



HAL
open science

Implication du tPA cérébral dans la régulation des comportements et le remodelage des perineuronal nets

Sara Douceau

► **To cite this version:**

Sara Douceau. Implication du tPA cérébral dans la régulation des comportements et le remodelage des perineuronal nets. Médecine humaine et pathologie. Normandie Université, 2020. Français. NNT : 2020NORMC423 . tel-03471791

HAL Id: tel-03471791

<https://theses.hal.science/tel-03471791>

Submitted on 9 Dec 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

Implication du tPA cérébral dans la régulation des comportements et le remodelage des perineuronal nets

**Présentée et soutenue par
Sara DOUCEAU**

**Thèse soutenue publiquement le 08/12/2020
devant le jury composé de**

Mme CATHERINE BELZUNG	Professeur des universités, Université de Tours François Rabelais	Rapporteur du jury
Mme NATHALIE ROUACH	Directeur de recherche à l'INSERM, COLLEGE DE FRANCE	Rapporteur du jury
M. KARIM BENCHENANE	Directeur de recherche, ESPCI Paris	Membre du jury
M. ALAIN TREMBLEAU	Professeur des universités, Sorbonne Université	Membre du jury
M. DENIS VIVIEN	Professeur des universités PraticienHosp, Université Caen Normandie	Président du jury
Mme VERONIQUE AGIN	Maître de conférences HDR, Université Caen Normandie	Directeur de thèse

Thèse dirigée par VERONIQUE AGIN, Physiopathologie et imagerie des troubles neurologiques



UNIVERSITÉ
CAEN
NORMANDIE



Normandie de Biologie Intégrative,
Santé, Environnement



La science pour la santé
From science to health

Remerciements

Je tiens tout d'abord à remercier Denis Vivien pour m'avoir accueillie au sein du laboratoire dès le Master 1. Merci pour ton enthousiasme sur les projets. Ta vision des résultats avec des « yeux d'enfants » s'est parfois confrontée à mon côté pessimiste mais on a toujours fini par se mettre d'accord. Merci de m'avoir permis d'évoluer sur différentes thématiques tout en me laissant mon autonomie. Enfin merci de nous donner les moyens de réaliser nos travaux dans des conditions optimales.

Je remercie Véronique Agin, d'avoir accepté cette direction de thèse. Merci d'avoir partagé ton expertise sur l'étude du comportement animal lors de mon stage de Master 1. Merci pour ton implication dans la rédaction de l'article et les corrections du manuscrit.

Je remercie chaleureusement les rapporteurs de cette thèse, le Pr Catherine Belzung et le Dr Nathalie Rouach, d'avoir accepté d'évaluer ce travail. Je remercie également le Dr Karim Benchenane et le Pr Alain Trembleau pour leur présence au sein de ce jury de thèse.

Je souhaite également remercier Carine Ali. Merci Carine, de nous accompagner dans l'histoire de la thèse depuis le master, pour ta présence au laboratoire et ton aide, tes « ça va les petits », j'espère qu'on va grandir! Merci pour ton aide sur le projet PNNs et pour la rédaction de l'article.

Merci à Sara, pour ton aide et tes conseils avisés. Je ne comprends pas tout à « tes trucs de vaisseaux » mais maintenant je sais que la plasmine c'est la vie!

Merci A Yannick et Laurent, la Dream Team, pour votre travail indispensable à nos manip. Merci Yannick de m'avoir accompagnée un nombre incalculable de fois dans le A2, je sais que tu adores porter la combi... Promis cette fois c'est la dernière manip !

Je remercie le personnel du CURB, et notamment Charlotte et Céline, pour votre travail essentiel à la réalisation de ces travaux.

Merci aux copains de promo et de bureau: Audrey, Camille, Fanny, Lodie, Vincent, Rhéda, Héloïse, Guénie, Mervé, Sylvaine. Merci aux voisins : Nenette, Fofie, Nolwenn, Antoine A, Charly, Aurélie, Jojo et Quentin. Merci pour les moments passés au labo et en dehors ! Merci pour votre bonne humeur, pour les V&B, les Chef raide et les Beauregards !

Merci Fanny et Audrey, pour votre aide sur le manuscrit. Merci pour les petites pauses « blind-test » du midi !

Merci à tous les membres de l'unité avec qui j'ai passé ces quatre années !

Merci à ma famille de m'avoir toujours encouragée à poursuivre mes études.

Enfin merci à Matthieu. Merci d'avoir partagé cette thèse avec moi. Ce n'était pas toujours évident mais je pense qu'on s'en sort plutôt bien ! Merci pour ta présence et ton soutien, dans la vie comme au travail !

Avant-propos

J'ai réalisé ma thèse dans l'Unité INSERM U1237 « *Physiopathology and Imaging of Neurological Disorders* » (PhIND) dirigée par le Professeur Denis Vivien. Historiquement, la thématique de recherche du laboratoire est axée sur les sérines protéases et, plus spécifiquement, sur l'activateur tissulaire du plasminogène ou tPA. Cette protéase a été initialement décrite pour son rôle fibrinolytique vis-à-vis des caillots sanguins et constitue actuellement le seul traitement pharmacologique pour le traitement des accidents vasculaires cérébraux ischémiques. Les fonctions du tPA ne sont cependant pas limitées à la fibrinolyse puisqu'il peut également être exprimé dans le parenchyme cérébral où il est impliqué dans différents processus en condition physiologique ou pathologique. Son implication dans ces processus peut alors être dépendante de son interaction directe avec différentes protéines et récepteurs ou de sa capacité à activer le plasminogène en plasmine, responsable de la dégradation de différents substrats de la matrice extracellulaire. En outre, le tPA et la plasmine vont jouer un rôle dans la modulation de la signalisation NMDA (N-méthyl-D-aspartate), la plasticité synaptique et les processus cognitifs et émotionnels. Ainsi, les études réalisées au laboratoire visent à mieux comprendre les mécanismes d'action du tPA dans le système nerveux central.

Mes travaux de thèse concernent à la fois l'étude du rôle du tPA exprimé au sein de différentes régions cérébrales dans la modulation des processus cognitifs et émotionnels et l'implication du système tPA/plasmine dans le remodelage d'une structure particulière de la matrice extracellulaire appelée *perineuronal nets* (PNNs).

Les premières parties de mon introduction de thèse permettent de présenter les deux protéases étudiées ici : le tPA et le plasminogène. Je développerai ensuite deux processus dans lesquels le tPA a été étudié : la cognition spatiale et l'anxiété. Enfin, la dernière section de cette introduction consistera à la présentation des réseaux périneuronaux ou *perineuronal nets*.

Sommaire

Introduction.....	1
A. L'activateur tissulaire du plasminogène	1
I. Historique	1
II. Structure du tPA	2
III. Synthèse du tPA.....	3
1- Expression périphérique.....	3
2- Expression centrale	5
3- Inhibiteurs du tPA.....	9
IV. Fonctions du tPA.....	11
1- Fonctions vasculaires.....	11
2- Fonctions centrales	14
B. Le système d'activation du plasminogène (SAP)	29
I. Structure du plasminogène	29
II. Synthèse et régulation	30
III. Fonctions du système d'activation du plasminogène dans le SNC	31
C. Neurobiologie de l'anxiété.....	37
I. L'anxiété étudiée en laboratoire	37
II. Réseaux de l'anxiété.....	39
1- Structure de l'amygdale	39
2- Connectivité de l'amygdale	40
III. Mécanismes moléculaires	43
D. Neurobiologie de la mémoire spatiale.....	45
I. Les différents types de mémoire.....	45
II. La cognition spatiale.....	45
1- Stratégies de navigation	46
2- La mémoire spatiale étudiée en laboratoire : le labyrinthe de Barnes.....	47
3- Rôle de l'hippocampe dans la mémoire spatiale	48
III. Mécanismes sous-tendant la mémoire	53
1- La consolidation synaptique	53
2- La consolidation systémique	55
E. Les réseaux périneuronaux.....	57
I. Découverte des PNNs.....	57
II. Généralités	58

III.	Structure des PNNS	59
1-	L'acide hyaluronique	59
2-	Les chondroïtines sulfate protéoglycanes (CSPGs)	60
3-	<i>Les Ténascines</i>	64
4-	Les protéines de liaisons	64
IV.	Mise en place des PNNs dans le développement cérébral	65
V.	Fonctions des PNNs	67
1-	PNNS et homéostasie ionique	68
2-	PNNS et plasticité	68
3-	PNNS et processus cognitifs	69
4-	PNNs et pathologies du SNC.....	71
5-	Protéases et dégradation des PNNs	73
	Objectifs	77
	Résultats.....	81
	Article 1	83
	Article 2	110
	Discussion.....	139
	Discussion (Article 1)	141
I.	Étude des fonctions du tPA dans les réponses comportementales à l'aide d'une nouvelle souche transgénique : la souris tPA Null	141
1-	La cognition spatiale chez les souris tPA Null.....	141
2-	Les fonctions motrices chez les souris tPA Null.....	145
3-	Évaluation des réponses émotionnelles chez les souris tPA Null.....	147
II.	Étude neuroanatomique des fonctions du tPA grâce à un modèle KO conditionnel	148
1-	Rôle du tPA hippocampique dans la régulation des processus cognitifs et émotionnels...	149
2-	Rôle du tPA amygdalien dans les processus émotionnels	152
3-	Le tPA est exprimé par les neurones PKC- δ au niveau de la CeA.....	153
	Discussion (Article 2)	157
I.	Modèles d'études pour visualiser l'expression neuronale du tPA	157
II.	Expression du tPA par les interneurons PV	158
III.	Implication du système tPA/plasmine dans le métabolisme des PNNs	159
1-	Mécanismes mis en jeu	159
2-	Conséquences fonctionnelles de la régulation du métabolisme des PNNs par le système tPA/plasmine.....	161
3-	Autres fonctions du tPA dans les interneurons PV.....	165

Conclusion generale	169
Autres travaux	171
Bibliographie.....	237

Index des Figures

Figure 1: Structure et fonctions du tPA.	3
Figure 2: Expression du tPA dans les cellules endothéliales.	4
Figure 3: Expression du tPA par différents types cellulaires du SNC chez la souris adulte.	5
Figure 4: Sécrétion du tPA au niveau dendritique et axonal.	6
Figure 5: Expression du tPA au sein des neurones excitateurs dans l'hippocampe et le cortex de souris adultes.	7
Figure 6: Caractérisation de l'expression et du trafic du tPA au sein dans différentes régions cérébrales.	9
Figure 7: Mécanisme d'action de la fibrinolyse.	11
Figure 8: Effet du tPA sur le couplage neurovasculaire.	14
Figure 9: Implication du tPA dans la migration neuronale au cours de la corticogénèse.	16
Figure 10: L'interaction du tPA avec le récepteur NMDA potentialise l'entrée de calcium et la mort excitotoxique.	18
Figure 11: Implication du tPA dans la potentialisation à long terme.	20
Figure 12: Représentation schématique du mécanisme impliquant le tPA dans les processus de LTP.	21
Figure 13: La surexpression de tPA dans les neurones augmente les performances spatiales.	23
Figure 14: Le tPA module la cognition spatiale en interagissant avec le récepteur NMDA dans le cortex entorhinal.	24
Figure 15: Le tPA est exprimé au niveau de l'amygdale et module les réponses anxieuses induites par un stress.	26
Figure 16: Structure du plasminogène.	29
Figure 17: Expression du plasminogène dans le SNC.	30
Figure 18: La plasmine module la LTP en convertissant le pro-BDNF en mBDNF.	33
Figure 19: Le système d'activation du plasminogène régule la pousse neuritique.	35
Figure 20: Représentation schématique du labyrinthe en zéro (A) et de l'open-field (B).	38
Figure 21: Structure et connexions des différents noyaux amygdaliens.	40
Figure 22: Les circuits de l'anxiété.	42
Figure 23: Les référentiels égocentrés et allocentrés dans la navigation.	47
Figure 24: Représentation schématique du test du labyrinthe de Barnes.	48
Figure 25: Représentation schématique du circuit trisynaptique hippocampique.	50
Figure 26: L'hippocampe et ses connexions avec le cortex parahippocampique et les aires sensorielles (Brown & Aggleton, 2001).	51
Figure 27 : Représentation schématique de la consolidation synaptique.	54
Figure 28: Représentations des PNNs au cours du temps.	57
Figure 29: Représentation schématique de la structure des PNNs.	59
Figure 30: Représentation des différents CSPGs et de leurs sulfatations.	61
Figure 31: La dégradation des PNNs chez l'adulte permet de restaurer la plasticité de la dominance oculaire.	67
Figure 32: La dégradation des PNNs affecte la plasticité synaptique hippocampique.	69
Figure 33: La déplétion des PNNs au niveau du cortex perirhinal améliore la mémoire à long terme dans un test de reconnaissance d'objets.	71
Figure 34: Le nombre d'interneurones PV entourés de PNNs est réduit dans un modèle épileptique.	72
Figure 35: Le remodelage des PNNs par la MMP9 permet la plasticité de la dominance oculaire pendant la période critique.	74
Figure 36: Acquisition du test du labyrinthe de Barnes.	142
Figure 37: Mesure des performances spatiales en labyrinthe en Y.	143

<i>Figure 38: Représentation schématique de la séquence du gène Plat chez les souris déficientes en tPA.</i>	145
<i>Figure 39: Mesure de l'activité locomotrice dans des cages d'activité.</i>	146
<i>Figure 40: Mesure des réponses de peur conditionnée au contexte chez les souris tPA Null.</i>	147
<i>Figure 41: Mesure de la distance parcourue dans le test de l'OF chez les souris cKO-CeA.</i>	153
<i>Figure 42: Immunomarquage du tPA et du marqueur vGluT2 au niveau de la CeA.</i>	154
<i>Figure 43: Analyse de l'activation neuronale au niveau de la CeA.</i>	155
<i>Figure 44: Régulations potentielles de la dégradation des PNNs par le tPA.</i>	161
<i>Figure 45: Caractérisation comportementale des souris tPA Flox^{+/+}; PV-Cre^{+/+}.</i>	163
<i>Figure 46: Expression de GluN2B par les interneurons PV.</i>	166
<i>Figure 47: Le tPA potentialise l'excitotoxicité induite par le NMDA dans des cultures d'interneurones.</i>	167

Index des Tableaux :

<i>Tableau 1: Tableau récapitulatif des différents sous-types neuronaux entourés de PNNs dans les différentes régions cérébrales.</i>	58
---	----

Liste des abréviations

AC	adénylate cyclase
ADAMTS	<i>a desintegrin and metalloproteinase with thrombospondin motifs</i>
AMPA	<i>a-amino-3-hydroxy-5-methylisoxazole- 4-propionic acid</i>
AMPC	adénosine monophosphate cyclique
ARN	acide ribonucléique
AVC	accident vasculaire cérébral
BA	noyau basal
BDZ	benzodiazépines
BHE	barrière hématoencéphalique
BLA	noyau basolatéral
BM	<i>barnes maze</i>
BMA	noyau basomédial
BNST	<i>bed nucleus of the stria terminalis</i>
Bra	<i>brain-specific hyaluronan-binding protein</i>
CA	corne d'amont
CAG	promoteur hybride <i>chicken β-actin/cytomegalovirus</i>
CAMKII	<i>calcium/calmodulin (CaM)-dependent protein kinase</i>
CBF	<i>cerebral blood flow</i>
CCK	cholécystokinine
c-DNA	acide désoxyribonucléique complémentaire
CE	cortex entorhinal
CeA	noyau central
CeC	noyau capsulaire
CeL	noyau centro-latéral
CeM	noyau centromédian
c-Fos	<i>cellular feline osteosarcoma</i>
ChABC	chondroïtinase ABC
cKO-BLA	<i>conditional knockout basolateral amygdala</i>
cKO-Cea	<i>conditional knockout central amygdala</i>
cKO-HPC	<i>conditional knockout hippocampus</i>
CREB	<i>cyclic AMP-response element binding protein</i>
CRF	<i>corticotropin-releasing factor</i>
CS-GAG	glycosaminoglycanes sulfatés
CSPG	chondroïtines sulfates protéoglycanes
DG	gyrus denté
E14	embryonnaire 14
EGF	<i>epidermal growth factor</i>
EPM	<i>elevated plus maze</i>
FS-PV	<i>fast-spiking parvalbumin</i>
GABA	<i>gamma-aminobutyric acid</i>
GAG	glycosaminoglycanes
GFP	<i>green fluorescence protein</i>
GlcA-GlcNAc	acide glucuronique + N-acétyl-glucosamine
HA	acide hyaluronique
HAPLN	<i>hyaluronan and proteoglycan link protein</i>
HAS	<i>hyalyronan synthase</i>
H-ase	<i>hyaluronidase</i>
HPA	hypothalamo-hypophyso surrénalien
HPLN	<i>hyaluronan- and proteoglycan-binding link proteins</i>

IHC	immunohistochimique
KO	<i>knockout</i>
KS-GAG	kératane sulfate
LA	noyau latéral
LBS	<i>lysine binding site</i>
L-LTP	<i>late-LTP</i>
LRP	<i>low density lipoprotein receptor-related protein</i>
LTD	<i>long term depression</i>
LTP	<i>long term potentiation</i>
MAPK	<i>mitogen-activated protein kinase</i>
MCP-1	monocytaire chémoattractante 1
MD	<i>monocular deprivation</i>
MDD	<i>major depressive disorders</i>
MEC	matrice extracellulaire
MF-CA3	fibres moussues projetant sur CA3
MMPs	<i>matrix metalloproteinases</i>
MWM	piscine de Morris
NGF	facteur de croissance neuronale
NMDA	N-méthyl-D-aspartate
NO	monoxyde d'azote
NS	neuroserpine
NSF	<i>novelty supressed feeding</i>
OF	<i>open-field</i>
OM	<i>o-maze</i>
PA	activateur du plasminogène
PAI-1	<i>plasminogen inhibitor 1</i>
Pap	<i>preactivation peptide</i>
PAR-1	<i>protease-activated receptor 1</i>
PDGF-CC	<i>platelet derived growth factor-CC</i>
PDGFR- α	<i>platelet-derived growth factor receptor α</i>
PFC	cortex préfrontal
PI3K	phosphatidylinositol-3-Kinase
PKA	protéine Kinase A
PKC	protéine Kinase C
PKC δ	protéine kinase C- δ
Plat	<i>plasminogen activator tissue-type</i>
Plg	plasminogène
PLG-2	prostaglandine de type 2
PN-1	protéase nexine-1
PNNS	réseaux périneuronaux
PV	parvalbumine
RCL	<i>reactive center loop</i>
RFP	<i>red fluorescence protein</i>
RPTP	<i>receptor protein tyrosin phosphatase</i>
RT-PCR	<i>single-cell reverse transcription polymerase chain reaction</i>
SAP	système d'activation du plasminogène
SC-CA1	collatérales de Schaffer projetant sur CA1
sc-tPA	<i>single chain tPA</i>
SNC	système nerveux central
SOM	somatostatine
TAFI	<i>thrombin activatable fibrinolysis inhibitor</i>
tc-tPA	two-chain tPA

TDAH	trouble déficitaire de l'attention avec hyperactivité
TIMP3	inhibiteur de métalloprotéinase 3
Tn	ténascine
TNF	<i>tumor necrosis factor</i>
tPA	<i>tissue-type plasminogen activator</i>
uPA	<i>urokinase plasminogen activator</i>
US	<i>unconditioned stimulus</i>
VAMP2	<i>vesicle-associated membrane protein 2</i>
VGLUT1	<i>vesicular glutamate transporter 1</i>
VIP	<i>vasointestinal peptide</i>
WFA	wisteria floribunda agglutinin
WT	wild-type
ϵ ACA	<i>ϵ-amino caproic acid</i>

Introduction

A. L'activateur tissulaire du plasminogène

L'activateur tissulaire du plasminogène (en anglais : *tissue-type plasminogen activator*, tPA) est une sérine protéase présente dans le sang où elle peut être libérée par les cellules endothéliales et les hépatocytes afin de promouvoir la fibrinolyse des caillots sanguins. Le tPA permet la conversion du plasminogène inactif en plasmine active qui, à son tour, dégrade les caillots de fibrine. Ainsi, le tPA est le seul traitement pharmacologique actuel pour le traitement de la phase aiguë des accidents vasculaires cérébraux (AVC) ischémiques. Le tPA est également exprimé dans le parenchyme cérébral par différents types cellulaires tels que les neurones ou les oligodendrocytes. Cette protéase présente de nombreuses fonctions dans le système nerveux central grâce à son interaction avec différentes protéines ou récepteurs et peut également avoir des fonctions directement dépendantes de son activité catalytique.

I. Historique

Dès 1761, Giovanni Battista Morgagni, un anatomiste italien observe que le sang des patients décédés subitement ne coagulait pas (Morgagni, 1761). Plus tard, en 1844, les travaux d'Andral apportent les premières évidences du système fibrinolytique en montrant que le sang coagulé pouvait redevenir liquide (Gabriel Andral, 1844). Le terme « fibrinolyse » est reporté pour la première fois en 1893 par Albert Dastre, un physiologiste français (Dastre, 1893). En 1903, Hédin met en évidence une activité protéolytique dans une fraction de sérum, qui sera par la suite identifié comme étant le plasminogène, précurseur inactif de la plasmine, responsable de la dégradation de la fibrine présente dans les caillots sanguins (Hedin, 1903). En 1947, les travaux d'Astrup et Permin montrent que les tissus animaux contiennent un agent capable d'activer le plasminogène, le tPA, alors appelé fibrinokinase (Astrup and Permin, 1947). Ce n'est qu'en 1979 que le tPA est purifié et caractérisé dans la circulation et dans l'utérus. Ce dernier est pour la première fois utilisé chez l'Homme en 1981, par Weimar afin de traiter des patients atteints de thrombose de la veine rénale (Weimar *et al.*, 1981). En 1983, l'équipe de Désiré Collen réussit à cloner le c-DNA du tPA humain et à le faire exprimer d'abord chez *E.Coli* puis dans des cellules de mammifère (Pennica *et al.*, 1983). Le tPA sera plus tard proposé comme agent thrombolytique dans le traitement des AVC ischémiques et est encore aujourd'hui le seul traitement pharmacologique autorisé dans le traitement de la phase aiguë de l'ischémie cérébrale (National Institute of Neurological Disorders and Stroke rt-PA Stroke Study Group, 1995).

II. Structure du tPA

L'activateur tissulaire du plasminogène est une glycoprotéine de 69 kDA de la famille des sérines protéases codée par le gène *Plat* (en anglais : *Plasminogen activator tissue-type*) situé sur le chromosome 8. Le tPA humain est constitué de 527 acides aminés et comprend 5 domaines dont la structure tridimensionnelle est maintenue par 17 ponts disulfures (Pennica *et al.*, 1983). Ces cinq domaines sont répartis sur 2 chaînes : la chaîne lourde comprend les domaines Finger, EGF-like, Kringle 1 et Kringle 2 tandis que la chaîne légère est composée du domaine sérine protéase. L'interaction de ses différents domaines avec d'autres protéines est à l'origine de ses différentes fonctions (Figure 1).

- **Le domaine Finger** permet au tPA de se lier à la fibrine nécessaire à la formation d'un complexe ternaire avec le plasminogène (Kagitani *et al.*, 1985). Ce domaine permet également la liaison au récepteur aux lipoprotéines de faible densité (en anglais : *Low Density Lipoprotein Receptor-related Protein* ou LRP) et à l'annexin II (Bu *et al.*, 1992; K. A. Hajjar *et al.*, 1994). Le domaine finger est également impliqué dans la liaison du tPA avec l'un de ses inhibiteurs, PAI-1 (en anglais : *plasminogen inhibitor 1*) (Kaneko *et al.*, 1992).
- **Le domaine EGF** (en anglais : *epidermal growth factor*), nommé ainsi en raison de son homologie avec le facteur de croissance épidermique, permet l'interaction du tPA avec le récepteur à l'EGF et la O-glycosylation de ce domaine joue un rôle dans la recapture et la clairance du tPA au niveau hépatique (Katherine A. Hajjar and Reynolds, 1994; Hurtado *et al.*, 2007).
- **Le domaine Kringle 1** a été peu étudié, néanmoins des travaux suggèrent l'importance de sa glycosylation dans sa recapture par le foie par l'intermédiaire des récepteurs au mannose des cellules endothéliales hépatiques (Kuiper *et al.*, 1988).
- **Le domaine Kringle 2** contient un site de forte affinité pour la lysine (en anglais : *lysine binding site*, LBS) qui permet au tPA de se lier avec différents substrats et récepteurs tels que le plasminogène, la sous-unité GluN1 du récepteur NMDA ou le facteur de croissance dérivé des plaquettes (en anglais : *platelet derived growth factor-CC* ou PDGF-CC) (Fredriksson *et al.*, 2004; Lopez-Atalaya *et al.*, 2008).
- **Le domaine sérine protéase** du tPA est responsable du clivage du plasminogène en plasmine grâce à la triade catalytique composée des acides aminés : histidine³²², acide aspartique³⁷¹ et sérine⁴⁷⁸ (Pennica *et al.*, 1983).

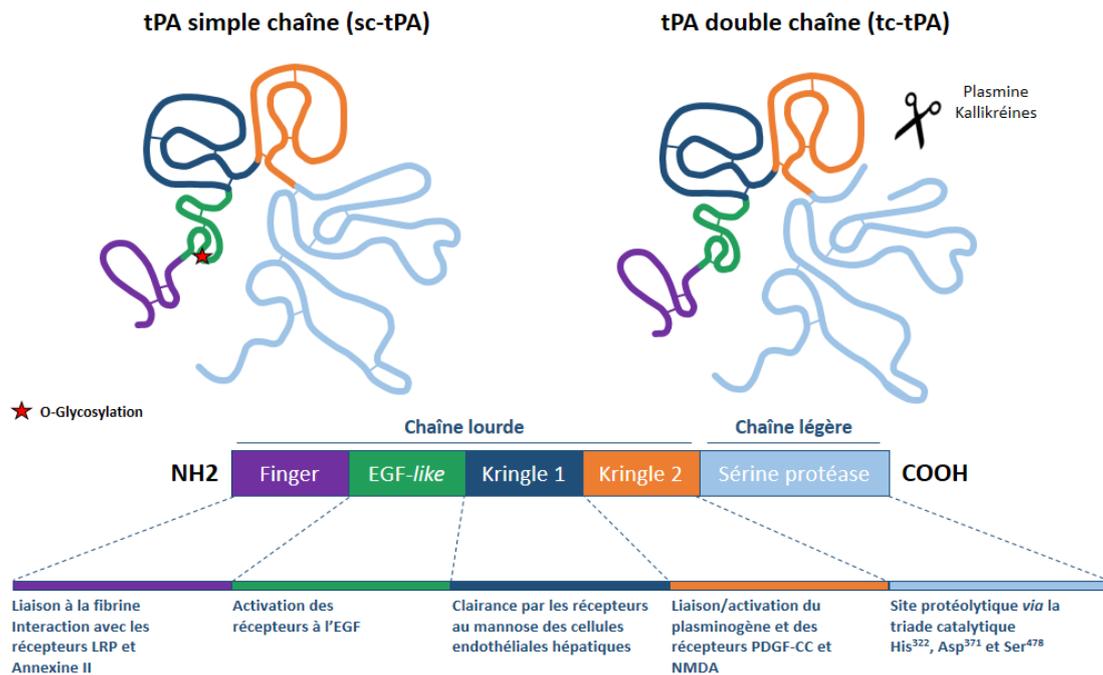


Figure 1: Structure et fonctions du tPA.

Schéma représentant le tPA sous forme simple (sc-tPA) et double chaîne (tc-tPA) mettant en évidence les 5 domaines (Finger, EGF, kringle1, kringle2 et sérine protéase), les 17 ponts disulfures ainsi que le site de clivage par des protéases comme la plasmine et les kallikréines (adapté de : Chevilly *et al.*, 2015; Hébert *et al.*, 2016).

Le tPA peut être présent sous forme simple chaîne (en anglais : *single chain* tPA ou sc-tPA) ou double-chaîne (en anglais : *two-chain* tPA ou tc-tPA) suite à un clivage par d'autres protéases telles que la plasmine ou des kallikréines (Ichinose *et al.*, 1984; Wallén *et al.*, 1982). Contrairement aux autres sérines protéases inactives sous leur forme simple chaîne, les deux formes de tPA présentent une activité protéolytique (D. C. Rijken *et al.*, 1982).

III. Synthèse du tPA

1- Expression périphérique

a. Dans les vaisseaux

Le tPA est essentiellement présent dans le compartiment vasculaire et sa concentration circulante est d'environ 70 pM (Dingeman C. Rijken and Lijnen, 2009). Le tPA est exprimé par les cellules endothéliales et peut être sécrété dans la circulation de manière constitutive (Binder *et al.*,

1979; Levin *et al.*, 1997) ou en réponse à différents stimuli tels que la présence de thrombine, l'hyperoxie ou un stress mécanique (Diamond *et al.*, 1989; Levin *et al.*, 1997). La localisation subcellulaire du tPA endothélial reste mal connue. En effet, tandis qu'une première étude rapporte sa co-localisation avec le facteur Van Willebrand au sein des corps de Weibel-Palade (Huber *et al.*, 2002), d'autres travaux décrivent sa présence dans des vésicules de plus petit diamètre (Figure 2) (Emeis *et al.*, 1997).

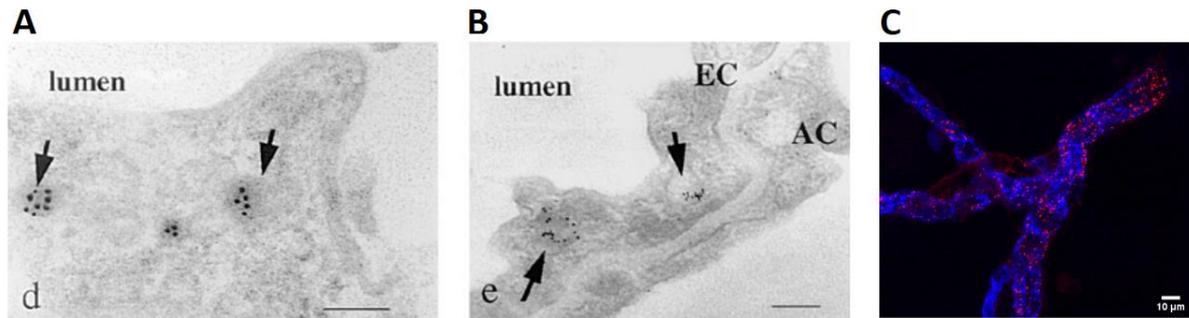


Figure 2: Expression du tPA dans les cellules endothéliales.

(A, B) Détection par *immunogold* du tPA au niveau des capillaires de poumon (A) et de diaphragme (B) observés par microscopie électronique. Le tPA est stocké dans des vésicules de petit diamètre dans les cellules endothéliales (adapté de Emeis *et al.*, 1997). (C) Immunohistochimie sur vaisseaux cérébraux isolés révélant le tPA (rouge) et les cellules endothéliales mises en évidence par un marquage du CD-31 (bleu).

Les cellules endothéliales étaient jusqu'alors proposées comme la source de tPA circulant. Cependant, une récente étude de Zheng et collaborateurs a montré que les hépatocytes sont également une source de tPA plasmatique en condition physiologique et suggère que le tPA produit par le foie permettrait d'amorcer la fibrinolyse suite à la formation d'un caillot sanguin (Zheng *et al.*, 2018).

b. En périphérie

L'activité protéolytique du tPA est également retrouvée dans de nombreux organes tels que les ovaires, les testicules, les poumons, le cœur ou la prostate (Roufet *et al.*, 1996). Il peut être exprimé en condition physiologique ou uniquement en condition pathologique comme dans le cancer du pancréas (Aguilar *et al.*, 2004). La synthèse de tPA est généralement associée à un remodelage tissulaire ou à des modifications de la vascularisation.

2- Expression centrale

Dès 1981, Soreq et Miskin ont mis en évidence la présence d'activateur du plasminogène dans le cerveau de souris par des techniques autoradiographiques. Ces premières données montrent que les activateurs du plasminogène sont retrouvés à la fois dans la vascularisation et au niveau des zones enrichies en neurones (Soreq and Miskin, 1981).

a. Sous-types cellulaires exprimant le tPA

Dans le SNC, l'expression de tPA a été rapportée au niveau de différents types cellulaires tels que les neurones, les oligodendrocytes, les astrocytes, la microglie, les épendymocytes et les péricytes (Figure 3).

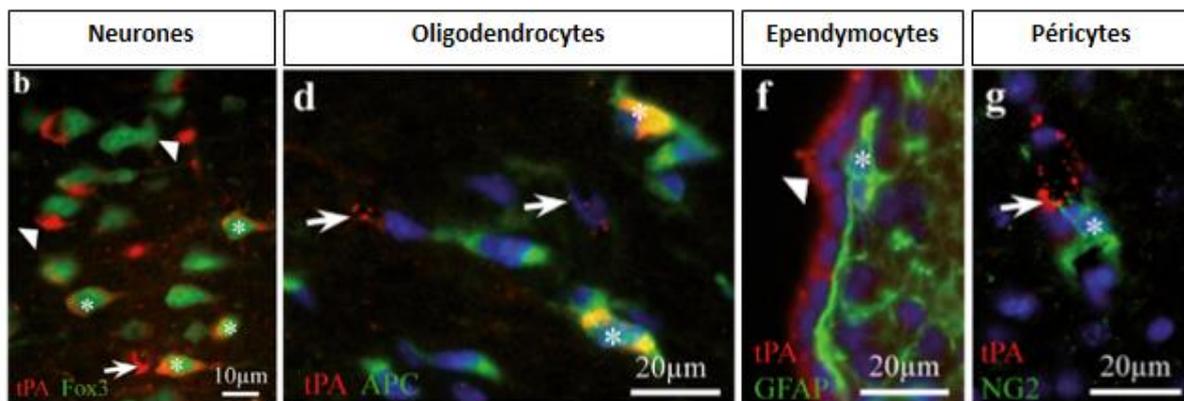


Figure 3: Expression du tPA par différents types cellulaires du SNC chez la souris adulte.

Immunohistochimie révélant la présence de tPA (marqué en rouge) au sein des neurones (marquage Fox3, en vert), des oligodendrocytes (marquage APC, en vert), des épendymocytes (marquage GFAP, en vert) et des péricytes (marquage NG2, en vert). Le tPA est détecté au niveau des neurones corticaux après un traitement à la colchicine (adapté de Louessard *et al.*, 2016).

...dans les neurones.

Krystosek et Seeds ont révélé la sécrétion d'activateurs tissulaires du plasminogène par les neurones granulaires du cervelet en culture (Krystosek and Seeds, 1981). Ils ont également pu mettre en évidence que cette sécrétion pouvait se faire au niveau du corps cellulaire ou du cône de croissance dans des cultures de lignées de neuroblastome (Krystosek and Seeds, 1981). Shin et collaborateurs ont montré la colocalisation du tPA avec la synaptophysine au niveau des dendrites dans un modèle de culture de neurones hippocampiques. Ils ont également confirmé la présence du tPA et de ses ARN messagers au niveau de la synapse par l'analyse des fractions synaptosomales (Shin *et al.*, 2004). L'utilisation d'un modèle de surexpression du tPA fusionné à une protéine GFP (en anglais : *green*

fluorescence protein) dans une lignée PC12 a permis à Lochner et collaborateur de montrer que le tPA est transporté dans des granules de sécrétion le long des neurites (Lochner *et al.*, 1998). Ils ont également découvert que le tPA pouvait être sécrété au niveau du cône de croissance en réponse à une stimulation chimique. Plus tard, cette même équipe a mis en évidence *in vitro* que le tPA était présent dans des vésicules à cœur dense au niveau des épines dendritiques et pouvait être libéré en réponse à une dépolarisation induite par l'ajout de potassium (Lochner *et al.*, 2006). Une récente étude menée au laboratoire a décrit dans un modèle *in vitro* de culture de neurones corticaux que le tPA est retrouvé dans des vésicules d'exocytose VAMP2 (en anglais : *Vesicle-associated membrane protein 2*) positives au niveau présynaptique et postsynaptique et peut être sécrété de manière constitutive, majoritairement au niveau des dendrites (Figure 4) (Lenoir *et al.*, 2019).

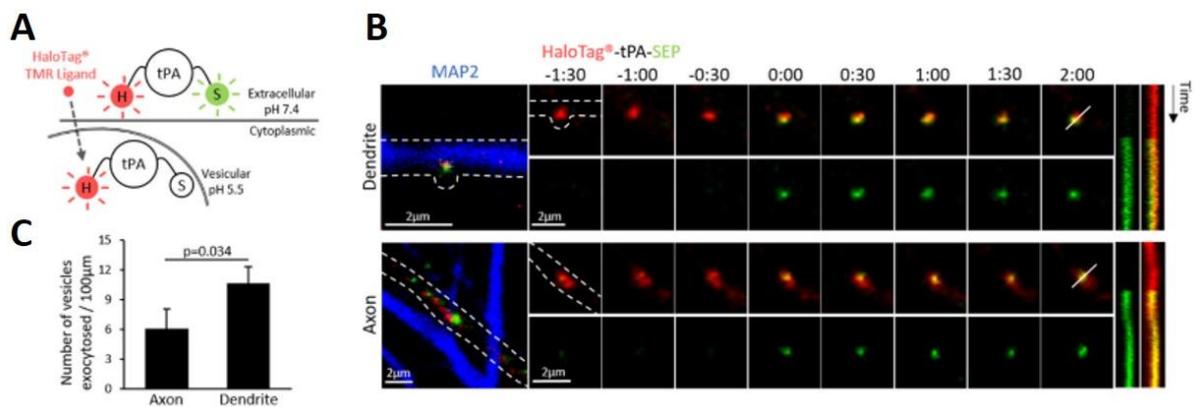


Figure 4: Sécrétion du tPA au niveau dendritique et axonal.

(A) Utilisation d'un modèle de surexpression d'un tPA fusionné à une molécule Halo-Tag (H, révélée en rouge par l'ajout de son ligand, le TMR) et à une molécule sensible au pH (la phluorine superecliptique, S) permettant de visualiser l'exocytose du tPA (en vert). (B) Visualisation de la dynamique du tPA dans les dendrites et les axones de neurones dans les neurones corticaux transfectés à 12 jours *in vitro* par microscopie confocale. Le tPA est préférentiellement exocyté au niveau des dendrites (C) (Adapté de Lenoir *et al.*, 2019).

La caractérisation précise des sous-types neuronaux exprimant le tPA *in vivo* reste encore mal connue. En effet, compte tenu du transport du tPA le long des axones et des dendrites, sa détection immunohistochimique est restreinte aux neurites, au niveau des fibres moussues hippocampiques, de l'amygdale, de l'hypophyse, de l'éminence médiane de l'hypothalamus ou de l'habenula médiane (Fredriksson *et al.*, 2015; Louessard *et al.*, 2016). En 2016, des travaux du laboratoire ont révélés l'accumulation du tPA spécifiquement au niveau des corps cellulaires des neurones glutamatergiques du cortex et des neurones granulaires du gyrus denté grâce à l'utilisation d'un traitement bloquant le transport axo-dendritique du tPA. Ces données ont également été confirmées au niveau de la couche V du cortex par des techniques de *single-cell* RT-PCR (en anglais : *single-cell reverse transcription*

polymerase chain reaction) couplée à des enregistrements en patch-clamp (Figure 5) (Louessard *et al.*, 2016).

Peu d'études ont mis en évidence la présence de tPA dans les neurones inhibiteurs GABAergiques (en anglais : *gamma-aminobutyric acid*). Néanmoins, son expression a été rapportée dans les interneurones exprimant la somatostatine (SOM), la parvalbumine (PV) ou le peptide vasointestinal (en anglais : *vasointestinal peptide* ou *VIP*) (Chu *et al.*, 2015; Fredriksson *et al.*, 2015; Stevenson and Lawrence, 2018).

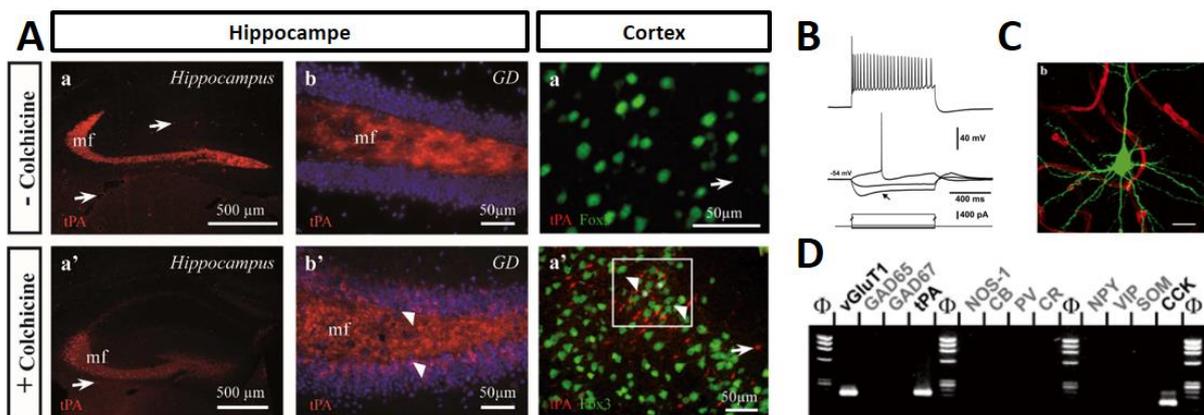


Figure 5: Expression du tPA au sein des neurones excitateurs dans l'hippocampe et le cortex de souris adultes. (A) Immunohistochimie révélant le tPA (en rouge) au niveau du cortex et de l'hippocampe. Le tPA est détecté uniquement dans les fibres moussues hippocampiques en condition basale. Un traitement à la colchicine permet de révéler l'accumulation du tPA dans les neurones granulaires du gyrus denté de l'hippocampe et dans les neurones corticaux (marquage Fox3, en vert). (B) Profil de décharge d'un neurone pyramidal exprimant le tPA au niveau de la couche V du cortex obtenu par patch-clamp. (C) Morphologie d'un neurone exprimant le tPA révélé par l'injection de biocytine (en vert). (D) *Single-cell* RT-PCR sur un neurone de la couche V du cortex révélant l'expression des ARNm du tPA ainsi que les ARNm du transporteur au glutamate (en anglais : *vesicular glutamate transporter 1* ou *VGLUT1*) et de la cholécystokinine (CCK).

...dans les astrocytes.

La synthèse du tPA par les astrocytes a été mise en évidence *in vitro* et *in vivo* chez la souris (Stevenson and Lawrence, 2018; Toshniwal *et al.*, 1987). Hultman et collaborateurs ont également montré que chez l'Homme le tPA est principalement retrouvé dans les astrocytes activés et que son expression et sa sécrétion pouvait être régulée par différents facteurs tel que l'acide rétinolique ou des activateurs de la protéine kinase C (Hultman *et al.*, 2008). De plus, les astrocytes sont capables de recapturer le tPA sécrété par les neurones en interagissant avec les récepteurs LRP. Le recyclage du tPA extracellulaire par les astrocytes pourrait alors permettre de réguler sa concentration à la synapse et de moduler ses effets sur la signalisation dépendante des récepteurs NMDA (Cassé *et al.*, 2012).

...dans les oligodendrocytes.

Le tPA est synthétisé par les oligodendrocytes chez l'adulte et son expression diminue au cours du vieillissement (Correa *et al.*, 2011; Louessard *et al.*, 2016). Cette protéase est impliquée dans la migration des précurseurs d'oligodendrocytes au niveau du cerveau et de la moelle épinière au cours du développement mais également lors de la phase de remyélinisation dans un modèle de lésion de la substance blanche (Leonetti *et al.*, 2017).

... dans la microglie.

La microglie est également capable d'exprimer du tPA dans un modèle de lésion excitotoxique. Le tPA pourrait également contribuer à l'activation microgliale en condition inflammatoire (Rogove *et al.*, 1999; Siao *et al.*, 2003; Siao and Tsirka, 2002; Tsirka *et al.*, 1997).

b. Régions cérébrales

Dès 1993, Sappino et collaborateurs décrivent la présence d'ARN messagers du tPA dans les neurones au sein de différentes régions cérébrales tel que le cortex ou l'hippocampe tandis que son activité protéolytique est concentrée dans certains noyaux tel que l'hippocampe ou l'hypothalamus (Sappino *et al.*, 1993).

Au sein du laboratoire, des neurones exprimant le tPA ont été mis en évidence par immunohistochimie dans le gyrus denté de l'hippocampe et les cortex somatosensoriel, entorhinal, retrosplénial, perhinal et piriforme (Louessard *et al.*, 2016).

Plus récemment, Stevenson et Lawrence ont confirmé ces données et révélé l'expression du tPA dans plusieurs aires sous-corticales telles que l'amygdale, l'hypothalamus et le noyau du lit de la strie terminale (en anglais : *bed nucleus of the stria terminalis* ou BNST) grâce à l'utilisation d'une souris transgénique exprimant la bêta-galactosidase sous le contrôle du promoteur Plat. De plus, l'utilisation d'une souris transgénique exprimant le tPA fusionné à la protéine fluorescente Cerulean leur a permis de montrer que les fibres neuronales exprimant du tPA sont principalement retrouvées au niveau des fibres moussues hippocampiques, du cortex entorhinal et des régions limbiques (Figure 6) (Stevenson and Lawrence, 2018).

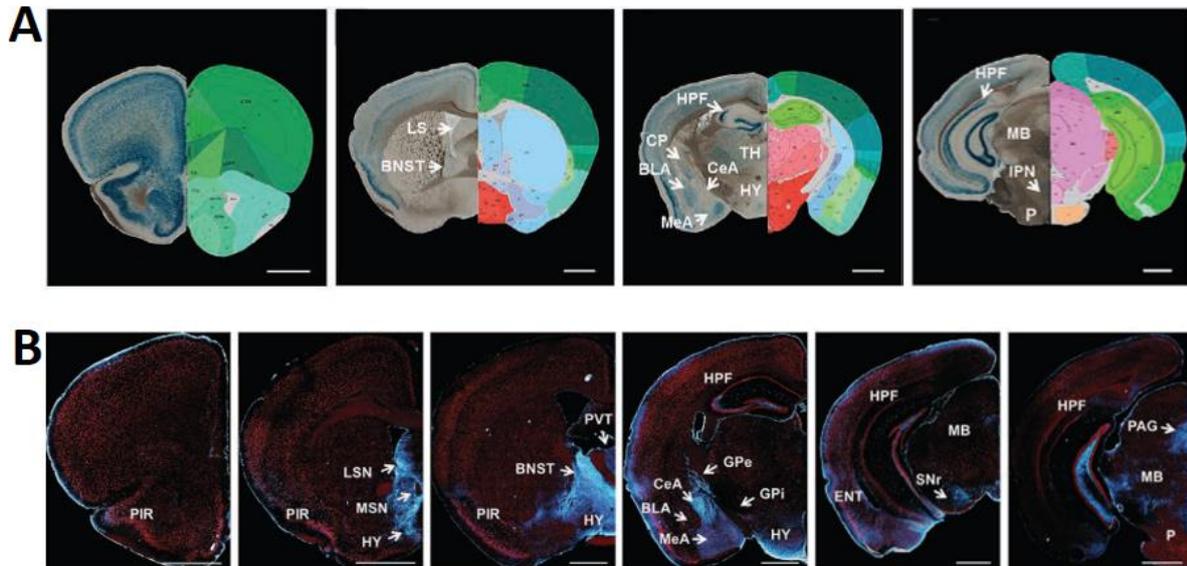


Figure 6: Caractérisation de l'expression et du trafic du tPA au sein dans différentes régions cérébrales.
 (A) Visualisation de l'expression du tPA au niveau somatique chez la souris dite « rapportrice » Plat- β -Gal. L'expression de la bêta-galactosidase sous le contrôle du promoteur du gène du tPA (Plat) est retrouvée au niveau du cortex et dans les régions sous-corticales. (B) Visualisation de l'expression du tPA au niveau des neurites chez la souris Plat-^{BAC}-Cer. La protéine rapportrice Cerulean est retrouvée essentiellement au niveau des régions limbiques. (HPF : formation hippocampique ; LS : septum lateral ; CP : caudo-putamen ; TH : thalamus ; BLA : amygdale basolatérale ; CeA : noyau central de l'amygdale ; MeA : noyau médial de l'amygdale ; HY : hypothalamus ; MB : mésencéphale ; IPN : noyau interpédonculaire ; P : Pont ; PIR : cortex piriforme ; LSN : noyau du septum latéral ; MSN : noyau du septum médial ; GPe/i : Globus pallidus externe/interne ; SNr : substance noire réticulée ; PAG : substance grise péri-aqueducule ; PVT : noyau paraventriculaire du thalamus ; ENT : cortex entorhinal ; BNST : noyau du lit de la strie terminale) (D'après Stevenson et Lawrence, 2018).

3- Inhibiteurs du tPA

L'absence de corrélation entre la présence des ARNm ou de la protéine du tPA et son activité protéolytique dans des régions cérébrales telle que la corne d'amont (CA1) suggère la présence d'inhibiteurs au sein du SNC (Sappino *et al.*, 1993). Les inhibiteurs du tPA appartiennent à la famille des serpines (en anglais : *serine proteinase inhibitors*). Les serpines sont des protéines monomériques glycosylées de 330 à 500 acides aminés ayant une masse molaire d'environ 50kDa. Leur conformation secondaire comprend trois feuillets β et huit à neuf hélices α . Leur boucle réactive centrale (en anglais : *reactive center loop* ou RCL) leur permet d'interagir avec les protéases. Le clivage du RCL par la protéase permet une liaison non-covalente entre les deux molécules et l'inhibition de la protéase. Dans le système nerveux central, l'inhibition du tPA est permise par PAI-1, la neuroserpine (NS) et la protéase nexine-1 (PN-1).

a. PAI-1

Au niveau périphérique, le PAI-1 aussi appelé SERPINE 1 est retrouvé dans le plasma où il est sécrété par les cellules endothéliales, les cellules musculaires lisses et les plaquettes (Sprengers and Kluft, 1987). L'inhibition du tPA est permise par l'interaction de PAI-1 avec ses domaines Finger et Kringle 2, bloquant ainsi sa fixation sur la fibrine (Kaneko *et al.*, 1992). Dans le système nerveux central, le PAI-1 est exprimé en faible quantité dans les neurones et les astrocytes en condition physiologique (Buisson *et al.*, 1998; Hino *et al.*, 2001) mais son expression est augmentée notamment dans les astrocytes dans un contexte pathologique tel que l'AVC ischémique (Docagne *et al.*, 1999; Sallés and Strickland, 2002). Le PAI-1 semble également être impliqué dans l'étiologie de certaines pathologies psychiatriques telles que la dépression majeure (en anglais : *major depressive disorders* ou MDD). En effet, une augmentation du taux de PAI-1 sanguin a pu être observée chez les patients souffrant de MDD (Jiang *et al.*, 2016). De plus, de récents travaux réalisés au laboratoire ont montré des phénotypes de type dépressifs tel que l'anhédonie ou l'apathie ainsi qu'une résistance aux antidépresseurs chez des souris déficientes en PAI-1 (Party *et al.*, 2019).

b. La neuroserpine

La neuroserpine est exprimée de manière pratiquement exclusive dans le système nerveux central où elle est synthétisée en condition physiologique par les neurones et les astrocytes (Docagne *et al.*, 1999; Osterwalder *et al.*, 1998). La neuroserpine inhibe le tPA en se liant directement à son domaine catalytique (Miranda and Lomas, 2006). Dans le SNC, la neuroserpine module la plasticité synaptique et est impliquée dans la régulation d'un grand nombre réponses comportementales telles que l'anxiété, la mémoire et la locomotion (Madani *et al.*, 2003; Reumann *et al.*, 2017).

c. La protéase nexine 1

La protéase nexine 1 est exprimée dans le parenchyme cérébral par les neurones et les cellules gliales (Giau *et al.*, 2005; Simpson *et al.*, 1994) et est capable d'inhiber de nombreuses protéases incluant la thrombine, la plasmine et le tPA (Evans *et al.*, 1991; Scott *et al.*, 1985). La PN-1 semble jouer un rôle dans la potentialisation à long terme et son activité est réduite dans l'hippocampe de patients atteints de la maladie d'Alzheimer (Lüthi *et al.*, 1997; Wagner *et al.*, 1989).

IV. Fonctions du tPA

1- Fonctions vasculaires

α- La fibrinolyse

La fibrinolyse est un mécanisme enzymatique permettant la dégradation des caillots de fibrine présents dans les vaisseaux sanguins. Le clivage de la fibrine est permis par une enzyme exprimée au niveau hépatique, la plasmine. Au niveau plasmatique, la plasmine est présente sous forme d'une proenzyme, le plasminogène. Ce dernier va pouvoir être clivé en sa forme active par deux activateurs : le tPA et l'activateur du plasminogène de type urokinase (en anglais : *urokinase-type plasminogen activator* ou uPA) (Collen and Lijnen, 1991). L'activation du plasminogène en plasmine par le tPA est peu efficace en absence de fibrine mais elle est multipliée par cent en sa présence (Hoylaerts *et al.*, 1982). Cette particularité permet au tPA d'activer le plasminogène en plasmine spécifiquement au niveau des caillots de fibrine (Figure 7).

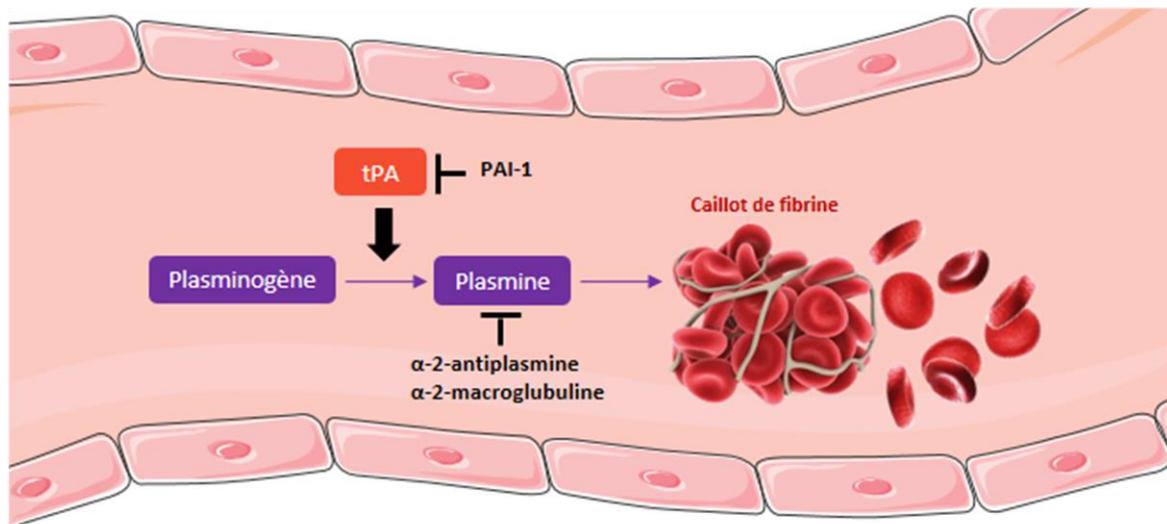


Figure 7: Mécanisme d'action de la fibrinolyse.

Le tPA libéré dans la circulation est capable de convertir le plasminogène en plasmine à proximité des caillots de fibrine. La plasmine peut alors dégrader la fibrine et permettre la lyse du caillot. La fibrinolyse est régulée par PAI-1 (inhibiteur du tPA) et par l'α-2-antiplasmine et l'α-2-macroglobuline (inhibiteurs de la plasmine).

L'inhibition de la fibrinolyse peut être effectuée à la fois au niveau des activateurs du plasminogène ou directement *via* l'inhibition de la plasmine par l'α-2-antiplasmine et l'α-2-macroglobuline (Thiebaut *et al.*, 2018). Cette régulation permet notamment d'éviter les phénomènes d'hyperfibrinolyse responsable d'une perméabilisation de la barrière hématoencéphalique (BHE) (Marcos-Contreras *et al.*, 2016).

b- tPA et BHE

Le tPA est actuellement l'unique traitement pharmacologique pour le traitement de la phase aiguë des AVC ischémiques. Il a cependant été montré que l'injection intraveineuse de tPA peut augmenter les lésions cérébrales, y compris chez des animaux déficients en tPA (Wang *et al.*, 1998). L'hypothèse d'un passage du tPA du compartiment sanguin vers le parenchyme cérébral à travers la BHE permettrait d'expliquer ces résultats. Des études menées au sein du laboratoire ont permis de montrer que le tPA est capable de passer la BHE en condition physiologique grâce à un mécanisme de transcytose dépendante des récepteurs LRP (Benchenane *et al.*, 2005). De plus, Benchenane et collaborateurs ont montré que le passage du tPA est indépendant des récepteurs LRP dans un modèle de privation en oxygène et en glucose (Benchenane *et al.*, 2005).

Le tPA pourrait également agir sur la perméabilisation de la BHE et être responsable des transformations hémorragiques suite à un AVC ischémique. En effet, l'interaction du tPA avec les récepteurs LRP jouerait un rôle dans le détachement des pieds astrocytaires et, par conséquent, dans la perméabilisation de la BHE en condition ischémique (Polavarapu *et al.*, 2007).

L'administration intraveineuse de tPA lors d'un AVC permettrait aussi d'augmenter l'expression des métalloprotéinases matricielles (en anglais : *Matrix Metalloproteinases* ou MMPs) dans les cellules endothéliales (Suzuki *et al.*, 2007). Ces dernières sont à leur tour capables de dégrader différents composants de la matrice extracellulaire (MEC) telle que la laminine ou le collagène (Lakhan *et al.*, 2013). De plus, le tPA est capable d'activer le PDGF-CC qui va à son tour pouvoir agir sur le récepteur α du facteur de croissance plaquettaire (en anglais : *Platelet-Derived Growth Factor Receptor* α , PDGFR- α) situés sur les astrocytes et réduire l'intégrité de la BHE (Su *et al.*, 2008).

Finalement, il a récemment été montré au laboratoire que le blocage de l'interaction du tPA avec le récepteur NMDA est capable de réduire la perméabilité de la BHE en condition inflammatoire suite à un traitement au TNF (en anglais: *Tumor Necrosis Factor*) ou dans un modèle animal de sclérose en plaques (Macrez *et al.*, 2016; Mehra *et al.*, 2020).

c- tPA et couplage neurovasculaire

Le concept d'unité neurovasculaire repose sur une relation étroite entre les vaisseaux sanguins et les différentes cellules cérébrales permettant un couplage entre l'activité neuronale et le flux sanguin cérébral (en anglais : *cerebral blood flow* ou CBF) : le couplage neurovasculaire (Iadecola, 2017). Ce mécanisme serait induit par la libération de facteurs vaso-actifs tel que le monoxyde d'azote (en anglais : *nitric oxide* ou NO) ou la prostaglandine de type 2 (PLG-2) suite à l'activation neuronale et permettrait d'adapter localement l'apport en substrats énergétiques au niveau des régions

cérébrales activées. Les premières données suggérant un rôle du tPA dans l'unité neurovasculaire ont été mises en évidence par Cipolla et collaborateurs qui ont montré que l'injection intraventriculaire de tPA réduit la réactivité vasculaire lors d'une ischémie cérébrale (Cipolla *et al.*, 2000). Par ailleurs, Armstead et collaborateurs ont montré que le tPA induit une vasodilatation dépendante d'une libération de NO en condition physiologique (Armstead *et al.*, 2004). Nasser et collaborateurs ont, quant à eux, observé que le tPA module la vasoconstriction induite par la phényléphrine et que ce mécanisme est dépendant de la concentration de tPA et de son interaction avec le récepteur LRP (Nassar *et al.*, 2004). Plus récemment, l'équipe de C. Iadecola a mis en évidence un déficit de couplage neurovasculaire en réponse à une stimulation sensorielle chez des animaux déficients en tPA (Park *et al.*, 2008). De plus, l'application directe du tPA au niveau du cortex cérébral permet de compenser les déficits de couplage observés chez les souris déficientes en tPA. Par ailleurs, ces auteurs suggèrent que l'interaction du tPA avec les récepteurs NMDA post-synaptiques stimulerait la production de NO et induirait la vasodilatation (Figure 8).

Les travaux du laboratoire réalisés par Anfray et collaborateurs ont, quant à eux, décrit que l'interaction du tPA vasculaire avec les récepteurs NMDA endothéliaux permet de moduler les réponses hémodynamiques en réponse à une stimulation des vibrisses (Anfray *et al.*, 2019).

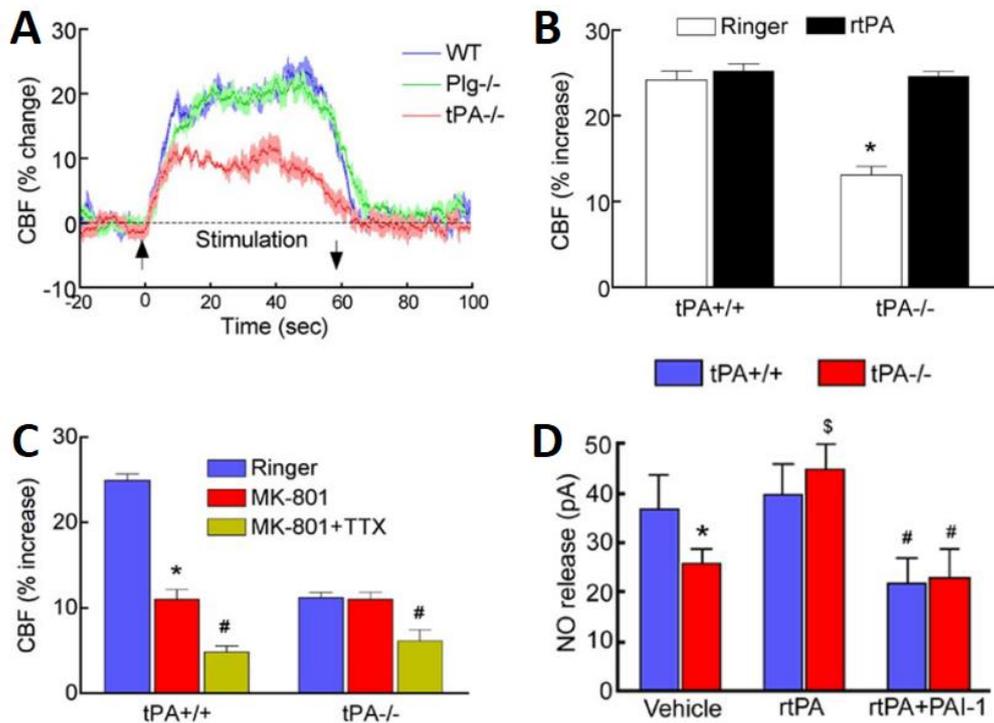


Figure 8: Effet du tPA sur le couplage neurovasculaire.

(A) L'hyperhémie fonctionnelle est réduite chez les souris déficientes en tPA par rapport aux souris WT en réponse à une stimulation des vibrisses. (B) L'application corticale de tPA exogène (r-tPA) permet de compenser le déficit de réponse hémodynamique chez les souris tPA KO. (C) L'inhibition des récepteurs NMDA par le MK-801 réduit l'hyperhémie fonctionnelle chez des souris sauvages mais n'a pas d'effet chez les souris tPA KO alors que la tétrodontoxine (TTX), un bloqueur des canaux sodiques réduit l'hyperhémie fonctionnelle chez les deux souches. (D) La production de NO est réduite chez les souris tPA KO et en présence de PAI-1 mais peut être restaurée par un traitement au r-tPA (adapté de Park *et al.*, 2008).

2- Fonctions centrales

a. tPA et neurodéveloppement

Le développement du cerveau est un processus complexe nécessitant la coordination entre la prolifération des progéniteurs neuronaux, leur différenciation, leur migration et, finalement, la mise en place de connexions permettant d'établir un réseau fonctionnel. La sécrétion de facteurs dans le milieu extracellulaire et le remodelage de la MEC permet de réguler finement l'ensemble de ces processus (Happel and Frischknecht, 2016; Jiang *et al.*, 2016). La dégradation des composants de la MEC est réalisée par différentes protéases telles que les MMPs, les désintégrines et métalloprotéinases à motifs thrombospondines (en anglais : *a desintegrin and metalloproteinase with thrombospondin motifs* ou ADAMTS) mais aussi par le tPA et la plasmine (Bonnans *et al.*, 2014).

Krystosek et Seeds ont montré que le tPA peut être sécrété au niveau des prolongements des progéniteurs neuronaux au cours du développement (A. Krystosek and Seeds, 1981; Alphonse Krystosek and Seeds, 1981). De plus, l'expression du tPA dans le SNC coïncide avec les stades de prolifération et de migration lors de l'embryogénèse (Friedman and Seeds, 1994). L'utilisation de souris déficientes en tPA (en anglais : tPA *knockout* ou tPA KO) a permis de mettre en évidence son implication dans la migration neuronale. En effet, Seeds et collaborateurs ont montré que la migration des neurones granulaires est retardée chez les souris tPA KO (Seeds *et al.*, 1999). L'application d'un inhibiteur bloquant le domaine catalytique du tPA sur des cultures organotypiques de cervelet ne semble pas influencer la migration des neurones granulaires suggérant un rôle indépendant de son activité protéolytique (Ware *et al.*, 1995).

Plus récemment, des travaux réalisés au sein du laboratoire ont montré un rôle du tPA dans la migration neuronale au cours de la corticogénèse (Pasquet *et al.*, 2019). En effet, ces travaux ont permis de mettre en évidence un retard de migration chez des souris déficientes en tPA et chez des souris dont le tPA est délété spécifiquement dans les progéniteurs neuronaux au jour embryonnaire 14 (E14) conduisant ainsi à un mauvais positionnement des neurones dans les couches corticales à l'âge adulte. Cette étude suggère également que l'implication du tPA dans la corticogénèse est dépendante de son interaction avec les récepteurs NMDA exprimés par la glie radiaire (Figure 9).

D'autres mécanismes pourraient également expliquer le rôle du tPA dans la corticogénèse, tel que sa capacité à cliver la réeline, une glycoprotéine sécrétée jouant un rôle majeur dans le positionnement des neurones et leur maturation dans le cerveau en développement (Trotter *et al.*, 2014). Le tPA joue également un rôle dans la migration des progéniteurs oligodendrocytes au cours du développement et ce, *via* un mécanisme de chémo-attraction dépendant des récepteurs à l'EGF (Leonetti *et al.*, 2017).

Plusieurs études se sont également intéressées au rôle du tPA dans la pousse neuritique. Le tPA est sécrété au niveau du cône de croissance, une structure transitoire nécessaire à l'élongation axonale et à la ramification des dendrites (Alphonse Krystosek and Seeds, 1981). Les données concernant l'implication du tPA dans la croissance neuritique sont contradictoires. En effet, Pittmann et collaborateurs ont montré que l'inhibition des activateurs du plasminogène (en anglais : *plasminogen activators* ou PA) augmente la pousse neuritique. Selon eux, l'inhibition des PA favoriserait l'adhésion des neurones aux substrats extracellulaires et l'élongation des neurites.

Les travaux de Lee et collaborateurs ont montré des résultats opposés. En effet, le traitement au tPA induit une augmentation de la taille des neurites dans des cultures de neurones corticaux (H.-Y. Lee *et al.*, 2007). L'implication du tPA dans la pousse neuritique serait également dépendante à la fois de son activité protéolytique et de l'activation des récepteurs LRP (S. H. Lee *et al.*, 2014). Baranes et collaborateurs ont également montré que le tPA joue un rôle la formation de varicosité synaptique axonale dans des cultures de neurones hippocampiques (Baranes *et al.*, 1998). Ces phénotypes sont également retrouvés chez l'adulte dans un contexte pathologique. En outre, le tPA est impliqué dans l'élongation des fibres moussues hippocampiques après un épisode épileptique induit par injection de kaïnate dans l'amygdale (Wu *et al.*, 2000).

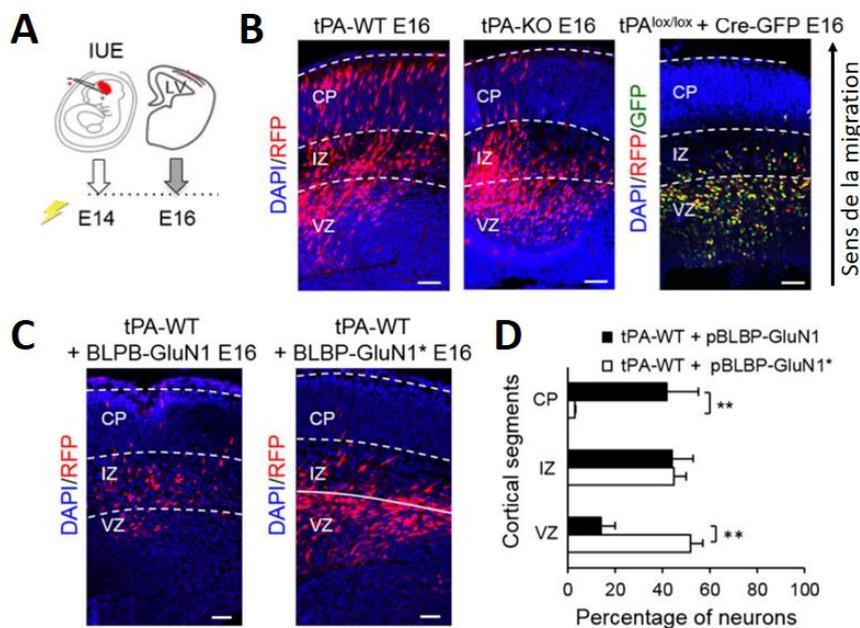


Figure 9: Implication du tPA dans la migration neuronale au cours de la corticogénèse.

(A) Électroporation *in utero* d'un plasmide pCAG-RFP codant pour une protéine fluorescente RFP (en rouge) dans les progéniteurs neuronaux situés dans la zone ventriculaire à E14. (B) Distribution des progéniteurs neuronaux dans les différentes couches corticales à E16. La migration neuronale est retardée chez les souris tPA KO par rapport aux souris tPA-WT. Un retard de migration est également observé chez les souris tPA^{lox/lox} dont le tPA est invalidé spécifiquement dans les progéniteurs neuronaux grâce à la transfection d'un plasmide codant pour la recombinaise Cre (pCAG-Cre-GFP). (C,D) La surexpression dans les cellules de glie radiaire de la sous-unité GluN1 du récepteur NMDA mutée au niveau de son site d'interaction avec le tPA conduit également à un défaut de migration qui se traduit par une accumulation des progéniteurs dans la zone ventriculaire (VZ) (Pasquet *et al.*, 2019).

b. tPA et apoptose

L'apoptose ou mort cellulaire programmée est un processus fondamental nécessaire au renouvellement cellulaire. L'apoptose est importante au cours du développement et dans des

pathologies neurologiques et neurodégénératives. Le tPA peut moduler l'apoptose à la fois dans les neurones et les oligodendrocytes. Le tPA exerce un effet anti-apoptotique sur les neurones et les oligodendrocytes dans des modèles de privation en facteurs trophiques (Correa *et al.*, 2011; Liot *et al.*, 2006).

L'effet anti-apoptotique du tPA dans les neurones est indépendant de son activité protéolytique et nécessite l'activation de la voie de signalisation phosphatidylinositol-3-Kinase (PI3K) (Liot *et al.*, 2006). Plusieurs récepteurs pourraient contribuer à cet effet anti-apoptotique tel que le récepteur à l'EGF ou l'annexine II (Bertrand *et al.*, 2015; H.-Y. Lee *et al.*, 2007). De manière similaire, le tPA exerce un effet anti-apoptotique dans les oligodendrocytes dépendant de la signalisation PI3K et de son interaction avec le récepteur à l'EGF. Ces résultats ont également été confirmés *in vivo*. Ainsi, l'injection de tPA au niveau du corps calleux permet de réduire les lésions de la substance blanche dans un modèle d'ischémie cérébrale chez la souris âgée tandis que cet effet protecteur n'est pas retrouvé avec l'injection de tPA muté sur son domaine EGF (Correa *et al.*, 2011).

c. tPA et transmission glutamatergique

Le glutamate est le principal neurotransmetteur exciteur du système nerveux central. Il peut agir à la fois sur des récepteurs ionotropiques comprenant les récepteurs AMPA (en anglais : *a-amino-3-hydroxy-5-methylisoxazole-4-propionic acid* ou AMPA), NMDA et Kaïnate ou sur des récepteurs de type métabotropiques. La signalisation glutamatergique participe à la transmission synaptique normale et à la plasticité synaptique nécessaire notamment au processus d'apprentissage et de mémoire (Willard and Koochekpour, 2013). Cependant, une stimulation prolongée des récepteurs ionotropiques peut être retrouvée en condition pathologique comme dans l'AVC et conduire au phénomène d'excitotoxicité. Ce phénomène est causé par un défaut de recapture du glutamate à la synapse et conduit à une accumulation de calcium dans les cellules responsables, à terme, des processus de nécrose et d'apoptose (Chamorro *et al.*, 2016).

En 2001, des travaux menés au laboratoire ont permis de montrer que le tPA est capable de cliver la sous-unité GluN1 du récepteur NMDA conduisant à une potentialisation de l'influx de calcium dans les neurones (Figure 10) (Nicole *et al.*, 2001). Le clivage de la sous-unité GluN1 par le tPA a lieu au niveau de l'arginine 260 nécessitant la fixation du domaine kring 2 sur la sous-unité GluN1 (Fernández-Monreal *et al.*, 2004; Lopez-Atalaya *et al.*, 2008). Par ce mécanisme, le tPA potentialise la mort neuronale dans des modèles d'excitotoxicité induite par le NMDA (Benchenane *et al.*, 2007; Liot *et al.*, 2004; Nicole *et al.*, 2001). Les effets délétères du tPA seraient également favorisés par la

présence de la sous-unité GluN2D du récepteur NMDA. En effet, l'utilisation d'un antagoniste de la sous-unité GluN2D empêche les effets pro-excitotoxiques du tPA (Baron *et al.*, 2010). De manière intéressante, des stratégies d'immunisation par l'utilisation d'un anticorps bloquant spécifiquement l'interaction du tPA avec la sous-unité GluN1 du récepteur NMDA ont montré des effets bénéfiques sur la réduction de la taille de la lésion dans des modèles d'AVC ischémiques et d'excitotoxicité induite par le NMDA (Benchenane *et al.*, 2007; Macrez *et al.*, 2010).

Cela permettrait également de réduire l'œdème et de réduire les déficits neurologiques dans un modèle d'AVC hémorragique (Gaberel *et al.*, 2013). De plus, les travaux de Parcq et collaborateurs ont montré que seule la forme simple chaîne du tPA (sc-tPA) est capable de potentialiser l'entrée de calcium et la mort neuronale induite par le NMDA (Parcq *et al.*, 2012). Plus récemment, des travaux du laboratoire ont également montré que l'interaction du tPA avec la sous-unité GluN1 augmente la dynamique des récepteurs NMDA au niveau extra-synaptique et favorise son effet pro-neurotoxique (Lesept *et al.*, 2016).

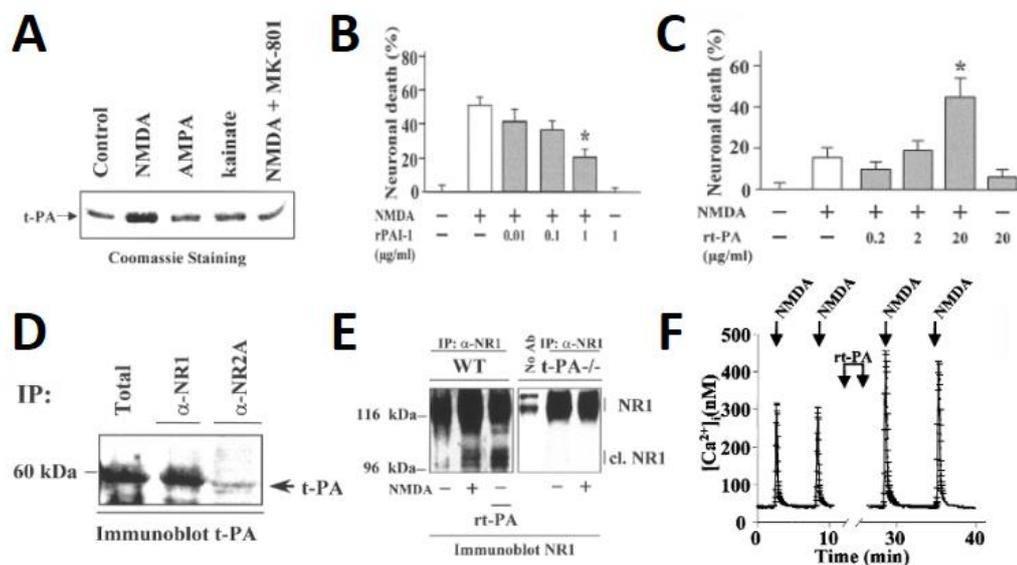


Figure 10: L'interaction du tPA avec le récepteur NMDA potentialise l'entrée de calcium et la mort excitotoxique.

(A) La dépolarisation neuronale induite par un traitement au NMDA augmente la sécrétion de tPA par les neurones corticaux tandis que les traitements AMPA et kainate ne modifient pas la sécrétion de tPA. (B) La mort neuronale induite par le NMDA est réduite avec un traitement au PAI-1 tandis que l'ajout de tPA exogène potentialise la mort excitotoxique (C). (D) Préparations membranaires de neurones corticaux immunoprécipitées à l'aide d'un anticorps dirigé contre les sous-unités GluN1 et GluN2A du récepteur NMDA et révélées avec un anticorps anti-tPA montrant l'interaction du tPA avec GluN1. (E) La sous-unité GluN1 est clivée au niveau C-terminal suite à un traitement au NMDA ou à l'ajout de tPA. (F) tPA potentialise l'entrée de calcium dans les neurones corticaux stimulés au NMDA (Nicole *et al.*, 2001).

L'implication du tPA sur la signalisation des récepteurs NMDA joue également de nombreux rôles en condition physiologique dans les processus de plasticité synaptique, d'apprentissage et de mémoire. Ces fonctions seront développées dans les parties « 2d. tPA et plasticité synaptique » et « 2e. tPA et processus cognitifs ».

d. tPA et plasticité synaptique

La plasticité synaptique correspond à la modification de l'intensité ou de l'efficacité de la transmission synaptique de synapses préexistantes. La plasticité des synapses a été proposée comme étant un des mécanismes permettant au cerveau d'intégrer des expériences transitoires en des traces mnésiques persistantes. Elle joue un rôle dans la formation et le maintien de réseaux neuronaux fonctionnels et peut être modulée en réponse à différents stimuli sensoriels. Par ailleurs, une altération de la plasticité synaptique est souvent associée à des troubles neuropsychiatriques (Citri and Malenka, 2008).

L'hypothèse selon laquelle l'apprentissage pourrait être associée à une modification de l'efficacité des connexions entre les neurones avait déjà été émise en 1894 par Ramon y Cajal puis par Donald Hebb qui propose que l'activation simultanée de deux neurones situés à proximité conduit à une augmentation de l'efficacité de la transmission de ces deux neurones (Hebb, 1949; Ramon Cajal, 1894).

Deux types de plasticité peuvent être retrouvés : la plasticité à court terme et la plasticité à long terme. La plasticité à court terme qui comprend la facilitation synaptique, la dépression synaptique et la potentialisation post-tétanique ne dure que quelques millisecondes à quelques minutes et consiste en une modification du relargage de neurotransmetteurs par les vésicules présynaptiques en réponse à l'arrivée de potentiels d'action successifs. La plasticité à long terme comprend la potentialisation à long terme (en anglais : *long term potentiation* ou LTP) et la dépression à long terme (en anglais : *long term depression* ou LTD) et peut perdurer plusieurs heures à plusieurs jours. Le phénomène de LTP est décrit pour la première fois dans l'hippocampe de lapin par Bliss et Lomo en 1973 (Bliss and Lømo, 1973). Ils montrent alors qu'une stimulation à haute fréquence permet d'augmenter durablement l'efficacité de la transmission synaptique. De manière opposée, la LTD correspond à une réduction persistante de l'efficacité de cette transmission et est induite par une stimulation prolongée à basse fréquence. Ces deux processus ont été majoritairement étudiés dans des modèles *ex-vivo* de tranches organotypiques d'hippocampe et constituent des modèles cellulaires pour l'étude de l'apprentissage et de la mémorisation.

La LTP est permise dans un premier temps par l'activation des récepteurs AMPA qui va permettre une entrée d'ions sodium et la dépolarisation du neurone post-synaptique. Cette dépolarisation va alors permettre la libération de l'ion magnésium bloquant le canal du récepteur NMDA permettant l'entrée de calcium et de sodium au niveau post-synaptique. L'entrée de calcium va alors induire différents processus tel que la phosphorylation de la protéine kinase CAMKII (en anglais : *calcium/calmodulin (CaM)-dependent protein kinase*) et l'exocytose des récepteurs AMPA. Les récepteurs AMPA d'abord exocytés au niveau pérисynaptique sont ensuite incorporés au niveau de la densité post-synaptique. La LTP s'accompagne également de modifications structurales de la densité post-synaptique et des épines dendritiques (Citri and Malenka, 2008; T. Takeuchi *et al.*, 2014).

En 1993, Qian et collaborateurs ont mis en évidence une augmentation des ARN messagers du tPA dans les neurones granulaires du gyrus denté suite à l'induction de la LTP au niveau de l'hippocampe chez le rat (Figure 11) (Qian *et al.*, 1993). Plus tard, Baranes et collaborateurs ont montré que l'application d'un inhibiteur du tPA, le tPA-stop réduit la phase tardive de la LTP ciblant les voies des collatérales de Schaffers projetant sur CA1 (SC-CA1) et les fibres moussues projetant sur CA3 (MF-CA3) mais n'affecte pas la phase précoce de la LTP (Baranes *et al.*, 1998). Ces résultats ont été confirmés par Huang et collaborateurs qui ont mis en évidence une diminution de la phase tardive de la LTP sur ces mêmes voies chez des animaux tPA KO (Figure 11) (Huang *et al.*, 1996). De plus, des travaux menés au laboratoire ont montré que seul le tPA sous sa forme simple chaîne joue un rôle dans la LTP tardive (Parcq *et al.*, 2012).

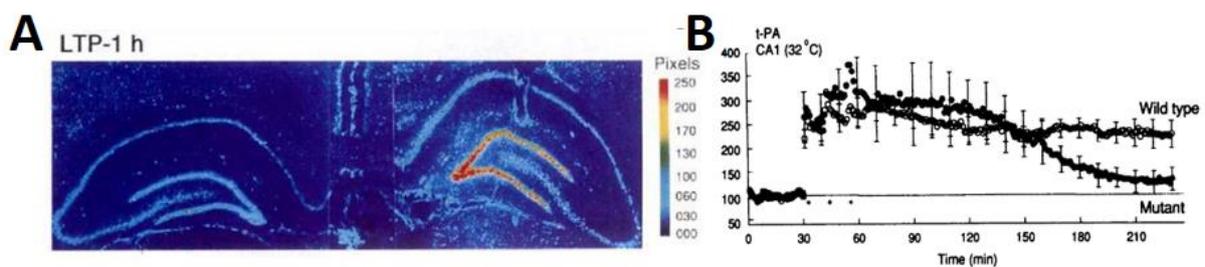


Figure 11: Implication du tPA dans la potentialisation à long terme.

(A) Augmentation des ARNm du tPA (en rouge) au niveau du gyrus denté suite à l'induction de la LTP par stimulation haute fréquence de la voie perforante (D'après Qian *et al.*, 1993). (B) La phase tardive de la LTP est réduite chez les souris déficientes en tPA (mutant) (D'après Huang *et al.*, 1996).

Une étude de Calabresi et collaborateurs a également montré que la phase précoce de la LTP pouvait être altérée chez les animaux déficients en tPA (Calabresi *et al.*, 2000). Les études de Parcq et Huang s'accordent cependant sur le fait que la plasticité synaptique à court terme n'est pas modifiée chez ces animaux (Calabresi *et al.*, 2000; Huang *et al.*, 1996). Plusieurs mécanismes ont été proposés

pour expliquer le rôle du tPA dans le maintien de la phase tardive de la LTP (en anglais : *late-LTP*, L-LTP).

Selon Qian et collaborateurs, l'augmentation de la transcription des ARNm du tPA dans le gyrus denté serait dépendante de l'activation des récepteurs NMDA (Qian *et al.*, 1993). L'activation des récepteurs NMDA conduirait en effet à l'activation de la voie de l'AMPC/PKA (en anglais : Adénosine monophosphate cyclic/protéine Kinase A) aboutissant à la synthèse et à la libération de tPA au niveau post-synaptique (Baranes *et al.*, 1998; Zhuo *et al.*, 2000). Le tPA serait ensuite libéré au niveau de la fente synaptique et pourrait activer les récepteurs LRP (Zhuo *et al.*, 2000) (Figure 12). D'autres mécanismes nécessitant l'activation du plasminogène ont également été proposés et seront détaillés dans la partie (B.III.k « Plasminogène et plasticité synaptique »).

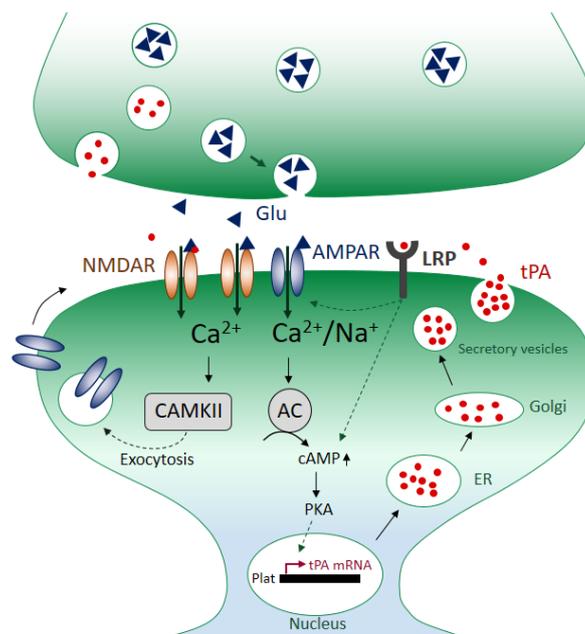


Figure 12: Représentation schématique du mécanisme impliquant le tPA dans les processus de LTP.

Lors de l'induction de la LTP, la fixation du glutamate (Glu) sur les récepteurs AMPA et NMDA induit l'entrée d'ions sodium et calcium et permet la dépolarisation postsynaptique. L'entrée de calcium induit l'activation de la CAMKII et conduit à l'exocytose des récepteurs AMPA tandis que l'activation de l'adénylate cyclase (AC) augmente la signalisation de la voie l'AMPC/PKA et stimule la synthèse de tPA et sa libération post-synaptique. Le tPA sécrété dans la fente synaptique va alors pouvoir interagir avec les récepteurs LRP et stimuler des voies intracellulaires impliquées dans la potentialisation synaptique. Le tPA sécrété au niveau pré et post-synaptique peut également potentialiser directement l'entrée de calcium en se fixant au récepteur NMDA (D'après Zhuo *et al.*, 2000; Samson & Medcalf, 2006 ; Citri *et al.*, 2008).

Le tPA semble également impliqué dans les processus de dépression à long terme. En effet, la transcription du tPA est augmentée suite à l'induction de la LTD dans un modèle de tranche organotypique cortico-striatale. De plus, le nombre de neurones striataux répondant à la LTD est

significativement réduit chez les souris déficientes en tPA (Calabresi *et al.*, 2000). Parcq et collaborateurs ont également décrit l'implication du sc-tPA dans la LTD. De plus, l'application du sc-tPA sur des tranches organotypiques d'hippocampe de souris sauvages reverse la LTD au niveau de CA1 (Parcq *et al.*, 2012).

e. tPA, processus cognitifs et émotions

Comme nous l'avons vu précédemment, le tPA est capable de moduler la signalisation de plusieurs récepteurs et contribue à la plasticité synaptique. L'implication du tPA dans l'ensemble de ces fonctions à la synapse lui confère également un rôle dans la régulation de certains apprentissages et émotions.

- tPA et cognition spatiale

De nombreuses études ont montré un rôle du tPA dans les apprentissages spatiaux, cependant, certains résultats restent contradictoires en fonction des protocoles utilisés. Parmi les protocoles utilisés, on retrouve le labyrinthe de Barnes (en anglais : *barnes maze*, BM) et la piscine de Morris (MWM) qui sont deux tests permettant de tester la mémoire spatiale. Lors de la phase d'entraînement qui dure plusieurs jours, la souris doit apprendre à reconnaître, respectivement, un refuge et une plateforme dissimulés en utilisant des indices visuels présents au sein même du dispositif (indices proximaux) ou dans la pièce d'expérimentation (indices distaux). Le refuge ou la plateforme sont ensuite retirés du dispositif lors d'un test de rappel et l'exploration autour de la zone cible est mesurée afin d'évaluer les performances mnésiques des animaux. Huang et collaborateurs ont montré un apprentissage spatial similaire entre des souris WT et tPA KO à l'aide du test du labyrinthe de Barnes (Huang *et al.*, 1996). Ces mêmes auteurs ont montré que les souris tPA KO testées en MWM parcourent une distance plus importante pour trouver la plateforme lors de la phase d'acquisition par rapport à leurs homologues sauvages (Huang *et al.*, 1996). Ils ne concluent cependant pas à un déficit d'apprentissage mais considèrent ce résultat comme la conséquence d'une augmentation de la thigmotaxie chez les souris tPA KO. Par ailleurs, les souris déficientes en tPA présentent les mêmes performances spatiales que leurs homologues sauvages lors d'un test d'inversion de la position de la plateforme. De la même manière, Pawlak et collaborateurs ne trouvent aucun déficit de cognition spatiale à l'aide du test de la piscine de Morris chez les souris tPA KO (Robert Pawlak *et al.*, 2005). De manière opposée, les travaux de Oh et collaborateurs ont mis en évidence des déficits d'acquisition et de mémorisation chez les souris tPA KO soumises au MWM par rapport aux souris WT (Oh *et al.*, 2014). Par ailleurs, Madani et collaborateurs ont montré une augmentation des

performances spatiales dans les tests du MWM et du *Homing Hole Board Test* chez des souris surexprimant le tPA dans les neurones (Figure 13) (Madani *et al.*, 1999).

L'implication du tPA dans la cognition spatiale a également été décrite par Calabresi et collaborateurs. En effet, les animaux tPA KO répondent de façon similaire à leurs homologues sauvages à un test de reconnaissance d'objet mais présentent un déficit de localisation d'objet suite à la modification de la position d'un objet. De plus, cette étude a montré une absence d'habituation aux objets lors de la phase d'exploration du test chez les animaux déficients en tPA (Calabresi *et al.*, 2000). Des déficits de reconnaissance d'objet ont cependant pu être retrouvés par Benchenane et collaborateurs. En effet, alors que les souris WT explorent significativement plus un nouvel objet par rapport à un objet familier, les souris tPA KO ne discriminent pas les deux objets (Benchenane *et al.*, 2007).

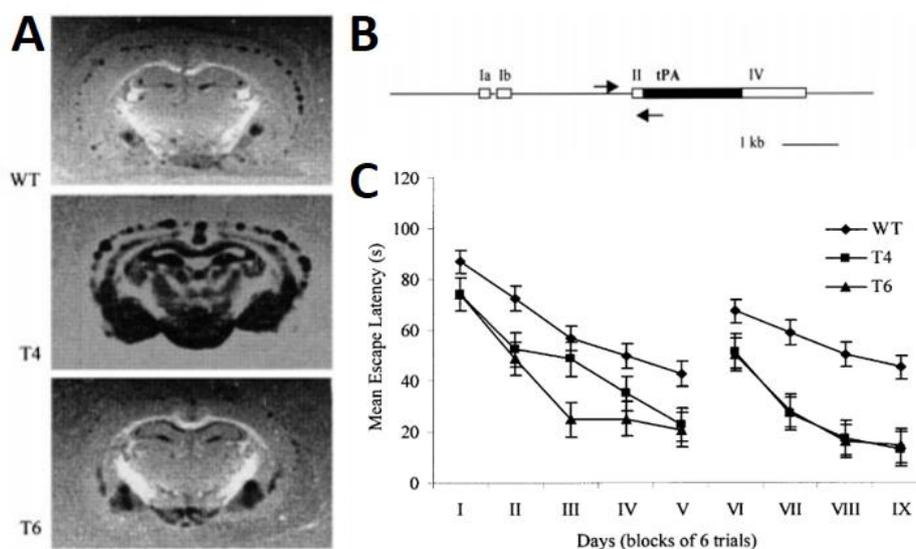


Figure 13: La surexpression de tPA dans les neurones augmente les performances spatiales.

(A) Image représentative montrant l'activité du tPA sur des coupes coronales de cerveaux issues de souris WT, T4 (expression du tPA multipliée par 3) et T6 (expression du tPA multipliée par 10). (B) Représentation schématique de la stratégie utilisée permettant l'expression d'une séquence codant pour le tPA pour le contrôle du promoteur neuronal Thy1.2. (C) Mesure de la latence à trouver la plateforme lors du test de MWM, au cours de l'acquisition (I-V) et d'un test d'inversion de position de la plateforme (VI-IX) (Adapté de Madani *et al.*, 1999).

Plus récemment, les travaux réalisés au laboratoire par Hébert et collaborateurs ont montré un déficit d'apprentissage spatial chez les animaux déficients en tPA lors de la phase d'acquisition du MWM nécessitant l'utilisation d'indices distaux et non proximaux. Cette étude suggère alors que l'hétérogénéité des résultats décrits dans la littérature pourrait dépendre de la configuration des

indices proximaux ou distaux dans la pièce d'expérimentation (Hébert *et al.*, 2017). D'autres travaux réalisés au laboratoire ont décrit que l'immunisation systémique à l'aide d'un anticorps bloquant l'interaction du tPA avec la sous-unité GluN1 du récepteur NMDA induisait des déficits de mémoire spatiale lors d'une tâche de reconnaissance de place en labyrinthe en Y chez des souris WT (Benchenane *et al.*, 2007; Obiang *et al.*, 2012). Grâce à une méthodologie similaire, Hébert et collaborateurs ont montré que d'un anticorps ciblant cette même interaction, au niveau du cortex entorhinal induit des déficits de mémoire spatiale dans un test de reconnaissance de place en labyrinthe en T (Figure 14) (Hébert *et al.*, 2017). De plus, les travaux du laboratoire suggèrent que la diminution de l'expression et de l'activité du tPA observée au cours du vieillissement physiologique au niveau de l'hippocampe et du cortex entorhinal est associée aux troubles de la cognition spatiale (Hébert *et al.*, 2017; Obiang *et al.*, 2011; Roussel *et al.*, 2009). L'étude de Obiang a également montré que l'utilisation d'un environnement enrichi permet de reverser la diminution d'expression du tPA et les déficits d'apprentissage associés chez la souris âgée (Obiang *et al.*, 2011).

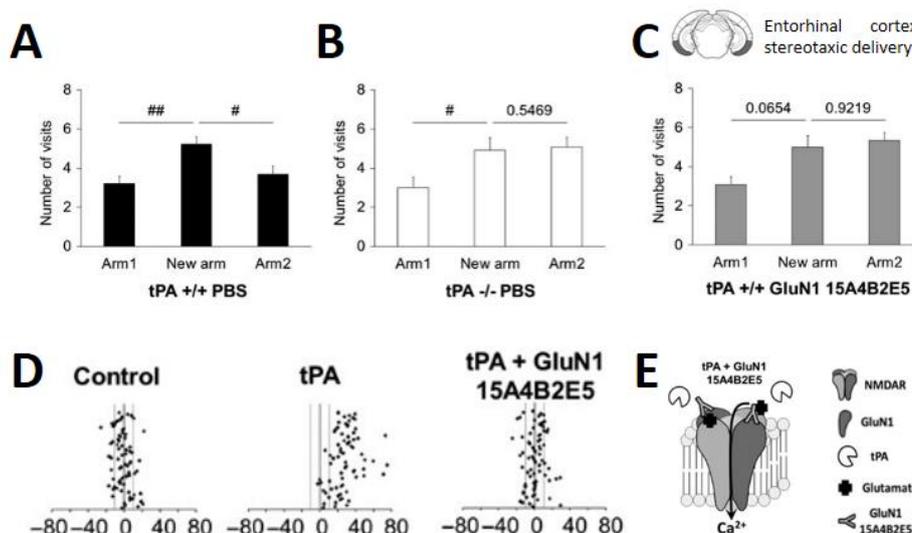


Figure 14: Le tPA module la cognition spatiale en interagissant avec le récepteur NMDA dans le cortex entorhinal.

(A-C) Mesure des performances spatiales à l'aide du test du labyrinthe en T. Les souris WT discriminent bien le bras nouveau (new arm) des deux autres bras du labyrinthe (A) tandis que les souris tPA KO présentent un déficit de navigation spatiale (B). (C) L'injection stéréotaxique au niveau du cortex entorhinal de l'anticorps GluN1 15A4B2E5, bloquant l'interaction du tPA avec la sous-unité GluN1 du récepteur NMDA induit des déficits de mémoire spatiale chez les souris WT. (D-E) L'anticorps GluN1 15A4B2E5 bloque la potentialisation de l'entrée de calcium induite par le tPA dans des cultures de neurones corticaux stimulées au NMDA (Hébert *et al.*, 2017).

Dans l'ensemble les résultats de la littérature ont permis de montrer un rôle du tPA dans la cognition spatiale mais ne permettent pas de conclure quant aux populations neuronales responsables

de l'expression cette protéase dans les différentes régions cérébrales et leurs implications dans les réponses comportementales décrites.

- tPA et régulation des émotions

Le tPA est fortement exprimé dans les régions cérébrales sous-tendant la régulation des émotions telles que l'amygdale, le BNST, l'hippocampe ou encore l'hypothalamus (Louessard *et al.*, 2016; T. Matys *et al.*, 2005; Tomasz Matys *et al.*, 2004; Robert Pawlak *et al.*, 2005; Stevenson and Lawrence, 2018). Le tPA serait notamment impliqué dans la peur conditionnée, l'anxiété-trait et l'anxiété induite par un stress.

De nombreuses études se sont intéressées au rôle du tPA dans la peur conditionnée. Une première étude de Huang et collaborateurs affirme que l'association d'un stimulus inconditionnel (choc électrique) à un stimulus conditionnel (SC, signal sonore) induit la même réponse d'immobilisation (réponse de peur) chez les animaux WT et tPA KO lors de la phase d'acquisition. Ils ont également montré que lors de la deuxième phase du test, les souris tPA KO femelles présentent une immobilisation supérieure à leur homologues sauvages en réponse au SC seul ou lorsque les souris sont réexposées au même contexte tandis que les réponses émotionnelles ne sont pas altérées chez les souris tPA KO mâles (Huang *et al.*, 1996). Plus tard, Calabresi et collaborateurs ont montré des résultats contradictoires. En effet, le temps d'immobilisation en réponse au son est significativement plus élevé chez des souris tPA KO mâles par rapport aux souris contrôles tandis qu'il est significativement réduit chez ces animaux lors du rappel au contexte, une tâche dépendante de l'hippocampe (Calabresi *et al.*, 2000). La diminution des réponses de peur au contexte peut alors être interprétée comme une diminution de l'anxiété-état des souris tPA KO en réponse à un stimulus environnemental (le contexte).

Les travaux menés par l'équipe de Sidney Strickland ont permis de mettre en évidence que les souris tPA KO ne présentent pas de différence d'anxiété-trait par rapport à leurs homologues sauvages. Par opposition à l'anxiété-état, l'anxiété trait est une réponse innée qui induit un état anxieux durable et présent même en l'absence de stimuli potentiellement menaçant. Ainsi, l'anxiété-trait mesurée grâce au labyrinthe en croix surélevé (en anglais : *elevated plus maze*, EPM) ne montre pas de différence du nombre d'entrées dans les bras ouverts (anxiogènes) entre les souris WT et tPA KO en condition basale (Tomasz Matys *et al.*, 2004; R. Pawlak *et al.*, 2002; Robert Pawlak *et al.*, 2003). De manière intéressante, les souris tPA KO présentent toutefois des réponses anxieuses amoindries par rapport à leurs homologues sauvages en réponse à un stress de contention ou à l'injection intraventriculaire de corticolibérine (en anglais : *corticotropin-releasing factor*, CRF), un neuropeptide impliqué dans la réponse au stress au niveau de l'axe corticotrope (Figure 15) (Tomasz Matys *et al.*,

2004; Robert Pawlak *et al.*, 2003). Ces auteurs ont également indiqué que ces deux modèles de stress induisent une augmentation précoce de l'activité protéolytique du tPA au niveau de l'amygdale chez les souris sauvages puis un retour au niveau basal associé à une augmentation de l'expression de PAI-1. Le mécanisme responsable des phénotypes observés semble cependant indépendant de l'activation du plasminogène, puisque les souris déficientes en plasminogène présentent des réponses au stress similaires celles de leurs homologues sauvages.

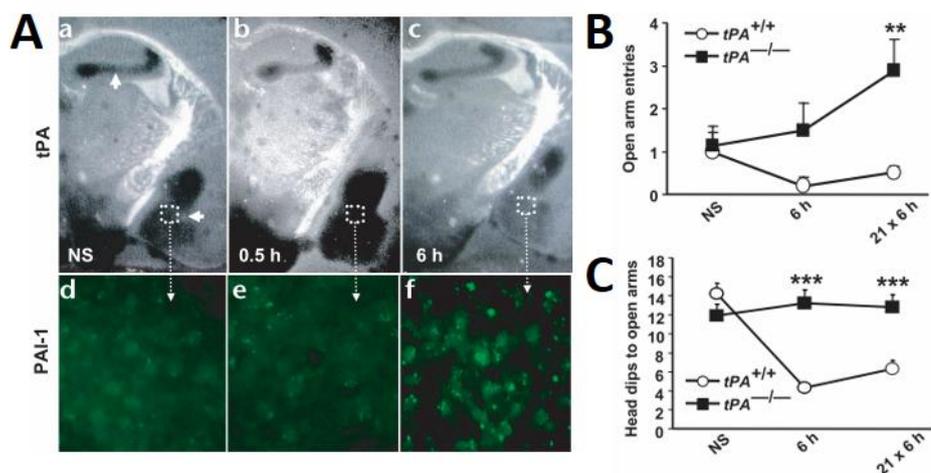


Figure 15: Le tPA est exprimé au niveau de l'amygdale et module les réponses anxieuses induites par un stress.

