



**HAL**  
open science

# Rôle glio-vasculaire de la dystrophine Dp71 : Altérations moléculaires et fonctionnelles chez un modèle murin déficient en Dp71

Mehdi Belmaati Cherkaoui Belmaati Cherkaoui

## ► To cite this version:

Mehdi Belmaati Cherkaoui Belmaati Cherkaoui. Rôle glio-vasculaire de la dystrophine Dp71 : Altérations moléculaires et fonctionnelles chez un modèle murin déficient en Dp71. Neurobiologie. Université Paris Saclay (COMUE), 2019. Français. NNT : 2019SACLS570 . tel-03506218

**HAL Id: tel-03506218**

**<https://theses.hal.science/tel-03506218>**

Submitted on 2 Jan 2022

**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.

# ROLE GLIO-VASCULAIRE DE LA DYSTROPHINE DP71 : ALTERATIONS MOLECULAIRES ET FONCTIONNELLES CHEZ UN MODELE MURIN DEFICIENT EN DP71

Thèse de doctorat de l'Université Paris-Saclay  
Préparée à l'Université Paris Sud

École doctorale n°568 Signalisation et réseaux intégratifs  
en biologie (BIOSIGNE)  
Spécialité de doctorat : Sciences de la vie et de la santé

Thèse présentée et soutenue à Orsay, le 20 Décembre 2019, par

**Mehdi Belmaati Cherkaoui**

Composition du Jury :

<b>Philippe Vernier</b> Directeur de recherche, CNRS, Institut NeuroPSI, Gif-sur-Yvette	Président
<b>Audrey Giocanti-Auregan</b> Praticien Hospitalier, Ophtalmologue, Hôpitaux Universitaires Paris XIII	Rapporteuse
<b>Jérôme Badaut</b> Directeur de recherche, CNRS, Institut INCIA, Bordeaux	Rapporteur
<b>Martine Cohen-Salmon</b> Directrice de recherche, CNRS, Collège de France, Paris	Examinatrice
<b>Alvaro Rendon</b> Directeur de recherche émérite, INSERM, Institut de la Vision, Paris	Examineur
<b>Cyrille Vaillend</b> Directeur de recherche, CNRS, Institut NeuroPSI, Orsay	Directeur de thèse

# TABLE DES MATIERES

<b>REMERCIEMENTS</b> .....	<b>4</b>
<b>LISTE DES FIGURES</b> .....	<b>7</b>
<b>LISTE DES TABLEAUX</b> .....	<b>9</b>
<b>LISTE DES ABREVIATIONS</b> .....	<b>10</b>
<b>PREFACE</b> .....	<b>12</b>
<b>INTRODUCTION</b> .....	<b>14</b>
<b>L'UNITE NEURO-GLIOVASCULAIRE</b> .....	<b>15</b>
ANATOMIE GENERALE DE LA BARRIERE HEMATO-ENCEPHALIQUE .....	17
<b>PROTEINES DES JONCTIONS ENDOTHELIALES ET GLIALES</b> .....	<b>21</b>
Jonctions serrées .....	21
Les protéines Zonula Occludens (ZO) .....	22
Rôle de ZO-1 .....	22
Les claudines.....	22
Rôle de la claudine-5.....	23
Les occludines .....	23
Jonctions adhérentes.....	24
Les cadhérines .....	24
Rôle de la VE-cadhérine .....	24
Jonctions communicantes .....	25
Les connexines .....	25
Rôle des connexines Cx43 et Cx30.....	26
Transports à travers la barrière hémato-encéphalique.....	27
Pathologies associées à la barrière hémato-encéphalique .....	29
<b>LES DYSTROPHINES</b> .....	<b>34</b>
Le gène <i>dmd</i> et ses différents produits .....	34
La Dp427 .....	37
La Dp260 .....	37
La Dp140 .....	38
La Dp116 .....	38
La Dp71 .....	38
La Dp40 .....	40
<b>COMPLEXE DES PROTEINS ASSOCIEES A LA DYSTROPHINE (DAPC) ET PHYSIOPATHOLOGIE</b> .....	<b>42</b>
Syntrophines, des protéines adaptatrices .....	43
La souris KO-syntrophine .....	44
Aquaporines et homéostasie hydrique .....	46
La souris KO-AQP4 .....	50
AQP4 et Kir4.1 : couplage fonctionnel ? .....	53
Kir4.1 et homéostasie potassique .....	53
Les canaux potassiques Kir4.1 .....	53
La souris KO-Kir4.1 .....	54
Dystroglycane, un lien avec la matrice extracellulaire.....	56
La souris KO-dystroglycane .....	57
Sarcoglycane, protéines glio-vasculaires ?.....	57
Laminine et agrine, composants de la matrice extracellulaire .....	58
La souris KO- $\alpha$ 2-laminine .....	59
Dystrobrevine et utrophine : analogues de la dp71 ? .....	60
La souris KO-utrophine .....	62

<b>MODELES MURINS D'ETUDE DE LA Dp71 .....</b>	<b>63</b>
Modèles ayant apporté des informations indirectes sur le rôle de la Dp71 dans la glie périvasculaire et la BHE .....	63
La souris Dp71-null .....	65
Caractérisation comportementale.....	65
Étude des fonctions neuronales et synaptiques .....	66
Étude des fonctions gliales .....	67
Étude de la barrière vasculaire .....	69
<b><i>ETUDE EXPERIMENTALE.....</i></b>	<b>72</b>
<b>I.  ALTERATIONS MOLECULAIRES ASSOCIEES A LA PERTE DE DYSTROPHINE DP71.....</b>	<b>73</b>
Introduction.....	74
Méthodes .....	76
Résultats .....	90
Conclusion .....	106
<b>II.  IMPACT CELLULAIRE ET FONCTIONNEL DE LA PERTE DE DYSTROPHINE DP71.....</b>	<b>107</b>
Introduction.....	108
Méthodes .....	108
Résultats .....	110
Conclusion .....	121
<b><i>DISCUSSION GENERALE .....</i></b>	<b>122</b>
<b><i>PERSPECTIVES.....</i></b>	<b>134</b>
<b><i>ANNEXES .....</i></b>	<b>136</b>
<b><i>REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES .....</i></b>	<b>171</b>



## REMERCIEMENTS

*Je tiens tout d'abord à remercier Cyrille Vaillend pour m'avoir donné l'opportunité d'intégrer ce laboratoire. A toi qui lis ces lignes, je tiens à t'exprimer toute ma gratitude pour m'avoir encadré, guidé et supporté durant ces cinq années. Ton leadership et ton intégrité m'inspire, tu m'as accompagné et fais grandir, je t'en suis vivement reconnaissant.*

*Je tiens également à remercier tous les membres du jury d'avoir évalué mon travail de thèse. Un grand merci à Philippe Vernier d'avoir accepté de présider mon jury de soutenance, un grand merci également à Audrey Giocanti-Auregan et Jérôme Badaut, d'avoir évalué mon manuscrit, pour leur expertise, leur corrections avisées et pertinentes. Un merci chaleureux aux examinateurs, Martine Cohen-Salmon et Alvaro Rendon, qui m'ont accompagné en tant que tuteurs, et qui l'une comme l'autre, m'ont été indispensables dans la réalisation de ce travail de thèse.*

*Martine, ton implication, ton exigence et tes critiques m'ont challengé et beaucoup apporté, tu m'as ouvert les portes du Collège de France, dans lequel j'ai pu apprendre en rigueur et grandir en autonomie.*

*Alvaro, ton encouragement, ta passion insatiable et inspirante que tu transmets, résonnent en moi et me rappelle ce pourquoi je me suis engagé dans la recherche. Grâce au partenariat et réseau que tu as construit entre la France et le Mexique, j'ai pu vivre une expérience qui restera marqué dans mon esprit et qui m'a ouvert de nouveaux horizons.*

*Au Professeur Hervé Daniel, qui nous a quitté... Son humilité et son engagement total me resteront en mémoire. J'exprime ici une pensée particulière pour celui qui m'a donné le goût pour les Neurosciences et m'a incité à cheminer dans cette voie. A Micaela Galante et Heather Mclean, vous m'avez les premiers accueillis et initié au monde de la recherche, je vous suis profondément reconnaissant.*

*A Anne-Cécile Boulay, auprès de qui j'ai été formé aux séparations de vaisseaux au Collège de France, pour ta joie et ton dynamisme à toute épreuve, un grand merci.*

*A Cathy, pour ton dévouement, ta patience et ta bonne humeur. Nos longues journées dans la pièce d'IRM et nos discussions enrichissantes, merci encore Cathy.*

*A Cécile Boulogne, un grand merci pour ta collaboration et ton implication dans les manips de microscopie électronique, ton aide nous a été précieuse.*

*A Jean-Vianney et toute son équipe, Sandrine, Véronique pour leur formation en PCR, à la microscopie confocale et au western blots.*

*A Roseline, pour son aide à la manœuvre du pinceau en immuno à mes tout débuts, et plus particulièrement pour son encouragement, ses sourires et sa bonne humeur peu importe les aléas du quotidien.*

*A Nathalie, Bruno, aux membres de l'équipe zootechnique, pour leur dévouement de tous les jours sans qui tous nos travaux ne pourront être réalisés dans de bonnes conditions.*

*A tous les membres du département CogComp qui participent à la cohésion du laboratoire et aux réunions InDiQ hebdomadaires dans lesquels on partage dans la convivialité et le bon esprit critique.*

*Aux membres de l'équipe, Ophélie, Faouzi, Rémi, Charlotte, Romain pour leur aide, leurs conseils, leur enthousiasme et tous les bons moments passés ensemble. Une bonne ambiance et un bon esprit d'équipe est indispensable et tellement plus agréable, merci à vous !*

*A la Doctora Cecilia Montanez, gracias por darme la bienvenida en el Instituto Politécnico Nacional de México. A Jorge, por su formación, su humor y buena energía de todos los días. A los amigos, Pablo, Coztli, Sandy, Yadira, .... con quien descubrí una cultura tan especial y compartí una experiencia inolvidable. Sinceramente, muchas gracias a todos !*

*En parallèle de ma thèse, j'ai pu m'exercer dans la communication scientifique, une de mes autres passions, et je remercie donc tout particulièrement Aurélie Massaux, qui m'a coaché dans la prise de parole en public au Palais de la*

*Découverte, à l'école de la médiation scientifique, à Tanguy et tous les autres, pour leur dévouement et leur énergie !*

*A François Legrand, avec qui j'ai partagé l'expérience d'animer des chroniques spéciale santé dans l'émission de radio Paris Saclay le Miroir des sciences.*

*Un grand merci également aux membres de la troupe de théâtre d'impro paris saclay, Maylis, Maëlle, Zoé, Selim, ... et particulièrement à Robin. Merci à vous !!*

*Aux amis du labo, à Aurore et Solal, à nos soirées, sorties, nos partages d'angoisse entre thésards et nos entraides, au student club et au Pint of Science. A Faouzi et Antoine, pour leur amitié au quotidien, nos pauses café, nos moments de rigolades et leur soutien indéfectible dans les moments difficiles, même jusqu'aux derniers jours avant la soutenance. Merci à vous tous !*

*Enfin, à Julie, que j'ai eu le plaisir d'encadrer,  
A Tatiane, Laura, Carmenza, je ne vous oublie pas.*

*A Rafik, pour son amitié et son dévouement, un grand merci du profond du cœur.  
A mes parents, mes frères et ma petite sœur, je vous aime.*

# LISTE DES FIGURES

- Figure 1** : Barrières cérébrales et homéostasie du microenvironnement cérébral
- Figure 2** : L'unité neurovasculaire
- Figure 3** : Représentation schématique de la barrière hémato-encéphalique
- Figure 4** : Représentation schématique des jonctions serrées et adhérentes
- Figure 5** : Transports à travers les cellules endothéliales formant la BHE
- Figure 6** : Organisation des différents produits du gène *DMD*
- Figure 7** : Dégradation du QI chez les patients DMD en fonction de la position de la mutation
- Figure 8** : Les différentes isoformes de la Dp71
- Figure 9** : Le complexe des protéines associées à la Dp71 à la membrane des astrocytes périvasculaires
- Figure 10** : Expression d'AQP4 au niveau des trois barrières du SNC
- Figure 11** : Désorganisation de la structure orthogonale en OAP des canaux AQP4 dans des cas d'œdème ou de lésion cérébrale
- Figure 12** : Les différentes phases de l'œdème : anoxique, ionique et vasogénique
- Figure 13** : Organisation des différents produits du gène *UTRN*
- Figure 14** : Schéma de l'insertion du gène de la beta-galactosidase dans le premier exon de la Dp71 pour empêcher son expression
- Figure 15** : Organisation laminaire de l'hippocampe de souris
- Figure 16** : Organisation du cervelet
- Figure 17** : Exemple de courbe d'absorption ARN au Nanodrop
- Figure 18** : Courbe d'absorption d'ARN et gel d'électrophorèse obtenus par l'Experion
- Figure 19** : Courbe de fluorescence en fonction du nombre de cycles PCR pour le gène codant l'actine.
- Figure 20** : Représentation schématique du protocole de qPCR
- Figure 21** : Exemple de courbe de fusion
- Figure 22** : Méthode de quantification de l'immunofluorescence
- Figure 23** : Localisation de la protéine Dp71

**Figure 24 :** Niveau d'expression de l'ARNm d'AQP4 dans l'hippocampe et le cervelet

**Figure 25 :** Localisation des canaux AQP4 dans le cervelet

**Figure 26 :** Localisation des canaux AQP4 dans la couche granulaire du cervelet

**Figure 27 :** Quantification de l'expression des canaux Kir4.1 par immunofluorescence et microscopie électronique

**Figure 28 :** Localisation de protéines associées à la Dp71 dans le cervelet

**Figure 29 :** Localisation des protéines associées à la Dp71 dans l'hippocampe

**Figure 30 :** Localisation des protéines associées à la Dp71 sur vaisseaux isolés du cerveau antérieur

**Figure 31 :** Localisation des dystrophines et des protéines associées ou reliées à la Dp71 sur tranches et vaisseaux isolés du cerveau antérieur

**Figure 32 :** Localisation subcellulaire des protéines associées à la Dp71 au niveau des capillaires cérébraux

**Figure 33 :** Localisation de la dystrophine Dp427 dans les différents éléments vasculaires

**Figure 34 :** Expression de la GFAP et d'aldh111-GFP dans les différentes couches de l'hippocampe

**Figure 35 :** Épaisseur des pieds des cellules gliales de Bergmann entourant les capillaires de la couche moléculaire et bordant la glia limitans du cervelet

**Figure 36 :** Évaluation de la contenance en eau du cerveau par déshydratation

**Figure 37 :** Évaluation de la contenance en eau du cerveau par IRM in vivo

**Figure 38 :** Profil de courbe de survie suite à une intoxication hydrique par hyponatrémie

**Figure 39 :** Niveau d'expression de l'ARNm de ZO-1 par PCR quantitative et exemples d'images de l'état des jonctions serrées par microscopie électronique

**Figure 40 :** Expression de protéines de jonction serrées et de la lame basale sur tissus et vaisseaux isolés

**Figure 41 :** Expression de la VE-cadhérine des jonctions adhérentes

**Figure 42 :** Analyse par angiotool du réseau vasculaire marqué par la lectine endothéliale

**Figure 43 :** Modèle hypothétique de clairance des solutés interstitiels médiée par les canaux AQP4

# LISTE DES TABLEAUX

**Tableau 1 :** Séquence des amorces

**Tableau 2 :** Comparaison des altérations moléculaires dans les deux structures cérébrales, leurs sous-couches et sous types cellulaires

**Tableau 3 :** Comparaison des altérations moléculaires et fonctionnelles des modèles KO-DAPs et Dp71-null

**Tableau 4 :** Comparaison des modèles KO-AQP4 et Dp71-null : plasticité synaptique, mémoire et apprentissage spatial

## LISTE DES ABREVIATIONS

KI : Knock in

Dp71 : Dystrophine Dp71

CA : Champ ammonien

BHE : Barrière hémato-encéphalique

BHR : Barrière hémato-rétinienne

DMD : Dystrophie musculaire de Duchenne

AQP : Aquaporines

CSF : Cerebrospinal fluid

DAPs : Dystrophin associated proteins / Protéines associées à la dystrophine

DAPC : Dystrophin associated protein complex

UGC : Utrophin-glycoprotein complex

Dp : Dystrophin protein

Up : Utrophin protein

ZO : Zonula occudens

VE : Vascular endothelial

ICAM : Intercellular Adhesion Molecule

IL : Interleukin

Kir : Inwardly rectifying K<sup>+</sup>

EAAT : Excitatory amino acid transporter

MMP : Matrix metalloproteinase

AD : Alzheimer disease

TNF : Tumor necrosis factor

JAMs : Junctional adhesion molécule

AVC : Accident vasculaire cérébral

MCAO : Middle cerebral artery occlusion/ Occusion de l'artère cérébrale moyenne

OAP : orthogonal arrays of intramembraneous particles

Cx : Connexine

siRNA : small interference RNA / petit ARN interférent

EAST : Epilepsy, Ataxia, Sensorineural deafness, Tubulopathy syndrome

SESAME : Seizures, Sensorineural deafness, Ataxia, Mental retardation and Electrolyte imbalance syndrome

LTP : Long term potentiation/ Potentialisation à long terme

AAV : Adeno-associated virus/ virus adéno-associé



# PREFACE

Les cellules gliales décrites pour la première fois en 1858 par Rudolf Virchow sont aujourd'hui l'objet de découvertes fascinantes. Leur rôle de cellule nourricière pour les neurones s'avère bien plus complexe. Le terme astrocyte en référence à la morphologie étoilée de ces cellules a été proposé et ce n'est qu'en 1891 que Ramon y Cajal nous laissa entrevoir au travers de ses dessins l'extraordinaire diversité des astrocytes.

Aujourd'hui, nous savons que le neurone et la cellule gliale sont interdépendants et jouent de concert formant avec le réseau vasculaire cérébral, ce que l'on appelle l'unité neuro-glio-vasculaire. A l'interface gliovasculaire, les extrémités terminales des astrocytes dits « pieds » astrocytaires forment une couverture entourant l'ensemble des vaisseaux sanguins cérébraux. C'est à ce niveau là qu'intervient la Dp71, dystrophine la plus abondamment exprimée dans le cerveau. Protéine d'échafaudage exprimée à la membrane des pieds astrocytaires périvasculaires, la Dp71 fait partie d'une plateforme contribuant à l'ancrage de plusieurs protéines de signalisation, de canaux et récepteurs membranaires. Sa perte conduit à des altérations cognitives et comportementales.

A ce jour, savoir pourquoi la perte ou l'altération de la Dp71 est délétère pour les fonctions cognitives reste une question non élucidée. Afin de mieux comprendre le rôle de la Dp71, un modèle de souris déficiente en Dp71 obtenu par knock-in (KI) a été créé et la lignée est maintenue dans notre laboratoire (voir matériel et méthodes). Le phénotype comportemental des souris Dp71-null a été caractérisé dans l'équipe. Ces souris montrent une anxiété accrue ainsi que des déficits touchant l'apprentissage spatial, la mémoire de travail et la flexibilité comportementale (Daoud et al., 2008 ; Chaussenot et al., 2019). La Dp71 étant présente à la fois dans les neurones et la glie (Perronnet et Vaillend, 2010 ; Waite et al. 2012), l'hypothèse d'un rôle glio-vasculaire et/ou synaptique de la Dp71 est à l'étude. L'analyse *in vitro* de neurones d'hippocampe en culture a mis en évidence une localisation de la Dp71 au niveau de synapses excitatrices ainsi qu'une altération de la morphologie des synapses (Daoud et al., 2008). De plus, les souris Dp71-null présentent une augmentation de la transmission glutamatergique dans les neurones du champ CA1 de l'hippocampe (Daoud et al, 2008). Bien que ces données confortent l'hypothèse d'un rôle synaptique de la Dp71, l'expression synaptique de Dp71 dans le cerveau adulte semble mineure en quantité, comparée à son expression importante dans les pieds astrocytaires.

L'hypothèse qu'une altération glio-vasculaire due à la perte de la Dp71 pourrait conduire à un dysfonctionnement global de l'activité cérébrale est actuellement au cœur des questions dans ce champ de recherche et fait l'objet de ma thèse.

Les objectifs principaux de ma thèse sont (1) de déterminer la nature des altérations cellulaires et moléculaires ainsi que les phénomènes de compensation associées à la perte de la Dp71 dans les astrocytes et (2) d'évaluer si ces altérations perturbent des fonctions glio-vasculaires, notamment l'homéostasie hydrique et l'intégrité de la barrière hémato-encéphalique.

Dans une première partie introductive, je présenterai les notions d'unité neuro-gliovasculaire et de barrière hématoencéphalique, les différents acteurs cellulaires impliqués et des altérations de la BHE (chapitre 1). Je décrirai ensuite les différentes formes et rôles connus des dystrophines (chapitre 2), les protéines du complexe associé à la Dp71 (chapitre 3), les protéines des jonctions endothéliales impliquées dans la perméabilité vasculaire (chapitre 4), puis enfin les phénotypes connus des modèles murins de la DMD déficients en dystrophine Dp71(chapitre 5).

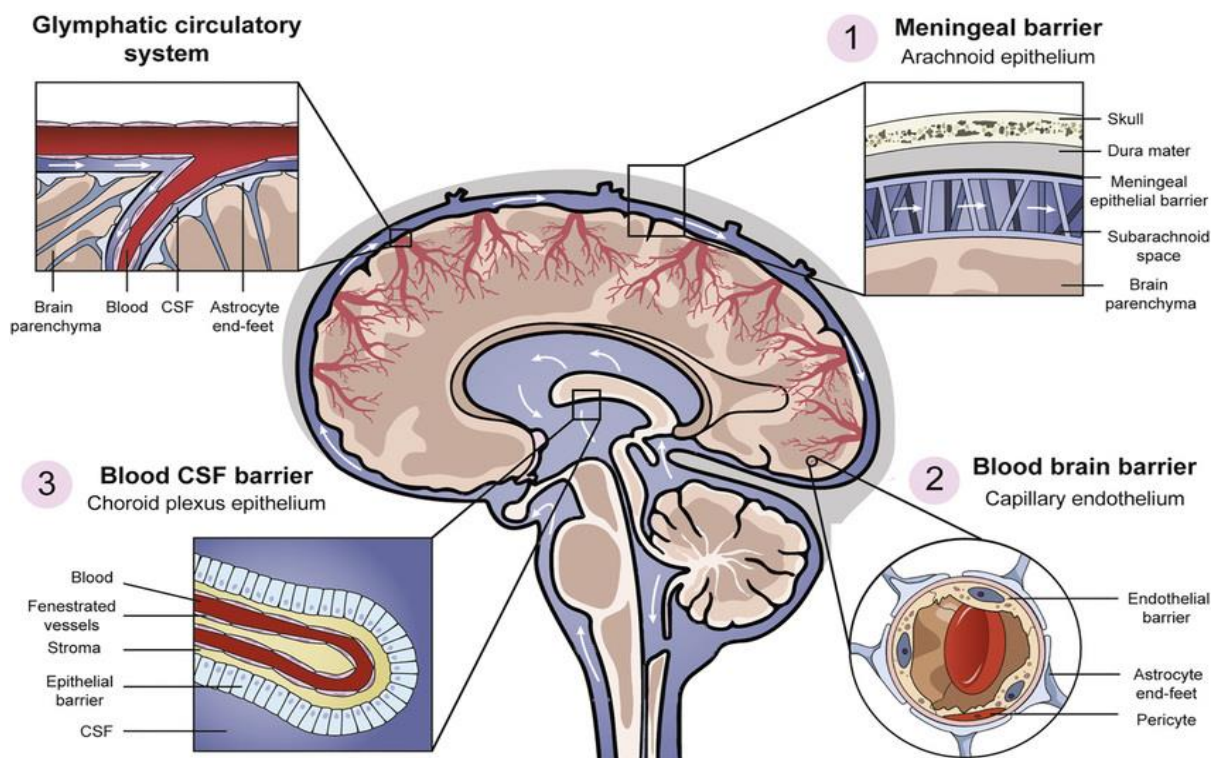
Dans une seconde partie, j'exposerai mon étude expérimentale avec les méthodes et résultats concernant : (1) l'impact moléculaire de la perte de Dp71 et (2) l'impact fonctionnel de cette perte.

Enfin, je discuterai les résultats et conclurai sur les perspectives de recherches à mener dans la quête d'une meilleure compréhension du rôle de la dystrophine Dp71.

# **INTRODUCTION**

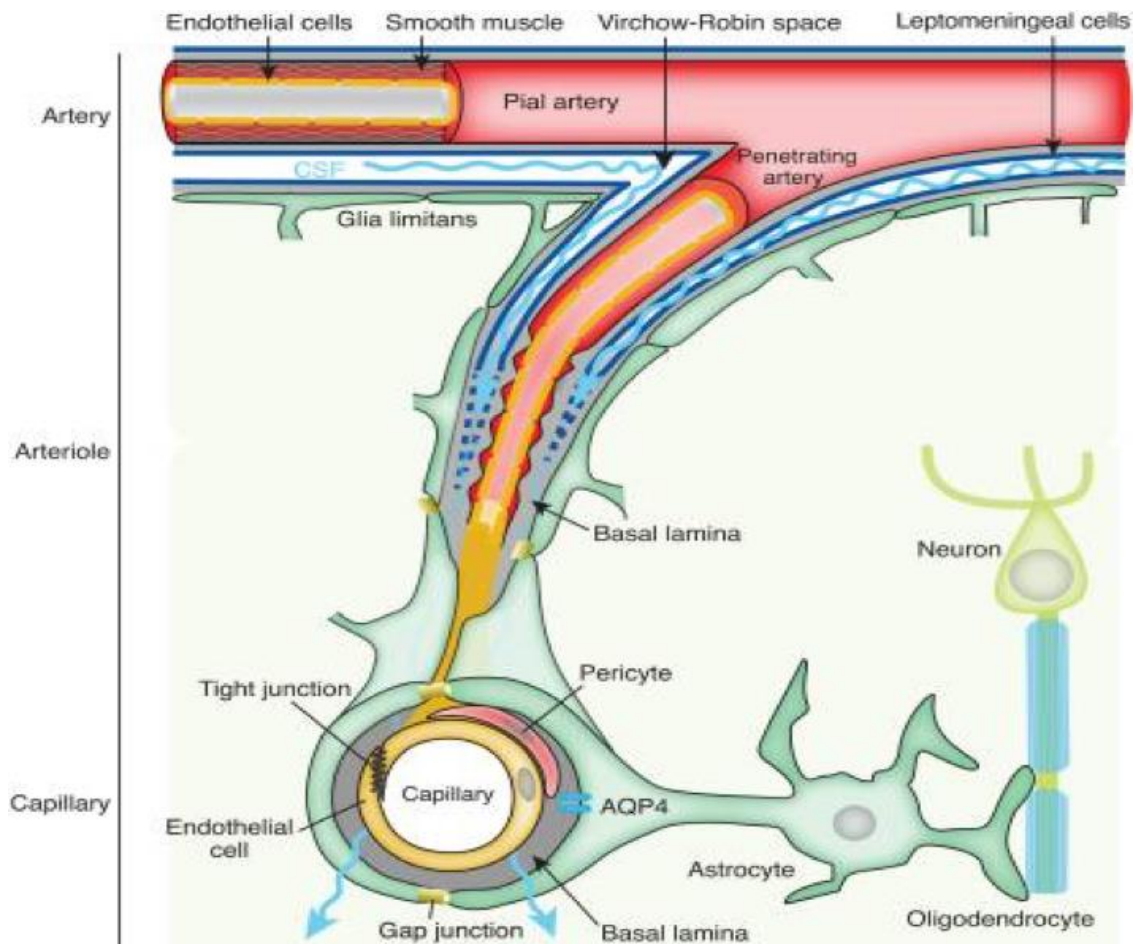
## L'UNITE NEURO-GLIOVASCULAIRE

Trois barrières limitent et régulent les échanges moléculaires à l'interface entre le sang et le cerveau : (1) l'épithélium arachnoïde entre le sang et le liquide cérébro-spinal sous-arachnoïdien, (2) la barrière hémato-encéphalique (BHE) entre le sang et le liquide interstitiel cérébral et (3) l'épithélium du plexus choroïde entre le sang et le liquide cérébro-spinal (CSF : cerebrospinal fluid) des ventricules cérébraux. Parmi ces barrières, la BHE est celle qui exerce le plus grand contrôle sur le microenvironnement immédiat des cellules cérébrales. La membrane délimitant les pieds astrocytaires en bordure de l'épithélium arachnoïde est appelé *glia limitans externa* alors que celle qui tapisse l'ensemble des vaisseaux sanguins (BHE) et des ventricules cérébraux est appelé *glia limitans interna*. L'ensemble regroupant la glie périvasculaire, la circulation du liquide cérébro-spinal et l'espace interstitiel du parenchyme cérébral est appelé le système glymphatique (Figure 1).



**Figure 1 - Barrières cérébrales et homéostasie du microenvironnement cérébral.** En bleu est représenté le liquide cérébrospinal (CSF) avec les flèches en blanc représentant la direction du flux. (1) La barrière au niveau des méninges formée par l'épithélium arachnoïde séparant la surface externe du cerveau et le CSF de l'espace sous-arachnoïdien. (2) La BHE (ou blood-brain barrier, BBB, en anglais) composée des cellules endothéliales et ses jonctions serrées séparant le sang du parenchyme cérébral. (3) La barrière formée par l'épithélium du plexus choroïde séparant le sang du CSF des ventricules cérébraux (Ariel D. Stock et al., 2017).

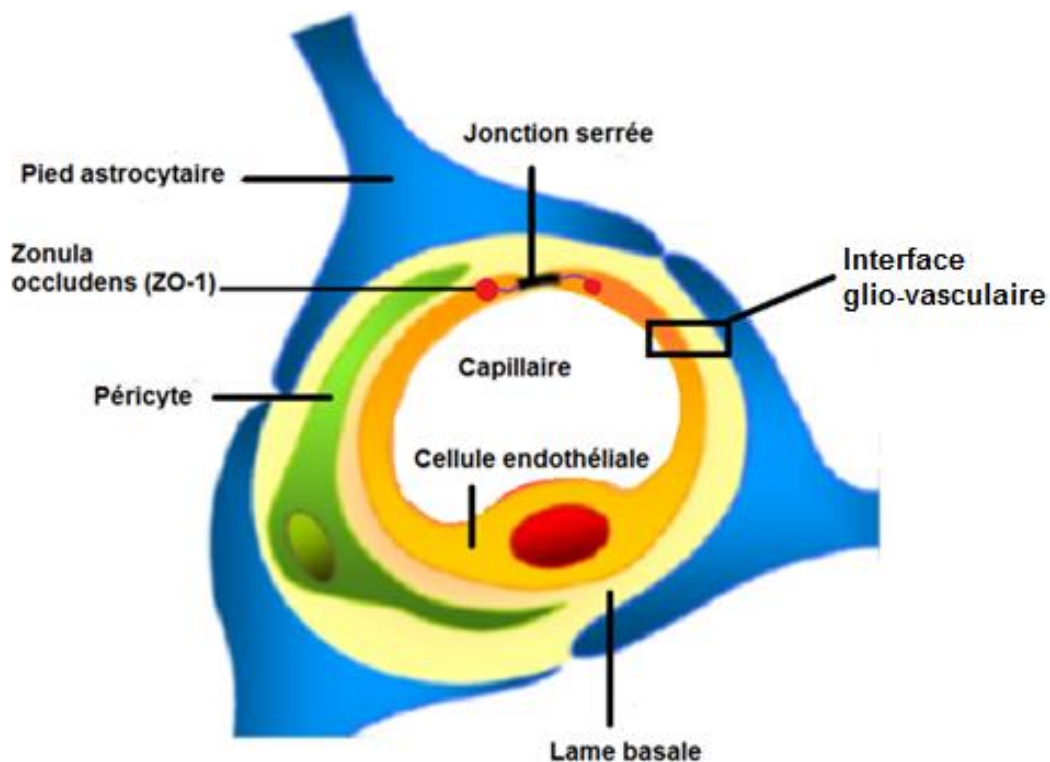
La communication intercellulaire entre cellules gliales et endothélium vasculaire est primordiale pour le maintien de l'homéostasie du microenvironnement cérébral. Grâce à la coopération fonctionnelle des cellules endothéliales avec les péricytes, les astrocytes et les neurones formant ce que l'on appelle les unités glio- et neurovasculaires (Abbott et al., 2006), la barrière hémato-encéphalique est un système dynamique dont la perméabilité et la fonction de transport peuvent être modulées afin de permettre un passage sélectif de certaines molécules entre le sang et le parenchyme cérébral.



**Figure 2 - L'unité neurovasculaire.** La structure et la fonction de l'unité neurovasculaire permet une communication bidirectionnelle entre les neurones et la microvasculature via les astrocytes. Les artères piales de l'espace sous-arachnoïdien baignant dans le liquide cébrospinal (CSF) deviennent des artères pénétrantes dans le parenchyme cérébral. L'espace périvasculaire autour de ces artères pénétrantes est appelé espace de Virchow-Robin ; il disparaît au fur et à mesure que les artères pénétrantes se divisent en artéριοles, capillaires et veinules. A cet endroit, la matrice extracellulaire de la lame basale permet le passage du CSF et les pieds astrocytaires exprimant les canaux aquaporines AQP4 forment la barrière hémato-encéphalique. (Jessen et al., 2015 Copyright 2015, Springer US).

## ANATOMIE GENERALE DE LA BARRIERE HEMATO-ENCEPHALIQUE

La barrière hémato-encéphalique est caractérisée par des jonctions serrées interconnectant les cellules endothéliales entre elles, une lame basale et une couverture astrocytaire formée par les pieds des astrocytes périvasculaires autour de la paroi des vaisseaux. Cette dernière permet une régulation fine et rapide des échanges d'eau et des concentrations tissulaires en potassium, par l'intermédiaire de complexes macromoléculaires ancrés à la membrane des pieds astrocytaires face à la lame basale (Figure 3).



**Figure 3 - Représentation schématique de la barrière hémato-encéphalique.** Les cellules endothéliales forment entre elles des jonctions serrées dont la protéine ZO-1 (zonula occludens-1) est un composant principal. Les péricytes sont distribués partiellement autour de l'endothélium. La lame basale, constituant une matrice extracellulaire périvasculaire, entoure à la fois les péricytes et les cellules endothéliales. Un réseau de pieds astrocytaires entoure les capillaires sanguins cérébraux.

Du compartiment le plus externe, c'est-à-dire de la lumière du vaisseau sanguin, au compartiment le plus interne, le parenchyme cérébral, nous allons décrire un à un les différents acteurs cellulaires de la BHE : de la cellule endothéliale jusqu'à l'astrocyte en passant par la lame basale et les péricytes.

**Les cellules endothéliales** cérébrales tapissent la face interne des vaisseaux sanguins du système nerveux central. Les protéines des jonctions serrées comme les zonula occludens (ZO) jouent un rôle important dans la perméabilité de la barrière hémato-encéphalique. En effet, les membranes des cellules endothéliales adjacentes sont fusionnées grâce à des protéines transmembranaires, telles que les occludines et les claudines. Ces dernières sont capables de se lier à la protéine zonula occludens 1 cytoplasmique (ZO-1). Les jonctions serrées permettent ainsi de restreindre le passage d'ions, de grosses et petites molécules hydrophiles. Les claudines-5 ont été identifiées comme appartenant aux jonctions serrées du système vasculaire cérébral (Morita et al., 1999). En plus des jonctions serrées situées au niveau apical de la cellule endothéliale, d'autres jonctions dites adhérentes sont présentes à un niveau plus basal et sont composées de cadhérines associées aux caténines.

**La lame basale** contribue significativement à l'intégrité de la BHE à travers plusieurs mécanismes. C'est une couche de la matrice extracellulaire comprenant des protéines comme le collagène IV, la laminine, le perlecan, l'agrine et la fibronectine qui sont produits par les cellules de l'unité neuro-gliovasculaire. Séparant les vaisseaux sanguins des astrocytes et des péricytes, nous pouvons mettre en évidence deux types de lame basale : (1) une lame basale endothéliale dont les composants sont produits par les cellules endothéliales et les péricytes et (2) une lame basale parenchymateuse dont les composants sont produits par les astrocytes (Sixt et al., 2001 ; Webersinke et al., 1992 ; Stratman et al., 2009 ; Kose et al., 2007). Alors que la lame basale endothéliale est enrichie en laminines  $\alpha 4$  et  $\alpha 5$ , les laminines  $\alpha 1$  et  $\alpha 2$  sont plus abondantes dans la lame basale parenchymateuse (Sixt et al., 2001). La lame basale fonctionne telle une barrière physique du côté abluminal des cellules endothéliales et contribue également à la régulation et la stabilité de la BHE via la régulation de la localisation cellulaire de l'occludine des cellules endothéliales (Savettieri et al., 2000).

**Les péricytes** sont des cellules contractiles entourant les cellules endothéliales des artérioles précapillaires, des capillaires et des veinules postcapillaires. La propriété contractile des péricytes contribue à la régulation du flux sanguin par le contrôle du diamètre capillaire (Peppiatt et al., 2006 ; Hamilton et al., 2010). Les péricytes semblent avoir plus de rôles que ce que l'on pensait. Lorsque la barrière hémato-encéphalique se forme durant l'embryogenèse, les péricytes déjà présents avant les astrocytes sont importants pour la formation de la BHE et le contrôle de la perméabilité microvasculaire. En effet, durant l'embryogenèse, la perte de péricytes chez des souris mutantes pour le gène *PDGFRB* conduit à une BHE qui « fuit ». On



observe en particulier chez ce mutant une augmentation du transport transendothélial (ou transcytose) et une augmentation de l'expression des laminines ayant pour conséquence une infiltration de cellules immunitaires (leucocytes) dans le système nerveux central (Armulik et al., 2010 ; Daneman et al., 2010b). De plus, ces études révèlent que le nombre total de péricytes est important pour la perméabilité des vaisseaux. Chez la souris *Pdgfr $\beta$* -null adulte, les péricytes régulent la BHE en inhibant la transcytose (Armulik et al., 2010). Des analyses microarray comparant le transcriptome des cellules endothéliales entre souris WT et souris *Pdgfr $\beta$* -null ont montré une faible modification de gènes impliqués dans les jonctions serrées mais une augmentation de l'expression de gènes lié à la transcytose (PLVAP) et à l'adhésion leucocytaire (ICAM1) (Daneman et al., 2010b). Ces données suggèrent que les péricytes régulent certains aspects fonctionnels de la BHE, notamment en inhibant l'expression de molécules qui augmentent la perméabilité vasculaire et l'infiltration de cellules immunitaires (transcytose, laminines), mais ils n'agissent pas au niveau de l'expression de gènes spécifiques aux cellules endothéliales (jonctions serrées, transporteurs).

**Les astrocytes**, appartenant à la catégorie des cellules gliales, sont des cellules constituées de nombreux prolongements émanant du corps cellulaire leur donnant un aspect en forme étoilée. Les astrocytes, faisant également partie de la barrière hémato-encéphalique, entourent la plupart des microvaisseaux en interagissant avec les cellules endothéliales à travers leurs pieds astrocytaires. Présents dans l'ensemble du système nerveux central, les astrocytes vont former un réseau astrocytaire dont les communications entre chacun d'entre eux sont permises par des jonctions communicantes (Rouach et Giaume, 2001). De plus, les astrocytes font également contact avec un millier de synapses, aussi bien qu'avec les capillaires sanguins, leur permettant d'être idéalement positionnés pour répondre aux multiples signaux de leur microenvironnement. Ce lien entre l'activité neuronale et les vaisseaux sanguins est appelé couplage neurovasculaire, dont la première preuve a été suggérée avec l'observation de signaux calciques somatiques corrélés aux changements de diamètre des vaisseaux sanguins en réponse à l'activation du récepteur au glutamate (Zonta et al., 2003). Les astrocytes sont en effet capables d'induire une vasoconstriction ou une vasodilatation des artérioles cérébrales (Gordon et al., 2011). En plus d'être fondamental pour l'apport de nutriments aux neurones via la synthèse, le stockage et le relargage de glycogène, les astrocytes assurent aussi l'homéostasie du microenvironnement cérébral par la régulation de l'équilibre des mouvements d'eau, d'ions, des acides aminés et de certains neurotransmetteurs (e.g. glutamate, GABA et glycine). Ils ont un rôle dans la formation des synapses et la clairance de molécules dérivés de l'axone



(Sofroniew and Vinters, 2010 ; Zhang and Barres, 2010 ; Allaman et al., 2011 ; Nguyen et al., 2011). Les astrocytes assurent ainsi un rôle de support métabolique pour les neurones et un rôle potentiel de régulation du flux sanguin en réponse à l'activité neuronale (Gordon et al., 2007 ; pour une revue).

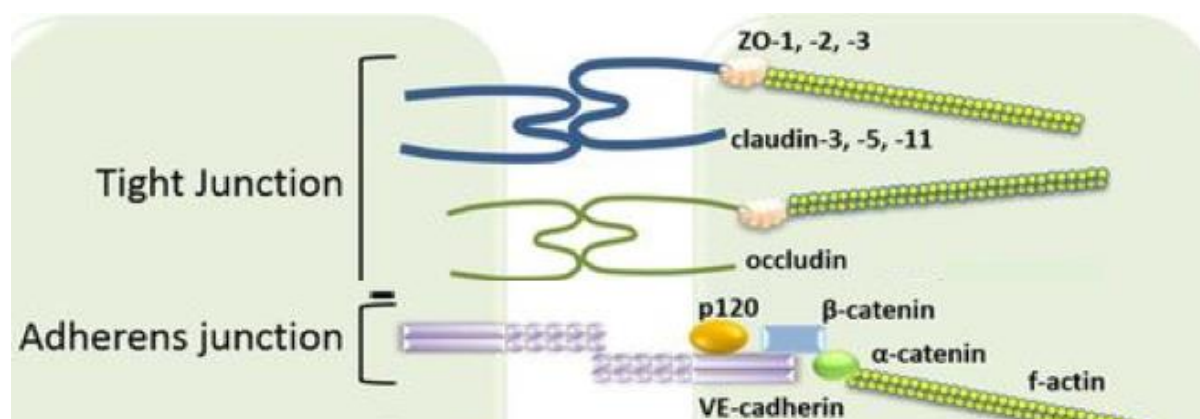
Les astrocytes ont également un rôle de barrière en régulant la perméabilité vasculaire et en contrôlant le développement des jonctions serrées. En effet, ils produisent des facteurs qui modulent le fonctionnement endothélial durant le développement et à l'âge adulte (Alvarez et al., 2011a, 2013). Les astrocytes sécrètent des facteurs de croissance vasculaires comme le VEGF (vascular endothelial growth factor), qui assure le développement vasculaire durant l'embryogenèse (Lee et al., 2007). Bien que le VEGF soit connu comme facteur pro-angiogénique, dans des conditions inflammatoires, il diminue au contraire la stabilité de la BHE (Argaw et al. 2009, 2012). De manière intéressante, lorsque des facteurs compromettent le fonctionnement de la BHE, d'autres facteurs sont co-exprimés avec le VEGF, comme l'angiopoiétine-1 (Ang-1). En conséquence, l'intégrité de la BHE est maintenue et des propriétés neuro-protectrices sont induites (Shen et al., 2011). En effet, en sécrétant au niveau des cellules endothéliales des facteurs de croissance tel que l'angiopoiétine-1, les astrocytes périvasculaires contrôlent la perméabilité vasculaire via la surexpression de protéines des jonctions endothéliales. L'expression d'Ang-1 active l'expression de protéines de jonctions à travers tie-2 et la voie nrf-2 qui libère par stress oxydatif des particules anti-oxydantes connues pour stabiliser l'expression des protéines de jonctions serrées ZO-1, occludine et claudine-5 (Fan et al., 2013). De même, les astrocytes activent au niveau de la cellule endothéliale la conversion de l'angiotensine I en angiotensine II via l'activation de l'enzyme de conversion de l'angiotensine (ACE-1), favorisant la formation des jonctions serrées (Wosik et al., 2007).

## PROTEINES DES JONCTIONS ENDOTHÉLIALES ET GLIALES

Comme pour toutes les cellules organisées en tissu, la cohésion entre les cellules endothéliales formant la barrière hémato-encéphalique est possible grâce à des jonctions dites serrées et des jonctions adhérentes. Ces dernières vont réguler la diffusion paracellulaire des ions et solutés à travers la BHE ainsi que des protéines entre l'espace luminal (face au sang) et abluminal (face au parenchyme cérébral).

