC marquée est le mésencéphale, au niveau des neuromères (ms2). (C) Vue latérale d'un embryon à E9,5 montrant une activité β -galactosidase au niveau du mésencéphale, du rhombencéphale (h) et des nerfs crâniens. D'après Carroll *et al.*, 1994.

Par exemple, l'expression d'ARNm du tPA au sein du cervelet est retrouvée uniquement à partir de E17. Durant la première semaine de vie (P1 à P7), un pic d'expression est observé, puis les transcrits diminuent rapidement entre P14 et P21. Ils ne sont que très peu exprimés au stade adulte ([Figure 33](#) ; Friedman & Seeds, 1995).

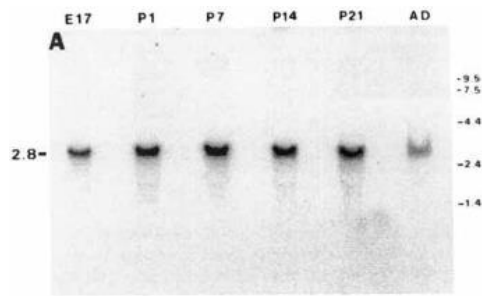


Figure 33 Expression et régulation du tPA au cours du développement cérébelleux.

Northern blot des ARNm codants pour le tPA du cervelet entre E17 et P21. Les ARNm codants le tPA sont plus élevés pendant la période de migration active des neurones granulaires et ils diminuent de 75% dans le cervelet adulte (AD ; Friedman & Seeds, 1995).

3.2 Dans la moelle épinière

L'expression de tPA au sein de la moelle épinière débute à E10.5 au niveau de la corne ventrale. À ce stade, son expression est majoritairement retrouvée dans la partie rostrale de la moelle épinière et descend progressivement dans les régions les plus caudales. À E13.5, l'expression du tPA décroît mais reste observable au niveau de la moelle cervicale et thoracique. En revanche à ce stade, un fort marquage est détecté dans les régions caudales (lombaire et sacrée ; Carroll *et al.*, 1994). Cela suggère que l'expression de tPA suit la maturation de la moelle épinière qui se fait aussi selon un axe rostrocaudal (Figure 34).

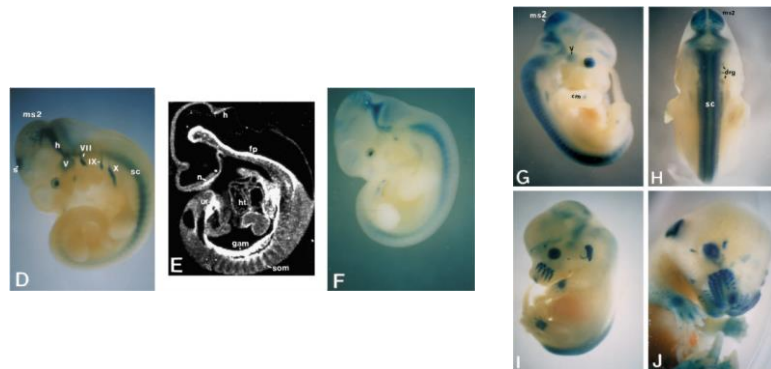


Figure 34 Expression spatio-temporelle du tPA lors du développement embryonnaire de la souris.

Vue latérale d'un embryon à E10,5 (D). Coupe sagittale montrant l'expression des ARNm codants pour le tPA à E10,5 (E). Vue latérale d'un embryon à E11,5 (F), et E12,5 (G). Vue dorsale d'un embryon à E12,5 (H), et vue latérale à E13,5 (I). Vue frontale d'un embryon à E15,5 (J). A ces différents stades, une expression de tPA au niveau du prosencéphale, du mésencéphale, du rhombencéphale, de la moelle épinière et des nerfs crâniens est détectée. rh : rhombencéphale ; ms2 : neuromères du mésencéphale ; sc : moelle épinière ; s : prosencéphale ; V, VII, IX, X : nerfs crâniens trijumeaux (V), faciaux (VII), glossopharyngiens (IX) et vagues (X). D'après Carroll *et al.*, 1994.

3.3 Expressions cellulaires

Une forte expression d'ARNm codants pour le tPA est retrouvée au sein des cellules de la plaque du plancher, ainsi que dans les cellules bordant le canal épendymaire de E10 jusqu'à E17 (Figure 35). Il a été suggéré que le tPA localisé au sein de la plaque du plancher était impliqué dans la pousse axonale et plus particulièrement dans la guidance des fibres commissurales (Sumi *et al.*, 1992).

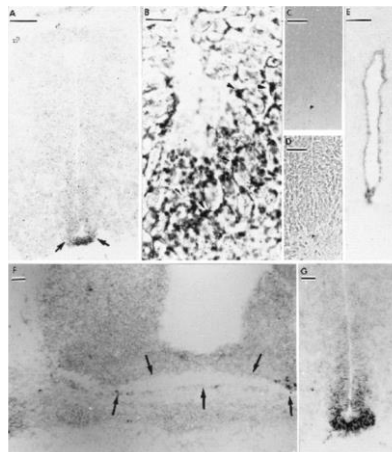


Figure 35 Hybridation *in situ* révélant les ARNm codants pour le tPA dans la moelle épinière de rat.

Moelle épinière à E13(A). Moelle épinière à E16 (B). Contrôles du marquage en microscopie optique (C) et en contraste de phase (D). Cerveau de rat adulte à l'extrémité caudale du 3^{ème} ventricule ; le tPA est présent dans les cellules épendymaires tapissant toute la circonférence du ventricule (E). Coupe coronale du chiasma optique à E17 (F). Moelle épinière à E17, montrant le marquage de la plaque du plancher ainsi que certaines des cellules épendymaires situées plus haut en bordure du ventricule (G). Les barres d'échelle sont de 100 μ m (A, E), 10 μ m (B), 50 μ m (C, D) et 20 μ m (F, G ; Sumi *et al.*, 1992).

Au sein du SNC, la majorité des types cellulaires expriment du tPA (Figure 36) : les neurones, les mastocytes, les péricytes, les épendymocytes, les astrocytes, les cellules microgliales et les oligodendrocytes (Toshniwal *et al.*, 1987; Buisson *et al.*, 1998; Siao *et al.*, 2003; Correa *et al.*, 2011).

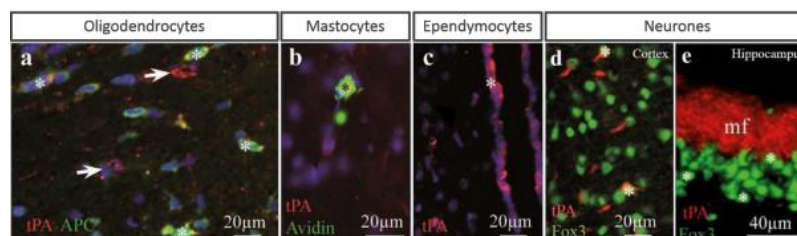


Figure 36 Expression du tPA par les différentes cellules du SNC chez la souris adulte

Immunohistochimie sur coupe de cerveau de souris après injection de colchicine (inhibiteur du transport neuronal). Le tPA (en rouge) est présent au niveau des oligodendrocytes (a ; marquage APC positif en vert, astérisques), des mastocytes (b ; marquage avidine positif en vert, astérisque), des épendymocytes (c ; astérisque), dans les neurones corticaux (d) et dans les fibres hippocampiques (e ; mf= fibres moussues, marquage Fox3 positif en vert, astérisques). D'après Louessard *et al.*, 2016.

❖ Les neurones : Des neurones exprimant du tPA ont été décrits dans plusieurs régions cérébrales : le cortex, le striatum, l'hypothalamus, l'hippocampe et le cervelet (Sappino *et al.*, 1993). Aujourd'hui, de nouvelles régions corticales exprimant cette protéase ont été identifiées telles que le cortex rétrosplénial, somatosensoriel primaire, périrhinal et piriforme (Louessard *et al.*, 2016). Le tPA est synthétisé et localisé au sein des dendrites et des terminaisons axonales, où il est stocké dans des vésicules présynaptiques (Parmer *et al.*, 1997; Shin *et al.*, 2004). Une récente étude du laboratoire, a montré que le tPA est majoritairement présent dans le compartiment post-synaptique des neurones corticaux matures (Lenoir *et al.*, 2019). Le tPA est ensuite transporté dans des vésicules de sécrétion le long des dendrites avant d'être libéré au niveau des cônes de croissance pour permettre l'élongation axonale (Lochner *et al.*, 1998). Des études ont montré que le tPA est contenu dans des vésicules à cœur dense situées dans les épines dendritiques, et qu'une dépolarisation neuronale conduisait à sa libération par une exocytose dépendante du calcium (Fernández-Monreal *et al.*, 2004; Lochner *et al.*, 2008). Il semble que tous les neurones ne soient pas capables d'exprimer du tPA, et que son expression soit réduite aux neurones glutamatergiques excitateurs pyramidaux. Dans ces neurones, le tPA est stocké et libéré par des vésicules d'exocytose VAMP2-positives (*Vesicle-associated membrane protein 2*; Lenoir *et al.*, 2019).

❖ Les astrocytes : la synthèse du tPA par les astrocytes a été mise en évidence chez la souris et chez l'homme (Toshniwal *et al.*, 1987; Hultman *et al.*, 2008). De plus, une fois libéré dans la fente synaptique par les neurones, le tPA peut être recapturé par les astrocytes *via* les récepteurs LRP et pourrait jouer un rôle dans la clairance du tPA au sein du SNC. Les astrocytes peuvent également libérer ce tPA endocytosé (Cassé *et al.*, 2012). Le tPA est majoritairement retrouvé dans les astrocytes activés suggérant son implication dans des processus pathologiques (Hultman *et al.*, 2008).

❖ Les cellules microgliales : l'expression de tPA au sein de ces cellules est encore débattue à l'heure actuelle. Certaines études rapportent l'absence d'expression de tPA dans ces cellules, tandis que d'autres auteurs en détectent (Rogove *et al.*, 1999; Dietzmann *et al.*, 2000; Louessard *et al.*, 2016). Cette expression ne serait induite qu'en condition inflammatoire (Siao *et al.*, 2003). Le tPA relargué par les neurones ou bien par les cellules microgliales elles-mêmes entraînent leur activation, qui est accompagnée d'une polarisation vers un phénotype M1 (pro-

inflammatoire ; (Siao *et al.*, 2003; Won *et al.*, 2015). Cette activation se fait *via* la liaison du domaine Finger à l'annexine II présente sur les cellules microgliales (Siao & Tsirka, 2002).

❖ Les oligodendrocytes : ce n'est qu'en 2011, que l'expression du tPA par les oligodendrocytes a été rapportée pour la première fois. Il a été montré, au niveau du corps calleux, que seuls des oligodendrocytes matures myélinisants exprimaient du tPA et que leur nombre diminuait au cours du vieillissement (Correa *et al.*, 2011). De plus, une étude récente a mis en évidence, que le tPA se trouve enrichi dans le transcriptome des populations d'oligodendrocytes nouvellement formés (NFOLs) et les oligodendrocytes formant la myéline (MFOLs ; (Marques *et al.*, 2016).

4 Implications physiologiques et pathologiques du tPA

4.1 tPA : Mort apoptotique

4.1.1 Neurones

Plusieurs études *in vitro* divergent quant au rôle pro-apoptotique ou anti-apoptotique du tPA sur les neurones. Par exemple, après activation des cellules microgliales par traitement au lipopolysaccharide (LPS), ces dernières relarguent du tPA dans le milieu. Lorsque des neurones hippocampiques sont exposés à ce milieu conditionné, une plus grande proportion de mort neuronale de type apoptotique est retrouvée comparée à la condition contrôle (Flavin *et al.*, 2000). Il en est de même dans un modèle où les neurones sont exposés au N-méthyl-D-aspartate (NMDA), connu pour induire une sur-stimulation des récepteurs NMDA et provoquer la mort neuronale dans le cadre de l'AVC ischémique (Liu *et al.*, 2004). Cette dernière est doublée dans la condition où les cellules sont traitées au tPA et au NMDA, comparativement à la condition NMDA seule (Liu *et al.*, 2004).

En revanche, dans une étude réalisée au sein du laboratoire, le tPA protège les neurones corticaux d'une mort apoptotique induite par un sevrage en sérum (Liot *et al.*, 2006). Une seconde étude du laboratoire s'est intéressée à l'effet du tPA endogène sur la survie neuronale dans un contexte ischémique. Ainsi, ils ont observé, que suite à une ischémie cérébrale ou lorsque des tranches hippocampiques sont soumises à une privation de glucose et maintenues en condition hypoxique (*oxygen-glucose deprivation* ou OGD), l'expression de tPA au sein des neurones hippocampiques est augmentée (Lemarchand *et al.*, 2016). Il s'est révélé que cette

expression endogène est neuroprotectrice dans un contexte ischémique, et cet effet est médié par la phosphorylation des récepteurs à l'EGF (Lemarchand *et al.*, 2016).

4.1.2 Oligodendrocytes

Les effets du tPA sur la mort apoptotique des oligodendrocytes ont été étudiés au sein de notre unité. Ainsi, il a été montré que le volume lésionnel de la substance blanche dans un modèle murin d'AVC ischémique augmente au cours du vieillissement (Correa *et al.*, 2011). Parallèlement, une autre observation fut faite ; le nombre d'oligodendrocytes exprimant du tPA diminue au cours du vieillissement. De ces observations, les auteurs ont suggéré que le tPA pouvait avoir un rôle protecteur vis-à-vis de la substance blanche et des oligodendrocytes. Grâce à un modèle *in vitro* de mort apoptotique induite par privation de sérum, Correa et ses collaborateurs ont pu démontrer que les oligodendrocytes étaient protégés suite à un traitement par le tPA (Correa *et al.*, 2011). Cet effet est dépendant de l'interaction du domaine EGF-like du tPA avec les récepteurs à l'EGF, induisant ainsi leur activation (Correa *et al.*, 2011).

4.2 tPA : Stress du réticulum endoplasmique

Durant un AVC ischémique, les neurones situés au sein de la lésion ischémique présentent de nombreux agrégats protéiques. En effet, l'ischémie cérébrale épuise l'ATP et modifie l'homéostasie intracellulaire, désactivant ainsi les systèmes de « contrôle qualité » des protéines dépendant de l'ATP notamment les chaperonnes moléculaires et les enzymes de repliement (Hu *et al.*, 2001). Ces altérations peuvent entraîner une surcharge de protéines mal repliées dans les neurones conduisant à un stress du RE (Roussel *et al.*, 2013; Louessard *et al.*, 2017). En conséquence, les protéines mal repliées et les polypeptides naissants non traités, ainsi que les ribosomes et les chaperonnes, sont empilés et progressivement agrégés au cours de la phase post-ischémique. Plus récemment, il a été démontré que le tPA module la protéostasie durant l'ischémie cérébrale. En effet, une étude *in vivo* a montré que le co-traitement avec un inhibiteur du protéasome renforce les effets bénéfiques du tPA (Zhang *et al.*, 2010). De plus, selon une étude *in vitro* réalisée au laboratoire, l'inhibition du stress du RE grâce à l'interaction du tPA avec Grp78 (*glucose-related protein 78*) membranaire, protège les neurones de la mort induite par OGD (Louessard *et al.*, 2017).

4.3 tPA : Migration cellulaire

4.3.1 Migration neuronale et corticogénèse

La mise en place du réseau de connexions entre les neurones nécessite la dégradation de la matrice extracellulaire par diverses protéines telles que les métalloprotéinases (MMPs), les désintégrines et certaines sérines protéases (Nadarajah *et al.*, 2003; Stiles & Jernigan, 2010). Une étude effectuée chez des souris à différents stades du développement embryonnaire a montré que le tPA était exprimé par un certain nombre de types cellulaires dans le SNC en développement, avec une forte expression dans les zones de migration neuronale et de remodelage tissulaire. Ces observations suggèrent que le tPA est impliqué dans la migration cellulaire et dans le remodelage tissulaire du SNC en développement, en jouant un rôle dans la dégradation de la matrice extracellulaire (Fredriksson *et al.*, 2004).

En 1999, Seeds et ses collaborateurs ont montré que des souris déficientes en tPA présentaient une migration neuronale retardée, se traduisant par une accumulation des cellules granulaires au sein de la couche moléculaire du cervelet (Seeds *et al.*, 1999). Plus récemment, une étude conduite au laboratoire a permis de montrer que la migration des neurones corticaux était arrêtée au niveau de la zone intermédiaire, à E16 chez des souris déficientes en tPA conduisant à une lamination corticale altérée chez l'adulte (Figure 37). Dans cette étude, l'effet du tPA sur la corticogénèse est dépendant des récepteurs NMDA présents sur les cellules gliales radiaires (Pasquet *et al.*, 2019).

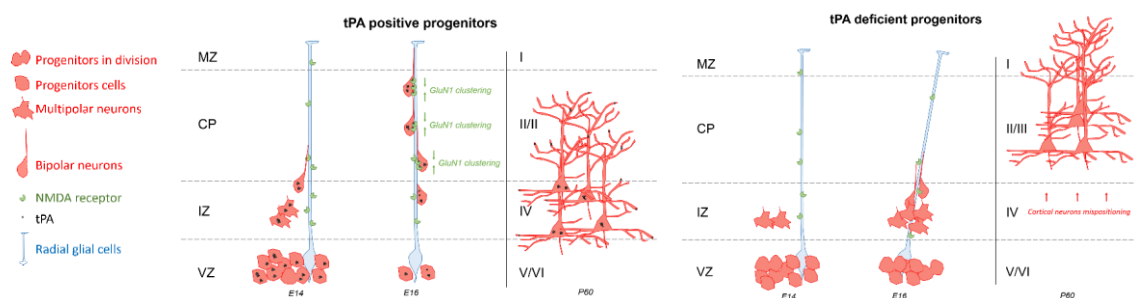


Figure 37 L'activateur tissulaire du plasminogène joue un rôle clé dans la corticogénèse.

Produit et libéré par des progéniteurs neuronaux, le tPA favorise la maturation des cellules gliales radiales (RGC) grâce à l'activation du NMDAR exprimé à leur surface. L'absence de tPA neuronal affecte le placement glial radial, l'orientation mais pas la fixation des pieds sur la surface piaie. En conséquence, une déficience globale en tPA ou une suppression conditionnelle du tPA neuronal à E14 a retardé la migration neuronale principalement à E16. Cette migration retardée observée en l'absence de tPA neuronal a conduit à une stratification altérée des couches corticales II – IV et V chez l'adulte. D'après Pasquet *et al.*, 2019.

4.3.2 Migration oligodendrocytaire et (re)myélinisation

Comme vu précédemment dans la première partie, la myélinisation s'articule autour d'une succession complexe d'évènements comprenant la prolifération, la migration, la différenciation et l'enroulement de la gaine de myéline. Récemment, une étude du laboratoire s'est intéressée à l'implication du tPA dans la migration des précurseurs oligodendrocytaires au cours du développement (Leonetti *et al.*, 2017). Ainsi, ils ont montré qu'en absence de tPA, les précurseurs oligodendrocytaires issus du domaine pMN restaient dans cette zone plus longtemps et entamaient leur migration vers la corne ventrale plus tardivement (Figure 38). Ces observations suggèrent que le tPA sécrété dans des cellules neurales Sox2⁺ du domaine pMN pourrait initier la migration oligodendrocytaire (Leonetti *et al.*, 2017).

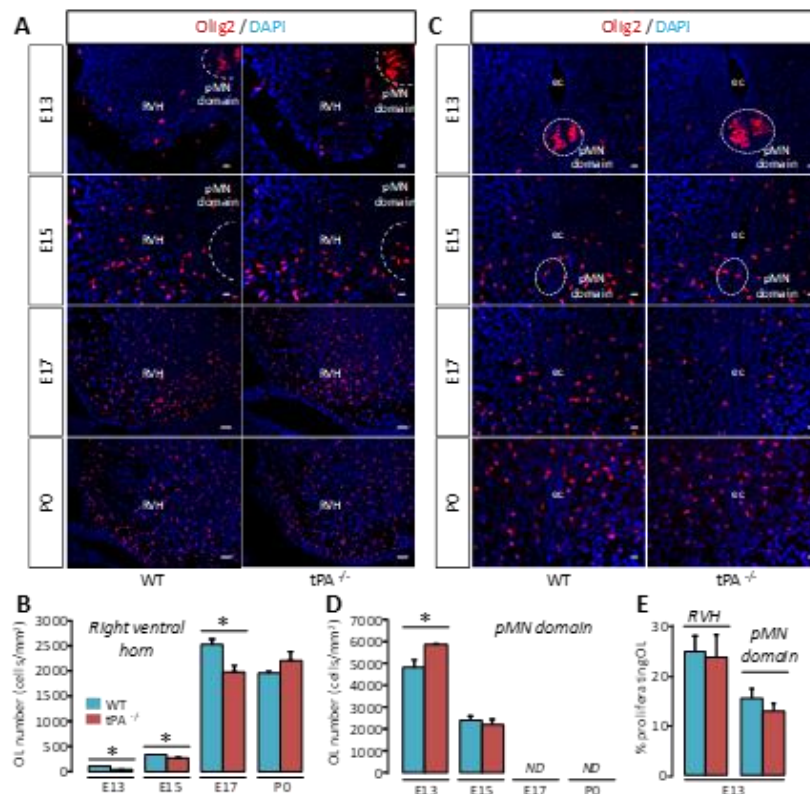


Figure 38 La migration de l'OPCs est retardée chez les souris tPA^{-/-} pendant le développement de la moelle épinière.

Microphotographies représentatives de l'immunomarquage anti-Olig2 (rouge) et DAPI (bleu) dans la corne ventrale droite de la moelle épinière chez des souris sauvages (WT) et déficientes en tPA (tPA^{-/-}) des souris à E13, E15, E17 et P0 (A). Quantifications des oligodendrocytes Olig2⁺ dans la corne ventrale droite (B). Microphotographies représentatives du marquage anti-Olig2 (rouge) et DAPI (bleu) dans le domaine pMN chez des souris sauvages et déficientes en tPA à E13, E15, E17 et P0 (C). Quantifications des oligodendrocytes Olig2⁺(D). Quantification du pourcentage d'oligodendrocytes en prolifération (Ki67⁺ / Olig2⁺) dans le parenchyme de la moelle épinière (corne ventrale droite et domaine pMN ; E). E: jour embryonnaire ; ec: canal épendymaire ; ND: non détecté ; OLS: oligodendrocytes ; P: jour postnatal ; domaine pMN: domaine progéniteurs des neurones moteurs ; RVH: corne ventrale droite Barres d'échelle: 20 μm (Leonetti *et al.*, 2017).

Dès que les OPCs ont quitté le domaine pMN vers les régions ventrales de la moelle épinière, ces cellules migrent le long des vaisseaux sanguins (Tsai *et al.*, 2016). La présence de tPA au sein des cellules endothéliales bordant les vaisseaux sanguins favorise la migration oligodendrocytaire chez les souris sauvages comparativement aux souris tPA^{-/-} (Leonetti *et al.*, 2017). En effet un nombre moins important de cellules oligodendrocytaires est retrouvé le long des vaisseaux chez les souris tPA^{-/-} (Figure 39). Ces observations suggèrent que le tPA a un effet chimio-attractant sur les précurseurs oligodendrocytaires, permettant de faciliter leur migration le long des vaisseaux au cours du développement embryonnaire (Leonetti *et al.*, 2017). Afin de corroborer cette hypothèse, des travaux *in vitro* ont été réalisés pour évaluer l'effet chimio-attractant du tPA sur les OPCs grâce au test de la chambre de Boyden. Un plus grand nombre d'OPCs est retrouvé dans la condition où le tPA est présent comparativement à la condition contrôle (Leonetti *et al.*, 2017).

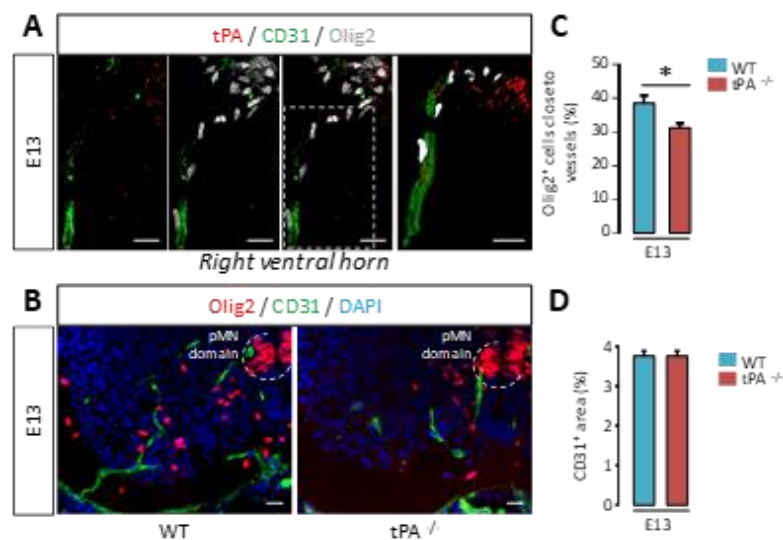


Figure 39 Le tPA favorise la migration des oligodendrocytes le long des vaisseaux pendant le développement en période de migration intense.

Microphotographies représentatives du marquage tPA (rouge), CD31 (vert) et Olig2 (gris) dans la corne ventrale droite de la moelle épinière des souris sauvages à E13. Reconstruction 3D à partir d'acquisitions confocale (gauche ; A). Microphotographies représentatives du marquage Olig2 (rouge), CD31 (vert) et DAPI (bleu) dans la corne ventrale droite de souris sauvages et déficientes en tPA à E13 (B). Quantification du pourcentage d'oligodendrocytes Olig2⁺ proches (<10 µm) des vaisseaux du parenchyme de la moelle épinière ventrale en dehors du domaine pMN chez les souris sauvages et déficientes en tPA (C). Quantification du pourcentage de la zone de coloration CD31⁺ dans le parenchyme de la moelle épinière ventrale en dehors du domaine pMN chez les souris sauvages et déficientes en tPA (D). * p < 0,05 ; E: jour embryonnaire ; OLS: oligodendrocytes ; domaine pMN: domaine progéniteurs des neurones moteurs ; WT: type sauvage. Barres d'échelle: 20 µm (Leonetti *et al.*, 2017).

Leonetti et ses collaborateurs ont également étudié l'implication du tPA dans les processus de remyélinisation suite à l'injection de lysophosphatidylcholine (LPC) au sein du corps calleux. En absence de tPA les souris présentent un volume lésionnel plus important, qui est maintenu

jusqu'à 7 jours post-injection. Les auteurs ont mis en évidence, au cours de la fenêtre de migration (qui s'opère entre 3 et 7 jours post-injection ; Nait-Oumesmar *et al.*, 1999) un défaut de recrutement des OPCs au niveau péri-lésionnel chez les souris tPA^{-/-} par rapport aux souris sauvages (Leonetti *et al.*, 2017). Ainsi, l'absence de tPA conduit à un retard de remyélinisation observé à J21 post-injection.

Au sein du domaine pMN, les cellules oligodendrocytaires sont dotées des récepteurs à l'EGF au 13^{ème} jour embryonnaire. Il a également été rapporté que suite à une démyélinisation focale du corps calleux, les OPCs recrutés sont eux aussi dotés des récepteurs à l'EGF. En présence de l'inhibiteur de l'activité kinase des récepteurs à l'EGF (AG1478), l'effet du tPA sur la migration des OPCs est reversée. L'interaction du tPA avec les récepteurs à l'EGF permet l'activation de ces derniers et la phosphorylation de la voie Erk/Akt initiant le processus de migration des OPCs (Leonetti *et al.*, 2017).

4.4 tPA : Neuroinflammation et dommages de la substance blanche

4.4.1 Sclérose en plaques et encéphalomyélite auto-immune expérimentale

Dans le contexte de la sclérose en plaques (SEP), maladie auto-immune démyélinisante, le taux d'activité du tPA retrouvé dans le liquide cérébro-spinal des patients se trouve être dix fois plus importants que chez les sujets contrôles (Akenami *et al.*, 1996; Teesalu *et al.*, 2002). De plus, la présence de tPA chez les sujets contrôles est strictement retrouvée au niveau de la matrice des vaisseaux sanguins, tandis que chez les patients SEP, le tPA est également présent au niveau périvasculaire, dans les plaques actives et au niveau des macrophages (Cuzner *et al.*, 1996). Cette distribution suggère que le tPA pourrait avoir un rôle dans l'inflammation dans ce contexte pathologique.

Dans un des modèles murins de SEP, le modèle d'encéphalomyélite auto-immune expérimentale immunisé contre le peptide MOG₃₃₋₅₅ (EAE-MOG), il a été retrouvé également une augmentation de l'expression de tPA accompagnée d'une augmentation de l'activité du tPA dans les zones endommagées (Tessalu *et al.*, 2002). En revanche, son implication dans le processus inflammatoire reste encore à ce jour débattu. Selon les études, les animaux déficients en tPA ne présentent pas le même tableau clinique que les animaux sauvages. Une première étude a montré que les souris déficientes en tPA déclaraient plus tardivement les premiers symptômes moteurs de l'EAE et présentaient un score clinique moins sévère en début

de maladie (Figure 40; Lu *et al.*, 2002). De plus, l'infiltration leucocytaire, l'activation microgliale, la démyélinisation et le dommage axonal sont retardés chez les souris $tPA^{-/-}$ comparativement aux souris sauvages (Lu *et al.*, 2002). L'ensemble de ces données suggère que le tPA exerce un effet délétère dans les phases précoces de la SEP et dans son modèle murin.

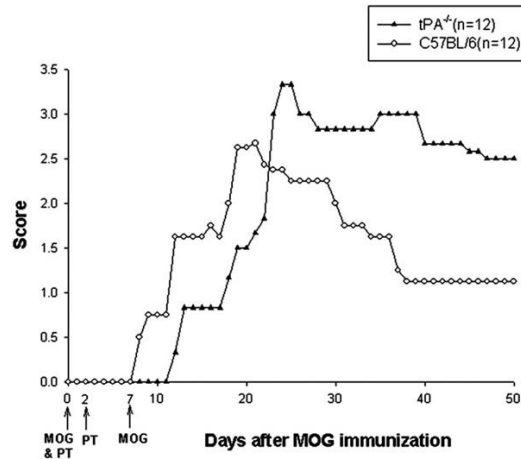


Figure 40 La progression de l'EAE-MOG est moins sévère chez les souris déficientes en tPA. Score clinique moyen entre des souris sauvages (C57BL/6) et des souris déficientes en tPA ($tPA^{-/-}$; Lu *et al.*, 2002).

Cependant, en 2005, une étude montre que la sévérité du score clinique est plus élevée chez les souris déficientes en tPA comparativement à leurs homologues sauvages (Figure 41A; East *et al.*, 2005). Très récemment, une deuxième étude a fait les mêmes observations, les souris $tPA^{-/-}$ présente des symptômes d'une plus grande sévérité, bien que la réponse immunitaire et l'activation lymphocytaire soient diminuées (Figure 41B; Mizrachi *et al.*, 2020).

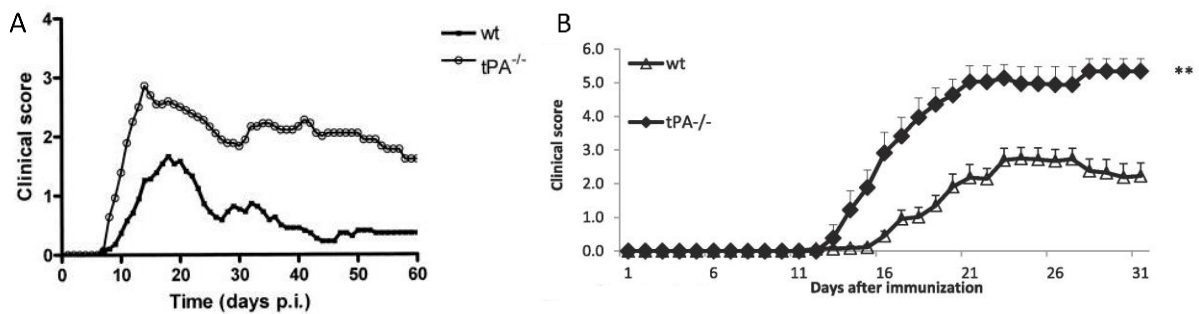


Figure 41 La progression de l'EAE-MOG est plus sévère chez les souris déficientes en tPA. Score clinique moyen entre des souris sauvages wt) et des souris déficientes en tPA ($tPA^{-/-}$); p.i: post-immunisation (East *et al.*, 2005; A). Score clinique moyen entre des souris sauvages (wt) et des souris déficientes en tPA ($tPA^{-/-}$) (B). ** $p < 0.001$ (Mizrachi *et al.*, 2020).

Toutefois, dans chacune de ces études, nous pouvons noter que les souris tPA^{-/-} présentent une rémission incomplète suggérant que le tPA serait bénéfique au cours de la fenêtre de remyélinisation (Lu *et al.*, 2002).

4.4.2 Lésion médullaire

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

Objectifs

Projet de thèse

Les fonctions cognitives, motrices et sensitives nécessitent un système de propagation rapide de l'influx nerveux. Chez les Vertébrés, il est assuré par la gaine de myéline qui permet la conduction rapide et saltatoire des potentiels d'action et qui sert également de support trophique aux axones. Au sein du SNC, cette gaine est produite par une population de cellules gliales : les oligodendrocytes. La myélinisation est une succession complexe d'évènements : (1) prolifération et migration des OPCs, (2) différenciation des cellules progénitrices vers un phénotype mature myélinisant, (3) extension de la membrane plasmique et enroulement de l'axone, (4) compaction de la gaine de myéline, (5) formation des nœuds de Ranvier (Simons and Nave, 2015). Ces différents évènements requièrent une régulation complexe faisant intervenir de nombreux facteurs intrinsèques et extrinsèques au cours du développement. Cependant, leurs orchestrations et leurs rôles sont encore peu connus. Récemment la sérine protéase tPA a été identifiée comme l'un d'eux et une étude du laboratoire a montré qu'il favorisait la migration des OPCs (Leonetti *et al.*, 2017). Plus précisément, cette étude intitulée ***“Tissue-type plasminogen activator exerts EGF-like chemokinetic effects on oligodendrocytes in white matter (re)myelination”*** a montré que :

- ✓ Le tPA n'exerce pas d'effet pro-prolifératif sur les OPCs ;
- ✓ Le tPA favorise la migration des OPCs le long des vaisseaux au cours du développement embryonnaire et suite à une lésion de la substance blanche ;
- ✓ Le tPA favorise la remyélinisation après une lésion de la substance blanche ;
- ✓ Le tPA exerce un effet chimiocinétiq ue dépendant de l'activation des récepteurs à l'EGF.

Il est intéressant de noter qu'une étude de 2016 a rapporté que le tPA est enrichi dans le transcriptome des oligodendrocytes nouvellement formés (NFOLs) ainsi que dans les oligodendrocytes formant de la myéline (MOLs ; Marques *et al.*, 2016). Or à ce jour aucune donnée ne nous renseigne sur l'implication de cette sérine protéase dans la différenciation des oligodendrocytes et la mise en place de la gaine de myéline.

Mes travaux de thèse visent donc à caractériser les implications du tPA dans les processus de myélinisation de la moelle épinière au cours du développement.

Pour cela, nous avons comparé à différents stades de développement le profil de différenciation des cellules oligodendrocytaires et de myélinisation et évalué les répercussions fonctionnelles entre des souris sauvages (tPA^{+/+}) et des souris déficientes en tPA (tPA^{-/-}).

Mes travaux de thèse se sont donc articulés autour de ces questions :

- ◆ Quelle est la cinétique d'expression du tPA au sein de la lignée oligodendrocytaire ? Quel(s) sous-type(s) d'oligodendrocytes exprime(nt) le tPA au cours du développement ?
- ◆ Le tPA favorise-t-il la différenciation des cellules oligodendrocytaires ? Si oui, quelles sont les conséquences sur la myélinisation ?
- ◆ Le tPA favorise-t-il la mise en place de la gaine de myéline ? Si oui, quelles sont les répercussions fonctionnelles ?

Ces travaux ont donné lieu à la rédaction d'une publication : « *Tissue-type plasminogen activator contributes to myelin compaction during development* » qui est en cours de préparation.

Résultats

Article: “Tissue-type plasminogen activator contributes to developmental myelination”

Titre : L’activateur tissulaire du plasminogène participe aux processus de myélinisation au cours du développement.

Contexte bibliographique : Les fonctions cognitives, sensitives et motrices sont assurées par un système de transmission rapide permis par la présence de la gaine de myéline autour des axones. Ce processus, que l’on nomme myélinisation, comprend différentes étapes dont la prolifération, la migration, la différenciation des cellules de la lignée oligodendrocytaire et enfin l’enroulement et la compaction de la gaine de myéline. Au cours du développement, toutes ces étapes sont finement régulées par divers facteurs intrinsèques et/ou extrinsèques. Nous savons aujourd’hui, que l’activateur tissulaire du plasminogène (tPA) est l’un de ces facteurs, en favorisant la migration des oligodendrocytes au cours du développement. Cependant, son rôle dans la différenciation et l’enroulement/compaction de la gaine de myéline n’a jamais été étudié. Dans cette étude, nous avons étudié l’implication du tPA dans ces processus de myélinisation et évaluer les répercussions fonctionnelles.

Matériels et méthodes : Grâce à différentes techniques d’imagerie (microscopie optique, électronique, imagerie par résonance magnétique), nous avons comparé les différents aspects de la substance blanche au cours du développement de la moelle épinière entre un modèle de souris sauvages et déficientes en tPA. L’évaluation des répercussions fonctionnelles entre ces deux souches a été mesurée par différents tests comportements moteurs, ainsi que par une technique d’électrophysiologie.

Résultats : Nous avons montré, dans un premier temps, que le tPA était exprimé par une sous-population d’oligodendrocytes bien particulier : les oligodendrocytes myélinisants/matures. Cette expression transitoire s’est avérée corrélée à la mise en place de la myélinisation de la moelle épinière. Notre étude comparative entre des souris sauvages et déficientes en tPA a pu montrer un retard de différenciation des OPCs vers un phénotype mature. De plus, nous avons pu mettre en lumière un profil dysmyélinique dans nos modèles de souris déficientes en tPA. L’évaluation fonctionnelle a pu mettre en évidence une atteinte de la démarche sans troubles de l’activité locomotrice chez nos souris déficientes en tPA. Cependant, aucunes anomalies structurelles et fonctionnelles de la substance blanche n’ont pu être détectées par imagerie par résonance magnétique et par mesure électrophysiologique.

Conclusion : Ces résultats montrent que le tPA est un acteur clé de la myélinisation et que les modèles de souris déficientes en tPA pourraient être de bons modèles pour étudier les pathologies dysmyélinisantes.

Tissue-type plasminogen activator contributes to developmental myelination.

Authors: Barbara Delaunay¹, Olivier Etard^{2,3}, Didier Goux⁴, Denis Vivien^{1,5}, Fabian Docagne¹, Eric Maubert^{1*}, Isabelle Bardou^{1*}

Affiliations:

- (1) Normandie Univ, UNICAEN, INSERM, PhIND “Physiopathology and Imaging of Neurological Disorders”, Institut Blood and Brain @ Caen-Normandie, Cyceron, 14000, Caen, France
- (2) Normandie Univ, UNICAEN, INSERM, COMETE, 14000, Caen, France
- (3) Normandie Univ, UNICAEN, CHU de Caen, Service des Explorations Fonctionnelles du Système Nerveux, CHU de Caen, 14000, Caen, France
- (4) Normandie Univ, UNICAEN, CMABIO, 14000, Caen, France
- (5) Department of Clinical Research, CHU Côte de Nacre, Caen, France

* Equal contributions

Abstract

The ability of oligodendrocytes to form the myelin sheath around the axons during developmental myelination is tightly regulated by a multitude of intrinsic and extrinsic cues. Among these factors, tissue-type plasminogen activator (tPA) was previously identified as a positive regulator of oligodendrocyte migration during embryonic development. However, the functional role of tPA on oligodendrocyte differentiation and myelin ensheathment was not investigated so far. Here, we report for the first time that tPA is transiently expressed in myelinating oligodendrocytes and that a lack of tPA delays oligodendrocytes precursor cells differentiation leading to a severe default of myelin compaction and myelin ultrastructure abnormalities. We thus hypothesized that this myelin organization issue can lead to functional impairments. Accordingly, lack of tPA delays ambulation and results in gait abnormalities. These data provide the first demonstration that serine protease tPA is an important factor for oligodendrocyte differentiation and myelin compaction and that tPA-deficient mice can be an interesting model to further dissect dysmyelination defects.

Keywords: Oligodendrocyte, Myelin, Development, Tissue-type plasminogen activator

Introduction

Myelin sheaths, as extensions of the oligodendrocyte plasma membrane, insulate axons of the central nervous system (CNS) and promote saltatory and rapid nerve conduction, which is a prerequisite for complex brain functions (Snaidero & Simons, 2014). Myelin sheath is composed of multiple concentric layers of plasma membrane that are brought into extremely close apposition (Aggarwal *et al.*, 2011).

The ability of oligodendrocytes to form myelin sheaths around the axons is ruled by oligodendrocyte precursor cells (OPCs) proliferation, migration, and differentiation into mature oligodendrocytes (Baumann & Pham-Dinh, 2001). Moreover, the formation of an effective myelin requires a correct axonal ensheathment and myelin compaction (Snaidero & Simons, 2014). The elaboration of this correct molecular architecture occurs in a similar way during developmental myelination and the adult regenerative process of remyelination (Fancy *et al.*, 2011). In fact, both processes may involve the same intrinsic and/or extrinsic factors and share common key stages. Myelination disruption leads to cognitive and motor impairments as occurs in common dysmyelinating disorders such as Pelizaeus-Merzbacher disease (Inoue, 2005). However, mechanisms underlying the failure of proper myelination are not fully understood. Therefore, finding new endogenous factors is crucial for a better understanding of mechanisms implied in a proper developmental myelination and in myelin (re)generation.

Tissue-type plasminogen activator (tPA) is a well-identified serine protease that serves an important role in fibrinolysis in the circulation (Collen & Lijnen, 1991). tPA is expressed by several cell types in the brain, such as neurons, endothelial cells and oligodendrocytes (Fernández-Monreal *et al.*, 2004; Samson & Medcalf, 2006; Louessard *et al.*, 2016). It can exert

multiple functions in the healthy and diseased CNS including neuronal plasticity, learning and memory processes and neuroinflammation (Qian *et al.*, 1993; Tsirka *et al.*, 1997; Baranes *et al.*, 1998; Nicole *et al.*, 2001; Obiang *et al.*, 2011; Cassé *et al.*, 2012; Docagne *et al.*, 2015; Hébert *et al.*, 2016). Moreover, previous studies revealed that tPA plays important roles during embryonic development (Seeds *et al.*, 1999; Leonetti *et al.*, 2017; Pasquet *et al.*, 2019). Indeed, neuronal tPA is important for a proper cortical lamination and an accurate organization and maturation of radial glial cells (Pasquet *et al.*, 2019). Furthermore, our previous works highlighted that tPA promotes OPCs survival by anti-apoptotic effects (Correa *et al.*, 2011) and facilitates OPCs migration during developmental myelination and remyelination (Leonetti *et al.*, 2017). Indeed, a delayed OPCs migration is observed in tPA-deficient mice compared to their wild-type counterparts during embryonic development (OPCs are restricted longer in the pMN_progenitor motoneurons_ domain in the spinal cord) and following a white matter injury without any influence on their proliferation (Leonetti *et al.*, 2017). However, the role of tPA in oligodendrocyte lineage differentiation and myelination was never investigated so far.

Therefore, in the present study, we investigated whether tPA can influence differentiation of oligodendrocyte lineage and myelination during development. We noticed a transient tPA expression in oligodendrocytes during development. tPA is mainly associated with myelinating oligodendrocytes and the proportion of oligodendrocytes expressing tPA increase at the onset of myelination. Furthermore, we demonstrated that the absence of tPA delays oligodendrocyte differentiation and leads to a severe default of myelin compaction resulting in a postponed ambulation establishment and gait abnormalities. Overall, our findings highlight that tPA-deficient mice can be useful to study developmental dysmyelination.

Material and Methods

Animals and ethical statement

Experiments were performed in accordance with the French ethical laws (act no. 87–848; Ministère de l'Agriculture et de la Forêt), European guidelines (Directive 2010/63/UE) and ethical committee recommendation (Project 16218). All experiments were performed following the ARRIVE guidelines (www.nc3rs.org.uk), including randomization as well as blinded analysis.

Two strains of tPA-deficient mice (tPA^{-/-} and tPA^{Null}) and their control littermates (tPA-WT and tPA^{fl/fl}, respectively) were bred in the Centre Universitaire de Ressources Biologiques (CURB; Center Agreement F14118001; Caen, France). All animals were housed in a temperature-controlled room on a 12 h light/12 h dark cycle with access to food and water *ad libitum*.

tPA^{-/-} mice were generated as previously described (Carmeliet *et al.*, 1994). To disrupt the *Plat* gene, the targeting vector pNT.tPA was constructed in which a cassette expressing the neomycin-resistance gene (*neo*) replaced the genomic sequences encoding most of the kringle-2 domain and part of the proteinase domain, including the catalytically essential histidine residue at position 326.

tPA^{fl/fl} mice in which exon 3 is flanked by loxP sites (see Pasquet *et al.*, 2019) were crossed with CMV-Cre mice (Mouse Clinical Institute, Illkirch, France) to induce deletion of loxP-flanked genes in all tissues (tPA^{Null}). Mice were genotyped by PCR analysis and southern blots, using tail genomic DNA samples, for the presence of loxP sequences (Pasquet *et al.*, 2019).

Immunohistochemistry on mice cryosections

Embryos (from E13 to E19) and mice pups (P0 to P7) were decapitated and trunks were fixed for 6 h by immersion in a solution (PAF) containing 2% paraformaldehyde supplemented with 0.2% picric acid (Sigma). Animals from P15 to adulthood were deeply anesthetized with 5% isoflurane in a 60/40 mixture of N₂O/O₂ and transcardially perfused with cold heparinized saline followed with 4% PFA in 0.1 M sodium phosphate buffer (PB, pH 7.4). Spinal cords were removed and post-fixed for 4 h with 4% PFA at 4°C. All samples were cryoprotected in 20% sucrose in phosphate buffer saline (PBS) for 24 h at 4°C. Then, they were embedded and frozen in OCT (Tissue-Tek) and stored at -80°C. Transversal sections (10 µm) were realized using a cryostat (Leica, CM3050S), collected on poly-lysine slides and stored at -80°C before processing.