(A) Un stress de contention augmente l'activité protéolytique du tPA au niveau de l'amygdale centrale et médiale à des temps précoces (a, b c). La diminution de l'activité du tPA au niveau de l'amygdale médiale 6h après l'induction d'un stress est corrélée à une augmentation de l'expression de PAI-1. (B-C) L'anxiété trait mesurée à l'aide du labyrinthe en croix surélevé est similaire entre les souris WT et tPA KO en condition basale. Un stress de contention augmente les réponses anxieuses chez les souris WT (diminution de l'exploration des bras ouverts) mais pas chez les souris tPA KO (D'après Pawlak *et al.*, 2003).

Les travaux de Bennur ont mis en évidence qu'un stress chronique par contention induisait une diminution de la densité des épines dendritiques au niveau de l'amygdale médiale chez les souris WT tandis que le nombre d'épines ne sont pas affecté chez les souris tPA KO. Ainsi, cela suggérerait un rôle du tPA dans la plasticité des épines dendritiques au niveau de l'amygdale (Bennur *et al.*, 2007).

Dans un test de peur conditionnée au contexte réalisé après un stress, Norris et Strickland ont également montré que les souris tPA KO s'immobilisent moins lors du rappel par rapport aux souris sauvages (Norris and Strickland, 2007). Ce résultat peut également être interprété comme une diminution de l'anxiété état chez ces animaux. Ils ont par ailleurs observé une diminution de l'activité protéolytique du tPA et une augmentation de la phosphorylation de la sous-unité GluN2B associée à une augmentation de l'activation de la voie ERK au niveau de l'hippocampe chez les souris sauvages

soumises à un stress aigu. Ce résultat est interprété comme une modulation de la plasticité des synapses par le tPA au niveau de l'hippocampe en réponse à un stress.

Le tPA semble également moduler les effets du stress au niveau du BNST. En effet, les travaux de Matys et collaborateurs ont décrit une augmentation précoce de l'activité protéolytique du tPA au niveau du BNST après un stress, suivie d'une augmentation de l'expression de son inhibiteur PAI-1 (T. Matys *et al.*, 2005). Ils ont également montré que la réponse de sursaut en réponse à un son était réduite chez les souris tPA KO et associée à une diminution spécifique de l'activation des neurones au niveau du BNST.

L'implication du tPA dans la régulation des émotions a été majoritairement étudiée grâce à des modèles murins déficients en tPA de manière constitutive et ne permettent pas de rendre compte du rôle du tPA exprimé de manière différentielle par les différents noyaux cérébraux. De nouvelles approches moléculaires telles que l'utilisation de vecteurs viraux ou le recours à des modèles transgéniques permettent un contrôle spatio-temporel de l'inactivation ou la surexpression de gènes. Ces outils favorisent ainsi l'étude des fonctions des gènes exprimés au sein de régions cérébrales spécifiques dans les réponses comportementales. Ce type d'approche a notamment été utilisé par Bahi et Dreyer, lesquels ont montré que la délétion spécifique du tPA au niveau de l'hippocampe induisait une augmentation de l'anxiété-trait évaluée en EPM (Bahi and Dreyer, 2012). Les données obtenues précédemment chez les souris tPA KO ne montrent pas d'effet du tPA sur l'anxiété-trait en condition basale. Cependant, il est important de noter que le tPA est exprimé simultanément dans de nombreuses régions cérébrales impliquées dans la régulation des émotions. Il est donc envisageable que le tPA régule des processus émotionnels de manière différentielle en fonction des noyaux cérébraux étudiés.

Pour résumer :

- ❖ Le tPA est une sérine protéase capable de convertir le plasminogène en plasmine afin de promouvoir la fibrinolyse des caillots sanguins.
- ❖ Son expression est retrouvée en périphérie et dans différents types cellulaires et de nombreuses régions cérébrales dans le SNC.
- ❖ Le tPA peut également interagir avec différentes protéines/récepteurs tels que le récepteur NMDA ou le récepteur LRP.
- ❖ Au sein du SNC, le tPA présente différentes fonctions en condition physiologique telles que la migration neuronale, la plasticité synaptique et les processus émotionnels et cognitifs.
- ❖ En condition pathologique, le tPA peut avoir un rôle délétère en favorisant notamment la mort neuronale de type excitotoxique.

B. Le système d'activation du plasminogène (SAP)

I. Structure du plasminogène

Le plasminogène est la forme zymogène inactive de la plasmine. C'est une glycoprotéine de 791 acides aminés formées de 5 domaines kringles, d'un peptide de pré-activation (en anglais : *preactivation peptide* ou PAp) et d'un domaine catalytique à activité sérine protéase (Figure 16) (Law *et al.*, 2013). Les domaines kringles 1 et 4 contiennent des sites de liaisons à la lysine lui permettant de se fixer à la fibrine. Le tPA et l'uPA vont pouvoir cliver le plasminogène au niveau de l'arginine en position 561 et ainsi le convertir en sa forme active, la plasmine. D'autres protéases comme les kallikréines et les facteurs XIa et XIIa vont également pouvoir cliver le plasminogène en plasmine.

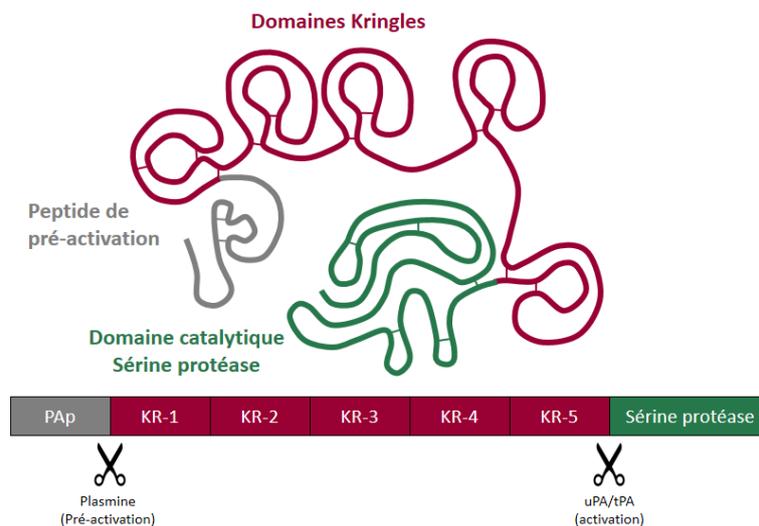


Figure 16: Structure du plasminogène.

Schéma représentant les 7 domaines du plasminogène ainsi que les sites de clivage du peptide de pré-activation et le site de clivage permettant sa conversion en plasmine par le tPA et l'uPA (D'après Law *et al.*, 2013).

Le plasminogène peut être présent sous deux formes, une forme fermée circulante, le Glu-plasminogène, qui ne peut pas être activée et une forme ouverte, le Lys-plasminogène, obtenue suite au clivage du PAp par la plasmine. Le Lys-plasminogène présente une forte affinité pour la fibrine mais va également pouvoir se fixer à des récepteurs présents à la surface des cellules. La forme ouverte permet alors l'accès des activateurs du plasminogène au site de clivage et la conversion du plasminogène en plasmine. La plasmine est présente sous forme de deux chaînes reliées par des ponts disulfures : une chaîne lourde de 561 acides aminés en N-terminal et une chaîne légère de 230 acides aminés en C-terminal.

II. Synthèse et régulation

a. En périphérie

Le plasminogène plasmatique est majoritairement exprimé par les cellules hépatiques au niveau du foie (Raum *et al.*, 1980). Le plasminogène peut également être exprimé par d'autres organes tel que le rein, le cœur, les testicules, l'utérus ou le cerveau suggérant des fonctions du SAP au sein de ces organes (Zhang *et al.*, 2002). Deux serpinines, l' α -2-antiplasmine et l' α -2-macroglobuline permettent de réguler l'activité protéolytique de la plasmine au niveau sanguin (Harpel, 1981). Le SAP peut également être régulé indirectement *via* l'inhibiteur de la fibrinolyse activable par la thrombine (en anglais, *Thrombin Activatable Fibrinolysis Inhibitor* ou TAFI) qui permet d'éliminer les résidus lysine de la fibrine empêchant ainsi la fixation du plasminogène et donc sa conversion en plasmine (Bouma and Mosnier, 2006).

b. Dans le système nerveux central

Le plasminogène est également exprimé dans le parenchyme cérébral dans plusieurs régions cérébrales telles que le cortex, l'hippocampe, l'hypothalamus et le cervelet (Figure 17). Son expression est majoritairement retrouvée dans les neurones pyramidaux mais il peut également être retrouvé dans les interneurones exprimant la parvalbumine au niveau de l'hippocampe (Basham and Seeds, 2001; Taniguchi *et al.*, 2011; Tsirka *et al.*, 1997; Zhang *et al.*, 2002).

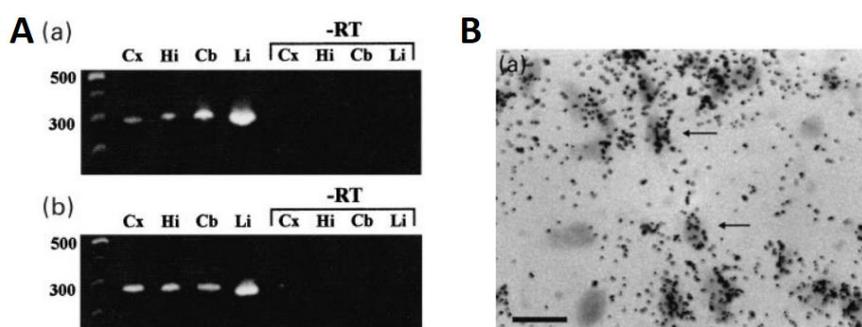


Figure 17: Expression du plasminogène dans le SNC.

(A) Les ARNm du plasminogène sont détectés dans le cortex (Cx), l'hippocampe (Hi), le cervelet (Cb) et le foie (Li) en post-natal (a) et chez la souris adulte (b). (B) Hybridation in situ révélant les ARNm du plasminogène au niveau de la couche moléculaire dans le cervelet (D'après Basham & Seeds, 2001).

Au niveau cérébral, l'activité de la plasmine est assurée par la protéase nexine 1 qui est exprimée par les neurones et les cellules gliales (Giau *et al.*, 2005; Simpson *et al.*, 1994). Des travaux réalisés au laboratoire ont montré que les astrocytes constituent une surface d'activation du plasminogène favorisant sa conversion en plasmine. Par ailleurs, les astrocytes sont impliqués dans la clairance du

plasminogène en permettant son endocytose par un mécanisme faisant intervenir les récepteurs LRP (Briens *et al.*, 2017).

III. Fonctions du système d'activation du plasminogène dans le SNC

Les fonctions du SAP dans le système nerveux central vont être dépendant des propriétés protéolytiques de la plasmine vis à vis un grand nombre de substrats. La plasmine est en effet capable de cliver différents substrats dans le système nerveux central. Outre sa capacité à cliver la fibrine, la plasmine peut également cliver des facteurs neurotrophiques comme le pro-BDNF ou la forme immature du facteur de croissance neuronal (en anglais : *pro-nerve growth factor* ou pro-NGF) en leur forme mature (Bruno and Cuello, 2006; K. Gray and Ellis, 2008). La plasmine va également pouvoir cliver différents composants de la matrice extracellulaire tel que la laminine, la fibronectine, le collagène ou les proteoglycanes (Liotta *et al.*, 1981; Mackay *et al.*, 1990; Mochan and Keler, 1984). Elle va également pouvoir jouer un rôle indirect dans le remodelage de la MEC en activant les pro-MMPs en leur forme mature (G.E. Davis *et al.*, 2001).

a. Plasminogène et développement cérébral

Le remodelage de la matrice extracellulaire va jouer un rôle important au cours du développement cérébral notamment pour les processus de migration neuronale et lors de l'établissement des réseaux neuronaux. Tout comme le tPA, le plasminogène est exprimé au cours du développement cérébral où ses ARN messagers ont pu être détectés au niveau de l'hippocampe et du cervelet chez la souris (Basham and Seeds, 2001). L'implication du SAP dans les processus neurodéveloppementaux a été proposée pour la première fois par Krystosek et Seeds qui ont montré une forte activité fibrinolytique des neurones granulaires du cervelet en migration (A. Krystosek and Seeds, 1981). De plus, l'utilisation de l'acide ϵ -amino caproïque (en anglais, *ϵ -amino caproic acid* ou ϵ ACA), un analogue de la lysine qui va bloquer le site de liaison à la lysine du plasminogène et donc empêcher son activation, ralentit la migration des cellules granulaires (Moonen *et al.*, 1982).

Par ailleurs, Seeds et collaborateurs ont émis l'hypothèse que le déficit de migration neuronale observé au niveau du cervelet chez les souris déficientes en tPA pouvait être lié à un défaut de la dégradation de la matrice extracellulaire par la plasmine (Seeds *et al.*, 1999). Les travaux de Pittman et DiBenedetto ont rapporté l'implication du plasminogène dans la dégradation de la matrice extracellulaire dans une lignée PC-12. Ils ont également montré que le plasminogène participe à la migration neuronale et à la pousse neuritique (Pittman and DiBenedetto, 2002). L'activation du plasminogène a également été observée au niveau du cône de croissance suggérant l'implication du

SAP dans la pousse neuritique et la croissance axonale (Alphonse Krystosek and Seeds, 1981). Li et collaborateurs ont montré que le système tPA/plasmine est impliqué dans la croissance des dendrites et la synaptogénèse des neurones de Purkinje au niveau du cervelet (J. Li *et al.*, 2013). Finalement, la plasmine pourrait également contribuer à la formation des réseaux neuronaux par l'intermédiaire du clivage de molécules de guidance axonale présentes au niveau de la MEC telle que la F-spondine (Tzarfaty-Majar *et al.*, 2001).

b. Plasminogène et apoptose

Différentes études ont rapporté l'implication du plasminogène sous sa forme active dans les processus d'apoptose. En effet, le plasminogène utilisé à de fortes concentrations sur des cultures de neurones corticaux peut être converti en plasmine par le tPA endogène favorisant ainsi la dégradation de la matrice et l'apoptose des neurones (Ho-Tin-Noé *et al.*, 2009). La plasmine participerait également activement aux processus d'apoptose. En effet, différentes études ont rapporté la fixation du plasminogène sur les cellules mortes ou en souffrance suite à la surexpression des récepteurs au plasminogène à leur surface (O'Mullane and Baker, 1999). La plasmine générée à la surface des cellules favoriserait l'élimination des débris cellulaires par processus de phagocytose (Rosenwald *et al.*, 2012).

c. Plasminogène et transmission glutamatergique

De façon comparable au tPA, la plasmine peut moduler la signalisation des récepteurs NMDA. Cependant, les résultats décrits dans la littérature montrent des mécanismes contradictoires. Il a ainsi été montré que la plasmine potentialise la signalisation NMDA des neurones dans un modèle de tranches organotypiques d'hippocampe en interagissant avec le récepteur PAR-1 (en anglais : *protease-activated receptor 1*), majoritairement exprimé par les astrocytes. De manière intéressante, ces auteurs ont également montré que la plasmine potentialise l'entrée de calcium dans les astrocytes mais n'a pas d'effet dans les neurones. La plasmine modulerait ainsi la signalisation NMDA dans les neurones par l'intermédiaire de l'activation des récepteurs PAR-1 astrocytaires (Mannaioni *et al.*, 2008).

Les travaux de l'équipe de Robert Medcalf ont montré que la plasmine et non le tPA permet de cliver la sous unité GluN1 du récepteur NMDA. Selon cette étude, la potentialisation de l'entrée de calcium requière l'activation des récepteurs LRP par le tPA mais ne nécessite pas le clivage du récepteur NMDA par la plasmine (Samson *et al.*, 2008). La plasmine est cependant capable de cliver le domaine de liaison du zinc au niveau N-terminal de la sous-unité GluN2A et favorise ainsi la levée de l'inhibition induite par le zinc (Yuan *et al.*, 2009).

d. Plasminogène et plasticité synaptique

De la même manière que le tPA, le plasminogène joue un rôle dans les processus de plasticité synaptique. En effet, Pang et collaborateurs ont montré que le plasminogène est également impliqué dans le maintien de la phase tardive de la LTP *via* sa capacité à activer les pro-MMPs en leur forme mature (Figure 18) (Pang *et al.*, 2004).

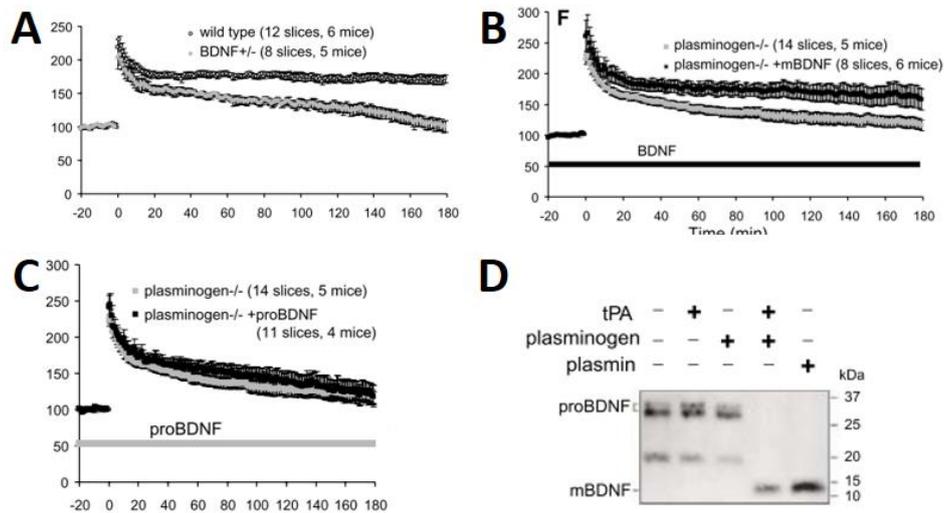


Figure 18: La plasmine module la LTP en convertissant le pro-BDNF en mBDNF.

(A) La phase tardive de la LTP est réduite chez les souris hétérozygotes BDNF^{+/-}. (B) L'application de m-BDNF permet de restaurer les déficits de L-LTP chez les souris déficientes en plasminogène. (C) L'utilisation du pro-BDNF me permet pas de restaurer la L-LTP chez les souris Plg^{-/-}. (D) La plasmine permet la conversion du pro-BDNF en m-BDNF. Le tPA seul, n'influence pas la conversion du pro-BDNF en sa forme mature (Pang *et al.*, 2004).

De manière opposée, une autre étude a montré que la plasmine perturbait la LTP en dégradant la laminine (Nakagami *et al.*, 2000).

e. Plasminogène, cognition et émotions

Peu d'études sont rapportées concernant le rôle potentiel du plasminogène dans la régulation des processus cognitifs. En effet, les souris déficientes en plasminogène ont un phénotype comportemental proche de leurs homologues sauvages. Malgré cela, des études ont suggéré l'implication du plasminogène (Plg) dans les réponses au stress. En effet, les souris Plg KO soumises à un test de réflexe de sursaut en réponse à un son réagissent significativement moins que les souris sauvages. De plus, les comportements d'auto-toilettage, induits en réponse à un stress, sont également moins importants chez ces animaux (Hoover-Plow *et al.*, 2001). Le plasminogène semble également moduler positivement le déclin cognitif induit par un stress (Robert Pawlak *et al.*, 2005).

Cependant, l'utilisation d'un stress de contention n'induit pas de modification de l'anxiété-état chez les souris déficientes en plasminogène (Robert Pawlak *et al.*, 2003).

f. Plasminogène et contexte pathologique

Le système d'activation du plasminogène est surexprimé dans de nombreux contextes pathologiques où il va jouer un rôle bénéfique ou délétère en dégradant de nombreux composants de la MEC.

Au niveau du compartiment vasculaire, l'activation du plasminogène va contribuer à l'altération de la barrière hémato-encéphalique directement en clivant des composants essentiels comme les claudines, occludines et la laminine ou indirectement activant les pro-MMPs (Lijnen, 2001; Liotta *et al.*, 1981). La plasmine va également jouer sur la perméabilité de la BHE en modifiant la morphologie des astrocytes ou activant la protéine monocytaire chémoattractante 1 (en anglais: *Monocyte Chemoattractant Protein-1* ou MCP-1) (Niego *et al.*, 2012; Yao and Tsirka, 2011).

Le SAP joue un rôle délétère dans des modèles de lésions excitotoxiques induites par l'injection de kaïnate au niveau de l'hippocampe. En effet, les souris tPA KO et Plg KO sont résistantes à la mort neuronale induite par l'injection de kaïnate. De plus, l'injection d' α -2-antiplasmine permet de prévenir les lésions excitotoxiques chez les souris sauvages (Tsirka *et al.*, 1997). L'effet pro-neurotoxique du plasminogène est alors lié à la dégradation de la laminine par la plasmine (Z. L. Chen and Strickland, 1997).

Le système tPA/plasmine joue également un rôle dans le remodelage des fibres moussues hippocampiques dans un modèle épileptique induit par l'injection de kainate au niveau de l'amygdale. En effet, Wu et collaborateurs ont montré qu'une croissance aberrante des fibres moussues était présente chez les animaux tPA KO et Plg KO par rapport à leurs homologues sauvages. Cette étude suggère que l'augmentation de la pousse neuritique observée chez les souris sauvages est dépendante du clivage par la plasmine des CSPG (chondroïtines sulfates protéoglycanes) phosphacan et neurocan exprimés au niveau de la MEC (Figure 19) (Wu *et al.*, 2000).

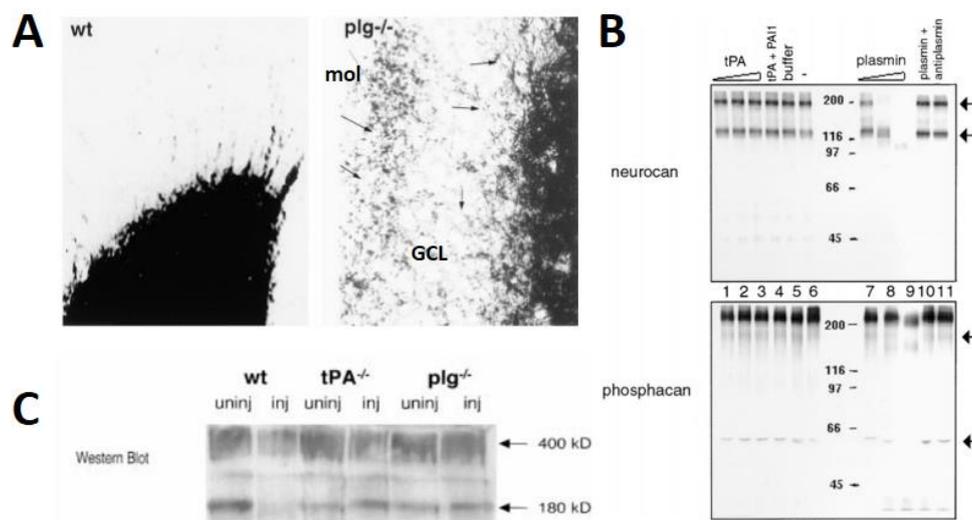


Figure 19: Le système d'activation du plasminogène régule la pousse neuritique.

(A) L'injection de kainate dans l'amygdale augmente la croissance des fibres moussues chez les souris WT. La pousse neuritique est aberrante chez les souris déficientes en plasminogène avec l'apparition d'une bande laminaire entre la région supragranulaire (GCL) et la couche moléculaire (MOL). (B) Incubation des CSPG neurocan et phosphacan purifiés en présence de tPA et de plasmine montrant un clivage de ces deux substrats par la plasmine. (C) Le clivage de phosphacan est augmenté dans l'hippocampe chez les souris WT injectées avec le Kainate tandis que ce clivage n'est pas retrouvé chez les souris tPA KO et Plg KO (Wu *et al.*, 2000).

L'activation du plasminogène joue également un rôle majeur dans la régénération axonale à la suite de lésions du système nerveux. En effet, une augmentation de l'expression des activateurs du plasminogène a été rapportée dans les neurones suite à un modèle de lésion du nerf sciatique (Siconolfi and Seeds, 2001).

Par ailleurs, il a été montré que le protéoglycane NG2 (antigène Neural/Glial 2), surexprimé lors d'une lésion de la moelle épinière favorise la conversion du plasminogène en plasmine (Nolin *et al.*, 2008). De plus, les travaux de l'équipe de Stella Tsirka ont montré que le système tPA/plasmine

contribue à la régénération axonale dans un modèle de lésion de la moelle épinière. En effet, la plasmine permet la dégradation des CSPGs au niveau de la cicatrice gliale, favorisant la pousse neuritique et la récupération fonctionnelle (Bukhari *et al.*, 2011).

Des résultats similaires ont également été observés après un modèle d'ischémie cérébrale. En effet, la plasticité axonale et la récupération fonctionnelle sont significativement réduites chez les souris déficientes en plasminogène 4 semaines après l'induction de l'AVC (Liu *et al.*, 2014).

Pour résumer :

- ❖ Le plasminogène est activé en plasmine active par le tPA pour promouvoir la fibrinolyse.
- ❖ Le plasminogène est exprimé en périphérie et dans le parenchyme cérébral.
- ❖ Les fonctions de la plasmine sont dépendantes de son activité protéolytique vis-à-vis de différents composants de la MEC ou *via* sa capacité à activer les pro-MMPs.
- ❖ La plasmine peut également activer des facteurs neurotrophiques tels que le pro-BDNF.
- ❖ En condition physiologique, la plasmine joue notamment un rôle dans le développement cérébral et la plasticité synaptique.
- ❖ En condition pathologique, la plasmine peut avoir des rôles délétères en modulant l'ouverture de la BHE ou bénéfiques en favorisant la régénération axonale.

C. Neurobiologie de l'anxiété

L'anxiété est définie comme un état émotionnel causé par l'anticipation d'une situation potentiellement menaçante. Dans le cas de l'anxiété, la probabilité ou l'occurrence de la menace est faible ou incertaine (Craske *et al.*, 2009; Craske and Stein, 2016; J. A. Gray and McNaughton, 2000; Steimer, 2002). Un état anxieux correspond à la fois à une réponse physiologique autonomes et neuroendocriniennes (ex : augmentation de l'activité du système nerveux sympathique) et à une réponse comportementale (ex : évitement de la source potentiellement menaçante, immobilisation). L'anxiété non-pathologique est une réponse physiologique nécessaire à la survie et à l'adaptation d'un individu dans son environnement et peut être divisée en deux sous-groupes : l'anxiété-état et l'anxiété-trait. L'anxiété état est décrite comme un état émotionnel intense et transitoire en réponse à une situation menaçante tandis que l'anxiété-trait correspond à une réponse anxieuse innée chez l'individu qui perdure dans le temps. Lorsque cet état émotionnel persiste dans le temps et ce, en l'absence d'une situation anxiogène avérée, on parle de trouble anxieux ou d'anxiété pathologique. Ces troubles anxieux sont retrouvés dans de nombreuses pathologies telles que les phobies, les troubles anxieux généralisés ou les troubles de stress post-traumatiques (Craske *et al.*, 2009; J. A. Gray and McNaughton, 2000).

I. L'anxiété étudiée en laboratoire

De nombreux modèles animaux rongeurs ont été développés en laboratoire afin d'appréhender les substrats neuro-anatomiques et moléculaires sous-tendant l'anxiété mais également d'évaluer l'efficacité de différents traitements anxiolytiques. Ces modèles sont généralement des lignées de rongeurs sélectionnées pour présenter un fort ou un faible niveau d'anxiété. Cependant, elles peuvent également être des lignées transgéniques déficientes pour certains récepteurs impliqués dans la régulation des processus anxieux (Sartori *et al.*, 2011).

Parmi les tests comportementaux chez le rongeur, on retrouve des tests mesurant des réponses conditionnées et des tests mesurant les réponses anxieuses non-conditionnées (tests basés sur l'exploration ou sur des réponses à un stimulus menaçant). Ces derniers regroupent notamment le test du labyrinthe en zéro (en anglais : *o-maze*, OM), le test du labyrinthe en croix surélevé et l'*open-field* (OF) (Figure 20). La validité des tests comportementaux utilisés pour évaluer l'anxiété chez l'animal repose notamment sur une modulation positive des critères mesurés lors du test par des agents pharmacologiques anxiolytiques (tels que les benzodiazépines, BDZ) (Belzung and Griebel, 2001; Cryan and Sweeney, 2011).

- Le labyrinthe en zéro

Le labyrinthe en zéro surélevé est un dispositif dérivé du labyrinthe en croix surélevé comprenant deux secteurs ouverts et deux secteurs fermés par des parois verticales.

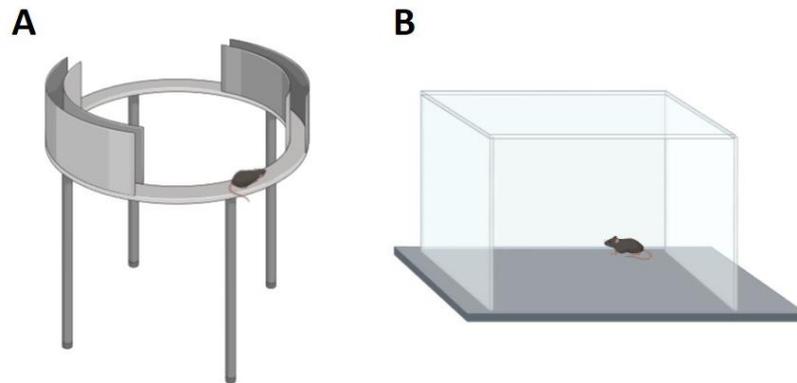


Figure 20: Représentation schématique du labyrinthe en zéro (A) et de l'open-field (B).

Ce test est basé sur un conflit d'approche-évitement entre la tendance naturelle des rongeurs à explorer un environnement nouveau et leur aversion naturelle pour le vide et les espaces ouverts non protégés. Ce test dure généralement cinq minutes et permet d'extraire différentes variables relatives à l'état-anxieux telles que le nombre d'entrées, le temps passé et la latence à aller dans les bras ouverts du labyrinthe. Ce test a été validé d'un point de vue pharmacologique. En effet, les différents paramètres mesurés sont sensibles aux anxiolytiques chez le rongeur (Braun *et al.*, 2011; Shepherd *et al.*, 1994).

- L'open-field

Le test du champ ouvert ou OF est largement utilisé chez le rongeur à la fois pour mesurer l'activité locomotrice globale et l'anxiété. Il présente la configuration d'une arène de forme circulaire, carrée ou rectangulaire de grande dimension par rapport à la taille de l'animal testé (on utilisera, par exemple, un OF ayant un diamètre moyen de 50 cm chez la souris).

Ce test est également basé sur un conflit d'approche-évitement vis-à-vis de la zone centrale de l'OF (anxiogène). Les rongeurs présentent, en effet, une préférence pour la périphérie du dispositif (zone protégée de l'exposition à des prédateurs potentiels) où ils se déplacent le long des parois, un comportement appelé thigmotaxie. Différents paramètres peuvent être mesurés lors du test tels que le nombre d'entrées et le temps passé au centre du dispositif mais également la distance parcourue dans les différentes zones. L'utilisation de ce test pour mesurer l'anxiété reste cependant discutée. En effet, bien que l'OF soit sensible aux agents pharmacologiques tels que les benzodiazépines, les paramètres mesurés avec l'OF ne semble pas influencés par certains traitements pharmacologiques

utilisés pour le traitement des troubles anxieux tels que les inhibiteurs de la recapture de la sérotonine (Prut and Belzung, 2003). Par ailleurs, les phénotypes anxieux restent difficiles à interpréter lorsque l'activité globale est également modifiée.

II. Réseaux de l'anxiété

De nombreuses régions cérébrales ont été décrites comme impliquées dans l'anxiété dans des modèles animaux de lésions cérébrales et, plus récemment, par l'utilisation de techniques optogénétiques chez le rongeur. Parmi ces régions, on peut citer l'amygdale, le BNST, la substance grise périaqueducule, le cortex préfrontal, l'hypothalamus et l'hippocampe ventral (Calhoon and Tye, 2015; Tovote *et al.*, 2015).

En 1937, le « circuit de Papez » fut proposé par James Papez, un neuroanatomiste américain, comme la base neuroanatomique des émotions. Selon ce modèle, les stimuli émotionnels seraient d'abord traités au niveau du thalamus, qui projetterait ensuite sur le cortex et l'hypothalamus. Ce dernier établirait à son tour des projections avec le thalamus antérieur, lui-même connecté au cortex cingulaire. Finalement, les informations traitées par le cortex cingulaire seraient transmises à l'hypothalamus *via* l'hippocampe formant ainsi une boucle dans le circuit (Papez, 1937).

Dix ans plus tard, Paul Yakovlev (1948) suggère que l'amygdale, le cortex orbitofrontal, l'insula et le lobe temporal antérieur forment un réseau sous-tendant les processus émotionnels et motivationnels (Yakovlev, 1948). MacLean intègre ensuite les travaux de Papez et Yakovlev dans un modèle du système limbique et conclut que le cortex limbique et les structures limbiques sous-corticales forment un circuit fonctionnel interconnecté pour la régulation des émotions (MacLean, 1949, 1952).

De nombreuses études se sont, par la suite, intéressées à l'amygdale, une structure du système limbique considérée comme l'épicentre du traitement des émotions. Cet intérêt a été, notamment, porté sur cette structure en raison de ses nombreuses connexions réciproques avec des structures cérébrales impliquées dans les réponses émotionnelles et cognitives (LeDoux, 2000; Phelps and LeDoux, 2005; Pitkänen *et al.*, 1997).

1- Structure de l'amygdale

L'amygdale est la région cérébrale la mieux caractérisée pour son rôle dans la régulation des processus émotionnels. La contribution de l'amygdale dans les processus anxieux a été rapportée chez l'Homme. En effet, des études par IRM (imagerie à résonance magnétique) fonctionnelle ont montré

une hyperactivation de cette région chez des individus souffrants de troubles anxieux (Etkin *et al.*, 2004; Etkin and Wager, 2007; Stein *et al.*, 2007). Par ailleurs, il a été mis en évidence que les individus présentant une lésion bilatérale de l'amygdale montrent des déficits de reconnaissance des expressions faciales des émotions négatives et de la peur (Adolphs *et al.*, 1999).

L'amygdale contient environ 13 différents noyaux. En outre, on retrouve le noyau basolatéral (en anglais: *basolateral amygdala* BLA) subdivisé en noyau latéral (LA), basal (BA) et basomédial (BMA) et le noyau central (CeA) subdivisé en noyau centro-latéral (CeL), capsulaire (CeC) et centromédian (CeM) (Sah *et al.*, 2003) (Figure 21). La BLA et la CeA dérivent de structures embryologiques différentes ce qui leur confère une structure et une composition neuronale propre. La BLA présente une structure de type "corticale" et est composée à 80% par des neurones à épines glutamatergiques. A l'inverse, la CeA a une structure de type striatale et est composée principalement d'interneurones GABAergiques (Johnston, 1923; McDonald, 2003).

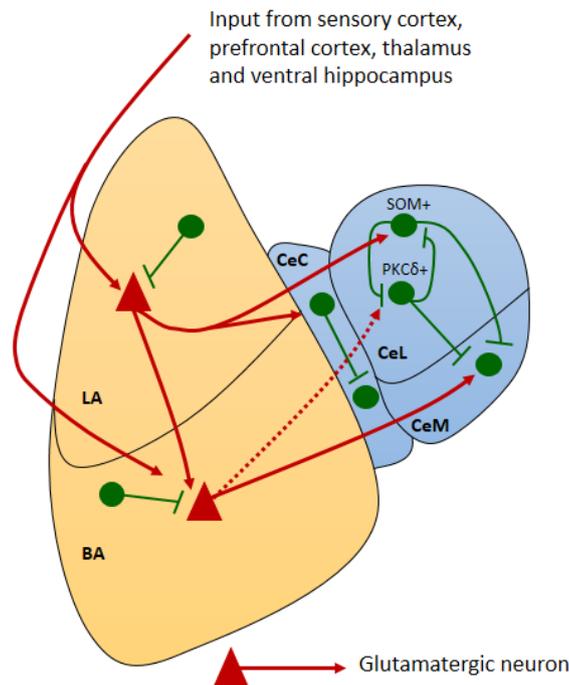


Figure 21: Structure et connexions des différents noyaux amygdaliens.
(Adapté de Babaev *et al.*, 2018 ; Calhoun *et al.*, 2015 ; Lee *et al.*, 2017).

2- Connectivité de l'amygdale

L'amygdale basolatérale joue un rôle crucial dans l'intégration des stimuli externes relayés par le thalamus et les aires corticales sensorielles et des informations contextuelles provenant de l'hippocampe (Ledoux, 2000; Alexander J. McDonald, 1998). Les informations traitées par les neurones

excitateurs de l'amygdale basolatérale sont ensuite relayées au niveau de l'amygdale centrale, du BNST, du PFC (cortex préfrontal) et de l'hippocampe. Ces différentes régions interconnectées participent à la régulation des émotions (Figure 22) (Calhoon and Tye, 2015; Tovote *et al.*, 2015). L'amygdale centrale reste, cependant, un relais majeur des projections glutamatergiques en provenance de la BLA. De manière intéressante, l'activation des neurones de la BLA projetant sur la CeA produit un effet anxiolytique chez les souris testées en labyrinthe en croix surélevé et en OF (Tye *et al.*, 2011).

Deux populations neuronales globalement distinctes sont retrouvées au sein de la CeL/C : les interneurons exprimant la somatostatine (SOM+) et les interneurons exprimant la protéine kinase C- δ (PKC δ +) (Hunt *et al.*, 2017). Une autre distinction est généralement faite entre les neurones PKC δ et PKC δ -négatifs (PKC δ -). En effet, ces deux populations répondent différemment à un stimulus de peur conditionnée, les neurones PKC δ sont inhibés (Cell OFF) tandis que les neurones PKC δ - sont activés (Cell ON) en réponse au stimulus (Ciochi *et al.*, 2010; Haubensak *et al.*, 2010a). Les interneurons SOM+ correspondent vraisemblablement aux neurones PKC δ - décrits dans cette étude (K. Yu *et al.*, 2017). En effet, les neurones SOM+ jouent un rôle dans l'acquisition et la consolidation des réponses de peur conditionnée ainsi que dans l'expression de comportements défensifs (H. Li *et al.*, 2013; K. Yu *et al.*, 2016). Les neurones PKC δ et SOM+ peuvent également réguler les réponses comportementales en s'inhibant réciproquement et en envoyant des projections inhibant les neurones de la CeM (Haubensak *et al.*, 2010a). Il a, entre autres, été montré que ces deux populations avaient des effets opposés dans la modulation des réponses comportementales à la douleur (Wilson *et al.*, 2019).

Une étude de Cai et collaborateurs a récemment mis en évidence que l'activation optogénétique des neurones PKC δ produisait des effets anxiolytiques dans l'OF, l'EPM et la boîte sombre/clair (Cai *et al.*, 2014). Il a également été montré que les neurones PKC δ de l'amygdale centrale projetant sur la substance innominée de Reichert (*substantia innominata*) jouent un rôle dans l'encodage des stimuli aversifs et permettent le renforcement négatif des apprentissages associatifs (Cui *et al.*, 2017).

Outre l'effet anxiolytique observé suite à l'activation de la voie BLA-CeA, il a été montré un effet anxiogénique lors de la stimulation des somas des neurones de la BLA suggérant l'existence d'autres projections capables de moduler les réponses anxieuses (Tye *et al.*, 2011). Il a, par exemple, été montré que l'activation des neurones glutamatergiques de la BLA projetant sur l'hippocampe ventral ou sur le cortex préfrontal médian augmente les phénotypes anxieux en EPM et en OF (Felix-Ortiz *et al.*, 2013).

Le BNST reçoit également des afférences provenant de la BLA et de la CeA et contribue à la régulation de l'anxiété et de la peur contextuelle (M. Davis *et al.*, 2010). Les afférences arrivant sur les différentes sous-régions du BNST vont également pouvoir réguler différemment les réponses anxieuses en raison de la spécificité de leurs efférences. Le noyau oval du BNST favoriserait, par exemple, un état pro-anxieux tandis que la partie antérodorsale exercerait un effet anxiolytique (S. Y. Kim *et al.*, 2013).

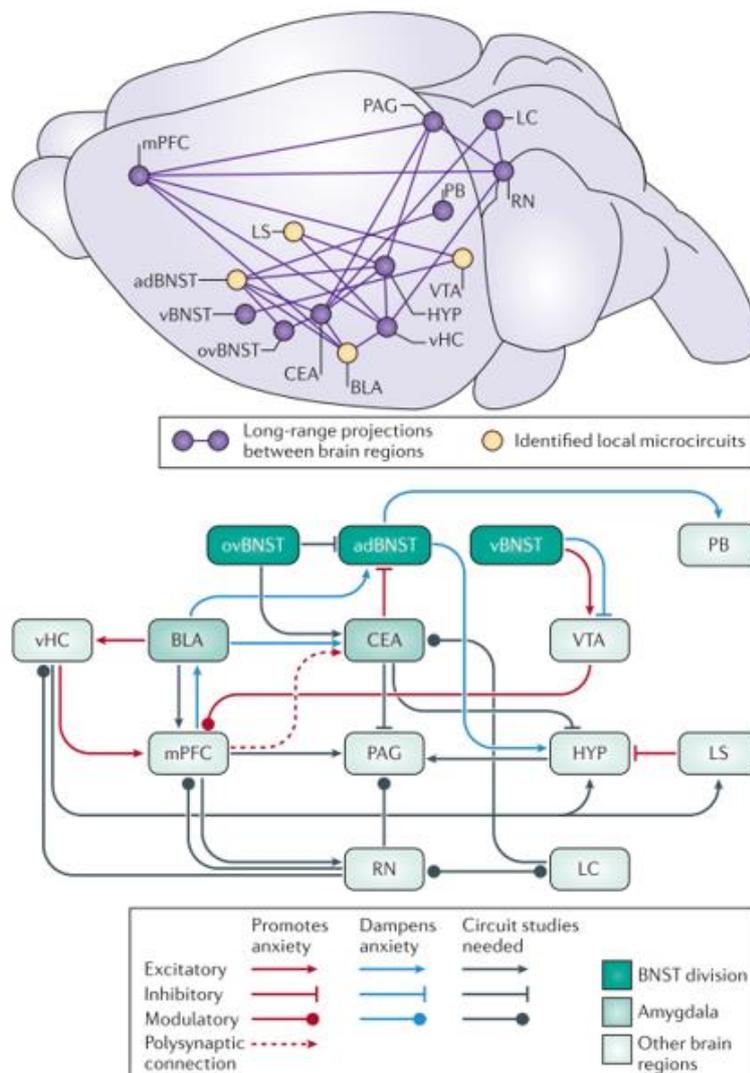


Figure 22: Les circuits de l'anxiété.

Amygdale basolatérale (BLA); partie antérodorsale du BNST (adBNST), Hippocampe ventral (vHC) amygdale centrale (CEA) ; BNST ventral (vBNST) ; aire tegmentale ventrale (VTA) ; Hypothalamus (HYP) ; Locus coeruleus (LC) ; Septum latéral (LS) ; cortex préfrontal médian (mPFC) ; noyau oval du BNST (ovBNST); substance grise periaqueducule (PAG) ; noyau parabrachial (PB) ; noyau du raphé (RN) (Tovote *et al.*, 2015).

III. Mécanismes moléculaires

De nombreux neurotransmetteurs et neuropeptides régulent localement l'activité des réseaux neuronaux impliqués dans l'anxiété. Parmi eux, on retrouve, entre autres, le GABA, le glutamate, la sérotonine, la dopamine, noradrénaline ou le CRF (Millan, 2003; Stoppel *et al.*, 2006).

La neurotransmission GABAergique est un acteur potentiel permettant d'expliquer la pathophysiologie de l'anxiété. Le GABA est le principal neurotransmetteur inhibiteur du SNC, où il permet de maintenir un équilibre de la balance excitation/inhibition neuronale nécessaire à la transmission neuronale physiologique. Il est alors proposé qu'un défaut de la transmission GABA puisse perturber cet équilibre et conduire à l'anxiété pathologique. Le GABA, majoritairement synthétisé par les interneurons, permet de réguler localement ou *via* des projections de longue portée, l'excitabilité des neurones excitateurs. Les récepteurs au GABA, qui peuvent être ionotropiques (GABA-RA, récepteur canal perméable au chlore) ou métabotropiques (couplés aux protéines G) afin de permettre respectivement un contrôle inhibiteur rapide et prolongé de la neurotransmission sont largement distribués dans le SNC (Nuss, 2015). Ainsi, il a été montré qu'une infusion de GABA ou d'agonistes des récepteurs GABA dans l'amygdale permettaient de réduire les réponses anxieuses chez les animaux (Barbalho *et al.*, 2009; Sanders and Shekhar, 1995). Les récepteurs GABA constituent d'ailleurs la principale cible thérapeutique pour le traitement des troubles anxieux. Les benzodiazépines agissent, par exemple, sur le site (BDZ) des récepteurs GABA-A pour potentialiser l'entrée de chlore et induire une hyperpolarisation (Sigel and Luscher, 2012). Chez l'homme, il a été montré que l'usage des BDZ permet de réduire l'activation de l'amygdale en présence de stimuli émotionnels négatifs (Del-Ben *et al.*, 2012; Paulus *et al.*, 2005).

Le système sérotoninergique est également un système inhibiteur et constitue une cible thérapeutique dans le traitement des troubles de l'anxiété, où les inhibiteurs de recapture de la sérotonine ont montré leur efficacité (Araneda and Andrade, 1991; Carhart-Harris and Nutt, 2017). Le récepteur 5-HT 1A est un récepteur métabotropique dont la cascade intracellulaire conduit à l'activation de canaux potassiques et à l'hyperpolarisation des neurones *via* l'efflux d'ions potassium. Chez l'animal, la délétion du récepteur à la sérotonine 5-HT 1A induit des phénotypes anxiogéniques dans différents tests comportementaux (Heisler *et al.*, 1998).

Le glutamate est le principal neurotransmetteur exciteur du SNC et module la neurotransmission au sein des circuits de l'anxiété. La BLA reçoit, en effet, des afférences glutamatergiques provenant du cortex et du thalamus et envoie à son tour des projections glutamatergiques excitatrices vers d'autres

régions limbiques (A. J. McDonald *et al.*, 1996). La délétion de la sous-unité GLUN1 du récepteur NMDA dans les cellules granulaires du gyrus denté diminue les réponses anxieuses (Niewoehner *et al.*, 2007). Par ailleurs, il a été montré que l'injection d'un antagoniste des NMDA-R au niveau de l'hippocampe ventral induisait une diminution d'anxiété chez le rat (Nascimento Häckl and Carobrez, 2007). Au niveau de l'amygdale, l'injection d'antagoniste du récepteur NMDA réduit l'anxiété induite par l'exposition à un prédateur (Adamec *et al.*, 1998). L'utilisation d'un agoniste des récepteurs glutamatergiques métabotropiques mGluR2 et mGluR3 a montré un effet anxiolytique chez les souris testées en EPM (Linden *et al.*, 2004).

La corticolibérine (CRH) est un neuropeptide sécrété en réponse au stress qui va également moduler les réponses émotionnelles en agissant sur les récepteurs CRH1 et CRH2. Les récepteurs CRH1 et CRH2 sont largement exprimés au niveau cérébral dans des régions telles que l'amygdale centrale, le BNST et le noyau paraventriculaire de l'hypothalamus (Lovejoy *et al.*, 2014). La sécrétion du CRH par les neurones hypothalamiques joue un rôle dans la réponse au stress *via* l'activation hypothalamo-hypophyso-surrénalien (axe HPA). Outre ces effets *via* l'axe HPA, il a été montré que la délétion conditionnelle du récepteur CRH1 dans le cerveau antérieur et les régions limbiques (excluant l'hypothalamus) réduit l'anxiété chez les souris (M. B. Müller *et al.*, 2003). Par ailleurs, l'activation chimogénétique des neurones exprimant le CRH dans l'amygdale centrale augmente les phénotypes anxieux chez les souris testées en labyrinthe en zéro et en boîte claire/sombre (Paretkar and Dimitrov, 2018).

Pour résumer :

- ❖ L'anxiété est un état émotionnel susceptible d'apparaître en réponse à une situation potentiellement menaçante.
- ❖ Lorsque cet état émotionnel persiste, on parle de trouble anxieux.
- ❖ L'anxiété est une réponse comportementale complexe sous-tendue par l'activation de nombreuses régions cérébrales.
- ❖ L'amygdale est une structure largement interconnectée au sein des réseaux neuronaux impliqués dans la régulation des processus émotionnels.

D. Neurobiologie de la mémoire spatiale

I. Les différents types de mémoire

La mémoire est un processus dynamique qui permet le stockage et la restitution d'informations et constitue une fonction biologique fondamentale à la survie et à l'identité des individus. Les traces mnésiques (ou engrammes) générées peuvent être stockées plus ou moins longtemps pour un rappel futur. Ainsi, on distingue la mémoire à court terme qui dure quelques secondes à quelques minutes et la mémoire à long terme qui perdure plusieurs heures à plusieurs années. La mémoire à long terme peut être classée en deux grandes classes : la mémoire déclarative et la mémoire implicite (non déclarative) (Henke, 2010; Squire and Zola, 1996). La mémoire déclarative fait référence aux souvenirs d'événements passés dans la vie de l'individu dans un cadre spatio-temporel déterminé (mémoire épisodique) et aux connaissances générales (mémoire sémantique). La mémoire non déclarative est relative aux apprentissages inconscients et concerne les habiletés motrices et les réponses motrices. La mémoire spatiale est souvent considérée comme une entité de la mémoire déclarative permettant de fournir un contexte spatial à la mémoire épisodique (Burgess *et al.*, 2002; Eichenbaum and Cohen, 2014).

II. La cognition spatiale

La cognition spatiale (ou navigation) concerne l'ensemble des processus permettant à un sujet d'acquérir, d'organiser et d'utiliser des informations spatiales pour effectuer des déplacements orientés dans son environnement. La cognition spatiale repose sur deux types de mémoires caractéristiques. Lors d'une tâche de navigation, l'ensemble des habiletés motrices requises pour atteindre un but suivant une direction optimisée repose sur la mémoire procédurale. Par ailleurs, l'encodage des événements et leurs relations spatiales et temporelles fait intervenir la mémoire déclarative de type épisodique. Les informations perçues lorsqu'un individu évolue dans son environnement peuvent être de nature idiothétique, c'est-à-dire liée au déplacement de l'individu lui-même (informations proprioceptives, sensorielles et liées au système vestibulaire) ou allothétique (informations liées à l'environnement), ces dernières pouvant être de nature visuelle, olfactive, auditive ou somesthésique.

Les informations spatiales peuvent être utilisées selon un référentiel égo-centré (les informations sont mises en relation avec le sujet lui-même) ou allo-centré (les informations spatiales sont définies dans un cadre extérieur au sujet) (Figure 23) (Arleo and Rondi-Reig, 2007).

1- Stratégies de navigation

La navigation basée sur un référentiel égocentré comprend les stratégies de route et de guidage (Arleo and Rondi-Reig, 2007; John O'Keefe and Nadel, 1978). La stratégie de guidage consiste à utiliser un indice « saillant » à proximité du but à atteindre. Cette stratégie reste efficace lorsque le point de départ est modifié tant que l'indice situé à proximité du but reste visible et nécessite l'association d'un seul stimulus égocentré. Plusieurs indices égocentrés peuvent cependant être utilisés dans une stratégie de réponse déclenchée par un stimulus. Dans ce cas, différents indices visuels vont être associés à des réponses motrices afin d'atteindre le but et ce, même si les indices présents à proximité du but ne sont pas visibles depuis le point de départ. Finalement, la stratégie de route consiste à associer différents indices égocentrés à des réponses motrices de manière séquentielle afin d'atteindre un but final.

Les stratégies allocentriques telles que la stratégie de carte permettent de mettre en lien les différents indices présents dans l'environnement les uns par rapport aux autres. L'individu peut alors utiliser les différentes informations de son environnement de manière flexible afin d'atteindre un but et ce, quelle que soit sa position de départ (Arleo and Rondi-Reig, 2007; Hartley, Lever, Burgess, and O'keefe, 2014). Cette stratégie de carte spatiale, proposée initialement par Tolman, permet aux individus d'adapter la navigation lorsque l'utilisation de stratégies de type stimulus-réponse n'est pas disponible (Tolman, 1948). Cette représentation mentale de l'environnement nécessite l'encodage et la mise en relation d'un grand nombre d'informations et serait dépendante de l'hippocampe (J. O'Keefe and Dostrovsky, 1971).

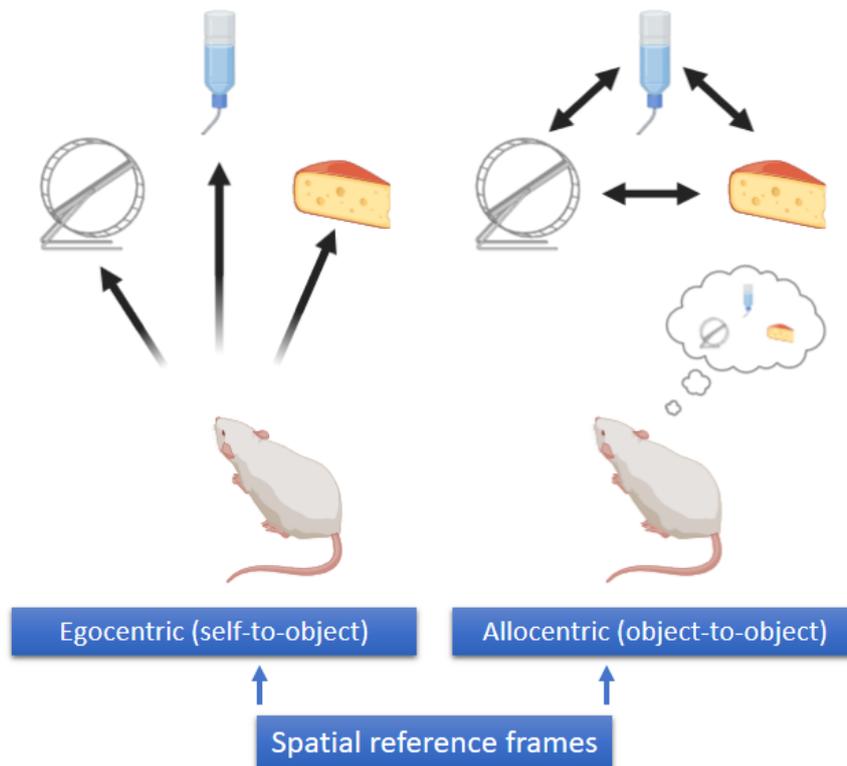


Figure 23: Les référentiels égocentriques et allocentriques dans la navigation.

La stratégie égocentrique est basée sur l'intégration d'informations en fonction des mouvements de l'individu. La stratégie allocentrique est basée sur la mise en relation entre des différents indices présents dans l'environnement.

2- La mémoire spatiale étudiée en laboratoire : le labyrinthe de Barnes

Différents tests ont été développés afin d'étudier la mémoire spatiale chez le rongeur. Le labyrinthe de Barnes est une tâche de mémoire spatiale au cours de laquelle l'animal doit apprendre à localiser un refuge situé spécifiquement sous l'un des nombreux trous (18 à 20) placés en périphérie d'une plateforme circulaire. Pour cela, des indices visuels sont placés sur les murs de la pièce ou directement au sein du labyrinthe (Figure 24). Ce test constitue une alternative à la piscine de Morris qui est largement utilisée chez le rongeur pour étudier la mémoire spatiale et est considéré comme moins anxiogène compte tenu de leur aversion pour l'eau (F. E. Harrison *et al.*, 2009). La motivation des rongeurs à trouver la boîte refuge est toutefois renforcée par la présence d'une source lumineuse intense au-dessus du labyrinthe. Le protocole utilisé pour mesurer la mémoire spatiale de référence comprend deux phases, une phase d'acquisition permettant aux animaux de repérer la localisation du trou « refuge » au cours de plusieurs sessions quotidiennes de 5 minutes réalisées pendant 4 jours consécutifs en moyenne, et un test de rappel de 90 secondes réalisé le 5^{ème} jour (et éventuellement plusieurs jours après le dernier essai de l'acquisition pour tester la mémoire à long-terme) au cours duquel la boîte refuge est retirée (*probe test*). Le nombre d'entrées et le temps passé au niveau du

trou sous lequel était précédemment placé le refuge sont deux paramètres permettant d'évaluer la mémoire spatiale des animaux. D'autres variables peuvent être mesurées au cours de l'acquisition et du rappel du test telles que la distance parcourues et la latence à trouver le « refuge », et le nombre d'erreur, afin d'évaluer les performances d'apprentissage (Fiona E. Harrison *et al.*, 2006).



Figure 24: Représentation schématique du test du labyrinthe de Barnes.

3- Rôle de l'hippocampe dans la mémoire spatiale

L'étude clinique de patients présentant des lésions ou des résections cérébrales a permis de démontrer que les sous-types de mémoires étaient sous-tendues par des régions cérébrales différentes. C'est notamment le cas du patient H.M., décrit par Scoville et Milner. L'ablation bilatérale du lobe temporal médian, incluant l'hippocampe chez ce patient traité pour des crises épileptiques sévères, a provoqué une amnésie antérograde (impossibilité de former de nouveaux souvenirs) et rétrograde (perte des souvenirs acquis avant l'opération). En revanche, l'amnésie antérograde et rétrograde de ce patient n'était pas totale. Il était, en effet, toujours capable de mémoriser des informations quelques minutes et d'apprendre des tâches perceptivo-motrices telle que l'exercice du dessin en miroir.

Par ailleurs, l'amnésie rétrograde d'H.M. concerne les souvenirs d'évènements relativement récents (3 ans avant l'opération) tandis que les souvenirs de son enfance sont préservés (Scoville and Milner, 1957; Squire, 2009). De façon surprenante, le patient H.M. présente des déficits d'apprentissage dans de nombreuses tâches spatiales mais est toutefois capable de réaliser des cartes spatiales de son environnement après son opération grâce à des apprentissages répétés. Ces observations ont alors suggéré que l'hippocampe était nécessaire à l'apprentissage et à la mémorisation des informations spatiales mais que d'autres structures cérébrales pouvaient également être engagées dans le traitement et la mémorisation des informations spatiales (Corkin, 2002).

Des études précliniques menées chez le rongeur ont également souligné l'importance de l'hippocampe dans la cognition spatiale. En effet, l'ablation ou la lésion de l'hippocampe produisent des déficits d'apprentissage dans des tâches spatiales mesurées, par exemple, à l'aide du labyrinthe en T ou de la piscine de Morris (Douglas, 1967; Morris *et al.*, 1982). Par ailleurs, Moser et collaborateurs indiquent que les apprentissages spatiaux sont dépendants spécifiquement de l'hippocampe dorsal (Moser *et al.*, 1995).

L'implication de l'hippocampe dans la cognition spatiale a également été proposée par O'Keefe et Dostrovsky par leur découverte des cellules de lieu, des neurones pyramidaux présents au niveau des aires CA1 et CA3 capables de décharger lorsque l'animal est présent dans une position spécifique de son environnement (J. O'Keefe and Dostrovsky, 1971). Plus tard, O'Keefe et Nadel ont suggéré que les cellules de lieu pourraient être un substrat nécessaire à l'établissement de « cartes cognitives » (John O'Keefe and Nadel, 1978).

a. Structure de l'hippocampe

La formation hippocampique regroupe les cornes d'Ammon CA1, CA2 et CA3, le gyrus denté (en anglais : *dentate gyrus*, DG) et le subiculum. La formation hippocampique est étroitement liée aux régions parahippocampiques comprenant le presubiculum, le parasubiculum, le cortex entorhinal, le cortex périrhinal et postrhinal. La voie perforante constitue la principale afférence de l'hippocampe et correspond aux projections des neurones du cortex entorhinal sur les neurones granulaires du gyrus denté. Au sein de l'hippocampe, les axones des neurones granulaires du gyrus denté, aussi appelée fibres moussues, projettent sur les neurones de la région CA3. Ces derniers innervent à leur tour les neurones de la région CA1 *via* les collatérales de Schaffer. Le réseau de neurones excitateurs reliant le cortex entorhinal à la région CA1 forme ainsi le circuit trisynaptique de l'hippocampe. Finalement, les cellules pyramidales de CA1 envoient des efférences vers le subiculum et le cortex entorhinal nécessaires au traitement de l'information (Van Strien *et al.*, 2009). Il existe également des connexions bilatérales au sein de l'hippocampe qui relient les collatérales de Schaffer aux régions CA1 et CA3 controlatérales *via* les fibres commissurales (Laurberg, 1979; Neves *et al.*, 2008) (Figure 25).

b. Connectivité de l'hippocampe et traitement des informations spatiales

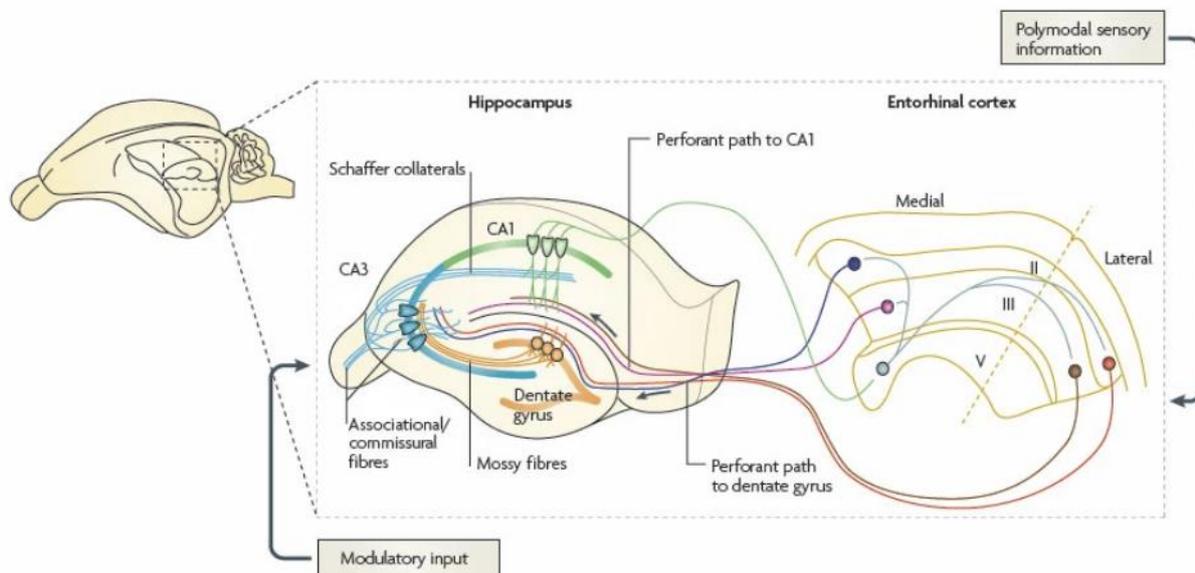


Figure 25: Représentation schématique du circuit trisynaptique hippocampique.

Le cortex entorhinal reçoit des informations sensorielles polymodales et établit à son tour des connexions avec l'hippocampe par la voie perforante (*perforant path*) au niveau du gyrus denté et des aires CA1 et CA3. Les cellules granulaires du gyrus denté envoient leurs axones (fibres moussues ; en anglais : *mossy fibres*) sur les dendrites des neurones de l'aire CA3 qui à leur tour envoient leurs axones (collatérales de Schaffer ; en anglais : *Schaffer collaterals*) sur les cellules pyramidales de l'aire CA1. Les neurones pyramidaux de l'aire CA1 projettent également sur les aires CA1 et CA3 contralatérales *via* les fibres commissurales (*commissural fibres*). Les neurones de CA1 envoient finalement leurs axones vers les couches profondes du cortex entorhinal (Neves *et al.*, 2008).

L'hippocampe établit des connexions directes ou indirectes avec différentes régions cérébrales impliquées dans le traitement des informations spatiales telles que le cortex entorhinal, le cortex pariétal, le cortex retrosplénial, le cortex périrhinal, le cervelet et le striatum. Une grande partie des afférences de l'hippocampe transite par le cortex entorhinal (Bird and Burgess, 2008; Brown and Aggleton, 2001) (Figure 26).

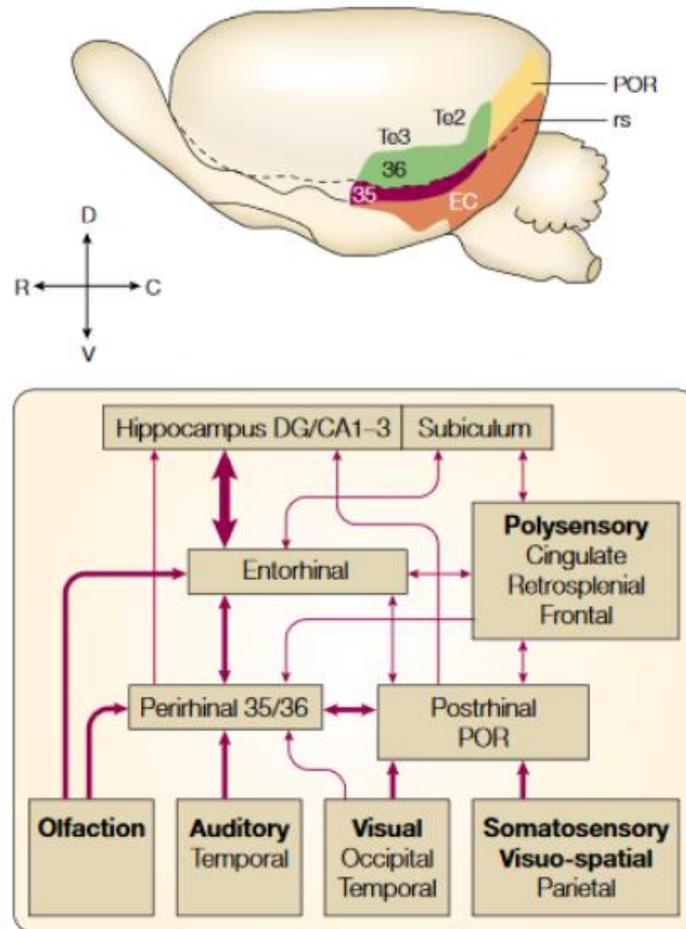


Figure 26: L'hippocampe et ses connexions avec le cortex parahippocampique et les aires sensorielles (Brown & Aggleton, 2001).

L'hippocampe reçoit principalement des afférences provenant des couches superficielles du cortex entorhinal tandis que les efférences de la formation hippocampique projettent principalement sur les couches profondes du cortex entorhinal. Les projections du cortex entorhinal ne sont pas limitées au gyrus denté, elles peuvent également établir des connexions directes avec les aires CA1 et CA3 (Figure 25). En effet, l'activité électrique des neurones de lieu de CA1 et CA3 persiste après la destruction des cellules granulaires du gyrus denté (McNaughton *et al.*, 1989). Similairement, l'activité des neurones de CA1 est maintenue après une lésion de l'aire CA3. Les informations spatiales provenant du cortex entorhinal *via* la voie perforante sont donc susceptibles de converger directement au niveau des aires CA1 et CA3 et de participer à l'activité des cellules de lieu (Brun *et al.*, 2002).

Au niveau anatomique, le cortex entorhinal est principalement innervé par le cortex périrhinal et postrhinal et par de multiples aires corticales nécessaires au traitement d'informations spatiales et non spatiales (Canto *et al.*, 2008; Van Strien *et al.*, 2009). Le cortex entorhinal est divisé en deux parties : le cortex entorhinal latéral et le cortex entorhinal médian, impliqués dans le traitement des

informations respectivement non-spatiales et spatiales. Le rôle du cortex entorhinal médian dans le traitement des informations spatiales a notamment été proposé suite la découverte des cellules de grilles. Ces cellules sont, en effet, capables d'être activées selon différentes positions de l'animal dans son environnement selon un motif triangulaire et pourraient potentiellement permettre une représentation spatiale de l'environnement lors de la navigation (Fyhn *et al.*, 2004).

Le rôle du cortex entorhinal dans la mémoire spatiale a été montré dans différents modèles lésionnels. Une lésion excitotoxique du cortex entorhinal médian au niveau de la bande dorsolatérale après la phase d'entraînement produit des déficits de mémoire spatiale chez le rat testé en piscine de Morris (Steffenach *et al.*, 2005). La bande dorsolatérale du cortex entorhinal médian permet, en effet, le traitement des informations visuo-spatiales provenant du cortex visuel associatif. Cette région reçoit également des afférences d'autres aires corticales telles que le cortex pariétal postérieur et cingulaire (Burwella, 2000; Canto *et al.*, 2008). Les travaux de Parron et collaborateurs ont mis en évidence que le cortex entorhinal était spécifiquement impliqué dans le traitement des indices distaux dans l'environnement. En effet, les animaux présentant une lésion du cortex entorhinal présentent des déficits de navigation en piscine de Morris lorsque les indices visuels sont distaux (en dehors de la piscine) mais ne présentent pas de déficits spatiaux lorsque les indices visuels sont proximaux (dans la piscine) (Parron *et al.*, 2004).

Le cortex rétrosplénial joue également un rôle dans les apprentissages spatiaux basés sur l'utilisation d'indices allocentriques. La lésion du cortex rétrosplénial induit, par exemple, des déficits de navigation en labyrinthe radial lorsque les indices visuels sont distaux et non lorsque ceux-ci sont placés sur les parois du labyrinthe (Vann and Aggleton, 2002). A l'inverse, le cortex pariétal associatif, une structure anatomiquement connectée à l'hippocampe et au cortex entorhinal *via* les cortex périrhinal et rétroplénial serait plutôt impliquée dans le traitement les informations spatiales égocentriques (Save and Poucet, 2000).

Par ailleurs, le cortex pariétal semble influencer les champs d'activité des cellules de lieu de l'hippocampe en présence d'indices égocentrique (Save and Poucet, 2009). Le cortex préfrontal médian (mPFC) reçoit également des informations en provenance de l'aire CA1 de l'hippocampe par une voie monosynaptique et envoie des projections indirectes sur l'hippocampe *via* le cortex entorhinal et le thalamus (Ferino *et al.*, 1987; Vertes, 2004).

Les travaux de Hoks et collaborateur ont mis en évidence la présence de neurones s'activant spécifiquement à l'emplacement de l'objectif à atteindre lors d'une tâche spatiale dans le mPFC. Ces neurones appelés « *goal-directed cells* » (cellules dirigées par un objectif) pourraient jouer un rôle dans la planification du trajet pour atteindre un but dans une tâche spatiale (V. Hok *et al.*, 2005). Plus tard,

cette même équipe a montré que l'inactivation du mPFC diminuait la variabilité des décharges des cellules de lieu hippocampiques suggérant un rôle du mPFC dans la flexibilité des représentations spatiales au niveau de l'hippocampe (Vincent Hok *et al.*, 2013).

III. Mécanismes sous-tendant la mémoire

Les informations spatiales encodées lorsqu'un individu explore son environnement doivent être consolidées en des traces mnésiques persistantes. La théorie selon laquelle les souvenirs se stabilisent avec le temps a été mise en avant à la fin des années 80 par Théodule Ribot, un médecin français. Il montre, en effet, que les déficits de mémoire observés chez les patients amnésiques après un traumatisme crânien, concernent principalement les souvenirs récents tandis que les souvenirs plus anciens sont préservés (Ribot, 1882). Le terme de consolidation a été proposé par Müller et Pilzecker qui montrent qu'une trace mnésique est consolidée dans le temps (G. Müller and Pilzecker, n.d.). En effet, le rappel des informations encodées est plus sensible aux interférences dans les premières minutes après une session d'entraînement.

Le processus de consolidation peut alors s'opérer au niveau cellulaire, par l'intermédiaire de modifications moléculaires au niveau synaptique (consolidation synaptique) et au niveau des régions cérébrales par une réorganisation des traces mnésiques du réseau hippocampique vers les régions corticales (consolidation systémique) (Asok *et al.*, 2019; Dudai, 2004; Frankland and Bontempi, 2005). La consolidation synaptique est réalisée quelques heures après un apprentissage tandis que la consolidation systémique s'établit progressivement, sur plusieurs jours ou plusieurs semaines (Squire *et al.*, 2015).

1- La consolidation synaptique

La consolidation synaptique est initiée par une cascade intracellulaire suite à l'activation neuronale lors de l'apprentissage et est dépendante d'une synthèse protéique *de novo*. En effet, l'utilisation d'inhibiteurs de la synthèse protéique peu de temps après l'acquisition d'une tâche induit des déficits de mémoire à long terme (H. P. Davis and Squire, 1984; Freeman *et al.*, 1995).

Les modifications moléculaires des synapses permettraient à terme d'améliorer l'efficacité de la neurotransmission. Cette plasticité synaptique dépendante d'une synthèse protéique est retrouvée de manière similaire lors de la phase tardive de la potentialisation à long terme, un modèle cellulaire de la mémoire (voir chapitre A.IV.2.d tPA et plasticité synaptique) (Asok *et al.*, 2019; Korte and Schmitz, 2016).

Brièvement, la dépolarisation du neurone post-synaptique permet l'entrée de calcium par les récepteurs NMDA qui va permettre l'activation de kinases intracellulaires parmi lesquelles on retrouve la protéine PKA, la protéine kinase C (PKC), la CAMKII et la voie des MAPK (en anglais : *mitogen-activated protein kinase*).

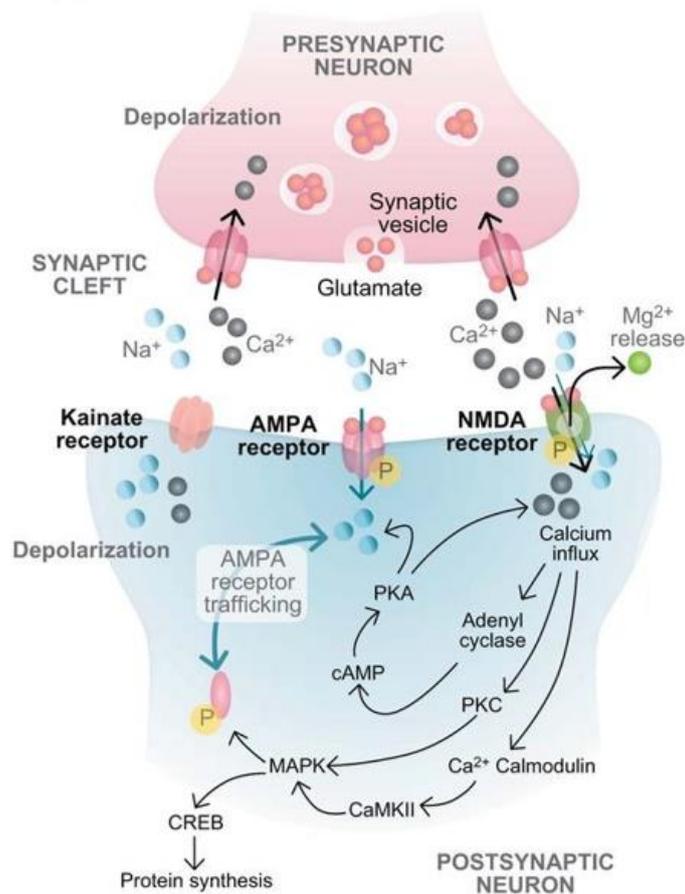


Figure 27 : Représentation schématique de la consolidation synaptique.

La dépolarisation du neurone post-synaptique permet la levée du blocage du récepteur NMDA par l'ion magnésium et permet l'influx calcique. L'entrée de calcium favorise l'activation de différentes enzymes dépendantes du calcium au niveau post-synaptique. Une cascade intracellulaire permet finalement d'augmenter l'expression de gènes nécessaires au renforcement synaptique.

Ces kinases phosphorylent à leur tour des facteurs de transcription tels que CREB (en anglais : *cyclic AMP-response element binding protein*) responsable de la transcription de gènes d'expression précoces tels que c-Fos (en anglais : *cellular feline osteosarcoma* (c-Fos) ou Zif-268 (Figure 27). Ces facteurs de transcription vont à leur tour augmenter l'expression de gènes codant pour des protéines impliquées dans la croissance et la stabilisation des synapses.

La croissance de la densité post-synaptique est également dépendante d'un remodelage de la matrice extracellulaire par des protéases. Celles-ci vont alors intervenir dans la dégradation des

composants extracellulaires afin de permettre la croissance synaptique mais vont également permettre la libération de molécules de signalisation provenant de la MEC ou de protéines transmembranaires et l'activation de facteurs neurotrophiques tels que le BDNF (Senkov *et al.*, 2014; Tsilibary *et al.*, 2014).

2- La consolidation systémique

Un premier modèle de consolidation systémique a été proposé par Marr et suggère que les informations sont initialement stockées dans l'hippocampe puis transférées au cortex où elles sont réorganisées. Selon lui, les motifs d'activation neuronale entre l'hippocampe et le cortex seraient rejoués pendant le sommeil et contribueraient au transfert des informations vers les aires corticales (Marr, 1971). La réactivation des réseaux cortico-hippocampiques permettrait un renforcement progressif des connexions cortico-corticales et les informations stockées deviendraient alors progressivement indépendantes de l'hippocampe. Cette théorie constitue le modèle standard de la consolidation systémique. Il a cependant été observé que les lésions du lobe temporal médian peuvent induire une amnésie rétrograde, y compris pour ces souvenirs anciens lorsqu'il s'agit de traces mnésiques riches en détails contextuels ou spatiaux, comme dans le cas des mémoires biographiques ou épisodiques. Selon la théorie des traces multiples, les informations seraient donc encodées dans le réseau cortico-hippocampique et l'hippocampe resterait indispensable au rappel des informations spatiales et contextuelles (Squire *et al.*, 2015).

La consolidation des traces mnésiques serait notamment sous-tendue par différentes activités oscillatoires au niveau de l'hippocampe durant le sommeil. Le rythme oscillatoire appelée *sharp-waves ripples* (ondulations à ondes vives) correspond à une activité explosive brève à haute fréquence (100-250 Hz) et peut être retrouvé durant le sommeil lent profond (Buzsáki *et al.*, 1992).

L'inactivation de ce type d'oscillation dans le sommeil suivant la phase d'apprentissage altère la consolidation de la mémoire dans une tâche spatiale (Girardeau *et al.*, 2009).

Pour résumer :

- ❖ La cognition spatiale est un processus permettant à un individu d'encoder des informations de son environnement afin de pouvoir les restituer pour s'orienter de manière flexible.
- ❖ La cognition spatiale est sous-tendue par différentes régions cérébrales et notamment par l'hippocampe.
- ❖ La mémoire est un processus complexe permettant la consolidation des informations à la fois au niveau de la synapse mais également au sein des réseaux neuronaux.

E. Les réseaux périneuronaux

I. Découverte des PNNs

Les réseaux périneuronaux (PNNs) ont été observés pour la première fois par Camillo Golgi qui a mis en évidence leur structure par un marquage au nitrate d'argent. Il les décrit alors comme des structures réticulaires autour du soma et des prolongements proximaux des cellules nerveuses. Selon Golgi, ce corset de « neuro-kératine » aurait pour rôle de limiter la diffusion de la transmission nerveuse d'une cellule à l'autre. Les observations de Golgi ont été confirmées plus tard par Donaggio qui a montré que les ouvertures polygonales de ces réseaux permettaient le contact avec les terminaisons nerveuses des cellules adjacentes. Par la suite, l'existence des PNNs a été remise en question par Santiago Ramón y Cajal qui suggèrent que les structures décrites par Golgi ne seraient qu'un artefact causé par la coagulation des fluides périce llulaires. Le développement des techniques d'immunohistochimie a cependant permis de confirmer les observations de Golgi et de mettre en évidence que les PNNs étaient majoritairement composés de chondroïtines sulfates protéoglycanes (CSPG) et d'acide hyaluronique (en anglais : *hyaluronic acid*, HA ; Figure 28) (Celio *et al.*, 1998).

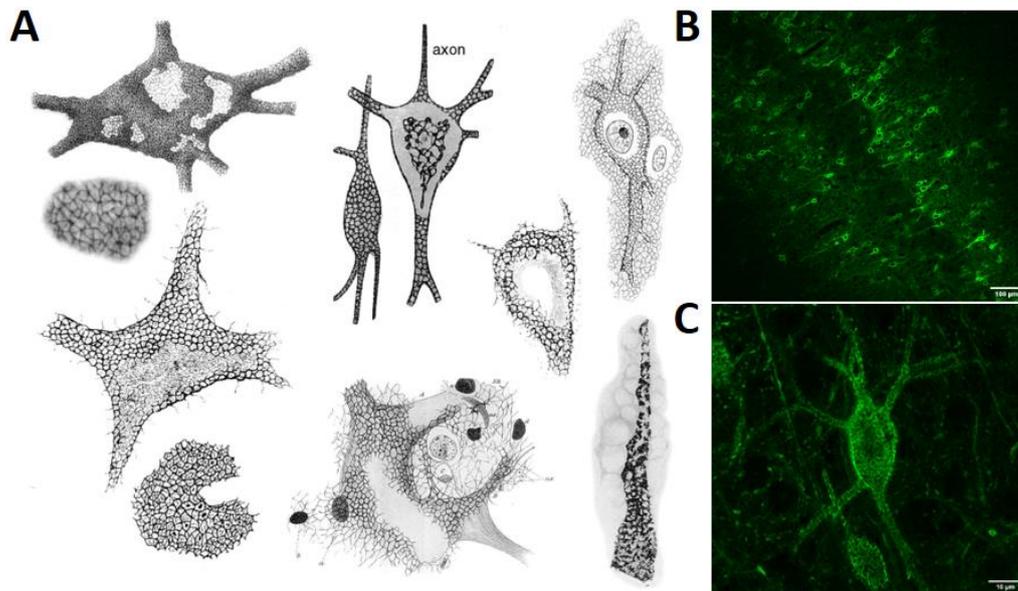


Figure 28: Représentations des PNNs au cours du temps.

(A) Illustrations des PNNs par différents auteurs au cours du dernier siècle (D'après Célio *et al.*, 1998). (B) Marquage des PNNs par la lectine *Wisteria Floribunda* (WFA) au niveau du cortex somatosensoriel chez la souris. (C) Représentation 3D d'un PNNs du cortex révélé par la WFA.

II. Généralités

Les PNNs sont retrouvés au niveau de différentes structures cérébrales et peuvent être associés à différents sous-types neuronaux. L'utilisation d'une lectine, la Wisteria Floribunda Agglutinin (WFA), se liant aux chaînes de sucre des PNNs a révélé que ces structures étaient majoritairement retrouvées autour des interneurons exprimant la parvalbumine dits à décharge rapide (en anglais : *fast-spiking parvalbumin*, FS-PV) au niveau des régions corticales (Shinji Miyata *et al.*, 2018). Les PNNs peuvent également entourer les neurones excitateurs au niveau de régions sous-corticales telles que l'hippocampe et l'amygdale basolatérale et sont présents autour des motoneurons dans la moelle épinière. Une caractérisation détaillée des différentes sous-populations neuronales associées aux PNNs au sein des différentes régions cérébrales est détaillée dans le Tableau 1.

Régions cérébrales	Types de neurones	Localisation	Références
Cortex	Interneurones FS-PV, neurones pyramidaux et neurones exprimant de la calbindine.	Cortex somatosensoriel, visuel, moteur, entorhinal et auditif.	(Lensjø, Christensen, et al. 2017; G. Brückner et al. 1999; Rossier et al. 2015; Mueller et al. 2016)
Hippocampe	Neurones pyramidaux et interneurons PV.	CA1, CA2, CA3 et gyrus denté.	(Yamada, Ohgomori, and Jinno 2015; Lensjø, Christensen, et al. 2017)
Amygdale	Interneurones PV, neurones excitateurs CamKII positifs et neurones exprimant de la calbindine.	Noyau basal et latéral.	(Wolfgang et al. 1995; Morikawa et al. 2017)
Thalamus	Interneurones PV + sous-population non identifiée.	Noyau latéral géniculé ventral.	(Sabbagh et al. 2019)
Hypothalamus	Interneurones PV.	Noyau latéral hypothalamique.	(Blacktop, Todd, and Sorg 2017; Horii-hayashi, Sasagawa, and Nishi 2016)
Cervelet	Cellules de Golgi, cellules de Purkinje et neurones excitateurs.	Cortex cérébelleux et noyau cérébelleux profond.	(Mabuchi et al. 2001; Carulli et al. 2006; Mueller et al. 2016)
Moelle épinière	Motoneurons.	Corne ventrale et dorsale.	(Lander et al. 1997; Lemarchant, Pomeschik, et al. 2016; Mueller et al. 2016)

Tableau 1: Tableau récapitulatif des différents sous-types neuronaux entourés de PNNs dans les différentes régions cérébrales.

III. Structure des PNNS

Les réseaux périneuronaux des structures condensées de la matrice extracellulaire entourent le soma, la partie proximale des dendrites et, dans certains cas, le segment proximal des axones. Les PNNS sont composés d'un squelette d'acide hyaluronique sur lequel sont liés différents CSPGs grâce à des protéines de liaison. L'ensemble de cette structure est également maintenue par des tenascines qui permettent de relier les différents CSPGs au niveau de leur extrémité C-terminale (Fawcett *et al.*, 2019; Testa *et al.*, 2019) (Figure 29).

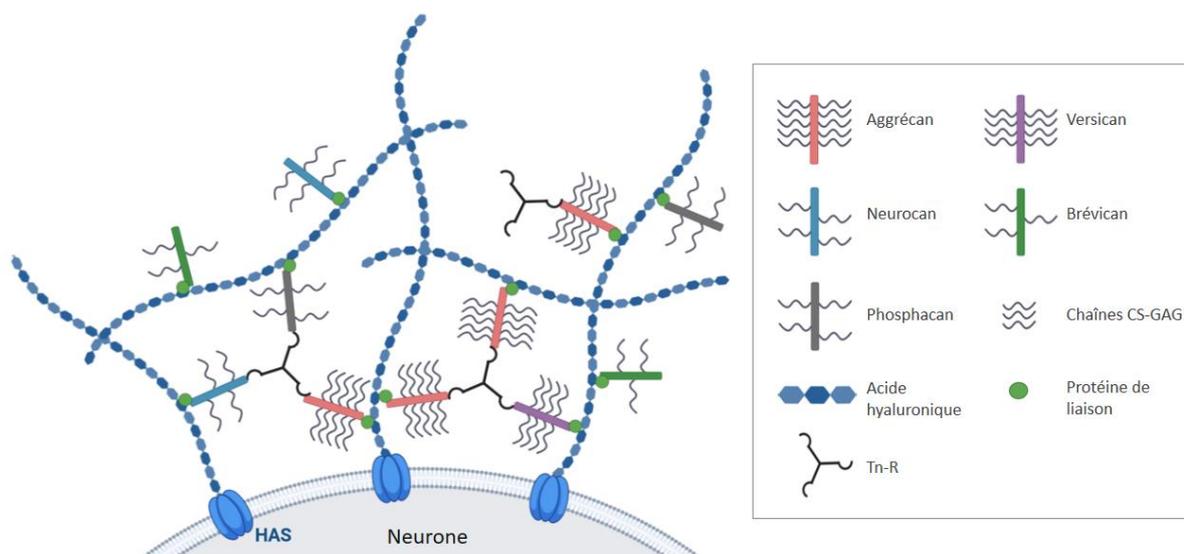


Figure 29: Représentation schématique de la structure des PNNS.

L'acide hyaluronique, synthétisé par les hyaluronane synthases (HAS) constitue le squelette des PNNS sur lesquels sont fixés les différents CSPGs (brévican, neurocan, versican, aggrécan et phosphacan) par des protéines de liaisons. Les différents CSPGs sont reliés entre eux par les tenascines-R (Tn-R) permettant la condensation des PNNS (D'après Fawcett *et al.*, 2019 et Testa *et al.*, 2019).

1- L'acide hyaluronique

L'acide hyaluronique (en anglais : *hyaluronique acid*, HA) est un polymère de glycosaminoglycanes (GAG) comportant pas de corps protéique et comprenant des répétitions de disaccharides GlcA-GlcNAc (acide glucuronique + N-acétyl-glucosamine) non sulfatés. L'HA constitue le squelette des réseaux périneuronaux. Il est synthétisé directement dans le compartiment extracellulaire par les Hyaluronan synthase (HAS) présentes à la membrane des neurones. Il existe trois isoformes de HAS (HAS1, HAS2 et HAS3) qui présentent des propriétés de synthèse différentes et qui sont exprimées différemment en fonction des régions cérébrales et au niveau subcellulaire. Ainsi, seule HAS1 va être responsable de la synthèse d'acide hyaluronique au niveau de l'axone (Bosiacki *et al.*, 2019).

2- Les chondroitines sulfate protéoglycanes (CSPGs)

Les CSPGs sont formés d'un corps protéique, sur lequel sont rattachés des glycosaminoglycanes sulfatés (CS-GAG) composés de motifs disaccharides GlcA-GlcNAc. Parmi les CSPGs exprimés au sein des PNNs on retrouve les protéines de la famille des lecticans (l'aggrécan, le neurocan, le brévican et le versican) et le phosphacan. Le corps protéique des CSPGs comprend un ou deux domaines globulaires (G1 et G2) au niveau N-terminal et un domaine globulaire G3 au niveau C-terminal. Le domaine G1 interagit avec les protéines de liaison HPLN (en anglais : *hyaluronan- and proteoglycan-binding link proteins*) et permet la liaison du corps protéique avec l'acide hyaluronique (Avram *et al.*, 2014). Le domaine G3 favorise la condensation des PNNs en se liant avec les ténascines R et C (Tn-R et Tn-C). Les chaînes GAG peuvent présenter différents profils de sulfatation au niveau des carbones GlcA et GlcNAc (Figure 30). La proportion de chaque sous-type de sulfatation varie au cours du développement et l'augmentation du ratio de sulfatation 4S/6S favorise la formation des PNNs (Dyck and Karimi-Abdolrezaee, 2015; Kwok *et al.*, 2011). De plus, la forme 4S/6S permet la liaison aux protéines l'homéoprotéine Otx2 (en anglais : *orthodenticle homeobox 2*) et sémaphorine 3A, deux molécules impliquées respectivement dans la maturation et les propriétés inhibitrices des PNNs (De Winter *et al.*, 2016; Sugiyama *et al.*, 2008).

- Aggrécan

L'aggrécan est le seul CSPG de la famille des lecticans à posséder un domaine G2, il peut également arborer des chaînes de kératane sulfate (KS-GAG). Le corps protéique d'aggrécan a une masse molaire d'environ 250 kDa mais la masse molaire de la protéine complète peut atteindre 2.5 MDa avec l'ensemble des chaînes GAG (Aspberg, 2012). En effet, la forme complète d'aggrécan peut comporter jusqu'à une centaine de chaînes CS-GAG et une trentaine de chaînes KS-GAG. L'aggrécan est exprimé tardivement au cours du développement. Il apparaît que son expression est augmentée en post-natal et coïncide avec la maturation des neurones (Matthews *et al.*, 2002).

Il est majoritairement exprimé par les interneurones exprimant la parvalbumine et son expression varie en fonction des régions cérébrales (Ueno *et al.*, 2017, 2018). Ainsi, il est fortement exprimé dans le cortex somatosensoriel et le noyau réticulaire du thalamus tandis que son expression est moindre dans les cortex préfrontal et entorhinal, deux régions hautement plastiques chez l'adulte.

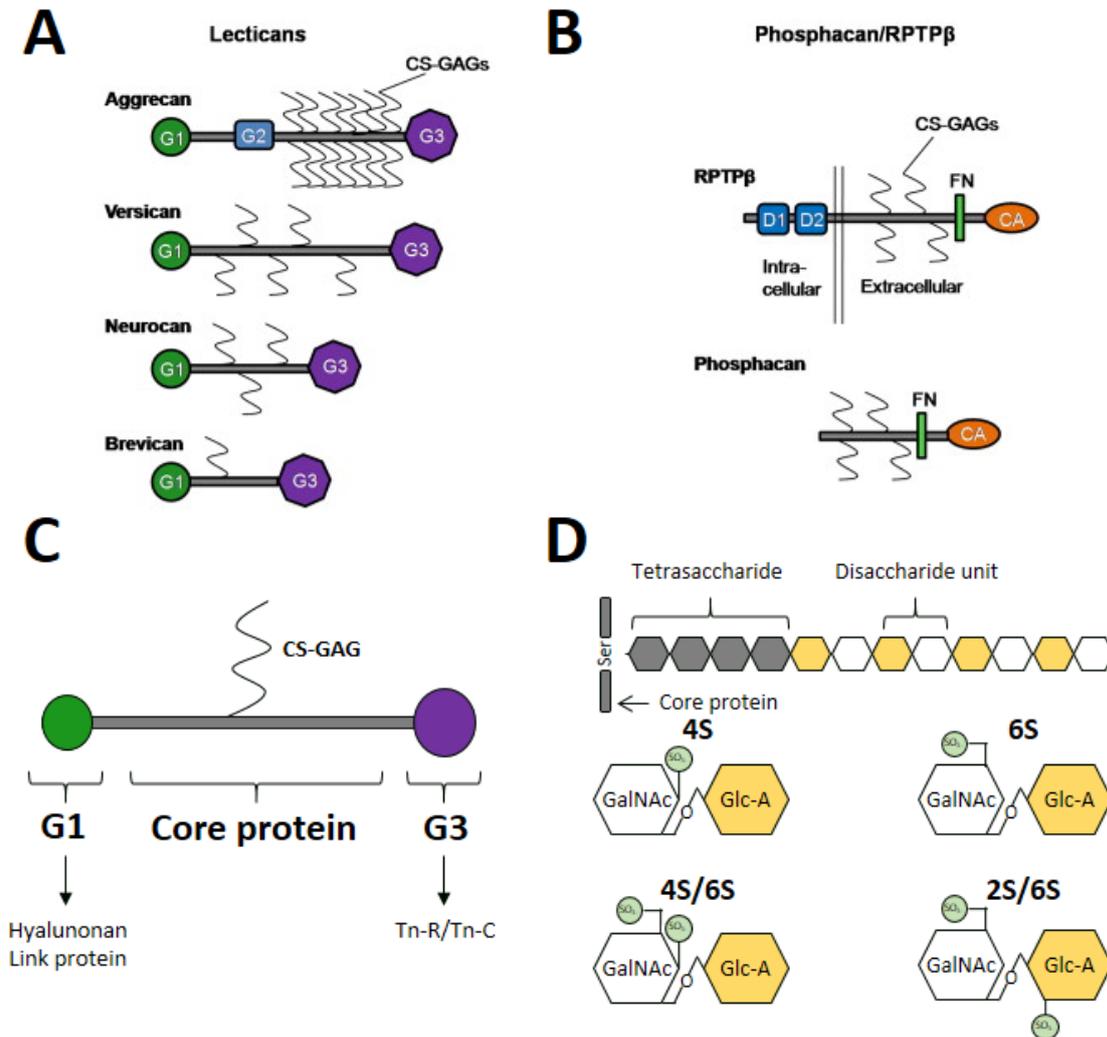


Figure 30: Représentation des différents CSPGs et de leurs sulfatations.

(A, C) Les différents lecticans et leurs domaines globulaires G1 et G3, permettant l'interaction avec l'acide hyaluronique et les ténascines. (B) Représentation de phosphacan et de sa forme transmembranaire RPTPβ comprenant les domaines anhydrase carbonique (CA) et fibronectine (FN). (D) Schéma des différents profils de sulfatation des CSPGs (Adapté de Dyck *et al.*, 2015)

L'aggrécane semble également être un élément important lors de la mise en place des PNNs, effectivement son expression est augmentée dans les neurones lors de la formation des PNNs et des études *in vitro* ont montré une altération de la mise en place des PNNs dans des neurones déficients en aggrécane (Carulli *et al.*, 2007; Giamanco *et al.*, 2010). De plus, Rowlands et collaborateurs ont récemment montré *in vivo* que la délétion de l'aggrécane dans le cortex visuel chez l'adulte induisait une déconstruction du réseau périneuronal et était associé à une augmentation de la plasticité des neurones.

De manière intéressante, la délétion globale de l'aggrécane dans le cerveau adulte permet également d'augmenter les performances mnésiques des animaux (Rowlands *et al.*, 2018). Par ailleurs,

Yu et collaborateurs ont montré que l'expression de l'aggrécan était réduite dans un modèle de stress chronique chez le rat et était associée à des phénotypes de type dépressifs (Z. Yu *et al.*, 2020). L'ensemble de ces données suggère un rôle majeur de l'aggrécan dans la mise en place et la stabilité des réseaux périneuronaux.

- **Brévican**

Le brévican est le plus petit CSPG de la famille des lecticans, avec un corps protéique compris entre 85/145 kDa et seulement trois chaînes CS-GAG. Le brévican est présent sous deux isoformes obtenus après épissage alternatif : une forme sécrétée et une forme ancrée à la membrane par le glycolipide GPI (glycosylphosphatidylinositol) (Seidenbecher *et al.*, 1995).

Le brévican est retrouvé spécifiquement dans le SNC où il est sous ses deux isoformes, la forme ancrée à la membrane est majoritairement exprimée par les astrocytes tandis que sa forme sécrétée serait préférentiellement produite par les neurones (Seidenbecher *et al.*, 1998). De plus, les deux isoformes sont exprimées différemment en fonction des régions cérébrales. En effet, la forme sécrétée est exprimée précocement en post-natal dans le cortex, l'hippocampe, le thalamus et le cervelet alors que la forme ancrée à la membrane est détectée plus tardivement et localisée dans les tractus de fibres au niveau du corps calleux, de l'hippocampe et du cervelet (Seidenbecher *et al.*, 1995).

L'utilisation de souris déficientes en brévican n'a pas révélé de modification de la structure des PNNs. En revanche, sa délétion induit une perturbation de la LTP et peut induire des déficits de mémoire à court terme et long terme (Brakebusch *et al.*, 2002; Favuzzi *et al.*, 2017; A Suttikus *et al.*, 2014).

- **Neurocan**

Au même titre que le brévican, le neurocan est exprimé exclusivement dans le SNC. Il est synthétisé sous une forme complète de 250kDa puis est clivé lors du développement en deux fragments de 130 kDa et 150 kDa respectivement en N-terminal et C-terminal. L'expression du neurocan apparaît très tôt au cours du développement embryonnaire où il est fortement exprimé dans la zone ventriculaire et l'éminence ganglionnaire, deux aires où prolifèrent les progéniteurs neuronaux. En post-natal, le neurocan est retrouvé au niveau du cortex, du cervelet, de l'hippocampe et des noyaux thalamiques (Cichon *et al.*, 2011; Engel *et al.*, 1996).

La synthèse du neurocan est assurée par les neurones, les astrocytes et les précurseurs d'oligodendrocytes (Asher *et al.*, 2000; Oohira *et al.*, 1994). La forme N-terminale du neurocan est retrouvée au sein des PNNs et également de façon diffuse dans la MEC tandis que la forme C-terminale est absente dans les PNNs (Matsui *et al.*, 1998). L'absence de neurocan ne semble pas affecter la morphologie des PNNs au niveau du cortex adulte (Zhou *et al.*, 2001). Cependant, Schmidt et

collaborateurs ont montré que sa délétion modifie l'expression d'autres composants des PNNs tels que le brévican et la protéine de liaison HAPLN1 (en anglais : *hyaluronan and proteoglycan link protein*) au cours du développement au niveau du tronc cérébral (Schmidt *et al.*, 2020).

Des mesures électrophysiologiques ont mis en évidence des délais de transmission augmentés ainsi qu'une altération de la phase tardive de la LTP chez les souris déficientes en neurocan (Schmidt *et al.*, 2020; Zhou *et al.*, 2001). La contribution du neurocan dans la neurotransmission pourrait être dépendante de son interaction avec la molécule d'adhésion cellulaire NCAM (en anglais : *Neural cell adhesion molecule*) permettant la stabilisation des synapses entre les interneurons PV et les neurones pyramidaux (Sullivan *et al.*, 2018). De manière intéressante, l'expression du neurocan et le nombre de PNNs est réduit au niveau du cortex prélimbique chez des rats soumis à un stress chronique présentant des troubles de type dépressifs (Z. Yu *et al.*, 2020).

- Versican

Le versican comprend deux régions d'attachement aux CS-GAG appelés domaines GAG α et GAG β . Il est exprimé sous cinq isoformes obtenues par épissage alternatif : une forme V0 comprenant les domaines GAG α et GAG β , une forme V1 qui ne contient que le domaine GAG β , une forme V2 qui contient uniquement le domaine GAG α , une forme V4 contenant un domaine GAG β tronqué et enfin une forme V3 exempt de domaines de liaison aux CS-GAG (Nandadasa *et al.*, 2014).

Les isoformes V0 et V1 sont majoritairement exprimées aux stades embryonnaires au niveau de la sous-plaque du cortex, de l'amygdale et de l'hippocampe puis diminuent en post-natal au profit de l'isoforme V2 (Milev *et al.*, 1998; Popp *et al.*, 2003; Zimmermann and Dours-Zimmermann, 2008). Cette dernière isoforme est retrouvée au sein des PNNs chez l'adulte (Carulli *et al.*, 2006; Deepa *et al.*, 2006). L'expression du versican est permise par les oligodendrocytes ainsi que les progéniteurs neuronaux et astrocytaires (Asher *et al.*, 2002; Gu *et al.*, 2007; Schmalfeldt *et al.*, 2000). Le rôle du versican au sein des réseaux périneuronaux reste peu connu. Une étude suggère cependant que le domaine G3 du versican pourrait être libéré suite à un clivage protéolytique et augmenter la croissance neuritique et la transmission synaptique (Xiang *et al.*, 2006).