### JONCTIONS SERRÉES

La jonction serrée, située au niveau le plus apical entre les cellules voisines, est composée de plus d'une quarantaine de protéines à la fois transmembranaires responsable des interactions au niveau de l'espace intercellulaire et cytoplasmique, servant de lien avec le cytosquelette d'actine. Les protéines du groupe transmembranaire sont les claudines, les occludines et les molécules d'adhésion jonctionnelle (JAMs). Ces trois protéines sont en interaction avec les zonula occludens ZO, protéines du groupe cytoplasmique, elles-mêmes en liaison avec l'actine. Les jonctions serrées ont pour fonction principale de réguler le passage des ions, de l'eau et des macromolécules entre les cellules dans l'espace dit paracellulaire (Shen et al., 2011 ; Gunzel et al., 2013). En second rôle, les jonctions serrées permettent également de maintenir la polarité cellulaire en restreignant la distribution des lipides dans la membrane (Cereijido et al., 1998).



**Figure 4 - Représentation schématique des jonctions serrées et adhérentes.** Les jonctions serrées (tight junctions) sont composées des protéines d'adhésion claudine et occludine et des zonula occludens ZO qui permettent le lien avec le cytosquelette d'actine. Les jonctions adhérentes (adherens junction) sont constituées de VE-cadhérine (vascular endothelial

cadherin) et des protéines associées  $\beta$ - et p120-caténine. L' $\alpha$ -caténine fixe la  $\beta$ -caténine et connecte l'ensemble au cytosquelette d'actine (Yulia A Komarova et al., 2017).

### ***Les protéines Zonula Occludens (ZO)***

Les protéines ZO sont les premiers partenaires en lien avec le cytosquelette d'actine au niveau des jonctions serrées. Elles font partie d'une famille composée des protéines ZO-1 de 225kDa (Stevenson et al., 1986), ZO-2 de 160 kDa (Gumbiner et al., 1991) et ZO-3 de 130 kDa (Haskins et al., 1998), qui sont similaires au niveau de leur structure de par leur domaine PDZ et SH3. Les protéines ZO interagissent via leur domaine PDZ avec les claudines (Itoh et al., 1999) et les JAMs (Bazzoni et al., 2000) et avec les occludines via leur domaines guanylate kinase GUK (Furuse et al., 1994). Les protéines ZO sont ainsi essentielles au maintien des claudines, des occludines et JAM-A, et l'ensemble de ce complexe macromoléculaire est ancré au cytosquelette d'actine (Fanning et al., 2002). Par ailleurs, ZO-1 a des propriétés lui permettant d'interagir à la fois avec l'occludine de la jonction serrée mais également avec une protéine de jonction adhérente, l' $\alpha$ -caténine (Itoh et al., 1997 ; Muller et al., 2005), ce qui suggère un lien physique entre les deux complexes de jonctions.

### ***Rôle de ZO-1***

Afin d'étudier le rôle de la protéine ZO-1, des souris knock-out ZO-1 ont été mises au point, mais elles sont létales à partir du 9<sup>e</sup>-10<sup>e</sup> jour de l'embryogénèse. Leur étude phénotypique indique que ZO-1 est nécessaire à la formation des vaisseaux sanguins dans le sac vitellin (Katsuno et al., 2008). L'approche par ARN interférence (knockdown) sur des cellules endothéliales permet de diminuer spécifiquement l'expression de ZO-1. Dans ce modèle-ci, une réduction de deux protéines de jonctions serrée est observée : claudine-5 et JAM-A. Par cette méthode, il a été mis en évidence que ZO-1 régule la distribution spatiale du cytosquelette, la tension cellulaire ainsi que la migration cellulaire et l'angiogenèse (Tornavaca et al., 2015).

### ***Les claudines***

Les claudines sont parmi les plus importantes protéines de la jonction serrée ; elles régulent la fonction de passage en restreignant les molécules par leur taille. Elles font partie d'une famille multigénique dans laquelle chaque claudine de 23 kDa possède quatre domaines transmembranaires et des domaines cytoplasmiques N- et C-terminaux (Krause et al., 2008).

Les claudines sont plus d'une vingtaine et permettent la jonction entre cellules dans différents tissus : les claudine-1, -5, -11, et -14 sont respectivement au niveau des cellules de l'épiderme (Furuse et al., 2002), des cellules endothéliales de la barrière hémato-encéphalique (Nitta et al., 2003), des gaines de myéline et cellules de Sertoli (Gow et al., 1999) et de l'épithélium de l'oreille interne (Ben-Yosef et al., 2003). L'expression de la claudine-5 n'est pas exclusive au cerveau mais spécifique des cellules endothéliales (Morita et al., 1999). Son étude nous intéresse particulièrement car c'est un bon marqueur de la perméabilité de la barrière hémato-encéphalique (Nitta et al., 2003).

### ***Rôle de la claudine-5***

La génération de souris déficientes en claudine-5 a révélé son rôle particulier dans la sélection de molécules de petite taille inférieure à 800 Da. En effet, des expériences de traceurs moléculaire, comme la streptavidine conjuguée à l'HRP, montrent un passage anormal de cet agent réactif à travers la BHE chez les souris KO-claudin-5 (Nitta et al., 2003). La claudine-5 joue donc un rôle de barrière aux petites molécules diffusant entre les cellules (paracellulaire). Son expression peut être régulée par des facteurs de transcription, des hormones de signalisation et par phosphorylation. Par exemple, la VE-cadhérine augmente son expression (Taddei et al., 2008), alors que le VEGF (vascular endothelial growth factor) et le TNF- $\alpha$  diminuent son expression (Argaw et al., 2009 ; Aveleira et al., 2010).

### ***Les occludines***

Les occludines (64 kDa) sont composées elles aussi de quatre domaines transmembranaires dont deux boucles extracellulaire et deux domaines intracellulaires N- et C-terminaux (Furuse et al., 1993). La première boucle extracellulaire permet l'interaction avec les occludines des cellules adjacentes, alors que la deuxième relie la protéine au complexe (Medina et al., 2000). La queue C-terminale est importante pour la formation de la barrière et se lie notamment aux protéines ZO.

Contrairement aux claudines, les occludines ne sont pas indispensables pour la formation de la jonction serrée (Schulzke et al., 2005). Cependant, il a été reporté que l'occludine est impliqué dans la régulation de la perméabilité en réponse aux cytokines (Marchiando et al., 2010 ; Van Itallie et al., 2010), ce qui suggère un rôle de modulation de la barrière. Par ailleurs, il a été mis en évidence que des mutations de l'occludine pouvaient causer

une calcification cérébrale et un dysfonctionnement rénal (O'Driscoll et al., 2010 ; LeBlanc et al., 2013).

## **JONCTIONS ADHÉRENTES**

### ***Les cadhérines***

En plus des jonctions serrées, les jonctions adhérentes participent aussi à l'intégrité de la barrière hémato-encéphalique et sont constituées de protéines appartenant à la superfamille des cadhérines pour « calcium-dependent adhesion ». (Takeichi et al., 1977). Il y a plus d'une centaine de cadhérines, on distingue cependant différents types : par exemple, la N-cadhérine pour neuronal (Shapiro et al., 1995) mais pas de manière exclusive, la P-cadhérine pour placenta, M- pour musculaire, R- pour rétinienne et la E-cadhérine pour épithéliale (Overduin et al., 1995), qui inclut la VE-cadhérine (vascular endothelial-cadherin) spécifique des cellules endothéliales (Gory et al., 1999). Chacune de ces cadhérines comporte un domaine extracellulaire permettant l'adhésion intercellulaire, un domaine transmembranaire et une queue C-terminale intracellulaire permettant le lien au cytosquelette d'actine via des caténines ( $\alpha$ -  $\beta$ -  $\gamma$ -). Dans le cas de ces cadhérines dites classiques, une molécule de cadhérine est fonctionnelle lorsqu'elle se lie avec une même sous-unité (homodimère) de la cellule adjacente pour induire une adhésion intercellulaire.

### ***Rôle de la VE-cadhérine***

La souris VE-cadhérine knockout est létale au cours du 7<sup>e</sup> jour de l'embryogénèse et présente des défauts d'angiogenèse liés à une apoptose endothéliale et une expression de VEGF anormale (Carmeliet et al., 1999). La VE-cadhérine est donc indispensable au développement et à la maturation des vaisseaux. Elle interagit avec la  $\beta$ -caténine et la  $\gamma$ -caténine, la  $\beta$ -caténine se liant à l' $\alpha$ -caténine et permettant le lien avec le cytosquelette d'actine (Lampugnani et al., 1995). La VE-cadhérine est essentielle pour le maintien et le contrôle des contacts entre cellules endothéliales. Les mécanismes qui régulent l'expression de la VE-cadhérine sont importants pour le contrôle de la perméabilité de la BHE. En effet, des molécules telles que l'histamine (Andriopoulou et al., 1999) et le VEGF (Esser et al., 1998) peuvent phosphoryler la VE-cadhérine ou induire son endocytose (Gavard et al., 2006) et ainsi déstabiliser la jonction adhérente et donc la perméabilité de la BHE. Par ailleurs, la VE-cadhérine peut dicter le niveau

d'expression et/ou la localisation d'autres protéines de jonctions tel que la claudine-5 (Gavard et al., 2008) et la N-cadhérine (Giampietro et al., 2012) dans les cellules endothéliales (Salomon et al., 1992).

Ainsi à travers ses propriétés d'adhésion et de signalisation, la VE-cadhérine maintient une balance entre l'intégrité et la plasticité des jonctions, ce qui est nécessaire aux cellules endothéliales afin d'assurer leur fonction de barrière hémato-encéphalique tout en étant capable de répondre efficacement aux signaux de facteurs de croissance et d'inflammation.

Pour conclure, toute altération des jonctions adhérentes et/ou serrées peut engendrer une diffusion paracellulaire non spécifique, c'est-à-dire une diffusion de molécules ne devant pas passer à travers la barrière hémato-encéphalique, donnant lieu à une fuite de la BHE que l'on retrouve notamment dans certaines pathologies.

## **JONCTIONS COMMUNICANTES**

### ***Les connexines***

Les jonctions communicantes, ou jonctions gap, sont connexions spécialisées reliant le cytoplasme de différentes cellules. Elles sont constituées d'hémicanaux de six sous-unités (hexamère) entre deux cellules pour former des connexines, qui permettent l'échange d'ions, de métabolites et de molécules chargés positivement ou négativement. Ces connexines contiennent quatre domaines transmembranaires, une extrémité N et C terminale, une boucle intracellulaire (CL : cytoplasmic loop) et deux boucles extracellulaires (E1 et E2). Les connexines sont respectivement au nombre de 19 et 20 chez la souris et l'humain (Willecke et al., 2002) et leur nom dépend du poids moléculaire (par exemple, connexine 43 de 43 kDa). (Beyer, 1990). L'épissage alternatif des différentes isoformes de connexines est tissu spécifique (Willecke et al., 2002). Par exemple, la connexine Cx43 est la plus exprimée dans les astrocytes alors que la connexine Cx30 est exprimé dans certains sous-type de péricytes (Mazaré et al., 2018).

## ***Rôle des connexines Cx43 et Cx30***

Les astrocytes forment un réseau interconnecté par des jonctions gap principalement constitués des connexines Cx43 et Cx30, exprimées principalement au niveau des pieds astrocytaires entourant les vaisseaux sanguins cérébraux (Giaume et al., 1991). Ces astrocytes reliés entre eux et mettant en commun leur cytoplasme établissent ainsi un syncytium fonctionnel (Theis et al., 2005). Ces connexines sont assemblées et concentrées au niveau de la membrane permettant l'échange notamment d'ATP, de NAD<sup>+</sup> et de glutamate. Cet échange de molécules inférieure à 1.5 kDa est direct entre l'endothélium cérébral et le réseau d'astrocytes périvasculaires, ce qui suggèrerait que les échanges impliqués dans la vasodilatation et la vasoconstriction durant le couplage neurovasculaire serait permis par ces jonctions gap (Rouach et al., 2008). Au niveau de l'unité gliovasculaire, dès le début du développement postnatal (P10-15), il a été démontré par l'équipe de M. Cohen-Salmon que la maturation des pieds astrocytaires est concomitante à celle de la BHE (Gilbert et al., 2019).

A l'âge adulte les souris double knock-out en connexines Cx43 et Cx30 présentent une perte significative d'AQP4 et de  $\beta$ -dystroglycane, des composants importants du complexe associé à la dystrophine Dp71 au niveau des pieds astrocytaires. Ces altérations conduisent à un œdème et une rupture de la BHE (Ezan et al., 2012). Les cellules endothéliales expriment aussi des connexines associées aux protéines de jonctions et leur inhibition altère aussi la fonction de la BHE (Nagasawa et al., 2006). Dans certaines conditions pathologiques comme la neuroinflammation, nous savons que les astrocytes peuvent participer à la régulation immunitaire par ce que l'on appelle une réaction astrocytaire. Récemment, et par la même équipe, il a été montré par une caractérisation du transcriptome des astrocytes de l'hippocampe que l'absence de Cx43 a pour conséquence une réponse auto-immune contre ces mêmes connexines par les astrocytes. Cependant, aucune activation de cytokines pro-inflammatoires n'a été mise en cause ; il s'agit plutôt de facteurs angiogéniques, ce qui suggère un rôle des Cx43 dans l'angiogenèse et la régulation de l'immunité (Boulay et al., 2018). Quant à la connexine Cx30, son absence n'altère ni l'intégrité ni la perméabilité de la BHE. En revanche, les souris déficientes en Cx30 présentent une surexpression de  $\gamma$ -sarcoglycane, une autre protéine membranaire associée aux dystrophines, ce qui suggèrerait la présence d'un complexe de protéines associées au sarcoglycane dans le système gliovasculaire (Boulay et al., 2015).

Les jonctions communicantes gliales sont donc tout aussi importantes que les jonctions endothéliales, en participant aussi à l'intégrité de la BHE, ou à des complexes de protéines pouvant interagir avec le DAPC.

## **TRANSPORTS À TRAVERS LA BARRIÈRE HÉMATO-ENCÉPHALIQUE**

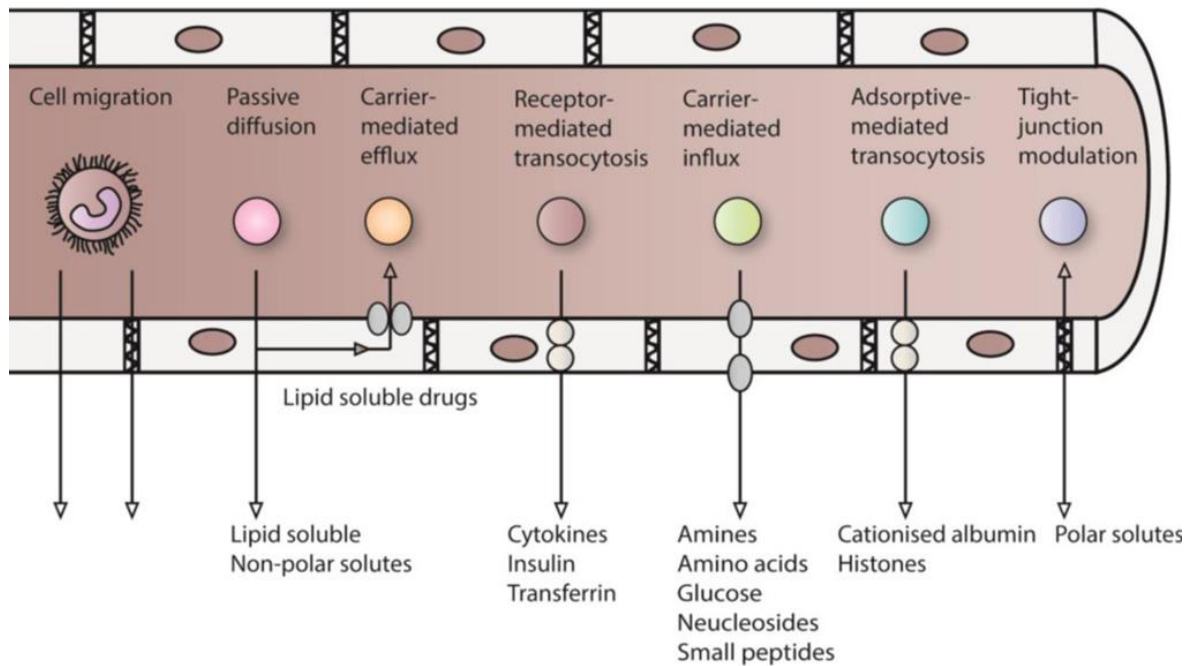
Les cellules endothéliales du système nerveux central sont hautement polarisées : elles comportent une face luminale tournée vers la lumière du vaisseau sanguin et une face abluminale ou basale du côté opposé. Il existe un transport paracellulaire de perméabilité passive qui, au travers des jonctions, permet de contrôler le passage des ions et des molécules entre le sang et le cerveau. Le transport transcellulaire au niveau de la cellule endothéliale peut être passif ou actif. Dans ce dernier cas, il y a deux types de transporteurs exprimés au niveau des cellules endothéliales : les transporteurs d'efflux et les transporteurs de nutriments.

Les transporteurs d'efflux utilisent l'hydrolyse de l'ATP pour transporter leurs substrats dans le sens contraire de leur gradient de concentration (Ha et al., 2007). Plusieurs de ces transporteurs sont localisés sur la surface luminale et permettent une large diffusion de substances vers le compartiment sanguin faisant ainsi barrière aux petites molécules lipophiles qui autrement passerait la membrane endothéliale.

Les transporteurs de nutriments favorisent l'entrée dans le parenchyme cérébral à travers la BHE de nutriments spécifiques dans le sens contraire de leur gradient de concentration. Bon nombre d'entre eux appartiennent aux transporteurs de solutés de la famille des *solute carriers* tel celui du glucose Glut-1 (Cornford et al., 1994), celui du lactate et du pyruvate entre autres (Zlokovic et al., 2008 ; Daneman et al., 2012). Alors que la plupart de ces transporteurs apportent des nutriments du sang au cerveau, d'autres transporteurs sont aussi importants pour l'évacuation de déchets.

La transcytose est un type de transport vésiculaire cavéoline-dépendant. La cavéoline-1 est exprimée par toutes les cellules endothéliales et son expression est augmentée en cas de trauma cérébral (Liu et al., 2010 ; Zhao et al., 2011 ; Gu et al., 2012). Plusieurs protéines utilisent comme transport la transcytose au travers de la BHE comme par exemple les récepteurs à l'insuline (Banks, W.A. et al., 2012 voir *revue*), à la leptine, à la transferrine ou aux LDL (low-density lipoprotein) (Preston, J.E. et al., 2014 *revue* ; Kastin, A.J. et al., 2016 *revue*).





**Figure 5 - Transports à travers les cellules endothéliales formant la BHE.** Une cellule peut potentiellement traverser la BHE au travers des jonctions serrées. Les solutés peuvent diffuser passivement à travers la membrane cellulaire. Des transporteurs actifs d'efflux peuvent pomper des solutés vers la circulation sanguine. Des transporteurs d'influx (transport passif ou actif secondaire) peuvent permettre le transport de molécules polaires (acides aminés, glucose, nucléosides) vers le SNC. Des récepteurs peuvent par transcytose permettre le transport de macromolécules telles que des peptides et protéines à travers l'endothélium. La transcytose par absorption permet le passage de molécules de charges positives de manière non-spécifique. Les jonctions serrées peuvent être modulées et affecter la perméabilité de la diffusion paracellulaire de solutés polaires. (Serlin et al., 2015)

Par ailleurs, dans le parenchyme cérébral, il n'y a pratiquement pas de cellules immunitaires telles que les lymphocytes et les neutrophiles. Néanmoins, dans certaines maladies inflammatoires, il y a un passage de leucocytes à travers de la BHE (infiltration leucocytaire). L'entrée de ces leucocytes est un processus en plusieurs étapes comprenant une adhésion et une extravasation médiée par une série de molécules d'adhésion aux leucocytes tels que les sélectines et des immunoglobulines présentes au niveau des cellules endothéliales (Huang et al., 2006 ; Aird et al., 2007b). Dans le cas de maladies inflammatoires, l'expression des molécules d'adhésion leucocytaire est augmentée (Henninger et al., 1997 ; Huang et al., 2006 ; Engelhardt et al., 2008 ; Daneman et al., 2010a) et différents types de cellules immunitaires s'infiltrent à travers la BHE comme par exemple, les lymphocytes T et B, les macrophages et les neutrophiles dans le cas de la sclérose en plaque.

Pour conclure, la BHE agit comme une barrière physique grâce aux jonctions serrées entre les cellules endothéliales adjacentes qui forcent la plupart des molécules à un trafic

transcellulaire. La présence d'un système de transport spécifique au niveau des membranes luminale et abluminale assure un transport sélectif, et avec l'intermédiaire d'enzymes intra et extracellulaires, permet à la BHE d'exercer une fonction de barrière métabolique. La BHE prévient donc la diffusion paracellulaire de solutés de manière non spécifique, favorise l'entrée de nutriments et permet l'évacuation dans la circulation sanguine des déchets de l'activité cérébrale liés à l'excès de neurotransmetteurs ou à la production de composés potentiellement nocifs (Abbott et al., 2010). L'ensemble des acteurs cellulaires de l'unité neuro-glio-vasculaire sécrète des molécules de signalisation assurant la régulation physiologique de la BHE mais dont la perturbation peut devenir pathologique. Par exemple, l'augmentation de la perméabilité de la BHE permet le passage de facteurs de croissance dans le cerveau alors que l'inflammation peut mener à un œdème cérébral.

A ce jour, on conçoit la BHE non plus seulement comme intrinsèque aux cellules endothéliales mais nécessitant l'environnement proche des astrocytes et des péricytes (Liebner et al., 2011). Ensemble, ces acteurs cellulaires participent aux propriétés de la BHE dont la régulation fine mais fragile peut être l'objet d'altérations à la moindre anomalie.

## **PATHOLOGIES ASSOCIEES A LA BARRIERE HEMATO-ENCEPHALIQUE**

Une rupture de la BHE est observée dans plusieurs pathologies du système nerveux central dont la sclérose en plaque (Cramer et al., 2014), l'accident vasculaire cérébral (Huang et al., 2011 ; Israeli et al., 2010), l'épilepsie (Fabene et al., 2013), la maladie d'Alzheimer (Erickson et Banks, 2013) incluant notamment un défaut de clairance des peptides amyloïdes- $\beta$  (Zlokovic et al., 2011), la maladie de Parkinson (Lu et al., 2012) et le diabète (Mogi et al., 2011). Un dysfonctionnement des mécanismes moléculaires liés aux jonctions serrées, à la transcytose, aux divers autres transporteurs ou même aux laminines peut altérer les propriétés de la BHE. Cette rupture de barrière peut engendrer un œdème, un déséquilibre de l'homéostasie ionique, une altération de la signalisation cellulaire et une infiltration leucocytaire, pouvant impacter le bon fonctionnement neuronal et in fine conduire à une neurodégénérescence. Bien que l'altération de la BHE soit souvent secondaire à un dysfonctionnement cérébral, il a été suggéré que dans certains cas, il peut être une cause primaire notamment dans la sclérose en plaque ou la maladie d'Alzheimer.

## Cas de la sclérose en plaque et de la neuromyélie optique

Dans la plupart des pathologies cérébrales, l'altération de la BHE est une conséquence de la neuroinflammation, d'une lésion ou d'une dégénérescence spécifique à la pathologie. Cependant, dans certaines maladies, la BHE est spécifiquement ciblée comme dans le cas de la sclérose en plaque et la neuromyélie optique, des maladies auto-immunes, inflammatoires et démyélinisantes, où les astrocytes ne sont pourtant pas les premières cibles du système immunitaire.

De ce point de vue, de nombreux facteurs à la fois environnementaux et génétiques peuvent être impliqués dans le développement du dérèglement du système immunitaire et conduire au développement de ces maladies auto-immunes. Ce qui est clair, c'est que durant l'infiltration de cellules immunitaires, la fonction de la BHE devient compromise (Larochelle et al., 2011) et caractérisée par une fuite vasculaire associée à l'altération des protéines de jonctions (Prat et al., 2001). Malgré son rôle neuroprotecteur, la BHE peut activement promouvoir une neuroinflammation. Les cellules endothéliales de la BHE sont une source de cytokines pro-inflammatoires (Biernacki et al., 2001 ; Kebir et al., 2007) nécessaires au recrutement leucocytaire infiltrant le parenchyme cérébral (Prat et al., 2001). Cette infiltration leucocytaire est en corrélation avec la production de facteurs pro-inflammatoires tels que l'interleukine IL-17, IL-22 et TNF- $\alpha$  (Alvarez et al., 2011b), qui dérèglent la fonction endothéliale et compromettent la perméabilité de la BHE. Les cellules endothéliales expriment alors des molécules ICAM qui favorisent encore plus l'infiltration leucocytaire (Cayrol et al., 2008 ; Dodelet-Devillers et al., 2009 ; Greenwood et al., 2011).

D'un autre point de vue, l'inflammation peut être positive ou négative en fonction du contexte de la maladie et de sa durée (DiSabato et al., 2016). En effet, les astrocytes réactifs peuvent être la source de facteurs positifs protégeant la BHE (à travers la voie Hedgehog) ou négatifs altérant la BHE. Dans la sclérose en plaque, le VEGF est exprimé par les astrocytes réactifs. Des études *in vitro*/*in vivo* montrent que le VEGF peut induire une rupture de la BHE par la perte d'expression de claudine-5 et d'occludine et ainsi promouvoir l'infiltration de cellules immunitaires dans le système nerveux central (Argaw et al., 2009). En effet, le VEGF sécrété par les astrocytes se fixe sur son récepteur endothélial VEGFR2 qui, via l'activation d'eNOS, diminue l'expression de claudine-5 et d'occludine (Argaw et al., 2012). En amont, l'expression de VEGF est stimulée par un facteur sensible à l'hypoxie appelé HIF-1 $\alpha$  (Hypoxia-inducible factor) (Argaw et al., 2006). Dans ce contexte inflammatoire, le VEGF diminue la stabilité de la BHE (Argaw et al., 2009, 2012).

De manière intéressante, deux canaux protéiques colocalisés à la membrane des pieds astrocytaires sont associés au bon fonctionnement physiologique de la BHE et de l'unité neuro-glio-vasculaire. Ce sont les canaux aquaporines AQP4 et les canaux potassiques Kir4.1, importants pour réguler respectivement l'homéostasie hydrique et potassique. Dans la sclérose en plaque, ce sont les canaux Kir4.1 qui sont ciblés par le système immunitaire alors que dans la neuromyéélite optique ce sont les canaux AQP4. Des études montrent que la perte d'expression d'AQP4 aussi bien que de dystroglycane, une protéine associée aux dystrophines, est associée à une inflammation périvasculaire et que ces modifications contribuent au développement de l'œdème (Fukuda et Badaut., 2012 ; Wolburg-Buchholz et al., 2009). Dans le cas de la neuromyéélite optique, maladie dont la moelle épinière et le nerf optique sont les plus affectés, la production d'anticorps anti-AQP4 impacte la fonction de l'aquaporine AQP4, ce qui impacte directement la fonction de la BHE. La fixation des anticorps anti-AQP4 sur leurs cibles conduit à l'activation du complément et à la perte d'AQP4 et d'un transporteur au glutamate EEAT2 fonctionnellement couplé à AQP4 (Hinson et al., 2008). De plus, ces dommages de la BHE sont associés à une infiltration de cellules immunitaires et une démyélinisation affectant les oligodendrocytes, symptôme caractéristique de la maladie.

### **Cas de l'hypoxie/ischémie et de l'accident vasculaire cérébral**

Une rupture de la BHE peut laisser passer dans le parenchyme cérébral des protéines potentiellement nocives (ex : thrombine, fibrine et plasmine), ce qui peut donner lieu à un œdème et induire une diminution du flux sanguin (Obermeier and al., 2013). Une réduction progressive du flux sanguin cérébral peut conduire, du fait d'un manque d'approvisionnement à un dysfonctionnement neuronal, une diminution de synthèse de protéines pouvant aller jusqu'à l'hypoxie. Des modèles animaux d'accidents vasculaires cérébraux (AVC) décrivent le processus de la fuite de la BHE en deux phases : (1) une première phase d'ouverture de la BHE, où la perméabilité vasculaire augmente pendant quelques heures suivant l'hypoxie/ischémie et est suivie d'une phase réfractaire puis (2) d'une seconde ouverture le jour suivant (Kuroiwa et al., 1985 ; Huang et al., 1999). Les altérations de la BHE se font aussi en deux étapes avec en premier lieu une augmentation de la transcytose puis une altération des jonctions serrées (Knowland et al., 2014). Après hypoxie, une réoxygénation peut augmenter l'expression d'occludine, de claudine-1 et de ZO-1/2. Des changements affectant les jonctions serrées sont connus pour augmenter l'expression du VEGF et l'inhibition de VEGF atténue l'augmentation de la perméabilité de la BHE induite par l'hypoxie (Fisher et al., 2002 ; Schoch et al., 2002).

Autre facteur impliqué dans l'hypoxie : Les métalloprotéinases (MMPs), des protéases qui ont la capacité de dégrader les laminines et les fibronectines de la lame basale. Or, il a été montré que les MMP-9, -3 et -2 sont augmentées à travers des voies pro-inflammatoires (nF-KB) ou même à travers Hif1 $\alpha$  (Lenglet et al., 2014). En absence de MMP-9 chez la souris KO-MMP9, l'altération de la BHE est réduite après induction d'ischémie (Asahi et al., 2001). Cependant, il n'est pas encore clair si les ruptures de BHE induite par les MMP sont au niveau de la lame basale ou des jonctions serrées et adhérentes, qui sont aussi cibles des MMP.

### **Cas de la maladie d'Alzheimer**

La possibilité que la BHE soit affectée dans la maladie d'Alzheimer (AD) est étudiée depuis déjà une trentaine d'années. Chez des patients atteints de la maladie d'Alzheimer, des expériences d'IRM et de PET-scan (Schlageter et al., 1987) montrent une fuite de la BHE (Montagne et al., 2015 ; Starr et al., 2009 ; Zipser et al., 2007 ; Wisniewski et al., 1997) et une diminution du flux sanguin cérébral (Eulate et al., 2017). De plus, la production du liquide cébrospinal est aussi diminuée (Silverberg et al., 2001). Des modèles humains et murins de la maladie d'Alzheimer présentent également une réduction des facteurs angiogéniques tel que le VEGF (Solerte et al., 2002 ; Viboolvorakul et al., 2014) et de la densité des capillaires (Paris et al., 2004 ; Lee et al., 2015 ; Buée L. et al., 2014), une accumulation de collagène et de perlecan dans la lame basale (Lepelletier et al., 2015) et une altération des protéines de jonctions serrées claudine-5 et occludine (Keaney et al., 2015) et des protéines des jonctions adhérentes comme la VE-cadhérine (Lee Daehoon et al., 2018)..

Le transport de l'amyloïde- $\beta$  (A $\beta$ ) dans le parenchyme cérébral semble être altéré (Storck L.E. et al., 2016), ainsi que son élimination (Shibata et al., 2000). L'hypothèse serait que l'altération de la clairance d'A $\beta$  conduirait à une accumulation neurotoxique d'A $\beta$  et à la formation des plaques amyloïdes autour des vaisseaux des patients AD. La transcytose comme mécanisme par lequel la clairance d'A $\beta$  se ferait est une piste de recherche (Pflanzner et al., 2011 ; Zhao et al., 2015). Le peptide soluble A $\beta$  est connu pour stimuler l'entrée de monocytes et induire l'expression de cytokines pro-inflammatoires TNF- $\alpha$  (Fillit et al., 1991) et IL-6 (Cojokaru et al., 2011), mais il peut aussi induire la production de MMP-9 (Lorenzl et al., 2003) et des ROS (reactive oxygen species) associés à une perte de la fonction mitochondriale (Beal et al., 2005 ; Tonnie et al., 2017 *review*). Ce processus inflammatoire accentuerait en retour l'accumulation d'A $\beta$ . Tous ces éléments pourraient contribuer à la dysfonction de la BHE et à l'accumulation d'A $\beta$ , bien que cela ne soit pas encore clairement démontré.

**En résumé**, différentes voies de signalisation sont impliquées dans ces pathologies cérébrales dont le trait commun est la rupture de la BHE. Cependant, ce qui déclenche ces différentes voies et les conséquences variées observées dans ces maladies reste à ce jour encore une voie de recherche active. Ce qui est clair, c'est que la rupture de la BHE est multifactorielle : rupture des jonctions serrées, altérations des transporteurs endothéliaux, du métabolisme, neuroinflammation. Ce qui est moins clair, c'est comment ces processus interagissent entre eux et ce qui les coordonne. Est-ce que la rupture de la BHE est une conséquence de la perte de signaux provenant des péricytes et/ou des astrocytes ? Ou bien est-ce à cause de signaux provenant des neurones et des cellules immunitaires ? Quels aspects sont protecteurs ou au contraire pathologique ? (Une réaction inflammatoire peut être bénéfique mais lorsqu'elle est chronique conduire à un dysfonctionnement). Une étude à grande échelle sur les différentes étapes impliquées dans chacune de ces maladies nous permettra à l'avenir de clarifier ces interrogations et développer des thérapies. Ceci nous montre l'urgence de mieux connaître et comprendre les facteurs régulant la BHE et ses dysfonctionnements. La présence de nombreuses protéines associées ou apparentées aux dystrophines dans les cellules gliales et/ou endothéliales suggère que des mécanismes dépendant de ces protéines pourraient être au cœur de certaines fonctions cruciales de la BHE.

# LES DYSTROPHINES

## LE GÈNE *DMD* ET SES DIFFÉRENTS PRODUITS

Les dystrophines assurent un rôle de plateforme moléculaire pour d'autres protéines, en assurant un lien physique entre le cytosquelette, la membrane plasmique et la matrice extracellulaire. D'abord identifiées dans les tissus musculaires squelettiques et cardiaques, les dystrophines sont également présentes dans différents types cellulaires non musculaires, tels que les neurones (Lidov et al., 1993) et les cellules gliales (Bar et al., 1993) dans le cerveau, les cellules de Schwann (Byers et al., 1993) dans le système nerveux périphérique, mais aussi dans d'autres organes tel que la rétine (Ahn et Kunkel, 1993 ; D'Souza et al., 1995 ; Fillers et al., 1993), les reins, le foie, le pancréas, les poumons, le cœur et les testicules (Bar et al., 1990 ; Durbeej et al., 1997 ; Muntoni et al., 1993).

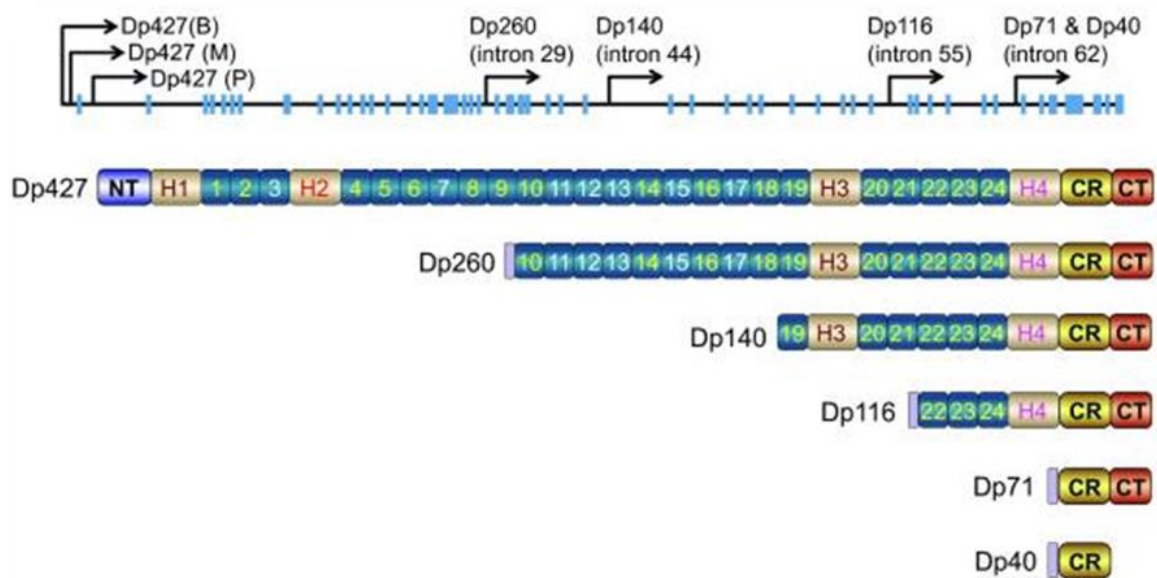
Les dystrophines sont codées par le gène *DMD* dont les mutations sont à l'origine de la dystrophie musculaire de Duchenne (DMD), une pathologie neuromusculaire liée à l'X et caractérisée par une dégénérescence musculaire associée à des troubles cognitifs.

Trois décennies après la découverte de la dystrophine (Koenig et al., 1988), nous parlons à présent de la famille des dystrophines. En effet, le gène *DMD* situé sur le bras court du chromosome X au locus Xp21, est l'un des gènes les plus longs du génome. Composé de 2.4 millions de paires de bases et de 79 exons, le gène *DMD* comprend au moins 7 promoteurs internes donnant lieu à l'expression de différentes dystrophines, qui ont en commun une portion C-terminale et qui sont nommées selon leur poids moléculaire. Trois promoteurs internes tissus-spécifiques régulent l'expression de la forme « complète » de la dystrophine, la Dp427 (de 427 kDa). Il s'agit du promoteur B pour « brain » (Nudel et al., 1989), M pour « muscle » (Barnea et al., 1990) et P pour « Purkinje cell » (Gorecki et al., 1992). Quatre autres promoteurs permettent l'expression des formes C-terminales plus courtes : Dp260, Dp140, Dp116 et Dp71/Dp40 (Figure 6).

Les dystrophines, en fonction du type tissulaire et/ou cellulaire, vont avoir différents partenaires d'interaction et ainsi différentes fonctions. Les dystrophines peuvent contenir différents domaines structuraux et fonctionnels :

Le domaine N-terminal des dystrophines permet l'interaction avec le cytosquelette d'actine alors que le domaine « riche en cystéine » et le domaine C-terminal permettent d'interagir avec les protéines du DAPC (complexe des protéines associées à la dystrophine). Le domaine riche en cystéine interagit avec le  $\beta$ -dystroglycane transmembranaire ( $\beta$ -DG) alors que la partie C-

terminale des dystrophines se lie aux protéines cytosoliques tels que les syntrophines (protéines de signalisation) et les dystrobrevines (homologues structuraux de la dystrophine). Les syntrophines présentent un domaine PDZ permettant d'ancrer à la membrane différents type de canaux et de récepteurs en fonction du type cellulaire et tissulaire. Par exemple, les canaux AQP4 et Kir4.1 en association avec la Dp71 au niveau des astrocytes périvasculaires, ou bien des récepteurs postsynaptiques, comme ceux de l'acétylcholine (AChR) en association avec l'utrophine dans les jonctions neuromusculaires, ou les récepteurs du GABA<sub>A</sub> (GABA<sub>A</sub>R) en association avec la Dp427 dans les synapses inhibitrices des neurones pyramidaux.

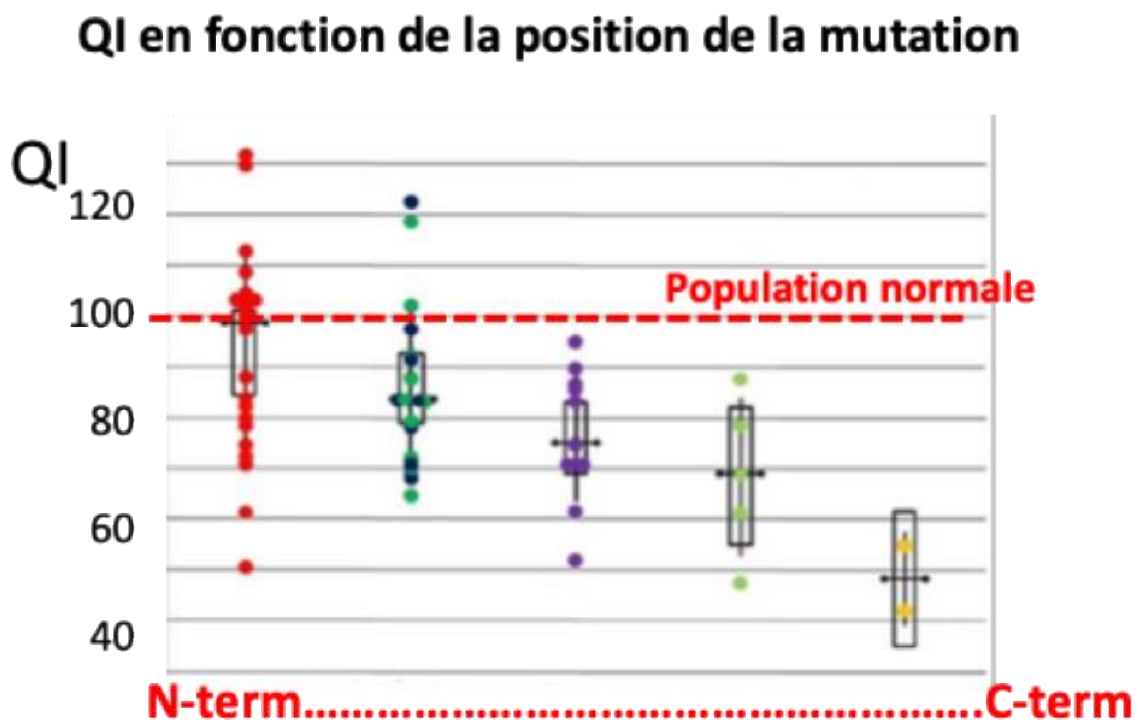


**Figure 6 - Organisation des différents produits du gène *DMD*.** La ligne verticale noire représente les 79 exons du gène *DMD* de la dystrophine. Les flèches indiquent les différents promoteurs des différentes formes de dystrophine : Dp427 tissu-spécifique (B : cerveau, M : muscle P : cellules de Purkinje), Dp260 (rétine), Dp140 (cerveau fœtal principalement), Dp116 (cellules de Schwann), Dp71 (majoritairement gliale dans le cerveau adulte) et la Dp40 (issu du clivage de la Dp71, détectée dans les neurones). La dystrophine comporte 4 domaines principaux : amino-terminal (NT), central, riche en cystéine (CR) et terminal (CT). Le domaine central est composé de 24 hélices de type spectrines (carrés bleus) et 4 domaines riches en proline (H1 à H4). Tous les produits du gène *DMD* possèdent un domaine N-terminal unique excepté la Dp140 (McGreevy et al., 2015).

Une déficience intellectuelle (quotient intellectuel inférieur à 70) est observée dans une sous-population de patients *DMD*, ce qui semble dépendre de la position de la mutation chez le patient, et donc du type de dystrophine touché par la mutation (Desguerre et al., 2009). En effet, l'étiologie des altérations cérébrales est complexe car les promoteurs internes permettent l'expression de différentes formes de dystrophines cérébrales (Perronnet et Vaillend, 2010).



Lorsque la mutation touche les premiers exons de la dystrophine (Dp427), il peut y avoir présence de déficits cognitifs légers sans pour autant que le QI soit affecté. En revanche, le QI des patients se détériore et conduit à une déficience intellectuelle lorsque la mutation est plus en aval et touche de façon cumulée les autres formes (Dp260, Dp140 et Dp116) et notamment l'une des formes la plus courte, la Dp71, qui est le produit du gène *DMD* le plus abondamment exprimé dans le système nerveux central. Les mutations affectant la Dp71 sont systématiquement associées aux déficiences intellectuelles les plus sévères (Moizard et al., 2000 ; Daoud et al., 2009). Comme la Dp71 est exprimée de manière abondante dans la glie, cela suggère que des altérations gliales participent à l'aggravation des déficits cognitifs dans cette pathologie.