Sections were incubated overnight at room temperature in a humid chamber with one or several of the following primary antibodies : goat anti-PDGFR α (1:100; AF1062, R&D); mouse anti-Olig2 conjugated to AlexaFluor488 (1:2000; AB96-18-AF488, Merck Millipore); sheep anti-tPA (1:3000; SASMTPAGFHT, Molecular Innovations); mouse anti-CNP (1:200; SMI91, BioLegend); rabbit anti-MBP (1:5000; ab40390, Abcam); rabbit anti-PLP (1:2000; ab105784, Abcam); mouse anti-MOG (1:200; MAB5680, Merck Millipore). Each primary antibody was revealed with its adapted fluorescent conjugated secondary antibody applied for 1.5 h at room temperature in a humid chamber (1:1000, Jackson Immunoresearch). Washed sections were coverslipped with antifade medium containing DAPI (Fluoromount-G; Southern Biotech). Images were digitally captured using a Leica DMI6000 microscope-coupled Hamamatsu Orca Flash 4.0 camera and visualized with Metamorph 7.8.13.0 software. Images were processed

using FIJI software (NIH). At least three to four different photomicrographies per animal were taken for each immunostaining analyzed.

For the analysis of Olig2⁺ and Olig2⁺/tPA⁺ cells, all positive cells were counted in the whole spinal cord for each developmental stage in tPA^{-/-} and WT mice. Then, ratio of Olig2⁺/tPA⁺ cells on Olig2⁺ cells was calculated. Similarly, for OPCs quantification, Olig2⁺/PDGFR α ⁺ co-immunostained cells were counted in the whole spinal cord, and the ratio of Olig2⁺/PDGFR α ⁺ cells on Olig2⁺ cells was calculated. For MBP quantification, all parameters for image acquisition were kept constant, with emission levels below saturation. Two Regions of interest (ROIs) were delimited: ventral and dorsal white matter. An automatic threshold was applied for all pictures at each developmental stage. The total area of each ROI and the MBP⁺ area were counted in each ROI by the plugin 'analyze particles' on Fiji. The ratio of MBP⁺ area on total ROI area was calculated.

Western blotting

Spinal cord samples (from P0 to P21) of tPA^{-/-} and their WT littermates were lysed with ice-cold TNT buffer (50 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, 0.5% Triton x-100, pH 7.4) supplemented with protease inhibitors (P8340, Sigma) and phosphatase inhibitors (P5726, Sigma). Debris were removed by centrifugation (12000 g at 4°C, 20 min). Protein concentration were determined using the Pierce BCA Protein Assay Kit (according to the manufacturer's instructions; 23225, Thermo Fisher Scientific). Proteins (30 μ g) were diluted in dH₂O and β -mercaptoethanol, heated at 95°C for 5 min, and loaded onto an polyacrylamide gel (10% or 12%; Bio-Rad). Gel electrophoresis was performed in Tris Buffer Saline (TBS; 10 mM Tris and 200 mM NaCl, pH 7.4) - glycine - sodium dodecyl sulfate (SDS) running buffer at 150 V and proteins transferred onto polyvinylidene difluoride (PVDF) membrane (Bio-Rad) for 7 min (Trans-Blot Turbo

Transfer System, Bio-Rad) in Tris-glycine-methanol transfer buffer. Membrane was blocked in TBS containing 0.1% Tween-20 and 1% bovine serum albumin (TTBS) for 1 h at room temperature on an orbital shaker. Blots were incubated overnight at 4°C with following primary antibody: rabbit anti-MBP (1:1000; ab40390, Abcam) or mouse anti-CNP (1:1000; SMI91, Abcam). Membrane was washed three times in TTBS for 5 min and incubated with the appropriate horseradish peroxidase (HRP)-IgG secondary antibody conjugates: goat anti-rabbit (1:50000; AO5445, Sigma) or rabbit anti-mouse (1:80000; A9044, Sigma) for 1h at room temperature. Immunoblot was revealed with an enhanced chemiluminescence ECL-Plus detection system (32132, Thermo Fisher Scientific) and Image Quant LAS 4000 Device (GE Healthcare, Orsay, France) was used to visualize bands. For loading control purposes, membrane was re-blotted with anti-rabbit beta-Actin (1:1000) and after incubation with adapted HRP-secondary antibodies, membranes were revealed as above. Analysis were realized on ImageLab™ software (Bio-Rad).

Electron microscopy

Mice were deeply anesthetized with 5% isoflurane in a 60/40 mixture of N₂O/O₂ and transcardially perfused with physiological saline, followed by fixative solution (4% PFA and 2.5% glutaraldehyde in 0.1M cacodylate buffer; Sigma). For myelin sheath and node of Ranvier imaging, spinal cords and optic nerves were post-fixed overnight at 4°C in fixative solution and transferred to PBS before osmification and embedding. Samples were cut on sagittal sections at the level of high thoracic part of the spinal cord or longitudinal sections for optic nerve. Tissues were post-fixed in 2% osmium tetroxide diluted in phosphate buffer for 1 h at RT. Specimens were dehydrated in graded aqueous solution of alcohol (5, 40, 60, 80, 100%), replaced finally by acetone, and infiltrated with a mixture of acetone and Epon overnight in

capped vials at room temperature and polymerized at 60°C for 48h. The embedded samples were trimmed on an ultramicrotome (Leica ultracut R) to obtain first 1 μm sections. Slices were stained with toluidine blue solution prior to bright field imaging at 40x magnification using a Leica DMI8 microscope. Then, 80nm ultramicrotome-cut sections were collected on formvar-coated copper slot grids and were counterstained with URANYLESS© (Delta Microscopie, Mauressac, France) in citrate buffer. Using an ORIUS 200 digital camera on a JEM 1011 transmission electron microscope, digital images were acquired at a magnification of 15000x for node of Ranvier visualization, 15000x for g-ratio analysis and 200000x for visualization of layers myelin sheaths organization. Samples treatment and image acquisition were performed at CMAbio3 (Centre de Microscopie Appliquée à la Biologie, Biological Microscopy Facility Center UFR des Sciences, SF 4206 ICORE, University of Caen Normandie).

Fifteen non-overlapping electron microscopy images of the corticospinal tract of four animals of each genotype (tPA-WT/tPA^{-/-}, tPA^{fl/fl}/tPA^{Null} mice) at P15 were taken, and a minimum of 100 axons per animal were analyzed for g-ratio and myelin sheath compaction.

Axonal diameter was given by the plugin Area measurement on Fiji. G-ratio was calculated by dividing the length of axon diameter on the length of outer myelin sheath diameter in regions with uncompacted myelin. Myelin was considered uncompacted by the presence of light regions located between the concentric myelin lamellae. Percentage of uncompacted myelin was calculated by assessing the percentage of light regions on the total myelin sheath area (see Supplementary Figure 3 for outline of quantification methods). Distribution of myelinated axons per axon diameter was determined by plotting the number of total myelinated axons with a specific diameter for each animal of each genotype.

For tPA immunodetection, P15 mice were perfused with PAF containing 0.05% of glutaraldehyde. Spinal cord were washed in PBS and cryoprotected in PBS supplemented with ethylene glycol and glycerol. Samples were cut on a Cryomicrotome (Microm HM 450) to obtain 40 μm free-floating sections. Sections were rinsed in PBS and incubated 24 h at 4°C with primary antibody anti-tPA (1:1000; generous gift from Pr R. Lijnen, Leuven). Sections were rinsed and incubated with a secondary antibody conjugated to peroxidase (1:1000) for 2 h at RT. To reveal the labeling, slices were incubated with Sigma Fast™ 3-,3'-diaminobenzidine solution (Sigma). Slices treatments were further performed as described above except that post-fixation was performed, 30 min, in phosphate buffer containing 1 % osmium tetroxide.

Diffusion tensor imaging

P15 tPA^{-/-} and WT mice were deeply anesthetized with 5% isoflurane in a 60/40 mixture of N₂O/O₂ and transcardially perfused with 4% PFA supplemented with 2% Dotarem® (60 mL at 4°C) at 3mL/min. Spinal cords were removed and kept in 4% PFA and 2% Dotarem® for 48 h ; then transferred into a PBS containing 0.05% sodium azide and 2% Dotarem®. The solution was changed every 72 h during 2 weeks. Before Magnetic Resonance Imaging (MRI) acquisition, samples were placed into 15mL conical Falcon tubes filled with Fomblin (Fluorinert FC75; 3M). Scans were performed with a 7T MRI scanner system (Bruker). DTI data were acquired using a diffusion-weighted fast spin echo sequence with the following parameters: TR = 4000 ms; echo time (TE) = 17 ms; slice thickness = 1 mm; number of averages = 8. Diffusion weighting gradients were applied with b = 719.45 s/mm². The acquisition time was 11 h. Images were processed using a diffusion toolkit and DSI Studio software (<http://dsi-studio.labsolver.org>). The whole spinal cord or specific regions in cervico-thoracic levels such

as dorsomedial (DM), dorsolateral (DL), ventromedial (VM), ventrolateral (VL), and grey matter (GM) were manually traced. For each region, several DTI parameters were generated. In this study, fractional anisotropy (FA), and mean diffusivity (MD) were used.

Motor evoked potentials

tPA^{-/-} and WT mice (from P15 to adult stages) were anesthetized with 5% isoflurane in a 60/40 mixture of N₂O/O₂, and then isoflurane was reduced to 1% for stabilization of the anesthesia. To record the total conduction time (TCT), stimulating electrodes were placed subcutaneously at the base of the first cervical vertebrae. To record the peripheral conduction time (PCT), stimulating electrodes were placed on both sides at the onset of the sciatic nerve. For both conditions, recording electrodes were placed subcutaneously aligning the gastrocnemius muscle and the reference electrode next to the Achilles tendon. The ground electrode was placed subcutaneously on the flank side of the mouse. Stimulation was performed through electrodes (intensity: 10-30 mA for TCT recordings and 100 mA for PCT recordings; duration: 0.1 ms; frequency: 1 Hz; band pass: 20-10,000 Hz; sweep: 1 ms/D). The motor evoked potentials were recorded using a dedicated Keypoint system (Alpine biomed). The measurement of latency response corresponds to the latency of the positive response peak. Central conduction time (CCT) was calculated as follow: CCT = TCT - PCT.

Assessment of gait and motor performance

All motor behavior tests were realized on tPA^{-/-} and WT mice.

Negative geotaxis: Mice pups were placed facing downward, on a 45° incline and holded for 5 sec, as previously described by Feather-Schussler and Fergusson, 2016. After releasing the pup, the time for the pup to turn face upward (turn around 180° on the incline) was recorded. A total of three trials was realized for each pup and the best time over the three trials was

recorded. A total of one min was given for each trial. The number of fails to turn during the three trials was also recorded.

Righting reflex: Mice pups were placed on their back on a bench pad and holded in position for 5 sec. After releasing the pup, the time for the pup to return to prone position was recorded. A total of one min was given for each trial. A total of three trials was realized for each pup.

Ambulation: Mice pups were placed on a bench pad for 1 minute and an ambulation scoring was realized depending on following criteria: 0 = no movement, 1 = crawling with asymmetric limb movement, 2 = slow crawling but symmetric limb movement, and 3 = fast crawling/walking, as previously described by Feather-Schussler and Fergusson, 2016. At the testing day, if mice presented an inferior ambulation score than the previous test, this data was excluded.

Catwalk: Gait analysis was performed using the CatWalk XT automated system (Noldus). The apparatus consists of an enclosed walkway (130.3 x 68.3 x 152 cm) on a glass plate in which the light of a fluorescent tube on its long side is completely internally reflected. The mouse traverses the corridor from one side to the other as a green light enters on the long side of the plate. When a mouse's paw makes contact with the glass plate, the light is scattered and its footprints are captured. The training and testing procedures were conducted as previously described (Hamers, Koopmans, & Joosten, 2006). The mice were subjected to three consecutive compliant runs (<60% of speed variation). The recorded data were analyzed using the CatWalk XT 9.0 software.

Hindlimb foot angle: Measure of hindlimb foot angle was taken during Catwalk acquisition, only when the pup was performing a full stride in a straight line and both feet were flat on the ground. Measurements were not taken while the pup was stationary or turning.

Open field: Open field experiment was performed to assess general locomotor activity of mice. Each mouse was placed in a square box of 31.5 x 31.5 cm for 5 min. Distance was videotracked (DMK 21AF04, The Imaging Source®) and analysed with EthoVision XT 11.5 (Noldus).

Statistics

All analyzes were performed in a blinded manner. Data are represented as mean \pm S.D. Data and statistical processing were performed using Microsoft Excel and GraphPad Prism Software. Statistical significance across groups defined by one factor was performed using Mann-Whitney *U* test or unpaired two-tailed student *t* test (with Welch's correction when variances were statistically different). Multiple comparisons were statistically evaluated by a 2-way ANOVA with Sidak's or False Discovery Rate post-hoc test (conduction velocity), when comparisons across groups were defined by two-factors (*e.g.*, genotype and time point). Cumulative ambulation scores were compared using the Kolmogorov-Smirnov test. For the correlation between nodal length and axonal diameter a non-parametric correlation with Spearman test was performed. The level of statistical significance was set at $p < 0.05$.

Results

tPA is selectively expressed in myelinating oligodendrocytes

In order to investigate whether tPA is required for myelination processes, we firstly determined the temporal expression of tPA in oligodendrocyte lineage during developmental myelination of the spinal cord. In accordance with previous study, tPA is not detectable in oligodendrocyte lineage at embryonic stages and its expression in Olig2⁺ cells (marker of all oligodendrocyte lineage) occurs from post-natal stages (**Figure 1a** and **Supplementary Figure 1a**). The proportion of Olig2⁺ cells expressing tPA starts at P0, progressively increases at P3 and P7 ($p < 0.001$ at P3, P7 vs P0), to reach an important peak at P15 ($p < 0.001$ at P15 vs P0) and then notably decreases from P21 ($p < 0.001$ at P21 vs P0) to become rare at adulthood ($p > 0.05$ at 8w vs P0; **Figures 1a and 1b**). Hence, Olig2⁺ / tPA⁺ cells represent 0.8971% at P0, 7.282% at P3, 17.18% at P7, 23.82% at P15, 12.63% at P21 and 0.8507% at 8w of total Olig2⁺ cells in the spinal cord (**Figure 1b**).

Since cells of oligodendrocyte lineage evolve through different stages of differentiation, we then assessed which sub-populations of oligodendrocytes expressed specifically tPA by supplemental immunostainings for OPCs (with PDGFR α - platelet-derived growth factor receptor α antibodies), and myelinating markers such as 2',3'-cyclic nucleotide 3'-phosphodiesterase (CNP), myelin basic protein (MBP), proteolipid protein (PLP) and myelin oligodendrocyte glycoprotein (MOG). At all developmental stages, only myelinating oligodendrocytes expressed tPA in the spinal cord (**Figure 1c**). Indeed, none OPCs (PDGFR α ⁺) exhibited tPA expression whereas this serine protease is mostly associated in CNP, MBP, PLP or MOG positive oligodendrocytes (**Supplementary Figure 1b**). Moreover, the presence of tPA in the cytoplasmic compartment of myelinating oligodendrocytes was confirmed by using

electron microscopy (**Figure 1d**). Our results are in accordance with a recent single-cell transcriptomic study of oligodendrocyte lineage in later development (linnarssonlab.org/oligodendrocytes; Marques *et al.*, 2016) where tPA gene expression (*Plat*) is mainly found in a subsets of newly-formed oligodendrocytes and myelin forming oligodendrocytes (**Figure 1Figure e**).

These data revealed that tPA is selectively expressed in myelinating oligodendrocytes and that the time point P15 (corresponding to the higher number of Olig2⁺/tPA⁺ oligodendrocytes) coincides with the peak of active myelination in the spinal cord suggesting a possible role of this serine protease during development myelination processes.

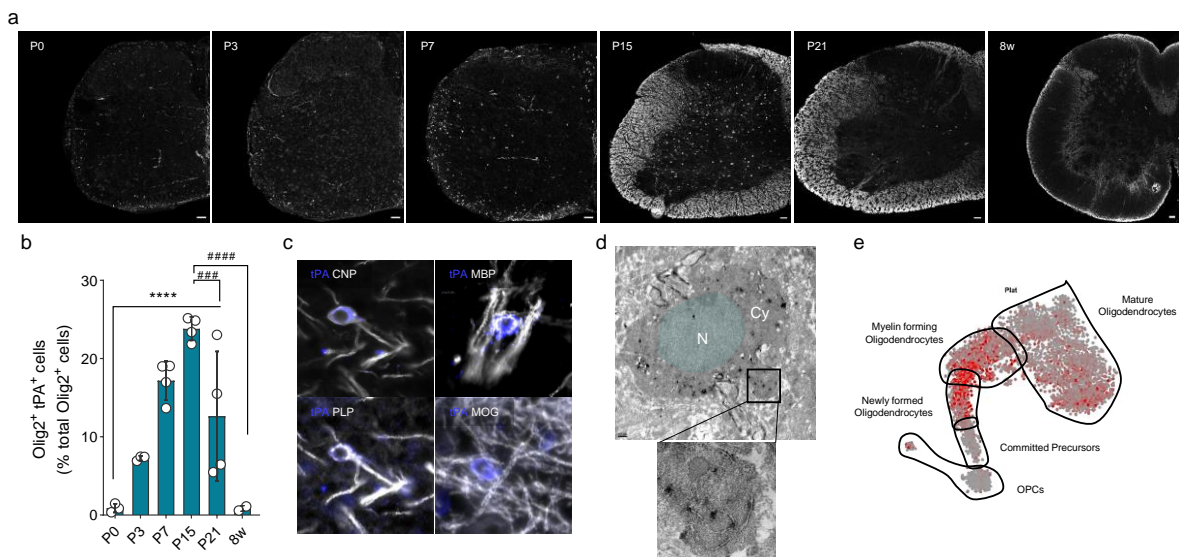
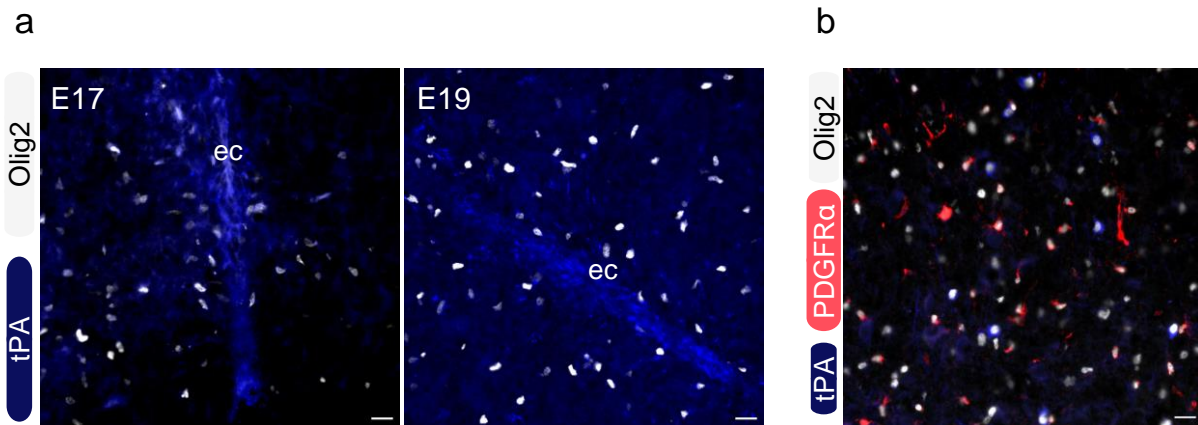


Figure 1 Transient expression of tPA is developmentally associated with myelinating oligodendrocytes. **a:** tPA (grey) expression throughout development (P0-8w) in the mice spinal cord. **b:** Quantification of tPA-positive oligodendrocytes (Olig2⁺/tPA⁺ cells) from P0 to adult stage in percentage of total Olig2⁺ cells in the whole spinal cord (****p<0.001 vs P0; ###p<0,01 vs P15; #####p<0,0001 vs P15; n=3 for P0, P3 and 8w and n=4 for P7, P15, and P21; unpaired t-test with Welch's correction). **c:** Representative images of myelinating oligodendrocytes (CNP, MBP, PLP, MOG, grey) expressing tPA (blue). **d:** Representative image of an oligodendrocyte expressing tPA by electron microscopy. **e:** t-SNE plot of oligodendrocyte lineage cell transcriptomes from P21-30 for *Plat* gene expression (red dot plot); represented as *t* distributed stochastic neighbor embedding projection (<https://linnarssonlab.org/oligodendrocytes/>; Marques *et al.*, 2016).



Supplementary Figure 1 tPA expression in oligodendrocytes occurs at post-natal stages and is not associated with OPCs. **a:** Representative photomicrographies at E17 (left) and E19 (right) showing tPA (blue). At these stages, tPA was only expressed in ependymal and endothelial cells bordering the ependymal canal (ec) and not in Olig2⁺ cells (grey). **b:** Representative photomicrographies showing tPA (blue) expression in Olig2⁺ cells (grey), but not associated with the OPCs marker (PDGFRα in red). Scale bars: 20 μm.

Oligodendrocyte differentiation is delayed in tPA-deficient mice

As we observed a strong expression of tPA only in myelinating oligodendrocytes, we sought to determine if tPA could influence oligodendrocyte differentiation. To do so, we quantified throughout development stages in the spinal cord, the number of OPCs (PDGFRα⁺) and myelinating oligodendrocytes (MBP⁺) in tPA-deficient mice (tPA^{-/-}) and their wild-type (WT) littermates (**Figure 2**). It is important to note that there was no significant differences between tPA^{-/-} and WT mice in the total number of oligodendrocytes (Olig2⁺ cells) at all stages (p>0.05; **Supplementary Figure 2a**). Concerning OPC cells, the proportion of Olig2⁺ / PDGFRα⁺ cells throughout the spinal cord was not significantly different in both strains at early embryonic development (E13 and E15; p>0.05) whereas at later developmental stages (E17, E19 and at P0), a higher proportion of these cells were found in tPA^{-/-} mice compared to tPA-WT ones

(**Figures 2a, 2b, and Supplementary Figure 2b**). At P3, there is no more difference in the number of PDGFR α ⁺ oligodendrocytes between the two strains ($p > 0.05$; **Figures 2a and 2b**).

Analysis of MBP immunostaining revealed that this latter is expressed in the spinal cord from E17 and displayed a region- and time-dependent expression in both strains (**Figures 2a, 2c, 2d, and Supplementary Figure 2b**). Therefore, we divided the spinal cord in two regions (ventral and dorsal parts). In the ventral part of the spinal cord and at embryonic stages (E17 and E19), levels of MBP expression were drastically lower in the tPA^{-/-} mice compared to their WT littermates ($p < 0.05$; **Figures 2a and 2c**). At postnatal stages (from P0 to P15) except at P7, there were no more significant differences between the two strains ($p > 0.05$ at P0, P3 and P15; **Figures 2a, 2c and Supplementary Figure 2c**).

Myelination of the spinal dorsal white matter occurs from E19, corresponding to the appearance of MBP expression in this area (**Figure 2a**). Analysis of MBP expression revealed almost the same differential patterns as in the ventral part with levels of MBP significantly inferior at prenatal stage and P7 in the tPA^{-/-} mice compared to the WT ones ($p < 0.05$; **Figures 2a and 2d**) and no more significant differences between the two strains at postnatal stages ($p > 0.05$; **Figures 2a, 2d and Supplementary Figure 2c**). We then performed immunoblotting against myelin proteins (MBP and CNP) from P0 to P21 tPA-WT and tPA^{-/-} mice spinal cord tissues. As in immunohistochemistry, no significant differences in CNP and MBP levels were observed between the two genotypes at postnatal stages (**Figure 2e**).

Altogether, these data demonstrate that the absence of tPA delays the differentiation of OPCs into myelinating oligodendrocytes during development supporting that this serine protease is required for a proper differentiation of oligodendrocyte lineage.

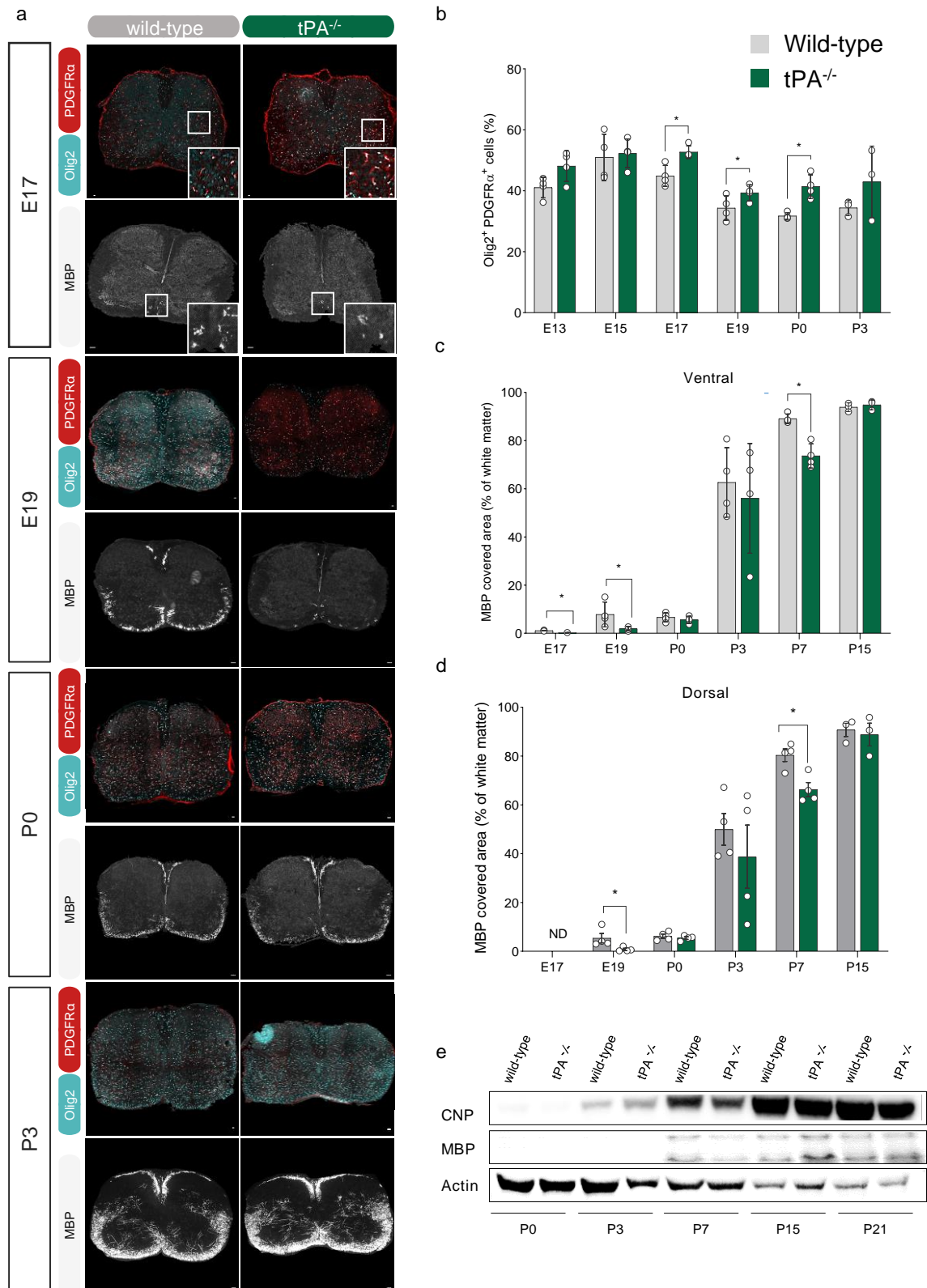
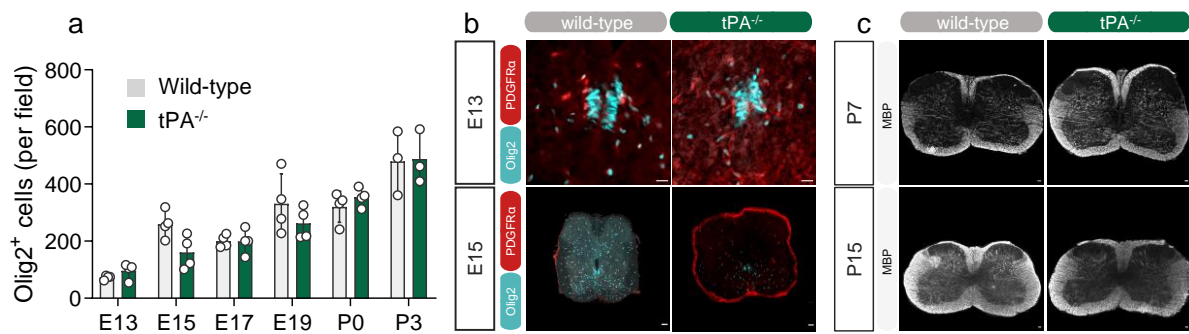


Figure 2 Oligodendrocyte differentiation is delayed in *tPA*^{-/-} mice. **a:** Representative images of oligodendrocytes precursor cells (Olig2; cyan and PDGFRα; red) and myelin (MBP; white) in spinal cord white matter of E17, E19, P0 and P3 *tPA*-wild-type and *tPA*^{-/-} mice. Images on the bottom right of MBP staining at E17 are magnification of the square in respective MBP

image. Scale bars: 20 μ m for Olig2/PDGFR α immunostaining and 50 μ m for MBP. **b**: Quantification of oligodendrocyte precursor cells (Olig2⁺ / PDGFR α ⁺ cells) in percentage of total Olig2⁺ cells in the entire spinal cord from E17 to P3 tPA-wild-type (grey) and tPA^{-/-} (green) mice. **c-d**: Quantification of MBP coverage in percentage of whiter matter ventral (c) and dorsal (d) part from E17 to P15 tPA-wild-type (grey) and tPA^{-/-} (green) mice. Graphs show mean \pm SD. Mann-Whitney *U* test, **p*<0.05; *n*=4 mice per genotype. ND: not detectable. **e**: Representative western blots of spinal cord lysates labeled for CNP or MBP with β -actin as a loading control from P0 to P21 in tPA^{-/-} and wild-type mice.



Supplementary Figure 2 a: Number of Olig2⁺ cells in the spinal cord from E13 to P3 tPA-wild-type (grey) and tPA^{-/-} (green) mice. Graphs show mean \pm SD. Mann-Whitney *U* test, *p*>0.05; *n*=4 mice per genotype. **b**: Representative images of oligodendrocytes cells (Olig2⁺; cyan) and PDGFR α marker (red) in the spinal cord of E13 and E15 wild-type and tPA^{-/-} mice. **c**: Representative images of MBP immunostaining (grey) in the spinal cord of P7 and P15 wild-type and tPA^{-/-} mice. Scale bars: 20 μ m for Olig2/PDGFR α immunostaining and 50 μ m for MBP.

Myelin compaction is altered in tPA-deficient mice

To further dissect the role of tPA in myelination processes, we examined myelin sheath ultrastructure of tPA-WT and tPA^{-/-} spinal cord axons by transmission electron microscopy. As the greater number of tPA⁺ oligodendrocytes is found at P15 and that this time point corresponds to the myelination of corticospinal tract (CST) in rodent spinal cords (Matthews

& Duncan, 1971), we specifically analyzed this contralateral descending fibers of the dorsal funiculus in the cervico-thoracic spinal cord.

At P15, we observed a major default of myelin compaction in $tPA^{-/-}$ mice compared to WT littermates (**Figure 3a**). By calculating the area of uncompact myelin (**Supplementary Figure 3a** for quantification methodology), we noticed that deficient mice displayed a severe myelin sheath split compared to WT. Indeed, the former have 29.18% and the latter 7.81% of uncompact myelin ($p < 0.0001$; **Figure 3b**). Moreover, this striking phenotype was associated with a decrease of axonal circularity (index of axonal circularity: 0.7581 in tPA -WT vs 0.6807 in $tPA^{-/-}$; $p < 0.0001$; **Figure 3c**). Neither the g-ratio nor the distribution of myelinated axons revealed significant differences between the two genotypes ($p > 0.05$; **Figures 3d** and **3e**). However, other distinctive myelin sheath ultrastructure phenotypes were found among the $tPA^{-/-}$ mice. While some axons presented a myelin sheath split, others displayed myelin outfoldings and axonal inclusions (**Supplementary Figure 3b**).

To confirm the role of tPA in myelin compaction, we then performed similar analyses in another strain of tPA -deficient mice (tPA^{Null}) and its control ($tPA^{fl/fl}$). As reported with $tPA^{-/-}$ mice, a higher area of uncompact myelin was detected in tPA^{Null} mice when compared to control mice (18.52% in tPA^{Null} vs 8.091% in $tPA^{fl/fl}$; $p < 0.0001$; **Figures 3a** and **3b**). We also observed that this myelin sheath compaction default was more subtle than in $tPA^{-/-}$ mice (**Figures 3a** and **3b**). These two tPA -deficient strains display other discrepancies. In tPA^{Null} mice, axonal circularity is not affected compared to control mice (index of axonal circularity: 0.7056 in $tPA^{fl/fl}$ vs 0.6959 in tPA^{Null} ; $p > 0.05$; **Figure 3c**) whereas g-ratio is significantly higher in tPA -deficient mice compared to control (0.8450 for $tPA^{fl/fl}$ and 0.8569 for tPA^{Null} ; $p < 0.05$; **Figure 3d**). Thus, these data indicate that myelin sheath is thicker in tPA^{Null} compared to $tPA^{fl/fl}$

control mice. However, the distribution of myelinated axons is similar between tPA^{Null} and tPA^{fl/fl} mice ($p > 0.05$; **Figure 3e**). Here, we observed that the two strains of tPA-deficient mice and their respective control exhibited equivalent polynomial regression curves of myelinated axons distribution depending to their diameter (**Figure 3e**).

Altogether, these data highlight that tPA plays a fundamental role in myelin compaction and each specific genotype of tPA-deficient mice can be a relevant model to study dysmyelination processes.

Uncompacted myelin could ensue from a default formation of the major dense line, or the double intraperiodic line (Snaidero & Simons, 2017). In order to discriminate myelin sheath ultrastructure, we next examined its lamellar organization at higher magnification in tPA-deficient and control mice (**Figure 3f**). Although the major dense line appeared normal in tPA-deficient (tPA^{-/-} and tPA^{Null}) and their respective control mice (tPA-WT and tPA^{fl/fl}), the organization of intraperiodic lines was not as well established in both tPA-deficient animals compared to their control littermates (**Figure 3f**). In some axonal regions, the lack of tPA leads to an intermittent intraperiodic line with a wider interlamellar space (**Figure 3f**).

So, this abnormality revealed that tPA is an important factor for a proper myelin compaction by promoting the apposition of external surfaces of adjacent lamellae.

Then, we investigated in the optic nerve of tPA-deficient and control mice, the ultrastructure of nodal and paranodal regions (pseudo-colored in blue in **Figure 3g**). We observed that Node of Ranvier are significantly longer in tPA^{Null} compared to the tPA^{fl/fl} mice (0.6004 vs 1.0033, respectively, $p < 0.005$; **Figure 3h**). In tPA^{-/-} mice, nodal length observed was only in trend higher compared to their control counterparts (0.7062 vs 0.9263 μm ,

respectively; $p > 0.05$; **Figure 3h**). In all strains, no significant differences were visualized by correlating the nodal length with axonal diameter (R between 0.08 and 0.16; **Figure 3i**).

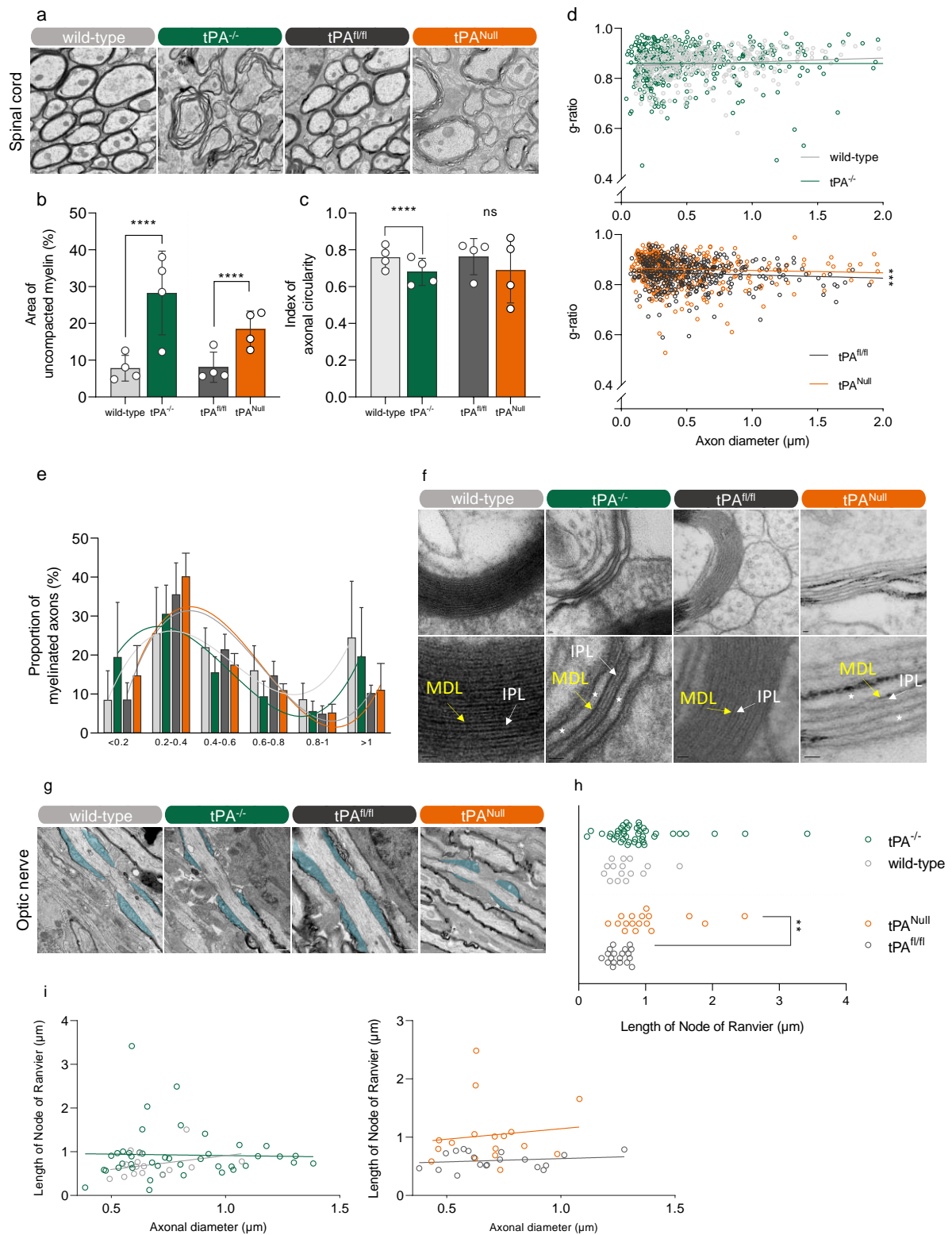
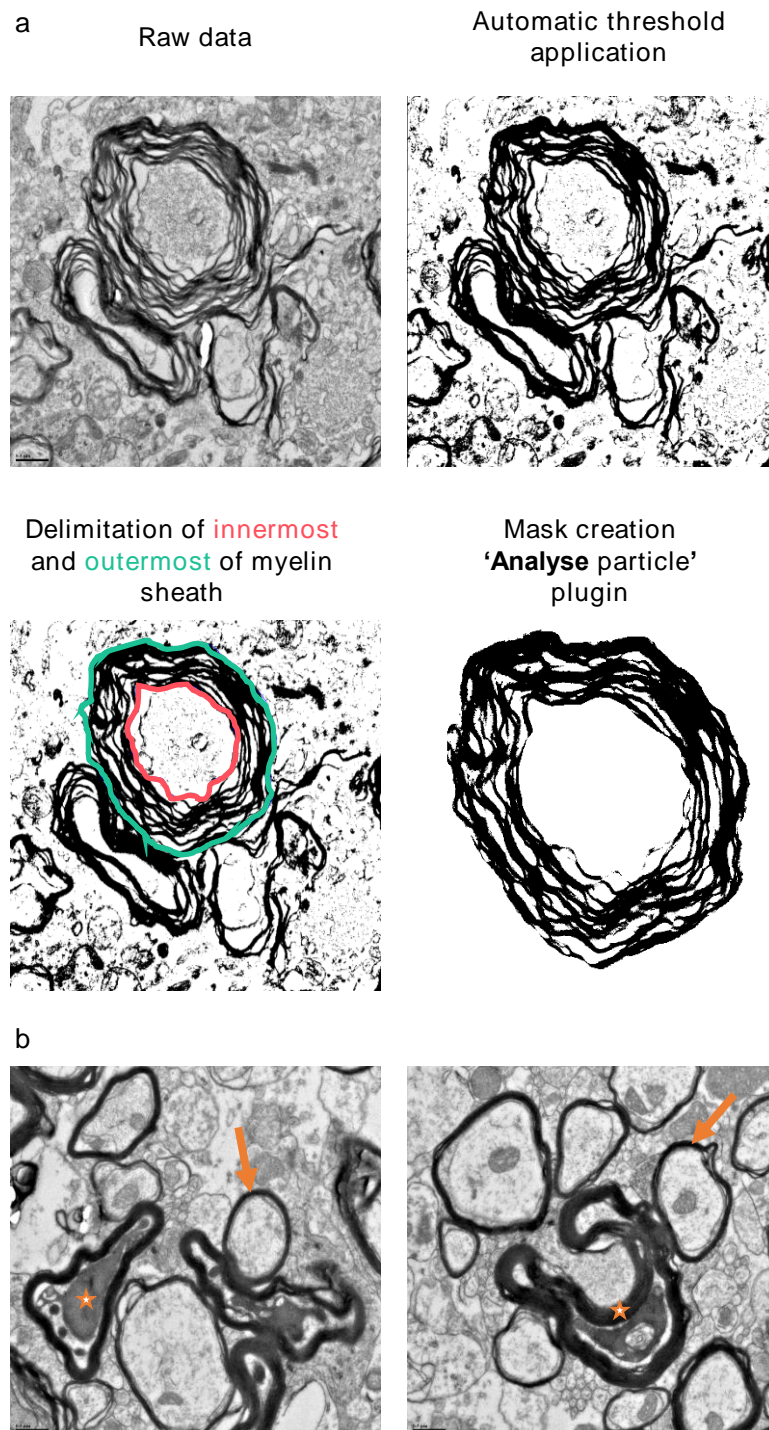


Figure 3 Myelin compaction and node of Ranvier length are altered in tPA-deficient mice. a: Representative electron micrographs of myelinated axons in spinal cord of P15 tPA wild-type, tPA^{-/-}, tPA^{fl/fl} and tPA^{Null} mice. Scale bars: 0.5 μ m. **b:** Percentage of uncompacted myelin area of P15 tPA wild-type (light grey), tPA^{-/-} (green), tPA^{fl/fl} (dark grey) and tPA^{Null} (orange) mice; n=4 mice per genotype; Two-tailed unpaired t-test with Welch's correction, ****p<0.0001. **c:** Index of axonal circularity of P15 tPA wild-type (light grey), tPA^{-/-} (green), tPA^{fl/fl} (dark grey) and tPA^{Null} (orange) mice; n=4 mice per genotype; Two-tailed unpaired t test with Welch's correction, ****p<0.0001; ns: non-significant. **d:** g-ratio analysis relative to axonal diameter in P15 wild-type (light grey) and tPA^{-/-} (green; top panel); tPA^{fl/fl} (dark grey) and tPA^{Null} (orange; bottom panel). Two-tailed unpaired t-test with Welch's correction, **p<0.005; n=4 mice per genotype, n=100 axons per animal. **e:** Proportion of myelinated axons distributed by axon diameter of P15 tPA wild-type (light grey), tPA^{-/-} (green), tPA^{fl/fl} (dark grey) and tPA^{Null} (orange) mice overlaid with polynomial best-fit regression curves. **f:** Representative electron micrographs of myelin sheath ultrastructure layers of P15 tPA wild-type, tPA^{-/-}; tPA^{fl/fl} and tPA^{Null}. Bottom panels show adjacent myelin sheaths with the presence of major dense lines (MDL, yellow arrows) and intraperiodic lines (IPL, white arrows). The absence of IPL are pointed with an asterisk (*). Scale bars: 20 nm. **g:** Representative electron micrographs of nodal and paranodal (pseudo-colored in blue) regions in the optic nerve of P15 tPA wild-type, tPA^{-/-}, tPA^{fl/fl} and tPA^{Null}. Scale bars: 0.5 μ m. **h:** Quantification of nodal region length in P15 tPA (light grey), tPA^{-/-} (green), tPA^{fl/fl} (dark grey) and tPA^{Null} (orange) mice. Two-tailed unpaired t-test with Welch's correction, **p<0.005; n=2 mice per genotype. **i:** Distribution of nodal length relative to axonal diameter in P15 tPA wild-type (light grey), tPA^{-/-} (green), tPA^{fl/fl} (dark grey) and tPA^{Null} (orange) mice.



Supplementary Figure 3 Methodology of myelin split calculation and abnormal myelin sheath phenotype. **a:** Protocol to create a mask for analyzing uncompacted myelin in total myelin area. From the raw data, we first applied an automatic threshold which allowed us to delimitate the innermost and outermost of myelin sheath. Then, once the mask is created, the 'analyze particle' plugin is applied and the area of uncompacted myelin is normalized to the total area of myelin sheath (between the innermost and outermost regions). **b:** Representative electron microphotographies showing normal compacted myelin sheath (arrow), axonal inclusions (asterisk in left panel) and myelin outfolding (asterisk in right panel) in *tPA*^{-/-} mice.

Next, *ex vivo* diffusion tensor imaging (DTI) was performed to assess microstructural changes within the spinal cord of tPA^{-/-} and WT mice. This technique tracks the position and direction of water molecules in tissues and it is mostly sensitive to myelin and often referred to a white matter integrity imaging technique (Madden *et al.*, 2012). First, images from MRI of the whole spinal cord were analyzed with DSI studio software to give a Generalized Q-sampling Imaging (GQI) reconstruction (**Figure 4a**). Thanks to this reconstruction, fiber tractography (**Figure 4b**), fibers volume, fractional anisotropy (FA) and mean diffusivity (MD) data were provided (**Figure 4c**). None parameters were modified in the entire spinal cord of tPA^{-/-} and WT mice ($p > 0.05$; **Figure 4c**). Although the whole spinal cord tractography did not show any microstructural alteration, there is an heterogeneity in tPA^{-/-} mice FA. So, we decided to look closer in the spinal cord and more precisely in specific regions of interest (ROI; **Figure 4d**). After manually defining ventromedian (vm), dorsomedian (dm), right and left ventrolateral (vlr and vll, respectively), right and left dorsolateral (dlr and dll, respectively) of the white matter and the grey matter (GM) ROIs in the cervico-thoracic spinal cord, same calculated parameters were given (**Figures 4e-4g**). As above, there are no significant differences in DTI parameters (fibers volume, FA and MD) in each regions of tPA^{-/-} and WT mice (**Figures 4f-4h**).