- Phosphacan

Le phosphacan est un variant d'épissage du récepteur à activité tyrosine phosphatase β (en anglais : *receptor protein tyrosin phosphatase beta*, RPTP β). Il comprend un domaine anhydrase carbonique, un domaine fibronectine de type III et un domaine d'attachement des chaînes CS-GAG séparé du domaine fibronectine par un domaine *spacer*. Il existe également un autre variant du phosphacan, le Phosphacan-KS dont le domaine d'attachement aux chaînes CS-GAG est tronqué et qui comprend un domaine d'attachement aux chaînes KS-GAG.

Comme les lecticans, le phosphacan peut interagir avec les tenascines impliquées dans la condensation des PNNs (Novak and Kaye, 2000; Zimmermann and Dours-Zimmermann, 2008). Le phosphacan est exprimé au cours du développement embryonnaire dans de nombreuses régions cérébrales telles que la zone ventriculaire et la plaque corticale mais également l'éminence ganglionnaire et l'hypothalamus (Engel *et al.*, 1996; Meyer-Puttlitz *et al.*, 1996). Dans le SNC, il peut être synthétisé par les neurones, les astrocytes et les oligodendrocytes (Dobbertin *et al.*, 2003; Hayashi *et al.*, 2005). Le phosphacan est retrouvé au sein de la structure des PNNs. Par ailleurs, les travaux de Eil et collaborateurs ont montré que la délétion de l'isoforme zeta du récepteur RPTP altère la formation des PNNs autour des neurones mais peut être restaurée par l'ajout de phosphacan (Eil *et al.*, 2020).

3- Les Ténascines

Les ténascines appartiennent à une famille de 5 glycoprotéines : la ténascine-C, la ténascine-R, la ténascine-X, la ténascine W et la ténascine-Y codées par au moins quatre gènes différents. Les ténascines -C et -R sont les plus représentées dans la SNC et seule la ténascine-R est retrouvée au sein des PNNs. La structure des ténascines se compose d'un domaine N-terminal riche en cystéine, un domaine répété similaire à l'EGF, un domaine répété fibronectine de type III et enfin un domaine globulaire similaire au fibrinogène.

Ces structures monomériques peuvent ensuite s'assembler au niveau de leur domaine N-terminal pour former des homo-trimères (forme R) ou des homo-hexamères (formes C et W). La liaison des domaines fibronectine de la ténascine-R avec les domaines G3 des CSPGs permet la condensation des réseaux périneuronaux (F. S. Jones and Jones, 2000; Kwok *et al.*, 2011). L'expression de la ténascine-R est retrouvée au niveau de structures ventrales telles que le néo-striatum, les bulbes olfactifs ou les ganglions de la base dans le cerveau embryonnaire (Derr *et al.*, 1998). Les ARN messagers codant pour la ténascine-R ont été détectés à la fois dans les neurones et les cellules gliales en post-natal et chez l'adulte (Galtrey *et al.*, 2008). L'utilisation de souris déficientes en ténascine-R a permis de mettre en évidence un rôle majeur de cette protéine dans la formation et la maturation des PNNs (Morawski *et al.*, 2014; A Suttkus *et al.*, 2014).

4- Les protéines de liaisons

Les protéines de liaison à l'acide hyaluronique et aux protéoglycanes (HAPLN) aussi appelée Bra (en anglais : *brain-specific hyaluronan-binding protein*) permettent la liaison des CSPGs aux chaînes d'acide hyaluronique. Leur structure comprend une séquence signal en N-terminal, un domaine immunoglobuline et deux modules de liaisons consécutifs liant l'HA. Les protéines Hapln1, Hapln2 et

Hapln4 sont retrouvées dans le SNC mais seules Hapln1 et Hapln4 sont associées aux PNNs (Kwok *et al.*, 2011).

Dans le cortex visuel, l'expression de Hapln1 connaît un pic vers P15 puis diminue à l'âge adulte tandis que Hapln4 voit son expression augmenter progressivement en post-natal pour atteindre un plateau à l'âge adulte (Carulli *et al.*, 2010). L'expression d'Hapln1 et Hapln4 est restreinte aux neurones alors que Hapln2 semble pouvoir être exprimé par à la fois par les oligodendrocytes et les neurones (Carulli *et al.*, 2006; Galtrey *et al.*, 2008; Oohashi *et al.*, 2002). Au niveau du cortex, l'immunodétection d'Hapln1 coïncide avec la mise en place des PNNs et semble indispensable à leur formation (Carulli *et al.*, 2007; A Suttkus *et al.*, 2014). Finalement, l'altération des PNNs observée chez des animaux déficients pour Hapln1 et Hapln4 est accompagnée par une augmentation de la plasticité neuronale chez l'adulte suggérant un rôle primordial de ces protéines au sein des PNNs dans la stabilisation synaptique (Bekku *et al.*, 2012; Carulli *et al.*, 2010).

IV. Mise en place des PNNs dans le développement cérébral

La mise en place des PNNs a lieu en post-natal. Elle débute vers P14 et se termine vers P56 dans le cortex somatosensoriel tandis qu'elle débute entre P10 et P14 et s'achève vers P42 dans le cortex visuel (Ueno *et al.*, 2017; Ye and Miao, 2013). De manière intéressante, plusieurs études ont démontré que le développement des PNNs était dépendant de l'expérience. En effet, une privation sensorielle par résection des vibrisses dès P2 est responsable d'une diminution de la condensation du marquage WFA et l'aggrecan (marqué Cat-135) autour du soma des neurones ainsi que d'une réduction de la densité des PNNs co-marqués WFA/Cat-135 au niveau de la couche IV (Ueno *et al.*, 2017). De manière similaire, l'élevage des animaux dans l'obscurité induit un retard de formation des PNNs, détectés avec la lectine WFA, dans l'aire V1 du cortex visuel (Ye and Miao, 2013). L'utilisation d'un environnement enrichi permet cependant de prévenir le retard de formation des PNNs et les déficits d'acuité visuelle chez les animaux élevés dans l'obscurité (Bartoletti *et al.*, 2004).

La maturation complète des PNNs coïncide avec la clôture d'une phase de haute plasticité appelée période critique. Cette dernière correspond à un intervalle de temps durant lequel la plasticité synaptique va être particulièrement augmentée et susceptible d'être influencée par des stimuli environnementaux. Plusieurs périodes critiques existent selon les régions cérébrales mais la période critique a été majoritairement étudiée au niveau du cortex visuel grâce à des modèles de privation monoculaire (en anglais : *monocular deprivation*, MD).

Les travaux de Hubel et Wiesel ont permis de montrer l'existence de périodes critiques dans le cortex visuel par la mesure de la dominance oculaire suite à une privation sensorielle visuelle. La dominance oculaire, qui correspond à la capacité des neurones du cortex visuel à être activés en

réponse aux informations provenant de l'œil ipsilatéral ou controlatéral est décalée en faveur de l'œil ipsilatéral resté ouvert lorsque la MD est réalisée pendant la période critique. Ce décalage de la dominance oculaire n'est cependant pas retrouvé lorsque la MD est effectuée chez à l'âge adulte suggérant l'existence d'une période de haute plasticité au cours du développement (Wiesel and Hubel, 1965).

Les travaux de Pizzorusso et collaborateurs ont permis de montrer que cette plasticité pouvait être réinstaurée chez l'adulte en dégradant les réseaux périneuronaux. En effet, l'élimination des chaînes CS-GAG des PNNs par la chondroïtinase ABC (ChABC), injectée au niveau du cortex visuel, permet de rétablir la plasticité de la dominance oculaire chez le rat adulte après MD (Pizzorusso *et al.*, 2002) (Figure 31). La modulation des PNNs constitue donc une piste prometteuse dans le rétablissement de la plasticité cérébrale chez l'adulte notamment dans les pathologies neurologiques et neurodégénératives.

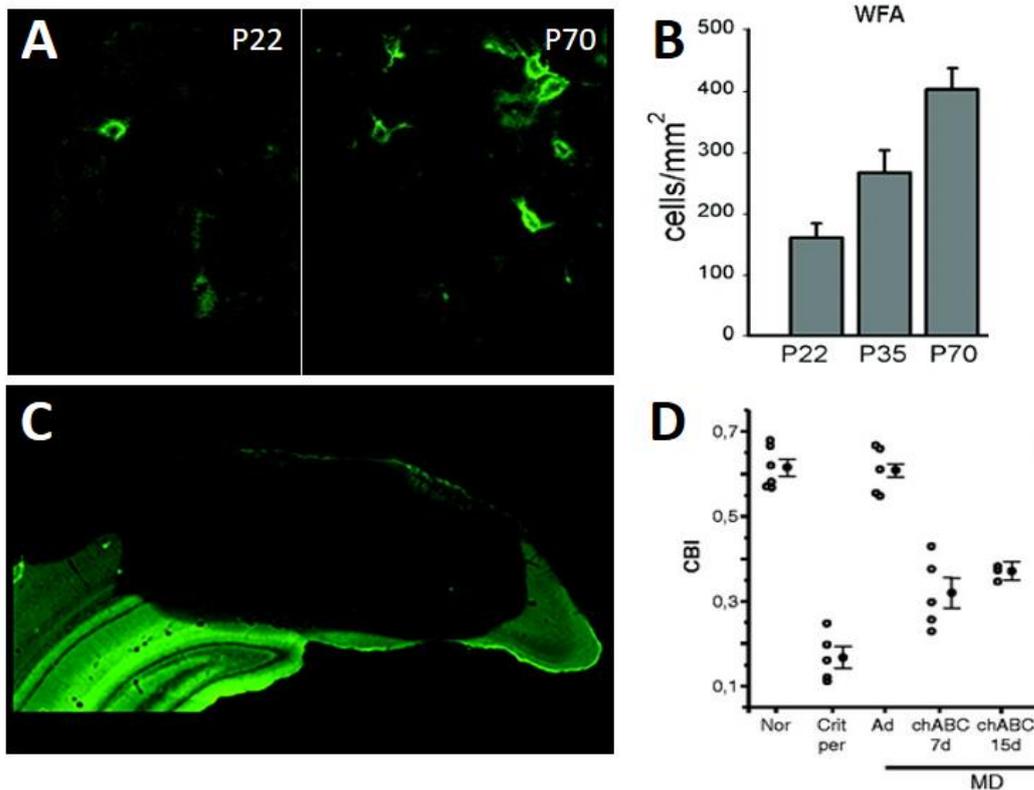


Figure 31: La dégradation des PNNs chez l'adulte permet de restaurer la plasticité de la dominance oculaire. (A-B) Les PNNs (marqués par la WFA) sont peu nombreux lors de la période critique (P22) et se développent progressivement jusqu'à l'âge adulte (P70). (C) L'injection de chondroitinase ABC dans le cortex visuel chez le rat adulte permet de dégrader les PNNs. (D) La dominance oculaire pour l'œil controlatéral est donnée par le CBI (en anglais : controlateral bias index) pour lequel un ratio de 0 correspond une dominance complète pour l'œil ipsilatéral et 1 pour l'œil controlatéral). La privation monoculaire lors de la période critique (Crit per) induit un décalage de la dominance oculaire en faveur de l'œil ipsilatéral tandis que ce décalage n'est pas retrouvé lorsque la MD est réalisé chez l'adulte (Ad). L'injection de ChABC chez l'adulte permet de restaurer la plasticité de la dominance oculaire après MD (chABC 7d, ChABC 15d) (Adapté de Pizzorusso *et al.*, 2002).

V. Fonctions des PNNs

Différentes approches expérimentales peuvent être utilisées pour étudier le rôle des PNNs dans le cerveau adulte. Une première consiste à la dégrader des chaînes CS-GAG des CSPGs par l'injection *in situ* de ChABC. Cette dernière n'altère pas le corps protéique des CSPGs. Une autre stratégie consiste à la dégrader l'acide hyaluronique par la hyaluronidase (H-ase) et permet d'éliminer l'ensemble des composants des PNNs. Finalement, le développement de modèles transgéniques permet d'étudier la contribution des différents composants du réseau périneuronale dans les fonctions associées aux PNNs.

1- PNNS et homéostasie ionique

Les propriétés polyanioniques des CSPGs et de l'acide hyaluronique composant les PNNS permettent à ces structures de tamponner les cations présents au niveau extracellulaire (Brückner *et al.*, 1993). La concentration de cations au sein des PNNS tels que le sodium, le potassium et le calcium dans le microenvironnement neuronal pourrait alors contribuer à l'excitabilité des cellules. Cette particularité permettrait alors de faciliter la décharge rapide des interneurons PV entourés par les PNNS. Parallèlement, les composants polyanioniques des PNNS pourraient interagir avec les cations générés lors d'un stress oxydatif et jouer un rôle neuroprotecteur (Anne Suttikus *et al.*, 2012).

2- PNNS et plasticité

De nombreuses études ont suggéré l'implication des PNNS dans la stabilisation des connexions synaptiques chez l'adulte. Ces structures forment, en effet, une barrière physique autour des neurones limitant la plasticité structurelle des circuits neuronaux. Le rôle inhibiteur des PNNS sur le remodelage des circuits neuronaux a notamment été observé au niveau du cervelet. En outre, l'injection intraparenchymateuse de ChABC augmente la croissance neuritique des cellules de Purkinje (Corvetti and Rossi, 2005). La dégradation des PNNS par la H-ase ou la ChABC augmente également la synaptogénèse au cours du développement (Pyka *et al.*, 2011) et la mobilité des épines dendritiques dans le cerveau adulte (De Vivo *et al.*, 2013; Orlando *et al.*, 2012).

Au niveau synaptique, les PNNS vont également pouvoir jouer un rôle dans la stabilisation des récepteurs à la membrane. En effet, la dégradation des PNNS *in vitro* par la H-ase augmente la dynamique des récepteurs AMPA et la plasticité synaptique à court terme dans un modèle de culture de neurones hippocampiques (Frischknecht *et al.*, 2009). Au niveau des régions corticales, les PNNS sont principalement retrouvés autour des interneurons GABAergiques exprimant la parvalbumine. Il a récemment été démontré que le brévican module l'excitabilité de ces neurones en favorisant la localisation des récepteurs AMPA et des canaux potassiques au niveau de la synapse (Favuzzi *et al.*, 2017).

D'autres études suggèrent également que les PNNS permettraient de réguler la plasticité synaptique à long terme. Cependant, de nombreuses études montrent des résultats contradictoires. En effet, la dégradation des PNNS présents autour des neurones pyramidaux dans l'aire CA2 de l'hippocampe permet l'induction de la LTP dans ces neurones, normalement résistants en condition basale (Carstens *et al.*, 2016). A l'inverse, la dégradation des PNNS diminue la LTP dans l'aire de CA1 en augmentant la transmission GABAergique. Par ailleurs, l'utilisation de picrotoxine (un antagoniste des récepteurs GABA-A) permet de restaurer les déficits de LTP sur des tranches organotypiques traitées à la ChABC (Shi *et al.*, 2019) (Figure 32). Ces résultats sont cohérents avec les travaux de

Dityatev et collaborateurs qui montrent que la dégradation des PNNs augmente l'excitabilité des interneurons GABAergiques dans un modèle de culture primaire d'hippocampe (Dityatev *et al.*, 2007).

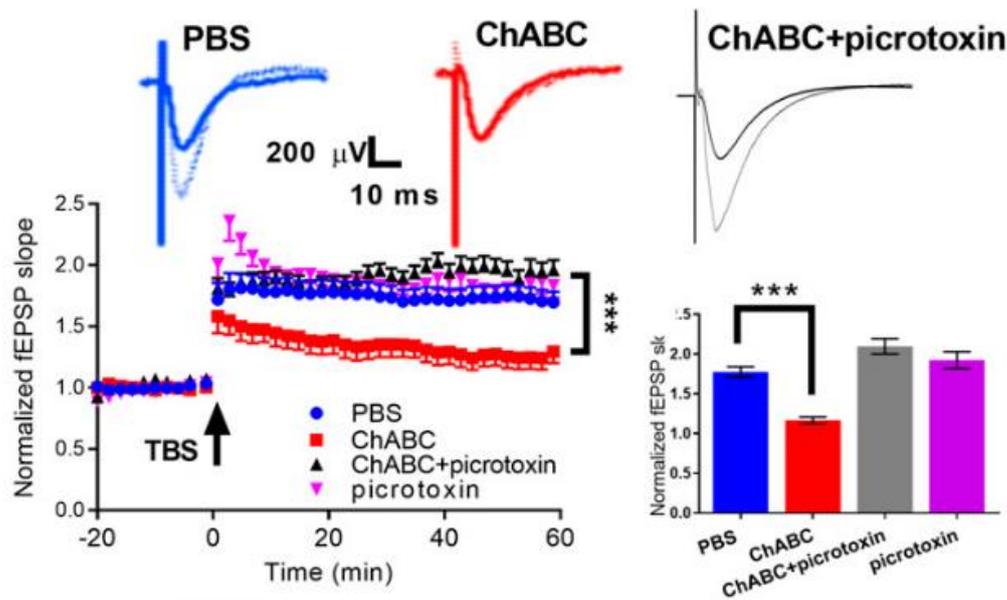


Figure 32: La dégradation des PNNs affecte la plasticité synaptique hippocampique.

L'application de ChABC sur des tranches organotypiques d'hippocampe empêche le maintien de la LTP au niveau de CA-1 en réponse à une stimulation de type «theta-burst». L'utilisation de picROTOXINE d'un antagoniste des récepteurs GABA-A permet de restaurer les déficits de LTP.

A l'inverse, l'application de chondroïtinase sur des tranches organotypiques de cortex réduit la fréquence des décharges des interneurons PV (Balmer, 2016). De même, la dégradation des PNNs au niveau du cortex visuel diminue l'activité des interneurons et augmente la variabilité de décharges à la fois des neurones excitateurs et inhibiteurs (Lensjø *et al.*, 2017). Dans le cortex préfrontal, la dégradation des PNNs diminue la fréquence des courants inhibiteurs dans les cellules pyramidales (Slaker *et al.*, 2015). L'hétérogénéité des résultats obtenus sur l'activité des neurones excitateurs et inhibiteurs et la potentialisation à long terme suite à la dégradation des PNNs dépend vraisemblablement des réseaux neuronaux engagés au sein des régions cérébrales étudiées.

3- PNNs et processus cognitifs

L'implication des PNNs dans la plasticité synaptique chez l'adulte et leur localisation au sein de différentes régions cérébrales suggèrent un rôle important de ces structures de la MEC dans la régulation des processus cognitifs tels que l'apprentissage et la mémoire.

Les PNNs sont retrouvés dans les régions limbiques et joueraient notamment un rôle dans la persistance de la mémoire émotionnelle (Gogolla *et al.*, 2009; Hylén *et al.*, 2013; Shi *et al.*, 2019). Au

niveau de l'amygdale basolatérale, la formation des PNNs coïncide avec la diminution des capacités d'extinction de la peur conditionnée des animaux. Par ailleurs, l'injection de ChABC au niveau de cette structure augmente l'extinction d'une mémoire de peur conditionnée par rapport aux animaux contrôles (Gogolla *et al.*, 2009). De manière intéressante, le nombre de PNNs augmente dans le cortex auditif dans les heures suivant une peur conditionnée induite par un stimulus conditionnel sonore. De plus, la dégradation des PNNs dans le cortex auditif diminue l'apprentissage et la consolidation de la peur conditionnée auditive (Banerjee *et al.*, 2017). Similairement, la déplétion des PNNs dans le cortex visuel secondaire V2 diminue la mémoire émotionnelle à long terme dans un protocole de peur conditionnée à un stimulus visuel (Thompson *et al.*, 2018).

Les PNNs présents au niveau de l'aire CA1 de l'hippocampe et du cortex cingulaire antérieur (en anglais : *anterior cingular cortex*, ACC) préserveraient également la mémoire contextuelle. Il a, par exemple, été rapporté une augmentation du nombre d'interneurones entourés de PNNs dans CA1 et l'ACC suite au rappel de peur conditionnée contextuelle. La déplétion des PNNs dans ces régions avant l'association entre un stimulus inconditionnel et un stimulus conditionnel (le contexte) diminue le temps d'immobilisation lors du premier rappel au contexte. Selon cette étude, l'activité des interneurones PV entourée par des PNNs permettrait de réguler les oscillations theta au niveau de l'hippocampe, un rythme oscillatoire impliqué dans les processus d'apprentissage et de mémorisation (Shi *et al.*, 2019). Finalement, les travaux de Hylín et collaborateurs ont montré que la déplétion des PNNs par la H-ase et la ChABC au niveau de l'hippocampe induit un déficit de mémoire de peur lors du rappel au contexte tandis que leur suppression au niveau du cortex préfrontal médian induit un déficit de mémoire lors du rappel au son (Hylín *et al.*, 2013).

Des résultats contradictoires ont été rapportés concernant le rôle des PNNs dans la mémoire de travail et la mémoire épisodique et peuvent s'expliquer par la diversité des modèles (transgéniques par rapport à la dégradation enzymatique des PNNs) ainsi que des protocoles utilisés. Les souris déficientes en brévican, présentent, par exemple, des déficits de mémoire à court terme dans un test de reconnaissance de place en labyrinthe en Y ainsi que dans un test de reconnaissance d'objets. La mémoire à long terme ne semble cependant pas être affectée chez ces animaux (Favuzzi *et al.*, 2017). A l'inverse, Rowlands et collaborateurs ont mis en évidence une augmentation des performances mnésiques mesurées grâce à un test de reconnaissance d'objets chez des souris déficientes en aggrécane au niveau cérébral (Rowlands *et al.*, 2018).

Les souris déficientes en Hapln1 présentent également des capacités mnésiques plus importantes que leurs homologues sauvages dans un test de reconnaissance d'objet en labyrinthe en Y (Romberg *et al.*, 2013). Romberg et collaborateurs ont également montré que la dégradation enzymatique des PNNs au niveau du cortex périrhinal améliore la mémoire à long terme chez des souris WT (Figure 33) (Romberg *et al.*, 2013). Deux ans plus tard, cette même équipe a montré que la

déplétion des PNNs dans le cortex périrhinal permet de rétablir les performances mnésiques dans un modèle murin de la maladie d'Alzheimer comparées au groupe sain (Yang *et al.*, 2015).

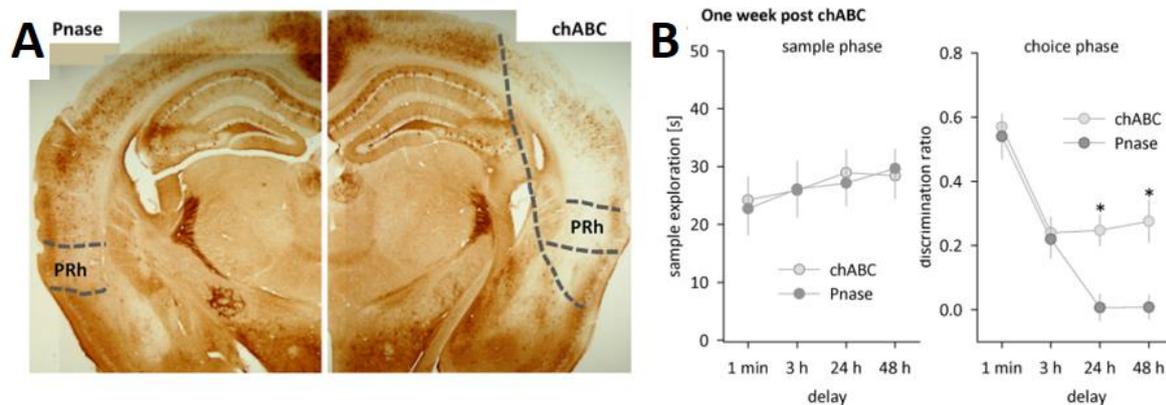


Figure 33: La déplétion des PNNs au niveau du cortex perirhinal améliore la mémoire à long terme dans un test de reconnaissance d'objets.

(A) L'injection de ChABC dans le cortex perirhinal permet de réduire le nombre de PNNs marqués par la WFA chez la souris adulte tandis que l'injection d'une enzyme bactérienne contrôle, la penicillinase (Pnase) n'affecte pas la densité des PNNs. (B) L'exploration des objets est similaire entre les groupes chABC et Pnase. Le ratio de discrimination est augmenté chez les animaux traités à la ChABC lorsque les tests de rappels sont réalisés à 24h et 48h (Romberg *et al.*, 2013).

Finalement, la modulation des PNNs dans le cerveau adulte pourrait contribuer à la flexibilité cognitive nécessaire à l'apprentissage de nouvelles informations. En effet, les souris déficientes en tenacine-R apprennent plus rapidement à localiser la plateforme lors d'un test d'inversion de position en piscine de Morris (Morellini *et al.*, 2010). De la même façon, la déplétion des PNNs au niveau du cortex auditif chez la gerbille augmente les capacités d'apprentissage lors de la session d'inversion dans un test d'évitement actif en réponse à un stimulus conditionné auditif (Happel *et al.*, 2014).

L'ensemble des données issues de la littérature suggèrent alors un rôle important des PNNs dans la stabilisation des réseaux neuronaux au cours du développement. En revanche, leur dégradation permet d'augmenter les capacités cognitives à l'âge adulte en facilitant l'apprentissage et la mémorisation mais également les processus d'extinction et de flexibilité.

4- PNNs et pathologies du SNC

Les rôles protecteurs ou délétères des PNNs et des CSPGs de façon plus générale ont été rapportés dans des modèles de lésions du SNC et dans des troubles neurologiques et neuropsychiatriques (Pantazopoulos and Berretta, 2016; Sorg *et al.*, 2016; Testa *et al.*, 2019).

Les CSPGs sont généralement associés à la cicatrice gliale après une lésion traumatique et joueraient un rôle inhibiteur dans la régénération axonale. Ainsi, il a été rapporté une augmentation

de l'expression des CSPGs le neurocan, le brevican et le versican après une lésion de la moelle épinière au niveau de la zone dénervée (Buss *et al.*, 2009; L. L. Jones *et al.*, 2003; Massey *et al.*, 2008). Dans un modèle animal de lésion spinale, l'injection de ChABC améliore la repousse axonale au niveau de la zone lésée après une transplantation neuronale (Massey *et al.*, 2008). De la même manière, il a été montré un effet bénéfique de l'injection de ChABC au niveau de la moelle épinière sur la récupération fonctionnelle après la réparation d'un nerf périphérique lésé (Galtrey *et al.*, 2007).

Une augmentation de l'expression des CSPGs le neurocan, le versican, le brevican, et l'aggrécane est également retrouvée dans les semaines suivant un AVC ischémique au niveau de la zone péri-lésionnelle corticale (Carmichael *et al.*, 2005). Une réduction du nombre de PNNs et du nombre d'interneurones exprimant la parvalbumine est observée précocement après un AVC au niveau du corps ischémique et de la zone péri-infarctée (Härtig *et al.*, 2017; Hobohm *et al.*, 2005).

D'autres travaux ont, par ailleurs, mis en évidence que la dégradation des PNNs précède la perte des interneurones PV après un traumatisme cérébral, suggérant un rôle protecteur des PNNs vis-à-vis de ces neurones dans la phase aiguë de cette pathologie (Hsieh *et al.*, 2017). A l'inverse, les travaux de Madinier et collaborateurs ont montré que l'utilisation d'un environnement enrichi permet de réduire le nombre de PNNs. De plus, il semblerait que cette réduction soit associée à une amélioration de la récupération fonctionnelle après un AVC suggérant un rôle bénéfique du remodelage des PNNs dans la récupération post-ischémique (Madinier *et al.*, 2014).

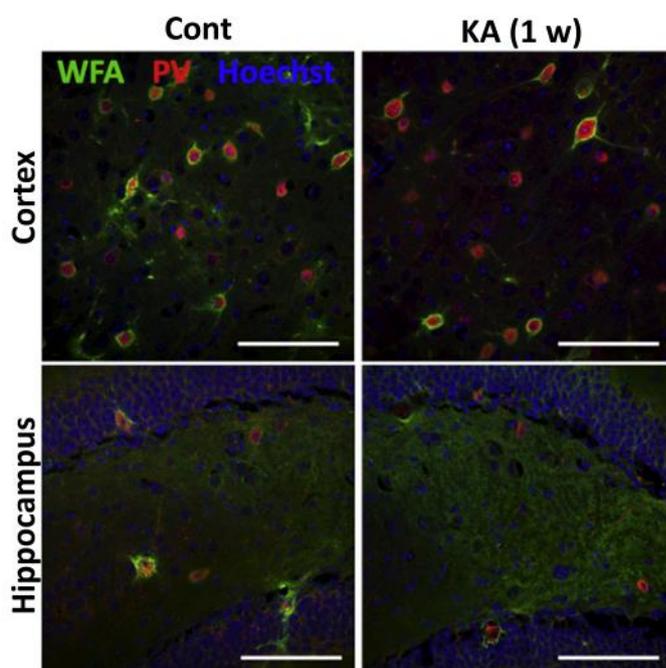


Figure 34: Le nombre d'interneurones PV entourés de PNNs est réduit dans un modèle épileptique.

L'injection intrapéritonéale de Kainate chez la souris induit une diminution du nombre d'interneurones PV co-marqués par la WFA au niveau du cortex et de l'hippocampe une semaine après l'induction du modèle (Yutsudo & Kitagawa, 2015).

L'altération de l'activité des interneurones PV et des réseaux périneuronaux pourrait également être impliquée dans la physiopathologie de l'épilepsie. Ce trouble neurologique est causé par une sur-activation neuronale au niveau de foyers épileptiques et pourrait être lié à une altération

du système inhibiteur GABAergique. Des analyses histologiques post-mortem ont notamment mis en évidence une diminution de la densité des interneurons exprimant la parvalbumine dans les cortex et l'hippocampe patients épileptiques (Andrioli *et al.*, 2007; Ferrer *et al.*, 1994). De plus, l'utilisation de techniques optogénétiques chez l'animal a permis de montrer que l'activation de ces neurones en périphérie du foyer empêche la propagation corticale d'un événement épileptique (Sessolo *et al.*, 2015). L'induction pharmacologique de crises épileptiques chez l'animal a permis de mettre en évidence une diminution du nombre de cellules PV entourées de PNNs au niveau du cortex et de l'hippocampe (Figure 34) (Mcrae *et al.*, 2012; Yutsudo and Kitagawa, 2015). Par ailleurs, Tewari et collaborateurs ont montré que la déplétion des PNNs augmente la survenue d'épisodes épileptiques dans un modèle de tumeur cérébrale en diminuant la fréquence de décharges des interneurons PV (Tewari *et al.*, 2018).

Une diminution de l'activité GABAergique est aussi retrouvée chez les patients atteints de schizophrénie et pourrait être liée à une modification de la structure des PNNs. En effet, une réduction du nombre de PNNs a été observée au niveau du cortex préfrontal chez des patients schizophrènes et dans un modèle murin de schizophrénie (Cabungcal *et al.*, 2013; Mauney *et al.*, 2013).

L'étude des fonctions des PNNs dans les troubles neurodégénératifs tels que la maladie d'Alzheimer ont montré des résultats contradictoires. Une augmentation du nombre de PNNs a, par exemple, été observée au niveau de l'hippocampe dans un modèle animal de la maladie d'Alzheimer surexprimant le peptide bêta-amyloïde. L'injection de ChABC permet alors de restaurer les performances cognitives chez ces animaux (Végh *et al.*, 2014). A l'inverse, un autre modèle animal de la maladie d'Alzheimer n'a pas montré d'effet significatif de la pathologie amyloïde sur la morphologie des PNNs (Morawski *et al.*, 2010).

D'autres études suggèrent que les PNNs pourraient jouer un rôle protecteur en agissant comme une barrière physique vis-à-vis du stress oxydatif et des molécules neurotoxiques. En effet, des analyses histologiques au niveau du cortex d'individus âgés sains et de sujets atteints de la maladie d'Alzheimer suggèrent que les neurones entourés de PNNs seraient moins susceptibles au stress oxydatif (Morawski *et al.*, 2004). Une étude menée *in vitro* a, quant à elle, montré un rôle neuroprotecteur des PNNs dans des neurones corticaux exposés au peptide bêta-amyloïde (Seiji Miyata *et al.*, 2007).

5- Protéases et dégradation des PNNs

Comme nous avons vu précédemment, les PNNs sont des structures dynamiques dont la formation est dépendante des stimuli sensoriels et qui peuvent être remodelées en condition pathologique. Parmi

les protéases endogènes proposées pour réguler la formation et la dégradation des PNNs, on retrouve notamment les MMPs et ADAMTS, deux familles de protéases exprimées dans le parenchyme cérébral par les neurones et les cellules gliales (Kaplan *et al.*, 2014; Lemarchant *et al.*, 2016; S. Takeuchi *et al.*, 2015). Ces protéases sont, en effet, capables de cliver les différents CSPGs présents au sein des PNNs au niveau de leur corps protéique. Ainsi, les ADAMTS et les MMPs sont capables de cliver l'aggrécane, le neurocan ainsi que le brevican tandis que seules les ADAMTS sont décrites pour cliver le versican et le phosphacan (Lorenzo Bozzelli *et al.*, 2018; Tauchi *et al.*, 2012; Testa *et al.*, 2019).

L'implication de la protéase MMP9 dans la dégradation des PNNs a d'abord été montrée dans un modèle de privation sensorielle chez la souris. En effet, une privation monoculaire (MD) réalisée au cours de la période critique induit une réduction de l'intensité et de la taille des PNNs au niveau du cortex visuel chez des souris WT mais n'a pas d'effet chez les souris déficientes en MMP9. La plasticité de la dominance oculaire après une MD est également réduite chez ces animaux (Figure 35) (Kelly *et al.*, 2015).

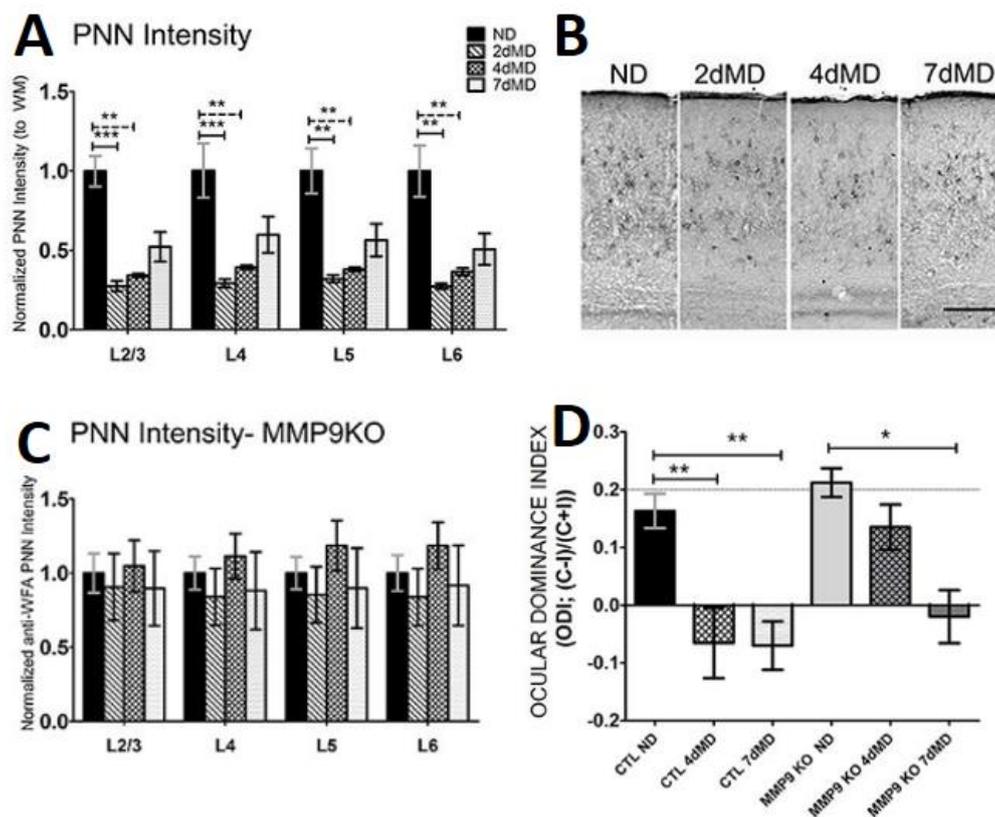


Figure 35: Le remodelage des PNNs par la MMP9 permet la plasticité de la dominance oculaire pendant la période critique.

(A-B) Une privation monoculaire (MD) lors de la période critique induit une diminution de l'intensité des PNNs marqués à la WFA au niveau de la zone binoculaire du cortex visuel controlatéral chez les souris sauvages tandis que la dégradation des PNNs n'est pas retrouvée chez les souris déficientes en MMP9 (MMP9KO). (D) La MD induit un décalage de la dominance oculaire (l'index de dominance oculaire négatif traduit un décalage de la dominance oculaire en faveur de l'œil ipsilatéral) chez les souris sauvages (CTL) mais pas chez les souris MMP9KO à 4 jours.

Plus récemment, Wen et collaborateurs ont montré un retard de formation des PNNs au niveau du cortex auditif chez des souris FMR1-KO (gène codant pour le retard mental lié au syndrome de l'X fragile) associé à une augmentation de l'activité MMP9. Dans ce modèle, la réduction génétique de MMP9 permet de restaurer la formation des PNNs autour des interneurons PV (Wen *et al.*, 2018).

Dans le parenchyme cérébral, l'activité des MMPs, et plus particulièrement de MMP9, augmente après un conditionnement de peur, un événement épileptique mais également lors d'une privation sensorielle et chez des animaux conditionnés dans un environnement enrichi (Foscarin *et al.*, 2011; Kaliszewska *et al.*, 2012; Ganguly *et al.*, 2013; Dubey *et al.*, 2017; Quattromani *et al.*, 2018).

La régulation de l'activité de MMPs pourrait alors expliquer les remodelages des PNNs observés dans ces différents contextes.

Les protéases de la famille des ADAMTS sont également responsables du clivage de différents CSPG présents au sein des PNNs. Une analyse transcriptomique par *single-cell-PCR* a révélé que ces protéases pouvaient être synthétisées spécifiquement par les interneurons PV. C'est, par exemple, le cas d'ADAMTS-8 et ADAMTS-15 (Rossier *et al.*, 2015). La contribution des ADAMTS dans la dégradation des PNNs a été mise en évidence dans un modèle animal de sclérose latérale amyotrophique. Dans cette étude, l'injection intracérébroventriculaire d'ADAMTS-4 recombinant induit une diminution du nombre de PNNs entourant les motoneurons dans la moelle épinière et favorise la neurodégénération de ces cellules (Lemarchant *et al.*, 2016).

Le système tPA/plasmine pourrait également jouer un rôle dans la formation et le remodelage des PNNs. En effet, la plasmine est capable de cliver les CSPG neurocan, versican et phosphacan retrouvés dans les PNNs (Kenagy *et al.*, 2002; Wu *et al.*, 2000). L'aggrécane est également susceptible d'être clivé par la plasmine au niveau de son domaine interglobulaire séparant les domaines G1 et G2 (Kiani *et al.*, 2002).

De manière intéressante, l'expression du tPA ou son activité, est augmentée au niveau des cortex somatosensoriel et visuel lors de privations sensorielles par élimination des vibrisses et privation monoculaire (C. C. Chen *et al.*, 2015; Mataga *et al.*, 2002). Les travaux de Mataga et collaborateurs ont, par ailleurs, montré un déficit de la plasticité de la dominance oculaire et une absence de remodelage des épines dendritiques après une MD chez les souris déficientes en tPA. Ces auteurs mentionnent également un défaut de plasticité de la dominance oculaire chez les souris déficientes en plasminogène (Mataga *et al.*, 2002, 2004). Le tPA et la plasmine pourraient également être impliqués indirectement dans le clivage des CSPGs en favorisant respectivement la conversion du pro-ADAMTS4 et des pro-MMPs (George E. Davis *et al.*, 2001; Lemarchant *et al.*, 2014).

Pour résumer :

- ❖ Les PNNs sont des structures condensées de la MEC retrouvées principalement autour des interneurons exprimant la parvalbumine.
- ❖ Les PNNs sont composés de chaînes d'acide hyaluronique synthétisées à la surface des neurones sur lesquelles sont fixés différents CSPGs.
- ❖ Les PNNs forment une barrière physique autour des neurones et peuvent moduler la plasticité synaptique et structurelle.
- ❖ Les PNNs sont mis en place au cours du développement à la fin de la période critique et leur dégradation à l'âge adulte permet de rouvrir cette période de haute plasticité.
- ❖ Plusieurs protéases sont susceptibles de dégrader les CSPGs retrouvés au sein des PNNs.

Objectifs

Objectifs

Le tPA est une protéase exprimée dans le système nerveux central au sein de nombreuses régions cérébrales, notamment par les neurones. Cette protéase exerce différentes fonctions au sein du parenchyme cérébral *via* des mécanismes directs, en modulant la signalisation de différents récepteurs, ou indirects en convertissant le plasminogène en plasmine. L'utilisation de modèles murins déficients en tPA a permis de montrer son implication dans la plasticité synaptique, la régulation des processus cognitifs et émotionnels. Le système tPA/plasmine peut également influencer la plasticité structurelle en dégradant certains composants de la matrice extracellulaire.

L'investigation des fonctions du tPA a été essentiellement réalisée chez des souris déficientes en tPA de manière constitutive ou dans des modèles pharmacologiques. Ces études ne permettent donc pas de rendre compte des rôles du tPA endogène exprimé au sein de régions cérébrales ou de populations neuronales spécifiques. Mes travaux de thèse s'orientent donc autour de cette problématique à travers deux axes de recherche.

Une première étude visait à mieux comprendre les fonctions du tPA dans les processus cognitifs et émotionnels et plus particulièrement dans la cognition spatiale et l'anxiété. Pour cela, nous avons développé au laboratoire une souche de souris « tPA Null », déficiente en tPA de manière constitutive et une souche « tPA Flox », permettant la délétion conditionnelle de l'exon 3 du gène *Plat* sous l'action de la recombinaison Cre.

Dans cette première étude, nous avons cherché à répondre à 4 questions principales :

- Quels sont les phénotypes comportementaux des souris tPA Null ?
- Quel est le rôle du tPA exprimé au sein de l'hippocampe dans les processus cognitifs et émotionnels ?
- Quel est le rôle du tPA exprimé par les noyaux amygdaliens dans les processus émotionnels ?
- Quelle population neuronale exprime du tPA dans l'amygdale ?

Une deuxième étude a eu pour but d'étudier le rôle du système d'activation du plasminogène dans le remodelage d'une structure particulière de la MEC, appelée *perineuronal nets* (PNNs).

Ainsi, l'objectif de ce second projet est de répondre aux questions suivantes :

- Par quel type de neurone le tPA est-il exprimé dans le cortex cérébral ?
- Quel est le rôle du tPA exprimé par les interneurons PV dans le remodelage des PNNs ?
- Par quel mécanisme le tPA influence-t-il la dégradation des PNNs ?

Résultats

Article 1

Tissue-type plasminogen activator expressed in PKC- δ positive GABAergic neurons within the central amygdala modulates motor and emotional responses

(in preparation)

Running title: tPA-dependent motor and emotional functions

Sara Douceau¹, Yannick Hommet¹, Laurent Lebouvier¹, Joëlle Chabry², Véronique Agin*¹, Denis Vivien*^{1,3}

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

² Institut de Pharmacologie Moléculaire et Cellulaire, UMR 7275 CNRS-Université Côte d'Azur, Sophia Antipolis, 06560 Valbonne, France

³ Department of clinical research, Caen-Normandie University Hospital, CHU, Avenue de la côte de Nacre, Caen, France.

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

ABSTRACT

Tissue plasminogen activator (tPA) is a serine protease expressed in brain regions and was reported involved in the control of emotional and cognitive functions. Nevertheless, little is known about the structure-function respective temporal relationships in these tPA-dependent behaviors. Here, by using a new model of constitutive tPA-deficient mice (tPA Null), we first show that tPA controls locomotor activity (open-field), spatial cognition (Barnes maze) and anxiety (open-field and O-maze). To investigate the brain structures involved in these tPA-dependent behavioral phenotypes, we next generated tPA floxed mice allowing conditional tPA deletion (cKO) following stereotaxic injections of adeno-associated virus driving Cre-recombinase expression (AAV9-CBA-Cre-GFP). We demonstrate that cKO-dentate gyrus (DG)-mice display hyperactivity and partial spatial memory deficits. Moreover, the deletion of tPA in the central nucleus of the amygdala (CeA), but not in the basolateral nucleus (BLA), induces hyperactivity and reduced anxiety-like level. Importantly, we prove that these behaviors depend on the tPA present in the adult brain and not on developmental disorders. Finally, our immunohistochemical data also reveal that these tPA-dependent behaviors are associated to PKC δ -positive GABAergic interneurons in the CeA. Together, our study brings new data about the critical role of tPA in behavioral modulation in adult mice. In addition, it offers new genetic tools useful to characterize the molecular and cellular mechanisms underlying functional impairments associated to psychiatric diseases and tPA functions.

Key words: tissue-type plasminogen activator, behavior, anxiety, spatial memory, locomotion, conditional knockout, AAV; hippocampus, amygdala.

Abbreviations: tPA: tissue-type plasminogen activator; AAV: adeno-associated virus; GFP: green fluorescent protein; cKO: conditional knockout; CeA: central amygdala; HPC: hippocampus; PFC: prefrontal cortex; PKC δ : protein kinase-C delta.

INTRODUCTION

In humans, emotional and cognitive impairments are symptoms of several psychiatric diseases, exacerbated by concomitant events such as stress, aging and/or chronic diseases, leading to a dramatic deterioration in the quality of life (Beaudreau and OHara, 2008). The precise molecular and cellular mechanisms that underlie these abnormal behaviors are still not well understood, and deserve further works aimed at developing accurate targeted therapies.

The tissue-type Plasminogen Activator (tPA) is a pleiotropic serine protease initially characterized for its ability to activate plasminogen into plasmin and thus to promote vascular and tissue fibrinolysis (Collen and Lijnen, 1991; Akassoglou et al., 2000). In the central nervous system, tPA is expressed in many brain areas including the entorhinal cortex, the hippocampus and the amygdala (Teesalu et al., 2002; Pawlak et al., 2003; Louessard et al., 2016; Hébert et al., 2017; Stevenson and Lawrence, 2018a) and reported to influence physiological mechanisms such as synaptic plasticity (Huang et al., 1996; Calabresi et al., 2000; Pang and Lu, 2004; Parcq et al., 2012). Thus, tPA contributes, either directly or indirectly, to the modulation of some learning and memory processes (Madani et al., 1999; Calabresi et al., 2000; Pawlak et al., 2002; Benchenane et al., 2007; Obiang et al., 2011, 2012; Hébert et al., 2017) as well as emotional responses such as anxiety (Pawlak et al., 2003; Matys et al., 2004), and locomotor activity (Krizo et al., 2018). tPA-dependent effects on synaptic plasticity can be attributed the modulation of *N*-Methyl D-Aspartate receptor (NMDAR), the type I Low Density Lipoprotein Related Receptor (LRP-1) signaling or to the conversion of the pro-Brain Derived Neurotrophic Factor (pro-BDNF) into its mature form (Huang et al., 1996; Calabresi et al., 2000; Zhuo et al., 2000; Pang et al., 2004; Benchenane et al., 2007; Parcq et al., 2012; Hébert et al., 2017). Up to now, all the studies aiming at investigating tPA-behavioral functions were performed from constitutive tPA-deficient mice, without information about whether these impairments could be linked to developmental alterations. Similarly, structure-function respective relationships in these tPA-dependent behaviors were indirectly determined in the majority of cases. In addition, all the data today available in terms of tPA-dependent behavioral functions were obtained from C57BL/6J tPA-deficient mice harboring the 129-derived chromosomal segment that co-segregates with the targeted tPA (Plat) allele, leading to a differential expression of a set of genes which could interfere with tPA's functions (Szabo et al., 2016).

In the present study, we have first characterized the behavioral phenotype of a novel tPA-deficient mouse strain (named tPA Null mice) generated by a unique deletion of the exon-3 of the Plat gene, to avoid possible off target effects. Then, the region-specific tPA's deletion was induced through stereotaxic delivery of AAV9-CBA-Cre-GFP either in the hippocampus, the amygdala or the prefrontal cortex of adult tPA-floxed mice (flanking exon-3 of the Plat gene), also newly generated by our group. Using these new experimental models, we first found that the hippocampal deletion of tPA, (cKO-HPC) in the adult mice, leads to hyperactivity and cognitive deficits. Then, we revealed that deletion of the tPA contained in PKC δ -positive GABAergic neurons (cKO-CeA) of the adult central amygdala promotes hyperactivity as well as reduced anxiety-like behavior. Our data support the view that tPA expressed in the CNS controls multiple behaviors including motor and emotional responses, and emphasize the importance of conditional knockout strategies to dissect tPA-dependent functions in specific brain networks.

MATERIALS & METHODS

Animals:

Experiments were performed on 8 weeks old males tPA Null mice, tPA Flox mice and their WT littermates (see paragraph below) mice (20-25g) (Centre Universitaire de Ressources Biologiques, Normandy University, Caen, France). Animals were housed with a 12-h light/12-h dark cycle in standard polypropylene cages (Charles River, France) with free access to water and food (SDS Dietex, France). Following AAV injection, tPA Flox mice and their WT littermates were housed in the biosafety level 2 animal facilities with a 12-h light/12-h dark cycle in filter cages. All experiments were conducted in accordance with the French ethical law (Decree 2013-118) and the European Communities Council guidelines (2010/63/EU) and were approved by institutional review board (French ministry of Research) and by the committee of Normandy (CENOMEXA) registered under the reference CENOMEXA-C2EA – 54 and received the agreement number #10959. All applicable international, national, and/or institutional guidelines for the care and use of animals were followed.

Generation of transgenic mice:

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

Stereotaxic injection of AAV virus:

Animals were deeply anesthetized with isoflurane 5 %, and maintained with 2.5 % isoflurane in a 70 %/30 % mixture of NO₂/O₂ in a stereotaxic frame (Havard Apparatus). AAV9-CBA-Cre-GFP (1.12.10¹³ pv/mL) were injected through a glass micropipette in both hemispheres at a rate of 0.2 µL/min. Coordinates (relative to bregma) according to Paxinos Mouse Brain Atlas were as follows: AP1: -2 mm; ML1: +/- 1 mm; DV1: -1.8 mm and AP2: -2.7 mm; ML2: +/- 2 mm; DV2: -2mm for the Hippocampus (0.5 µL/site). The coordinates for the BLA were as follows: AP: -1.8 mm; ML: +/-3 mm; DV: -3.6 mm (0.5 µL/site). The coordinates for the CeA were: AP: -1.4 mm; ML: +/- 2.3mm; DV: -4.2mm (0.3 µL/site). The coordinates for the mPFC were: AP: + 1.5 mm; ML: +/- 1.5mm; DV: -2 mm (0.5 µL/site). The needle was left in position for a further 5 minutes and then removed slowly from the brain. After recovery from surgery, mice were left undisturbed for 3 weeks to allow the time-course for effective and stable transgene expression.

Viral production:

Viral particles were provided by Gilles Bonvento and Alexis Bemelmans (INSERM U1169/MIRCen CEA, Fontenay aux Roses 92265, France). The vector used for this study was an AAV2/9 hybrid serotype. Self-complementary AAV vectors expressing the CBA-Cre-GFP construct were produced by transfecting HEK293 cells with the adenovirus helper plasmid (pXX6-80), the AAV packaging plasmid carrying the rep2 and the cap8 genes, and the AAV2 shuttle plasmid containing the CBA-Cre-GFP transgene in a sc

genome. Recombinant vectors (rAAV) were purified by ultracentrifugation on a discontinuous iodixaniol density gradient followed by dialysis against the formulation buffer of the vector stocks, 0.5 mmol/l MgCl₂ and 1.25 mmol/l KCl in phosphate-buffered saline (PBSMK; five buffer changes, 3 hours per round of dialysis). Physical particles were quantified by real-time PCR. Vector titers are expressed as viral genomes per milliliter (vg/ml).

Behavioral tests:

Open-field exploration: The open field test was used to assess general locomotor activity and anxiety-like behaviors. The activity of the mouse was recorded by a camera placed on top of a circular open field (60 cm diameter) for 10 min. The distance travelled, velocity and time spent in each area of the apparatus was video-tracked and analyzed with Ethovision XT 11.5. A central area with a diameter of 30 cm was defined in order to measure anxiety-like behavior.

Zero-maze: The elevated zero maze was used to measure anxiety-like behaviors. The apparatus consists of two opens and two enclosed elevated arms (diameter: 50 cm, elevation: 80 cm from floor, wall height: 15 cm, path width: 5cm; Imetronic, France). A camera was placed on top of the maze to record the mouse activity for 5 minutes. Recorded trials were then blind-analyzed to measure de time spent in each area of the maze.

Barnes-maze: This task was used to assess spatial reference memory. The maze consists of a 90 cm grey circular platform with 18 equally spaced holes along the perimeter. Visual cues (29*42 cm) were located on the walls of the room. An escape box was placed under one of the holes during the training sessions. During training sessions mice were held inside a start chamber for 15 seconds, the room light turn-off. Then the room light was turn-on and the mice were released to freely explore the maze. The training period consists of 2 trials/day during 4 training days. The trial ended when the mouse enter the escape box or after 5 min elapsed. If the mice didn't find the box before the 5 min elapsed, the experimenter guided the mouse to the escape box. Mice were allowed to stay in the escape box for 1 min at the end of the trial before return to their home cages. To assess spatial memory reference, the escape box was removed from the apparatus and a 90 sec probe test was performed on day 5. Animal behavior was recorded using a camera and tracked with the software PolyVision (Imetronic, France).

Fibrin-agar zymography:

Mice were deeply anesthetized with isoflurane 5 % and thereafter maintained with 2.5 % isoflurane in a 70 %/30 % mixture of NO₂/O₂. A transcardial perfusion was performed with ice-cold heparinized 0.9 % NaCl. Brains were then removed and cut in 1 mm thick slices using a brain matrix (Delta Microscopies). Structures of interest were then sampled using a biopsy punch (Delta Microscopies). Tissues were dissociated in ice-cold TNT buffer (50 mM Tris-HCl pH 7.4; 150 mM NaCl; 0.5 % Triton X-100; Sigma-Aldrich). After a 20-minute centrifugation (12000 × g at 4°C), proteins were quantified using the bicinchoninic acid (BCA) method (Pierce). Zymographies were performed as previously described (Dejouvencel et al. 2010).

Immunohistochemistry:

Three weeks post AAV injection mice were deeply anesthetized with isoflurane 5 % in 70 %/30 % mixture of NO₂/O₂. A transcardial perfusion was performed with ice cold 0.9 % NaCl with 3 % heparin followed by 150 ml of fixative solution containing 2 % paraformaldehyde and 0.2 % picric acid (in PBS 0.1M, pH 7.4). Brains were removed and cryoprotected in 20 % sucrose solution (in PBS 0.1M, pH 7.4) for 24h and frozen in Tissue-Tek (Miles Scientific). Cryostat sections of 10 µm were collected on Poly-Lysine slides and stored at -80°C. Sections were incubated overnight at room temperature with primary antibodies. Corresponding Fab'2-conjugated secondary antibodies were diluted at 1:800 (Jackson Immunoresearch). Images were acquired using Leica DM6000 microscope-coupled CoolSnap camera, visualized with Metamorph 7.0 software (Molecular Devices), and further processed were realized using ImageJ software.

Antibodies:

The following antibodies were used in this study: rabbit anti-tPA (1:3000; generous gift from R. Lijnen, Leuven); mouse anti-NeuN (1:800, MAB377, Merck); anti-GFP (rabbit, 1:1000, ab6556, Abcam or chicken, 1:1000, ab13970, Abcam); mouse anti-Cre (1:1000, MAB3120, Merck); chicken anti-VGAT (1:500, 131006, Synaptic Systems); Mouse anti-PKCδ (1:500, BD Biosciences) and rabbit anti-SOM (1:1000, MAB 354, Merck).

RESULTS

Constitutive tPA Null mice display hyperactivity, reduced anxiety, and impaired spatial memory

To avoid possible off target effects of tPA (Szabo et al., 2016), we used here new strain of tPA-deficient mice (tPA Null) by targeting the exon-3 of the *Plat* gene using a Cre-mediated deletion on a C57/BL6NTac background (Fig. 1A-B; see methods section). In order to characterize the behavioral phenotype of this new tPA-deficient mouse strain, a battery of tasks was conducted in tPA Null mice and their wild-type (WT) littermates (8-10 weeks old; n=20 per group).

The open-field (OF) and the O-maze (OM) tests were used to measure general overall locomotion and anxiety-related behavior (Fig. 1C-H). In the OF, mutant mice displayed significant higher velocity (Fig. 1C; + 17.5 %, $p < 0.01$) and distance travelled (Fig. 1D; + 17.5 %, $p < 0.05$) than those of WT animals. This indicates that tPA Null mice exhibit increased locomotor activity. Moreover, mutant mice showed a marked increase in the distance travelled (Fig. 1F; + 12.8 %, $p < 0.05$) and time spent (Fig. 1G; + 20 %, $p < 0.05$) in the anxiogenic center area of the OF compared to controls, indicating a reduced anxiety-like behavior. In line with these data, tPA Null mice spent significantly more time in the anxiogenic open arms of the OM than WT mice (Fig. 1H; + 59 % $p < 0.05$). Thus, data from OF and OM tests consistently indicate hyperactivity and reduced anxiety in tPA Null mice. We then used the Barnes maze (BM) in order to study possible spatial cognition deficits due to the lack of tPA. For this task, the mice were trained to selectively search for location of a target box during eight trials. After training, a probe test was performed to evaluate spatial long-term memory. During the testing phase, WT mice spent significantly higher time in the target area compared to others (Fig. 1I; $p < 0.05$), whereas tPA Null mice failed to discriminate the target box (Fig. 1I; $p > 0.05$). Consistent with this result, the time spent in the target area was significantly higher than chance level in WT mice (Fig 1I-J; $p < 0.05$) contrary to tPA Null mice (Fig. 1I-J; $p > 0.05$). In addition, mutant mice made significantly more errors to find the target box than control mice (Fig. 1K; + 89 %; $p < 0.01$). These data show that the tPA deficiency leads to an impairment of long-term spatial memory.

Altogether, we reveal here that tPA in mice is involved in a range of behavioral functions, including locomotor activity, anxiety and spatial memory.

Deletion of tPA in PKC δ GABAergic neurons of the central amygdala induces hyperactivity and reduced anxiety

To characterize the respective structure-function relationships in these tPA-dependent functions, we then induced the deletion of the target protein in several brain areas (hippocampus, prefrontal cortex or amygdala) of adult mice.

First, AAV9-CBA-Cre-GFP were bilaterally injected in the dentate gyrus of newly generated tPA Flox mice (Fig. 2A; see methods section) for a conditional deletion of tPA in the hippocampal mossy fibers (cKO-HPC; n=19). The same AAV construct was injected in the WT littermate mice as control (Control; n=20). The efficacy of the recombination (three weeks after injection) was confirmed by immunohistochemistry for GFP to reveal infected cells in the dentate gyrus (Fig. 2B), and by immunohistochemistry raised against tPA to unmask the specific depletion of endogenous tPA in the hippocampal mossy fibers of cKO-HPC mice (Fig. 2B). These data were confirmed by fibrin-agar zymography with reduced levels of active tPA in the hippocampus of the injected tPA Flox mice compared to the injected tPA WT animals (Fig. 2C; n=4; $p < 0.05$). As performed for the tPA Null mice (Fig. 1), the same set of behavioral tasks was performed with the cKO-HPC and control mice three weeks post-AAV9-CBA-Cre-GFP injections. In the OF, both the velocity and the distance travelled were

significantly increased in cKO-HPC mice compared to controls (Fig. 2D-E; $p < 0.05$). By contrast, the anxiety-like behavior was similar in the two groups which showed equal distance travelled (Fig. 2G; $p > 0.05$) and time spent (Fig. 2H; $p > 0.05$) in the center area of the OF. These results were confirmed in the OM (Fig. 2I; $p > 0.05$). In the cognitive task, cKO-HPC mice performance was equivalent to random exploration (Fig 2J-K; $p > 0.05$) unlike that of the control mice which was significantly greater than chance level (Fig 2J-K; $p < 0.001$). Both groups displayed an equal error numbers (Fig. 2L; $p > 0.05$) to discriminate the target box (Fig 2J; cKO-HPC mice: $p < 0.05$; Control: $p < 0.001$). Altogether, these data demonstrate that tPA present in the hippocampus of adult mice is involved in the modulation of locomotor activity and partly in spatial memory.

The targeted suppression of tPA in the median prefrontal cortex did not affect anxiety, locomotor activity, or spatial performance (Supplementary Fig. 1).

Then, AAV9-CBA-Cre-GFP were bilaterally injected in the central amygdala (CeA) of the tPA Flox mice for a conditional deletion tPA (Fig 3A; cKO-CeA; $n=19$). The same AAV construct was injected in the WT littermate mice as control (Control; $n=20$). The efficacy of the recombination (three weeks after injection) was confirmed by immunohistochemistry for GFP, to reveal infected cells in the central amygdala (Fig. 3B), and by fibrin-agar zymography showing a decrease of tPA activity in the CeA (Fig. 3C; $n=4$; $p < 0.05$). Control and cKO-CeA mice were submitted to the same set of behavioral tasks as above three weeks post-AAV9-CBA-Cre-GFP injections. In the OF, cKO-CeA mice displayed a hyperactive phenotype (Fig. 3D-E; velocity: + 9.4 %, $p < 0.05$; distance travelled: + 9.4 %, $p < 0.05$). A reduced anxiety-like behavior was also observed in conditional mutant mice compared to controls in the OF (Fig. 3G-H; distance travelled in the center area: + 43.2 %, $p < 0.01$; time in the center area: + 35.5 %, $p < 0.05$). In the Barnes maze, the conditional knockout mice succeeded in the task since spatial memory performance was similar in both groups (Fig. 3J-L).

Parallel bilateral injections of AAV9-CBA-Cre-GFP were performed in the basolateral amygdala (BLA) of tPA Flox mice and their WT littermates (Fig. 4A; cKO-BLA: $n=18$, Control: $n=18$). The site of injection was confirmed by the expression of GFP (Fig. 4B) and the efficacy of the recombination was assessed by the measurement of tPA proteolytic activity in the BLA (Fig. 4C; $n=4$; $p < 0.05$). The locomotor activities were equal in cKO-BLA and control mice in the OF (Fig. 4D-E; $p > 0.05$). No difference in the anxiety-like behavior was reported between the two groups, neither in the OF nor in the OM (Fig. 4G-I; $p > 0.05$). About spatial memory, the BM task revealed that both groups displayed equal memory performance (Fig 4J-L). Altogether, these data reveal that the tPA present in the CeA of adult mice, but not in the BLA, is involved in the control of anxiety-like behavior, with the tPA promoting anxiety. Furthermore, we demonstrate that central amygdalar tPA modulates locomotor activity. In order to determine which cell types of the CeA are involved in the functions of tPA described above, immunohistochemistry was performed from coronal brain sections of WT mice-using a set of neuronal markers (vesicular GABA transporter: VGAT; somatostatin: SOM; protein: kinase-C delta, PKC δ) combined with tPA immunostaining. Our data revealed positive neuronal fibers for tPA colocalized with the GABAergic marker VGAT in the CeA (Fig. 5A). Co-immunostaining of these GABAergic tPA-positive interneurons expressed in the CeA revealed that they were also positive for the PKC δ , but not for somatostatin.

DISCUSSION

In the present study, we describe the behavioral defects induced by constitutive and brain structures conditional deletion of tPA (hippocampus, prefrontal cortex, basolateral amygdala and central amygdala). We then reveal that the tPA from PKC δ -positive neurons of the central amygdala of adult mice is involved in motor and emotional functions.

The current literature investigating roles of tPA, including its brain functions, were obtained using C57BL/6J tPA-deficient mice harboring the 129-derived chromosomal segment that co-segregates with the targeted Plat allele (Szabo et al., 2016). Due to the strategy of engineering of this mouse strain, the expression of an additional set of genes was altered in addition to that of tPA. Among others, some of these genes (ARHGEF18, MCF2L and MCPH1) may have roles in brain functions and dysfunctions and thus interfere with the tPA ones. For example, MCF2L was reported to participate in the formation and stabilization of glutamatergic synapses and mutations of its homolog, MCF2 Rho GEF could be associated to mental retardation and autism spectrum disorders (Piton et al., 2011; Hayashi et al., 2013). The tPA Null mouse strain used in the present study, recently generated by our group, is the consequence of a specific deletion of the exon-3 of the Plat gene, with no possibly of off-target effects. Our behavioral experiments confirm most of the previous reports about the functional roles of tPA such as in spatial memory (Calabresi et al.; Benchenane et al., 2007; Oh et al., 2014; Hébert et al., 2017). Importantly, our study is the first to show that tPA deficiency also leads to hyperactivity and emotional dysfunction with decreased trait-anxiety in basal conditions. Thus, tPA Null mouse strain represents an informative model for understanding how tPA disruption may directly or indirectly impact behaviors relevant to psychic disorders. Nevertheless, as the functional dysfunctions found in tPA Null mice could be linked to neurodevelopmental disorders, we then completed our work by generating a novel model allowing conditional deletion of tPA.

Using this new molecular tool, the tPA floxed mice targeting the exon-3 of the Plat gene, we clearly demonstrate tPA-dependent structure-function respective relationships. We thus evidence that tPA of the dentate gyrus is involved in the regulation of locomotor activity and partly in spatial cognition. Furthermore, we show that tPA expressed in the central amygdala controls both locomotor activity and anxiety level. Finally, we also establish that that these functions of tPA are related to its presence in the adult brain and not to effects occurring during development.

It was previously reported that tPA displays functions in learning and memory processes (Benchenane et al. 2007; Calabresi et al. 2000; Hébert et al., 2017; Madani et al. 1999; Obiang et al. 2011, 2012; Oh et al. 2014; Pawlak et al. 2002). For example, overexpression of tPA in the CNS has been associated with improved spatial performance when using both Morris Water Maze (MWM) and Homing hole board tests (Madani et al. 1999). Accordingly, tPA deficiency has been shown to induce spatial deficits in both MWM and T-maze (Hébert et al., 2017; Oh et al. 2014), as well as alterations in responsiveness to a spatial change during an object placement test (Calabresi et al. 2000). However, other studies using tPA $-/-$ mice did not report a particular phenotype when using MWM or BM (Huang et al. 1996; Pawlak et al. 2005). Here, we reconcile the different theories showing that tPA produced by dentate gyrus neurons in the adult brain play a role, albeit moderate, in spatial cognition. Regarding tPA involvement in locomotor activity, data of literature are again conflicting. Indeed, tPA-deficient mice do not display abnormal spontaneous locomotion in home cages but show decreased nocturnal wheel-running activity (Krizo et al., 2018; Pawlak et al., 2002). One notes that these studies were led on constitutive tPA-deficient mice, with distinct behavioral experimental conditions. Here, we highlight

for the first time that the dentate gyrus mature neurons' tPA in the adult brain plays a role in the modulation of locomotor activity. In the trisynaptic circuit of the hippocampus, dentate gyrus granule cells encode multiple sensory informations coming from parahippocampal regions during exploration and send inputs to CA3 area through giant synapses from mossy fibers (Henze et al., 2002; Neves et al., 2008). Therefore dentate gyrus granule cells can display place fields during exploration and exhibit locomotion-associated activity patterns (Pilz et al., 2016; GoodSmith et al., 2017). In vivo, dentate gyrus granule cell activation leads to an increase in exploratory behaviors both in the elevated plus-maze and the OF (Kheirbek et al., 2013). In our conditional knockout model, we could therefore hypothesized that removal of the dentate gyrus's tPA may affect hippocampal control of exploratory behaviors. We observed moderate spatial deficits following tPA removal in the hippocampus. This is consistent with a work from our lab which show, in tPA-deficient mice, that tPA plays a key role in entorhinal cortex-dependent processing of spatial information (Hébert et al., 2017). Moreover, dentate gyrus granule cells and CA3 are mainly involved in pattern separation mechanisms in the hippocampus which allow the storage of different memories from similar events (Leutgeb et al., 2007; Rolls, 2013). Since tPA is strongly expressed in granule cells and mossy fibers (Louessard et al., 2016; Stevenson and Lawrence, 2018b), it would be interesting to test memory performance of tPA Null mice and cKO-HPC mice using pattern separation paradigms.

Interestingly it was previously shown that specific knockdown of tPA in the hippocampus using lentiviral vectors expressing specific short hairpin RNAs (LV-shRNA) induces increased anxiety and depressive-like behaviors (Bahi and Dreyer, 2012). In their work, the authors targeted caudal hippocampus leading to removal of tPA in ventral part of the structure, which is implicated in the modulation of emotional responses (Parfitt et al., 2017). In our conditional knockout model, we performed tPA deletion in both rostral and caudal parts of the dentate gyrus. These local specifics of tPA suppression within the hippocampus are complementary and easily explain the reason why no emotional consequence was found in the cKO-HPC mice.

tPA activity in the amygdala is critical for both stress-induced synaptic plasticity and anxiety-like behavior (Pawlak et al., 2003; Matys et al., 2004; Bennur et al., 2007). Accordingly, tPA-deficient mice exhibit reduced anxiety-like behavior under stress conditions (Pawlak et al., 2003; Matys et al., 2004). Our present data thus provide new insights about tPA and anxiety, demonstrating that conditional deletion of tPA in the adult amygdala, more precisely in the central nucleus, leads to reduced anxiety-related behavior, regardless of any stressor. Using co-immunostaining, we also evidenced that in the CeA, tPA is expressed in PKC δ -positive GABAergic neurons. Interestingly, it was previously shown that optogenetic activation of CeA's PKC δ -positive interneurons leads to an anxiolytic-like phenotype in different task including the OF (Cai et al., 2014). It is important to note that CeA plays a key role in the integration of emotional sensory information coming from the BLA, and can modulate emotional responses through intrinsic circuit and projections to different brain areas such as the bed nucleus of the stria terminalis (BNST) (Gilpin et al., 2015). In the brain, tPA activity is increased in limbic regions such as the CeA, medial amygdala and the BNST under stress conditions (Pawlak et al., 2003; Matys et al., 2004, 2005). Since PKC δ -positive neurons can provide local inhibition of the CeA and also sent inhibitory projections to the BNST (Hunt et al., 2017; Ye and Veinante, 2019), we could hypothesize that tPA controls emotional responses through local or long range circuit (Stevenson and Lawrence, 2018b).

In our study, we also revealed that tPA deficiency in the CeA increases locomotor activity. Cai and collaborators did not report any effect of PKC δ -positive interneurons activation on general locomotor activity (Cai et al., 2014). However, targeting monosynaptic connections between the CeA and mesencephalic locomotor region was reported to modulate spontaneous locomotion (Roseberry et al., 2019). Although, specific signaling pathways of PKC δ -positive neurons are not clearly established, our data suggest that tPA may contribute to the involvement of this neuron subtype in the control of anxiety-like behaviors and possibly locomotion. Further investigations will be needed to describe these mechanisms, possibly opening new avenues for treatment of such types of diseases in human.

CONCLUSION

In summary, we demonstrate that tPA deficiency (tPA Null mice) leads to hyperactivity, spatial memory deficits and decreased anxiety-like responses. Using a corresponding conditional knockout model allowing brain structures-specific tPA removal in the adult mice, we reveal that 1/ selective loss of tPA in the hippocampus leads to hyperactivity and moderate spatial memory deficits, 2/ tPA deficiency in the CeA induces both hyperactivity and anxiolytic-like phenotype. In addition, we unveil that the expression of tPA in PKC δ -positive GABAergic interneurons in the CeA is associated to these tPA-dependent behaviors. Finally, this study brings new genetic tools useful to characterize the neural substrates underlying functional impairments related to some psychiatric diseases.

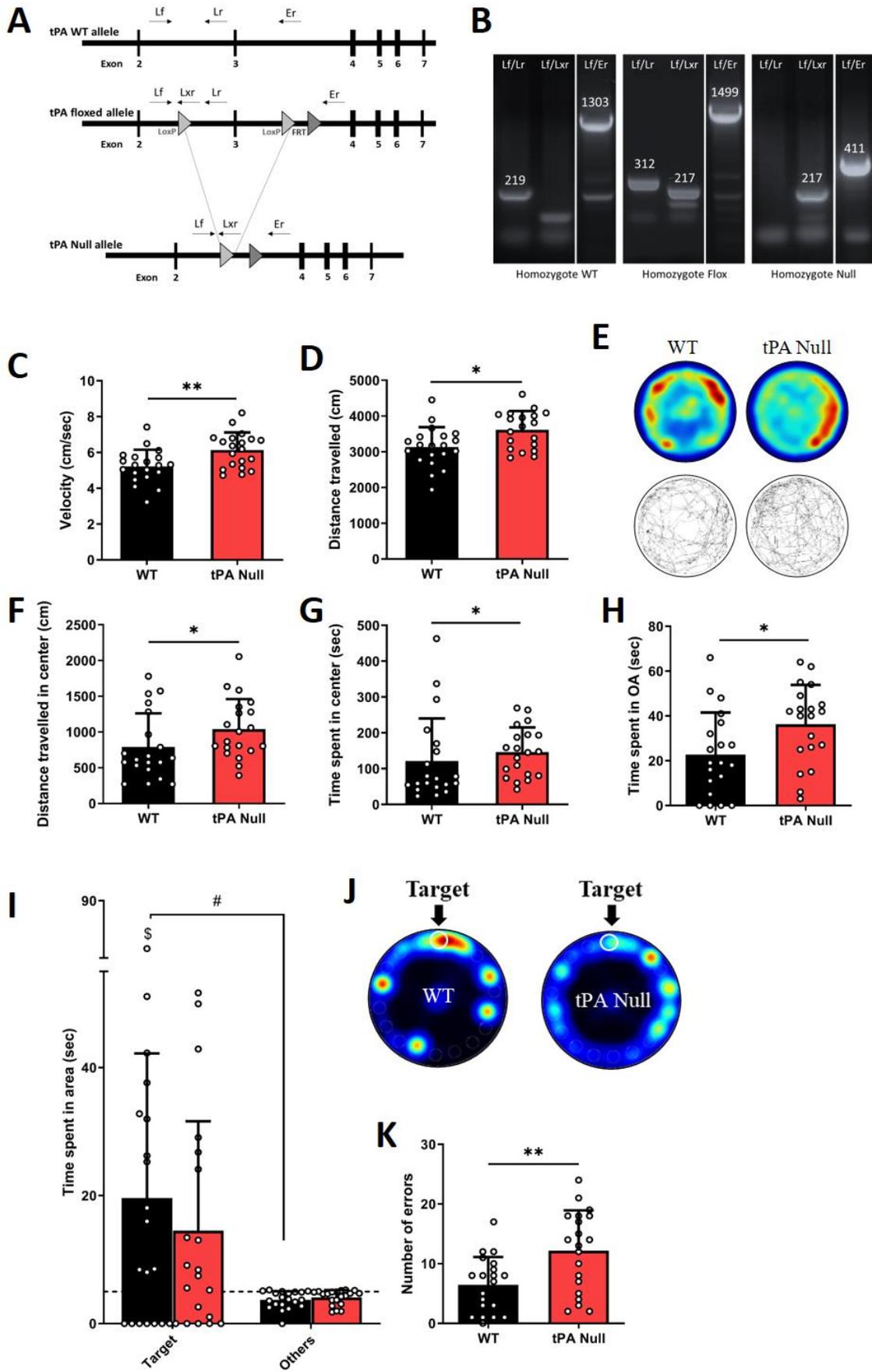


Figure 1: tPA plays a role in behavioral responses.

(A-B) Molecular approach for the generation of tPA Null mice and the corresponding tPA Floxed mice (tPA Flox). (C, D, E) tPA Null mice display a locomotor hyperactivity in the OF task (Mann Whitney test; velocity: $p=0.007$, C; total distance travelled: $p=0.012$, D). (E) Average heatmaps and representative tracks in the OF for WT and tPA Null mice. (F, G, H) tPA Null mice show an anxiolytic-like phenotype both in the OF (Mann Whitney test; distance travelled in center: $p=0.030$, F; time spent in center: $p=0.043$, G) and in the OM task (Unpaired t-test; time spent in open-arms: $p=0.023$, H). (I, J, K) tPA null mice display impaired cognition during the probe test session of the BM. (I) Intragroup comparison of the time spent in target area compared to others areas showing that tPA Null mice failed to discriminate the target hole from other holes (Wilcoxon test: #: $p=0.027$ for WT mice; $p=0.085$ for tPA Null mice). Statistical analysis of target hole preference compared to chance level (One sample Wilcoxon signed rank test, compared to chance level; \$: $p=0.035$ for WT mice and $p=0.089$ for tPA Null mice). (K) tPA Null mice make significantly more errors than WT mice (Unpaired t-test; $p=0.003$). (J) Average heatmaps of the time spent in the BM during the probe test between the two groups (mean heatmaps of 10 animals/group). Data are presented as mean+SD (ns: $p > 0.05$; *: $p < 0.05$; **: $p < 0.001$; N=20 in both genotype).

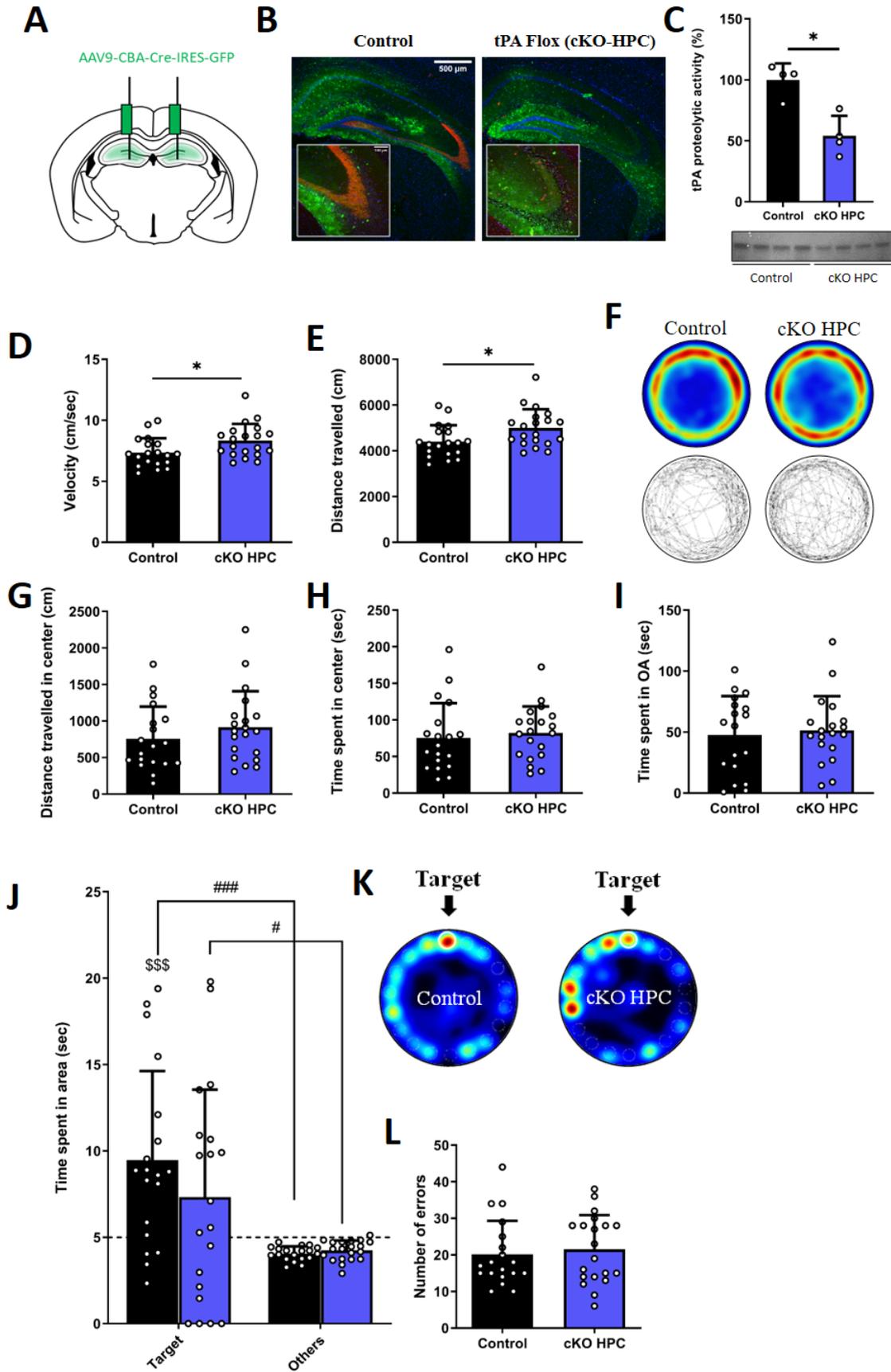


Figure 2: Conditional deletion of tPA in the hippocampus (cKO-HPC) leads to mild spatial cognitive deficits and locomotor hyperactivity.

(A) Bilateral stereotaxic injection of AAV9-CBA-Cre-GFP in the dentate gyrus of WT and tPA Flox mice. (B) Immunohistochemistry staining for GFP (green), tPA (red) and DAPI (blue) in coronal sections. (C) Fibrin-agar zymography showing tPA activity in the hippocampus of control and cKO-HPC mice (Mann Whitney test, $p=0.028$, $n=4$ per group). (D, E, F) cKO-HPC mice have a locomotor hyperactivity in the OF (Unpaired t-test; velocity: $p=0.021$, D; total distance travelled: $p=0.022$, E). (F) Average heatmaps and representative tracks in the OF for control and cKO-HPC mice. (G, H, I) tPA deletion in the hippocampus does not affect anxiety (Unpaired t-test; distance travelled in center: $p=0.29$, G; time spent in center: $p=0.62$, H; time spent in open arms: $p=0.38$, I). (J, K, L) cKO-HPC mice have cognition performances similar to control mice in the BM task. (J) Intragroup comparison of the time spent in target area compared to others areas (Wilcoxon test: ###: $p=0.0001$ for control mice; #: $p=0.021$ for cKO-HPC mice). Statistical analysis of target hole preference compared to chance level (One sample Wilcoxon signed rank test, compared to chance level; \$\$\$: $p=0.0007$ for control mice and $p=0.07$ for cKO-HPC mice). (L) Number of errors during the probe test of the BM (Unpaired T-test; $p=0.64$). (K) Average heatmaps of the time spent in the BM during the probe test between the two groups (mean heatmaps of 6 animals/group). Data are presented as mean+SD (ns: $p > 0.05$; *: $p < 0.05$; **: $p < 0.001$; $n=19$ Control; $n=20$ cKO-HPC).

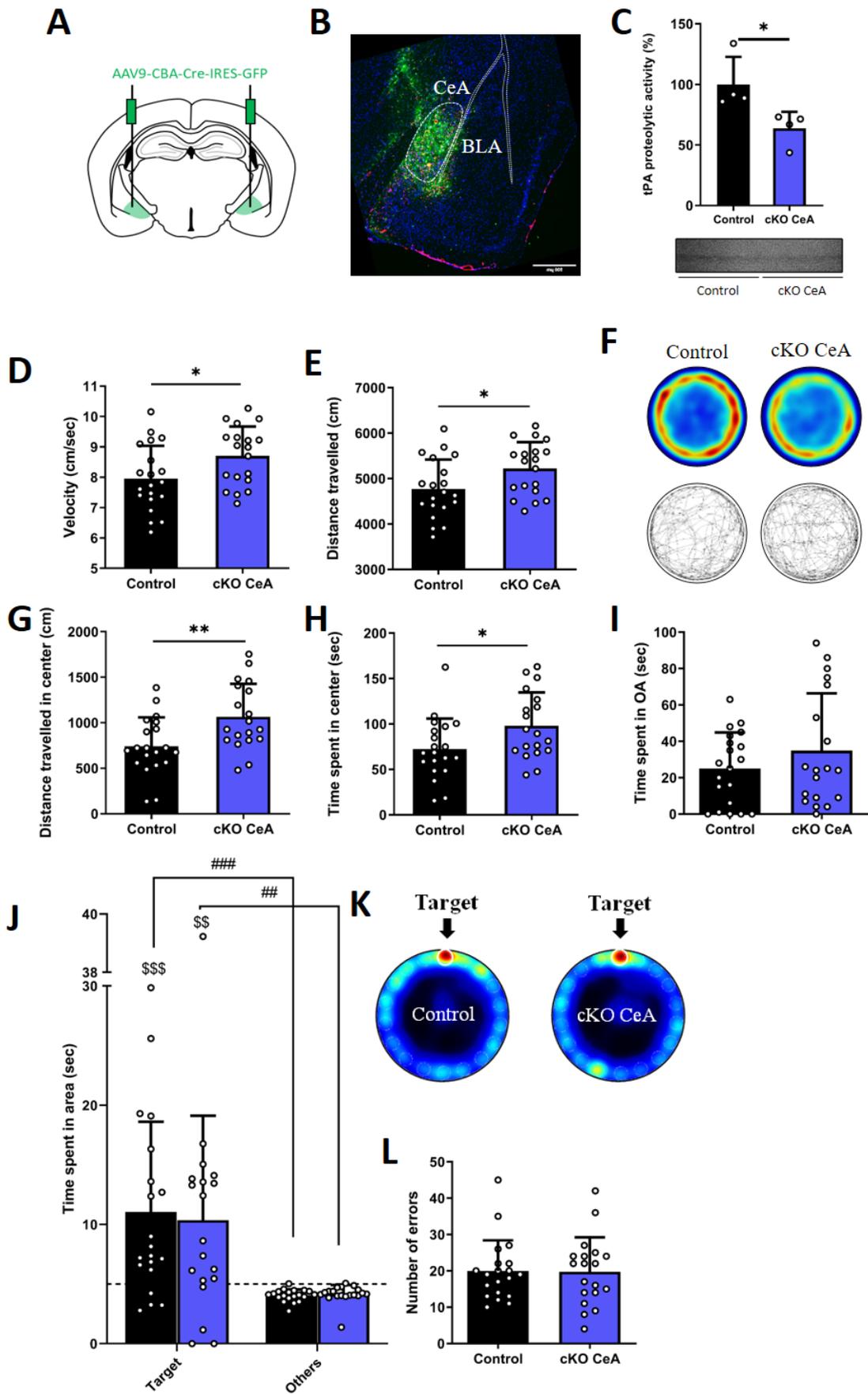


Figure 3: Conditional deletion of tPA in the CeA (cKO-CeA) leads to an anxiolytic-like phenotype and a locomotor hyperactivity.

(A) Bilateral stereotaxic injection of AAV9-CBA-Cre-GFP in the CeA of WT and tPA Flox mice. (B) Immunohistochemistry staining for GFP (green), Cre (red) and DAPI (blue) in coronal sections. (C) Fibrin-agar zymography showing tPA activity in the CeA of control and cKO-CeA mice (Mann Whitney test, $p=0.028$, $n=4$ per group). (D, E, F) cKO-CeA mice have a locomotor hyperactivity in the open-field test (Unpaired t-test; velocity: $p=0.028$, D; total distance travelled: $p=0.028$, E). (F) Average heatmaps and representative tracks in the OF for control and cKO-CeA mice. (G, H, I) tPA deletion in CeA induces an anxiolytic-like phenotype in the OF (Unpaired t-test; distance travelled in center: $p=0.005$, G; time spent in center: $p=0.027$, H). (I) The anxiety state is not affected in the OM (Mann Whitney test; time spent in open arms: $p=0.27$). (J, K, L) cKO-CeA mice have cognition performances similar to controls in the BM task. (J) Intragroup comparison of the time spent in target area compared to others areas (Wilcoxon test; ###: $p < 0.0001$ for control mice; ##: $p=0.004$ for cKO-CeA mice). Statistical analysis of target hole preference compared to chance level (One sample Wilcoxon signed rank test, compared to chance level; \$\$\$: $p=0.0005$ for control mice and \$\$: $p=0.0052$ for cKO-CeA mice). (L) Number of errors during the probe test of the BM (Mann Whitney unpaired-test; $p=0.85$). (K) Average heatmaps of the time spent in the BM during the probe test between the two groups (mean heatmaps of 8 animals/group). Data are presented as mean+SD (ns: $p > 0.05$; *: $p < 0.05$; **: $p < 0.001$; $n=20$ Control; $n=19$ cKO-CeA).

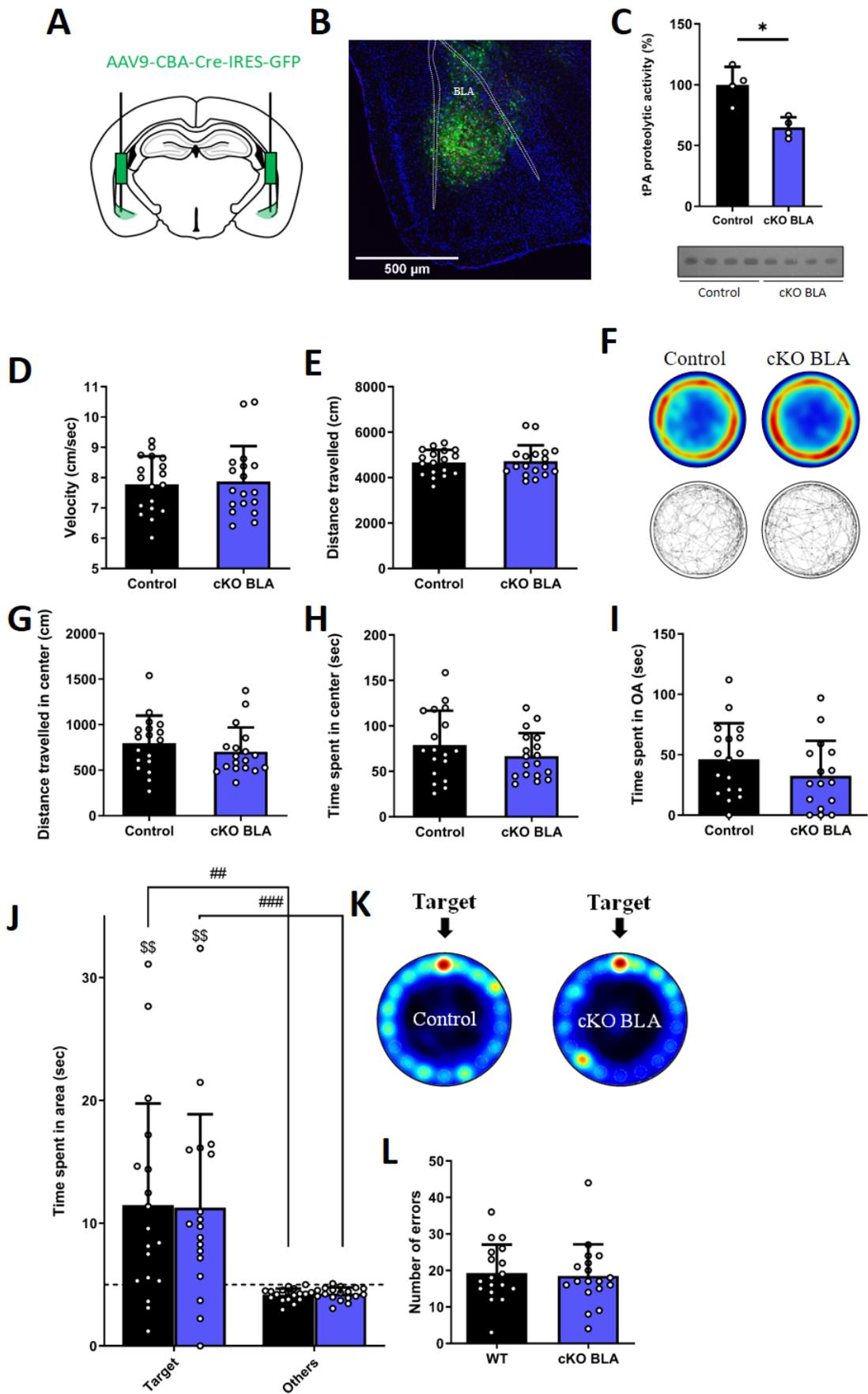


Figure 4: Conditional deletion of tPA in the BLA (cKO-BLA) does not affect behavioral phenotype and cognition performance. (A) Bilateral stereotaxic injection of AAV9-CBA-Cre-GFP in the BLA of WT and tPA Flox mice. (B) Immunohistochemistry staining for GFP (green), Cre (red) and DAPI (blue) in coronal sections. (C) Fibrin-agar zymography showing tPA activity in the BLA of control and cKO-BLA mice (Mann Whitney test, $p=0.028$, $n=4$ per group). (D, E) Deletion of tPA in the BLA does not affect locomotor activity in the OF test Unpaired t-test; velocity: $p=0.79$; distance travelled: $p=0.80$). (F) Average heatmaps and representative tracks in the OF for control and cKO-BLA mice. (G, H, I) tPA deletion in BLA does not affect the anxiety state in the OF (Unpaired t-test; distance travelled in center: $p=0.33$, G; time spent in center: $p=0.26$, H) or in the OM (Mann Whitney unpaired test; time spent in open arms: $p=0.18$, I). (J, K, L) cKO-BLA have cognition performances similar to controls in the BM task. (J) Intragroup comparison of the time spent in target area compared to others areas (Wilcoxon test; ##: $p=0.0013$ for control mice; ###: $p=0.0007$ for cKO-BLA mice). Statistical analysis of target hole preference compared to chance level (One sample Wilcoxon signed rank test, compared to chance level; \$\$: $p=0.001$ for control mice and \$\$\$ $p=0.001$ for cKO-BLA mice). (L) Number of errors during the probe test of the BM (Mann Whitney unpaired test; $p=0.78$). (K) Average heatmaps of the time spent in the BM during the probe test between the two groups (mean heatmaps of 10 animals/group). Data are presented as mean+SD (ns: $p > 0.05$; *: $p < 0.05$; **: $p < 0.001$; $n=18$ Control; $n=18$ cKO-BLA).

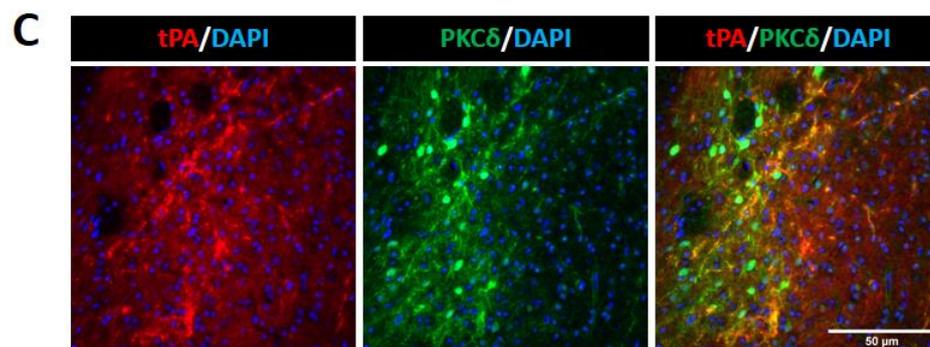
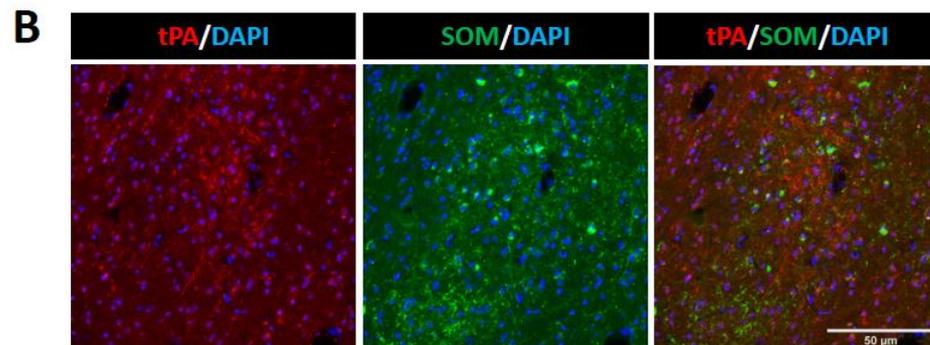
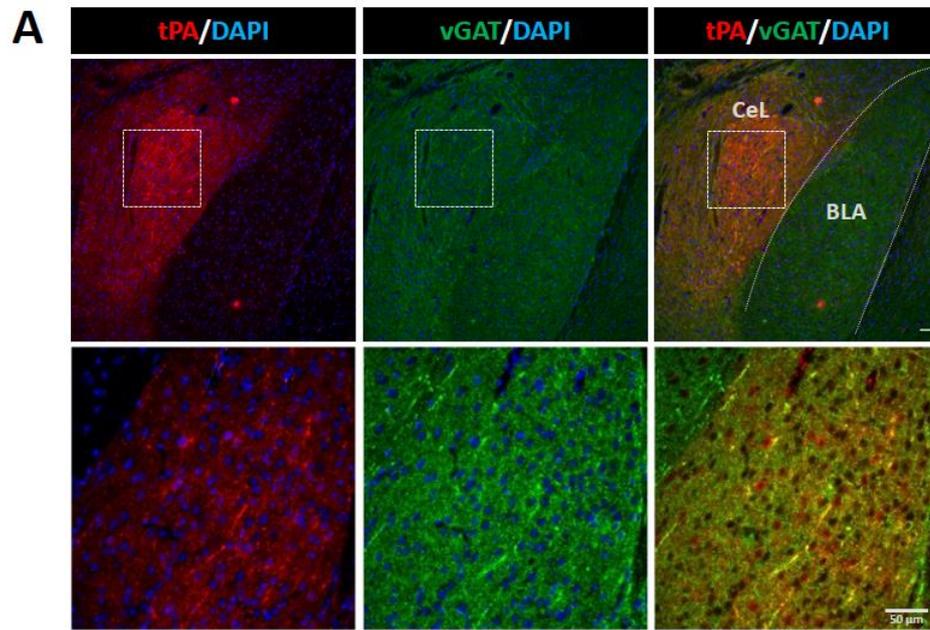


Figure 5: tPA colocalizes with PKC δ -positive interneurons in the CeA.

(A) Immunohistochemistry of tPA (red) and the vesicular GABA transporter vGAT (green) in the amygdala nuclei. tPA positive neuronal processes co-localized with vGAT within the CeA. (B) Co-immunohistochemistry of somatostatin interneurons (SOM; green) and tPA (red) in the CeA did not reveal tPA and SOM interneurons co-labelling. (C) Co-immunohistochemistry of PKC δ interneurons (green) and tPA (red) in the CeA. tPA positive neuronal processes co-localized with PKC δ .

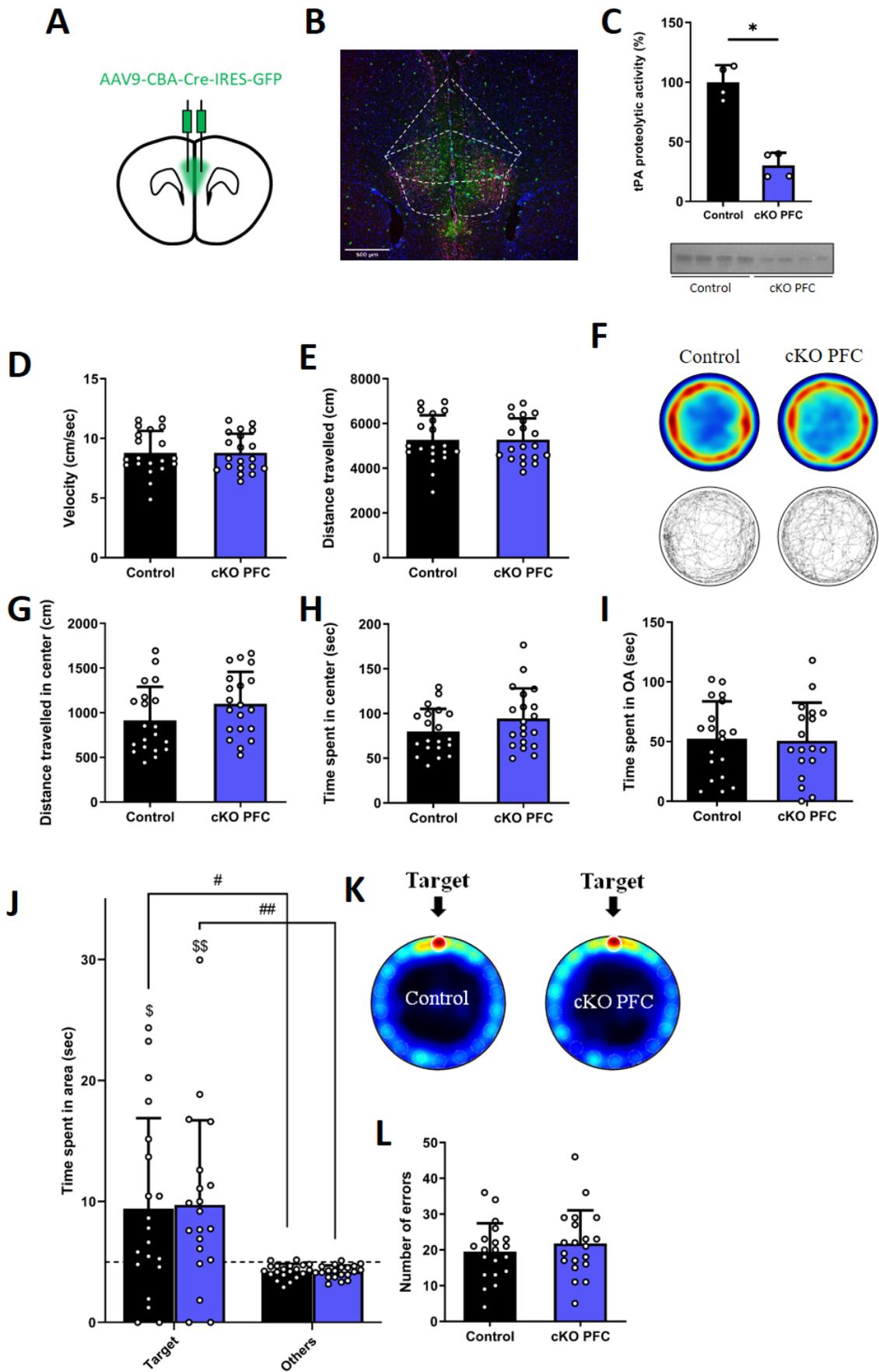


Figure S1: cKO-PFC mice have a behavioral phenotype and cognition performances similar to controls.