**Figure 7 - Dégradation du QI chez les patients DMD en fonction de la position de la mutation.** Pour les groupes de patients dont les mutations touchent la partie N-terminale (rouge : perte uniquement de Dp427 ; vert : Dp427+Dp260), le QI n'est pas affecté. Les patients des groupes dont les mutations sont plus en aval (violet : perte aussi de Dp140 ; vert clair : perte aussi de Dp116) voient leur QI se détériorer et certains présentent une déficience intellectuelle (QI<70). Pour les groupes de patients en vert, Les mutations les plus en aval touchant la partie C-terminale (groupe en jaune, avec perte cumulée de toutes les dystrophine y compris la Dp71) conduisent à la perte de l'ensemble des dystrophines y compris la Dp71 et à une déficience intellectuelle sévère (Taylor et al., 2010)

### ***La Dp427***

La Dystrophine Dp427, forme la plus longue et complète, est exprimée dans le sarcolemme des muscles, où elle permettrait de stabiliser et protéger la membrane des fibres musculaires des contractions à long terme. Sa perte conduit à une altération du complexe de protéines associés à la Dp427 et à l'activation de mécanismes tel que l'augmentation de calcium intracellulaire (Culligan and Ohlendieck., 2002), l'infiltration de cellules immunitaires (macrophages) dans le tissu musculaire (Evans et al., 2009), la production de cytokines pro-inflammatoires et de NO (nitric oxyde) lié au stress oxydatif (Rando et al., 2001) via la voie NF- $\kappa$ B (Tidball and Villalta, 2010 ; Pescatori et al., 2007 ; Acharyya et al., 2007 ; Moylan and Reid, 2007), de protéases (Li et al., 2009) et d'une altération de l'autophagie (Mammucari et al., 2007). Ces mécanismes induisent une nécrose progressive des muscles, responsable de la myopathie de Duchenne. Dans le muscle squelettique, la Dp427 colocalise avec les canaux sodiques (Gee et al., 1998). Dans le cerveau, la dystrophine Dp427 est aussi exprimée, mais au niveau des neurones. Elle semble moduler l'agrégation, ou clustering, des récepteurs GABAergiques (Fritschy et al., 2003), mais pourrait aussi interagir avec des canaux sodiques (Gee et al., 1998). Ces derniers sont exprimés au niveau post-synaptique des synapses inhibitrices des neurones (Lidov et al., 1993) de plusieurs structures du cerveau impliquées dans la cognition, tels que les neurones pyramidaux de l'hippocampe (Chaussonnet et al., 2015), les cellules de Purkinje du cervelet (Knussel et al., 1999), les neurones principaux du cortex ainsi que ceux de l'amygdale.

### ***La Dp260***

Détectée dans la rétine (Pillers et al., 1933), elle est principalement exprimée dans la couche plexiforme externe au niveau des cellules photoréceptrices (Wersinger et al., 2011). Elle possède 13 nouveaux acides aminés (D'Souza et al., 1995) au niveau de sa partie N-terminale, mais comporte le même domaine C-terminal riche en cystéine que la Dp427. Sa perte chez les patients cause des dommages oculaires. Pour ceux dont les mutations sont en amont de l'exon 30 (i.e. touchant la Dp427), l'électrorétinogramme (ERG), qui mesure l'amplitude des ondes lentes nécessaires entre les cellules photoréceptrices et cellules bipolaires de la rétine, montre un profil normal (Ricotti et al., 2015). En revanche, tous les patients dont les mutations sont en aval de l'exon 30, et qui empêchent donc notamment l'expression de la Dp260 rétinienne,

présentent un profil ERG avec une onde b négative, encore plus sévère pour ceux dont la Dp71 est affectée (Ricotti et al., 2016).

### ***La Dp140***

Découverte par Lidov et al., en 1995 au travers d'analyses de Western blots de régions cérébrales disséquées, la Dp140 a été détectée dans le système nerveux central (cortex, cervelet, hippocampe) et les reins. Lidov met en évidence que la Dp140 est fortement exprimée par le cerveau fœtal, mais semble essentiellement présente au niveau gliovasculaire dans le cerveau adulte, mais ceci reste à confirmer. Elle est fréquemment associée à la présence d'une déficience intellectuelle chez les patients atteints de la DMD (Taylor et al., 2010). Contrairement aux autres dystrophines, elle ne possède pas de domaine N-terminal spécifique.

### ***La Dp116***

Identifiée par Byers et al. en 1993, la Dp116 est exclusivement exprimée dans les cellules de Schwann des nerfs périphériques. Dans ces cellules, ni la Dp71 ni la Dp427 n'ont été détectées. Le rôle physiologique de la Dp116 est peu connu. Chez la souris, les cellules de Schwann montrent un lien entre la Dp116 et le complexe Drp2/periaxin (Sherman et al., 2012) ainsi qu'avec un transporteur de cholestérol ABCA1 (ATP-binding cassette transporter A1) (Albrecht et al., 2008). Un seul patient a été identifié comme possédant une mutation sur un site d'épissage qui inhibe l'expression de la Dp116 et présente une neuropathie démyélinisante (Scherer et al., 2002).

### ***La Dp71***

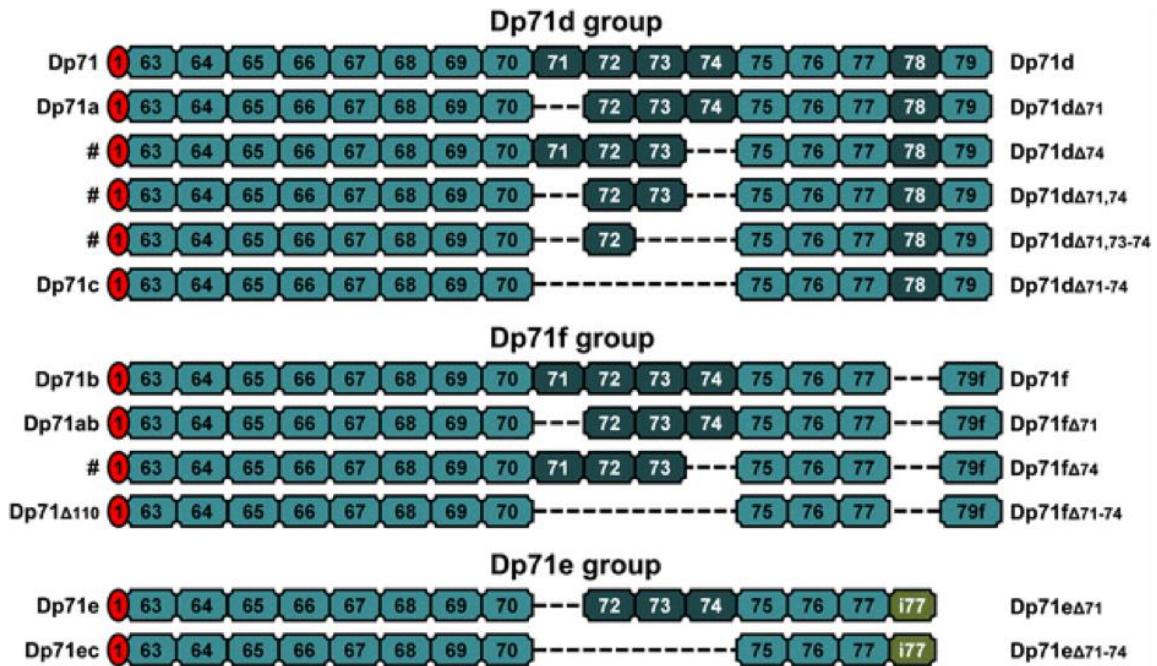
La Dp71, forme identifiée au départ comme la plus courte (Nudel et al., 1989), est la dystrophine la plus abondamment exprimée dans le cerveau. L'expression de la Dp71 augmente graduellement au cours du développement embryonnaire et sa localisation a été mise en évidence pour la toute première fois au niveau des membranes synaptiques par le groupe d'A. Rendon (Jung et al., 1993), puis dans les cellules souches embryonnaires pluripotentes (Sarig et al., 1999). Son promoteur est situé entre l'exon 62 et l'exon 63 et permet une expression ubiquitaire de la Dp71 dans de nombreux tissus (cerveau, poumons, reins, foie, estomac, testicules) excepté le muscle squelettique adulte (Bar et al., 1990 ; Lederfein et al., 1992, 1993 ;

Blake et al., 1992 ; Hugnot et al., 1992). En effet, l'inhibition des facteurs de transcription Sp1 et Sp3 empêche l'expression de la Dp71 dans le muscle adulte (León et al., 2005).

La Dp71 ne possède pas de domaine spectrine mais conserve la partie C-terminale pouvant lier la syntrophine et la dystrobrevine ainsi que le domaine riche en cystéine permettant une liaison avec le dystroglycane. Cependant, la région C-terminale de la Dp71 subit de nombreux épissages alternatifs (Bies et al., 1995 ; Austin et al., 1995 ; Lumeng et al., 1999 ; Feener et al., 1989 ; Jin et al., 2007). A ce jour, il a été identifié trois groupes d'isoformes et une nouvelle nomenclature a été proposée par l'équipe de C. Montañez en fonction de l'épissage alternatif des exons (77 à 74, 78 et l'intro 77) et de leur terminaison C-terminale : Dp71d, Dp71f et Dp71e. Les isoformes du groupe Dp71d possèdent les exons 78 et 79 ; celles du groupe Dp71f ne possèdent pas l'exon 78 et présentent un exon 79 alternatif (79f), enfin le groupe Dp71e possède l'intron 77 mais pas les exons 78 et 79 (Aragón et al., 2017).

Les différentes isoformes de la Dp71 montrent une distribution dans le noyau, le cytoplasme et à la périphérie de la cellule. Durant la différenciation des cellules PC12 - lignée cellulaire dérivée d'un phéochromocytome de la médullaire surrénale du rat (Cisneros et al., 1996) - les isoformes de la Dp71 qui contiennent les exons 78 et 79 ont une localisation nucléaire alors que celles dont il manque l'exon 78 mais gardent l'exon 79 ont une distribution cytosolique/membranaire (Marquez et al., 2003). Il a été montré que la protéine Dp71 participe à la prolifération cellulaire, l'architecture nucléaire, la division cellulaire, mais aussi la migration, l'invasion, l'apoptose, l'adhésion et la différenciation cellulaire (Cerna et al., 2006 ; Tayadoni et al., 2012 ; Tan et al., 2017 ; Siquieros-Marquez et al., 2017 ; Herrera-Salazar et al., 2016 ; Aragón et al., 2011 ; Garcia-Cruz et al., 2018).

Ainsi, l'existence de plusieurs épissages alternatifs possibles donne lieu à différentes fonctions potentielles de la Dp71. Il semblerait qu'en fonction de la présence ou non de certains domaines d'interaction, ces isoformes pourraient s'exprimer de manière différentielle dans différents types cellulaires ou à différents stades au cours du développement. Par exemple, la Dp71e $\Delta$ 71 est impliquée dans la croissance des neurites et la différenciation neuronale (Garcia-Cruz et al., 2018). A ce jour, on sait que le groupe des isoformes Dp71d est fortement exprimé dans le cerveau alors que celui des isoformes Dp71f prédomine dans la rétine (Aragón et al., 2017). Cependant le rôle spécifique de chaque isoforme de la Dp71 reste encore à l'étude.



**Figure 8 – Les différentes isoformes de la Dp71.** Groupes des isoformes de la Dp71 (Dp71d, Dp71f et Dp71e). Le groupe Dp71d se caractérise par la présence des exons 78 et 79, le groupe Dp71f perd l'exon 78 et possède un exon 79 alternatif et le groupe Dp71e possède l'intron 77 mais perd les exons 78 et 79. Les noms à gauche désignent le nom des isoformes avec le symbole # désignant les nouvelles isoformes découvertes en 2017. Les pointillés représentent les différents épissages. A droite, une nouvelle nomenclature est proposée par les auteurs avec la lettre désignant l'appartenance au groupe (d, f ou e) et le symbole Δ précédant l'exon épissé (Aragon et al., 2017).

Le rôle physiologique de la Dp71 dans la rétine et le cerveau au niveau des synapses excitatrices des neurones glutamatergiques et des astrocytes périvasculaires sera détaillé dans le chapitre dédié à l'étude des modèles murins déficients en dystrophine Dp71 (p. 63). En effet, une description détaillée des protéines associées à la Dp71 est un préambule nécessaire à la compréhension du phénotype des souris déficiente en cette dystrophine.

### **La Dp40**

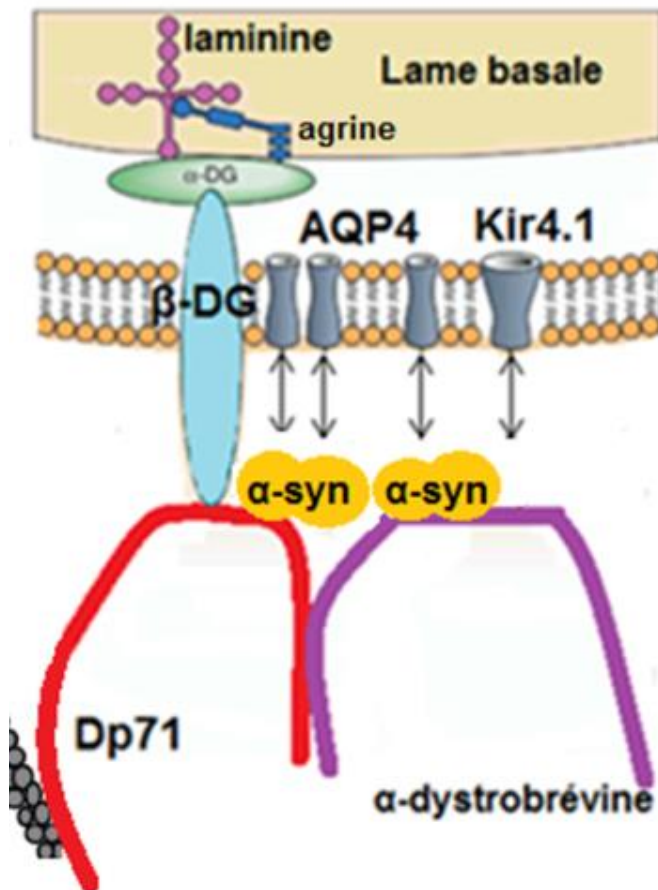
Elle peut être considérée comme une autre isoforme de la Dp71 issue d'un arrêt prématuré de la transcription de la Dp71. Mise en évidence par Tinsley et son équipe en 1993, il s'agit du produit du gène *DMD* le plus court connu à ce jour. Protéine de 341 acides aminés, elle ne possède pas la fin du domaine C-terminal des autres dystrophines mais contient plusieurs domaines fonctionnels importants, et son rôle reste encore à déterminer. Une hypothèse émise

par l'équipe de Tozawa en 2012 suggère un rôle de la Dp40 dans les neurones, en interaction non pas avec le dystroglycane, mais avec des protéines des vésicules du compartiment présynaptique incluant SNAP25 et la syntaxine 1A. Cependant, le même groupe (Fujimoto et al., 2014) propose aussi une localisation postsynaptique et somatodendritique de la Dp40, tandis qu'Aragón et al., 2015 montrent que la Dp40 possède un site d'interaction avec le  $\beta$ -dystroglycane (exon 63-70). Ainsi, la Dp40 serait plutôt une dystrophine de type neuronal avec des fonctions dendritiques et synaptiques, mais les recherches sur le rôle précis de cette isoforme restent à poursuivre.

Afin de mieux comprendre le rôle de la Dp71 en tant que protéine de plateforme moléculaire au sein du complexe identifié dans les pieds gliaux périvasculaires, je vais maintenant décrire les différents composants du DAPC qui interagissent directement ou indirectement avec la Dp71.

## COMPLEXE DES PROTEINES ASSOCIEES A LA DYSTROPHINE (DAPC) ET PHYSIOPATHOLOGIE

Au cœur d'un complexe macromoléculaire, la Dp71 gliale interagit avec le  $\beta$ -dystroglycane transmembranaire, lui-même associé à l' $\alpha$ -dystroglycane extracellulaire, qui est un récepteur des protéines de la matrice extracellulaire telles que la laminine et l'agrine de la lame basale. La Dp71 interagit également avec des protéines cytosoliques, comme l' $\alpha$ -syntrophine et l' $\alpha$ -dystrobrevine, qui permettent l'ancrage à la membrane des pieds gliaux des canaux hydriques aquaporine-4 (AQP4) (Amiry- Moghaddam et Ottersen, 2003 ; Neely et al., 2001) et des canaux potassiques Kir4.1 (Connors et Kofuji., 2002 ; Connors et al., 2004 ; Dalloz et al., 2003), suggérant un rôle important de la Dp71 dans l'homéostasie hydrique et potassique (Figure 9).



**Figure 9 - Le complexe des protéines associées à la Dp71 à la membrane des astrocytes périvasculaires.** Dp71 en interaction (1) avec le  $\beta$ -dystroglycane transmembranaire associée à l' $\alpha$ -dystroglycane et les protéines de la matrice extracellulaire (laminine, agrine) de la lame basale ; (2) avec les  $\alpha$ -syntrophines et l' $\alpha$ -dystrobrevine, qui interagissent avec les canaux AQP4 et les canaux Kir4.1 DG : dystroglycane ; syn : syntrophine.

## SYNTROPHINES, DES PROTÉINES ADAPTATRICES

Les syntrophines sont une famille de protéines cytoplasmiques dites adaptatrices ; elles permettent via la dystrophine l'interaction du complexe DAPC avec des canaux ioniques et des protéines de signalisation. Elles sont au nombre de cinq isoformes, chacune de 59 kDa ( $\alpha$ ,  $\beta$ 1,  $\beta$ 2,  $\gamma$ 1 et  $\gamma$ 2). La nomenclature de ces isoformes est basée sur le fait que la protéine  $\alpha$ -syntrophine est acide alors que les  $\beta$ -syntrophines sont basiques. Toutes les isoformes de la famille de syntrophine existent en tant que monomère ou dimère et chacune d'entre elles peut interagir avec l'autre. Chez l'humain, l'isoforme alpha est codée par le gène *SNTA1*, les isoformes beta ( $\beta$ 1- et  $\beta$ 2-syntrophines) sont codées respectivement par *SNTB1* et *SNTB2* et les isoformes gamma ( $\gamma$ 1- et  $\gamma$ 2 - syntrophines) par les gènes *STNG1* et *STNG2*. Chacune des différentes syntrophines possède un domaine PDZ qui sert d'adaptateur pour le recrutement d'autres protéines transmembranaires ou cytosoliques (canaux ioniques, récepteurs, kinases), via sa fixation aux parties C-terminales de ces dernières (Albrecht DE et al., 2002). Elles possèdent également deux domaines pleckstrines PH1 et PH2 (pleckstrin homology) ainsi qu'un domaine SU (syntrophin unique domain). Les domaines PH2 et SU sont responsables de la fixation à la dystrophine, l'utrophine et la dystrobrevine (Bhat, 2019).

La distribution des diverses formes de syntrophines et leurs combinaisons varient selon les compartiments cellulaires. Dans le muscle squelettique, les syntrophines  $\alpha$ ,  $\beta$ 1,  $\beta$ 2 se lient à l'actine (Iwata et al., 2004), régulant l'organisation du cytosquelette dans le muscle. Au niveau de la fibre musculaire cardiaque, les syntrophines  $\alpha$ ,  $\beta$ 1,  $\beta$ 2 permettent l'ancrage du canal sodique Nav1.5 à la membrane de même que des récepteurs  $\alpha$ 1D-adrénergiques (Lyssand et al., 2011). Les formes  $\alpha$  et  $\beta$ 1 sont fortement exprimées dans le muscle cardiaque et squelettique et moins dans le cerveau, à l'inverse de la  $\beta$ 2 qui est par exemple exprimée dans les cellules granulaires du cervelet. A cela s'ajoutent les formes  $\gamma$  : la  $\gamma$ 1-syntrophine a été détectée uniquement dans le cerveau, spécifiquement dans les neurones pyramidaux de l'hippocampe, les cellules de Purkinje du cervelet ainsi que les neurones du cortex cérébral (Alessi et al., 2006) tandis que la  $\gamma$ 2-syntrophine également exprimée dans le cerveau présente une distribution tissulaire plus large chez les mammifères, notamment dans le muscle squelettique, le foie, les testicules (Piluso et al., 2000). Dans la rétine, les dimères d' $\alpha$ 1 et de  $\beta$ 1-syntrophine sont exprimés dans les cellules gliales de Müller et les astrocytes (Fort et al., 2008). Au niveau cérébral, l' $\alpha$ -syntrophine et son association différentielle avec d'autres syntrophines ( $\alpha$  ou  $\beta$ ) pour former une paire, en fait un partenaire essentiel du complexe DAPC dans l'ancrage des



canaux AQP4 et Kir4.1 à la membrane des astrocytes périvasculaires, dont le rôle est crucial pour l'homéostasie hydrique et potassique. (Neely et al., 2001 ; Amiry-Moghaddam et al., 2003b). Par ailleurs, les syntrophines (en particulier la forme  $\alpha 1$ ) sont aussi associées aux canaux TRPC régulant l'homéostasie du calcium (Vandebrouck et al., 2007), aux phospholipides impliqués dans l'homéostasie lipidique (Rigot et al., 2002), aux calmodulines (Brennan et al., 1995) et aux neuroligines via la  $\gamma 2$ -syntrophine dont les mutations sont associées à l'autisme (Yamakawa et al., 2007). Même si à ce jour les fonctions des syntrophines ne sont pas complètement élucidées, on connaît son implication dans divers processus biologiques : développement musculaire, fonction synaptique, régulation du calcium musculaire, voies de signalisation.

### ***La souris KO-syntrophine***

La perte de syntrophine au niveau du muscle squelettique est associée à des pathologies de développement neuromusculaires caractérisées par des altérations de la formation des jonctions neuromusculaires (Adams et al., 2004), au sein desquelles les syntrophines  $\alpha$ -1 et  $\beta$ -2 sont primordiales. En raison de l'implication de la syntrophine dans différents complexes macromoléculaires, la perte de syntrophine peut avoir des conséquences physiopathologiques sur chacun de ses partenaires protéiques. En effet, l'absence de syntrophine peut provoquer un dysfonctionnement des canaux TRPC et une altération des nNOS conduisant respectivement à une augmentation anormale de la concentration calcique et à des dommages oxydatifs. En conséquence, des enzymes protéolytiques sont activées et induiraient la dégénération musculaire caractéristique de la DMD. En plus des dystrophies musculaires, les syntrophines sont associées à des pathologies cardiovasculaires. En effet, dans le sarcolemme des cardiomyocytes, la perte d'interaction de nNOS et des canaux sodiques NaV1.5 ou des récepteurs  $\alpha 1D$ -adrénergiques avec l' $\alpha$ -syntrophine peuvent engendrer des anomalies du rythme cardiaque e.g. syndrome long-QT (Ueda et al., 2008 ; Cheng et al., 2009) et de la pression sanguine (Tanoue et al., 2002). Par ailleurs, la syntrophine  $\beta 2$  a été récemment mise en évidence au niveau des granules d'insuline sécrétés par les cellules  $\beta$  pancréatiques et pourrait être impliquée dans le diabète de type 2 (Schubert et al., 2010 ; Trajkovski et al., 2008).

Dans la rétine, l'équipe d'Amiry-Moghaddam a mis en évidence en 2006 les conséquences de la perte de l' $\alpha$ -syntrophine sur l'expression d'AQP4 et de Kir4.1 dans les cellules macrogliales de la rétine, les cellules gliales de Müller (Puwaeawuttipanit et al., 2006).

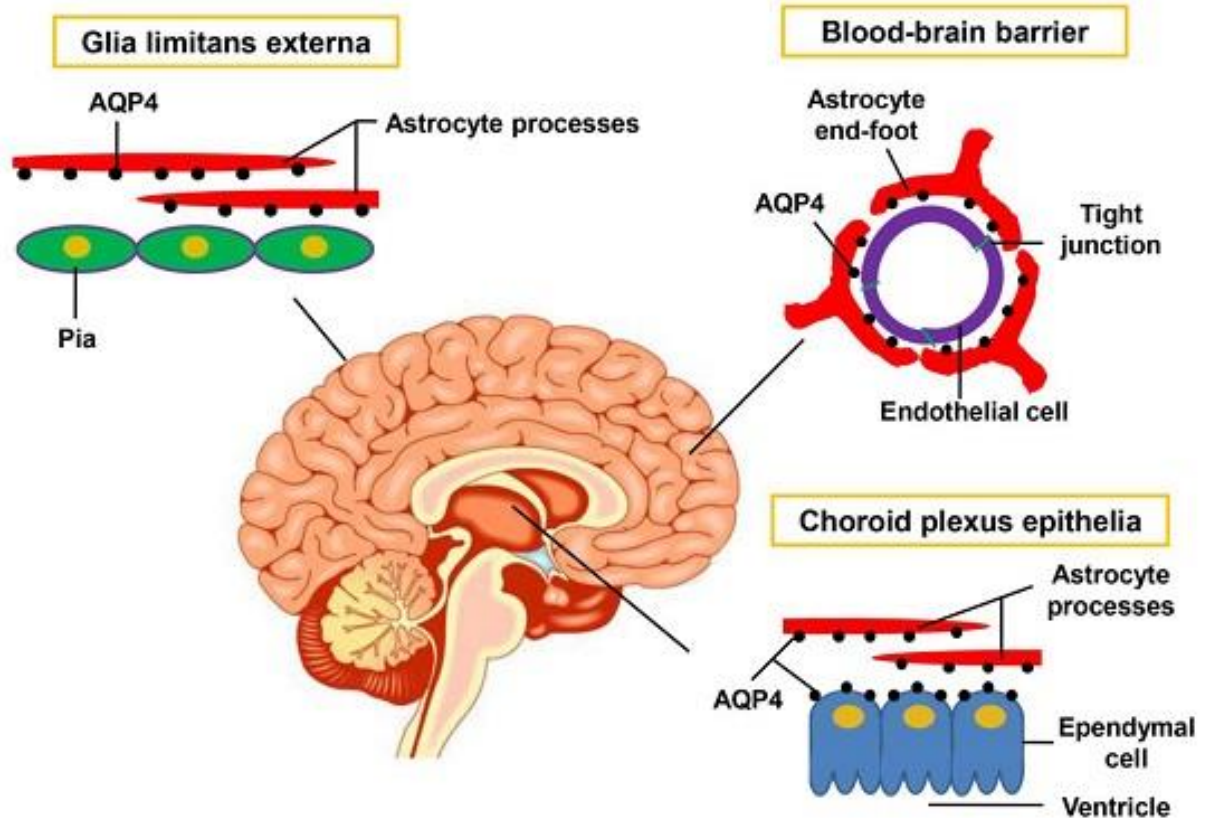
Dans le cerveau, l' $\alpha$ -syntrophine est indispensable pour l'ancrage des canaux aquaporines AQP4 à la membrane des astrocytes périvasculaires (Neely et al., 2001), ainsi que pour la clairance du potassium (Amiry-Moghaddam et al., 2003b), en interaction avec une dystrophine (Nico et al., 2004 ; Vajda et al., 2002). Plus précisément, la perte d' $\alpha$ -syntrophine induit une perte d'expression polarisée d'AQP4 au niveau de la membrane des pieds astrocytaires. Cette polarisation dépend de deux facteurs : Le premier étant que la protéine doit être dirigée à la membrane. Le second est qu'elle doit être maintenue à la membrane lipidique. Pour ce faire, les protéines d'ancrage telles que les syntrophines sont indispensables. En conséquence de l'absence de syntrophine et donc de la délocalisation du pool membranaire d'AQP4 des astrocytes périvasculaires, des perturbations du transport d'eau avec formation d'œdèmes apparaissent chez la souris déficiente en  $\alpha$ -syntrophine (Amiry-Moghaddam et al., 2004). En effet, l' $\alpha$ -syntrophine est le facteur le plus déterminant dans la taille des pools d'AQP4 périvasculaires et de leur capacité à drainer l'eau à l'interface gliovasculaire (Hoddevik et Amiry-Moghaddam, 2017). De plus, nous savons à présent qu'au niveau du « pied astrocytaire » l' $\alpha$ -syntrophine se trouve au cœur d'un complexe impliquant la dystrophine Dp71, l' $\alpha$ -dystrobrevine-2 et la  $\gamma$ 2-syntrophine alors que de dans les cellules endothéliales faisant face aux pieds des astrocytes, ce sont les  $\beta$ 1 et  $\beta$ 2- syntrophines que l'on retrouve au sein d'un autre complexe avec l' $\alpha$ -dystrobrevine-1 et l'utrophine comme protéines de support sous-membranaire (Bragg et al., 2011). La syntrophine est donc un acteur majeur dans la stabilité et la polarisation des complexes macromoléculaires membranaires. En particulier l' $\alpha$ -syntrophine dans la polarisation gliale des canaux AQP4 et Kir4.1 avec son rôle important dans l'homéostasie hydrique et potassique.

La perte de polarisation gliale d'AQP4 est un trait commun à de nombreuses pathologies telles que l'épilepsie du lobe temporal (Eid et al., 2005), Alzheimer (Yang et al., 2011), les glioblastomes (Noell et al., 2012), les traumatismes et accidents vasculaires cérébraux (Frydenlund et al., 2006). Par ailleurs, dans des modèles pathologiques d'induction d'hyponatrémie et/ou d'AVC expérimental (par occlusion de l'artère cérébrale moyenne, MCAO), la souris déficiente en  $\alpha$ -syntrophine présente une protection vis-à-vis du développement d'œdème (Amiry-Moghaddam et al., 2004) et de la mauvaise distribution des canaux AQP4 périvasculaires qui perturbe les échanges d'eau avec le parenchyme. Des inhibiteurs du récepteur à la vasopressine (antidiurétique) ou du cotransporteur  $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-2Cl}^-$ , respectivement le conivaptan et le bumétanide, ont le même effet protecteur contre l'œdème et

agirait partiellement via le blocage des canaux AQP4 périvasculaires (Nakayama et al., 2016 ; Migliati et al., 2010).

## **AQUAPORINES ET HOMÉOSTASIE HYDRIQUE**

Les aquaporines sont une famille de canaux protéiques transmembranaires permettant le transport bidirectionnel de l'eau entre le sang et le parenchyme cérébral (Naghelhus et al., 2013 ; Papadopoulos et al., 2013). Parmi les 9 aquaporines exprimées dans le cerveau, AQP4 est l'aquaporine la plus abondante et est principalement exprimée dans les « pieds astrocytaires » en bordure de la barrière hémato-encéphalique (Nielsen et al., 1997), de la pie-mère (glia limitans externe) et dans les épendymocytes (glia limitans interne) qui tapissent les ventricules cérébraux à l'interface avec le liquide cébrospinal (Figure 10). Plus précisément dans le cerveau, AQP4 est exprimée dans des régions du tronc cérébral, dans l'hippocampe et le cortex autant que dans l'hypothalamus et le thalamus mais le plus fortement dans le cervelet. (Hubbard et al., 2015). Son expression est relativement homogène dans le cortex cérébral, mais dans certaines sous-couches de l'hippocampe et du cervelet, l'expression est hétérogène (Hubbard et al., 2015). Elle est également présente dans de nombreux tissus épithéliaux dans divers autres organes (poumons, reins, iléum du tube intestinal, etc.), mais exclusivement au niveau de la membrane basolatérale. L'AQP4 est également exprimée dans des cellules macrogliales d'organes sensoriels, notamment dans la rétine (cellules gliales de Müller), dans des couches spécifiques du bulbe olfactif, la couche glomérulaire et la couche interne du nerf olfactif (Beiersdorfer et al., 2020), et dans les noyaux ventraux de la cochlée, expliquant respectivement diverses altérations de la fonction rétinienne (Li et al., 2002), de l'olfaction (Lu et al., 2008) et de l'audition (Li et al., 2001) chez les souris KO-AQP4.



**Figure 10 – Expression d’AQP4 au niveau des trois barrières du SNC.** AQP4 est polarisé au niveau des pieds gliaux de la barrière CSF-parenchyme cérébral et de la barrière hémato-encéphalique. Les cellules épendymales bordant les ventricules cérébraux expriment AQP4 au niveau de leur membrane basolatérale. (Heling Chu et al., 2016)

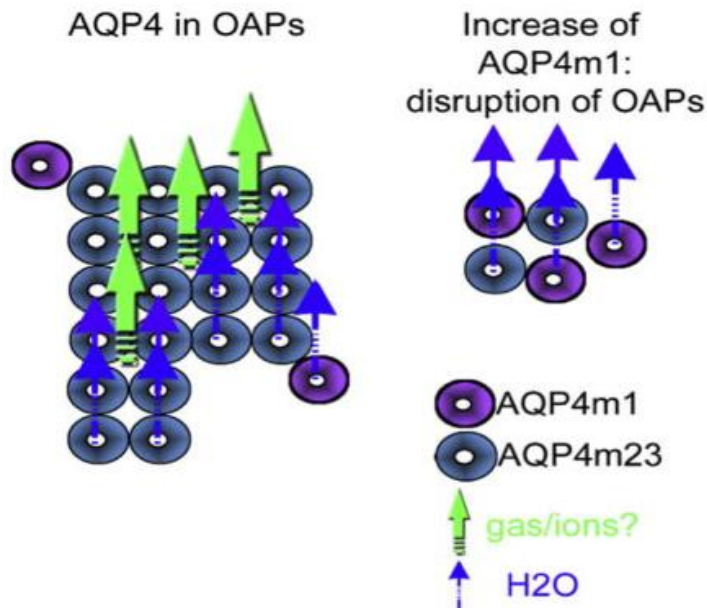
Le canal aquaporine est un tétramère dont chacun des monomères est formé par six hélices transmembranaires et deux motifs peptidiques Asn-Pro-Ala créant un pore permettant le passage de l’eau. Les tétramères d’AQP4 sont regroupés à la membrane par des interactions N-terminales (Crane et Verkman, 2009), sous forme de clusters appelés OAPs (orthogonal arrays of intramembranous particles), structure des molécules « rangées en carré » observée en microscopie électronique par cryofracture. AQP4 existe sous deux isoformes majeures qui diffèrent par le début d’initiation de la traduction : l’isoforme dite complète AQP4-M1 dont l’initiation commence au niveau de la Methionine-1 (34 kDa) et la plus courte AQP4-M23 dont le premier acide aminé est la méthionine-23 (31 kDa). Les résidus en amont de la Met-23 de l’isoforme M1 empêchent des interactions N-terminale spécifiques de se former. Ainsi, seules les isoformes M23 sont capables de s’associer entre elles pour former des OAPs (Rash et al., 1998 ; Furman et al., 2003). Mais l’équipe de Verkman met en évidence que M23 et M1 peuvent également s’associer en hétérotétramères et former à leur tour des OAPs de taille différente que celles exprimant AQP4-M23 seul (Crane et al., 2009). Il a été suggéré que ces OAPs servent à améliorer le transport de l’eau, à maintenir les pools d’AQP4 dans les « pieds gliaux » et à

favoriser l'adhésion cellulaire (Silberstein et al., 2004 ; Van Hoek et al., 2000 ; Rash et al., 1998 ; Yang et al., 1997 ; Amiry-Moghaddam et al., 2004). Une autre isoforme plus longue d'AQP4 existe (Mz 39 kDa) mais elle n'a été identifiée à ce jour que chez le rat. On ne savait pas si les OAPs de différentes tailles pouvaient correspondre à des complexes d'AQP4 fonctionnellement différents, or on sait maintenant qu'il existe des pools d'AQP4 en OAPs de tailles distinctes associés à des protéines d'ancrage différentes mis en évidence dans le cervelet en absence de Dp71 (Nicchia et al., 2008).

L'aquaporine AQP4 interagit avec de nombreuses protéines, notamment celles associées aux dystrophines (DAPC, dystrophin-associated protein complex). Par des techniques de co-immunoprécipitation, des interactions via le domaine PDZ C-terminal d'AQP4 ont été montrées avec, par exemple, les domaines PDZ des syntrophines (Adams et al., 2001) ou avec la dystrobrevine (Adams et al., 2008). Cependant, la perte d'AQP4 cause une légère réduction de la dystrophine et ne modifie pas l'expression du dystroglycane (Eilert-Olsen et al., 2012). Les principales interactions directes de l'AQP4 avec les protéines du DAPC sont avec l' $\alpha$ -syntrophine, comme mentionné précédemment, la dystrophine et la dystrobrevine, via les syntrophines. D'autres protéines peuvent en revanche favoriser le clustering d'AQP4 en OAP comme l'agrine (Noell et al., 2009), l' $\alpha$ 2-laminine (Long Tham et al., 2016), le dystroglycane (Noell et al., 2011) et l' $\alpha$ -dystrobrevine (Lien et al., 2012). Par ailleurs, il a été mis en évidence qu'un certains nombres de canaux ioniques interagissent avec AQP4. Appelés « co-transporteurs d'eau », tels que les canaux VRACs (volume-regulated anion channels), ils sont perméables à la fois à l'eau et aux ions et contribueraient au gonflement astrocytaire (Nilius et al., 2004 ; Zeuthen et al., 2010). En dehors de ces co-transporteurs, le TRPV4 (transient receptor potential vanilloid 4) interagit physiquement avec AQP4 (Benfenati et al., 2011) et contrôle le volume cellulaire de l'astrocyte. Plus récemment découvert, le complexe tripartite SUR1-TRMP4-AQP4 (Stokum et al., 2018), surexprimé dans des conditions pathologiques comme la formation d'œdème (Simard et al., 2006), permettrait d'amplifier le flux eau/ions et de contrôler le gonflement de l'astrocyte. SUR1-TRMP4 est ainsi une cible pharmacologique intéressante car son blocage réduit le swelling astrocytaire suite à un AVC (Sheth et al., 2016).

Par ailleurs, l'AQP4 a de nombreux sites de phosphorylation importants pour sa régulation, sa synthèse et sa dégradation. En effet, un des sites sérine de phosphorylation (Ser<sup>180</sup>) dépendant de la PKC (Protéine Kinase C) permet l'internalisation d'AQP4 et la diminution de la perméabilité (Zelenina et al., 2002), alors qu'un autre site Ser<sup>111</sup> permettrait à l'inverse l'augmentation de la perméabilité hydrique (Silberstein et al., 2004). La

phosphorylation du site Ser<sup>276</sup> par la CKII (Casein kinase II) induirait la dégradation d'AQP4 (Madrid et al., 2001).



**Figure 11 - Désorganisation de la structure orthogonale en OAP des canaux AQP4 dans des cas d'œdème ou de lésion cérébrale** A gauche, les isoformes des canaux AQP4-M1 (cercles violet) and AQP4-M23 (cercles bleus) sont regroupés pour former des OAPs (orthogonal array particles) au niveau des pieds gliaux en contact avec les vaisseaux sanguins. Il a été montré qu'une forte proportion en isoformes AQP4-M23 contribue à des cluster d'OAP de grande taille. Alors que l'augmentation de l'isoforme AQP4-M1 contribue à des OAP de plus petites tailles. Cette modification est observée dans des conditions pathologiques tel que l'AVC. Les connaissances récentes sur les aquaporines nous conduisent à émettre l'hypothèse que les OAP de grande taille contribueraient à la diffusion des gaz et des cations de la membrane des astrocytes au travers de pores centraux (flèches vertes) (modifié de Badaut et al., 2014 *revue*).

Des interactions et des régulations non-directes mais fonctionnelles ont été mises en évidence entre AQP4 et différentes protéines : l'agrine, protéine de la matrice extracellulaire liée à l' $\alpha$ -dystroglycane, s'avère cruciale pour le clustering des OAPs d'AQP4 à la membrane des pied gliaux (Noell et al., 2009). Le transport du  $K^+$  par les canaux potassiques Kir4.1 est fonctionnellement couplé à celui d'AQP4 (Amiry-Moghaddam et al., 2003 ; Nagelhus et al., 1999), mais la perte d'AQP4 ne semble pourtant pas influencer l'expression de Kir4.1 dans les astrocytes (Ruiz-Ederra et al., 2007 ; Zhang et Verkman, 2008). Cependant, des résultats plus récents montrent que Kir4.1 serait sensible aux variations de volume cellulaire (Soe et al., 2009), ce qui peut être fondamental dans la régulation homéostatique en cas d'œdème des pieds

gliaux. Dans le cervelet, AQP4 est associée à la NaK-ATPase dont on sait qu'elle serait impliquée dans la clairance du potassium extracellulaire après activation neuronale. Mais on ne sait pas si cette NaK-ATPase participe à la régulation de l'homéostasie hydrique médiée par AQP4. Néanmoins, l'association d'AQP4 avec les récepteurs métabotropiques au glutamate (mGluR5) au sein d'un complexe incluant une forme gliale de pompe NaK-ATPase (Sweadner, 1989 ; McGrail, 1991) pourrait réguler la perméabilité hydrique associée à AQP4 dans les astrocytes (Illarionova et al., 2010). Il y a également un lien fonctionnel entre les connexines Cx43, protéine des jonctions communicantes exprimées au niveau des pieds astrocytaires (Giaume et al., 1991) et AQP4, dont la suppression par des ARN interférents induit une régulation à la baisse de ces connexines (Nicchia et al., 2005). A ce jour, nous savons que le lien fonctionnel étroit des AQP4 et des Cx43 est important dans la formation des jonctions "gap" (Katozi et al., 2017) et participerait à la formation d'œdème par des voies de signalisation distinctes mais dont la Cx43 serait un effecteur en aval (Li et al., 2003). Plus récemment l'équipe de J. Badaut a clairement montré que la diminution de l'expression d'AQP4 par ARN interférence diminue l'expression des connexines Cx43 et réduit la mobilité de l'eau, alors qu'à l'inverse le « silencing » de Cx43 n'altère pas l'expression des aquaporines (Julienne et al., 2018). Enfin, à travers les co-transporteurs Na<sup>+</sup>- glutamate EAAT (excitatory amino acid transporters), le glutamate aussi régulerait AQP4 (MacAulay et al., 2004) : Dans certaines conditions pathologiques tels que l'AVC ou l'hypoxie, une trop forte sur-expression d'AQP4 par le glutamate et donc de l'absorption d'eau par les astrocytes pourrait conduire un gonflement des pieds astrocytaires (autrement appelé œdème cytotoxique) que j'expliciterais plus loin (Figure 12).

### ***La souris KO-AQP4***

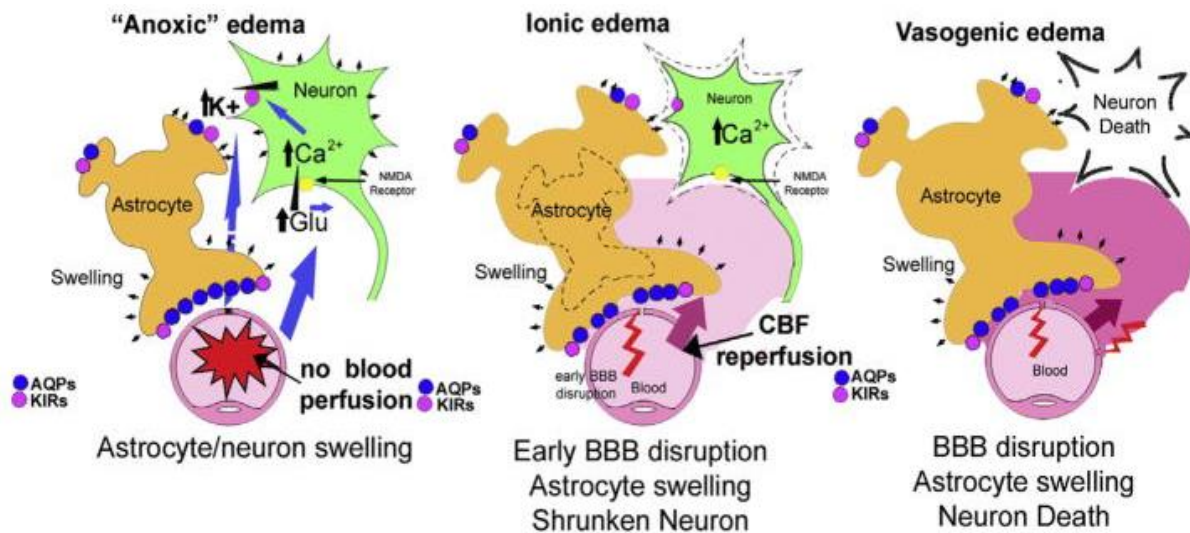
La souris déficiente en AQP4 a permis d'en savoir plus sur le rôle de ce canal, de ses interactions avec la dystrophine, certains membres du DAPC et d'autres protéines gliales ainsi que les conséquences physiopathologiques de sa perte au niveau cérébral.