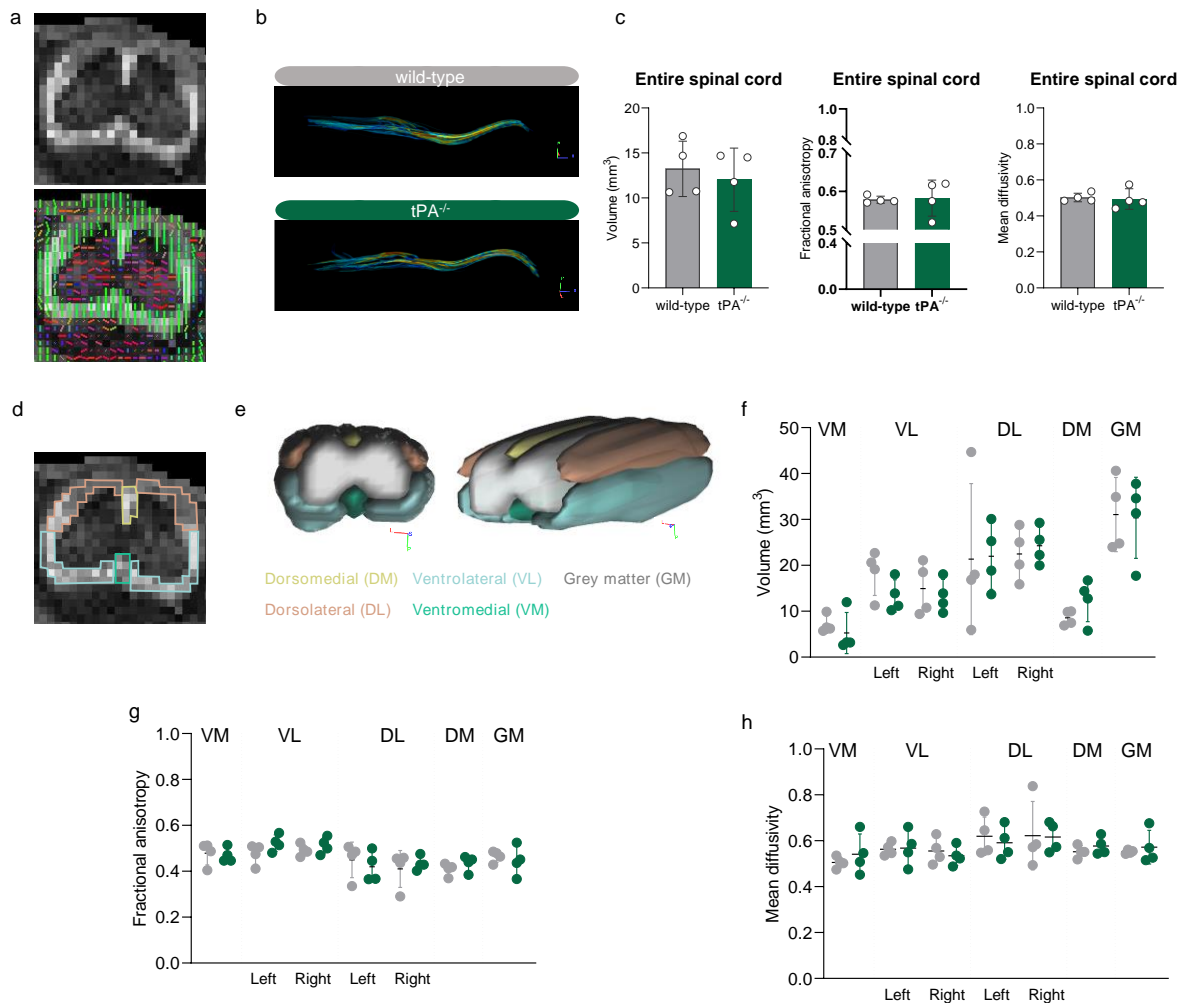


Figure 4 Diffusion tensor imaging parameters are not affected by the lack of tPA in the spinal cord. **a:** Representative scan of spinal cord MRI (coronal view: top panel) and Generalized Q-sampling Imaging (GQI) reconstruction (bottom panel). **b:** Reconstruction of fiber tracts in the entire spinal cord of P15 tPA-WT (grey) and tPA^{-/-} (green) mice. **c:** Microstructure and diffusion parameters (fibers volume, FA and MD) in the entire spinal cord of P15 tPA-WT (grey) and tPA^{-/-} (green) mice. Graphs show mean ± SD. **d:** Representative scan of spinal cord MRI with delimitation of ventromedial (VM, cyan), left and right ventrolateral (VL, light cyan), dorsomedial (DM, yellow), and left and right dorsolateral (DL, orange). **e:** Reconstruction of regions of interest (ROIs). **f-h:** Quantification of several parameters (**f:** Fibers tract volume; **g:** FA and **h:** MD) of each delimited ROIs of P15 tPA-WT (grey) and tPA^{-/-} (green) mice. FA: fractional anisotropy; MD: mean diffusivity. p>0.05 Mann-Whitney U test. n=4 per genotype.

tPA-deficient mice display gait abnormalities without affecting conduction velocity

After having shown the role of tPA in developmental myelination of the corticospinal tract (CST) and as this tract is the major descending pathway which contributing to motor function in mammals, our next objective was to determine the functional consequences of myelin ultrastructure defect in one of our dysmyelinating model. For that, we first performed motor evoked potentials (MEPs) to examine the conduction velocity of descending motor pathways, and secondly, we investigated i) motor coordination, ii) postural imbalances, iii) ambulation, iv) hindlimb foot angle to determine gait abnormalities and v) motor activity at several post-natal stages (from P3 to P30) both in our most severe dysmyelinating model (*i.e.* tPA wild type and tPA^{-/-} mice).

Regarding the MEPs, we followed-up the same tPA^{-/-} and their controls mice throughout development (from P15 to adulthood). Dorsal CST fibers were stimulated at the level of the first cervical vertebrae (Stimulation 1) and at the onset of the sciatic nerve (Stimulation 2; **Figure 5a**). Thanks to the recorded electrode situated at the gastrocnemius muscle level, the total conduction time (TCT; **Figure 5b**) and the peripheral conduction time (PCT; **Figure 5c**) were recorded allowing the determination of central conduction time (CCT) corresponding to TCT-PCT (**Figure 5d**). For each genotype, we detected an age-dependent effect of the CCT (**Figure 5d**). Indeed, the conduction latency decreased between P15 and the other time points (P30-P60), showing a maturation of CNS after P15 ($p < 0.0001$ for each time point vs P15; **Figure 5d**). However, we did not detect any significant difference in the TCT, PCT or CCT between the two genotypes at each stage ($p > 0.05$; **Figures 5b-5d**).

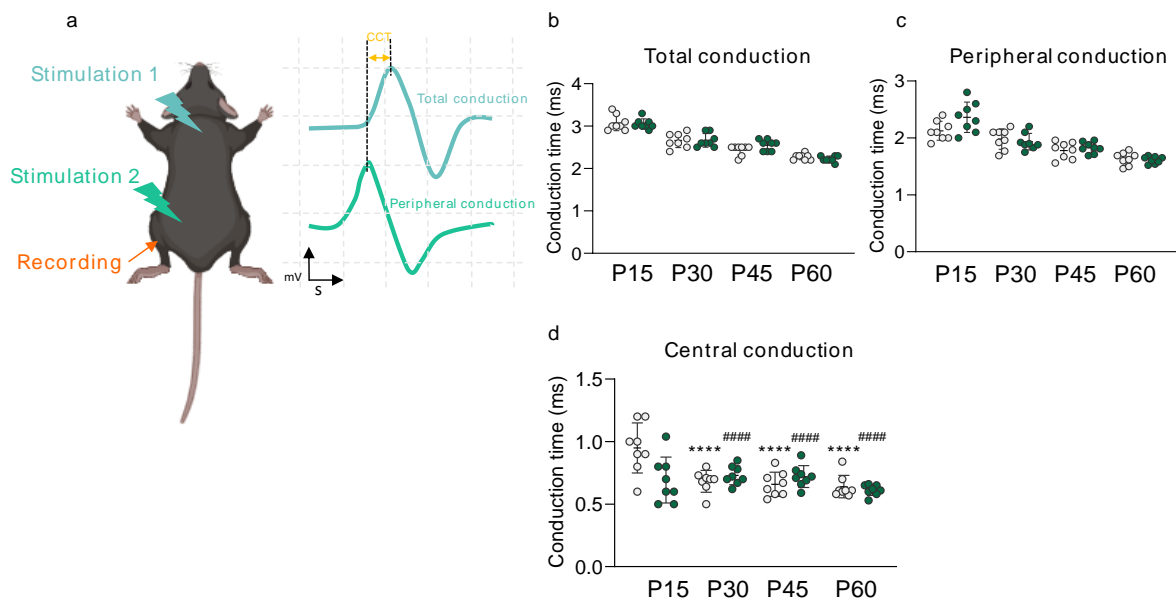


Figure 5 The lack of tPA does not affect motor evoked potentials a: Schematic representation of stimulation protocol (left) and motor evoked potential (MEP) responses for each stimulation (right). The recording of MEPs were performed at the gastrocnemius muscle level (orange arrow). Stimulation 1 was performed at the base of cervical vertebrae to measure total conduction time (TCT). Simultaneously, stimulation 2 was performed at the onset of the sciatic nerve to measure peripheral nerve conduction (PCT). Central conduction time (CCT) was calculated as TCT-PCT. **b-d:** Analysis of TCT (**b**), PCT (**c**) and CCT (**d**) throughout postnatal development (P15 to P60) in tPA-WT (grey) and tPA^{-/-} (green) mice. Graphs show mean \pm SD. **** $p < 0,0001$ vs P15 WT and #### $p < 0,0001$ vs P15 tPA^{-/-} mice ; unpaired t-test followed by multiple comparison corrected by FDR. n=8 par genotype.

Then, we investigated the motor impact of a lack of tPA in several behavior assays. Motor coordination was assessed by negative geotaxis test in pups from P3 to P7 because after this stage, negative reflex is established in rodents (Heyser, 2003; Feather-Schussler & Ferguson, 2016). No significant differences were found between tPA-deficient mice and their control littermates regarding the time for pups to face up the slope and the number of fails to face upward ($p > 0.05$; **Supplementary Figure 4a** and **Supplementary Figure 4b**).

Postural imbalance was evaluated thanks to the righting reflex test from P3 to P7 mice since it appears in rodent at P5 (Heyser, 2003; Feather-Schussler & Ferguson, 2016). As expected on the above results, no significant differences were detected in the time for pups to return to

prone position in both strains ($p>0.05$; **Supplementary Figures 4c** and **Supplementary 4d**). While there is no significant difference between tPA wild type and tPA-deficient mice, tPA^{-/-} pups are heterogeneous group (**Supplementary Figures 4c** and **Supplementary 4d**). For example, at P3, half of the animals had an execution time <20s whereas the other half turn in more than 40s.

Ambulation was scored to determine whether myelin compaction default lead to a delay in crawling to walking transition. At P3, both tPA^{-/-} and WT mice have a score of zero corresponding to no movement (**Figure 6a**). Half of wild-type pups showed a crawling behavior with asymmetric limb movement (score 1) emerging at P5 whereas any tPA^{-/-} mice have initiated it (**Figures 6a** and **6b**). So, from this stage to P10, tPA-deficient mice displayed gait deficits compared to their control counterparts ($p<0.0001$; **Figure 6a**). At P12, there were no more differences between the two genotypes in the ambulation score revealing that tPA^{-/-} mice have caught up their delay in ambulation ($p>0.05$; **Figure 6a**). Furthermore, tPA^{-/-} mice exhibited a reduced cumulative score compared to WT mice from P5 to P12 ($p<0.0001$ from P5 to P12; **Figure 6b**). Thus, the acquisition to a symmetric and fast walking took more time and is postponed in tPA^{-/-} mice compared to tPA wild-type ones.

In addition to ambulation score, hindlimb foot-angle was assessed at P12 and P30 (**Figure 6c**). We observed that tPA-deficient pups walked with their paws splayed contrary to control ones that walked with paws facing towards (**Figure 6c**). tPA^{-/-} mice showed an increase of hindlimb foot-angle at P12 and P30 compared to WT mice (P12: 62.31° vs 86.74°; P30: 37.94 vs 63.31 respectively; ** $p<0.01$, * $p<0.05$, ; **Figure 6d**). This increased angle is correlated with gait instability. So, tPA^{-/-} mice need to increase the angle of their rear paws to stabilize their gait.

Then, we evaluated whether the delay in the acquisition of walking behavior and the gait instability was due to a weight variance in $tPA^{-/-}$ compared to wild type mice. Analyses of weight did not indicate any differences between the two littermates (**Supplementary Figure 4e**). Since $tPA^{-/-}$ mice displayed gait abnormalities from P12, we next evaluated general activity and several parallel gait parameters at later stages (P30 and 8 weeks) thanks to an open-field setup and CatWalk system, respectively (**Figures 6e-6i**).

The openfield measures general activity by tracking mice movements into a square box for 5 min (**Figure 6e**). Interestingly, at P30, $tPA^{-/-}$ mice have an increased of locomotor activity compared to WT ones covering a significant longer distance (19.56 m vs 12.04 m, respectively $p < 0.05$; **Figure 6f**). However, no significant difference were found at adult stage between the two strains (14.16 m vs 12.58 m; $p > 0.05$; **Figure 6f**). Regarding the Catwalk experiment, we selected and analyzed by this automated system four general gait parameters (run average speed, number of steps, regularity index, run maximum variation), and five parameters related to the paws (stride length, base of support (BOS), print length, print width and, print area; **Figures 6g-6i** and **Supplementary Figures 4f-4h**). None general parameters were significantly differences between $tPA^{-/-}$ and WT mice at P30 and 8w (**Figure 6h**). Regarding paw parameters, only the stride length for the right front, right hind, left front, and left hind paws, were significantly decreased in $tPA^{-/-}$ compared to WT mice at P30 ($p < 0.05$; **Figure 6i**). There were no significant differences between the two genotypes at P30 and 8w for other paw parameters (**Supplementary Figure 4h**).

Taken together, these data reveal that dysmyelination which occurs in $tPA^{-/-}$ mice leads to a delay in walking establishment and gait abnormalities. By walking with a splayed hindlimb foot angle, $tPA^{-/-}$ mice displayed a smaller stride length without affecting motor functions.

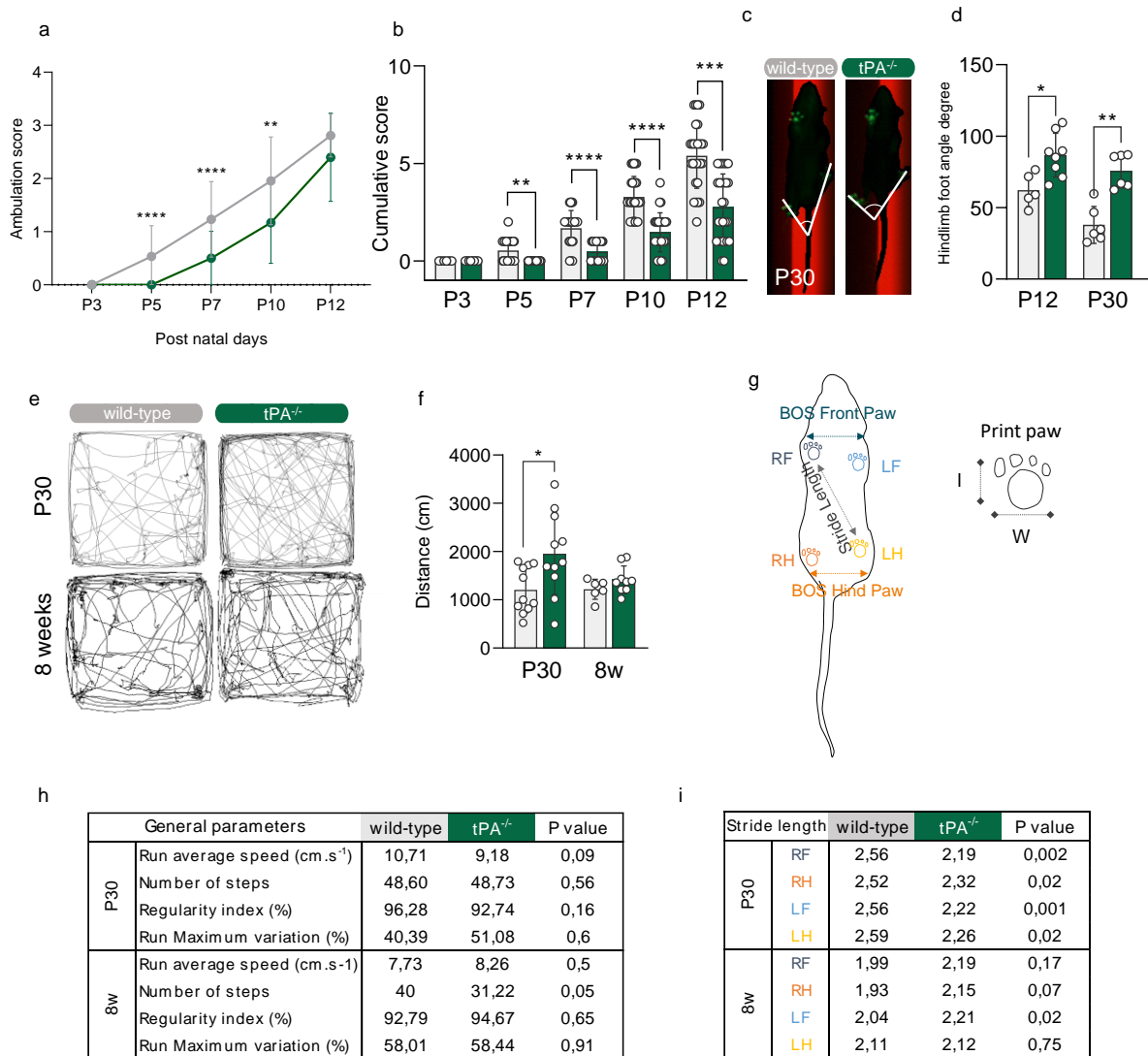
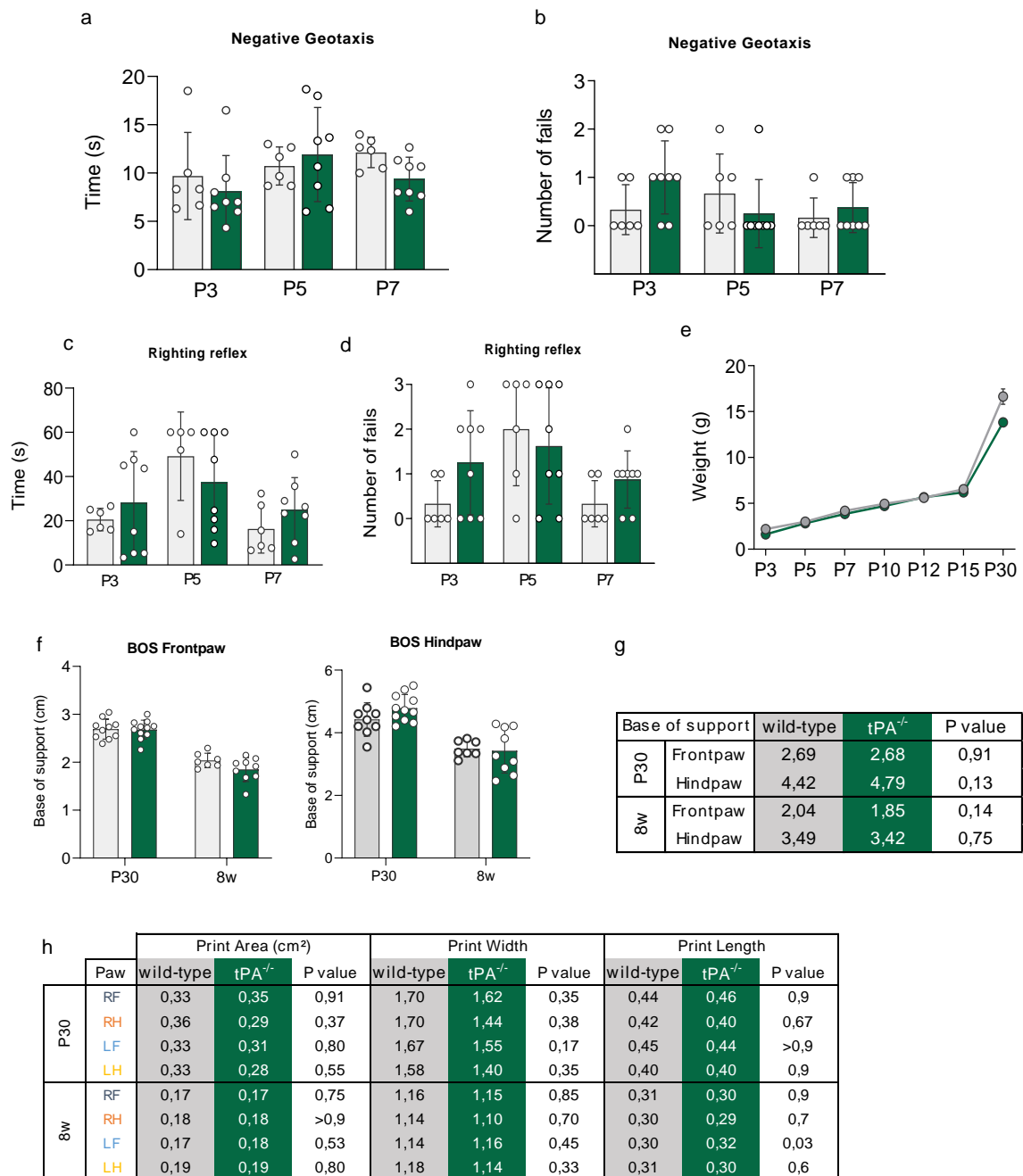


Figure 6 tPA-deficient mice display gait abnormalities. **a-b:** Ambulation score (**a**) and cumulative ambulation score (**b**) through early development from P3 to P12 tPA^{-/-} (green) and WT (grey) mice. **c:** Representative photographs showing hindlimb foot angle at P30 in tPA^{-/-} and WT mice. **d:** Analysis of hindlimb foot angle at P12 and P30 in tPA^{-/-} (green) and WT (grey) mice. **e:** Representative traces showing 5 min of open-field exploration at P30 (top panel) and 8 weeks (bottom panel) in WT and tPA^{-/-} mice. **f:** Analysis of total distance travelled during open field test at P30 and 8w in tPA^{-/-} (green) and WT (grey) mice. **g:** Schematic representation of the paw parameters acquired with the Catwalk system. The base of support (BOS), print length (l) and width (w) of the front (F) and hind (H) paws were measured. **h-i:** Comparison tables of the general parameters (**h**) and stride length measured for all four paws (**i**) between P30 and 8w WT (grey) and tPA^{-/-} (green) mice. RF: right front; RH: right hind; LF: left front; LH: left hind. n=8 per genotype. Graphs show mean \pm SD. ** p<0.005 ; *** p<0.001 ; ****p<0.0001 vs WT mice. Kolmogorov-Smirnov's test for (a) and Mann-Whitney U tests for (b, d, h, i).



Supplementary Figure 4 Neonatal motor tests and catwalk paw parameters do not displayed differences between tPA WT and tPA^{-/-} mice. **a-b:** Analysis of duration time (a) and number of fails (b) in negative geotaxis test. **c-d:** Analysis of duration time (c) and number of fails (d) in righting reflex. **e:** Body weight follow-up. **f:** Analysis of frontpaws (left panel) and hindpaws (right panel) BOS in P30 and 8w WT (grey) and tPA^{-/-} (green) mice. **g-h:** Comparison tables of BOS (g) and print areas (left), print width (middle) and print length (right; h) measured for all four paws between P30 and 8w WT (grey) and tPA^{-/-} (green) mice. RF: right front; RH: right hind; LF: left front; LH: left hind. n=8 per genotype. Graphs show mean ± SD. P>0.05; Mann-Whitney U tests.

Discussion

This present study reports the effects of tPA on differentiation, myelin compaction and its functional repercussion during development. By investigating the spatiotemporal distribution of tPA expression in spinal cord oligodendrocytes, we revealed that tPA expression is transient during development with a strong peak at the stage of active myelination (P15). During this period, tPA is almost exclusively found in myelinating oligodendrocytes (CNP, MBP, PLP and MOG cells). Furthermore, a tPA-deficiency delays oligodendrocyte differentiation from OPCs towards the myelinating stage. Then, by electron microscopy, we demonstrated that the absence of tPA ensue to a severe default of myelin compaction related to ultrastructure abnormalities (in the intraperiodic line, node of Ranvier). While neuroimaging study on white matter tractography and motor evoked potentials do not reveal discrepancies between tPA^{-/-} and their control littermates, a delay in ambulation and gait abnormalities were identified in tPA^{-/-} mice. Thus, these data provide the first description of a role of tPA in oligodendrocyte differentiation and myelination processes with functional consequences and tPA-deficient mice can be considered as a new animal model to dissect developmental dysmyelination.

Role of tPA in oligodendrocyte differentiation

We describe here that the number of oligodendrocytes immunopositive for tPA increase during active developmental myelination and become rare in adult stage. We also revealed that tPA is associated with myelinating oligodendrocytes. These data are in agreement with a recent transcriptomic study reporting that gene of tPA (*Plat*) is mainly expressed in newly formed, myelin forming oligodendrocytes (NFOL2, MFOL and MOL2; Marques *et al.*, 2016). These data show that this serine protease can be an important factor

for OPCs differentiation and myelination processes. Accordingly, we identified in a region- and time- dependent manner, a delay in OPCs differentiation into myelinating oligodendrocytes. From E17 to P0, while OPCs (Olig2⁺/PDGFR α ⁺ cells) are found in higher proportion in tPA^{-/-} compared to tPA-WT mice, the proportion of myelinating oligodendrocytes (MBP⁺ immunostaining) is decreased. This delay in differentiation is caught up at postnatal stages. OPCs proliferate and differentiate to form mature oligodendrocytes through a tightly regulated process underlying important gene expression modifications, which are in turn subject to extrinsic and intrinsic regulatory signals (Emery & Lu, 2015). We can hypothesize that this delayed differentiation can be a result of postponed OPCs migration. Indeed, we previously demonstrated that migration of OPCs could be delayed in tPA-deficient mice during development without any influence on OPCs proliferation (Leonetti *et al.*, 2017). Thus, delayed migration could maintain an OPCs phenotype due to various factors present in their environment. Although molecular mechanisms underlying this differentiation are not fully understood, we can also suggest that tPA act on a transcriptional activation program for OPCs differentiation. This should be addressed in future investigations.

tPA is important for myelin compaction

A notable result is that in the two strains of tPA-deficient mice, a severe split of the myelin sheath occurs. In addition, we observed that in one strain (tPA^{-/-}) axonal circularity index is decreased without affecting g-ratio whereas in the other strain (tPA^{Null}), only the g-ratio is modified and none significant modification was detected in the axonal circularity index comparatively to their respective control animals. As the distribution of myelinated axons related to the axonal diameter is similar between the two genotypes, we can suggest that this axonal diameter does not influence ensheathment and myelin compaction defect in our

models. These results were obtained in the spinal CST and more precisely in the cervico-thoracic region. Ongoing experiments will determine whether it is a specific region phenotype or if it can be apply to several white matter regions such as in the corpus callosum and cerebellum.

Establishment of the MDL, or the double IPL is a critical step in the myelin compaction and a default in this process can lead to uncompacted myelin (Snaidero & Simons, 2017). In this way, we analyzed the lamellar myelin ultrastructure. In tPA-deficient mice we observed normal MDL and intermittent IPL with a wider interlamellar space compared to control mice. So, this abnormality reveals that tPA is an important factor for myelin compaction by promoting the correct apposition of the external surfaces of adjacent lamellae. PLP protein is crucial to acquire a compact myelin sheath and to maintain the stability of extracellular leaflets of myelin membrane by acting like a “zipper” (Klugmann *et al.*, 1997). The lack or mutations of the *plp* gene in several species lead to variable ultrastructural abnormalities of the IPL and can result in dysmyelinating disorders such as Pelizaeus-Merzbacher disease (PMD) and spastic paraplegia type 2 (SPG2) in humans (Boison & Stoffel, 1994; Klugmann *et al.*, 1997; Griffiths *et al.*, 1998; Yool *et al.*, 2002). Interestingly, each *plp1*- mutant mice display specific ultrastructural features able to mimick each subtype of PMD. In the present study, we identified that each strain of tPA-deficient mice display particular myelin morphologic alterations suggesting that tPA-deficient mice can be a relevant model to study developmental dysmyelinating disorder.

The mechanism by which tPA influences myelin compaction or differentiation is also an intriguing question. tPA is a serine protease composed of five functional domains through which it interacts with different proteins, and receptors (Chevilley *et al.*, 2015). We can

suggest that these effects are not mediated *via* EGFR, LRP1 or BDNF due to their rare presence in myelinating oligodendrocyte lineage (Marques *et al.*, 2016; personal observations). Although these molecular mechanisms are not yet identified, several hypotheses can be stated. 1) One explanation could be that tPA interact with oligodendrocytic NMDAR leading to several signalling pathways activation (Nicole *et al.*, 2001; Lundgaard *et al.*, 2013; Lesept *et al.*, 2016). 2) Another explanation could be related to endoplasmic reticulum (ER) stress. In *plp1*mutants, the underlying mechanisms to myelin sheath abnormalities are not fully understood but some studies reported that perturbation in PLP incorporation into myelin are due to an alteration of protein trafficking and ER stress (Lin & Popko, 2009; Inoue, 2017, 2019). Interestingly, we previously shown that tPA is able to decrease ischaemia-induced ER stress in a specific model of neuronal death (Louessard *et al.*, 2017). Here, we can suggest that lack of tPA modify ER stress leading to an altered protein trafficking subsequent to an altered PLP incorporation into myelin sheath and so an intermittent IPL. 3) A recent study presents a model in which the apposition and adhesion of extracellular adjacent lamellae of myelin requires a loss of repulsive forces. These latter are generated by the presence of glyocalix components in extracellular space of two adjacent myelin leaflets (Bakhti *et al.*, 2013). Glyocalix is a network of proteoglycans, glycoproteins and glycolipids. We previously shown that tPA can activate ADAMTS-4 (type 4 disintegrin and metalloproteinase with thrombospondin motifs), an endogenous metalloproteinase known to degradate CSPGs (chondroitin sulfate proteoglycans; Lemarchant *et al.*, 2014). Consequently, the lack of tPA would lead to a non-degradation of CSPGs in the extracellular space of two myelin leaflets. Thus, glyocalyx would not be removed and PLP proteins could not maintain its adhesiveness in myelin sheaths. Further studies will help us to define the molecular mechanisms by which

tPA influence myelin compaction and whether tPA act on myelination *via* a cell-autonomous process.

The lack of tPA leads to gait abnormalities without motor deficits

In the present study, we revealed a delay in crawling/walking transition and gait abnormalities without affecting locomotor activity. However, in our transgenic model, conduction time measured by MEPs and DTI parameters (fibers volume, FA and MD) are not affected. Data from tractography analyses in PMD patients are controversial. While some studies do not show any differences in several brain regions between patients and controls, other ones reported detectable variations in FA in PMD (Laukka *et al.*, 2014; Sarret *et al.*, 2018). Our non-significant results could be explained by the sample size and the sensitivity of MRI for detecting WM alteration in mice spinal cords. Further tractography experiments on other central regions will be also relevant. We highlighted tPA^{-/-} mice displayed a larger hindlimb foot angle compared to WT mice without affecting locomotor activity (measured by behavioral tests and MEPs). Since, gait disorders have also been found in dysmyelinating diseases (Tsuji, 2007), this data reinforces the fact that tPA-deficient mice can be a relevant model for studying dysmyelination. Motor circuits maturation is complex and involves both central and peripheral processes such as reflexes, precise synaptic control of motoneurons and/or interneurons (Heyser, 2003; Alvarez *et al.*, 2013). We can also hypothesize that gait alterations are due to sensitive problems. In order to better understand behavioral features of our model, further electrophysiological experiments at a cellular level and somatosensory evoked potentials will be relevant.

Overall, we demonstrated that tPA influences myelination processes. This serine protease is expressed in myelinating oligodendrocytes and is required to properly

differentiate oligodendrocytes and ensheath myelin. Accordingly, the lack of tPA lead to gait deficits suggesting that this model can be considered as a new dysmyelinating animal model. While this model need to be fully elucidated it will provide new perspectives in the field of developmental myelination.

References

- Aggarwal S, Yurlova L & Simons M (2011). Central nervous system myelin: structure, synthesis and assembly. *Trends Cell Biol* **21**, 585–593.
- Alvarez FJ, Benito-Gonzalez A & Siembab VC (2013). Principles of interneuron development learned from Renshaw cells and the motoneuron recurrent inhibitory circuit. *Ann N Y Acad Sci* **1279**, 22–31.
- Bakhti M, Snaidero N, Schneider D, Aggarwal S, Möbius W, Janshoff A, Eckhardt M, Nave KA & Simons M (2013). Loss of electrostatic cell-surface repulsion mediates myelin membrane adhesion and compaction in the central nervous system. *Proc Natl Acad Sci U S A* **110**, 3143–3148.
- Baranes D, Lederfein D, Huang VY, Chen M, Bailey CH & Kandel ER (1998). Tissue plasminogen activator contributes to the late phase of LTP and to synaptic growth in the hippocampal mossy fiber pathway. *Neuron* **21**, 813–825.
- Baumann N & Pham-Dinh D (2001). Biology of oligodendrocyte and myelin in the mammalian central nervous system. *Physiol Rev* **81**, 871–927.
- Boison D & Stoffel W (1994). Disruption of the compacted myelin sheath of axons of the central nervous system in proteolipid protein-deficient mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* **91**, 11709–11713.
- Carmeliet P, Schoonjans L, Kieckens L, Ream B, Degen J, Bronson R, De Vos R, Van Den Oord JJ, Collen D & Mulligan RC (1994). Physiological consequences of loss of plasminogen activator gene function in mice. *Nature* **368**, 419–424.
- Cassé F, Bardou I, Danglot L, Briens A, Montagne A, Parcq J, Alahari A, Galli T, Vivien D & Docagne F (2012). Glutamate controls tPA recycling by astrocytes, which in turn influences glutamatergic signals. *J Neurosci* **32**, 5186–5199.
- Chevilly A, Lesept F, Lenoir S, Ali C, Parcq J & Vivien D (2015). Impacts of tissue-type plasminogen activator(tPA) on neuronal survival. *Front Cell Neurosci*; DOI: 10.3389/fncel.2015.00415.
- Collen D & Lijnen HR (1991). Basic and clinical aspects of fibrinolysis and thrombolysis. *Blood* **78**, 3114–3124.
- Correa F, Gauberti M, Parcq J, Macrez R, Hommet Y, Obiang P, Hernangómez M, Montagne A, Liot G, Guaza C, Maubert E, Ali C, Vivien D & Docagne F (2011). Tissue plasminogen activator prevents white matter damage following stroke. *J Exp Med* **208**, 1229–1242.
- Docagne F, Parcq J, Lijnen R, Ali C & Vivien D (2015). Understanding the functions of endogenous and exogenous tissue-type plasminogen activator during stroke. *Stroke* **46**, 314–320.
- Emery B & Lu QR (2015). Transcriptional and epigenetic regulation of oligodendrocyte development and myelination in the central nervous system. *Cold Spring Harb Perspect Biol*; DOI: 10.1101/cshperspect.a020461.
- Fancy SPJ, Chan JR, Baranzini SE, Franklin RJM & Rowitch DH (2011). Myelin Regeneration: A Recapitulation of Development? *Annu Rev Neurosci* **34**, 21–43.
- Feather-Schussler DN & Ferguson TS (2016). A battery of motor tests in a neonatal mouse

- model of cerebral palsy. *J Vis Exp* **2016**, 53569.
- Fernández-Monreal M, López-Atalaya JP, Benchenane K, Léveillé F, Cacquevel M, Plawinski L, MacKenzie ET, Bu G, Buisson A & Vivien D (2004). Is tissue-type plasminogen activator a neuromodulator? *Mol Cell Neurosci* **25**, 594–601.
- Griffiths I, Klugmann M, Anderson T, Yool D, Thomson C, Schwab MH, Schneider A, Zimmermann F, McCulloch M, Nadon N & Nave KA (1998). Axonal swellings and degeneration in mice lacking the major proteolipid of myelin. *Science (80-)* **280**, 1610–1613.
- Hébert M, Lesept F, Vivien D & Macrez R (2016). The story of an exceptional serine protease, tissue-type plasminogen activator (tPA). *Rev Neurol (Paris)* **172**, 186–197.
- Heyser CJ (2003). Assessment of Developmental Milestones in Rodents. *Curr Protoc Neurosci*; DOI: 10.1002/0471142301.ns0818s25.
- Inoue K (2005). PLP1-related inherited dysmyelinating disorders: Pelizaeus-Merzbacher disease and spastic paraplegia type 2. *Neurogenetics* **6**, 1–16.
- Inoue K (2017). Cellular Pathology of Pelizaeus-Merzbacher Disease Involving Chaperones Associated with Endoplasmic Reticulum Stress. *Front Mol Biosci* **4**, 7.
- Inoue K (2019). Pelizaeus-Merzbacher Disease: Molecular and Cellular Pathologies and Associated Phenotypes. In *Advances in Experimental Medicine and Biology*, pp. 201–216. Springer.
- Klugmann M, Schwab MH, Pühlhofer A, Schneider A, Zimmermann F, Griffiths IR & Nave KA (1997). Assembly of CNS myelin in the absence of proteolipid protein. *Neuron* **18**, 59–70.
- Laukka JJ, Makki MI, Lafleur T, Stanley J, Kamholz J & Garbern JY (2014). Diffusion tensor imaging of patients with proteolipid protein 1 gene mutations. *J Neurosci Res* **92**, 1723–1732.
- Lemarchant S, Pruvost M, Hébert M, Gauberti M, Hommet Y, Briens A, Maubert E, Gueye Y, Féron F, Petite D, Mersel M, Do Rego JC, Vaudry H, Koistinaho J, Ali C, Agin V, Emery E & Vivien D (2014). tPA promotes ADAMTS-4-induced CSPG degradation, thereby enhancing neuroplasticity following spinal cord injury. *Neurobiol Dis* **66**, 28–42.
- Leonetti C, Macrez R, Pruvost M, Hommet Y, Bronsard J, Fournier A, Perrigault M, Machin I, Vivien D, Clemente D, De Castro F, Maubert E & Docagne F (2017). Tissue-type plasminogen activator exerts {EGF}-like chemokinetic effects on oligodendrocytes in white matter (re)myelination. *Mol Neurodegener*; 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 KU, Hommet Y, Maubert E, Ali C, Groc L & Vivien D (2016). Tissue-type plasminogen activator controls neuronal death by raising surface dynamics of extrasynaptic NMDA receptors. *Cell Death Dis* **7**, e2466–e2466.
- Lin W & Popko B (2009). Endoplasmic reticulum stress in disorders of myelinating cells. *Nat Neurosci* **12**, 379–385.
- Louessard M, Bardou I, Lemarchand E, Thiebaut AM, Parcq J, Leprince J, Terrisse A, Carraro V, Fafournoux P, Bruhat A, Orset C, Vivien D, Ali C & Roussel BD (2017). Activation of cell surface GRP78 decreases endoplasmic reticulum stress and neuronal death. *Cell Death Differ* **24**, 1518–1529.

- Louessard M, Lacroix A, Martineau M, Mondielli G, Montagne A, Lesept F, Lambomez B, Cauli B, Mothet JP, Vivien D & Maubert E (2016). Tissue Plasminogen Activator Expression Is Restricted to Subsets of Excitatory Pyramidal Glutamatergic Neurons. *Mol Neurobiol* **53**, 5000–5012.
- Lundgaard I, Luzhynskaya A, Stockley JH, Wang Z, Evans KA, Swire M, Volbracht K, Gautier HOB, Franklin RJM, French-Constant C, Attwell D & Káradóttir RT (2013). Neuregulin and BDNF Induce a Switch to NMDA Receptor-Dependent Myelination by Oligodendrocytes. *PLoS Biol*; DOI: 10.1371/journal.pbio.1001743.
- Madden DJ, Bennett IJ, Burzynska A, Potter GG, Chen N kwei & Song AW (2012). Diffusion tensor imaging of cerebral white matter integrity in cognitive aging. *Biochim Biophys Acta - Mol Basis Dis* **1822**, 386–400.
- Marques S et al. (2016). Oligodendrocyte heterogeneity in the mouse juvenile and adult central nervous system. *Science* **352**, 1326–1329.
- Matthews MA & Duncan D (1971). A quantitative study of morphological changes accompanying the initiation and progress of myelin production in the dorsal funiculus of the rat spinal cord. *J Comp Neurol* **142**, 1–22.
- Nicole O, Docagne F, Ali C, Margaille I, Carmeliet P, Mackenzie ET, Vivien D & Buisson A (2001). The proteolytic activity of tissue-plasminogen activator enhances NMDA receptor-mediated signaling. *Nat Med*; DOI: 10.1038/83358.
- Obiang P, Maubert E, Bardou I, Nicole O, Launay S, Bezin L, Vivien D & Agin V (2011). Enriched housing reverses age-associated impairment of cognitive functions and tPA-dependent maturation of BDNF. *Neurobiol Learn Mem* **96**, 121–129.
- Pasquet N, Douceau S, Naveau M, Lesept F, Louessard M, Lebouvier L, Hommet Y, Vivien D & Bardou I (2019). Tissue-Type Plasminogen Activator Controlled Corticogenesis Through a Mechanism Dependent of NMDA Receptors Expressed on Radial Glial Cells. *Cereb Cortex* **29**, 2482–2498.
- Qian Z, Gilbert ME, Colicos MA, Kandel ER & Kuhl D (1993). Tissue-plasminogen activator is induced as an immediate-early gene during seizure, kindling and long-term potentiation. *Nature* **361**, 453–457.
- Samson AL & Medcalf RL (2006). Tissue-Type Plasminogen Activator: A Multifaceted Modulator of Neurotransmission and Synaptic Plasticity. *Neuron* **50**, 673–678.
- Sarret C, Lemaire J-J, Sontheimer A, Coste J, Savy N, Pereira B, Roche B, Boespflug-Tanguy O & Brain al (2018). Brain Diffusion Imaging and Tractography to Distinguish Clinical Severity of Human PLP1-Related Disorders. *Dev Neurosci Karger*; DOI: 10.1159/000492218i.
- Seeds NW, Basham ME & Haffke SP (1999). Neuronal migration is retarded in mice lacking the tissue plasminogen activator gene. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**, 14118–14123.
- Snaidero N & Simons M (2014). Myelination at a glance. *J Cell Sci* **127**, 2999–3004.
- Snaidero N & Simons M (2017). The logistics of myelin biogenesis in the central nervous system. *Glia* **65**, 1021–1031.
- Tsirka SE, Rogove AD, Bugge TH, Degen JL & Strickland S (1997). An extracellular proteolytic cascade promotes neuronal degeneration in the mouse hippocampus. *J Neurosci* **17**,

543–552.

Tsuji S (2007). Leukodystrophies. In *Neurobiology of Disease*, pp. 43–49. Elsevier Inc.

Yool D, Klugmann M, Barrie JA, McCulloch MC, Nave K-A & Griffiths IR (2002). Observations on the structure of myelin lacking the major proteolipid protein. *Neuropathol Appl Neurobiol* **28**, 75–78.

Discussion

1 Synthèse des résultats

Au cours de ce travail de thèse, nous avons tout d'abord étudié la cinétique d'expression du tPA i) au cours de développement de la moelle épinière et, ii) dans la lignée oligodendrocytaire. Nous avons ainsi pu associer l'expression de tPA aux oligodendrocytes myélinisants et montrer que son expression était corrélée avec la mise en place de la myélinisation. Nous avons, par la suite, étudié l'implication du tPA dans les dernières étapes de la myélinisation (*i.e.* la différenciation des oligodendrocytes, l'enroulement et la compaction de la gaine de myéline). Dans notre modèle de souris déficientes en tPA (tPA^{-/-}), nous avons observé aux stades tardifs du développement embryonnaire (E17-E19), un retard de différenciation des OPCs/pré-oligodendrocytes vers un phénotype myélinisant. Nous avons également observé, au stade post-natal P15, un défaut de compaction de la gaine de myéline résultant d'une mauvaise apposition des lamelles externes. En utilisant une deuxième lignée de souris déficientes pour le tPA (tPA^{Null}), nous avons confirmé ce défaut de compaction. Cependant, les deux lignées présentent un profil dysmyélinique plus ou moins sévère, suggérant des conséquences fonctionnelles. Ainsi, ces études ont montré un retard dans la mise en place de la marche accompagné d'un trouble de la démarche sans défaut d'activité locomotrice chez les souris tPA^{-/-}. Aucune anomalies de la microstructure de la moelle épinière détectables à l'IRM, ni de différence de réponse des potentiels évoqués moteurs n'ont été retrouvées.

2 Le tPA et le processus de myélinisation

Le premier objectif de cette thèse a été d'étudier la cinétique d'expression du tPA au cours du développement de la moelle épinière. Celle-ci n'avait été observée que de E13 à P0 (Leonetti et al., 2017). Cependant, son expression à d'autres stades n'ont jamais été décrit chez la souris.

2.1 Le tPA et la spécification oligodendrocytaire

La plaque du plancher est une structure importante, impliquée dans la spécification des cellules souches neurales ventrales. En effet, les cellules de la plaque du plancher sécrètent à ce stade un facteur morphogénique, la Shh. Le gradient de concentration de ce celui-ci est crucial pour définir l'identité phénotypique des progéniteurs neuraux (Briscoe & Small, 2015). Grâce à une étude immunohistochimique, nous avons pu détecter du tPA au sein des cellules de la plaque du plancher au stade E11 (**Figure 42 a**). Afin de s'assurer de la bonne mise en place de la lignée oligodendrocytaire entre les souris sauvages et déficientes en tPA, nous avons

analysé la formation des domaines les plus ventraux du tube neural. L'expression du facteur de transcription Nkx2.2 est uniquement retrouvée dans le domaine p3, qui génère des interneurons de type V3. Les progéniteurs du domaine pMN, sont caractérisés par l'expression du facteur de transcription Olig2 et génèrent les OPCs. L'absence d'une différence significative dans le nombre de cellules Olig2⁺ et Nkx2.2, à E11 et à E13, entre les souris sauvages et déficientes en tPA, suggère que le tPA ne joue pas un rôle majeur dans la mise en place des cellules souches neurales (Figure 42 b-d).