(A) Bilateral stereotaxic injection of AAV9-CBA-Cre-GFP in the mPFC of WT and tPA Flox mice. (B) Immunohistochemistry staining for GFP (green), Cre (red) and DAPI (blue) in coronal sections. (C) Fibrin-agar zymography showing tPA activity in the mPFC of control and cKO-PFC mice (Mann Whitney test, $p=0.028$, $n=4$ per group). (D, E, F) Deletion of tPA in the mPFC does not affect locomotor activity in the open-field (Unpaired t-test; velocity: $p=0.98$, D; total distance travelled: $p=0.99$, E). (F) Average heatmaps and representative tracks in the OF for control and cKO-PFC mice. (G, H, I) tPA deletion in mPFC does not affect the anxiety state in the OF (Unpaired t-test; distance travelled in center: $p=0.12$, G; time spent in center: $p=0.13$, H) or in the OM (Unpaired t-test; time spent in open arms: $p=0.74$, I). (J, K, L) cKO-PFC have cognition performances similar to controls in the BM task. (J) Intragroup comparison of the time spent in target area compared to others areas (Wilcoxon test; $p=0.011$ for control mice; $p=0.002$ for cKO-PFC mice). (L) Number of errors during the probe test of the BM (Unpaired T-test; $p=0.40$). (K) Representative heatmap of the time spent in the BM during the probe test between the two groups (mean heatmaps of 12 animals/group). Data are presented as mean+SD (ns: $p < 0.05$; *: $p < 0.05$; **: $p < 0.001$; $n=20$ Control; $n=20$ cKO-PFC).

REFERENCES

- Akassoglou, K., Kombrinck, K. W., Degen, J. L., and Strickland, S. (2000). Tissue plasminogen activator-mediated fibrinolysis protects against axonal degeneration and demyelination after sciatic nerve injury. *J. Cell Biol.* doi:10.1083/jcb.149.5.1157.
- Bahi, A., and Dreyer, J. L. (2012). Hippocampus-specific deletion of tissue plasminogen activator “tPA” in adult mice impairs depression- and anxiety-like behaviors. *Eur. Neuropsychopharmacol.* 22, 672–682. doi:10.1016/j.euroneuro.2012.01.008.
- Beaudreau, S. A., and OHara, R. (2008). Late-life anxiety and cognitive impairment: A review. *Am. J. Geriatr. Psychiatry* 16, 790–803. doi:10.1097/JGP.0b013e31817945c3.
- Benchenane, K., Castel, H., Boulouard, M., Bluthé, R., Fernandez-Monreal, M., Roussel, B. D., et al. (2007). Anti-NR1 N-terminal-domain vaccination unmasks the crucial action of tPA on NMDA-receptor-mediated toxicity and spatial memory. *J. Cell Sci.* 120, 578–585. doi:10.1242/jcs.03354.
- Bennur, S., Shankaranarayana Rao, B. S., Pawlak, R., Strickland, S., McEwen, B. S., and Chattarji, S. (2007). Stress-induced spine loss in the medial amygdala is mediated by tissue-plasminogen activator. *Neuroscience* 144, 8–16. doi:10.1016/j.neuroscience.2006.08.075.
- Cai, H., Haubensak, W., Anthony, T. E., and Anderson, D. J. (2014). Central amygdala PKC- δ + neurons mediate the influence of multiple anorexigenic signals. *Nat. Neurosci.* 17, 1240–1248. doi:10.1038/nn.3767.
- Calabresi, P., Napolitano, M., Centonze, D., Marfia, G. A., Gubellini, P., Teule, M. A., et al. (2000). Tissue plasminogen activator controls multiple forms of synaptic plasticity and memory. *Eur. J. Neurosci.* 12, 1002–1012. doi:10.1046/j.1460-9568.2000.00991.x.
- Collen, D., and Lijnen, H. R. (1991). Basic and clinical aspects of fibrinolysis and thrombolysis. *Blood*. doi:10.1182/blood.v78.12.3114.bloodjournal78123114.
- Gilpin, N. W., Herman, M. A., and Roberto, M. (2015). The Central Amygdala as an Integrative Hub for Anxiety and Alcohol Use Disorders. *Biol. Psychiatry* 77, 859–869. doi:10.1016/j.biopsych.2014.09.008.
- GoodSmith, D., Chen, X., Wang, C., Kim, S. H., Song, H., Burgalossi, A., et al. (2017). Spatial Representations of Granule Cells and Mossy Cells of the Dentate Gyrus. *Neuron* 93, 677-690.e5. doi:10.1016/j.neuron.2016.12.026.
- Hayashi, T., Yoshida, T., Ra, M., Taguchi, R., and Mishina, M. (2013). IL1RAPL1 Associated with Mental Retardation and Autism Regulates the Formation and Stabilization of Glutamatergic Synapses of Cortical Neurons through RhoA Signaling Pathway. *PLoS One* 8. doi:10.1371/journal.pone.0066254.
- Hébert, M., Anfray, A., Chevilly, A., Martinez De Lizarrondo, S., Quenault, A., Louessard, M., et al. (2017). Distant Space Processing is Controlled by tPA-dependent NMDA Receptor Signaling in the Entorhinal Cortex. *Cereb. Cortex*. doi:10.1093/cercor/bhw275.
- Henze, D. A., Wittner, L., and Buzsáki, G. (2002). Single granule cells reliably discharge targets in the hippocampal CA3 network in vivo. *Nat. Neurosci.* 5, 790–795. doi:10.1038/nn887.

- Huang, Y. Y., Bach, M. E., Lipp, H. P., Zhuo, M., Wolfer, D. P., Hawkins, R. D., et al. (1996). Mice lacking the gene encoding tissue-type plasminogen activator show a selective interference with late-phase long-term potentiation in both Schaffer collateral and mossy fiber pathways. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 93, 8699–8704. doi:10.1073/pnas.93.16.8699.
- Hunt, S., Sun, Y., Kucukdereli, H., Klein, R., and Sah, P. (2017). Intrinsic circuits in the lateral central amygdala. *eNeuro* 4. doi:10.1523/ENEURO.0367-16.2017.
- Kheirbek, M. A., Drew, L. J., Burghardt, N. S., Costantini, D. O., Tannenholz, L., Ahmari, S. E., et al. (2013). Differential control of learning and anxiety along the dorsoventral axis of the dentate gyrus. *Neuron* 77, 955–968. doi:10.1016/j.neuron.2012.12.038.
- Krizo, J. A., Moreland, L. E., Rastogi, A., Mou, X., Prosser, R. A., and Mintz, E. M. (2018). Regulation of Locomotor activity in fed, fasted, and food-restricted mice lacking tissue-type plasminogen activator. *BMC Physiol.* 18, 2. doi:10.1186/s12899-018-0036-0.
- Leutgeb, J. K., Leutgeb, S., Moser, M. B., and Moser, E. I. (2007). Pattern separation in the dentate gyrus and CA3 of the hippocampus. *Science* (80-.). 315, 961–966. doi:10.1126/science.1135801.
- Louessard, M., Lacroix, A., Martineau, M., Mondielli, G., Montagne, A., Lesept, F., et al. (2016). Tissue Plasminogen Activator Expression Is Restricted to Subsets of Excitatory Pyramidal Glutamatergic Neurons. *Mol. Neurobiol.* 53, 5000–5012. doi:10.1007/s12035-015-9432-7.
- Madani, R., Hulo, S., Toni, N., Madani, H., Steimer, T., Muller, D., et al. (1999). Enhanced hippocampal long-term potentiation and learning by increased neuronal expression of tissue-type plasminogen activator in transgenic mice. *EMBO J.* 18, 3007–3012. doi:10.1093/emboj/18.11.3007.
- Matys, T., Pawlak, R., Matys, E., Pavlides, C., McEwen, B. S., and Strickland, S. (2004). Tissue plasminogen activator promotes the effects of corticotropin-releasing factor on the amygdala and anxiety-like behavior. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 101, 16345–16350. doi:10.1073/pnas.0407355101.
- Matys, T., Pawlak, R., and Strickland, S. (2005). Tissue plasminogen activator in the bed nucleus of stria terminalis regulates acoustic startle. *Neuroscience* 135, 715–722. doi:10.1016/j.neuroscience.2005.06.076.
- Neves, G., Cooke, S. F., and Bliss, T. V. P. (2008). Synaptic plasticity, memory and the hippocampus: A neural network approach to causality. *Nat. Rev. Neurosci.* 9, 65–75. doi:10.1038/nrn2303.
- Obiang, P., Macrez, R., Jullienne, A., Bertrand, T., Lesept, F., Ali, C., et al. (2012). GluN2D subunit-containing NMDA receptors control tissue plasminogen activator-mediated spatial memory. *J. Neurosci.* 32, 12726–12734. doi:10.1523/JNEUROSCI.6202-11.2012.
- Obiang, P., Maubert, E., Bardou, I., Nicole, O., Launay, S., Bezin, L., et al. (2011). Enriched housing reverses age-associated impairment of cognitive functions and tPA-dependent maturation of BDNF. *Neurobiol. Learn. Mem.* doi:10.1016/j.nlm.2011.03.004.
- Oh, S. B., Byun, C. J., Yun, J. H., Jo, D. G., Carmeliet, P., Koh, J. Y., et al. (2014). Tissue plasminogen activator arrests Alzheimer's disease pathogenesis. *Neurobiol. Aging* 35, 511–519. doi:10.1016/j.neurobiolaging.2013.09.020.

Pang, P. T., and Lu, B. (2004). Regulation of late-phase LTP and long-term memory in normal and aging hippocampus: Role of secreted proteins tPA and BDNF. *Ageing Res. Rev.* 3, 407–430. doi:10.1016/j.arr.2004.07.002.

Pang, P. T., Teng, H. K., Zaitsev, E., Woo, N. T., Sakata, K., Zhen, S., et al. (2004). Cleavage of proBDNF by tPA/plasmin is essential for long-term hippocampal plasticity. *Science* (80-.). doi:10.1126/science.1100135.

Parcq, J., Bertrand, T., Montagne, A., Baron, A. F., MacRez, R., Billard, J. M., et al. (2012). Unveiling an exceptional zymogen: The single-chain form of tPA is a selective activator of NMDA receptor-dependent signaling and neurotoxicity. *Cell Death Differ.* 19, 1983–1991. doi:10.1038/cdd.2012.86.

Parfitt, G. M., Nguyen, R., Bang, J. Y., Aqrabawi, A. J., Tran, M. M., Seo, D. K., et al. (2017). Bidirectional Control of Anxiety-Related Behaviors in Mice: Role of Inputs Arising from the Ventral Hippocampus to the Lateral Septum and Medial Prefrontal Cortex. *Neuropsychopharmacology* 42, 1715–1728. doi:10.1038/npp.2017.56.

Pawlak, R., Magarinos, A. M., Melchor, J., McEwen, B., and Strickland, S. (2003). Tissue plasminogen activator in the amygdala is critical for stress-induced anxiety-like behavior. *Nat. Neurosci.* 6, 168–174. doi:10.1038/nn998.

Pawlak, R., Nagai, N., Urano, T., Napiorkowska-Pawlak, D., Ihara, H., Takada, Y., et al. (2002). Rapid, specific and active site-catalyzed effect of tissue-plasminogen activator on hippocampus-dependent learning in mice. *Neuroscience*. doi:10.1016/S0306-4522(02)00166-5.

Pilz, G.-A., Carta, S., Stäuble, A., Ayaz, A., Jessberger, S., and Helmchen, F. (2016). Systems/Circuits Functional Imaging of Dentate Granule Cells in the Adult Mouse Hippocampus. doi:10.1523/JNEUROSCI.3065-15.2016.

Piton, A., Gauthier, J., Hamdan, F. F., Lafrenière, R. G., Yang, Y., Henrion, E., et al. (2011). Systematic resequencing of X-chromosome synaptic genes in autism spectrum disorder and schizophrenia. *Mol. Psychiatry* 16, 867–880. doi:10.1038/mp.2010.54.

Rolls, E. T. (2013). The mechanisms for pattern completion and pattern separation in the hippocampus. *Front. Syst. Neurosci.* 7, 74. doi:10.3389/fnsys.2013.00074.

Roseberry, T. K., Lalive, A., Margolin, B., and Kreitzer, A. C. (2019). Locomotor suppression by a monosynaptic amygdala to brainstem circuit. *bioRxiv*, 724252. doi:10.1101/724252.

Stevenson, T. K., and Lawrence, D. A. (2018a). Characterization of tissue plasminogen activator expression and trafficking in the adult murine brain. *eNeuro* 5. doi:10.1523/ENEURO.0119-18.2018.

Szabo, R., Samson, A. L., Lawrence, D. A., Medcalf, R. L., and Bugge, T. H. (2016). Passenger mutations and aberrant gene expression in congenic tissue plasminogen activator-deficient mouse strains. *J. Thromb. Haemost.* doi:10.1111/jth.13338.

Teesalu, T., Kulla, A., Asser, T., Koskiniemi, M., and Vaheri, A. (2002). Tissue plasminogen activator as a key effector in neurobiology and neuropathology. *Biochem. Soc. Trans.* 30, 183–189. doi:10.1042/bst0300183.

Ye, J., and Veinante, P. (2019). Cell-type specific parallel circuits in the bed nucleus of the stria terminalis and the central nucleus of the amygdala of the mouse. *Brain Struct. Funct.* 224, 1067–1095. doi:10.1007/s00429-018-01825-1.

Zhuo, M., Holtzman, D. M., Li, Y., Osaka, H., DeMaro, J., Jacquin, M., et al. (2000). Role of tissue plasminogen activator receptor LRP in hippocampal long-term potentiation. *J. Neurosci.* 20, 542–549. doi:10.1523/jneurosci.20-02-00542.2000.

Article 2

tPA originating from parvalbumin interneurons controls the remodeling of perineuronal nets

(in preparation)

Matthieu Lépine^{1*}, Sara Douceau^{1*}, Gabrielle Devienne², Paul Prunotto¹, Sophie Lenoir¹, Laurent Lebouvier¹, Yannick Hommet¹, Véronique Agin¹, Bertrand Lambolez², Bruno Cauli², Carine Ali^{*1}, Denis Vivien^{*1,3}

¹Normandie Univ, UNICAEN, INSERM, INSERM UMR-S U1237, Physiopathology and Imaging of Neurological Disorders, Institut Blood and Brain @ Caen-Normandie, Cyceron, Caen, 14000, France.

²Neuroscience Paris Seine - Institut de Biologie Paris Seine (NPS - IBPS), Sorbonne Université UM119, CNRS UMR8246, INSERM U1130, 75005 Paris, France

³Department of clinical research, Caen-Normandie Hospital (CHU), Caen, France

* Authors with equal contribution

Corresponding author: Pr. Carine Ali

INSERM U1237, GIP Cyceron, boulevard Becquerel, 14074 Caen, France.

Tel: +33231470265; email: ali@cyceron.fr

ABSTRACT

Tissue plasminogen activator (tPA) is a multifaceted mediator of brain pathophysiology. Understanding how this protease can exert so many functions requires deciphering its cellular and molecular targets, as well as its cellular origin. In this study, we first used in the mouse brain an AAV-driven strategy, to deliver a construct encoding for a GFP under the control of the plat promoter. We thus identified that in addition to glutamatergic neurons in the cortex, some interneurons also express tPA. Combining immunohistology, electrophysiology and single cell-RT-PCR allowed identifying fast-spiking parvalbumin (FS-PV) interneurons as a source of tPA *in vivo*. FS-PV are key players in the balance between excitatory and inhibitory neurotransmission, as well as in brain plasticity. These features are partly attributable to their wrapping in a specialized extracellular matrix, the perineuronal nets (PNNs). We found that mice specifically lacking tPA in FS-PV neurons display denser PNNs, thus identifying tPA as an endogenous protease responsible for PNNs remodeling. *In vitro* analyses supported this hypothesis, and allowed the demonstration that tPA converts plasminogen into active plasmin, which in turn, directly degrades aggrecan, a major chondroitin sulfate proteoglycans contained in PNNs. The discovery of this mechanistic pathway sustaining PNNs remodeling opens interesting insights into the control of brain circuitry and plasticity.

Key words: fast-spiking parvalbumin interneurons, tissue-type plasminogen activator, perineuronal nets.

Abbreviations: tPA: tissue-type plasminogen activator; PV: parvalbumin; FS-PV: fast-spiking parvalbumin; PNNs: perineuronal nets; CSPG: chondroitin sulfate proteoglycans; ECM: extracellular matrix; DIV: days *in vitro*; AAV: adeno-associated virus; GFP: green fluorescent protein; RT-PCR: reverse transcriptase polymerase chain reaction.

INTRODUCTION

Tissue-type plasminogen activator (tPA) is well-known in the (neuro-)vascular clinical community as being the major enzymatic activator of plasminogen, thus promoting vascular fibrinolysis. But tPA is far more than just a fibrinolytic. As reviewed recently (Thiebaut et al., 2018), tPA's actions in the central nervous system can be plasminogen-independent (and even protease-independent), and the ever growing list of its receptors/partners includes low-density lipoprotein receptor-related proteins (LRPs), N-methyl-D-aspartate receptor (NMDAR), some growth factor precursors, annexin 2, epidermal growth factor receptors (EGFRs) or grp78. Via these multiple partners, tPA stands as a key player of important physiological and pathological processes in the central nervous system (for recent reviews see Thiebaut et al., 2018; Zhu et al., 2019). For instance, during development, tPA controls neuronal migration (Pasquet et al., 2019) and promotes axonal growth/synaptic plasticity (Sumi et al., 1992; Qian et al., 1993; Baranes et al., 1998; Pu et al., 2019). Later in life, tPA is described to modulate learning and memory processes (Madani et al., 1999; Benchenane et al., 2007; Hébert et al., 2017). Under pathological circumstances, tPA controls neuronal death/survival (Nicole et al., 2001; Liot et al., 2006; Wu et al., 2012; Louessard et al., 2017), anxiety behavior (Pawlak et al., 2003; Matys et al., 2004) or neuroinflammation and blood-brain barrier permeabilization (Siao and Tsirka, 2002; Su et al., 2008; Macrez et al., 2016; Mehra et al., 2020).

While functional studies abound, clear and consensual descriptions on the cellular and subcellular distribution of tPA in the CNS are lacking. So far, the expression of tPA by endothelial cells, oligodendrocytes, and hippocampal neurons seems well admitted (Louessard et al., 2016; Leonetti et al., 2017; Stevenson and Lawrence, 2018a). Microglia and astrocytes are discussed as sources of tPA under physiological conditions but might be under pathological conditions (Adhami et al., 2008; Wang et al., 2009). While hippocampal mossy fibers are easily immunostained for tPA, blocking axo-dendritic transport with colchicine is necessary to reveal immunopositive cortical fibers (Louessard et al., 2016). In addition, electrophysiological and transcriptional analyses have shown the expression of tPA in a subset of pyramidal neurons in several cerebral cortices (Louessard et al., 2016). This confirms a previous study showing tPA staining in neurons expressing neurogranin, a putative marker of excitatory neurons (Chu et al., 2015). By using a transgenic mouse line expressing a tPA/cerulean-fluorescent protein fusion protein, Stevenson and Lawrence (2018) reported the existence of a subclass of somatostatin (Sst) interneurons with tPA positive somas in the stratum oriens-lacunosum moleculare of the hippocampus (Stevenson and Lawrence, 2018). This contrasts with Chu's observations who found no staining in Sst interneurons in the cortex (Chu et al., 2015). This last study also suggested an expression of tPA by parvalbumin positive interneurons, but overall, convincing data to determine which interneuron subpopulations express tPA are sparse.

Parvalbumin interneurons are the most abundant subtype of interneurons (Lim et al., 2018). They are featured by a high discharge frequency of fast action potentials, explaining their name, fast-spiking parvalbumin neurons (FS-PV). They sustain most of the axo-somatic inhibition of pyramidal neurons. Another peculiarity of FS-PV is their experience-driven enwrapping by a specific form of extracellular matrix (ECM), composed of chondroitin sulfate proteoglycans (CSPGs) organized into dense lattice-like structures, termed perineuronal nets (PNNs) (Fawcett et al., 2019; Testa et al., 2019).

Understanding the metabolism of PNNs is crucial, as accumulating evidence show its impact on the reciprocal control between pyramidal neurons and FS-PV. Indeed, up-regulation of PNNs or its degradation profoundly affect synaptic plasticity during development or pathological conditions

(Pizzorusso et al., 2002; Bartoletti et al., 2004; Wang and Fawcett, 2012; Devienne et al., 2019; Murthy et al., 2019; Shi et al., 2019; Alaiyed et al., 2020). PNN (re)modelings occur in plastic periods: their formation/condensation closes developmental plastic periods, while their degradation reopens plasticity. Monocular deprivation has been an extremely helpful paradigm to study PNNs remodeling and to identify matrix metalloproteinase 9 (MMP9) as an endogenous protease involved in PNNs plasticity (Kelly et al., 2015; Wen et al., 2018). The expression and activity of tPA increase after sensorial deprivation and are thought to participate in plasticity in this process (Müller and Griesinger, 1998; Mataga et al., 2002, 2004; Chen et al., 2015). However, in these studies, no evidence link tPA-driven plasticity to PNNs.

In the present study, using an *in vivo* tPA reporter gene, electrophysiology and single cell RT-PCR, in mice, we first ascertain the expression of tPA in cortical GABAergic neurons, mostly FS-PV interneurons. On this basis, we developed *in vitro* (primary cultures of interneurons) and *in vivo* approaches (conditional tPA deficient mice in FS-PV neurons) to understand the impact of tPA originating from FS-PV interneurons on PNNs plasticity.

MATERIALS AND METHODS

Animals:

All experiments were conducted in accordance with the French ethical law (Decree 2013-118) and the European Communities Council guidelines (2010/63/EU). Protocols were approved by our local ethics committee dependent on the French Ministry of Research and Higher Education (agreement numbers Cenomexa #10959 and Ce5/2012/062). All applicable international, national, and/or institutional guidelines for the care and use of animals were followed. Experiments were performed on G42 transgenic mice (Jackson laboratories #007677, GAD67-GFP, Chattopadhyaya et al., 2004), 8 weeks old male Swiss mice, tPAFlox^{+/+} mice, tPAFlox^{+/+}; PV-Cre^{+/-} mice and their Control (tPAFlox^{-/-}; PV-Cre^{+/-}) littermates (20-25g). Pregnant tPA Null mice and their WT littermates at gestational day 14 were used for *in vitro* neuronal cultures.

Animals were housed with a 12-h light/12-h dark cycle with free access to water and food.

tPA Null mice were generated by the Mouse Clinical Institute (ICS, Illkirch, France). Briefly tPAFlox^{+/+} mice (on a C57BL6J genetic background) in which exon 3 is flanked by loxP sites (see Pasquet et al., 2018) were crossed with CMV-Cre mice to induce Cre-mediated excision of the third exon in germline. Mice were genotyped by PCR analysis and southern blots, using tail genomic DNA samples, to detect the presence/absence of loxP sequences. PV-Cre^{+/+} female mice (Jackson laboratory # 008069, Pvalbtm1(cre)Arbr, Hippenmeyer et al., 2005) were crossed with tPAFlox^{+/+} males mice to generate tPAFlox^{+/+}; PV-Cre^{+/-} (cKO) and their control littermates tPAFlox^{-/-}; PV-Cre^{+/-}. PCR genotyping using primer to detect both loxP sites and Cre transgene.

Whole-Cell Recordings in Acute Slices:

G42 mice were deeply anesthetized with isoflurane. After decapitation, brains were quickly removed and placed into ice-cold oxygenated artificial cerebrospinal fluid (aCSF) containing (in mM): 126 NaCl, 2.5 KCl, 1.25 NaH₂PO₄, 2 CaCl₂, 1 MgCl₂, 26 NaHCO₃, 10 glucose, 15 sucrose, and 1 kynurenic acid (Sigma). Coronal slices (300 μm thick) containing the primary visual cortex were cut with a vibratome (VT1000S; Leica) and allowed to recover at room temperature for at least 30min in aCSF saturated with O₂/CO₂ (95 %/5 %). Patch pipettes (4–6 MΩ) pulled from borosilicate glass were filled with 8 μl of RNase free internal solution containing in (mM): 144 K-gluconate, 3 MgCl₂, 0.5 EGTA, 10 HEPES, pH 7.2 (285/295 mOsm). Whole-cell recordings were performed at room temperature using a patch-clamp amplifier (MultiClamp 700B, MDS). Membrane potentials were not corrected for liquid junction potential. Data were filtered at 10 kHz and digitized at 20 kHz using an acquisition board (Digidata 1440, MDS). Cells were set at -60 mV by continuous current injection and submitted to current pulses (800 ms, from -100 to 280 pA with 20 pA increments).

Cytoplasm Harvesting and scRT-PCR:

At the end of the whole-cell recording, lasting <15 min, the cytoplasmic content was harvested in the recording pipette. The pipette's content was expelled into a test tube and RT was performed in a final volume of 10 μL, as described previously (Lambolez et al., 1992). The scRT-PCR protocol was designed to probe simultaneously the expression of neuronal markers and key molecular elements including Tissue-type plasminogen activator gene, *Plat*. Two-steps amplification was performed essentially as described (Cauli et al., 1997; Devienne et al., 2018). Briefly, cDNAs present in the 10 μL reverse transcription reaction were first amplified simultaneously using all external primer pairs (Table 1). Taq polymerase (2.5 U; Qiagen) and 20 pmol of each primer were added to the buffer supplied by the manufacturer (final volume, 100 μl), and 20 cycles (94°C, 30 s; 60°C, 30 s; and 72°C, 35 s) of PCR were run. Second rounds of PCR were performed using 1 μl of the first PCR product as a template. In this second round, each amplicon was individually re-amplified using its specific nested primer pair (Table 1) by performing 35 PCR cycles as described above. Ten μL of each individual PCR product were run on a 2 % agarose gel stained with ethidium bromide using ΦX174 digested by *HaeIII* as a molecular weight marker.

Unsupervised clustering:

To classify cells, unsupervised clustering was performed using 16 molecular parameters (*VGlut1*, *Gad65*, *Gad67*, *PV*, *Akr1c18*, *Sst*, *S100β*, *APC*, *Mybpc1*, *Ncan*, *Plat*, *Plau*, *Ptprr*, *Ptprz1*, *Sdc4*, *Sema3a*). The presence of a given gene was digitized by 1 and its absence was digitized by 0. Ward-linkage hierarchical clustering (Ward Jr, 1963) was performed and plotted as a dendrogram using 'scipy.cluster.hierarchy' functions on Python 3.7. The final number of clusters was suggested by the Thorndike procedure (Thorndike, 1953) as described previously (Cauli et al., 2000).

Viral production:

Viral particles were provided by Gilles Bonvento and Alexis Bemelmans (INSERM U1169/MIRCen CEA, Fontenay aux Roses 92265, France).

The clone encoding for a GFP under the control of a 1.2-kb sequence of the Human Plat promoter (spanning from -1035 to +207 bp from the transcription start codon) was purchased from GeneCopoeia (pPlat-GFP; Catalog No.: HPRM12655-PF02). For the pPlat-Cre-GFP, the cDNA encoding for the Cre recombinase was subcloned by fusion into the pPlat-GFP (In-fusion HD cloning Kit Clontech-Takarabio). The pPlat-GFP and the pPlat-Cre-GFP were then subcloned in the pDONR221 for AAV production. All the constructs were amplified in *Escherichia coli* JM109 cells and purified by a Nucleobond endotoxin-free plasmid DNA PC 2000 kit (Macherey-Nagel) according to the manufacturer's instructions. The vector used for this study was an AAV9 serotype. Self-complementary AAV vectors expressing the Plat-GFP construct were produced by transfecting HEK293 cells with the adenovirus helper plasmid (pXX6-80), the AAV packaging plasmid carrying the rep2 and the cap8 genes, and the AAV2 shuttle plasmid containing the Plat-GFP transgene in a sc genome. Recombinant vectors (rAAV) were purified by ultracentrifugation on a discontinuous iodixaniol density gradient followed by dialysis against the formulation buffer of the vector stocks, 0.5 mmol/l MgCl₂ and 1.25 mmol/l KCl in phosphate-buffered saline (PBSMK; five buffer changes, 3 hours per round of dialysis). Physical particles were quantified by real-time PCR. Vector titers are expressed as viral genomes per milliliter (vg/mL).

Stereotaxic injection of AAV virus:

Animals were deeply anesthetized with isoflurane 5 %, and maintained with 2 % isoflurane in a 70 %/30 % mixture of NO₂/O₂ in a stereotaxic frame (Havard Apparatus). AAV9-Plat-GFP or AAV9-Plat-Cre-GFP (1.25.10¹³ vp/mL) were injected through a glass micropipette in the right hemisphere in a volume of 0.5 µL at a rate of 0.2 µL/min. Coordinates (relative to bregma) according to the Paxinos Mouse Brain Atlas were as follows: AP: -2 mm; ML: -1 mm; DV: -1.8 mm for the hippocampus and AP: -0.25 mm; ML: -3.4 mm; DV: -0.4 mm and -0.8 mm for the somatosensory cortex. The needle was left in position for a further 5 minutes and then removed slowly from the brain. After recovery from surgery, mice were left undisturbed for 3 weeks for effective and stable transgene expression.

Antibodies:

The following antibodies and/or lectins were used: rabbit anti-tPA (1:3000; generous gift from R. Lijnen, Leuven); mouse anti-NeuN (1:800, MAB377, Merck); anti-GFP (rabbit, 1:1000, ab6556, abcam or chicken, 1:1000, ab13970, abcam); chicken anti-Glial Fibrillary Acidic Protein (GFAP) (1:2000, ab4674, abcam); rabbit anti-Ionized calcium-binding adapter molecule-1 (Iba-1) (1:1000, 019-19741, Fujifilm); rabbit anti-GABA (1:500, A2052, Sigma Aldrich); anti-parvalbumin (rabbit, 1:3000, ab 11427, abcam or guinea pig, 1:500, GP72, Swant); rabbit anti-aggrecan (1:1000, AB1031, Merck); chicken anti-T-box brain 1 (Tbr1) (1:250, AB2261, Merck) or incubated with Biotinylated Hyaluronic Acid Binding Protein (HABP) (1:200, 385911, Merck) or Biotinylated Wisteria floribunda Agglutinin (WFA) (1:1000, L1516, Sigma Aldrich).

Immunohistochemistry:

Three weeks post-AAV injection, mice were deeply anesthetized with isoflurane 5 % in 70 %/30 % mixture of NO₂/O₂. A transcardial perfusion was performed with ice cold 0.9 % NaCl with 3 % heparin followed by 150 ml of fixative solution containing 4 % paraformaldehyde (in PBS 0.1M, pH 7.4). Brains were removed and cryoprotected in 20 % sucrose solution (in PBS 0.1M, pH 7.4) for 24h and frozen in Tissue-Tek (Miles Scientific). Cryostat sections of 10 µm were collected on Poly-Lysine slides and stored at -80°C. Sections were incubated overnight at room temperature with primary antibodies. Corresponding Fab'2-conjugated secondary antibodies were diluted at 1:800 (Jackson ImmunoResearch). Images were acquired using Leica DM6000 microscope-coupled CoolSnap camera, visualized with Metamorph 7.0 software (Molecular Devices), and further processed were realized using ImageJ software.

For 3D reconstruction, images were acquired using Leica TCS SP8 Confocal/STED 3 × microscope with an oil-immersion 40 ×, 1.44-N.A. objective at a resolution of 512×512 pixels with 572 Hz speed and a step size of 0.22µm.

Histological analysis:

For PNNs/PV cells quantification, 2 images per section were acquired (four sections per brain) on layers 4 et 5/6 of the somatosensory cortex. PNNs morphology was evaluated using an arbitrary scale ranging from High+ (strong WFA staining) to Low- (faint WFA staining). Only cells of which the soma was in the focal plane were classified. Analyses were performed blind to genotype.

Primary cultures of interneurons:

GABAergic interneurons derived from the medial ganglionic eminence (MGE) were prepared from fetal mice (embryonic day 14) as previously described (Franchi et al., 2018). Medial ganglionic eminences were dissected in HBSS (Hanks' Balanced Salt Solution, Gibco) /HEPES 10mM, incubated 15 min at 37°C in HBSS/HEPES with trypsin (0.05 %, Gibco) and DNase I (100 µg/mL, Worthington) and mechanically dissociated through a glass pipette. Then, cells were plated (425 000 cells/mL) on glass bottom microwell dishes (MatTek Corporation) or on 24 well plates (500 000 cells/mL) previously coated with poly-d-lysine (0.1 mg/mL, Sigma Aldrich, P6407-5MG) and laminin (0.02 mg/mL, Gibco) in Neurobasal medium (Life Technologies) containing 2 % B27 supplement (Life Technologies) and 1 % Glutamax (Life Technology). Cytosine β-D-arabinofuranoside hydrochloride (5 µM, Sigma Aldrich) was added at DIV3 and fresh medium was added at DIV7.

In vitro treatments:

Cells were treated at DIV14 with either 0.1 U/mL Chondroitinase ABC (Merck, C2905), 100 nM Human Glu-plasminogen (Enzyme Research Laboratories, HPg 2001), 200 nM Human Plasmin (Enzyme Research Laboratories, HPlasmin), 10 nM or 200 nM Human tPA (Actilyse®, Boehringer Ingelheim), 1.5 µM Aprotinin (Sigma Aldrich) or 60 nM recombinant Human TIMP3 (Origene, TP762069) for 24 hours.

Immunocytochemistry:

Cells were fixed during 10 min in 0.1 M PBS containing 4 % paraformaldehyde. After PBS washes, cells incubated for 1 h in PBS-Triton 0.25 % containing 1 % BSA and then incubated overnight at 4 °C in blocking buffer containing primary antibodies Confocal images were acquired with a Leica TCS SP8 Confocal/STED 3 × microscope with an oil-immersion 40 ×, 1.44-N.A. objective. Confocal images were taken at a resolution of 1024×1024 pixels with 400 Hz speed and a step size of 0.45µm. Lasers intensity, gain and offset were maintained constant in each analysis.

PNNs quantification in vitro:

Confocal images were analyzed with the ImageJ software. Random PV-positive cells were imaged with 160 × 160 × 15 µm z-stack with 0.45 µm step size. A threshold was applied to the WFA channel or aggrecan channel (range 0-255) and the area were quantified in 40 neurons from 4 independent experiments.

Matrix degradation assay:

Recombinant human aggrecan core protein G1-IGD-G2 (156nM) (Biotechne) was incubated at 37°C overnight with either 7.8 nM recombinant human ADAMTS4 protein (Biotechne), purified human plasmin (Enzyme Research Laboratories), Human Glu-plasminogen (Enzyme Research Laboratories) and/or tPA (Actilyse) in a buffer containing 50 mM Tris, 10mM CaCl₂, 150 mM NaCl and 0.05 % Brij35 78 nM Aprotinin treatment was applied with either Glu-plasminogen + tPA treatment or plasmin treatment. Digestion products were analyzed by SDS-PAGE on 10 % Tris-Glycine gel and stained with GelCode Imperial Blue Stain Reagent (Pierce).

Plasmin activity assay:

Plasmin activity was assessed with a specific plasmin fluorescent substrate (Sensolyte AFC Plasmin Activity Assay Kit; Ex/Em=380 nm/500 nm; Anaspec, Fremont, CA, USA). Live imaging was performed using a Leica TCS SP8 Confocal/STED microscope.

Statistics:

For sc-PCR analyses, between-group comparisons were performed using Mann–Whitney nonparametric test. Comparison of the occurrence of expressed genes between cell types was determined using Fisher's exact test. A p-value below 0.05 was considered statistically significant.

Otherwise, experiments were analyzed by investigators blinded to group allocation. Unblinding was made after completion of statistical analysis. All statistical analyses were performed using the GraphPad Prism 8 software. Comparisons between more than two independent samples were performed using two-tailed Kruskal-Wallis test and appropriate post-hoc test (Dunn's test). Mann-Whitney U-test was used for the comparisons of two independent samples. Plasmin activity was

analyzed using 2 way Anova (Two-stage linear step-up procedure of Benjamini, Krieger and Yekutieli). Recombinant aggrecan degradation was analyzed using one-sample t-test (theoretical value of 100 % for the 120 kDa fragment). A threshold of $P < 0.05$ was defined as statistically significant. All graph data are presented as the mean standard error mean (SEM). Sample sizes are indicated in each corresponding legend.

RESULTS

A tPA promoter-driven GFP unmasks the neuronal expression of tPA in vivo.

We first engineered a viral reporter construct, encoding for a green fluorescent protein (GFP) under the control of the human tPA (Plat) promoter (-1035 to +207 from the transcription start site) (AAV-Plat-GFP) (Fig. 1A). Three weeks after injection in the dentate gyrus (DG) of adult mice, a clear GFP staining is observed in the granular cells of the DG and in the corresponding mossy fibers in the CA3 subregion of the hippocampus (Fig. 1A). Interestingly, the GFP hippocampal signals match with a co-immunostaining using an antibody specific for tPA (Louessard et al., 2016; Fig. 1A). In order to validate the specificity of the Plat-GFP construct, tPAFlox^{+/+} mice (Pasquet et al., 2018) were injected in the DG with an AAV-Plat-Cre-GFP construct. As expected, Cre-GFP was detected in both granular cells of the DG and in the corresponding mossy fibers (Fig. 1B), while co-immunostaining for tPA was negative, confirming the efficient and specific conditional knock-out in tPAFlox^{+/+} mice but not in their wild type littermates. Thus, the AAV-Plat-GFP construct is thus a valid reporter of tPA expression in vivo.

tPA is expressed by GABAergic parvalbumin cortical neurons.

The cell subtypes expressing tPA, were identified by immunostainings three weeks after AAV-Plat-GFP infection of the somatosensory cortex of adult mice. GFP signals were detected in NeuN positive neuronal cells but neither in GFAP positive astrocytes nor in Iba-1 positive microglia, (these three cell types have been described as potential target of AAV9-driven infection; Maes et al., 2019; Merienne et al., 2013) (Fig. 2A). Even under inflammatory conditions (LPS treatment), neither reactive astrocytes nor reactive microglia expressed GFP, excluding the expression of tPA in these cell types (Supplementary Fig. 1).

Confirming our previous findings (Louessard et al., 2016), a subset of tPA-GFP⁺ neurons are excitatory glutamatergic neurons, as they express Tbr1 (Supplementary Fig. 2). A new finding was that 36.9 % of Plat-GFP⁺ neurons were positive for GABA (Fig. 2B-C). Among these Plat-GFP GABAergic interneurons, the majority (72.7 %) are parvalbumin⁺ (Fig. 2B-C) and 76.1 % of these are enwrapped with PNNs (stained with WFA; Fig. 2D-E).

Twenty-eight neurons from deeper layers (IV-V) of the mouse primary visual cortex were analyzed by combining patch-clamp recordings and single cell RT-PCR (Cauli et al., 1997) for electrophysiological and molecular characterization, respectively. The PCR protocol was designed to probe the expression of different cell-type specific markers (VGLUT1, GAD65 and GAD67, PV, S100 β , Sst, APC and Akrlc18), plasminogen activators (Plat and Plau) and extracellular matrix related genes (Ncan, Ptprz1, Ptprr, Sema3a, Sdc4 and Mybpc1) (Supplementary Table 1). Pyramidal cells (n=14) were identified by the triangular shape of their soma and their regular spiking firing pattern characterized by broad spikes and marked frequency adaption. FS-PV interneurons were first visualized by the fluorescence of GFP

they express in G42 mice (Chattopadhyaya et al., 2004). These neurons were characterized by low input resistance and high rheobasic current (Kawaguchi, 1993). They typically, fired short duration action potentials with sharp after hyperpolarizing potentials and were able to sustain high firing rate with little or no spike frequency adaptation (Fig 3A). The molecular analysis of the FS-PV interneuron shown in Figure 3B confirmed the expression of PV and GAD65/67, as well as SST, APC, Akr1c18, Plat, Ncan, Ptpr and Sema3a.

Analyzed neurons were grouped together according to their overall molecular similarity using Ward's clustering (Cauli et al., 2000b) and fell into two main groups (Fig. 3C). All neurons of the left cluster expressed VGLUT1 but none of the two GADs nor PV and corresponded to pyramidal cells. By contrast, all neurons of the right cluster expressed PV and had been identified as FS-PV interneurons. Interestingly, a subcluster of two FS-PV cells (dotted box, Fig. 3C) displayed a similar molecular profile with expression of Sst, Plat, Ncan, Plat, Ptpr. Plat mRNA was detected in 14.3 % of FS-PV cells (n=2 of 14 cells, Fig. 3D) a proportion similar to that observed in pyramidal cells (21.4 %, n=3 of 14 cells, p=0.663) confirming our previous observations (Louessard et al., 2016).

tPA produced by PV interneurons degrades surrounding PNNs in a plasmin-dependent manner (in vivo and in vitro investigations).

In order to assess the effect of tPA on the remodeling of PNNs, we crossed tPA floxed mice with mice expressing Cre under a PV-specific promoter to generate a conditional mouse line selectively deficient in tPA of PV interneuron origin (a crossing between tPA unfloxed mice with PV-Cre mice were used as a control). In both genotypes, the number of PV interneurons, as well as the number of PV interneurons enwrapped with PNNs was similar (see quantifications Fig. 4B-C in the somatosensory cortex after staining with WFA and immunostaining for PV). However, the overall intensity of WFA was higher in cKO mice than in WT mice (+14.4 %, Fig. 4D). A refined analysis (grading PNNs staining intensity around PV soma, from very low to very high WFA staining, as illustrated on Fig. 4E) revealed a higher percentage of neurons enwrapped with the highest degree of PNNs coverage in cKO mice (Fig. 4F). Overall, these observations support the idea that tPA released from PV interneurons contributes to PNNs metabolism in vivo.

We then used a model of primary murine interneuron cultures (Franchi et al., 2018) to dissect the potential mechanism by which tPA could influence PNNs metabolism (Fig. 5A). Co-(immuno)cytochemistry confirmed the presence of PNNs, characterized by WFA labelling and expression of aggrecan and hyaluronic acid (Supplementary Fig. 3A). As expected, WFA staining was lost when cultures were treated with ChABC (Supplementary Fig 3B). We assessed the effect of tPA on PNNs integrity by treating interneuron cultures with tPA (200 nM) alone or in combination with its conventional substrate plasminogen (10 nM), with plasminogen alone (100 nM) or with active plasmin (200 nM) (Fig. 5B-C). After 24h, plasmin (-87.3 %) or the combination of plasminogen + tPA (-87.6 %) all led to PNNs degradation, assessed by WFA staining, while tPA alone did not alter PNNs metabolism. This suggested that tPA could not directly promote PNNs degradation. Accordingly, aprotonin (1.5 μ M), a blocker of plasmin proteolytic activity, prevented PNNs degradation induced by plasminogen + tPA, (Fig. 5D-E) demonstrating that tPA promotes PNNs degradation by a plasmin-dependent mechanism. We found that plasminogen alone could also induce PNNs degradation (-88.4 %; Fig. 5B-C). This suggested that endogenous tPA released by interneurons is effective in the paradigm. To confirm this,

a fluorescent assay of plasmin activity was performed and revealed the actual conversion of plasminogen in active plasmin in the cultures in the absence of exogenous tPA (Fig. 5F-G; Supplementary Fig. 4). Moreover, interneurons cultures obtained from tPA Null mice were treated with plasminogen (100 nM), plasmin (200 nM) or plasminogen + tPA (100 nM and 10 nM respectively) during 24 hours (Fig. 5H-I). Although plasmin and plasminogen + tPA significantly reduced WFA staining (-88.2 % for plasmin; -91.5 % for plasminogen + tPA), plasminogen alone did not (Fig. 5I), showing that PNNs degradation depends on endogenous tPA produced by interneurons. We also found that plasmin-dependent metabolism of PNNs in vitro was not sensitive to TIMP3, suggesting that matrix metalloproteinases are not a downstream effector of this effect (Supplementary Fig. 5). To further study the mechanism by which tPA may promote PNNs degradation, recombinant aggrecan core protein (G1-IGD-G2) (156 nM; 12 hours) was subjected to plasminogen (7.8 nM), plasmin (7.8 nM), tPA (7.8 nM) alone or in combination, and with or without aprotinin (78 nM) (Fig. 6A-C). ADAMTS-4 (7.8 nM) was used as a positive proteolytic control. Aggrecan degradation products were quantified following coomassie blue staining. Like ADAMTS-4 (-65.3 %), plasmin (-51 %) and plasminogen + tPA (-28.4 %) were capable to cleave the core protein of aggrecan. Moreover as observed with WFA staining, immunolabelling of aggrecan in cell cultures revealed that tPA-dependent activation of plasminogen degrades perineuronal CSPGs in situ (Fig. 6D-E).

DISCUSSION

The present study provides the first clear demonstration that FS-PV GABAergic interneurons express the protease tPA, which thereby controls PNNs plasticity. We also show that the underlying mechanism is a tPA-plasmin dependent direct degradation of CSPGs.

tPA expression was previously reported in excitatory pyramidal neurons using in situ hybridization techniques, immunohistochemistry and single cell-PCR coupled with patch clamp recordings (Sappino et al., 1993; Sallés and Strickland, 2002; Louessard et al., 2016). Sparse and inconsistent studies have also reported tPA expression in some subtypes of GABAergic interneurons. Immunohistological studies have reported tPA expression in VIP-positive perivascular interneurons but not in SST-positive perivascular interneurons (Fredriksson et al., 2015). These VIP-positive perivascular interneurons are known to contribute to vasodilation of microvessels (Cauli et al., 2004). Using a reporter mouse line, Stevenson and Lawrence discovered the specific expression of tPA in SST-positive oriens-lacunosum moleculare interneurons, a subpopulation of hippocampal interneurons responsible for synaptic plasticity in Shaffer collateral synapses (Stevenson and Lawrence, 2018). Finally, the presence of tPA in Parvalbumin-positive neurons but not in SST-positive neurons has been proposed in the somatosensory cortex, although the specificity of the stainings could be questioned (Chu et al., 2015). Our first main finding is the demonstration by molecular, electrophysiological and single-cell RT-PCR approaches of the actual occurrence of tPA expression in GABAergic interneurons, including FS-PV cells.

In the brain, the soma and proximal dendrites of PV interneurons often become enwrapped by a specialized extracellular matrix, PNNs, during critical periods of post-natal development (Fawcett et al., 2019). PNNs can form a physical barrier preventing interaction between neurons and restricting receptor mobility at the synapse, a feature of synaptic plasticity. As such, PNNs metabolism is a full-

fledged actor in brain plasticity, occurring under normal conditions and with clear clinical implications later in life.

CSPGs, the major components of PNNs, are sensitive to endogenous processing by proteases of the MMP and ADAMTS family (Howell and Gottschall, 2012; Testa et al., 2019). In fact, FS-PV interneurons and pyramidal cells express an array of proteases that in theory could process PNNs respectively from the inside and from the outside (Rossier et al., 2015; Devienne et al., 2019). The tPA/plasmin system has also been proposed for the degradation PNNs, as it can degrade neurocan, versican and phosphacan (Wu 2000, Kenagy 2002) and can activate pro-MMPs and pro-ADAMTS4 into their mature form (Davis et al., 2001; Lemarchant et al., 2014). However, direct evidence of PNNs degradation by the tPA/plasmin system was lacking.

Here we show that *in vivo* conditional deletion of tPA in FS-PV cells leads to an increase in PNNs density in the somatosensory cortex, which is indicative of a cell-autonomous regulation of PNNs plasticity under physiological conditions. *In vitro*, by combining cell imaging and pharmacology, we concluded that tPA indeed promotes PNNs degradation around FS-PV interneurons. This occurs through plasminogen conversion into plasmin, which is preventable by aprotinin, and is independent on MMP or ADAMTS activation, since a broad range inhibitor of MMPs (TIMP3) did not reverse plasmin effects.

PNNs density is known to influence FS-PV excitability and frequency of firing, which in turn, modifies the inhibitory feedback on pyramidal neurons (Dityatev et al., 2007; Slaker et al., 2015; Balmer, 2016; Lensjø et al., 2017). The chemogenetic inhibition of FS-PV activity has been shown to reduce PNNs density, while their chemogenetic activation has no effect (Devienne et al., 2019). PV cells activity and PNNs may thus control each other in a bidirectional manner.

In cortical glutamatergic neurons, tPA is stored in synaptic vesicles, that are released upon neuronal activity (Lochner et al., 2006; Lenoir et al., 2019). NMDA receptors have been described on FS-PV cells (Korotkova et al., 2010), so glutamate released from pyramidal cells could promote vesicular release of tPA from FS-PV cells. In turn, tPA could increase FS-PV excitability, via its well documented property of being a positive neuromodulator of NMDA receptors (Nicole et al., 2001).

Our findings show that in the presence of plasminogen, tPA released from FS-PV reduces PNNs. This could result in an imbalance between GABAergic and glutamatergic neurotransmissions, in favor of excitation. This could then impact on several functions associated with PNNs, including being a physical protective barrier (Miyata et al., 2007; Frischknecht et al., 2009; Cabungcal et al., 2013), a contributor to pathogenic pathways (Orlando et al., 2012; Madinier et al., 2014; Yutsudo and Kitagawa, 2015; Lemarchant et al., 2016), a modulator of synaptic plasticity (Orlando et al., 2012; Carstens et al., 2016; Shi et al., 2019) and of learning/memory processes (Gogolla et al., 2009; Romberg et al., 2013; Happel et al., 2014; Shi et al., 2019). In fact, several of these functions have also been associated with tPA (Tsirka et al., 1997; Baranes et al., 1998; Madani et al., 1999; Bukhari et al., 2011; Hébert et al., 2017; Pu et al., 2019). Future studies will help understanding the respective contribution of tPA and PNNs in these functions.

Overall, we provide new knowledge on the plasticity of PNNs at the mechanistic level, which could translate into new target to promote plasticity/recovery under pathological conditions.

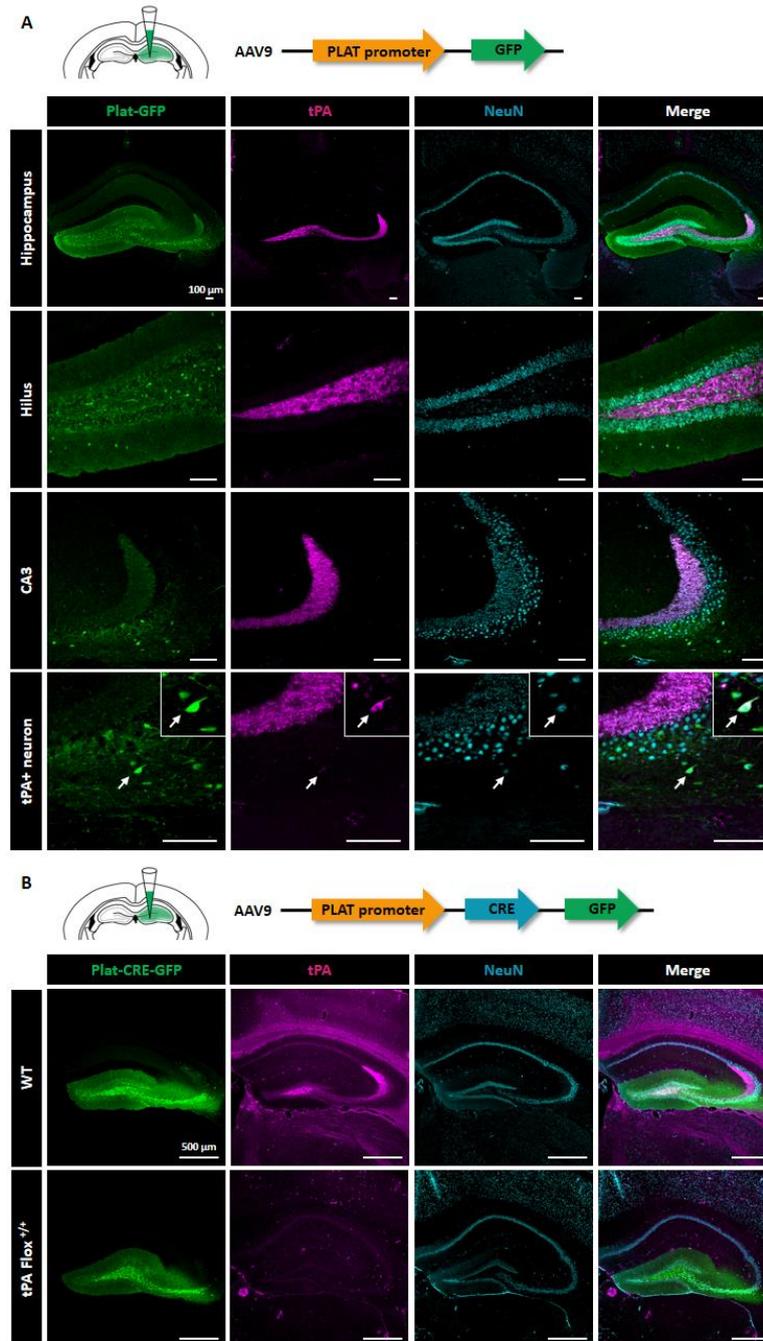


Figure 1: Characterization of a tPA-reporter construct, for in vivo investigations – AAV9-Plat-GFP

(A) AAV-Plat-GFP was injected in the dentate gyrus of adult wild-type mice. Co-Immunohistochemistry of the GFP reporter (green) with the neuronal marker NeuN (cyan) and tPA (magenta) in the hippocampus 3 weeks after injection. Co-localization of GFP with tPA is observed in mossy fibers in CA3. GFP reporter is also detected in dentate gyrus granular cells and mossy cells of the hilus.

(B) AAV-Plat-Cre-GFP was injected in the dentate gyrus of tPA $Flox^{+/+}$ mice and WT mice. Co-immunohistochemistry of the GFP reporter (green) with the neuronal marker NeuN (cyan) and tPA (magenta) in the hippocampus 3 weeks after injection. The GFP reporter colocalized with tPA in mossy fibers projecting to CA3 in WT mice but is completely lost in tPA $Flox^{+/+}$ mice. Scale bar: 100 μ m.

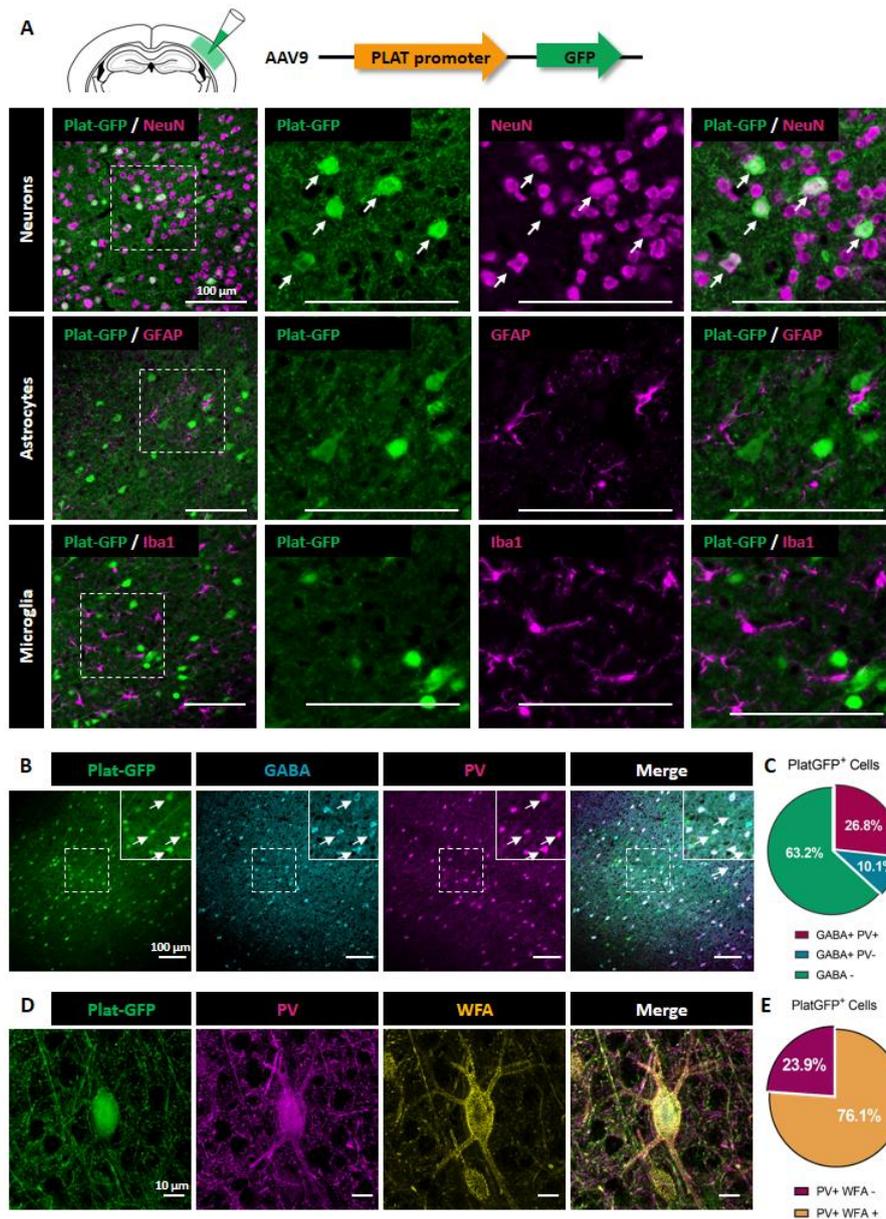


Figure 2: tPA is expressed in parvalbumin interneurons enwrapped with PNNs

(A) AAV-Plat-GFP was injected in the somatosensory cortex of adult wild-type mice. Co-Immunohistochemistry of the GFP reporter (green) with the neuronal marker NeuN (magenta), the astrocyte marker GFAP (magenta) and the microglial marker Iba-1 (magenta) in the somatosensory cortex of adult WT mice 3 weeks after AAV injection. AAV-Plat-GFP induces expression of GFP in neurons but not in astrocytes or microglia (Scale bar: 100 μ m).

(B-C) Co-localization of the Plat-GFP reporter (green) with GABA (cyan) and parvalbumin (magenta) markers following injection of AAV-Plat-GFP in the somatosensory cortex of WT mice (Scale bar: 100 μ m). Quantitative analysis of Plat-mediated expression of GFP in relation to GABAergic positive neurons and parvalbumin interneurons (C). Around 37 % of Plat-GFP positive neurons are GABAergic interneurons and 73 % of them co-localized with PV marker (n=4 coronal sections from N=3 WT brains). (D) 3D reconstruction of a Plat-GFP positive neuron (green), co-labeled with PV (magenta) and the PNNs marker Wisteria floribunda agglutinin (WFA, yellow) (Scale bar: 10 μ m). (E) Quantification of Plat-GFP neurons double stained with PV and WFA.

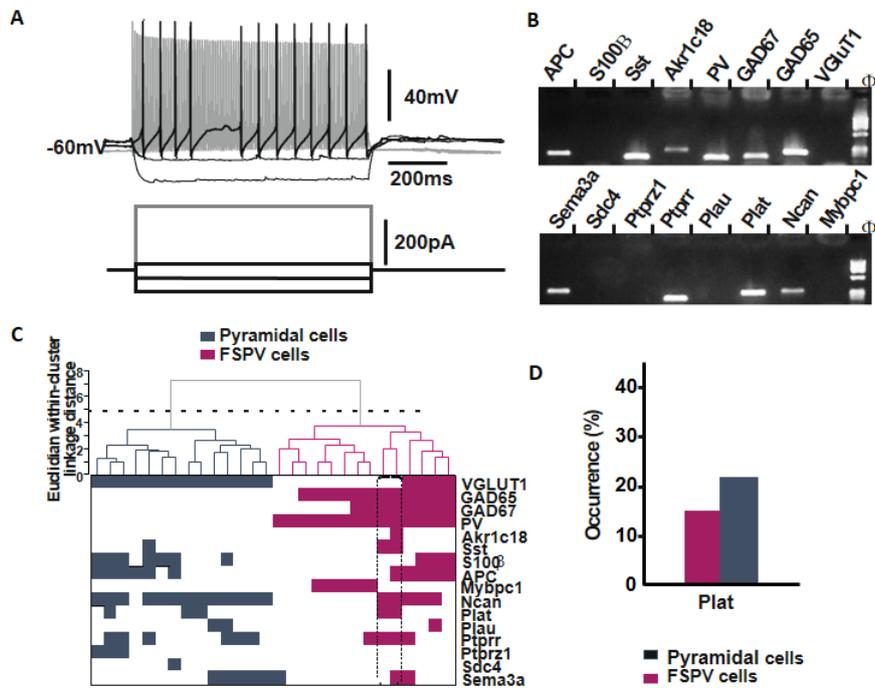


Figure 3: Electrophysiological and molecular characterization of tPA expressing FS-PV interneurons

(A-B) Characterization of Plat-expressing FS-PV cells. (A) Current-clamp recordings of a Plat-expressing FS-PV interneuron. Upper traces show voltage responses to current steps (bottom traces). This neuron typically displayed a low input resistance, a high rheobasic current (120 pA, black trace first depolarizing current step) and fired short duration action potentials with fast and large after hyperpolarizing potentials. A strong depolarizing current (380 pA) evoked a high and sustained firing rate with little or no spike frequency adaptation (shaded trace). (B) Agarose gel analysis of the RT-PCR products of the same FS-PV neuron showing expression of VGlut1, GAD65, GAD67, PV, Akr1c18, Sst, APC, Ncan, Plat, Ptprr and Sema3a. (C) Ward's clustering based on the expression of 16 genes performed on 28 cortical neurons (upper panel). The x axis represents individual cells and the y-axis the average Euclidian within-cluster linkage distance. Pyramidal (grey) and FS-PV (magenta) cells were segregated into two first-order clusters as suggested by Thorndike procedure (dotted line). Heatmap of genes expression across the different cell clusters (bottom panel). For each cell, colored and white squares indicate presence and absence of genes, respectively. Note the presence of VGlut1 in pyramidal cells and of PV in FS-PV cells. Plat-expressing FS-PV neurons (dotted box) displayed a similar gene expression profile and were segregated together. (D) Histograms depicting a similar occurrence of Plat in pyramidal and FS-PV cells.

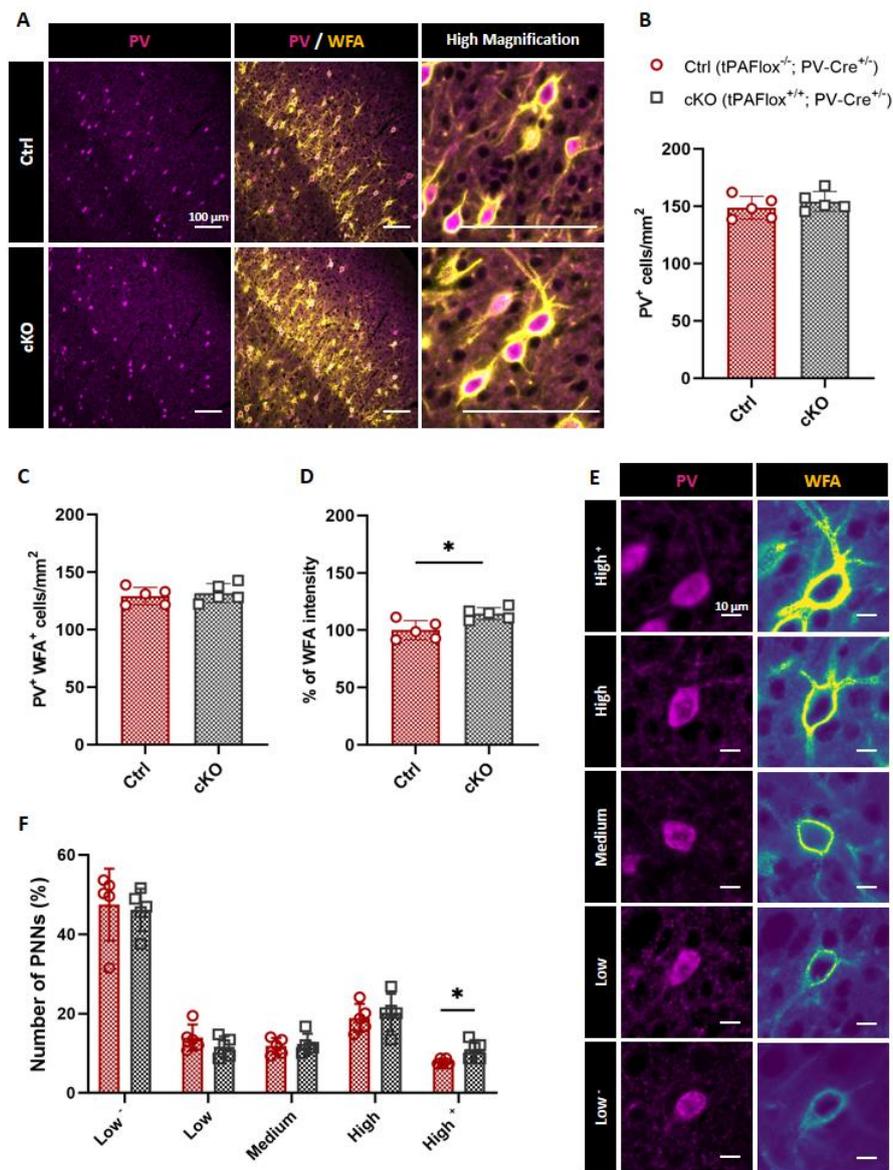


Figure 4: Specific deletion of tPA in PV interneurons affects PNN morphology

(A) Representative images of PV cells (magenta) and PNN (yellow) in the somatosensory cortex of adult tPAFlox^{+/+}; PV-Cre^{+/-} mice (cKO) and their control littermates (Ctrl), tPAFlox^{+/+}; PV-Cre^{+/-} mice (Scale bar: 100 μ m). Quantitative analysis of the density of PV cells (B) and PNN-containing PV cells (C) in both genotypes. (D) Average WFA intensity was quantified in both groups. (E) PNNs were assigned to different categories based on the intensity of WFA staining (Scale bar: 10 μ m). The percentage of each PNN subtype (F) and the Graph show mean \pm sem (N=5 animals; n=4 coronal sections per animal). Mann Whitney test; *: p<0.05.

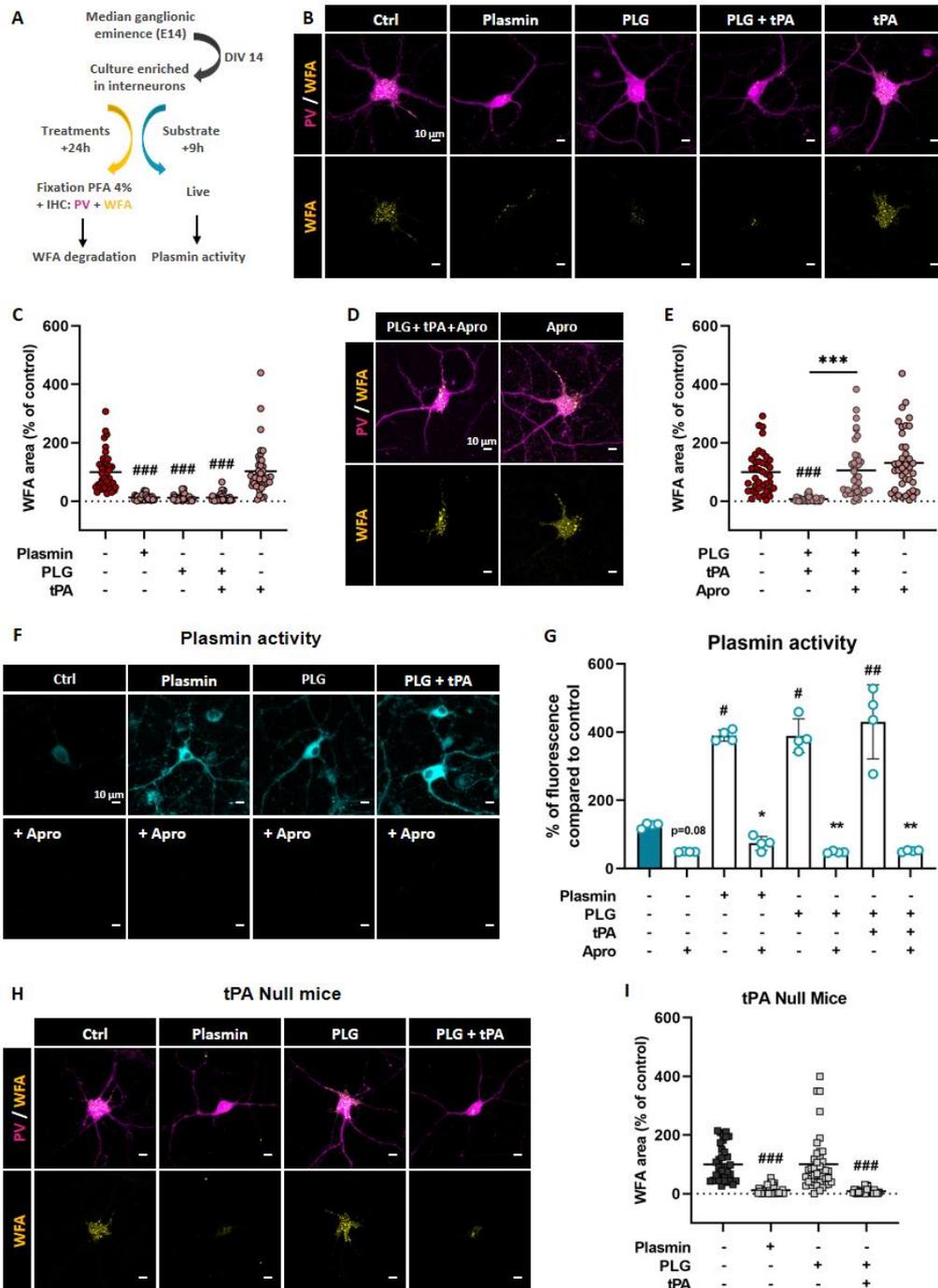


Figure 5: Endogenous tPA controls the remodeling of PNNs in a plasmin dependent manner

(A-B) MGE-derived WT interneuron cultures were treated at DIV14 with plasmin (200 nM), plasminogen (100 nM), tPA (10 nM and 200 nM) and aprotinin (1.5 μM) and processed 24h later for immunocytochemistry. (B, D) Representative images of immunocytochemical stainings for PV (magenta) and WFA (yellow) 24h after treatment. (C) Quantification shows that plasmin, plasminogen and plasminogen + tPA reduce WFA staining whereas tPA treatment has no effect in WT interneurons. (D-E). Aprotinin reverses plasminogen + tPA-induced PNN-like degradation. Graph show mean ± sem (n=40 cells from 4 independent experiments). Kruskal-Wallis test followed by Dunn’s post-hoc test for multiple comparisons; ###: p<0.001 (compared to Control), ***: p<0.001 (compared to PLG + tPA). (F-G) Plasmin activity was assessed by measuring the fluorescence emission of a plasmin substrate at 500 nm following treatments of neuronal cultures with plasmin (positive control), plasminogen (PLG), tPA and aprotinin (Apro). Graph show means ± sem (n=4 independent experiments; Kruskal Wallis

followed by Two-stage linear step-up procedure of Benjamini, Krieger and Yekutieli; #: $p < 0.05$; ##: $p < 0.01$; ###: $p < 0.001$: compared to Control; *: $p < 0.05$; **: $p < 0.01$; ***: $p < 0.001$: compared to respective aprotinin treatment. (H) Representative images of MGE-derived tPA Null interneuron cultures stained for PV (magenta) and WFA (yellow) 24h after treatment with plasmin (200 nM), plasminogen (100 nM) and tPA (10 nM). (I) WFA-positive area quantification reveals that plasmin induces the degradation of PNN-like in PV cells from tPA Null cultures whereas plasminogen fails to. Graph show mean \pm sem (n=40 cells from 4 independent experiments). Kruskal-Wallis test followed by Dunn's post-hoc test for multiple comparisons; ###: $p < 0.001$ (compared to Control). Scale bar: 10 μ m.

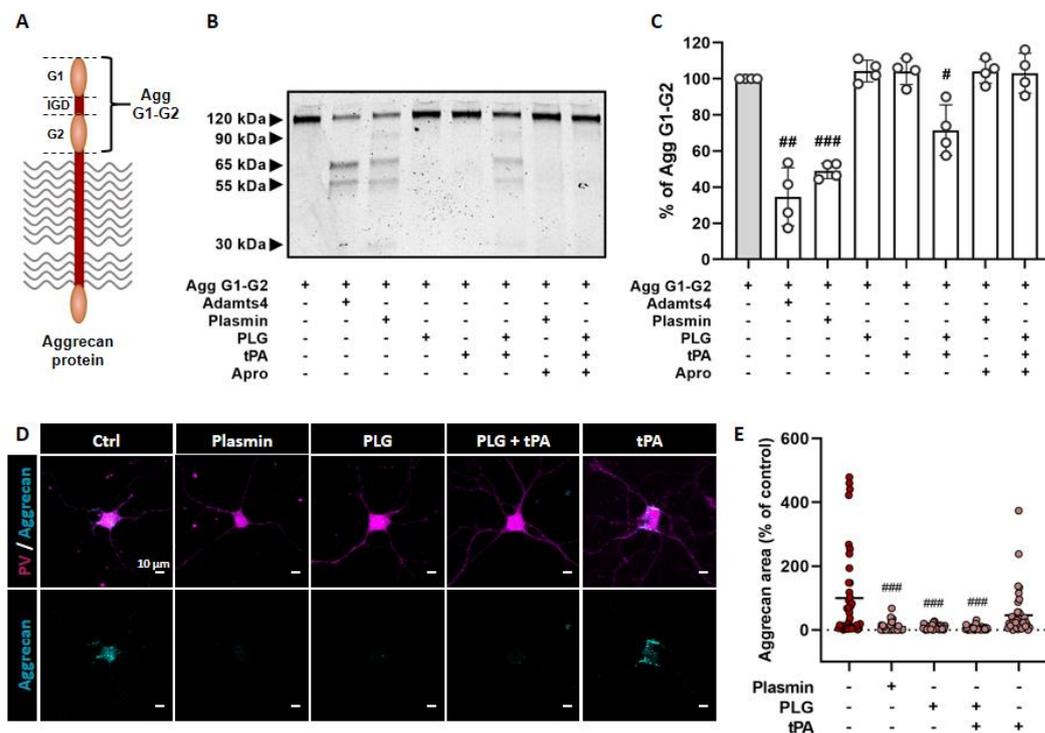
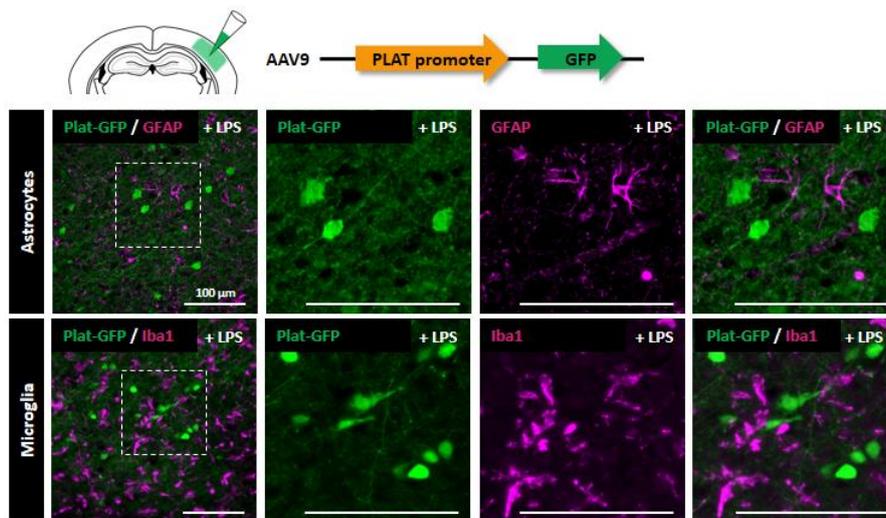


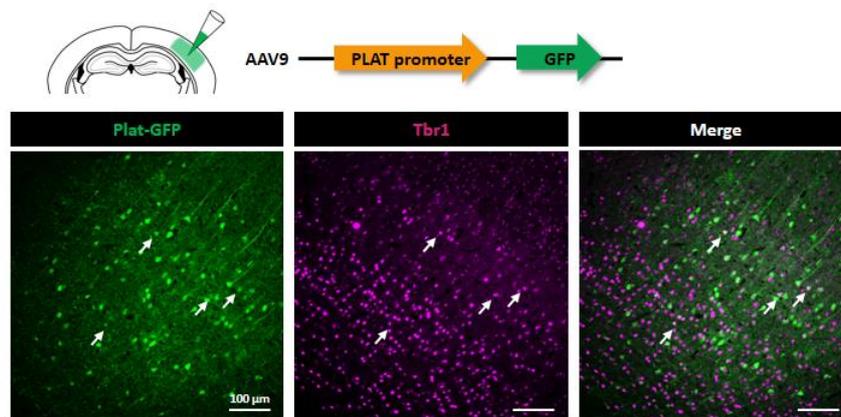
Figure 6: In vitro degradation of aggrecan by plasmin

(A-C) Recombinant Human aggrecan G1-IGD-G2 (156 nM) was incubated with ADAMTS4 (positive control), plasmin, plasminogen, tPA (7.8 nM for each protease) and aprotinin (78 nM) overnight. (B) Degradation products were visualized in Imperial blue staining. Like ADAMTS4, plasmin and plasminogen + tPA are able to cleave aggrecan G1-IDG-G2 in vitro. Aprotinin reverses plasmin-dependent aggrecan degradation. One sample t-test (hypothetical value of 100); #: $p < 0.05$; ##: $p < 0.01$; ###: $p < 0.001$. (D) Representative images of MGE-derived WT interneuron cultures treated at DIV14 with plasmin (100 nM), plasminogen (100 nM), tPA (10 nM and 200 nM) and co-stained with aggrecan (cyan) and PV (magenta). (E) Quantitative analysis of aggrecan positive area shows that plasmin, plasminogen and plasminogen + tPA reduce aggrecan staining whereas tPA treatment has no effect in WT interneurons. Graph show mean \pm sem (n=40 cells from 4 independent experiments). Kruskal-Wallis test followed by Dunn's post-hoc test for multiple comparisons; ###: $p < 0.001$ (compared to Control). Scale bar: 10 μ m.



Supplementary Figure 1: Plat-GFP expression in the somatosensory cortex of LPS treated mice

AAV-Plat-GFP was injected in the somatosensory cortex of adult wild-type mice. Co-immunohistochemistry of the GFP reporter (green) with the astrocyte marker GFAP (magenta) and the microglial marker Iba-1 (magenta) in the somatosensory cortex of adult WT mice under inflammatory conditions (LPS injection in the somatosensory cortex). Scale bar: 100 μ m.

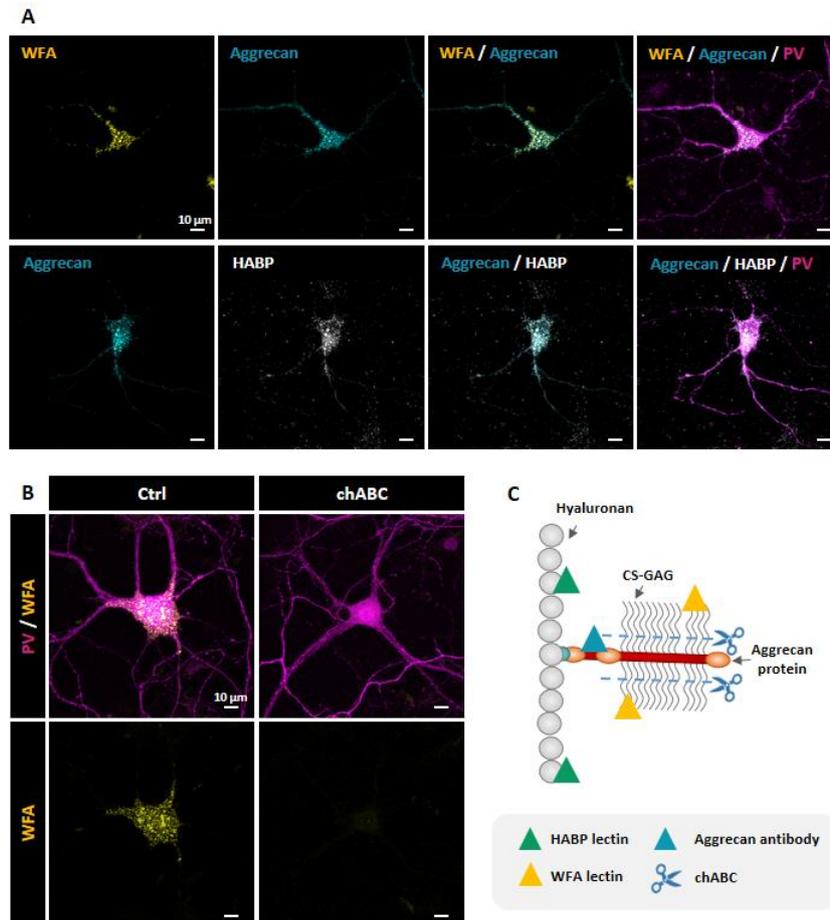


Supplementary Figure 2: Plat-GFP expression in excitatory neurons in the somatosensory cortex

AAV-Plat-GFP was injected in the somatosensory cortex of adult WT mice. Immunohistochemistry of the GFP reporter (green) with the excitatory neuronal marker Tbr1 (magenta) shows a colocalization between Plat-GFP and excitatory neurons. Scale bar: 100 μ m.

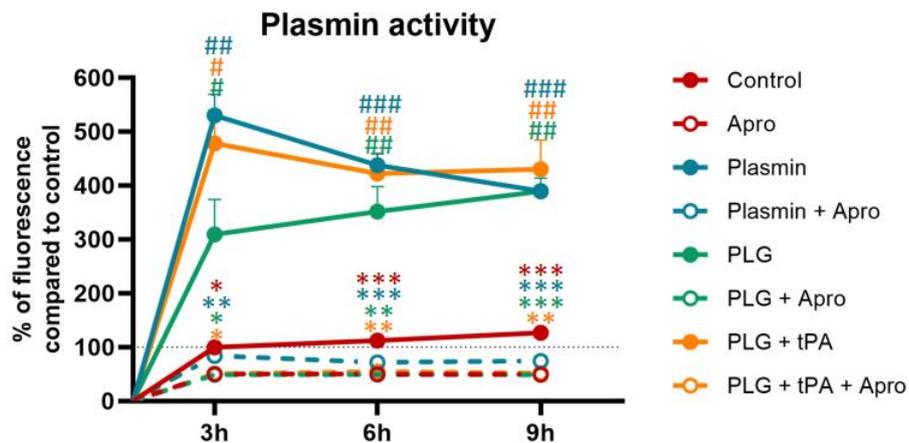
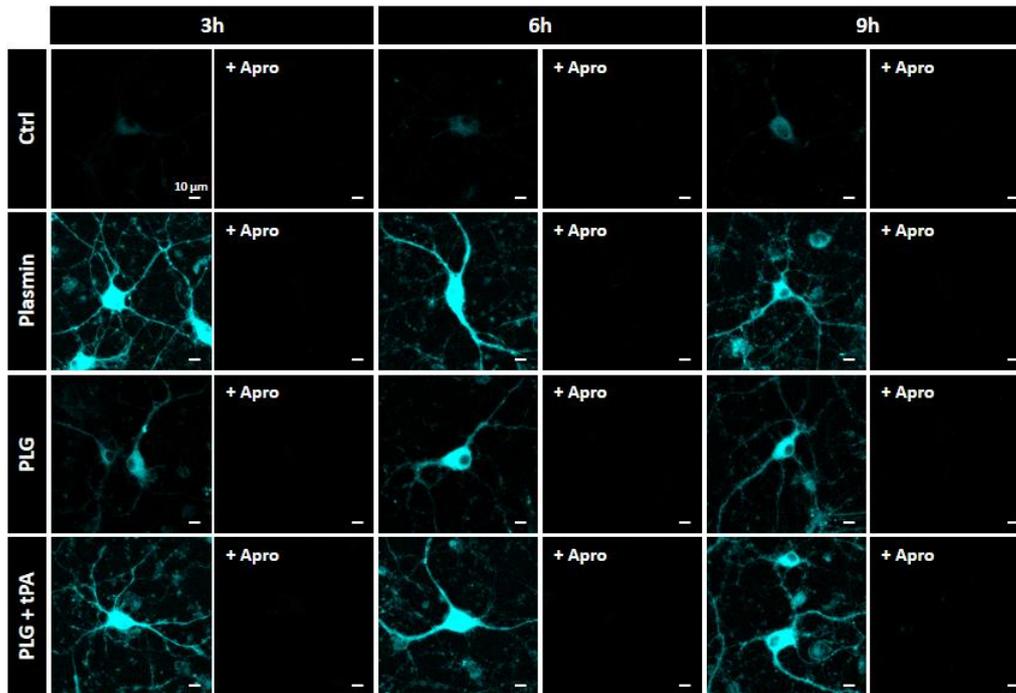
Genes accession no.	First PCR primers	Size bp	Second PCR nested primers	Size, bp
VGlut1* NM_182993.2	Sense, 597: CCCTTAGAACGGAGTCGGCT Antisense, 1169: TATCCGACCACCAGCAGCAG	592	Sense, 621: ACGACAGCCTTTGCGGTTTC Antisense, 968: CAAAGTAGCGGGCTGAGAG	366
GAD65* NM_008078.2	Sense, 99: CCAAAAAGTTCACGGGCGG Antisense, 454: TCCTCCAGATTTGCGGTG	373	Sense, 219: CACCTGCGACAAAAACCCT Antisense, 447: GATTTGCGGTTGGTCTGCC	247
GAD67* NM_008077.4	Sense, 83: ATGATACTTGGTGTGGCGTAGC Antisense, 314: GTTTGCTCCTCCCGTTCTTAG	253	Sense, 159: CAATAGCCTGGAAGAGAAGAGTCTG Antisense, 314: GTTTGCTCCTCCCGTTCTTAG	178
pv* NM_013645.3	Sense, 104: GCCTGAAGAAAAAGAACCCG Antisense, 275: AATCTTGCCGTCCCATCCT	191	Sense, 122: CGGATGAGGTGAAGAAGGTGT Antisense, 265: TCCCATCCTTGTCTCCAGC	163
Akr1c18 NM_134066	Sense, 290: GGTCAACTTCCCATCGTCCA Antisense, 667: GCACCATAGGCAACCAGAAC	397	Sense, 374: ATCTCATTCATTTCCAGTGTCTC Antisense, 610: GCTCTGGTTGAGATAAAGATGGC	259
Sst NM_009215.1	Sense, 1: ATGCTGTCTCGCCCTCTCCA Antisense, 231: GCCTCATCTCGCTCTCTCA	250	Sense, 41: GCATCGTCCTGGCTTTGGG Antisense, 191: GGGCTCCAGGGCATCATTCT	168
S100beta NM_009115.3	Sense, 57: CGGGCGAGAGGGTGACAA Antisense, 172: TCTTCGTCCAGCGTCTCCAT	133	Sense, 57: CGGGCGAGAGGGTGACAA Antisense, 133: TGTCCACCATTCCTGTCTCC	93
APC NM_007462	Sense, 1598: GGACCAGGACAAAAACCCAATG Antisense, 1962: TGCTATTTACATCTGCTCGCCA	386	Sense, 1642: TCTGTCTGTGTGTGTGTCT Antisense, 1826: GGCAACATCTCCAAAGGTCAAG	207
Mybpc1 NM_001252372	Sense, 774: CGTAGGGAGGTGAAGCAGCA Antisense, 1102: TCTGCCAACTCCACGACAAA	247	Sense, 825: CTGCTGAAAAATGCCAACCC Antisense, 974: TGCCTCCTTTATCCACCTGA	168
Ncan NM_007789	Sense, 159: TGCTGCTGTGGCTGCTTCTC Antisense, 521: CAGCGATACAGCCAGAGTC	381	Sense, 193: TCAGGACACACAGGACACCA Antisense, 383: CAGCAGAAGGGTAGCATGGG	309
Plat NM_008872	Sense, 157: CTGCTGCTTTGTGGACTGGC Antisense, 464: ATGTCACAGCGTTCCCTACA	327	Sense, 175: GCTTTCCATTGCCTGACCA Antisense, 449: CCTACAAATCCATCAGGGCACT	293
Plau NM_008873	Sense, 974: GCACAGCCATCCAGGTCC Antisense, 1237: GTTACAGATAAGCGGTCTCTCA	281	Sense, 1010: CCCCCAAGGTTTACTGATGCTC Antisense, 1180: CCGCAGCACACAGCATTTTA	191
Ptpr NM_	Sense, 543: AAGAAGAGCCTGGACATCGC Antisense, 903: TCGCTTCTCTGTTTCCG	380	Sense, 582: AACTACCACTCCCCTTCCGAAG Antisense, 774: AGATCCGAAGCAGGGTATGTT	213
Ptprz1 NM_001081306	Sense, 421: TGTTGAAGAGATTGGCTGGTCC Antisense, 806: CCTCAAAACTGGAAAATCTGTC	406	Sense, 447: CAGGAGCACTAAATCAAAAAAA Antisense, 794: AAAATCTGTCCGCATCAAAGCA	368
Sdc4 NM_011521	Sense, 222: TCTGGATGACACGGAGGAGC Antisense, 546: GTCGTAAGTCTCGTCCCTTC	344	Sense, 284: ATAACCACATCCCTGAGAAATGC Antisense, 496: AGGAAAACGGCAAAGAGGAT	233
Sema3a NM_009152	Sense, 653: GGCTGGTTCACCTGGGATTGC Antisense, 1035: CCCAGTCCACAGGCATACA	401	Sense, 671: GCCTGTCTTTCTGGGGTGT Antisense, 957: ATCTTTTCCAGCCATTGTC	306

Supplementary Table 1: RT-PCR primer



Supplementary Figure.3: PNN-like structures express aggrecan and hyaluronic acid and are sensitive to ChABC treatment

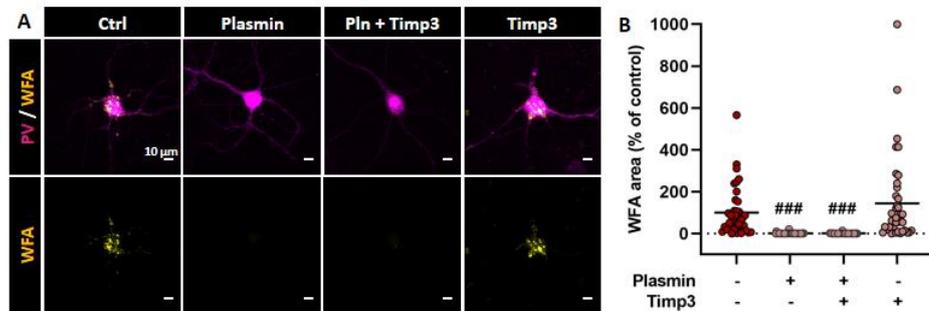
(A) Perineuronal nets-like expression in MGE-derived interneurons in vitro. Immunofluorescent staining of neurons at DIV14 with antibodies against WFA (yellow), aggrecan (cyan), HABP (white) and PV (magenta). (B) Chondroitinase ABC (ChABC) treatment during 24h enable a complete removal of PNN-like revealed by WFA staining.(C) Schematic representation showing WFA binding to chondroitin-sulfate glycosaminoglycans chains (CS-GAG) of CSPG, HABP binding to hyaluronan and ChABC degradation of CS-GAG. Scale bar: 10 μ m.



2way Anova; Two-stage linear step-up procedure of Benjamini, Krieger and Yekutieli
 #: $p < 0,05$; ##: $p < 0,01$; ###: $p < 0,001$: compared to Control
 *: $p < 0,05$; **: $p < 0,01$; ***: $p < 0,001$: compared to Aprotinin treatment

Supplementary Figure 4: Endogenous tPA drives plasminogen conversion into plasmin

Plasmin activity was monitored at different time point (+3h, +6h, +9h) following treatments of neuronal cultures with plasmin (positive control), plasminogen (PLG), tPA and aprotinin (Apro). Plasmin activity referred to the fluorescence emission of a plasmin substrate at 500 nm. Graph show means \pm sem. (n=4 independent experiments). 2way Anova followed by Two-stage linear step-up procedure of Benjamini, Krieger and Yekutieli. #: $p < 0.05$; ##: $p < 0.01$; ###: $p < 0.001$: compared to Control; *: $p < 0.05$; **: $p < 0.01$; ***: $p < 0.001$: compared to respective aprotinin treatment. Scale bar: 10 μ m.



Supplementary Figure 5: tPA/plasmin mediated PNN degradation is MMP-independent

MGE-derived WT interneuron cultures were treated at DIV14 with plasmin (200 nM) and TIMP3 (60 nM) and processed 24h later for immunocytochemistry. (A) Representative images of immunocytochemical stainings for PV (magenta) and WFA (yellow) 24h after treatment. (B) Quantitative analysis of WFA positive area show that plasmin reduces WFA staining whereas TIMP3 treatment has no effect on plasmin-dependent PNN degradation. Graph show mean \pm sem (n=30-40 cells from 4 independent experiments). Kruskal-Wallis test followed by Dunn's post-hoc test for multiple comparisons; ###: $p < 0,001$ (compared to Control). Scale bar: 10 μ m.

REFERENCES

- Adhami, F., Yu, D., Yin, W., Schloemer, A., Burns, K. A., Liao, G., et al. (2008). Deleterious effects of plasminogen activators in neonatal cerebral hypoxia-ischemia. *Am. J. Pathol.* 172, 1704–1716. doi:10.2353/ajpath.2008.070979.
- Alaiyed, S., McCann, M., Mahajan, G., Rajkowska, G., Stockmeier, C. A., Kellar, K. J., et al. (2020). Venlafaxine stimulates an MMP-9-dependent increase in excitatory/inhibitory balance in a stress model of depression. *J. Neurosci.* 40, 4418–4431. doi:10.1523/JNEUROSCI.2387-19.2020.
- Balmer, T. S. (2016). Perineuronal nets enhance the excitability of fast-spiking neurons. *eNeuro* 3, 745–751. doi:10.1523/ENEURO.0112-16.2016.
- Baranes, D., Lederfein, D., Huang, V. Y., Chen, M., Bailey, C. H., and Kandel, E. R. (1998). Tissue plasminogen activator contributes to the late phase of LTP and to synaptic growth in the hippocampal mossy fiber pathway. *Neuron* 21, 813–825. doi:10.1016/S0896-6273(00)80597-8.
- Bartoletti, A., Medini, P., Berardi, N., and Maffei, L. (2004). Environmental enrichment prevents effects of dark-rearing in the rat visual cortex. *Nat. Neurosci.* 7, 215–216. doi:10.1038/nn1201.
- Benchenane, K., Castel, H., Boulouard, M., Bluthé, R., Fernandez-Monreal, M., Roussel, B. D., et al. (2007). Anti-NR1 N-terminal-domain vaccination unmasks the crucial action of tPA on NMDA-receptor-mediated toxicity and spatial memory. *J. Cell Sci.* 120, 578–585. doi:10.1242/jcs.03354.
- Bruno Cauli, Etienne Audinat, Bertrand Lambolez, Maria Cecilia Angulo, Nicole Ropert, Keisuke Tsuzuki, et al. (1997). Molecular and Physiological Diversity of Cortical Nonpyramidal Cells. *J. Neurosci.* 17, 3894–3906.
- Bukhari, N., Torres, L., Robinson, J. K., and Tsirka, S. E. (2011). Axonal regrowth after spinal cord injury via chondroitinase and the tissue plasminogen activator (tPA)/plasmin system. *J. Neurosci.* 31, 14931–14943. doi:10.1523/JNEUROSCI.3339-11.2011.
- Cabungcal, J. H., Steullet, P., Morishita, H., Kraftsik, R., Cuenod, M., Hensch, T. K., et al. (2013). Perineuronal nets protect fast-spiking interneurons against oxidative stress. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 110, 9130–9135. doi:10.1073/pnas.1300454110.
- Carstens, K. E., Phillips, M. L., Lucas Pozzo-Miller, X., Weinberg, R. J., and Dudek, S. M. (2016). Perineuronal Nets Suppress Plasticity of Excitatory Synapses on CA2 Pyramidal Neurons. doi:10.1523/JNEUROSCI.0245-16.2016.
- Cauli, B., Audinat, E., Lambolez, B., Angulo, M. C., Ropert, N., Tsuzuki, K., et al. (1997). Molecular and physiological diversity of cortical nonpyramidal cells. *J. Neurosci.* 17, 3894–3906. doi:10.1523/jneurosci.17-10-03894.1997.
- Cauli, B., Porter, J. T., Tsuzuki, K., Lambolez, B., Rossier, J., Quenet, B., et al. (2000). Classification of fusiform neocortical interneurons based on unsupervised clustering. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 97, 6144–6149. doi:10.1073/pnas.97.11.6144.
- Chattopadhyaya, B., Di Cristo, G., Higashiyama, H., Knott, G. W., Kuhlman, S. J., Welker, E., et al. (2004). Experience and activity-dependent maturation of perisomatic GABAergic innervation in primary visual cortex during a postnatal critical period. *J. Neurosci.* 24, 9598–9611. doi:10.1523/JNEUROSCI.1851-04.2004.
- Chen, C. C., Chu, P., and Brumberg, J. C. (2015). Experience-dependent regulation of tissue-type plasminogen activator in the mouse barrel cortex. *Neurosci. Lett.* 599, 152–157. doi:10.1016/j.neulet.2015.05.050.

- Chu, P., Chen, E., Bajnath, A., and Brumberg, J. C. (2015). Cell type specificity of tissue plasminogen activator in the mouse barrel cortex. *Data Br.* 4, 332–335. doi:10.1016/j.dib.2015.06.008.
- Devienne, G., Gac, B. Le, Piquet, J., and Cauli, B. (2018). Single Cell Multiplex Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction After. 1–12. doi:10.3791/57627.
- Devienne, G., Picaud, S., Cohen, I., Piquet, J., Tricoire, L., Testa, D., et al. (2019). Regulation of perineuronal nets in the adult cortex by the electrical activity of parvalbumin interneurons. *Regul. perineuronal nets adult cortex by Electr. Act. parvalbumin interneurons*, 671719. doi:10.1101/671719.
- Dityatev, A., Brückner, G., Dityateva, G., Grosche, J., Kleene, R., and Schachner, M. (2007). Activity-dependent formation and functions of chondroitin sulfate-rich extracellular matrix of perineuronal nets. *Dev. Neurobiol.* 67, 570–588. doi:10.1002/dneu.20361.
- Fawcett, J. W., Oohashi, T., and Pizzorusso, T. (2019). The roles of perineuronal nets and the perinodal extracellular matrix in neuronal function. *Nat. Rev. Neurosci.* 20, 451–465. doi:10.1038/s41583-019-0196-3.
- Franchi, S. A., Macco, R., Astro, V., Tonoli, D., Savino, E., Valtorta, F., et al. (2018). A method to culture GABAergic interneurons derived from the medial ganglionic eminence. *Front. Cell. Neurosci.* 11, 423. doi:10.3389/fncel.2017.00423.
- Frischknecht, R., Heine, M., Perrais, D., Seidenbecher, C. I., Choquet, D., and Gundelfinger, E. D. (2009). Brain extracellular matrix affects AMPA receptor lateral mobility and short-term synaptic plasticity. *Nat. Neurosci.* 12, 897–904. doi:10.1038/nn.2338.
- Gogolla, N., Caroni, P., Lüthi, A., and Herry, C. (2009). Perineuronal Nets Protect Fear Memories from Erasure. *Science (80-)*. 325, 1258–1261. Available at: www.sciencemag.org.
- Happel, M. F. K., Niekisch, H., Castiblanco Rivera, L. L., Ohl, F. W., Deliano, M., and Frischknecht, R. (2014). Enhanced cognitive flexibility in reversal learning induced by removal of the extracellular matrix in auditory cortex. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 111, 2800–2805. doi:10.1073/pnas.1310272111.
- Hébert, M., Anfray, A., Chevilly, A., Martinez De Lizarrondo, S., Quenault, A., Louessard, M., et al. (2017). Distant Space Processing is Controlled by tPA-dependent NMDA Receptor Signaling in the Entorhinal Cortex. *Cereb. Cortex*. doi:10.1093/cercor/bhw275.
- Howell, M. D., and Gottschall, P. E. (2012). Lectican proteoglycans, their cleaving metalloproteinases, and plasticity in the central nervous system extracellular microenvironment. *Neuroscience* 217, 6–18. doi:10.1016/j.neuroscience.2012.05.034.
- Joeh, and WARD, J. (1963). Hierarchical grouping to optimize an objective function. *Div. Aerosp. Med. Force, Lackl. Air.*
- Kawaguchi, Y. (1993). Physiological, morphological, and histochemical characterization of three classes of interneurons in rat neostriatum. *J. Neurosci.* 13, 4908–4923. doi:10.1523/jneurosci.13-11-04908.1993.
- Kelly, E. A., Russo, A. S., Jackson, C. D., Lamantia, C. E. L., and Majewska, A. K. (2015). Proteolytic regulation of synaptic plasticity in the mouse primary visual cortex: Analysis of matrix metalloproteinase 9 deficient mice. *Front. Cell. Neurosci.* 9. doi:10.3389/fncel.2015.00369.
- Korotkova, T., Fuchs, E. C., Ponomarenko, A., von Engelhardt, J., and Monyer, H. (2010). NMDA Receptor Ablation on Parvalbumin-Positive Interneurons Impairs Hippocampal Synchrony, Spatial Representations, and Working Memory. *Neuron* 68, 557–569. doi:10.1016/j.neuron.2010.09.017.
- Lambolez, B., Audinat, E., Bochet, P., Crépel, F., and Rossier, J. (1992). AMPA receptor subunits expressed by single purkinje cells. *Neuron* 9, 247–258. doi:10.1016/0896-6273(92)90164-9.