Il y a trois principaux groupes de recherche qui étudient la souris AQP4 knock-out. L'équipe de Verkman de San Francisco aux Etats-Unis est la première à avoir généré en 1997 des lignées de souris déficiente en AQP4. Celles de Hu de Nanjing en Chine (Fan et al., 2005), d'Otterson et Naghelhus d'Oslo en Norvège (Haj-Yasein et al., 2011). Des différences de

résultats observées entre les lignées provenant de Nanjing et celles d'Oslo et de San Francisco ont par ailleurs semé le doute. En effet, Saadoun et ses collaborateurs réfute la thèse de Zhou et al., 2008 en affirmant que la perte d'AQP4 n'altère pas l'intégrité de la barrière hémato-encéphalique (Saadoun et al., 2009), ce qui est également conforté par des résultats plus récents de l'équipe d'Oslo. En effet, la délétion d'AQP4 n'altère pas la structure des cellules endothéliales des capillaires, ni l'expression des protéines de jonctions serrées tel que la claudine-5, l'occludine et ZO-1, ni la perméabilité vasculaire pour des traceurs de la taille de l'albumine (Eilert-Olsen et al., 2012). De plus, dans la même équipe, dans des conditions de stress hypo-osmotique, Haj-Yasein et al., 2011 mettent en évidence que les cellules endothéliales sont dépourvues d'AQP4 et que ces derniers exprimés au niveau astrocytaire contrôlent les échanges d'eau à l'interface glio-vasculaire, puisqu'en leur absence la recapture d'eau est réduite, ce qui attribue aux pieds astrocytaires périvasculaires une fonction de barrière plus complexe que ce que l'on pensait. D'autre part, dans des modèles d'intoxication hydrique, la souris déficiente en AQP4 présente comme la souris KO- $\alpha$ -syntrophine une protection vis-à-vis de l'œdème cytotoxique (Papadopoulos et Verkman, 2005) et un délai de clairance du potassium extracellulaire (Amiry-Moghaddam et al., 2003b). Dans l'équipe française de J.Badaut, l'ARN interférence (knock-down) a été utilisée chez le rat comme un autre modèle que celui knock-out, afin d'étudier les mouvements d'eau au travers des canaux AQP4 dans des conditions physiologiques normales et évaluer ainsi leur répercussion sur la mesure du coefficient apparent (ADC) en IRM de diffusion. Badaut et al. démontrent que l'inhibition de l'expression spontanée d'AQP4 par ARN interférence (siAQP4) fait diminuer drastiquement les valeurs d'ADC dans le cerveau, en l'absence de lésion du tissu cérébral ou quelque atteinte pathologique (Badaut et al., 2011). Dans des études ultérieures, ce groupe a testé sur des rats l'impact d'une lésion cérébrale traumatique (TBI : traumatic brain injury). Ces rats présentent un œdème, une neuroinflammation, une rupture de la BHE et une mort neuronale. Or, après traitement par ARN interférence, les rats TBI présentent une baisse de tous les symptômes cités précédemment (Fukuda et al., 2013). Une autre étude de la même équipe a été réalisée cette fois-ci sur des souris KO-AQP4 (provenant du Dr A.Verkmán) et après induction d'une ischémie cérébrale transitoire par occlusion artérielle. L'absence d'AQP4 chez ces souris après une induction d'ischémie les protège de déficits neurologiques observés chez les WT, avec une lésion cérébrale plus petite mais un œdème plus important (Hirt et al., 2017). L'absence d'AQP4 dans ce modèle a donc un effet bénéfique en réduisant la lésion et en améliorant le phénotype comportemental à court et à long terme.



L'un des premiers événements déclenchés après une ischémie est le développement d'un œdème à l'endroit même ou à proximité de la zone touchée par l'ischémie. Il y a deux types principaux d'œdème cérébral : vasogénique et cytotoxique. Dans le premier, il y a une fuite de composés plasmatiques vers le parenchyme cérébral dû à la rupture des jonctions serrées des cellules endothéliales de la BHE. Dans l'œdème cytotoxique, la barrière hémato-encéphalique reste intacte, mais une perturbation du métabolisme cellulaire lié à un dysfonctionnement du transport d'eau et d'ions conduit à un gonflement des pieds astrocytaires. Dans les modèles d'œdème cytotoxique, les souris KO-AQP4 présentent une accumulation d'eau dans les pieds astrocytaires moins importante que les WT, ce qui suggère que la perte d'AQP4 est protectrice vis-à-vis de l'œdème par la diminution de la perméabilité médiée par les canaux AQP4 (Haj-Yasein et al., 2011). Dans le cas d'œdème vasogénique, l'excès d'eau est absorbé par les aquaporines des pieds astrocytaires pour être évacuée vers le liquide cébrospinal. Mais dans ce cas, la souris déficiente en AQP4 montre une accumulation d'eau plus importante et une mortalité augmentée comparé aux souris WT (Papadopoulos et al., 2004). Ainsi, AQP4 faciliterait l'accumulation d'eau lors de l'œdème cytotoxique et l'évacuation d'eau en excès dans le cas d'un œdème vasogénique. Cependant, plus récemment, une nouvelle catégorisation des œdèmes a été proposée, et donne une vision plus nuancée avec l'ajout d'un troisième type d'œdème à l'état intermédiaire entre cytotoxique et vasogénique (Figure 12).



**Figure 12- Les différentes phases de l'œdème : anoxique, ionique et vasogénique.** Durant la lésion cérébrale, les premières minutes sont caractérisées par un œdème anoxique caractérisé par un gonflement des astrocytes et des dendrites neuronales causé par la perturbation de l'équilibre hydrique et ionique. Durant l'œdème ionique, les astrocytes ont un gonflement plus important avec pour conséquence une atteinte des neurones et une fuite transitoire de la BHE.

L'œdème vasogénique est le résultat de la rupture des jonctions serrées conduisant à une augmentation de la perméabilité de la BHE pour l'albumine ou autres protéines plasmatiques contribuant à un gonflement des astrocytes plus conséquent et à une mort neuronale (modifié de Badaut et al., 2014 *revue*).

### ***AQP4 et Kir4.1 : couplage fonctionnel ?***

Les canaux AQP4 ne sont pas seulement importants pour les mouvements osmotiques et le drainage de l'eau, mais aussi pour le fonctionnement neuronal. En effet, des études sur des souris déficientes en AQP4 mentionnent une altération de l'excitation neuronale, laquelle est associée au niveau des astrocytes à une recapture plus lente du potassium en réponse à une stimulation neuronale expérimentale (Padmawar et al., 2005 ; Binder et al., 2006). A savoir par quels mécanismes les canaux aquaporines AQP4 sont impliqués dans l'altération du tamponnage potassique, la question n'est que partiellement élucidée. Les premières hypothèses ont suggéré une possible interaction entre ces deux canaux, ce qui a été confirmé dans la rétine (Connors et Kofuji, 2006). Dans le cerveau, l'hypothèse la plus probante à ce jour, même si elle reste controversée, est celle d'une interaction indirecte et fonctionnelle. La localisation de ces deux canaux à proximité l'un de l'autre à la membrane des cellules gliales (Nagelhus et al., 1999 ; Connors et al., 2004) serait médiée par le complexe DAPC (Amiry-Moghaddam et al., 2004). Ainsi, une diminution de la perméabilité hydrique pourrait perturber les mouvements osmotiques, et par conséquent le gradient de concentration potassique et en aval la recapture du potassium. Les variations de concentrations de potassium extracellulaire étant le reflet d'une activité neuronale, des concentrations excessives en potassium peuvent conduire le réseau neuronal à des phénomènes d'hyperexcitabilité : le potassium étant considéré comme un agent pro-épileptique. Ceci nous amène à nous intéresser plus particulièrement aux canaux potassiques Kir4.1.

## **KIR4.1 ET HOMÉOSTASIE POTASSIQUE**

### ***Les canaux potassiques Kir4.1***

Une fonction cruciale attribuée aux astrocytes est la clairance du potassium ; c'est-à-dire le maintien d'une concentration extracellulaire de potassium adéquate pour le bon fonctionnement des neurones afin d'éviter toute éventuelle hyperexcitabilité neuronale. Comme nous l'avons précédemment mentionné les canaux Kir4.1 spécifiques de la glie en sont les

acteurs principaux (Djukic et al., 2008 ; Chever et al., 2010). Tout comme AQP4, Kir4.1 peut être ancré à la membrane via l' $\alpha$ -syntrophine (Connors et al., 2004) et la Dp71 (Fort et al., 2008) ; l'ensemble AQP4, Kir4.1 et  $\alpha$ -syntrophine est co-localisé à la membrane des pieds gliaux (Masaki et al., 2010).

Codé par le gène *KCNJ10*, les canaux Kir4.1 font partie d'une famille de 15 canaux protéiques (UPHAR database) caractérisés par un courant entrant allant dans le sens du mouvement des ions dont la conductance est la plus importante, d'où leur appellation Kir pour canaux dits à rectification entrante (inwardly rectifying K<sup>+</sup>). Ces derniers ont été décrits pour la première fois dans les cellules gliales de Müller de la rétine (Newman et al., 1985). Ce n'est que dix ans plus tard que l'on a découvert l'expression des canaux Kir4.1 dans les cellules gliales de l'ensemble du système nerveux central (Takumi et al., 1995) : La distribution de Kir4.1 est large mais ne se retrouve pas dans toutes les structures cérébrales ; une forte expression est observée dans la couche glomérulaire du bulbe olfactif, les cellules gliales de Bergmann du cervelet, l'épendyme et la pie-mère alors qu'elle est beaucoup plus réduite mais présente dans les oligodendrocytes de la matière blanche du corps calleux et du cervelet. Ces canaux sont constitués de quatre sous-unités dont chacune est composée de deux domaines transmembranaires formant un pore sélectif au passage de K<sup>+</sup>, ainsi que d'un domaine cytosolique N-terminal et un domaine C-terminal (Hibino et al., 2010). A ce jour, et grâce aux outils pharmacologiques et génétiques dont on dispose, plusieurs rôles de Kir4.1 ont été découverts que nous détaillerons ci-après.

### ***La souris KO-Kir4.1***

Deux types de souris knock-out Kir4.1 ont été développés depuis les dix à vingt dernières années. Une souris knock-out conventionnelle Kir4.1 (Kofuji et al., 2000 ; Kofuji et al., 2002) et une souris knock-out conditionnelle astrocyte-spécifique (Djukic et al., 2007) ont permis de mettre en évidence une dépolarisation de la membrane et une diminution du courant entrant, respectivement dans les cellules gliales de Müller de la rétine et dans les astrocytes de l'hippocampe. Ajouté à cela, des bloquants pharmacologiques utilisés sur ces souris, tels que le barium Ba<sup>2+</sup>, relativement spécifiques des canaux Kir4.1 à forte concentration (Jansen et al., 2005), permettent d'isoler la contribution de ces canaux lors d'enregistrements électrophysiologiques. Ces données suggèrent un premier rôle de Kir4.1 dans la conductance potassique de l'astrocyte et de son potentiel de repos membranaire hyperpolarisé (Djukic et al., 2007). Son second rôle est lié à la localisation spécifique et enrichie de Kir4.1 dans les pieds astrocytaires autour des synapses et des vaisseaux sanguins (Higashi et al., 2001), alors que son

expression à la membrane des corps cellulaires est moindre. Ceci suggère son implication dans la recapture du  $K^+$  au niveau de la synapse dite tripartite et son évacuation dans la circulation sanguine (Newman et al., 1996). Dans le même sens, l'étude menée par Djukic et son équipe (2007) dans l'hippocampe de la souris KO conditionnelle met en évidence une diminution de la recapture du  $K^+$  ainsi qu'une dynamique plus lente de la clairance suite à une activation neuronale (Chever et al., 2010). Cependant, comme les mesures de concentration en  $K^+$  sont globales, elles ne peuvent rendre compte précisément de la dynamique temporelle du  $K^+$  durant et après l'activité neuronale. D'autant plus que les astrocytes n'expriment pas tous Kir4.1, ces derniers ne peuvent à eux seuls expliquer le tamponnage potassique dans l'ensemble du cerveau. D'autres acteurs, comme la pompe Na/K ATPase entre autres, seraient impliqués et les mécanismes par lesquels Kir4.1 affecte spécifiquement l'homéostasie potassique. Rappelons aussi que le « siphonage » du potassium est possible grâce aux aquaporines AQP4 qui fournissent la « driving force » nécessaire aux mouvements d'ions selon leur gradient de concentration chimique. De ce fait, comme nous l'avons abordé dans la partie précédente, ceci expliquerait qu'une perte d'AQP4 totale ou partielle puisse altérer le tamponnage potassique, entraîner une accumulation de potassium extracellulaire qui *in fine* peut conduire à une hyperexcitabilité des neurones. Inversement une perte de Kir4.1 peut aussi perturber les échanges d'eau. Par exemple, le blocage par la physotigmine du courant inhibiteur sortant spécifique de Kir4.1 est suffisant pour induire un gonflement des cellules gliales de Müller de la rétine (Pannocke et al., 2004). Kir4.1 semble ainsi avoir un tout autre rôle : la régulation du volume astrocytaire. Cependant, ce résultat n'est pas observé dans l'hippocampe, où à l'inverse de la rétine, le volume des astrocytes de l'hippocampe ne semble pas être altéré dans le modèle KO-Kir4.1 (Haj-Yasein et al., 2011). Enfin, à l'instar d'AQP4, Kir4.1 participe également à la fonction astrocytaire de recapture du glutamate (Djukic et al., 2007) médié principalement par les transporteurs EAAT1 et EAAT2 (Rothstein et al., 1996). Le glutamate étant chargé positivement, un équilibre des charges électriques positives des ions (stœchiométrie) de part et d'autre de la cellule est nécessaire. Ainsi, le transport de  $K^+$ ,  $Na^+$  et  $H^+$  est étroitement dépendant de celui du glutamate (Barbour et al., 1988).

Des mutations du gène humain *kcnj10* codant pour le canal Kir4.1 peuvent donner lieu à des symptômes tels que l'épilepsie (Bruno RJ et al., 2004 ; Haj-Yasein et al., 2011), l'ataxie, la surdité (Bockenbauer et al., 2009) que l'on retrouve dans le syndrome de EAST et de SESAME (Scholl et al., 2019). Mais également l'ischémie (Pivonkova et al., 2010), l'inflammation (Takeda et al., 2011), le traumatisme cérébral ainsi que les maladies

neurodégénératives tel que Alzheimer (Scarmeas et al., 2009), et la sclérose amyotrophique latérale (Bataveljic et al., 2012), sont associés à une perte de l'expression de Kir4.1.

Le complexe des protéines liées à la Dp71 peut être subdivisé en deux sous-complexes. Le premier qui par l'intermédiaire des  $\alpha$ -syntrophines permet l'ancrage d'AQP4 et Kir4.1 à la membrane des pieds gliaux. Nous revenons ainsi à notre hypothèse de travail : la perte de la Dp71 aurait pour conséquence une accumulation d'eau et de potassium extracellulaire et donc un impact sur l'homéostasie hydrique et potassique, ce qui suggèrerait que les altérations cognitives observées chez la souris Dp71-null seraient secondaires aux altérations gliovasculaires. Le second sous-complexe du DAPC associé à la Dp71 dans la glie a pour élément central le dystroglycane, qui permet le lien avec les protéines de la matrice extracellulaire.

## **DYSTROGLYCANES, UN LIEN AVEC LA MATRICE EXTRACELLULAIRE**

Les dystroglycanes sont les produits d'un gène unique, *DAG1* (Dystrophin associated glycoprotein-1), codant pour un seul ARNm. La protéine traduite est clivée en deux sous-unités formant un complexe de deux protéines reliées de manière non covalente : une protéine extracellulaire ( $\alpha$ -dystroglycane de 120 kDa) et une protéine transmembranaire ( $\beta$ -dystroglycane de 43 kDa), avec sa partie C-terminale associée au domaine riche en cystéine de la dystrophine. L' $\alpha$ -dystroglycane se lie aux composants de la matrice extracellulaire tels que la laminine et l'agrine. Le  $\beta$ -dystroglycane quant à lui est un composant central dirigé à la fois vers l'espace extracellulaire via l' $\alpha$ -dystroglycane et vers le cytosquelette cytoplasmique d'actine (Ibraghimov et al., 1992 ; Ervasti et al., 1993). Ainsi le complexe  $\alpha / \beta$  dystroglycane est un récepteur d'adhérence cellulaire majeur et ubiquitaire permettant la stabilité de la membrane basale de nombreux tissus cellulaires tels que le muscle lisse et squelettique, la rétine, le cerveau et le système nerveux périphérique, la jonction neuromusculaire, l'interface entre les cellules endothéliales et les pieds gliaux, mais également les glomérules du rein et les barrières épithéliales du poumon, du foie et du pancréas. On observe également une isoforme spécifique dans la rétine, maintenant l'intégrité de la membrane limitante interne (Clements et al., 2017).

Par ailleurs, le  $\beta$ -dystroglycane peut être phosphorylé par des tyrosine kinases (Sotgia et al., 2001), permettant son association avec ses partenaires protéiques, dystrophine et utrophine, mais aussi un rôle dans des cascades de signalisation tel que la cascade kinase ERK-

MAP (Spence et al., 2004), et même migrer de la membrane vers le noyau via le réseau endosome-réticulum endoplasmique (Gracida-Jiménez et al., 2017), ou encore comme un signal de dégradation (Ilshley et al., 2001). L' $\alpha$ -dystroglycane possède des sites de glycosylations dont les mutations au niveau de ces derniers peuvent être source de dystroglycanopathies.

### ***La souris KO-dystroglycane***

Le modèle de knock-out dystroglycane étant létal, ce n'est qu'au moyen du KO conditionnel que l'on a mis en évidence son rôle dans la régulation de l'architecture membranaire du pied astrocytaire. En effet, l'absence de dystroglycane a pour conséquence une réduction du clustering en OAPs des canaux AQP4 (Noell et al., 2011). Cependant, le nombre restant d'AQP4 forment quand même quelques OAPs en absence de dystroglycane, ce qui suggère d'autres mécanismes moléculaires dans la formation des OAP d'AQP4 (cf Nicchia et al., 2008 ; et *La souris Dp71-null p.65*).

## **SARCOGLYCANES, PROTÉINES GLIO-VASCULAIRES ?**

Les sarcoglycanes sont des protéines transmembranaires glycosylées sur leur partie C-terminale et contenant un grand domaine C-terminal avec une région riche en cystéine. Codé par le gène *SGCE* et premièrement découvert dans le muscle et les nerfs périphériques (Claudepierre et al., 2000). Les sarcoglycanes constituent une famille de sept protéines :  $\alpha$ -,  $\beta$ -,  $\gamma$ -,  $\varepsilon$ -,  $\delta$ - et  $\zeta$ - sarcoglycanes et la sarcospane. (Ettinger et al., 1997 ; McNally et al., 1998 ; Crosbie et al., 1999). Les mutations touchant l'une des formes peut engendrer une dystrophie musculaire des ceintures (Ozawa et al., 2005) et celle touchant spécifiquement le  $\varepsilon$ -sarcoglycane aboutit au syndrome de dystonie myoclonique (Zimprich et al., 2001 ; Waite et al., 2016). Ceci confère un rôle plutôt musculaire aux sarcoglycanes. Le complexe des sarcoglycanes étant ancré latéralement à la membrane en lien avec le  $\beta$ -dystroglycane, tout en renforçant son lien avec la dystrophine (Humphrey et al., 2015), aurait pour rôle de stabiliser les compartiments intra- et extracellulaires (Waite et al., 2009). Cependant, le rôle de toutes les isoformes n'est pas complètement connu, tel la forme  $\zeta$  - dont on ignore encore les fonctions (Wheeler et al., 2002). L'hypothèse d'une expression des sarcoglycanes au niveau central est une large voie de recherche avec en particulier celle du  $\gamma$ -sarcoglycane au niveau gliovasculaire (Boulay et al., 2015) et de l' $\varepsilon$ -sarcoglycane au niveau neuronal. Ce dernier, dont on sait



l'expression dans les cellules de Purkinje du cervelet et les neurones dopaminergiques de la substance noire et de l'aire tegmentale ventrale, pourrait éventuellement être en cause dans l'altération de la transmission dopaminergique observée chez des patients souffrant de sarcoglycanopathie (Allikian et al., 2007 ; Hjerminnd et al., 2008 ; Esapa et al., 2007 ; Chan et al., 2005 ; Nishiyama et al., 2004). Dans le système glio-vasculaire, le  $\gamma$ -sarcoglycane est surexprimé chez les souris déficientes en connexines Cx30. De manière intéressante, des expériences de purification et de séparation de sous-types de vaisseaux cérébraux selon leur taille tout en préservant les pieds astrocytaires associés ont été initié par A-C. Boulay de l'équipe de M. Cohen-Salmon (Collège de France, Paris). Des analyses par RT-PCR sur ces vaisseaux isolés (Yousif et al., 2007) ont permis de détecter les différents transcrits des sarcoglycanes. Ainsi, d'autres sarcoglycanes glio-vasculaires s'ajouteraient au  $\gamma$ -sarcoglycane. En effet, en séparant les vaisseaux extrait et purifié du cerveau puis isolés selon leur diamètre, les  $\delta$ - et  $\epsilon$ -sarcoglycanes ont été mis en évidence dans les vaisseaux de gros calibre supérieur à 100  $\mu\text{m}$  (Boulay et al., 2015). Ces études préliminaires mettent en lumière l'existence d'autres complexes de sarcoglycanes au niveau gliovasculaire, jusque-là inconnus.

## **LAMININE ET AGRINE, COMPOSANTS DE LA MATRICE EXTRACELLULAIRE**

Les laminines, dont la première forme a été isolée il y a quarante ans (Timpl et al., 1979), sont des glycoprotéines de la lame basale, un type de matrice extracellulaire dont la fonction est de maintenir les cellules et tissus ensemble, et de réguler ainsi de nombreuses activités et voies de signalisation cellulaire. Au niveau de leurs structures, les laminines sont des hétérotrimères composés d'une des cinq chaînes  $\alpha$ , d'une des trois chaînes  $\beta$  et d'une des trois chaînes  $\gamma$  (Durbeej et al., 2010). Ces trois chaînes s'assemblent pour former une structure en forme de croix asymétrique composée d'un long bras et de trois bras courts. Le long bras correspondant à la partie C-terminale est en interaction avec des récepteurs de la membrane cellulaire et possède des sites de liaison avec l' $\alpha$ -dystroglycane et les intégrines. Les trois bras courts constituent la partie N-terminale interagissant avec d'autres laminines. Un premier réseau de polymères de laminines va former avec le collagène IV un réseau supramoléculaire important pour la stabilité de la membrane basale. Codés par 11 gènes *LAMA1-5*, *LAMB1-3* et *LAMG1-3*, les différentes combinaisons de sous-unités  $\alpha$ ,  $\beta$  et  $\gamma$  des laminines varient en fonction du type cellulaire et tissulaire. La laminine  $\alpha1 \beta1 \gamma1$  est la plus ubiquitaire durant le

développement alors qu'elle est restreinte à certains tissus à l'âge adulte. Au contraire, la chaîne  $\alpha 5$  est la plus exprimée chez l'adulte (Miner et al., 1997). Les isoformes 211 ( $\alpha 2$ ,  $\beta 1$ ,  $\gamma 1$ ) et 221 ( $\alpha 2$ ,  $\beta 2$ ,  $\gamma 1$ ) sont respectivement présentes dans les membranes des muscles squelettiques et cardiaques (Holmberg et Durbeej, 2013). Les sous-unités  $\alpha 2$  ont des propriétés adhérentes avec les myoblastes (Schuler et Sorokin, 1995) et avec la sous-unité  $\beta 2$ , elles seraient respectivement impliquées dans la myogenèse et la synaptogenèse (Hunter et al., 1989b). Alors que les sous-unités  $\alpha 4$  et  $\alpha 5$  sont le plus abondamment exprimées à la membrane basale des cellules endothéliales (Yousif et al., 2013). Nous détaillerons ultérieurement les fonctions des différentes isoformes de laminines.

**L'agrine** est codée par le gène *AGRN* et a pour fonction principale à la jonction neuromusculaire l'agrégation des récepteurs de l'acétylcholine et de protéines associées (Wallace BG et al., 1989), d'où sa dénomination issue du grec *ageirein* pour « assembler ». Elle favorise ainsi la formation de la densité post-synaptique apposée à la terminaison axonale, et contribue à l'établissement d'une transmission neuromusculaire fonctionnelle. L'agrine est une protéine de la matrice extracellulaire de haute affinité avec le dystroglycane ; son interaction comme celle entre la laminine et le dystroglycane est importante pour l'intégrité de la lame basale de nombreux tissus, non seulement dans les muscles ou les neurones, mais aussi dans les astrocytes, notamment pour l'adressage des canaux AQP4 (Noell et al., 2007). De plus, des expériences in vivo ont démontré que l'agrine est importante pour le clustering des OAPs d'AQP4 au niveau de la membrane des pieds astrocytaires. (Noell et al., 2009).

### ***La souris KO- $\alpha 2$ -laminine***

La laminine  $\alpha 2$  a un rôle important dans le maintien de l'intégrité de la barrière hémato-encéphalique (Yao Yao et al., 2019), mais aussi dans le maintien des canaux AQP4 au niveau des astrocytes périvasculaires, et elle favorise l'expression sélective de la forme M23 d'AQP4 (Long Tham et al., 2016). La laminine  $\alpha 2$ , exprimée par les astrocytes, régule le développement et la maturation de la barrière hémato-encéphalique. Son absence induit une gliose, une altération de la morphologie astrocytaire et une réduction de la présence d' $\alpha$ -SMA dans les muscles lisses des vaisseaux, ce qui suggère une BHE immature. On observe aussi une diminution d'expression de protéines de jonctions adhérente (VE-cadhérine) et serrées (claudine-5 et d'occludine), ce qui contribue à l'augmentation de la perméabilité de la BHE (Menezes et al., 2014).



## DYSTROBRÉVINE ET UTROPHINE : ANALOGUES DE LA Dp71 ?

Les dystrobrévines, protéines de 87-94 kDa, existent sous deux isoformes principales,  $\alpha$ - et  $\beta$ -dystrobrévines, codées respectivement par les gènes *DNTA* et *DNTB*. Homologues structuraux de la région C-terminale de la dystrophine, les dystrobrévines interagissent avec la dystrophine via leurs hélices H1 et H2 et peuvent, comme les dystrophines, lier jusqu'à quatre syntrophines. La dystrobrévine comporte également de nombreux partenaires protéiques tels que syncoline, desmuline, dysbindine, ainsi que les sarcoglycanes. L' $\alpha$ -dystrobrévine est majoritairement exprimée dans les muscles et le cerveau alors que la  $\beta$ -dystrobrévine, absente des muscles et du cœur, est présente au niveau du cerveau, des reins, des poumons et du foie (Rees ML et al., 2007). Malgré une similitude dans leur séquence protéique, les deux protéines ne diffèrent que par la partie distale comportant des sites de phosphorylations, l' $\alpha$ -dystrobrévine et la  $\beta$ -dystrobrévine sont distribuées dans le cerveau dans des complexes protéiques différents (Blake et al., 1999). De par leurs nombreux sites d'épissage, elles comportent de nombreuses isoformes. Par exemple, l' $\alpha$ -dystrobrévine-1 est retrouvée dans le complexe des protéines associées à la Dp71 des astrocytes périvasculaires et de la glie de Bergmann, mais elle est absente des domaines post-synaptiques des neurones.

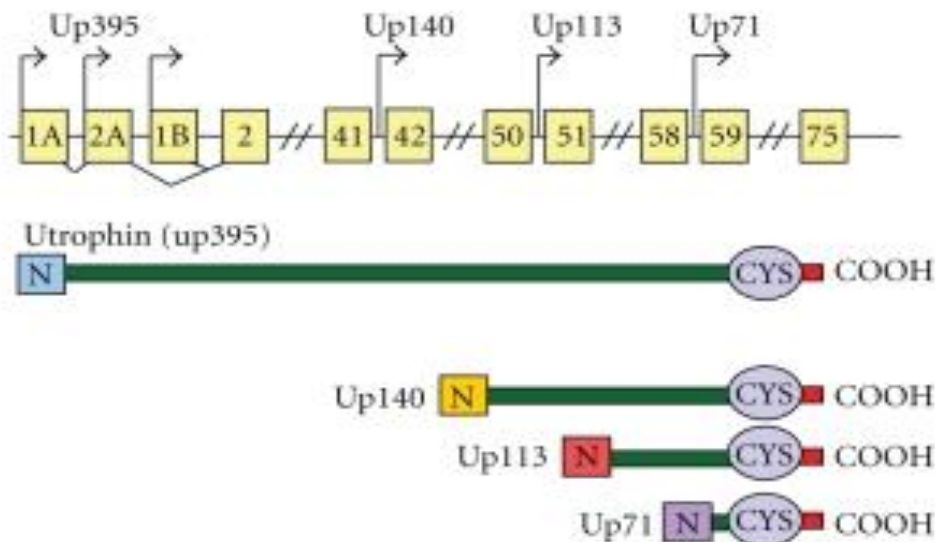
La souris KO-  $\alpha$ -dystrobrévine présente barrière hémato-encéphalique anormalement perméable, ainsi qu'un œdème cérébral progressif. Des analyses de co-culture de 8 jours d'astrocytes et de cellules endothéliales de souris WT *versus* KO- $\alpha$ -dystrobrévine montrent un délai dans l'expression temporelle des canaux AQP4 et Kir4.1 ainsi que de la laminine et de l'occludine chez les souris KO. Les contacts astrocyte/cellule endothéliale sont altérés en absence d' $\alpha$ -dystrobrévine, notamment une surexpression de  $\beta$ -dystrobrévine, et une diminution des quantités d' $\alpha$ - et  $\beta$ -dystroglycane et de Dp71 (Lien et al., 2012). Les auteurs de l'étude suggèrent que la perte de laminine et de dystroglycane pourrait être l'origine de l'augmentation de la perméabilité de la BHE et que, les canaux AQP4 ne parvenant pas à former des OAP, l'homéostasie hydrique serait alors perturbée et ceci conduirait à une rétention d'eau et à l'œdème cérébral progressif.

L'utrophine pour la première fois identifiée en 1989, par Love et son équipe, est une protéine paralogue de la dystrophine, exprimée de manière ubiquitaire dans le sarcolemme du muscle durant le développement fœtal. Elle est ensuite remplacée par la dystrophine durant l'embryogenèse puis restreinte aux jonctions neuromusculaires, au sarcolemme des muscles

squelettiques et aux muscles lisses, notamment ceux entourant les vaisseaux sanguins (Nguyen et al., 1991 ; Tinsley et al., 1992). Codée par le gène *UTRN*, la forme longue Up395 de l'utrophine est de 395 kDa. La séquence primaire de la protéine présente un domaine N-terminal de liaison avec l'actine-F et un domaine C-terminal riche en cystéine similaire à la dystrophine, permettant la liaison des partenaires du complexe DAPC, dont le  $\beta$ -dystroglycane, l' $\alpha$ -dystrobrevine et les syntrophines (Blake et al., 2002 ; Haenggi et al., 2006).

A l'instar de la dystrophine, l'utrophine Up395 possède deux promoteurs tissu-spécifiques. Le promoteur *UTRN-A* permet la transcription de l'isoforme adulte Utrophine-A que l'on retrouve à la jonction neuromusculaire au niveau de la membrane postsynaptique, associée aux récepteurs à l'acétylcholine. Le promoteur *UTRN-B* permet quant à lui l'expression de l'isoforme Utrophine-B au niveau de l'endothélium vasculaire (Weir et al., 2002). Au niveau cérébral, ces utrophines sont également distribuées différemment : l'utrophine-A est principalement exprimée dans les neurones, certaines cellules gliales et dans quelques structures vasculaires, tandis que l'utrophine-B est majoritairement localisée au niveau de l'endothélium vasculaire (Baby et al., 2010). Par ailleurs, on retrouve ces utrophines au niveau du complexe membranaire DAPC de la cellule gliale de Müller de la rétine (Fort et al., 2008), le système nerveux périphérique et de nombreux autres tissus tels que les reins, les poumons et le foie.

Comme pour le gène DMD, des formes plus courtes d'utrophines issus des promoteurs internes du gène *UTRN* existent (Figure 13) mais leurs fonctions ne sont pas toutes connues à ce jour. L'utrophine Up113 ou G-utrophine est la première mise en évidence (Blake et al., 1993), la plus abondamment exprimée dans le cerveau adulte, homologue à la Dp116, et également détectée en partie dans le système vasculaire.



**Figure 13- Organisation des différents produits du gène *UTRN*.** Le dessin en haut représente les 75 exons du gène *UTRN* de l'utrophine (box en jaune pour chaque numéro d'exon) et les introns (ligne noire), avec les flèches indiquant les différents promoteurs des différentes formes d'utrophine : Up395 pouvant être Utrn-A et Utrn-B, Up140, Up113, et Up71. L'utrophine comporte 4 domaines principaux : amino-terminal (N, différentes couleurs schématisant les différentes séquences NH<sub>2</sub>-terminales), central (vert), riche en cystéine (CYS, bleu) et C-terminal (COOH, rouge). Les régions géniques et protéiques ne sont pas à l'échelle (Perronnet et Vaillend, 2010).

### ***La souris KO-utrophine***

La souris déficiente en utrophine présente une réduction du nombre de récepteurs à l'acétylcholine au niveau de la jonction neuromusculaire mais ne montre pas de signe de faiblesse musculaire et pas de compensation par une surexpression de dystrophine. (Deconinck et al., 1997 ; Grady et al., 1997). Cependant, dans le complexe des protéines associées à l'utrophine-B (UGC) des cellules endothéliales, la perte d'utrophine suggère un rôle dans le fonctionnement de la BHE (Haenggi et al., 2004).

L'absence de Dp71 peut donc potentiellement perturber les protéines de jonctions dont l'altération peut être signe d'une modification de la perméabilité vasculaire. Les protéines des jonctions sont une cible privilégiée pour déterminer les conséquences secondaires de la perte de Dp71 au niveau de la barrière hémato-encéphalique.

## **MODELES MURINS D'ETUDE DE LA Dp71**

Avant la souris transgénique Dp71-null, il n'y avait pas de modèle d'étude spécifique de cette protéine. Néanmoins, d'autres modèles murins, les souris mdx3cv et mdx $\beta$ geo, développés respectivement au début et à la fin des années 90 ont cependant permis les premières avancées sur la caractérisation indirecte – par la connaissance de sa localisation – du rôle de la Dp71. Mais ces souris présentaient une perte ou une diminution de toutes les dystrophines et ne permettaient donc pas d'affirmer que les phénotypes observés découlaient directement de la perte de Dp71.

### **MODÈLES AYANT APPORTÉ DES INFORMATIONS INDIRECTES SUR LE RÔLE DE LA Dp71 DANS LA GLIE PÉRIVASCULAIRE ET LA BHE**

La souris mdx3cv développée par Chapman et al. en 1989 possède une mutation ponctuelle sur l'intron 65, donc sur la partie C-terminale commune à toutes les dystrophines et de fait possède une expression altérée de toutes les dystrophines. Cyrille Vaillend a le premier caractérisé le phénotype comportemental de cette souris et l'a comparé aux souris mdx déficientes uniquement en Dp427 (Vaillend et al., 1995 ; Vaillend et Ungerer, 1999). Les souris mdx3cv ont des réponses d'anxiété exacerbées par rapport aux WT, mais aussi une réduction de la locomotion. Cependant, cette première étude n'a pas détecté de déficits d'apprentissage plus importants que chez la souris déficiente uniquement en Dp427. Nicchia et son équipe ont également étudié la souris mdx3cv en comparaison avec les souris WT et Dp71-null (Nicchia et al., 2008), montrant des résultats similaires des niveaux d'expression d'AQP4, de  $\beta$ -dystroglycane et d' $\alpha$ -syntrophine entre souris mdx3cv et Dp71-null.

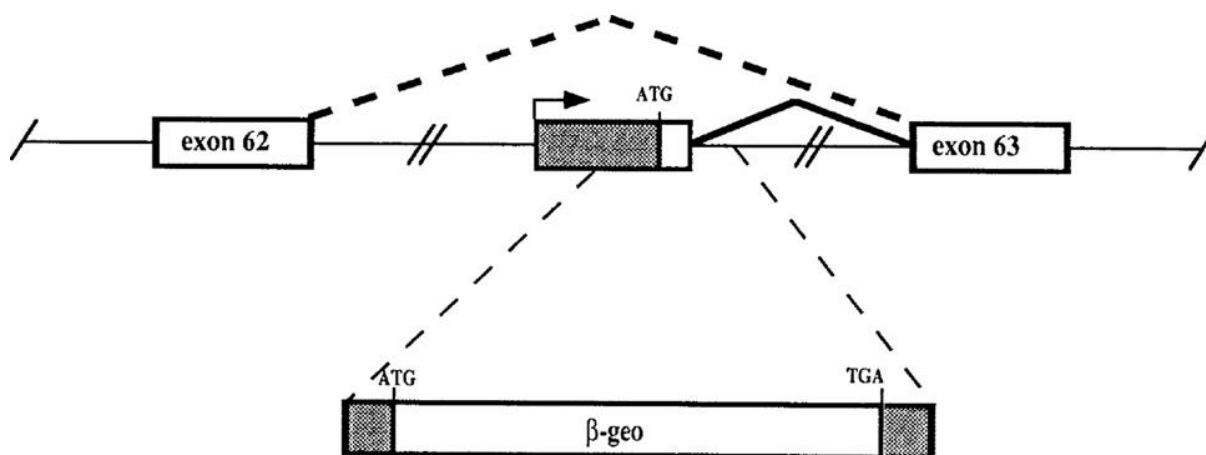
La souris mdx $\beta$ geo développée par Wertz et Fuchtbauer en 1998 possède quant à elle une insertion d'un gène rapporteur par un vecteur au niveau de l'exon 63, donc dans la partie C-terminale commune à l'ensemble des dystrophines. Dans ce modèle l'induction de la mutation se fait par le vecteur ROSA $\beta$ geo et contient le gène de la  $\beta$ -galactosidase. Au contraire de la mutation spontanée induite chimiquement par l'éthylnitrosurée sur la souris mdx3cv, chez la souris mdx $\beta$ geo il est possible de suivre l'expression des protéines durant l'embryogénèse grâce à l'activité de la  $\beta$ -galactosidase. L'étude de Vajda et al. en 2002 sur cette souris mdx $\beta$ geo a révélé que le début de l'œdème induit par injection de vasopressine (modèle

d'hyponatrémie) est plus tardif comparé aux souris contrôles. Ceci est associé à une réduction de l'expression d'AQP4 au niveau des pieds astrocytaires et de la glia limitans observé en immunofluorescence. Cependant, la quantité totale d'AQP4 n'étant pas modifiée, les auteurs suggèrent que l'AQP4 serait délocalisé de la membrane des pieds astrocytaires et associé à une perte d'expression périvasculaire de l' $\alpha$ -syntrophine. Afin de vérifier ces modifications d'échanges d'eau dans le cerveau, Vajda et son équipe mettent en évidence par IRM de diffusion que le coefficient apparent de diffusion (ADC) mesuré décroît progressivement durant les 35 premières minutes, indiquant une phase d'accumulation d'eau intracellulaire dans les deux groupes de souris WT et mdx $\beta$ geo. Après cet instant, l'ADC des souris contrôles décline drastiquement avant que les souris ne décèdent, alors qu'un délai supplémentaire et significatif est observé chez les souris mdx $\beta$ geo avant que l'ADC ne diminue aussi chez ces souris, mais plus tardivement (Vajda et al., 2002). Les auteurs de cette étude suggèrent que la délocalisation d'AQP4 chez ces souris mdx $\beta$ geo a pour conséquence une résistance à l'oedème., comme cela avait été déjà suggéré dans d'autres modèles murins déficients en AQP4 (Manley et al., 2000) ou en syntrophine (Amiry-Moghaddam et al., 2004).

Chez la souris mdx, uniquement déficiente en Dp427, Frigeri et son équipe ont mis en évidence pour la première fois une déficience en AQP4 dans le muscle mais également au niveau du système nerveux central (Frigeri et al., 2001). Les causes de cette altération restent mal comprises puisque la Dp427 n'est pas supposée être exprimée dans les cellules gliales exprimant AQP4. Quelques années plus tard, le groupe de Nico a comparé l'immunomarquage de la Dp71 chez les souris WT versus mdx durant le développement de la BHE et à l'âge adulte. Ces études suggèrent qu'il y a une perturbation de l'expression de la Dp71 chez la souris mdx déficiente en Dp427, ce qui pourrait expliquer que la souris mdx présente des altérations d'AQP4 et de la BHE (Nico et al., 2004 ; Nico et al., 2010). Ceci pourrait aussi contribuer aux déficits comportementaux des souris mdx, mais cette hypothèse reste controversée (Perronnet et al., 2012). En effet, ces travaux montrent une expression réduite au niveau endothélial de ZO-1, une altération ultrastructurale des jonctions serrées et une augmentation de la perméabilité de la BHE (Nico et al. 2003). Une inflammation cérébrale associée à ces anomalies de structure est également suggérée, vue l'augmentation du facteur VEGF et de son récepteur VEGFR2 (Nico et al., 2002) et la surexpression de métalloprotéinases MMP-2 et -9 dont on connaît l'implication dans l'altération de la BHE associé à l'inflammation (Nico et al., 2006). Ce modèle mdx a donc lui aussi apporté des informations indirectes d'un rôle joué par la Dp71 dans la glie périvasculaire et la BHE.

## LA SOURIS DP71-NULL

Sarig et Nudel en 1999 nous offrent le premier modèle murin knock-in, c'est-à-dire par l'insertion d'un gène chimère (celui de la  $\beta$ -galactosidase, cf. Figure 14) dans la région promotrice, empêchant spécifiquement et uniquement l'expression de la Dp71. Ce modèle nous permettra donc d'étudier le rôle spécifique de la Dp71 par des études comparatives des souris Dp71-null et WT.



**Figure 14- Schéma de l'insertion du gène de la beta-galactosidase dans le premier exon de la Dp71 pour empêcher son expression.** Le premier exon de la Dp71 et son site d'initiation de la transcription est localisé dans l'intron entre les exons 62 et 63 du gène de la *DMD* (flèche). Les boîtes rectangulaires représentent les exons. Les parties en gris représentent les régions 5' et 3' non transcrites et la ligne continue représente les introns (pas à l'échelle). Les lignes brisées indiquent les deux épissages alternatifs : celui du transcrit initié par le promoteur de la Dp71 (ligne en gras, continue) et celui des transcrits initiés en amont (autres produits connus du gène *DMD* ; en gras pointillé). ATG, codon initiateur de la Dp71 chez la souris WT, TGA, le codon stop du gène chimérique de  $\beta$ -galactosidase-néomycine ( $\beta$ -géo). L'insertion du gène  $\beta$ -géo est décrite schématiquement au-dessous et indiquée par les lignes en pointillés.

### *Caractérisation comportementale*

La première caractérisation du phénotype comportemental des souris Dp71-null a montré une réduction de l'exploration et du comportement de recherche de la nouveauté, un déficit de rétention de l'évitement passif et des déficiences de mémoire et d'apprentissage spatial hippocampe-dépendants (Daoud et al., 2008). Une étude comportementale à plus large spectre a permis d'encore mieux de caractériser le phénotype associé à la perte de Dp71, notamment des déficits de mémoire de travail. La souris Dp71-null présente une altération de la flexibilité comportementale dans deux apprentissages impliquant la mémoire spatiale, dans

la piscine de Morris et dans le labyrinthe radial dans des tâches d'inversion de règles. En plus de ces aspects, une anxiété exacerbée s'ajoute au profil phénotypique de ces souris (Delphine Le Verger, Master 2) ainsi qu'une réduction des performances dans l'apprentissage de stratégie motrices dépendantes du cervelet (Helleringer et al., 2018). En revanche, ces souris n'ont aucune déficience de motricité fine ou d'équilibre impliquant le cervelet, rappelons d'ailleurs à ce titre que la souris Dp71-null n'est pas myopathe car la Dp71 n'est pas exprimée dans les muscles squelettiques adultes. Pour expliquer ce phénotype comportemental, on suppose que la perte de Dp71 conduirait à une hyperexcitabilité neuronale et *in fine* aux déficits cognitifs observés. Deux hypothèses pourraient être à l'origine de cette hyperexcitabilité neuronale : (1) un dysfonctionnement au niveau des synapses glutamatergiques et/ou (2) une perturbation de l'homéostasie potassique due à une dysfonction gliale. En effet, on sait que la Dp71 s'exprime à la fois au niveau neuronal et glial, et ce, dans différentes structures du système nerveux central : dans les neurones de l'hippocampe, du cortex et du bulbe olfactif (Gorecki et Barnard, 1995) mais également dans les astrocytes périvasculaires (Haenggi et al., 2004 ; Szabo et al., 2004) et les cellules gliales de Müller de la rétine (Claudepierre et al., 2000b).

Dans la rétine, ces souris Dp71-null possèdent aussi des anomalies, comme une hypersensibilité à l'ischémie et des anomalies de l'électrorétinogramme (ERG). Cet examen électrophysiologique utilisé notamment en ophtalmologie permet l'enregistrement de l'activité électrique des cellules excitables de la rétine en présence ou absence de lumière. En condition scotopique (i.e. d'adaptation à l'obscurité), l'équipe d'Alvaro Rendon de l'Institut de la Vision à Paris a mis en évidence une diminution de l'amplitude de l'onde b (Cia et al., 2014) et d'autres recherches à ce niveau ont été récemment effectuées dans notre laboratoire (Barboni et al., 2020, IOVS, sous presse).