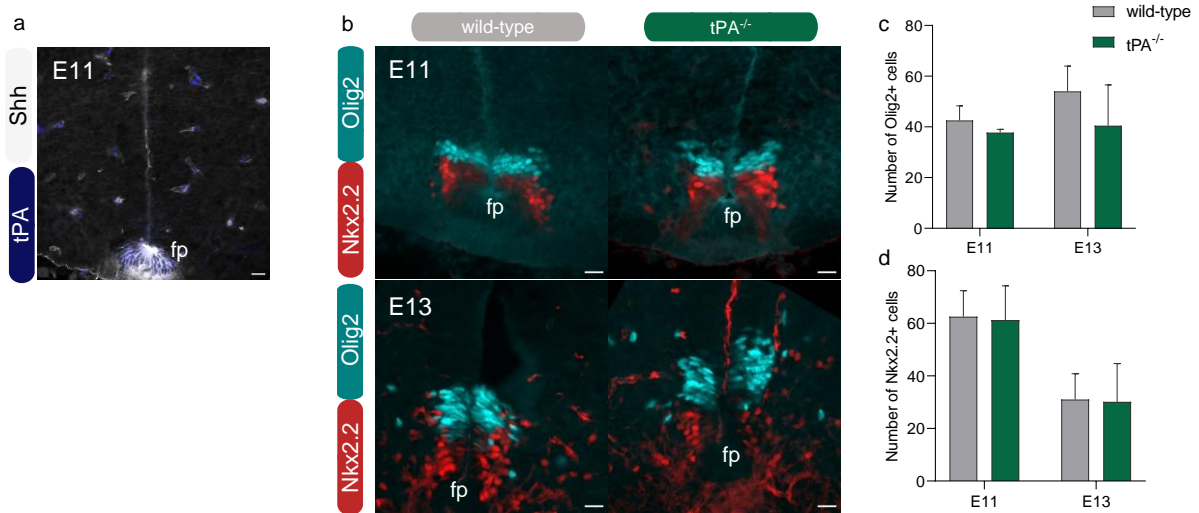


Figure 42 L'expression de tPA est retrouvée très tôt au cours du développement embryonnaire au niveau de la moelle épinière. Photomicrographies représentatives de l'expression de Shh (gris) et de tPA (bleu) au niveau de la plaque du plancher (fp) à E11 (a). Photomicrographies représentatives de l'expression du marqueur Olig2 (cyan) définissant le domaine des progéniteurs des motoneurons (pMN) et du marqueur Nkx2.2 (rouge) définissant le domaine p3 à E11 (panel du haut) et E13 (panel du bas) entre des souris sauvages (wild-type ; gris) et déficientes en tPA (tPA^{-/-}, vert) ; fp : floor plate ou plaque du plancher (b). Barres d'échelles 20 µm. Analyse du nombre de cellules Olig2⁺ à E11 et E13 chez les souris sauvages (gris) et tPA^{-/-} (vert ; c). Analyse du nombre de cellules Nkx2.2⁺ à E11 et E13 chez les souris sauvages (gris) et tPA^{-/-} (vert ; d).

2.2 Expression du tPA dans les oligodendrocytes

L'expression de tPA au sein d'oligodendrocytes fut décrite pour la première fois en 2011 (Correa *et al.*, 2011). Cependant, le sous-type d'oligodendrocyte associé à son expression n'a jamais été étudié. Nous avons donc cherché à déterminer quelle(s) population(s) d'oligodendrocytes exprimaient du tPA. Grâce à une étude immunohistochimique, nous avons pu montrer une expression spécifique du tPA au sein des oligodendrocytes myélinisants/matures (CNP⁺, MBP⁺, PLP⁺ et MOG⁺). Nous avons observé l'apparition de l'expression de tPA par les oligodendrocytes de façon concomitante par rapport à la mise en place de la gaine de myéline dans la moelle épinière en développement chez la souris. La proportion de cellules oligodendrocytaires exprimant du tPA augmente au moment où la

myélinisation s'intensifie, pour atteindre un pic à P15 correspondant à la phase active de la myélinisation. Puis, au stade adulte, seul un faible nombre d'oligodendrocytes tPA⁺ est retrouvé. De ces observations, nous avons fait l'hypothèse d'un rôle du tPA dans les processus de myélinisation.

Peu de sérine protéases ont été décrites dans la lignée des cellules oligodendrocytaires. Nous pouvons référencer parmi elles l'activateur du plasminogène de type urokinase ou uPA (urokinase plasminogen activator). Une étude a montré que les oligodendrocytes du cervelet de rat expriment de façon transitoire cette sérine protéase au cours du développement (Dent *et al.*, 1993). Les oligodendrocytes commencent à exprimer l'uPA entre P10 et P14. Puis, une forte baisse d'expression est observée à P28 et aucun oligodendrocyte immunomarcqué pour l'uPA n'est retrouvé à P56 (Dent *et al.*, 1993). De manière intéressante, cette période correspond à la fin de la myélinisation du cervelet chez le rat (Matthews & Duncan, 1971; KNAPP & SKOFF, 1991). Nous pouvons également souligner, que ce profil présente de forte ressemblance à celui retrouvé dans notre étude.

Une autre sérine protéase exprimée au sein des cellules oligodendrocytaires a été décrite chez la souris. Il s'agit de la kallikréine 6, connue également sous le nom de M/neurosin. Les auteurs rapportent l'expression d'ARNm de la kallikréine 6 dans les oligodendrocytes CNP- et NG2-positifs dans la moelle épinière au stade adulte (Figure 43 ; Terayama *et al.*, 2005).

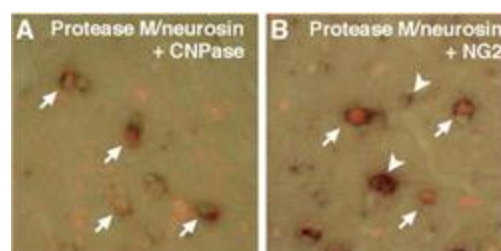


Figure 43 L'expression des ARNm codants pour la M/neurosin est associée aux oligodendrocytes CNP et NG2 positifs. Visualisation de l'expression des ARNm codants pour la M/neurosin (en marron foncé), combinée à l'expression des marqueurs oligodendrocytaires CNP (en rouge, A) et NG2 (en rouge, B) dans la moelle épinière de souris adulte (Terayama *et al.*, 2005).

Notre étude est aujourd'hui, à notre connaissance, la seule à rapporter le rôle d'une sérine protéase dans les processus de myélinisation développementale. Les données de l'étude transcriptomique de Marques et ses collaborateurs en 2016 montrent la prédominance de l'expression du gène *Plat* dans les oligodendrocytes nouvellement formés (NFOLs) et myélinisants (MFOLs) au cours du développement (Figure 44). En comparaison, le gène codant

l'uPA : *Plau*, est retrouvé au sein des NFOLs et MFOLs, mais en faible quantité. Pour ce qui est de *Klk6*, il est majoritairement présent dans les oligodendrocytes matures (MOL1-5 ; [Figure 44](#)).

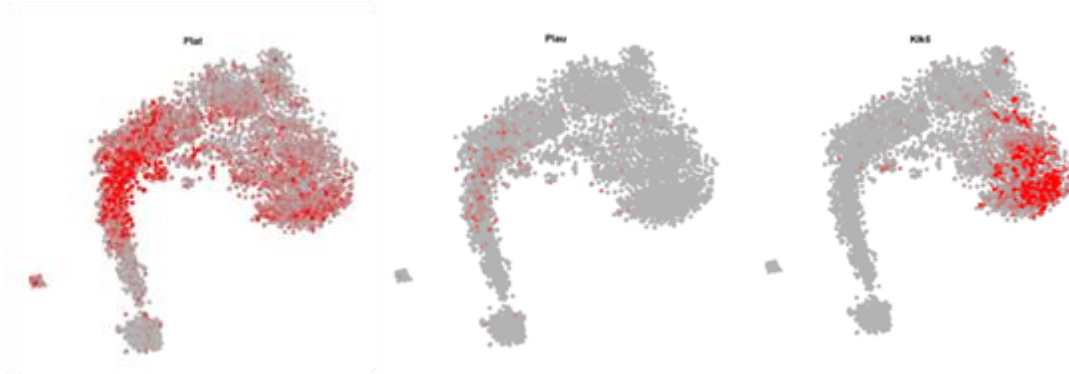


Figure 44 Expression des transcrits de trois sérine protéases au sein de la lignée oligodendrocytaire.

Les gènes *Plaf* (panel de gauche), *Plau* (panel du milieu) et *Klk6* (panel de droite) codant respectivement pour le tPA, l'uPA et la kallikréine 6 sont majoritairement retrouvés dans les oligodendrocytes myélinisants ou matures. <https://linnarsson.com/oligodendrocytes> (Marques et al., 2016).

2.3 tPA, un nouvel acteur de la myélinisation

2.3.1 Différenciation oligodendrocytaire

Notre étude immunohistochimique a permis de mettre en évidence que la différenciation des OPCs/pré-oligodendrocytes vers un stage oligodendrocytes myélinisants était retardée durant le développement embryonnaire chez les souris *tPA*^{-/-}.

Afin d'identifier les effets du tPA sur la différenciation oligodendrocytaire, nous avons réalisé des cultures primaires d'OPCs de rats que nous avons traités avec différentes concentrations de tPA (protocole d'après Leonetti *et al.*, 2017). Partant du principe que la complexité morphologique des cellules est le reflet d'une différenciation vers un stade mature, nous avons basé notre méthode de quantification sur ce critère (Barateiro & Fernandes, 2014). Nous avons ainsi catégorisé les cellules selon 4 classes ([Figure 45](#)).

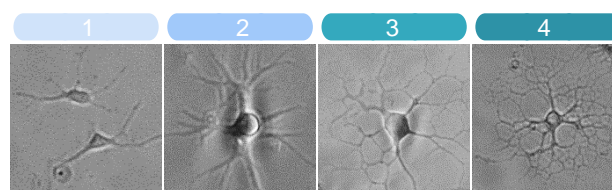


Figure 45 Caractérisations morphologiques des cellules de la lignée oligodendrocytaire *in vitro*.

Photomicrographies en contraste de phase représentatives de chaque catégorie. La catégorie 1 regroupe des cellules bipolaires ou avec peu de prolongements sans ramifications. Dans la catégorie 2, les cellules présentent plusieurs prolongements et des ramifications primaires. La catégorie 3 correspond aux cellules qui possèdent des ramifications secondaires et tertiaires et enfin la catégorie 4 comprend les cellules ayant une ramification très développée et/ou bien la présence d'une jupe de myéline.

Notre étude *in vitro*, n'a montré aucune différence significative concernant les proportions de cellules dans chacune des catégories entre la condition contrôle et les conditions traitées au tPA (1 et 10 μ g/mL ; **Figure 46 a**). De plus, nous avons effectué un immunomarquage anti-MBP afin de visualiser la proportion d'oligodendrocytes myélinisants/matures. Aucune différence significative n'a été retrouvée concernant la proportion de cellules Olig2⁺/MBP⁺ sur le nombre total d'Olig2⁺ (**Figure 46 b**).

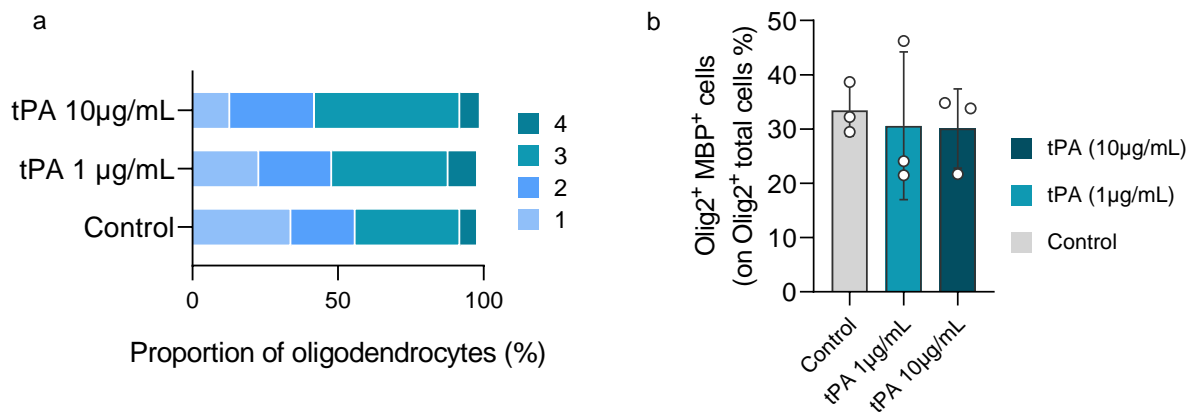


Figure 46 Quantification des oligodendrocytes selon des critères morphologiques ou immunocytochimiques.

Quantification des oligodendrocytes selon leur critère morphologique dans la condition contrôle, traitée au tPA (1 μ g/ml) et tPA (10 μ g/mL), N=3 cultures indépendantes (a). Quantification du nombre de cellules Olig2⁺/MBP⁺ sur le nombre total d'Olig2⁺ dans la condition contrôle (gris), traitée au tPA (1 μ g/mL, bleu clair ou 10 μ g/mL, bleu foncé), N=3 cultures indépendantes, (b).

N'ayant pas pu identifier d'effet du tPA sur la différenciation des oligodendrocytes, nous nous sommes interrogés sur la validité de notre méthode de quantification. Pour s'assurer de sa robustesse, nous avons décidé d'utiliser un facteur connu pour favoriser la différenciation oligodendrocytaire : la triio-L-thyronine (T3). Nous avons ainsi pu mettre en évidence une différenciation des cellules vers un phénotype mature (catégorie 4) dans la condition traitée avec la T3 (**Figure 47**). Cependant, nous n'avons à nouveau pas pu mettre en évidence un effet du tPA sur ce paramètre (**Figure 47**). Plusieurs hypothèses peuvent expliquer ce résultat.

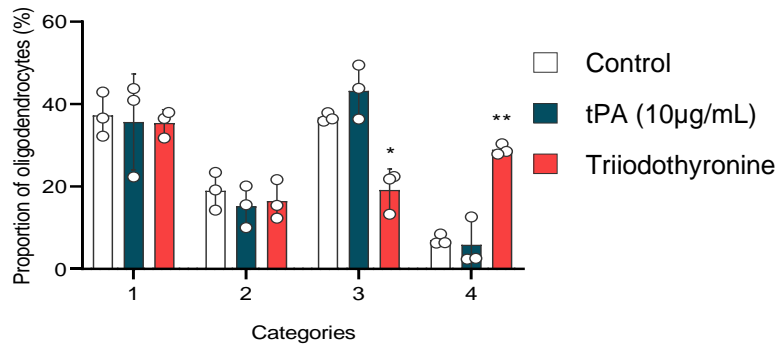


Figure 47 La triiodothyronine favorise la différenciation des oligodendrocytes *in vitro*.

Quantification des oligodendrocytes selon leur critère morphologique dans la condition contrôle (blanc), traitée au tPA (10µg/mL : bleu) et T3 (rouge), N=3 cultures indépendantes.

Dans notre modèle *in vivo*, nous avons mis en évidence que les cellules oligodendrocytaires exprimaient du tPA à un moment concomitant avec la myélinisation, suggérant que le tPA endogène exercerait un effet sur ces cellules. Or dans notre modèle *in vitro*, nous avons réalisé des traitements de tPA. Le tPA exogène pourrait donc ne pas agir sur le processus de différenciation. Deuxièmement, notre étude *in vivo* a été réalisée sur du tissu murin. En revanche, nos études *in vitro*, ont été réalisées sur des cellules issues de rat. La divergence des effets du tPA pourrait aussi s'expliquer sur le fait que les cellules issues d'espèces différentes ne répondent pas de la même manière à ce facteur, malgré leur phylogénie proche. Chez la souris, nous retrouvons l'expression de tPA au sein de ces cellules dès le stade P0. En revanche, nous ne retrouvons pas d'oligodendrocytes exprimant du tPA chez le raton à P0, alors qu'il est retrouvé au sein des cellules endothéliales et dans les cellules bordant le canal épendymaire (Figure 48 a-b). La cinétique d'expression du tPA est donc différente entre ces deux espèces et pourrait expliquer nos résultats.

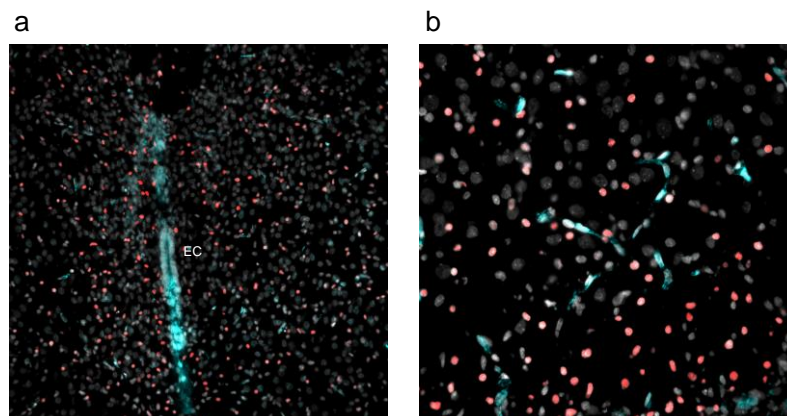


Figure 48 L'expression de tPA n'est pas associée aux oligodendrocytes à P0 chez le raton.

Photomicrographies représentatives montrant l'expression de tPA (cyan) dans les cellules bordant le canal épendymaire (EC; a) et dans les vaisseaux sanguins (b). Aucune cellule Olig2⁺ (rouge) n'est associée au marquage tPA, DAPI (blanc).

Des expériences *in vitro* d'OPCs murines pourraient nous permettre de répondre à cette question. Nous pourrions tout d'abord envisager de reproduire les expériences précédentes avec les souris tPA-WT et tPA^{-/-} et de comparer la différenciation oligodendrocytaire chez ces deux souches grâce aux caractéristiques morphologiques et immunocytochimiques. Afin d'évaluer s'il s'agit d'un effet strictement autocrine et de s'affranchir de l'influence de l'environnement dans lequel les cellules ont évolué avant isolation, nous pourrions utiliser un système qui permet de cibler spécifiquement les oligodendrocytes. Ainsi, nous pourrions par exemple utiliser la lignée tPA^{fl/fl}, isoler les oligodendrocytes et induire *in vitro* la délétion du tPA avec des vecteurs adénoviraux exprimant la Cre-recombinase.

Enfin, nous nous sommes demandés si notre modèle de culture était le plus approprié pour répondre à notre question. Bien que les cellules acquièrent une morphologie complexe dans ce modèle et développent une jupe de myéline, ces dernières sont dans l'incapacité d'enrouler leur prolongement et d'entamer les derniers processus de différenciation. Il faudrait alors envisager d'utiliser un modèle de culture dit myélinisante, comme la co-culture neurones/OPCs ou bien encore des nanofibres, afin de permettre aux cellules d'enrouler leurs prolongements et de former une gaine de myéline. Nous avons mis au point le protocole de culture myélinisantes sur nanofibres et quantifié le processus de différenciation. Nous avons pu distinguer trois profils différents : cellules avec de nombreuses ramifications/jupe de myéline mais n'ayant pas commencé le processus d'enroulement ([Figure 49 a](#)) ; cellules ayant entamer le processus d'enroulement et présence de ponctuations de marquage MBP ([Figure 49 b](#)) ; cellules ayant fini le processus d'enroulement et présence de marquage de MBP le long des prolongements ([Figure 49 c](#)).

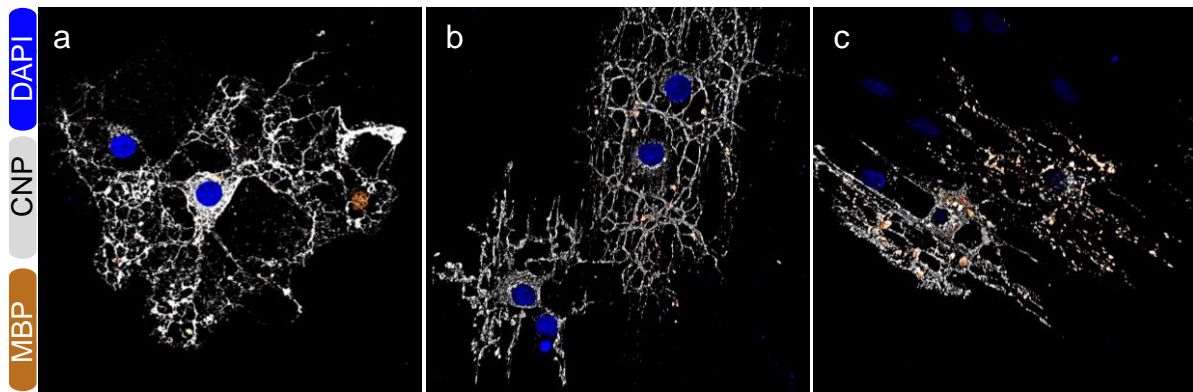


Figure 49 Profil de différenciation des oligodendrocytes dans un modèle *in vitro* en présence de nanofibres.

Photographies représentatives des différentes catégories d'oligodendrocytes pouvant être retrouvées dans une culture « myélinisante » en présence de nanofibres. Les cellules (en bleu, DAPI) exprimant fortement le marqueur CNP (en gris) et faiblement MBP (marron), présentent une forte ramification mais n'entament pas le processus d'enroulement (a). La présence de ponctuas de MBP sont retrouvés le long des prolongements enroulés autour des nanofibres (b). Une fois le processus d'enroulement achevé, les cellules expriment plus fortement MBP (c).

Le retard de différenciation observé *in vivo* chez les souris déficientes en tPA, pourrait également s'expliquer par le retard de migration observé dans cette souche. En effet, dans son étude de 2017, Leonetti et ses collaborateurs ont montré que la migration des OPCs depuis le domaine pMN vers la corne ventrale était retardé. Ainsi, les cellules atteignent leur position finale plus tardivement et entamerait leur différenciation vers des stades plus matures plus tardivement.

2.3.2 Profil de myélinisation des souris déficientes en tPA

Nous avons choisi d'étudier l'ultrastructure de la gaine de myéline au stade P15. C'est à cet âge que nous retrouvons la plus grande proportion d'oligodendrocytes exprimant du tPA (**Figure 50**). Étant donné que la phase active de la myélinisation s'opère à cette étape du développement, l'analyse s'est portée sur le tractus corticospinal (CST) qui devient myélinisé à ce stade chez les rongeurs (**Figure 50** ; Matthews & Duncan, 1971).

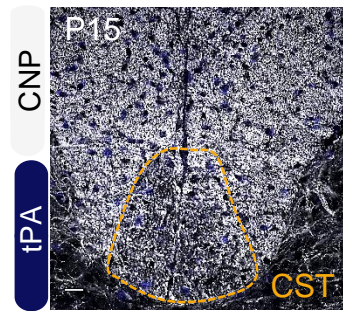


Figure 50 Photomicrographies représentatives du cordon dorsal de la moelle épinière à P15.

Photomicrographies représentatives du cordon dorsal de la moelle épinière à P15, montrant l'expression de tPA (bleu) associée au marqueur CNP (gris). Le tractus corticospinal (CST ; pointillé jaune) présente un marquage moins intense que les autres régions du cordon dorsal, reflétant une myélinisation plus tardive.

Nous avons pu mettre en évidence un profil de myélinisation du CST différent entre les souris sauvages et les souris $tPA^{-/-}$. Chez les souris déficientes en tPA, les axones myélinisés présentent une compaction de la myéline altérée. Les défauts de compaction des lamelles de myéline peuvent résulter d'un défaut de formation i) de la ligne dense majeure ou ii) de la double ligne intrapériodique. Grâce à l'observation à fort grossissement, nous avons pu constater que la double ligne intrapériodique était malformée, voire absente en certains endroits chez les souris $tPA^{-/-}$. La stabilisation de l'IDL est assurée par la protéine PLP, qui joue un rôle de « zip ». Ainsi, dans des modèles de souris déficientes en PLP, la formation de l'IDL se trouve également altérée (Figure 51; Yool *et al.*, 2002).

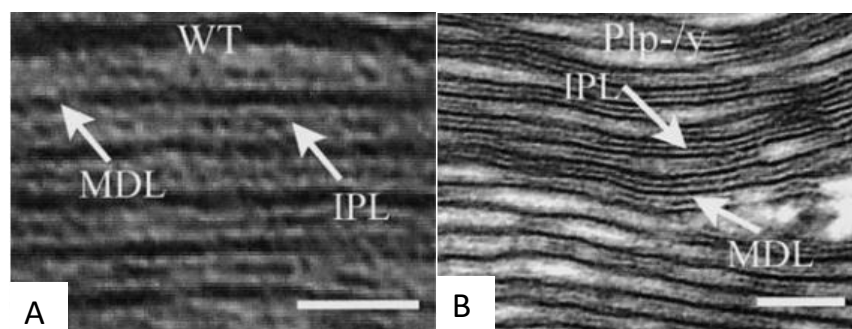


Figure 51 La ligne intrapériodique est altérée chez le souris déficientes en PLP.

Photomicrographies électroniques montrant la présence régulière de MDL et IPL chez les souris sauvages (WT ; A). Photomicrographies électroniques montrant la présence de lignes denses majeures (MDL) et la présence intermittente de la ligne intrapériodique (IPL) chez les souris déficientes PLP ($Plp^{-/-}$). Lorsque l'IPL est absente, les lamelles de myéline sont moins compactées (B). Barre d'échelle : 0.05 μm ; Yool *et al.*, 2002.

De nombreuses mutations non ciblées dans la lignée de souris déficientes $tPA^{-/-}$ ont été rapportées (Szabo *et al.*, 2016). Afin de s'assurer que les défauts de compaction soient bien la

résultante de l'absence d'expression de tPA et non la conséquence d'une altération d'un autre gène, nous avons décidé de confirmer ces résultats dans une deuxième lignée de souris déficientes en tPA : tPA^{Null}. Nous avons pu observer également un profil dysmyélinique dans cette lignée, cependant ce dernier est plus discret. Et de la même façon, nous retrouvons un défaut au niveau de l'IPL. Ainsi, étant donné que deux lignées de souris déficientes en tPA présentent des profils dysmyéliniques différents, nous pensons que ces souches pourraient être un bon modèle pour étudier les pathologies dysmyélinisantes.

Nous nous sommes ensuite interrogés sur l'éventuelle présence d'autres anomalies ultrastructurelles dans ces souches. Pour cela, nous avons commencé à étudier les nœuds de Ranvier. Nos premières observations et nos résultats préliminaires tendent à montrer que la longueur des nœuds de Ranvier dans les nerfs optiques est plus grande chez nos souris tPA^{-/-}. Il en est de même chez les souris tPA^{Null}, la longueur des nœuds s'avèrent en moyenne plus grande. Par la suite, après avoir complété cette étude, nous aimerions étudier la répartition des canaux Na_v au niveau des nœuds de Ranvier, et plus particulièrement la proportion des canaux Na_v1.2 (associés aux nœuds immatures) et des canaux Na_v1.6 (associés aux nœuds matures), entre nos différentes souches.

Comment l'absence de tPA peut-elle modifier la compaction de la myéline ?

Comme nous avons pu le voir dans l'introduction, le tPA est doté de 5 domaines lui permettant d'interagir avec de nombreux récepteurs. Des données du laboratoire ont mis en évidence que la propriété pro-migratoire du tPA sur les OPCs est associée à l'activation des récepteurs à l'EGF (Leonetti *et al.*, 2017). Cependant, d'après l'étude transcriptomique menée par Marques et collaborateurs, les récepteurs EGFR ne sont pas présents sur les oligodendrocytes myélinisants ; nous n'avons également pas retrouvé d'immunomarquage EGFR sur les oligodendrocytes exprimant du tPA (Figure 52 ; Marques *et al.*, 2016). Le domaine Finger du tPA est notamment connu pour son interaction avec les récepteurs LRP, cependant ces récepteurs se trouvent enrichis dans les OPCs et non dans les NFOLS et MFOLS ; nous n'avons également pas retrouvé de LRP au niveau des oligodendrocytes tPA⁺ (Figure 52 ; Marques *et al.*, 2016).

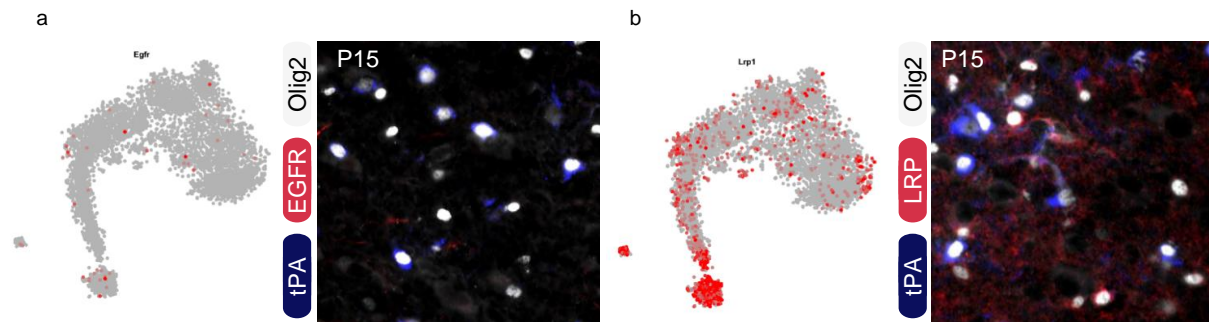


Figure 52 Expression des transcrits et immunomarquages d'EGFR et LRP.

Représentation de l'expression du gène *Egfr* (panel de gauche) et photographies représentatives (panel de droite) de l'expression d'EGFR (rouge), du tPA (bleu) dans les oligodendrocytes (gris, Olig2 ; a). Représentation de l'expression du gène *Lrp1* (panel de gauche) et photographies représentatives (panel de droite) de l'expression de LRP1 (rouge), du tPA (bleu) dans les oligodendrocytes (gris, Olig2 ; b). <https://linnarsson.com/oligodendrocytes> (Marques *et al.*, 2016).

Dans de nombreux modèles de pathologies dysmyélinisantes, un défaut de formation de l'IPL est rapporté (Thomson *et al.*, 1999; Yool *et al.*, 2002). Ceci serait dû un défaut d'adressage de la protéine PLP à la membrane plasmique, à une accumulation de cette protéine dans le réticulum endoplasmique (RE) résultant à une absence d'intégration membranaire de cette protéine. Les oligodendrocytes doivent synthétiser une forte quantité de protéines de myéline *via* le RE, ce qui rend ces cellules hautement sensibles aux perturbations du RE. Il est bien documenté que cette sensibilité accrue contribue à la pathogenèse de diverses pathologies dysmyéliniques (Inoue, 2017). Le maintien de la protéostase dans le RE est essentiel pour réguler la production des protéines mal repliées de la myéline et le maintien des fonctions des oligodendrocytes (Lin & Popko, 2009; Clayton & Popko, 2016; Volpi *et al.*, 2017). Ainsi, il n'est pas surprenant qu'une suractivation du stress du RE soit retrouvée dans plusieurs pathologies de la myéline (Inoue, 2017). Le tPA pourrait jouer un rôle non pas dans la production stricte de la myéline, mais plutôt dans l'agencement ou le trafic de la PLP au sein de la membrane. Nous pouvons aussi imaginer que le tPA pourrait moduler la réponse du stress du RE. Des travaux au laboratoire ont montré que le tPA pouvait prévenir la suractivation du stress du RE dans un modèle de mort neuronale induite par OGD et protégerait ainsi les cellules d'une mort neuronale (Louessard *et al.*, 2017). Nous pourrions donc imaginer dans notre étude que le tPA peut moduler la réponse du RE des oligodendrocytes pour aboutir à une myélinisation correcte du SNC. Nous pourrions étudier si l'absence de tPA au sein des oligodendrocytes chez nos souris $tPA^{-/-}$ et tPA^{Null} , présentent une dérégulation du stress du RE menant à une mauvaise régulation de la production, ou d'intégration de la PLP au sein de la membrane plasmique et provoquerait ainsi une mauvaise formation de l'IPL.

Cependant, dans certains modèles de souris déficientes en PLP, l'IDL ne présente que des défauts subtils (Klugmann, 1997). En 2013, Bahkti et collaborateurs, propose que la propriété d'adhésion de la myéline pourrait ne pas nécessiter de forces de verrouillage spécifiques par les molécules d'adhésion, mais qu'elle pourrait dépendre de faibles forces non spécifiques de la bicouche lipidique (Bahkti *et al.*, 2013). L'interaction des membranes plasmiques sur de longues distances est empêchée par un certain nombre de forces répulsives telles que les répulsions stérique et électrostatique générées par les polymères volumineux et chargés du glycocalyx. Le glycocalyx, qui recouvre la surface de la plupart des cellules de mammifères, peut contrecarrer l'adhésion par répulsions stérique et électrostatique de ces grands polymères oligosaccharidiques chargés négativement (Figure 53, Bahkti *et al.*, 2013).

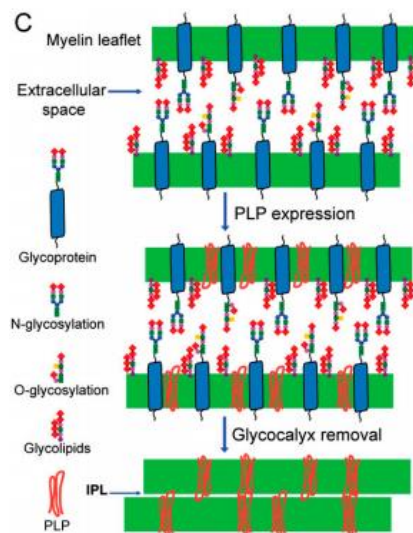


Figure 53 Modèle hypothétique montrant comment l'élimination du glycocalyx démasque l'adhésivité de la PLP. (Bahkti *et al.*, 2013).

De plus, le glycocalyx est composé de protéoglycanes à chondroïtines sulfates (CSPGs). Au sein du laboratoire, il a été montré dans un modèle de trauma médullaire que la dégradation du cœur protéique des CSPGs pouvait être dégradé par le tPA (Lemarchant *et al.*, 2014). Ils ont pu mettre en évidence que le tPA, indépendamment de l'activation du plasminogène, dégrade les CSPGs (sans l'intervention de la chondroïtinase ABC) *via* l'activation de l'ADAMTS-4 (Lemarchant *et al.*, 2014). Cette dernière est une protéase connue pour son interaction avec les chaînes glycosylées des CSPGs et induire leur dégradation. De plus, une deuxième étude du laboratoire a pu identifier ADAMTS-4 comme un marqueur spécifique des oligodendrocytes myélinisants et un nouvel acteur de la myélinisation (Pruvost *et al.*, 2017). Nous pourrions donc vérifier si les oligodendrocytes myélinisants co-expriment le tPA et ADAMTS-4. Et envisager que

ces deux protéines agissent ensemble à la dégradation du glycocalyx, pouvant ainsi permettre le rapprochement et l'apposition des feuillettes externes de la myéline.

Nous avons voulu étudier la quantité de protéines de myéline dans la moelle épinière de souris sauvages et déficientes en tPA, au cours du développement (P3 à P21). L'étude n'a révélé aucune différence du niveau d'expression des protéines CNP et MBP. Des western-blots ciblant la PLP ont également été réalisés. Cependant, l'anticorps utilisé ne s'est pas révélé être adéquat pour identifier la présence de cette protéine dans les tissus. En plus de réaliser des western-blots en utilisant un anticorps anti-PLP différent, nous pourrions réaliser de la microscopie corrélative afin de visualiser la présence de la PLP au sein de l'IPL.

Afin de déceler si l'expression du tPA par les oligodendrocytes myélinisants a un effet autocrine, nous sommes actuellement en train de générer une nouvelle lignée de souris tPA^{fl/fl}:CNP-Cre, permettant ainsi de supprimer spécifiquement le tPA dans les oligodendrocytes myélinisants. Avec cette nouvelle lignée, nous pourrions répliquer nos expériences et étudier i) si la différenciation des cellules est impactée, ii) si la formation de la gaine de myéline se trouve altérée. De plus, nous avons également prévu de réaliser une étude transcriptomique, de *single-cell* RNASeq (scRNA) chez nos souris sauvages et tPA^{-/-}, afin de d'identifier le(s) mécanisme(s) et la/les voie(s) où le tPA pourrait être impliqué.

3 tPA et répercussions fonctionnelles

Nous avons pu montrer que la mise en place de la marche était retardée chez les souriceaux tPA^{-/-}. Par la suite, nous avons pu observer un élargissement de l'angle des pattes arrières dans la démarche des souris tPA^{-/-}. Cependant, aucun déficit locomoteur n'a été révélé avec le test de l'open field. Au contraire, les souris présentent une activité locomotrice plus accrue à P30 que les souris sauvages. Dans une récente étude, des résultats similaires ont été observés. En effet, à P15, les souris tPA^{-/-} parcourent une distance plus longue ([Figure 54](#) ; Léger *et al.*, 2020).

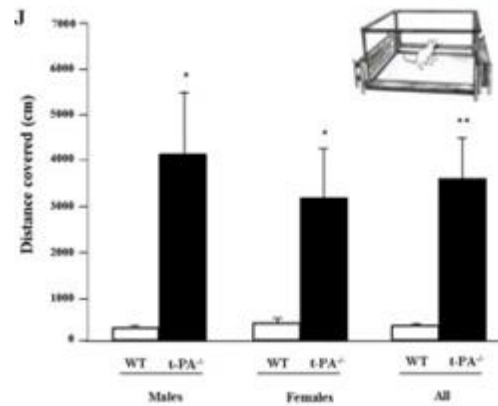


Figure 54 Les souris déficientes en tPA présentent une activité locomotrice accrue à P15.

Quantification de l'activité locomotrice chez les souris sauvages et tPA^{-/-} à P15. *p<0.5 et **p<0.01 (J ; Léger *et al.*, 2020).

La mesure des potentiels évoqués moteurs, nous a permis de suivre de façon longitudinale les animaux. Les résultats de cette étude n'ont montré aucune différence dans la conduction nerveuse entre les deux souches bien qu'un défaut de myélinisation du CST soit observé. La latence des PEM recueillis chez les souris tPA^{-/-} n'étant pas modifiée, cela renforce nos observations sur l'absence d'atteintes locomotrices dans cette souche. D'une part, nous pouvons également émettre l'hypothèse de l'existence d'un défaut dans la mise en place des circuits inhibiteurs spinaux chez les souris tPA^{-/-}. Léger et ses collaborateurs ont montré au niveau cortical, que la migration des neurones inhibiteurs GABAergique était retardée chez les souris tPA^{-/-} (Léger *et al.*, 2020). Nous pourrions donc imaginer que la mise en place de ces réseaux soit altérés également dans la moelle épinière. Une étude a évalué la modulation de la conduction nerveuse par le GABA dans la moelle épinière chez le rat entre P10 et P17 (Sakatani *et al.*, 1991). Les mesures des potentiels d'action composés (*compound action potential* ou CAP) ont été réalisés sur des segments isolés du cordon dorsal. Ils ont pu montrer, qu'à forte concentration, le GABA augmente la latence ; et inversement, à faible concentration, il la décroît (Sakatani *et al.*, 1991). Nous pouvons retenir de cette expérience, que le GABA permet de ralentir la vitesse de conduction. Bien que les souris tPA^{-/-} présentent un profil dysmyélinique nous pouvons imaginer alors que la conduction nerveuse ne se trouve pas modifiée de par l'absence de signaux inhibiteurs.

D'autre part, nous pourrions envisager que les troubles de la marche pourraient être due à une atteinte des voies sensibles. En effet, bien que le tractus corticospinal soit connu pour être la voie descendante majeure contrôlant la motricité, nous savons également qu'elle participe aux voies sensibles (Lemon, 2008). Par conséquent, il serait intéressant de mesurer les

potentiels évoqués somesthésiques (PES) afin de s'assurer de l'intégrité de ces voies dans nos deux souches et de réaliser des tests mesurant la sensibilité des souris tPA^{-/-}, comme par exemple avec le test de retrait de l'adhésif.

4 Expression transitoire du tPA

Nous avons vu que l'expression du tPA au sein des cellules oligodendrocytaires était transitoire. Ce n'est qu'au moment de la phase active de la myélinisation qu'une forte proportion d'oligodendrocytes myélinisants expriment du tPA. En revanche, chez l'adulte, seule une petite proportion d'oligodendrocytes tPA⁺ est retrouvée, pouvant suggérer que le tPA est nécessaire au moment de la mise en place de la gaine de myéline, mais qu'il n'interviendrait pas dans son maintien.

Ces données sont en accord avec des précédents travaux du laboratoire. En effet, suite à une injection de LPC dans le corps calleux, les OPCs sont recrutés pour remyéliniser la zone de lésion. Ces travaux ont montré que le pourcentage d'oligodendrocytes tPA⁺ augmente jusqu'à 14 jours post-injection puis leur proportion chute à J21 (Figure 55 ; travaux thèse Camille Leonetti). De manière intéressante, cette fenêtre de temps correspond à la période de remyélinisation (Nait-Oumesmar *et al.*, 1995). Ceci suggère que le tPA joue un rôle important dans les processus de (re)myélinisation.

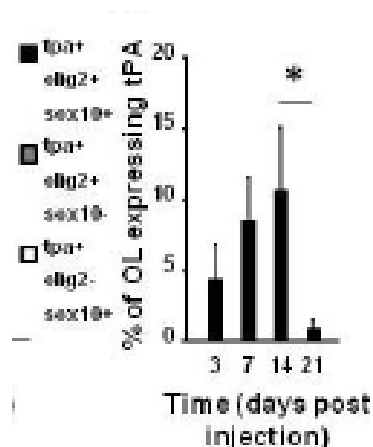


Figure 55 Expression de tPA par les oligodendrocytes après dommage de la substance blanche.

Quantification du pourcentage d'oligodendrocytes exprimant du tPA dans le corps calleux de souris sauvages à 3,7,14 et 21 jours post-injection de lysolécithine. *p<0.05, test Mann-Whitney (travaux de thèse de Camille Leonetti).

Au cours de la vie adulte, l'intégration de nouvelles tâches d'apprentissages nécessitent un remodelage continu et l'ajout de nouveaux internœuds (Sampaio-Baptista & Johansen-Berg, 2017 ; Hill et al., 2018). Il serait intéressant d'étudier si au cours de ce processus de myélinisation adaptative, les oligodendrocytes expriment de nouveau du tPA. Afin d'étudier cela, nous pourrions quantifier la proportion d'oligodendrocytes exprimant du tPA chez des souris confrontées à une nouvelle tâche (*i.e.* running wheel) ou à un environnement enrichi permettant de stimuler les activités cognitive, sensorimotrice et sociale, et ainsi étudier si celui-ci participe à la plasticité structurelle de la myéline.

Références bibliographiques

A

- Aggarwal S, Yurlova L & Simons M (2011). Central nervous system myelin: structure, synthesis and assembly. *Trends Cell Biol* **21**, 585–593.
- Akenami FOT, Sirén V, Koskiniemi M, Siimes MA, Teräväinen H & Vaheri A (1996). Cerebrospinal fluid activity of tissue plasminogen activator in patients with neurological diseases. *J Clin Pathol* **49**, 577–580.
- Andral G (1844). Pathological Hæmatology. An Essay on the Blood in Disease. *Am J Med Sci* **8**, 197.
- Armstrong RC, Dorn HH, Kufta C V., Friedman E & Dubois-Dalcq ME (1992). Pre-oligodendrocytes from adult human CNS. *J Neurosci* **12**, 1538–1547.
- Astrup T & Permin PM (1947). Fibrinolysis in the animal organism [16]. *Nature* **159**, 681–682.
- Astrup T & Stage A (1952). Isolation of a soluble fibrinolytic activator from animal tissue. *Nature* **170**, 929.

B

- Bakhti M, Snaidero N, Schneider D, Aggarwal S, Möbius W, Janshoff A, Eckhardt M, Nave KA & Simons M (2013). Loss of electrostatic cell-surface repulsion mediates myelin membrane adhesion and compaction in the central nervous system. *Proc Natl Acad Sci U S A* **110**, 3143–3148.
- Barateiro A & Fernandes A (2014). Temporal oligodendrocyte lineage progression: In vitro models of proliferation, differentiation and myelination. *Biochim Biophys Acta - Mol Cell Res* **1843**, 1917–1929.
- Baron W, Shattil SJ & French-Constant C (2002). The oligodendrocyte precursor mitogen PDGF stimulates proliferation by activation of alpha(v)beta3 integrins. *EMBO J* **21**, 1957–1966.
- Barres BA, Hart IK, Coles HSR, Burne JF, Voyvodic JT, Richardson WD & Raff MC (1992). Cell death and control of cell survival in the oligodendrocyte lineage. *Cell* **70**, 31–46.
- Barres BA & Raff MC (1993). Proliferation of oligodendrocyte precursor cells depends on electrical activity in axons. *Nature* **361**, 258–260.
- Barres BA & Raff MC (1999). Axonal control of oligodendrocyte development. *J Cell Biol* **147**, 1123–1128.
- Barres BA, Raff MC, Gaese F, Bartke I, Dechant G & Barde YA (1994). A crucial role for neurotrophin-3 in oligodendrocyte development. *Nature* **367**, 371–375.
- Barres BA, Schmid R, Sendtner M & Raff MC (1993). Multiple extracellular signals are required for long-term oligodendrocyte survival. *Development*.

- Bartsch U, Faissner A, Trotter J, Dörries U, Bartsch S, Mohajeri H & Schachner M (1994). Tenascin demarcates the boundary between the myelinated and nonmyelinated part of retinal ganglion cell axons in the developing and adult mouse. *J Neurosci* **14**, 4756–4768.
- Baumann N & Pham-Dinh D (2001). Biology of oligodendrocyte and myelin in the mammalian central nervous system. *Physiol Rev* **81**, 871–927.
- Bengtsson SL, Nagy Z, Skare S, Forsman L, Forssberg H & Ullén F (2005). Extensive piano practicing has regionally specific effects on white matter development. *Nat Neurosci* **8**, 1148–1150.
- Boiko T, Rasband MN, Levinson SR, Caldwell JH, Mandel G, Trimmer JS & Matthews G (2001). Compact Myelin Dictates the Differential Targeting of Two Sodium Channel Isoforms in the Same Axon. *Neuron* **30**, 91–104.
- Boison D & Stoffel W (1994). Disruption of the compacted myelin sheath of axons of the central nervous system in proteolipid protein-deficient mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* **91**, 11709–11713.
- Boullerne AI (2016). The history of myelin. *Exp Neurol* **283**, 431–445.
- Briscoe J & Small S (2015). Morphogen rules: design principles of gradient-mediated embryo patterning. *Development* **142**, 3996–4009.
- Brunner C, Lassmann H, Waehnel T V., Matthieu J -M & Linington C (1989). Differential Ultrastructural Localization of Myelin Basic Protein, Myelin/Oligodendroglial Glycoprotein, and 2',3'-Cyclic Nucleotide 3'-Phosphodiesterase in the CNS of Adult Rats. *J Neurochem* **52**, 296–304.
- Bu G, Williams S, Strickland DK & Schwartz AL (1992). Low density lipoprotein receptor-related protein/ α 2-macroglobulin receptor is an hepatic receptor for tissue-type plasminogen activator. *Proc Natl Acad Sci U S A* **89**, 7427–7431.
- Buisson A, Nicole O, Docagne F, Sartelet H, Mackenzie ET & Vivien D (1998). Up-regulation of a serine protease inhibitor in astrocytes mediates the neuroprotective activity of transforming growth factor β 1. *FASEB J* **12**, 1683–1691.
- Bukhari N, Torres L, Robinson JK & Tsirka SE (2011). Axonal regrowth after spinal cord injury via chondroitinase and the tissue plasminogen activator (tPA)/plasmin system. *J Neurosci Off J Soc Neurosci* **31**, 14931–14943.
- Butts BD, Houde C & Mehmet H (2008). Maturation-dependent sensitivity of oligodendrocyte lineage cells to apoptosis: implications for normal development and disease. *Cell Death Differ* **15**, 1178–1186.