- Lemarchant, S., Pomeshchik, Y., Kidin, I., Kärkkäinen, V., Valonen, P., Lehtonen, S., et al. (2016). ADAMTS-4 promotes neurodegeneration in a mouse model of amyotrophic lateral sclerosis. *Mol. Neurodegener.* 11, 1–24. doi:10.1186/s13024-016-0078-3.
- Lenoir, S., Varangot, A., Lebouvier, L., Galli, T., Hommet, Y., and Vivien, D. (2019). Post-synaptic release of the neuronal tissue-type plasminogen activator (tPA). *Front. Cell. Neurosci.* 13. doi:10.3389/fncel.2019.00164.
- Lensjø, K. K., Lepperød, M. E., Dick, G., Hafting, T., and Fyhn, M. (2017). Removal of perineuronal nets unlocks juvenile plasticity through network mechanisms of decreased inhibition and increased gamma activity. *J. Neurosci.* 37, 1269–1283. doi:10.1523/JNEUROSCI.2504-16.2016.
- Leonetti, C., Macrez, R., Pruvost, M., Hommet, Y., Bronsard, J., Fournier, A., et al. (2017). Tissue-type plasminogen activator exerts EGF-like chemokinetic effects on oligodendrocytes in white matter (re)myelination. *Mol. Neurodegener.* 12. doi:10.1186/s13024-017-0160-5.
- Lim, L., Mi, D., Llorca, A., and Marín, O. (2018). Neuron Review Development and Functional Diversification of Cortical Interneurons. doi:10.1016/j.neuron.2018.10.009.
- Liot, G., Roussel, B. D., Lebeurrier, N., Benchenane, K., López-Atalaya, J. P., Vivien, D., et al. (2006). Tissue-type plasminogen activator rescues neurones from serum deprivation-induced apoptosis through a mechanism independent of its proteolytic activity. *J. Neurochem.* 98, 1458–1464. doi:10.1111/j.1471-4159.2006.03982.x.
- Lochner, J. E., Honigman, L. S., Grant, W. F., Gessford, S. K., Hansen, A. B., Silverman, M. A., et al. (2006). Activity-dependent release of tissue plasminogen activator from the dendritic spines of hippocampal neurons revealed by live-cell imaging. *J. Neurobiol.* doi:10.1002/neu.20250.
- Louessard, M., Bardou, I., Lemarchand, E., Thiebaut, A. M., Parcq, J., Leprince, J., et al. (2017). Activation of cell surface GRP78 decreases endoplasmic reticulum stress and neuronal death. *Cell Death Differ.* 24, 1518–1529. doi:10.1038/cdd.2017.35.
- Louessard, M., Lacroix, A., Martineau, M., Mondielli, G., Montagne, A., Lesept, F., et al. (2016). Tissue Plasminogen Activator Expression Is Restricted to Subsets of Excitatory Pyramidal Glutamatergic Neurons. *Mol. Neurobiol.* 53, 5000–5012. doi:10.1007/s12035-015-9432-7.
- Macrez, R., Ortega, M. C., Bardou, I., Mehra, A., Fournier, A., Van Der Pol, S. M. A., et al. (2016). Neuroendothelial NMDA receptors as therapeutic targets in experimental autoimmune encephalomyelitis. *Brain.* doi:10.1093/brain/aww172.
- Madani, R., Hulo, S., Toni, N., Madani, H., Steimer, T., Muller, D., et al. (1999). Enhanced hippocampal long-term potentiation and learning by increased neuronal expression of tissue-type plasminogen activator in transgenic mice. *EMBO J.* 18, 3007–3012. doi:10.1093/emboj/18.11.3007.
- Madinier, A., Quattromani, M. J., Sjölund, C., Ruscher, K., and Wieloch, T. (2014). Enriched housing enhances recovery of limb placement ability and reduces aggrecan-containing perineuronal nets in the rat somatosensory cortex after experimental stroke. *PLoS One* 9. doi:10.1371/journal.pone.0093121.
- Maes, M. E., Colombo, G., Schulz, R., and Siegert, S. (2019). Targeting microglia with lentivirus and AAV: Recent advances and remaining challenges. *Neurosci. Lett.* 707. doi:10.1016/j.neulet.2019.134310.
- Mataga, N., Mizuguchi, Y., and Hensch, T. K. (2004). Experience-dependent pruning of dendritic spines in visual cortex by tissue plasminogen activator. *Neuron* 44, 1031–1041. doi:10.1016/j.neuron.2004.11.028.
- Mataga, N., Nagai, N., and Hensch, T. K. (2002). Permissive proteolytic activity for visual cortical plasticity. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 99, 7717–7721. doi:10.1073/pnas.102088899.

- Matys, T., Pawlak, R., Matys, E., Pavlides, C., McEwen, B. S., and Strickland, S. (2004). Tissue plasminogen activator promotes the effects of corticotropin-releasing factor on the amygdala and anxiety-like behavior. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 101, 16345–16350. doi:10.1073/pnas.0407355101.
- Mehra, A., Guérit, S., Macrez, R., Gosselet, F., Sevin, E., Lebas, H., et al. (2020). Nonionotropic action of endothelial NMDA receptors on blood–brain barrier permeability via Rho/ROCK-mediated phosphorylation of myosin. *J. Neurosci.* 40, 1778–1787. doi:10.1523/JNEUROSCI.0969-19.2019.
- Merienne, N., Le Douce, J., Faivre, E., Déglon, N., and Bonvento, G. (2013). Efficient gene delivery and selective transduction of astrocytes in the mammalian brain using viral vectors. *Front. Cell. Neurosci.* 7, 106. doi:10.3389/fncel.2013.00106.
- Miyata, S., Nishimura, Y., and Nakashima, T. (2007). Perineuronal nets protect against amyloid β -protein neurotoxicity in cultured cortical neurons. *Brain Res.* 1150, 200–206. doi:10.1016/j.brainres.2007.02.066.
- Müller, C. M., and Griesinger, C. B. (1998). Tissue plasminogen activator mediates reverse occlusion plasticity in visual cortex. *Nat. Neurosci.* 1, 47–53. doi:10.1038/248.
- Murthy, S., Kane, G. A., Katchur, N. J., Lara Mejia, P. S., Obiofuma, G., Buschman, T. J., et al. (2019). Perineuronal Nets, Inhibitory Interneurons, and Anxiety-Related Ventral Hippocampal Neuronal Oscillations Are Altered by Early Life Adversity. *Biol. Psychiatry* 85, 1011–1020. doi:10.1016/j.biopsych.2019.02.021.
- Nicole, O., Docagne, F., Ali, C., Margaille, I., Carmeliet, P., Mackenzie, E. T., et al. (2001). The proteolytic activity of tissue-plasminogen activator enhances NMDA receptor-mediated signaling. *Nat. Med.* 7. doi:10.1038/83358.
- Orlando, C., Ster, J., Gerber, U., Fawcett, J. W., and Raineteau, O. (2012). Perisynaptic chondroitin sulfate proteoglycans restrict structural plasticity in an integrin-dependent manner. *J. Neurosci.* 32, 18009–18017. doi:10.1523/JNEUROSCI.2406-12.2012.
- Pasquet, N., Douceau, S., Naveau, M., Lesept, F., Louessard, M., Lebouvier, L., et al. (2019). Tissue-Type Plasminogen Activator Controlled Corticogenesis Through a Mechanism Dependent of NMDA Receptors Expressed on Radial Glial Cells. *Cereb. Cortex* 29. doi:10.1093/cercor/bhy119.
- Pawlak, R., Magarinos, A. M., Melchor, J., McEwen, B., and Strickland, S. (2003). Tissue plasminogen activator in the amygdala is critical for stress-induced anxiety-like behavior. *Nat. Neurosci.* 6, 168–174. doi:10.1038/nn998.
- Pizzorusso, T., Medini, P., Berardi, N., Chierzi, S., Fawcett, J., and Maffei, L. (2002). Reactivation of Ocular Dominance Plasticity in the Adult Visual Cortex Author (s): Tommaso Pizzorusso , Paolo Medini , Nicoletta Berardi , Sabrina Chierzi , James W . Fawcett and Lamberto Maffei Reviewed work (s): Source : Science , New Series , Vol . Science (80-). 298, 1248–1251.
- Pu, H., Shi, Y., Zhang, L., Lu, Z., Ye, Q., Leak, R. K., et al. (2019). Protease-independent action of tissue plasminogen activator in brain plasticity and neurological recovery after ischemic stroke. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 116, 9115–9124. doi:10.1073/pnas.1821979116.
- Qian, Z., Gilbert, M. E., Colicos, M. A., Kandel, E. R., and Kuhl, D. (1993). Tissue-plasminogen activator is induced as an immediate-early gene during seizure, kindling and long-term potentiation. *Nature* 361, 453–457. doi:10.1038/361453a0.
- Romberg, C., Yang, S., Melani, R., Andrews, M. R., Horner, A. E., Spillantini, M. G., et al. (2013). Depletion of perineuronal nets enhances recognition memory and long-term depression in the perirhinal cortex. *J. Neurosci.* 33, 7057–7065. doi:10.1523/JNEUROSCI.6267-11.2013.

- Sallés, F. J., and Strickland, S. (2002). Localization and regulation of the tissue plasminogen activator-plasmin system in the hippocampus. *J. Neurosci.* 22, 2125–2134. doi:10.1523/jneurosci.22-06-02125.2002.
- Sappino, A. P., Madani, R., Huarte, J., Belin, D., Kiss, J. Z., Wohlwend, A., et al. (1993). Extracellular proteolysis in the adult murine brain. *J. Clin. Invest.* 92, 679–685. doi:10.1172/JCI116637.
- Shi, W., Wei, X., Wang, X., Du, S., Liu, W., Song, J., et al. (2019). Perineuronal nets protect long-term memory by limiting activity-dependent inhibition from parvalbumin interneurons. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 116, 27063–27073. doi:10.1073/pnas.1902680116.
- Siao, C. J., and Tsirka, S. E. (2002). Tissue Plasminogen Activator Mediates Microglial Activation via Its Finger Domain through Annexin II. *J. Neurosci.* 22, 3352–3358. doi:10.1523/jneurosci.22-09-03352.2002.
- Slaker, M., Churchill, L., Todd, R. P., Blacktop, J. M., Zuloaga, D. G., Raber, J., et al. (2015). Removal of perineuronal nets in the medial prefrontal cortex impairs the acquisition and reconsolidation of a cocaine-induced conditioned place preference memory. *J. Neurosci.* 35, 4190–4202. doi:10.1523/JNEUROSCI.3592-14.2015.
- Stevenson, T. K., and Lawrence, D. A. (2018a). Characterization of tissue plasminogen activator expression and trafficking in the adult murine brain. *eNeuro* 5. doi:10.1523/ENEURO.0119-18.2018.
- Stevenson, T. K., and Lawrence, D. A. (2018). Characterization of tissue plasminogen activator expression and trafficking in the adult murine brain. *eNeuro* 5. doi:10.1523/ENEURO.0119-18.2018.
- Su, E. J., Fredriksson, L., Geyer, M., Folestad, E., Cale, J., Andrae, J., et al. (2008). Activation of PDGF-CC by tissue plasminogen activator impairs blood-brain barrier integrity during ischemic stroke. *Nat. Med.* 14, 731–737. doi:10.1038/nm1787.
- Sumi, Y., Dent, M., Seeley, J., and Morris, R. J. (1992). The expression of tissue and urokinase plasminogen activators in neural development suggests different modes of proteolytic involvement in neuronal growth. Available at: <https://www.researchgate.net/publication/21866760>.
- Testa, D., Prochiantz, A., and Di Nardo, A. A. (2019). Perineuronal nets in brain physiology and disease. *Semin. Cell Dev. Biol.* 89, 125–135. doi:10.1016/j.semcdb.2018.09.011.
- Thiebaut, A. M., Gauberti, M., Ali, C., Martinez De Lizarrondo, S., Vivien, D., Yepes, M., et al. (2018). The role of plasminogen activators in stroke treatment: fibrinolysis and beyond. *Lancet Neurol.* 17, 1121–1132. doi:10.1016/S1474-4422(18)30323-5.
- Thorndike, R. L. (1953). Who belongs in the family? *Psychometrika*, 267–276.
- Tsirka, S. E., Rogove, A. D., Bugge, T. H., Degen, J. L., and Strickland, S. (1997). An extracellular proteolytic cascade promotes neuronal degeneration in the mouse hippocampus. *J. Neurosci.* 17, 543–552. doi:10.1523/jneurosci.17-02-00543.1997.
- Wang, D., and Fawcett, J. (2012). The perineuronal net and the control of CNS plasticity. *Cell Tissue Res.* 349, 147–160. doi:10.1007/s00441-012-1375-y.
- Wang, W. Y., Xu, G. Z., Tian, J., and Sprecher, A. J. (2009). Inhibitory effect on LPS-induced retinal microglial activation of downregulation of t-pa expression by siRNA interference. *Curr. Eye Res.* 34, 476–484. doi:10.1080/02713680902916108.
- Wen, T. H., Afroz, S., Reinhard, S. M., Palacios, A. R., Tapia, K., Binder, D. K., et al. (2018). Genetic Reduction of Matrix Metalloproteinase-9 Promotes Formation of Perineuronal Nets Around Parvalbumin-Expressing Interneurons and Normalizes Auditory Cortex Responses in Developing Fmr1 Knock-Out Mice. *Cereb. Cortex* 28, 3951–3964. doi:10.1093/cercor/bhx258.

Wu, F., Wu, J., Nicholson, A. D., Echeverry, R., Haile, W. B., Catano, M., et al. (2012). Tissue-type plasminogen activator regulates the neuronal uptake of glucose in the ischemic brain. *J. Neurosci.* 32, 9848–9858. doi:10.1523/JNEUROSCI.1241-12.2012.

Yutsudo, N., and Kitagawa, H. (2015). Involvement of chondroitin 6-sulfation in temporal lobe epilepsy. *Exp. Neurol.* 274, 126–133. doi:10.1016/j.expneurol.2015.07.009.

Zhu, J., Wan, Y., Xu, H., Wu, Y., Hu, B., and Jin, H. (2019). The role of endogenous tissue-type plasminogen activator in neuronal survival after ischemic stroke: friend or foe? *Cell. Mol. Life Sci.* 76, 1489–1506. doi:10.1007/s00018-019-03005-8.

Fundings

This work was funded by the Agence Nationale de la Recherche (Projet-ANR-15-CE16-0010), the Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale, Caen Normandy University and the Regional Council of Normandy.

Discussion

Discussion (Article 1)

I. Étude des fonctions du tPA dans les réponses comportementales à l'aide d'une nouvelle souche transgénique : la souris tPA Null

L'objectif de ces travaux de thèse visait à étudier le rôle du tPA cérébral exprimé au sein de différentes régions dans la régulation des réponses comportementales et plus particulièrement dans la cognition spatiale et l'anxiété. Pour répondre à cette question, le laboratoire a développé deux nouvelles lignées transgéniques : une souche déficiente en tPA de manière constitutive, tPA Null et une souche tPA Flox permettant la délétion conditionnelle du premier exon codant du gène du tPA sous l'action de la recombinaison Cre (**Figure 1A, Article 1**). Cette dernière nous a permis d'invalider spécifiquement le tPA *in situ* grâce à l'injection stéréotaxique d'un vecteur AAV-Cre-GFP dans différentes structures cérébrales. Un premier objectif de ces travaux de thèse a été de caractériser le phénotype comportemental de la souche tPA Null.

1- La cognition spatiale chez les souris tPA Null

La caractérisation comportementale de la souche tPA Null nous a permis de mettre en évidence un déficit de mémoire spatiale chez ces animaux. En effet, les souris tPA Null ne discriminent pas la zone cible où se trouvait le refuge des autres zones lors du *probe test* et réalisent un nombre plus important d'erreurs par rapport à leurs homologues sauvages (**Figure 1I-K, Article 1**). Les précédentes données de la littérature n'ont pas montré de déficits de la cognition spatiale à l'aide du labyrinthe de Barnes (BM) chez les souris déficientes en tPA. En effet, Huang et collaborateurs ont montré que les souris tPA KO réalisent un nombre d'erreurs et parcourent une distance avant d'atteindre le refuge similaire à leurs homologues sauvages lors de l'entraînement (Huang *et al.*, 1996). Le protocole réalisé et la configuration du labyrinthe utilisé dans leur étude diffèrent cependant sur de nombreux points par rapport à notre méthodologie. De plus, cette étude ne teste pas la rétention de la tâche par un *probe test* après la phase d'entraînement contrairement à la nôtre.

Dans notre étude, nous n'avons pas mesuré la distance parcourue jusqu'au refuge car celle-ci ne permettait pas de prendre en compte les animaux n'ayant pas atteint la zone cible lors des sessions d'entraînement. Nous avons choisi de mesurer la latence primaire à trouver le refuge (Figure 36) qui nous permet d'attribuer le temps maximal du test (300 secondes) aux animaux n'ayant pas réussi à réaliser la tâche dans le temps imparti. Nos données montrent que les souris WT mettent plus de temps que les souris tPA Null à atteindre le refuge lors de l'entraînement du BM (Figure 36). Les performances plus élevées des souris tPA Null pour atteindre le refuge lors de l'entraînement du BM pourraient

cependant être expliquées par une hyperactivité locomotrice, induisant une exploration plus importante du labyrinthe. En effet, nous avons pu montrer que les souris tPA Null parcouraient une distance plus importante que les souris WT, à la fois dans le test de l'OF (**Figure 1C-E, Article 1**) et du BM (Figure 36).

Lors du test de rappel du BM, nous montrons que les souris tPA Null réalisent plus d'erreurs que les souris WT (**Figure 1K, Article 1**). Il serait également pertinent de mesurer le nombre d'erreurs lors de l'entraînement du BM afin de conclure quant aux performances spatiales des souris tPA Null lors

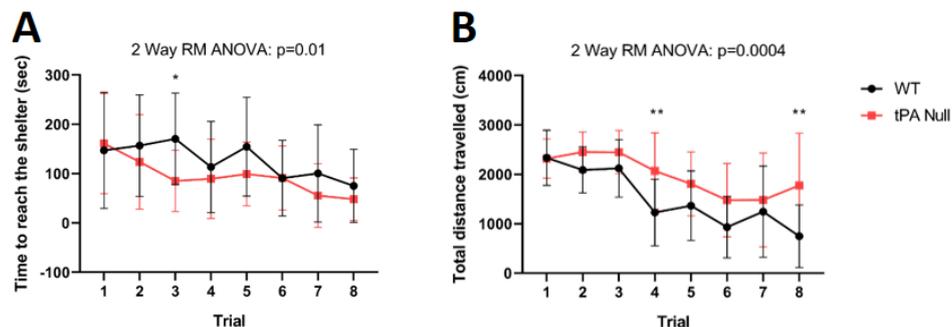


Figure 36: Acquisition du test du labyrinthe de Barnes.

La latence à atteindre le refuge (A) et la distance totale parcourue sont évaluées lors des différentes sessions d'entraînement (B). (Moyenne \pm SD; Test ANOVA à 2 facteurs à mesures répétées, test post-hoc de Sidak; * : $p<0.05$; ** : $p<0.01$; N=20 souris par génotype.

de l'acquisition du BM. Lors du *probe test* du BM, nous montrons un déficit de mémoire spatiale chez les souris tPA Null. En effet, celles-ci ne discriminent pas la zone cible des autres zones du labyrinthe (**Figure 1I-J, Article 1**). Les données de la littérature reportent des résultats contradictoires concernant les performances spatiales lors du *probe test* de la piscine de Morris (MWM), un test similaire au BM, chez les souris tPA KO. Tandis que Oh et collaborateurs mettent en évidence un déficit de mémoire spatiale chez les souris tPA KO, les travaux de Hébert et collaborateurs et Huang et collaborateurs ne montrent pas de déficit lors du *probe test* (Hébert *et al.*, 2017; Huang *et al.*, 1996; Oh *et al.*, 2014). Parallèlement, Madani et collaborateurs ont montré une augmentation des performances spatiales en piscine de Morris dans un modèle de souris transgéniques surexprimant le tPA dans les neurones (Madani *et al.*, 1999).

Dans notre analyse, il est possible que l'hyperactivité locomotrice observée chez les souris tPA Null puisse altérer les apprentissages spatiaux chez ces animaux. En effet, des déficits de mémoire ont été retrouvés dans différents modèles animaux de Trouble Déficitaire de l'Attention avec Hyperactivité (TDAH) (Russell, 2011). Ainsi, il serait intéressant d'évaluer l'attention des animaux tPA Null dans une tâche de réaction en série à 5 choix afin de déterminer si des déficits d'attention chez ces animaux

pourraient interférer dans les apprentissages spatiaux dans une tâche complexe telle que le BM (Young *et al.*, 2009).

Au cours de ces travaux, nous avons également évalué les performances spatiales des souris tPA Null à l'aide d'une tâche d'apprentissage de place en labyrinthe en Y. A l'aide de ce test, nous montrons que les souris tPA Null présentent des performances spatiales similaires à leurs homologues de type sauvage lors du test de rappel. En effet, les deux génotypes discriminent bien le bras nouveau (*New arm*), des deux bras (*Arm1*, *Arm2*) du labyrinthe explorés lors de la phase d'acquisition (Figure 37).

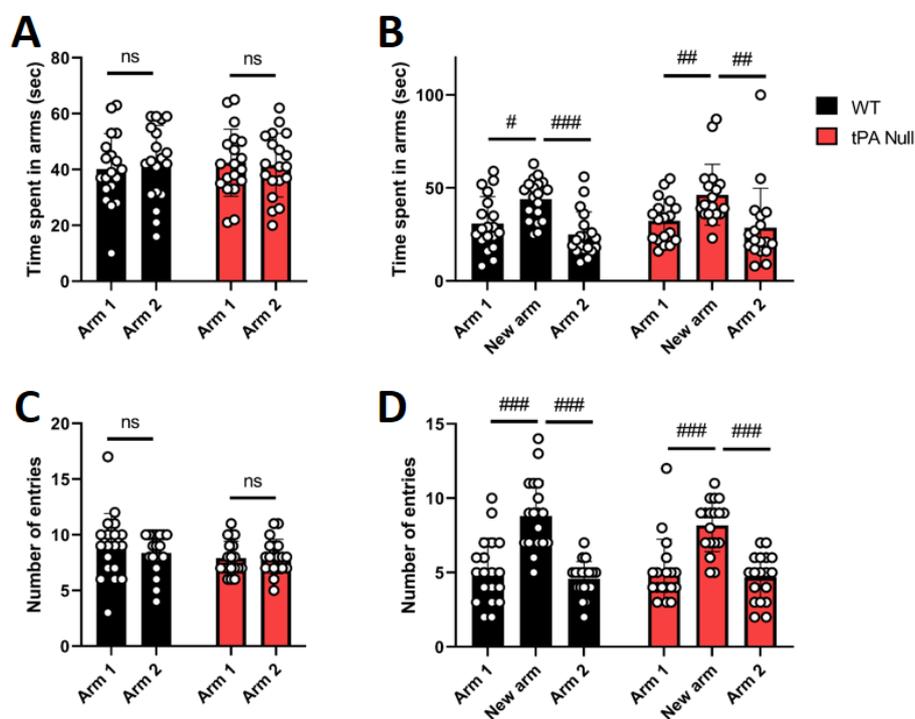


Figure 37: Mesure des performances spatiales en labyrinthe en Y.

Mesure du temps passé (A-B) et du nombre d'entrées (C-D) dans les différents bras du labyrinthe au cours de la phase d'acquisition (A-C) et de rappel (B-D). Les souris explorent deux bras du Y-maze (Arm 1, Arm 2) pendant 5 minutes lors de la phase d'acquisition (A-C) puis un test de rappel est réalisé 90 minutes après la phase d'acquisition au cours duquel les souris ont également accès à un troisième bras du labyrinthe (New arm ; B-D). Moyenne + SD ; Test de Wilcoxon : # : $p < 0.05$; ## : $p < 0.01$; ### : $p < 0.001$ (par rapport au bras nouveau) ; N=20 souris par génotype.

Au sein de notre étude, nous avons réalisé ce test selon une configuration permettant aux animaux d'utiliser des indices visuels distaux placés sur les murs de la pièce d'expérimentation. Des études réalisées précédemment au laboratoire ont permis de mettre en évidence un déficit de reconnaissance de place en labyrinthe en Y ou T chez des souris tPA KO testées avec cette même configuration des

indices visuels (Benchenane *et al.*, 2007; Hébert *et al.*, 2017). L'absence de déficits spatiaux chez les souris tPA Null dans le test du labyrinthe en Y pourrait notamment s'expliquer par un délai de rétention plus court (2h30) dans ce test, comparativement au délai de rétention dans le test du BM (24h). Ainsi ces deux tests pourraient faire intervenir différents types de mémoire.

L'absence de concordance entre les phénotypes observés chez les souris tPA Null et tPA KO concernant la cognition spatiale pourrait s'expliquer à la fois par la différence du fond génétique et par la stratégie permettant la délétion du tPA entre ces deux lignées. Bien que les modèles tPA KO et tPA Null présentent tous les deux une délétion constitutive du tPA, la stratégie utilisée pour invalider le gène diffère. En effet, chez les souris tPA KO, les exons codant les domaines kringle 2 (exon 8) et sérine protéase sont remplacés par une cassette néomycine insérée par recombinaison homologue (Carmeliet *et al.*, 1994). En ce qui concerne les tPA Null, la délétion est permise grâce à la recombinaison de séquences loxP insérées de part et d'autres du premier exon codant (exon 3). En pratique, cette dernière stratégie consiste à croiser des souris tPA Flox avec des souris exprimant la recombinase Cre du bactériophage P1 sous le contrôle d'un promoteur ubiquitaire (Kühn and Torres, 2002). Ainsi, chez les souris tPA Null, la délétion de l'exon 3 induit précocement un décalage du cadre de lecture et la génération d'un codon stop. Chez les souris tPA KO, l'insertion de la cassette néomycine est réalisée à partir de l'exon 8 codant le domaine kringle 2 (Figure 38). Bien que les données montrent l'absence de l'ARN du tPA chez ces souris, l'insertion en aval de la cassette néomycine pourrait potentiellement permettre l'expression de variants transcriptionnels du tPA chez ces animaux (les isoformes potentielles du tPA humain sont référencées dans la base de donnée Uniprot ; N° P00750) (Carmeliet *et al.*, 1994).

Outre la différence de stratégie génétique utilisée pour générer les souris tPA KO, une récente étude de Szabo et collaborateurs a mis en évidence que le génome des souris tPA KO comporte de larges fragments d'ADN issues des cellules souches embryonnaires 129, utilisées pour générer la lignée. Cette étude met en évidence un cluster de gènes différentiellement exprimés ainsi que différentes mutations héritées de la souche 129 chez les souris tPA KO et ce, même après plusieurs générations de croisement avec des souris C57BL6/J (Szabo *et al.*, 2016). L'analyse transcriptomique réalisée dans cette étude révèle la délétion ou la substitution de séquences codantes, parmi lesquelles sont retrouvés des gènes impliqués dans certaines fonctions cérébrales. Ces travaux suggèrent que la contamination génétique héritée de la souche 129 pourrait confondre l'interprétation des résultats obtenus chez les souris tPA KO. En effet, l'étude d'autres lignées transgéniques, telles que les souris déficientes en MMPs, a permis de révéler que certains phénotypes décrits chez ces animaux étaient liés aux mutations génétiques héritées de la souche 129 (Vanden Berghe *et al.*, 2015). Dans notre modèle tPA Null, les cellules souches embryonnaires utilisées pour générer la lignée sont issues du

fond génétique C57BL/6NTac et non 129, permettant de s'affranchir des effets potentiels des mutations décrites par Szabo et collaborateurs (Szabo *et al.*, 2016). Ainsi, la divergence des phénotypes décrits entre les souris tPA Null et tPA KO pourrait potentiellement s'expliquer par les variabilités génétiques retrouvées dans ces deux souches.

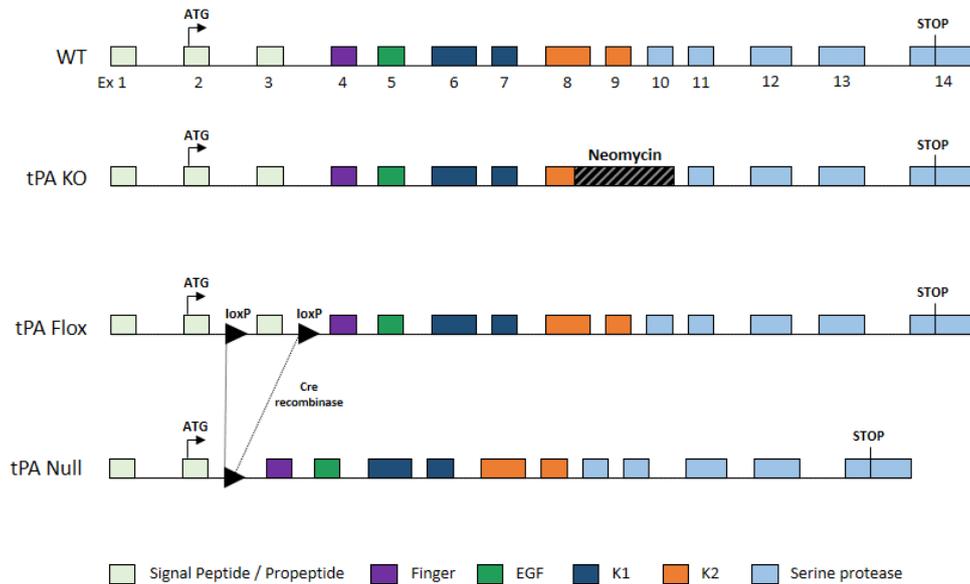


Figure 38: Représentation schématique de la séquence du gène *Plat* chez les souris déficientes en tPA. Schéma représentant les exons codants pour les différents domaines du gène *Plat* chez les souris WT, tPA KO, tPA Null et tPA Flox ainsi que les modifications génétiques mises en œuvre.

2- Les fonctions motrices chez les souris tPA Null

Comme évoqué dans la section précédente, la caractérisation phénotypique de la souche tPA Null nous a permis de mettre en évidence une augmentation de l'activité locomotrice chez ces animaux comparativement à leurs homologues sauvages dans le test de l'OF (**Figure 1C-E, Article 1**) et du BM (Figure 36). La littérature fait état de résultats contradictoires concernant l'effet de la délétion du tPA sur l'activité locomotrice selon les protocoles utilisés. En effet, Pawlak et collaborateurs ne trouvent pas de différence d'activité locomotrice spontanée mesurée dans les cages d'élevage entre les souris WT et tPA KO tandis que Krizo et collaborateurs montrent une réduction de l'activité locomotrice chez les souris tPA KO à l'aide de roues d'activité placées dans la cage des animaux (Krizo *et al.*, 2018; R. Pawlak *et al.*, 2002). Dans un protocole similaire au nôtre, Calabresi et collaborateurs décrivent une diminution du nombre de redressements chez les animaux tPA KO testés en OF mais ne détectent pas de différence de l'activité horizontale entre les deux génotypes (Calabresi *et al.*, 2000).

De manière intéressante, nous retrouvons une hyperactivité locomotrice chez les souris tPA Null à la fois dans l'OF (**Figure 1C-E, Article 1**) et le BM (Figure 36), mais ce phénotype n'est pas retrouvé lorsque les souris sont testées en cages d'activité (Figure 39). En effet, la mesure de l'activité motrice

spontanée à l'aide de l'actimètre ne montre pas de différence d'activité horizontale ni verticale chez les souris tPA Null par rapport aux souris WT.

La divergence des phénotypes locomoteurs observés entre ces différents tests pourrait s'expliquer par la nature anxiogénique des tests de l'OF et du BM (enceinte de grande dimension associée à une source lumineuse aversive) par rapport au test de l'actimétrie. Ainsi, la différence d'activité locomotrice observée entre les souris WT et tPA Null pourrait être liée à l'environnement anxiogène.

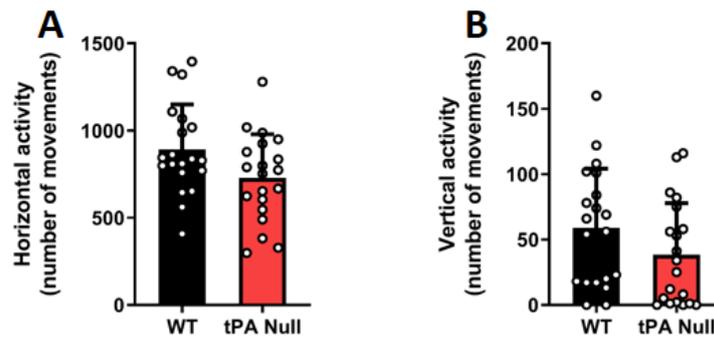


Figure 39: Mesure de l'activité locomotrice dans des cages d'activité.

L'activité horizontale (A) et verticale (B) des souris est mesurée pendant 30 minutes dans une cage d'activité permettant à la détection de mouvements des animaux par des capteurs infrarouges. Moyenne + SD ; Test de Mann Whitney : $p > 0.05$; $N = 20$ souris par génotype.

3- Évaluation des réponses émotionnelles chez les souris tPA Null

Comme nous l'avons vu dans notre introduction, le tPA joue un rôle dans les processus émotionnels tels que la peur et l'anxiété et son expression est retrouvée au sein de différentes régions cérébrales impliquées dans ces processus (Louessard *et al.*, 2016; T. Matys *et al.*, 2005; Tomasz Matys *et al.*, 2004; Robert Pawlak *et al.*, 2003; Stevenson and Lawrence, 2018). Au cours de ces travaux, nous avons montré que les souris tPA Null présentaient une diminution de l'anxiété-trait par rapport à leurs homologues de type sauvage testés en labyrinthe en zéro (en anglais : *o-maze*, OM) et en OF (**Figure 1F-H, Article 1**). Une diminution de l'anxiété-état avait été précédemment décrite par l'équipe de Sidney Strickland chez les souris tPA KO après un stress de contention ou l'injection de CRF (Tomasz Matys *et al.*, 2004; Robert Pawlak *et al.*, 2003). Ces auteurs ne montrent cependant pas de différence d'anxiété chez les souris tPA KO et leurs homologues WT en absence d'un stimulus de stress. Les différences phénotypiques observées entre notre étude et les travaux de Pawlak et collaborateurs (2003) et Matys et collaborateurs (2004) pourraient être liées à des variations méthodologiques. En effet, ces auteurs réalisent les tests durant la phase diurne des souris, correspondant à leur période de repos tandis que nous avons testé nos animaux lors de leur période d'activité (phase nocturne). Ainsi, nous pouvons émettre l'hypothèse que la réalisation des expérimentations pendant le pic d'activité des souris favorise l'exploration des dispositifs par les animaux et permet de révéler plus naturellement des phénotypes.

Concernant l'implication du tPA dans les réponses de peur, la littérature fait état de résultats contradictoires dans des modèles de peur conditionnée (Calabresi *et al.*, 2000; Huang *et al.*, 1996).

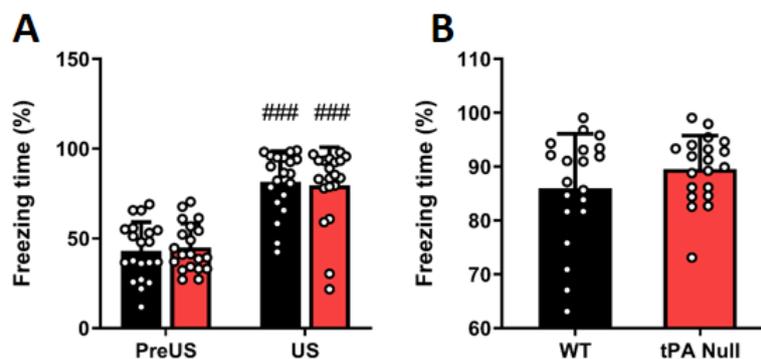


Figure 40: Mesure des réponses de peur conditionnée au contexte chez les souris tPA Null.

(A) Le temps d'immobilisation (*Freezing time*) des souris est mesuré avant (preUS) et après un choc électrique (stimulus inconditionnel, en anglais : *unconditionned stimulus*, US) lors de la phase d'acquisition du test. (B) Un test de rétention de la peur conditionnée est réalisé 48h après la phase d'acquisition au cours duquel le temps d'immobilisation, reflétant la peur conditionnée est mesuré lors de la ré-exposition au contexte du test, en absence de choc électrique. Moyenne +SD; Test de Wilcoxon : ### : $p < 0.001$ (par rapport au niveau d'immobilisation de référence (PreUS)) ; Test de Mann Whitney (comparaisons intergroupes) : $p > 0.05$; N=20 par génotype.

Lors de la caractérisation phénotypique de la lignée tPA Null, nous avons évalué les réponses de peur à l'aide d'un protocole de peur conditionnée contextuelle. Grâce à ce test, nous montrons des réponses de peur conditionnée équivalentes entre les souris WT et tPA Null (Figure 40), telles que décrites précédemment par Huang et collaborateurs chez les souris tPA KO (Huang *et al.*, 1996).

II. Étude neuroanatomique des fonctions du tPA grâce à un modèle KO conditionnel

La majorité des études visant à étudier le rôle du tPA dans les réponses comportementales ont été réalisées chez les souris tPA KO, pour lesquelles le gène du tPA est inactivé de manière constitutive dans l'ensemble des cellules de l'organisme et ce, dès la naissance. Ainsi, ces études ne permettent pas de rendre compte du rôle du tPA exprimé dans les différentes régions cérébrales ni de potentiels effets liés à un déficit neurodéveloppemental chez ces animaux (Pasquet *et al.*, 2019; Seeds *et al.*, 1999). Afin de s'affranchir de ces limites, le laboratoire PhiND a développé, en collaboration avec l'Institut Clinique de la Souris (ICS, Strasbourg), une souris transgénique tPA Flox permettant l'inactivation conditionnelle du tPA afin de permettre un contrôle spatio-temporel de l'inactivation du tPA. Dans notre modèle, l'inactivation du tPA est permise sous l'action de la recombinaison Cre, surexprimée *in situ* grâce à l'injection stéréotaxique de vecteurs AAV codant la Cre et une protéine rapportrice GFP sous le contrôle du promoteur ubiquitaire CBA (*chicken β actine*). Le sérotype de l'AAV (sérotype 9) et le promoteur utilisé (CBA) dans notre étude permet d'induire l'expression de la Cre essentiellement dans les neurones et de façon moindre dans les astrocytes (Jackson *et al.*, 2016; Sato *et al.*, 2016). Cette stratégie nous permet de contrôler spatialement l'inactivation du tPA chez les souris tPA Flox afin d'étudier l'effet de son expression dans différentes régions associées et les réponses comportementales induites. Afin de déterminer l'implication du tPA dans les modifications comportementales observées chez les souris tPA Null, nous avons choisi de déléter le tPA de manière conditionnelle dans l'hippocampe (cKO-HPC) et les noyaux basolatéral (cKO-BLA) et central de l'amygdale (cKO-CeA). En effet, l'expression du tPA est retrouvée dans ces différentes régions cérébrales décrites pour leur implication dans la régulation des processus émotionnels et de la cognition spatiale (Brown and Aggleton, 2001; Calhoon and Tye, 2015; Hartley, Lever, Burgess, and O'Keefe, 2014; Louessard *et al.*, 2016; Robert Pawlak *et al.*, 2003; Stevenson and Lawrence, 2018; Tovote *et al.*, 2015).

1- Rôle du tPA hippocampique dans la régulation des processus cognitifs et émotionnels

Le circuit trisynaptique hippocampique joue un rôle majeur dans l'encodage et le traitement des informations spatiales provenant du cortex périrhinal, postrhinal et entorhinal (Brown and Aggleton, 2001; Hartley, Lever, Burgess, and O'Keefe, 2014). Par ailleurs, la découverte des cellules de place de l'hippocampe, dont l'activité dépend de la position de l'animal dans son environnement, renforce l'idée selon laquelle l'hippocampe joue un rôle crucial dans les représentations spatiales (J. O'Keefe and Dostrovsky, 1971). De plus, dans des modèles animaux, les lésions hippocampiques induisent des déficits d'apprentissage dans différentes tâches spatiales (Douglas, 1967; Morris *et al.*, 1982). De manière intéressante, ces études montrent une dissociation entre l'hippocampe dorsal et ventral, le premier serait plutôt impliqué dans la cognition spatiale tandis que le deuxième jouerait un rôle dans la régulation des processus émotionnels (Kheirbek *et al.*, 2013; Kjelstrup *et al.*, 2002; Moser *et al.*, 1995; Moser and Moser, 1998; Sinnamoni *et al.*, 1978; Weeden *et al.*, 2015). La dissociation neuroanatomique des fonctions de l'hippocampe serait en partie liée aux différences de connectivité existant entre la partie dorsale et ventrale avec les régions cérébrales impliquées respectivement dans la cognition spatiale et les émotions (Fanselow and Dong, 2010).

Le tPA est fortement exprimé dans les neurones granulaires et est transporté le long des fibres moussues hippocampiques, correspondant aux axones des neurones granulaires projetant sur l'aire CA3 (Louessard *et al.*, 2016; Qian *et al.*, 1993; Stevenson and Lawrence, 2018). Par ailleurs, le tPA joue un rôle dans la LTP hippocampique, un mécanisme cellulaire sous-tendant la mémoire (Baranes *et al.*, 1998; Huang *et al.*, 1996; Parcq *et al.*, 2012). L'activité de cette protéase est diminuée dans les fibres moussues après un stress de contention et sa délétion hippocampique augmente les réponses anxieuses (Bahi and Dreyer, 2012b; Norris and Strickland, 2007b). Par ailleurs, le tPA protégerait du déclin cognitif induit par un stress (Robert Pawlak *et al.*, 2005). Ainsi, le tPA hippocampique constitue une cible potentielle dans la régulation des processus cognitifs et émotionnels.

a. tPA hippocampique : fonctions motrices et comportements exploratoires

Nous avons mis en évidence que la délétion du tPA dans les fibres moussues hippocampiques, par l'injection d'AAV-Cre-GFP au niveau du gyrus denté chez les souris tPA Flox, induisait une hyperactivité locomotrice en OF (**Figure 2D-F, Article 1**). En effet, les souris cKO-HPC parcourent une distance plus importante dans l'OF que les souris contrôles. De manière intéressante, un phénotype similaire avait été observé chez les souris tPA Null (**Figure 1C-E, Article 1**). De nombreux travaux menés chez le rongeur montrent une augmentation de l'activité locomotrice suite à une lésion

hippocampique (Bannerman *et al.*, 1999, 2001; Cassel *et al.*, 1998). Ces modèles lésionnels ne permettent cependant pas de conclure quant à l'implication des différentes régions hippocampiques et des réseaux neuronaux associés dans les phénotypes observés. Ces quinze dernières années, le développement d'outils chémogénétiques ou optogénétiques permettant d'activer ou d'inhiber spécifiquement certaines populations neuronales a permis une avancée considérable dans la compréhension des réseaux neuronaux régissant les réponses comportementales (Armbruster *et al.*, 2007; Banghart *et al.*, 2004; Bernstein and Boyden, 2011; Campbell and Marchant, 2018). Grâce à l'utilisation de ce type d'approche, les travaux de Kheirbek et collaborateurs ont récemment mis en évidence l'implication du gyrus denté dans les comportements exploratoires (Kheirbek *et al.*, 2013). En effet, l'activation optogénétique des cellules granulaires du gyrus denté augmente l'activité locomotrice des souris testées en OF et en EPM. Les auteurs de cette étude ont alors conclu à un rôle des cellules granulaires de l'hippocampe dans les comportements exploratoires.

Dans le cadre de nos travaux, nous montrons une hyperactivité locomotrice suite à la délétion du tPA granulaire du gyrus denté de l'hippocampe (**Figure 2A-F, Article 1**). De façon semblable, une augmentation de l'activité exploratoire chez la souche tPA KO a été précédemment décrite par l'équipe de Stella Tsirka, dans le test de l'OF et lors d'un test de réactivité à un nouvel objet (Pothakos *et al.*, 2010). Afin de déterminer si l'augmentation de l'activité locomotrice observée chez les souris cKO-HPC peut se traduire comme une augmentation des comportements exploratoires, il serait nécessaire de réaliser des analyses complémentaires. Par exemple, nous pourrions mesurer le nombre de redressements effectués lors du test de l'OF ou à l'aide de l'actimètre et également mesurer l'exploration des souris dans le test du *Hole Board* ou dans un test d'exploration d'un nouvel objet. D'un point de vue fonctionnel, il serait également pertinent d'évaluer l'activation neuronale à l'aide d'un marquage de type c-Fos chez les souris tPA Null et cKO-HPC comparativement à leurs homologues contrôles après l'exposition des animaux à l'OF. De plus, des enregistrements électrophysiologiques *in vivo*, lors d'une tâche d'exploration en OF permettraient d'évaluer la neurotransmission hippocampique en fonction de la présence ou de l'absence de tPA.

Indépendamment des effets du tPA liés à l'activation du plasminogène en plasmine, les travaux du laboratoire ont montré que le tPA pouvait potentialiser l'influx calcique lors d'une stimulation des récepteurs NMDA (Nicole *et al.*, 2001; Parcq *et al.*, 2012). Par ailleurs, l'utilisation d'un anticorps bloquant l'interaction du tPA avec la sous-unité GluN1 du récepteur NMDA grâce à une immunisation systémique ou *via* son injection *in situ* dans le cortex entorhinal induit des déficits spatiaux (Benchenane *et al.*, 2007; Hébert *et al.*, 2017; Obiang *et al.*, 2012). Le tPA étant transporté le long des axones et des dendrites, celui-ci est susceptible d'être exocyté au niveau post-synaptique par les cellules granulaires du gyrus denté ou au niveau présynaptique par les fibres moussues connectant les

neurones de CA3. Ainsi, l'injection d'un anticorps bloquant l'interaction du tPA avec les récepteurs NMDA au niveau du gyrus denté et de CA3 de souris sauvages nous permettrait d'évaluer l'effet de cette signalisation sur les phénotypes observés en OF.

b. tPA hippocampique et cognition spatiale

La mise en évidence d'une altération de la plasticité synaptique hippocampique chez les souris déficientes en tPA a longtemps suggéré l'implication de cette protéase dans les processus de mémorisation (Baranes *et al.*, 1998; Calabresi *et al.*, 2000; Huang *et al.*, 1996; Parcq *et al.*, 2012; Qian *et al.*, 1993; Zhuo *et al.*, 2000). Néanmoins, aucune étude n'a jusqu'alors montré l'implication du tPA hippocampique dans ces processus. Grâce à notre modèle d'inactivation conditionnelle du tPA hippocampique, nous montrons que l'absence de tPA induit seulement des déficits spatiaux partiels lors du *probe test* du BM (**Figure 2J-L, Article 1**). En effet, bien que les souris cKO-HPC explorent significativement plus la zone cible par rapport aux autres zones, l'analyse du temps passé au niveau de la zone cible montre que celui-ci n'est pas significativement différent d'un niveau d'exploration correspondant au hasard (**Figure 2J-L, Article 1**). Ainsi, notre étude suggère que le tPA exprimé au niveau du gyrus denté n'affecte que partiellement les performances spatiales des animaux. De plus, les déficits spatiaux observés chez les souris tPA KO et tPA Null seraient vraisemblablement liés à l'absence de tPA dans d'autres régions cérébrales impliquées dans le traitement des informations spatiales. Ces résultats sont, en effet, cohérents avec les données obtenues au laboratoire par Hébert et collaborateurs, montrant que la signalisation du tPA avec le récepteur NMDA au niveau du cortex entorhinal (CE) joue un rôle dans la cognition spatiale (Hébert *et al.*, 2017). L'hippocampe reçoit des afférences provenant du CE et les neurones de CA1 envoient à leur tour des efférences vers les couches profondes du CE. Le tPA étant également exprimé par les neurones au niveau de CA1 (Sallés and Strickland, 2002; Stevenson and Lawrence, 2018), il serait intéressant d'évaluer les performances spatiales des souris suite à la délétion du tPA spécifiquement au niveau de la voie CA1-CE.

Classiquement, le gyrus denté de l'hippocampe est décrit pour son rôle dans l'encodage des informations sensorielles provenant des régions parahippocampiques et plus particulièrement dans la séparation de pattern. Le processus de séparation de pattern permet d'encoder des informations sensorielles similaires et de les stocker de manière distincte, sans chevauchement (GoodSmith *et al.*, 2019; Leutgeb *et al.*, 2007). Le tPA étant fortement exprimé dans les cellules granulaires du gyrus denté, il serait intéressant d'évaluer l'effet du tPA dans ces processus à l'aide d'une tâche de discrimination spatiale adaptée du test de localisation d'objet (van Goethem *et al.*, 2018).

c. tPA hippocampique et émotions

Au cours de nos travaux, nous montrons que la délétion du tPA hippocampique n'affecte pas les réponses anxieuses mesurées en OM et en OF (**Figure 2G-I, Article 1**). Ces résultats sont contradictoires par rapport aux données obtenues par Bahi et Dreyer montrant une augmentation des réponses anxieuses et des comportements dépressifs suite à la délétion du tPA hippocampique (Bahi and Dreyer, 2012). Dans leur étude, l'inactivation du tPA hippocampique est réalisée grâce à l'injection de lentivirus codant pour les sh-RNA au niveau du gyrus denté caudal contrairement à notre approche ciblant l'ensemble du gyrus denté. Ainsi, dans l'étude de Bahi et Dreyer, le tPA n'est plus exprimé dans la partie ventrale de l'hippocampe. Or, il est établi que cette sous-région hippocampique serait spécifiquement impliquée dans les processus émotionnels (Fanselow and Dong, 2010; Kjelstrup *et al.*, 2002). Dans notre modèle, la délétion totale du tPA hippocampique le long de l'axe rostro-caudal pourrait ainsi masquer ces phénotypes.

2- Rôle du tPA amygdalien dans les processus émotionnels

L'amygdale est une structure centrale impliquée dans le traitement des émotions. Cette structure peut être subdivisée en différents noyaux qui sont intimement interconnectés et établissent également des connexions avec de nombreuses régions cérébrales participant au contrôle des réponses émotionnelles (Ledoux, 2000; Tovote *et al.*, 2015).

Le tPA est exprimé dans les différents noyaux amygdaliens et son activité protéolytique est détectée au niveau de l'amygdale centrale et médiane (Louessard *et al.*, 2016; Tomasz Matys *et al.*, 2004; Robert Pawlak *et al.*, 2003; Stevenson and Lawrence, 2018). Par ailleurs, Pawlak et collaborateurs (2003) et Matys et collaborateurs (2004) montrent que l'activité protéolytique du tPA augmente dans ces noyaux suite à l'induction d'un stress de contention ou à l'injection intracérébroventriculaire de CRF (Tomasz Matys *et al.*, 2004; Robert Pawlak *et al.*, 2003).

Lors de notre étude, nous avons montré que la délétion du tPA au niveau de l'amygdale basolatérale (BLA) ne modifie pas les réponses anxieuses des animaux (**Figure 4G-I, Article 1**) tandis que sa délétion au niveau du noyau central (CeA) induit une diminution de l'anxiété dans le test de l'OF (**Figure 3G-H, Article 1**). De fait, les souris cKO-CeA parcourent une distance plus importante au centre de l'OF et passent également plus de temps dans cette zone anxiogène. Nous avons également démontré une hyperactivité locomotrice chez les souris cKO-CeA dans le test de l'OF (**Figure 3D-F, Article 1**). Une augmentation de l'activité locomotrice en OF pourrait confondre l'interprétation des résultats concernant l'état anxieux des animaux (Prut and Belzung, 2003). Néanmoins, nous n'avons pas observé de différence quant à la distance parcourue dans la périphérie de l'OF entre les souris

contrôles et cKO-CeA (Figure 41). Par ailleurs, lorsque la distance parcourue dans les différentes zones est rapportée à la distance totale parcourue par les souris, nous montrons bien que l'effet anxiolytique est conservé dans le groupe cKO-CeA (Figure 41).

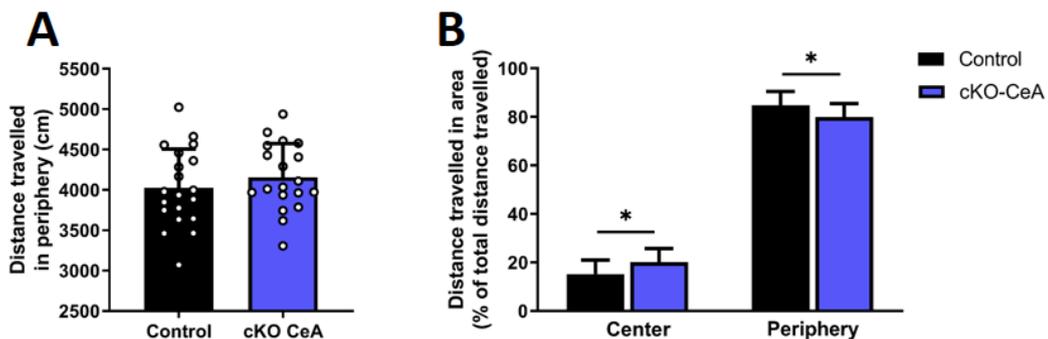


Figure 41: Mesure de la distance parcourue dans le test de l'OF chez les souris cKO-CeA.

(A) Mesure de la distance parcourue dans la périphérie de l'OF. (B) Analyse de la distance parcourue au centre et en périphérie de l'OF, rapportée en pourcentage à la distance totale parcourue. Moyenne +SD ; Test de Mann Whitney : * : $p < 0,05$; N= 20 Control ; N=19 cKO-CeA.

Le phénotype anxiolytique décrit chez les souris cKO-CeA n'est cependant pas retrouvé à l'aide du test du OM (Figure 31, Article 1). Notons que, les variations interindividuelles des réponses mesurées à l'aide du test du OM sont également plus importantes que pour le test de l'OF, ceci pouvant masquer un phénotype potentiel. Il serait toutefois intéressant de compléter l'analyse des résultats obtenus en OM par la mesure du temps passé dans les bras ouverts du labyrinthe au cours des premières minutes du test.

3- Le tPA est exprimé par les neurones PKC- δ au niveau de la CeA

Bien que les travaux menés par l'équipe de Sidney Strickland aient mis en évidence que l'activité du tPA pouvait être retrouvée au sein l'amygdale centrale, ces auteurs n'avait pas identifié la population neuronale responsable de cette activité.

Le noyau central de l'amygdale reçoit des afférences des neurones pyramidaux localisés dans la BLA qui font synapse avec différentes populations de neurones GABAergiques au sein de la CeA (Ledoux, 2000; Tye *et al.*, 2011). Il existe également un réseau intrinsèque au sein de la CeA formée

par les différents interneurons GABAergiques exerçant des connexions réciproques (Hunt *et al.*, 2017).

Dans notre analyse, nous montrons que les fibres neuronales exprimant le tPA colocalisent avec le marqueur GABAergique vGAT suggérant l'expression du tPA par les interneurons au niveau de la CeA (**Figure 5A, Article 1**). En revanche, le marquage du tPA ne semble pas colocaliser avec le marqueur exciteur vGluT2 (Figure 42).

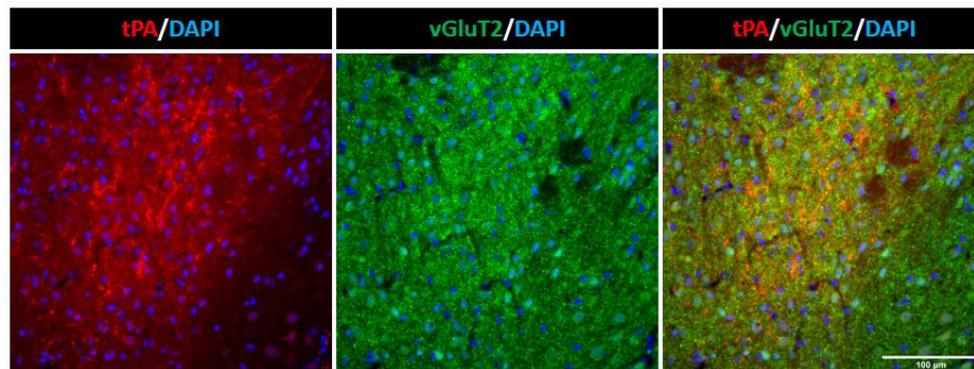


Figure 42: Immunomarquage du tPA et du marqueur vGluT2 au niveau de la CeA.

Ce résultat suggère alors que l'activité protéolytique du tPA détectée au niveau de l'amygdale centrale serait liée à l'expression du tPA par les interneurons de la CeA et non par des neurones excitateurs provenant de la BLA. Les interneurons retrouvés dans la CeA sont principalement regroupés selon deux populations : les interneurons exprimant la protéine kinase-C delta (PKC- δ) et les interneurons exprimant la somatostatine (Haubensak *et al.*, 2010b; Hunt *et al.*, 2017). La caractérisation immunohistochimique (IHC) nous a permis de montrer que les fibres neuronales exprimant le tPA colocalisent spécifiquement avec le marqueur PKC δ (**Figure 5B-C, Article 1**).

Ces dix dernières années, la communauté scientifique a permis de révéler l'implication des neurones PKC δ de l'amygdale centrale dans de nombreux processus. En outre, l'activité des neurones PKC δ de la CeA régule les réponses de peur conditionnée et leur généralisation, les apprentissages conditionnés par un stimulus aversif, les réponses à la douleur et les comportements alimentaires (Cai *et al.*, 2014; Ciochi *et al.*, 2010; Cui *et al.*, 2017; Haubensak *et al.*, 2010b). Par ailleurs, les travaux de Cai et collaborateurs et Botta et collaborateurs ont montré que l'activation optogénétique des neurones PKC- δ de la CeA module les réponses anxieuses (Botta *et al.*, 2015; Cai *et al.*, 2014). L'étude de Cai et collaborateurs a, par exemple, mis en évidence un effet anxiolytique induit par l'activation de ces neurones à l'aide du test de l'EPM, de l'OF et de la boîte claire/sombre (Cai *et al.*, 2014).

Compte tenu des données de la littérature, nous avons réalisé des expériences préliminaires afin d'évaluer l'activation neuronale des neurones PKC δ dans la CeA après l'exposition à un test d'OF. Nous avons, pour cela, effectué des immuno-marquages de la protéine c-Fos et des neurones PKC δ chez des souris contrôles et cKO-CeA, 90 minutes après l'exposition des animaux à l'OF.

Bien que le nombre de cellules c-Fos dans la CeA soit équivalent entre nos deux groupes, nous observons une tendance à l'augmentation du pourcentage de neurones co-marqués c-Fos/PKC δ chez les souris cKO-CeA par rapport à leurs homologues contrôles (Figure 43). Ce résultat pourrait se traduire comme une activation neuronale plus importante des neurones PKC δ suite à la délétion du tPA, liée aux phénotypes hypo-anxieux observés en OF. Ainsi, nos résultats seraient également cohérents avec les données obtenues par Cai et collaborateurs montrant un effet anxiolytique suite l'activation des neurones PKC δ (Cai *et al.*, 2014).

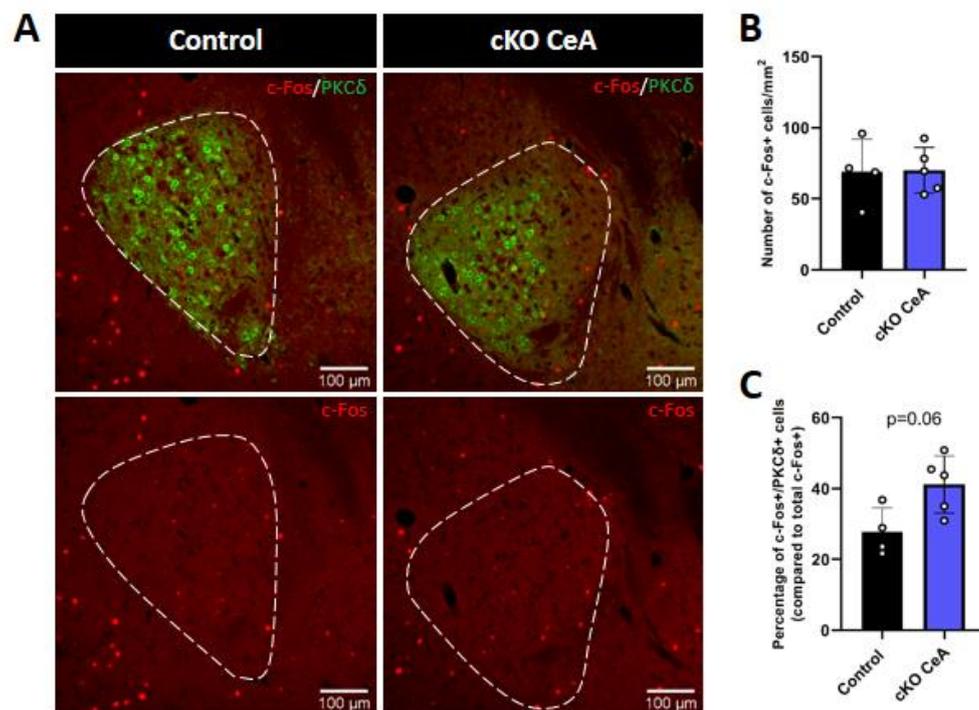


Figure 43: Analyse de l'activation neuronale au niveau de la CeA.

(A) Immunohistochimie révélant la protéine c-Fos et les neurones exprimant la PKC- δ au niveau de la CeA chez les souris contrôles et cKO-CeA, 90 minutes après le test de l'OF. (B) Quantification du nombre de cellules positives pour le marqueur c-Fos dans la CeA. (C) Quantification du pourcentage de neurones positifs pour le marqueur c-Fos et PKC- δ (rapporté en pourcentage par rapport au nombre total de cellules c-Fos+). Moyenne \pm SD ; Test de Mann Whitney ; n=4 coupes/animal ; N= 4 Control ; N= 5 cKO-CeA.

Le mécanisme par lequel le tPA exprimé par les neurones PKC δ de la CeA module des réponses émotionnelles pourrait être lié à ses effets dépendant de la plasmine. Par exemple, cette protéase pourrait influencer la plasticité synaptique en agissant sur la maturation du BDNF ou sur le remodelage de la MEC (Mataga *et al.*, 2004; Oray *et al.*, 2004; Pang *et al.*, 2004). Les travaux menés par Bennur et collaborateurs ont notamment montré que la plasticité structurelle des épines dendritiques en réponse à un stress est altérée chez les souris tPA KO au niveau de l'amygdale médiane (Bennur *et al.*, 2007). Dans notre étude, il serait intéressant de déterminer si la délétion du tPA dans la CeA affecte la morphologie des épines en condition basale. Outre ses effets liés à la plasmine, le tPA est également décrit pour ses propriétés de neuromodulation de l'influx calcique *via* son interaction avec les récepteurs NMDA (Nicole *et al.*, 2001; Parcq *et al.*, 2012). Les neurones excitateurs de la BLA projetant sur la CeA, il est envisageable que le tPA sécrété par les neurones PKC δ puisse influencer la neurotransmission glutamatergique en agissant sur les récepteurs NMDA exprimés au niveau de la CeA (Alhadeff *et al.*, 2015; Babaev *et al.*, 2018). Pour répondre à cette hypothèse, nous pourrions mesurer les réponses anxieuses suite à l'injection d'un anticorps bloquant l'interaction du tPA avec les récepteurs NMDA au niveau de la CeA chez des souris sauvages. Il serait également envisageable de réaliser des expériences de *rescue* chez les souris tPA Null afin de déterminer si la surexpression d'un tPA sauvage ou muté sur son domaine Kringle 2, nécessaire à son interaction avec les récepteurs NMDA, augmente les réponses anxieuses des animaux.

Discussion (Article 2)

I. Modèles d'études pour visualiser l'expression neuronale du tPA

Comme nous l'avons vu dans l'introduction, le tPA est une sérine protéase largement exprimée dans le parenchyme cérébral notamment par les neurones. Cependant, compte tenu de sa faible concentration et de son transport le long des dendrites et des axones des neurones, l'identification des populations neuronales exprimant le tPA par des techniques immunohistochimiques reste imprécise. Ainsi, l'utilisation d'outils pharmacologiques permettant le blocage du transport axo-dendritique du tPA ou de modèles transgéniques permettant l'expression d'une protéine rapportrice sous le contrôle de l'activité du promoteur du tPA a permis de mieux caractériser son expression au niveau anatomique et cellulaire (Louessard *et al.*, 2016; Stevenson and Lawrence, 2018; H. Yu *et al.*, 2001).

Dans notre analyse, nous avons utilisé un vecteur viral adéno-associé codant une protéine rapportrice GFP sous le contrôle du promoteur Plat afin de caractériser les sous-types neuronaux exprimant le tPA *in vivo*. L'injection de cette construction au niveau du gyrus denté de l'hippocampe a permis de révéler l'expression du rapporteur GFP au niveau des cellules granulaires et des cellules moussues du hile (**Figure 1 ; Article 2**). Par ailleurs, nous avons pu mettre en évidence la colocalisation du rapporteur GFP avec l'immunomarquage du tPA dans les fibres moussues. Ce pattern d'expression avait déjà été retrouvé dans l'étude de Stevenson et Lawrence en 2018, chez les souris rapportrices Plat- β GAL et tPABAC-Cer, permettant de caractériser respectivement les populations cellulaires exprimant le tPA et son trafic cytoplasmique (Stevenson and Lawrence, 2018). Cette dernière étude s'était majoritairement focalisée sur la description régionale de l'expression du tPA mais n'a pas permis d'identifier les sous-types neuronaux pouvant l'exprimer au niveau de ces différentes régions cérébrales.

Dans notre étude, nous avons cherché à caractériser l'expression du tPA au niveau du cortex cérébral, une région pour laquelle l'immunodétection du tPA neuronal n'est pas possible sans traitement à la colchicine. L'injection d'un AAV-Plat-GFP au niveau du cortex somatosensoriel nous a permis de montrer que l'expression du rapporteur GFP était retrouvée uniquement dans les neurones (**Figure 2A ; Article 2**). En prenant en compte le tropisme du sérotype d'AAV utilisé (sérotype 9), notre construction était susceptible d'infecter à la fois les neurones et les astrocytes (Alves *et al.*, 2016). En effet, l'utilisation d'une construction similaire sous le contrôle du promoteur ubiquitaire CAG (promoteur hybride *chicken β -actin/cytomegalovirus*) permet la transduction des neurones et des astrocytes tandis que les oligodendrocytes et la microglie ne sont pas transduits (Alves *et al.*, 2016).

De manière similaire, nous n'avons pas observé d'expression de notre rapporteur Plat-GFP dans la microglie et les oligodendrocytes (**Figure 2A ; Article 2** ; les données concernant les oligodendrocytes ne sont pas présentées ici). Concernant l'expression potentielle du tPA dans les astrocytes, la littérature a uniquement rapporté son expression en culture ou dans des contextes pathologiques (Adhami *et al.*, 2008; Docagne *et al.*, 1999; Hultman *et al.*, 2008; Joo *et al.*, 2010; J. W. Kim *et al.*, 2011). Dans notre modèle, nous avons voulu déterminer si l'expression de notre rapporteur pouvait différer dans un contexte inflammatoire induit par l'injection de LPS au niveau du cortex somatosensoriel. Nous n'avons cependant pas observé de différences d'expression de notre rapporteur après l'injection de lipopolysaccharides (LPS) dans les cellules gliales (**Supplementary Figure 1 ; Article 2**). L'injection de LPS n'est probablement pas le modèle le plus adapté pour induire l'expression de tPA dans les astrocytes. Adhami et collaborateurs ont montré que le tPA pouvait être exprimé dans les astrocytes après une ischémie cérébrale chez le rat nouveau-né (Adhami *et al.*, 2008). Au regard de ces données, nous pourrions soumettre des souris ayant reçu une injection intracorticale du rapporteur AAV-Plat-GFP à un protocole d'ischémie cérébrale afin de visualiser l'effet de l'ischémie sur l'expression astrocytaire du tPA.

II. Expression du tPA par les interneurons PV

Dans un second temps, nous avons cherché à caractériser les sous-types neuronaux surexprimant notre rapporteur Plat-GFP en condition physiologique. En l'absence de marqueurs ubiquitaires des neurones excitateurs disponibles en immunohistochimie, nous avons fait le choix de mettre en évidence les neurones inhibiteurs par un marqueur GABA. Nous avons ainsi pu montrer l'expression de notre rapporteur à hauteur de 37% dans les interneurons GABAergiques (**Figure 2B ; Article 2**). Parallèlement à cela, nous avons également retrouvé l'expression du rapporteur Plat-GFP dans les neurones excitateurs marqués TBR1 (en anglais : *T-Box Brain Transcription Factor 1*) tels que décrits précédemment dans l'étude de Louessard et collaborateurs (**Supplementary Figure 2 ; Article 2**) (Louessard *et al.*, 2016).

L'utilisation de co-immunomarquages nous a permis de mettre en évidence que la majorité des neurones GABAergiques étaient des interneurons exprimant la protéine de liaison au calcium, parvalbumine (PV) (**Figure 2B-C ; Article 2**). Par ailleurs, nous avons pu révéler la présence de *perineuronal nets*, autour des interneurons PV, co-marqués avec le Plat-GFP (**Figure 2D-E ; Article 2**). Des enregistrements électrophysiologiques en patch-clamp couplés à des analyses par *single-cell* RT-PCR dans le cortex visuel de souris ont permis de confirmer la présence des ARN du tPA dans les interneurons PV à décharges rapides (**Figure 3 ; Article 2**).

Peu de données de la littérature ont décrit l'expression du tPA dans les neurones inhibiteurs. En effet, son expression a été détectée dans les interneurons périvasculaires exprimant le peptide vasointestinal (VIP) et dans les interneurons exprimant la somatostatine (SOM) au niveau du stratum oriens de l'hippocampe (Fredriksson *et al.*, 2015; Stevenson and Lawrence, 2018). Une étude a également décrit son expression dans les interneurons PV au niveau du cortex somatosensoriel. Cependant, le nombre de neurones détectés positifs pour le tPA et la qualité du marquage retrouvé dans cette étude semblent incohérents avec l'ensemble des données fournies dans la littérature (Chu *et al.*, 2015). Dans notre étude, nous avons pu confirmer l'expression du tPA dans les interneurons PV à l'aide de deux approches. Nous avons également pu montrer que la majorité des interneurons PV exprimant le rapporteur Plat-GFP co-localisaient avec la lectine WFA permettant la mise en évidence des PNNs (**Figure 2D-E ; Article 2**).

III. Implication du système tPA/plasmine dans le métabolisme des PNNs

1- Mécanismes mis en jeu

Le développement d'une lignée transgénique déficiente pour le tPA dans les interneurons PV nous a permis de déceler que l'intensité du marquage des PNNs et la proportion de PNNs présentant une intensité élevée était augmentée chez les souris tPA Flox^{+/+}; PV-Cre^{+/-} (cKO) par rapport à leurs homologues contrôles (**Figure 4 ; Article 2**).

Dans un modèle *in vitro* de culture primaire d'interneurones, nous avons pu montrer que le tPA seul n'était pas capable de dégrader les PNNs. En revanche, nous avons mis en évidence que ce mécanisme est dépendant de la conversion du plasminogène en plasmine par le tPA endogène (**Figure 5 ; Article 2**). Par ailleurs, nous avons pu démontrer *in vitro* que la dégradation des PNNs était dépendante du clivage du CSPG agrégé par la plasmine (**Figure 6 ; Article 2**). L'agrégé est un composant majoritaire des PNNs dans le cortex cérébral. En effet, une large proportion de PNNs marqués avec la WFA co-localise avec le marqueur agrégé notamment au niveau du cortex somatosensoriel (Ueno *et al.*, 2018). Par ailleurs, sa délétion conditionnelle dans le SNC empêche l'agrégation d'autres composants des PNNs et entraîne une perte complète du marquage WFA dans le cortex somatosensoriel adulte (Rowlands *et al.*, 2018). Nous pouvons suggérer que le clivage du CSPG agrégé par le système tPA/plasmine peut également impacter l'agrégation d'autres composants des PNNs et influencer leur condensation. Les données de la littérature suggèrent que la plasmine pourrait avoir d'autres substrats de clivage au sein des PNNs tels que les CSPGs versican, phosphacan et le neurocan (Kenagy *et al.*, 2002; Wu *et al.*, 2000). Ainsi, il serait pertinent de comparer l'intensité de ces différents CSPGs au sein des PNNs dans le cortex des animaux cKO et contrôles. Bien que l'activité de la plasmine soit retrouvée dans notre modèle de culture d'interneurones (**Supplementary Figure 4 ;**

Article 2), la dégradation des PNNs a été observée uniquement suite à l'ajout de plasminogène exogène (**Figure 5 ; Article 2**). En effet, nous n'avons pas observé d'effet significatif du *turnover* des PNNs dans les cultures traitées à l'aprotinine seule par rapport aux cellules non-traitées (**Figure 5E ; Article 2**). L'expression du plasminogène par les interneurons n'est peut-être pas suffisante pour induire une dégradation des PNNs en culture. Il serait intéressant de confirmer notre mécanisme *in vivo* en mesurant l'intensité des PNNs marqués à la WFA chez des souris déficientes en plasminogène ou chez des animaux WT ayant subi une injection intracérébrale d'aprotinine. Le fait est que dans le SNC, l'expression du plasminogène a été rapportée au sein de différents sous-types neuronaux tels que les neurones excitateurs et les interneurons PV (Taniguchi *et al.*, 2011; Tsirka *et al.*, 1997; Zhang *et al.*, 2002). Nous pourrions identifier la source de plasminogène responsable du *turnover* des PNNs en condition physiologique grâce à l'utilisation de modèles transgéniques déficients en plasminogène respectivement dans les neurones excitateurs ou inhibiteurs.

In vitro, nous avons montré que le plasminogène pouvait être activé en plasmine dans un modèle de culture d'interneurones (**Figure 5F-G ; Article 2**). Dans le compartiment vasculaire, la fibrine constitue une surface d'activation du plasminogène *via* la liaison des sites LBS présents sur les domaines kringles du plasminogène avec les résidus lysine de la fibrine (Hoylaerts *et al.*, 1982; Law *et al.*, 2013). Dans le SNC, l'activation du plasminogène est favorisée en présence d'astrocytes, agissant comme une surface d'activation (Briens *et al.*, 2017). Notre modèle de culture d'interneurones ne contient qu'une faible proportion d'astrocytes car les cellules sont traitées à la cytosine arabinoside permettant d'inhiber la prolifération des cellules gliales. Il serait intéressant de déterminer si les PNNs présents dans nos cultures constituent également une surface d'activation du plasminogène. Afin de répondre à cette interrogation, nous pourrions mesurer l'activité de la plasmine en présence ou en absence de PNNs. Pour ce faire, il serait pertinent d'ajouter du plasminogène exogène et de mesurer l'activité de la plasmine grâce à un substrat fluorescent, dans nos cultures prétraitées ou non avec la ChABC ou la H-ase. Il serait également intéressant de visualiser l'interaction du plasminogène couplé à un fluorophore à la surface des neurones avec la dégradation des PNNs en temps réel à l'aide d'une lectine WFA directement couplée à un fluorophore.

Nous avons montré *in vitro*, que le clivage des PNNs par la plasmine était indépendant de l'activation d'autres protéases telles que les MMPs ou les ADAMTS. Effectivement, l'utilisation d'un inhibiteur de large spectre (inhibiteur de métalloprotéinase 3, TIMP3) de ces deux familles de protéases ne reverse pas l'effet de la plasmine sur la dégradation des PNNs (**Supplementary Figure 5 ; Article 2**). Il est cependant important de noter que notre modèle *in vitro* est essentiellement composé d'interneurones et que l'expression des MMPs et des ADAMTS est également assurée par des neurones excitateurs et les cellules gliales (Tauchi *et al.*, 2012; Testa *et al.*, 2019). Il est donc

envisageable que le tPA et la plasmine puissent contribuer au remodelage des PNNs *in vivo* en activant respectivement les pro-ADAMTS ou les pro-MMPs sécrétées dans le milieu extracellulaire (Figure 44). Par ailleurs, le tPA peut potentiellement contrôler le *turnover* des PNNs de manière indirecte en stimulant l'expression de la MMP-9 (Hu *et al.*, 2006), décrite dans la littérature pour jouer un rôle dans la dégradation des PNNs (Kelly *et al.*, 2015; Wen *et al.*, 2018).

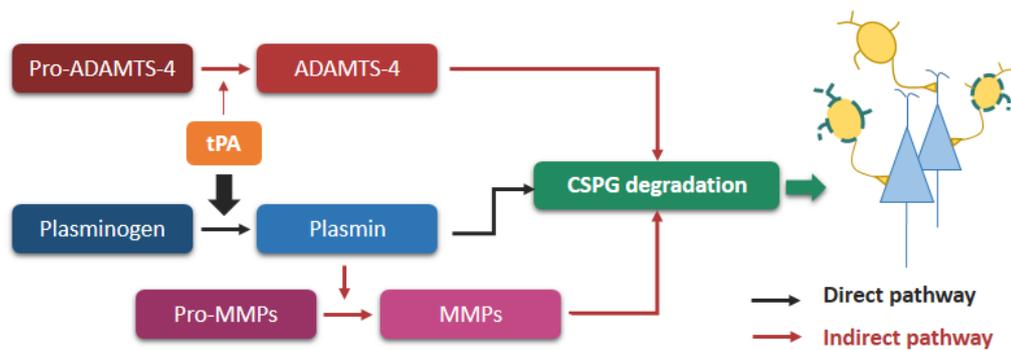


Figure 44: Régulations potentielles de la dégradation des PNNs par le tPA.

2- Conséquences fonctionnelles de la régulation du métabolisme des PNNs par le système tPA/plasmine

Les travaux de la littérature montrent que la dégradation des PNNs dans le cerveau adulte modifie l'activité électrophysiologique des neurones. En effet, la déplétion des PNNs module l'excitabilité neuronale et la plasticité synaptique (Dityatev *et al.*, 2007; Shi *et al.*, 2019). L'activité des neurones PV régule également le rythme oscillatoire gamma responsable de la synchronisation des réseaux neuronaux en exerçant un tonus inhibiteur sur les cellules pyramidales (Cardin *et al.*, 2009; Sohal *et al.*, 2009). Par ailleurs, il a été montré que la déplétion des PNNs potentialise l'activité gamma (Faini *et al.*, 2018; Lensjø *et al.*, 2017).

Chez nos animaux cKO, l'augmentation de la densité des PNNs pourrait également s'accompagner d'une modification de l'activité des interneurons PV. Il serait pertinent de réaliser des enregistrements électrophysiologiques en patch-clamp des neurones excitateurs et inhibiteurs. Nous pourrions également analyser les oscillations gamma grâce à des enregistrements en électroencéphalographie ou par la mesure des potentiels de champs chez les souris cKO et chez leurs homologues contrôles.

Outre les modifications électrophysiologiques des interneurons PV observées suite à la manipulation des PNNs, de nombreuses études ont établi que leur déplétion au sein de régions cérébrales spécifiques pouvait également modifier les réponses comportementales.

Au cours de ces travaux de thèse, nous avons également cherché à caractériser le phénotype comportemental des souris cKO afin de déterminer le rôle du tPA exprimé dans les interneurons PV dans les réponses comportementales. Nous n'avons pas montré de différence significative du niveau d'anxiété chez ces animaux mesuré à l'aide du OM. Par ailleurs, le temps passé au centre de l'OF ne diffère pas entre les souris contrôles et déficientes en tPA dans les neurones PV (Figure 45). En revanche, nous avons pu observer une augmentation de la distance parcourue en périphérie chez les souris cKO par rapport à leurs homologues contrôles. Ce phénotype peut alors traduire une augmentation de l'anxiété chez cette lignée. Ce phénotype devra cependant être confirmé par d'autres tests permettant de mesurer l'anxiété tels que la boîte claire/sombre ou le test d'hypophagie induite par la nouveauté (en anglais : *Novelty Suppressed Feeding*, NSF).

Nous n'avons pas observé de déficits de la cognition spatiale chez des souris cKO à l'aide du test du labyrinthe en Y et du labyrinthe de Barnes (Figure 45). Il serait judicieux de réaliser un test d'inversion de position après le *probe test* du Barnes maze afin d'évaluer la flexibilité cognitive des animaux. En effet, les PNNs sont décrits comme inhibant la flexibilité cognitive puisque celle-ci est augmentée chez les animaux déficients en tenascine-R et ou après une déplétion pharmacologique des PNNs (Happel *et al.*, 2014; Morellini *et al.*, 2010).

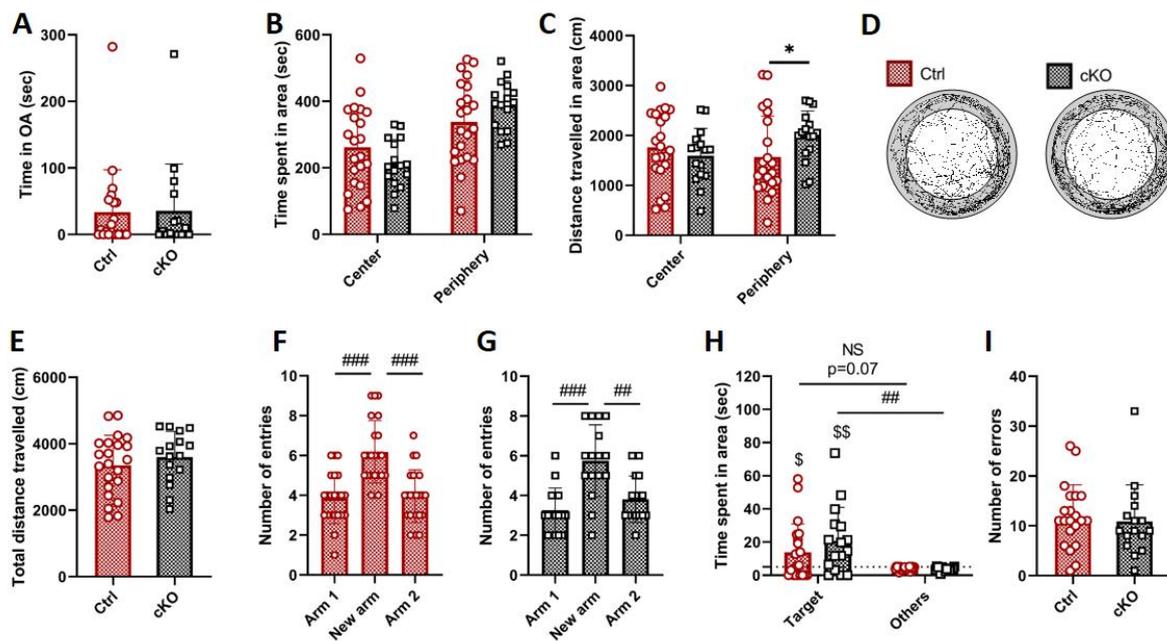


Figure 45: Caractérisation comportementale des souris tPA Flox^{+/+}; PV-Cre^{+/-}.

(A) Mesure du temps passé les bras ouverts du labyrinthe en zéro entre les deux génotypes. (B-E) Résultats obtenus pour le test de l'OF chez les souris tPA Flox^{+/+}; PV-Cre^{+/-} (cKO) et tPA Flox^{-/-}; PV-Cre^{+/-} (Ctrl) montrant le temps passé (B) et la distance parcourue (C) au centre et à la périphérie de l'OF. (D) Des tracés représentatifs sont présentés pour les deux génotypes. (E) Distance totale parcourue par les animaux lors des 10 minutes du test. (F-G) Analyse du nombre d'entrées réalisées dans les différents bras lors du test de rétention du labyrinthe en Y chez les souris Ctrl (F) et cKO (G). (H-I) Mesure du temps passé (H) dans les zones du labyrinthe et du nombre d'erreurs (I) lors du *probe test* du BM. Les analyses intergroupes sont réalisées à l'aide d'un test de Mann Whitney ; * : $p < 0.05$. Les analyses intragroupes sont effectuées à l'aide d'un test de Wilcoxon ; ## : $p < 0.01$; ### : $p < 0.001$. Pour le test du BM, le temps passé dans la zone cible est comparé à la chance (5 sec) à l'aide du test One-sample T-test ; \$: $p < 0.05$; \$\$: $p < 0.01$; N= 22 Ctrl, N=16 cKO.

Le nombre de PNNs augmente au niveau de différentes régions cérébrales suite à un protocole de peur conditionnée (Banerjee *et al.*, 2017; Shi *et al.*, 2019) et leur déplétion diminue les réponses de peur conditionnée lors du rappel du test (Banerjee *et al.*, 2017; Gogolla *et al.*, 2009; Hylin *et al.*, 2013; Shi *et al.*, 2019; Thompson *et al.*, 2018). Il serait également intéressant d'évaluer la mémoire émotionnelle chez la lignée tPA Flox^{+/+}; PV-Cre^{+/-} grâce au test du *fear conditioning* et également d'analyser la densité et l'intensité des PNNs dans différentes structures telles que l'amygdale, l'hippocampe et le cortex préfrontal après un protocole de peur conditionnée.

Des protocoles de stress chronique chez l'adulte ou dans les stades précoces du développement post-natal ont permis de mettre en évidence des altérations du nombre de neurones PV et également de la densité des PNNs dans différentes régions cérébrales (Pesarico *et al.*, 2019; Z. Yu *et al.*, 2020). L'activité du tPA est augmentée dans l'amygdale et l'hippocampe en réponse à un stress de contention ou à l'injection de CRF (Tomasz Matys *et al.*, 2004; Norris and Strickland, 2007;

Robert Pawlak *et al.*, 2003). Cette augmentation est vraisemblablement dépendante de la sécrétion de tPA par différents types neuronaux et notamment par les neurones excitateurs. Au vu de l'ensemble de ces travaux, il serait intéressant de déterminer l'implication du système tPA/plasmine dans la plasticité des réseaux périneuronaux après un protocole de stress chronique en réalisant des marquages IHC des PNNs chez des souris déficientes en tPA (tPA Null) et leurs homologues sauvages.

Compte-tenu de l'expression du tPA et du plasminogène au cours du développement cérébral, ces protéases pourraient également influencer la formation des PNNs. Il serait cohérent d'étudier la mise en place des PNNs au cours du développement post-natal chez les souris tPA Null, tPA Flox^{+/+}; PV-Cre^{+/-} et chez leurs homologues contrôles. Par ailleurs, les travaux de Mataga et collaborateurs ont rapporté une augmentation de l'activité protéolytique du tPA lors d'une privation monoculaire (MD) réalisée au cours de la période critique en post-natal (Mataga *et al.*, 2002, 2004). De plus, d'autres travaux ont montré qu'une MD s'accompagne d'une diminution de l'intensité et de la taille des PNNs au niveau du cortex visuel chez des souris sauvages (Kelly *et al.*, 2015). L'utilisation de privations sensorielles visuelles couplées à une analyse morphologique des PNNs et de leur composition serait également relevant chez des animaux déficients en tPA afin d'évaluer la contribution du système tPA/plasmine dans le remodelage des PNNs. Également, différents travaux ont mis en évidence un rôle bénéfique du tPA et de la plasmine dans la plasticité de la dominance oculaire suite à une privation monoculaire. Ces effets peuvent être dus au remodelage des épines dendritiques (Bukhari *et al.*, 2015; Mataga *et al.*, 1996, 2002, 2004; C. M. Müller and Griesinger, 1998; Oray *et al.*, 2004). Les CSPGs retrouvés au sein des PNNs jouent un rôle stabilisateur sur la plasticité des épines dendritiques, leur dégradation augmentant la mobilité des épines et leur densité (De Vivo *et al.*, 2013; Orlando *et al.*, 2012; Pizzorusso *et al.*, 2006). Il est alors envisageable que le clivage des CSPGs par le système tPA/plasmine puisse favoriser la plasticité de la dominance oculaire en augmentant la dynamique des épines.

Les PNNs sont également susceptibles d'être dégradés dans différents contextes pathologiques tels que lors de la survenue de crises épileptiques (Mcrae *et al.*, 2012; Yutsudo and Kitagawa, 2015). Par ailleurs, Rankin-Gee et collaborateurs ont montré que l'injection intrahippocampique de ChABC retarde la survenue des crises épileptiques et la durée des crises de haut score tandis qu'elle augmente le nombre de crises myocloniques. Ces auteurs ont également montré une augmentation d'un produit de clivage d'aggrécane par les MMPs suite à un statut épileptique (Rankin-Gee *et al.*, 2015). D'autre part, les travaux de Qian et collaborateurs ont montré une augmentation de l'expression du tPA dans l'hippocampe suite à l'induction de crises épileptiques (Qian *et al.*, 1993). De plus, les souris déficientes en tPA sont résistantes à la survenue de crises épileptiques induites par l'injection de kaïnate ou de pentylènetétrazole (Tsirka *et al.*, 1995). Les souris

déficientes en tPA et en plasminogène sont également protégées de la neurodégénérescence induite par l'injection de kaïnate (Tsirka *et al.*, 1995, 1997). Nous pourrions envisager d'étudier la contribution du tPA et de la plasmine dans la dégradation des PNNs après un épisode épileptique. Une des limites de ce type de protocole résiderait cependant dans la dissociation entre les effets du tPA et du plasminogène exprimés dans le parenchyme cérébral et de ces mêmes protéases sécrétées dans le compartiment vasculaire. De ce fait, dans de nombreuses pathologies cérébrales pour lesquelles une altération des PNNs est retrouvée telles que l'épilepsie, l'AVC ou les traumatismes crâniens, on retrouve également une ouverture de la BHE (Noé *et al.*, 2016; Yan *et al.*, 2018). Dans de telles configurations, le passage des protéases du compartiment vasculaire vers le parenchyme cérébral contribue vraisemblablement à la dégradation importante des PNNs.

Les travaux du laboratoire ont permis de mettre en avant l'expression du tPA dans les neurones excitateurs où il est retrouvé au sein de vésicules synaptiques glutamatergiques (Louessard *et al.*, 2016). La surexpression d'un tPA recombinant fusionné à des protéines fluorescentes ou à un Tag-Halo a permis de démontrer le transport du tPA le long des axones et des dendrites et sa sécrétion de manière constitutive ou en réponse à une activation (Lenoir *et al.*, 2019; Lochner *et al.*, 1998, 2006). Dans notre étude, nous avons établi que la délétion du tPA au sein des interneurons PV conduisait à une augmentation de l'intensité des PNNs suggérant un effet cellule-autonome du tPA sur la plasticité de ces structures. En raison de la complexité et de la réciprocité des connexions entre les neurones excitateurs et les interneurons PV, il est envisageable que le tPA exprimé par les neurones pyramidaux puisse être transporté le long des neurites et sécrété au niveau des synapses conçues avec les neurones PV (Hensch, 2014). Ainsi, l'activation des neurones pyramidaux pourrait également contribuer au *turnover* des PNNs entourant les neurones PV *via* la libération de tPA à la synapse. Afin d'étudier cette hypothèse, il serait pertinent de réaliser des cultures de neurones sur des dispositifs microfluidiques. Nous pourrions ainsi mettre en contact les axones ou les dendrites de neurones excitateurs issus de dissociations corticales ensemencées dans un premier compartiment avec des interneurons issus de dissociations de l'éminence ganglionnaires ensemencées dans un second compartiment. Dans ce type de modèle, nous pourrions utiliser des neurones corticaux issus de souris WT ou tPA Null et visualiser l'influence du tPA issu de ces neurones sur la dégradation des PNNs des interneurons PV en condition basale ou suite à une stimulation.

3- Autres fonctions du tPA dans les interneurons PV

Des données récentes de la littérature suggèrent que l'activité des interneurons PV influence directement le remodelage des PNNs (Deviene *et al.*, 2019). Effectivement, l'inhibition chimogénétique des interneurons PV ou des neurones excitateurs induit une diminution de l'intensité des PNNs. Le tPA est, lui, décrit pour moduler la signalisation NMDA en potentialisant

l'entrée de calcium dans les neurones. Le tPA pourrait contribuer indirectement à la plasticité des réseaux périneuronaux en modulant la transmission NMDA. L'implication du tPA sur la neurotransmission glutamatergique a été majoritairement étudiée dans des modèles *in vitro* de culture de neurones corticaux, enrichi en neurones glutamatergiques (Björklund *et al.*, 2010). Dans ces modèles, le tPA potentialise l'entrée de calcium induite par le NMDA et augmente la mort de type excitotoxique (Lesept *et al.*, 2016; Nicole *et al.*, 2001; Parcq *et al.*, 2012). D'autre part, il faut noter que la signalisation des récepteurs NMDA a été majoritairement étudiée dans les cellules pyramidales. Cependant, de récents travaux suggèrent que les récepteurs NMDA exprimés par les interneurons PV pourraient être impliqués dans différentes fonctions telles que la régulation des rythmes oscillatoires gamma et thêta et influencer les processus cognitifs (Bygrave *et al.*, 2016; Carlén *et al.*, 2012; Kauer *et al.*, 1988; Korotkova *et al.*, 2010; Nakazawa *et al.*, 2004). Le modèle de culture primaire utilisé pour notre étude est enrichi en interneurons et nous avons révélé que celui-ci comprenait notamment des interneurons PV (Franchi *et al.*, 2018). Nous avons également rapporté que les interneurons PV retrouvés dans nos cultures expriment la sous-unité GluN2B du tPA (Figure 46). En revanche, nous n'avons pas pu mettre en évidence l'expression de la sous-unité GluN1 en raison de l'absence d'anticorps spécifiques pour l'immunocytochimie.

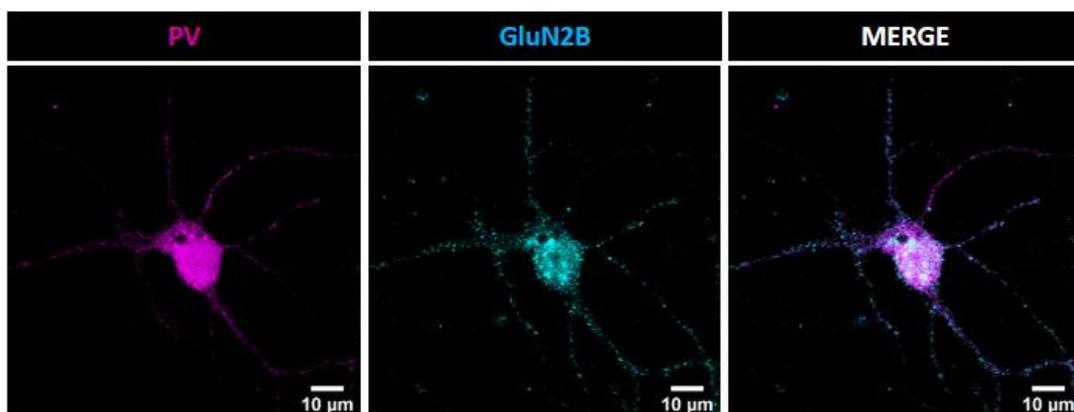


Figure 46: Expression de GluN2B par les interneurons PV.

Immunocytochimie révélant la parvalbumine (PV, magenta) et la sous-unité GluN2B (cyan) dans des cultures d'interneurones à DIV14.

Nous avons par la suite tenté de déterminer si un traitement au tPA pouvait potentialiser la mort de type excitotoxique dans nos cultures et ce, en présence ou en absence de PNNs. Nous avons révélé qu'un traitement au NMDA à une concentration de 25µM induit environ 45% de mort neuronale dans nos cultures et qu'un co-traitement au NMDA et au tPA (300 nM) potentialise la mort neuronale (+28%) (Figure 47). Des résultats similaires ont été retrouvés chez les cultures traitées à la ChABC permettant de dégrader les PNNs. En effet, nous n'avons pas observé de différence significative de la

mort neuronale induite par le NMDA dans les cultures traitées à la ChABC par rapport aux cellules non-traitées. Par ailleurs, le tPA potentialise également la mort neuronale induite par le NMDA (+64%) dans les cultures traitées à la ChABC. Il est important de mentionner que les cultures primaires utilisées dans cette étude sont enrichies en interneurons PV mais que d'autres sous-types d'interneurones tels que des interneurons exprimant la somatostatine sont également présents (Franchi *et al.*, 2018).

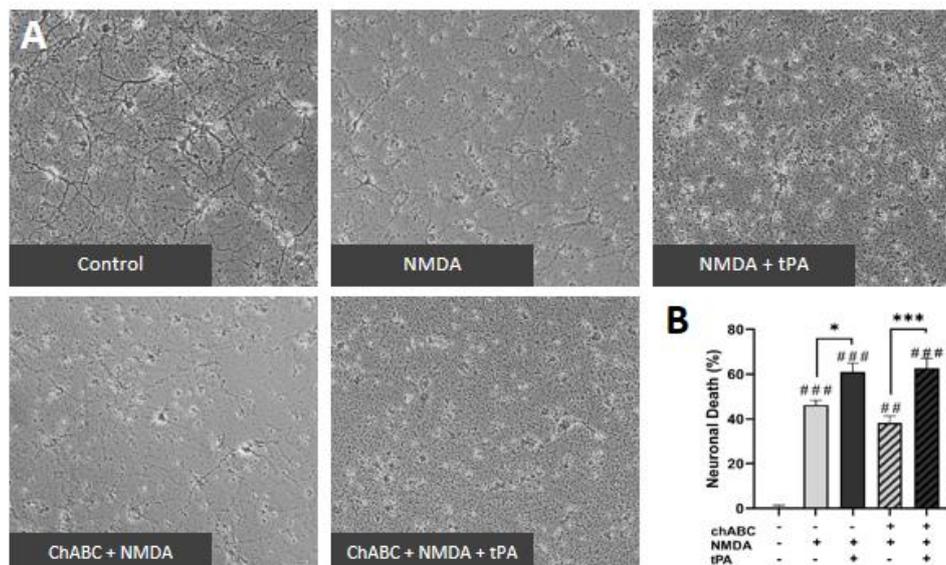


Figure 47: Le tPA potentialise l'excitotoxicité induite par le NMDA dans des cultures d'interneurones.

(A) Des cultures d'interneurones à DIV14 ont été pré-traitées ou non à la ChABC pendant 24h. Les cellules ont ensuite été traitées au NMDA (25 μ M) et au tPA (300 nM) pendant 18h. (B) La mort neuronale induite par le NMDA a été mesurée à l'aide d'un dosage de la LDH dans le milieu de culture. Moyenne +SEM ; Test de Kruskal Wallis et tests post-hoc de Dunn ; # : p < 0.05 ; ## : p < 0.01 ; ### : p < 0.001 (par rapport au contrôle) ; * : p < 0.05 ; *** : p < 0.001 (par rapport au traitement NMDA) ; N=5 expériences indépendantes.

Ainsi, dans nos cultures, le traitement à la ChABC affecte une faible proportion d'interneurones PV. De plus, la mort neuronale est mesurée grâce à un dosage de la lactate déshydrogénase (LDH) libérée dans le milieu de culture par les cellules endommagées et ne rend pas compte de la mort neuronale des interneurons PV spécifiquement. Il est aussi envisageable que les récepteurs NMDA soient exprimés par d'autres types de neurones, leur conférant une sensibilité à l'excitotoxicité induite par le NMDA. Afin de compléter ces résultats, il serait relevant de mesurer les flux calciques en réponse à une stimulation au NMDA et au tPA dans les interneurons PV. Cependant, compte-tenu de la diversité des interneurons retrouvés dans nos cultures, nous ne pouvons pas réaliser l'imagerie calcique à l'aide de sondes calciques de type Fura-2AM puisque celles-ci vont être incorporées dans les différentes cellules présentes dans la culture. Ainsi, dans notre modèle il serait envisageable de réaliser l'imagerie calcique dans les neurones grâce à la surexpression de sondes GCaMP inducibles

par la recombinaison cre dans des cultures d'interneurones issus de souris PV-Cre^{+/+}, disponibles au laboratoire.

Conclusion générale

L'ensemble de mon travail de thèse a permis de mieux comprendre les fonctions du tPA cérébral, exprimé par les neurones dans la régulation des comportements et l'implication du système d'activation du plasminogène dans la dégradation des réseaux périneuronaux (PNNs).

La première étude a permis de caractériser une nouvelle souche murine, déficiente en tPA (tPA Null) et de mettre en évidence l'implication du tPA cérébral dans la régulation des réponses comportementales de façon structure-dépendante grâce à l'utilisation d'une souche tPA Flox. Ainsi, nous avons mis en évidence une hyperactivité locomotrice, des déficits de mémoire spatiale et une réduction de l'anxiété chez les souris tPA Null par rapport à leurs homologues sauvages. Grâce au développement d'un modèle conditionnel permettant la délétion du tPA au niveau de différentes régions cérébrales chez les souris tPA Flox, nous avons montré que la délétion de cette protéase au niveau du gyrus denté de l'hippocampe entraîne une hyperactivité locomotrice et des déficits spatiaux partiels tandis que sa délétion dans l'amygdale centrale a un effet pro-anxiolytique. Finalement, nous avons mis en évidence l'expression du tPA dans les interneurones GABAergiques PKC- δ dans l'amygdale centrale. Ces derniers résultats soulèvent de nouvelles perspectives dans l'étude du tPA exprimé par les interneurones PKC- δ de l'amygdale centrale dans la modulation des émotions.

Au cours de la deuxième étude nous avons révélé pour la première fois l'expression du tPA par les interneurones PV entourés de PNNs. Ces travaux ont également permis de révéler l'implication du tPA exprimé par les interneurones dans la dégradation des PNNs grâce à l'utilisation de modèles *in vitro* et de souris déficientes en tPA dans les interneurones PV. Par ailleurs, nous avons montré que le tPA influence le remodelage des PNNs grâce à un mécanisme dépendant de la conversion du plasminogène en plasmine. De plus, nous montrons que la plasmine exerce un effet direct sur la dégradation des PNNs en clivant le corps protéique de l'aggrécane.

Dans l'ensemble, nos résultats permettent de mieux appréhender les fonctions du tPA exprimé dans les neurones et leurs implications les fonctions cérébrales en condition physiologique.