### ***Étude des fonctions neuronales et synaptiques***

Dans le gyrus denté de l'hippocampe, l'ARNm de la Dp71 est détecté au niveau neuronal (Górecki et Barnard, 1995), et la protéine a été détectée dans les zones postsynaptiques (Jancsik et Hajós, 1999). Notre équipe (Daoud et al., 2008) a été la première à démontrer la présence de la Dp71 associée aux récepteurs NMDA et AMPA dans les synapses excitatrices glutamatergiques. Or, chez les souris Dp71-null, la perte de Dp71 est à l'origine d'une augmentation de la transmission glutamatergique associée à une réduction de la plasticité synaptique au niveau des neurones CA1 de l'hippocampe. Une réduction du nombre des synapses excitatrices est aussi observée, de même qu'une augmentation de leur taille (Daoud et

al., 2008). Des analyses de microscopie électronique ont aussi révélé chez la souris Dp71-null des changements significatifs de densité et de taille des vésicules présynaptiques dans les synapses glutamatergiques de l'hippocampe (Miranda et al., 2011).

Dans le cortex, la balance excitation/inhibition est modifiée en faveur de l'excitation (Chausseot et al., 2019). La perte de Dp71 affecte donc principalement la transmission glutamatergique qui est anormalement augmentée, et est associée à une réduction de la plasticité synaptique (LTP) dans le cortex préfrontal et dans l'hippocampe. Ces résultats suggèrent une hyperexcitabilité neuronale des réseaux cortico-hippocampiques

Enfin dans le cervelet, on sait que les réseaux neuronaux cérébelleux sont impliqués dans les stratégies de navigation (Rocheffort et al., 2013) et pourraient contribuer à certains déficits d'apprentissage spatial observés chez la souris Dp71-null. Afin d'expliquer ces déficits à un niveau moléculaire et synaptique, Romain Helleringer et en collaboration avec notre équipe avons exploré si la PSD-95, protéine d'échafaudage majeure de la synapse glutamatergique, était modifiée dans les cellules de Purkinje du cervelet. L'analyse de la taille et de la distribution des clusters de PSD-95 chez la souris Dp71-null indique une plus grande proportion de petits clusters comparé aux souris WT, suggérant que la Dp71 participerait à l'organisation moléculaire des densités postsynaptiques. Ces observations corroborent celles des modifications de la force synaptique dans l'hippocampe, également observée au niveau de la synapse fibre grimpante/cellule de Purkinje du cervelet (CF/PC). En effet, des enregistrements électrophysiologiques de signaux EPSC (courants postsynaptiques excitateurs) émis par les récepteurs membranaires AMPA et NMDA à la synapse CF/PC de la souris Dp71-null révèlent une augmentation de la force synaptique tandis que la LTP est diminué au niveau de cette synapse.

En cohérence avec les résultats observés dans d'autres structures, telles que l'hippocampe et le cortex, il semblerait que l'augmentation de l'excitation neuronale et la diminution de la plasticité soient une caractéristique des structures cérébrales en l'absence de Dp71.

### *Étude des fonctions gliales*

En dehors des neurones, dans lesquels la quantité de Dp71 reste relativement faible, la Dp71 est fortement exprimée au niveau glial, plus précisément au niveau des pieds des cellules gliales. Ceci a été montré au niveau des cellules gliales de Muller dans la rétine (Claudepierre



et al., 2000), des cellules gliales de Bergmann dans le cervelet et des astrocytes périvasculaires dans l'ensemble du cerveau (Haenggi et al., 2004).

Dans la rétine, la Dp71 est majoritairement exprimée par la cellule gliale de Müller (Claudepierre et al., 1999 ; Mornet, et al., 2000) mais aussi dans les astrocytes (P6 et adulte) et les péricytes autour des vaisseaux rétinien (Tadayoni et al., 2009). La localisation de la Dp71 à l'aide des anticorps H4 et 5F3 au niveau des pieds et du soma des cellules gliales de Müller a permis de révéler respectivement deux groupes de Dp71, les Dp71 d et f. La localisation des Dp71e et de la Dp40 dans la rétine reste à élucider. L'expression des dystrophines dans la rétine humaine est comparable à la rétine de souris (Tadayoni et al., 2009). Chez la souris Dp71-null, on observe dans la rétine une délocalisation des canaux potassiques Kir4.1 le long des cellules gliales de Müller et une réduction de l'expression des canaux aquaporines AQP4 (Daloz et al., 2003). La dérégulation de l'homéostasie du potassium dans la rétine est à l'origine d'une hyperexcitabilité neuronale et d'une excitotoxicité liée à une réduction de la capture du glutamate par les cellules gliales de Müller. En effet, la perte de Kir4.1 induit une dépolarisation de la membrane de ces cellules en conséquence de la baisse des courants potassiques K<sup>+</sup> (Kofuji et al., 2000 ; Kofuji et al., 2002).

Dans les astrocytes périvasculaires de l'ensemble du système nerveux central, il semble que la perte de Dp71 perturbe le tamponnage extracellulaire du potassium K<sup>+</sup> et l'homéostasie hydrique (Daloz et al., 2003 ; Amiry-Moghaddam et al., 2004 ; Connors et al., 2004 ; Haenggi et al., 2006 ; Fort et al., 2008). La Dp71 est identifié comme la protéine permettant l'ancrage des canaux AQP4 mais une précision s'ajoute à ces résultats par l'équipe de Nicchia et al., 2008. En effet, en étudiant pour la première fois la souris Dp71-null, et en la comparant à la fois aux souris WT mais aussi mdx3cv, Nicchia et son équipe mettent en évidence dans le cervelet un premier pool de canaux AQP4 dépendant de la Dp71, au niveau périvasculaire, ainsi qu'un second pool ne dépendant pas de la Dp71 dans la couche granulaire et la substance blanche du cervelet. Le premier pool Dp71-dépendant correspondant à des OAP de grande taille est altéré, c'est-à-dire que les isoformes d'AQP4 M1 et 23 qui composent l'OAP sont réduits alors que le second pool correspondant à un OAP de taille plus petite ne l'est pas. Les auteurs suggèrent que la Dp71 n'est pas nécessaire pour l'expression de certains pools d'AQP4 dans certaines sous-régions comme la couche granulaire (gcl) du cervelet, les pieds gliaux de la glia limitans externe et les cellules épendymaires. Dans cette étude, l' $\alpha$ -syntrophine est très fortement diminuée alors que le  $\beta$ -dystroglycane l'est légèrement. L'ancrage d'AQP4 à la membrane nécessite l' $\alpha$ -syntrophine, alors qu'au contraire la localisation membranaire de syntrophine ne dépend pas d'AQP4 (Nicchia et al., 2005).

Dans l'hypothalamus ou plus précisément l'axe hypothalamo-hypophysaire, le groupe de Latifa Dorbani-Mamine montre l'implication fonctionnelle de la Dp71. Sa localisation hypothalamique au niveau des pieds astrocytaires est nécessaire à la régulation de l'osmolalité plasmatique alors que, dans la neurohypophyse, elle est impliquée dans le contrôle de la sécrétion de vasopressine (Benabdesselam et al., 2010).

### *Étude de la barrière vasculaire*

Des travaux menés à l'institut de la vision (Paris) ont permis de montrer que l'absence de Dp71 inhibe l'angiogenèse postnatale jusqu'à six jours après la naissance dans la rétine. Après P6, l'activité d'angiogenèse est plus élevée chez les souris Dp71-null, permettant un « rattrapage » de la vascularisation comparable aux souris sauvages à P12 (Tadayoni et al., 2010).

La dystrophine Dp71 joue un rôle clé dans le maintien de la barrière hémato-rétinienne BHR (Sene et al., 2009). Lors d'un décollement de rétine induit chez la souris C57BL/6, il est observé une délocalisation des canaux Kir4.1 et une baisse d'expression d'AQP4 et de Dp71 et une surexpression d'utrophine ne permettant pas de compenser la baisse de Dp71. Dans ces conditions de choc osmotique induits par le décollement de rétine, l'absence de Dp71 aggrave la pathophysiologie des cellules de Müller qui ne régulent plus efficacement les échanges d'eau, conduisant à un œdème cytotoxique, à une altération des courants potassiques et une augmentation drastique de la perméabilité de la BHR (Sene et al., 2009).

Afin d'expliquer cette altération de la BHR, et dans la continuation du travail de Sene et al. (2009), B. El Mathari a mis en évidence le rôle de la Dp71 dans l'inflammation rétinienne et la dégénérescence des capillaires. En effet, l'absence de la Dp71 entraîne une augmentation de l'expression du VEGF, d'ICAM-1, une augmentation du nombre de leucocytes adhérents rétiniens et une dégénérescence accrue des capillaires, associée à une forte perméabilité vasculaire chez les souris Dp71-null (Mathari et al., 2015 ; Vacca et al., 2014).

Dans la continuité de cette recherche, A. Giocanti-Auregan et al. (2016) ont exploré l'architecture du réseau astrocytaire rétinien et le développement vasculaire de la rétine. Ce dernier se trouve être perturbé et le nombre d'astrocytes diminuée dès P6 et jusqu'à l'âge adulte, ce qui pourrait être à l'origine d'un développement vasculaire retardé. A l'inverse, dans un modèle transitoire de rupture de la BHR in vivo, ne comportant ni ischémie ni injection de VEGF, il a été mis en évidence une diminution de l'expression de la Dp71 et d'AQP4, ainsi

qu'une délocalisation de Kir4.1 le long de la membrane des CGM. L'ensemble de ces anomalies ont été corrigés par injection intra-vitréenne de dexaméthasone (Siqueiros-Marquez et al., 2016)

La suite de ces travaux sur le rôle de la Dp71 dans la rétine a consisté à tenter de restaurer l'expression de la Dp71 dans les cellules gliales de Müller chez les souris Dp71-null. Ceci a fait l'objet de la thèse d'Ophélie Vacca à l'institut de la vision (Paris) dans l'équipe d'A. Rendon. Ce groupe a utilisé un vecteur AAV recombinant comportant une capsid ShH10 qui est un variant de l'AAV5 à spécificité gliale. Ce dernier comporte la séquence du gène de la Dp71 et de la GFP (expression bicistronique) afin de pouvoir suivre leur transduction. Les vecteurs AAV injectés dans l'humeur vitrée passent très mal la BHR. Mais dans le cas de la souris Dp71-null, les altérations de la matrice extracellulaire favorisent leur passage (Vacca et al., 2014), ce qui a aussi permis à l'AAV-ShH10 de transduire spécifiquement et efficacement les cellules gliales de Müller, et d'induire une forte ré-expression de la Dp71 dans la rétine des souris Dp71-null (Vacca et al., 2016). De plus, cette restauration de la Dp71 permet de restaurer la barrière hémato-rétinienne et de relocaliser les canaux AQP4 et Kir4.1, et permet aussi une résorption de l'œdème (Vacca et al., 2016).

Ceci fournit une base importante pour le développement de nouvelles stratégies thérapeutiques pour les maladies dont la barrière hémato-rétinienne est endommagée, comme la rétinopathie diabétique, maladie liée à un œdème. L'adaptation d'un vecteur de ce type pour le cerveau a été récemment développée par O Vacca au cours de son stage postdoctoral dans notre équipe. Les AAV donnent des résultats prometteurs dans un nombre croissant d'essais cliniques (Bainbridge et al., 2008 ; Hauswirth et al., 2008 ; Maguire et al., 2008) et sont également étudiés en recherche clinique pour traiter les dystrophies musculaires, la maladie de Parkinson et la maladie d'Alzheimer (Ginn et al., 2013).

A la lumière de ces travaux, l'objectif de mon travail de thèse a été de caractériser les altérations moléculaires et cellulaires associées à la perte de Dp71 dans le cerveau. Mon modèle d'étude était la souris Dp71-null, afin d'identifier des altérations spécifiques d'une perte sélective de Dp71, sans l'influence d'autres dystrophines comme dans les modèles de type mdx. J'ai comparé les altérations présentes dans le cervelet et l'hippocampe, deux structures qui semblent impliquées dans la genèse de perturbations comportementales chez la souris Dp71-null (Helleringer et al., 2018 ; Chaussonot et al., 2019). Ce travail a été effectué en étroite concertation et collaboration avec A Rendon (Institut de la Vision) et M Cohen-Salmon et AC Boulay (Collège de France). J'ai également participé à un projet collaboratif financé par l'ANR et l'AFM-Telethon, visant à identifier des perturbations physiologiques reflétant des altérations

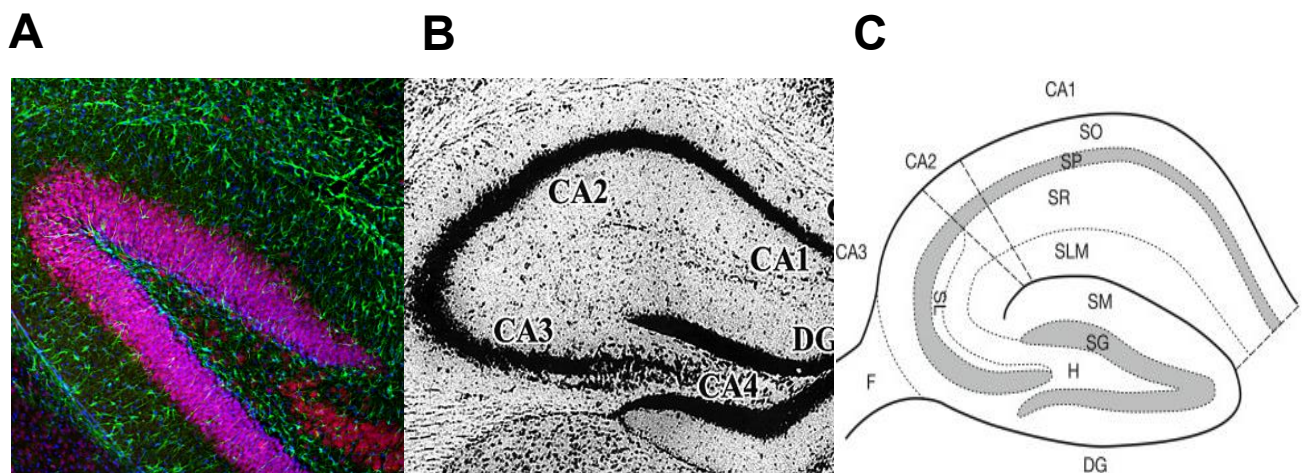
de l'homéostasie hydrique et potassique et des fonctions de la BHE. Cette partie de projet impliquait une postdoctorante impliquée notamment dans des expériences visant à restaurer la Dp71 cérébrale avec des vecteurs AAV (O Vacca), un groupe d'électrophysiologistes de notre Institut, spécialistes des cellules gliales de Bergmann du cervelet (R Helleringer, H Daniel et M Galante), une ingénieure de recherche experte en IRM in vivo (C Sébrié), une ingénieure d'étude (C Isabelle) et la plateforme de microscopie électronique de l'I2BC (Gif-sur-Yvette). Les résultats de cette seconde partie de projet feront l'objet d'une publication en préparation qui décrira cette caractérisation pluridisciplinaire des phénotypes liés aux fonctions gliales de la Dp71, dont certains sont/seront utilisés pour évaluer l'efficacité d'un traitement par injection de vecteurs AAV pour ré-exprimer la Dp71 dans le cerveau.

# **ETUDE EXPERIMENTALE**

**I. ALTERATIONS MOLECULAIRES ASSOCIEES A LA  
PERTE DE DYSTROPHINE DP71**

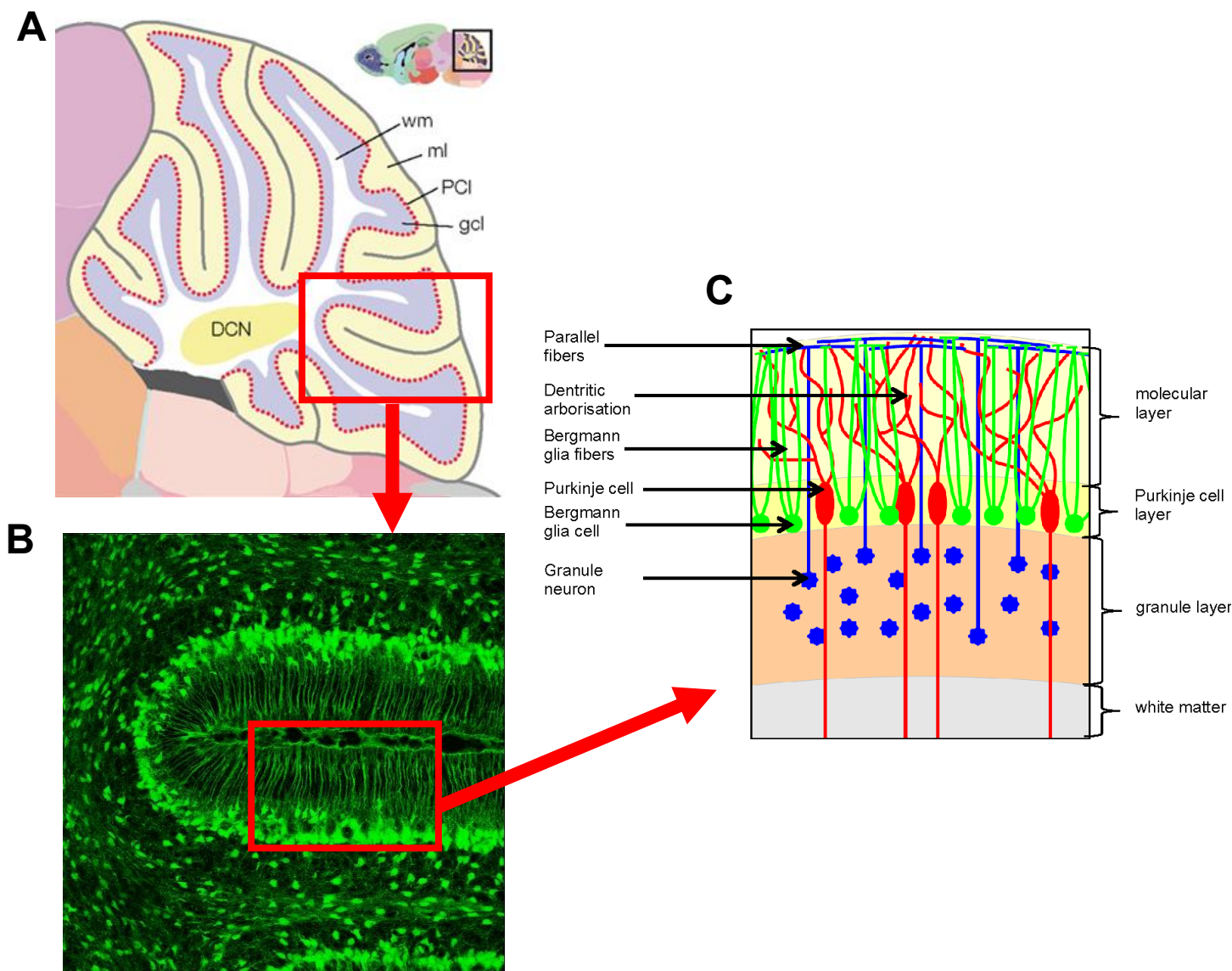
## INTRODUCTION

L'hippocampe est une structure bilatérale de forme recourbée composée de la corne d'Ammon et du gyrus denté. Elle est organisée en sous-couches avec notamment deux couches neuronales, celle des cellules pyramidales des champs ammoniens (CA1-CA4) constituant la *stratum pyramidale* SP et des cellules granulaires du gyrus denté (GD). Au-dessus de la SP se trouve une couche nommée *stratum oriens* SO, qui contient les dendrites basales des neurones pyramidaux, et entre la SP et le GD, se succèdent les sous-couches *stratum radiatum* SR, contenant les dendrites apicales, *stratum lacunosum moleculare* SLM et *stratum moleculare* SM. La sous-couche SLM est formée de *lacunosum* par lesquels les artérioles entrent le long de la fissure hippocampique et se divisent ensuite en artérioles précapillaires et *in fine* en capillaires.



**Figure 15 - Organisation laminaire de l'hippocampe de souris.** (A) Coupe transversale d'hippocampe. En vert sont représentés les astrocytes marqués par la GFAP et en rouge les neurones de la couche granulaire du gyrus denté marqué par NeuN qui se superposent au marqueur nucléaire DAPI (bleu) (B) Coupe transversale d'hippocampe gauche de souris. En noir sont représentés les neurones pyramidaux des champs ammoniens CA1-CA4 ainsi que les cellules granulaires du gyrus denté (DG). (C) Schéma représentatif des différentes sous-couches de l'hippocampe. En pointillé sont délimitées les sous-couches ainsi que les champs ammoniens de l'hippocampe. En gris, ce sont les neurones de la *stratum pyramidale* (SP) et de la *stratum granulosum* (SG). F : Fornix, H : Hile, SO : *stratum oriens*, SR : *stratum radiatum*, SLM : *stratum lacunosum moleculare*, SM : *stratum moleculare*.

Le cervelet, ou plus exactement le cortex cérébelleux, est aussi une structure laminaire qui comporte plusieurs couches distinctes : la couche moléculaire (externe) contenant l'arborisation dendritique des cellules de Purkinje et les prolongements gliaux des cellules de Bergmann qui forment par leurs pieds périvasculaires et la glia limitans externe ; la couche des cellules de Purkinje contenant aussi les corps cellulaires des cellules de Bergmann ; et la couche granulaire. Chacun des lobules du cervelet est espacé par de la substance blanche formant le centre médullaire du cervelet.



**Figure 16 - Organisation du cervelet.** (A) Coupe sagittale du cervelet où sont représentés les différents lobules et ses différentes sous-couches. wm : matière blanche ; ml : couche moléculaire ; PCI : couche des cellules de Purkinje ; gcl : couche des cellules granulaires. (B) Coupe sagittale sur tranche d'un lobule de cervelet marqué par la GFAP en vert montrant les cellules gliales de Bergmann et ses prolongements radiaires dont les pieds forment la glia



limitans. (C) Représentation schématique des sous-couches du cervelet. Cellule en bleu : Cellule granulaire et ses prolongements vers la couche moléculaire dont les fibres parallèles : cellule en rouge : cellule gliale de Bergmann ; cellule en vert : cellule de Purkinje et son arbre dendritique.

Dans cette première partie de l'étude expérimentale, nous avons cherché à évaluer l'impact de la perte de Dp71 au niveau moléculaire dans le cervelet et l'hippocampe car ces deux régions cérébrales sont associées à des déficits cognitifs et neurophysiologiques hippocampe-dépendants (Daoud et al., 2008 ; Chaussonot et al., 2019) et cervelet-dépendants (Helleringer et al., 2018) chez la souris Dp71-null. Pour ce faire, nous avons évalué la distribution d'AQP4 et des protéines associées à la Dp71 par des analyses semi-quantitatives d'immunofluorescence avec double marquage glial et vasculaire des différentes cibles protéiques et leur analyse par imagerie confocale et/ou de marquage immunogold en microscopie électronique. Nous avons comparé le profil d'expression de ces protéines dans les différentes couches du cervelet et de l'hippocampe, et pour aller plus loin, nous avons détaillé leur expression dans des préparations de vaisseaux purifiés du cerveau antérieur et triés en fonction de leur calibre : artérioles ( $\geq 30 \mu\text{m}$  de diamètre), artérioles précapillaires (10-30  $\mu\text{m}$  de diamètre et capillaires (5-10  $\mu\text{m}$  de diamètre).

## MÉTHODES

### Animaux

Les souris transgéniques Dp71-KI (Sarig et al., 1999) ont été offertes par le Professeur David Yaffe (Weizmann Institute, Rehovot, Israël). Ces souris ont été construites par recombinaison homologue en remplaçant une grande partie du premier exon spécifique, site d'initiation de la transcription de la Dp71, et une petite partie du premier intron de la Dp71, par une séquence chimérique codant la protéine  $\beta$ -galactosidase-néomycine ( $\beta$ -geo). Cette manipulation inhibe spécifiquement l'expression de la Dp71 sans interférer avec les autres produits du gène *dmd* (Sarig et al., 1999). Les souris Dp71-null ont été croisées sur plus de dix générations avec des souris sauvages, mâles et femelles, sont sur fond génétique pur C57BL/6 (Janvier Labs, France) par le Dr. Alvaro Rendon (Institut de la Vision, Paris, France) au CDTA (CNRS, Orléans, France). La production et le maintien de la lignée est réalisé par le croisement des souris mâles Dp71-null ( $X_{Dp71}/Y$ ) avec des souris femelles sauvages ( $X/X$ ) afin d'obtenir

des femelles hétérozygotes ( $X_{Dp71}/X$ ) que nous avons sélectionné pour un deuxième croisement avec des souris mâles sauvages ( $X/Y$ ). Ainsi, au sein de la même portée, nous sélectionnons pour notre étude les souris mâles sauvages ( $X/Y$ ) et  $Dp71$ -null ( $X_{Dp71}/Y$ ). Tous les animaux ont été génotypés par analyse PCR des queues de souris et détection du gène  $\beta$ -galactosidase ( $\beta$ -geo). Ils ont été maintenus durant un cycle jour-nuit de 12h (lumière à partir de 7h du matin) avec nourriture et eau ad libitum. Toutes les expériences ont été réalisées chez des souris adultes (2,5 à 5 mois) en respectant les règles en matière d'éthique (#D91-471-104) en conformité avec la directive européenne 2010/63/EU, le Comité National Français (87/848) et le Comité d'Ethique local (Paris Centre et Sud, #59).

### **Anticorps utilisés en immunofluorescence**

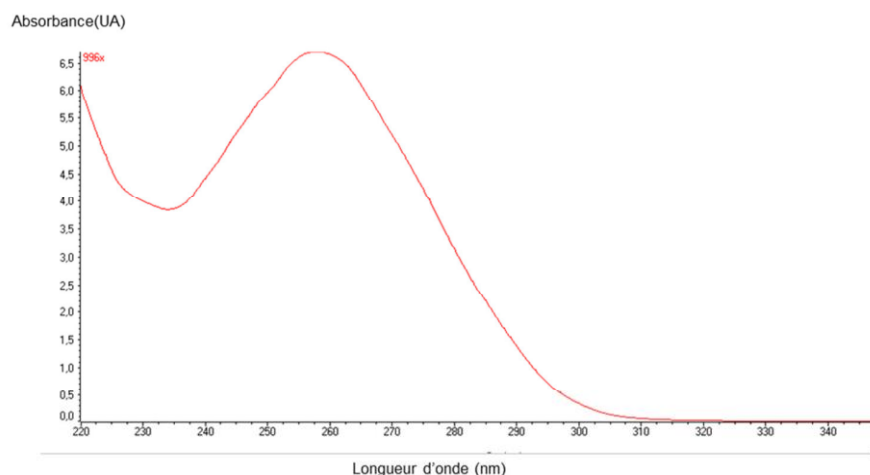
Des anticorps primaires polyclonaux produits chez le lapin ont été utilisés: H4 dirigé contre les exons 78-79 de la partie C-terminale de la dystrophine ; anti- $\beta$ -dystroglycane (dilution 1:400; don de D. Mornet, Montpellier) ; l'anti-Aquaporin-4 AQP4 (dilution 1:200, Alomone labs, Israël) ; l'anti-Kir4.1 (dilution 1 :200, Alomone labs, Israël) ; l'anti-alpha-1 syntrophine (dilution 1 :200, Alomone labs, Israël) ; l'anti-pan-laminine (dilution 1 :200, Sigma) ; l'anti-zonula occludens-1 ZO-1 (dilution 1:400, Invitrogen, USA) ; l'anti-Glial Fibrillary Acidic Protein GFAP (dilution 1: 1000, Dako, Denmark) ; l'anti-utrophine (dilution 1 :200 ; K7 don de D Mornet) ; et l'anti-alpha smooth muscle actin SMA (dilution 1 :200, Sigma). Des anticorps monoclonaux ont été utilisés : l'anti-GFAP produit chez la souris (dilution 1:500, Sigma) afin d'analyser le marquage astrocytaire et d'étudier l'éventuelle localisation des protéines cibles dans les pieds gliaux périvasculaires ; Dys1 dirigé contre la partie N-terminale de la dystrophine  $Dp427$  (dilution 1:3). Les anticorps secondaires suivants ont été utilisés : goat anti-rabbit conjugué à la cyanine Cy3 (dilution 1:400, Jackson Immunoresearch, USA) et goat anti-mouse IgG H&L (dilution 1:400 Alexa Fluor® 647, Abcam). La lectine *lycopersicon esculentum* Dy-Light 488 (Vector laboratories), spécifique des N-acetyl-D-glucosamines et N-acetyl-polylectosamines (Kawashima et al., 1990 ; Porter et al., 1990), a été utilisée comme marquage endothélial afin de normaliser les quantifications ainsi que pour l'étude de la vascularisation.

## **Extraction ARN**

Douze souris vont servir pour l'extraction d'ARNm et de protéines (six souris WT et six souris Dp71-null). Après dislocation cervicale, les cerveaux sont prélevés. On isole le cervelet et l'hippocampe que l'on met directement dans un tampon fourni avec le kit d'extraction d'ARN et de protéines sur colonne (NucleoSpin RNA/Protein isolation, Macherey-Nagel). Dans un premier temps, les échantillons sont broyés, homogénéisés et subissent une lyse cellulaire. Les lysats sont extraits avec des filtres NucleoSpin®. Après liaison de l'ADN et de l'ARN à la membrane de silice, l'échantillon est incubé dans la Dnase I pour purifier l'ARN. Quant à la purification des protéines, on réalise une précipitation à travers une colonne. Les protéines sont ensuite dissoutes dans du tampon de charge (PSB-TCEP).

## **Évaluation de l'intégrité de l'ARN**

L'intégrité de l'ARN et sa concentration ont été déterminé au Nanodrop® et à l'Experion RNA StdSens™ (BioRad). Le Nanodrop® est un spectrophotomètre pour des microvolumes. Nous avons utilisé cet appareil pour analyser l'intégrité de l'ARN en déposant 1 µl d'ARN de chaque échantillon. On obtient une courbe d'absorption ARN avec un pic à 260 nm (Figure 17), ce qui indique la présence d'ARN et permet de calculer sa concentration grâce à la loi de Beer-Lambert :  $C = (A \times e)/b$  ; où c'est la concentration en ng/ml, A l'absorbance, e, le coefficient d'extinction molaire en ng/ml et b le trajet optique en mm. Pour l'ARN, le coefficient d'extinction généralement admis est de 40 ng/µl et le trajet optique utilisé est de 1.0 mm.



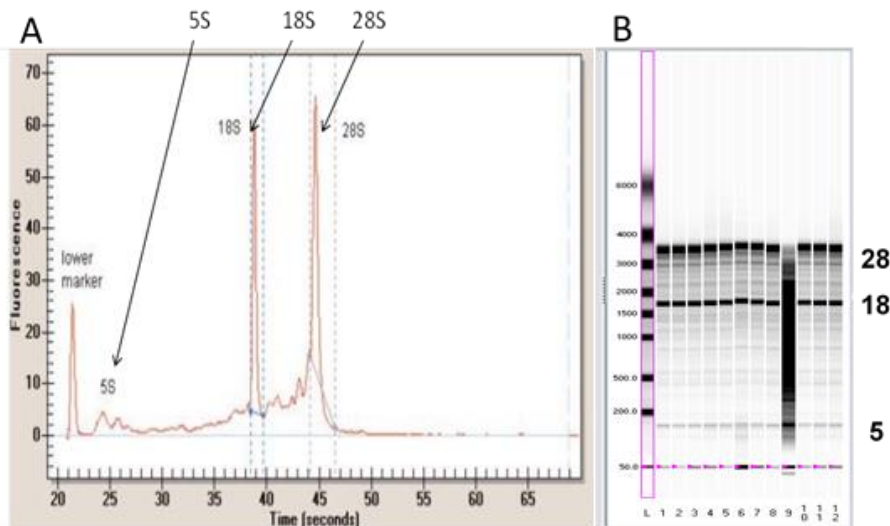
**Figure 17- Exemple de courbe d'absorption ARN au Nanodrop®.** L'absorbance (unité arbitraire) est exprimée en fonction de la longueur d'onde (nm). Échantillon d'ARN de cortex de souris Dp71-null (des échantillons de cortex ont parfois servi pour mettre au point les méthodes en début de projet, mais cette région cérébrale n'a pas été étudiée en détails).

Le Nanodrop® a l'avantage de nous informer sur d'éventuelles contaminations. Ainsi pour considérer que l'ARN est pur, le ratio 260/280 doit être entre 1.5 et 2. En effet, l'ARN absorbe à 260 nm. Si le ratio est inférieur à 2, cela peut indiquer la présence de protéines, de phénol ou d'autres contaminants qui absorbent à 280 nm (par exemple l'ADN). Des composants tels que l'EDTA (acide éthylène diamine tétraacétique), le réactif TRIzol® (Guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform) utilisé pour l'extraction d'acides nucléiques ou la guanidine HCl ont une absorbance à 230 nm et peuvent également contaminer l'échantillon d'ARN, ce qui peut s'évaluer par le calcul du rapport 260/230 qui doit être entre 2 et 2.2. Cependant, ce type de contamination ne biaise pas significativement le calcul des concentrations en ARNm.

L'Experion™ a été utilisé pour évaluer la présence éventuelle d'une dégradation d'ARN parmi nos échantillons système d'électrophorèse automatique sur puce. L'analyse quantitative de l'expression des gènes repose sur l'utilisation d'ARN pur et intact. Le but est de déterminer le RQI (RNA quality indicator), qui est l'indicateur de l'intégrité de l'ARN qui doit normalement comprendre 95 % d'ARN ribosomiaux et 5% d'ARNm. La proportion d'ARN ribosomal est non négligeable et nécessite donc d'être évaluée. L'experion donne également la valeur d'absorbance à 260 nm et permet de confirmer le rapport 260/280. La première étape est la dénaturation des ARN : 1 µl d'ARN de chaque échantillon et 1 µl de marqueur de taille sont mis à 70°C au bain marie pendant 2 min. Ces échantillons sont ensuite refroidis dans la glace pilée pendant 5 min et centrifugés. La deuxième étape est la préparation des réactifs : 600 µl de

gel d'électrophorèse (G) est centrifugé à 1500g pendant 10 min puis 1 µl de marqueur (S) est ajouté à 65 µl de G pour constituer la solution GS (gel-marqueur). La troisième étape est celle du remplissage de la puce Experion RNA StdSens : 12 puits sont remplis par 1µl d'ARN et 5µl de tampon de charge, un puit par 5µl de tampon de charge et 1µl de marqueur de taille, deux puits par 9µl de solution gel-marqueur et un puit servant de rinçage par 9µl de G.

On obtient après lancement de l'analyse par le logiciel Experion une courbe montrant un pic de faible amplitude correspondant à l'ARN 5s et deux grands pics correspondant au 18S et au 28S (Fig. 18 A). Le logiciel peut également construire une représentation de la migration des ARN pour chaque échantillon ce qui permet d'observer la présence distincte des bandes 5S, 18S et 28S ainsi que les 8 bandes du marqueur de taille (Fig. 18 B). L'intégrité de l'ARN est évaluée par la quantification de l'aire sous les pics correspondants aux ARN ribosomiaux. Un ratio 28S/18S proche de 2 est indicateur d'un ARN intact. Un algorithme prend ensuite en compte d'autres caractéristiques de la courbe et la compare à une série standardisée d'ARN dégradés. On obtient ainsi une valeur du RQI, (indicateur de l'intégrité de l'ARN) compris entre 10 (ARN intact) et 1 (ARN fortement dégradé).



**Figure 18- Courbe d'absorption d'ARN et gel d'électrophorèse obtenus par l'Experion.** (A) Pics correspondant à l'ARN 5S, 18S et 28S (B) Gel d'électrophorèse avec un premier puit correspondant aux 8 bandes du marqueur de taille et les puits 1-12 montrant la migration des échantillons d'ARN avec les bandes 5S, 18S et 28S. L'échantillon d'ARN n°9 dégradé fait apparaître une bande noire tout le long du gel.

## **RT-PCR**

L'ADNc est synthétisé grâce à l'enzyme iScript, une reverse transcriptase modifiée (kit iScript BioRad cDNA Synthesis), A partir des ARNs préalablement quantifiés (Nanodrop et Expérian) et dilués au 1/10e, de manière à obtenir une quantité de 0.5 µg/µl d'ARN dans un volume final de 13 µl. On ajoute à chaque échantillon 2 µl d'eau dénuée de nucléase 4 µl du mix de réaction 5X et 1 µl d'iScript. On lance ensuite le programme de transcription inverse suivant : 25°C 5 min, 42°C 30 min et 85°C 5 min sur le thermocycleur Mastercycler® personal eppendorf.

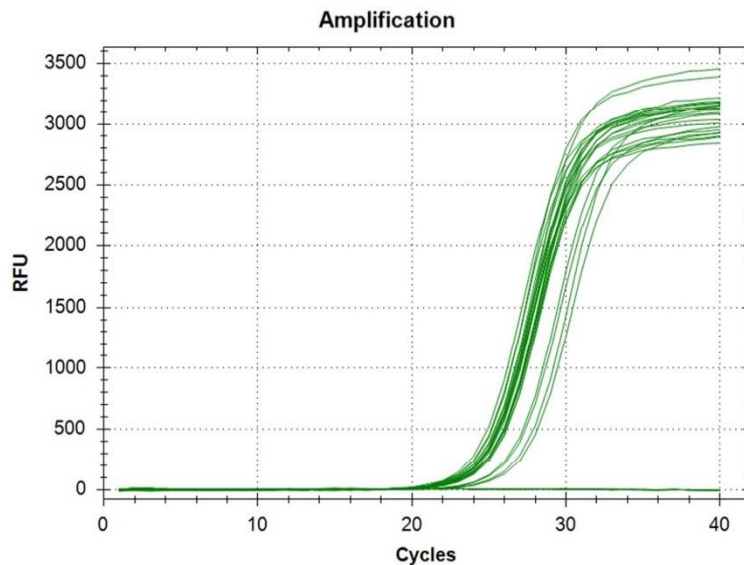
## **PCR quantitative**

### *Principe*

La PCR quantitative permet une mesure en temps réel de la quantité d'ADN. Un couple d'amorces prédéfini permet d'amplifier une région spécifique de l'ARNm. Après dénaturation de l'ADNc et hybridation des amorces sur la séquence cible, un agent intercalant, le SYBR®Green, émet un signal fluorescent uniquement lorsqu'il s'incorpore dans l'ADN double brin, permettant de quantifier un signal qui est donc proportionnel à la quantité de produits amplifiés (amplicons). Un seuil de fluorescence est fixé et une fois que la quantité d'ADN permet au SYBR®Green de dépasser ce seuil, on détermine le signal seuil dénommé cycle seuil ou Ct (Cycle threshold), qui est proportionnel à la quantité d'ADNc initialement présent dans l'échantillon. Le Ct calculé est en fait inversement proportionnel au logarithme décimal du nombre de copies initiales.

Le résultat d'une PCR en temps réel est représenté par une courbe sigmoïde. Dans la Fig. 19, chaque courbe correspond à un échantillon et représente la mesure du signal de fluorescence de cet échantillon au fil des cycles d'amplification (RFU, unité relative de fluorescence). Pour chaque courbe, le point d'intersection de la droite obtenue par régression linéaire avec le niveau seuil (signal seuil = 0 ; matérialisé par la ligne verte horizontale dans la figure 19) correspond au Ct.

**Figure 19 - Courbe de fluorescence en fonction du nombre de cycles PCR pour le gène codant l'actine.** L'analyse par régression linéaire montre que tous les échantillons ont un CT compris entre 22 et 24 cycles. RFU : unité relative de fluorescence.



La variation relative de l'expression des gènes d'intérêts est ensuite calculée et normalisée par rapport à trois gènes de référence, UBC (Ubiquitine C), HPRT1 (Hypoxanthine phosphoribosyltransférase 1) et PGM1 (Phosphoglucomutase 1), supposés montrer des niveaux d'expression invariants dans nos groupes expérimentaux (logiciel CFX Manager™). Nous avons vérifié qu'il n'existe pas de différence significative d'expression de ces gènes de référence entre nos deux génotypes. L'ensemble des échantillons est analysé en duplicata pour chaque gène cible et gène de référence. Les valeurs moyennées sont utilisées comme valeur de Ct.

#### *Choix des séquences des amorces*

Les amorces ont été prédéfinies en recherchant des séquences spécifiques des gènes d'intérêts (Tableau 1) et en veillant à ce que les séquences amplifiées répondent à plusieurs critères assurant une réaction de qPCR optimale (applications BLAST et OligoAnalyzer ; logiciel APE) : une taille d'amplicon de 100 à 200 pb, une température de fusion ( $T_m$ ) comprise entre 55 et 60°C, une quantité de paires de bases GC > 50%, et un nombre minimal (<4) de structures en épingle à cheveux (hairpin). Ces critères permettent d'assurer une hybridation robuste et spécifique des amorces à la séquence cible. Le tableau ci-dessous montre les séquences sens et anti-sens choisies pour les 3 gènes de référence et pour l'ensemble des gènes d'intérêts de notre étude. Les gènes de référence UBC, PGM1 et HPRT1 ont été choisis suite à des expériences préliminaires car ils présentent des niveaux d'expression proches de nos gènes d'intérêt.

**Tableau 1 - Séquences des amorces.** Les séquences sens et anti-sens utilisées pour la qPCR sont indiquées pour les 3 gènes de référence (UBC, PGM1, HPRT1) et pour les gènes d'intérêt AQP4 et ZO-1.

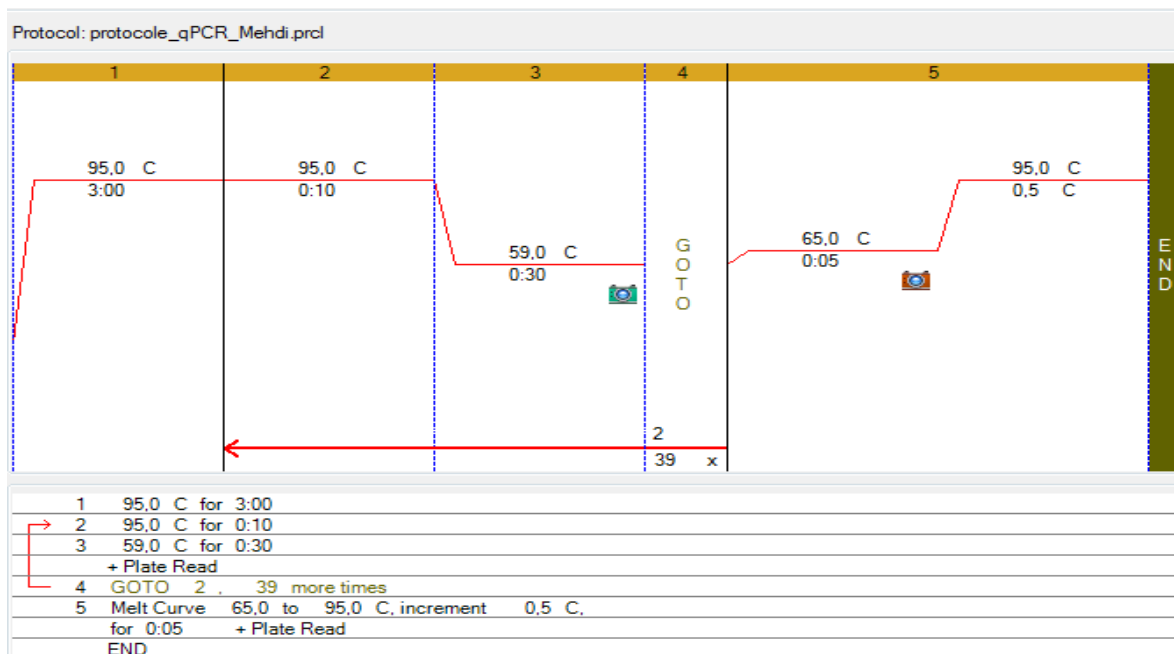
	Sens	Antisens
UBC	5'-GCAAGACCATCACCCCTGGAC-3'	5'-GAGCCCTCCTTGTGCTTGTT-3'
PGM1	5'-GCATTTCTCAGGCATTGAGG-3'	5'-GGAGAGCAAGGTGAAGTTCG-3'
HPRT1	5'-CCCAGCGTCGTGATTAGC-3'	5'-ATCTTTGTTTTGCTCGGTGTGG-3'
AQP4	5'-GGTAAGTGTGGACATTCCTGC-3'	5'-ATCTTTGTTTTGCTGGTGTGG-3'
ZO-1	5'-GGGCTCCTGGGTTTGGATTG-3'	5'-GCTACAGGAAAATGACCGAGTTGC-3'

### *Protocole*

La qPCR a été réalisée avec l'appareil CFX96 Touch Real-Time PCR Detection System (Biorad). Les échantillons sont déposés dans des plaques de 96 puits. Dans chaque puit, on dépose une quantité d'ADNc correspondant à 0.50 µg/µl d'ARNm, 375 nM de chaque amorce (sens et anti-sens) et du SYBR Green Supermix 2X jusqu'à un volume final 20 µl par puit.