C

- Cahoy JD, Emery B, Kaushal A, Foo LC, Zamanian JL, Christopherson KS, Xing Y, Lubischer JL, Krieg PA, Krupenko SA, Thompson WJ & Barres BA (2008). A Transcriptome Database for Astrocytes, Neurons, and Oligodendrocytes: A New Resource for Understanding Brain Development and Function. *J Neurosci* **28**, 264–278.
- Cai J, Qi Y, Hu X, Tan M, Liu Z, Zhang J, Li Q, Sander M & Qiu M (2005). Generation of Oligodendrocyte Precursor Cells from Mouse Dorsal Spinal Cord Independent of Nkx6 Regulation and Shh Signaling. *Neuron* **45**, 41–53.
- Cailloux F, Gauthier-Barichard F, Mimault C, Isabelle V, Courtois V, Giraud G, Dastugue B & Boespflug-Tanguy O (2000). Genotype-phenotype correlation in inherited brain myelination defects due to proteolipid protein gene mutations. *Eur J Hum Genet* **8**, 837–845.
- Camani C & Kruihof EKO (1995). The role of the finger and growth factor domains in the clearance of tissue-type plasminogen activator by hepatocytes. *J Biol Chem* **270**, 26053–26056.
- Câmara J, Wang Z, Nunes-Fonseca C, Friedman HC, Grove M, Sherman DL, Komiyama NH, Grant SG, Brophy PJ, Peterson A & Ffrench-Constant C (2009). Integrin-mediated axoglial interactions initiate myelination in the central nervous system. *J Cell Biol* **185**, 699–712.
- Cambi F, Tang XM, Cordray P, Fain PR, Keppen LD & Barker DF (1996). Refined genetic mapping and proteolipid protein mutation analysis in X-linked pure hereditary spastic paraplegia. *Neurology* **46**, 1112–1117.
- Carroll PM, Tsirka SE, Richards WG, Frohman MA & 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*.
- Cassé F, Bardou I, Danglot L, Briens A, Montagne A, Parcq J, Alahari A, Galli T, Vivien D & Docagne F (2012). Glutamate controls tPA recycling by astrocytes, which in turn influences glutamatergic signals. *J Neurosci* **32**, 5186–5199.
- Cerghet M, Bessert DA, Nave KA & Skoff RP (2001). Differential expression of apoptotic markers in jimpy and in Plp overexpressors: Evidence for different apoptotic pathways. *J Neurocytol* **30**, 841–855.
- Chamberlain CE, Jeong J, Guo C, Allen BL & McMahon AP (2008). Notochord-derived Shh concentrates in close association with the apically positioned basal body in neural target cells and forms a dynamic gradient during neural patterning. *Development* **135**, 1097–1106.
- Chen MS, Huber AB, Van Der Haar MED, Frank M, Schnell L, Spillmann AA, Christ F & Schwab ME (2000). Nogo-A is a myelin-associated neurite outgrowth inhibitor and an antigen for monoclonal antibody IN-1. *Nature* **403**, 434–439.

- Chen Y, Wu H, Wang S, Koito H, Li J, Ye F, Hoang J, Escobar SS, Gow A, Arnett HA, Trapp BD, Karandikar NJ, Hsieh J & Lu QR (2009). The oligodendrocyte-specific G protein-coupled receptor GPR17 is a cell-intrinsic timer of myelination. *Nat Neurosci* **12**, 1398–1406.
- Chevilly A, Lesept F, Lenoir S, Ali C, Parcq J & Vivien D (2015). Impacts of tissue-type plasminogen activator(tPA) on neuronal survival. *Front Cell Neurosci*; DOI: 10.3389/fncel.2015.00415.
- Chew L-J, Ming X, McEllin B, Dupree J, Hong E, Catron M, Fauveau M, Nait-Oumesmar B & Gallo V (2019). Sox17 Regulates a Program of Oligodendrocyte Progenitor Cell Expansion and Differentiation during Development and Repair. *Cell Rep* **29**, 3173--3186.e7.
- Chong SYC, Rosenberg SS, Fancy SPJ, Zhao C, Shen Y-AA, Hahn AT, McGee AW, Xu X, Zheng B, Zhang LI, Rowitch DH, Franklin RJM, Lu QR & Chan JR (2012). Neurite outgrowth inhibitor Nogo-A establishes spatial segregation and extent of oligodendrocyte myelination. *Proc Natl Acad Sci U S A* **109**, 1299–1304.
- Christensen LR & Macleod CM (1945). A proteolytic enzyme of serum: Characterization, activation, and reaction with inhibitors. *J Gen Physiol* **28**, 559–583.
- Clayton BLL & Popko B (2016). Endoplasmic reticulum stress and the unfolded protein response in disorders of myelinating glia. *Brain Res* **1648**, 594–602.
- Cohen CCH, Popovic MA, Klooster J, Weil M-T, Möbius W, Nave K-A & Kole MHP (2020). Saltatory Conduction along Myelinated Axons Involves a Periaxonal Nanocircuit. *Cell* **180**, 311--322.e15.
- Collen D & Lijnen HR (1991). Basic and clinical aspects of fibrinolysis and thrombolysis. *Blood* **78**, 3114–3124.
- Copp AJ, Greene NDE & Murdoch JN (2003). The genetic basis of mammalian neurulation. *Nat Rev Genet* **4**, 784–793.
- Correa F, Gauberti M, Parcq J, Macrez R, Hommet Y, Obiang P, Hernangómez M, Montagne A, Liot G, Guaza C, Maubert E, Ali C, Vivien D & Docagne F (2011). Tissue plasminogen activator prevents white matter damage following stroke. *J Exp Med* **208**, 1229–1242.
- Cuzner ML, Gveric D, Strand C, Loughlin AJ, Paemen L, Opdenakker G & Newcombe J (1996). The expression of tissue-type plasminogen activator, matrix metalloproteases and endogenous inhibitors in the central nervous system in multiple sclerosis: Comparison of stages in lesion evolution. *J Neuropathol Exp Neurol* **55**, 1194–1204.
- Czopka T, French-Constant C & Lyons DA (2013). Individual Oligodendrocytes Have Only a Few Hours in which to Generate New Myelin Sheaths In Vivo. *Dev Cell* **25**, 599–609.

D

- Dastre A (1893). 8. Laboratoire de physiologie de la Sorbonne. (Provisoirement rue d'Ulm, 3.). *Annu l'École Prat des hautes études* **1**, 78–79.
- Dawson MRL, Polito A, Levine JM & Reynolds R (2003). NG2-expressing glial progenitor cells: An abundant and widespread population of cycling cells in the adult rat CNS. *Mol Cell Neurosci* **24**, 476–488.
- Demerens C, Stankoff B, Logak M, Anglade P, Allinquant B, Couraud F, Zalc B & Lubetzki C (1996). Induction of myelination in the central nervous system by electrical activity. *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**, 9887–9892.
- Dent M a. R, Sumi Y, Morris RJ & Seeley PJ (1993). Urokinase-type Plasminogen Activator Expression by Neurons and Oligodendrocytes During Process Outgrowth in Developing Rat Brain. *Eur J Neurosci* **5**, 633–647.
- Denys J & De Marbaix H (1889). *Cellule*.
- Dietzmann K, Bossanyi P V., Krause D, Wittig H, Mawrin C & Kirches E (2000). Expression of the plasminogen activator system and the inhibitors PAI-1 and PAI-2 in posttraumatic lesions of the CNS and brain injuries following dramatic circulatory arrests: An immunohistochemical study. *Pathol Res Pract* **196**, 15–21.
- Doherty P, Cohen J & Walsh FS (1990). Neurite outgrowth in response to transfected N-CAM changes during development and is modulated by polysialic acid. *Neuron* **5**, 209–219.
- Dominici C, Moreno-Bravo JA, Puiggros SR, Rappeneau Q, Rama N, Vieugue P, Bernet A, Mehlen P & Chédotal A (2017). Floor-plate-derived netrin-1 is dispensable for commissural axon guidance. *Nature* **545**, 350–354.
- Douarin NM Le, Teillet MA & Catala M (2004). Neurulation in amniote vertebrates: a novel view deduced from the use of quail-chick chimeras. *Int J Dev Biol* **42**, 909–916.
- Duménieu M, Oulé M, Kreutz MR & Lopez-Rojas J (2017). The Segregated Expression of Voltage-Gated Potassium and Sodium Channels in Neuronal Membranes: Functional Implications and Regulatory Mechanisms. *Front Cell Neurosci* **11**, 115.
- Duncan ID, Hammang JP, Goda S & Quarles RH (1989). Myelination in the jimpy mouse in the absence of proteolipid protein. *Glia* **2**, 148–154.
- Dupree JL & Pomicter AD (2010). Myelin, DIGs, and membrane rafts in the central nervous system. *Prostaglandins Other Lipid Mediat* **91**, 118–129.
- Durand B, Gao FB & Raff M (1997). Accumulation of the cyclin-dependent kinase inhibitor p27/Kip1 and the timing of oligodendrocyte differentiation. *EMBO J* **16**, 306–317.
- Durand B & Raff M (2000). A cell-intrinsic timer that operates during oligodendrocyte development. *BioEssays* **22**, 64–71.

Dziembowska M, Tham TN, Lau P, Vitry S, Lazarini F & Dubois-Dalcq M (2005). A role for CXCR4 signaling in survival and migration of neural and oligodendrocyte precursors. *Glia* **50**, 258–269.

E

East E, Baker D, Pryce G, Lijnen HR, Cuzner ML & Gverić D (2005). A role for the plasminogen activator system in inflammation and neurodegeneration in the central nervous system during experimental allergic encephalomyelitis. *Am J Pathol* **167**, 545–554.

Emery B & Lu QR (2015). Transcriptional and epigenetic regulation of oligodendrocyte development and myelination in the central nervous system. *Cold Spring Harb Perspect Biol*; DOI: 10.1101/cshperspect.a020461.

F

Faivre-Sarrailh C (2020). Molecular organization and function of vertebrate septate-like junctions. *Biochim Biophys Acta Biomembr* **1862**, 183211.

Fancy SPJ, Zhao C & Franklin RJM (2004). Increased expression of Nkx2.2 and Olig2 identifies reactive oligodendrocyte progenitor cells responding to demyelination in the adult CNS. *Mol Cell Neurosci* **27**, 247–254.

Fauveau M, Wilmet B, Deboux C, Benardais K, Bachelin C, Temporão AC, Kerninon C & Oumesmar BN (2018). SOX17 transcription factor negatively regulates oligodendrocyte precursor cell differentiation. *Glia* **66**, 2221–2232.

Feng JM (2007). Minireview: Expression and function of golli protein in immune system. *Neurochem Res* **32**, 273–278.

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

Fields RD & Bukalo O (2020). Myelin makes memories. *Nat Neurosci* **23**, 469–470.

Fredriksson L, Li H, Fieber C, Li X & Eriksson U (2004). Tissue plasminogen activator is a potent activator of PDGF-CC. *EMBO J* **23**, 3793–3802.

Friede RL, Miyagishi T & Johnstone M (1972). Adjustment of the myelin sheath to changes in axon caliber. *Anat Rec* **172**, 1–13.

Fumagalli M, Daniele S, Lecca D, Lee PR, Parravicini C, Douglas Fields R, Rosa P, Antonucci F, Verderio C, Letizia Trincavelli M, Bramanti P, Martini C & Abbracchio MP (2011). Phenotypic changes, signaling pathway, and functional correlates of GPR17-expressing neural precursor cells during oligodendrocyte differentiation. *J Biol Chem* **286**, 10593–10604.

Fünfschilling U, Supplie LM, Mahad D, Boretius S, Saab AS, Edgar J, Brinkmann BG, Kassmann CM, Tzvetanova ID, Möbius W, Diaz F, Meijer D, Suter U, Hamprecht B, Sereda MW, Moraes CT, Frahm J, Goebbels S & Nave KA (2012). Glycolytic oligodendrocytes maintain myelin and long-term axonal integrity. *Nature* **485**, 517–521.

G

Gencic S, Abuelo D, Ambler M & Hudson LD (1989). Pelizaeus-Merzbacher disease: An X-linked neurologic disorder of myelin metabolism with a novel mutation in the gene encoding proteolipid protein. *Am J Hum Genet* **45**, 435–442.

Gencic S & Hudson LD (1990). Conservative amino acid substitution in the myelin proteolipid protein of jimpy(msd) mice. *J Neurosci* **10**, 117–124.

Gielen E, Baron W, Vandeven M, Steels P, Hoekstra D & Ameloot M (2006). Rafts in oligodendrocytes: Evidence and structure-function relationship. *Glia* **54**, 499–512.

Greer JM & Lees MB (2002). Myelin proteolipid protein - The first 50 years. *Int J Biochem Cell Biol* **34**, 211–215.

Griffiths I, Klugmann M, Anderson T, Yool D, Thomson C, Schwab MH, Schneider A, Zimmermann F, McCulloch M, Nadon N & Nave KA (1998). Axonal swellings and degeneration in mice lacking the major proteolipid of myelin. *Science (80-)* **280**, 1610–1613.

Griffiths IR, Scott I, McCulloch MC, Barrie JA, McPhilemy K & Cattanach BM (1990). Rumpshaker mouse: A new X-linked mutation affecting myelination: Evidence for a defect in PLP expression. *J Neurocytol* **19**, 273–283.

Grinspan JB & Franceschini B (1995). Platelet-derived growth factor is a survival factor for PSA-NCAM + oligodendrocyte pre-progenitor cells. *J Neurosci Res* **41**, 540–551.

Gyllensten L & Malmfors T (1963). Myelination of the Optic Nerve and its Dependence on Visual Function— A Quantitative Investigation in Mice. *Development*.

H

Hajjar KA & Krishnan S (1999). Annexin II: A mediator of the plasmin/plasminogen activator system. *Trends Cardiovasc Med* **9**, 128–138.

Hébert M, Lesept F, Vivien D & Macrez R (2016). The story of an exceptional serine protease, tissue-type plasminogen activator (tPA). *Rev Neurol (Paris)* **172**, 186–197.

Hedin S (1904). On the presence of a proteolytic enzyme in the normal serum of the ox. *J Physiol*.

Hildebrand C, Remahl S, Persson H & Bjartmar C (1993). Myelinated nerve fibres in the CNS.

Prog Neurobiol **40**, 319–384.

Hill RA, Li AM & Grutzendler J (2018). Lifelong cortical myelin plasticity and age-related degeneration in the live mammalian brain. *Nat Neurosci* **21**, 683–695.

Hu BR, Janelidze S, Ginsberg MD, Busto R, Perez-Pinzon M, Sick TJ, Siesjö BK & Liu CL (2001). Protein aggregation after focal brain ischemia and reperfusion. *J Cereb Blood Flow Metab* **21**, 865–875.

Hudson LD, Berndt JA, Puckett C, Kozak CA & Lazzarini RA (1987). Aberrant splicing of proteolipid protein mRNA in the dysmyelinating jimpy mutant mouse. *Proc Natl Acad Sci U S A* **84**, 1454–1458.

Hudson LD, Puckett C, Berndt J, Chan J & Gencic S (1989). Mutation of the proteolipid protein gene PLP in a human X chromosome-linked myelin disorder. *Proc Natl Acad Sci U S A* **86**, 8128–8131.

Hughes EG, Kang SH, Fukaya M & Bergles DE (2013). Oligodendrocyte progenitors balance growth with self-repulsion to achieve homeostasis in the adult brain. *Nat Neurosci* **16**, 668–676.

Hultman K, Tjärnlund-Wolf A, Fish RJ, Wilhelmsson U, Rydenhag B, Pekny M, Kruihof EKO & Jern C (2008). Retinoids and activation of PKC induce tissue-type plasminogen activator expression and storage in human astrocytes. *J Thromb Haemost* **6**, 1796–1803.

I

Inoue K (2005). PLP1-related inherited dysmyelinating disorders: Pelizaeus-Merzbacher disease and spastic paraplegia type 2. *Neurogenetics* **6**, 1–16.

Inoue K (2019). Pelizaeus-Merzbacher Disease: Molecular and Cellular Pathologies and Associated Phenotypes. In *Advances in Experimental Medicine and Biology*, pp. 201–216. Springer.

J

Jakovcevski I, Mo Z & Zecevic N (2007). Down-regulation of the axonal polysialic acid-neural cell adhesion molecule expression coincides with the onset of myelination in the human fetal forebrain. *Neuroscience* **149**, 328–337.

Jarjour AA, Manitt C, Moore SW, Thompson KM, Yuh S-J & Kennedy TE (2003). Netrin-1 Is a Chemorepellent for Oligodendrocyte Precursor Cells in the Embryonic Spinal Cord. *J Neurosci* **23**, 3735–3744.

Jurand A (1974). Some aspects of the development of the notochord in mouse embryos. *Development* **32**, 1–33.

K

- Kagitani H, Tagawa M, Hatanaka K, Ikari T, Saito A, Bando H, Okada K & Matsuo O (1985). Expression in *E. coli* of finger-domain lacking tissue-type plasminogen activator with high fibrin affinity. *FEBS Lett* **189**, 145–149.
- Kennedy TE, Serafini T, de la Torre J & Tessier-Lavigne M (1994). Netrins are diffusible chemotropic factors for commissural axons in the embryonic spinal cord. *Cell* **78**, 425–435.
- Kiebler MA & Bassell GJ (2006). Neuronal RNA granules: movers and makers. *Neuron* **51**, 685–690.
- Kiss JZ, Wang C, Olive S, Rougon G, Lang J, Baetens D, Harry D & Pralong WF (1994). Activity-dependent mobilization of the adhesion molecule polysialic NCAM to the cell surface of neurons and endocrine cells. *EMBO J* **13**, 5284–5292.
- Klugmann M, Schwab MH, Pühlhofer A, Schneider A, Zimmermann F, Griffiths IR & Nave KA (1997). Assembly of CNS myelin in the absence of proteolipid protein. *Neuron* **18**, 59–70.
- KNAPP PE & SKOFF RP (1991). Expression of Myelin Glycolipids and Proteins in Mitotic and Postmitotic Murine Oligodendrocytes. *Ann N Y Acad Sci* **633**, 508–510.
- Kosaras B & Kirschner DA (1990). Radial component of CNS myelin: junctional subunit structure and supramolecular assembly. *J Neurocytol* **19**, 187–199.
- Kuiper J, Van't Hof A, Otter M, Biessen EAL, Rijken DC & Van Berkel TJC (1996). Interaction of mutants of tissue-type plasminogen activator with liver cells: Effect of domain deletions. *Biochem J* **313**, 775–780.

L

- Lee AG (2001). Myelin: Delivery by raft. *Curr Biol* **11**, R60–R62.
- Léger C, Dupré N, Aligny C, Bénard M, Lebon A, Henry V, Hauchecorne M, Galas L, Frebourg T, Leroux P, Vivien D, Lecointre M, Marret S & Gonzalez BJ (2020). Glutamate controls vessel-associated migration of GABA interneurons from the pial migratory route via NMDA receptors and endothelial protease activation. *Cell Mol Life Sci* **77**, 1959–1986.
- Lemarchant S, Pruvost M, Hébert M, Gauberti M, Hommet Y, Briens A, Maubert E, Gueye Y, Féron F, Petite D, Mersel M, Do Rego JC, Vaudry H, Koistinaho J, Ali C, Agin V, Emery E & Vivien D (2014). TPA promotes ADAMTS-4-induced CSPG degradation, thereby enhancing neuroplasticity following spinal cord injury. *Neurobiol Dis* **66**, 28–42.
- Lemon RN (2008). Descending Pathways in Motor Control. *Annu Rev Neurosci* **31**, 195–218.
- Lenoir S, Varangot A, Lebouvier L, Galli T, Hommet Y & Vivien D (2019). Post-synaptic release of the neuronal tissue-type plasminogen activator (tPA). *Front Cell Neurosci* **13**, 164.

- Leonetti C, Macrez R, Pruvost M, Hommet Y, Bronsard J, Fournier A, Perrigault M, Machin I, Vivien D, Clemente D, De Castro F, Maubert E & Docagne F (2017). Tissue-type plasminogen activator exerts EGF-like chemokinetic effects on oligodendrocytes in white matter (re)myelination. *Mol Neurodegener*; DOI: 10.1186/s13024-017-0160-5.
- Li H, de Faria J, Andrew P, Nitarska J & Richardson WD (2011). Phosphorylation Regulates OLIG2 Cofactor Choice and the Motor Neuron-Oligodendrocyte Fate Switch. *Neuron* **69**, 918–929.
- Liang X, Draghi NA & Resh MD (2004). Signaling from integrins to Fyn to Rho family GTPases regulates morphologic differentiation of oligodendrocytes. *J Neurosci* **24**, 7140–7149.
- Lin W & Popko B (2009). Endoplasmic reticulum stress in disorders of myelinating cells. *Nat Neurosci* **12**, 379–385.
- Liu R, Cai J, Hu X, Tan M, Qi Y, German M, Rubenstein J, Sander M & Qiu M (2003). Region-specific and stage-dependent regulation of Olig gene expression and oligodendrogenesis by Nkx6.1 homeodomain transcription factor. *Development* **130**, 6221–6231..
- Lochner JE, Kingma M, Kuhn S, Meliza CD, Cutler B & Scalettar BA (1998). Real-time imaging of the axonal transport of granules containing a tissue plasminogen activator/green fluorescent protein hybrid. *Mol Biol Cell* **9**, 2463–2476.
- Lochner JE, Spangler E, Chavarha M, Jacobs C, McAllister K, Schuttner LC & Scalettar BA (2008). Efficient copackaging and cotransport yields postsynaptic colocalization of neuromodulators associated with synaptic plasticity. *Dev Neurobiol* **68**, 1243–1256.
- Lopez-Atalaya JP, Roussel BD, Levrat D, Parcq J, Nicole O, Hommet Y, Benchenane K, Castel H, Leprince J, To Van D, Bureau R, Rault S, Vaudry H, Petersen KU, Santos JSDO, Ali C & Vivien D (2008). Toward safer thrombolytic agents in stroke: Molecular requirements for NMDA receptor-mediated neurotoxicity. *J Cereb Blood Flow Metab* **28**, 1212–1221.
- Louessard M, Bardou I, Lemarchand E, Thiebaut AM, Parcq J, Leprince J, Terrisse A, Carraro V, Fafournoux P, Bruhat A, Orset C, Vivien D, Ali C & Roussel BD (2017). Activation of cell surface GRP78 decreases endoplasmic reticulum stress and neuronal death. *Cell Death Differ* **24**, 1518–1529.
- Louessard M, Lacroix A, Martineau M, Mondielli G, Montagne A, Lesept F, Lambolez B, Cauli B, Mothet JP, Vivien D & Maubert E (2016). Tissue Plasminogen Activator Expression Is Restricted to Subsets of Excitatory Pyramidal Glutamatergic Neurons. *Mol Neurobiol* **53**, 5000–5012.
- Love S (2006). Demyelinating diseases. *J Clin Pathol* **59**, 1151–1159.
- Lu QR, Yuk D, Alberta JA, Zhu Z, Pawlitzky I, Chan J, McMahan AP, Stiles CD & Rowitch DH (2000). Sonic Hedgehog-Regulated Oligodendrocyte Lineage Genes Encoding bHLH Proteins in the Mammalian Central Nervous System. *Neuron* **25**, 317–329.
- Lu W, Bhasin M & Tsirka SE (2002). Involvement of tissue plasminogen activator in onset and

effector phases of experimental allergic encephalomyelitis. *J Neurosci* **22**, 10781–10789.

Lubetzki C, Charles P, Denisenko-Nehrbass N, Barbin G & Girault J-A (2003). [Paranodal junctions of myelinated fibers: site of anchorage and interactions]. *Med Sci M/S* **19**, 22–24.

Lubetzki C, Sol-Foulon N & Desmazières A (2020). Nodes of Ranvier during development and repair in the CNS. *Nat Rev Neurol* 1–14.

Ludwig A, Schlierf B, Schardt A, Nave K-A & Wegner M (2004). Sox10-rtTA mouse line for tetracycline-inducible expression of transgenes in neural crest cells and oligodendrocytes. *genesis* **40**, 171–175.

M

Marques S et al. (2016). Oligodendrocyte heterogeneity in the mouse juvenile and adult central nervous system. *Science* **352**, 1326–1329.

Marty MC, Alliot F, Rutin J, Fritz R, Trisler D & Pessac B (2002). The myelin basic protein gene is expressed in differentiated blood cell lineages and in hemopoietic progenitors. *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**, 8856–8861.

Matthews MA & Duncan D (1971). A quantitative study of morphological changes accompanying the initiation and progress of myelin production in the dorsal funiculus of the rat spinal cord. *J Comp Neurol* **142**, 1–22.

Maysami S, Nguyen D, Zobel F, Pitz C, Heine S, Höpfner M & Stangel M (2006). Modulation of rat oligodendrocyte precursor cells by the chemokine CXCL12. *Neuroreport* **17**, 1187–1190.

McKinnon RD, Smith C, Behar T, Smith T & Dubois-Dalcq M (1990). Distinct effects of bFGF and PDGF on oligodendrocyte progenitor cells. *Glia* **7**, 245–254.

McLaughlin M, Barrie JA, Karim S, Montague P, Edgar JM, Kirkham D, Thomson CE & Griffiths IR (2006). Processing of PLP in a model of Pelizaeus-Merzbacher disease/SPG2 due to the *rumpshaker* mutation. *Glia* **53**, 715–722.

McLaughlin M, Karim SA, Montague P, Barrie JA, Kirkham D, Griffiths IR & Edgar JM (2007). Genetic background influences UPR but not PLP processing in the rumpshaker model of PMD/SPG2. *Neurochem Res* **32**, 167–176.

Mi S, Miller RH, Lee X, Scott ML, Shulag-Morskaya S, Shao Z, Chang J, Thill G, Levesque M, Zhang M, Hession C, Sah D, Trapp B, He Z, Jung V, McCoy JM & Pepinsky RB (2005). LINGO-1 negatively regulates myelination by oligodendrocytes. *Nat Neurosci* **8**, 745–751.

Miller DJ, Duka T, Stimpson CD, Schapiro SJ, Baze WB, McArthur MJ, Fobbs AJ, Sousa AMM, Sěstan N, Wildman DE, Lipovich L, Kuzawa CW, Hof PR & Sherwood CC (2012). Prolonged myelination in human neocortical evolution. *Proc Natl Acad Sci U S A* **109**, 16480–16485.

Miron VE (2017). Microglia-driven regulation of oligodendrocyte lineage cells, myelination, and remyelination. *J Leukoc Biol* **101**, 1103–1108.

Mizrachi T, Gur-Wahnon D, Al-Roof Higazi A & Brenner T (2020). Role of tissue plasminogen activator in clinical aggravation of experimental autoimmune encephalomyelitis and its therapeutic potential. *Cell Immunol* **348**, 104040.

Montag D, Giese KP, Bartsch U, Martini R, Lang Y, Blüthmann H, Karthigasan J, Kirschner DA, Wintergerst ES, Nave KA, Zielasek J, Toyka K V., Lipp HP & Schachner M (1994). Mice deficient for the glycoprotein show subtle abnormalities in myelin. *Neuron* **13**, 229–246.

Morell P & Quarles RH (1999). Characteristic Composition of Myelin. *Basic Neurochem Mol Cell Med Asp 6th Ed.*

N

Nadarajah B, Alifragis P, Wong ROL & Parnavelas JG (2003). Neuronal migration in the developing cerebral cortex: Observations based on real-time imaging. *Cereb Cortex* **13**, 607–611.

Nadon NL & West M (1998). Myelin proteolipid protein: function in myelin structure is distinct from its role in oligodendrocyte development. *Dev Neurosci* **20**, 533–539.

Nait-Oumesmar B, Decker L, Lachapelle F, Avellana-Adalid V, Bachelin C & Baron-Van Evercooren A (1999). Progenitor cells of the adult mouse subventricular zone proliferate, migrate and differentiate into oligodendrocytes after demyelination. *Eur J Neurosci* **11**, 4357–4366.

Nave K-A (2010). Myelination and the trophic support of long axons. *Nat Rev Neurosci* **11**, 275–283.

Nave KA, Lai C, Bloom FE & Milner RJ (1986). Jimpy mutant mouse: a 74-base deletion in the mRNA for myelin proteolipid protein and evidence for a primary defect in RNA splicing. *Proc Natl Acad Sci U S A* **83**, 9264–9268.

Nishiyama A, Lin XH, Giese N, Heldin CH & Stallcup WB (1996). Co-localization of NG2 proteoglycan and PDGF α -receptor on O2A progenitor cells in the developing rat brain. *J Neurosci Res* **43**, 299–314.

O

O'Brien JS (1965). Stability of the myelin membrane. *Science (80-)* **147**, 1099–1107.

O'Rahilly R & Müller F (2002). The two sites of fusion of the neural folds and the two neuropores in the human embryo: Fusion of Human Neural Folds and Neuropores. *Teratology* **65**, 162–170.

- Omlin FX & Anders JJ (1983). Abnormal cell relationships in Jimpy mice: electron microscopic and immunocytochemical findings. *J Neurocytol* **12**, 767–784.
- Ortiz-Zapater E, Peiró S, Roda O, Corominas JM, Aguilar S, Ampurdanés C, Real FX & Navarro P (2007). Tissue plasminogen activator induces pancreatic cancer cell proliferation by a non-catalytic mechanism that requires extracellular signal-regulated kinase 1/2 activation through epidermal growth factor receptor and annexin A2. *Am J Pathol* **170**, 1573–1584.
- Oumesmar BN, Vignais L, Duhamel-Clerin E, Avellana-Adalid V, Rougon G & Evercooren AB (1995). Expression of the Highly Polysialylated Neural Cell Adhesion Molecule During Postnatal Myelination and Following Chemically Induced Demyelination of the Adult Mouse Spinal Cord. *Eur J Neurosci* **7**, 480–491.

P

- Panfili I, Bruschi M, Santucci L, Calzia D, Ravera S, Petretto A & Candiano G (2014). Myelin proteomics: The past, the unexpected and the future. *Expert Rev Proteomics* **11**, 345–354.
- Parmer RJ, Mahata M, Mahata S, Sebald MT, O'Connor DT & Miles LA (1997). Tissue plasminogen activator (t-PA) is targeted to the regulated secretory pathway: Catecholamine storage vesicles as a reservoir for the rapid release of t-PA. *J Biol Chem* **272**, 1976–1982.
- Pasquet N, Douceau S, Naveau M, Lesept F, Louessard M, Lebouvier L, Hommet Y, Vivien D & Bardou I (2019). Tissue-Type Plasminogen Activator Controlled Corticogenesis Through a Mechanism Dependent of NMDA Receptors Expressed on Radial Glial Cells. *Cereb Cortex* **29**, 2482–2498.
- Pennica D, Holmes WE, Kohr WJ, Harkins RN, Vehar GA, Ward CA, Bennett WF, Yelverton E, Seeburg PH, Heyneker HL, Goeddel D V. & Collen D (1983). Cloning and expression of human tissue-type plasminogen activator cDNA in *E. coli*. *Nature* **301**, 214–221.
- Pérez-Cerdá F, Sánchez-Gómez MV & Matute C (2015). Pío del Río Hortega and the discovery of the oligodendrocytes. *Front Neuroanat*; DOI: 10.3389/fnana.2015.00092.
- Peschl P, Bradl M, Höftberger R, Berger T & Reindl M (2017). Myelin oligodendrocyte glycoprotein: Deciphering a target in inflammatory demyelinating diseases. *Front Immunol*; DOI: 10.3389/fimmu.2017.00529.
- Peters A (1961). A RADIAL COMPONENT OF CENTRAL MYELIN SHEATHS. *J Biophys Biochem Cytol* **11**, 733–735.
- Pfeiffer SE, Warrington AE & Bansal R (1993). The oligodendrocyte and its many cellular processes. *Trends Cell Biol* **3**, 191–197.
- Pham-Dinh D, Mattei MG, Nussbaum JL, Roussel G, Pontarotti P, Roedel N, Mather IH, Artzt K, Lindahl KF & Dautigny A (1993). Myelin/oligodendrocyte glycoprotein is a member of a subset of the immunoglobulin superfamily encoded within the major histocompatibility

- complex. *Proc Natl Acad Sci U S A* **90**, 7990–7994.
- Piaton G, Gould RM & Lubetzki C (2010). Axon-oligodendrocyte interactions during developmental myelination, demyelination and repair. *J Neurochem* **114**, no-no.
- Placzek M, Yamada T, Tessier-Lavigne M, Jessell T & Dodd J (1991). Control of dorsoventral pattern in vertebrate neural development: induction and polarizing properties of the floor plate. *Dev Suppl Suppl 2*, 105–122.
- Poliak S & Peles E (2003). The local differentiation of myelinated axons at nodes of Ranvier. *Nat Rev Neurosci* **4**, 968–980.
- Pringle NP, Mudhar HS, Collarini EJ & Richardson WD (1992). PDGF receptors in the rat CNS: during late neurogenesis, PDGF alpha-receptor expression appears to be restricted to glial cells of the oligodendrocyte lineage. *Development* **115**, 535–551.
- Pringle NP & Richardson WD (1993). A singularity of PDGF alpha-receptor expression in the dorsoventral axis of the neural tube may define the origin of the oligodendrocyte lineage. *Development* **9**.
- Privat A, Jacque C, Bourre JM, Dupouey P & Baumann N (1979). Absence of the major dense line in myelin of the mutant mouse “shiverer.” *Neurosci Lett* **12**, 107–112.
- Pruvost M, Lépine M, Leonetti C, Etard O, Naveau M, Agin V, Docagne F, Maubert E, Ali C, Emery E & Vivien D (2017). ADAMTS-4 in oligodendrocytes contributes to myelination with an impact on motor function. *Glia* **65**, 1961–1975.

R

- Raff M, Apperly J, Kondo T, Tokumoto Y & Tang D (2001). Timing Cell-Cycle Exit and Differentiation in Oligodendrocyte Development. In *The Cell Cycle and Development*, pp. 100–113. John Wiley & Sons, Ltd.
- Raff MC, Barres BA, Burne JF, Coles HS, Ishizaki Y & Jacobson MD (1993). Programmed cell death and the control of cell survival: lessons from the nervous system. *Science (80-)* **262**, 695–700.
- Rama S, Zbili M & Debanne D (2018). Signal propagation along the axon. *Curr Opin Neurobiol* **51**, 37–44.
- Raskind WH, Williams CA, Hudson LD & Bird TD (1991). Complete deletion of the proteolipid protein gene (PLP) in a family with X-linked Pelizaeus-Merzbacher disease. *Am J Hum Genet* **49**, 1355–1360.
- Richardson WD, Smith HK, Sun T, Pringle NP, Hall A & Woodruff R (2000). Oligodendrocyte lineage and the motor neuron connection. *Glia* **29**, 136–142.
- Rijken DC, Hoylaerts M & Collen D (1982). Fibrinolytic properties of one-chain and two-chain human extrinsic (tissue-type) plasminogen activator. *J Biol Chem* **257**, 2920–2925.

- Rinholm JE & Bergersen LH (2014). White matter lactate - Does it matter? *Neuroscience* **276**, 109–116. Available at: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24125892/> [Accessed August 24, 2020].
- Rio-Hortega P Del (1928). TERCERA APORTACIÓN AL CONOCIMIENTO MORFOLÓGICO E INTERPRETACIÓN FUNCIONAL DE LA OLIGODENDROGLÍA. 118.
- Rios JC, Rubin M, Martin MS, Downey RT, Einheber S, Rosenbluth J, Levinson SR, Bhat M & Salzer JL (2003). Paranodal Interactions Regulate Expression of Sodium Channel Subtypes and Provide a Diffusion Barrier for the Node of Ranvier. *J Neurosci* **23**, 7001–7011.
- Rivers LE, Young KM, Rizzi M, Jamen F, Psachoulia K, Wade A, Kessaris N & Richardson WD (2008). PDGFRA/NG2 glia generate myelinating oligodendrocytes and piriform projection neurons in adult mice. *Nat Neurosci* **11**, 1392–1401.
- Rogove A, Siao C, Keyt B, Strickland S & Tsirka S (1999). Activation of microglia reveals a non-proteolytic cytokine function for tissue plasminogen activator in the central nervous system. *undefined*.
- Rosenbluth J, Nave K-A, Mierzwa A & Schiff R (2006). Subtle myelin defects in PLP-null mice. *Glia* **54**, 172–182.
- Roussel BD, Kruppa AJ, Miranda E, Crowther DC, Lomas DA & Marciniak SJ (2013). Endoplasmic reticulum dysfunction in neurological disease. *Lancet Neurol* **12**, 105–118.
- Roussel BD, Mysiorek C, Rouhiainen A, Jullienne A, Parcq J, Hommet Y, Culot M, Berezowski V, Cecchelli R, Rauvala H, Vivien D & Ali C (2011). HMGB-1 promotes fibrinolysis and reduces neurotoxicity mediated by tissue plasminogen activator. *J Cell Sci* **124**, 2070–2076.

S

- Saab AS, Tzvetanova ID & Nave K-A (2013). The role of myelin and oligodendrocytes in axonal energy metabolism. *Curr Opin Neurobiol* **23**, 1065–1072.
- Sakatani K, Chesler M & Hassan AZ (1991). GABAA receptors modulate axonal conduction in dorsal columns of neonatal rat spinal cord. *Brain Res* **542**, 273–279.
- Salzer JL (2003). Polarized domains of myelinated axons. *Neuron* **40**, 297–318.
- Sampaio-Baptista C & Johansen-Berg H (2017). White Matter Plasticity in the Adult Brain. *Neuron* **96**, 1239–1251.
- Sappino AP, Madani R, Huarte J, Belin D, Kiss JZ, Wohlwend A & Vassalli JD (1993). Extracellular proteolysis in the adult murine brain. *J Clin Invest* **92**, 679–685.
- Saugier-veber P, Munnich A, Bonneau D, Rozet JM, le Merrer M, Gil R & Boespflug-Tanguy O (1994). X-linked spastic paraplegia and Pelizaeus-Merzbacher disease are allelic disorders at the proteolipid protein locus. *Nat Genet* **6**, 257–262.

- Schiffmann R & Boespflug-Tanguy O (2001). An update on the leukodystrophies. *Curr Opin Neurol* **14**, 789–794.
- Schoenwolf GC (1991). *Cell movements driving neurulation in avian embryos*.
- Scholze AR & Barres BA (2012). A Nogo signal coordinates the perfect match between myelin and axons. *Proc Natl Acad Sci U S A* **109**, 1003–1004.
- Scolding NJ, Frith S, Linington C, Morgan BP, Campbell AK & Compston DAS (1989). Myelin-oligodendrocyte glycoprotein (MOG) is a surface marker of oligodendrocyte maturation. *J Neuroimmunol* **22**, 169–176.
- Seeds NW, Basham ME & Haffke SP (1999). Neuronal migration is retarded in mice lacking the tissue plasminogen activator gene. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**, 14118–14123.
- Seitelberger F (1995). Neuropathology and Genetics of Pelizaeus-Merzbacher Disease. *Brain Pathol* **5**, 267–273.
- Shin CY, Kundel M & Wells DG (2004). Rapid, activity-induced increase in tissue plasminogen activator is mediated by metabotropic glutamate receptor-dependent mRNA translation. In *Journal of Neuroscience*, pp. 9425–9433. *J Neurosci*.
- Siao CJ, Fernandez SR & Tsirka SE (2003). Cell type-specific roles for tissue plasminogen activator released by neurons or microglia after excitotoxic injury. *J Neurosci* **23**, 3234–3242.
- Siao CJ & Tsirka SE (2002). Tissue Plasminogen Activator Mediates Microglial Activation via Its Finger Domain through Annexin II. *J Neurosci* **22**, 3352–3358.
- Snaidero N, Möbius W, Czopka T, Hekking LHP, Mathisen C, Verkleij D, Goebbels S, Edgar J, Merkler D, Lyons DA, Nave K-A & Simons M (2014). Myelin membrane wrapping of CNS axons by PI(3,4,5)P3-dependent polarized growth at the inner tongue. *Cell* **156**, 277–290.
- Snaidero N & Simons M (2014). Myelination at a glance. *J Cell Sci* **127**, 2999–3004.
- Snaidero N, Velte C, Myllykoski M, Raasakka A, Ignatev A, Werner HB, Erwig MS, Möbius W, Kursula P, Nave KA & Simons M (2017). Antagonistic Functions of MBP and CNP Establish Cytosolic Channels in CNS Myelin. *Cell Rep* **18**, 314–323.
- Solly SK, Thomas JL, Monge M, Demerens C, Lubetzki C, Gardinier M V., Matthieu JM & Zalc B (1996). Myelin/oligodendrocyte glycoprotein (MOG) expression is associated with myelin deposition. *Glia* **18**, 39–48.
- Sommer I & Schachner M (1981). Monoclonal antibodies (O1 to O4) to oligodendrocyte cell surfaces: An immunocytological study in the central nervous system. *Dev Biol* **83**, 311–327.
- Soreq H & Miskin R (1981). Plasminogen activator in the rodent brain. *Brain Res* **216**, 361–374.
- Spörkel O, Uschkureit T, Büssow H & Stoffel W (2002). Oligodendrocytes expressing exclusively

- the DM20 isoform of the proteolipid protein gene: Myelination and development. *Glia* **37**, 19–30.
- Staugaitis SM & Trapp BD (2009). NG2-positive glia in the human central nervous system. *Neuron Glia Biol* **5**, 35–44.
- Stiles J & Jernigan TL (2010). The basics of brain development. *Neuropsychol Rev* **20**, 327–348.
- Stolt CC, Lommes P, Sock E, Chaboissier M-C, Schedl A & Wegner M (2003). The Sox9 transcription factor determines glial fate choice in the developing spinal cord. *Genes Dev* **17**, 1677–1689.
- Stolt CC, Rehberg S, Ader M, Lommes P, Riethmacher D, Schachner M, Bartsch U & Wegner M (2002). Terminal differentiation of myelin-forming oligodendrocytes depends on the transcription factor Sox10. *Genes Dev* **16**, 165–170.
- Sumi Y, Dent MA, Owen DE, Seeley PJ & Morris RJ (1992). The expression of tissue and urokinase-type plasminogen activators in neural development suggests different modes of proteolytic involvement in neuronal growth. *Development* **116**, 625–637.
- Svenstrup K, Giraud G, Boespflug-Tanguy O, Danielsen ER, Thomsen C, Rasmussen K, Law I, Vogel A, Stokholm J, Crone C, Hjermand LE & Nielsen JE (2010). Hereditary spastic paraplegia caused by the PLP1 “rumpshaker mutation.” *J Neurol Neurosurg Psychiatry* **81**, 666–672.
- T**
- Teesalu T, Kulla A, Asser T, Koskiniemi M & Vaheri A (2002). Tissue plasminogen activator as a key effector in neurobiology and neuropathology. *Biochem Soc Trans* **30**, 183–189.
- Terayama R, Bando Y, Jiang YP, Mitrovic B & Yoshida S (2005). Differential expression of protease M/neurosin in oligodendrocytes and their progenitors in an animal model of multiple sclerosis. *Neurosci Lett* **382**, 82–87.
- Thaxton C & Bhat MA (2009). Myelination and regional domain differentiation of the axon. *Results Probl Cell Differ* **48**, 1–28.
- Thomson CE, Anderson TJ, McCulloch MC, Dickinson P, Vouyiouklis DA & Griffiths IR (1999). The early phenotype associated with the jimpy mutation of the proteolipid protein gene. *J Neurocytol* **28**, 207–221.
- Toshniwal PK, Firestone SL, Barlow GH & Tiku ML (1987). Characterization of astrocyte plasminogen activator. *J Neurol Sci* **80**, 277–287.
- Tosic M, Rakic S, Matthieu J-M & Zecevic N (2002). Identification of Golli and myelin basic proteins in human brain during early development. *Glia* **37**, 219–228.
- Traiffort E, Zakaria M, Laouarem Y & Ferent J (2016). Hedgehog: A Key Signaling in the Development of the Oligodendrocyte Lineage. *J Dev Biol* **4**, 28.

- Trapp BD, Bernier L, Andrews SB & Colman DR (1988). Cellular and subcellular distribution of 2',3'-cyclic nucleotide 3'-phosphodiesterase and its mRNA in the rat central nervous system. *J Neurochem* **51**, 859–868.
- Trapp BD & Kidd GJ (2000). Axo-glial septate junctions. The maestro of nodal formation and myelination? *J Cell Biol* **150**, F97--F100.
- Tress O, Maglione M, May D, Pivneva T, Richter N, Seyfarth J, Binder S, Zlomuzica A, Seifert G, Theis M, Dere E, Kettenmann H & Willecke K (2012). Panglial gap junctional communication is essential for maintenance of myelin in the CNS. *J Neurosci* **32**, 7499–7518.
- Tripathi RB, Clarke LE, Burzomato V, Kessar N, Anderson PN, Attwell D & Richardson WD (2011). Dorsally and Ventrally Derived Oligodendrocytes Have Similar Electrical Properties but Myelinate Preferred Tracts. *J Neurosci* **31**, 6809–6819.
- Tsai H-H, Frost E, To V, Robinson S, Ffrench-Constant C, Geertman R, Ransohoff RM & Miller RH (2002). The chemokine receptor CXCR2 controls positioning of oligodendrocyte precursors in developing spinal cord by arresting their migration. *Cell* **110**, 373–383.
- Tsai H-H, Macklin WB & Miller RH (2006). Netrin-1 Is Required for the Normal Development of Spinal Cord Oligodendrocytes. *J Neurosci* **26**, 1913–1922.
- Tsai H-H, Niu J, Munji R, Davalos D, Chang J, Zhang H, Tien A-C, Kuo CJ, Chan JR, Daneman R & Fancy SPJ (2016). Oligodendrocyte precursors migrate along vasculature in the developing nervous system. *Science* **351**, 379–384.
- Tsai H-H, Tessier-Lavigne M & Miller RH (2003). Netrin 1 mediates spinal cord oligodendrocyte precursor dispersal. *Development* **130**, 2095–2105.

V

- Vallstedt A, Klos JM & Ericson J (2005). Multiple dorsoventral origins of oligodendrocyte generation in the spinal cord and hindbrain. *Neuron* **45**, 55–67.
- Vassalli JD, Sappino AP & Belin D (1991). The plasminogen activator/plasmin system. *J Clin Invest* **88**, 1067–1072.
- Volpi VG, Touvier T & D'Antonio M (2017). Endoplasmic reticulum protein quality control failure in myelin disorders. *Front Mol Neurosci*; DOI: 10.3389/fnmol.2016.00162.