Autres travaux



Cerebral Cortex, 2018; 1–17

doi: 10.1093/cercor/bhy119
Original Article

ORIGINAL ARTICLE

Tissue-Type Plasminogen Activator Controlled Corticogenesis Through a Mechanism Dependent of NMDA Receptors Expressed on Radial Glial Cells

Nolwenn Pasquet¹, Sara Douceau¹, Mickael Naveau¹, Flavie Lesept¹, Morgane Louessard¹, Laurent Lebouvier¹, Yannick Hommet¹, Denis Vivien^{1,2} and Isabelle Bardou ¹

¹Normandie Université, UNICAEN, INSERM, INSERM UMR-S U 1237 “Physiopathology and Imaging of Neurological Disorders”, GIP Cyceron, 14074 Caen, France and ²CHU Caen, Clinical Research Department, Caen University Hospital, 14000 Caen, France

Address correspondence to Isabelle Bardou, INSERM UMR-S U 1237 “Physiopathology and Imaging of Neurological Disorders”, University of Caen Normandie, GIP Cyceron, Bd Bequerel, BP5229, 14074 Caen, France. Email: bardou@cyceron.fr; Denis Vivien, Email: vivien@cyceron.fr  orcid.org/0000-0003-0432-3635.

Denis Vivien and Isabelle Bardou have contributed equally to this work

Abstract

Modifications of neuronal migration during development, including processes that control cortical lamination are associated with functional deficits at adult stage. Here, we report for the first time that the lack of the serine protease tissue-type Plasminogen Activator (tPA), previously characterized as a neuromodulator and a gliotransmitter, leads to an altered cortical lamination in adult. This results in a neuronal migration defect of tPA deficient neurons which are stopped in the intermediate zone at E16. This phenotype is rescued by re-expressing a wild-type tPA in cortical neurons at E14 but not by a tPA that cannot interact with NMDAR. We thus hypothesized that the tPA produced by cortical neuronal progenitors can control their own radial migration through a mechanism dependent of NMDAR expressed at the surface of radial glial cells (RGC). Accordingly, conditional deletion of tPA in neuronal progenitors at E14 or overexpression of a dominant-negative NMDAR that cannot bind tPA in RGC also delayed neuronal migration. Moreover, the lack of tPA lead to an impaired maturation and orientation of RGC. These data provide the first demonstration that the neuronal serine protease tPA is an actor of a proper corticogenesis by its ability to control NMDAR signaling in RGC.

Key words: corticogenesis, NMDA receptor, radial glial cells, tissue-type plasminogen activator

Introduction

The mammalian cortex is a multilayered structure derived from the neural tube. During development, neuroepithelial cells of the neural tube are proliferative cells forming the ventricular zone (VZ) (Bystron et al. 2006). The first postmitotic neurons leave the VZ to form the preplate (Bystron et al. 2008). As neurogenesis occurs, neuroepithelial cells are subjected to

cell divisions in order to produce neural progenitors and radial glial cells (RGC) (Noctor et al. 2001; Götz and Huttner 2005). Then, by the arrival of accumulating neurons, the preplate is divided into the superficial marginal zone (MZ), the cortical plate (CP), and the intermediate zone (IZ). The MZ will become the layer I of the cortex (Bystron et al. 2008). As the CP emerges, the neural progenitors form a new proliferative layer, above the

VZ named subventricular zone (SVZ) (Bayer et al. 1991, 1970) that will mainly generate upper layer neurons (Smart et al. 2002). The RGC extend their apical and basal processes to the ventricular and pial surfaces, respectively (Götz and Huttner 2005) and predominantly undergo asymmetrical cell division in which they self-renew and generate neurons directly or indirectly via progenitor cells (Rakic 1988). RGC play fundamental roles in guiding migrating neurons to their final locations by serving as a migratory scaffolding (Rakic 1972, 1978, 2003a, 2003b). After the final mitotic division, the majority of neurons migrate radially, along RGC, from the VZ through the IZ into the CP; (Rakic et al. 1974; Rakic 1972, 1988; Haubensak et al. 2004; Noctor et al. 2001, 2004). They accumulate in the CP via an inside-out pattern. Finally, when these neurons reach their final destination, they settle onto the outmost layer forming an inside-out gradient of maturation leading to the formation of 6 cortical layers (Angevine and Sidman 1961; Rakic et al. 1974; Nadarajah and Parnavelas 2002; Nadarajah et al. 2002; Evsyukova et al. 2013). It is well admitted that modification of the sequence of events that contribute to the cortical architecture may lead to important functional deficits (Rakic 1988; Palmini et al. 1991; Brodtkorb et al. 1992; Hong et al. 2000; Matsumoto et al. 2001; Cardoso et al. 2002; Marín and Rubenstein 2003). The molecular mechanisms that control the complex steps in neuronal migration are partially elucidated. It has been shown that some proteins are indispensable for normal cortical lamination thanks to a proper cortical migration via RGC. For example, filamin 1 is an essential factor for the onset of the neuronal migration (Fox et al. 1998); That the brain derived neurotrophic factor (BDNF) can promote the migration of cortical neurons (Behar et al. 1997); That reelin or cdk5 are indispensable for normal cortical lamination (Caviness and Sidman 1973; Ogawa et al. 1995; Gilmore et al. 1998; Dulabon et al. 2000). Other molecules have been involved in regulating the interaction of migrating cells (for review, Marín and Rubenstein 2003) such as astrotactin, integrins or N-methyl-D-aspartate receptors (NMDAR) (Anton et al. 1999; Behar et al. 1999; Dulabon et al. 2000; Komuro and Rakic 1993).

Tissue-type plasminogen activator (tPA) is a serine protease, highly expressed in the central nervous system and more precisely in the somatosensory cortex by neurons and endothelial cells, as well as some glial cells (Docagne et al. 1999; Fernández-Monreal et al. 2004; Samson and Medcalf 2006; Louessard et al. 2016). In addition to its well-known fibrinolytic activity (Rijken et al. 1982), tPA controls several functions in the brain parenchyma, including for instance neurotransmission and gliotransmission, neuronal plasticity and survival, learning and memory processes and anxiety behavior (Qian et al. 1993; Tsrirka et al. 1997; Baranes et al. 1998; Wang et al. 1998; Nicole, Ali, et al. 2001; Melchor and Strickland 2005; Cassé et al. 2012; Obiang et al. 2012; Macrez et al. 2016). These effects are mediated through its interaction with a variety of binding proteins and receptors (Rijken 1988) such as the low-density lipoprotein receptor-related protein (LRP), annexin-II, epidermal growth factor receptor (EGFR) and also NMDAR (Nicole, Docagne, et al. 2001; Siao and Tsrirka 2002; Lesept et al. 2016; Macrez et al. 2016). It has been demonstrated that tPA is expressed from E8 to the adult stage in the telencephalon (Carroll et al. 1994). Nevertheless, our knowledge about the role of tPA in the developing brain remains limited. tPA has been shown to control neurite outgrowth in vitro (Krystosek and Seeds 1981; Pittman and DiBenedetto 1995) and its lack to impair cerebellar neuronal migration (Seeds et al. 1999; Li et al. 2013), with no mechanism of action provided so far. Furthermore, a recent study has

demonstrated that tPA is implied in fragile X syndrome, one of the most common neurodevelopmental disorders (Achuta et al. 2014). However, there is no data about the possible influence of tPA in the developing cortex.

Here, we investigated whether the extracellular serine protease, tPA, previously characterized as a neuromodulator (Fernández-Monreal et al. 2004) and as a gliotransmitter (Cassé et al. 2012) could play a role in corticogenesis. To address this question, we used an array of in vivo molecular tools, such as tPA constitutive and conditional deficient mice that we combined with in utero electroporation of reporter genes and tPA mutants. Our data reveal an original mechanism in which the tPA produced and released by cortical neurons (from E14 to E17) controls their radial migration and positioning through a mechanism dependent of NMDAR expressed at the surface the RGC.

Materials and Methods

Mouse Maintenance

Mouse protocols were performed in accordance with the French (Decree 87/848) and the European Communities Council (Directive 86/609) guidelines. Time-pregnant tPA knockout (tPA-KO), tPA^{lox/lox} (see paragraph below), their C57BL6J wild-type control (tPA-WT) mice were bred in our animal facilities (CURB; Caen, France). Animals were housed with a 12-h light/12-h dark cycle in standard polypropylene cages (Charles River, France) with free access to water and food (SDS Dietex, France). The day of vaginal plug appearance was considered to be embryonic day 0.5 (E0.5), and the day of birth was defined as postnatal day 0 (P0).

Generation of tPA^{lox/lox} Mice

The tPA^{lox/lox} mice were generated by the Mouse Clinical Institute (ICS, Illkirch, France). Plat, the mouse tPA gene, is composed of 14 exons spanning ~25 kb region on chromosome 8. To construct the targeting vector for generation of tPA conditional mice, one LoxP sequence was inserted into intron 2 while a second LoxP site along with the PGK-Neo selectable marker gene flanked by 2 FRT sites was introduced into intron 3 (Supplementary Fig. S3A). The resultant targeting vector contained a 5' homology arm of ~4.8 kb in size, from intron 1 to intron 2, a floxed-PGK-Neo region of ~1 kb and, a 3' homology arm of ~3.2 kb in size, from intron 3 to exon 4. The excision of exon 3 resulting in a complete loss of tPA transcripts. The targeting vector was linearized and electroporated into C57BL6J mouse embryonic stem (ES) cells. G418 resistant clones were screened by long-range PCR. Targeted ES positive clone was used to generate chimeras by injection into C57BL6J blastocysts. Chimeric male mice were bred with C57BL6J females to obtain germ line transmission. F1 mice were genotyped by PCR analysis and southern blots, using tail genomic DNA samples, for the presence of tPA^{lox} allele (Supplementary Fig. S3B). Heterozygous mice were intercrossed and genotyping of F2 progeny detected homozygous tPA^{lox/lox}. tPA^{lox/lox} mice exhibited normal life span and fertility with no detectable abnormalities.

Plasmids

The pCAG-RFP and pCAG-Cre-GFP plasmids were purchased from Addgene. The pBLBP-GFP (brain lipid-binding protein) plasmid was kindly provided by C. Pellegrino (INMED, Marseille). The pCAG-GFP-tPA construction was obtained as follows. Coding sequence for amino acids 1–32 of the human tPA peptide signal was amplified from the full-length human tPA cDNA

including the sequence for a 6xHistidine tag (6xHis) at its 3' end. The PCR product was subcloned into the eukaryotic expression plasmid pCDNA5.1 FRT between NheI and BamHI. Thereafter the full-length coding sequence for mature human tPA was PCR amplified and subcloned downstream of the "peptide signal – 6xHis" PCR product between the BamHI and XhoI restriction sites to generate a cDNA encoding for the mature 6xHis human tPA-wt (tPA). This full cDNA (peptide signal for human tPA + 6xHis human tPA-wt) was amplified and subcloned in pCAG vector by DNA fusion between XhoI and NotI using the In-Fusion HD kit (Clontech). Moreover, pCAG-GFP-tPA was generated by PCR from pAc-GFP (Clontech) and subcloned between the 6xHis-tag and the cDNA of tPA by DNA-fusion in pCAG-tPA (In-Fusion HD kit, Clontech). The pBLBP-GluN1 construction was generated by subcloning the cDNA of full-length GluN1 between AgeI and NotI. The cDNA of GluN1 was extracted by PCR from a pCDNA3-GluN1 construct generated in our laboratory. Mutagenesis of full-length tPA-wt (W254R; tPA-K2*) and of the GluN1 (K178V; GluN1*) were performed by using QuikChange[®] XL Site-Directed Mutagenesis Kit purchased from Stratagene (Agilent Technologies, Massy, France). Mutation was confirmed using an automated sequence analysis. All constructs were then amplified in *Escherichia coli* JM109 cells and purified by a Nucleobond endotoxin-free plasmid DNA PC 2000 kit (Macherey-Nagel) according to the manufacturer's instructions.

In Utero Electroporation

At E14, pregnant mice were deeply anesthetized with isoflurane 5% in a mixture of O₂/N₂O (at 30% and 70%, respectively) and their uterine horns were exposed via a midline abdominal incision. Mice were maintained at 37 ± 0.5°C during all the procedure. Embryos were carefully lifted using ring-forceps through the incision and placed on humidified gauze pads. Plasmid DNA solution (0.25 µg/µL pCAG-RFP either alone or with 2.0 µg/µL of pCAG-GFP-tPA, pCAG-GFP-tPA-K2*, pCAG-Cre-GFP, pBLBP-GluN1, pBLBP-GluN1* or pBLBP-GFP) mixed with Fast Green solution (2 mg/mL; Sigma, St Louis, MO, USA) was microinjected via a calibrated glass micropipette (Drummond Scientific, Broomall, PA, USA) and a microinjector (30 ms; 30 psi; Pico-Liter Injector PLI-10; Warner Instruments, Hamden, CT, USA) into the lateral ventricle of each embryo. Immediately after DNA injection, the heads of the embryos were placed and held between 5 mm platinum electrodes with the anode directly toward the cortex and electronic pulses were applied (five 50 ms pulses of 35 V at 950 ms intervals) using an EM830 electroporator (BTX, Harvard Apparatus, Holliston, MA, USA). During the procedure, the embryos were constantly bathed with warm physiological water. Then, uterine horns were placed back in the abdominal cavity to allow embryos to continue normal development until the desired time of observation. Finally, the abdomen wall and skin were quickly sutured using surgical needle and thread. Pregnant mice were injected with buprenorphine (Buprécare[®], Axience 0.09 mg/kg), lidocaïne (Xylocaïne[®], Astra Zeneca, spray 5%) and warmed on a heating pad until they woke up. The whole procedure was complete within 30 min. Meloxicam (Métacam[®], Boehringer Ingelheim, 0.5 mg/kg) treated drinking water was administrated post-surgically for 24h.

Brain Tissue Preparation

Pregnant mice were euthanized by cervical dislocation and pups by decapitation under CO₂ anesthesia. Embryos were collected at the indicated stages (E16, E17, E18, adult corresponding to P60)

after IUE. At prenatal stages, brains were fixed at 4°C with 4% paraformaldehyde (PFA) in 0.1 M sodium phosphate buffer (PB), pH 7.4 for 24 h. At adult stages, mice were deeply anesthetized, transcardially perfused with 0.9% NaCl heparinized followed by a mixture of 4% PFA in 0.1 M PB, pH 7.4 and brains were removed. Then, brains were washed in phosphate buffered saline (PBS)-Azide (0.0125%) solution containing 20% sucrose overnight at 4°C and rinsed 3 times in PBS-Azide-Sucrose solution at 4°C every 12 h. Finally, brains were embedded and frozen in Tissue-Tek (Miles Scientific, Newark, DE, USA). Coronal sections (20 µm) were realized using a cryostat (Leica CM3050S, Wetzlar, Germany), collected on poly-D-lysine slides, and stored at -80°C until processing.

Immunohistochemistry

The following antibodies were used: anti-tPA (generous gift from Pr R. Lijnen, Leuven; 1/1500), anti-Ki67 (Abcam, Cambridge, UK; ab15580; 1/1000), anti-Nestin (Millipore, MA, USA; mab353, 1/800), anti-Vimentin (Millipore, MA, USA; AB5733, 1/1000), anti-GluN1 (Santa Cruz, CA, USA; sc1467, 1/250), anti-NeuN (Millipore, MA, USA; mab377, 1/1500), anti-FABP7 (BLBP; Millipore, MA, USA; ABS811, 1/250), anti-Sox2 (Abcam, Cambridge, UK; ab92494; 1/500), anti-Cux1 (Santa Cruz, CA, sc-6327, 1/50), anti-Tbr1 (Millipore, MA, USA, AB2261, 1/250).

Brain sections were washed 3 times in PBS-azide and then blocked at room temperature (RT) for 1 h with PBS containing 0.3% Triton X-100 and 4% bovine serum albumin (BSA). Slices were incubated with the appropriate primary antibodies overnight at RT. After 3 rinses in PBS, adapted secondary antibody coupled to alexa 647 or fluorescein isothiocyanate (FITC; 1/600; Jackson ImmunoResearch, West Grove, CA, USA) were incubated at RT for 1 h 30 min. Washed sections were coverslipped with an antifade medium containing DAPI (Sigma) for nuclei staining.

In Vivo Colchicine Treatment

The blockage of axo-dendritic transports by colchicine treatment was performed to unmask the presence of tPA in the cortex. This technique led to an accumulation of tPA in cortical neuronal cell bodies allowing us to visualize selectively neurons that expressed tPA as previously shown in Louessard et al. (2016). Mice were deeply anesthetized and maintained with 2% isoflurane in a gas mixture of N₂O/O₂ (at 70%/30%, respectively) and the rectal temperature was maintained at 37 ± 0.5°C. Anesthetized mice were placed into stereotaxic instrument. The skulls were exposed and small bore holes were drilled with a dental burr to allow intraventricular injection to be targeted by borosilicate glass pipettes (mice anteroposterior (AP) -0.2 mm from bregma, lateral (L) ± 1 mm from midline, and ventral (V) -2.0 mm deep to the surface). Animals were injected with 35 µg of colchicine in solution (Sigma-Aldrich) for mice, and the other half were injected with the vehicles.

Confocal Imaging and Quantifications

All images were acquired on a laser-scanning confocal microscope (SP5, Leica) using the LAS-AF software. Overall, 20–25 consecutive Z sections were obtained per each brain slice. All parameters for image acquisition were kept constant, with emission levels below saturation. All images were processed using Image J (NIH, USA) and/or Imaris (Bitplane, MA, USA) software.

For cortical positioning from E16 to E18, the total length of the cortex was divided in 3 main areas corresponding to the CP,

the IZ and the VZ using DAPI immunolabelling and layers density.

For cortical positioning at P60, the total length of the cortex was divided in 3 main areas corresponding to the layers II–IV, V, and VI as revealed by using combined labeling with layer-specific markers and DAPI.

Relative position of transfected cells was estimated by counting the number of RFP- or GFP-positive cells present in each segment of interest normalized by the total number of the transfected cells $\times 100$ (as percentage). For migration experiments, 1000–3000 neurons were counted in each brain and 4–8 brains were analyzed for each condition using Imaris software.

For the number of branches, we analyzed the morphology of RFP-transfected neurons at adult stages. For each condition, we analyzed 5–20 neurons and counted the number of branches for each neuron manually.

For cell cycle proliferation, an automatic threshold was applied on each slice. The number of Ki67-positive cells was counted in a defined area of 0.15 mm² within the VZ of 4 confocal coronal sections per animal using the “analyse particles” plugin on Image J.

For multipolar/bipolar analysis, transfected neurons were visualized and the number of cells with multipolar or bipolar morphology was counted in the upper part of the IZ. Multipolar cells were defined as cells with more than 3 processes and bipolar neurons as cells with less than 3 processes.

For GluN1 localization, around 30 neurons were selected in several slices. For each neuron, we observed the coronal profile plot of the different stainings (Nestin-positive cells represent the RGC; RFP-positive cells represent neurons and GluN1) and measured the distance from GluN1 to RGC or neurons with Image J. For GluN1 localization on migrating neurons, we observed the transversal profile plot of GluN1 staining along RFP transfected neurons with Image J. For changes in GluN1 intensity quantification, we measured along migrating neurons the difference between the maxima and the minima intensity of GluN1 staining which is dependent on its clustering.

For the intensity profiles, the CP and the IZ were defined. The staining intensity of each slice was measured as integrated intensity, taking into account the background intensity with Image J.

For the orientation of RGC over the pial surface, we performed an automatic threshold on each ROI slice with Image J. Then, we measured the opposite and adjacent sites to obtain the angle at the pial surface. Their parallelism was measured thanks to the standard deviation on each slices.

For the morphology of radial glial endfeet, we performed an automatic threshold followed by “watershed” plugin on each ROI slice with Image J. Then, we used the “analyse particles” plugin to quantify the area of radial glial endfeet.

Neuronal Cell Culture and In Vitro Transfection

Neuronal cultures were prepared from fetal mice (embryonic day 14) as previously described (Nicole et al. 2001). Cortices were dissected and dissociated in DMEM (Sigma), and plated on 6-well plates previously coated with poly-D-lysine (0.1 mg/mL; Sigma) and laminin (0.02 mg/mL; Fisher Life Technologies). Cells were cultured in DMEM supplemented with 5% fetal bovine serum (GIBCO), 5% horse serum (GIBCO) and 2 mM glutamine (Sigma). Cultures were maintained at 37 °C in a humidified 5% CO₂ atmosphere. Cytosine β -D-arabinoside (10 μ M) was added after 3 days in vitro (DIV) to inhibit glial proliferation. Neurons were transfected with Lipofectamine 2000 (Fisher Life

Technologies) at DIV14. Then, media and cells were collected for zymography after protein extractions.

Protein Extraction

Cells were lysed at 4 °C in Tris-HCl 50 mM, pH 7.4, NaCl 150 mM, and 0.5% Triton X-100 (TNT buffer). To clear lysates, samples were centrifuged for 20 min (12 000 \times g) at 4 °C. Proteins were quantified by using BCA protein assay (Pierce).

Zymography Assay

The presence of active and free (non-complexed) tPA contained in brain protein extracts was detected by indirect fibrin zymography assay following sodium dodecylsulphate polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) performed as previously described (Marcos-Contreras et al. 2016). Murine cortical protein lysates (20 μ g) from different developmental stages (E14, E16, E17, E18, P0, P60) and reference protein (recombinant tPA, Actlyse, 0.25 nM) were electrophoresed in a 8% polyacrylamide gel under non-reducing conditions. SDS was then exchanged with 2.5% Triton X-100. After washing off excess Triton X-100 with distilled water at 4 °C, the gel was carefully overlaid on a 1% agarose gel containing 1 mg/mL bovine fibrinogen (Bovogen), 100 nM plasminogen and 0.2 NIH U/mL of bovine thrombin (Sigma). Zymograms were allowed to develop at 37 °C for 12 h and photographed at regular intervals using dark-ground illumination. Active proteins in cortex samples were identified by reference to the migration of known markers (tPA at 75 kD).

Statistical Analyses

All the values were expressed as the mean \pm SEM of *n* experiments. Comparisons of multiple groups were performed using 2-tailed Mann-Whitney test. Difference were considered statistically significant when **P* < 0.05; ***P* < 0.01; ****P* < 0.001. Analyses were carried out by using Statistica software.

Results

The Neuronal tPA is Involved in the Cortical Positioning at the Adult Stage

In adult mice, cortical tPA immunopositive neurons are mostly localized in layers V (Fig. 1A and Fig. S1; concordant with previous findings) (Louessard et al. 2016). Zymography assays revealed the presence of active tPA (at 75 kDa) from different developmental stages (E14, E15, E16, E17, E18, P0, P60), with increasing levels with time (Fig. 1B). Based on these observations, we investigated the possible contribution of tPA during cortical development. We thus compared the distribution of neurons in the different somatosensorial cortical layers of tPA-WT and tPA-KO adult mice previously in utero electroporated at E14 with an expression vector containing RFP (promoter pCAG allows a neuronal expression as previously reported (Yaguchi et al. 2013) and confirmed here, Fig. 1C,D, see Fig. S2 for cell specificity expression). In utero transfection were performed at E14, during the peak of neurogenesis when the majority of layers IV and V neurons are produced (Angevine and Sidman 1961; Fig 1C,E,F). Our data reveal a neuronal mispositioning in adult tPA-KO mice. Indeed, although tPA-WT neurons are mainly localized in cortical layers V, neurons from tPA-KO mice settled in upper layers II–IV (Fig. 1E,F and Fig. S1).

In order to decipher the specific role of neuronal tPA in corticogenesis, we have newly generated tPA-floxed mice (see

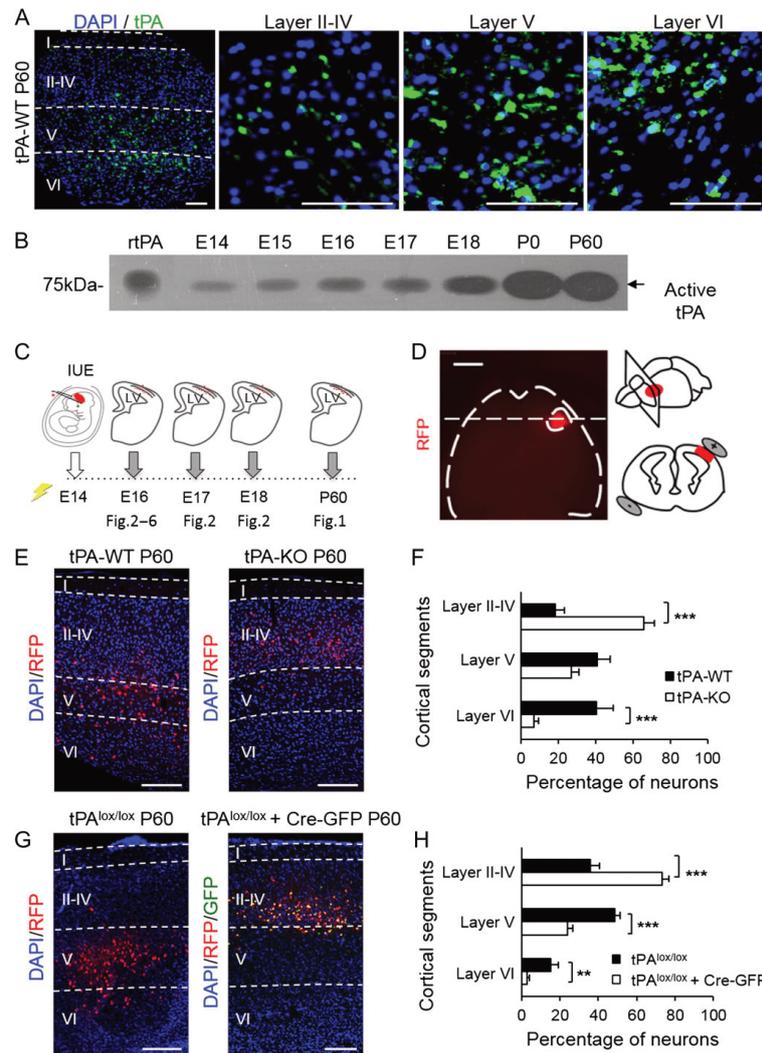


Figure 1. Cortical layering is impaired in tPA deficient mice. (A) Representative images of cortical coronal sections from adult mice (P60) showing tPA (green) and nuclei (DAPI, blue; $n = 3$ brain sections). (B) Representative zymography assay of tPA expression and activity in the cortex during development at different stages (E14, E15, E16, E17, E18, P0, and P60) in mice ($n = 5$ brains per condition) and with a reference protein (recombinant tPA, rtPA). (C) In utero electroporation of neuronal progenitors at E14 in tPA-WT and tPA-KO mice cortices and their distribution at E16, E17, E18, and P60 with their corresponding figures. (D) Representative image of a brain at E16 submitted to in utero electroporation at E14 with pCAG-RFP plasmid (left panel) and its schematic view (right top panel). On the right bottom panel, the 2 grey spots represent the electrodes. (E) Representative confocal images showing the distribution of electroporated neuronal cells (red) after DAPI immunolabelling (blue) in the cortex of adult tPA-WT and tPA-KO mice (P60). (F) Quantification of RFP-positive neurons in each cortical layers ($n = 10$ brain sections, 3 animals for tPA-WT mice and $n = 22$ brain sections, 4 animals for tPA-KO mice). (G) Representative confocal images showing the distribution of electroporated neuronal cells (red) after DAPI immunostaining (blue) in the cortex of adult tPA^{lox/lox} (P60). (H) Quantification of RFP-positive neurons in each cortical layers ($n = 19$ brain sections, 4 animals for tPA^{lox/lox} mice and $n = 16$ brain sections, 3 animals for tPA^{lox/lox} + Cre-GFP mice; right panel). Graphs show means + SEM. ** $P < 0.01$; *** $P < 0.001$. Scale bars represent 40 μm in A, 1 mm in D and 100 μm in E, G.

Fig. S3A,B for their characterization). This new strain was in utero electroporated with the RFP plasmid alone (tPA^{lox/lox} mice) or combined with a Cre-recombinase-GFP plasmid (tPA^{lox/lox} + Cre-GFP mice) expressed under the control of the pCAG promoter, allowing a parallel tracking of tPA-WT (RFP positive) and tPA-deficient neocortical neurons (RFP + Cre-GFP positive; Fig. 1G,H). In all the following experiments, we thus analyzed the role of tPA in general (by using tPA-KO vs tPA-WT mice) and neuronal tPA in particular (by using tPA^{lox/lox} mice).

As reported in tPA-KO mice, the neuronal lamination is affected in adult tPA^{lox/lox} + Cre-GFP mice when compared with control mice (tPA^{lox/lox} mice; Fig. 1G,H). Indeed, although tPA-deficient neurons were located in the layers II-IV, the majority of the non-deleted tPA neurons were found in the layer V (Fig. 1G,H), with a pattern similar to that observed in tPA-WT mice (Fig. 1E,F). This result reinforces that tPA have an intrinsic effect on cortical neuronal migration. Moreover, we observed that mice lacking tPA have a higher neuronal density in the whole cortex and mostly in the layers II-IV compared with their WT littermates (Fig. S4A-C). However, the number of branches per neuron (Fig. S4D,E) is not different in both strains. Thus, cortical neurons require tPA expression for an optimal lamination at the adult stage. We can thus postulate that neuronal tPA triggers the neuronal migration/layering of upper cortical layers.

tPA Plays a Role During Migration of Cortical Neurons

To further investigate the role of neuronal tPA in neuronal migration/lamination processes, we used in utero transfection to introduce a RFP reported plasmid in tPA-WT and tPA-KO cortices at E14 (pCAG-RFP; Fig. S5A,B), corresponding to the peak of neurogenesis intended to mostly settle the cortical layers IV-V at the adult stage. Neuronal migration was analyzed at E16 (Fig. 2A,B). Interestingly, in tPA-KO mice, around 20% of electroporated neurons failed to reach the CP and were stopped in the IZ. We observed the majority of cortical neurons stopped in the IZ in tPA-KO mice at E16, tPA-WT cells have already migrated to the outside, reaching the CP (Fig. 2A,B and Fig. S6A for higher magnification). These data were confirmed using the conditional KO of tPA in neuronal progenitors, (pCAG-Cre-GFP transfection in tPA^{lox/lox} mice, Fig. S5A,B) and an analysis of the neuronal distribution at E16 (Fig. 2C,D). Although, tPA^{lox/lox} mice transfected with a RFP plasmid alone (tPA^{lox/lox}) were equally distributed in the CP, IZ and VZ, tPA^{lox/lox} animals co-transfected with RFP + Cre-GFP (tPA^{lox/lox} + Cre-GFP) displayed a similar pattern of distribution than tPA-KO mice (Fig. 2C,D and Fig. S6B for higher magnification). Analysis of the cortex at E17 revealed almost the same differential patterns as at E16; with nevertheless the majority of transfected cells that reached the CP and some of them that are misplaced in the IZ in both WT and tPA deficient mice (Fig. 2E,F and Fig. S7A for higher magnification). At E18, neurons were equally distributed across the CP and in the IZ, respectively, in tPA-WT and tPA-KO mice (Fig. 2G,H and Fig. S7B for higher magnification).

Thus, these data demonstrate that the absence of tPA and more specifically of the neuronal tPA delays the migration of cortical neurons in the IZ throughout the CP but not in the VZ during the cortical development (E16, E17, Fig. S7C-E). Altogether, these data demonstrate that neuronal tPA plays a crucial role in corticogenesis and that its absence in cortical neurons is responsible for an accumulation of migrating cells in the IZ of the developing cortex, affecting neuronal layering in adults (Figs 1, 2).

tPA Does not Affect Neuronal Precursor Proliferation, Transition From Multipolar to Bipolar Stage

We then investigated whether the dysregulation in cortical lamination in tPA-deficient mice was due to a default in neuronal proliferation or in the switch from multipolar to bipolar morphology (Fig. S8). Ki67 immunohistochemistry (a proliferative marker) performed on tPA-WT and tPA-KO mice at E16 did not reveal difference in term of proliferation rate (Fig. S8A,B). Same observations were made from tPA^{lox/lox} and tPA^{lox/lox} + Cre-GFP animals at E16 (Fig. S8C,D). Analyses of the percentage of bipolar and multipolar neurons in the upper IZ of brain sections at E16 from neocortical progenitors expressing RFP in utero electroporated at E14 did not indicate differences between tPA-WT and tPA-KO mice (Fig. S8E,F).

Migration of Neuronal Progenitors: A Process Dependent on tPA-Mediated Kringle 2 Domain

Then, we intended to rescue the phenotype observed in tPA-KO mice. We thus investigated the migration of cortical neurons at E16 in tPA-KO mice previously in utero electroporated at E14 with a vector encoding for tPA tagged with a GFP at its N-terminal end driven by the pCAG promoter (RFP ± GFP-tPA; Fig. S9A). Control in vitro transfections of primary cultures of cortical neurons confirmed the neuronal expression of GFP-tPA, its release from transfected neurons and its proteolytic activity (Fig. S9B). When transfected in utero, GFP-tPA is expressed and accumulated at the soma of cortical migrating neurons, thus becoming immunopositive for tPA (full head arrow), in contrast of RFP positive cells only (empty head arrow; Fig. S9C). When in utero electroporated at E14, GFP-tPA partially rescued the abnormal accumulation of tPA-deficient cortical neurons, in the IZ at E16 (Fig. 3A,B). No difference in the percentage of neuronal progenitors in the VZ or in the CP between tPA-KO and tPA-KO + GFP-tPA mice were observed. Thus, the total absence of tPA in progenitors lead to persistent radial migration defect in the CP that cannot be counterbalanced by only reintroducing tPA at E14. Moreover, immunostainings against Ki67 did not reveal modification of the proliferation rate between tPA-KO and tPA-KO + GFP-tPA (Fig. S9D).

tPA is composed by 5 different domains. Among them, the kringle 2 domain is known to interact with NMDAR, an important actor of corticogenesis (Behar et al. 1999; Reiprich et al. 2005; Luhmann et al. 2015). To address the hypothesis that tPA may contribute to cortical neuronal migration via its Kringle 2 domain, we used a vector encoding for a mutated tPA, tPA-K2* (W254R; mutation in the lysine binding site of the Kringle 2 domain), previously characterized to not bind with and to not promote NMDAR signaling (Parcq et al. 2013); tagged with a GFP at its N-terminal end, and driven by the pCAG promoter (Fig. S9E). As above, we observed that in cultured transfected neurons, GFP-tPA-K2* is released and remains proteolytically active (data not shown); and that in vivo, GFP-tPA-K2* is expressed in neuronal progenitors (full head arrow; Fig. S9F). When in utero electroporated at E14 (Fig. 3C,D), GFP-tPA-K2* has the same abnormal migration as in tPA-deficient cortical neurons (Fig. 3C,D). Moreover, differences in the percentage of neurons in the VZ or in the CP between tPA-KO + RFP and tPA-KO + RFP + GFP-tPA-K2* mice were observed revealing that neurons transfected with GFP-tPA-K2* are stopped in IZ and VZ as in tPA-KO mice. Immunostainings against Ki67 revealed no difference in the proliferation rate between tPA-KO and tPA-KO + GFP-tPA-K2* (Fig. S9G). Overall, these data demonstrate that tPA

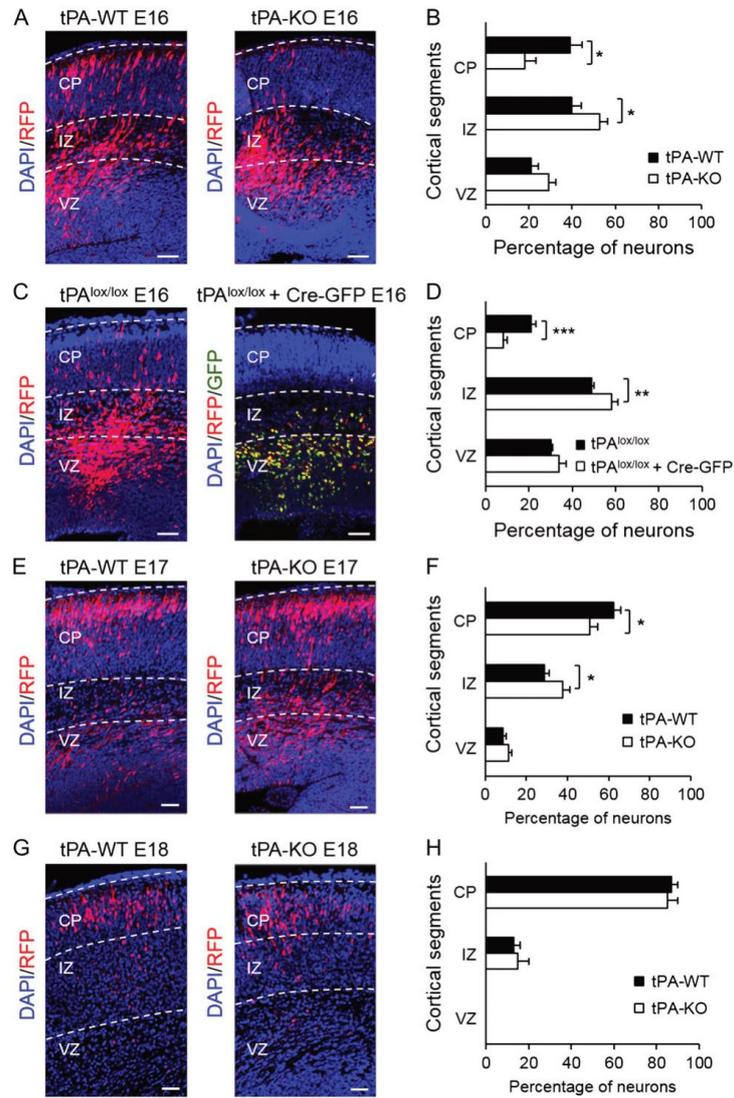


Figure 2. tPA affects cortical neuronal migration. In utero electroporation of pCAG-RFP plasmid at E14 in tPA-WT and tPA-KO mice cortices. (A, E, G) Representative confocal images showing the distribution of electroporated neuronal cells (red) after DAPI immunolabelling (blue) in the cortex of tPA-WT and tPA-KO mice (E16, E17, and E18, respectively). (B, F, H) Quantification of RFP-positive neurons in each cortical layers (For E16: $n = 10$ brain sections, 6 animals for tPA-WT mice and $n = 7$ brain sections, 3 animals for tPA-KO mice; For E17: $n = 14$ brain sections, 8 animals for tPA-WT mice and $n = 20$ brain sections, 8 animals for tPA-KO mice; For E18: $n = 28$ brain sections, 8 animals for tPA-WT mice and $n = 10$ brain sections, 5 animals for tPA-KO mice). (C) Representative confocal images showing the distribution of electroporated neuronal cells (red) after DAPI immunostaining (blue) in the cortex of adult tPA^{lox/lox} (E16). (D) Quantification of RFP-positive neurons in each cortical layers ($n = 34$ brain sections, 11 animals for tPA^{lox/lox} mice and $n = 21$ brain sections, 10 animals for tPA^{lox/lox} + Cre-GFP mice). Graphs show means + SEM. * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$; *** $P < 0.001$. Scale bars represent 50 μm .

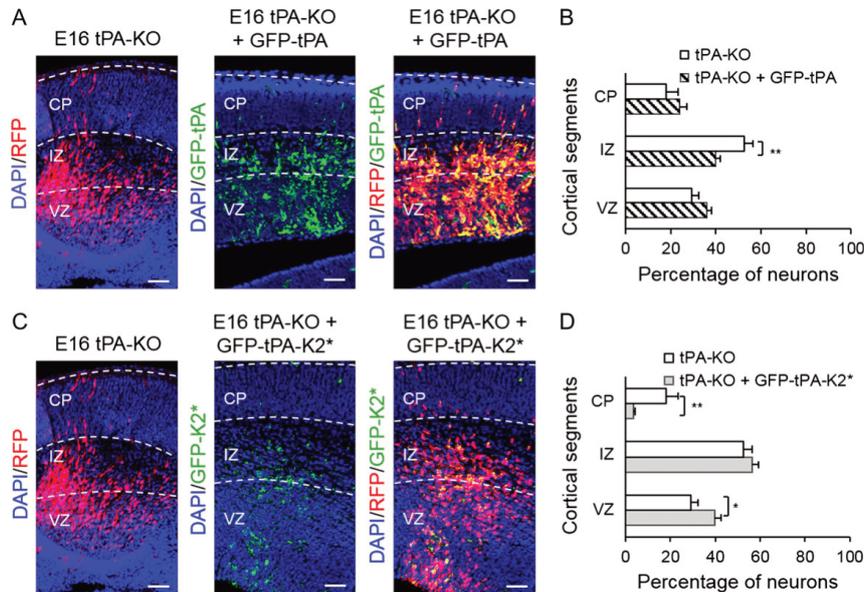


Figure 3. Kringle 2 domain of tPA is important for cortical neuronal migration. (A, B) In utero electroporation of pCAG-RFP plasmid alone or in combination with pCAG-GFP-tPA plasmid at E14 in tPA-KO mice cortices. (A) Representative confocal images showing the distribution of RFP (red), or GFP-tPA (green) after DAPI immunolabelling (blue) in the cortex of E16 tPA-KO and tPA-KO + GFP-tPA mice. (B) Quantification of RFP-positive neurons and RFP + GFP-tPA positive neurons in CP, IZ, and VZ of E16 ($n = 7$ brain sections, 5 animals for tPA-KO mice and $n = 28$ brain sections, 4 animals for tPA-KO mice). (C, D) In utero electroporation of pCAG-RFP plasmid alone or in combination with pCAG-GFP-tPA-K2* plasmid at E14 in tPA-KO mice cortices. (C) Representative confocal images showing the distribution of RFP (red), or GFP-tPA-K2* (green) after DAPI immunolabelling (blue) in the cortex of E16 tPA-KO and tPA-KO + GFP-tPA-K2* mice. (D) Quantification of RFP-positive neurons and RFP + GFP-tPA-K2* positive neurons in CP, IZ, and VZ of E16 ($n = 7$ brain sections, 5 animals for tPA-KO mice and $n = 15$ brain sections, 5 animals for tPA-KO + GFP-tPA-K2* mice; right panel). Graphs show means + SEM. * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$. Scale bars represent 50 μm .

expressed and released by cortical neurons controls migration via its Kringle 2 domain.

Migration of Neuronal Progenitors Occurs Through a tPA-Dependent Mechanism Involving the NMDAR Expressed on RGC

We then postulated that tPA may contribute to neuronal migration by its capacity to influence NMDAR signaling (Nicole, Docagne, et al. 2001). Since NMDAR is a key target of the K2 domain of tPA, we investigated the expression pattern of the common GluN1 subunit of NMDAR in the developing cortex (Fig. 4). So, we looked at GluN1 immunostaining in E16 whole cortex of tPA-WT and tPA-KO mice (Fig. 4A,B). We observed a significant decrease of GluN1 immunostaining in CP (Fig. 4A,B) of tPA-KO mice compared with tPA-WT mice. Furthermore, we detected that transfected cortical neurons (RFP positive cells in red) do not exhibit NMDAR (GluN1 positive cells in green) at E16 while RGC do (nestin-positive cells in blue; Fig. 4C,D). Indeed, GluN1 immunostainings co-localize with nestin positive cells (Fig. 4C,F) at distance of neuronal bodies (Fig. 4E,F). Interestingly, in wild-type mice, the immunolabelling of GluN1 was not homogenous in radial glia but focalized in front of neuronal cell bodies with a maximum intensity of GluN1 staining (Fig. 4C, D,F). The same results were obtained on tPA^{lox/lox} (Fig. 4G). In tPA^{lox/lox} + Cre mice, the GluN1 immunostaining is not

co-localized anymore in front of neuronal cell bodies, but it is scattered along the radial glial fibers (Fig. 4H).

In order to validate our hypothesis that neuronal tPA controls neuronal migration through radial glial NMDAR interaction, we electroporated cortices of tPA-WT mice at E14 with a plasmid encoding for either a wild-type GluN1 or a mutated GluN1 not responsive to tPA, both under the control of the RGC specific promoter pBLBP (Brain Lipid Binding Protein; pBLBP-GluN1 vs. pBLBP-GluN1*, respectively; Fig. 5A, Fig. S10 to see the specificity of the BLBP promoter for RGC). The mutated GluN1* has a mutation on its lysine in position 178 into valine (K178V) leading to the expression of a NMDAR not responsive to tPA (L178 being the binding site of tPA on the amino-terminal domain of GluN1) but still responsive to NMDAR agonists, as previously characterized (Lesept et al. 2016; Macrez et al. 2016). At E16, tPA-WT mice cotransfected with pCAG-RFP and pBLBP-GluN1 displayed a similar distribution pattern than tPA-WT mice (Fig. 5A,B). However, analysis of the tPA-WT mice cotransfected with pCAG-RFP and pBLBP-GluN1* revealed an accumulation of RFP-positive cells in the VZ and in the IZ, with only few neurons that reached the CP (Fig. 5A,B), as previously observed in tPA-deficient mice. Moreover, although the GluN1 immunostaining in tPA-WT + pBLBP-GluN1 is focalized in front of neuronal cell bodies with an increased GluN1 staining intensity, it is dispersed on RGC in tPA-WT + pBLBP-GluN1* transfected animals (Fig. 5C,D). These data demonstrate that the tPA expressed by cortical neurons drives their migration through a

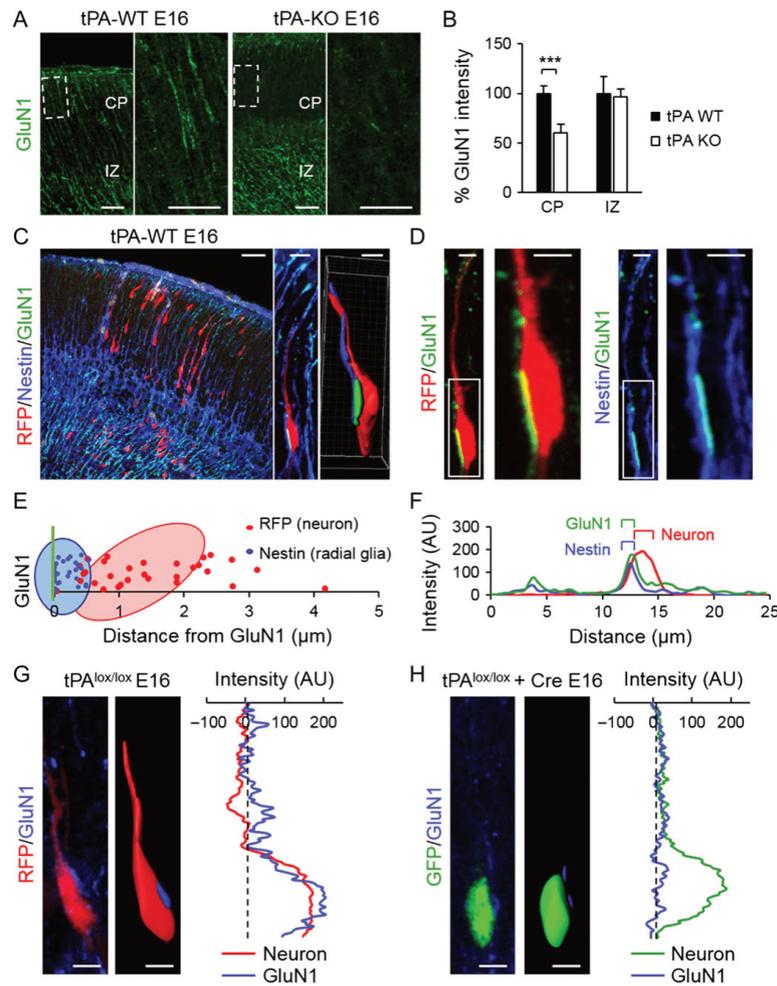


Figure 4. NMDA receptors positioning along radial glial fibers. (A) Representative confocal images of NMDAR (GluN1 subunit) immunostaining (green) in tPA-WT and tPA-KO mice at E16. The images on right are higher magnification of the ROI (dotted square). (B) Corresponding quantification of GluN1 fluorescent intensity in the CP and IZ of tPA-WT and tPA-KO mice ($n = 16$ brain sections, 4 animals, respectively). (C) Representative confocal images of immunolabelled cortical section in E16 tPA-WT mice, following in utero electroporation with pCAG-RFP plasmid at E14, showing the expression of NMDAR (GluN1, green) with transfected neurons (RFP, red) and radial glial cells (Nestin, blue). Image representing the electroporated area (left panel), a higher magnification focused on an electroporated neuron (central panel) and its modelization with Imaris software (right panel). (D) Representative confocal image of an electroporated neuron (RFP, red) immunolabelled with NMDAR (GluN1, green; left panels) or radial glial cells (Nestin, blue; right panels) and their corresponding higher magnification. (E) Graph showing the distance from GluN1 positive cells (green bar) to radial glial cells (Nestin positive, blue spots) or neurons (RFP positive, red spots; $n = 57$ neurons, 4 animals). (F) Representative fluorescent intensity-distance graph measured from confocal images in C showing that NMDAR staining (GluN1) follows the radial glia fibers (Nestin) and not the neuron (RFP). (G) Representative confocal image (left panel) and its Imaris modelization (middle panel) of immunolabelled neuron in E16 tPA^{lox/lox} mice, following in utero electroporation with pCAG-RFP plasmid at E14 showing the expression of NMDAR (GluN1, blue) and its corresponding graph (right panel) of fluorescent intensity-distance showing that NMDAR staining (GluN1) is localized in front of neuronal body. (H) Representative confocal image (left panel) and its Imaris modelization (middle panel) of immunolabelled neuron in E16 tPA^{lox/lox} mice, following in utero electroporation with pCAG-Cre-GFP plasmid at E14 showing the expression of NMDAR (GluN1, blue) and its corresponding graph (right panel) of fluorescent intensity-distance showing that NMDAR staining (GluN1) is distributed homogeneously along migrating neurons when tPA is deleted at E14 in neuronal progenitors. *** $P < 0.001$. Graphs show means + SEM. Scale bars represent 40 μm in A, 10 μm in C, and 5 μm in G and H.

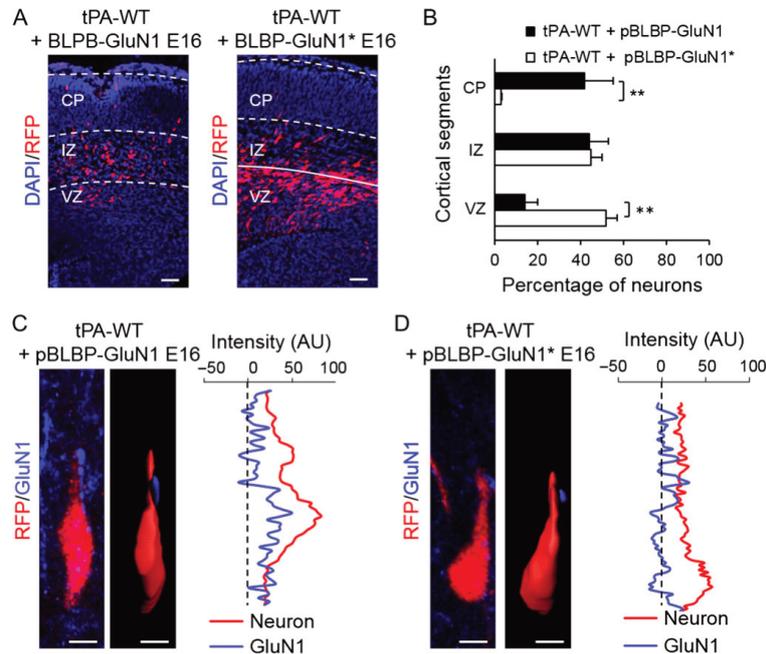


Figure 5. tPA controls the cortical neuronal migration by a mechanism dependent of NMDAR expressed on radial glial cells. In utero electroporation of pCAG-RFP plasmid and pBLBP-GluN1 or pBLBP-GluN1* (no specific interaction with tPA) at E14 in tPA-WT mice cortices. (A) Representative confocal images showing the distribution of RFP (red) after DAPI immunolabelling (blue) in the cortex of E16 tPA-WT mice. (B) Quantification of RFP-positive neurons in CP, IZ and VZ of E16 ($n = 6$ brain sections, 3 animals for tPA-WT + pBLBP-GluN1 mice and $n = 8$ brain sections, 5 animals for tPA-WT + pBLBP-GluN1* mice). (C) Representative confocal image (left panel) and Imaris modelization (middle panel) of immunolabelled neuron in E16 tPA-WT mice, following in utero electroporation with pCAG-RFP plasmid in combination with pBLBP-GluN1 plasmid at E14, showing the expression of NMDAR (GluN1, blue) and its corresponding graph (right panel) of fluorescent intensity-distance showing that NMDAR staining (GluN1) is localized in front of neuronal body and not the neurite for tPA-WT + pBLBP-GluN1 mice. (D) Representative confocal image (left panel) and Imaris modelization (middle panel) of immunolabelled neuron in E16 tPA-WT mice, following in utero electroporation with pCAG-RFP plasmid in combination with pBLBP-GluN1* plasmid at E14, showing the expression of NMDAR (GluN1, blue) and its corresponding graph (right panel) of fluorescent intensity - distance showing that NMDAR staining (GluN1) is localized in front of neuronal body and not the neurite for tPA-WT + pBLBP-GluN1* mice. ** $P < 0.01$; Scale bars represent 50 μm in A; 5 μm in C and D.

mechanism dependent of the NMDAR present at the surface of RGC.

The Neuronal tPA Controls the Maturation and Organization of RGC

RGC provide a scaffold for radial migration of new neurons to their target cortical location (Rakic 2003a; Anthony et al. 2004). As neuronal tPA influence neuronal migration through its kringle 2 domain which can interact with NMDAR-dependent radial glial process (see our above data) and that NMDAR are expressed in RGC at this stage of development, we thus investigated the influence of tPA on radial glia maturation and organization. In order to further investigate modifications of the architecture of RGC between tPA-KO and tPA-WT mice, we electroporated cortices of these mice at E14 with a plasmid encoding for BLBP tagged with a GFP (Fig. 6A). We first observed a significant variation in the orientation of radial glia fibers at the pial surface between tPA-WT and tPA-KO mice (Fig. 6B-D, Fig. S11A). Indeed, in tPA-WT mice the majority of RGC displays a perpendicular

angle with the pial surface compared with the tPA-KO mice (Fig. 6B-D). Moreover, we noticed a defect in radial glial fibers parallelism in tPA-KO mice compared with tPA-WT mice (Fig. 6D,E). Similar data were obtained between tPA-WT and tPA-KO mice with nestin immunostaining regarding the radial glia fibers orientation at the pial surface and the parallelism between the fibers (Fig. S11B-F). However, surface area of pial processes remained similarly attached to the pial surface between tPA-WT and tPA-KO mice (Fig. S11G).

Brains from tPA-WT, tPA-KO, tPA^{lox/lox} and tPA^{lox/lox} + Cre in utero electroporated at E14 were immunostained at E16 with the radial glial markers nestin, vimentin and BLBP (Fig. 6F-I, Fig. S12A-D). While the number of RGC was similar in tPA-WT and tPA-KO mice (Fig. S11F), we observed significant lower immunostainings in CP for all these markers (nestin, vimentin, and BLBP in tPA-KO mice only compared with tPA-WT, tPA^{lox/lox} and tPA^{lox/lox} mice) (Fig. 6F-I, Fig. S12A-D). These last data show that neuronal tPA is might be important for an accurate organization and specific expression of RGC markers.

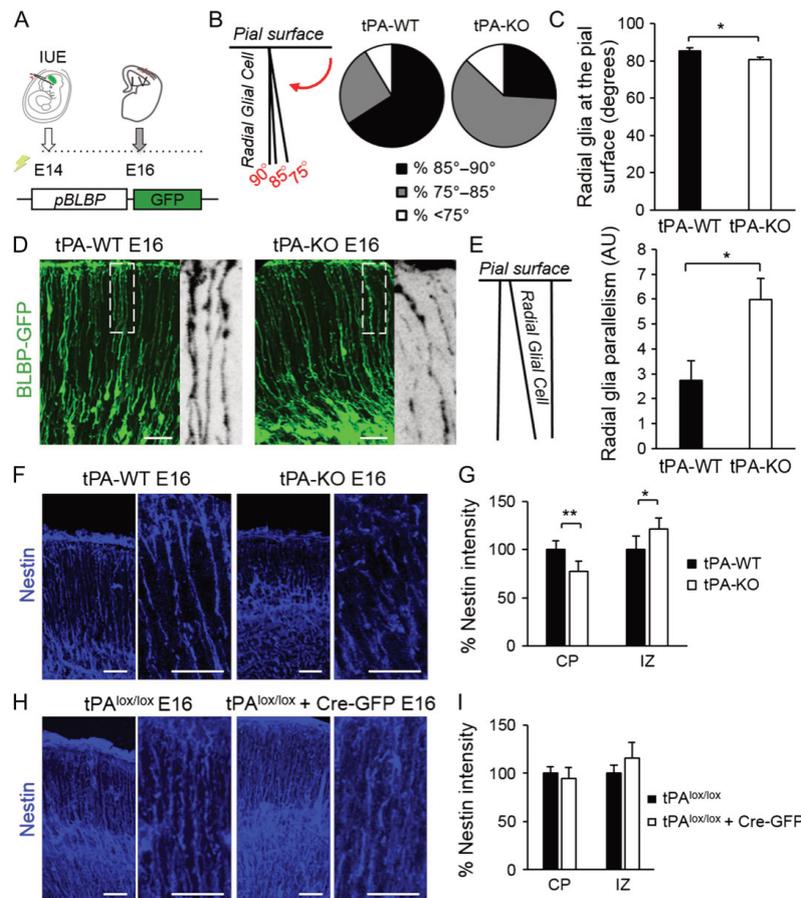


Figure 6. Phenotype of radial glial cells. (A) *In utero* electroporation of pBLBP-GFP plasmid at E14 in tPA-WT and tPA-KO mice cortices. (B) Section graph showing the RGC orientation distribution from the most (85° to 90°) to the least (<75°) orthogonally (left panel). Quantification of radial glial fibers orientation over the pial surface in tPA-WT (middle panel) and tPA-KO (right panel) mice. (C) Histogram showing the radial glial cells orientation in degrees over the pial surface in tPA-WT and tPA-KO mice ($n = 5$ and 18 brain sections, 3 and 8 animals, respectively). (D) Representative confocal images showing the distribution of electroporated radial glial cells (green) in E16 tPA-WT (left panel) and tPA-KO (right panel) mouse cortices. The images on right are magnification and bright field images of the analyzed ROI (dotted square). (E) Histogram showing the RGC parallelism (calculated according to the variability of the radial glial cells angle in each slice) in tPA-WT and tPA-KO mice ($n = 5$ and 18 brain sections, 3 and 8 animals, respectively). (F, H) Representative confocal images of coronal sections at E16 in tPA-WT (F), tPA-KO (F), tPA^{lox/lox} (H), and tPA^{lox/lox} + Cre-GFP (H) mouse cortices showing the expression of nestin (blue) in tPA-WT and tPA-KO mice at E16. (G, I) Corresponding quantification of fluorescence intensity in CP and IZ ($n = 16$ brain sections in 4 tPA-WT and 4 tPA-KO, respectively). Histograms show means + SEM. * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$. Scale bars represent 40 μm .

Discussion

Here, we report that during the early stages of corticogenesis, cortical migrating neurons produce and release active tPA as a paracrine signal serving neuronal migration. In this study, we performed *in utero* electroporation on constitutive and conditional tPA-deficient mice. In all experiments, we compared these 2 strains to be able to differentiate the role of tPA in general and neuronal tPA in particular (by using tPA-KO and/or tPA^{lox/lox} mice, respectively). Thus, we identified that the tPA released by neurons controls neuronal migration via a clustering of NMDAR expressed at the surface of RGC. Accordingly, a global tPA

deficiency or a conditional deletion of neuronal tPA at E14 both delay neuronal migration at E16 and E17, an effect that can be partially rescued by overexpressing tPA in neuronal progenitor cells at E14. Importantly, this delayed migration observed in the absence of neuronal tPA is sufficient to maintain an altered neuronal lamination in adults (Fig. 7). These data provide the first description of a role of tPA in developing cortex with a long-term impact on the final cortical pattern which could affect neuronal networks. Indeed, although the absence of tPA was reported to cause disturbances on neurite outgrowth and migration of cerebellar granule cells (Raoult et al. 2014; Seeds et al. 1999), our present

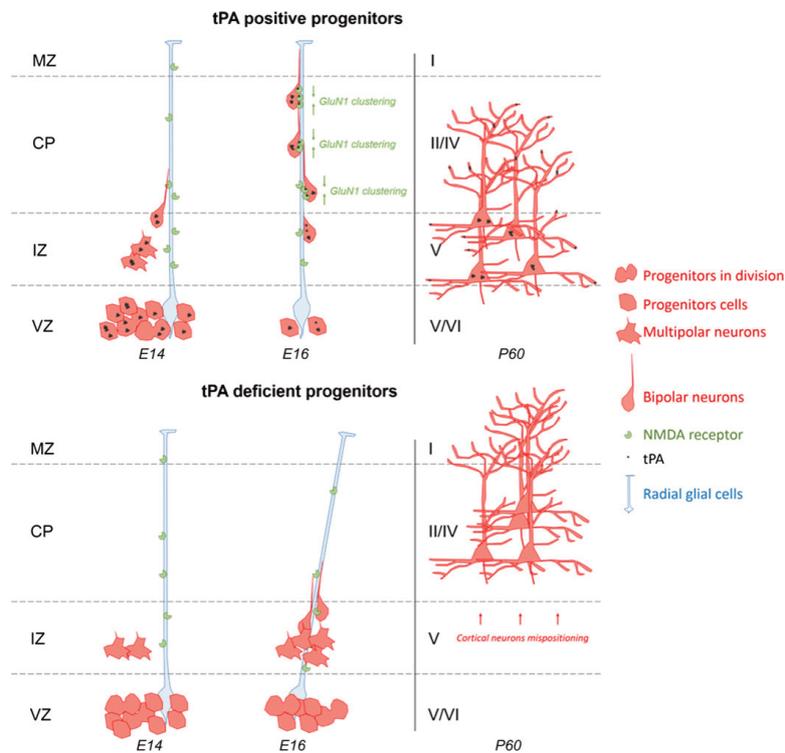


Figure 7. Tissue-type plasminogen activator (tPA) plays a key role in corticogenesis. Produced and released by neuronal progenitors, tPA promotes the maturation of radial glial cells (RGC) through activation of NMDAR expressed at their surface. The absence of neuronal tPA affects radial glial placement, orientation but not end-feet attachment over the pial surface. Accordingly, a global tPA deficiency or a conditional deletion of the neuronal tPA at E14 delayed neuronal migration mainly at E16. This delayed migration observed in the absence of neuronal tPA led to an altered lamination of cortical layers II-IV and V in adults.

study provides the first description of a role of tPA in the developing cortex with a long-term impact on the final cortical pattern.

The Kringle 2 Domain of the Neuronal tPA and its Interaction With the GluN1 Subunit of NMDAR Expressed in RGC are Essential in the Control of Neuronal Migration

tPA is composed of several domains including the Kringle 2 domain. This latter mediates its interaction with NMDAR via its Lysine Binding Site leading to a potentiation of NMDAR-mediated neuronal calcium influx (Parcq et al. 2013; Lesept et al. 2016; Macrez et al. 2016). The altered migration of tPA-deficient neurons is partially rescued by re-expressing a wild-type tPA, whereas it is worse when re-expressing a tPA mutated in its Kringle 2 domain (tPA-K2^{*}; previously characterized to be unable to interact with NMDAR) (Parcq et al. 2013). Similarly, a conditional dominant negative expression of a mutated form of the GluN1 subunit of NMDAR (GluN1^{*}), that is not responsive to tPA (Baranes et al. 1998; Nicole, Docagne, et al. 2001) on RGC led to an impaired migration of cortical

neurons in wild-type mice similar to that observed in tPA-deficient animals. It is then interesting to note that at this stage of development (E16) NMDAR are expressed in RGC and not in cortical neurons. Of note, although the distribution of NMDAR is focused in front of the cell bodies of tPA positive neuronal progenitors in wild-type animals, it is not the case when cortical neurons are deficient in tPA or when RGC display the mutated form of NMDAR that cannot bind tPA. These data are also in agreement with the recent demonstration that tPA by interacting with neuronal NMDAR promotes their surface dynamic and clustering (Lesept et al. 2016). We can thus propose a crosstalk between the neuronal tPA and the NMDAR expressed in RGC that contributes to the early phases of neuronal migration that might be important for neuronal motility (Komuro and Rakic 1996; Zheng and Poo 2007). These data indicate that the lack of tPA in progenitor cells destined to give the cortical layer V neurons causes a persistent radial migration defect in the CP. One interpretation of these data could be that levels of the tPA expressed are too low to rescue neuronal migration from the CP or that this timing of expression (E14) is too late to rescue neuronal migration from the CP.

tPA is also known to be crucial in the plasmin-dependent processing of the precursor form of BDNF (proBDNF) and of

MMP-9 (proMMP-9) into their respective active form, both are known as actors of the control of neuronal migration (McCarthy et al. 2011; Reinhard et al. 2015), maturation (Nakajima et al. 2015) and plasticity (Pang et al. 2004). Furthermore, tPA is also known to activate several signaling pathways such as ERK, PI3K/Akt, AMPK-, or mTor-HIF-1 α (Correa et al. 2011; Wu et al. 2012, 2013) and to upregulate MMP production via an interaction with LRP receptor after a brain injury (Wang et al. 2003). Thus, we cannot exclude the possibility that tPA can act at different levels and may also contribute to the neuronal migration by influencing the BDNF and MMP-9-dependent pathways.

tPA is Required for RGC Organization and Differentiation

Previous studies have demonstrated that upper cortical layers preferentially migrate to their final location in a radial-glia-dependent manner whereas the deeper layers through a radial-glia independent manner (Gal et al. 2006; Nadarajah et al. 2002). Our results show that the absence of tPA led to a mispositioning of upper-layer cortical neurons only. Indeed, until E17, we observed a delay of neurons to reach the CP leading to an accumulation in the IZ whereas, at E18, the neuronal distribution of the IZ and CP layers is not affected anymore. These impairments lead to an altered neuronal lamination of the upper cortical layer. Consequently, these results indicate that tPA is not required for the migration of deeper-layer cortical neurons and that the impairment in upper-layer neuronal migration in tPA-KO mice is the consequence of abnormalities in RGC.

Moreover, a recent study reveal that tPA-positive cells in the cortex are pyramidal glutamatergic neurons (Louessard et al. 2016) mainly positioned in cortical layer V. RGC are essential for the accurate construction of the mammalian brain (Rakic 1972). These cells give an instructive scaffold for migration and placement of newborn neurons in the developing cerebral cortex. The term RGC refers to their 2 major characteristics, that are, their long radial processes extending from the VZ to the pial surface and their glial properties, such as the content of glycogen granules (Rakic 1972) or the expression of specific markers shared with astrocytes such as vimentin (Pixley and de Vellis 1984), nestin (Hockfield and McKay 1985), BLBP (Feng et al. 1994), RC1 and RC2 (Misson et al. 1988; Edwards et al. 1990). Here, we demonstrated that radial glial placement and orientation are affected in tPA-KO mice. This disruption in organization may underlie the misplacement of newborn cortical neurons. Concerning their molecular phenotypes, several studies have demonstrated that besides these specific glial markers, numerous proteins or ligands play important roles in the control of development, maturation, morphology, and polarity of RGC and thus for a proper neuronal radial migration. For example, reelin is known to be a key regulator of the development of RGC (Hartfuss et al. 2003) and tPA can cleave reelin (Trotter et al. 2014). Interestingly, it has been demonstrated a decrease in BLBP staining in *reeler* mice (Hartfuss et al. 2003). Here, for the first time, our data reveal that several glial markers are poorly expressed in tPA-KO mice demonstrating that tPA plays a key role in the development of RGC and more precisely in their organization and differentiation. Further studies will help to better understand the molecular mechanism of this new function.

Role of tPA in the Morphology and Maturation of Migrating Neurons

The transition of migrating neurons into a multipolar to bipolar shape is emerging as a fundamental requirement for pyramidal neurons to obtain their correct morphology (Hatanaka and Murakami 2002; Noctor et al. 2004). Here, analyses of the percentage of bipolar and multipolar neurons in the upper IZ of brain sections at E16 from neocortical progenitors expressing RFP in utero electroporated at E14 did not indicate differences between tPA-WT and tPA-KO mice neither in their soma size and their branches number. The IZ, contains the pool of intermediate progenitors, specific stage for indirect neurogenesis and necessary to extend cortical upper layers. Furthermore, it has been shown that NMDAR can influence the migration of cortical neurons, and more precisely that the distribution of NMDAR subunits can modulate the neuronal fate (Sheng et al. 1994; Chakraborty et al. 2017). During early development, there is a transitional switch from RGC into neuronal progenitors. In agreement with our findings, the GluN1 subunit is expressed at the surface of RGC and a clustering of these subunits has been observed (Götz et al. 1998; Englund et al. 2005; Chakraborty et al. 2017). The switch of RGC into mature neurons is possible via the production of intermediate neuronal progenitor cells (IPC) that can express various glutamate receptors (Chakraborty et al. 2017). Moreover, developing neurons require glutamate/Ca²⁺-mediated NMDAR for cortical migration (Behar et al. 1999). We can thus suggest that the clustering of the NMDAR on RGC in front of neuronal soma and the interaction between neuronal tPA and NMDAR on RGC is essential to increase neuronal Ca²⁺ influx leading to an appropriate cortical migration and neuronal maturation.

tPA is Important for Neuronal Cortical Layering

During neocortical development it has been well described that E14 labeled a population of neurons which are mainly settled in layers IV–V and received thalamic axons sensory inputs (Custo Greig et al. 2013). Here, we showed that a deletion of tPA led to a delayed wave of neuronal migration and to a discontinuing neuronal migration in the IZ, finally associated with a neuronal mispositioning at birth and adult stages. We hypothesize that the lack of tPA in neuronal progenitors born at E14 leads to a delayed and/or a stopped migration in the IZ. These delayed neurons in the IZ, will end up in the CP at E18 and in the upper cortical layers at adult stage (compared with tPA-WT mice). By being delayed in the IZ, neuronal progenitors could be catching up by the next ones (those born at E15–16) and could finish their migration to their final location with them, that is, in an upper cortical layer. Thus, these delayed neurons could display the phenotypes of the later born neurons due to various trophic factors present at this specific stage in the IZ. This precise timing of corticogenesis is critical for a successful organization of cortical networks (De la Rossa et al. 2013; Telley et al. 2016). We can thus suggest that mispositioning of tPA-deficient neurons could modify the subtype identities of cortical layering and subsequent molecular identities, neuronal morphology and electrophysiological properties, leading to abnormal or lesioned circuits. This should be addressed in future investigations. This neuronal positioning defect is also associated with an increased neuronal density in layer II/IV.

Role of tPA in Developmental Disorders

For instance, it was reported that tPA is involved in the pathophysiology of Fragile X Syndrome (FXS). Indeed, tPA is increased in glial cells differentiated from neural progenitors of Fmr1-KO mice, a mouse model for FXS leading to an altered migration and differentiation of the progenitors lacking Fragile X mental retardation protein (FMRP) (Achuta et al. 2014). In this model, when tPA function is blocked with an antibody, enhanced migration of doublecortin-immunoreactive neurons in one day differentiated FMRP-deficient neurospheres is normalized. It was shown that enhanced intracellular Ca^{2+} responses to depolarization with potassium are prevented by the treatment with a tPA-neutralizing antibody in FMRP-deficient cells during early neural progenitor differentiation. Moreover, several studies have reported the influence of tPA in many behaviors such as anxiety (Pawlak et al. 2003; Obiang et al. 2011) and spatial learning (Madani et al. 1999; Calabresi et al. 2000; Obiang et al. 2011; Oh et al. 2014). It was recently described that this latter requires tPA-dependent NMDAR signaling (Hébert et al. 2017). A better understanding of the tPA-dependent NMDAR signaling influence on behavior will be further investigated.

To conclude, our present study indicates that the tPA expressed by cortical neurons is a new actor of the crosstalk between neuronal cells and RGC during corticogenesis, through a mechanism involving NMDARs expressed on RGC. We can thus postulate that this mechanism may be an interesting target for intervention in developmental disorders, including FXS.

Authors' Contributions

N.P., S.D., M.N., F.L., M.L., I.B. performed the experiments. L.L., Y.H., created the plasmids. N.P., I.B., and D.V. designed the experiments, wrote and checked the article. All authors reviewed the article.

Supplementary Material

Supplementary material is available at *Cerebral Cortex* online.

Funding

Grants from the Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche.

Notes

Conflict of Interest: None declared.

References

1970. Embryonic vertebrate central nervous system: revised terminology. The Boulder Committee. *Anat Rec.* 166:257–261. doi:10.1002/ar.1091660214.
- Achuta VS, Rezov V, Utela M, Louhivuori V, Louhivuori L, Castrén ML. 2014. Tissue plasminogen activator contributes to alterations of neuronal migration and activity-dependent responses in fragile X mice. *J Neurosci Off J Soc Neurosci.* 34:1916–1923.
- Angevine JB, Sidman RL. 1961. Autoradiographic study of cell migration during histogenesis of cerebral cortex in the mouse. *Nature.* 192:766–768.
- Anthony TE, Klein C, Fishell G, Heintz N. 2004. Radial glia serve as neuronal progenitors in all regions of the central nervous system. *Neuron.* 41:881–890.
- Anton ES, Kreidberg JA, Rakic P. 1999. Distinct functions of $\alpha 3$ and αV integrin receptors in neuronal migration and laminar organization of the cerebral cortex. *Neuron.* 22:277–289.
- Baranes D, Lederfein D, Huang YY, 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.
- Bayer SA, Altman J, Russo RJ, Dai X, Simmons JA. 1991. Cell migration in the rat embryonic neocortex. *J Comp Neurol.* 307:499–516.
- Behar TN, Dugich-Djordjevic MM, Li YX, Ma W, Somogyi R, Wen X, Brown E, Scott C, McKay RD, Barker JL. 1997. Neurotrophins stimulate chemotaxis of embryonic cortical neurons. *Eur J Neurosci.* 9:2561–2570.
- Behar TN, Scott CA, Greene CL, Wen X, Smith SV, Maric D, Liu QY, Colton CA, Barker JL. 1999. Glutamate acting at NMDA receptors stimulates embryonic cortical neuronal migration. *J Neurosci Off J Soc Neurosci.* 19:4449–4461.
- Brodtkorb E, Nilsen G, Smevik O, Rinck PA. 1992. Epilepsy and anomalies of neuronal migration: MRI and clinical aspects. *Acta Neurol Scand.* 86:24–32.
- Bystron I, Blakemore C, Rakic P. 2008. Development of the human cerebral cortex: Boulder Committee revisited. *Nat Rev Neurosci.* 9:110–122.
- Bystron I, Rakic P, Molnár Z, Blakemore C. 2006. The first neurons of the human cerebral cortex. *Nat Neurosci.* 9:880–886.
- Calabresi P, Napolitano M, Centonze D, Marfia GA, Gubellini P, Teule MA, Berretta N, Bernardi G, Frati L, Tolu M, et al. 2000. Tissue plasminogen activator controls multiple forms of synaptic plasticity and memory. *Eur J Neurosci.* 12:1002–1012.
- Cardoso C, Leventer RJ, Dowling JJ, Ward HL, Chung J, Petras KS, Roseberry JA, Weiss AM, Das S, Martin CL, et al. 2002. Clinical and molecular basis of classical lissencephaly: mutations in the LIS1 gene (PAFAH1B1). *Hum Mutat.* 19:4–15.
- 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. *Dev Camb Engl.* 120:3173–3183.
- Cassé F, Bardou I, Danglot L, Briens A, Montagne A, Parcq J, Alahari A, Galli T, Vivien D, Docagne F. 2012. Glutamate controls tPA recycling by astrocytes, which in turn influences glutamatergic signals. *J Neurosci Off J Soc Neurosci.* 32:5186–5199.
- Caviness VS, Sidman RL. 1973. Time of origin or corresponding cell classes in the cerebral cortex of normal and reeler mutant mice: an autoradiographic analysis. *J Comp Neurol.* 148:141–151.
- Chakraborty A, Murphy S, Coleman N. 2017. The role of NMDA receptors in neural stem cell proliferation and differentiation. *Stem Cells Dev.* 26:798–807.
- Correa F, Gauberti M, Parcq J, Macrez R, Hommet Y, Obiang P, Hernangómez M, Montagne A, Liot G, Guaza C, et al. 2011. Tissue plasminogen activator prevents white matter damage following stroke. *J Exp Med.* 208:1229–1242.
- Custo Greig L, Woodworth M, Galazo M, Padmanabhan H, Macklis J. 2013. Molecular logic of neocortical projection

- neuron specification, development and diversity. *Nat Rev Neurosci.* 14:755–769.
- De la Rossa A, Bellone C, Golding B, Vitali I, Moss J, Toni N, Lüscher C, Jabaudon D. 2013. In vivo reprogramming of circuit connectivity in postmitotic neocortical neurons. *Nat Neurosci.* 16:193–200.
- Docagne F, Nicole O, Marti HH, MacKenzie ET, Buisson A, Vivien D. 1999. Transforming growth factor-beta1 as a regulator of the serpins/t-PA axis in cerebral ischemia. *FASEB J Off Publ Fed Am Soc Exp Biol.* 13:1315–1324.
- Dulabon L, Olson EC, Taglienti MG, Eisenhuth S, McGrath B, Walsh CA, Kreidberg JA, Anton ES. 2000. Reelin binds $\alpha 3\beta 1$ integrin and inhibits neuronal migration. *Neuron.* 27:33–44.
- Edwards MA, Yamamoto M, Caviness VS Jr. 1990. Organization of radial glia and related cells in the developing murine CNS. An analysis based upon a new monoclonal antibody marker. *Neuroscience.* 36:121–144.
- Englund C, Fink A, Lau C, Pham D, Daza RAM, Bulfone A, Kowalczyk T, Hevner RF. 2005. Pax6, Tbr2, and Tbr1 are expressed sequentially by radial glia, intermediate progenitor cells, and postmitotic neurons in developing neocortex. *J Neurosci.* 25:247–251.
- Evsyukova I, Plestant C, Anton ES. 2013. Integrative mechanisms of oriented neuronal migration in the developing brain. *Annu Rev Cell Dev Biol.* 29:299–353.
- Feng L, Hatten ME, Heintz N. 1994. Brain lipid-binding protein (BLBP): a novel signaling system in the developing mammalian CNS. *Neuron.* 12:895–908.
- 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.
- Fox JW, Lamperti ED, Eksjoğlu YZ, Hong SE, Feng Y, Graham DA, Scheffer IE, Dobyns WB, Hirsch BA, Radtke RA, et al. 1998. Mutations in filamin 1 prevent migration of cerebral cortical neurons in human periventricular heterotopia. *Neuron.* 21:1315–1325.
- Gal JS, Morozov YM, Ayoub AE, Chatterjee M, Rakic P, Haydar TF. 2006. Molecular and morphological heterogeneity of neural precursors in the mouse neocortical proliferative zones. *J Neurosci Off J Soc Neurosci.* 26:1045–1056.
- Gilmore EC, Ohshima T, Goffinet AM, Kulkarni AB, Herrup K. 1998. Cyclin-dependent kinase 5-deficient mice demonstrate novel developmental arrest in cerebral cortex. *J Neurosci.* 18:6370–6377.
- Götz M, Huttner WB. 2005. The cell biology of neurogenesis. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 6:777–788.
- Götz M, Stoykova A, Gruss P. 1998. Pax6 controls radial glia differentiation in the cerebral cortex. *Neuron.* 21:1031–1044.
- Hartfuss E, Förster E, Bock HH, Hack MA, Leprince P, Luque JM, Herz J, Frotscher M, Götz M. 2003. Reelin signaling directly affects radial glia morphology and biochemical maturation. *Dev Camb Engl.* 130:4597–4609.
- Hatanaka Y, Murakami F. 2002. In vitro analysis of the origin, migratory behavior, and maturation of cortical pyramidal cells. *J Comp Neurol.* 454:1–14.
- Haubensak W, Attardo A, Denk W, Huttner WB. 2004. Neurons arise in the basal neuroepithelium of the early mammalian telencephalon: a major site of neurogenesis. *Proc Natl Acad Sci USA.* 101:3196–3201.
- Hébert M, Anfray A, Chevilly A, Martinez de Lizarrondo S, Quenault A, Louessard M, Roussel BD, Obiang P, Save E, Orset C, et al. 2017. Distant space processing is controlled by tPA-dependent NMDA receptor signaling in the entorhinal cortex. *Cereb Cortex.* 1991(27):4783–4796.
- Hockfield S, McKay RD. 1985. Identification of major cell classes in the developing mammalian nervous system. *J Neurosci Off J Soc Neurosci.* 5:3310–3328.
- Hong SE, Shugart YY, Huang DT, Shahwan SA, Grant PE, Hourihane JO, Martin ND, Walsh CA. 2000. Autosomal recessive lissencephaly with cerebellar hypoplasia is associated with human RELN mutations. *Nat Genet.* 26:93–96.
- Komuro H, Rakic P. 1993. Modulation of neuronal migration by NMDA receptors. *Science.* 260:95–97.
- Komuro H, Rakic P. 1996. Intracellular Ca²⁺ fluctuations modulate the rate of neuronal migration. *Neuron.* 17:275–285.
- Krystosek A, Seeds NW. 1981. Plasminogen activator secretion by granule neurons in cultures of developing cerebellum. *Proc Natl Acad Sci USA.* 78:7810–7814.
- Lesept F, Chevilly A, Jezequel J, Ladépêche L, Macrez R, Aimable M, Lenoir S, Bertrand T, Rubrecht L, Galea P, et al. 2016. Tissue-type plasminogen activator controls neuronal death by raising surface dynamics of extrasynaptic NMDA receptors. *Cell Death Dis.* 7:e2466.
- Li J, Yu L, Gu X, Ma Y, Pasqualini R, Arap W, Snyder EY, Sidman RL. 2013. Tissue plasminogen activator regulates Purkinje neuron development and survival. *Proc Natl Acad Sci USA.* 110:E2410–E2419.
- Louessard M, Lacroix A, Martineau M, Mondielli G, Montagne A, Lesept F, Lambomez B, Cauli B, Mothet J-P, Vivien D, et al. 2016. Tissue plasminogen activator expression is restricted to subsets of excitatory pyramidal glutamatergic neurons. *Mol Neurobiol.* 53:5000–5012.
- Luhmann HJ, Fukuda A, Kilb W. 2015. Control of cortical neuronal migration by glutamate and GABA. *Front Cell Neurosci.* 9:4.
- Macrez R, Stys PK, Vivien D, Lipton SA, Docagne F. 2016. Mechanisms of glutamate toxicity in multiple sclerosis: biomarker and therapeutic opportunities. *Lancet Neurol.* 15:1089–1102.
- Madani R, Hulo S, Toni N, Madani H, Steimer T, Muller D, Vassalli JD. 1999. Enhanced hippocampal long-term potentiation and learning by increased neuronal expression of tissue-type plasminogen activator in transgenic mice. *EMBO J.* 18:3007–3012.
- Marcos-Contreras OA, Martinez de Lizarrondo S, Bardou I, Orset C, Pruvost M, Anfray A, Frigout Y, Hommet Y, Lebouvier L, Montaner J, et al. 2016. Hyperfibrinolysis increases blood-brain barrier permeability by a plasmin- and bradykinin-dependent mechanism. *Blood.* 128:2423–2434.
- Marín O, Rubenstein JLR. 2003. Cell migration in the forebrain. *Annu Rev Neurosci.* 26:441–483.
- Matsumoto N, Leventer RJ, Kuc JA, Mewborn SK, Dudlicek LL, Ramocki MB, Pilz DT, Mills PL, Das S, Ross ME, et al. 2001. Mutation analysis of the DCX gene and genotype/phenotype correlation in subcortical band heterotopia. *Eur J Hum Genet EJHG.* 9:5–12.
- McCarthy DM, Zhang X, Darnell SB, Sangrey GR, Yanagawa Y, Sadri-Vakili G, Bhide PG. 2011. Cocaine alters BDNF expression and neuronal migration in the embryonic mouse forebrain. *J Neurosci.* 31:13400–13411.
- Melchor JP, Strickland S. 2005. Tissue plasminogen activator in central nervous system physiology and pathology. *Thromb Haemost.* 93:655–660.
- Misson J-P, Edwards MA, Yamamoto M, Caviness VS Jr. 1988. Identification of radial glial cells within the developing

- murine central nervous system: studies based upon a new immunohistochemical marker. *Dev Brain Res.* 44:95–108.
- Nadarajah B, Alifragis P, Wong ROL, Parnavelas JG. 2002. Ventricle-directed migration in the developing cerebral cortex. *Nat Neurosci.* 5:218–224.
- Nadarajah B, Parnavelas JG. 2002. Modes of neuronal migration in the developing cerebral cortex. *Nat Rev Neurosci.* 3:423–432.
- Nakajima S, Numakawa T, Adachi N, Ooshima Y, Odaka H, Yoshimura A, Kunugi H. 2015. Self-amplified BDNF transcription is a regulatory system for synaptic maturation in cultured cortical neurons. *Neurochem Int.* 91:55–61.
- Nicole O, Docagne F, Ali C, Margail I, Carmeliet P, MacKenzie ET, Vivien D, Buisson A. 2001. The proteolytic activity of tissue-plasminogen activator enhances NMDA receptor-mediated signaling. *Nat Med.* 7:59–64.
- Noctor SC, Flint AC, Weissman TA, Dammerman RS, Kriegstein AR. 2001. Neurons derived from radial glial cells establish radial units in neocortex. *Nature.* 409:714–720.
- Noctor SC, Martínez-Cerdeño V, Ivic L, Kriegstein AR. 2004. Cortical neurons arise in symmetric and asymmetric division zones and migrate through specific phases. *Nat Neurosci.* 7:136–144.
- Obiang P, Macrez R, Jullienne A, Bertrand T, Lesept F, Ali C, Maubert E, Vivien D, Agin V. 2012. GluN2D subunit-containing NMDA receptors control tissue plasminogen activator-mediated spatial memory. *J Neurosci Off J Soc Neurosci.* 32:12726–12734.
- 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.
- Ogawa M, Miyata T, Nakajima K, Yagyu K, Seike M, Ikenaka K, Yamamoto H, Mikoshiba K. 1995. The reeler gene-associated antigen on Cajal-Retzius neurons is a crucial molecule for laminar organization of cortical neurons. *Neuron.* 14:899–912.
- Oh SB, Byun CJ, Yun J-H, Jo D-G, Carmeliet P, Koh J-Y, Lee J-Y. 2014. Tissue plasminogen activator arrests Alzheimer's disease pathogenesis. *Neurobiol Aging.* 35:511–519.
- Palmini A, Andermann F, Olivier A, Tampieri D, Robitaille Y, Andermann E, Wright G. 1991. Focal neuronal migration disorders and intractable partial epilepsy: a study of 30 patients. *Ann Neurol.* 30:741–749.
- Pang PT, Teng HK, Zaitsev E, Woo NT, Sakata K, Zhen S, Teng KK, Yung W-H, Hempstead BL, Lu B. 2004. Cleavage of proBDNF by tPA/plasmin is essential for long-term hippocampal plasticity. *Science.* 306:487–491.
- Parcq J, Bertrand T, Baron AF, Hommet Y, Anglès-Cano E, Vivien D. 2013. Molecular requirements for safer generation of thrombolytics by bioengineering the tissue-type plasminogen activator A chain. *J Thromb Haemost JTH.* 11:539–546.
- Pawlak R, Magarinos AM, Melchor J, McEwen B, Strickland S. 2003. Tissue plasminogen activator in the amygdala is critical for stress-induced anxiety-like behavior. *Nat Neurosci.* 6:168–174.
- Pittman RN, DiBenedetto AJ. 1995. PC12 cells overexpressing tissue plasminogen activator regenerate neurites to a greater extent and migrate faster than control cells in complex extracellular matrix. *J Neurochem.* 64:566–575.
- Pixley SK, de Vellis J. 1984. Transition between immature radial glia and mature astrocytes studied with a monoclonal antibody to vimentin. *Brain Res.* 317:201–209.
- 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.
- Rakic P. 1972. Mode of cell migration to the superficial layers of fetal monkey neocortex. *J Comp Neurol.* 145:61–83.
- Rakic P. 1978. Neuronal migration and contact guidance in the primate telencephalon. *Postgrad Med J.* 54(Suppl 1):25–40.
- Rakic P. 1988. Defects of neuronal migration and the pathogenesis of cortical malformations. *Prog Brain Res.* 73:15–37.
- Rakic P. 2003a. Developmental and evolutionary adaptations of cortical radial glia. *Cereb Cortex.* 13:541–549.
- Rakic P. 2003b. Elusive radial glial cells: historical and evolutionary perspective. *Glia.* 43:19–32.
- Rakic P, Stensas LJ, Sayre EP, Sidman RL. 1974. Computer-aided three-dimensional reconstruction and quantitative analysis of cells from serial electron microscopic montages of foetal monkey brain. *Nature.* 250:31–34.
- Raouf E, Bénard M, Komuro H, Lebon A, Vivien D, Fournier A, Vaudry H, Vaudry D, Galas L. 2014. Cortical-layer-specific effects of PACAP and tPA on interneuron migration during post-natal development of the cerebellum. *J Neurochem.* 130:241–254.
- Reinhard SM, Razak K, Ethell IM. 2015. A delicate balance: role of MMP-9 in brain development and pathophysiology of neurodevelopmental disorders. *Front Cell Neurosci.* 9:280.
- Reiprich P, Kilb W, Luhmann HJ. 2005. Neonatal NMDA receptor blockade disturbs neuronal migration in rat somatosensory cortex in vivo. *Cereb Cortex.* 15:349–358.
- Rijken DC. 1988. Relationships between structure and function of tissue-type plasminogen activator. *Klin Wochenschr.* 66 (Suppl 12):33–39.
- 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.
- Samson AL, Medcalf RL. 2006. Tissue-type plasminogen activator: a multifaceted modulator of neurotransmission and synaptic plasticity. *Neuron.* 50:673–678.
- Seeds NW, Basham ME, Haffke SP. 1999. Neuronal migration is retarded in mice lacking the tissue plasminogen activator gene. *Proc Natl Acad Sci USA.* 96:14118–14123.
- Sheng M, Cummings J, Roldan LA, Jan YN, Jan LY. 1994. Changing subunit composition of heteromeric NMDA receptors during development of rat cortex. *Nature.* 368:144–147.
- Siao C-J, Tsirka SE. 2002. Tissue plasminogen activator mediates microglial activation via its finger domain through annexin II. *J Neurosci Off J Soc Neurosci.* 22:3352–3358.
- Smart IHM, Dehay C, Giroud P, Berland M, Kennedy H. 2002. Unique morphological features of the proliferative zones and postmitotic compartments of the neural epithelium giving rise to striate and extrastriate cortex in the monkey. *Cereb Cortex.* 12:37–53.
- Telley L, Govindan S, Prados J, Stevant I, Nef S, Dermitzakis E, Dayer A, Jabaudon D. 2016. Sequential transcriptional waves direct the differentiation of newborn neurons in the mouse neocortex. *Science.* 351:1443–1446.
- Trotter JH, Lussier AL, Psilos KE, Mahoney HL, Sponaugle AE, Hoe H-S, Rebeck GW, Weeber EJ. 2014. Extracellular proteolysis of reelin by tissue plasminogen activator following synaptic potentiation. *Neuroscience.* 274:299–307.
- Tsirka SE, Bugge TH, Degen JL, Strickland S. 1997. Neuronal death in the central nervous system demonstrates a non-fibrin substrate for plasmin. *Proc Natl Acad Sci USA.* 94:9779–9781.

- Wang X, Lee S-R, Arai K, Lee S-R, Tsuji K, Rebeck GW, Lo EH. 2003. Lipoprotein receptor-mediated induction of matrix metalloproteinase by tissue plasminogen activator. *Nat Med.* 9:1313-1317.
- Wang YF, Tsirka SE, Strickland S, Stieg PE, Soriano SG, Lipton SA. 1998. Tissue plasminogen activator (tPA) increases neuronal damage after focal cerebral ischemia in wild-type and tPA-deficient mice. *Nat Med.* 4:228-231.
- Wu F, Echeverry R, Wu J, An J, Haile WB, Cooper DS, Catano M, Yepes M. 2013. Tissue-type plasminogen activator protects neurons from excitotoxin-induced cell death via activation of the ERK1/2-CREB-ATF3 signaling pathway. *Mol Cell Neurosci.* 52:9-19.
- Wu F, Wu J, Nicholson AD, Echeverry R, Haile WB, Catano M, An J, Lee AK, Duong D, Dammer EB, et al. 2012. Tissue-type plasminogen activator regulates the neuronal uptake of glucose in the ischemic brain. *J Neurosci Off J Soc Neurosci.* 32:9848-9858.
- Yaguchi M, Ohashi Y, Tsubota T, Sato A, Koyano KW, Wang N, Miyashita Y. 2013. Characterization of the properties of seven promoters in the motor cortex of rats and monkeys after lentiviral vector-mediated gene transfer. *Hum Gene Ther Methods.* 24:333-344.
- Zheng JQ, Poo M. 2007. Calcium signaling in neuronal motility. *Annu Rev Cell Dev Biol.* 23:375-404.

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

(in preparation)

Running title: MET and NMDA neuronal crosstalk

Élodie Hédou¹, Sara Douceau¹, Arnaud Chevilly¹, Alexandre Varangot¹, Hélène Party¹, Audrey Thiebaut¹, Eloise Lemarchand², Mehdi Boudjadja², Hortense Triniac¹, Isabelle Bardou¹, Carine Ali¹, Mike Maillason³, Tiziana Crepaldi⁴, Paolo Comoglio⁴, Veronique Agin¹, Benoit Roussel^{1*}, Denis Vivien^{1,5*}

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

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

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

⁴ Candiolo Cancer Institute IRCCS-FPO, Candiolo, Turin, Italy.

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

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

*: authors with equal contribution

Acknowledgments

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

ABSTRACT

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

Key words:

Autism spectrum disorders, tissue-type Plasminogen Activator, NMDA receptor, MET receptor

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

INTRODUCTION

Tissue-type plasminogen activator (tPA) is a widespread serine protease, expressed in the central nervous system (CNS)^{1,2}, and is currently used under its recombinant form in the treatment of thromboembolic diseases including stroke³. Its therapeutic activity relies on the activation of plasminogen into active plasmin⁴. tPA is synthesized and released as a single-chain form (sc-tPA) that is processed into a two-chain form (tc-tPA) within the circulation⁵, however, both forms display the same fibrinolytic activity⁶. Extending its functions above the conversion of plasminogen into plasmin, tPA interferes with a variety of neuronal receptors, including *N*-Methyl-D-Aspartate receptors (NMDARs)⁷. Interestingly, only the sc-tPA was reported to promote NMDARs signalling in experimental models^{8,9}. At the opposite, the tc-tPA was reported to decrease neuronal NMDARs signalling⁹.

Hepatocyte growth factor (HGF) and its receptor MET are present in the CNS¹⁰. Binding of HGF to MET results in tyrosine kinase activation¹¹. The structure of HGF shares 38% of sequence homology with plasminogen¹². The pro-HGF is converted to its active form by a plasmin-dependent extracellular proteolytic processing¹³. It has also been reported in vitro that both uPA and tPA, as well as factor XII, were able to activate pro-HGF^{14–16}. However, a controversy is present in the literature about the capacity of tPA to activate pro-HGF into its active form^{17,18}.

In cultured neuronal cells, HGF enhances neurite extension and branching, maturation of the dendritic spine and membrane translocation of NMDARs^{19,20}. HGF induces phosphorylation of the GluN2B subunit of NMDARs²⁰ and endorses neuronal survival²¹. Interestingly, HGF enhances NMDA currents and synaptic plasticity in the hippocampus, as well as synaptic long-term potentiation (LTP) in the CA1 region of the hippocampus in vitro^{22,23}. Accordingly, the HGF-MET axis contributes to the activity-dependent regulation of physiological learning and memory performance in the adult brain²⁴.

Numbers of neurological and psychiatric diseases are linked to malfunction of NMDARs during brain development and in adulthood²⁵. For instance, schizophrenia and autism spectrum disorders (ASD)^{26,27} are associated with either the presence of NMDARs auto-antibodies and/or missense variants of its regulatory GluN2B subunit^{28–31}. Mutations of other neuronal receptors have been reported to contribute to ASD, including MET^{32,33}.

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

protease tPA may contribute to autistic-like behaviours by an original mechanism involving a tc-tPA-dependent crosstalk between NMDARs and MET.

RESULTS

Downregulation of MET in tPA Null mice. tPA is known to interfere with a large number of signalling pathways, but translational investigations related to tPA effects are poor. Here, a new strain of tPA-deficient mice (tPA Null) has been used (see methods section). This strain was generated by targeting the exon-3 of the *Plat* (tPA) gene using a Cre-mediated deletion on a C57/BL6NTac background (supplementary 1) to avoid off-targeted mutations due to the 129-derived ES background previously described for the tPA-deficient mice used so far in the literature³⁷. Using this new model of tPA-deficient mice, whole RNA sequencing and KEGG pathway analysis were performed from several brain structures (hippocampus, amygdala, prefrontal cortex, parietal cortex and entorhinal cortex) of adult mutant mice (8-10 weeks) and their wild-type (WT) littermates (Fig. 1). 62 genes were differentially expressed in the hippocampus between tPA Null mice and WT mice (18 up-regulated and 44 down-regulated; Fig. 1a,f $n = 3$ tPA WT and tPA Null mice), 86 in the amygdala (39 up-regulated and 47 down-regulated; Fig. 1b,g, $n = 3$ tPA WT and tPA Null mice), 110 in the prefrontal cortex (31 up-regulated and 79 down-regulated; Fig. 1c,h $n = 3$ tPA WT and tPA Null mice), 154 in the parietal cortex (91 up-regulated and 63 down-regulated; Fig. 1d,i $n = 3$ tPA WT and tPA Null mice) and 185 in the entorhinal cortex (29 up-regulated and 156 down-regulated; Fig. 1e,j $n = 3$ tPA WT and tPA Null mice). Among these genes differentially expressed, one as retained our attention, MET, which was significantly down-regulated in both the amygdala (-31.71%, $P = 0.00065$) and the entorhinal cortex (-29.33%, $P = 0.0008$) (Fig. 1k), two structures reported to play key roles in psychiatric disorders^{38,39}.

tPA-deficient mice demonstrate autistic-like behaviours.

As MET is a candidate gene linked with ASD in human³², and because MET is deregulated in tPA null cerebral structures involved in ASD (Fig. 1), we sought to determine the ASD-like phenotype in these mice. ASD symptoms are a range of heterogeneous neurodevelopmental disorders but two-core affected domains are considered to be hallmarks of the disease⁴⁰: i) impaired social communication and interaction, ii) repetitive, restricted and stereotyped behaviours (RRSB). In addition, individuals with ASD present, in some cases, associated symptoms such as mental retardation and mood disorders. We thus first assessed social abilities of our tPA null mice through scoring separation-induced ultrasonic vocalizations (USV) in pups on postnatal days 2 to 12. WT mouse pups showed USV with a normal developmental course^{41,42}, emerging shortly after birth, peaking at around P8, and then decreasing at around

P10 (Fig. 2a; tPA WT: $P = 0.0091$). Interestingly, tPA Null pups emitted significantly fewer USV than tPA control pups along the tested postnatal period, especially between the postnatal days 2 and 6 (Fig. 2a; P2: -56 %, $P = 0.0482$, tPA WT: $n = 20$; tPA Null: $n = 20$; P6: -61.5%, $P = 0.015$, tPA WT: $n = 19$, tPA Null: $n = 20$). Moreover, mutant pups spent less time calling than their littermates control (Fig. 2b; P2: -64%, $P = 0.0215$, tPA WT: $n = 20$; tPA Null: $n = 20$; P4: -9%, $P = 0.0227$, tPA WT: $n = 20$, tPA Null: $n = 20$ and P6: -66%, $P = 0.0129$, tPA WT: $n = 19$, tPA Null: $n = 20$). These results show social disabilities in tPA Null mice, a recurrent feature of autistic-like phenotype (Fig. 2g). We then assessed RRSB in mice by scoring for the repetition of spontaneous behaviours using activity boxes. RRSB are considered as repetitive motor behaviours, apparently purposeless, with insistence on sameness⁴²⁻⁴⁴. We found a main effect of genotype on rearing behaviour, tPA Null mice displaying significantly higher number of vertical movements than control mice over the 30-minutes period of the test (Fig. 2c, at 10 minutes, +81.98 % $P = 0.0196$, at 30 minutes, +113.38%, $P = 0.0274$; tPA WT: $n = 12$; tPA Null: $n = 15$). This prolonged rearing behaviour evidences perseverative phenotype in mutant mice, an important RRSB symptom exhibited by patients with ASD (Fig. 2g). To investigate whether associated symptoms such as mental retardation were also affected in tPA-deficient mice, we next assessed learning performance in our model by using a T-maze which required the use of distal landmarks⁴⁵⁻⁴⁷. Mice were placed in the "start" arm of the apparatus and allowed to visit the two accessible arms (arm 1, arm 2) for 5 min. A mouse with good spatial abilities analyses in a strictly similar way the different spaces of the maze to build a representation of the environment. Control animals visited the two accessible arms equally (Fig. 2d and 2e; $P > 0.05$, $n = 10$), therefore indicating good acquisition performance. On the contrary, tPA Null mice visited more often in the arm 1 relative to arm 2 (Fig. 2d; +21.41%, $P = 0.0234$; tPA WT: $n = 10$; tPA Null: $n = 14$). In addition, they spent more time in the arm 1 than in the other arm (Fig. 2e; +144.14%, $P = 0.002$; tPA WT: $n = 10$; tPA Null: $n = 14$). In other words, using two measures of acquisition performance, we found that mutant animals showed impaired learning capabilities (Fig. 2g), similarly to some autistic individuals. Finally, we subjected the animals to the forced swimming test (FST) to determine whether tPA Null mice have deficits in emotional behaviours. FST is a useful behavioural assay validated for assessing depression-related behaviour of rodents^{48,49}. The FST revealed that mutant mice showed higher duration of immobility compared with WT mice (Fig. 2f; +27.46 %, $P = 0.0418$, tPA WT: $n = 13$; tPA Null: $n = 15$). These data imply that tPA Null mice show symptoms of depression (Fig. 2g), disorders also encountered in ASD. Overall, these behavioural tests demonstrate that tPA Null mice have social disabilities and RRSB, learning deficits and depressive disorders, all autistic-like features.