Vu le nombre important de gènes cibles dans notre étude, nous avons choisi d'analyser simultanément tous les échantillons sur chaque plaque (12 souris x 3 régions cérébrales x 2 duplicats = 72 puits ; 6 WT et 6 KO) pour chaque gène cible. Afin de pouvoir faire des comparaisons entre plaques, et surtout pour pouvoir normaliser les résultats par rapports aux mesures effectuées avec les 3 gènes de référence, deux échantillons « contrôles » identiques (1 WT et 1 DP71-null ; amorces dirigées contre le gène UBC) ont été déposés sur chaque plaque en duplicat afin de servir de « calibrateur ». D'autres puits contrôles sont également présents sur chaque plaque (H<sub>2</sub>O, puits dans lequel l'ADNc est remplacé par de l'eau). Le protocole d'amplification utilisé, représenté par la figure 20 ci-dessous, est constitué d'une étape à 95°C pendant 3 min, puis de 40 cycles de 10s à 95°C en alternance avec des cycles de 30s à 59°C. Une dernière phase allant de 65°C à 95°C par incréments de 0.5°C est utilisée pour créer une courbe de fusion (melt curve) qui permet de s'assurer qu'un seul amplicon a été généré (figure 20).

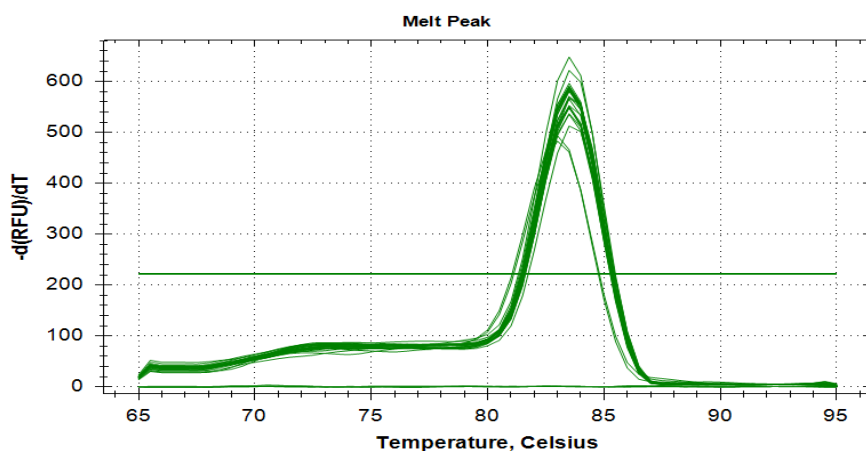




**Figure 20 - Représentation schématique du protocole de qPCR.**

### *Spécificité et efficacité de la réaction de qPCR*

Afin de valider l'amorce utilisée pour l'amplification d'un gène d'intérêt, on doit répondre à plusieurs critères. Tout d'abord, on doit vérifier qu'il n'y a qu'un seul pic dans la courbe de fusion ce qui indique que l'amorce est spécifique de notre gène d'intérêt et ne s'hybride pas à une autre séquence non spécifique qui serait responsable d'un second pic (Exemple de courbe de fusion, Figure 21) On peut confirmer cette spécificité en faisant migrer sur gel les produits amplifiés au cours de la qPCR. Pour tous les échantillons, un seul pic de forte amplitude apparaît au cours du gradient de température à l'origine de cette courbe de fusion obtenue avec une paire d'amorces spécifiques du gène d'intérêt ciblé.



**Figure 21- Exemple de courbe de fusion.** Variation de fluorescence  $d(RFU)/dT$  en fonction de la température ( $^{\circ}$ Celsius). RFU : unité relative de fluorescence ;  $dT$  : en fonction du nombre de cycle CT.

On peut ensuite vérifier qu'il existe une relation linéaire entre la concentration en ADNc d'un échantillon et le CT calculé à partir du signal fluorescent. On utilise pour cela 5 dilutions afin d'obtenir une courbe étalon en 5 points. Un coefficient de corrélation linéaire R2 supérieur à 0.985 et une pente comprise entre 3.3 et 3.7 indiquent des conditions optimales. Le pourcentage d'efficacité est également déduit de cette courbe et entre 95 et 105 %, et cette valeur est ensuite également prise en compte pour le calcul du CT. Une efficacité de 100 % signifie que la quantité du gène cible est doublée à chaque cycle. Toutes ces validations/vérifications ont été effectuées dans notre étude

### *Calcul du Ct*

Le Ct (Cycle Threshold) correspond au point d'intersection la courbe PCR sigmoïde avec le seuil, déterminé par un modèle de régression non linéaire. Le CT correspond au nombre de cycles d'amplification qui ont été nécessaires pour commencer à détecter la séquence d'ADN cible. Plus le Ct est élevé, moins l'ARN est présent car il faut plus de cycles pour détecter le signal fluorescent. Inversement si le Ct est faible, le gène est fortement exprimé.

Le delta du Ct ( $\Delta Ct$ ), correspond à la quantité relative d'ADNc cible pour un échantillon par rapport à un échantillon contrôle (ou calibrateur), est calculé selon la formule suivante (Instruction Manual ; BioRad, France) :

$$\Delta Ct_{\text{échantillon}} = E^{Ct_{\text{contrôle}} - Ct_{\text{échantillon}}}$$

Où : E = Efficacité de réaction calculé selon la formule (% d'efficacité x 0.01) +1 avec 100% d'efficacité =2 ;  $Ct_{\text{contrôle}}$  = moyenne des Ct (duplicata) pour l'échantillon correspondant au gène contrôle ;  $Ct_{\text{échantillon}}$  = moyenne des Ct (duplicata) pour l'échantillon correspondant à un gène d'intérêt.

Le double delta Ct, noté  $\Delta\Delta Ct$ , correspondant à la quantité relative du gène d'intérêt  $\Delta Ct_{\text{échantillon}}$  normalisée par rapport aux gènes de référence (ref1-3) est calculé selon la formule suivante :

$$\Delta\Delta Ct_{\text{échantillon}} = \Delta Ct_{\text{échantillon}} / (\Delta Ct_{\text{réf 1}} \times \Delta Ct_{\text{réf 2}} \times \Delta Ct_{\text{réf 3}})^{1/3}$$

## **Immunofluorescence**

### ***Préparation des tissus***

Après dislocation cervicale, les cerveaux de souris C57Bl6 et Dp71-null âgées de 3 mois ont été disséqués et recouverts de poudre de carboglace pilée pour une congélation douce sans fixation initiale. Ces cerveaux sont ensuite conservés à - 80°C. Des sections de 30 µm d'épaisseur d'hippocampe (coupe frontale) et de cervelet (coupe sagittale) sont réalisées au cryostat à -13°C sur des lames SuperFrost Plus (Roth, France) puis stockée à -80°C. Les tissus sont postfixés dans l'acétone-méthanol (1 :1, -20°C, 5min) juste avant chaque expérience d'immunomarquage (Daoud et al., 2008 ; Vaillend et al., 2010).

### ***Purification de vaisseaux sanguins cérébraux***

La méthode mécanique d'isolation des vaisseaux cérébraux (Boulay et al., 2015 *journal of visual experiments jove*) a été réalisé sur des souris sauvages et Dp71-null âgées de 4 à 7 mois. Après dislocation cervicale, le cerveau disséqué est placé dans 20ml de tampon B1 (1.5 ml HEPES 1M dans 150 ml de HBSS). Les cerveaux sont finement coupés au moyen de scalpels en petits morceaux d'environ 2 mm puis broyés à l'aide d'un homogénéisateur automatique équipé d'un rotor effectuant 400 tours/min. (Dounce homogenizer). L'homogénat est centrifugé à 2000g pendant 10 min à 4°C et le supernageant éliminé. Le culot restant est resuspendu dans 10ml d'un second tampon B2 (3.6 g de Dextran dans 20ml de tampon B1) puis manuellement agité pendant 1 min et centrifugé à 3200g pendant 15 min à 4°C. La myéline forme une couche blanchâtre à la surface du supernageant. Après retrait de la myéline et du surnageant, le culot est resuspendu dans 1ml d'un tampon B3 (1 g de BSA dans 100 ml de B1) en faisant des va-et-vient avec une pipette équipée d'un cône « low binding » (Corning® DeckWorks™ low binding tips, Sigma). L'homogénat de vaisseaux est ensuite filtré à travers un filtre de 100µm afin de retenir les vaisseaux de gros calibre alors que l'homogénat de microvaisseaux passant à travers le filtre est quant à lui filtré à travers un filtre de 20µm. Au final, les filtres sont immergés dans un bécher contenant du tampon B3. Les vaisseaux sont ensuite détachés en remuant le filtre à l'aide d'une pince dans la solution contenant le tampon B3. Ce dernier contenant les vaisseaux est versé dans un falcon et centrifugé à 2000 g à 4°C pendant 5 min. Les vaisseaux isolés sont ensuite immobilisés sur des lames SuperFrost Plus puis recouverts de Cell Tak (Corning) et fixés avec 4% de paraformaldéhyde pendant 15 m avant immunohistochimie.

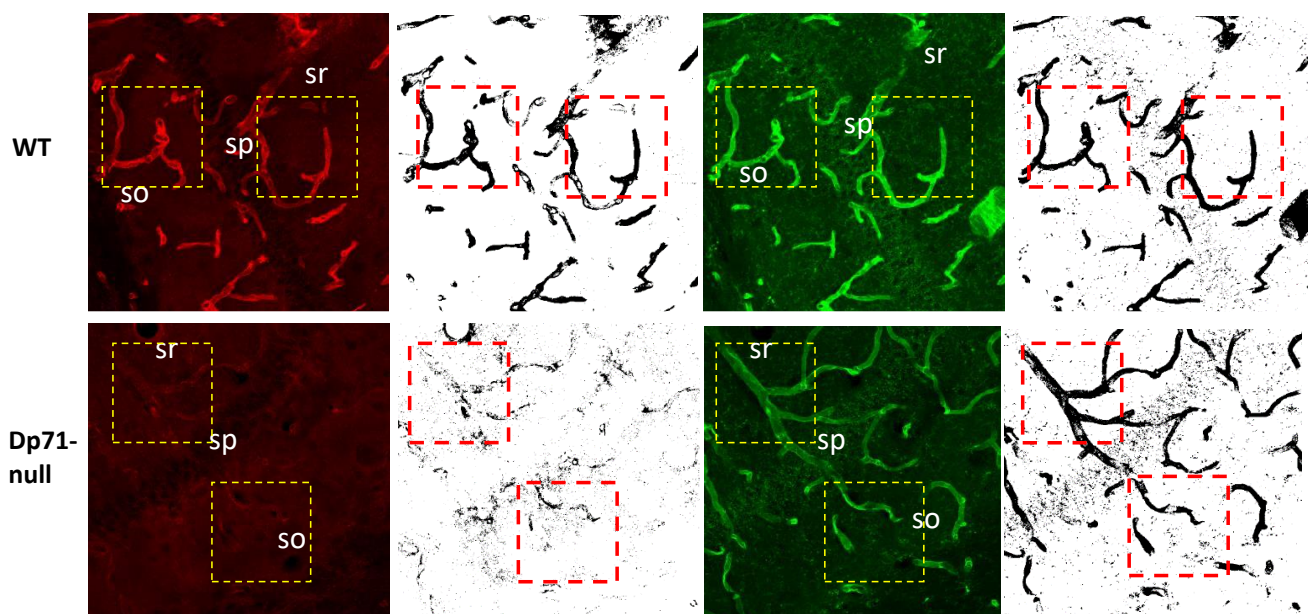
### ***Protocole d'immunofluorescence***

Les lames sont décongelées pendant 1-2 min à température ambiante, immergées dans une solution fixatrice d'acétone/méthanol (1:1) à -20°C pendant 10 minutes, puis dans une solution de blocage composée de 10% de sérum de chèvre (NGS : normal goat serum), 1% d'albumine de sérum bovin (BSA), 0.3% de Triton 100X dans un tampon phosphate salin (PBS) à 0.1M. Les tranches de tissu et les vaisseaux isolés sont lavés trois fois dans du PBS à 0,1M puis incubés pendant 60min dans une solution de blocage contenant 10% de sérum de chèvre (NGS : normal goat serum), 0.3% de Triton 100X et 1% d'albumine de sérum bovin (BSA). L'incubation dans cette solution de blocage pendant 1 h à température ambiante permet de saturer les sites antigéniques non spécifiques. On applique à la fois les anticorps primaires et la lectine fluorescente Dy-Light 488 (Vector laboratories) pendant une nuit à 4°C (dilué dans du PBS 0.1M, 5%NGS et 0.1% BSA). On réalise le lendemain 4 lavages de 15 min dans du PBS 0.1M puis on incube pendant 1 h à température ambiante avec les anticorps secondaires (1:500) conjugués à l'Alexa fluor (Invitrogen, France) ou la Cyanine 3 (Jackson ImmunoResearch, USA). Après 4 derniers lavages de 10 min dans du PBS 0.1M, les lames sont montées sous lamelle avec un milieu contenant un marqueur nucléaire fluorescent bleu (405nm) (DAPI-fluoromount-G®, Clinisciences, France). Les contrôles sont réalisés en omettant l'anticorps primaire, aucun marquage non spécifique résultant éventuellement de l'anticorps secondaire n'est observé.

### ***Analyses des images prises au microscope confocal***

L'acquisition des photos est réalisée avec un microscope confocal Zeiss LSM 700 pour visualiser la fluorescence à 555 nm, 488 nm, 647nm (ou 694nm pour anticorps secondaire anti-rat) et 405nm pour le DAPI. L'enregistrement séquentiel avec les deux tubes photomultiplicateurs (PMT) des images des tranches immunomarquées est pris aux mêmes endroits et durant une même période d'exposition pour les deux génotypes.

L'intensité du laser pour le signal d'excitation des anticorps secondaires et du DAPI est ajusté afin d'éviter une superposition des signaux des fluorochromes. Des empilements de 7 à 15 images espacés de 300nm à 500nm sont importées utilisant les objectifs EC Plan-Neofluar. Toutes les images avec les mêmes paramètres d'acquisition entre souris WT et Dp71-null sont analysées avec ImageJ en utilisant la projection *maximum intensity* et quantifié par le logiciel ImageJ (Figure 22 ci-dessous).



**Figure 22 – Méthode de quantification de l’immunofluorescence.** Exemples d’images de souris WT et Dp71-null montrant en rouge l’immunofluorescence de la cible protéique, en noir et blanc la projection correspondante analysée par le logiciel ImageJ et en vert l’immunofluorescence de la lectine servant de normalisation pour la quantification. Les fenêtres rectangulaires (en jaune et rouge pointillé) de  $13\ 125\ \mu\text{m}^2$  représentent l’aire de fluorescence quantifiée. Un nombre de 3 fenêtres par sous-couches sur deux tranches par souris et 4 à 5 souris par génotype (4 WT, 5 Dp71-null) ont été moyenné et normalisé à la quantité de lectine (vert) ainsi qu’à la valeur moyenne des WT. So : stratum oriens ; sr : stratum radiatum, sp : stratum pyramidale

### Microscopie électronique dans le cervelet

Les souris sont anesthésiées par injection intrapéritonéale d’un mélange de kétamine (60mg/kg) et de domitor (1mg/kg) et 0,1ml d’héparine est injecté en intracardiaque avant perfusion (500 UI). Les souris sont ensuite perfusées en intracardiaque (7.5ml/min) avec 0,1M de tampon phosphate (PB) contenant de l’héparine (10 UI) pendant 30s et ensuite avec 60ml de solution fixatrice contenant 4% de PFA et 1,2% d’acide picrique dans 0,1M de PB (pH 7,3-7,4). Les cerveaux sont extraits et postfixés dans 4% de PFA. Le cervelet est ensuite coupé en tranche sagittales de  $300\ \mu\text{m}$  d’épaisseur au vibratome (VT 1000 S, Leica, Vienne, Autriche). Les morceaux de lobules de cervelet sont disséqués sous stéréo-microscope (1-2mm, 5<sup>e</sup> et 6<sup>e</sup> lobule autour de la fissure primaire, latéral 1,68-0,84) (Paxinos and Franklin, 2001) et cryoprotégés par immersion dans des concentrations croissantes de glycérol (10, 20, 30%). Des sections rondes de 1mm de diamètre incluant la glia limitans, la couche moléculaire et celle des

cellules de Purkinje sont cryofixées à haute pression (EMPACT2, Leica). Les échantillons sont ensuite congelés dans du méthanol contenant 1% d'acétate d'uranyle à -90°C pendant 12h (AFS2, Leica) et enrobés dans de la résine (Lowicryl HM20 resin, EMS, #14345) à -45°C pendant 2 jours. Pour l'immunomarquage, des coupes de 70nm sont réalisées sur ultramicrotome à l'aide d'une lame en diamant avec un angle de 35°, et sont successivement mises pendant 5min dans un milieu contenant 0.5% de Tween-PBS pendant 5min, puis 10min dans 50mM de Glycine-PBS, 30 min dans une solutions de blocage (Aurion, #905.002), 10min dans 0,1% PBS-BSAc (Aurion, #900.099) et enfin à 4°C la nuit avec l'anticorps primaire polyclonal anti-AQP4 (ou Kir4.1) fabriqué chez le lapin (1:40 ; Alomone, Israel). Les sections sont ensuite lavées plusieurs fois dans du PBS-BSA-c et incubées 30 min à température ambiante avec l'anticorps secondaire F(ab')<sub>2</sub> anti-lapin fabriqué chez la chèvre et conjugué aux particules d'or de 10nm (Aurion). Les tranches sont ensuite rincées plusieurs fois dans du PBS et de l'eau ultrapure et contrastées avec de l'actétate d'uranyle (10min) et du citrate (5min). Les tranches contrôles sont obtenues en retirant l'anticorps secondaire. Les photographies obtenues par microscopie électronique à transmission sont réalisées en utilisant un objectif JEOL1400 à x7000, le microscope fonctionnant à 80kV et étant équipé d'une caméra digitale (Gatan Orius). Les expériences sont réalisées sur 2 souris de chaque génotype (3 fenêtres et au final 25 images par souris). Les quantifications sont faites manuellement par comptage des particules dorées localisés aux pieds des cellules de Bergmann le long des capillaires (n>10, et > 180 µm de longueur de membrane par génotype) et le long de la glia limitans externe (>140 µm de longueur de membrane par génotype). Les longueurs de membrane sont mesurées en utilisant le logiciel Fiji (<https://fiji.sc/>) afin d'exprimer le nombre de particules dorées par µm.

## Statistiques

Les données individuelles sont représentées sur les graphes et exprimées en moyenne d'écart-type ± SEM. Les comparaisons statistiques entre génotypes ont été effectuées à l'aide du test non paramétrique du Mann-Whitney. Une différence ou une corrélation est considérée significative si  $p < 0.05$ .

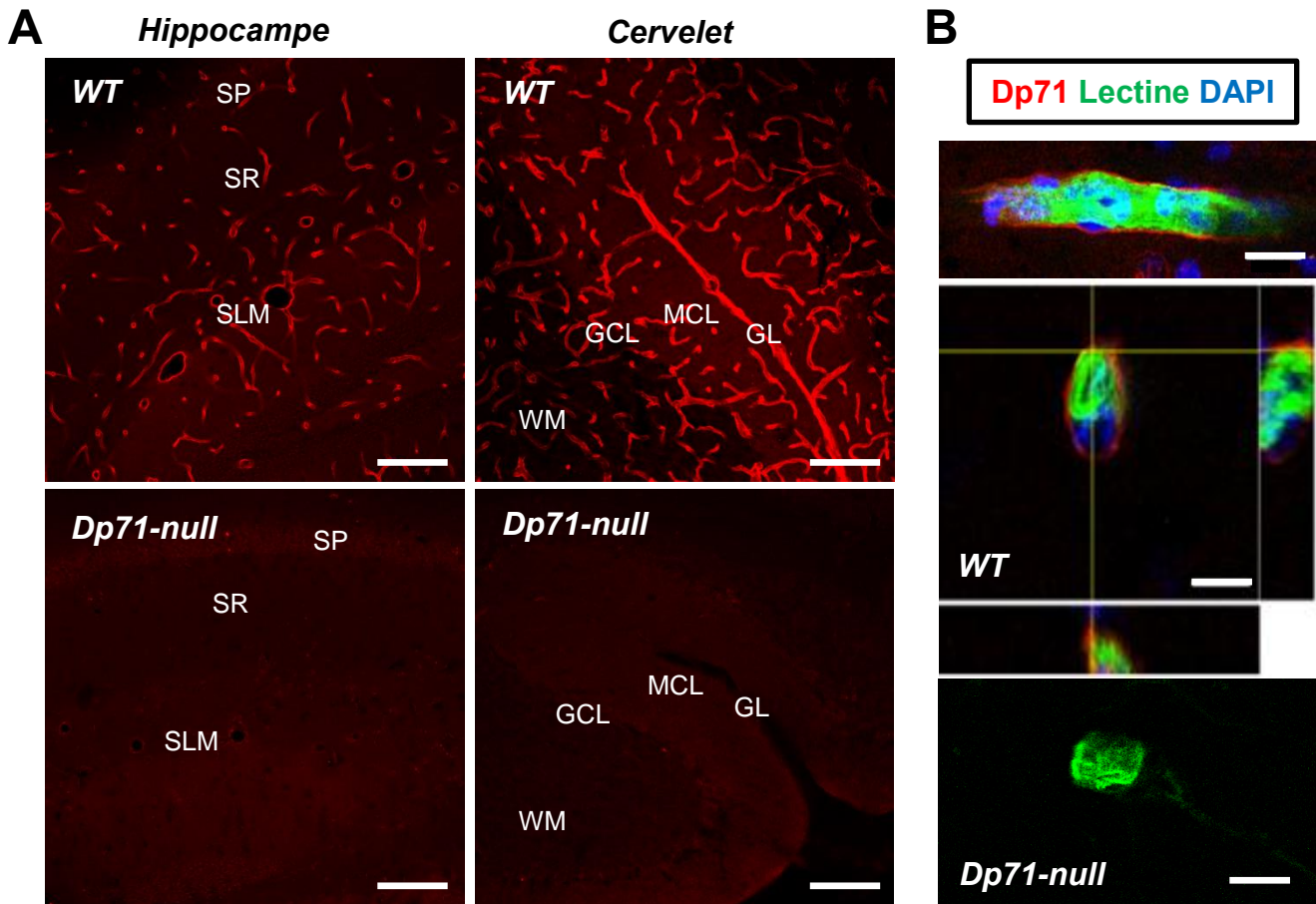
## RÉSULTATS

### **Perte partielle d'AQP4 et de $\beta$ -dystroglycane et perte totale d' $\alpha$ -syntrophine dans le cervelet**

Les premières expériences ont consisté à évaluer la localisation de la dystrophine Dp71 dans l'hippocampe et le cervelet. L'anticorps polyclonal H4 dirigé contre la partie C-terminale de la dystrophine révèle un fort marquage de la Dp71 le long des vaisseaux sanguins dans toutes les couches de l'hippocampe et des lobules du cervelet (Figure 23A). Cet immunomarquage est complètement absent chez les souris Dp71-null ce qui nous indique que ce marquage correspond spécifiquement à celui de la Dp71. Des images à haute résolution obtenues par microscopie confocale sur des sections de tissu marqué par H4, et par la lectine *Lycopersicon esculentum* couplée au FITC qui permet de visualiser les cellules endothéliales, confirment la localisation du côté abluminal des capillaires. En effet, sur des coupes longitudinales et transversales de vaisseaux, le marquage de la Dp71 (rouge) ne colocalise pas avec celui des glycans des cellules endothéliales marqués par la lectine (Figure 23B). Ce qui confirme que l'expression de la Dp71 est distribuée le long de la membrane des pieds des cellules macrogliales (Haenggi et al., 2004 ; Enger et al., 2012).

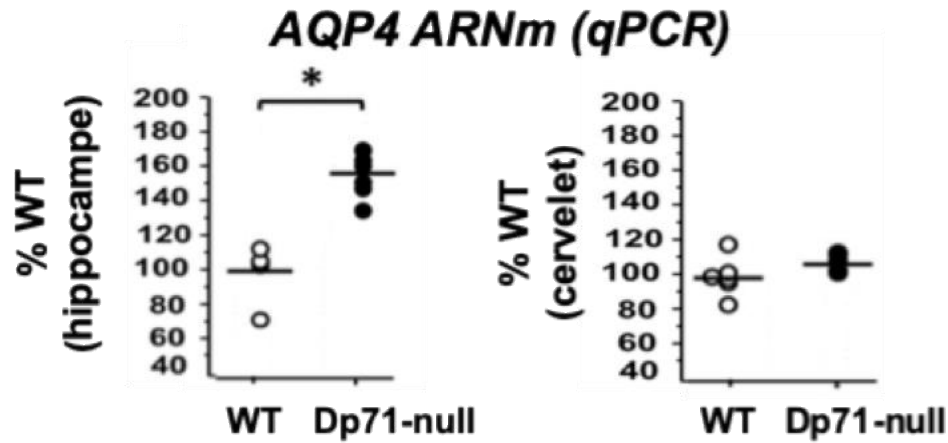
Il y a des évidences que la Dp71 joue un rôle clé dans l'ancrage et la stabilisation des canaux AQP4 à la membrane des pieds des cellules gliales du système nerveux central (Daloz et al., 2003 ; Haenggi et al., 2004 ; Nicchia et al., 2004 ; Enger et al., 2012). Dans une première expérience, nous avons analysé les niveaux d'expression d'ARNm d'AQP4 dans l'hippocampe et le cervelet. De manière intéressante, l'hippocampe présente une surexpression significative des ARNm codant pour AQP4 alors que le cervelet ne présente aucune différence significative (Figure 24). Bien que cette surexpression en ARNm ait déjà été observée dans la rétine des souris déficientes en Dp71 (El Mathari et al., 2015 ; Vacca et al., 2016), nos résultats suggèrent une transcription en ARNm d'AQP4 différenciellement régulée dans l'hippocampe par rapport au cervelet, ce qui nous a amené à évaluer dans ces deux structures l'expression d'AQP4 et des protéines associées au complexe de la Dp71.





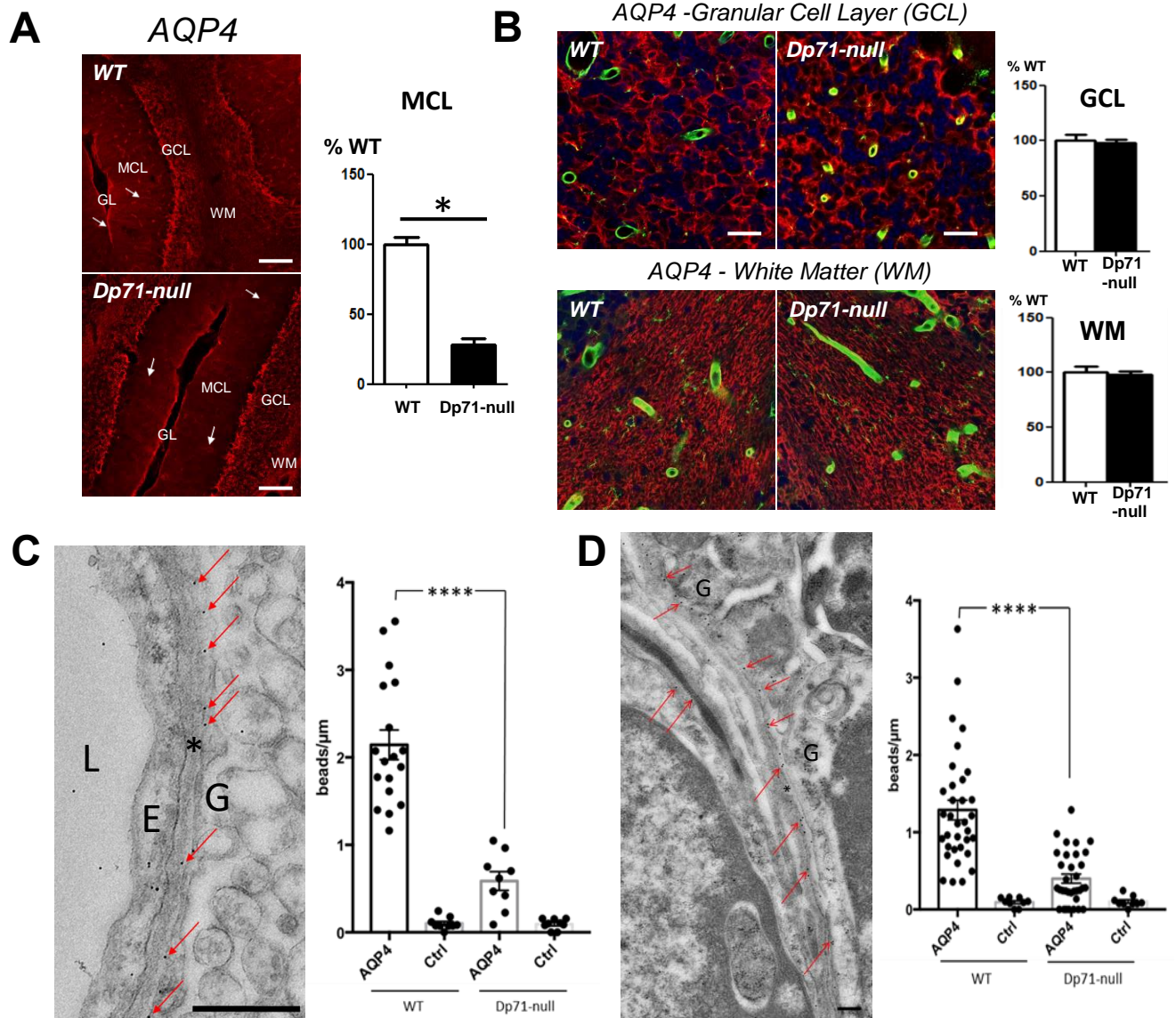
**Figure 23. Localisation de la protéine Dp71.** (A) Projection d'une superposition d'images (stack) obtenue par microscopie confocale montrant le marquage de la dystrophine Dp71 (rouge) par l'anticorps H4 dans l'hippocampe et le cervelet des souris WT et Dp71-null. Ce marquage est distribué le long des vaisseaux sanguins dans toutes les couches de l'hippocampe et du cervelet ainsi que de la glia limitans des souris WT mais pas des souris Dp71-null. SP : stratum pyramidale, SR : stratum radiatum, SLM : stratum lacunosum moleculare, MCL : couche moléculaire, GL : Glia limitans, GCL : couche granulaire, WM : matière blanche. Barre d'échelle : 100  $\mu$ m. (B) Superposition à fort grossissement (x63) du marquage de la Dp71 (rouge), de la lectine (vert) et du DAPI (bleu). Vue longitudinale (panel du haut, barre d'échelle : 20 $\mu$ m) et transversale avec projections orthogonales en x/y (barre d'échelle : 10 $\mu$ m) ne montrant pas de colocalisation du marquage de la Dp1 et de la lectine, confirmant l'expression périvasculaire de la Dp71 et son absence chez la souris Dp71-null.





**Figure 24 - Niveau d'expression de l'ARNm d'AQP4 dans l'hippocampe et le cervelet.** Quantifications réalisées par qPCR et exprimé en pourcentage normalisé à la valeur moyenne des WT (n=5 souris par génotype, 3 réplicats par souris). La moyenne des groupes est représentée par une ligne horizontale alors que les valeurs individuelles sont représentées par des cercles. Nous pouvons remarquer la régulation différentielle entre l'hippocampe (surexpression) et le cervelet (inchangé) chez les souris Dp71-null comparé aux souris WT. L'astérisque (\*) indique une différence significative  $p < 0,05$ .

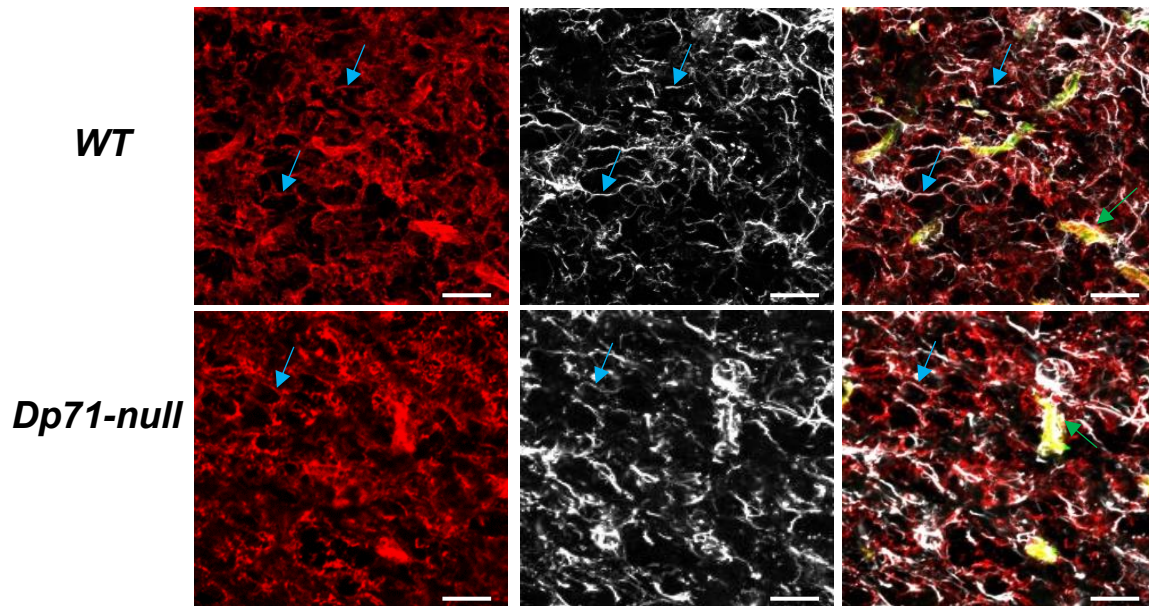
L'expression d'AQP4 n'est pas détecté uniquement le long des capillaires et au niveau de la glia limitans du cervelet de souris WT mais également dans les astrocytes et ses prolongements de la couche granulaire (GCL) et de la matière blanche (WM). La perte de Dp71 est associée à une forte diminution d'expression d'AQP4 le long des vaisseaux de la couche moléculaire (MCL). Cependant, au contraire des études qui ont mis en évidence une perte complète d'AQP4 dans la couche moléculaire (Nicchia et al., 2008 ; Enger et al., 2012), nos analyses d'images au confocal révèlent un marquage résiduel d'AQP4, qui a été estimé à 30% de celui du WT, ainsi qu'une expression résiduelle le long de la glia limitans alors que l'expression d'AQP4 dans la couche granulaire et la matière blanche est largement préservée. (Figure 25A ; Figure 25B ; Figure 26). Ces résultats suggèrent que la Dp71 est impliquée uniquement dans la distribution polarisée des canaux AQP4 à la membrane des pieds des cellules gliales alors que l'expression résiduelle dans les autres couches du cervelet semblent correspondre à une expression distincte d'un pool d'AQP4 indépendant de la Dp71 (Nicchia et al., 2008).



**Figure 25 - Localisation des canaux AQP4 dans le cervelet.** Projection d'une superposition d'images (stack) obtenue par microscopie confocale. En haut à gauche (A) AQP4 est détecté (rouge, barre d'échelle : 100  $\mu$ m) dans toutes les couches du cervelet des souris WT avec un fort marquage périvasculaire dans la couche moléculaire et le long de la glia limitans (flèches). Chez la souris Dp71-null (en dessous), le marquage le long des capillaires de la couche moléculaire est drastiquement réduit même si un signal de plus faible intensité est toujours détecté dans certains capillaires (flèches) ; le marquage d'AQP4 est préservé dans la matière blanche et la GCL. Le marquage résiduel d'AQP4 au niveau périvasculaire est estimé par des analyses semi-quantitatives à 30% des niveaux du WT (histogramme, MCL). (B) Le marquage d'AQP4 est comparable entre les deux génotypes dans la couche granulaire ainsi que dans la matière blanche (barre d'échelle : 20  $\mu$ m). La plupart de ce marquage ne colocalise pas avec la lectine (vert) suggérant une expression principalement dans les prolongements des astrocytes de la couche granulaire et dans les fibres de la matière blanche. MCL : couche moléculaire, GL : glia limitans, GCL : couche granulaire, WM : matière blanche. L'astérisque (\*) indique une différence significative  $p < 0,05$ . (n=4 WT et 5 Dp71-null) (C-D) Quantification des canaux AQP4 dans la couche moléculaire MCL du cervelet par microscopie électronique. Micrographes montrant le marquage immunogold d'AQP4 (flèches rouge) au niveau des

domaines membranaires des pieds des cellules de Bergmann entourant l'endothélium vasculaire de la couche moléculaire (C) et le long de la glia limitans externe (D). La densité des canaux AQP4 est exprimée en nombre de particules d'or par  $\mu\text{m}$  de membrane gliale périvasculaire (A : WT : 18 capillaires, 292  $\mu\text{m}$  ; Dp71-null : 9 capillaires, 187  $\mu\text{m}$ ) et formant la glia limitans externe (B : WT : 213  $\mu\text{m}$  ; Dp71-null : 149  $\mu\text{m}$ ) sur deux souris par génotype. Les tranches contrôles sans anticorps primaire sont utilisées afin d'évaluer le marquage non spécifique (Ctrl). Barre d'échelle : 500 nm. E : endothélium, L : lumière du capillaire, G : pied d'une cellule de Bergmann ; astérisque : lame basale. Données représentées en moyenne d'écart-type  $\pm$  SEM ; les points représentent des données individuelles. Les astérisques (\*\*\*\*) indiquent une différence significative  $p < 0.001$ .

Afin de caractériser plus précisément l'expression d'AQP4 et sa distribution dans les pieds des cellules de Bergmann, nous avons quantifié le marquage immunogold d'AQP4 par microscopie électronique (Figure 25C-D). Ce travail a été réalisé par Charlotte Isabelle (IE en CDD sur ce projet) avec la participation de Claire Boulogne à la plateforme de microscopie électronique de l'I2BC à Gif-sur-Yvette. La densité des particules d'immunogold a été normalisée par rapport à la longueur des membranes des pieds gliaux et le marquage non spécifique est minimal en absence d'anticorps primaire (histogramme 23C-D). Les canaux AQP4 sont détectés dans les pieds gliaux autour des capillaires (Figure 25C) et ceux formant la glia limitans (Figure 25D). La densité des canaux AQP4 est fortement réduite chez la souris Dp71-null à la fois autour des capillaires sanguins de la couche moléculaire et le long de la glia limitans. (Figure 25C-D). Le niveau d'expression d'AQP4 résiduel est estimé une fois encore à environs 30% de celui du WT ce qui conforte les résultats des analyses semi-quantitative des immunofluorescences réalisées précédemment. De plus, cela confirme l'implication de la Dp71 dans la distribution d'AQP4 dans les pieds des cellules de Bergmann entourant les capillaires et formant la glia limitans.

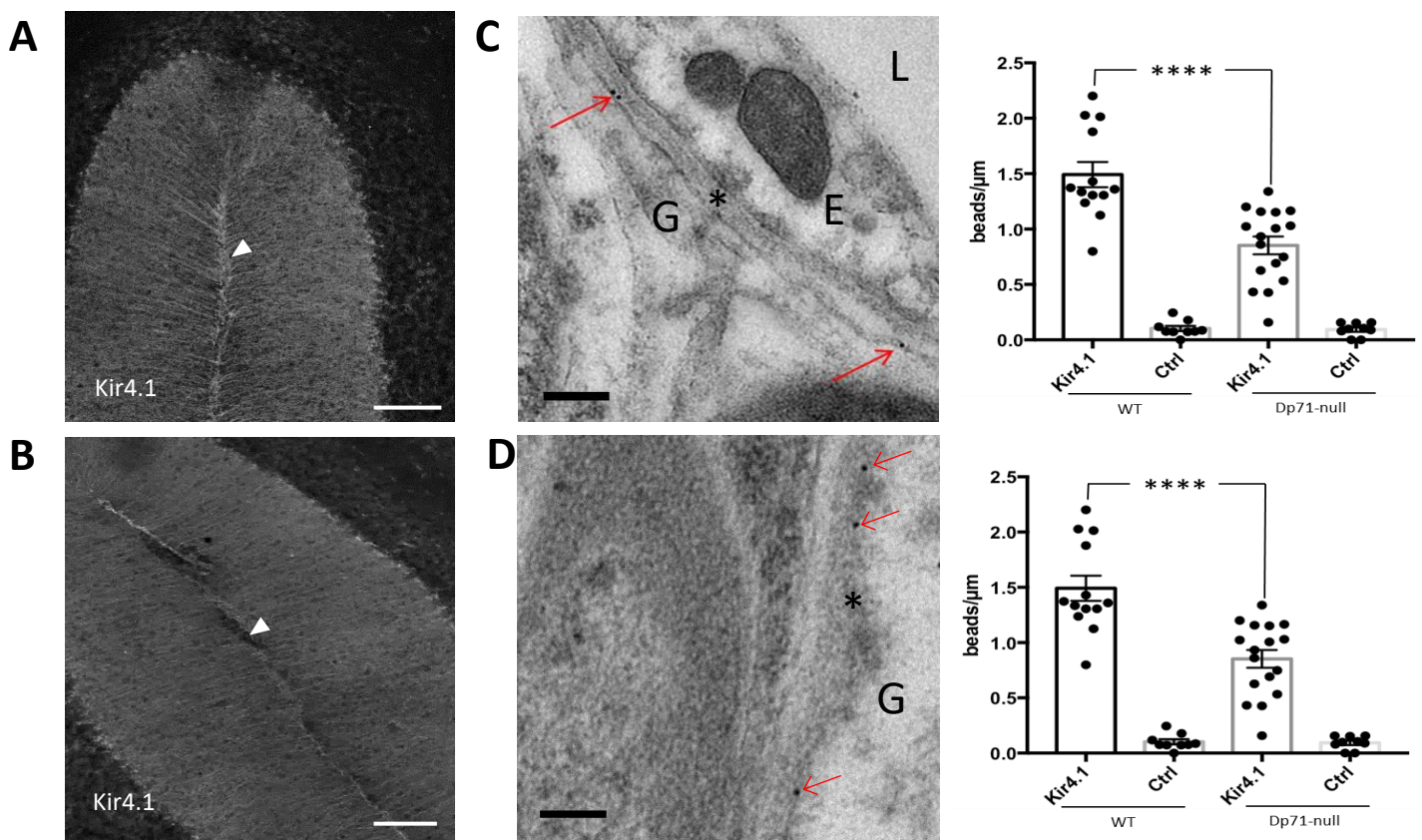


**Figure 26 - Localisation des canaux AQP4 dans la couche granulaire du cervelet.** Projections d'images obtenue par microscopie confocale après un triple marquage d'AQP4 (rouge, à gauche) de la GFAP (blanc, au milieu) et de la lectine (vert, superposition à droite). La superposition de ces trois signaux fluorescents montre un co-marquage d'AQP4, de la GFAP et de la lectine au niveau des régions périvasculaires dans les deux génotypes (flèches vertes) et un co-marquage d'AQP4 avec uniquement la GFAP (flèches bleues). Barre d'échelle : 20  $\mu\text{m}$ .

L'homéostasie hydrique est également liée à l'homéostasie ionique notamment celle du potassium. Nous avons alors étudié l'expression du canal potassique par immunofluorescence (Figure 27A-B) et en microscopie électronique (Figure 27C-D). Nos résultats d'immunofluorescence montrent une expression des canaux Kir4.1 dans les cellules de Bergmann du cervelet dans le corps cellulaire, les prolongements radiaux qui projettent jusqu'au niveau de la glia limitans pour les deux génotypes (Figure 27A-B). Cependant, la quantification à partir des images en microscopie confocale des canaux Kir4.1 (données non montrées) n'est pas assez résolutive en raison de son expression ponctiforme et continue le long de la cellule de Bergmann. Nous avons donc utilisé la microscopie électronique (Travail effectué par Charlotte Isabelle, IE-CDD, à la plateforme de l'I2BC de Gif sur Yvette) qui s'avère être un outil plus fin : en effet, nos résultats montrent une nette diminution du marquage des particules immunogold de Kir4.1 aussi bien au niveau des pieds des cellules gliales entourant les microvaisseaux de la couche moléculaire (Histogramme, figure 27C) que ceux bordent la glia limitans externe du cervelet (Histogramme, figure 27D) chez les souris Dp71-null comparés aux souris WT. Cela suggère que la Dp71 participe aussi bien à l'ancrage des canaux Kir4.1 que des canaux AQP4 à la membrane gliale des cellules de Bergmann. Une de ses fonctions principales étant le tamponnage potassique par la recapture du potassium



extracellulaire, nous avons aussi exploré l'impact fonctionnel de la perte de la Dp71 sur l'homéostasie potassique. Ainsi ces analyses en immunofluorescence et en microscopie électronique ont été complétées par des études électrophysiologiques effectuées en collaboration avec Micaela Galante qui a montré que le tamponnage du  $K^+$  extracellulaire est ralenti chez la souris Dp71-null suite à une activation neuronale, Et que ceci affecte les propriétés d'activation des neurones de Purkinje. Mes images d'immunofluorescence et la microscopie électronique compléteront l'étude électrophysiologique dans un manuscrit en cours de préparation (Helleringer et al.).