W

- Wake H, Lee PR & Fields RD (2011). Control of local protein synthesis and initial events in

- myelination by action potentials. *Science (80-)* **333**, 1647–1651.
- Warf B, Fok-Seang J & Miller R (1991). Evidence for the ventral origin of oligodendrocyte precursors in the rat spinal cord. *J Neurosci* **11**, 2477–2488.
- Weimar W, Stibbe J, Van Seyen AJ, Billiau A, De Somer P & Collen D (1981). SPECIFIC LYSIS OF AN ILIOFEMORAL THROMBUS BY ADMINISTRATION OF EXTRINSIC (TISSUE-TYPE) PLASMINOGEN ACTIVATOR. *Lancet* **318**, 1018–1020.
- Wight PA & Dobretsova A (2004). Where, when and how much: Regulation of myelin proteolipid protein gene expression. *Cell Mol Life Sci* **61**, 810–821.
- Willard HF & Riordan JR (1985). Assignment of the gene for myelin proteolipid protein to the X chromosome: Implications for X-Linked myelin disorders. *Science (80-)* **230**, 940–942.
- Wolf NI, Sistermans EA, Cundall M, Hobson GM, Davis-Williams AP, Palmer R, Stubbs P, Davies S, Endziniene M, Wu Y, Chong WK, Malcolm S, Surtees R, Garbern JY & Woodward KJ (2005). Three or more copies of the proteolipid protein gene PLP1 cause severe Pelizaeus-Merzbacher disease. *Brain* **128**, 743–751.
- Won S, Lee JK & Stein DG (2015). Recombinant tissue plasminogen activator promotes, and progesterone attenuates, microglia/macrophage M1 polarization and recruitment of microglia after MCAO stroke in rats. *Brain Behav Immun* **49**, 267–279.
- Wyss MT, Jolivet R, Buck A, Magistretti PJ & Weber B (2011). In Vivo evidence for lactate as a neuronal energy source. *J Neurosci* **31**, 7477–7485.

Y

- Yamada M, Jung M, Tetsushi K, Ivanova A, Nave KA & Ikenaka K (2001). Mutant PLP/DM20 cannot be processed to secrete PLP-related oligodendrocyte differentiation/survival factor. *Neurochem Res* **26**, 639–645.
- Yamada T, Placzek M, Tanaka H, Dodd J & Jessell TM (1991). Control of cell pattern in the developing nervous system: polarizing activity of the floor plate and notochord. *Cell* **64**, 635–647.
- Yeung MSY, Zdunek S, Bergmann O, Bernard S, Salehpour M, Alkass K, Perl S, Tisdale J, Possnert G, Brundin L, Druid H & Frisén J (2014). Dynamics of oligodendrocyte generation and myelination in the human brain. *Cell* **159**, 766–774.
- Yool D, Klugmann M, Barrie JA, McCulloch MC, Nave K-A & Griffiths IR (2002). Observations on the structure of myelin lacking the major proteolipid protein. *Neuropathol Appl Neurobiol* **28**, 75–78.
- Yu WP, Collarini EJ, Pringle NP & Richardson WD (1994). Embryonic expression of myelin genes: Evidence for a focal source of oligodendrocyte precursors in the ventricular zone of the neural tube. *Neuron* **12**, 1353–1362.

Z

- Zalc B, Goujet D & Colman D (2008). The origin of the myelination program in vertebrates. *Curr Biol CB* **18**, R511--512.
- Zeisel A, Muñoz-Manchado AB, Codeluppi S, Lönnerberg P, La Manno G, Juréus A, Marques S, Munguba H, He L, Betsholtz C, Rolny C, Castelo-Branco G, Hjerling-Leffler J & Linnarsson S (2015). Brain structure. Cell types in the mouse cortex and hippocampus revealed by single-cell RNA-seq. *Science* **347**, 1138–1142.
- Zeman W, Demyer W & Falls HF (1964). Pelizaeus-merzbacher disease. *J Neuropathol Exp Neurol* **23**, 334–354.
- Zhang L, Zhang ZG, Buller B, Jiang J, Jiang Y, Zhao D, Liu X, Morris D & Chopp M (2010). Combination treatment with VELCADE and low-dose tissue plasminogen activator provides potent neuroprotection in aged rats after embolic focal ischemia. *Stroke* **41**, 1001–1007.
- Zhang SC (2001). Defining glial cells during CNS development. *Nat Rev Neurosci* **2**, 840–843.
- Zhang Y, Chen K, Sloan SA, Bennett ML, Scholze AR, O’Keefe S, Phatnani HP, Guarnieri P, Caneda C, Ruderisch N, Deng S, Liddelow SA, Zhang C, Daneman R, Maniatis T, Barres BA & Wu JQ (2014). An RNA-Sequencing Transcriptome and Splicing Database of Glia, Neurons, and Vascular Cells of the Cerebral Cortex. *J Neurosci* **34**, 11929–11947.
- Zuchero JB, Fu M, Sloan SA, Ibrahim A, Olson A, Zaremba A, Dugas JC, Wienbar S, Caprariello A V, Kantor C, Leonoudakis D, Lariosa-Willingham K, Kronenberg G, Gertz K, Soderling SH, Miller RH & Barres BA (2015). CNS myelin wrapping is driven by actin disassembly. *Dev Cell* **34**, 152–167.

Autres travaux

Autoimmune encephalitis mediated by B-cell response against *N*-methyl-D-aspartate receptor

Isabelle **Wagnon**¹, Pauline **Hélie**¹, Isabelle **Bardou**¹, Caroline **Regnaud**¹, Lesec **Léonie**¹, Jérôme **Leprince**², Mikaël **Naveau**³, Barbara **Delaunay**¹, Olivier **Toutirais**^{1,4}, Brigitte **Lemauff**^{1,4}, Olivier **Etard**^{5,6}, Denis **Vivien**^{1,7}, Véronique **Agin**¹, Richard **Macrez**^{1,8}, Eric **Maubert**¹ and Fabian **Docagne**¹

AQ1

Anti-*N*-methyl-D-aspartate receptor (NMDAR) encephalitis is a neuropsychiatric disease characterized by an antibody-mediated autoimmune response against NMDAR. Recent studies have shown that anti-NMDAR antibodies are involved in the pathophysiology of the disease. However, the upstream immune and inflammatory processes responsible for this pathogenic response are still poorly understood. Here, we immunized mice against the region of NMDA receptor containing the N368/G369 amino acids, previously implicated in a pathogenic response. This paradigm induced encephalopathy characterized by blood–brain barrier opening, periventricular T₂-MRI hyperintensities and IgG deposits into the brain parenchyma. Two weeks after immunization, mice developed clinical symptoms reminiscent of encephalitis: anxiety- and depressive-like behaviours, spatial memory impairment (without motor disorders) and increased sensitivity to seizures. This response occurred independently of overt T-cell recruitment. However, it was associated with B220⁺ (B cell) infiltration towards the ventricles, where they differentiated into CD138⁺ cells (plasmocytes). Interestingly, these B cells originated from peripheral lymphoid organs (spleen and cervical lymphoid nodes). Finally, blocking the B-cell response using a depleting cocktail of antibodies reduced the severity of symptoms in encephalitis mice. This study demonstrates that the B-cell response can lead to an autoimmune reaction against NMDAR that drives encephalitis-like behavioural impairments. It also provides a relevant platform for dissecting encephalitogenic mechanisms in an animal model, and enables the testing of therapeutic strategies targeting the immune system in anti-NMDAR encephalitis.

- 1 Normandie Univ, UNICAEN, INSERM, U1237, PhIND “Physiopathology and Imaging of Neurological Disorders”, Institut Blood and Brain at Caen-Normandie, Cyceron, Caen, France
- 2 Normandie Univ, UNIROUEN, INSERM, U1239, Neuronal and Neuroendocrine Differentiation and Communication, Rouen, France
- 3 Normandie Univ, UNICAEN, CNRS UMS 3408, Cyceron, Caen, France
- 4 Department of Immunology, Caen University Hospital, CHU Caen, Caen, France
- 5 Normandie Univ, UNICAEN, ISTS, EA 7466, Cyceron, Caen, France
- 6 Service des explorations fonctionnelles du système nerveux, CHU de Caen, Caen, France
- 7 Department of Clinical Research, Caen University Hospital, CHU Caen, Caen, France
- 8 Emergency Department, Caen University Hospital, CHU Caen, Caen, France

Correspondence to: Fabian Docagne, PhD
InsERM U1237, PhIND, Institut BB@C, Centre Cyceron, BP5229, 14074 Caen Cedex, France
Email: docagne@cyceron.fr

AQ5

Keyword:**Abbreviation:** NMDAR = *N*-methyl-d-aspartate receptor

Received July 29, 2019. Revised May 6, 2020. Accepted June 29, 2020.

© The Author(s) (2020). Published by Oxford University Press on behalf of the Guarantors of Brain. All rights reserved.
For permissions, please email: journals.permissions@oup.com

Introduction

Anti-N-methyl-D-aspartate receptor (NMDAR) encephalitis is a neuropsychiatric disorder first characterized by the Josep Dalmau's group (Dalmau *et al.*, 2008). Tumours (mostly ovarian teratomas) (Dalmau *et al.*, 2008) and herpes simplex encephalitis (Nosadini *et al.*, 2017) are the two main triggers of the disease. It affects 1.5 per million individuals every year. Its presentation is variable among patients and includes psychiatric disturbances (hallucination, confusion, and psychosis), cognitive impairments (deficits in executive functions and memory (Finke *et al.*, 2012), epileptic seizures (Dalmau *et al.*, 2008; Vincent and Bien, 2008; Irani *et al.*, 2010; Geis *et al.*, 2019) or sleep disturbance (DeSena *et al.*, 2014). The associated encephalopathy can lead to movement disorder, autonomic dysfunction, hypoventilation and, in some cases, coma (Dalmau *et al.*, 2008; Irani *et al.*, 2010).

AQ2

This disease is closely associated with the presence of autoreactive antibodies against NMDAR in the CSF and serum of patients (Gresa-Arribas *et al.*, 2014; Hara *et al.*, 2018), although they may not be the only antibodies to be causative. The autoimmune nature of this disease is supported by the detection of inflammatory infiltrates, including B cells and CD138⁺ antibody-secreting cells (CD138⁺), in perivascular, interstitial, and Virchow-Robin spaces of post-mortem patient brains (Martinez-Hernandez *et al.*, 2011). These infiltrates are considered responsible for the intrathecal production of autoreactive antibodies.

Further studies have shown that these antibodies disrupt the interaction of NMDAR with partner transmembrane proteins, such as Ephrin B2 receptors, which govern their presence at the synapse (Mikasova *et al.*, 2012). When this interaction is lost, NMDAR are internalized and their synaptic density drops. This leads to perturbation of synaptic transmission and surface dynamics of NMDAR (Jézéquel *et al.*, 2017) and may explain the observed symptoms. To promote these effects, the autoreactive anti-NMDAR antibodies recognize a portion of the amino-terminal domain of NMDAR that comprises the critical amino acids asparagine and glycine at position 368/369 of the protein (Gleichman *et al.*, 2012).

This crucial role of NMDAR antibodies in the pathogenesis of the disease was recently highlighted in an animal model where pooled CSFs from anti-NMDAR encephalitis patients were injected directly into the CSF of mice (Planagumà *et al.*, 2015). Behavioural deficits were observed, reminiscent of the human disease: spatial memory deficits, anhedonia and depressive-like behaviour. An increased sensitivity to pharmacologically-induced seizures, relevant to the epileptic phenotype of the human disease, was also reported (Wright *et al.*, 2015). Given the nature of this experimental paradigm, the autoimmune processes responsible for the production of autoreactive anti-NMDAR antibodies were not addressed in these previous studies.

In the present study, we induced in mice an active immunization against the portion of NMDAR involved in the

human pathology. This led to the production of autoreactive anti-NMDAR antibodies in the circulation and the CSF. We report a pathological frame providing an immune-mediated model of anti-NMDAR encephalitis in which behavioural and cognitive impairments arose in combination with encephalopathy. Importantly, these pathological events occurred in a context of autoimmune, B-cell mediated response triggering the CNS.

Materials and methods

Animals

Eight-week-old male C57BL/6J (25–30 g) (Janvier labs) were housed in our central animal house (CURB: centre universitaire de ressources biologiques, Caen University) at a controlled temperature ($21 \pm 1^\circ\text{C}$) and humidity ($55 \pm 10\%$) in 12-h inverted light cycle (light period: 7 pm–7 am) with food and water *ad libitum*. Animals were weighed daily during the protocols. Health status was controlled and provided by the CURB. All experiments were performed during the dark phase. Animals were habituated to the experimental room for 30 min before each experiment. All procedures were performed according to official guidelines under approval of institutional ethics committee (Comité Normand d'éthique en matière d'expérimentation animale, CeNomExA. Project licence number #11904) in accordance with the European directive N° 2010/63/UE. The experiments were performed and reported in accordance to the ARRIVE guideline.

Experimental group allocation

Animals were randomly allocated to experimental group: each cage was given a letter by an individual not associated with the experiments. The experimenter was blinded to experimental groups until the end of the protocol. For ethical considerations, each cage contained animals from the same group in order to avoid mixing potentially sick animals with animals in which the disease is milder or absent and exposing them to harmful conditions (fights, competition for dominance, access to food etc. with animals in a better health condition). The order in which the animals in the different experimental groups were treated and assessed was also determined in a random way at the beginning of the protocol. Correspondence between letters and experimental groups was revealed to the experimenter after all analyses were performed.

Statistical analyses

Results are presented as the mean \pm standard deviation (SD). Sample size are indicated in the text for each group and protocol. Normality test were performed on all sample with a Shapiro-Wilk test. If normality was assumed, we used Student's *t*-test. When normality could not be assumed, we used a non-parametric test (Wilcoxon for paired sample compared; Mann-Whitney U-test to compare two independent samples). All analyses were performed with Statistica PRO[®] software

AQ11

Autoimmune encephalitis mediated

BRAIN 2020: Page 3 of 16 | 3

version 13.3 and StatView[®]. *P* values are given in the text (results) for each individual experiment.

Peptide design

Previous reports (Gleichman *et al.*, 2012) have determined that the N368 and G369 amino acids on GluN1 are crucial for binding and subsequent effects of encephalitis antibodies on NMDAR. Our approach was to design a peptide that would recognize this region. To assess the theoretical immunogenicity of peptides included in GluN1, we used the BepiPred linear epitope prediction method (Immune Epitope Data Base and Analysis Resource, www.iedb.org). This algorithm predicts the immunogenicity of peptide based on the properties of its amino acids: presence/absence of an aromatic cycle, amino acid weight, chemical properties (acidic or basic), and length of the peptide. A score was given to each peptide from 0 (lowest immunogenicity) to 1 (highest immunogenicity). A negative score indicates theoretical non-immunogenicity.

Active immunization

Autoimmune response was induced on 8-week-old male C57BL/6J mice (Janvier lab) via subcutaneous injection of 200 µg of selected peptide (GluN1₃₅₉₋₃₇₈ peptide or GluN1₁₆₈₋₁₈₇ control peptide) in an emulsion mixture (volume ratio 1:1) of complete Freund's adjuvant (Sigma Aldrich Laboratories) containing 600 µg of heat-killed *Mycobacterium tuberculosis* H37Ra (Difco). For sham animals, the immunogenic peptide was replaced with 200 µl of saline. The emulsion was administered in four injections of 50 µl: two at shoulders and two at limbs. All animals were intraperitoneally injected with 200 ng of *Bordetella pertussis* toxin (Sigma Aldrich) in 200 µl of saline at the time of immunization, and at 48 h after immunization.

Experimental design

After immunization with the GluN1₃₅₉₋₃₇₈ or the GluN1₁₆₈₋₁₈₇ control peptide, mice were subjected to one different behavioural test every day in the following order: actimetry, Y-maze, O-Maze, swimming test, starting 1 or 2 weeks after immunization, depending on the experiment. Tissue and fluids were collected on the last day of the series of behavioural tests.

Detection of anti-NMDAR antibodies

Presence of NMDAR antibodies in serum was determined at the end of the first or second week post-immunization (as indicated in corresponding figure legends) by using HEK293 cell-based assay expressing GluN1a and GluN2b subunits. HEK293 were transfected with a mixture of pcDNA3-GluN1a and pcDNA3-GluN2b plasmids (2 µg of each) using the lipofection method (Lipofectamine[®], Life Technologies). Cells were fixed with 4% paraformaldehyde (20 min, room temperature), permeabilized with PBS 0.1M-0.3% Triton[™] X-100 (Sigma Aldrich) and blocked with bovine serum albumin 4% (Sigma Aldrich) (1 h, room temperature). HEK293 were incubated with sera extracted from immunized mice at different dilutions (1:10; 1:40; 1:100; 1:1000; 1:2000; 1:3000) (overnight, 4°C). Rabbit anti-GluN1 antibody (ab9058; 1:800; Abcam) was used as positive

transfection control. The next day, cells were washed and incubated with F(ab')₂ fragments of donkey anti-mouse IgG (H + L), or anti-rabbit (1:800; Jackson ImmunoResearch) (1 h 30 min, room temperature).

Behavioural tasks

All behavioural tests were assessed by researcher blinded to experimental condition using standardized tests. Behavioural tests were aimed to assess spatial memory (Y-maze), anxiety-like behaviour (O-maze), depressive-like behaviour (swim forced test) and spontaneous locomotor activity (horizontal and vertical assessment).

O-maze

Anxious-like phenotype of mice was assessed by the elevated zero-maze (O-maze) (Cryan and Holmes, 2005). Behaviour in the O-maze reflects a conflict ('approach-avoidance') between the rodent's preference for protected areas and their innate motivation to explore novel environments. The apparatus (BMP Chaudronnerie) was a black circular PVC corridor (61 cm in diameter, 10 cm path width, 70 cm above floor level), which was equally divided into two opposite open quadrants and two opposite enclosed ones (15-cm high side walls). Each mouse was placed in the centre of a randomly chosen closed quadrant, and was then allowed to explore freely the maze during a 5-min period. Anxiety-like behaviour was assessed by the quantification of the time spent in the open quadrants.

Y-maze

To assess cognitive functions, we used a two-trial place recognition task previously developed to study spatial cognition processes in rats and mice (Kraeuter *et al.*, 2019). The standard Y-maze used in this study consisted of white plastic with three identical arms (BMP Chaudronnerie). Extra-maze distal cues were suspended on the black curtains of the room walls at 123 cm from the maze (from the top of the cues to the centre of the maze). The behavioural procedure consisted in two trials separated by a 2.5-h intertrial interval. During the acquisition phase (trial 1), one randomly-chosen arm of the Y-maze was closed with a guillotine door. Each mouse was then placed in the start arm (Arm 1), the head facing away from the centre of the maze, and allowed to freely visit the accessible parts of the maze (Arm 1/Arm 2) for 5 min. At the end of the trial, the labelled mouse was then replaced in its home cage. To exclude possible anxiety-related states towards the apparatus, we verified that the total number of visits in arms 1 and 2 of the Y-maze was similar between GluN1 immunized mice and sham mice, and that both groups visited the Arm 1 as often as the Arm 2. During the test phase (trial 2), animals had free access to all three arms (Arm 1/Arm 2/New arm) for 1 min. Spatial performance was assessed through the comparison of the number of visits made in each arm.

Forced swim test

The forced swim test was used to assess depressive-like behaviour (Slattery and Cryan, 2012). Mice were individually placed into a glass cylinder containing warm water (25°C), deep enough to force the mouse to swim. The total trial time was

6 min and immobilization time measurement began from the second minute. Immobilization time was defined as the time that animal stop swimming and start floating with its head above the water. This test is considered to reflect behavioural despair.

Actimetry

Spontaneous locomotor activity was quantified by using a rack of eight activity cages equipped with horizontal infrared beams located across the long axis of the cage (Imetronic®). Mice were placed in individual acrylic chambers (30 × 20 × 20 cm) for 30 min. The number of horizontal movements was determined by breaks in movement-sensitive photo-beams that were then converted into locomotor activity counts. This test evaluates the hypo- or hyperactivity.

Pharmacologically-induced seizures

These experiments were performed following a previously described method (Wright et al., 2015). Briefly, a subthreshold injection (40 mg/kg) of pentylenetetrazol (PTZ) (Sigma Aldrich) diluted in 200 µl of saline was intraperitoneally injected in mice 2 weeks after immunization. After injection, mice were individually placed in their experimental cage and recorded for 60 min with a camera. The PTZ's scale (Lüttjohann et al., 2009) was used to assess seizure stage (see PTZ scale in the Supplementary material). Investigator was blinded to experimental groups. Animals were terminated at the end of the experiment for ethical considerations.

MRI

Microparticles of iron oxide (MPIOs) coupled to anti-P-Selectin antibodies were prepared as previously described (Fournier et al., 2017). For MPIO imaging, we used 3D respiration-gated T₂*-weighted gradient with echo imaging with flow compensation (GEFC; spatial resolution of 150 µm × 75 µm × 75 µm interpolated to an isotropic resolution of 75 µm with echo time/repetition time: 8.6/200 ms and a flip angle of 25° (acquisition time = 10 min). Settings for 2D-T₂-high-resolution-weighted multi spin mutli echo (MSME) imaging were: echo time/repetition time, 62.57/2351.68; flip angle 90°; acquisition time 7, 31 min, slice thickness: 0.5; slice separation: 0.5. Settings for 2D-T₂-high resolution FLAIR imaging were: echo time/repetition time: 62.57/4000; flip angle, 90°; acquisition time: 38.24 minutes; slice thickness, 4.5; slice separation, 4.5.

AQ6
AQ7

In vivo vascular permeability

Mice received an intravenous injection of 200 µl of 2% Evan's blue solution in saline and were left awake in their cage for 4 h. Brains were extracted after perfusion and placed in optical imaging (Biospace™), and Evan's blue fluorescence was measured (excitation 650 nm and emission filter 700 nm). Fluorescence was quantified with M3 Vision software (Biospace).

CSF protein dosage

Total protein concentration was measured in CSF samples (2 µl) by measuring their absorbance at 280 nm on a Nanodrop™ spectrophotometer (Thermo Scientific).

Tissue processing

Mice were deeply anaesthetized and perfused with cold heparinized saline until total blood removal. For histology, mice were then perfused with a 150 ml solution of 2% paraformaldehyde and 0.2% picric acid. Next, brain, spleen and cervical lymph node were extracted and cryoprotected in four successive 20% sucrose baths for 24 h at 4°C. Organs were included in Tissue-Tek (Miles scientific) and conserved at -80°C. Cryomicrotome-cut axial slice (8–10 µm) were collected on poly-lysine slides (Thermo scientific) and stored at -80°C before processing.

Immunostaining

Sections were co-incubated overnight at room temperature with the following antibodies: Rabbit anti-laminin or chicken anti-laminin (1:1500; Abcam), rat anti-CD4 (1:25; eBiosciences), rat anti-CD8 (1:25; eBiosciences), sheep anti-fibrinogen serum, rat anti CD45R/B220 (RA3-6B2) (1:800; Invitrogen), rabbit anti-syndecan-1 (1:800; Abcam) or sheep anti-TTR (ab9015) (Abcam; 1:1000). Primary antibodies were revealed by using AffiniPure F(ab')₂ fragment IgGs conjugated to Alexa⁴⁸⁸, Cy3 or Alexa⁶⁴⁷ at 1:800 (Jackson ImmunoResearch). Next, sections were coverslipped with antifade medium containing DAPI. Assessment of neurodegeneration was performed by Fluoro-Jade® C staining (Schmued et al., 2005).

Microscopy

Images were digitally captured on a Leica DM6000 microscope coupled to Coolsnap camera, visualized with Metavue software (Version 5.0; Molecular Devices), and further processed by using ImageJ software (Version 1.49e; NIH). All analyses were performed blinded to the experimental groups.

Dot-blot

A recombinant peptide corresponding to the N-Terminal part of GluN1 was blotted on a nitrocellulose membrane for 1 h at room temperature until the blots were dry. The membrane was then blocked with 2% bovine serum albumin in TTBS (50 mM Tris, 0.5 M NaCl, 0.05% Tween-20, pH 7.4) for 1 h at room temperature. The membrane was then incubated for 1 h at room temperature in TTBS with CSF from sham or GluN1³⁵⁹⁻³⁷⁸ mice, or with Glunomab® (Lesept et al., 2016) an anti-GluN1 antibody as a positive control. The membrane was washed three times (10 min each) in TTBS on rocker before incubation with anti-mouse IgG secondary antibody for 1 h at room temperature in TTBS. Membrane was washed again three times (10 min each) in TTBS on rocker. Blots were enhanced for analysis and detection by chemiluminescence agent Thermo Scientific Pierce ECL Plus substrate and data was obtained by ImageQuant LAS 4000 (GE Healthcare Life Sciences).

Calcium video microscopy

Neuron cultures were prepared from embryonic Day 14.5 Swiss mice as previously described (Nicole et al., 2001). Cortices were dissected and dissociated in Dulbecco's modified Eagle medium (DMEM), and cultured in DMEM supplemented with 5% foetal bovine serum, 5% horse serum and 2 mM glutamine on 35 mm dishes with poly-lysine (0.1 mg/ml)/laminin (0.02 mg/ml)

AQ3

coating at 37°C in 5% CO₂. Calcium video-microscopy was performed as previously described (Lesept *et al.*, 2016). Briefly, after 12 days *in vitro*, cultures were transferred into a serum-free HEPES-buffered saline solution and Fura-2-AM (10 µM) was loaded into the cells by incubation at 37°C for 45 min. Cells were then placed at room temperature, on the stage of a Leica DMI6000B inverted microscope equipped with a 150 W Xenon high stability lamp and a Leica 40×, 1.3 numerical aperture epifluorescence oil immersion objective (Wetzlar). Neurons received two consecutive stimulations with NMDA (50 µM, 30 s each) using a peristaltic pump. Neurons were then incubated for 45 min with sera from sham or GluN1₃₅₉₋₃₇₈ and two additional stimulations were performed (50 µM, 30 s each) in order to compare the response to what observed with the first stimulation. Fura-2 ratio images (excitation: 340, 380 nm, emission: 510 nm) were acquired with a Digital CMOS camera (Hamamatsu, ORCA-Flash2.8 C11440-10C) and digitized (2048 × 2048 pixels) using MetaFluor 6.1 software (Universal Imaging Corporation). For each cell, we calculated the area under the curve (AUC) of intracellular calcium influx before (AUC_b) and after treatment (AUC_a) so that each cell is its own control. Results are given as per cent of responsiveness [= [(AUC_a)/(AUC_b)] × 100], which gives a measure of the effect of the treatment with the different sera.

Flow cytometry

Immunophenotyping of leucocytes was performed by flow cytometry from brain, spleen, lymph node and CSF. Cells were isolated using a cell strainer (Ø 40 µm, Falcon). Brain cells were centrifuged through by Percoll gradient (Sigma Aldrich) to remove myelin. Spleen cells were incubated with ammonium chloride to lyse red cell. Then, all sample were incubated with 1 µl of Fc-CD16-32 (BD Pharmingen) for 15 min at 4°C to block non-antigen-specific binding of immunoglobulins. The antibodies used for flow cytometry (all provided by BD Pharmingen and used at 0.2 mg/ml) were: BV421-Rat Anti-mouse CD11b, APC-Rat Anti-mouse CD4, PE-Cy7 Rat Anti-mouse CD8a, FITC Rat Anti-mouse CD45, PE-Cy7 Rat Anti-mouse Ly-6G, APC Hamster Anti-mouse CD11c, 0.2 mg/ml, BV421-Rat Anti-Mouse CD45/B220, APC-Rat Anti-Mouse CD138, APC Rat IgG2a K Isotype Control, PE-Cy7 Hamster Anti-Mouse CD3e, PE-Cy7 Hmaster IgG1, k Isotype Control, FITC Rat Anti-Mouse CD45, BV421 Rat Anti-Mouse CD45R/B220 (BD Horizon 0.2 mg/ml). Experiments were performed on a FACSVerser™ (BD) and analysis was done using with FlowJo™ (7.6.5 version).

B cell depletion

B cells were depleted following a previously described method (Carmi *et al.*, 2015) by the injection of anti-mouse B220 (clone RA3.3A1/6.1, InVivoMab) and anti-mouse CD19 (clone 1D3, InVivoMab). Each antibody was injected intraperitoneally at a dose of 300 µg per injection, once a week for 4 weeks, starting 1 week before active immunization. Control animals were injected in the same manner with 600 µg of an isotype antibody (anti-trinitrophenol IgG2a isotype, clone 2A3, InVivoMab).

Data availability

All data are available upon request by a qualified researcher.

Results

Autoimmune response against GluN1 induces spatial memory impairment and anxiety-like behaviour

The primary objective of this study was to design an animal model reproducing the immune processes occurring in NMDAR encephalitis. To this end, we designed a protocol of active immunization against the region of GluN1 previously implicated in this disease (Gleichman *et al.*, 2012). Our first step was to design an immunogenic peptide including the N368/G369 region of GluN1, crucial for the development of immunoreactivity (Gleichman *et al.*, 2012). We used the BepiPred linear epitope prediction method (www.icdb.org) to assess the theoretical immunogenicity of several peptides encompassing this region of GluN1 (Table 1). The criteria for design was that the peptide would have a high theoretical immunogenicity, and would include the N368/G369 amino acids in a central position. The GluN1₃₅₉₋₃₇₈ peptide (RKL VQVGIYNGTHVIPNDRK) fulfilled these two criteria (Supplementary Table 1) and was thus used for immunization for the rest of the study. We immunized mice with this peptide in an immunogenic adjuvant cocktail typically used to induce a T-cell (Fournier *et al.*, 2017) or B-cell mediated (Whittaker Hawkins *et al.*, 2017; Michel *et al.*, 2019) autoimmune response in mice. We extracted sera from these mice and used them to stain HEK-293 cells transfected with NMDAR subunits, a method classically used to detect circulating anti NMDAR autoantibodies (αNMDAR-Ab) in human diagnosis. This showed that animals immunized with the GluN1₃₅₉₋₃₇₈ peptide, but not sham animals, produced circulating αNMDAR-Ab (Fig. 1).

Then, we addressed whether this autoimmune challenge (Fig. 2A) induces behavioural changes that may reproduce part of the symptoms observed in NMDAR encephalitis. Two weeks after immunization, GluN1₃₅₉₋₃₇₈ immunized mice entered less often ($P = 0.018$) and spent less time ($P = 0.002$) than sham mice in the open arms of the O-maze (Respectively $n = 10$ and $n = 12$; Fig. 2B and C), and showed an increased latency time ($P = 0.00001$) before entering the open arms (Fig. 2D). They also stayed immobile for a longer time than sham mice in the swimming test ($I = 0.0004$, $n = 10$ in each group; Fig. 2E). These two sets of experiments are evocative of an anxious and depressive-like behaviour in GluN1₃₅₉₋₃₇₈ mice. Next, sham and GluN1₃₅₉₋₃₇₈ mice were subjected to the Y-maze test to assess spatial memory. During the acquisition phase, the total number of visits into the two free access arms was equivalent for sham and GluN1₃₅₉₋₃₇₈ mice (see 'Materials and methods' section). During the test phase, sham mice discriminated the newly open arm and the two familiar arms correctly, as they visited significantly more often the new arm than the familiar arms (arms 1 and 2) ($P = 0.028$ and $P = 0.006$,

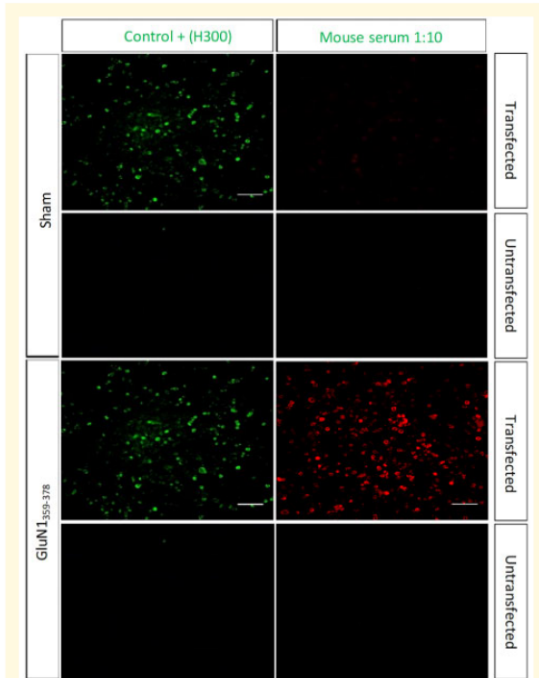


Figure 1 Validation of immunization. Immunostaining of HEK293 cells ($n = 3$) transfected with GluN1a and GluN2B subunits after incubation with serum of sham mice or GluN1359-378 mice (revealed by anti-mouse IgG coupled to Cy3, red), or with a commercial anti-GluN1 antibody (H300, revealed by anti-rabbit IgG coupled to FITC, green). Scale bars =.

AQ9

respectively, $n = 12$; Fig. 2F). This indicates good spatial memory in sham mice. In sharp contrast, GluN1₃₅₉₋₃₇₈ mice failed to discriminate between new and familiar arms, as they visited the new arm significantly less often than the familiar arms ($P = 0.018$ for both, $n = 10$; Fig. 2F). These results reveal a deficit of spatial memory in GluN1₃₅₉₋₃₇₈. Active immunization with a control peptide (Fig. 3A, Supplementary Table 2) did not induce any behavioural changes in the O-maze ($P = 0.84$, $P = 0.12$ and $P = 0.67$, respectively; Fig. 3B–D) or in the Y-maze (new arm versus arm 1: $P = 0.007$, new arm versus arm 2: $P = 0.023$; Fig. 3E). Global motor activity (horizontal or vertical) was not influenced by active immunization with GluN1₃₅₉₋₃₇₈ (horizontal: $P = 0.63$, vertical: $P = 0.91$, $n = 10$ in each group; Fig. 2G and H) or with the control peptide (horizontal: $P = 0.73$, vertical $P = 0.91$, $n = 10$ in each group; Fig. 3F and G) as compared to sham mice.

Our next step was to test whether active immunization with GluN1₃₅₉₋₃₇₈ could induce epileptogenic effects, a symptom of human NMDAR encephalitis (Geis et al., 2019) reproduced after passive transfer of NMDAR antibodies in mouse models (Wright et al., 2015). The injection of PTZ

resulted in epileptic like behavioural signs ranging from motionless staring (stage 1) to convulsions (stages 5) (Fig. 4A–F). The number of stage 4 ($P = 0.035$; $n = 10$ in each group, Fig. 4C) and the average cumulative score after 60 min ($P = 0.035$; Fig. 4E) were increased in GluN1₃₅₉₋₃₇₈ mice.

We then assessed the general pathological markers induced by active immunization in GluN1₃₅₉₋₃₇₈ mice. GluN1₃₅₉₋₃₇₈ mice showed diffuse MRI T2-FLAIR hyperintensities in the brain, particularly at perivascular locations (Fig. 5A). GluN1₃₅₉₋₃₇₈ mice also showed an increase in blood–brain barrier permeability, revealed by Evan’s blue extravasation, within the whole brain (Fig. 5B and corresponding quantification: $P = 0.028$, $n = 4$ in each group; Fig. 5C). Protein concentration was increased in the CSF of GluN1₃₅₉₋₃₇₈ mice ($P = 0.029$, $n = 10$ in each group; Fig. 5D), where anti-NMDAR IgG were detected (Fig. 5E). Finally, IgG deposits were observed within the brain parenchyma, around the ventricles and in the hippocampal region (Fig. 5F). These different pathological signs occurred in the absence of positive immunostaining for the neuronal degeneration marker, Fluoro-Jade® C (Fig. 5G).

These data show that the immunization against GluN1₃₅₉₋₃₇₈ induces an autoimmune response that drives structural and behavioural impairments reminiscent of several key aspects of anti-NMDAR encephalitis.

Our next step was to explore whether the antibodies produced by the mice after immunization against GluN1₃₅₉₋₃₇₈ may influence NMDAR function. To this end, we studied the dynamics of Calcium influx into cultured neurons induced by NMDA stimulation by using calcium video-microscopy (Fig. 5H–J). After two reference NMDA-induced spikes ($50 \mu\text{M}$, 30 s), neurons were incubated with the sera from sham or GluN1₃₅₉₋₃₇₈ mice for 45 min. At the end of the incubation period, neurons were stimulated again (two stimulations with $50 \mu\text{M}$ NMDA for 30s). Incubation with serum from GluN1₃₅₉₋₃₇₈ mice strongly reduced the amplitude of NMDA-induced spike, while incubation with serum from sham mice had limited effects (Fig. 5H). The responsiveness compared to the first two peaks (Fig. 5I) and the global calcium response (AUC; Fig. 5J) were strongly reduced after incubation with serum from GluN1₃₅₉₋₃₇₈ mice ($P < 0.00001$) as compared to incubation with serum from sham mice.

Experimental NMDAR autoimmune encephalitis is mediated by a B-cell response

At the histological level, fibrinogen extravasation illustrated the increase in blood–brain barrier permeability in the hippocampal region of GluN1₃₅₉₋₃₇₈ animals (Fig. 6A). To address whether this increase in blood–brain barrier permeability was important for the development of the behavioural impairments, we immunized a series of animals without injecting PTX (Supplementary Fig. 1A). In this case, in which no overt Evan’s blue extravasation could be

AQ8

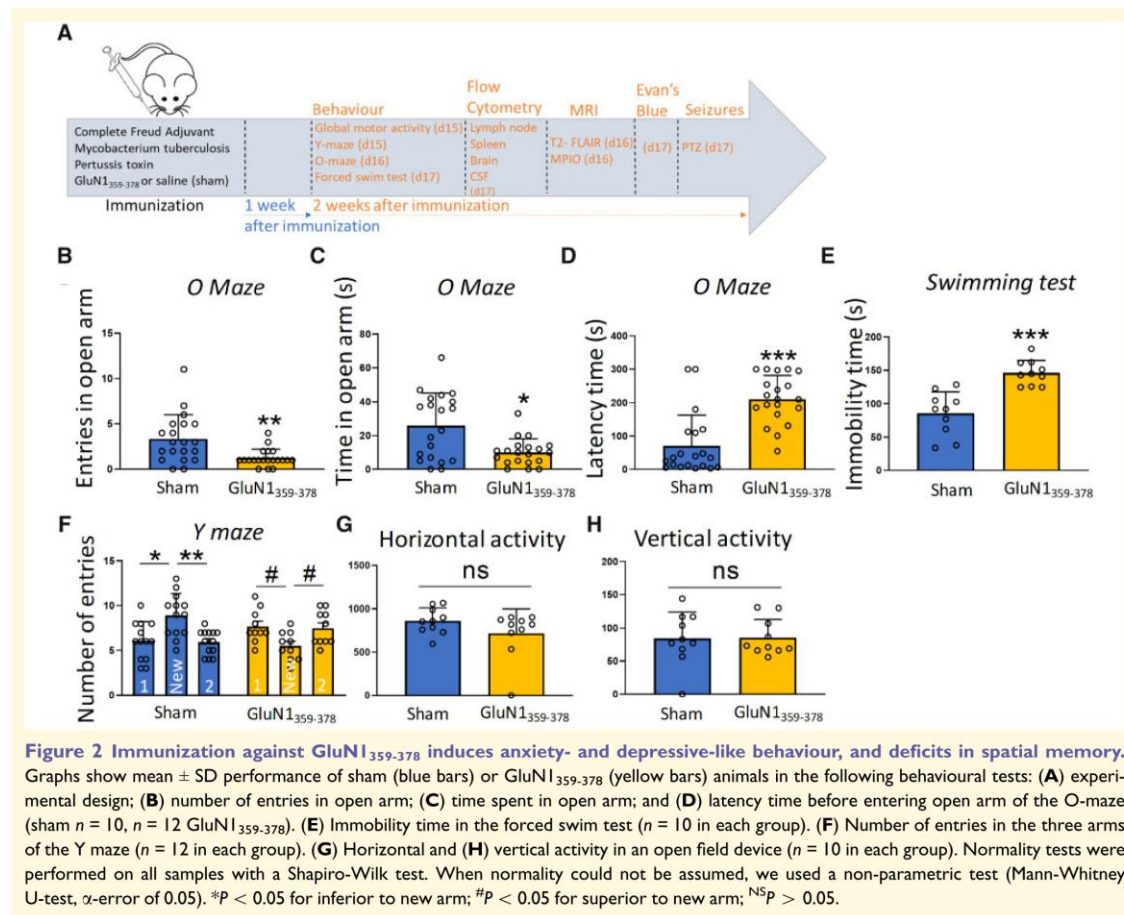
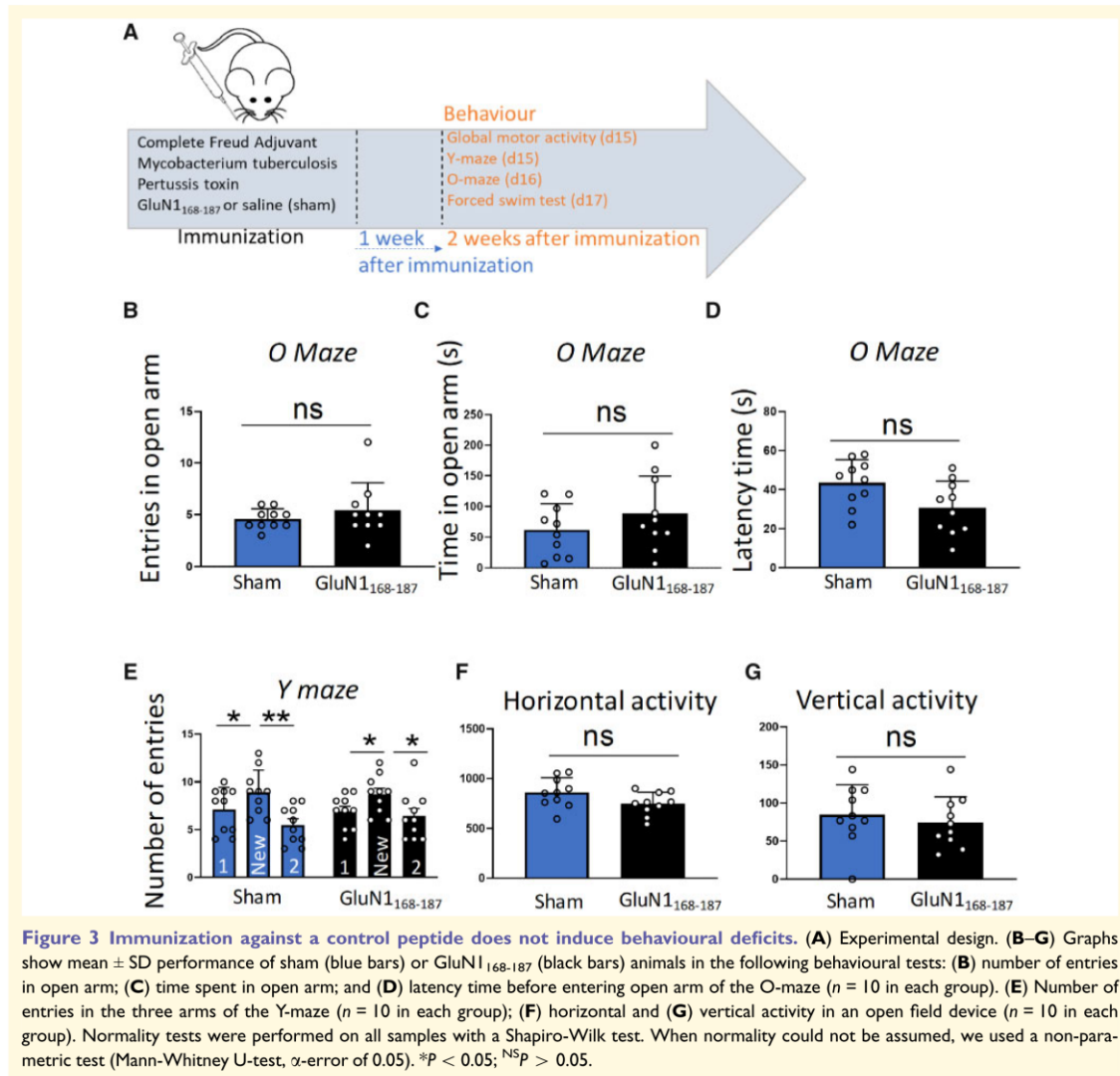


Figure 2 Immunization against GluN1₃₅₉₋₃₇₈ induces anxiety- and depressive-like behaviour, and deficits in spatial memory. Graphs show mean \pm SD performance of sham (blue bars) or GluN1₃₅₉₋₃₇₈ (yellow bars) animals in the following behavioural tests: (A) experimental design; (B) number of entries in open arm; (C) time spent in open arm; and (D) latency time before entering open arm of the O-maze (sham $n = 10$, $n = 12$ GluN1₃₅₉₋₃₇₈). (E) Immobility time in the forced swim test ($n = 10$ in each group). (F) Number of entries in the three arms of the Y maze ($n = 12$ in each group). (G) Horizontal and (H) vertical activity in an open field device ($n = 10$ in each group). Normality tests were performed on all samples with a Shapiro-Wilk test. When normality could not be assumed, we used a non-parametric test (Mann-Whitney U-test, α -error of 0.05). * $P < 0.05$ for inferior to new arm; # $P < 0.05$ for superior to new arm; ^{NS} $P > 0.05$.

observed (Supplementary Fig. 1B), anxiety-like behaviour was absent (Entries: $P = 0.35$, time in open arms: $P = 0.97$, latency time: $P = 0.53$; $n = 10$ in each group; Supplementary Fig. 1C and E) and spatial memory impairments were less marked (new arm versus arm 1: $P = 0.007$, new arm versus arm 2: $P = 0.012$, $n = 15$ in each group; Supplementary Fig. 1F). The increase in blood-brain barrier was not associated with endothelial expression of adhesion molecules, assessed here by molecular MRI for P-selectin (Fig. 6B), in contrast to what observed in other models of CNS-directed autoimmune diseases (Fournier *et al.*, 2017). In line with this, few if any T-cell infiltration was observed at sites of overt blood-brain barrier permeabilization (Fig. 6C), in contrast to what observed in other models of CNS-directed autoimmune diseases such as experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE) (Fig. 6D). This absence of T-cell infiltration was confirmed by flow cytometry from the whole dissociated brain (Fig. 6E and corresponding quantification: CD4: $P = 0.46$, CD8: $P = 0.082$, $n = 5$ (sham) and 6 (GluN1₃₅₉₋₃₇₈); Fig. 6F).