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

Because it was reported that the two forms of tPA, sc-tPA and tc-tPA may display differential neuronal functions^{8,9}, we have here tested these two forms on MET signalling. Although tc-tPA induced the phosphorylation of MET (+156% of phosphoMET/ β -actin, $P = 0.0476$; +171% of phospho/total, $P = 0.0022$; $n = 6$ from 6 independent treated cultures), sc-tPA slightly decreased it (-22% of phosphoMET/actin, $P = 0.0476$; -22% of phospho/total, $P = 0,0476$; $n = 6$ from 6 independent treated cultures) (Fig. 3a,c). Control experiments confirmed the activation of MET under HGF exposure (+217% of phosphoMET/ β -actin, $P = 0.0022$; +284% of phospho/total, $P = 0,0022$; $n = 6$ from 6 independent treated cultures) (Fig. 3a,c). Importantly, we reversed HGF-induced MET phosphorylation with the specific inhibitor of MET activation, JNJ-38877605, (-68.15% compared to HGF of phosphoMET/ β -actin, $P = 0.0495$, -69.02% compared to HGF of phospho/total, $P = 0.0495$; $n = 3$ from 3 independent experiments (Fig. 2d,f). To note, the expression of total MET did not vary with sc-, tc-tPA, and HGF treatments (98%, 88%, 90%, 104% of control for sc-tPA, tc-tPA, HGF, and HGF + JNJ respectively, ns = non-significant; $n = 6$ and $n = 3$ for HGF + JNJ) (Fig. 2b,e).

There is controversy in the literature about the conversion of pro-HGF into HGF by tPA¹⁸. Here we tested the abilities of the two forms of tPA (sc-tPA and tc-tPA) to induce the conversion of pro-HGF into HGF. As shown in batches (Fig. 4a), both forms of tPA are inefficient for activating the pro-HGF; while FXII, a positive control¹⁸ does (representative blots of 3 independent experiments). We then tested if tPA could directly bind to MET by using Surface Resonance Plasmonic (SPR) (Fig 4b). Increasing doses of sc-tPA, tc-tPA, and HGF were used on immobilized MET receptors. HGF bound to MET in a dose dependent manner with a $K_d = 2.5 \cdot 10^{-8}M$ as expected. There is no SPR signal with sc-tPA and tc-tPA. The data are inconsistent with the fact that they could trigger a biological activity through this receptor. Thus, up to now, we failed to identify exactly how tc-tPA can activate MET signalling.

MET and NMDA receptors form complexes at the neuronal surface. tPA has already been intensively described as interfering with NMDARs signalling^{8,50}. Interestingly, the two forms of tPA have opposite effects on NMDARs signalling: while sc-tPA promotes it by increasing calcium influx, tc-tPA decreases it⁹ (Fig. 8a). As only tc-tPA promotes MET signalling, we have investigated whether MET and NMDARs could form complexes. In order to demonstrate an interaction between the two receptors, we performed co-immunoprecipitation assays. The GluN1 subunit co-immunoprecipitated with MET receptor (Fig. 5a, representative blots of 3 independent experiments), confirming the presence of MET/NMDARs complexes under basal conditions. Then, we performed a proximity ligation assay (PLA) to determine whether MET/NMDARs complexes were present at the neuronal surface. PLA performed in cultured neurons showed a significant number of MET/NMDARs complexes (GluN1/MET) along

neurites (Fig. 5b, representative pictures of 5 independent neuronal cultures). There was virtually no PLA signal in the absence of either primary antibody or the PLA probe. Next, we investigated whether treatment with sc-tPA or tc-tPA influenced the formation of MET/NMDARs complexes. PLA showed that tc-tPA, when added to the culture medium, increased the number of MET/NMDARs complexes at the cell surface (+42%, $P = 0.0456$ when compared to control and +119% when compared to sc-tPA, $P < 0.0001$; $n = 29$ for tPA buffer, $n = 29$ for tc-tPA (300 nM) from 5 independent neuronal cultures). (Fig. 5b,c). On the contrary, sc-tPA significantly inhibited complex formation (-35%, $P = 0.0127$; $n = 29$ from 5 independent neuronal cultures) (Fig. 5b,c). Control experiments in the presence of HGF, also led to an increased formation of MET/NMDARs complexes (+138%, $P = 0.0086$ when compared to control, $n = 18$ for both HGF buffer and HGF from 5 independent neuronal cultures). (Fig. 5b,c).

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

and degradation of GluN2B-containing NMDARs, mediated by MET signalling. In order to validate this hypothesis, similar experiments were performed in the presence of the Lactacystin (5 μ M), an inhibitor of the proteasome (Fig. 7a). Our data reveal that tc-tPA led to a down-regulation of GluN2B-containing NMDARs (-30.95% of total GluN2B compared to control, $P = 0.0286$) (Fig. 7a), an effect reversed by the presence of the Lactacystin, incubated 2 hours before tc-tPA treatment. (Lactacystin and tc-tPA: +24.49% of total GluN2B compared to tc-tPA alone, $P < 0.0286$; $n = 4$ from 4 independent experiments (Fig. 7a). Parallel experiments using immunocytochemistry of surface versus total GluN2B, confirmed a tc-tPA dependent endocytosis and degradation of GluN2B-containing NMDARs. Experiments in permeabilized conditions with tc-tPA treatment decrease total GluN2B at 10 minutes (-77.39% compared to control, $P < 0.0001$) and at 30 minutes (-51.42% compared to control, $P = 0.0257$; $n = 11$ neurons for control, $n = 6$ neurons for tc-tPA at 10 minutes and $n = 12$ neurons for tc-tPA at 30 minutes, from 3 independent neuronal cultures) (Fig 7e) (Experiments in no permeabilized conditions with tc-tPA and the same experiments for sc-tPA are in progress; (Fig. 7a-g *in preparation for final manuscript*)).

tc-tPA-dependent MET signalling controls NMDA receptors-mediated calcium influx. As previously reported⁹, addition of tc-tPA to neuronal cultures media decreased the NMDA-induced calcium influx (-10.66%, $P < 0.001$; $n = 98$ from 3 independent neuronal cultures), while sc-tPA treatment was stimulatory (+27.29%, $P < 0.001$; $n = 77$ from 3 independent neuronal cultures) (Fig. 8a and 8c; corresponding mean Fig. 8b and 8d). Interestingly, the specific MET inhibitor, JNJ-38877605, reversed the inhibitory effect of tc-tPA (-10.66%, for tc-tPA alone versus +26.6% for tc-tPA + JNJ-38877605, $P < 0.001$; $n = 98$ from 3 independent neuronal cultures) (Fig. 8a and corresponding mean Fig. 8b). Similar results were obtained with another MET inhibitor, SU11274, which competes with the ATP binding site within the MET activation loop^{51,52} (-11.24% for tc-tPA alone versus +8.30% for tc-tPA + SU11274, $P < 0.0001$) (supplementary 2). Accordingly, addition of rHGF (Fig. 8c and corresponding mean Fig. 8d) or DO-24 (a monoclonal antibody agonist of MET⁵³) (supplementary 2) did not affect the action of tc-tPA, but reduced the stimulatory effect of sc-tPA on NMDARs signalling (+27.44% for sc-tPA alone versus +14.69% for sc-tPA + rHGF, $P < 0,001$; $n = 93$ for sc-tPA and $n = 89$ for sc-tPA and rHGF from 3 independent neuronal cultures; Fig. 8c and 8d; and +31.57% for sc-tPA alone versus +3.30% for sc-tPA + DO24, $P < 0,001$; $n = 86$ for sc-tPA and $n = 94$ for sc-tPA and DO-24 from 3 independent neuronal cultures; (supplementary 2). Altogether, these data demonstrate dual effects of tPA isoforms, with sc-tPA promoting NMDARs signalling while tc-tPA reduced it. Importantly, the effect of tc-tPA depends of MET and involves a downregulation of membrane GluN2B-containing NMDARs by a proteasomal degradation process. Similarly, rHGF prevented the potentiation of NMDA-mediated calcium

influx by sc-tPA and the MET agonist DO-24 antibody completely blocked the stimulatory effect of sc-tPA (Supplementary 2). The blockage of MET activation by JNJ-38877605 (Fig. 8a,b) or SU11274 (Supplementary 2a and 2b) did not affect the potentiating effect of sc-tPA. To reinforce this concept of a differential effect of tPA isoforms on NMDAR signalling, we decided to combine sc-tPA with increasing concentrations of tc-tPA and to evaluate the corresponding NMDA-induced neuronal calcium influx (Supplementary 3a and 3b). In agreement with our above data, tc-tPA counteracted the effect of sc-tPA on NMDAR signalling (-22.26% at 100nM of tc-tPA, -32.74% at 200nM of tc-tPA and -33.20% at 300nM of tc-tPA, $P < 0.0001$). We then investigated whether the tc-tPA dependent MET signalling also influenced the NMDAR-mediated neuronal death. As previously reported⁸, sc-tPA promotes NMDA-induced excitotoxicity (+20.86%, $P = 0.025$) and tc-tPA does not promote NMDA-induced excitotoxicity (-1.69%, ns) (Supplementary 4a). In agreement with the above data, inhibition of MET by the JNJ-38877605 (Supplementary 4b) and the SU11274 (Supplementary 4d), converted the slight but significant inhibitory effect of tc-tPA to pro-excitotoxic effects (+14.46% for tc-tPA + JNJ-38877605, $P = 0.0253$ ($n = 7$ from 7 independent experiments); +18.81% for tc-tPA + SU11274, $P = 0.0472$; $n = 5$ from 5 independent experiments). Thus, as expected, sc-tPA potentiated NMDA-induced excitotoxicity was also prevented by co-application of either rHGF (Supplementary 4a) (+20.86% for sc-tPA alone versus -3.73% for sc-tPA + rHGF, $P = 0.0374$; $n = 6$ from 6 independent experiments) or by the agonist MET antibody DO-24 (Supplementary 4c) (+25.31% for sc-tPA alone versus -0.73% for sc-tPA + DO-24, $P = 0.0472$; $n = 5$ from 5 independent experiments).

DISCUSSION

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

A number of studies demonstrated the physical interaction between NMDAR subunits and other receptors, including Dopamine D1 receptor (D1R)⁵⁴, VEGF receptor (VEGFR2)⁵⁵, and Ephrin-B2^{56,57}. These complexes are dynamically regulated by ligands, which mutually modify receptor functions^{58,59}. For example, uncoupling D1R/NMDAR complexes in the hippocampus impairs NMDARs-dependent LTP and working memory⁶⁰. Ligand-dependent activation of VEGFR2 induces a rapid redistribution of GluN2B at synaptic sites influencing the consolidation of emotional memory⁵⁵. In patients with encephalitis, anti-NMDARs antibodies alter the dynamic retention of synaptic receptors by reducing the interaction between the extracellular domains of the NMDARs and Ephrin-B2⁵⁶. Here, we provide evidence that tc-tPA leads to a connection between NMDARs and MET at the neuronal surface, and that the dynamic of these interactions plays a critical role in the control of NMDARs signalling and neuronal fate. These data are in agreement with recent reports supporting that genes encoding for NMDARs subunits are part of the interactome of MET, with roles in the modulation of synapses formation⁶¹, and also associated with neurodevelopmental disorders such as ASD^{62,63}. Accordingly, the NMDARs antagonist, DL-2-amino-5-phosphonopentanoic acid, was reported to interfere with the pro-survival effect of HGF on cultured neurons⁶⁴.

Like all the members of the plasminogen activator family, the secreted sc-tPA is processed into tc-tPA by plasmin or kallikrein^{65,66}. However, sc-tPA is an unusual zymogen that does not require proteolytic processing to be activated, but relies on the presence of an allosteric regulator, such as fibrin⁶. It has been reported that sc-tPA, but not tc-tPA, promotes NMDARs signalling and neurotoxicity in cortical neurons^{67,68}. Here, we provide a mechanistic explanation of this differential function of the two forms of tPA. We demonstrate that, although tc-tPA prompts the formation of proximal complexes between MET and NMDARs, sc-tPA promotes their disruption. Interestingly, we also demonstrated that tc-tPA enhances MET signalling, leading to an increased endocytosis and degradation of GluN2B-containing NMDARs and

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

Since MET has been discovered, many signalling pathways and assembling proteins have been identified downstream of the receptor. It is now well described that MET can directly binds⁶⁹, or indirectly through the protein Gab1⁷⁰, to Shp2: a non-receptor tyrosine phosphatase. Interestingly, mutations in Shp2 gene *PTPN11* are linked to cognitive impairment, such as memory deficit. A possible explanation of this, could be the important role of the regulation of Src-family kinases (SFKs) by Shp2⁷¹. Indeed, SFKs are crucial for controlling NMDARs-mediated synaptic transmission and plasticity⁷², thus learning and memory. In fact, disrupting the balance of Shp2 (gain or loss of function, such as in Noonan and Leopard syndromes) will affect memory and NMDARs signalling and functions⁷³. This is confirmed in Shp2 deficient mice, where the addition of a Src family kinase inhibitor reversed the phosphorylation of GluN2B, restored basal synaptic transmission, and rescued the contextual fear memory deficit of the deficient animals⁷⁴. Our results are in line with these findings, where activation of MET by tc-tPA leads to a downregulation of GluN2B-containing NMDARs signalling by targeting and degrading them. We also identified a cognitive impairment in our tPA deficient mice, associated to a reduction of MET expression in the amygdala and the entorhinal cortex. This is also in frame with data showing that SFKs are important triggers of the reduction of GluN2B-containing NMDARs surface expression and synaptic plasticity in the brain.

tPA is known to mediate signalling through a set of receptors and/or binding proteins including the Low Density Lipoprotein Related Receptors (LRPs), annexin-II, Epidermal Growth Factor Receptor (EGFR) and NMDARs, among others⁷⁵. Although there is a consensus about the capacity of tPA to modulate NMDAR signalling and functions, some opposite results are reported in the literature^{50,76}. When it interacts with the GluN2A subunit, tPA activates either the Akt/mTOR/p70S6K/HIF1 α signalling pathway, leading to neuroprotection and to an increase of glucose uptake⁷⁷ or the Erk1/2/CREB/ATF3 signalling pathway to decrease excitotoxicity⁷⁸. tPA was also reported to interact⁷⁹ and possibly cleave the GluN2B subunit of NMDAR leading to change its pharmacological properties. GluN2B-dependent effects were associated with influence of tPA on acute stress⁸⁰ and on seizures induced by alcohol withdrawal⁷⁹. The sc-tPA was reported to interact with the GluN1 subunit of NMDARs either directly⁵⁰ or through LRP1⁸¹ to promote NMDARs signalling and excitotoxicity. Our present study may reconcile all these data. Indeed, we evidence here that sc-tPA and tc-tPA differentially influence NMDARs signalling, with the sc-tPA leading, as previously reported⁶⁷, to a broad activation of NMDARs, due to its ability to bind the common GluN1 subunit⁵⁰, and the tc-tPA leading to a specific down-regulation of GluN2B-containing NMDARs, a mechanism dependent of MET activation.

MET is a susceptibility gene for ASD⁸². Accordingly, genetically altered mice with a kinase-inactive MET display autistic like behaviours associated with profound deficits in neural development, synaptic transmission, and plasticity^{83,84}. Interestingly, variants of *GRIN2B* gene encoding the GluN2B subunit of the NMDARs have been also reported in neurodevelopmental disorders, including language, motor and learning deficits, and in autistic patients^{31,85}. Although clinical phenotypes have shown *GRIN2A* variants (GluN2A) associated with an epileptic phenotype, *GRIN2B* variants were more often associated with neurodevelopmental disorders^{86,87}. ASDs are also associated with mutations of neurobeachin (NBEA), a protein involved with KIF21B in local recycling of GluN2B-containing NMDARs⁸⁸. To determine the possible role of tPA in ASD, we investigated the functional consequences of the tPA deletion by using a behavioral screening system based on a battery of tests believed to reflect autistic-like behaviors in rodents⁴³. We first show reductions of USV in the mutant pup mice. Similar social defects have been reported in other ASD models⁸⁹. USV are important markers of mother-pup social interaction and communication in response, for example, to maternal separation, as well as indicators of early neurobehavioural development^{90,91}. Our results thus demonstrate deep early deficits in social relations when tPA is lacking, indicating a major autistic-like feature in tPA Null mice. We then examined the possible presence in these mice of another major diagnostic symptom of autism, namely the repetitive motor behaviors⁴⁰. The tPA Null mice exhibited exacerbated rearing behavior relative to their WT littermates. The frequency of rearing is an indicator of spontaneous motor activity and arousal state, which normally decreases in the course of the environmental familiarization^{92,93}. The phenotype exhibited by our mutant mice that abnormally over-explored the environment indicates perseverative behavior, a hallmark diagnostic symptom of ASD. Mutant mice also recapitulate two other associated symptoms of ASD, learning disabilities and depressive-like behavior. Indeed, tPA Null mice showed acquisition impairment of the characteristics of the selective spaces of the maze, indicating a failure in the built of spatial representation of the environment by processing of remote spatial cues. Such cognitive dysfunction has previously been found with other learning tasks in ASD models^{94,95}. Deletion of tPA also induced behavioural despair in the forced swimming test. This behavior, classically conceptualized as a depressive-like behavior in mice⁹⁶, is in line with reports of depression in some autistic individuals⁹⁷. In sum, our behavioural analysis demonstrate an autistic-like phenotype in tPA Null mice characterized by aberrant social communication, expression of repetitive behaviors and associated symptoms such as learning defects and depressive-like behavior. Not only observed symptoms are multiple and in addition, they include mandatory core criteria diagnostic like in humans, providing face validity of the tPA Null mouse model.

The expression of tPA has been described in many regions of the brain parenchyma, including the amygdala^{80,98,99}, with tPA involved in mechanisms controlling anxiety-like behaviour^{80,100}.

When present in the entorhinal cortex, tPA is known to control spatial learning, especially when landmarks are distal versus proximal⁴⁶. In this study, we reveal in mice lacking tPA decreased levels of MET, specifically in these two brain areas.

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

MATERIAL AND METHODS

Ethical statement

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

Chemicals

(5*R*,10*S*)-(-)-5-Methyl-10,11-dihydro-5*H*-dibenzo[*a,d*]cyclohepten-5,10-iminemaleate (MK-801; 0924) and *N*-methyl-*D*-aspartate (NMDA; 0114) were purchased from Tocris (Pittsburgh, USA). Human tPA (Actilyse®) was from Boehringer Ingelheim (Paris, France). tPA buffer was 34.84 mg/mL arginine, 10.72 mg/mL phosphoric acid, 0.1 mg/mL Tween 80. Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM), poly-*D*-lysine, glutamine, cytosine β-*D*-arabinoside (Ara-C), glycine, foetal bovine serum, horse serum, sodium chloride (NaCl), HEPES, potassium chloride (KCl), calcium chloride (CaCl₂), magnesium sulfate (MgSO₄), sodium phosphate monobasic (NaH₂PO₄), *D*-glucose, sodium dodecyl sulfate (SDS), trizma base, trizma hydrochloride, paraformaldehyde, sucrose, bovine serum albumin (BSA), Triton X-100, anti-rabbit (A0545) peroxidase antibody, protease inhibitor cocktail (P8340), phosphatase inhibitor cocktail (P5726) and Lactacystin (CAS1258004) were from Sigma-Aldrich (Saint-Quentin Fallavier, France). Phosphate-buffered saline solution (PBS; 14190-094), Pierce BCA Protein Assay Kit (23225) ECL-Plus detection system (32132) and lipofectamine® 2000 reagent was purchased from Thermo Fisher Scientific (Illkirch-Graffenstaden, France). Lactate dehydrogenase (LDH) detection kit (11644793001) were purchased from Roche Diagnostics (Meylan, France). Series S CM5 sensor chips and HBS-EP buffer (10mM buffer with 2.7mM KCl, 150mM NaCl, 5mM EDTA and 0.05% surfactant P20, pH 7.4), Amine Coupling Kit [1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl) carbodiimide hydrochloride (EDC) and *N*-hydroxysuccinimide (NHS); 1.0M ethanolamine (pH 8.5)], immobilization buffer (Maleate Buffer pH 6.5),

regeneration solutions (Ethanolamine 1M pH 8.5, for analysis) were purchased from GE Healthcare Life Science (Uppsala, Sweden).

RNA-sequencing

RNA-sequencing and analysis have been performed by the company Helixio (Saint-Beauzire, France). Three RNA-seq libraries per population (three biological replicates) were prepared using the TruSeq Stranded mRNA sample Prep kit (Illumina, San Diego, CA, USA) and sequenced on an Illumina GAllx sequencer as 75 bp paired reads by Hybrigenics-Helixio (Clermont-Ferrand, France). Samples were quantified with Qubit 2.0 Fluorometer (Thermo Fischer) and checked with Nanodrop ND-1000 (Thermo Fisher). Libraries were prepared with three kits: NEBNext Ultra II Directional Library prep Kit (New England Biolabs, Ipswich, MA, USA), NEBNext Poly(A) mRNA Isolation Module (New England Biolabs) and NEBNext Multiplex Oligos (New England Biolabs). Sequencing was done with NextSeq 500 (Illumina). Data were processed with Bcl2fastq (Illumina). Raw data were checked with FastQC (Babraham Institute, Cambridge, UK). Reads were mapped on reference genome (GRCm38, release 91) with TopHat (<https://ccb.jhu.edu/software/tophat>) and differential expression analysis is done with Cuffdiff (Cufflinks suite, <https://github.com/cole-trapnell-lab/cufflinks>). Tests have been performed between supplied conditions. FPKM values were calculated for each transcript in each sample (geometric library normalization, pooled dispersion method). Analyses uses the reference annotation GTF file (GRCm38, release 91) and quantitates the expression values and differential regulation across BAM files. CummeRbund (<https://bioconductor.org/packages/release/bioc/html/cummeRbund.html>) R package is designed to process global statistics and quality control.

Preparation of sc-and tc-tPA

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

Neuronal cell cultures

Culture of cortical neurons were prepared from foetal mice (embryonic day 14) as previously described^{101,102}. Cortices were dissected and mechanically dissociated in DMEM, seeded on 24 well plates or on dishes previously coated with poly-D-lysine (0.1mg/mL; Sigma-Aldrich P6407) and laminin (0.02mg/mL; Life Technologies 23017-015). Cells were cultured in DMEM (Sigma-Aldrich D5671) supplemented with 5% foetal bovine serum (Sigma-Aldrich F9665), 5% horse serum (Sigma-Aldrich H1138) and 2 mM glutamine (Sigma-Aldrich G3156). Cultures were maintained at 37 °C in a humidified 5% CO₂ atmosphere. Cytosine β-D-arabinoside (10 μmol/l; Sigma-Aldrich C1768) was added after 3 day in vitro (DIV) to inhibit glial proliferation. Treatments were performed after 12–13 DIV for NMDA-mediated neurotoxicity assays, calcium imaging experiments, immunoblottings.

Astrocytes cultures

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

Hypodense neuronal cultures

Primary cultures of cortical neurons were prepared from fetal mice (embryonic day 14) as previously describe^{101,102}. Cortices were dissected and dissociated in DMEM and plated (250 000 cell/ mL) on glass bottom microwell dishes (MatTek Corporation, P35G-1.5-14-C, Ashland, MA, USA) earlier coated with poly-D-lysine (0.1mg/ml) and laminin (0.02mg/ml). Cells were cultured in Neurobasal Medium supplemented with 0.4 mM of glutamine, 2% B27 supplement 50X, 10% horse serum and penicillin/streptomycin (10 000 IU/ml; 10 000 UG/ml). After 1 hour, media were replaced by conditioned medium (Neurobasal Medium supplemented with 0.4 glutamine, 2% B27 supplement 50X and penicillin/streptomycin (10 000 IU/ml; 10 000 UG/ml) obtained from primary cultures of astrocytes. Cultures were maintained at 37 °C in a humidified 5% CO₂ atmosphere. Cytosine β-D-arabinoside (10 μmol/l; Sigma-Aldrich C1768)

was added after 3 DIV. Cultures have been used for neuronal transfection and immunocytochemistry.

Proximity ligation assay

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

Crossed immunoprecipitation assays

Supernatants from TNT buffer (50 mM Tris-HCl, pH 7.4, 150 mM NaCl and 0.5% Triton X-100)-lysed cultured cortical neurons (13 DIV) (100 µg of total proteins) were incubated overnight at 4 °C with an antibody (raised against the GluN1 subunit of NMDAR (1µg, Santa-cruz Biotechnology, Dallas, USA, sc-1467). This antibody was coupled to protein G-sepharose beads as described by the manufacturer (GE Healthcare, Buc, France) for immunoprecipitation procedures, including repeated washes in TNT buffer. Then, immunoprecipitated proteins were separated by 10% SDS-PAGE and immunoblots were revealed with either an antibody raised

against total GluN1 (Santa-Cruz Biotechnology, sc-1467, diluted 1:1000) or an antibody raised against total MET (R&D systems, Noyal Châtillon sur Seiche, France, AF527, diluted 1: 1000) by following the procedure described above (see « Immunoblotting » section).

Calcium video microscopy

Experiments were performed at room temperature on the stage of an inverted calcium microscope (Leica DMI6000B, Nanterre, France) equipped with a 150 W Xenon high stability lamp and a Leica 40 \times , 1.3 numerical aperture epifluorescence oil immersion objective. Fura-2 ratio images were acquired with a Digital CMOS camera (ORCA-Flash2.8 C11440-10C, Hamamatsu, Japan) and digitized (2048*2048) using Metafluor® 6.1 software (Universal Imaging Corporation). Cultures were transferred into a serum-free HEPES-buffered saline solution (HBBSS: NaCl 116mM, KCl 5,4mM, CaCl₂ 1,8mM, MgSO₄ 0,8mM, HEPES 12mM, NaH₂PO₄ 0,34mM, D-Glucose 5,5mM, NaHCO₃ 25mM, Glycine 10 μ M) at DIV 12 and loaded with Fura-2-AM (10 μ M; Invitrogen, Life Technologies F1201, Saint Aubin, France) diluted in pluronic acid (Life Technologies P-3000MP) for 45 min at 37°C. The Ca²⁺ bound form of Fura-2 gets excited at 340nm, the Ca²⁺ unbound form at 380nm and both recorded at 510nm. Neurons were washed with HBBSS flux and NMDA stimulations (2 X 25 μ M for 30s) were applied using a peristaltic pump. Prior a second run of NMDA stimulations, neurons were incubated for 45 min with either sc-tPA (300nM), tc-tPA (300nM), recombinant HGF (50ng/mL; rHGF; Gibco, Life Technologies PHG0254, Saint Aubin, France), DO-24 antibody (50ng/mL; agonist of MET)¹⁰³, JNJ-38877605 (500nM; antagonist of MET)¹⁰⁴ or SU11274 (2 μ M; inhibitor of MET activation; Selleckchem S1080, Houston, TX, USA)⁵¹ or Glunomab® (antagonist of the action of tPA on the GluN1 subunit of NMDAR)^{59,105} alone or in combination, as mentioned in the legend of the corresponding figures. For each cell, the area under curve (AUC) corresponding to the intracellular calcium influx induced by NMDA (ratio 340/380) was calculated before (AUCb) (mean of the two first NMDA stimulations) and after treatment (AUCa) (mean of the two second post-treatment stimulations). We then compared, for each cell, the amount of NMDA-induced calcium influx after treatment with the NMDA-induced calcium influx recorded before treatment. Thus, each cell is its own control with an expression of the modification of the NMDA-induced calcium influx due to the treatment or their excipient performed between the two rounds of stimulations, expressed as a percentage of response to treatments (% of responsiveness). % of responsiveness= [(AUC)a/(AUC)b]*100 with (AUC)a : sum of area under curve of Fura-2 ratio during both NMDA stimulations after treatment and (AUC)b : sum of area under curve of Fura-2 ratio during NMDA stimulations before treatment.

Surface plasmon resonance.

SPR experiments were performed on a Biacore T200 (GE Healthcare) at 25°C. HBS-EP buffer was filtered through a 0.45µm membrane filter and degassed prior to use. First, recombinant Human HGF R / MET Fc chimera were immobilized on the chip surface by amine coupling. Briefly, recombinant MET receptor was diluted to 20µg/mL in 5mM Maleate solution at pH 6.2. The diluted MET protein was soon covalently immobilized to a flow cell of CM5 sensor chip via primary amine group, using standard Amine Coupling Kit. HGF, sc-tpA, tc-tpA were then analyzed in a “Single Cycle kinetics” (SCK) models over the MET immobilized chip. The affinity (KD) and kinetics parameters (ka and kd) of HGF, sc-tpA and tc-tpA over MET were determined by using series of proteins dilutions in a “Single Cycle Kinetics” (SCK) model. HGF, sc-tpA and tc-tpA, as the analytes, were diluted in HBS-EP buffer with concentrations ranging from 0.6nM to 50nM for HGF and from 25nm to 2000nM for sc-tpA and tc-tpA, which flowed over the immobilized MET and the obtained response units (RUs) were recorded. The flow rate was at 30µL/min with 120s for binding and 600s for dissociation. Then, the sensor chip surface was regenerated with Ethanolamine 1M, pH 8.5 for 30s. The dissociation equilibrium constant, KD, and kinetics parameters, kd and ka, were determined by direct curve fitting of the sensorgrams to a Langmuir 1:1 model of interaction.

Neuronal transfection

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

Immunocytochemistry

Hypodense neuron cultures (13 DIV) were used to visualize neural extensions. Cultures treated with tc-tPA (300nM) for 10 or 30 min and washed with HBBSS. Neurons were fixed in paraformaldehyde 4% for 20min at room temperature, washed in PBS (0.1M) followed by a 1 hour blockage in PBS supplemented either with BSA 4% and 0.3% Triton X100 for the permeability conditions or either with BSA 4% for the surface experiments. A rabbit anti-GluN2B N-term antibody (Alomone Labs, AGC-003, diluted 1:500) was incubated overnight at 4°C. Neurons were subsequently rinsed 3 times with PBS (0.1M) and were incubated 1 hour at room temperature with an Alexa-Fluor 488-conjugated anti-rabbit secondary antibody (Jackson Immunoresearch, West Grove, PA, USA, 1:800). The specificity of the immunoreactions was tested using a negative control procedure, i.e. the omission of primary or secondary antibodies. Immunocytochemistry were examined with a Leica TCS SP8 confocal

/STED microscope 3x microscope with an oil-immersion 100x, 1.44-N.A objective and further processed using ImageJ software (NIH; Bethesda, MD, USA). The number of punctua per 100µm on dendrites was calculated with the plugin "Trackmate".

Immunoblotting.

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

Generation of transgenic mice

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

Behavioural assays

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

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

Actimetry. Rearing activity was quantified by using a rack of eight activity cages equipped with vertical infrared beams located across the cage (Imetronic®). Mice were placed in individual acrylic chambers (30 x 20 x 20 cm) for 30 min. The number of vertical movements was determined by breaks in movement-sensitive photo-beams that were then converted into locomotor activity counts. The frequency of rearing is an indicator of motor repetitive behaviours¹⁰⁷.

T-maze. To assess learning performance, we used a T-maze which required the use of distal landmarks to orientate properly⁴⁵⁻⁴⁷. The standard T-maze used in this study was constructed of white plastic with three identical arms (31 x 8 x 15 cm; BMP Chaudronnerie, Bretteville-sur-

Odon, France). Extra-maze distal cues were suspended on the black curtains of the room walls at a distance of 123 cm from the maze (from the top of the cues to the center of the maze). The behavioral procedure consisted of an acquisition phase during which one randomly-chosen arm of the T-maze was closed with a guillotine door. Each mouse was then placed in the start arm, the head facing away from the center of the maze, and allowed to freely visit the accessible parts of the maze (Arm 1/Arm 2) for 5 min. Spatial performance was assessed through the comparison of the number of visits made in each arm (considered only when the mouse passed two-thirds of the arm). It has been shown that control mice examine the two arms equivalently, therefore indicating the built of a spatial representation of the environment by processing of remote spatial cues.

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

Statistics

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

SUPPLEMENTARY

PCR GENOTYPING

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

Excitotoxic neuronal death.

Neurons (12-13 DIV) were rinsed three times with serum-free medium (DMEM) supplemented with glycine (20 µM), excitotoxicity was induced by exposure to NMDA (10 µM) in serum-free DMEM supplemented with 20 µM of glycine for twenty-four hours (Roussel et al., 2011). NMDA was applied alone or in the presence of either sc-tPA (300nM), tc-tPA (300nM), recombinant HGF (50ng/mL; rHGF), anti-HGF blocking (50ng/mL; sc-1356)¹⁰⁹, DO-24 antibody (50ng/mL; agonist of MET)¹⁰³, JNJ-38877605 (500nM; antagonists of MET)¹⁰⁴ or SU11274 (2µM; inhibitor of MET activation)⁵¹ alone or in combination, as mentioned in the legend of the corresponding figures. Twenty-four hours later, neuronal death was quantified by measurement of lactate dehydrogenase (LDH) released from damaged cells¹¹⁰.

REFERENCES

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

20. Akita, H. *et al.* Hepatocyte growth factor improves synaptic localization of the NMDA receptor and intracellular signaling after excitotoxic injury in cultured hippocampal neurons. *Experimental neurology* **210**, 83–94 (2008).
21. Ishihara, N. *et al.* Inhibition of apoptosis-inducing factor translocation is involved in protective effects of hepatocyte growth factor against excitotoxic cell death in cultured hippocampal neurons. *Journal of neurochemistry* **95**, 1277–1286 (2005).
22. Akimoto, M. *et al.* Hepatocyte growth factor as an enhancer of nmda currents and synaptic plasticity in the hippocampus. *Neuroscience* **128**, 155–162 (2004).
23. Qiu, S. *et al.* GluA1 phosphorylation contributes to postsynaptic amplification of neuropathic pain in the insular cortex. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* **34**, 13505–13515 (2014).
24. Kato, T. *et al.* Hepatocyte growth factor overexpression in the nervous system enhances learning and memory performance in mice. *Journal of neuroscience research* **90**, 1743–1755 (2012).
25. Uzunova, G., Hollander, E. & Shepherd, J. The role of ionotropic glutamate receptors in childhood neurodevelopmental disorders: autism spectrum disorders and fragile x syndrome. *Curr Neuropharmacol* **12**, 71–98 (2014).
26. Zhang, Y., Li, P., Feng, J. & Wu, M. Dysfunction of NMDA receptors in Alzheimer's disease. *Neurol Sci* **37**, 1039–1047 (2016).
27. Lee, E.-J., Choi, S. Y. & Kim, E. NMDA receptor dysfunction in autism spectrum disorders. *Current Opinion in Pharmacology* **20**, 8–13 (2015).
28. Tarabeux, J. *et al.* Rare mutations in N-methyl-D-aspartate glutamate receptors in autism spectrum disorders and schizophrenia. *Translational Psychiatry* **1**, e55–e55 (2011).
29. Creten, C. *et al.* Late onset autism and anti-NMDA-receptor encephalitis. *Lancet* **378**, 98 (2011).
30. Pollak, T. A., McCormack, R., Peakman, M., Nicholson, T. R. & David, A. S. Prevalence of anti-N-methyl-D-aspartate (NMDA) receptor [corrected] antibodies in patients with schizophrenia and related psychoses: a systematic review and meta-analysis. *Psychol Med* **44**, 2475–2487 (2014).
31. Sceniak, M. P. *et al.* An autism-associated mutation in GluN2B prevents NMDA receptor trafficking and interferes with dendrite growth. *J. Cell. Sci.* **132**, (2019).
32. Campbell, D. B. *et al.* A genetic variant that disrupts MET transcription is associated with autism. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **103**, 16834–16839 (2006).
33. Campbell, D. B. *et al.* Disruption of cerebral cortex MET signaling in autism spectrum disorder. *Annals of neurology* **62**, 243–250 (2007).
34. Yaniv, D., Vouimba, R. M., Diamond, D. M. & Richter-Levin, G. Simultaneous induction of long-term potentiation in the hippocampus and the amygdala by entorhinal cortex activation: mechanistic and temporal profiles. *Neuroscience* **120**, 1125–1135 (2003).
35. LeDoux, J. E. Emotion circuits in the brain. *Annu. Rev. Neurosci.* **23**, 155–184 (2000).
36. Martens-Mantai, T., Speckmann, E.-J. & Gorji, A. Propagation of cortical spreading depression into the hippocampus: The role of the entorhinal cortex. *Synapse* **68**, 574–584 (2014).
37. Szabo, R., Samson, A. L., Lawrence, D. A., Medcalf, R. L. & Bugge, T. H. Passenger mutations and aberrant gene expression in congenic tissue plasminogen activator-deficient mouse strains. *Journal of Thrombosis and Haemostasis* **14**, 1618–1628 (2016).

38. Lebow, M. A. & Chen, A. Overshadowed by the amygdala: the bed nucleus of the stria terminalis emerges as key to psychiatric disorders. *Molecular Psychiatry* **21**, 450–463 (2016).
39. Hamazaki, K., Hamazaki, T. & Inadera, H. Abnormalities in the fatty acid composition of the postmortem entorhinal cortex of patients with schizophrenia, bipolar disorder, and major depressive disorder. *Psychiatry Research* **210**, 346–350 (2013).
40. American Psychiatric Association. *Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders*. (American Psychiatric Association, 2013). doi:10.1176/appi.books.9780890425596.
41. Scattoni, M. L., Crawley, J. & Ricceri, L. Ultrasonic vocalizations: a tool for behavioural phenotyping of mouse models of neurodevelopmental disorders. *Neurosci Biobehav Rev* **33**, 508–515 (2009).
42. Pasciuto, E. *et al.* Autism Spectrum Disorders: Translating human deficits into mouse behavior. *Neurobiol Learn Mem* **124**, 71–87 (2015).
43. Crawley, J. N. Mouse behavioral assays relevant to the symptoms of autism. *Brain Pathol.* **17**, 448–459 (2007).
44. Cuccaro, M. L. *et al.* Behavioral comparisons in autistic individuals from multiplex and singleton families. *J Autism Dev Disord* **33**, 87–91 (2003).
45. Dellu, F., Contarino, A., Simon, H., Koob, G. F. & Gold, L. H. Genetic differences in response to novelty and spatial memory using a two-trial recognition task in mice. *Neurobiol Learn Mem* **73**, 31–48 (2000).
46. Hébert, M. *et al.* Distant Space Processing is Controlled by tPA-dependent NMDA Receptor Signaling in the Entorhinal Cortex. *Cereb. Cortex* **27**, 4783–4796 (2017).
47. Party, H. *et al.* Plasminogen Activator Inhibitor-1 (PAI-1) deficiency predisposes to depression and resistance to treatments. *Acta Neuropathol Commun* **7**, 153 (2019).
48. Castagné, V., Moser, P., Roux, S. & Porsolt, R. D. Rodent Models of Depression: Forced Swim and Tail Suspension Behavioral Despair Tests in Rats and Mice. *Current Protocols in Pharmacology* **49**, 5.8.1-5.8.14 (2010).
49. Porsolt, R. D., Bertin, A. & Jalfre, M. Behavioral despair in mice: a primary screening test for antidepressants. *Arch Int Pharmacodyn Ther* **229**, 327–336 (1977).
50. Nicole, O. *et al.* The proteolytic activity of tissue-plasminogen activator enhances NMDA receptor-mediated signaling. *Nat. Med.* **7**, 59–64 (2001).
51. Sattler, M. *et al.* A Novel Small Molecule Met Inhibitor Induces Apoptosis in Cells Transformed by the Oncogenic TPR-MET Tyrosine Kinase. *Cancer research* **63**, 5462–5469 (2003).
52. Wang, X. *et al.* Potent and selective inhibitors of the Met [hepatocyte growth factor/scatter factor (HGF/SF) receptor] tyrosine kinase block HGF/SF-induced tumor cell growth and invasion. *Molecular cancer therapeutics* **2**, 1085–1092 (2003).
53. Prat, M., Crepaldi, T., Pennacchietti, S., Bussolino, F. & Comoglio, P. M. Agonistic monoclonal antibodies against the Met receptor dissect the biological responses to HGF. *Journal of Cell Science* **111**, 237–247 (1998).
54. Cahill, E. *et al.* D1R/GluN1 complexes in the striatum integrate dopamine and glutamate signalling to control synaptic plasticity and cocaine-induced responses. *Molecular psychiatry* **19**, 1295–1304 (2014).
55. De Rossi, P. *et al.* A critical role for VEGF and VEGFR2 in NMDA receptor synaptic function and fear-related behavior. *Molecular psychiatry* (2016) doi:10.1038/mp.2015.195.
56. Mikasova, L. *et al.* Disrupted surface cross-talk between NMDA and Ephrin-B2 receptors in anti-NMDA encephalitis. *Brain : a journal of neurology* **135**, 1606–16521 (2012).

57. Planagumà, J. *et al.* Ephrin-B2 prevents N-methyl-D-aspartate receptor antibody effects on memory and neuroplasticity. *Annals of neurology* (2016) doi:10.1002/ana.24721.
58. Zhu, S., Stroebel, D., Yao, C. A., Taly, A. & Paoletti, P. Allosteric signaling and dynamics of the clamshell-like NMDA receptor GluN1 N-terminal domain. *Nature structural and molecular biology* **20**, 477–485 (2013).
59. Lesept, F. *et al.* Tissue-type plasminogen activator controls neuronal death by raising surface dynamics of extrasynaptic NMDA receptors. *Cell death and disease* (2016) doi:10.1038/cddis.2016.279.
60. Nai, Q. *et al.* Uncoupling the D1-N-Methyl-D-Aspartate (NMDA) Receptor Complex Promotes NMDA-Dependent Long-Term Potentiation and Working Memory. *Biological psychiatry* **67**, 246–254 (2010).
61. Qiu, S., Lu, Z. & Levitt, P. MET Receptor Tyrosine Kinase Controls Dendritic Complexity, Spine Morphogenesis, and Glutamatergic Synapse Maturation in the Hippocampus. *Journal of Neuroscience* **34**, (2014).
62. Xie, Z. *et al.* Receptor Tyrosine Kinase MET Interactome and Neurodevelopmental Disorder Partners at the Developing Synapse. *Biological psychiatry* **80**, 933–942 (2016).
63. Xie, Z., Eagleson, K. L., Wu, H.-H. & Levitt, P. Hepatocyte Growth Factor Modulates MET Receptor Tyrosine Kinase and β -Catenin Functional Interactions to Enhance Synapse Formation. *eneuro* **3**, e0074 (2016).
64. Tyndall, S. J., Patel, S. J. & Walikonis, R. S. Hepatocyte growth factor-induced enhancement of dendritic branching is blocked by inhibitors of N-methyl-D-aspartate receptors and calcium/calmodulin-dependent kinases. *Journal of neuroscience research* **85**, 2343–2351 (2007).
65. Wallén, P., Bergsdorf, N. & Rånby, M. Purification and identification of two structural variants of porcine tissue plasminogen activator by affinity adsorption on fibrin. *Biochimica et biophysica acta* **719**, 318–28 (1982).
66. Ichinose, A., Kisiel, W. & Fujikawa, K. Proteolytic activation of tissue plasminogen activator by plasma and tissue enzymes. *FEBS letters* **175**, 412–418 (1984).
67. Parcq, J. *et al.* Unveiling an exceptional zymogen: the single-chain form of tPA is a selective activator of NMDA receptor- dependent signaling and neurotoxicity. *Cell death and differentiation* **19**, 1983–1991 (2012).
68. Bertrand, T. *et al.* Conformations of tissue plasminogen activator (tPA) orchestrate neuronal survival by a crosstalk between EGFR and NMDAR. *Cell death and disease* **6**, e1924 (2015).
69. Koch, A., Mancini, A., El Bounkari, O. & Tamura, T. The SH2-domain-containing inositol 5-phosphatase (SHIP)-2 binds to c-Met directly via tyrosine residue 1356 and involves hepatocyte growth factor (HGF)-induced lamellipodium formation, cell scattering and cell spreading. *Oncogene* **24**, 3436–3447 (2005).
70. Schaeper, U. *et al.* Coupling of Gab1 to c-Met, Grb2, and Shp2 mediates biological responses. *J. Cell Biol.* **149**, 1419–1432 (2000).
71. Zhang, S. Q. *et al.* Shp2 regulates SRC family kinase activity and Ras/Erk activation by controlling Csk recruitment. *Mol. Cell* **13**, 341–355 (2004).
72. Lu, Y. M., Roder, J. C., Davidow, J. & Salter, M. W. Src activation in the induction of long-term potentiation in CA1 hippocampal neurons. *Science* **279**, 1363–1367 (1998).
73. Cesarini, L. *et al.* Cognitive profile of disorders associated with dysregulation of the RAS/MAPK signaling cascade. *Am. J. Med. Genet. A* **149A**, 140–146 (2009).

74. Yan, X. *et al.* Increased Src Family Kinase Activity Disrupts Excitatory Synaptic Transmission and Impairs Remote Fear Memory in Forebrain Shp2-Deficient Mice. *Mol. Neurobiol.* **54**, 7235–7250 (2017).
75. Thiebaut, A. M. *et al.* The role of plasminogen activators in stroke treatment: fibrinolysis and beyond. *Lancet Neurol* **17**, 1121–1132 (2018).
76. Matys, T. & Strickland, S. Tissue plasminogen activator and NMDA receptor cleavage. *Nat. Med.* **9**, 371–372; author reply 372–373 (2003).
77. Wu, F. *et al.* Tissue-type plasminogen activator regulates the neuronal uptake of glucose in the ischemic brain. *J. Neurosci.* **32**, 9848–9858 (2012).
78. Wu, F. *et al.* Tissue-type plasminogen activator protects neurons from excitotoxin-induced cell death via activation of the ERK1/2-CREB-ATF3 signaling pathway. *Mol. Cell. Neurosci.* **52**, 9–19 (2013).
79. Pawlak, R., Melchor, J. P., Matys, T., Skrzypiec, A. E. & Strickland, S. Ethanol-withdrawal seizures are controlled by tissue plasminogen activator via modulation of NR2B-containing NMDA receptors. *PNAS* **102**, 443–448 (2005).
80. Pawlak, R., Magarinos, A. M., Melchor, J., McEwen, B. & Strickland, S. Tissue plasminogen activator in the amygdala is critical for stress-induced anxiety-like behavior. *Nat. Neurosci.* **6**, 168–174 (2003).
81. Samson, A. L. *et al.* Tissue-type plasminogen activator requires a co-receptor to enhance NMDA receptor function. *J. Neurochem.* **107**, 1091–1101 (2008).
82. Campbell, D. B. *et al.* A genetic variant that disrupts MET transcription is associated with autism. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **103**, 16834–16839 (2006).
83. Tang, S. *et al.* Altered Forebrain Functional Connectivity and Neurotransmission in a Kinase-Inactive Met Mouse Model of Autism. *Mol Imaging* **18**, 1536012118821034 (2019).
84. Ma, X. & Qiu, S. Control of cortical synapse development and plasticity by MET receptor tyrosine kinase, a genetic risk factor for autism. *Journal of Neuroscience Research* **n/a**, (2019).
85. Hu, C., Chen, W., Myers, S. J., Yuan, H. & Traynelis, S. F. Human GRIN2B variants in neurodevelopmental disorders. *Journal of Pharmacological Sciences* **132**, 115–121 (2016).
86. Liu, S. *et al.* A Rare Variant Identified Within the GluN2B C-Terminus in a Patient with Autism Affects NMDA Receptor Surface Expression and Spine Density. *J. Neurosci.* **37**, 4093–4102 (2017).
87. Myers, S. J. *et al.* Distinct roles of GRIN2A and GRIN2B variants in neurological conditions. *F1000Res* **8**, (2019).
88. Gromova, K. V. *et al.* Neurobeachin and the Kinesin KIF21B Are Critical for Endocytic Recycling of NMDA Receptors and Regulate Social Behavior. *Cell Rep* **23**, 2705–2717 (2018).
89. Wöhr, M., Roulet, F. I. & Crawley, J. N. Reduced Scent Marking and Ultrasonic Vocalizations in the BTBR T+tf/J Mouse Model of Autism. *Genes Brain Behav* **10**, 35–43 (2011).
90. Ricceri, L., Moles, A. & Crawley, J. Behavioral phenotyping of mouse models of neurodevelopmental disorders: relevant social behavior patterns across the life span. *Behav. Brain Res.* **176**, 40–52 (2007).
91. Branchi, I., Santucci, D., Vitale, A. & Alleva, E. Ultrasonic vocalizations by infant laboratory mice: a preliminary spectrographic characterization under different conditions. *Dev Psychobiol* **33**, 249–256 (1998).
92. Scattoni, M. L. *et al.* Progressive behavioural changes in the spatial open-field in the quinolinic acid rat model of Huntington's disease. *Behav. Brain Res.* **152**, 375–383 (2004).

93. Thiel, C. M., Müller, C. P., Huston, J. P. & Schwarting, R. K. High versus low reactivity to a novel environment: behavioural, pharmacological and neurochemical assessments. *Neuroscience* **93**, 243–251 (1999).
94. Rutter, M. Cognitive deficits in the pathogenesis of autism. *Child Psychology & Psychiatry & Allied Disciplines* **24**, 513–531 (1983).
95. Velikonja, T., Fett, A.-K. & Velthorst, E. Patterns of Nonsocial and Social Cognitive Functioning in Adults With Autism Spectrum Disorder: A Systematic Review and Meta-analysis. *JAMA Psychiatry* **76**, 135–151 (2019).
96. Yankelevitch-Yahav, R., Franko, M., Huly, A. & Doron, R. The forced swim test as a model of depressive-like behavior. *J Vis Exp* (2015) doi:10.3791/52587.
97. Gegelashvili, M. AUTISM AND DEPRESSION (REVIEW). *Georgian Med News* 54–56 (2019).
98. Pawlak, R. *et al.* Rapid, specific and active site-catalyzed effect of tissue-plasminogen activator on hippocampus-dependent learning in mice. *Neuroscience* **113**, 995–1001 (2002).
99. Teesalu, T. *et al.* Tissue plasminogen activator and neuroserpin are widely expressed in the human central nervous system. *Thromb. Haemost.* **92**, 358–368 (2004).
100. Bennur, S. *et al.* Stress-induced spine loss in the medial amygdala is mediated by tissue-plasminogen activator. *Neuroscience* **144**, 8–16 (2007).
101. Rose, K., Goldberg, M. & Choi, D. Cytotoxicity in murine neocortical cell culture. in *In vitro biological methods. Methods in Toxicology* **1**, 46 – 60 (1993).
102. Baron, A. *et al.* NR2D-containing NMDA receptors mediate tissue plasminogen activator-promoted neuronal excitotoxicity. *Cell death and differentiation* **17**, 860–871 (2010).
103. Prat, M., Crepaldi, T., Pennacchietti, S., Bussolino, F. & Comoglio, P. M. Agonistic monoclonal antibodies against the Met receptor dissect the biological responses to HGF. *Journal of cell science* **111**, 237–247 (1998).
104. Perera, T. *et al.* JNJ-38877605: a selective Met kinase inhibitor inducing regression of Met-driven tumor models. *Cancer research* **68**, (2008).
105. Macrez, R. *et al.* Neuroendothelial NMDA receptors as therapeutic targets in experimental autoimmune encephalomyelitis. *Brain : a journal of neurology* **139**, 2406–2419 (2016).
106. Pasquet, N. *et al.* Tissue-Type Plasminogen Activator Controlled Corticogenesis Through a Mechanism Dependent of NMDA Receptors Expressed on Radial Glial Cells. *Cereb. Cortex* **29**, 2482–2498 (2019).
107. McCarson, K. E., Winter, M. K., Abrahamson, D. R., Berman, N. E. & Smith, P. G. Assessing complex movement behaviors in rodent models of neurological disorders. *Neurobiology of Learning and Memory* **165**, 106817 (2019).
108. Mineur, Y. S., Belzung, C. & Crusio, W. E. Effects of unpredictable chronic mild stress on anxiety and depression-like behavior in mice. *Behavioural Brain Research* **175**, 43–50 (2006).
109. Trapp, T. *et al.* Hepatocyte growth factor/c-MET axis-mediated tropism of cord blood-derived unrestricted somatic stem cells for neuronal injury. *The journal of biological chemistry* **283**, 32244–32253 (2008).
110. Koh, J. Y. & Choi, D. W. Quantitative determination of glutamate mediated cortical neuronal injury in cell culture by lactate dehydrogenase efflux assay. *Journal of neuroscience methods* **20**, 83–90 (1987).

FIGURES LEGENDS

Figure 1. RNA sequencing analysis demonstrates downregulation of MET gene from tPA Null. (a-e), Volcano plot of \log_2 fold change versus significance ($-\log_{10}(\text{q-value})$) for a pairwise comparison of transcripts between tPA WT and tPA Null mice within 5 cerebral structures. **a**, hippocampus with 18 genes up-regulated and 44 genes down-regulated. **b**, amygdala with 39 genes up-regulated and 47 genes down-regulated. **c**, prefrontal cortex with 31 genes up-regulated and 79 genes down-regulated. **d**, parietal cortex with 91 genes up-regulated and 63 genes down-regulated, **e**, entorhinal cortex with 29 genes up-regulated and 156 genes down-regulated. Heatmaps representing RNA sequencing gene expression which are up and down-regulated by using a z-score scale in **f** hippocampus, **g** amygdala, **h** prefrontal cortex, **i** parietal cortex, **j** entorhinal cortex. **k**, Representation of z score of MET gene in 5 cerebral structures shows a significant downregulation of MET gene in amygdala and entorhinal cortex in tPA Null mice. RNA-sequencing experiments originate from 3 tPA WT animals and 3 tPA Null. Analysis and statistical analysis were performed by Helixio. Data are represented as mean \pm SEM; * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ indicate significantly different between tPA WT and tPA Null.

Figure 2. tPA Null mice demonstrate autistic-like behaviors. **a**, Evaluation of the behavioral phenotype of tPA knockout mice (tPA Null) and of their wild-type littermates (tPA WT). (**a, b**), Ultrasonic vocalization recordings: $n_{\text{tPA WT}} = 19$; $n_{\text{tPA Null}} = 20$. **c**, Actimetry: $n_{\text{tPA WT}} = 12$; $n_{\text{tPA Null}} = 15$. (**d, e**), T-maze: $n_{\text{tPA WT}} = 10$; $n_{\text{tPA Null}} = 14$. **f**, Forced swimming test: $n_{\text{tPA WT}} = 13$; $n_{\text{tPA Null}} = 15$. **g**, Summary of autistic-like features in tPA Null mice. Friedman test (**a**), Mann-Whitney U-tests (**a-c**), Wilcoxon signed-rank tests (**d-e**), Unpaired t-test (**f**). Data are represented as mean \pm SEM, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, ## $P < 0.01$.

Figure 3. The tc-tPA activates MET receptors. (**a, b, c**), Representative and quantification of western blot from primary cultures of cortical neurons (12-13 DIV) were subjected to 1 hour either sc-tPA or tc-tPA (300nM) or HGF (50ng/ml) prior immunoblotting with antibodies directing against phospho-MET Y1234 and total MET. **a**, Quantification of corresponding ratio of phospho-MET on actin. **b**, Quantification of corresponding ratio of total MET on actin. (**c**), Quantification of corresponding ratio of phospho-MET on total MET. (**d,e,f**) Representative and quantification of western blot from primary cultures of cortical neurons (12-13 DIV) were subjected to 1 hour either HGF (50ng/ml) alone or either with JNJ-38877605 (500nM) prior immunoblotting with antibodies raised against phospho-MET Y1234 and total MET. **d**,

Quantification of corresponding ratio of phospho-MET on actin. **(e)** Quantification of corresponding ratio of total MET on actin. **(f)**, Quantification of corresponding ratio of phospho-MET on total MET. Data are represented as mean \pm SEM $n = 6$ (**a, b, c**) and $n = 3$ (**d,e,f**), * $P < 0.05$; **, $P < 0.01$ indicate significantly different from the corresponding control by Mann-Whitney test, # $P < 0.05$; ## $P < 0.01$ indicate significantly different between treatments with Mann-Whitney test.

Figure 4. The tc-tPA activates MET receptors independently of Hepatocyte Growth Factor (HGF) conversion. **a**, tc-tPA does not convert Pro-HGF in mature HGF. Pro-HGF (150 nM) was incubated at 37°C for 4 h without proteases (lane 1) or with 5,2 nM FXIIa (internal control), 150nM tc-tPA and 150nM sc-tPA. Immunodetection of α HGF after incubation. Representative images of three independent experiments are presented. **b**, Resonance surface plasmon does not reveal of interaction of sc-tPA and tc-tPA on MET receptor. Five increasing doses (20nM, 60nM, 200nM, 600nM, 2 μ M) of sc-tPA and tc-tPA have been applied on fixed MET receptor and no SPR signal have been detected. HBS is the buffer used for the immobilization of MET receptor. Recombinant HGF has been used as control (0,5nM, 1,5nM, 5nM, 15nM, 50nM) showing an increase of SPR signal with an affinity (Kd) of $2,5 \times 10^{-8}$ M.

Figure 5. NMDAR and MET form complexes at the neuronal surface modulating by sc-tPA, tc-tPA and HGF. **a**, Immunoprecipitations with GluN1 antibody revealed by western blot against either MET or GluN1 antibodies on primary cultures of cortical neurones (representative blot of three independent experiments). **b**, Representative confocal microscopy images of PLA staining on primary cultures of cortical neurons treated tPA buffer, HGF buffer, sc-tPA (300nM), tc-tPA (300nM) and recombinant HGF (50ng/ml) for 45min. Magenta fluorescent profiles represent regions of PLA signal amplifications denoting MET and NMDAR proximity. **c**, Quantitative analysis of MET/NMDAR PLA signals. $N = 18$ concerning conditions HGF buffer and HGF $N = 18$ and for tPA buffer, sc-tPA (300nM), tc-tPA (300nM) $N = 29$ from five independent cultures. (Data are represented as mean \pm SEM; * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ and **** $P < 0.0001$ indicate significantly different from the corresponding control by Kruskal-Wallis and Mann-Whitney tests).

Figure 6. The tc-tPA (300nM) induces a decrease on GluN2B phosphorylation (Y1474) and total GluN2B involving MET receptor. **a**, Representative western blot **b**, and analysis mean density of the band for pGluN2A (Y1325) and pGluN2B (Y1474) on cultures of cortical neurons incubated with sc-tPA (300nM) on time-dependent (10-30-60 minutes; $n = 5$ independent experiments). No significant difference with sc-tPA. **c**, Analysis mean density of the band for total GluN2A, total GluN2B and total GluN1 ($n = 5$ independent experiments for

GluN2B and GluN1, $n = 3$ for GluN2A). No significant difference with sc-tPA. **d**, Representative western blot. **e**, Analysis mean density of the band for pGluN2A (Y1325) and pGluN2B (Y1474) on cultures of cortical neurons incubated with tc-tPA (300nM) on time-dependent (10-30-60 minutes; $n = 4$ independent experiments for GluN2B (Y1474) and $n = 7$ for pGluN2A (Y1325) at 10-30minutes and $n = 4$ at 60minutes. The analysis reveals that tc-tPA induces a decrease of pGluN2B (Y1474) at 10-30 and 60 minutes. **f**, Analysis mean density of the band for total GluN2A, total GluN2B and total GluN1 ($n = 4$ independent experiments for GluN2B and GluN1, $n = 7$ for GluN2A at 10-30minutes and $n = 4$ at 60minutes). tc-tPA significantly decreases total GluN2B at 10-30 and 60 minutes and total GluN1 at 10 minutes. **g**, Representative western blot (**h,i**), and analysis mean density of the band for pGluN2B (Y1474) **h**, and total GluN2B **i**, after treatment on cortical neurons with tc-tPA (300nM) for 10 min alone or in combination with JNJ-38877605 (500nM). JNJ-38877605 significantly reverses the level of pGluN2B (Y1474) but not the level of total GluN2B ($n = 4$ independent experiments for pGluN2B (Y1474) and total GluN2B. All data are represented as mean \pm SEM, * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$ indicate significantly different from the corresponding control by Mann-Whitney test. # $P < 0.05$ indicate significantly different between treatments by Mann-Whitney test. ns = non-significant.

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

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

Figure 8. Inhibition or activation of the HGF-MET axis controls the tPA-dependent NMDA receptor-mediated neuronal calcium influx. Calcium video imaging performed on primary cultures of cortical neurons (13 DIV). After control NMDA stimulations (25 mM) used as

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

Supplementary

Supplementary 1: Genetic validation of tPA Null mice.

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

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

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

****, indicates significantly different from the corresponding control by Kruskal-Wallis and Mann-Whitney tests ($P < 0.0001$).

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

Supplementary 4: The blockage or the MET activation affects the potentiation of NMDA-mediated neuronal death. Neuronal death was assessed on primary cultured cortical neurons (12-14 DIV) by measuring LDH release in the bathing media after 24 hours exposure to NMDA (10 μ M), sc-tPA (300nM) and tc-tPA (300nM) alone or combined with **a**, rHGF (50ng/mL; $n = 6$, mean \pm SEM) or **b**, JNJ-38877605 (500nM; $n = 7$, mean \pm SEM), **c**, DO-24 (50ng/mL; $n = 5$, mean \pm SEM), **d**, SU11274 (2 μ M; $n = 5$, mean \pm SEM). *, indicates significantly different from the corresponding control by Kruskal-Wallis and Mann-Whitney tests ($P < 0.05$).

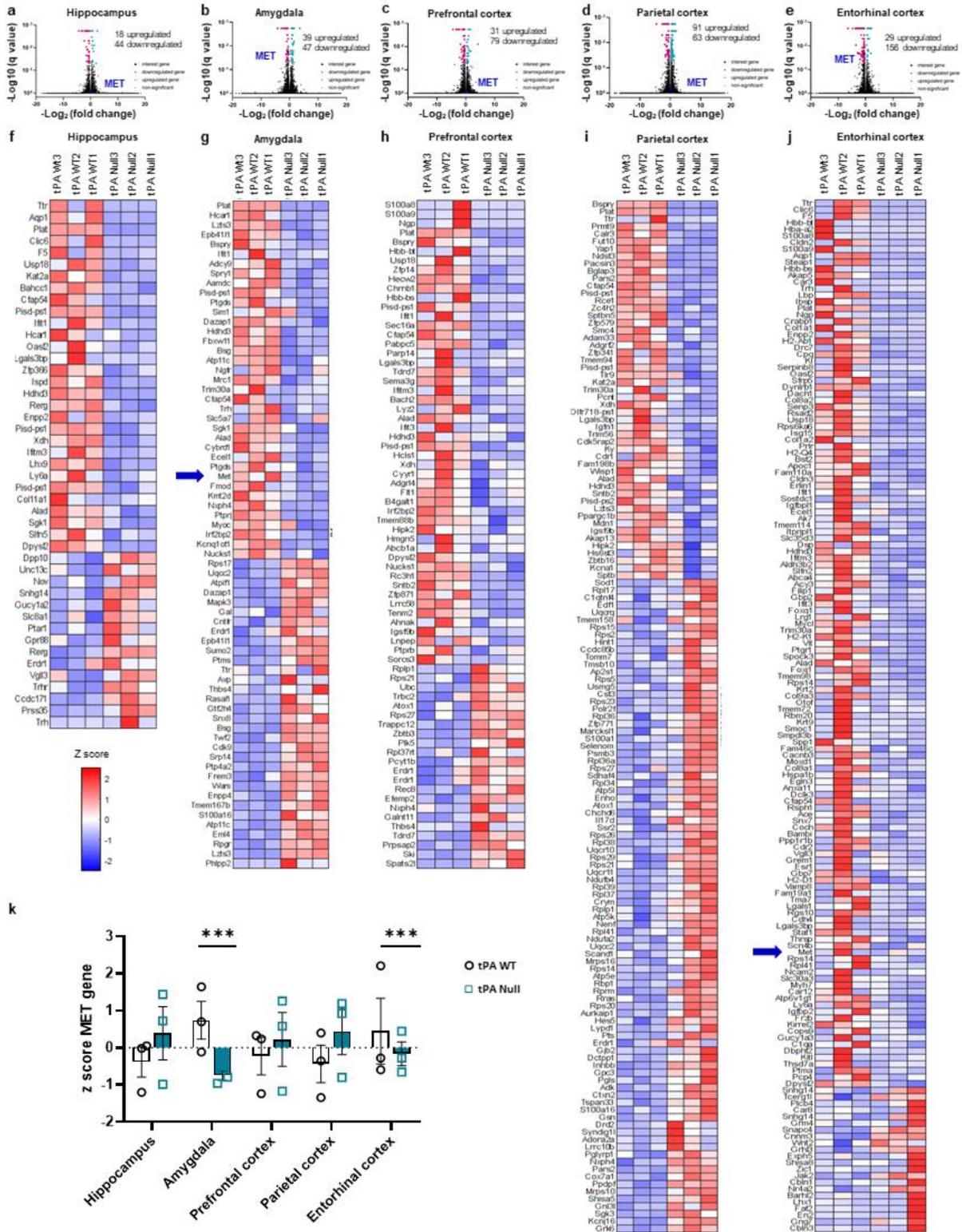


Figure 2

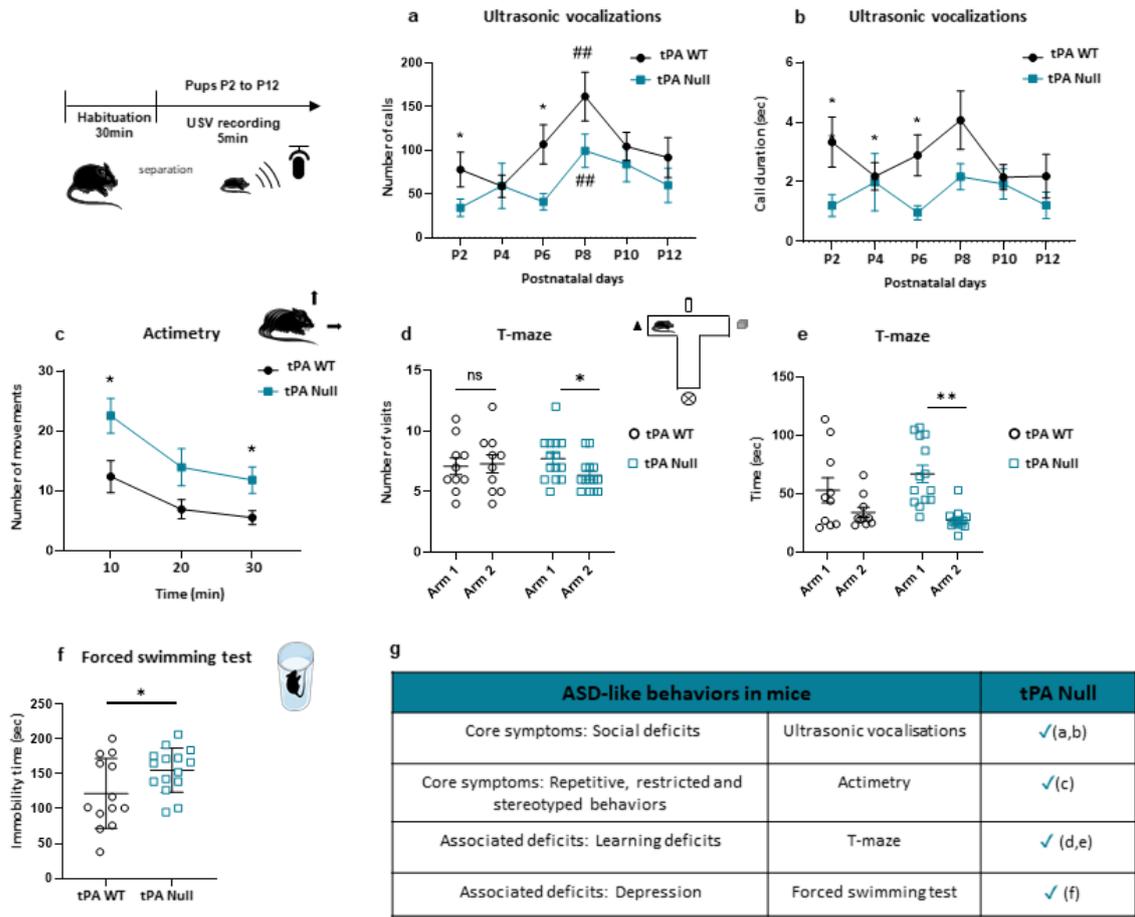


Figure 3

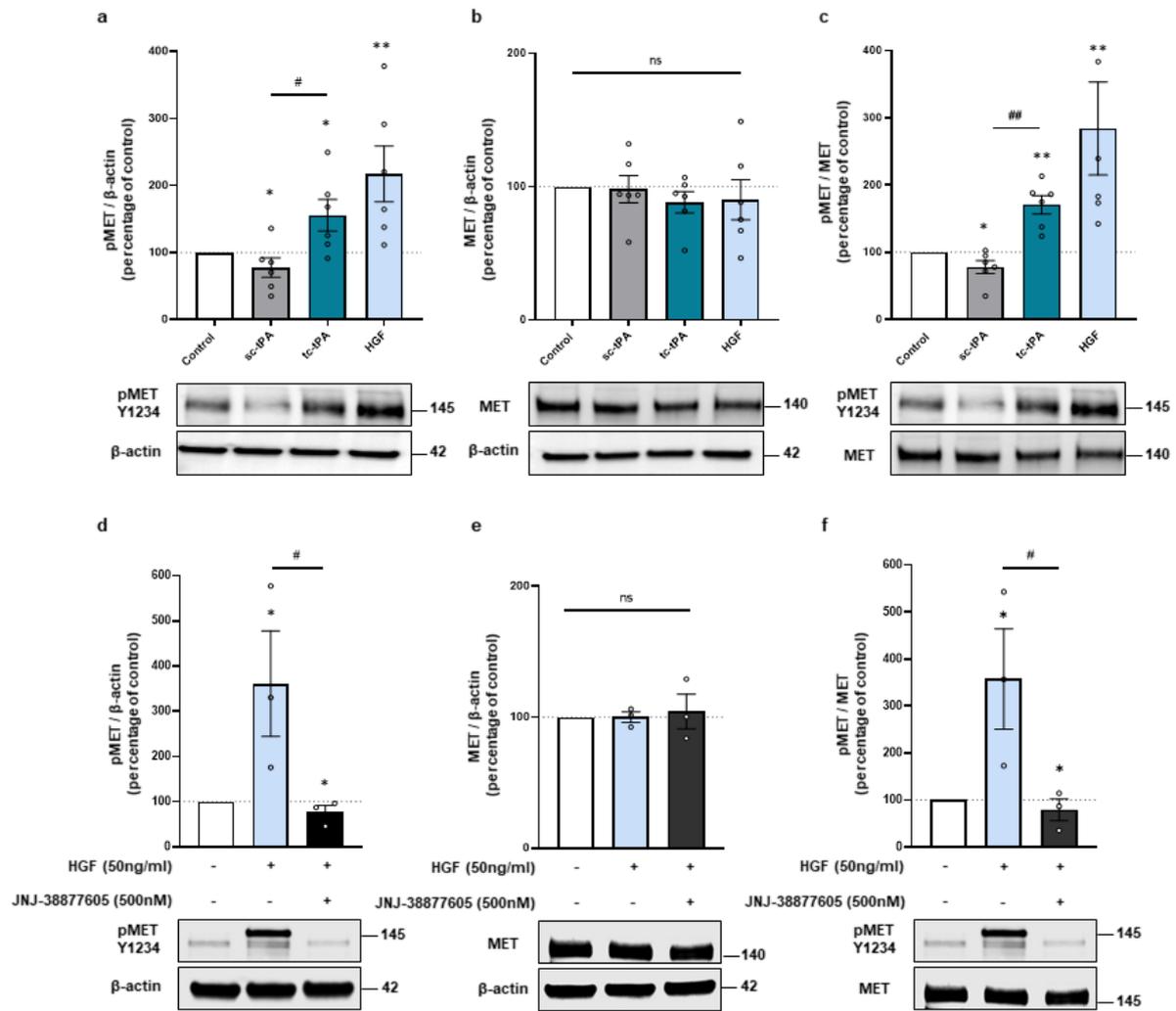


Figure 4

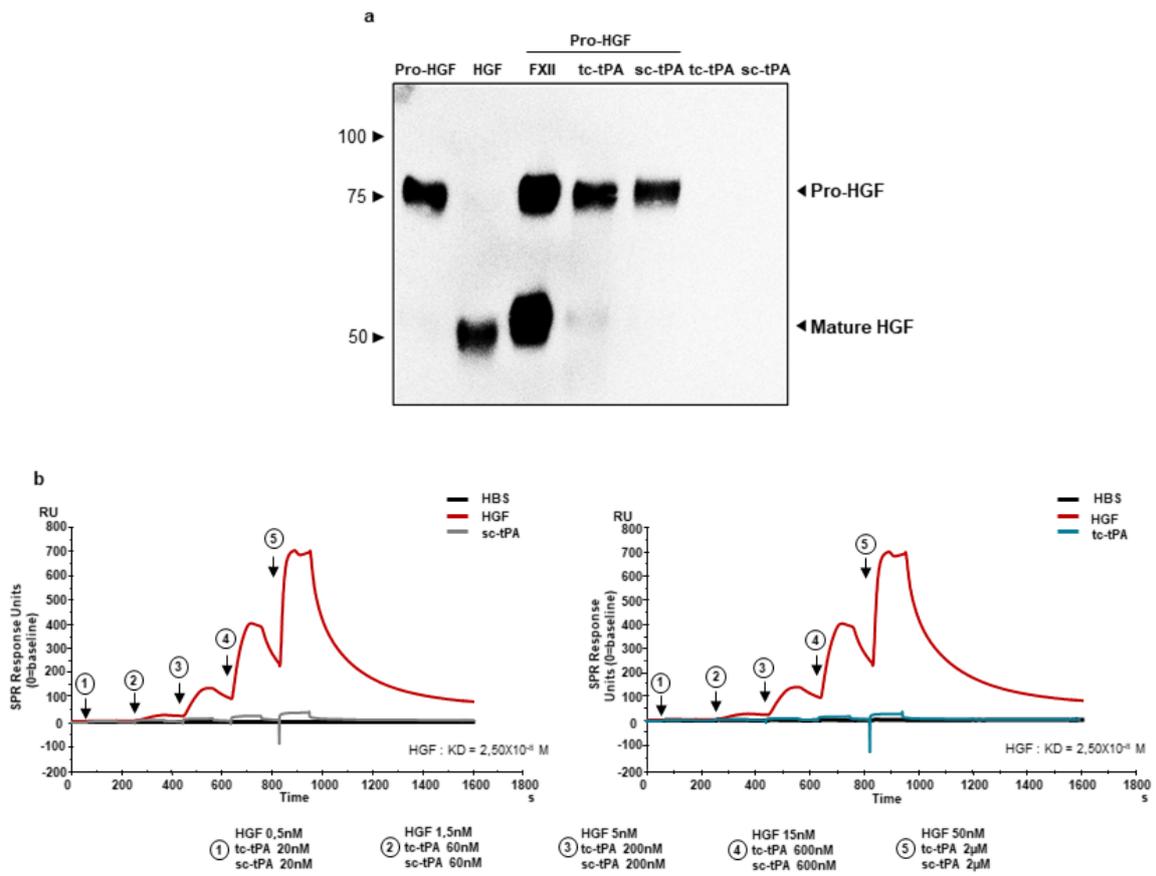


Figure 5

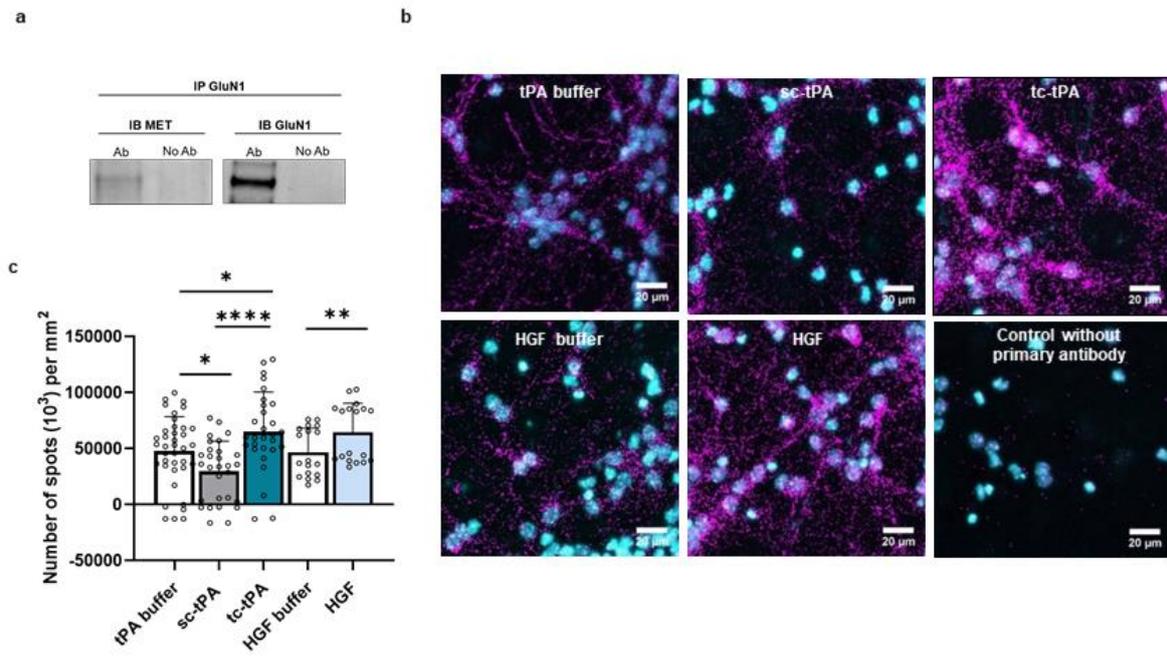


Figure 6

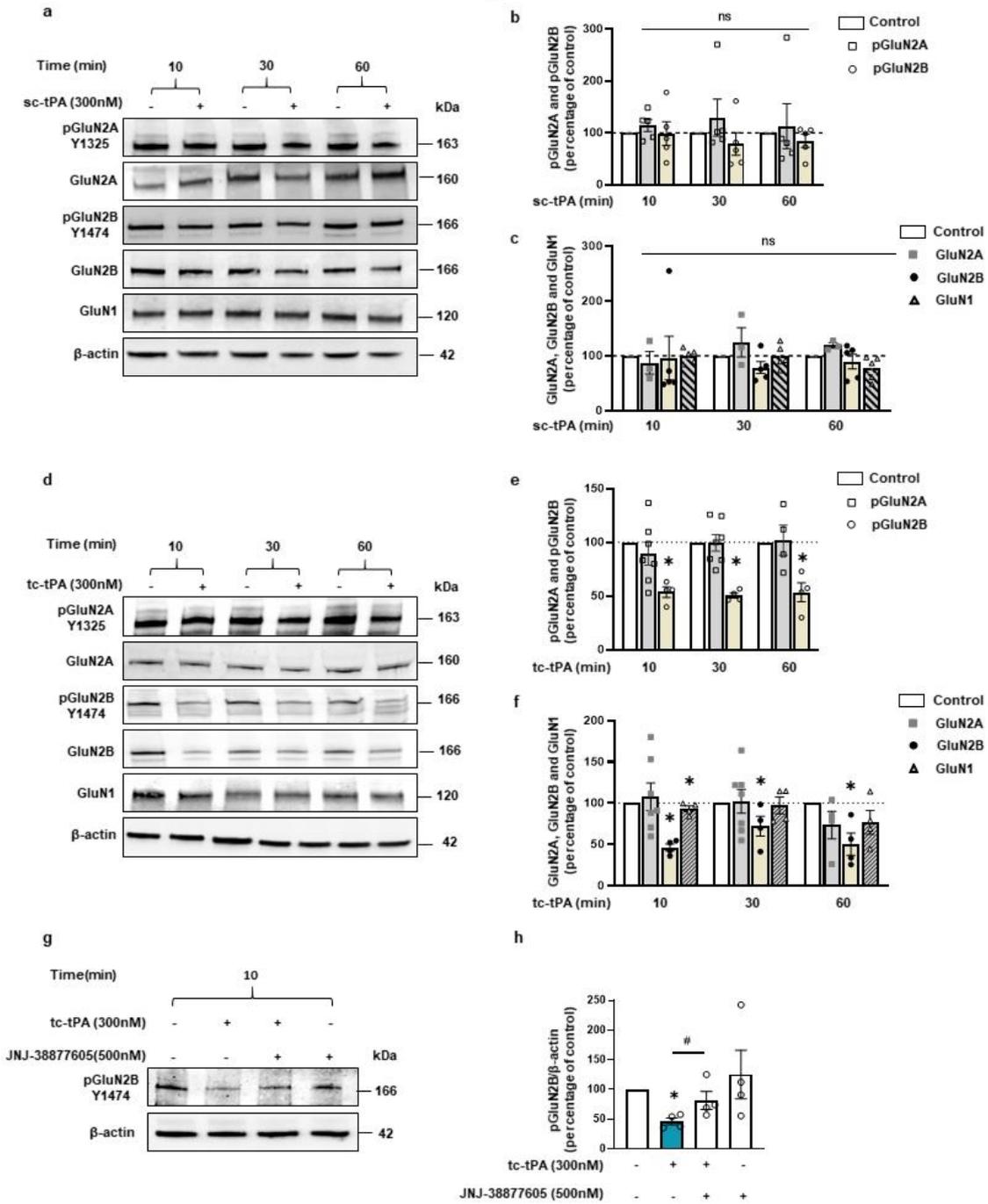


Figure 7

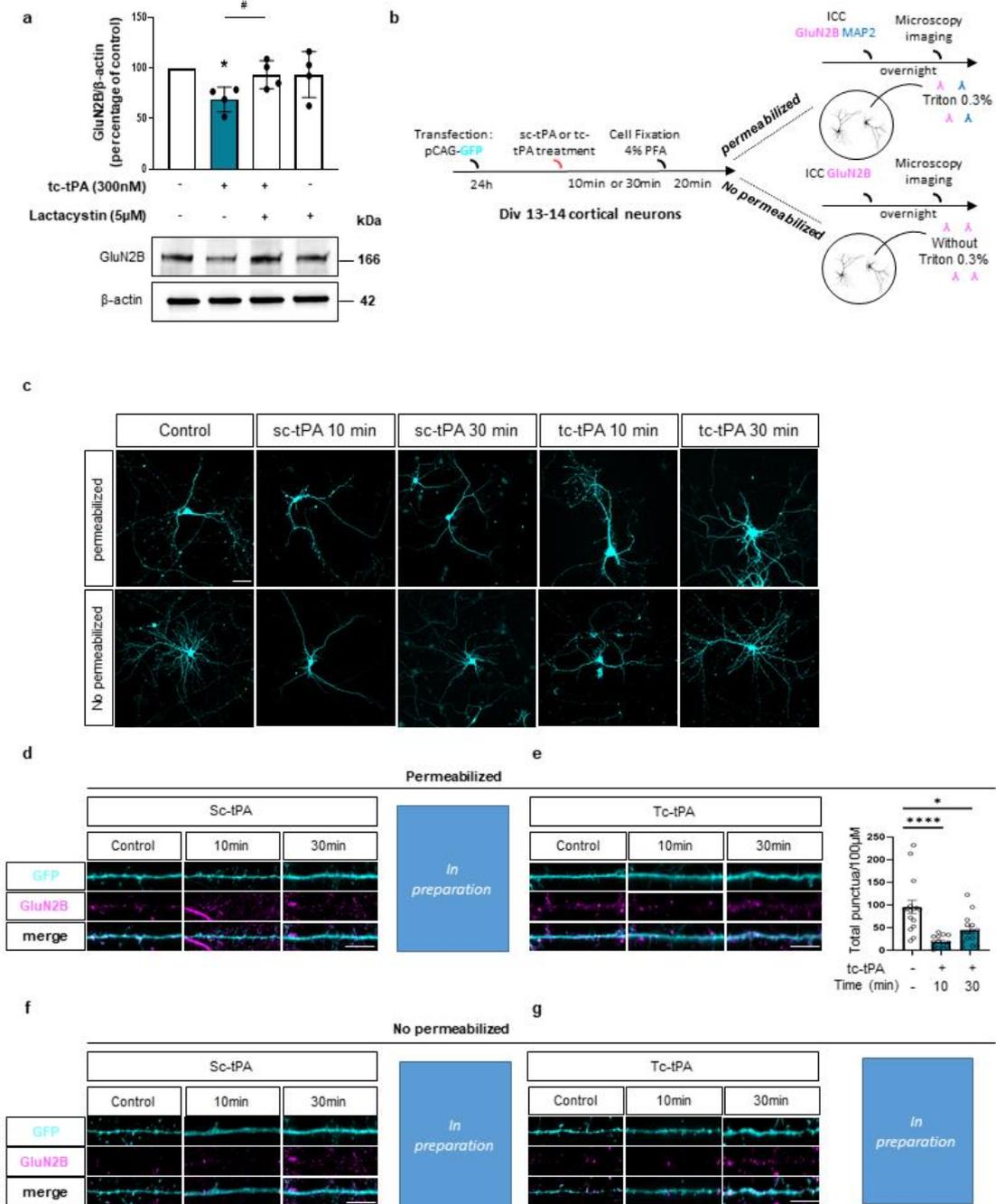
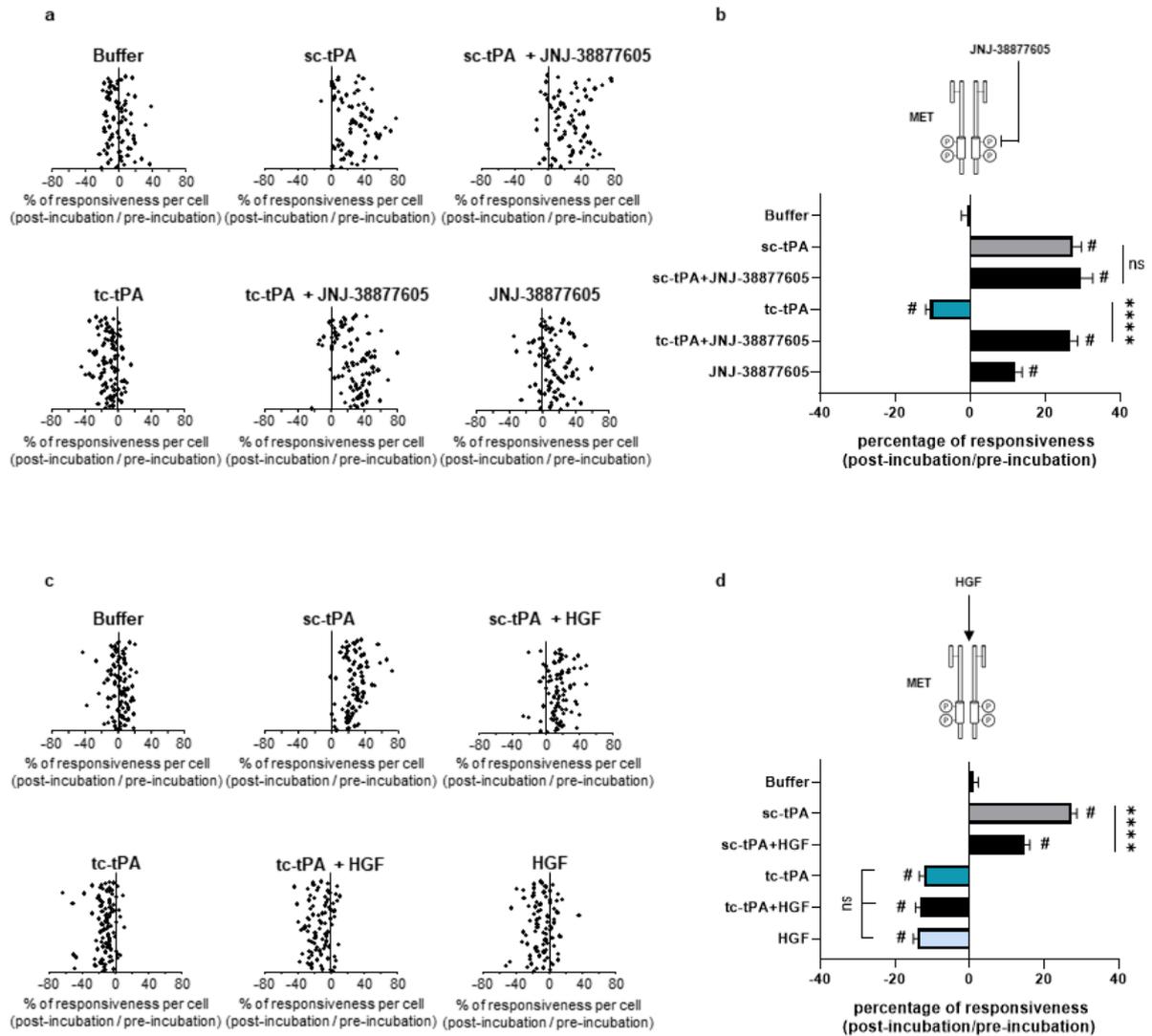
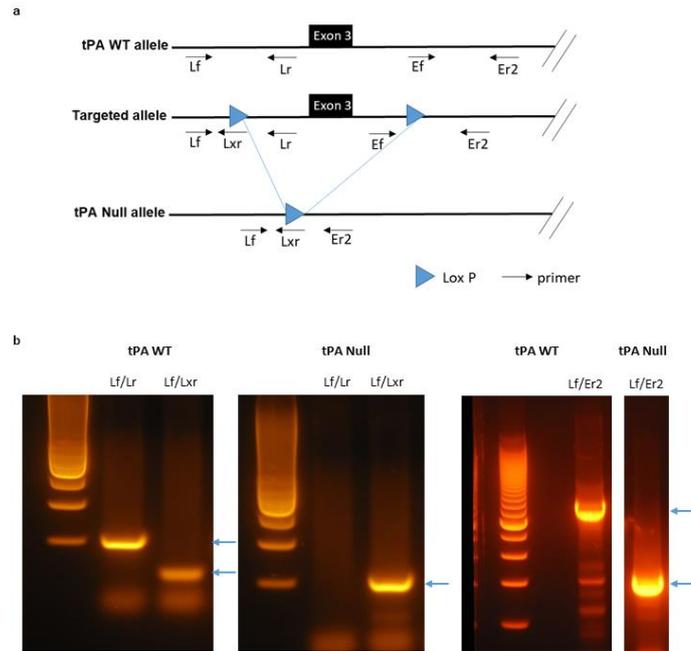


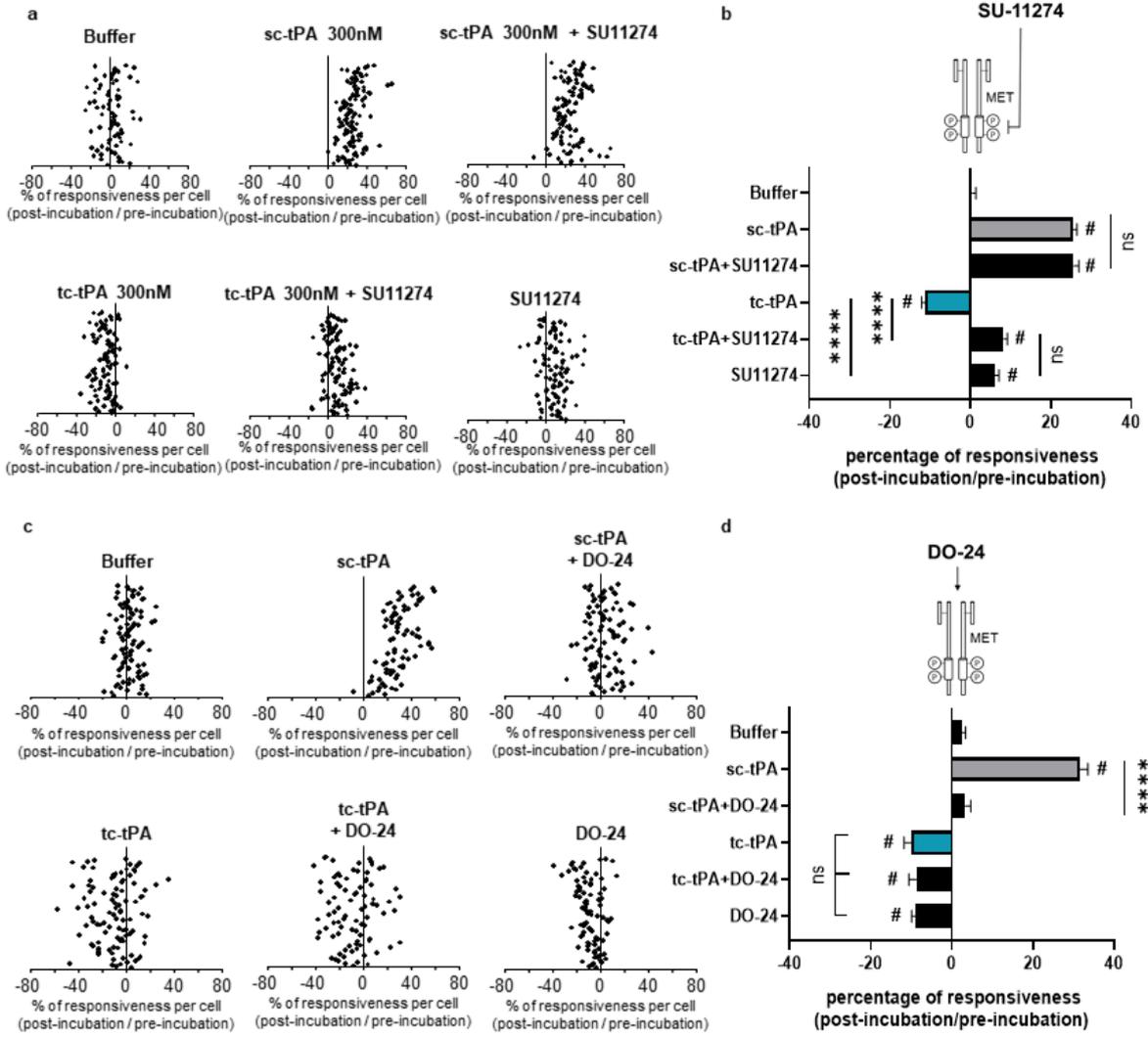
Figure 8



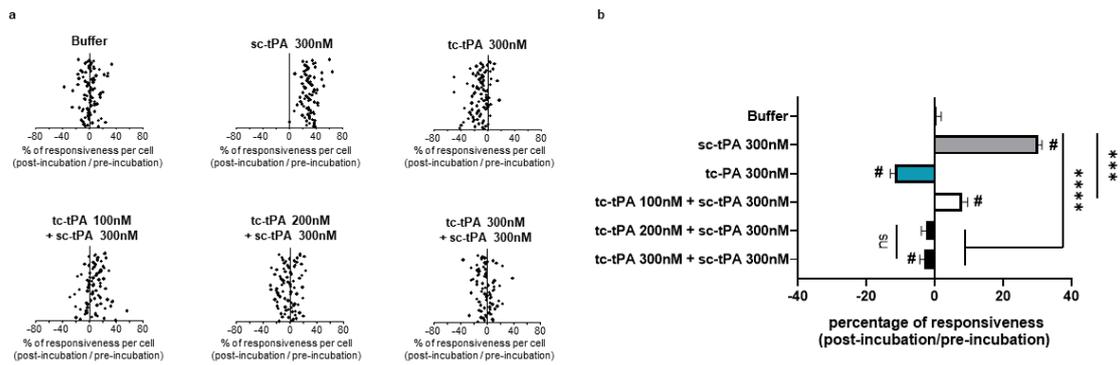
Supplementary 1



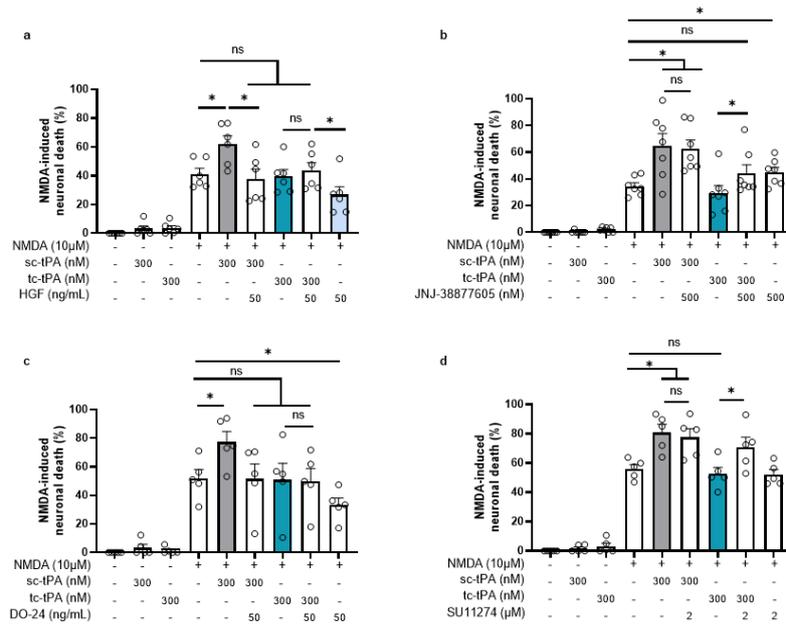
Supplementary 2



Supplementary 3



Supplementary 4



Bibliographie

A

- Adamec RE, Burton P, Shallow T, and Budgell J (1998) Unilateral block of NMDA receptors in the amygdala prevents predator stress - Induced lasting increases in anxiety-like behavior and unconditioned startle - Effective hemisphere depends on the behavior *Physiol Behav* **65**, 739–751.
- Adhami F, Yu D, Yin W, Schloemer A, Burns KA, Liao G, ... Kuan CY (2008) Deleterious effects of plasminogen activators in neonatal cerebral hypoxia-ischemia *Am J Pathol* **172**, 1704–1716.
- Adolphs R, Tranel D, Hamann S, Young AW, Calder AJ, Phelps EA, ... Damasio AR (1999) Recognition of facial emotion in nine individuals with bilateral amygdala damage *Neuropsychologia* **37**, 1111–1117.
- Aguilar S, Corominas JM, Malats N, Pereira JA, Dufresne M, Real FX, and Navarro P (2004) Tissue plasminogen activator in murine exocrine pancreas cancer: Selective expression in ductal tumors and contribution to cancer progression *Am J Pathol* **165**, 1129–1139.
- Alhadef AL, Holland RA, Nelson A, Grill HJ, and De Jonghe BC (2015) Glutamate receptors in the central nucleus of the amygdala mediate cisplatin-induced malaise and energy balance dysregulation through direct hindbrain projections *J Neurosci* **35**, 11094–11104.
- Alves S, Bode J, Bemelmans AP, Von Kalle C, Cartier N, and Tews B (2016) Ultramicroscopy as a novel tool to unravel the tropism of AAV gene therapy vectors in the brain *Sci Rep* **6**, 1–12.
- Andrioli A, Alonso-Nanclares L, Arellano JI, and DeFelipe J (2007) Quantitative analysis of parvalbumin-immunoreactive cells in the human epileptic hippocampus *Neuroscience* **149**, 131–143.
- Anfray A, Drieu A, Hingot V, Hommet Y, Yetim M, Rubio M, ... Vivien D (2019) Circulating tPA contributes to neurovascular coupling by a mechanism involving the endothelial NMDA receptors *J Cereb Blood Flow Metab*.
- Araneda R, and Andrade R (1991) 5-Hydroxytryptamine₂ and 5-hydroxytryptamine_{1A} receptors mediate opposing responses on membrane excitability in rat association cortex *Neuroscience* **40**, 399–412.
- Arleo A, and Rondi-Reig L (2007) Multimodal sensory integration and concurrent navigation strategies for spatial cognition in real and artificial organisms *J Integr Neurosci* **6**, 327–366.
- Armbruster BN, Li X, Pausch MH, Herlitze S, and Roth BL (2007) Evolving the lock to fit the key to create a family of G protein-coupled receptors potentially activated by an inert ligand *Proc Natl Acad Sci U S A* **104**, 5163–5168.
- Armstead WM, Cines DB, and Al-Roof Higazi A (2004) Altered NO Function Contributes to Impairment of uPA and tPA Cerebrovasodilation after Brain Injury *J Neurotrauma* **21**, 1204–1211.
- Asher RA, Morgenstern DA, Fidler PS, Adcock KH, Oohira A, Braistead JE, ... Fawcett JW (2000) Neurocan is upregulated in injured brain and in cytokine-treated astrocytes *J Neurosci* **20**, 2427–2438.
- Asher RA, Morgenstern DA, Shearer MC, Adcock KH, Pesheva P, and Fawcett JW (2002) Versican is upregulated in CNS injury and is a product of oligodendrocyte lineage cells *J Neurosci* **22**, 2225–2236.
- Asok A, Leroy F, Rayman JB, and Kandel ER (2019, January 1) Molecular Mechanisms of the Memory Trace *Trends Neurosci*. Elsevier Ltd.

Aspberg A (2012) The Different Roles of Aggrecan Interaction Domains *J Histochem Cytochem* **60**, 987–996.

Astrup T, and Permin PM (1947) Fibrinolysis in the animal organism [16] *Nature*.

Avram S, Shaposhnikov S, Buiu C, and Mernea M (2014) Chondroitin sulfate proteoglycans: Structure-function relationship with implication in neural development and brain disorders *Biomed Res Int*. Hindawi Publishing Corporation.

B

Babaev O, Piletti Chatain C, and Krueger-Burg D (2018, April 1) Inhibition in the amygdala anxiety circuitry *Exp Mol Med*. Nature Publishing Group.

Bahi A, and Dreyer JL (2012) Hippocampus-specific deletion of tissue plasminogen activator “tPA” in adult mice impairs depression- and anxiety-like behaviors *Eur Neuropsychopharmacol* **22**, 672–682.