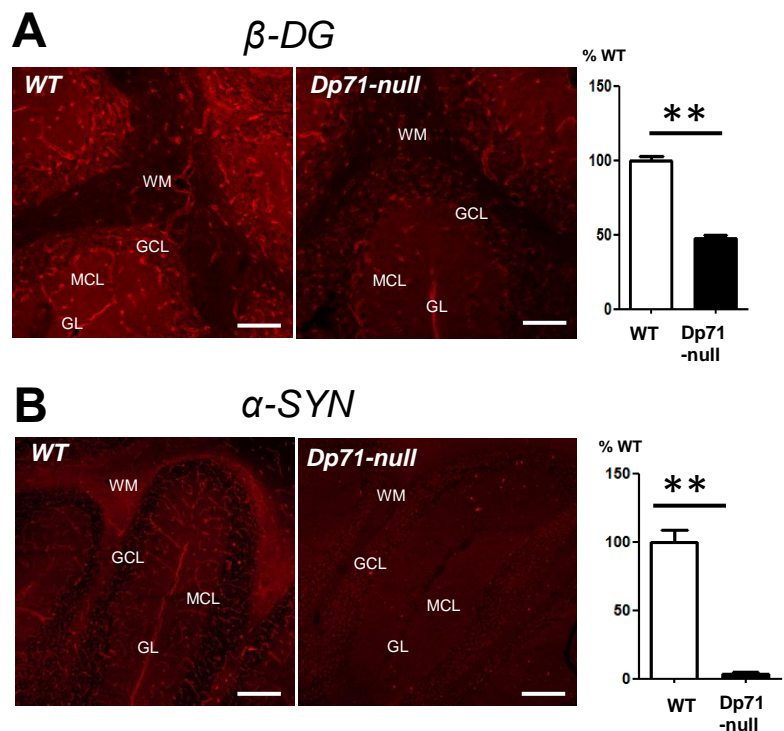
**Figure 27 - Quantification de l'expression des canaux Kir4.1 par immunofluorescence et microscopie électronique.** (A-B) Immunofluorescence des canaux Kir4.1 dans les cellules de Bergmann est détecté dans le soma, les prolongements radiaux et le long de la glia limitans dans les deux génotypes, notons que l'expression de Kir4.1 est moins intense le long de la glia limitans chez les souris Dp71-null comparé aux WT (flèches). Barré d'échelle : 100 μm. Marquage immunogold des canaux Kir4.1 (flèches rouges) au niveau des domaines gliaux entourant l'endothélium vasculaire (C) et le long de la glia limitans (D). La densité des canaux Kir4.1 est exprimée par le nombre de points noirs (flèches rouges) par μm de membrane gliale (C; WT: 13 capillaires, 191 μm; Dp71-null: 17 capillaires, 277 μm) and glia limitans (D; WT: 112 μm; Dp71-null: 140 μm) dans deux souris par génotype. Tranches contrôle sans anticorps primaire ont été utilisé pour évaluer le marquage non spécifique. Barre d'échelle, 200 nm. E:

endothélium; L: lumière du capillaire; G: pied d'une cellule gliale de Bergmann; astérisque: lame basale. Données représenté en moyenne d'écart-type  $\pm$  SEM; les points sont des données individuelles. Les astérisques (\*\*\*) indiquent une statistique significative lorsque  $P < 0.0001$  avec le test Mann-Whitney.

Parce que la distribution correcte d'AQP4 et Kir4.1 dans les pieds gliaux dépend aussi de l'expression d'autres protéines associées à la dystrophine, nous avons quantifié l'expression du  $\beta$ -dystroglycane (Figure 28A) et de l' $\alpha$ -syntrophine (Figure 28B) dans la couche moléculaire de souris WT. Ces deux protéines montrent un pattern d'expression similaire à la Dp71 à la fois dans les régions périvasculaires et le long de la glia limitans. En revanche, chez la souris Dp71-null, l'expression du  $\beta$ -dystroglycane est réduit de 50% alors que l' $\alpha$ -syntrophine est quasiment absent. Ceci confirme que la perte de la Dp71 altère différemment l'expression des protéines associés à la Dp71 (Nicchia et al., 2008) ce qui pourrait participer en partie au maintien de l'expression d'AQP4 résiduelle dans les domaines périvasculaire.

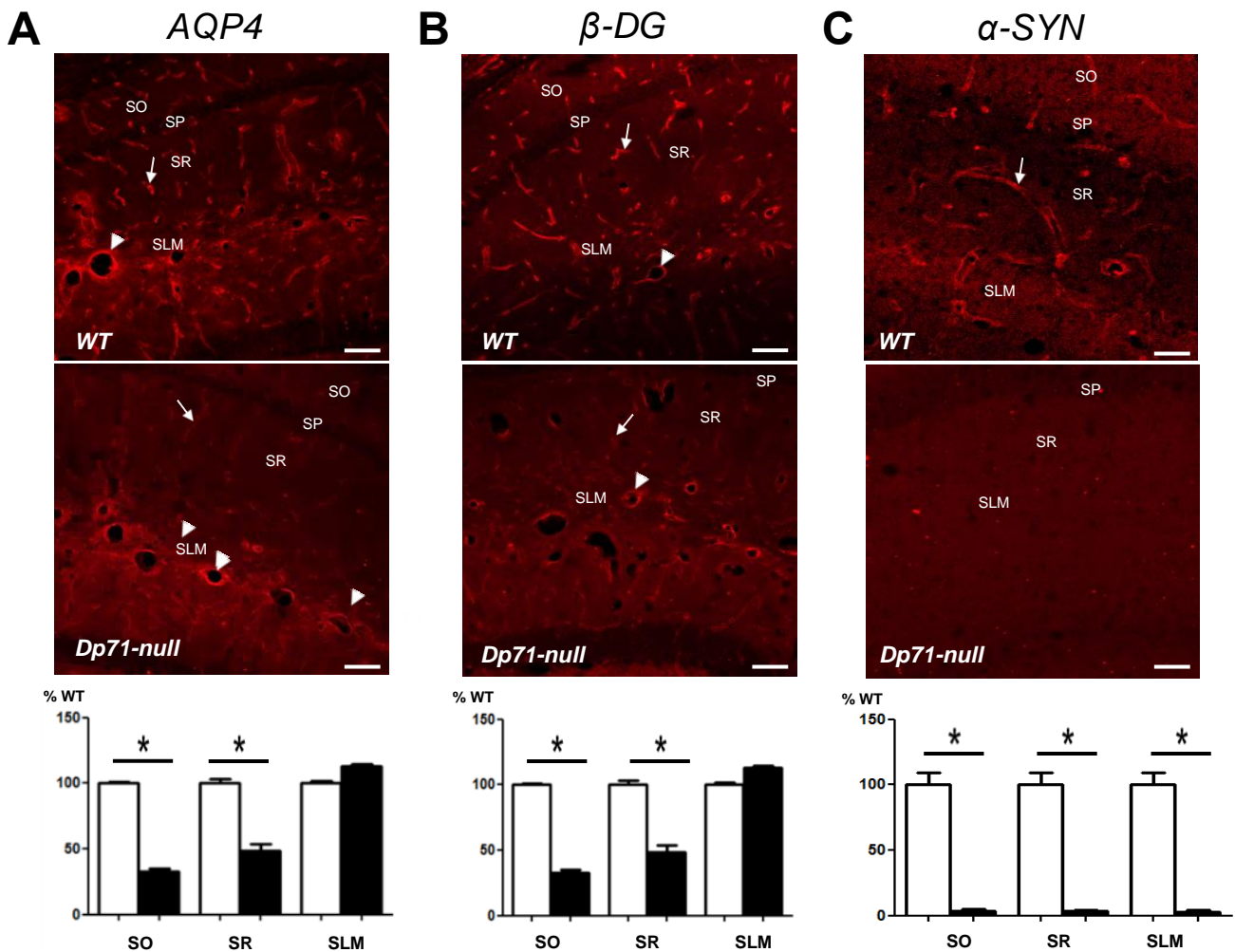
### Figure 28 - Localisation de protéines associées à la Dp71 dans le cervelet.

(A) L'immunomarquage du  $\beta$ -dystroglycane ( $\beta$ -DG), distribué autour des capillaires et le long de la glia limitans est diminué de 50% chez les souris Dp71-null. Barre d'échelle : 80  $\mu$ m. (B) L'immunomarquage de l' $\alpha$ -syntrophine ( $\alpha$ -SYN), distribué autour des capillaires et le long de la glia limitans chez les souris WT est totalement absent des souris Dp71-null. Barre d'échelle : 100  $\mu$ m. MCL : couche moléculaire, GL : glia limitans, GCL : couche granulaire, WM : matière blanche. Les astérisques (\*\*) indiquent une différence significative  $p < 0.01$ ,  $n = 4$  WT et 5 Dp71-null).



## Perte partielle d'AQP4 et de $\beta$ -dystroglycane et perte totale d' $\alpha$ -syntrophine dans l'hippocampe

Nous avons ensuite analysé l'expression des protéines associées à la Dp71 dans l'hippocampe (Figure 29), une autre structure cérébrale dans laquelle les altérations liées à la Dp71 contribueraient à la genèse des déficits cognitifs observés chez la souris Dp71-null (Daoud et al., 2008 ; Chaussonnet et al., 2019). Nous avons trouvé que l'expression résiduelle d'AQP4 et des DAPS est également un trait caractéristique de l'hippocampe. Une expression résiduelle d'AQP4 (Figure 29A) et de  $\beta$ -dystroglycane (Figure 29B) a été mise en évidence autour des capillaires alors que l' $\alpha$ -syntrophine est pratiquement indétectable dans toutes les couches de l'hippocampe (Figure 29C). De manière intéressante, alors que l'expression résiduelle d'AQP4 et du  $\beta$ -dystroglycane est estimée à moins de 50% dans les couches dendritiques de la *stratum oriens* (SO) et de la *stratum radiatum* (SR) des souris Dp71-null, les niveaux d'expression sont comparables à ceux des WT dans la *stratum lacunosum moleculare* (SLM). Une forte expression d'AQP4 dans la SLM, non restreinte aux régions périvasculaires, a déjà été rapportée par d'autres auteurs (Hubbard et al., 2015). Cependant, une des particularités de la SLM comparé aux autres couches de l'hippocampe est la présence d'artérioles de large diamètre et d'artérioles précapillaires. Nos résultats montrent ici une claire diminution de l'expression d'AQP4 et de  $\beta$ -dystroglycane autour des capillaires de l'ensemble des couches de l'hippocampe. Cependant, nous observons un intense marquage d'AQP4 et de  $\beta$ -dystroglycane autour des artérioles et des artérioles précapillaires dispersées le long de la fissure hippocampique entre la SLM et le gyrus denté, suggérant que la perte de Dp71 n'affecte pas la polarisation d'AQP4 à ce niveau spécifique.

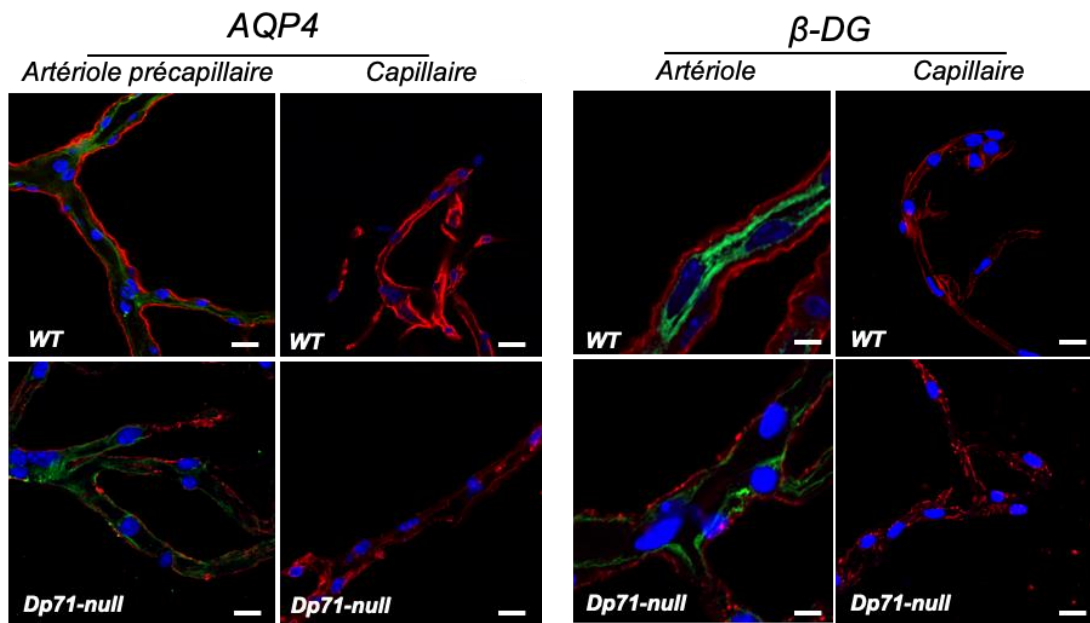


**Figure 29 - Localisation des protéines associées à la Dp71 dans l'hippocampe.** (A-C) L'immunomarquage d'AQP4 (A), du  $\beta$ -dystroglycane (B) et de l' $\alpha$ -syntrophine (C) est distribué autour des capillaires (flèches) et des artérioles (têtes de flèche). Les histogrammes montrent que l'expression d'AQP4 et de  $\beta$ -dystroglycane sont significativement réduits chez les souris *Dp71-null* (barre noire) comparé aux WT (barre blanche) dans les couches SO et SR alors qu'aucune différence n'est observée dans les couches SLM, où une expression résiduelle d'AQP4 et de  $\beta$ -dystroglycane est mise en évidence autour des artérioles présentes le long de la fissure hippocampique (têtes de flèche). L'expression d' $\alpha$ -syntrophine est totalement absente des souris *Dp71-null* dans toutes les couches de l'hippocampe (C). SO : *stratum oriens*, SP : *stratum pyramidale*, SR : *stratum radiatum*, SLM : *stratum lacunosum moleculare*. L'astérisque (\*) indique une différence significative  $p < 0,05$ ,  $n = 4$  WT et 5 *Dp71-null*. Barre d'échelle : 50  $\mu$ m.



## Vaisseaux du cerveau antérieur : artérioles *versus* capillaires

L'analyse de l'expression d'AQP4 et de  $\beta$ -dystroglycane sur vaisseaux isolés extrait du cerveau antérieur confirment leur expression au niveau périvasculaire de l'ensemble des artérioles des souris WT (Figure 30). J'ai réalisé ce travail grâce à une collaboration qui s'est développé au cours de ma thèse avec l'équipe de Martine Cohen-Salmon au collège de France à Paris, ce qui m'a permis d'être formé à cette technique. Chez les souris Dp71-null, à la fois les artérioles (diamètre  $\geq 30 \mu\text{m}$ ) et les artérioles précapillaires (10-30  $\mu\text{m}$ ) possèdent une expression résiduelle d'AQP4 et de  $\beta$ -dystroglycane caractérisée par un marquage ponctiforme autour des vaisseaux, comparé au marquage continu que l'on observe chez la souris WT. Ainsi, une altération de la distribution spatiale d'AQP4 et de  $\beta$ -dystroglycane est associée à la réduction de leur expression, même dans les artérioles. Ces résultats soulignent l'importance du rôle de la Dp71 dans l'adressage, le clustering et la polarisation de ces protéines à la membrane des pieds astrocytaires.



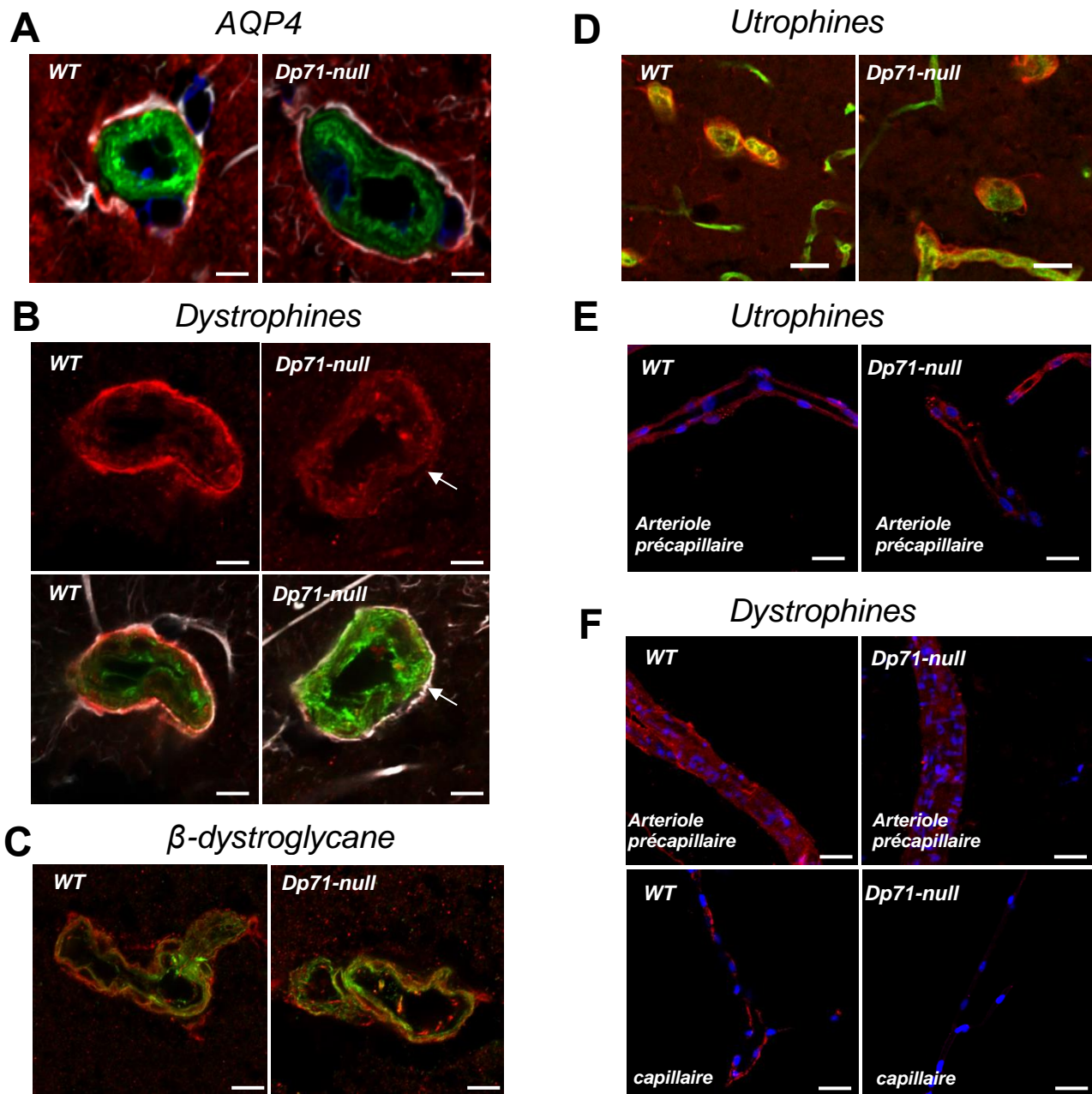
**Figure 30 – Localisation des protéines associées à la Dp71 sur vaisseaux isolés du cerveau antérieur.** L'immunomarquage pour AQP4 (gauche, rouge) ou le  $\beta$ -dystroglycane (droite, rouge) a été analysé sur artérioles précapillaires isolés (10-30  $\mu\text{m}$  de diamètre) et/ou artérioles ( $\geq 30 \mu\text{m}$  de diamètre) et sur capillaires (5-10  $\mu\text{m}$  de diamètre). Un marquage endothélial par la lectine (vert) et nucléaire par le DAPI (bleu) ont aussi été réalisés. L'immunomarquage d'AQP4 et du  $\beta$ -DG ne se superpose pas à celui de la lectine sur les artérioles capillaires et précapillaires, ce qui confirme leur expression au niveau des domaines périvasculaires. L'analyse sur vaisseaux isolés de souris Dp71-null confirment l'expression résiduelle caractérisée par l'immunomarquage ponctiforme suggérant une altération de la distribution

polarisée le long de la membrane périvasculaire des pieds astrocytaires. Barre d'échelle : 15  $\mu\text{m}$  (grossissement x40).

Afin de déterminer la localisation subcellulaire de l'expression résiduelle d'AQP4 dans les artérioles précapillaires de la région SLM de l'hippocampe, un triple marquage a été réalisé sur des tranches d'hippocampe utilisant les anticorps anti-AQP4, le marqueur glial GFAP et la lectine endothéliale (Figure 31A). Chez les souris WT et Dp71-null, le marquage d'AQP4 se superpose à celui de la GFAP, ce qui montre que l'expression normale de même que résiduelle d'AQP4 est localisée dans les pieds astrocytaires faisant contact et entourant les artérioles précapillaires.

Nous avons ensuite utilisé l'anticorps H4 dirigé contre la partie C-terminale des dystrophines mettant en évidence une expression des dystrophines à la fois dans les domaines GFAP-positifs et lectine-positifs (Figure 31B). Chez la souris WT, la plupart du marquage était GFAP-positif alors que chez la souris Dp71-null un marquage lectine-positif est clairement détecté suggérant la présence à cet endroit d'autres dystrophines cérébrales, telles que la Dp427 ou la Dp140. De plus, le marquage de la dystrophine au niveau des domaines GFAP-positifs se révèle être de type ponctiforme chez la souris Dp71-null. Ceci suggère que l'une des dystrophines contribuerait aussi l'adressage au niveau des pieds astrocytaires faisant face aux artérioles précapillaires (Barnea et al., 1990 ; Chelly et al., 1990 ; Lidov et al., 1995), même en l'absence de la Dp71. L'expression de  $\beta$ -dystroglycane (Figure 31C) et d'utrophines (31D) est également détectée au niveau glial autour des artérioles précapillaires des souris WT et Dp71-null). Seule une partie du marquage reconnu par l'anticorps anti-utrophine pan-spécifique se superpose à celui de la lectine suggérant que certaines utrophines pourraient être exprimées au niveau endothélial et/ou glial autour des artérioles précapillaires ce qui est en accord avec des études qui montrent la localisation de la forme longue de l'utrophine dans les cellules endothéliales (Knussel et al., 2000). Cependant, au niveau des capillaires sur tranche (Figure 31D, vaisseaux de petits calibre) et sur capillaires isolés (non montré), la superposition du marquage de l'utrophine avec celui de la lectine n'est pas clairement mis en évidence sur les capillaires isolés du fait de leur diamètre de petite taille. De plus, comme notre anticorps anti-utrophine dirigé contre la partie C-terminale (Perronnet et al., 2012) reconnaît plusieurs des différentes formes d'utrophines, ces dernières peuvent être exprimé différemment au niveau glial. Les utrophines sont également détectées au niveau des artérioles précapillaires isolées extrait du cerveau antérieur avec le même anticorps ne montrant pas d'altération d'expression chez la souris Dp71-null (Figure 31E). Sur vaisseaux isolés, la présence de certaines

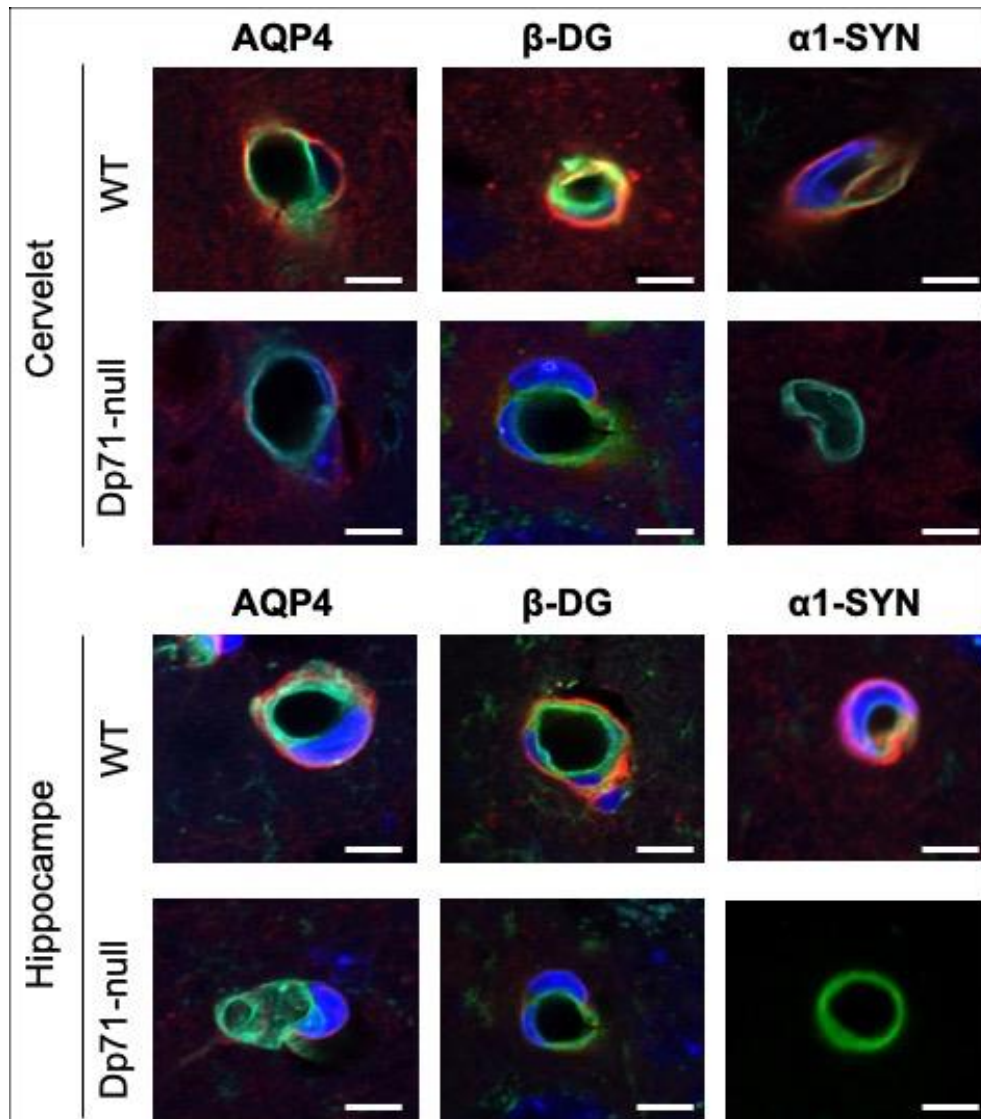
dystrophines a été confirmée dans les artérioles précapillaires des souris Dp71-null mais pas au niveau des capillaires (Figure 31F). Ainsi, si une autre dystrophine participe à l'expression résiduelle d'AQP4 autour des artérioles, cela n'explique pas l'expression résiduelle observée au niveau des capillaires.



**Figure 31 - Localisation des dystrophines et des protéines associées ou liées à la Dp71 sur tranches et vaisseaux isolés du cerveau antérieur.** (A-B-C) Sections transversales d'artérioles (diamètre  $\geq 30\mu\text{m}$ ) sur tranche d'hippocampe (CA1). Immunomarquage d'AQP4 (A), des dystrophines (B), du  $\beta$ -dystroglycane (C) et des utrophines (D) sont en rouge, la lectine en vert (A-D), la GFAP en blanc (A-B). La flèche en B indique le marquage par la GFAP autour des artérioles chez la souris Dp71-null. (E-F) Immunomarquage des utrophines et des

dystrophines sur artérioles précapillaires isolées (10-30  $\mu\text{m}$ ) et capillaires (5-10  $\mu\text{m}$ ) et DAPI en bleu. Barre d'échelle : 10  $\mu\text{m}$  pour A-C (zoom x63) ou 15  $\mu\text{m}$  pour D-E (objectif x40).

Afin de déterminer la localisation subcellulaire de l'expression résiduelle d'AQP4, de  $\beta$ -dystroglycane et l' $\alpha$ 1-syntrophine dans les capillaires de l'hippocampe, un triple marquage a été réalisé sur des tranches d'hippocampe utilisant les anticorps anti-AQP4, anti- $\beta$ -DG, anti- $\alpha$ 1-syntrophine avec le marqueur glial GFAP et la lectine endothéliale (Figure 32). Nos résultats ont montré et confirmé la réduction de l'expression d'AQP4 et de  $\beta$ -dystroglycane et l'absence d'expression de l' $\alpha$ 1-syntrophine chez les souris Dp71-null comparé aux WT.

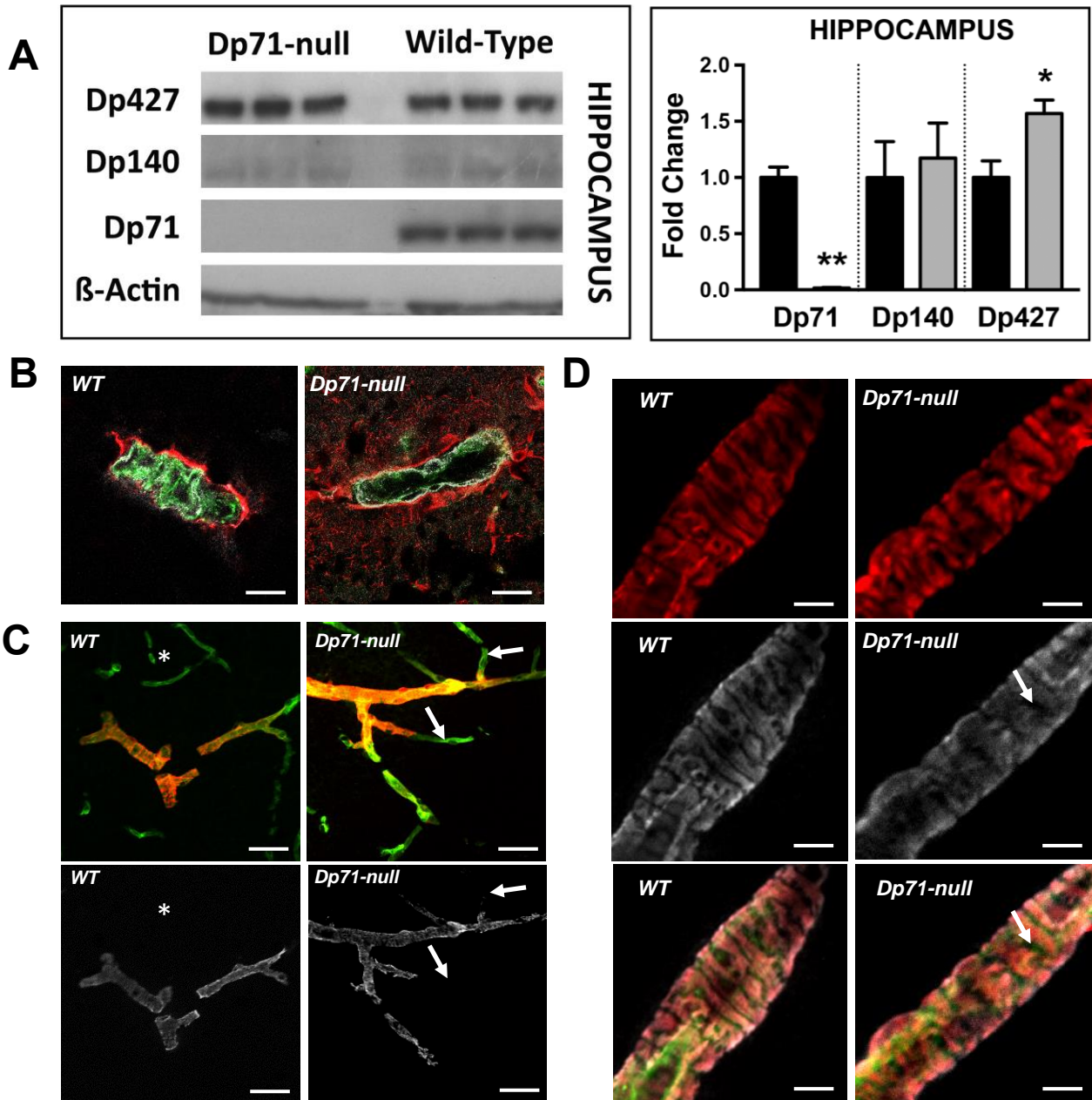


**Figure 32. Localisation subcellulaire des protéines associées à la Dp71 au niveau des capillaires cérébraux.** Coupes transversales montrant le double marquage des capillaires du cervelet et de l'hippocampe par les anticorps primaires dirigés contre AQP4, le  $\beta$ -dystroglycane et l' $\alpha$ 1-syntrophine (rouge). Les cellules endothéliales vasculaires sont marquées par la lectine (vert), et le DAPI (bleu) est utilisé comme marqueur nucléaire. Les images obtenues au microscope confocale sont prises avec l'objectif x63 (zoom 1.5). Barre d'échelle : 5  $\mu\text{m}$ .

Afin d'évaluer la présence d'autres dystrophines qui pourraient contribuer à certains mécanismes compensatoires dans l'hippocampe, nous avons utilisé notre anticorps H4 anti-dystrophines en Western-blots. Cette expérience a été réalisée par Ophélie Vacca (postdoc). Nous avons réalisé une quantification de l'expression des niveaux de dystrophines (Dp427, Dp140 et Dp71) dans l'hippocampe des souris WT et Dp71-null. Comme attendu, la Dp71 n'est pas exprimée mais une surexpression de la forme longue Dp427 est détecté chez la souris Dp71-null (Figure 33A). Nous avons ensuite utilisé l'anticorps monoclonal Dys1 dirigé contre la partie N-terminale spécifique de la Dp427. Dans les tranches d'hippocampe, nous confirmons que l'expression neuronale de la Dp427 est caractérisée par un marquage ponctiforme des neurones pyramidaux des champs CA1-3 alors qu'elle est absente des capillaires (donnée non montrée). Au niveau vasculaire, un marquage Dys1-positif est uniquement trouvé sur les vaisseaux de large diamètre de la SLM, suggérant que la Dp427 est exprimé dans les artérioles suggérant une localisation au niveau des muscles lisses plutôt qu'au niveau glial ou endothélial (Figure 33B). et/ou artérioles précapillaires. De manière intéressante, nous pouvons observer un marquage Dys1-positif exactement situé entre celui de la GFAP et de la lectine sur coupe transversale, suggérant une localisation au niveau des muscles lisses plutôt qu'au niveau glial ou endothélial (Figure 33B).

Afin de confirmer cette hypothèse, nous avons réalisé un triple marquage de la Dp427, des muscles lisses avec l' $\alpha$ -SMA et des cellules endothéliales avec la lectine. Comme nous pouvons l'observer sur la figure 33C, l'anticorps anti- $\alpha$ -SMA ne marque que les artérioles précapillaires de large diamètre alors que celles de plus petit diamètre et les capillaires sont uniquement lectine-positives. De même l'immunomarquage de la Dp427 est restreint aux artérioles précapillaires de large diamètre. Ceci est confirmé sur artérioles isolées par la superposition de Dys1 avec l' $\alpha$ -SMA et non avec la lectine (Figure 33D). Ainsi, l'expression de la Dp427 est restreinte aux muscles lisses des artérioles. Pour cette raison, le marquage glial persistant autour des artérioles chez la souris Dp71-null ne peut pas correspondre à la Dp427, et il s'agirait donc de la Dp140.





**Figure 33 – Localisation de la dystrophine Dp427 dans les différents éléments vasculaires.** (A) Western blots montrant l'expression des dystrophines (Dp427, Dp140, Dp71) rapporté à l'expression de la protéine contrôle  $\beta$ -actine chez les souris WT et Dp71-null (n=6 par génotype). L'histogramme montre que l'expression de la Dp427 est significativement augmentée chez la souris Dp71-null comparé au WT. (B) Immunomarquage de la Dp427 (blanc), de la GFAP (rouge) et de la lectine (vert) dans les artérioles (diamètre  $\geq 30\mu\text{m}$ ) de la SLM de l'hippocampe. (C) Les images en haut montrent le double marquage des artérioles précapillaires et des capillaires (astérisque, sur images de gauche) par l' $\alpha$ -SMA et la lectine. Notons que la superposition des deux marquages (jaune-orange) est seulement présente au niveau des vaisseaux de large diamètre (i.e. artérioles). Sur les mêmes vaisseaux, les images en bas montrent le marquage de la Dp427 (blanc) détecté sur les artérioles précapillaires de large diamètre et non sur celles de plus petit diamètre (flèches) ou sur les capillaires (astérisques). (D) Détection de l' $\alpha$ -SMA des muscles lisses (rouge), de la Dp427 (blanc) et de la lectine (vert) sur artérioles isolés. Notons que la Dp427 et l' $\alpha$ -SMA sont localisés dans le même compartiment vasculaire sans se superposer au marquage de la lectine (flèche). Barre d'échelle : 10  $\mu\text{m}$  en A (zoom x63), 15  $\mu\text{m}$  en B et 20  $\mu\text{m}$  en C (objectif x40).

## CONCLUSION

En conclusion, nous mettons en évidence une réduction partielle mais importante (70%) de la distribution polarisée des canaux AQP4 des pieds gliaux adjacents aux capillaires du cervelet et de l'hippocampe associée à une réduction de  $\beta$ -dystroglycane (>50%) et une perte complète d' $\alpha$ 1-syntrophine. Ceci ne dépend pas de compensation par d'autres dystrophines cérébrales et cela est confirmé sur vaisseaux isolés et extraits du cerveau antérieur. Nous avons également identifié un pool d'AQP4 indépendant de la Dp71 dans des couches spécifiques de l'hippocampe et du cervelet. L'expression d'AQP4 est préservée au niveau des artérioles précapillaires le long de la fissure hippocampique. Nous avons détecté d'autres dystrophines autour des artérioles, la Dp427 au niveau des muscles lisses et la Dp140 dans certains domaines gliaux, qui pourraient avoir un rôle protecteur chez la souris Dp71-null. L'absence de l' $\alpha$ 1-syntrophine et la réduction de la distribution polarisée d'AQP4 au niveau des pieds astrocytaires pourraient altérer l'homéostasie hydrique et fonctions de la barrière hémato-encéphalique et contribuer aux déficits cognitifs et de plasticité synaptique chez la souris Dp71-null.

## **II. IMPACT CELLULAIRE ET FONCTIONNEL DE LA PERTE DE DYSTROPHINE DP71**



## INTRODUCTION

Après avoir évalué l'impact de la perte de Dp71 au niveau moléculaire, nous allons à présent étudier les conséquences au niveau de mécanismes physiologiques qui mettent en jeu les cellules gliales, en se posant les questions suivantes : Est-ce que la perte d'AQP4 a une incidence sur l'homéostasie hydrique cérébrale ? Comment la perturbation des échanges d'eau se traduit-elle au niveau de la morphologie des cellules astrocytaires ? Et est-ce que l'absence de Dp71 a pour conséquence une altération du réseau vasculaire et des jonctions de la barrière hémato-encéphalique ? Pour répondre à ces questions, nous avons utilisé dans un premier temps différentes techniques d'analyse en conditions basales : celle de la déshydratation des cerveaux afin d'évaluer par un calcul indirect le contenu en eau du cerveau ; de l'imagerie cérébrale in vivo par IRM, pour mettre en évidence la présence ou non d'œdème cérébral ; et celle de la microscopie électronique qui nous a permis de mesurer la taille des pieds périvasculaires des cellules gliales de Bergmann. Dans un second temps, nous avons testé dans des conditions non basales, si des modifications de l'homéostasie hydrique étaient observées entre les souris Dp71-null et WT. Enfin, nous avons évalué l'état d'intégrité glio-vasculaire par des techniques d'analyse semi-quantitative de l'arbre vasculaire et d'immunofluorescences des protéines de jonctions.

## MÉTHODES

### **Contenu hydrique cérébral**

Des souris adultes (4-6 mois) ont été sacrifiées par dislocation cervicale et leurs cerveaux rapidement pesés. Afin d'analyser séparément les différentes régions d'intérêt, nous avons procédé à la dissection du cervelet, de l'hippocampe et du cortex pariétal. Chaque échantillon a été pesé de manière à obtenir la masse humide (masse de l'échantillon avant déshydratation) puis ont été soumis au refroidissement par azote liquide et stocké à  $-80^{\circ}\text{C}$ . Un total de  $n=6$  souris ont été utilisé pour déshydrater les différents échantillons par le moyen d'un centrifugeur à une température de  $80^{\circ}\text{C}$ , une pression de 1000 mbar et ce pendant 24h. (Savant SpeedVac Concentrator). Les échantillons sont à nouveau pesés afin de mesurer la masse sèche qui correspond à la masse de l'échantillon après déshydratation. Le pourcentage de contenance en

eau du cerveau a été ensuite calculé comme suit :  $(\text{masse humide} - \text{masse sèche}) \times 100 / (\text{masse humide})$ .

### **Imagerie par résonance magnétique (IRM)**

Les souris sont anesthésiées sous isoflurane (induction 2% ; débit 0.8% dans 50% d'O<sub>2</sub> et 50% de N<sub>2</sub>O) et restent sous surveillance grâce à l'acquisition des paramètres respiratoires. Leurs corps est maintenu sur un dispositif chauffant à une température de 37°C. Les mesures sont réalisées avec un aimant horizontal à 7 Tesla (Oxford, UK) conduit par Paravision (Bruker, Wissembourg, France) et équipé avec un appareil à gradient de 300mT/m (diamètre interne ID= 90 mm, Bruker). Pour l'expérience d'IRM, l'animal est introduit dans un dispositif adapté à sa taille. Les images sont acquises parallèlement (coronal) à l'axe antéro-postérieur du cerveau. Le cerveau de la souris est positionné en repérant les images des écho-gradients dans les trois directions orthogonales.

Le signal de résonance magnétique provient en IRM des noyaux d'hydrogène (protons). Les séquences d'IRM de diffusion apportent des informations non disponibles avec les séquences d'IRM conventionnelles. En effet, elles permettent d'évaluer le mouvement des molécules d'eau qui peut être modifié en cas de processus pathologique. L'eau étant le constituant majoritaire des tissus biologiques, ce sont les protons des molécules d'eau qui contribuent majoritairement au signal. C'est donc essentiellement la diffusion des molécules d'eau qui est observée par l'IRM de diffusion. L'intensité du signal dépend des paramètres physiques magnétiques propres à chaque tissu. Ces paramètres appelés temps de relaxation correspondent à la période de retour à l'équilibre (relaxation) des atomes d'hydrogène après leur excitation (résonance) par l'onde de radiofréquence. Pour chaque tissu, il existe deux types de temps de relaxation, le T1 et le T2 qui vont influencer l'intensité du signal obtenu. T1 est le taux de relaxation longitudinale du vecteur de magnétisation d'un tissu, reflétant le temps nécessaire pour les spins de ses protons H<sup>+</sup> de se réaligner avec le champ magnétique principal ; il reflète le rapport entre l'eau et lipides présents dans les tissus. Le T2 est le temps de relaxation transverse ; il reflète la quantité d'eau dans le milieu extracellulaire. Le degré de mobilité des molécules d'eau est caractérisé par un facteur appelé coefficient de diffusion apparent ou ADC (apparent diffusion coefficient). L'ADC augmente si la mobilité des molécules d'eau extracellulaire est élevée. En revanche, l'ADC diminue si les cellules gonflent ce qui peut être le signe d'un œdème intracellulaire ou d'une tumeur.

## Hyponatrémie

L'induction d'un œdème chez la souris se fait par voie intrapéritonéale (i.p.) au moyen d'une injection d'hormone hyponatrémiant, la vasopressine 8-deamino-arginine, qui empêche l'élimination normale de l'eau par les reins. Les souris sont pesées, anesthésiées (kétamine 1000 = 0,12ml ; Domitor = 0,24ml, NaCl = 1,64ml pour un volume total de 2ml), puis subissent une injection en i.p. de vasopressine (0,3 µg/kg) et d'une solution d'eau distillée et en quantité de 15% du poids corporel (volume injecté de 4,5ml pour une souris de 30g). Un dispositif mesurant la fréquence respiratoire et cardiaque est placé sur le buste de l'animal et permet de surveiller son état et le temps de « survie » avant le décès de l'animal du fait d'un œdème fatal induit l'hyponatrémie.