In contrast, a significant increase in B cell population, identified as B220⁺ cells, was observed in the whole dissociated brain of GluN1₃₅₉₋₃₇₈ (Fig. 7A and corresponding quantification: $P = 0.008$, $n = 5$ and 6, respectively; Fig. 7B), reaching $\sim 30\%$ of CD45⁺ leucocytes. Interestingly, B cells were not found within the parenchyma (Fig. 7C), but rather in the meninges (Fig. 7D), ventricles (Fig. 7E), choroid plexus (Fig. 7F) and in the form of cell aggregates (Fig. 7G; Corresponding quantification: meninges: $P = 0.009$, choroid plexus: $P = 0.012$, ventricles: $P = 0.011$, hippocampus: $P = 1$, $n = 5$ in each group; Fig. 7H). In addition, although B cells were rarely found in the CSF of sham animals, their number was increased in the CSF of GluN1₃₅₉₋₃₇₈ animals (Fig. 7I). Further, a substantial number of these cells matured into CD138⁺ cells (plasma cells) (Fig. 7J). In sham animals, the vast majority (87%) of CD45⁺ cells (leucocytes) were CD3⁺ positive cells (T lymphocytes), while within the remaining population of CD3⁻ cells, only 11.4% of cells were B220⁺ (B cells) and 10.4% were CD138⁺ (plasma cells) (Fig. 7K). In contrast, in GluN1₃₅₉₋₃₇₈ mice, only half of CD45⁺ cells

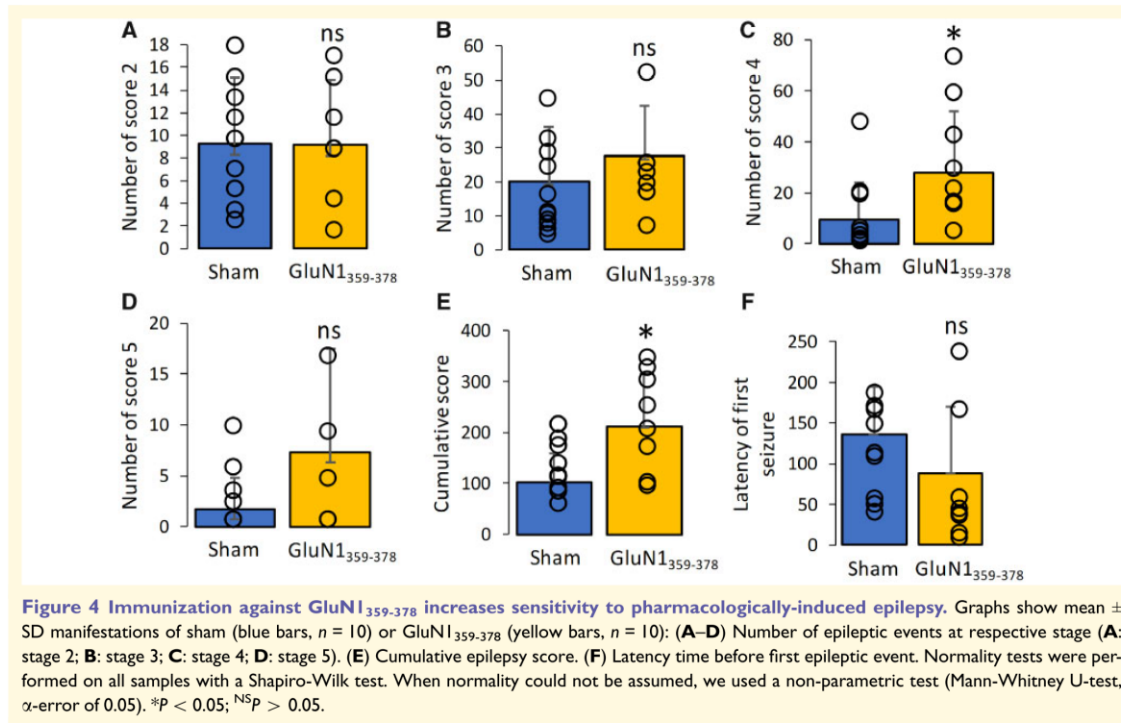


(leucocytes) were CD3⁺ positive cells (T lymphocytes), and within the remaining population of CD3⁺ cells, 33% of cells were B220⁺ (B cells) and 27.2% were CD138⁺ (plasmocytes) (Fig. 7K).

Some changes were observed in the myeloid populations (Supplementary Fig. 2. sham: $n = 5$, GluN1₃₅₉₋₃₇₈: $n = 6$). The LY6G⁺ population (neutrophil phenotype) was increased in the brain ($P = 0.008$), cervical lymph nodes ($P = 0.0035$) and unchanged in the spleen ($P = 0.78$) at Week 2 post-immunization (Supplementary Fig. 2A–C). Most myeloid cells were CD11b⁺/CD11c[−] cells (microglia/macrophages phenotype), while CD11b[−]/CD11c⁺ cells and CD11b⁺/CD11c⁺ cells (dendritic cell phenotypes) were found in low numbers (<1% of leucocytes; Supplementary

Fig. 2D). CD11b⁺/CD11c[−] cells were increased in the brain ($P = 0.013$) and cervical lymph nodes ($P = 0.008$) of GluN1₃₅₉₋₃₇₈ mice (Supplementary Fig. 2D and E), but not in the spleen (Supplementary Fig. 2) at that stage.

Increase in B cells and plasma cells in the CSF was only observed at 2 weeks after immunization, which corresponds to the symptomatic phase of the model. At 1 week after immunization, circulating antibodies were detected with less intensity (Supplementary Fig. 3A) than at 2 weeks post-immunization in GluN1₃₅₉₋₃₇₈ mice, and symptoms were still absent (Supplementary Fig. 3B–E). There was no increase in B cell population in the CSF of GluN1₃₅₉₋₃₇₈ mice as compared to sham animals neither in the whole dissociated brain (Supplementary Fig. 3F and corresponding quantification



Supplementary Fig. 3G) nor in the CSF (Supplementary Fig. 3H and corresponding quantification, Supplementary Fig. 3J), where no CD138^+ plasma cells were detected (Supplementary Fig. 3I and corresponding quantification, Supplementary Fig. 3J).

At 1 week after immunization, B220^+ B cells ($P = 0.03$), CD8^+ T cells ($P = 0.03$) or CD4^+ T cells ($P = 0.03$) were increased in the spleen of $\text{GluN1}_{359-378}$ mice ($n = 6$) as compared to sham mice ($n = 5$) (Supplementary Fig. 4A and E). At 2 weeks after immunization, the number of B cells in the spleen of $\text{GluN1}_{359-378}$ mice went back to the level of sham mice ($P = 0.64$), while the number of T4 ($P = 0.008$) and T8 ($P = 0.008$) cells decreased as compared to sham mice (Supplementary Fig. 4B and F). No difference in B cells ($P = 0.19$) or T cells ($P = 0.11$) were observed in cervical lymph node at 1 week (Supplementary Fig. 4C and G) or 2 weeks (Supplementary Fig. 4D and H) after immunization.

The above data suggested that anti-NMDAR encephalitis in $\text{GluN1}_{359-378}$ mice was mediated by a B-cell response. To verify this hypothesis, we depleted B cells by four injections (one injection every week) of B220 and CD19 antibodies (Carmi *et al.*, 2015) beginning 1 week before active immunization with $\text{GluN1}_{359-378}$ (Fig. 8A). This led to the depletion of B cells and plasmacytes, still observed at the end of the protocol (2 weeks after the last injection of depleting antibodies) (Fig. 8B, C and corresponding quantification,

Fig. 8E), without affecting T-cells (Fig. 8D and corresponding quantification, Fig. 8E).

Our next step was to assess how B-cell depletion affects the behaviour of $\text{GluN1}_{359-378}$ mice. Although B-cell depletion did not affect anxiety-like behaviour [entries: $P = 0.11$, time in open arms: $P = 0.15$ and latency time: $P = 1$, $n = 10$ (isotype) and 9 (depleted); Fig. 8F–H], it reduced depressive-like behaviour, as B-cell-depleted $\text{GluN1}_{359-378}$ mice stayed immobile for a shorter time than isotype-injected $\text{GluN1}_{359-378}$ mice ($P = 0.002$; Fig. 8I) in the swimming test. Y-maze experiments were used to assess whether B-cell depletion may also prevent the spatial memory deficit observed in $\text{GluN1}_{359-378}$ mice. When injected with control isotype, $\text{GluN1}_{359-378}$ mice failed to discriminate between new and familiar arms, as they visited the new arm as often as the familiar arms ($P = 0.13$ and $P = 1$; Fig. 8J). This indicates impairment of spatial memory in isotype-injected $\text{GluN1}_{359-378}$ mice. However, $\text{GluN1}_{359-378}$ mice depleted of B cells recover their ability to discriminate between new and familiar arms, as they visited significantly more often the new arm than the familiar arms ($P = 0.01$ and $P = 0.007$; Fig. 8J). These results indicate that the deficit of spatial memory in $\text{GluN1}_{359-378}$ is prevented when mice are depleted of B cells. Global motor activity (horizontal or vertical) was the same in isotype-injected or B-cell depleted $\text{GluN1}_{359-378}$ mice (Fig. 8K and L), which discards an influence of motor activity in the above observations.

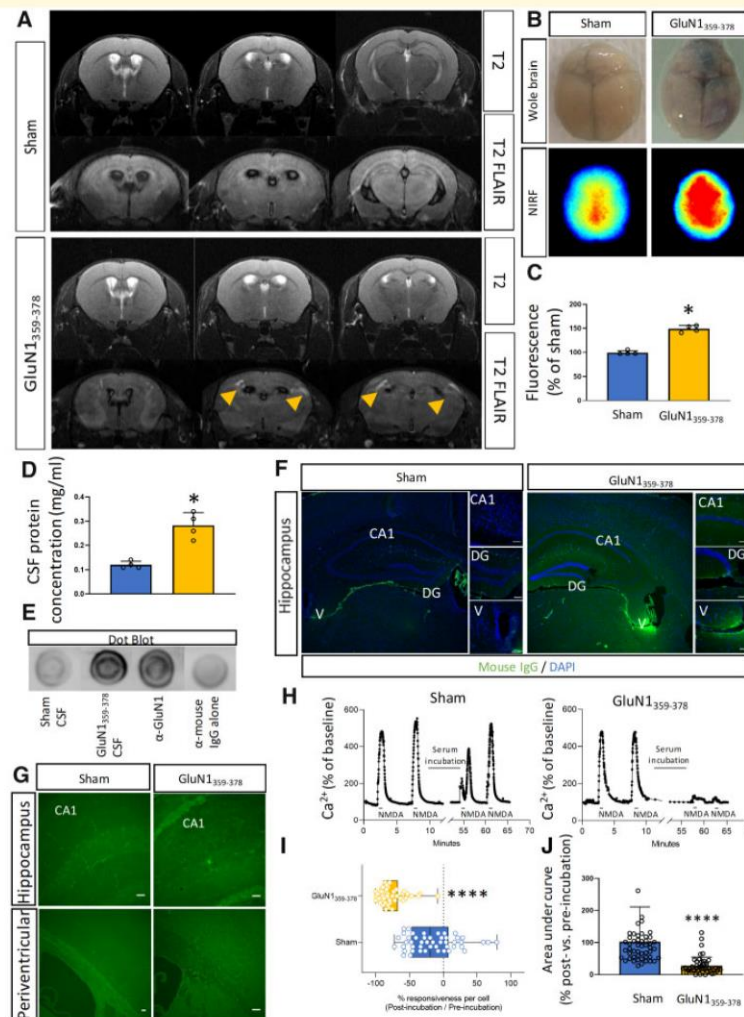


Figure 5 Pathological markers of encephalitis after immunization against GluN1³⁵⁹⁻³⁷⁸. **(A)** Representative images ($n = 5$; nine slices per brain) of T₂-FLAIR MRI of sham and GluN1³⁵⁹⁻³⁷⁸ mice. Arrows show periventricular lesions. **(B)** Representative images; and **(C)** corresponding quantification of fluorescence (mean \pm SD) in brains of sham (blue bars) and GluN1³⁵⁹⁻³⁷⁸ (yellow bars) mice ($n = 4$ in each group) after Evan's blue injection to assess blood–brain barrier integrity. **(D)** Total protein concentration (mean \pm SD) in the CSF of sham (blue bars) and GluN1³⁵⁹⁻³⁷⁸ (yellow bars) mice ($n = 10$ in each group). **(E)** Immunoblotting using CSF from sham GluN1³⁵⁹⁻³⁷⁸ mice to detect the amino-terminal domain of GluN1. Glunomab[®] (Lesept et al., 2016), an antibody directed against GluN1, was used as a positive control. The dot blot was revealed by anti-mouse IgG. Negative control was performed by omitting the primary serum (anti-mouse IgG alone). **(F)** Representative images mice ($n = 3$ in each group, three anatomical sections: caudal, medial, rostral) of immunostaining for mouse IgG in the brain of sham and GluN1³⁵⁹⁻³⁷⁸. **(G)** Representative image of Fluoro-Jade[®] C staining in the brain (hippocampus and perivascular zones) of sham and GluN1³⁵⁹⁻³⁷⁸ mice ($n = 3$ in each group). **(H)** Neurons were stimulated twice with NMDA (50 μ M, 30 s) at times indicated in the figure before and after incubation with serum from sham or GluN1³⁵⁹⁻³⁷⁸ mice. Variations of mean calcium concentration in individual neurons (sham, $n = 48$; GluN1³⁵⁹⁻³⁷⁸ $n = 46$; from three independent experiments) were measured by Fura-2 videomicroscopy and are expressed as percentage of basal level. **(I)** Graphs show percentage of responsiveness of each neuron after serum incubation (comparison of the AUC of calcium peaks after and before serum incubation, see 'Materials and methods' section). **(J)** Graphs show mean \pm SEM AUC of NMDA induced calcium peaks in neurons after incubation with serum from sham or GluN1³⁵⁹⁻³⁷⁸ mice (sham, $n = 48$; GluN1³⁵⁹⁻³⁷⁸, $n = 46$; from three independent experiments). $P < 0.00001$, Mann-Whitney U-test. Scale bar = in **G**.

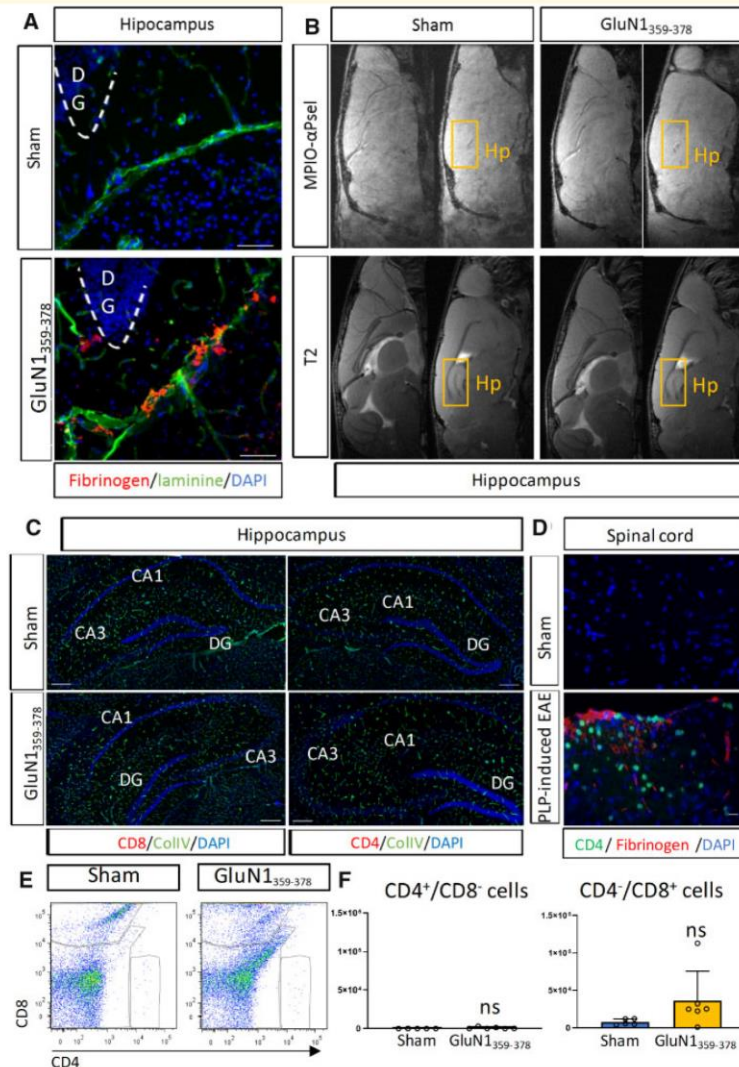


Figure 6 Anti-NMDAR encephalitis occurs without overt T-cell recruitment. **(A)** Photomicrographs show staining for laminin (vessels, green) and fibrinogen (index of blood–brain barrier leakage, red) in the hippocampus of sham and GluN1₃₅₉₋₃₇₈ mice. Nuclei were counterstained with DAPI (blue). DG = dentate gyrus. Scale bar = 50 μ m. Representative image from $n = 3$ in each group. **(B)** MRI images of brains from sham and GluN1₃₅₉₋₃₇₈ mice. *Top*: Molecular imaging after injection of MPIOs coupled to anti-P-selectin antibodies (MPIO- α PSel). *Bottom*: T₂-weighted images. Hp = hippocampus. **(C)** Photomicrographs show staining for Collagen IV (vessels, green), CD4 and CD8 (lymphocytes, red) in the hippocampus of sham and GluN1₃₅₉₋₃₇₈ mice. Nuclei were counterstained with DAPI (blue). DG = dentate gyrus. Scale bar = 150 μ m. Representative image from $n = 3$ in each group. **(D)** Photomicrographs show staining for CD4 (lymphocytes, green) and fibrinogen (index of blood–brain barrier leakage, red) in the spinal cord of sham and PLP-induced EAE mice. Nuclei were counterstained with DAPI (blue). Scale bar = 150 μ m. Representative image from $n = 3$ in each group. **(E)** Flow cytometry for CD4⁺ and CD8⁺ cells (T lymphocytes) from sham and GluN1₃₅₉₋₃₇₈ mouse brains and **(F)** corresponding quantification (sham, $n = 5$; GluN1₃₅₉₋₃₇₈, $n = 6$).

Discussion

This study describes that active immunization of mice against GluN1₃₅₉₋₃₇₈ induces a B-cell-mediated autoimmune

response targeting the CNS. This response features an infiltration of B-cells into the meninges, periventricular spaces and ventricles, where they differentiate into plasmocytes. This reaction is associated with encephalopathy

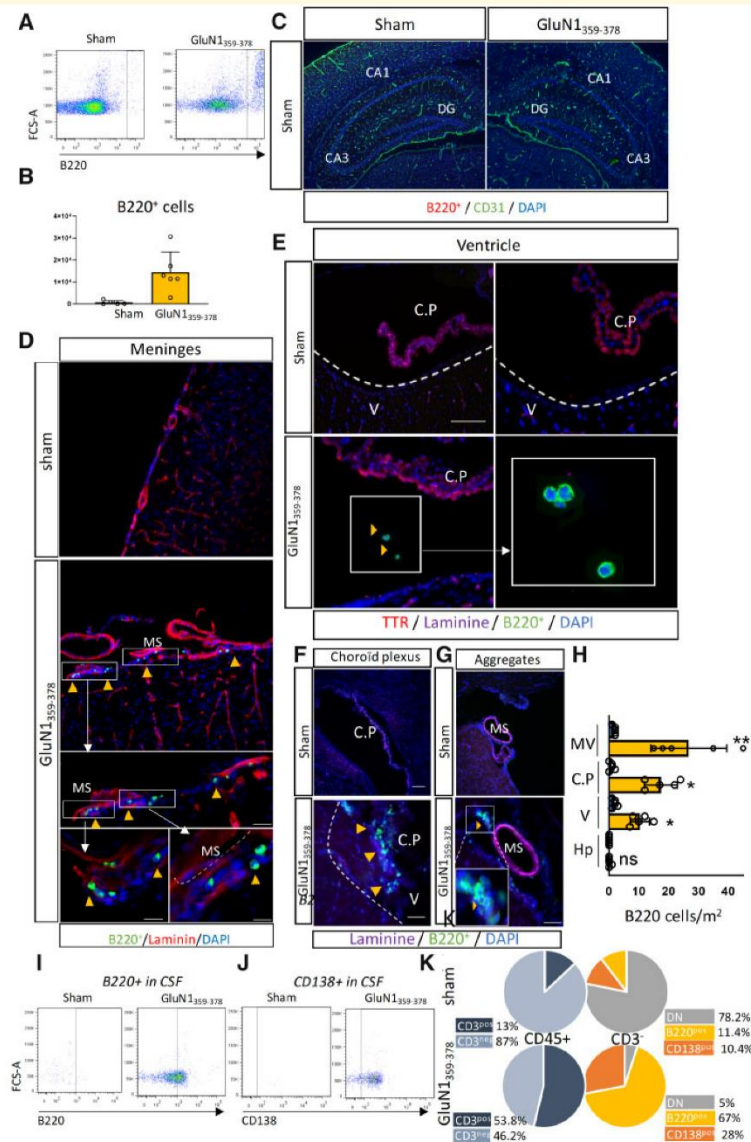
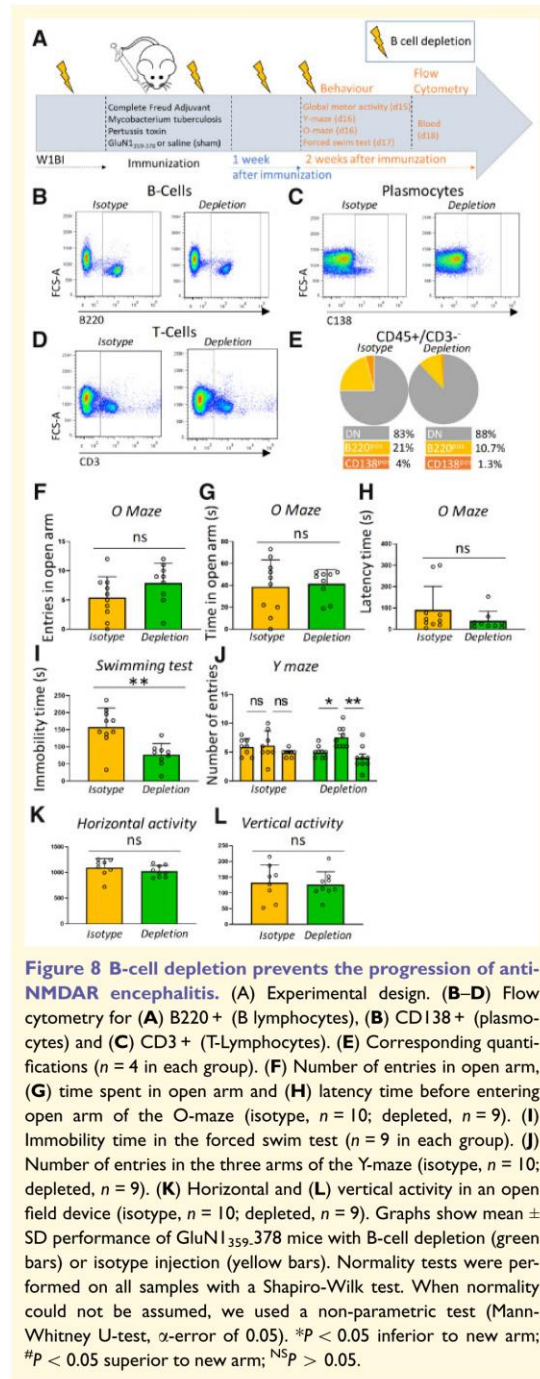


Figure 7 Anti-NMDAR encephalitis occurs with B cell infiltration via leptomeningeal and circumventricular pathways. (A) Flow cytometry for B220⁺ cells (B lymphocytes) from sham and GluN1³⁵⁹⁻³⁷⁸ mouse brains and (B) corresponding quantification ($n = 5$ and 6 , respectively). (C) Photomicrographs show staining for CD31 (vessels, green) and B220 (B lymphocytes, red) in the hippocampus of sham and GluN1³⁵⁹⁻³⁷⁸ mice. Nuclei were counterstained with DAPI (blue). Note the absence of B220⁺ staining. Scale bar = $150 \mu\text{m}$. Representative image from $n = 3$ in each group. (D) Photomicrographs show staining for Laminin (vessels, red) and B220 (B lymphocytes, green) in the meninges of sham and GluN1³⁵⁹⁻³⁷⁸ mice. Nuclei were counterstained with DAPI (blue). Scale bar = $150 \mu\text{m}$ (top) and $20 \mu\text{m}$ (bottom). Representative image from $n = 3$ in each group. (E–G) Photomicrographs show staining for Laminin (vessels, magenta), TTR (choroid plexus, red) and B220 (B lymphocytes, green) in the ventricles (E), choroid plexus (F) and B cell aggregates (G) of sham and GluN1³⁵⁹⁻³⁷⁸ mice. Nuclei were counterstained with DAPI (blue). Scale bar = $150 \mu\text{m}$ (top) and $20 \mu\text{m}$ (bottom). Representative image from $n = 5$ in each group. (H) Corresponding quantification. CP = choroid plexus; Hp = hippocampus; MV = meningeal vessel; V = ventricle. (I–K) Flow cytometry for B220⁺ (B lymphocytes) and CD138⁺ (plasmocytes) and corresponding quantifications ($n = 3$ pools of five CSF in each group).



characterized by blood–brain barrier opening, periventricular FLAIR hyperintensities and IgG deposits. Two weeks after immunization, mice develop cognitive, emotional and

behavioural impairments. This paradigm provides a novel immune-mediated model of anti-NMDAR encephalitis that could be complementary to the existing models (Planagumà *et al.*, 2015; Pan *et al.*, 2019). It should be used in further studies to dissect the autoimmune processes leading to the intrathecal production of these antibodies and the mechanisms of their action. It could also provide a nice platform to test therapeutic strategies targeting the immune system in anti-NMDAR encephalitis.

Mice subjected to this paradigm show symptoms that are reminiscent of human anti-NMDAR encephalitis: memory impairments, anxiety- and depressive-like behaviours, and increased sensitivity to seizures. These symptoms are very similar to those observed in previous works (Planagumà *et al.*, 2015; Wright *et al.*, 2015), despite distinct experimental paradigms. Interestingly, serum from GluN1₃₅₉₋₃₇₈ mice strongly reduced NMDA-induced calcium influx *in vitro*, which supports the relevance of the autoantibodies produced in this model and gives a possible link with the symptoms observed *in vivo*. Overall, it confirms that an immune reaction against NMDAR can lead to adverse effects *in vivo*, whatever the way this reaction is induced: direct injection or infusion of antibodies into the ventricles (Planagumà *et al.*, 2015; Malviya *et al.*, 2017; Taraschenko *et al.*, 2019), stereotactic injection of patient CSF into the parenchyma (Blome *et al.*, 2018), or active immunization, as is the case in the present work.

Interestingly, only anti-NMDAR antibodies from patients, but not from healthy subjects, induce synapse disorganization (Jézéquel *et al.*, 2017) and the effect of CSF from different patients induce variable effects (Blome *et al.*, 2018). This suggests that the epitope targeted by these antibodies is critical. Accordingly, active immunization or injection of anti-NMDA antibodies targeting other epitopes than the one involved in encephalitis have provided beneficial effects in models of brain haemorrhage (Gaberel *et al.*, 2013), ischaemic stroke (Macrez *et al.*, 2011) or multiple sclerosis (Macrez *et al.*, 2016). In the present study, active immunization against the amino acids 168 to 187 of the NMDA receptor—a site of positive regulation of NMDAR function (Lesept *et al.*, 2016)—did not induce any encephalitogenic effects. This observation in our experimental context contrasts with an earlier study describing that human circulating anti-NMDAR antibodies (purified from healthy donors or from patients with schizophrenia, anti-NMDA encephalitis or hypertension) act regardless of their target epitope to induce NMDAR dysfunction (Castillo-Gómez *et al.*, 2017). This previous work may not exhaustively reflect the full variety of epitopes targeted by naturally occurring, autoreactive anti-NMDAR antibodies in humans. Further studies in a larger number of patients may help concluding on this point.

Of note, when injected intravenously in mice, human circulating anti-NMDAR antibodies induce effects on motor activity, but this occurs only when the blood–brain barrier permeability is impaired (Hammer *et al.*, 2014). This underlines the fact that anti-NMDAR antibodies must reach the CNS to induce their deleterious effects. In contrast, some

actions of anti-NMDAR antibodies outside the CNS, such as modulation of endothelial NMDAR activity, can provide beneficial effects in neuroinflammatory context (Macrez et al., 2016). Further studies should address whether anti-NMDAR autoantibodies may interfere with described functions of non-neuronal NMDAR (Hogan-Cann and Anderson, 2016) in animal models of anti-NMDAR encephalitis.

Overall, these different points of discussion indicate that anti-NMDAR antibodies can provide various effects (beneficial, neutral or deleterious) depending on their target epitope, the context (healthy versus neuroinflammation), the localization of their action (intra- versus extra-CNS) or their target cell (neural versus non neural cells).

The behavioural impairments observed in the present study are more pronounced than those reported previously with a different paradigm (Pan et al., 2019): These deficits are multiple (anxiety- and depressive-like behaviours, spatial memory impairment and increased sensitivity to seizures) and they occur spontaneously (in the absence of injection of the NMDA antagonist MK801). These differences could be linked to differences in the experimental design, including the target peptide (a single peptide focusing on N368/G369 versus four different peptides distributed on GluN1 extracellular sequence). Interestingly, one of these four peptides encompasses the same amino acids as the one used in the present study, which may indicate that other factors, besides the epitope, could be relevant in determining the effects of the antibodies, particularly in animal models. Another important difference with this previous study is the age (8–10-week-old mice versus 12-month old mice). This latter parameter is likely to be critical, as the migration of B cells and their ability to produce antibodies is impaired as mice age (Turner and Mabbott, 2017). In line with this, anti-NMDAR encephalitis mostly affects young patients.

In the present study, NMDAR encephalitis is mediated by a B-cell response, without parenchyma infiltration or contribution of T cells. These findings are in contrast with another recent model (Jones et al., 2019) in which mature T cells as well as antibody-producing cells were required for disease induction. A major difference in the study design was the material used for immunization and may explain this dissimilarity in the pathological mechanisms: in this previous study, mice were immunized with GluN1/GluN2B NMDA fully-assembled tetrameric receptors embedded in liposomes, in contrast to the small peptides injected without carriers in the present work. This indicates that different study designs can model NMDA encephalitis with a different respective involvement of B- or T-cell responses. The complementarity of these models gives interesting perspectives for further studies.

In any case, our study confirms the observation that the symptoms can occur in the absence of overt T cell and myeloid cell responses (Pan et al., 2019) and brings an important new element by the description of a B-cell response after active immunization against GluN1. This response is characterized by an increase in the number of B cells in the peripheral lymphoid organs, followed by their migration

towards the meninges, passage to the ventricles and differentiation into plasma cells. The precise mechanisms responsible for B cell migration towards the brain in this model remain to be investigated. Assessing cytokine and chemokine levels may give important clues in this instance. This B-cell response is particularly relevant to the human pathology, as these cells are found in the CSF of patients (Dale et al., 2013). In line with this, the nature of the inflammatory infiltrates is reminiscent of the clinical situation, in which rare T-cell infiltrates are detected (Tüzün et al., 2009) and CD138+ cells are the main component of inflammatory infiltrates (Martinez-Hernandez et al., 2011). These observations have given the basis for the use of anti-B cell therapy using Rituximab®, a monoclonal anti-CD20 antibody (Hohlfeld, 2018). Here, the depletion of B-cells prevented the depression-like symptoms and the impairments in spatial memory observed in GluN1³⁵⁹⁻³⁷⁸ mice. This confirms the central role of B-cell response in the establishment of encephalitis-like symptoms in these mice.

The differentiation of B cell into plasma cells coincides in the ventricles with an increase in protein concentration and the detection of anti-NMDAR IgG in the CSF. This suggests that these plasma cells are responsible for the production of anti-NMDAR autoantibodies. In fact, we detected antibodies within the brain tissue, around the ventricles and in the hippocampus, which suggests that these antibodies diffuse from the ventricles to the tissue, as is the case in previously reported models where antibodies are infused into the ventricles (Planagumà et al., 2015). However, the reduction of deficits observed here in the absence of PTX injection suggests that other mechanisms are important to induce a full behavioural phenotype. PTX targets various mediators of the immune system such TLR4, chemokine receptors or regulatory T cells and induces blood–brain barrier permeation, as confirmed here. This may indicate that one or several of these PTX-mediated effects may be important for the establishment of symptoms, in addition to B-cell mediated processes. The fact that the prevention of behaviour impairments is only partial after both B depletion and PTX omission is in favour of this hypothesis, which should be tested in further studies. Finally, evaluating the respective Ig isotypes found in the CSF, brain and serum could help addressing this point further.

The model described here may provide a useful platform for further studies aimed at testing therapies for anti-NMDAR encephalitis. Given the pathophysiology described in the present work, this model may prove particularly relevant for new therapies targeting B-cells. This may include B-cell directed antibodies, autoantigen specific B cell depleting therapy or B cell receptor signalling inhibition (Musette and Bouaziz, 2018).

Acknowledgements

We would like to thank Antoine Fournier, Marina Rubio, Yannick Hommet, Laurent Lebouvier and Isabelle Bardou for their input to this work.

Funding

I.W., P.H. and C.R. received fellowships from the Regional Council of Normandy. This work was supported by the French ANR (Agence Nationale pour la Recherche).

AQ4

Competing interests

The authors report no competing interests.

Supplementary material

Supplementary material is available at *Brain* online.

References

- Blome R, Bach W, Guli X, Porath K, Sellmann T, Bien CG, et al. Differentially altered NMDAR dependent and independent long-term potentiation in the CA3 subfield in a model of anti-NMDAR encephalitis. *Front Synaptic Neurosci* 2018; 10: 26.
- Carmi Y, Spitzer MH, Linde IL, Burt BM, Prestwood TR, Perlman N, et al. Allogeneic IgG combined with dendritic cell stimuli induce antitumour T-cell immunity. *Nature* 2015; 521: 99–104.
- Castillo-Gómez E, Oliveira B, Tapken D, Bertrand S, Klein-Schmidt C, Pan H, et al. All naturally occurring autoantibodies against the NMDA receptor subunit NR1 have pathogenic potential irrespective of epitope and immunoglobulin class. *Mol Psychiatry* 2017; 22: 1776–84.
- Cryan JF, Holmes A. The ascent of mouse: advances in modelling human depression and anxiety. *Nat Rev Drug Discov* 2005; 4: 775–90.
- Dale RC, Pillai S, Brilof F. Cerebrospinal fluid CD19(+) B-cell expansion in N-methyl-D-aspartate receptor encephalitis. *Dev Med Child Neurol* 2013; 55: 191–3.
- Dalmau J, Gleichman AJ, Hughes EG, Rossi JE, Peng X, Lai M, et al. Anti-NMDA-receptor encephalitis: case series and analysis of the effects of antibodies. *Lancet Neurol* 2008; 7: 1091–8.
- DeSena AD, Greenberg BM, Graves D. 'Light switch' mental status changes and irritable insomnia are two particularly salient features of anti-NMDA receptor antibody encephalitis. *Pediatr Neurol* 2014; 51: 151–3.
- Finke C, Kopp UA, Prüss H, Dalmau J, Wandinger K-P, Ploner CJ. Cognitive deficits following anti-NMDA receptor encephalitis. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 2012; 83: 195–8.
- Fournier AP, Quenault A, Martinez de Lizarrondo S, Gauberti M, Defer G, Vivien D, et al. Prediction of disease activity in models of multiple sclerosis by molecular magnetic resonance imaging of P-selectin. *Proc Natl Acad Sci USA* 2017; 114: 6116–21.
- Gabriel T, Macrez R, Gauberti M, Montagne A, Hebert M, Petersen K-U, et al. Immunotherapy blocking the tissue plasminogen activator-dependent activation of N-methyl-D-aspartate glutamate receptors improves hemorrhagic stroke outcome. *Neuropharmacology* 2013; 67: 267–71.
- Geis C, Planagumà J, Carreño M, Graus F, Dalmau J. Autoimmune seizures and epilepsy. *J Clin Invest* 2019; 129: 926–40.
- Gleichman AJ, Spruce LA, Dalmau J, Seeholzer SH, Lynch DR. Anti-NMDA receptor encephalitis antibody binding is dependent on amino acid identity of a small region within the GluN1 amino terminal domain. *J Neurosci* 2012; 32: 11082–94.
- Gresa-Arribas N, Titulaer MJ, Torrents A, Aguilar E, McCracken L, Leypoldt F, et al. Antibody titres at diagnosis and during follow-up of anti-NMDA receptor encephalitis: a retrospective study. *Lancet Neurol* 2014; 13: 167–77.
- Hammer C, Stepniak B, Schneider A, Papiol S, Tantra M, Begemann M, et al. Neuropsychiatric disease relevance of circulating anti-NMDA receptor autoantibodies depends on blood-brain barrier integrity. *Mol Psychiatry* 2014; 19: 1143–9.
- Hara M, Martinez-Hernandez E, Ariño H, Armangué T, Spatola M, Petit-Pedrol M, et al. Clinical and pathogenic significance of IgG, IgA, and IgM antibodies against the NMDA receptor. *Neurology* 2018; 90: e1386–94.
- Hogan-Cann AD, Anderson CM. Physiological roles of non-neuronal NMDA receptors. *Trends Pharmacol Sci* 2016; 37: 750–67.
- Hohlfeld R. B-cells as therapeutic targets in neuro-inflammatory diseases. *Clin Immunol* 2018; 186: 51–3.
- Irani SR, Bera K, Waters P, Zuliani L, Maxwell S, Zandi MS, et al. N-methyl-D-aspartate antibody encephalitis: temporal progression of clinical and paraclinical observations in a predominantly non-paraneoplastic disorder of both sexes. *Brain* 2010; 133: 1655–67.
- Jézéquel J, Johansson EM, Dupuis JP, Rogemond V, Gréa H, Kellermayer B, et al. Dynamic disorganization of synaptic NMDA receptors triggered by autoantibodies from psychotic patients. *Nat Commun* 2017; 8: 1791.
- Jones BE, Tovar KR, Goehring A, Jalali-Yazdi F, Okada NJ, Gouaux E, et al. Autoimmune receptor encephalitis in mice induced by active immunization with conformationally-stabilized holoreceptors. *Sci Transl Med* 2019; 11: eaaw0044.
- Krauter A-K, Guest PC, Sarnyai Z. The Y-maze for assessment of spatial working and reference memory in mice. *Methods Mol Biol* 2019; 1916: 105–11.
- Lesept F, Chevilly A, Jezequel J, Ladépêche L, Macrez R, Aimable M, et al. Tissue-type plasminogen activator controls neuronal death by raising surface dynamics of extrasynaptic NMDA receptors. *Cell Death Dis* 2016; 7: e2466.
- Lüttjohann A, Fabene PF, van Luijtelaar G. A revised Racine's scale for PTZ-induced seizures in rats. *Physiol Behav* 2009; 98: 579–86.
- Macrez R, Obiang P, Gauberti M, Roussel B, Baron A, Parcq J, et al. Antibodies preventing the interaction of tissue-type plasminogen activator with N-methyl-D-aspartate receptors reduce stroke damages and extend the therapeutic window of thrombolysis. *Stroke* 2011; 42: 2315–22.
- Macrez R, Ortega MC, Bardou I, Mehra A, Fournier A, Van der Pol SMA, et al. Neuroendothelial NMDA receptors as therapeutic targets in experimental autoimmune encephalomyelitis. *Brain* 2016; 139: 2406–19.
- Malviya M, Barman S, Golombek KS, Planagumà J, Mannara F, Strutz-Seeborn N, et al. NMDAR encephalitis: passive transfer from man to mouse by a recombinant antibody. *Ann Clin Transl Neurol* 2017; 4: 768–83.
- Martinez-Hernandez E, Horvath J, Shiloh-Malawsky Y, Sangha N, Martinez-Lage M, Dalmau J. Analysis of complement and plasma cells in the brain of patients with anti-NMDAR encephalitis. *Neurology* 2011; 77: 589–93.
- Michel L, Grasmuck C, Charabati M, Lécuyer M-A, Zandee S, Dhaeze T, et al. Activated leukocyte cell adhesion molecule regulates B lymphocyte migration across central nervous system barriers. *Sci Transl Med* 2019; 11: eaaw0475.
- Mikasova L, De Rossi P, Bouchet D, Georges F, Rogemond V, Didelot A, et al. Disrupted surface cross-talk between NMDA and Ephrin-B2 receptors in anti-NMDA encephalitis. *Brain* 2012; 135: 1606–21.
- Musette P, Bouaziz JB. Cell modulation strategies in autoimmune diseases: new concepts. *Front Immunol* 2018; 9: 622.
- Nosadini M, Mohammad SS, Corazza F, Ruga EM, Kothur K, Perilongo G, et al. Herpes simplex virus-induced anti-N-methyl-d-aspartate receptor encephalitis: a systematic literature review with analysis of 43 cases. *Dev Med Child Neurol* 2017; 59: 796–805.
- Pan H, Oliveira B, Saher G, Dere E, Tapken D, Mitjans M, et al. Uncoupling the widespread occurrence of anti-NMDAR1 autoantibodies from neuropsychiatric disease in a novel autoimmune model. *Mol Psychiatry* 2019; 24: 1489–501.

- Planagumà J, Leypoldt F, Mannara F, Gutiérrez-Cuesta J, Martín-García E, Aguilar E, et al. Human N-methyl D-aspartate receptor antibodies alter memory and behaviour in mice. *Brain* 2015; 138: 94–109.
- Schmued LC, Stowers CC, Scallet AC, Xu L. Fluoro-Jade C results in ultra high resolution and contrast labeling of degenerating neurons. *Brain Res* 2005; 1035: 24–31.
- Slattery DA, Cryan JF. Using the rat forced swim test to assess anti-depressant-like activity in rodents. *Nat Protoc* 2012; 7: 1009–14.
- Taraschenko O, Fox HS, Pittock SJ, Zekeridou A, Gafurova M, Eldridge E, et al. A mouse model of seizures in anti-N-methyl-d-aspartate receptor encephalitis. *Epilepsia* 2019; 60: 452–63.
- Turner VM, Mabbott NA. Ageing adversely affects the migration and function of marginal zone B cells. *Immunology* 2017; 151: 349–62.
- Tüzün E, Zhou L, Baehring JM, Bannykh S, Rosenfeld MR, Dalmau J. Evidence for antibody-mediated pathogenesis in anti-NMDAR encephalitis associated with ovarian teratoma. *Acta Neuropathol* 2009; 118: 737–43.
- Vincent A, Bien CG. Anti-NMDA-receptor encephalitis: a cause of psychiatric, seizure, and movement disorders in young adults. *Lancet Neurol* 2008; 7: 1074–5.
- Whittaker Hawkins RF, Patenaude A, Dumas A, Jain R, Tesfagiorgis Y, Kerfoot S, et al. ICAM1 + neutrophils promote chronic inflammation via ASPRV1 in B cell-dependent autoimmune encephalomyelitis. *JCI Insight* 2017; 2: e96882.
- Wright S, Hashemi K, Stasiak L, Bartram J, Lang B, Vincent A, et al. Epileptogenic effects of NMDAR antibodies in a passive transfer mouse model. *Brain* 2015; 138: 3159–67.

Vascular Tissue-Type Plasminogen Activator Promotes Intracranial Aneurysm Formation

Paul-Emile Labeyrie, MD, MSc*; Romain Goulay, PhD*; Sara Martinez de Lizarrondo, PhD; Marie Hébert, PhD; Maxime Gauberti, PhD; Eric Maubert, PhD; Barbara Delaunay, MSc; Benjamin Gory, MD, PhD; Francesco Signorelli, MD, MSc; Francis Turjman, MD, PhD; Emmanuel Touzé, MD, PhD; Patrick Courthéoux, MD†; Denis Vivien, PhD*; Cyrille Orset, PhD*

Background and Purpose—Although the mechanisms that contribute to intracranial aneurysm (IA) formation and rupture are not totally elucidated, inflammation and matrix remodeling are incriminated. Because tPA (tissue-type plasminogen activator) controls both inflammatory and matrix remodeling processes, we hypothesized that tPA could be involved in the pathophysiology of IA.

Methods—Immunofluorescence analyses of tPA and its main substrate within the aneurysmal wall of murine and human samples were performed. We then compared the formation and rupture of IAs in wild-type, tPA-deficient and type 1 plasminogen activator inhibitor-deficient mice subjected to a model of elastase-induced IA. The specific contribution of vascular versus global tPA was investigated by performing hepatic hydrodynamic transfection of a cDNA encoding for tPA in tPA-deficient mice. The formation and rupture of IAs were monitored by magnetic resonance imaging tracking for 28 days.

Results—Immunofluorescence revealed increased expression of tPA within the aneurysmal wall. The number of aneurysms and their symptomatic ruptures were significantly lower in tPA-deficient than in wild-type mice. Conversely, they were higher in plasminogen activator inhibitor-deficient mice. The wild-type phenotype could be restored in tPA-deficient mice by selectively increasing circulating levels of tPA via hepatic hydrodynamic transfection of a cDNA encoding for tPA.

Conclusions—Altogether, this preclinical study demonstrates that the tPA present in the blood stream is a key player of the formation of IAs. Thus, tPA should be considered as a possible new target for the prevention of IAs formation and rupture. (*Stroke*. 2017;48:2574-2582. DOI: 10.1161/STROKEAHA.117.017305.)

Key Words: animals ■ intracranial aneurysm ■ mice ■ physiopathology ■ tissue plasminogen activator

Intracranial aneurysms (IAs) are brain vascular malformations, with a prevalence of 3% to 5% in the general population.¹⁻³ In most cases, IA causes no symptom and goes unnoticed. However, the rupture of an IA causes a subarachnoid hemorrhage leading to high mortality and disability rates.³ Despite recent therapeutic advances, no reliable non-invasive treatment has proved efficient to prevent aneurysm growth and rupture.⁴⁻⁶ Thus, a better understanding of the pathophysiology of IAs is mandatory to develop new preventive and therapeutic strategies.^{2,6}

Aneurysms originate from a series of events starting with the activation of endothelial cells leading to inflammatory

processes and ultimately to a progressive loss of integrity of the arterial wall.⁷⁻⁹ Some of the actors involved in this cascade of events have been identified, including macrophages, lymphocytes, and their effector molecules (like chemokines and inflammatory cytokines)^{7,10,11} and matrix metalloproteinases (MMPs).¹²

tPA (tissue-type plasminogen activator) is a serine protease expressed and released by endothelial cells, where it displays its fibrinolytic role through activation of plasminogen into plasmin.^{13,14} Interestingly, an increased expression of tPA has been observed in aortic aneurysms.¹⁵⁻¹⁸ Furthermore, the tPA-plasmin axis is well known to promote inflammatory

Received March 20, 2017; final revision received June 8, 2017; accepted July 5, 2017.

From the Department of Physiopathology and Imaging of Neurological Disorders, INSERM U1237, UNICAEN, GIP Cyceron, France (P.-E.L., R.G., S.M.d.L., M.H., M.G., E.M., B.D., E.T., P.C., D.V., C.O.); Department of Interventional Neuroradiology (P.-E.L., B.G., F.T.) and Department of Neurosurgery (F.S.), Hôpital Wertheimer, University Lyon 1, Bron, France; and Department of Neurology (E.T.), Department of Neuroradiology (P.C.), and Department of Clinical Research (D.V.), CHU Caen, University Caen Normandie, France.