Balmer TS (2016) Perineuronal nets enhance the excitability of fast-spiking neurons *ENeuro* **3**, 745–751.

Banerjee SB, Gutzeit VA, Baman J, Aoued HS, Doshi NK, Liu RC, and Ressler KJ (2017) Perineuronal Nets in the Adult Sensory Cortex Are Necessary for Fear Learning *Neuron* **95**, 169-179.e3.

Banghart M, Borges K, Isacoff E, Trauner D, and Kramer RH (2004) Light-activated ion channels for remote control of neuronal firing *Nat Neurosci* **7**, 1381–1386.

Bannerman DM, Good MA, Yee BK, Heupel MJ, Iversen SD, and Rawlins JNP (1999) Double dissociation of function within the hippocampus: A comparison of dorsal, ventral, and complete hippocampal cytotoxic lesions *Behav Neurosci* **113**, 1170–1188.

Bannerman DM, Lemaire M, Beggs S, Rawlins JNP, and Iversen SD (2001) Cytotoxic lesions of the hippocampus increase social investigation but do not impair social-recognition memory *Exp Brain Res* **138**, 100–109.

Baranes D, Lederfein D, Huang VY, Chen M, Bailey CH, and Kandel ER (1998) Tissue plasminogen activator contributes to the late phase of LTP and to synaptic growth in the hippocampal mossy fiber pathway *Neuron* **21**, 813–825.

Barbalho CA, Nunes-de-Souza RL, and Canto-de-Souza A (2009) Similar anxiolytic-like effects following intra-amygdala infusions of benzodiazepine receptor agonist and antagonist: Evidence for the release of an endogenous benzodiazepine inverse agonist in mice exposed to elevated plus-maze test *Brain Res* **1267**, 65–76.

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

Bartoletti A, Medini P, Berardi N, and Maffei L (2004) Environmental enrichment prevents effects of dark-rearing in the rat visual cortex *Nat Neurosci* **7**, 215–216.

Basham ME, and Seeds NW (2001) Plasminogen expression in the neonatal and adult mouse brain *J Neurochem* **77**, 318–325.

Bekku Y, Saito M, Moser M, Fuchigami M, Maehara A, Nakayama M, ... Oohashi T (2012) Bral2 is indispensable for the proper localization of brevican and the structural integrity of the perineuronal net in the brainstem and cerebellum *J Comp Neurol* **520**, 1721–1736.

- Belzung C, and Griebel G (2001) Measuring normal and pathological anxiety-like behaviour in mice: A review In *Behavioural Brain Research* (Vol. 125, pp. 141–149). Elsevier.
- Benchenane K, Berezowski V, Ali C, Fernández-Monreal M, López-Atalaya JP, Brillault J, ... Vivien D (2005) Tissue-type plasminogen activator crosses the intact blood-brain barrier by low-density lipoprotein receptor-related protein-mediated transcytosis *Circulation* **111**, 2241–2249.
- Benchenane K, Berezowski V, Fernández-Monreal M, Brillault J, Valable S, Dehouck MP, ... Ali C (2005) Oxygen glucose deprivation switches the transport of tPA across the blood-brain barrier from an LRP-dependent to an increased LRP-independent process *Stroke* **36**, 1059–1064.
- Benchenane K, Castel H, Boulouard M, Bluthé R, Fernandez-Monreal M, Roussel BD, ... Ali C (2007) Anti-NR1 N-terminal-domain vaccination unmasks the crucial action of tPA on NMDA-receptor-mediated toxicity and spatial memory *J Cell Sci* **120**, 578–585.
- Bennur S, Shankaranarayana Rao BS, Pawlak R, Strickland S, McEwen BS, and Chattarji S (2007) Stress-induced spine loss in the medial amygdala is mediated by tissue-plasminogen activator *Neuroscience* **144**, 8–16.
- Bernstein JG, and Boyden ES (2011, December) Optogenetic tools for analyzing the neural circuits of behavior *Trends Cogn Sci*. NIH Public Access.
- Bertrand T, Lesept F, Chevilly A, Lenoir S, Aimable M, Briens A, ... Vivien D (2015) Conformations of tissue plasminogen activator (tPA) orchestrate neuronal survival by a crosstalk between EGFR and NMDAR *Cell Death Dis* **6**.
- Binder BR, Spragg J, and Austen KF (1979) Purification and characterization of human vascular plasminogen activator derived from blood vessel perfusates *J Biol Chem*.
- Bird CM, and Burgess N (2008, March) The hippocampus and memory: Insights from spatial processing *Nat Rev Neurosci*. Nature Publishing Group.
- Björklund U, Persson M, Rönnbäck L, and Hansson E (2010) Primary cultures from cerebral cortex and hippocampus enriched in glutamatergic and GABAergic neurons *Neurochem Res* **35**, 1733–1742.
- Bliss TVP, and Lømo T (1973) Long-lasting potentiation of synaptic transmission in the dentate area of the anaesthetized rabbit following stimulation of the perforant path *J Physiol*.
- Bonnans C, Chou J, and Werb Z (2014, December 11) Remodelling the extracellular matrix in development and disease *Nat Rev Mol Cell Biol*. Nature Publishing Group.
- Bosiacki M, Gąssowska-Dobrowolska M, Kojder K, Fabiańska M, Jeżewski D, Gutowska I, and Lubkowska A (2019) Perineuronal nets and their role in synaptic homeostasis *Int J Mol Sci* **20**, 1–22.
- Botta P, Demmou L, Kasugai Y, Markovic M, Xu C, Fadok JP, ... Lüthi A (2015, October 28) Regulating anxiety with extrasynaptic inhibition *Nat Neurosci*. Nature Publishing Group.
- Bouma BN, and Mosnier LO (2006, October 1) Thrombin activatable fibrinolysis inhibitor (TAFI) - How does thrombin regulate fibrinolysis? *Ann Med*. Ann Med.
- Brakebusch C, Seidenbecher CI, Asztely F, Rauch U, Matthies H, Meyer H, ... Fässler R (2002) Brevican-Deficient Mice Display Impaired Hippocampal CA1 Long-Term Potentiation but Show No Obvious Deficits in Learning and Memory *Mol Cell Biol* **22**, 7417–7427.
- Braun AA, Skelton MR, Vorhees C V., and Williams MT (2011) Comparison of the elevated plus and elevated zero mazes in treated and untreated male Sprague-Dawley rats: Effects of anxiolytic and anxiogenic agents *Pharmacol Biochem Behav* **97**, 406–415.

- Briens A, Bardou I, Lebas H, Miles LA, Parmer RJ, Vivien D, and Docagne F (2017) Astrocytes regulate the balance between plasminogen activation and plasmin clearance via cell-surface actin *Cell Discov* **3**, 17001.
- Brown MW, and Aggleton JP (2001) Recognition memory: What are the roles of the perirhinal cortex and hippocampus? *Nat Rev Neurosci* **2**, 51–61.
- Brückner G, Brauer K, Härtig W, Wolff JR, Rickmann MJ, Derouiche A, ... Reichenbach A (1993) Perineuronal nets provide a polyanionic, glia-associated form of microenvironment around certain neurons in many parts of the rat brain *Glia* **8**, 183–200.
- Brun VH, Otnæss MK, Molden S, Steffenach HA, Witter MP, Moser MB, and Moser EI (2002) Place cells and place recognition maintained by direct entorhinal-hippocampal circuitry *Science (80-)* **296**, 2243–2246.
- Bruno MA, and Cuello AC (2006) Activity-dependent release of precursor nerve growth factor, conversion to mature nerve growth factor, and its degradation by a protease cascade *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**, 6735–6740.
- Bu G, Morton PA, and Schwartz AL (1992) Identification and partial characterization by chemical cross-linking of a binding protein for tissue-type plasminogen activator (t-PA) on rat hepatoma cells: A plasminogen activator inhibitor type 1-independent t-PA receptor *J Biol Chem*.
- Buisson A, Nicole O, Docagne F, Sartelet H, Mackenzie ET, and 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, Burman PN, Hussein A, Demars MP, Sadahiro M, Brady DM, ... Morishita H (2015) Unmasking proteolytic activity for adult visual cortex plasticity by the removal of Lynx1 *J Neurosci* **35**, 12693–12702.
- Bukhari N, Torres L, Robinson JK, and Tsirka SE (2011) Axonal regrowth after spinal cord injury via chondroitinase and the tissue plasminogen activator (tPA)/plasmin system *J Neurosci* **31**, 14931–14943.
- Burgess N, Maguire EA, and O'Keefe J (2002, August 15) The human hippocampus and spatial and episodic memory *Neuron*. Cell Press.
- Burwella RD (2000) Reprinted from *The Parahippocampal Region The Parahippocampal Region: Corticocortical Connectivity*.
- Buss A, Pech K, Kakulas BA, Martin D, Schoenen J, Noth J, and Brook GA (2009) NG2 and phosphacan are present in the astroglial scar after human traumatic spinal cord injury *BMC Neurol* **9**, 1–15.
- Buzsáki G, Horváth Z, Urioste R, Hetke J, and Wise K (1992) High-frequency network oscillation in the hippocampus *Science (80-)* **256**, 1025–1027.
- Bygrave AM, Masiulis S, Nicholson E, Berkemann M, Barkus C, Sprengel R, ... Kätzel D (2016) Knockout of NMDA-receptors from parvalbumin interneurons sensitizes to schizophrenia-related deficits induced by MK-801 *Transl Psychiatry* **6**, 1–9.

C

- Cabungcal JH, Steullet P, Morishita H, Kraftsik R, Cuenod M, Hensch TK, and Do KQ (2013) Perineuronal nets protect fast-spiking interneurons against oxidative stress *Proc Natl Acad Sci U S A* **110**, 9130–9135.

- Cai H, Haubensak W, Anthony TE, and Anderson DJ (2014) Central amygdala PKC- δ + neurons mediate the influence of multiple anorexigenic signals *Nat Neurosci* **17**, 1240–1248.
- Calabresi P, Napolitano M, Centonze D, Marfia GA, Gubellini P, Teule MA, ... Gulino A (2000) Tissue plasminogen activator controls multiple forms of synaptic plasticity and memory *Eur J Neurosci* **12**, 1002–1012.
- Calhoun GG, and Tye KM (2015, October 28) Resolving the neural circuits of anxiety *Nat Neurosci*. Nature Publishing Group.
- Campbell EJ, and Marchant NJ (2018, April 1) The use of chemogenetics in behavioural neuroscience: receptor variants, targeting approaches and caveats *Br J Pharmacol*. John Wiley and Sons Inc.
- Canto CB, Wouterlood FG, and Witter MP (2008) What does the anatomical organization of the entorhinal cortex tell us? *Neural Plast*. Hindawi Publishing Corporation.
- Cardin JA, Carlén M, Meletis K, Knoblich U, Zhang F, Deisseroth K, ... Moore CI (2009) Driving fast-spiking cells induces gamma rhythm and controls sensory responses *Nature* **459**, 663–667.
- Carhart-Harris RL, and Nutt DJ (2017, September 1) Serotonin and brain function: A tale of two receptors *J Psychopharmacol*. SAGE Publications Ltd.
- Carlén M, Meletis K, Siegle JH, Cardin JA, Futai K, Vierling-Claassen D, ... Tsai LH (2012) A critical role for NMDA receptors in parvalbumin interneurons for gamma rhythm induction and behavior *Mol Psychiatry* **17**, 537–548.
- Carmeliet P, Schoonjans L, Kieckens L, Ream B, Degen J, Bronson R, ... Mulligan RC (1994) Physiological consequences of loss of plasminogen activator gene function in mice *Nature* **368**, 419–424.
- Carmichael ST, Archibeque I, Luke L, Nolan T, Momiy J, and Li S (2005) Growth-associated gene expression after stroke: Evidence for a growth-promoting region in peri-infarct cortex *Exp Neurol* **193**, 291–311.
- Carstens KE, Phillips ML, Lucas Pozzo-Miller X, Weinberg RJ, and Dudek SM (2016) Perineuronal Nets Suppress Plasticity of Excitatory Synapses on CA2 Pyramidal Neurons.
- Carulli D, Pizzorusso T, Kwok JCF, Putignano E, Poli A, Forostyak S, ... Fawcett JW (2010) Animals lacking link protein have attenuated perineuronal nets and persistent plasticity *Brain* **133**, 2331–2347.
- Carulli D, Rhodes KE, Brown DJ, Bonnert TP, Pollack SJ, Oliver K, ... Fawcett JW (2006) Composition of perineuronal nets in the adult rat cerebellum and the cellular origin of their components *J Comp Neurol* **494**, 559–577.
- Carulli D, Rhodes KE, and Fawcett JW (2007) Upregulation of aggrecan, link protein 1, and hyaluronan synthases during formation of perineuronal nets in the rat cerebellum *J Comp Neurol* **501**, 83–94.
- Cassé F, Bardou I, Danglot L, Briens A, Montagne A, Parcq J, ... Docagne F (2012) Glutamate controls tPA recycling by astrocytes, which in turn influences glutamatergic signals *J Neurosci* **32**, 5186–5199.
- Cassel JC, Cassel S, Galani R, Kelche C, Will B, and Jarrard L (1998) Fimbria-fornix vs selective hippocampal lesions in rats: Effects on locomotor activity and spatial learning and memory *Neurobiol Learn Mem* **69**, 22–45.
- Celio MR, Spreafico R, De Biasi S, and Vitellaro-Zuccarello L (1998) Perineuronal nets: Past and present *Trends Neurosci* **21**, 510–515.
- Chamorro Á, Dirnagl U, Urra X, and Planas AM (2016, July 1) Neuroprotection in acute stroke: Targeting excitotoxicity, oxidative and nitrosative stress, and inflammation *Lancet Neurol*. Lancet Publishing

Group.

- Chen CC, Chu P, and Brumberg JC (2015) Experience-dependent regulation of tissue-type plasminogen activator in the mouse barrel cortex *Neurosci Lett* **599**, 152–157.
- Chen ZL, and Strickland S (1997) Neuronal death in the hippocampus is promoted by plasmin-catalyzed degradation of laminin *Cell* **91**, 917–925.
- Chu P, Chen E, Bajnath A, and Brumberg JC (2015) Cell type specificity of tissue plasminogen activator in the mouse barrel cortex *Data Br.*
- Cichon S, Mühleisen TW, Degenhardt FA, Mattheisen M, Miró X, Strohmaier J, ... Nöthen MM (2011) Genome-wide association study identifies genetic variation in neurocan as a susceptibility factor for bipolar disorder *Am J Hum Genet* **88**, 372–381.
- Ciocchi S, Herry C, Grenier F, Wolff SBE, Letzkus JJ, Vlachos I, ... Lüthi A (2010) Encoding of conditioned fear in central amygdala inhibitory circuits.
- Cipolla MJ, Lessov N, and Clark WM (2000) Postischemic attenuation of cerebral artery reactivity is increased in the presence of tissue plasminogen activator *Stroke* **31**, 940–945.
- Citri A, and Malenka RC (2008) Synaptic Plasticity: Multiple Forms, Functions, and Mechanisms *Neuropsychopharmacol Rev* **33**, 18–41.
- Collen D, and Lijnen HR (1991) Basic and clinical aspects of fibrinolysis and thrombolysis *Blood*.
- Corkin S (2002) What's new with the amnesic patient H.M.? *Nat Rev Neurosci* **3**, 153–160.
- Correa F, Gauberti M, Parcq J, Macrez R, Hommet Y, Obiang P, ... Docagne F (2011) Tissue plasminogen activator prevents white matter damage following stroke *J Exp Med* **208**, 1229–1242.
- Corvetto L, and Rossi F (2005) Degradation of chondroitin sulfate proteoglycans induces sprouting of intact Purkinje axons in the cerebellum of the adult rat *J Neurosci* **25**, 7150–7158.
- Craske MG, Rauch SL, Ursano R, Prenoveau J, Pine DS, and Zinbarg RE (2009, December 1) What is an anxiety disorder? *Depress Anxiety*. John Wiley & Sons, Ltd.
- Craske MG, and Stein MB (2016, December 17) Anxiety *Lancet*. Lancet Publishing Group.
- Cryan JF, and Sweeney FF (2011) The age of anxiety: Role of animal models of anxiolytic action in drug discovery *Br J Pharmacol*. John Wiley and Sons Inc.
- Cui Y, Lv G, Jin S, Peng J, Yuan J, He X, ... Li H (2017) A Central Amygdala-Substantia Innominata Neural Circuitry Encodes Aversive Reinforcement Signals *Cell Rep* **21**, 1770–1782.

D

- Dastre A (1893) Fibrinolyse dans le sang *Arch Norm Pathol* **5**, 661–663.
- Davis G.E., Pintar KA, and Allen, R. Salazar SAM (2001) Matrix metalloproteinase-1 and -9 activation by plasmin regulates a novel endothelial cell-mediated mechanism of collagen gel contraction and capillary tube regression in three-dimensional collagen matrices *J Cell Sci* **114**, 917–930.
- Davis George E., Allen KAP, Salazar R, and Maxwell and SA (2001) Matrix metalloproteinase-1 and -9 activation by plasmin regulates a novel endothelial cell-mediated mechanism of collagen gel contraction and capillary tube regression in three-dimensional collagen matrices *J Cell Sci* **114**, 917–930.
- Davis HP, and Squire LR (1984) Protein synthesis and memory: A review *Psychol Bull* **96**, 518–559.

- Davis M, Walker DL, Miles L, and Grillon C (2010, January) Phasic vs sustained fear in rats and humans: Role of the extended amygdala in fear vs anxiety *Neuropsychopharmacology*. Nature Publishing Group.
- De Vivo L, Landi S, Panniello M, Baroncelli L, Chierzi S, Mariotti L, ... Ratto GM (2013) Extracellular matrix inhibits structural and functional plasticity of dendritic spines in the adult visual cortex *Nat Commun* **4**, 1–10.
- De Winter F, Kwok JCF, Fawcett JW, Vo TT, Carulli D, and Verhaagen J (2016) The Chemorepulsive Protein Semaphorin 3A and Perineuronal Net-Mediated Plasticity *Neural Plast* **2016**.
- Deepa SS, Carulli D, Galtrey C, Rhodes K, Fukuda J, Mikami T, ... Fawcett JW (2006) Composition of perineuronal net extracellular matrix in rat brain: A different disaccharide composition for the net-associated proteoglycans *J Biol Chem* **281**, 17789–17800.
- Del-Ben CM, Ferreira CAQ, Sanchez TA, Alves-Neto WC, Guapo VG, De Araujo DB, and Graeff FG (2012) Effects of diazepam on BOLD activation during the processing of aversive faces *J Psychopharmacol* **26**, 443–451.
- Derr LB, Mckae LA, and Tucker RP (1998) The distribution of tenascin-R in the developing avian nervous system *J Exp Zool* **280**, 152–164.
- Devienne G, Picaud S, Cohen I, Piquet J, Tricoire L, Testa D, ... Lambolez B (2019) Regulation of perineuronal nets in the adult cortex by the electrical activity of parvalbumin interneurons *Regul Perineuronal Nets Adult Cortex by Electr Act Parvalbumin Interneurons* 671719.
- Diamond SL, Eskin SG, and McIntire L V. (1989) Fluid flow stimulates tissue plasminogen activator secretion by cultured human endothelial cells *Science (80-)*.
- Dityatev A, Brückner G, Dityateva G, Grosche J, Kleene R, and Schachner M (2007) Activity-dependent formation and functions of chondroitin sulfate-rich extracellular matrix of perineuronal nets *Dev Neurobiol* **67**, 570–588.
- Dobbertin A, Rhodes KE, Garwood J, Properzi F, Heck N, Rogers JH, ... Faissner A (2003) Regulation of RPTP/phosphacan expression and glycosaminoglycan epitopes in injured brain and cytokine-treated glia.
- Docagne F, Nicole O, Marti HH, Mackenzie ET, Buisson A, and Vivien D (1999) Transforming growth factor- β 1 as a regulator of the serpins/t-PA axis in cerebral ischemia *FASEB J* **13**, 1315–1324.
- Douglas RJ (1967) THE HIPPOCAMPUS AND BEHAVIOR *Psychol Bull* **67**, 416–442.
- Dubey D, McRae PA, Rankin-Gee EK, Baranov E, Wandrey L, Rogers S, and Porter BE (2017) Increased metalloproteinase activity in the hippocampus following status epilepticus *Epilepsy Res* **132**, 50–58.
- Dudai Y (2004) The neurobiology of consolidations, or, how stable is the engram? *Annu Rev Psychol* **55**, 51–86.
- Dyck SM, and Karimi-Abdolrezaee S (2015, July 1) Chondroitin sulfate proteoglycans: Key modulators in the developing and pathologic central nervous system *Exp Neurol*. Academic Press Inc.

E

- Eichenbaum H, and Cohen NJ (2014, August 20) Can We Reconcile the Declarative Memory and Spatial Navigation Views on Hippocampal Function? *Neuron*. Cell Press.
- Eill GJ, Sinha A, Morawski M, Viapiano MS, Matthews RT, and Matthews R (2020) The protein tyrosine

phosphatase RPTPZ/phosphacan is critical for perineuronal net structure **295**, 955–968.

- Emeis JJ, Van Den Eijnden-Schrauwen Y, Van Den Hoogen CM, De Priester W, Westmuckett A, and Lupu F (1997) An endothelial storage granule for tissue-type plasminogen activator *J Cell Biol* **139**, 245–256.
- Engel M, Maurel P, Margolis RU, and Margolis RK (1996) Chondroitin sulfate proteoglycans in the developing central nervous system. I. Cellular sites of synthesis of neurocan and phosphacan *J Comp Neurol* **366**, 34–43.
- Etkin A, Klemenhagen KC, Dudman JT, Rogan MT, Hen R, Kandel ER, and Hirsch J (2004) Individual differences in trait anxiety predict the response of the basolateral amygdala to unconsciously processed fearful faces *Neuron* **44**, 1043–1055.
- Etkin A, and Wager TD (2007) Functional Neuroimaging of Anxiety: A Meta-Analysis of Emotional Processing in PTSD, Social Anxiety Disorder, and Specific Phobia *Am J Psychiatry* **164**, 1476–1488.
- Evans DL, Mcgrogan II M, Scott II RW, and Camell\$ RW (1991) *THE JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY Protease Specificity and Heparin Binding and Activation of Recombinant Protease Nexin I** (Vol. 266).

F

- Faini G, Aguirre A, Landi S, Lamers D, Pizzorusso T, Ratto GM, ... Bacci A (2018) Perineuronal nets control visual input via thalamic recruitment of cortical PV interneurons *Elife* **7**.
- Fanselow MS, and Dong HW (2010, January 14) Are the Dorsal and Ventral Hippocampus Functionally Distinct Structures? *Neuron*. NIH Public Access.
- Favuzzi E, Marques-Smith A, Fernandes C, Ewers H, and Correspondence BR (2017) Activity-Dependent Gating of Parvalbumin Interneuron Function by the Perineuronal Net Protein Brevican *Neuron* **95**, 639–655.
- Fawcett JW, Oohashi T, and Pizzorusso T (2019) The roles of perineuronal nets and the perinodal extracellular matrix in neuronal function *Nat Rev Neurosci* **20**, 451–465.
- Felix-Ortiz AC, Beyeler A, Seo C, Leppla CA, Wildes CP, and Tye KM (2013) BLA to vHPC inputs modulate anxiety-related behaviors *Neuron* **79**, 658–664.
- Ferino F, Thierry AM, and Glowinski J (1987) Anatomical and electrophysiological evidence for a direct projection from ammon's horn to the medial prefrontal cortex in the rat *Exp Brain Res* **65**, 421–426.
- Fernández-Monreal M, López-Atalaya JP, Benchenane K, Cacquaevel M, Dulin F, Le Caer JP, ... Vivien D (2004) Arginine 260 of the amino-terminal domain of NR1 subunit is critical for tissue-type plasminogen activator-mediated enhancement of N-methyl-D-aspartate receptor signaling *J Biol Chem* **279**, 50850–50856.
- Ferrer I, Oliver B, Russi A, Casas R, and Rivera R (1994) Parvalbumin and calbindin-D28k immunocytochemistry in human neocortical epileptic foci *J Neurol Sci* **123**, 18–25.
- Foscarin S, Ponchione D, Pajaj E, Leto K, Gawlak M, Wilczynski GM, ... Carulli D (2011) Experience-dependent plasticity and modulation of growth regulatory molecules at central synapses *PLoS One* **6**, 16666.
- Franchi SA, Macco R, Astro V, Tonoli D, Savino E, Valtorta F, ... de Curtis I (2018) A method to culture GABAergic interneurons derived from the medial ganglionic eminence *Front Cell Neurosci* **11**,

423.

- Frankland PW, and Bontempi B (2005, February) The organization of recent and remote memories *Nat Rev Neurosci*. Nature Publishing Group.
- Fredriksson L, Li H, Fieber C, Li X, and Eriksson U (2004) Tissue plasminogen activator is a potent activator of PDGF-CC *EMBO J*.
- Fredriksson L, Stevenson TK, Su EJ, Ragsdale M, Moore S, Craciun S, ... Lawrence DA (2015) Identification of a neurovascular signaling pathway regulating seizures in mice *Ann Clin Transl Neurol* **2**, 722–738.
- Freeman FM, Rose SPR, and Scholey AB (1995) Two time windows of anisomycin-induced amnesia for passive avoidance training in the day-old chick *Neurobiol Learn Mem* **63**, 291–295.
- Friedman GC, and Seeds NW (1994) Tissue plasminogen activator expression in the embryonic nervous system *Dev Brain Res* **81**, 41–49.
- Frischknecht R, Heine M, Perrais D, Seidenbecher CI, Choquet D, and Gundelfinger ED (2009) Brain extracellular matrix affects AMPA receptor lateral mobility and short-term synaptic plasticity *Nat Neurosci* **12**, 897–904.
- Fyhn M, Molden S, Witter MP, Moser EI, and Moser MB (2004) Spatial representation in the entorhinal cortex *Science (80-)* **305**, 1258–1264.

G

- Gabarel T, MacRez R, Gauberti M, Montagne A, Hebert M, Petersen KU, ... Vivien D (2013) Immunotherapy blocking the tissue plasminogen activator-dependent activation of N-methyl-D-aspartate glutamate receptors improves hemorrhagic stroke outcome *Neuropharmacology* **67**, 267–271.
- Gabriel Andral (1844) *Essai d'hématologie pathologique* (Fortin Masson et Cie, Ed.).
- Galtrey CM, Asher RA, Nothias F, and Fawcett JW (2007) Promoting plasticity in the spinal cord with chondroitinase improves functional recovery after peripheral nerve repair *Brain* **130**, 926–939.
- Galtrey CM, Kwok JCF, Carulli D, Rhodes KE, and Fawcett JW (2008) Distribution and synthesis of extracellular matrix proteoglycans, hyaluronan, link proteins and tenascin-R in the rat spinal cord *Eur J Neurosci* **27**, 1373–1390.
- Ganguly K, Rejmak E, Mikosz M, Nikolaev E, Knapska E, and Kaczmarek L (2013) Matrix metalloproteinase (MMP) 9 transcription in mouse brain induced by fear learning *J Biol Chem* **288**, 20978–20991.
- Giamanco KA, Morawski M, and Matthews RT (2010) Perineuronal net formation and structure in aggrecan knockout mice *Neuroscience* **170**, 1314–1327.
- Giau R, Carrette J, Bockart J, and Homburger V (2005) Constitutive secretion of protease nexin-1 by glial cells and its regulation by G-protein-coupled receptors *J Neurosci* **25**, 8995–9004.
- Girardeau G, Benchenane K, Wiener SI, Buzsáki G, and Zugaro MB (2009) Selective suppression of hippocampal ripples impairs spatial memory *Nat Neurosci* **12**, 1222–1223.
- Gogolla N, Caroni P, Lüthi A, and Herry C (2009) Perineuronal Nets Protect Fear Memories from Erasure *Science (80-)* **325**, 1258–1261.
- GoodSmith D, Lee H, Neunuebel JP, Song H, and Knierim JJ (2019) Dentate Gyrus Mossy Cells Share a

Role in Pattern Separation with Dentate Granule Cells and Proximal CA3 Pyramidal Cells *J Neurosci* **39**, 9570–9584.

Gray JA, and McNaughton N (2000) *The Neuropsychology of anxiety: An enquiry into the functions of septohippocampal system* (Oxford Uni, Vol. 33).

Gray K, and Ellis V (2008) Activation of pro-BDNF by the pericellular serine protease plasmin *FEBS Lett* **582**, 907–910.

Gu WL, Fu SL, Wang YX, Li Y, Wang XF, Xu XM, and Lu PH (2007) Expression and regulation of versican in neural precursor cells and their lineages *Acta Pharmacol Sin* **28**, 1519–1530.

H

Hajjar K. A., Jacovina AT, and Chacko J (1994) An endothelial cell receptor for plasminogen/tissue plasminogen activator. I. Identity with annexin II *J Biol Chem*.

Hajjar Katherine A., and Reynolds CM (1994) α -Fucose-mediated binding and degradation of tissue-type plasminogen activator by HepG2 cells *J Clin Invest* **93**, 703–710.

Happel MFK, and Frischknecht R (2016) Neuronal Plasticity in the Juvenile and Adult Brain Regulated by the Extracellular Matrix In *Composition and Function of the Extracellular Matrix in the Human Body*. InTech.

Happel MFK, Niekisch H, Castiblanco Rivera LL, Ohl FW, Deliano M, and Frischknecht R (2014) Enhanced cognitive flexibility in reversal learning induced by removal of the extracellular matrix in auditory cortex *Proc Natl Acad Sci U S A* **111**, 2800–2805.

Harpel PC (1981) α 2-Plasmin inhibitor and α 2-macroglobulin-plasmin complexes in plasma. Quantitation by an enzyme-linked differential antibody immunosorbent assay *J Clin Invest* **68**, 46–55.

Harrison F. E., Hosseini AH, and McDonald MP (2009) Endogenous anxiety and stress responses in water maze and Barnes maze spatial memory tasks *Behav Brain Res* **198**, 247–251.

Harrison Fiona E., Reiserer RS, Tomarken AJ, and McDonald MP (2006) Spatial and nonspatial escape strategies in the Barnes maze *Learn Mem* **13**, 809–819.

Härtig W, Mages B, Aleithe S, Nitzsche B, Altmann S, Barthel H, ... Michalski D (2017) Damaged neocortical perineuronal nets due to experimental focal cerebral ischemia in mice, rats and sheep *Front Integr Neurosci* **11**.

Hartley T, Lever C, Burgess N, and O'keefe J (2014) Space in the brain: how the hippocampal formation supports spatial cognition *Philos Trans R Soc B Biol Sci* **369**, 1–11.

Hartley T, Lever C, Burgess N, and O'Keefe J (2014, February 5) Space in the brain: How the hippocampal formation supports spatial cognition *Philos Trans R Soc B Biol Sci*. Royal Society.

Haubensak W, Kunwar PS, Cai H, Ciochi S, Wall NR, Ponnusamy R, ... Anderson DJ (2010a) Genetic dissection of an amygdala microcircuit that gates conditioned fear *Nature* **468**, 270–276.

Haubensak W, Kunwar PS, Cai H, Ciochi S, Wall NR, Ponnusamy R, ... Anderson DJ (2010b) Genetic dissection of an amygdala microcircuit that gates conditioned fear *Nature* **468**, 270–276.

Hayashi N, Miyata S, Yamada M, Kamei K, and Oohira A (2005) Neuronal expression of the chondroitin sulfate proteoglycans receptor-type protein-tyrosine phosphatase β and phosphacan *Neuroscience* **131**, 331–348.

- Hebb DO (1949) *The Organization of Behavior: A Neuropsychological Theory* (New-York:).
- Hébert M, Anfray A, Chevilly A, Martinez De Lizarrondo S, Quenault A, Louessard M, ... Agin V (2017) Distant Space Processing is Controlled by tPA-dependent NMDA Receptor Signaling in the Entorhinal Cortex *Cereb Cortex*.
- Hedin SG (1903) On the presence of a proteolytic enzyme in the normal serum of the ox *J Physiol* **30**, 195–201.
- Heisler LK, Chu HM, Brennan TJ, Danao JA, Bajwa P, Parsons LH, and Tecott LH (1998) Elevated anxiety and antidepressant-like responses in serotonin 5-HT_{1A} receptor mutant mice *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**, 15049–15054.
- Henke K (2010, April 9) A model for memory systems based on processing modes rather than consciousness *Nat Rev Neurosci*. Nature Publishing Group.
- Hensch TK (2014, January 16) Bistable parvalbumin circuits pivotal for brain plasticity *Cell*. Cell Press.
- Hino H, Akiyama H, Iseki E, Kato M, Kondo H, Ikeda K, and Kosaka K (2001) Immunohistochemical localization of plasminogen activator inhibitor-1 in rat and human brain tissues *Neurosci Lett* **297**, 105–108.
- Ho-Tin-Noé B, Enslin H, Doeuvre L, Corsi JM, Lijnen HR, and Anglés-Cano E (2009) Role of plasminogen activation in neuronal organization and survival *Mol Cell Neurosci* **42**, 288–295.
- Hobohm C, Günther A, Grosche J, Roßner S, Schneider D, and Brückner G (2005) Decomposition and long-lasting downregulation of extracellular matrix in perineuronal nets induced by focal cerebral ischemia in rats *J Neurosci Res* **80**, 539–548.
- Hok V., Save E, Lenck-Santini PP, and Poucet B (2005) Coding for spatial goals in the prelimbic/infralimbic area of the rat frontal cortex *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**, 4602–4607.
- Hok Vincent, Chah E, Save E, and Poucet B (2013) Prefrontal Cortex Focally Modulates Hippocampal Place Cell Firing Patterns.
- Hoover-Plow J, Skomorovska-Prokvolit O, and Welsh S (2001) Selective behaviors altered in plasminogen-deficient mice are reconstituted with intracerebroventricular injection of plasminogen *Brain Res* **898**, 256–264.
- Hoylaerts M, Rijken DC, Lijnen HR, and Collen D (1982) Kinetics of the activation of plasminogen by human tissue plasminogen activator. Role of fibrin *J Biol Chem*.
- Hsieh TH, Cheong Lee HH, Hameed MQ, Pascual-Leone A, Hensch TK, and Rotenberg A (2017) Trajectory of parvalbumin cell impairment and loss of cortical inhibition in traumatic brain injury *Cereb Cortex* **27**, 5509–5524.
- Hu K, Yang J, Tanaka S, Gonias SL, Mars WM, and Liu Y (2006) Tissue-type plasminogen activator acts as a cytokine that triggers intracellular signal transduction and induces matrix metalloproteinase-9 gene expression *J Biol Chem* **281**, 2120–2127.
- Huang YY, Bach ME, Lipp HP, Zhuo M, Wolfer DP, Hawkins RD, ... Carmeliet P (1996) Mice lacking the gene encoding tissue-type plasminogen activator show a selective interference with late-phase long-term potentiation in both Schaffer collateral and mossy fiber pathways *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**, 8699–8704.
- Huber D, Cramer EM, Kaufmann JE, Meda P, Massé JM, Kruithof EKO, and Vischer UM (2002) Tissue-type plasminogen activator (t-PA) is stored in Weibel-Palade bodies in human endothelial cells both in vitro and in vivo *Blood* **99**, 3637–3645.

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

Hunt S, Sun Y, Kucukdereli H, Klein R, and Sah P (2017) Intrinsic circuits in the lateral central amygdala *ENeuro* **4**.

Hurtado M, Lozano JJ, Castellanos E, López-Fernández LA, Harshman K, Martínez-A C, ... Paciucci R (2007) Activation of the epidermal growth factor signalling pathway by tissue plasminogen activator in pancreas cancer cells *Gut*.

Hylin MJ, Orsi SA, Moore AN, and Dash PK (2013) Disruption of the perineuronal net in the hippocampus or medial prefrontal cortex impairs fear conditioning *Learn Mem* **20**, 267–273.

I

Iadecola C (2017, September 27) The Neurovascular Unit Coming of Age: A Journey through Neurovascular Coupling in Health and Disease *Neuron*. Cell Press.

Ichinose A, Kisiel W, and Fujikawa K (1984) Proteolytic activation of tissue plasminogen activator by plasma and tissue enzymes *FEBS Lett*.

J

Jackson KL, Dayton RD, Deverman BE, and Klein RL (2016) Better targeting, better efficiency for wide-scale neuronal transduction with the synapsin promoter and AAV-PHP.B *Front Mol Neurosci* **9**.

Jiang H, Li X, Chen S, Lu N, Yue Y, Liang J, ... Yuan Y (2016) Plasminogen Activator Inhibitor-1 in depression: Results from Animal and Clinical Studies *Sci Rep* **6**.

Johnston JB (1923) Further contributions to the study of the evolution of the forebrain *J Comp Neurol* **35**, 337–481.

Jones FS, and Jones PL (2000, June 1) The tenascin family of ECM glycoproteins: Structure, function, and regulation during embryonic development and tissue remodeling *Dev Dyn*. John Wiley & Sons, Ltd.

Jones LL, Margolis RU, and Tuszynski MH (2003) The chondroitin sulfate proteoglycans neurocan, brevican, phosphacan, and versican are differentially regulated following spinal cord injury *Exp Neurol* **182**, 399–411.

Joo SH, Kwon KJ, Kim JW, Kim JW, Hasan MR, Lee HJ, ... Shin CY (2010) Regulation of matrix metalloproteinase-9 and tissue plasminogen activator activity by alpha-synuclein in rat primary glial cells *Neurosci Lett* **469**, 352–356.

K

Kagitani H, Tagawa M, Hatanaka K, Ikari T, Saito A, Bando H, ... Matsuo O (1985) Expression in E. coli of finger-domain lacking tissue-type plasminogen activator with high fibrin affinity *FEBS Lett* **189**, 145–149.

Kaliszewska A, Bijata M, Kaczmarek L, and Kossut M (2012) Experience-dependent plasticity of the barrel cortex in mice observed with 2-DG brain mapping and c-Fos: Effects of MMP-9 KO *Cereb Cortex* **22**, 2160–2170.

Kaneko M, Sakata Y, Matsuda M, and Mimuro J (1992) Interactions between the finger and kringle-2

- domains of tissue-type plasminogen activator and plasminogen activator inhibitor-1 *J Biochem.*
- Kaplan A, Spiller KJ, Towne C, Kanning KC, Choe GT, Geber A, ... Henderson CE (2014) Neuronal matrix Metalloproteinase-9 is a determinant of selective Neurodegeneration *Neuron* **81**, 333–348.
- Kauer JA, Malenka RC, and Nicoll RA (1988) NMDA application potentiates synaptic transmission in the hippocampus *Nature* **334**, 250–252.
- Kelly EA, Russo AS, Jackson CD, Lamantia CEL, and Majewska AK (2015) Proteolytic regulation of synaptic plasticity in the mouse primary visual cortex: Analysis of matrix metalloproteinase 9 deficient mice *Front Cell Neurosci* **9**.
- Kenagy RD, Fischer JW, Davies MG, Berceli SA, Hawkins SM, Wight TN, and Clowes AW (2002) Increased plasmin and serine proteinase activity during flow-induced intimal atrophy in baboon PTFE grafts *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **22**, 400–404.
- Kheirbek MA, Drew LJ, Burghardt NS, Costantini DO, Tannenholz L, Ahmari SE, ... Henl R (2013) Differential control of learning and anxiety along the dorsoventral axis of the dentate gyrus *Neuron* **77**, 955–968.
- Kiani C, Chen L, Wu YJ, Yee AJ, and Yang BB (2002) *Structure and function of aggrecan Cell Research* (Vol. 12). Retrieved from <http://www.cell-research.com>
- Kim JW, Lee SH, Ko HM, Kwon KJ, Cho KS, Choi CS, ... Shin CY (2011) Biphasic regulation of tissue plasminogen activator activity in ischemic rat brain and in cultured neural cells: Essential role of astrocyte-derived plasminogen activator inhibitor-1 *Neurochem Int* **58**, 423–433.
- Kim SY, Adhikari A, Lee SY, Marshel JH, Kim CK, Mallory CS, ... Deisseroth K (2013) Diverging neural pathways assemble a behavioural state from separable features in anxiety *Nature* **496**, 219–223.
- Kjelstrup KG, Tuvnes FA, Steffenach HA, Murison R, Moser EI, and Moser MB (2002) Reduced fear expression after lesions of the ventral hippocampus *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**, 10825–10830.
- Korotkova T, Fuchs EC, Ponomarenko A, von Engelhardt J, and Monyer H (2010) NMDA Receptor Ablation on Parvalbumin-Positive Interneurons Impairs Hippocampal Synchrony, Spatial Representations, and Working Memory *Neuron* **68**, 557–569.
- Korte M, and Schmitz D (2016) Cellular and system biology of memory: Timing, molecules, and beyond *Physiol Rev* **96**, 647–693.
- Krizo JA, Moreland LE, Rastogi A, Mou X, Prosser RA, and Mintz EM (2018) Regulation of Locomotor activity in fed, fasted, and food-restricted mice lacking tissue-type plasminogen activator *BMC Physiol* **18**, 2.
- Krystosek A., and Seeds NW (1981) Plasminogen activator secretion by granule neurons in cultures of developing cerebellum *Proc Natl Acad Sci U S A* **78**, 7810–7814.
- Krystosek Alphonse, and Seeds NW (1981) Plasminogen activator release at the neuronal growth cone *Science (80-)* **213**, 1534.
- Kühn R, and Torres RM (2002) Cre/loxP recombination system and gene targeting. *Methods Mol Biol.* Springer, Totowa, NJ.
- Kuiper J, Otter M, Rijken DC, and Van Berkel TJC (1988) Characterization of the interaction in vivo of tissue-type plasminogen activator with liver cells *J Biol Chem.*
- Kwok JCF, Dick G, Wang D, and Fawcett JW (2011) Extracellular matrix and perineuronal nets in CNS repair *Dev Neurobiol* **71**, 1073–1089.

L

- Lakhan SE, Kirchgessner A, Tepper D, and Leonard A (2013) Matrix metalloproteinases and blood-brain barrier disruption in acute ischemic stroke *Front Neurol* **4** APR.
- Laurberg S (1979) Commissural and intrinsic connections of the rat hippocampus *J Comp Neurol* **184**, 685–708.
- Law RHP, Abu-Ssaydeh D, and Whisstock JC (2013, December 1) New insights into the structure and function of the plasminogen/plasmin system *Curr Opin Struct Biol*. Elsevier Current Trends.
- Ledoux JE (2000) Emotion circuits in the brain *Annu Rev Neurosci* **23**, 155–184.
- LeDoux JE (2000) Emotion Circuits in the Brain *Annu Rev Neurosci* **23**, 155–184.
- Lee H-Y, Hwang I-Y, Im H, Koh J-Y, and Kim Y-H (2007) Non-proteolytic neurotrophic effects of tissue plasminogen activator on cultured mouse cerebrocortical neurons *J Neurochem* **101**, 1236–1247.
- Lee SH, Ko HM, Kwon KJ, Lee J, Han SH, Han DW, ... Shin CY (2014) TPA regulates neurite outgrowth by phosphorylation of LRP5/6 in neural progenitor cells *Mol Neurobiol* **49**, 199–215.
- Lemarchant S, Pomeschik Y, Kidin I, Kärkkäinen V, Valonen P, Lehtonen S, ... Koistinaho J (2016) ADAMTS-4 promotes neurodegeneration in a mouse model of amyotrophic lateral sclerosis *Mol Neurodegener* **11**, 1–24.
- Lemarchant S, Pruvost M, Hébert M, Gauberti M, Hommet Y, Briens A, ... Vivien D (2014) TPA promotes ADAMTS-4-induced CSPG degradation, thereby enhancing neuroplasticity following spinal cord injury *Neurobiol Dis* **66**, 28–42.
- Lenoir S, Varangot A, Lebouvier L, Galli T, Hommet Y, and Vivien D (2019) Post-synaptic release of the neuronal tissue-type plasminogen activator (tPA) *Front Cell Neurosci* **13**.
- Lensjø KK, Lepperød ME, Dick G, Hafting T, and Fyhn M (2017) Removal of perineuronal nets unlocks juvenile plasticity through network mechanisms of decreased inhibition and increased gamma activity *J Neurosci* **37**, 1269–1283.
- Leonetti C, Macrez R, Pruvost M, Hommet Y, Bronsard J, Fournier A, ... Docagne F (2017) Tissue-type plasminogen activator exerts EGF-like chemokinetic effects on oligodendrocytes in white matter (re)myelination *Mol Neurodegener* **12**.
- Lesept F, Chevilly A, Jezequel J, Ladépêche L, Macrez R, Aimable M, ... Vivien D (2016) Tissue-type plasminogen activator controls neuronal death by raising surface dynamics of extrasynaptic NMDA receptors *Cell Death Dis* **7**, e2466–e2466.
- Leutgeb JK, Leutgeb S, Moser MB, and Moser EI (2007) Pattern separation in the dentate gyrus and CA3 of the hippocampus *Science (80-)* **315**, 961–966.
- Levin EG, Santell L, and Osborn KG (1997) The expression of endothelial tissue plasminogen activator in vivo: A function defined by vessel size and anatomic location *J Cell Sci* **110**, 139–148.
- Li H, Penzo MA, Taniguchi H, Kopec CD, Huang ZJ, Li B, and Harbor CS (2013) Experience-dependent modification of a central amygdala fear circuit *Nat Neurosci* **16**, 332–339.
- Li J, Yu L, Gu X, Ma Y, Pasqualini R, Arap W, ... Sidman RL (2013) Tissue plasminogen activator regulates Purkinje neuron development and survival *Proc Natl Acad Sci U S A* **110**.
- Lijnen HR (2001) Plasmin and matrix metalloproteinases in vascular remodeling In *Thrombosis and Haemostasis* (Vol. 86, pp. 324–333).

- Linden AM, Greene SJ, Bergeron M, and Schoepp DD (2004) Anxiolytic activity of the MGLU2/3 receptor agonist LY354740 on the elevated plus maze is associated with the suppression of stress-induced c-Fos in the hippocampus and increases in c-Fos induction in several other stress-sensitive brain regions *Neuropsychopharmacology* **29**, 502–513.
- Liot G, Benchenane K, Léveillé F, López-Atalaya JP, Fernández-Monreal M, Ruocco A, ... Vivien D (2004) 2,7-bis-(4-amidinobenzylidene)-cycloheptan-1-one dihydrochloride, tPA stop, prevents tPA-enhanced excitotoxicity both in vitro and in vivo *J Cereb Blood Flow Metab* **24**, 1153–1159.
- Liot G, Roussel BD, Lebeurrier N, Benchenane K, López-Atalaya JP, Vivien D, and Ali C (2006) Tissue-type plasminogen activator rescues neurones from serum deprivation-induced apoptosis through a mechanism independent of its proteolytic activity *J Neurochem* **98**, 1458–1464.
- Liotta LA, Goldfarb RH, Brundage R, Siegal GP, Terranova V, and Garbisa S (1981) Effect of Plasminogen Activator (Urokinase), Plasmin, and Thrombin on Glycoprotein and Collagenous Components of Basement Membrane *Cancer Res* **41**.
- Liu Z, Li Y, Qian J, Cui Y, and Chopp M (2014) Plasminogen Deficiency Causes Reduced Corticospinal Axonal Plasticity and Functional Recovery after Stroke in Mice *PLoS One* **9**, e94505.
- Lochner JE, Honigman LS, Grant WF, Gessford SK, Hansen AB, Silverman MA, and Scalettar BA (2006) Activity-dependent release of tissue plasminogen activator from the dendritic spines of hippocampal neurons revealed by live-cell imaging *J Neurobiol*.
- Lochner JE, Kingma M, Kuhn S, Meliza CD, Cutler B, and Scalettar BA (1998) Real-time imaging of the axonal transport of granules containing a tissue plasminogen activator/green fluorescent protein hybrid *Mol Biol Cell* **9**, 2463–2476.
- Lopez-Atalaya JP, Roussel BD, Levrat D, Parcq J, Nicole O, Hommet Y, ... Vivien D (2008) Toward safer thrombolytic agents in stroke: Molecular requirements for NMDA receptor-mediated neurotoxicity *J Cereb Blood Flow Metab*.
- Lorenzo Bozzelli P, Alaiyed S, Kim E, Villapol S, and Conant K (2018) Proteolytic Remodeling of Perineuronal Nets: Effects on Synaptic Plasticity and Neuronal Population Dynamics *Neural Plast* **2018**.
- Louessard M, Lacroix A, Martineau M, Mondielli G, Montagne A, Lesept F, ... Maubert E (2016) Tissue Plasminogen Activator Expression Is Restricted to Subsets of Excitatory Pyramidal Glutamatergic Neurons *Mol Neurobiol* **53**, 5000–5012.
- Lovejoy DA, Chang BSW, Lovejoy NR, and del Castillo J (2014) Molecular evolution of GPCRs: CRH/CRH receptors *J Mol Endocrinol* **52**, 43–60.
- Lüthi A, Van Der Putten H, Botteri FM, Mansuy IM, Meins M, Frey U, ... Monard D (1997) Endogenous serine protease inhibitor modulates epileptic activity and hippocampal long-term potentiation *J Neurosci* **17**, 4688–4699.

M

- Mackay AR, Corbitt RH, Hartzler JL, and Thorgeirsson UP (1990) Basement Membrane Type IV Collagen Degradation: Evidence for the Involvement of a Proteolytic Cascade Independent of Metalloproteinases *Cancer Res* **50**.
- MacLean PD (1949) Psychosomatic disease and the visceral brain; recent developments bearing on the Papez theory of emotion. *Psychosom Med* **11**, 338–353.
- MacLean PD (1952) Some psychiatric implications of physiological studies on frontotemporal portion

- of limbic system (Visceral brain) *Electroencephalogr Clin Neurophysiol* **4**, 407–418.
- Macrez R, Bezin L, Le Mauff B, Ali C, and Vivien D (2010) Functional occurrence of the interaction of tissue plasminogen activator with the NR1 subunit of N-methyl-D-aspartate receptors during stroke *Stroke* **41**, 2950–2955.
- Macrez R, Ortega MC, Bardou I, Mehra A, Fournier A, Van Der Pol SMA, ... Docagne F (2016) Neuroendothelial NMDA receptors as therapeutic targets in experimental autoimmune encephalomyelitis *Brain*.
- Madani R, Hulo S, Toni N, Madani H, Steimer T, Muller D, and Vassalli JD (1999) Enhanced hippocampal long-term potentiation and learning by increased neuronal expression of tissue-type plasminogen activator in transgenic mice *EMBO J* **18**, 3007–3012.
- Madani R, Kozlov S, Akhmedov A, Cinelli P, Kinter J, Lipp HP, ... Wolfer DP (2003) Impaired explorative behavior and neophobia in genetically modified mice lacking or overexpressing the extracellular serine protease inhibitor neuroserpin *Mol Cell Neurosci* **23**, 473–494.
- Madinier A, Quattromani MJ, Sjölund C, Ruscher K, and Wieloch T (2014) Enriched housing enhances recovery of limb placement ability and reduces aggrecan-containing perineuronal nets in the rat somatosensory cortex after experimental stroke *PLoS One* **9**.
- Mannaioni G, Orr AG, Hamill CE, Yuan H, Pedone KH, McCoy KL, ... Traynelis SF (2008) Plasmin potentiates synaptic N-methyl-D-aspartate receptor function in hippocampal neurons through activation of protease-activated receptor-1 *J Biol Chem* **283**, 20600–20611.
- Marcos-Contreras OA, De Lizarrondo SM, Bardou I, Orset C, Pruvost M, Anfray A, ... Gauberti M (2016) Hyperfibrinolysis increases blood-brain barrier permeability by a plasmin- and bradykinin-dependent mechanism *Blood* **128**, 2423–2434.
- Marr D (1971) Simple memory: a theory for archicortex *Philos Trans R Soc London B, Biol Sci* **262**, 23–81.
- Massey JM, Amps J, Viapiano MS, Matthews RT, Wagoner MR, Whitaker CM, ... Onifer SM (2008) Increased chondroitin sulfate proteoglycan expression in denervated brainstem targets following spinal cord injury creates a barrier to axonal regeneration overcome by chondroitinase ABC and neurotrophin-3 *Exp Neurol* **209**, 426–445.
- Mataga N, Imamura K, Shiomitsu T, Yoshimura Y, Fukamauchi F, and Watanabe Y (1996) Enhancement of mRNA expression of tissue-type plasminogen activator by L-threo-3,4-dihydroxyphenylserine in association with ocular dominance plasticity *Neurosci Lett* **218**, 149–152.
- Mataga N, Mizuguchi Y, and Hensch TK (2004) Experience-dependent pruning of dendritic spines in visual cortex by tissue plasminogen activator *Neuron* **44**, 1031–1041.
- Mataga N, Nagai N, and Hensch TK (2002) Permissive proteolytic activity for visual cortical plasticity *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**, 7717–7721.
- Matsui F, Nishizuka M, Yasuda Y, Aono S, Watanabe E, and Oohira A (1998) Occurrence of a N-terminal proteolytic fragment of neurocan, not a C-terminal half, in a perineuronal net in the adult rat cerebrum *Brain Res* **790**, 45–51.
- Matthews RT, Kelly GM, Zerillo CA, Gray G, Tiemeyer M, and Hockfield S (2002) Aggrecan glycoforms contribute to the molecular heterogeneity of perineuronal nets *J Neurosci* **22**, 7536–7547.
- Matys T., Pawlak R, and Strickland S (2005) Tissue plasminogen activator in the bed nucleus of stria terminalis regulates acoustic startle *Neuroscience* **135**, 715–722.

- Matys Tomasz, Pawlak R, Matys E, Pavlides C, McEwen BS, and Strickland S (2004) Tissue plasminogen activator promotes the effects of corticotropin-releasing factor on the amygdala and anxiety-like behavior *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**, 16345–16350.
- Mauney SA, Athanas KM, Pantazopoulos H, Shaskan N, Passeri E, Berretta S, and Woo TUW (2013) Developmental pattern of perineuronal nets in the human prefrontal cortex and their deficit in schizophrenia *Biol Psychiatry* **74**, 427–435.
- McDonald A. J., Mascagni F, and Guo L (1996) Projections of the medial and lateral prefrontal cortices to the amygdala: A Phaseolus vulgaris leucoagglutinin study in the rat *Neuroscience* **71**, 55–75.
- McDonald AJ (2003) Is there an amygdala and how far does it extend? An anatomical perspective In *Annals of the New York Academy of Sciences* (Vol. 985, pp. 1–21). New York Academy of Sciences.
- McDonald Alexander J. (1998) Cortical pathways to the mammalian amygdala *Prog Neurobiol* **55**, 257–332.
- McNaughton B, Barnes C, and Sutherland R (1989) *Experimental Brain Research Hippocampal granule cells are necessary for normal spatial learning but not for spatially-selective pyramidal cell discharge Exp Brain Res* (Vol. 76).
- Mcrae PA, Baranov E, Rogers SL, and Porter BE (2012) Persistent decrease in multiple components of the perineuronal net following status epilepticus *Eur J Neurosci* **36**, 3471–3482.
- Mehra A, Guérit S, Macrez R, Gosselet F, Sevin E, Lebas H, ... Docagne F (2020) Nonionotropic action of endothelial NMDA receptors on blood–brain barrier permeability via Rho/ROCK-mediated phosphorylation of myosin *J Neurosci* **40**, 1778–1787.
- Meyer-Puttlitz B, Junker E, Margolis RU, and Margolis RK (1996) Chondroitin sulfate proteoglycans in the developing central nervous system. II. Immunocytochemical localization of neurocan and phosphacan *J Comp Neurol* **366**, 44–54.
- Milev P, Maurel P, Chiba A, Mevissen M, Popp S, Yamaguchi Y, ... Margolis RU (1998) Differential regulation of expression of hyaluronan-binding proteoglycans in developing brain: Aggrecan, versican, neurocan, and brevican *Biochem Biophys Res Commun* **247**, 207–212.
- Millan MJ (2003) The neurobiology and control of anxious states *Prog Neurobiol*. Elsevier Ltd.
- Miranda E, and Lomas DA (2006, March) Neuroserpin: A serpin to think about *Cell Mol Life Sci*. Cell Mol Life Sci.
- Miyata Seiji, Nishimura Y, and Nakashima T (2007) Perineuronal nets protect against amyloid β -protein neurotoxicity in cultured cortical neurons *Brain Res* **1150**, 200–206.
- Miyata Shinji, Nadanaka S, Igarashi M, and Kitagawa H (2018) Structural Variation of Chondroitin Sulfate Chains Contributes to the Molecular Heterogeneity of Perineuronal Nets *Front Integr Neurosci* **12**.
- Mochan E, and Keler T (1984) Plasmin degradation of cartilage proteoglycan *BBA - Gen Subj* **800**, 312–315.
- Moonen G, Grau-Wagemans MP, and Selak I (1982) Plasminogen activator-plasmin system and neuronal migration *Nature* **298**, 753–755.
- Morawski M, Brückner MK, Riederer P, Brückner G, and Arendt T (2004) Perineuronal nets potentially protect against oxidative stress *Exp Neurol* **188**, 309–315.
- Morawski M, Dityatev A, Hartlage-Rübsamen M, Blosa M, Holzer M, Flach K, ... Schachner M (2014) Tenascin-R promotes assembly of the extracellular matrix of perineuronal nets via clustering of

aggrecan *Philos Trans R Soc B Biol Sci* **369**.

- Morawski M, Pavlica S, Seeger G, Grosche J, Kouznetsova E, Schliebs R, ... Arendt T (2010) Perineuronal nets are largely unaffected in Alzheimer model Tg2576 mice *Neurobiol Aging* **31**, 1254–1256.
- Morellini F, Sivukhina E, Stoenica L, Oulianova E, Bukalo O, Jakovcevski I, ... Schachner M (2010) Improved reversal learning and working memory and enhanced reactivity to novelty in mice with enhanced GABAergic innervation in the dentate gyrus *Cereb Cortex* **20**, 2712–2727.
- Morgagni BB (1761) G.B. Morgagni: De sedibus et causis morborum per anatomen indagatis. *G Ital Cardiol*.
- Morris RGM, Garrud P, Rawlins JNP, and O'Keefe J (1982) Place navigation impaired in rats with hippocampal lesions *Nature* **297**, 681–683.
- Moser MB, and Moser EI (1998) Functional differentiation in the hippocampus *Hippocampus* **8**, 608–619.
- Moser MB, Moser EI, Forrest E, Andersen P, and Morris RGM (1995) Spatial learning with a minislab in the dorsal hippocampus *Proc Natl Acad Sci U S A* **92**, 9697–9701.
- Müller CM, and Griesinger CB (1998) Tissue plasminogen activator mediates reverse occlusion plasticity in visual cortex *Nat Neurosci* **1**, 47–53.
- Müller G, and Pilzecker A (n.d.) Experimentelle beiträge zur lehre vom gedächtniss: Zeitschrift Für In *Psychol Ergänzungsband* (pp. 1–300).
- Müller MB, Zimmermann S, Sillaber I, Hagemeyer TP, Deussing JM, Timpl P, ... Wurst W (2003) Limbic corticotropin-releasing hormone receptor 1 mediates anxiety-related behavior and hormonal adaptation to stress *Nat Neurosci* **6**, 1100–1107.

N

- Nakagami Y, Abe K, Nishiyama N, and Matsuki N (2000) Laminin degradation by plasmin regulates long-term potentiation *J Neurosci* **20**, 2003–2010.
- Nakazawa K, McHugh TJ, Wilson MA, and Tonegawa S (2004) NMDA receptors, place cells and hippocampal spatial memory *Nat Rev Neurosci*. Nature Publishing Group.
- Nandadasa S, Foulcer S, and Apte SS (2014) The multiple, complex roles of versican and its proteolytic turnover by ADAMTS proteases during embryogenesis *Matrix Biol*. Elsevier.
- Nascimento Häckl LP, and Carobrez AP (2007) Distinct ventral and dorsal hippocampus AP5 anxiolytic effects revealed in the elevated plus-maze task in rats *Neurobiol Learn Mem* **88**, 177–185.
- Nassar T, Akkawi S, Shina A, Haj-Yehia A, Bdeir K, Tarshis M, ... Higazi AAR (2004) In vitro and in vivo effects of tPA and PAI-1 on blood vessel tone *Blood* **103**, 897–902.
- National Institute of Neurological Disorders and Stroke rt-PA Stroke Study Group (1995) Tissue Plasminogen Activator for Acute Ischemic Stroke *N Engl J Med* **333**, 1581–1588.
- Neves G, Cooke SF, and Bliss TVP (2008, January) Synaptic plasticity, memory and the hippocampus: A neural network approach to causality *Nat Rev Neurosci*.
- Nicole O, Docagne F, Ali C, Margail I, Carmeliet P, Mackenzie ET, ... Buisson A (2001) The proteolytic activity of tissue-plasminogen activator enhances NMDA receptor-mediated signaling *Nat Med* **7**.
- Niego B, Freeman R, Puschmann TB, Turnley AM, and Medcalf RL (2012) t-PA-specific modulation of a

human blood-brain barrier model involves plasmin-mediated activation of the Rho kinase pathway in astrocytes *Blood* **119**, 4752–4761.

Niewoehner B, Single FN, Hvalby, Jensen V, Meyer Zum Alten Borgloh S, Seeburg PH, ... Bannerman DM (2007) Impaired spatial working memory but spared spatial reference memory following functional loss of NMDA receptors in the dentate gyrus *Eur J Neurosci* **25**, 837–846.

Noé FM, Bellistri E, Colciaghi F, Cipelletti B, Battaglia G, de Curtis M, and Librizzi L (2016) Kainic acid-induced albumin leak across the blood-brain barrier facilitates epileptiform hyperexcitability in limbic regions *Epilepsia* **57**, 967–976.

Nolin WB, Emmetsberger J, Bukhari N, Zhang Y, Levine JM, and Tsirka SE (2008) tPA-Mediated Generation of Plasmin Is Catalyzed by the Proteoglycan NG2 **56**, 177–189.

Norris EH, and Strickland S (2007) Modulation of NR2B-regulated contextual fear in the hippocampus by the tissue plasminogen activator system *Proc Natl Acad Sci U S A* **104**, 13473–13478.

Novak U, and Kaye AH (2000) Extracellular matrix and the brain: Components and function *J Clin Neurosci*. Churchill Livingstone.

Nuss P (2015) Anxiety disorders and GABA neurotransmission: A disturbance of modulation *Neuropsychiatr Dis Treat* **11**, 165–175.

O

O'Keefe J., and Dostrovsky J (1971) The hippocampus as a spatial map. Preliminary evidence from unit activity in the freely-moving rat *Brain Res* **34**, 171–175.

O'Keefe John, and Nadel L (1978) *The Hippocampus as a Cognitive Map Philosophical Studies* (Vol. 27). Press, Oxford: Clarendon.

O'Mullane MJ, and Baker MS (1999) Elevated plasminogen receptor expression occurs as a degradative phase event in cellular apoptosis *Immunol Cell Biol* **77**, 249–255.

Obiang P, Macrez R, Jullienne A, Bertrand T, Lesept F, Ali C, ... Agin V (2012) GluN2D subunit-containing NMDA receptors control tissue plasminogen activator-mediated spatial memory *J Neurosci* **32**, 12726–12734.

Obiang P, Maubert E, Bardou I, Nicole O, Launay S, Bezin L, ... Agin V (2011) Enriched housing reverses age-associated impairment of cognitive functions and tPA-dependent maturation of BDNF *Neurobiol Learn Mem*.

Oh SB, Byun CJ, Yun JH, Jo DG, Carmeliet P, Koh JY, and Lee JY (2014) Tissue plasminogen activator arrests Alzheimer's disease pathogenesis *Neurobiol Aging* **35**, 511–519.

Oohashi T, Hirakawa S, Bekku Y, Rauch U, Zimmermann DR, Su WD, ... Ninomiya Y (2002) Bral1, a brain-specific link protein, colocalizing with the versican V2 isoform at the nodes of Ranvier in developing and adult mouse central nervous systems *Mol Cell Neurosci* **19**, 43–57.

Oohira A, Matsui F, Watanabe E, Kushima Y, and Maeda N (1994) Developmentally regulated expression of a brain specific species of chondroitin sulfate proteoglycan, neurocan, identified with a monoclonal antibody 1G2 in the rat cerebrum *Neuroscience* **60**, 145–157.

Oray S, Majewska A, and Sur M (2004) Dendritic spine dynamics are regulated by monocular deprivation and extracellular matrix degradation *Neuron* **44**, 1021–1030.

Orlando C, Ster J, Gerber U, Fawcett JW, and Raineteau O (2012) Perisynaptic chondroitin sulfate proteoglycans restrict structural plasticity in an integrin-dependent manner *J Neurosci* **32**,

18009–18017.

Osterwalder T, Cinelli P, Baici A, Pennella A, Krueger SR, Schrimpf SP, ... Sonderegger P (1998) The axonally secreted serine proteinase inhibitor, neuroserpin, inhibits plasminogen activators and plasmin but not thrombin *J Biol Chem*.

P

Pang PT, Teng HK, Zaitsev E, Woo NT, Sakata K, Zhen S, ... Lu B (2004) Cleavage of proBDNF by tPA/plasmin is essential for long-term hippocampal plasticity *Science* (80-).

Pantazopoulos H, and Berretta S (2016) In sickness and in health: Perineuronal nets and synaptic plasticity in psychiatric disorders *Neural Plast*. Hindawi Publishing Corporation.

Papez JW (1937) A proposed mechanism of emotion *Arch Neurol Psychiatry*.

Parcq J, Bertrand T, Montagne A, Baron AF, MacRez R, Billard JM, ... Vivien D (2012) Unveiling an exceptional zymogen: The single-chain form of tPA is a selective activator of NMDA receptor-dependent signaling and neurotoxicity *Cell Death Differ* **19**, 1983–1991.

Parekar T, and Dimitrov E (2018) The Central Amygdala Corticotropin-releasing hormone (CRH) Neurons Modulation of Anxiety-like Behavior and Hippocampus-dependent Memory in Mice *Neuroscience* **390**, 187–197.

Park L, Gallo EF, Anrather J, Wang G, Norris EH, Paul J, ... Iadecola C (2008) Key role of tissue plasminogen activator in neurovascular coupling *Proc Natl Acad Sci U S A* **105**, 1073–1078.

Parron C, Poucet B, and Save E (2004) Entorhinal cortex lesions impair the use of distal but not proximal landmarks during place navigation in the rat *Behav Brain Res* **154**, 345–352.

Party H, Dujarrier C, Hébert M, Lenoir S, Martinez De Lizarrondo S, Delépée R, ... Agin V (2019) Plasminogen Activator Inhibitor-1 (PAI-1) deficiency predisposes to depression and resistance to treatments *Acta Neuropathol Commun* **7**.

Pasquet N, Douceau S, Naveau M, Lesept F, Louessard M, Lebouvier L, ... Bardou I (2019) Tissue-Type Plasminogen Activator Controlled Corticogenesis Through a Mechanism Dependent of NMDA Receptors Expressed on Radial Glial Cells *Cereb Cortex* **29**.

Paulus MP, Feinstein JS, Castillo G, Simmons AN, and Stein MB (2005) Dose-dependent decrease of activation in bilateral amygdala and insula by lorazepam during emotion processing *Arch Gen Psychiatry* **62**, 282–288.

Pawlak R., Nagai N, Urano T, Napiorkowska-Pawlak D, Ihara H, Takada Y, ... Takada A (2002) Rapid, specific and active site-catalyzed effect of tissue-plasminogen activator on hippocampus-dependent learning in mice *Neuroscience*.

Pawlak Robert, Magarinos AM, Melchor J, McEwen B, and Strickland S (2003) Tissue plasminogen activator in the amygdala is critical for stress-induced anxiety-like behavior *Nat Neurosci* **6**, 168–174.

Pawlak Robert, Rao BSS, Melchor JP, Chattarji S, McEwen B, and Strickland S (2005) Tissue plasminogen activator and plasminogen mediate stress-induced decline of neuronal and cognitive functions in the mouse hippocampus *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**, 18201–18206.

Pennica D, Holmes WE, Kohr WJ, Harkins RN, Vehar GA, Ward CA, ... Collen D (1983) Cloning and expression of human tissue-type plasminogen activator cDNA in *E. coli* *Nature* **301**, 214–221.

Pesarico AP, Bueno-Fernandez C, Guirado R, Gómez-Climent MÁ, Curto Y, Carceller H, and Nacher J

- (2019) Chronic Stress Modulates Interneuronal Plasticity: Effects on PSA-NCAM and Perineuronal Nets in Cortical and Extracortical Regions *Front Cell Neurosci* **13**, 197.
- Phelps EA, and LeDoux JE (2005, October 20) Contributions of the amygdala to emotion processing: From animal models to human behavior *Neuron*. Neuron.
- Pitkänen A, Savander V, and LeDoux JE (1997, November 1) Organization of intra-amygdaloid circuitries in the rat: An emerging framework for understanding functions of the amygdala *Trends Neurosci*. Trends Neurosci.
- Pittman RN, and DiBenedetto AJ (2002) PC12 Cells Overexpressing Tissue Plasminogen Activator Regenerate Neurites to a Greater Extent and Migrate Faster than Control Cells in Complex Extracellular Matrix *J Neurochem* **64**, 566–575.
- Pizzorusso T, Medini P, Berardi N, Chierzi S, Fawcett J, and Maffei L (2002) Reactivation of Ocular Dominance Plasticity in the Adult Visual Cortex Author (s): Tommaso Pizzorusso , Paolo Medini , Nicoletta Berardi , Sabrina Chierzi , James W . Fawcett and Lamberto Maffei Reviewed work (s): Source : Science , New Series , Vol . *Science (80-)* **298**, 1248–1251.
- Pizzorusso T, Medini P, Landi S, Baldini S, Berardi N, and Maffei L (2006) Structural and functional recovery from early monocular deprivation in adult rats *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**, 8517–8522.
- Polavarapu R, Gongora MC, Yi H, Ranganathan S, Lawrence DA, Strickland D, and Yepes M (2007) Tissue-type plasminogen activator-mediated shedding of astrocytic low-density lipoprotein receptor-related protein increases the permeability of the neurovascular unit *Blood* **109**, 3270–3278.
- Popp S, Andersen JS, Maurel P, and Margolis RU (2003) Localization of aggrecan and versican in the developing rat central nervous system *Dev Dyn* **227**, 143–149.
- Pothakos K, Robinson JK, Gravanis I, Marsteller DA, Dewey SL, and Tsirka SE (2010) Decreased serotonin levels associated with behavioral disinhibition in tissue plasminogen activator deficient (tPA-/-) mice *Brain Res* **1326**, 135–142.
- Prut L, and Belzung C (2003, February 28) The open field as a paradigm to measure the effects of drugs on anxiety-like behaviors: A review *Eur J Pharmacol*. Elsevier.
- Pyka M, Wetzel C, Aguado A, Geissler M, Hatt H, and Faissner A (2011) Chondroitin sulfate proteoglycans regulate astrocyte-dependent synaptogenesis and modulate synaptic activity in primary embryonic hippocampal neurons *Eur J Neurosci* **33**, 2187–2202.

Q

- Qian Z, Gilbert ME, Colicos MA, Kandel ER, and Kuhl D (1993) Tissue-plasminogen activator is induced as an immediate-early gene during seizure, kindling and long-term potentiation *Nature* **361**, 453–457.
- Quattromani MJ, Pruvost M, Guerreiro C, Backlund F, Englund E, Aspberg A, ... Wieloch T (2018) Extracellular Matrix Modulation Is Driven by Experience-Dependent Plasticity During Stroke Recovery *Mol Neurobiol* **55**, 2196–2213.

R

- Ramon Cajal S (1894) The Croonian lecture.—La fine structure des centres nerveux *Proc R Soc London* **55**, 444–468.
- Rankin-Gee EK, McRae PA, Baranov E, Rogers S, Wandrey L, and Porter BE (2015) Perineuronal net

- degradation in epilepsy *Epilepsia* **56**, 1124–1133.
- Raum D, Marcus D, Alper CA, Levey R, Taylor PD, and Starzl TE (1980) Synthesis of human plasminogen by the liver *Science (80-)* **208**, 1036–1037.
- Reumann R, Vierk R, Zhou L, Gries F, Kraus V, Mienert J, ... Galliciotti G (2017) The serine protease inhibitor neuroserpin is required for normal synaptic plasticity and regulates learning and social behavior *Learn Mem* **24**, 650–659.
- Ribot T (1882) *Diseases of Memory, an Essay in the Positive Psychology*.
- Rijken D. C., Hoylaerts M, and Collen D (1982) Fibrinolytic properties of one-chain and two-chain human extrinsic (tissue-type) plasminogen activator *J Biol Chem*.
- Rijken Dingeman C., and Lijnen HR (2009) New insights into the molecular mechanisms of the fibrinolytic system *J Thromb Haemost.* *J Thromb Haemost.*
- Rogove AD, Siao CJ, Keyt B, Strickland S, and Tsirka SE (1999) Activation of microglia reveals a non-proteolytic cytokine function for tissue plasminogen activator in the central nervous system *J Cell Sci*.
- Romberg C, Yang S, Melani R, Andrews MR, Horner AE, Spillantini MG, ... Saksida LM (2013) Depletion of perineuronal nets enhances recognition memory and long-term depression in the perirhinal cortex *J Neurosci* **33**, 7057–7065.
- Rosenwald M, Koppe U, Keppeler H, Sauer G, Hennel R, Ernst A, ... Lauber K (2012) Serum-Derived Plasminogen Is Activated by Apoptotic Cells and Promotes Their Phagocytic Clearance *J Immunol* **189**, 5722–5728.
- Rossier J, Bernard A, Cabungcal JH, Perrenoud Q, Savoye A, Gallopin T, ... Lein ES (2015) Cortical fast-spiking parvalbumin interneurons enwrapped in the perineuronal net express the metallopeptidases Adamts8, Adamts15 and Neprilysin *Mol Psychiatry* **20**, 154–161.
- Rouf SA, Moo-Young M, and Chisti Y (1996, January 1) Tissue-type plasminogen activator: Characteristics, applications and production technology *Biotechnol Adv.* Pergamon Press Ltd.
- Roussel BD, MacRez R, Jullienne A, Agin V, Maubert E, Dauphinot L, ... Vivien D (2009) Age and albumin D site-binding protein control tissue plasminogen activator levels: Neurotoxic impact *Brain* **132**, 2219–2230.
- Rowlands D, Lensjø KK, Dinh T, Yang S, Andrews MR, Hafting T, ... Dick G (2018) Aggrecan directs extracellular matrix-mediated neuronal plasticity *J Neurosci* **38**, 10102–10113.
- Russell VA (2011) Overview of Animal Models of Attention Deficit Hyperactivity Disorder (ADHD) *Curr Protoc Neurosci* **54**, 9.35.1-9.35.25.

S

- Sah P, Faber ESL, De Armentia ML, and Power J (2003) The amygdaloid complex: Anatomy and physiology *Physiol Rev.* American Physiological Society.
- Sallés FJ, and Strickland S (2002) Localization and regulation of the tissue plasminogen activator-plasmin system in the hippocampus *J Neurosci* **22**, 2125–2134.
- Samson AL, Nevin ST, Croucher D, Niego B, Daniel PB, Weiss TW, ... Medcalf RL (2008) Tissue-type plasminogen activator requires a co-receptor to enhance NMDA receptor function *J Neurochem*

107, 1091–1101.

- Sanders SK, and Shekhar A (1995) Regulation of anxiety by GABAA receptors in the rat amygdala *Pharmacol Biochem Behav* **52**, 701–706.
- Sappino AP, Madani R, Huarte J, Belin D, Kiss JZ, Wohlwend A, and Vassalli JD (1993) Extracellular proteolysis in the adult murine brain *J Clin Invest* **92**, 679–685.
- Sartori SB, Landgraf R, and Singewald N (2011, July) The clinical implications of mouse models of enhanced anxiety *Future Neurol*. Europe PMC Funders.
- Sato M, Kawano M, Yanagawa Y, and Hayashi Y (2016) In vivo two-photon imaging of striatal neuronal circuits in mice *Neurobiol Learn Mem* **135**, 146–151.
- Save E, and Poucet B (2000) Involvement of the hippocampus and associative parietal cortex in the use of proximal and distal landmarks for navigation *Behav Brain Res* **109**, 195–206.
- Save E, and Poucet B (2009) Role of the parietal cortex in long-term representation of spatial information in the rat *Neurobiol Learn Mem* **91**, 172–178.
- Schmalfeldt M, Bandtlow CE, Dours-Zimmermann MT, Winterhalter KH, and Zimmermann DR (2000) *Brain derived versican V2 is a potent inhibitor of axonal growth*. Retrieved from www.cbs.dtu.dk/services/NetOGlyc/
- Schmidt S, Arendt T, Morawski M, and Sonntag M (2020) Neurocan Contributes to Perineuronal Net Development *Neuroscience* **442**, 69–86.
- Scott RW, Bergman BL, Bajpai A, Hersh RT, Rodriguez H, Jonesd BN, ... Bakera JB (1985) *THE JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY Protease Nexin PROPERTIES AND A MODIFIED PURIFICATION PROCEDURE** (Vol. 260).
- Scoville WB, and Milner B (1957) *LOSS OF RECENT MEMORY AFTER BILATERAL HIPPOCAMPAL LESIONS* *J. Neurol. Neurosurg. Psychiat.*
- Seeds NW, Basham ME, and Haffke SP (1999) Neuronal migration is retarded in mice lacking the tissue plasminogen activator gene *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**, 14118–14123.
- Seidenbecher CI, Gundelfinger ED, Böckers TM, Trotter J, and Kreutz MR (1998) Transcripts for secreted and GPI-anchored brevican are differentially distributed in rat brain *Eur J Neurosci* **10**, 1621–1630.
- Seidenbecher CI, Richter K, Rauch U, Fassler R, Garner CC, and Gundelfinger ED (1995) Brevican, a chondroitin sulfate proteoglycan of rat brain, occurs as secreted and cell surface glycosylphosphatidylinositol-anchored isoforms *J Biol Chem* **270**, 27206–27212.
- Senkov O, Andjus P, Radenovic L, Soriano E, and Dityatev A (2014) *Neural ECM molecules in synaptic plasticity, learning, and memory* *Progress in Brain Research* (1st ed., Vol. 214). Elsevier B.V.
- Sessolo M, Marcon I, Bovetti S, Losi G, Cammarota M, Ratto GM, ... Carmignoto G (2015) Parvalbumin-positive inhibitory interneurons oppose propagation but favor generation of focal epileptiform activity *J Neurosci* **35**, 9544–9557.
- Shepherd JK, Grewal SS, Fletcher A, Bill DJ, and Dourish CT (1994) Behavioural and pharmacological characterisation of the elevated “zero-maze” as an animal model of anxiety *Psychopharmacology (Berl)* **116**, 56–64.
- Shi W, Wei X, Wang X, Du S, Liu W, Song J, and Wang Y (2019) Perineuronal nets protect long-term memory by limiting activity-dependent inhibition from parvalbumin interneurons *Proc Natl Acad Sci U S A* **116**, 27063–27073.

- Shin CY, Kundel M, and Wells DG (2004) Rapid, activity-induced increase in tissue plasminogen activator is mediated by metabotropic glutamate receptor-dependent mRNA translation *J Neurosci* **24**, 9425–9433.
- Siao CJ, Fernandez SR, and Tsirka SE (2003) Cell type-specific roles for tissue plasminogen activator released by neurons or microglia after excitotoxic injury *J Neurosci* **23**, 3234–3242.
- Siao CJ, and Tsirka SE (2002) Tissue Plasminogen Activator Mediates Microglial Activation via Its Finger Domain through Annexin II *J Neurosci* **22**, 3352–3358.
- Siconolfi LB, and Seeds NW (2001) Induction of the plasminogen activator system accompanies peripheral nerve regeneration after sciatic nerve crush *J Neurosci* **21**, 4336–4347.
- Sigel E, and Luscher BP (2012) A Closer Look at the High Affinity Benzodiazepine Binding Site on GABAA Receptors *Curr Top Med Chem* **11**, 241–246.
- Simpson CS, Johnston HM, and Morris BJ (1994) Neuronal expression of protease-nexin 1 mRNA in rat brain *Neurosci Lett* **170**, 286–290.
- Sinnamon HM, Freniere S, and Kootz J (1978) Rat hippocampus and memory for places of changing significance *J Comp Physiol Psychol* **92**, 142–155.
- Slaker M, Churchill L, Todd RP, Blacktop JM, Zuloaga DG, Raber J, ... Sorg BA (2015) Removal of perineuronal nets in the medial prefrontal cortex impairs the acquisition and reconsolidation of a cocaine-induced conditioned place preference memory *J Neurosci* **35**, 4190–4202.
- Sohal VS, Zhang F, Yizhar O, and Deisseroth K (2009) Parvalbumin neurons and gamma rhythms enhance cortical circuit performance *Nature* **459**, 698–702.
- Soreq H, and Miskin R (1981) Plasminogen activator in the rodent brain *Brain Res* **216**, 361–374.
- Sorg BA, Berretta S, Blacktop JM, Fawcett JW, Kitagawa H, Kwok JCF, and Miquel M (2016) Casting a wide net: Role of perineuronal nets in neural plasticity In *Journal of Neuroscience* (Vol. 36, pp. 11459–11468). Society for Neuroscience.
- Sprengers ED, and Kluft C (1987) Plasminogen activator inhibitors *Blood*. Blood.
- Squire LR (2009, January 15) The Legacy of Patient H.M. for Neuroscience *Neuron*. NIH Public Access.
- Squire LR, Genzel L, Wixted JT, and Morris RG (2015) Memory consolidation *Cold Spring Harb Perspect Biol* **7**.
- Squire LR, and Zola SM (1996) Structure and function of declarative and nondeclarative memory systems *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**, 13515–13522.
- Steffenach HA, Witter M, Moser MB, and Moser EI (2005) Spatial memory in the rat requires the dorsolateral band of the entorhinal cortex *Neuron* **45**, 301–313.
- Steimer T (2002) The biology of fear- and anxiety-related behaviors *Dialogues Clin Neurosci*. Les Laboratoires Servier.
- Stein MB, Simmons AN, Feinstein JS, and Paulus MP (2007) Increased amygdala and insula activation during emotion processing in anxiety-prone subjects *Am J Psychiatry* **164**, 318–327.
- Stevenson TK, and Lawrence DA (2018) Characterization of tissue plasminogen activator expression and trafficking in the adult murine brain *ENeuro* **5**.
- Stoppel C, Albrecht A, Pape H-C, and Stork O (2006) Genes and neurons: molecular insights to fear and anxiety *Genes, Brain Behav* **5**, 34–47.

- Su EJ, Fredriksson L, Geyer M, Folestad E, Cale J, Andrae J, ... Lawrence DA (2008) Activation of PDGF-CC by tissue plasminogen activator impairs blood-brain barrier integrity during ischemic stroke *Nat Med* **14**, 731–737.
- Sugiyama S, Di Nardo AA, Aizawa S, Matsuo I, Volovitch M, Prochiantz A, and Hensch TK (2008) Experience-Dependent Transfer of Otx2 Homeoprotein into the Visual Cortex Activates Postnatal Plasticity *Cell* **134**, 508–520.
- Sullivan CS, Gotthardt I, Wyatt E V., Bongu S, Mohan V, Weinberg RJ, and Maness PF (2018) Perineuronal Net Protein Neurocan Inhibits NCAM/EphA3 Repellent Signaling in GABAergic Interneurons *Sci Rep* **8**, 1–15.
- Suttkus A, Rohn S, Weigel S, Glöckner P, Arendt T, and Morawski M (2014) Aggrecan, link protein and tenascin-R are essential components of the perineuronal net to protect neurons against iron-induced oxidative stress *Cell Death Dis* **5**, e1119–e1119.
- Suttkus Anne, Rohn S, Jäger C, Arendt T, and Morawski M (2012) Neuroprotection against iron-induced cell death by perineuronal nets - An in vivo analysis of oxidative stress *Am J Neurodegener Dis* **1**, 122–129.
- Suzuki Y, Nagai N, Umemura K, Collen D, and Lijnen HR (2007) Stromelysin-1 (MMP-3) is critical for intracranial bleeding after t-PA treatment of stroke in mice *J Thromb Haemost* **5**, 1732–1739.
- Szabo R, Samson AL, Lawrence DA, Medcalf RL, and Bugge TH (2016) Passenger mutations and aberrant gene expression in congenic tissue plasminogen activator-deficient mouse strains *J Thromb Haemost* **14**, 1618–1628.

T

- Takeuchi S, Nagatani K, Otani N, Nawashiro H, Sugawara T, Wada K, and Mori K (2015) Hydrogen improves neurological function through attenuation of blood-brain barrier disruption in spontaneously hypertensive stroke-prone rats *BMC Neurosci* **16**.
- Takeuchi T, Duzkiewicz AJ, and Morris RGM (2014, January 5) The synaptic plasticity and memory hypothesis: Encoding, storage and persistence *Philos Trans R Soc B Biol Sci*. Royal Society.
- Taniguchi Y, Inoue N, Morita S, Nikaido Y, Nakashima T, Nagai N, ... Miyata S (2011) Localization of plasminogen in mouse hippocampus, cerebral cortex, and hypothalamus *Cell Tissue Res* **343**, 303–317.
- Tauchi R, Imagama S, Natori T, Ohgomori T, Muramoto A, Shinjo R, ... Kadomatsu K (2012) The endogenous proteoglycan-degrading enzyme ADAMTS-4 promotes functional recovery after spinal cord injury *J Neuroinflammation* **9**, 53.
- Testa D, Prochiantz A, and Di Nardo AA (2019) Perineuronal nets in brain physiology and disease *Semin Cell Dev Biol* **89**, 125–135.
- Tewari BP, Chaunsali L, Campbell SL, Patel DC, Goode AE, and Sontheimer H (2018) Perineuronal nets decrease membrane capacitance of peritumoral fast spiking interneurons in a model of epilepsy *Nat Commun* **9**, 1–17.
- Thiebaut AM, Gauberti M, Ali C, Martinez De Lizarrondo S, Vivien D, Yepes M, and Roussel BD (2018, December 1) The role of plasminogen activators in stroke treatment: fibrinolysis and beyond *Lancet Neurol*. Lancet Publishing Group.
- Thompson EH, Lensjø KK, Wigestrands MB, Malthe-Sørensen A, Hafting T, and Fyhn M (2018) Removal of perineuronal nets disrupts recall of a remote fear memory *Proc Natl Acad Sci U S A* **115**, 607–

612.

- Tolman EC (1948) *THE PSYCHOLOGICAL REVIEW COGNITIVE MAPS IN RATS AND MEN* * (Vol. 55).
- Toshniwal PK, Tiku ML, Tiku K, and Skosey JL (1987) Secretion of plasminogen activator by cerebral astrocytes and its modulation *J Neurol Sci* **80**, 307–321.
- Tovote P, Fadok JP, and Lüthi A (2015) Neuronal circuits for fear and anxiety *Nat Publ Gr* **16**, 317.
- Trotter JH, Lussier AL, Psilos KE, Mahoney HL, Sponaugle AE, Hoe HS, ... Weeber EJ (2014) Extracellular proteolysis of reelin by tissue plasminogen activator following synaptic potentiation *Neuroscience* **274**, 299–307.
- Tsilibary E, Tzinia A, Radenovic L, Stamenkovic V, Lebitko T, Mucha M, ... Kaczmarek L (2014) *Neural ECM proteases in learning and synaptic plasticity Progress in Brain Research* (1st ed., Vol. 214). Elsevier B.V.
- Tsirka SE, Gualandris A, Amaral DG, and Strickland S (1995) Excitotoxin-induced neuronal degeneration and seizure are mediated by tissue plasminogen activator *Nature* **377**, 340–344.
- Tsirka SE, Rogove AD, Bugge TH, Degen JL, and Strickland S (1997) An extracellular proteolytic cascade promotes neuronal degeneration in the mouse hippocampus *J Neurosci* **17**, 543–552.
- Tye KM, Prakash R, Kim SY, Fenno LE, Grosenick L, Zarabi H, ... Deisseroth K (2011) Amygdala circuitry mediating reversible and bidirectional control of anxiety *Nature* **471**, 358–362.
- Tzarfaty-Majar V, López-Alemaný R, Feinstein Y, Gombau L, Goldshmidt O, Soriano E, ... Klar A (2001) Plasmin-mediated Release of the Guidance Molecule F-spondin from the Extracellular Matrix *J Biol Chem* **276**, 28233–28241.

U

- Ueno H, Fujii K, Suemitsu S, Murakami S, Kitamura N, Wani K, ... Takao K (2018) Expression of aggrecan components in perineuronal nets in the mouse cerebral cortex *IBRO Reports* **4**, 22–37.
- Ueno H, Suemitsu S, Okamoto M, Matsumoto Y, and Ishihara T (2017) Sensory experience-dependent formation of perineuronal nets and expression of Cat-315 immunoreactive components in the mouse somatosensory cortex *Neuroscience* **355**, 161–174.

V

- van Goethem NP, van Hagen BTJ, and Prickaerts J (2018) Assessing spatial pattern separation in rodents using the object pattern separation task *Nat Protoc* **13**, 1763–1792.
- Van Strien NM, Cappaert NLM, and Witter MP (2009, April) The anatomy of memory: An interactive overview of the parahippocampal- hippocampal network *Nat Rev Neurosci*. *Nat Rev Neurosci*.
- Vanden Berghe T, Hulpiau P, Martens L, Vandenbroucke RE, Van Wonterghem E, Perry SW, ... Vandenabeele P (2015) Passenger Mutations Confound Interpretation Of All Genetically Modified Congenic Mice *Immunity* **43**, 200–209.
- Vann SD, and Aggleton JP (2002) Extensive cytotoxic lesions of the rat retrosplenial cortex reveal consistent deficits on tasks that tax allocentric spatial memory *Behav Neurosci* **116**, 85–94.
- Végh MJ, Heldring CM, Kamphuis W, Hijazi S, Timmerman AJ, Li KW, ... van Kesteren RE (2014) Reducing hippocampal extracellular matrix reverses early memory deficits in a mouse model of Alzheimer's disease *Acta Neuropathol Commun* **2**.

Vertes RP (2004) Differential Projections of the Infralimbic and Prelimbic Cortex in the Rat *Synapse* **51**, 32–58.

W

Wagner SL, Geddes JW, Cotman CW, Lau AL, Gurwitz D, Isackson PJ, and Cunningham DD (1989) Protease nexin-1, an antithrombin with neurite outgrowth activity, is reduced in Alzheimer disease *Proc Natl Acad Sci U S A* **86**, 8284–8288.

Wallén P, Bergsdorf N, and Rånby M (1982) Purification and identification of two structural variants of porcine tissue plasminogen activator by affinity adsorption on fibrin *BBA - Gen Subj*.

Wang YF, Tsirka SE, Strickland S, Stieg PE, Soriano SG, and Lipton SA (1998) Tissue plasminogen activator (tPA) increases neuronal damage after focal cerebral ischemia in wild-type and tPA-deficient mice *Nat Med* **4**, 228–231.

Ware JH, DiBenedetto AJ, and Pitman RN (1995) Localization of tissue plasminogen activator mRNA in the developing rat cerebellum and effects of inhibiting tissue plasminogen activator on granule cell migration *J Neurobiol* **28**, 9–22.

Weeden CSS, Roberts JM, Kamm AM, and Kesner RP (2015) The role of the ventral dentate gyrus in anxiety-based behaviors *Neurobiol Learn Mem* **118**, 143–149.

Weimar W, Stibbe J, Van Seyen AJ, Billiau A, De Somer P, and Collen D (1981) SPECIFIC LYSIS OF AN ILIOFEMORAL THROMBUS BY ADMINISTRATION OF EXTRINSIC (TISSUE-TYPE) PLASMINOGEN ACTIVATOR *Lancet*.

Wen TH, Afroz S, Reinhard SM, Palacios AR, Tapia K, Binder DK, ... Ethell IM (2018) Genetic Reduction of Matrix Metalloproteinase-9 Promotes Formation of Perineuronal Nets Around Parvalbumin-Expressing Interneurons and Normalizes Auditory Cortex Responses in Developing *Fmr1* Knock-Out Mice *Cereb Cortex* **28**, 3951–3964.

Wiesel TN, and Hubel DH (1965) Extent of recovery from the effects of visual deprivation in kittens. *J Neurophysiol* **28**, 1060–1072.

Willard SS, and Koochekpour S (2013, September 22) Glutamate, glutamate receptors, and downstream signaling pathways *Int J Biol Sci*. Ivyspring International Publisher.

Wilson TD, Valdivia S, Khan A, Ahn HS, Adke AP, Gonzalez SM, ... Carrasquillo Y (2019) Dual and Opposing Functions of the Central Amygdala in the Modulation of Pain *Cell Rep* **29**, 332–346.e5.

Wu YP, Siao CJ, Lu W, Sung TC, Frohman MA, Milev P, ... Tsirka SE (2000) The tissue plasminogen activator (tPA)/plasmin extracellular proteolytic system regulates seizure-induced hippocampal mossy fiber outgrowth through a proteoglycan substrate *J Cell Biol* **148**, 1295–1304.

X

Xiang YY, Dong H, Wan Y, Li J, Yee A, Yang BB, and Lu WY (2006) Versican G3 domain regulates neurite growth and synaptic transmission of hippocampal neurons by activation of epidermal growth factor receptor *J Biol Chem* **281**, 19358–19368.

Y

Yakovlev PI (1948) Motility, behavior and the brain: Stereodynamic organization and neural coordinates of behavior *J Nerv Ment Dis* **107**, 313–335.

- Yan BC, Xu P, Gao M, Wang J, Jiang D, Zhu X, ... Su PQ (2018) Changes in the blood-brain barrier function are associated with hippocampal neuron death in a kainic acid mouse model of epilepsy *Front Neurol* **9**, 775.
- Yang S, Cacquevel M, Saksida LM, Bussey TJ, Schneider BL, Aebischer P, ... Spillantini MG (2015) Perineuronal net digestion with chondroitinase restores memory in mice with tau pathology *Exp Neurol* **265**, 48–58.
- Yao Y, and Tsirka SE (2011) Truncation of monocyte chemoattractant protein 1 by plasmin promotes blood-brain barrier disruption *J Cell Sci* **124**, 1486–1495.
- Ye Q, and Miao Q long (2013) Experience-dependent development of perineuronal nets and chondroitin sulfate proteoglycan receptors in mouse visual cortex *Matrix Biol* **32**, 352–363.
- Young JW, Light GA, Marston HM, Sharp R, and Geyer MA (2009) The 5-Choice Continuous Performance Test: Evidence for a Translational Test of Vigilance for Mice *PLoS One* **4**, e4227.
- Yu H, Schleuning WD, Michl M, Liberatore G, Tan SS, and Medcalf RL (2001) Control elements between -9.5 and -3.0 kb in the human tissue-type plasminogen activator gene promoter direct spatial and inducible expression to the murine brain *Eur J Neurosci* **14**, 799–808.
- Yu K, Ahrens S, Zhang X, Schiff H, Ramakrishnan C, Fenno L, ... Li B (2017) The central amygdala controls learning in the lateral amygdala *Nat Neurosci* **20**, 1680–1685.
- Yu K, Garcia P, Albeanu DF, and Li XB (2016) Central Amygdala Somatostatin Neurons Gate Passive and Active Defensive Behaviors **36**, 6488–6496.
- Yu Z, Chen N, Hu D, Chen W, Yuan Y, Meng S, ... Shi J (2020) Decreased Density of Perineuronal Net in Prelimbic Cortex Is Linked to Depressive-Like Behavior in Young-Aged Rats *Front Mol Neurosci* **13**, 4.
- Yuan H, Vance KM, Junge CE, Geballe MT, Snyder JP, Hepler JR, ... Traynelis SF (2009) The serine protease plasmin cleaves the amino-terminal domain of the NR2A subunit to relieve zinc inhibition of the N-methyl-D-aspartate receptors *J Biol Chem* **284**, 12862–12873.
- Yutsudo N, and Kitagawa H (2015) Involvement of chondroitin 6-sulfation in temporal lobe epilepsy *Exp Neurol* **274**, 126–133.

Z

- Zhang L, Seiffert D, Fowler BJ, Jenkins GR, Thinnis TC, Loskutoff DJ, ... Miles LA (2002) Plasminogen has a broad extrahepatic distribution *Thromb Haemost* **87**, 493–501.
- Zheng Z, Nayak L V., Jain M, and Tabas I (2018) Hepatocyte-Derived Tissue Plasminogen Activator Regulates Systemic Fibrinolysis *Blood* **132**, 217–217.
- Zhou X-H, Brakebusch C, Matthies H, Oohashi T, Hirsch E, Moser M, ... Fässler R (2001) Neurocan Is Dispensable for Brain Development *Mol Cell Biol* **21**, 5970–5978.
- Zhuo M, Holtzman DM, Li Y, Osaka H, DeMaro J, Jacquin M, and Bu G (2000) Role of tissue plasminogen activator receptor LRP in hippocampal long-term potentiation *J Neurosci* **20**, 542–549.
- Zimmermann DR, and Dours-Zimmermann MT (2008, October) Extracellular matrix of the central nervous system: From neglect to challenge *Histochem Cell Biol. Histochem Cell Biol.*

Implication du tPA cérébral dans la régulation des comportements et le remodelage des *perineuronal nets*

Résumé

L'activateur tissulaire du plasminogène (tPA) est une sérine protéase initialement décrite dans le compartiment vasculaire pour son rôle dans les processus de fibrinolyse. Le tPA est également retrouvé dans le parenchyme cérébral où il est exprimé par différents types cellulaires et notamment par les neurones. Cette protéase est impliquée dans de nombreuses fonctions cérébrales telles que la plasticité synaptique, la modulation de la neurotransmission glutamatergique et régule également les processus cognitifs et émotionnels. L'implication du tPA dans ces différentes fonctions est dépendante de sa capacité à convertir le plasminogène en plasmine ou à interagir avec différents récepteurs. L'étude des fonctions du tPA a été essentiellement réalisée dans des modèles d'inactivation constitutive du gène codant le tPA (Plat) et ne permettent pas de rendre compte de son expression au sein de différents types cellulaires et régions cérébrales.

Lors d'une première étude nous avons utilisé une souris transgénique, tPA Flox permettant la délétion conditionnelle du tPA dans les régions cérébrales, grâce au système Cre-lox, ainsi qu'une souris tPA Null, déficiente en tPA de manière constitutive. Chez les souris tPA Null, nous avons mis en évidence une diminution de l'anxiété-trait, une hyperactivité locomotrice ainsi que des déficits de la mémoire spatiale. De manière intéressante la délétion conditionnelle du tPA dans le gyrus denté de l'hippocampe a révélé une augmentation de l'activité locomotrice chez les souris tPA Flox. Parallèlement nous avons montré que la délétion du tPA dans le noyau central de l'amygdale augmente l'activité locomotrice et diminue l'anxiété des animaux. Nous avons également montré que le tPA est exprimé dans les interneurons PKC δ dans l'amygdale centrale.

La seconde partie de ces travaux visait à étudier l'implication du système tPA/plasmine dans le remodelage des réseaux périneuronaux (PNNs), une structure spécifique de la matrice extracellulaire entourant les interneurons à parvalbumine (PV). L'utilisation d'un outil rapporteur de l'activité du gène Plat couplée à des analyses électrophysiologiques et par *single-cell* RT-PCR nous a permis de mettre en évidence l'expression du tPA par les interneurons PV. Nous montrons que la délétion conditionnelle du tPA dans les interneurons PV augmente la densité des PNNs, suggérant un rôle de cette protéase dans leurs modulations. *In vitro*, nous mettons en évidence que le tPA influence le remodelage des PNNs par un mécanisme dépendant de l'activation du plasminogène en plasmine, elle-même responsable du clivage de l'aggrécane, un composant majeur de ces structures.

Ces résultats sont novateurs et permettent une meilleure compréhension du rôle du tPA et de la plasmine dans les réponses comportementales et dans le remodelage de la matrice extracellulaire.

Mots clés : tPA, comportement, neurones, PNNs, PV.

Abstract

Tissue-type plasminogen activator is a serine protease, initially describe in the vascular compartment for its role in fibrinolysis processes. tPA is also found in the cerebral parenchyma where it is expressed by different cell types, being notably expressed by neurons. This protease displays different roles including synaptic plasticity, modulation of glutamatergic neurotransmission and also regulates cognitive and emotional processes. tPA's involvement in these different functions depends on its ability to convert plasminogen into plasmin or to interact with different receptors. The study of tPA's functions has been mainly performed in models constitutively deficient for tPA gene (Plat) and does not allow to account for its expression within different cell types and brain regions.

In a first study we used a transgenic mouse, tPA Flox, which allows the conditional deletion of tPA in brain regions, thanks to the Cre-lox system, as well as a tPA Null mouse, constitutively deficient in tPA. In tPA Null mice, we have demonstrated a decreased anxiety, a locomotor hyperactivity and spatial memory deficits. Interestingly, the conditional deletion of tPA in the dentate gyrus of the hippocampus revealed an increase in locomotor activity in tPA Flox mice. At the same time we showed that tPA deletion in the central nucleus of the amygdala increases locomotor activity and decreases anxiety of mice. We also showed that tPA is expressed in PKC δ -positive interneurons in the central amygdala.

The second part of my work aimed at studying the involvement of the tPA/plasmin system in the remodeling of perineuronal nets (PNNs), a specific structure of the extracellular matrix surrounding parvalbumin (PV) interneurons. Using a reporter construct of the Plat gene activity coupled with electrophysiological and single-cell RT-PCR analyses, we were able to highlight the expression of tPA by PV interneurons. We show that the conditional deletion of tPA in PV interneurons increases the density of PNNs, suggesting a role of this protease in their modulations. *In vitro*, we show that tPA influences the remodeling of PNNs by a mechanism dependent of the activation of plasminogen into plasmin, which is responsible for the cleavage of aggrecan, a major component of these structures.

These results are novel and allow a better understanding of the role of tPA and plasmin in behavioral responses and extracellular matrix remodeling.

Key words: tPA, behavior, neurons, PNNs, PV.