Guest Editor for this article was Christoph Kleinschnitz, MD.

*Drs Labeyrie, Goulay, Vivien, and Orset contributed equally.

†Contributing author Patrick Courthéoux passed away in April 2016.

The online-only Data Supplement is available with this article at <http://stroke.ahajournals.org/lookup/suppl/doi:10.1161/STROKEAHA.117.017305/-/DC1>.

Correspondence to Denis Vivien, PhD, Department of Physiopathology and Imaging of Neurological Disorders, INSERM U1237, University Caen Normandie, GIP Cyceron, Bd Becquerel, BP5229, 14074 Caen, France. E-mail vivien@cyceron.fr

© 2017 American Heart Association, Inc.

Stroke is available at <http://stroke.ahajournals.org>

DOI: 10.1161/STROKEAHA.117.017305

processes^{19,20} and to enhance extracellular matrix degradation both known to contribute to IAs generation.^{15,19,20} Because IAs are strongly associated with inflammatory processes and remodeling of the extracellular matrix,^{11,12} we hypothesized that tPA could contribute to the formation or rupture of IAs.

Methods

An expanded materials and methods section is available as an [online-only Data Supplement](#).

Experiments were performed in accordance with European union directives (2010/63/UE) and French ethical laws (act no. R214; 87–137; Ministère de l'Agriculture) guidelines and approved by the local and regional ethics committees (authorization code, CENOMEXA 0113-03). All experiments were performed following the ARRIVE guidelines (Animal Research: Reporting of In Vivo Experiments; <http://www.nc3rs.org.uk>).

Induction of IAs

IAs were induced as described by Hashimoto et al^{11,21} in 3 different mouse strains: tPA^{-/-} (n=31), plasminogen activator inhibitor-1 (PAI-1) knockout mice (n=12), and their wild-type (WT) littermates (n=12) all on a C57BL/6J background.

Briefly, stereotaxic injection in the right basal cistern of 2.5 μ L of elastase was realized in deeply anesthetized animals. Followed by subcutaneous implantation of an osmotic pump (p1001; Alzet) filled with angiotensin II (Sigma Aldrich). The profile of systemic hypertension induced by angiotensin II was assessed by repeated blood pressure measurements using the tail-cuff method. At day 2, a magnetic resonance imaging (MRI) was performed to exclude animals presenting a brain hemorrhage caused by the stereotaxic injection. Each animal was evaluated for inclusion criterion using a semiquantitative aneurysm induction invasiveness score (Figure IA in the [online-only Data Supplement](#)). All animals with a score >7 were excluded from the study. Animals were analyzed twice a day for detection of neurological symptoms and weight loss during a period of 28 days postinduction. Symptomatic mice were immediately scanned by MRI for the identification of intracranial hemorrhages and ruptured aneurysms. The period before symptoms occurs, mice were considered as symptom-free surviving animals, and this time was evaluated and quoted per day after aneurysm induction. At 28 days marking the term of the study, all asymptomatic mice were scanned by MRI before euthanasia because their MRI analyses were also used to estimate the number of unruptured aneurysms and the absence of bleeding. IA lesions were observed on each mouse, at the acute phase of rupture when symptomatic and at the end of the experiment (day 28) in the absence of rupture.

MRI Analysis

Experiments were performed on a Pharmascan 7T/12 cm system using surface coils (Bruker) in anesthetized mice. T2*-weighted sequence was used to detect intracranial hemorrhage as a specific hyposignal.²² 3-dimensional T1 contrast enhanced weighted sequence after intraperitoneal gadolinium injection (Gadovist 1 mg/kg; Guerbet) was performed to visualize IA defined as an abnormal sacciform outpouching of the wall of intracranial arteries of which the diameter is >150% of the parent artery diameter.²¹

Hydrodynamic Transfection of tPA

Generation of pLIVEPlasmids

The coding sequence for rat tPA was inserted into a mouse hepatocyte specific plasmid (pLIVE; Figure IB in the [online-only Data Supplement](#)).

Hydrodynamic Transfection

Hydrodynamic transfections were performed as described previously.^{23,24} To assess the time course of gene delivery, we have previously investigated²⁴ the presence of active and free (noncomplexed)

plasmatic tPA by direct fibrin zymography following SDS-PAGE (Sodium Dodecyl Sulfate Polyacrylamide Gel Electrophoresis), performed from plasma samples harvested before and after hepatic (hydrodynamic) transfection at days 1, 2, 3, 5, 7, and 14.²⁴ Then, PA^{-/-} mice considered for IA induction were injected 2 days before induction with 100 μ g of pLIVE vector encoding for tPA (n=11) or empty pLIVE vector (n=9; Figure IB and IC in the [online-only Data Supplement](#)). Then, sentinel mice induced for IAs were used to control levels of active plasmatic tPA, 24 hours after hydrodynamic transfection (Figure ID in the [online-only Data Supplement](#); time when the highest plasmatic levels) as described previously.²⁴ Human tPA (Actilyse; Boehringer Ingelheim) and plasmin (Enzyme Research Laboratories) were used as loading controls.

Immunohistochemistry

Mouse Tissue Samples

Each mouse was anesthetized and transcardially perfused with cold heparinized saline followed by 100 mL of fixative solution. Brains were cryoprotected before freezing in Tissue-Tek (Miles Scientific).

Human Sample

Human aneurysm samples were obtained during microsurgery by resecting the aneurysm sac distal to the clip closing the neck (F.S.). Samples were obtained from a 42-year-old woman, who experienced subarachnoid hemorrhage after a rupture of a 7-mm large, middle cerebral artery IA. Tissues were immediately stored for 2 hours in fixative then cryoprotected before freezing in Tissue-Tek.

For both human and mouse tissue samples, cryomicrotome-cut transversal sections (12 μ m) were collected on polylysine slides and stored at -80°C before processing. Mouse and human tissue sections were incubated overnight with primary antibodies as described in the corresponding legend and detailed in the Methods in the [online-only Data Supplement](#). For each animal, vascular wall and aneurysm were analyzed.

Statistical Analysis

All results were expressed in the form of mean. Continuous variables were described as median and interquartile range and compared using the nonparametric Kruskal–Wallis test. Categorical variables were compared using χ^2 or Fisher exact test (unilateral test), as appropriate (SPSS 19, SPSS). The survival analyses were performed by using Kaplan–Meier and log-rank tests. The mice that did not show aneurysm formation were not excluded from the analysis. A *P* value ≤ 0.05 was considered as significant.

Results

tPA and Plasmin Are Present in the Arterial Wall of Aneurysmal Cerebral Arteries

IAs were induced and monitored as described (Figure IA) in WT mice (n=12). This induction allowed forming sacciform aneurysms that can spontaneously rupture. Detection of symptomatic aneurysmal ruptures was addressed daily via a neurological score.^{21,25} Symptomatic animals were immediately analyzed by MRI to assess the presence of intracranial bleedings and ruptured aneurysms (Figure IB). Ruptures of IAs were confirmed by macroscopic visualization of harvested brains (Figure IB). MRI for IAs detection perfectly matched with macroscopic observations (Figure IC). The presence of tPA and plasminogen/plasmin were investigated in aneurysmal arteries and compared with normal contralateral arteries by immunohistochemistry. IA walls showed luminal bloating and asymmetrical wall thickening at multiple vascular localizations, especially around the distal intracerebral bifurcations

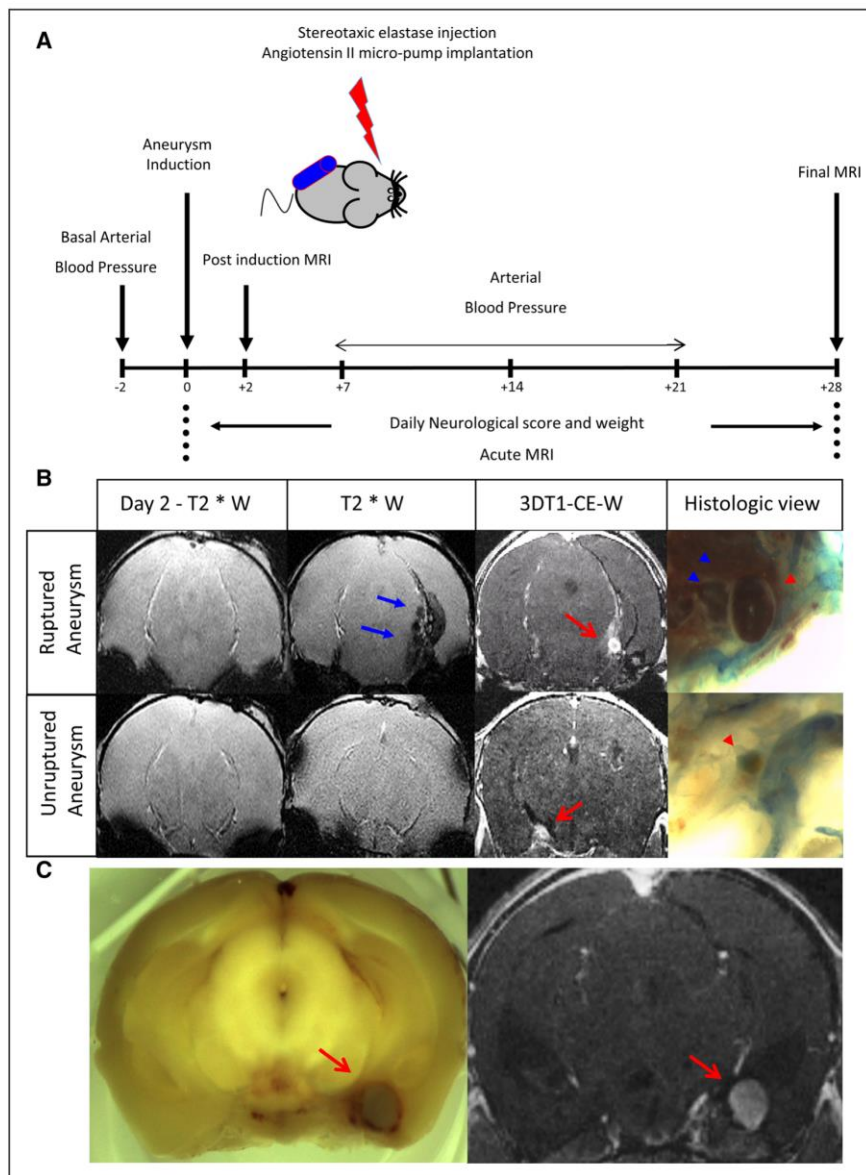
2576 *Stroke* September 2017

Figure 1. Experimental protocol. **A**, Six-week-old male mice maintained hypertensive by a chronic infusion of angiotensin II received a single stereotaxic injection of elastase to induce IAs. A clinical score and an magnetic resonance imaging (MRI) follow-up during the next 28 days allowed us to identify symptomatic and asymptomatic IA. **B**, At day 2, a T2*W (T2*-weighted) sequence was performed to exclude bleeding caused by the stereotaxic injection itself. **Top**, at day 7, symptomatic mice were subjected to MRI analyses: the T2*W sequence showed the appearance of a hypointense (blue arrow) on the subarachnoid spaces; the 3-dimensional T1 contrast enhanced weighted (3DT1-CE-W) confirmed the presence of an IA (red arrow). The macroscopic analysis confirmed a bleeding (blue arrow head) and the presence of a ruptured aneurysm (red arrow head). **Bottom**, a MRI was performed on asymptomatic mice at day 28 showing the absence of bleeding on T2*W but the presence of an unruptured aneurysm (red arrow) confirmed by macroscopic examination (red arrow head). **C**, Higher magnification of the correlation between MRI (left) and the histological (right) identification of aneurysms.

when compared with contralateral arteries (Figure 2A). A massive tPA-positive immunostaining was revealed in the peripheral parts of the media and the adventitia for both ruptured and unruptured IAs (Figure 2B), with only a slight tPA-positive staining in the luminal part of the intima of normal arteries (Figure 2C). Immunostainings also revealed the presence of

plasminogen/plasmin in the arterial walls of both ruptured and unruptured IA with a same distribution in the media of the pathological arterial walls (Figure 2B). Interestingly, immunostainings performed from human tissue samples also revealed the presence of tPA and plasminogen/plasmin within the arterial wall of IA arteries (Figure 2D).

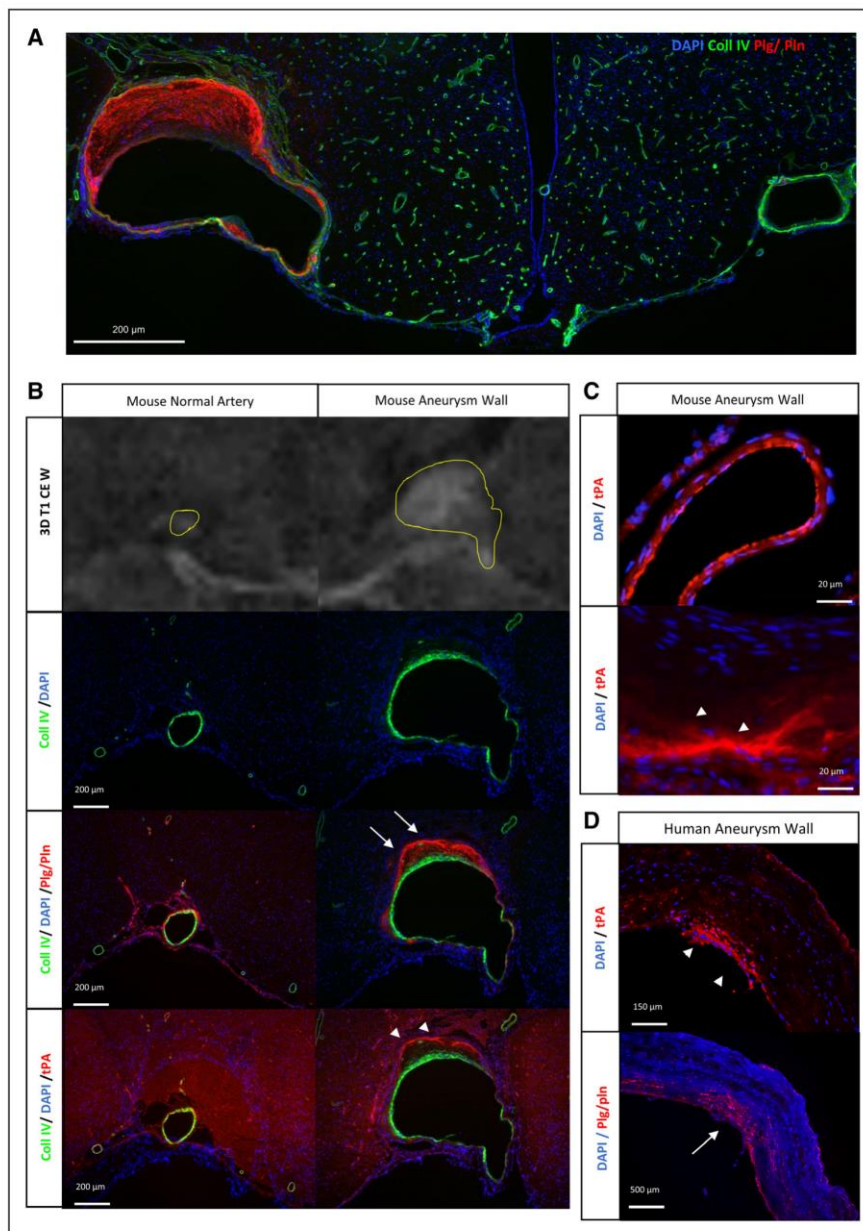


Figure 2. Overexpression of tPA (tissue-type plasminogen activator) and of plasminogen/plasmin within the aneurysmal wall. **A**, Representative immunohistochemistries performed from wild-type (WT) mice ($n=10$) displaying unruptured intracranial aneurysms (collagen-IV [Coll IV] in green, plasminogen [Plg]/plasmin [Pln] in red, and 4',6-diamidino-2-phenylindole in blue). An aneurysm can be visualized on the **left** and a healthy contralateral artery on the **right**. **B**, Representative immunohistochemistries performed from WT mice displaying unruptured intracranial aneurysms for both Pln/Plg (white arrow) and tPA (white arrow head). An aneurysmal artery can be visualized on the **right** and a healthy contralateral artery on the **left**. **C**, Immunohistochemistries with high magnification on WT mice showing the endothelial repartition of tPA in normal artery (**top**) as its parietal presence in the aneurysm (white arrow head, **bottom**). **D**, Representative immunohistochemistries performed from intracranial aneurysms harvested on human after microsurgical clipping, showing the presence of tPA (white arrow head) and Plg/Pln (white arrow). Scale bars: **A**, 200 μm ; **B**, 200 μm ; **C**, 20 μm ; and **D**, 150 μm , 500 μm .

Deletion of tPA Protects Against IAs Formation and Rupture

The influence of endogenous tPA on the formation and rupture of IAs was investigated in tPA-deficient (tPA $^{-/-}$; $n=12$),

PAI-1-deficient (PAI $^{-/-}$; $n=12$), and compared with WT littermates ($n=12$). No significant difference in the mean systolic blood pressure was observed between groups (Figure IIA in the [online-only Data Supplement](#)). Similarly, aneurysm

2578 *Stroke* September 2017

induction invasiveness scores were not significantly different between groups (Figure IIB in the [online-only Data Supplement](#)). Patterns of aneurysms (no aneurysm, unruptured aneurysms, and ruptured aneurysms) between groups

are shown in Figure 3A. tPA^{-/-} animals were resistant to aneurysms formation ($P=0.004$) and subsequent ruptures ($P=0.017$) when compared with WT animals. Indeed, whereas only 40% of tPA^{-/-} mice ($n=10$) presented at least 1 aneurysm

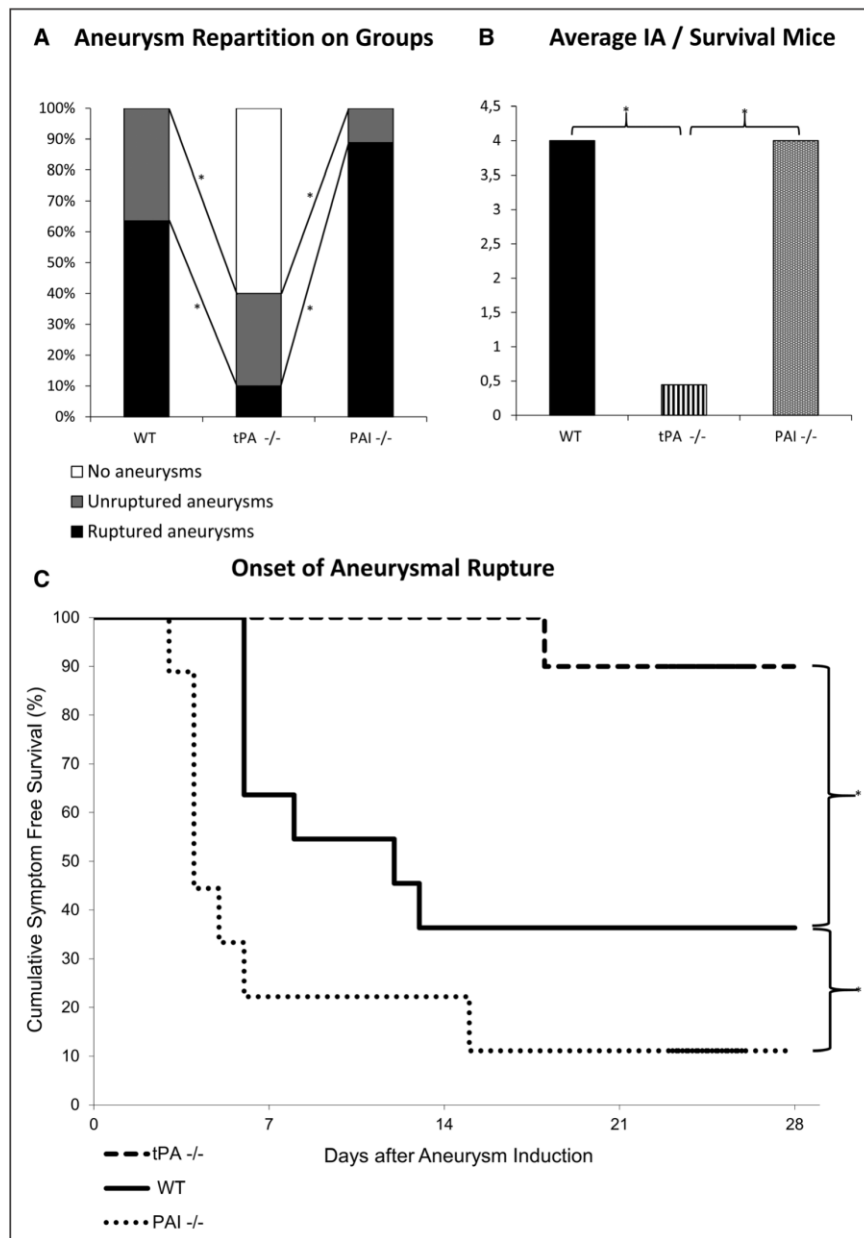


Figure 3. Lack of tPA (tissue-type plasminogen activator) protects against intracranial aneurysms formation and rupture. Intracranial aneurysms (IAs) were induced in tPA-deficient (tPA^{-/-}), plasminogen activator inhibitor-1 (PAI-1)-deficient (PAI^{-/-}), and wild-type (WT) mice. **A**, Aneurysm repartition in WT, tPA^{-/-}, and PAI^{-/-} mice shows that 100% of WT mice displayed at least 1 aneurysm and that 64% were symptomatic. tPA^{-/-} mice displayed less aneurysms formation ($P=0.004$) and rupture ($P=0.017$) with 60% of animals with no aneurysm. PAI^{-/-} mice displayed a phenotype similar than WT animals. $*P<0.05$. **B**, Kaplan–Meier analyses of asymptomatic mice at 28 days postinduction showed a better rate of survival for tPA^{-/-} mice and a worse rate of survival for PAI^{-/-} mice when compared with WT animals. **C**, Magnetic resonance imaging assessment of the number of aneurysms on surviving animals at day 28 showed that the average number of aneurysms was significantly higher in WT and PAI^{-/-} animals when compared with tPA^{-/-} mice. $*P<0.05$. The final enrolled animal number was WT ($n=11$), tPA^{-/-} ($n=10$), and PAI^{-/-} ($n=9$).

and only 10% had ruptured aneurysms, 100% of the WT animals (n=11) displayed at least 1 aneurysm and 64% had ruptured aneurysms. Accordingly, Kaplan–Meier analyses of asymptomatic mice at 28 days postsurgery revealed a higher proportion of healthy animals in the tPA^{-/-} group when

compared with the WT group (respectively 90% and 36%; $P=0.009$; Figure 3B). PAI^{-/-} mice displayed a pattern of unruptured and ruptured aneurysms similar to that of WT animals ($P=0.22$; Figure 3A). Indeed, in the PAI^{-/-} group, 100% of animals (n=9) harbored at least 1 aneurysm and 89% had

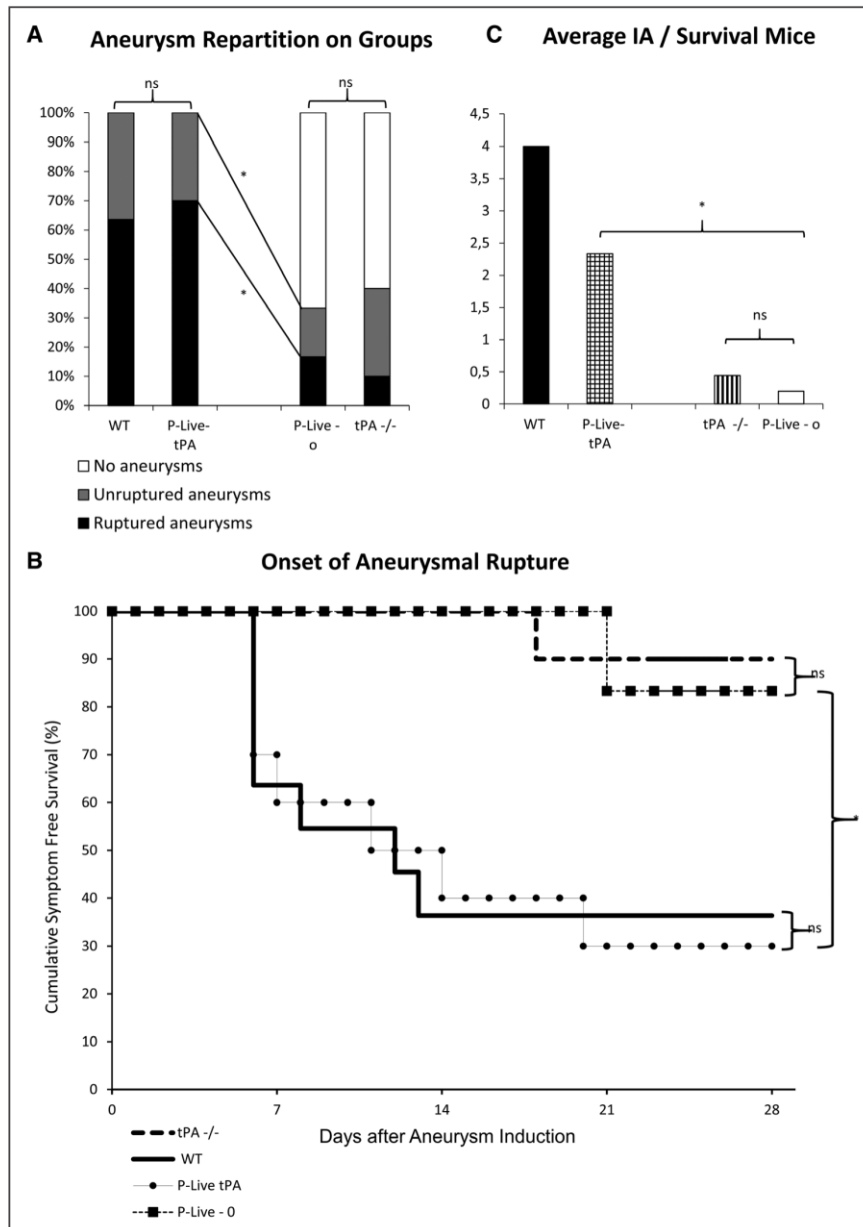


Figure 4. Vascular tPA (tissue-type plasminogen activator) contributes to aneurysms formation and rupture. Intracranial aneurysms (IAs) were induced in tPA deficient (tPA^{-/-}) 2 days after the mice were transfected (hydrodynamic transfections as described in the Methods in the [online-only Data Supplement](#)) with a plasmid encoding for tPA (P-Live-tPA) or an empty vector (P-Live-o). **A**, 100% of P-Live-tPA animals presented at least 1 ruptured aneurysm compared with P-Live-o animals at day 28. * $P<0.05$. **B**, Kaplan–Meier test revealed a better rate of survival for the P-Live-o mice when compared with P-Live-tPA animals. No significant difference was observed between wild-type (WT) and P-Live-tPA animals or between tPA^{-/-} and P-Live-o animals. **C**, Number of aneurysms on surviving mice at 28 days showed that the average number of aneurysms was significantly higher in the P-Live-tPA animals than in the P-Live-o animals. * $P<0.05$. The final enrolled animal number was P-Live-tPA group (n=10); P-Live-o group (n=6).

2580 *Stroke* September 2017

ruptured aneurysms. Nevertheless, the symptom-free survival Kaplan–Meier analysis revealed that PAI^{−/−} mice displayed a significant higher rate of survival when compared with WT animals ($P=0.049$; Figure 3B). These results are explained by the fact that in PAI^{−/−} mice, ruptures occurred earlier than in WT mice (Figure 3B). MRI analyses of the number of aneurysms in surviving mice at the end of the experiment at 28 days are shown in Figure 3C. WT ($P=0.003$) and PAI^{−/−} ($P=0.002$) groups had more aneurysms than tPA^{−/−} group.

Vascular tPA Contributes to IAs Formation and Subsequent Rupture

Thus, we sought to determine which tPA vascular or parenchymal, contributed to aneurysm formation and subsequent rupture in our model. Hydrodynamic transfections in tPA^{−/−} mice with a pLIVE plasmid encoding for the rat tPA (P-Live-tPA) induced a vascular release of proteolytically active tPA in the circulation as soon as 24 hours after hepatic transfection,^{23,24} compared with the levels of tPA present in the circulation of control empty P-Live plasmid (P-Live-o; Figure 4D in the [online-only Data Supplement](#)). Although in the P-Live-tPA group ($n=10$), 100% of animals displayed at least 1 aneurysm at day 28 with 70% of them ruptured (Figure 4A), in the P-Live-o group ($n=6$) only 33% of mice presented at least 1 aneurysm, and only 17% were symptomatic (Figure 4A). Therefore, P-Live-tPA animals presented significantly more aneurysms ($P=0.008$) with an increased number of ruptured aneurysms ($P=0.059$) than P-Live-o animals. Accordingly, the symptom-free survival Kaplan–Meier analysis (Figure 4B) shows a better rate of survival for P-Live-o mice than for P-Live-tPA animals ($P=0.028$). Moreover, regarding surviving mice at the end of the experiment (Figure 4C), P-Live-tPA mice presented a higher average number of aneurysms ($P=0.036$) than P-Live-o mice. It is interesting to note (Figure 4A and 4B) that the symptom-free survival rate of P-Live-tPA was not different from that of WT mice ($P=0.908$) and that the symptom-free survival rate of P-Live-o animals was similar to that of tPA^{−/−} mice ($P=0.74$). Immunostainings for tPA performed in tPA^{−/−} mice (Figure IIIA in the [online-only Data Supplement](#)) clearly show the absence of tPA in the endothelium, in the media, and in the adventitia of normal arteries. Interestingly, tPA^{−/−} mice develop IAs when the tPA is overexpressed and released in the vasculature after hydrodynamic transfection of liver cells.

Immunostainings raised against CD4 revealed the presence of inflammatory cells in the thickened wall of IAs, in mice (Figure IIIB in the [online-only Data Supplement](#)). Moreover, a clear positive and specific staining for CD11 b was also observed in the wall of IAs in mice (Figure IIIC in the [online-only Data Supplement](#)). It is interesting to note that the stain was observed as well within the wall of IA than fixed at the endothelium during the diapedesis

Discussion

Our data reveal that tPA present in the circulation is a putative pharmacological target to prevent IAs formation and, thus, their subsequent ruptures. To our knowledge, we provide the first preclinical demonstration of a role of tPA in the formation of aneurysms. We show the presence of tPA and its

substrate, plasminogen, in the arterial walls of cerebral aneurysms in both rodents and humans. Our preclinical data then demonstrate that the absence of tPA reduces the incidence of aneurysms. Interestingly, this effect is merely counteracted by the rescue of active tPA in the circulation. Accordingly, PAI-1^{−/−} mice (PAI-1 being the main inhibitor of tPA in the circulation²⁶) are highly sensitive to aneurysms formation and subsequent ruptures. The presence of tPA within the aneurysmal wall contrast with its location site in the luminal part of the endothelial cells of normal arteries (Figure 2B and 2C; Figure IIIA in the [online-only Data Supplement](#)). tPA^{−/−} mice develop IAs only when the tPA is overexpressed in the blood stream (Figure 4A and 4B). These data suggest that the tPA present in the blood stream is enough to promote aneurysms formation and rupture. Even if we did not properly investigate the source of the tPA present in the aneurysmal wall, our hypothesis that it comes from the blood stream is in agreement with the recent publications demonstrating the capacity of tPA to cross the blood–brain barrier.^{13,14,24} Also, we can propose that the vascular tPA is responsible for aneurysms formation.

Although the involvement of tPA in aneurysms formation is similarly observed between either WT and tPA^{−/−} mice or tPA^{−/−} p-live-empty vector and tPA^{−/−} Plive-tPA, differences in IAs rupture reached significance only between WT and tPA^{−/−} mice. This could be explained by the fact that the expression of tPA is only transient after hydrodynamic transfection (from 1 to 7 days),²⁴ sufficient to induce aneurysms formation but may be too short to promote their rupture which can step afterward (38% from 7 to 14 days in our experiments, regardless of the genotype). This interesting shift suggests the continuity over time of the tPA influence on IAs because it has been reported in aortic aneurysms.¹⁸ Because the size of IAs is mainly described as a key factor for IAs rupture,²⁵ we aimed to assess this parameter (data not shown). Probably because of important bias in the methodology, we did not evidence significant differences nor trend between groups on the size of IAs, which could have specified the mode of influence of tPA on the rupture of IAs.

Although aneurysmal formation and rupture may depend on several mechanisms,^{2,5,7,9} our data demonstrate an important contribution of tPA. Different mechanisms could explain our finding because the MMPs can be activated by tPA either directly or indirectly through plasmin.^{13,27} By their proteolytic activities, MMPs, especially MMP-2 and MMP-9, are also well known to contribute to the degradation of the internal elastic lamina, promoting IAs formation.^{7,8,10,12} Similarly, it was reported that inflammation causes an overexpression and overactivation of MMPs, not compensated by the action of their inhibitors (tissue inhibitor of matrix metalloproteinases).^{27,28} Moreover, tPA is known to upregulate the expression of MCP-1 (monocyte chemoattractant protein type 1), then to stimulate diapedesis and to participate in the infiltration process of macrophages within the arterial wall²⁹ as we experimentally found-it in our model (Figure IIIB and IIIC in the [online-only Data Supplement](#)). Thus, tPA could indirectly contribute to aneurysm formation and rupture through a proinflammatory path.^{7,11,20} Our present data agree with this hypothesis, with the tPA present in the blood stream promoting the recruitment of macrophages in the IAs wall. These results are

in agreement with those reported from studies performed on aortic aneurysms that share some similarities with IAs.^{16–18,28} Thus, some studies have suggested that the LRP-1 (low density lipoprotein related protein receptor 1) protected against elastin fiber fragmentation by reducing excess of protease activity in the artery wall.²⁸ These proteases include MMP-2 and -9, some of them being direct or indirect targets of tPA.^{15,19,28} Even if abdominal aortic aneurysms and IAs present different clinical evolutions and responses to pharmacological therapies,^{17,30} there are several similarities between the 2, and some pathophysiological cross pathways may be proposed, such as the role of tPA.

There are known direct inhibitors of tPA (such as neuroserpin and PAI-1) or indirect inhibitors (such as tranexamic acid via inhibition of plasmin) which could be used to prevent aneurysms formation and rupture.^{13,14} Our data obtained from PAI-1^{-/-} mice suggest that PAI-1 and PAI-1 mimetics²⁶ may be appropriate to prevent IAs formation and rupture. Additional studies are needed to address this important question. In conclusion, we propose the vascular tPA as a possible new target to prevent IA progression and rupture. However, because our present study was performed in a preclinical model of IAs, which does not completely fit with the pathogenesis of IAs formation and rupture in human, this conclusion should be cautioned. Further investigations are needed before translate these findings to clinic, thus, opening new avenues for the noninvasive prevention and treatment of IAs.

Acknowledgments

We thank Prof Carine Ali and Drs Anne-Laure Genevois and Gabriel Ichim for their help to edit this article.

Sources of Funding

This work was supported by grants from the French National Institute for Health and Medical Research and the Caen Normandie University, Fonds Européens de Développement Economique et Régional Normandie. This work is also part of an Agence Nationale de la Recherche program entitled PREDIC (prevent delayed ischemia), ANR16-CE19-004-01.

Disclosures

None.

References

- Vlak MH, Algra A, Brandenburg R, Rinkel GJ. Prevalence of unruptured intracranial aneurysms, with emphasis on sex, age, comorbidity, country, and time period: a systematic review and meta-analysis. *Lancet Neurol*. 2011;10:626–636. doi: 10.1016/S1474-4422(11)70109-0.
- Ishibashi T, Murayama Y, Urashima M, Saguchi T, Ebara M, Arakawa H, et al. Unruptured intracranial aneurysms: incidence of rupture and risk factors. *Stroke*. 2009;40:313–316. doi: 10.1161/STROKEAHA.108.521674.
- Alleyne CH Jr. Aneurysmal subarachnoid hemorrhage: have outcomes really improved? *Neurology*. 2010;74:1486–1487. doi: 10.1212/WNL.0b013e3181e0ef1a.
- Sandvei MS, Mathiesen EB, Vatten LJ, Müller TB, Lindekleiv H, Ingebrigtsen T, et al. Incidence and mortality of aneurysmal subarachnoid hemorrhage in two Norwegian cohorts, 1984–2007. *Neurology*. 2011;77:1833–1839. doi: 10.1212/WNL.0b013e3182377de3.
- Bacigaluppi S, Piccinelli M, Antiga L, Veneziani A, Passerini T, Rampini P, et al. Factors affecting formation and rupture of intracranial saccular aneurysms. *Neurosurg Rev*. 2014;37:1–14. doi: 10.1007/s10143-013-0501-y.
- Steiner T, Juvela S, Unterberg A, Jung C, Forsting M, Rinkel G; European Stroke Organization. European stroke organization guidelines for the management of intracranial aneurysms and subarachnoid haemorrhage. *Cerebrovasc Dis*. 2013;35:93–112. doi: 10.1159/000346087.
- Chalouhi N, Ali MS, Jabbour PM, Tjoumakaris SI, Gonzalez LF, Rosenwasser RH, et al. Biology of intracranial aneurysms: role of inflammation. *J Cereb Blood Flow Metab*. 2012;32:1659–1676. doi: 10.1038/jcbfm.2012.84.
- Frösen J, Piippo A, Paetau A, Kangasniemi M, Niemelä M, Hernesniemi J, et al. Remodeling of saccular cerebral artery aneurysm wall is associated with rupture: histological analysis of 24 unruptured and 42 ruptured cases. *Stroke*. 2004;35:2287–2293. doi: 10.1161/01.STR.0000140636.30204.da.
- Penn DL, Witte SR, Komotar RJ, Sander Connolly E Jr. The role of vascular remodeling and inflammation in the pathogenesis of intracranial aneurysms. *J Clin Neurosci*. 2014;21:28–32. doi: 10.1016/j.jocn.2013.07.004.
- Chu Y, Wilson K, Gu H, Wegman-Points L, Dooley SA, Pierce GL, et al. Myeloperoxidase is increased in human cerebral aneurysms and increases formation and rupture of cerebral aneurysms in mice. *Stroke*. 2015;46:1651–1656. doi: 10.1161/STROKEAHA.114.008589.
- Hashimoto T, Meng H, Young WL. Intracranial aneurysms: links among inflammation, hemodynamics and vascular remodeling. *Neurol Res*. 2006;28:372–380. doi: 10.1179/016164106X14973.
- Aoki T, Kataoka H, Morimoto M, Nozaki K, Hashimoto N. Macrophage-derived matrix metalloproteinase-2 and -9 promote the progression of cerebral aneurysms in rats. *Stroke*. 2007;38:162–169. doi: 10.1161/01.STR.0000252129.18605.c8.
- Vivien D, Gauberti M, Montagne A, Defer G, Touzé E. Impact of tissue plasminogen activator on the neurovascular unit: from clinical data to experimental evidence. *J Cereb Blood Flow Metab*. 2011;31:2119–2134. doi: 10.1038/jcbfm.2011.127.
- Macrez R, Ortega MC, Bardou I, Mehra A, Fournier A, Van der Pol SM, et al. Neuroendothelial NMDA receptors as therapeutic targets in experimental autoimmune encephalomyelitis. *Brain*. 2016;139(pt 9):2406–2419. doi: 10.1093/brain/aww172.
- Kadoglou NP, Liapis CD. Matrix metalloproteinases: contribution to pathogenesis, diagnosis, surveillance and treatment of abdominal aortic aneurysms. *Curr Med Res Opin*. 2004;20:419–432. doi: 10.1185/030079904125003143.
- Oszajca K, Wroński K, Janiszewska G, Biełkiewicz M, Bartkowiak J, Szemraj J. The study of t-PA, u-PA and PAI-1 genes polymorphisms in patients with abdominal aortic aneurysm. *Mol Biol Rep*. 2014;41:2859–2864. doi: 10.1007/s11033-014-3141-6.
- Davis FM, Rateri DL, Daugherty A. Abdominal aortic aneurysm: novel mechanisms and therapies. *Curr Opin Cardiol*. 2015;30:566–573. doi: 10.1097/HCO.0000000000000216.
- Lindholt JS. Activators of plasminogen and the progression of small abdominal aortic aneurysms. *Ann NY Acad Sci*. 2006;1085:139–150. doi: 10.1196/annals.1383.023.
- Lo EH, Wang X, Cuzner ML. Extracellular proteolysis in brain injury and inflammation: role for plasminogen activators and matrix metalloproteinases. *J Neurosci Res*. 2002;69:1–9. doi: 10.1002/jnr.10270.
- Gur-Wahnon D, Mizrahi T, Maaravi-Pinto FY, Lourbopoulos A, Grigoriadis N, Higazi AA, et al. The plasminogen activator system: involvement in central nervous system inflammation and a potential site for therapeutic intervention. *J Neuroinflammation*. 2013;10:124. doi: 10.1186/1742-2094-10-124.
- Tada Y, Kanematsu Y, Kanematsu M, Nuki Y, Liang EI, Wada K, et al. A mouse model of intracranial aneurysm: technical considerations. *Acta Neurochir Suppl*. 2011;111:31–35. doi: 10.1007/978-3-7091-0693-8_6.
- Makino H, Hokamura K, Natsume T, Kimura T, Kamio Y, Magata Y, et al. Successful serial imaging of the mouse cerebral arteries using conventional 3-T magnetic resonance imaging. *J Cereb Blood Flow Metab*. 2015;35:1523–1527. doi: 10.1038/jcbfm.2015.78.
- Ahlén G, Frelin L, Holmström F, Smetham G, Augustyn S, Sällberg M. A targeted controlled force injection of genetic material in vivo. *Mol Ther Methods Clin Dev*. 2016;5:16016. doi: 10.1038/mtm.2016.16.
- Marcos-Contreras OA, Martínez de Lizarondo S, Bardou I, Orset C, Pruvost M, Anfray A, et al. Hyperfibrinolysis increases blood-brain barrier permeability by a plasmin- and bradykinin-dependent mechanism. *Blood*. 2016;128:2423–2434. doi: 10.1182/blood-2016-03-705384.
- Makino H, Tada Y, Wada K, Liang EI, Chang M, Mobashery S, et al. Pharmacological stabilization of intracranial aneurysms in

2582 *Stroke* September 2017

- mice: a feasibility study. *Stroke*. 2012;43:2450–2456. doi: 10.1161/STROKEAHA.112.659821.
26. Gong L, Proulle V, Fang C, Hong Z, Lin Z, Liu M, et al. A specific plasminogen activator inhibitor-1 antagonist derived from inactivated urokinase. *J Cell Mol Med*. 2016;20:1851–1860. doi: 10.1111/jcmm.12875.
27. Kang LI, Isse K, Koral K, Bowen WC, Muratoglu S, Strickland DK, et al. Tissue-type plasminogen activator suppresses activated stellate cells through low-density lipoprotein receptor-related protein 1. *Lab Invest*. 2015;95:1117–1129. doi: 10.1038/labinvest.2015.94.
28. Strickland DK, Au DT, Cunfer P, Muratoglu SC. Low-density lipoprotein receptor-related protein-1: role in the regulation of vascular integrity. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2014;34:487–498. doi: 10.1161/ATVBAHA.113.301924.
29. Lansley SM, Cheah HM, Varano Della Vergiliana JF, Chakera A, Lee YC. Tissue plasminogen activator potently stimulates pleural effusion via a monocyte chemotactic protein-1-dependent mechanism. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 2015;53:105–112. doi: 10.1165/rmb.2014-0017OC.
30. Zhou X, Ji WJ, Tu Y, Yao M, Li YM. Abdominal aortic aneurysm and cerebral aneurysm present different pathological evolutions and responses to pharmacological therapy. *Med Hypotheses*. 2007;68:601–606. doi: 10.1016/j.mehy.2006.06.062.

Influence de l'activateur tissulaire du plasminogène dans la lignée oligodendrocytaire et le processus de myélinisation

Résumé

L'activateur tissulaire du plasminogène (tPA) est une sérine protéase, impliquée dans de nombreux processus physiopathologiques au sein du système nerveux central (*e.g.* corticogenèse, rôle anti-apoptotique sur les oligodendrocytes). Des travaux du laboratoire ont montré que la migration oligodendrocytaire était retardée chez des souris déficientes en tPA comparativement à des souris sauvages au cours du développement embryonnaire. Les cellules précurseurs d'oligodendrocytes (OPCs) doivent se différencier en oligodendrocytes myélinisants afin d'enrouler leurs prolongements et de former une gaine de myéline. Mes travaux de thèse ont consisté à étudier les effets du tPA sur ces paramètres au cours du développement dans la moelle épinière chez la souris. Nos travaux montrent dans un premier temps, que le tPA est exprimé de façon transitoire au sein d'oligodendrocytes myélinisants. L'expression de tPA au sein de ces cellules est transitoire, atteignant un pic à 15 jours post-natal, qui correspond à la phase active de la myélinisation. Dans un second temps, dans un modèle de souris déficientes en tPA, un retard de différenciation des OPCs vers un phénotype d'oligodendrocytes matures au cours du développement embryonnaire est observé. Nous mettons également en évidence, un phénotype dysmyélinique chez les souris déficientes en tPA (myéline non compacte et anomalies ultrastructurelles de la myéline). Bien que ce phénotype ne présente ni des différences dans la tractographie des fibres détectables à l'IRM et ni de troubles dans la conduction nerveuse, des atteintes de la démarche ont pu être mises en évidence. Le tPA semble donc être un facteur déterminant dans la compaction de la gaine de myéline. Les souris déficientes en tPA pourraient être un modèle relevant pour étudier les pathologies dysmyélinisantes.

Mots-clés : oligodendrocytes ; activateur tissulaire du plasminogène ; développement ; myélinisation

Abstract

Tissue-type plasminogen activator (tPA) is a serine protease involves in many central nervous system physiopathological processes (*e.g.* corticogenesis, anti-apoptotic effect on oligodendrocytes). Our laboratory has shown that oligodendrocyte migration was delayed in tPA-deficient mice during embryonic development. In order to become myelinating cells, oligodendrocyte precursors cells (OPCs) had to differentiate, and wrap their processes around axons to form a myelin sheath. My thesis work consisted in studying the effects of tPA on these parameters throughout development in mice spinal cord. First, we showed a transient expression of tPA in myelinating cells, reaching a peak at P15, which corresponds to active myelination. Secondly, we observed a delay in OPCs differentiation towards a myelinating phenotype. Furthermore, tPA-deficient mice displays a dysmyelination phenotype with uncompacted myelin and ultrastructure anomalies. Neither differences in fiber tractography of spinal cord tracts detectable on MRI, nor central conduction disorders were revealed in this phenotype. However, tPA-deficient mice displayed gait abnormalities. Consequently, tPA seems to be a important factor to drive myelin compaction and tPA-deficient mice could be a relevant model to study dysmyelinating disorders.

Key words: oligodendrocytes; tissue-type plasminogen activator; developpement; myelination