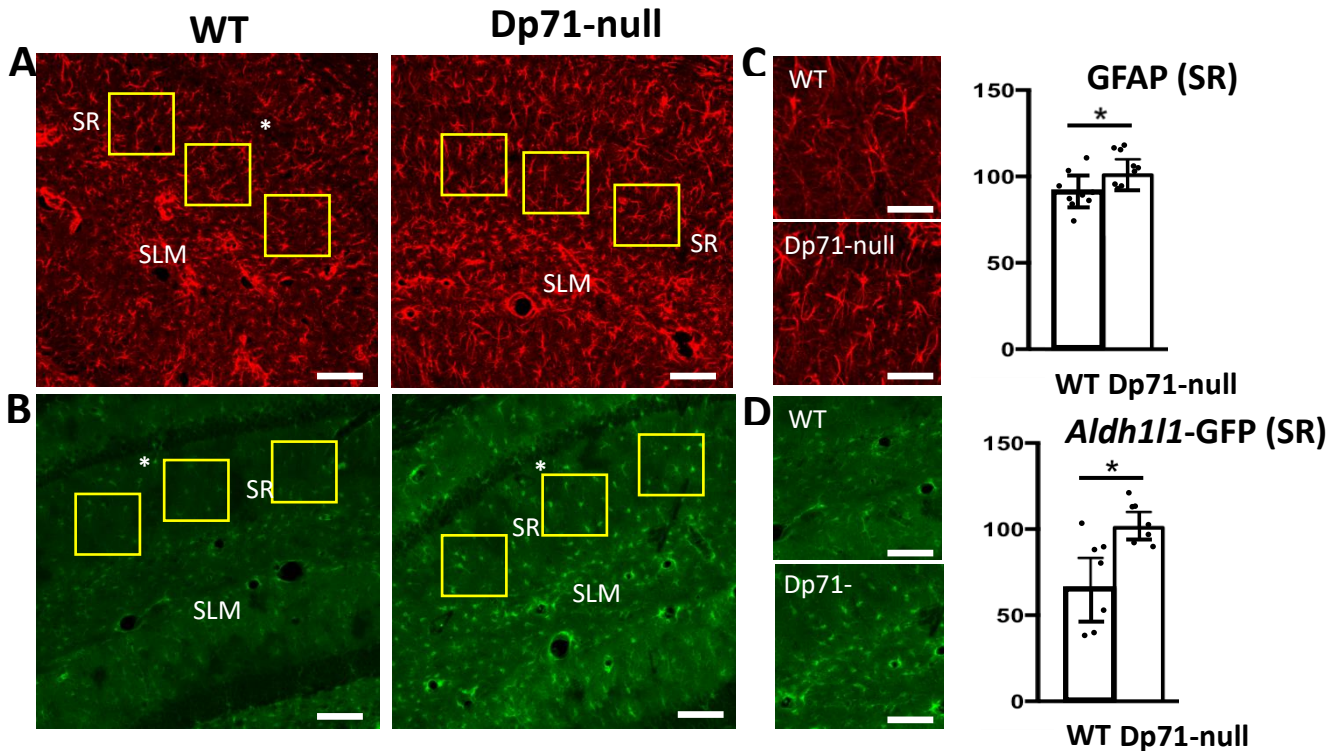
## RÉSULTATS

### 1. Gonflement (swelling) des cellules gliales

Afin d'évaluer l'impact de la perte de Dp71 sur la morphologie astrocytaire, nous avons réalisé une quantification de l'expression dans l'hippocampe de la GFAP qui marque les astrocytes et leur prolongements astrocytaires. La GFAP n'étant pas présente dans tous les astrocytes, nous avons utilisé un autre marqueur astrocytaire nommé aldh111 qui est une enzyme (Zhang et al., 2014) dont l'expression permet de caractériser le corps cellulaire des astrocytes. Pour ce faire, des souris ont été modifiées génétiquement afin de coupler le gène de la GFP avec celui du promoteur glial du gène ALDH1L1. L'expression d'aldh111 est donc reflétée par celle de la GFP.

Dans l'hippocampe, nous mettons en évidence pour les deux génotypes un marquage de la GFAP dans les astrocytes et ses prolongements de toutes les couches excepté les couches neuronales du CA1 marqués par un astérisque ou du gyrus denté. Nous pouvons également noter dans la SLM la présence d'astrocytes entourant les artérioles de la fissure hippocampique. En revanche, chez la souris Dp71-null, dans la *stratum radiatum* nos résultats montrent une augmentation significative de la surface de tissu marqué par l'anticorps anti-GFAP (Figure 34A). Ce résultat est de même observé avec le marqueur aldh111 couplé à la GFP (Figure 34B). Aldh111 marque un peu moins les prolongements des astrocytes et plutôt le soma, en comparaison avec GFAP, mais là aussi le marquage est plus présent chez la souris Dp71-null

que chez la WT. Bien que le nombre d'astrocytes n'ait pas été estimé, nos observations à plus fort grossissement (Figure 34C-D) montrent un marquage plus intense de l'ensemble des prolongements et soma des astrocytes, suggérant une hypertrophie astrocytaire susceptible de refléter la présence d'astrocytes réactifs.

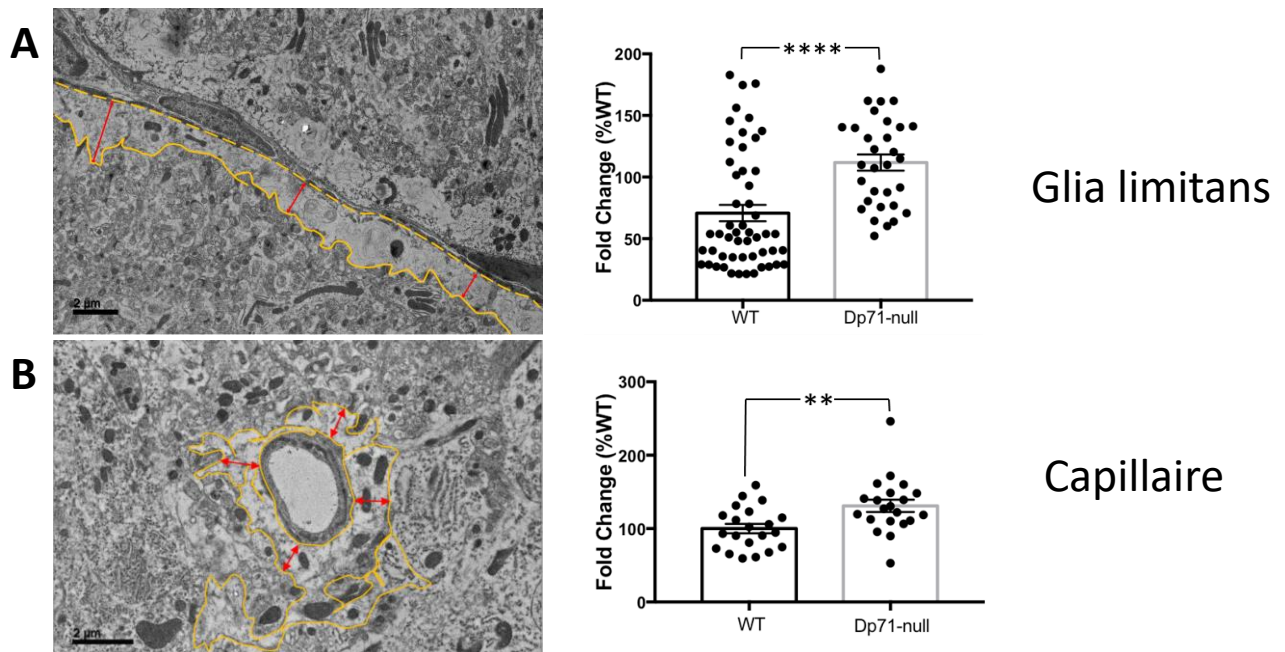


**Figure 34 – Expression de la GFAP et d'aldh11-GFP dans les différentes couches de l'hippocampe.** (A) L'expression de la GFAP (rouge) est localisée dans les astrocytes de l'ensemble de l'hippocampe des souris WT et Dp71-null. Une expression plus importante est observée dans les astrocytes de la stratum radiatum (SR),  $n=3$ ,  $*p=0,042 < 0,05$  Mann-Whitney. L'astérisque (\*) sur la figure indique les neurones CA1. Les points noirs sont des données individuelles (B) L'expression de aldh11 est restreinte aux corps cellulaires des astrocytes et montrent un marquage plus important dans les astrocytes de la même couche SR de l'hippocampe,  $n=3$ ,  $*p=0,02 < 0,05$ . (C) Zoom de l'expression de la GFAP (D) et de aldh11 dans la fenêtre (jaune) au niveau de la stratum radiatum (SR). Barre d'échelle : 150  $\mu\text{m}$  (A-B), 40  $\mu\text{m}$  (C-D).

### Évaluation de l'épaisseur des pieds gliaux par microscopie électronique

De manière plus fine, nous avons mesuré sur des images de microscopie électronique l'épaisseur des pieds gliaux sur des microéchantillons de cervelet de souris WT comparé au souris Dp71-null (Figure 35). Nous observons sur des mesures prises sur une longueur de 150  $\mu\text{m}$  de glial limitans et de même qu'autour des capillaires de la couche moléculaire, une

épaisseur plus importante des pieds gliaux en l'absence de Dp71 ce qui suggère encore une fois un gonflement ou œdème cytotoxique qui pourrait être lié à une accumulation d'eau intracellulaire.

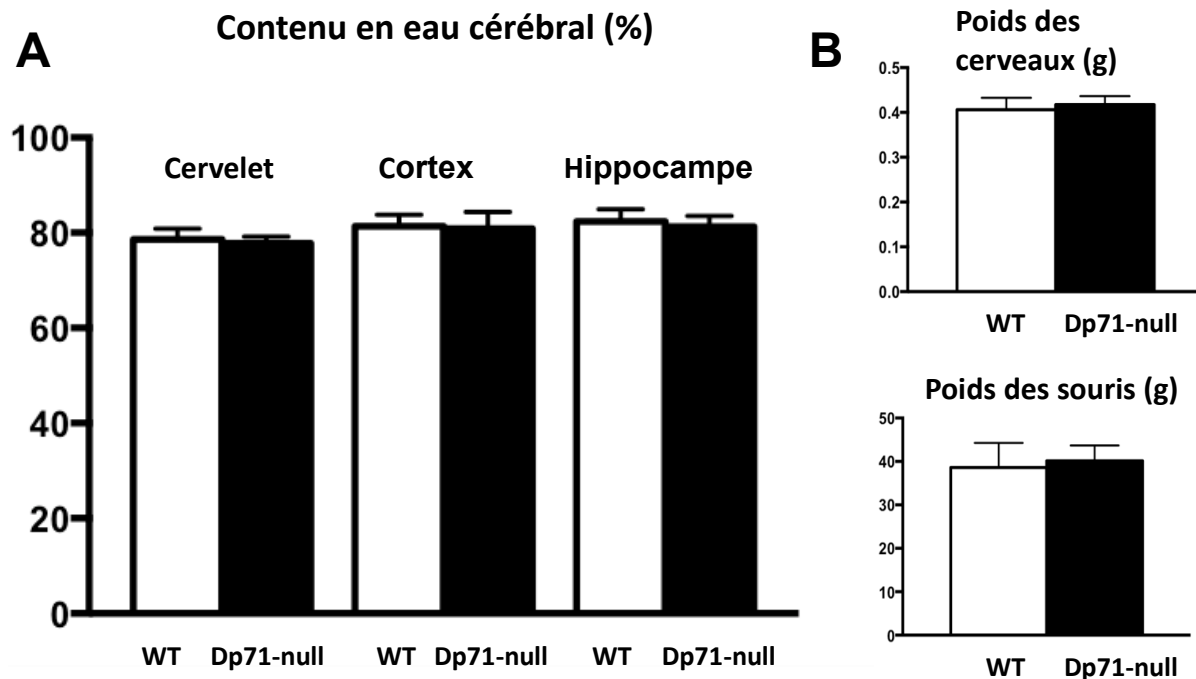


**Figure 35 – Épaisseur des pieds des cellules gliales de Bergmann entourant les capillaires de la couche moléculaire et bordant la glia limitans du cervelet.** Les images en A et B sont issues d'une souris WT et illustrent la méthode d'analyse quantitative : Les mesures ont été prises sur 150 µm de longueur de glia limitans (A) et sur 21 capillaires et deux souris par génotypes (B). Les quantifications (histogrammes à droite) mettent en évidence une épaisseur des pieds plus importante en l'absence de Dp71. Le Fold Change correspond aux valeurs normalisées par rapport à la valeur moyenne des WT. Les astérisques (\*\*) et (\*\*\*\*) indiquent respectivement une différence significative  $p < 0,01$  et  $p < 0,0001$ . Barre d'échelle : 2 µm.

## 2. Quantité d'eau basale dans le cerveau

Dans une première expérience, nous avons extrait des échantillons de cervelet, de cortex et d'hippocampe et les avons soumis à une déshydratation pendant 24h (Figure 36A). Le pourcentage d'eau normalement contenu dans le cerveau des souris est en moyenne de 80%, ce qui était attendu pour les souris WT. Nos résultats montrent que le calcul permettant de déduire le pourcentage d'eau des différents échantillons des souris contrôles est en cohérence avec ce chiffre et que les souris déficientes en Dp71 ne montrent pas de différence de contenu en eau

dans les trois régions testées. Nous avons également vérifié le poids des cerveaux et des animaux qui de même ne présentent pas de différence (Figure 36B).

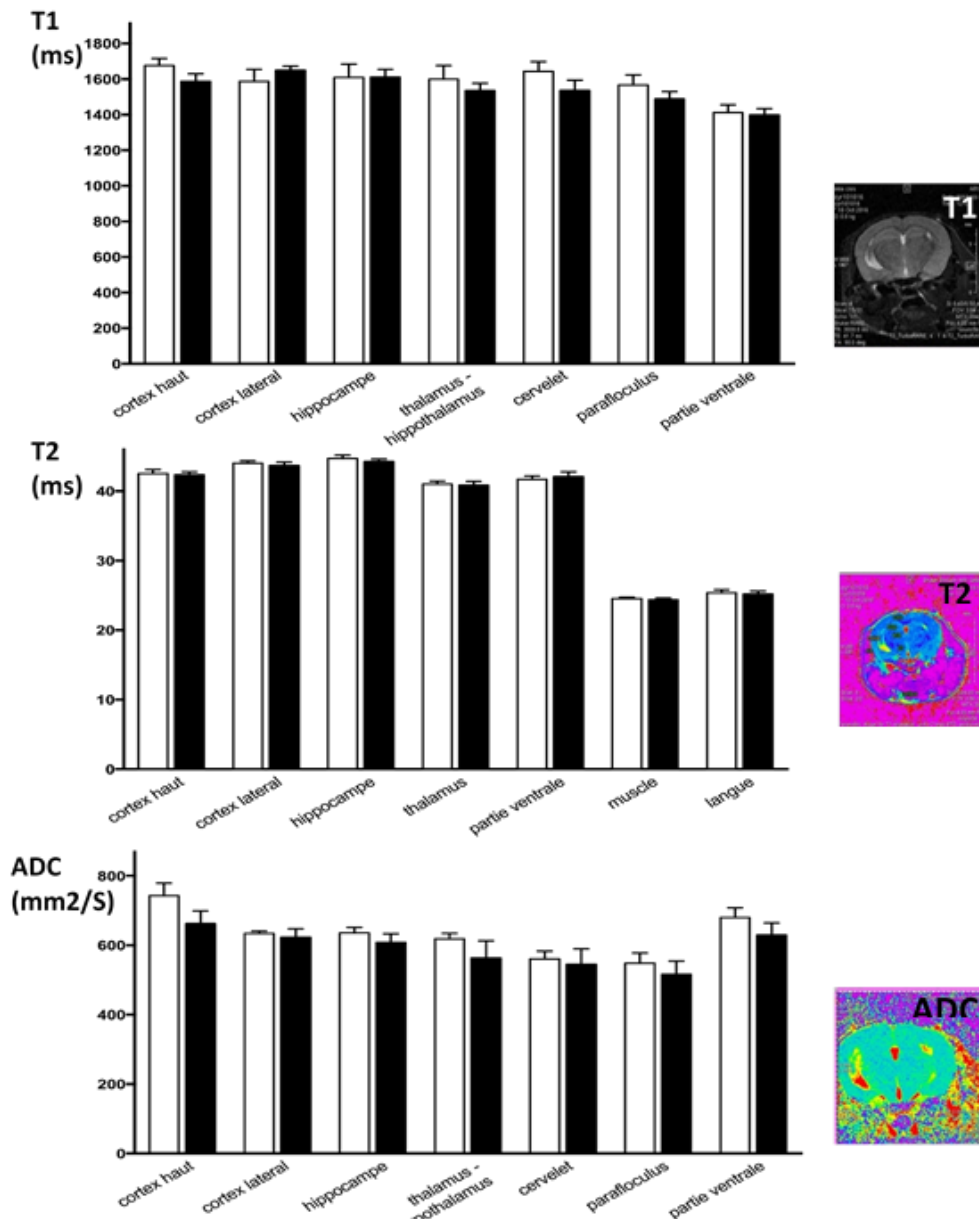


**Figure 36 – Évaluation de la contenance en eau du cerveau par déshydratation.** (A) Contenu en eau du cervelet, du cortex et de l’hippocampe chez les souris Dp71-null comparées aux WT et calculé comme suit :  $(\text{wet mass} - \text{dry mass}) \times 100 / (\text{wet mass})$  après 24 h de déshydratation des échantillons. (B) Poids des cerveaux et des souris Dp71-null comparés aux WT. Effectifs : n=8 WT et 13 Dp71-null.

Dans une seconde expérience, afin d’évaluer de manière plus précise l’impact de l’absence de Dp71 sur le contenu en eau cérébral, nous avons préalablement anesthésié les souris et les avons placées dans un dispositif pour une imagerie par résonance magnétique dans des conditions basales (Figure 37). Aucune variation volumétrique significative n’a été détecté pour l’ensemble des structures cérébrales étudiées dans une analyse d’IRM structurale préliminaire (C.Vaillend et C.Sébrié, données non publiées). Nous avons ainsi mesuré les différents paramètres T1, T2 et l’ADC (coefficient de diffusion apparent) au niveau de plusieurs structures cérébrales telles que le cortex, l’hippocampe, le thalamus et le cervelet. Une augmentation d’ADC et/ou de T2 pourrait être le signe d’une augmentation d’eau extracellulaire, ou d’une nécrose cellulaire augmentant le volume extracellulaire, et à l’inverse une diminution d’ADC et/ou de T1, d’un œdème cellulaire et une réduction du volume



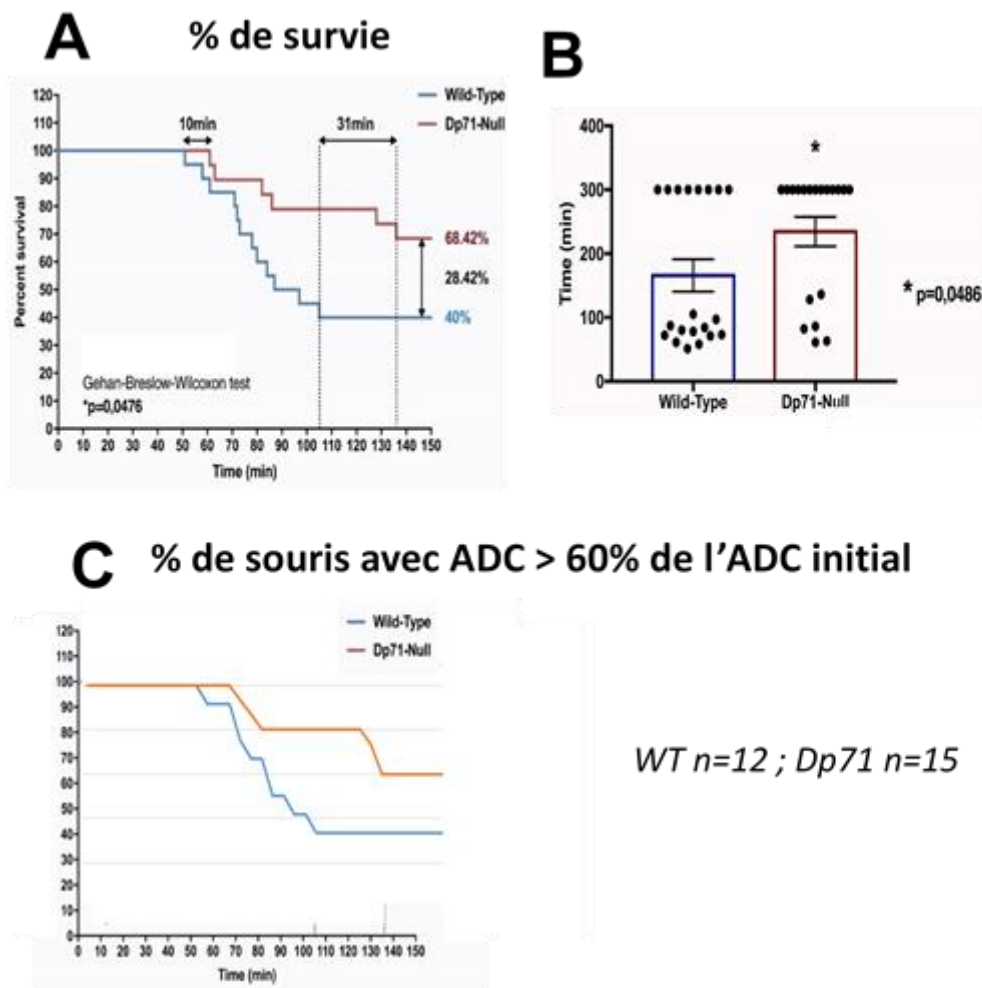
extracellulaire. Dans ces conditions basales, nous n'observons pas de différence significative ni de T1, de T2 et d'ADC entre les souris WT et Dp71-null que ce soit dans le cortex, l'hippocampe, le cervelet et autres régions.



**Figure 37- Évaluation de la contenance en eau du cerveau par IRM in vivo.** Les mesures en conditions basale des paramètre T1, T2 et ADC ne montrent pas de différences significatives entre les souris WT et Dp71-null. T1 est le taux de relaxation longitudinale et T2 est le temps de relaxation transverse. L'ADC est le coefficient de diffusion apparent. Colonne blanche : WT Colonne noire : Dp71-null. Muscle et langue ont aussi été analysés en tant que contrôles. A droite des graphes : exemple d'images illustratives d'IRM (T1, T2, ADC) sur lesquelles on peut observer notamment l'hippocampe dorsal et les ventricules cérébraux et localiser les régions plus ou moins riches en eau, en blanc sur une image brute (T1) et en rouge sur les images illustrant une cartographie de la densité d'eau en code couleurs (T2, ADC).

### 3. Formation d'un œdème cérébral induit par une intoxication hydrique

Une expérience réalisée en collaboration avec O. Vacca (postdoctorante) et Catherine Sébrié (Ingénieure de Recherche à l'IR4M à Orsay), et avec la participation de Charlotte Isabelle, a consisté à induire un œdème par intoxication hydrique des souris après injection d'une solution hyponatrémiant. Nos résultats ont révélé sur la courbe de survie un délai de 10 min entre le décès de la première souris WT et de la première Dp71-null et de 31 min entre la dernière souris WT et Dp71-null (Figure 38A).



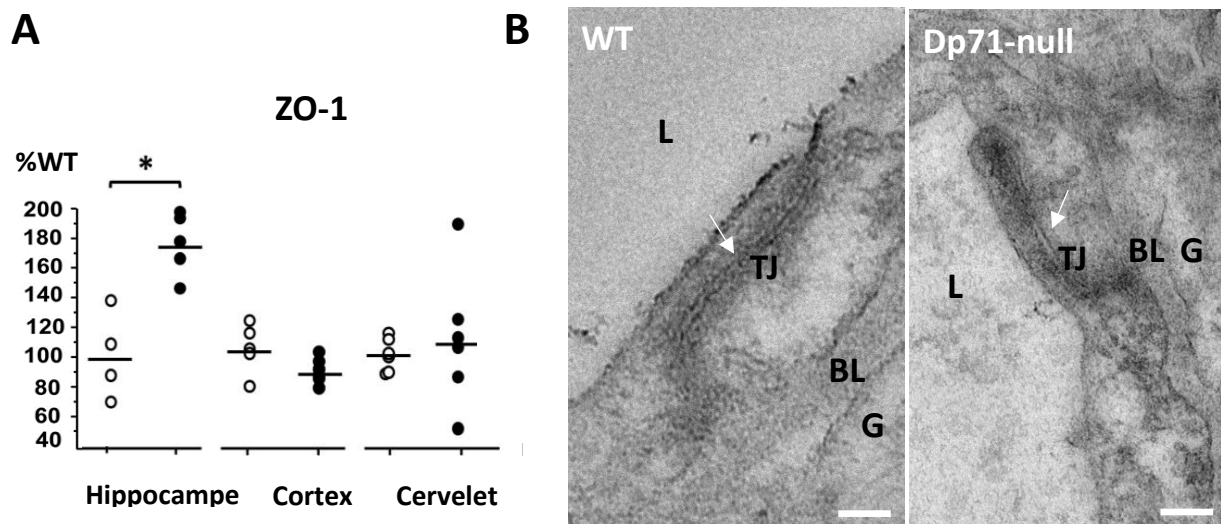
**Figure 38 – Profil de courbe de survie suite à une intoxication hydrique par hyponatrémie.** (A) Profil de la courbe de survie des souris WT et Dp71-null après induction d'œdème par hyponatrémie. La courbe rouge est celles des souris Dp71-null et la bleue des souris WT. Un écart entre les deux courbes est observé (B) Le temps de survie avant le décès est significativement plus important chez les souris Dp71-null qui montrent une résistance à l'œdème. L'astérisque (\*) indique une différence significative  $p < 0,05$ ,  $n = 20$  WT et 20 Dp71-null. (C) Pourcentage de souris ayant un ADC supérieur à 60% de la valeur initiale (avant hyponatrémie) au cours de l'expérience d'intoxication à l'eau.



La courbe de survie montre clairement une plus forte résistance à l'œdème caractérisé par un temps de survie significativement plus important chez les souris Dp71-null (Figure 38B). La courbe de l'ADC suit la courbe de survie (Figure 38C). L'amélioration de la survie chez les souris Dp71-null a été estimée à 28%.

## Intégrité de la barrière hémato-encéphalique

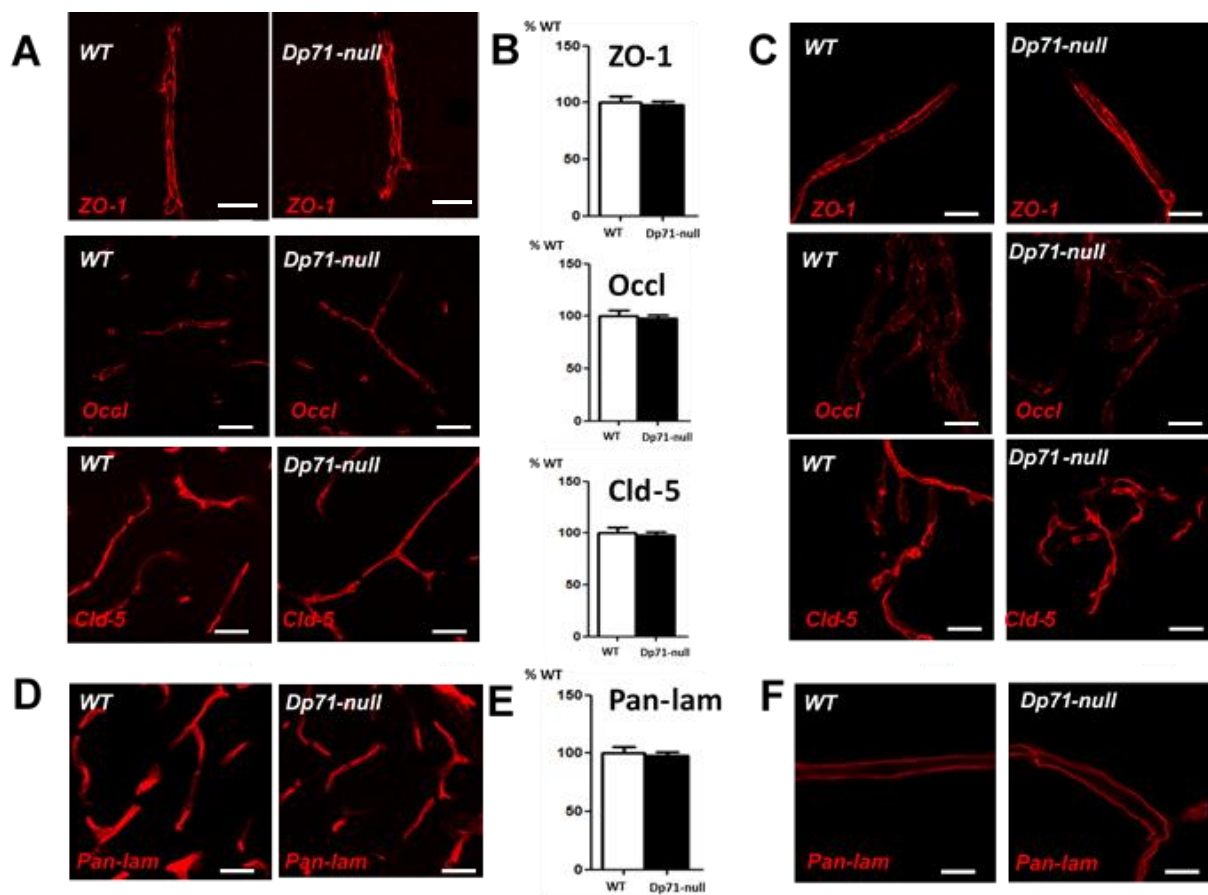
En microscopie électronique, l'étude de la structure de la jonction serrée ne montre pas de différences ou de rupture visible de la BHE, mais nous n'avons étudié que le cervelet avec cette méthode (Figure 39B).



**Figure 39 - Niveau d'expression de l'ARNm de ZO-1 par PCR quantitative et exemples d'images de l'état des jonctions serrées par microscopie électronique.** (A) L'expression du gène codant la protéine ZO-1 est surexprimée dans l'hippocampe des souris Dp71-null mais pas dans le cortex ni le cervelet. La moyenne des groupes est représentée par une ligne horizontale alors que les valeurs individuelles sont représentées par des cercles (cercles noirs : souris Dp71-null, cercles blancs : souris WT). L'astérisque (\*) indique une différence significative  $p < 0,05$ . (B) Image en microscopie électronique à transmission d'une jonction serrée sur un capillaire du cervelet chez une souris WT et une souris Dp71-null. Nous observons la lumière du capillaire (L) entourée des cellules endothéliales composées de jonctions serrées (TJ ; indiqués par des flèches blanches) qui forment des points noirs continus et séparent les deux cellules endothéliales. Le pied glial (G) apposé au capillaire est séparé par la lame basale (BL). L : lumière du vaisseau sanguin, TJ : jonction serrée, BL : lame basale, G : pied glial.

Une première expérience afin d'évaluer l'intégrité de la barrière hémato-encéphalique (BHE) a été d'étudier l'expression de ZO-1 des jonctions serrées par PCR quantitative (Figure

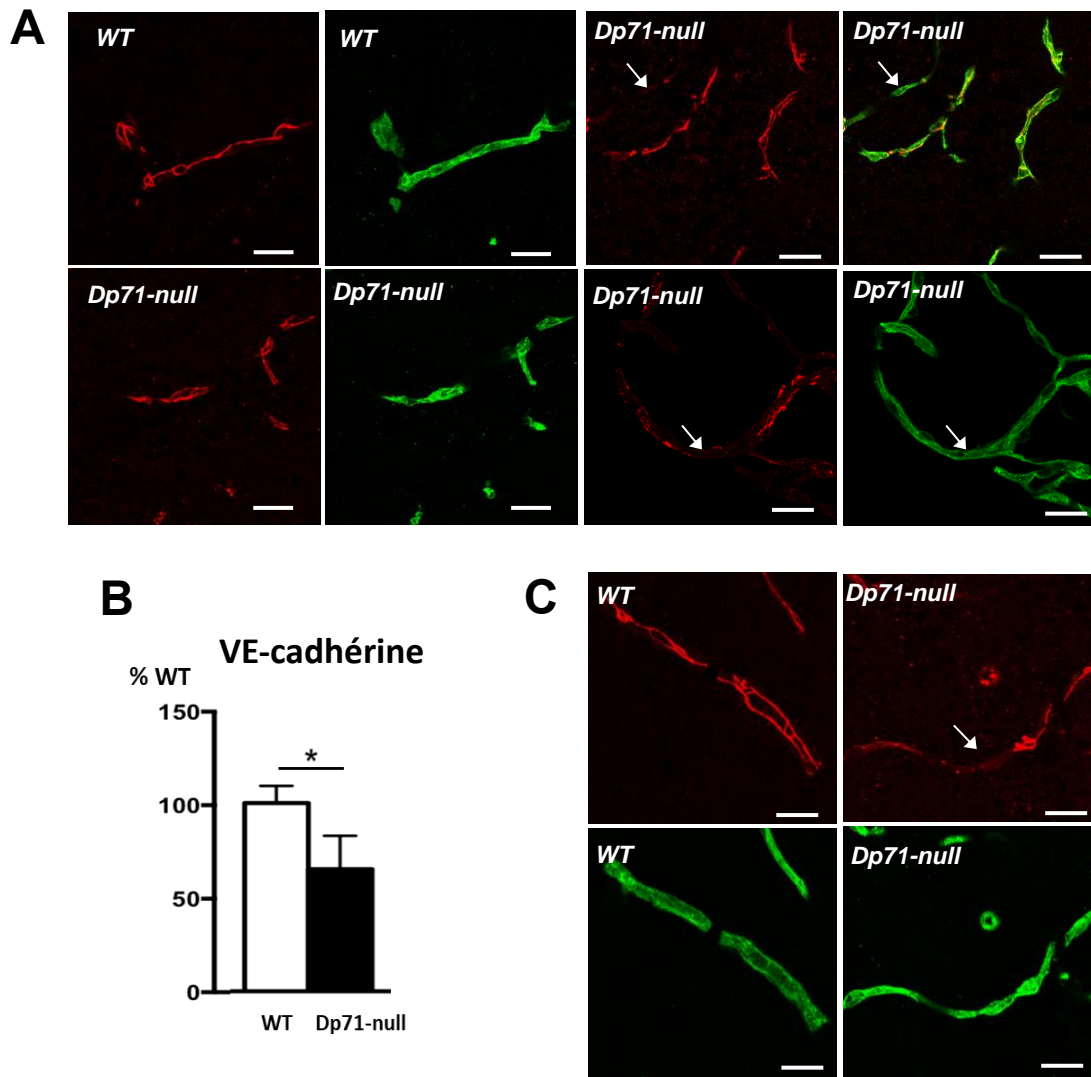
39A). Nos résultats mettent en évidence une surexpression de l'ARNm de ZO-1 dans l'hippocampe. Pour aller plus loin, l'état d'intégrité des vaisseaux et de la lame basale a été étudié sur tissu par immunofluorescence et analyse semi-quantitative d'images confocales. L'immunofluorescence de la protéine ZO-1 et de l'occludine montrent un marquage fin par un trait continu qui délimite les jonctions serrées entre les cellules endothéliales dont celui de l'occludine est moins intense que ZO-1. Tandis que la claudine-5 montre un marquage plus diffus le long des vaisseaux. Ces protéines ont été quantifiées sur tranches d'hippocampe (région SR) et nous n'avons pas mis en évidence d'altération visible du marquage entre souris WT et Dp71-null (Figures 40 A-B).



**Figure 40 – Expression de protéines de jonction serrées et de la lame basale sur tissus et vaisseaux isolés.** (A) Images prises au microscope confocale (objectif x40, zoom 0,5) de l'immunofluorescence des protéines de jonctions de haut en bas de ZO-1, occludine, claudine-5 et de la pan-laminine (en rouge) sur capillaires de la région *stratum radiatum* de l'hippocampe dont aucune altération (B, histogrammes de quantification) n'est mise en évidence entre souris WT et Dp71-null, n= 4 WT et 5 Dp71-null. Barre d'échelle : 30  $\mu$ m. (C) Mêmes immunofluorescences sur capillaires isolés extrait du cerveau antérieur, n=4-5 vaisseaux de chaque génotype. Occl : Occludine, Cld-5 : claudine-5, Pan-lam : pan-laminine Barre d'échelle :15  $\mu$ m.

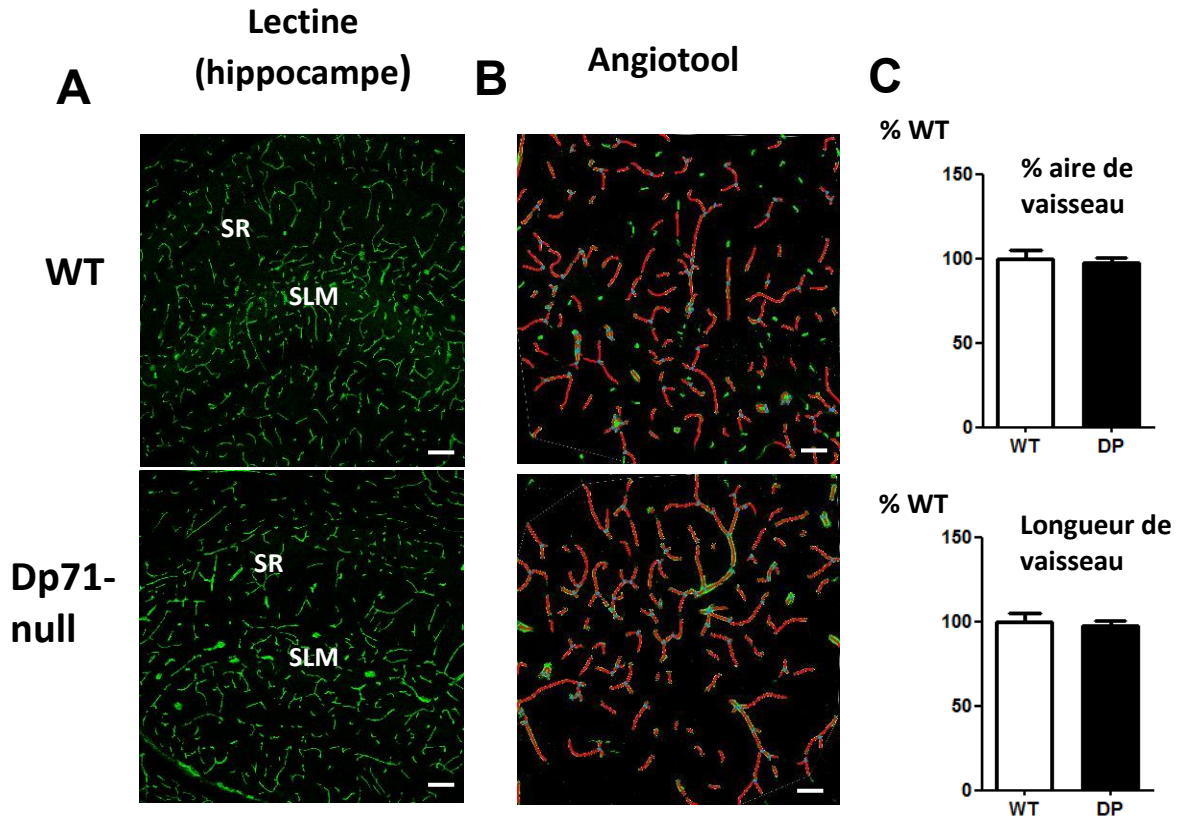
Ces résultats ont été confirmés sur vaisseaux isolés extraits du cerveau antérieur, où on ne voit pas de différence évidente au niveau quantitatif ni au niveau de la distribution spatiale au niveau qualitatif entre les génotypes (Figure 40C). Nous n'avons donc pas à ce niveau d'altération des jonctions serrées. Pour ce qui concerne les protéines de la lame basale, l'anticorps pan-spécifique anti-laminine reconnaît toutes les isoformes de laminines mais ne met pas non plus en évidence d'altération de l'expression des laminines de la matrice extracellulaire (Figure 40D-F).

Enfin, nous avons exploré les jonctions adhérentes dont l'une des composantes principales au sein des cellules endothéliales du cerveau est la VE-cadhérine. De même que précédemment, nous avons analysé par immunofluorescence et imagerie confocale sur tissu et capillaires isolés l'expression de la VE-cadhérine. Nous avons pu constater qu'en normalisant par rapport à la quantité de vaisseaux (lectine), que le marquage de la VE-cadhérine n'était pas uniforme chez les souris Dp71-null comparé aux WT. En effet, certaines portions de capillaires de la stratum radiatum de l'hippocampe présentaient une expression moindre en VE-cadhérine (Figure 41A, flèches). Ainsi, une altération des jonctions adhérentes mais non des jonctions serrées est mise en évidence en absence de Dp71. Sur vaisseaux isolés, nous observons de même une réduction de l'expression de VE-cadhérine sur certaines portions de vaisseaux mais le nombre de vaisseaux étant peu élevé, nous n'avons pas d'analyse quantitative (Figure 41C).



**Figure 41 - Expression de la VE-cadhérine des jonctions adhérentes.** (A) Immunofluorescence détectant la VE-cadhérine (rouge) et la lectine (vert) au niveau des capillaires sur tranche d'hippocampe (*stratum radiatum*) de souris WT (haut, gauche) et Dp71-null (bas, gauche : exemple où le marquage VE-cadhérine suit celui de la lectine ; A droite, deux exemples où des portions de vaisseaux ne présentent pas de marquage VE-cadhérine, indiqués par des flèches). Barre d'échelle : 30  $\mu$ m. (B) Quantification de l'expression de VE-cadhérine sur tranche d'hippocampe montrant une diminution significative en l'absence de Dp71, n=2 WT et 3 Dp71-null. (C) Immunofluorescence de la VE-cadhérine (rouge) et de la lectine (vert) sur vaisseaux isolés de souris WT et Dp71-null, n= 4 vaisseaux. La flèche indique une portion où l'expression de VE-cadhérine est très faible. Barre d'échelle : 15  $\mu$ m.

Afin de déterminer si la perte de Dp71 a des conséquences au niveau de l'arbre vasculaire, nous avons utilisé un logiciel (Angiotool) permettant de quantifier la surface occupée par les vaisseaux dans le tissu, leur nombre et leur longueur. Sur nos tranches d'hippocampe, nous avons quantifié le marquage de la lectine endothéliale et n'avons pas mis en évidence d'altération du réseau vasculaire (Figure 42).



**Figure 42 - Analyse par angiotool du réseau vasculaire marqué par la lectine endothéliale.** (A) Immunofluorescence du marqueur endothélial (vert) montrant le réseau vasculaire sur un plan 2D dans l'ensemble de l'hippocampe d'une souris WT et Dp71-null. SLM : *stratum lacunosum moleculare*, SR : *stratum radiatum*. (B) Analyse de la microvasculature de l'hippocampe par angiotool avec les tracés en rouge mesurant la longueur et le pourcentage d'aire occupé par les vaisseaux et représenté par les histogrammes (C). Barre d'échelle : 150  $\mu$ m en (A) 50  $\mu$ m en (B).

## CONCLUSION

En condition basale, nous n'avons pas détecté de modifications du contenu en eau cérébral ni d'accumulation d'eau extracellulaire ou intracellulaire sur la base de l'analyse de plusieurs paramètres d'IRM in vivo en l'absence de Dp71. En revanche, par une analyse plus fine en microscopie électronique, nous observons que l'épaisseur des pieds des cellules gliales de Bergmann du cervelet est plus importante chez la souris Dp71-null comparativement aux WT, ce qui met en évidence la présence d'un œdème de type cytotoxique. De même, dans l'hippocampe, les analyses d'immunofluorescence révèlent une quantité de GFAP plus élevée dans la couche *stratum radiatum* en l'absence de Dp71, suggérant aussi un gonflement des astrocytes. Nous mettons en évidence après induction d'œdème par intoxication hydrique couplée à l'administration de vasopressine hyponatrémiante, que la survie des souris Dp71-null est plus importante que celle des souris WT, ce qui confère un rôle protecteur de la Dp71 vis-à-vis de l'œdème, du fait d'une réduction des échanges d'eau de la vascularisation vers le parenchyme. D'autres expériences effectuées en collaboration avec Micaela Galante dans notre Institut (Partenaire de l'ANR DysTher coordonnée par C Vaillend de 2014 à 2018), ont utilisé des approches électrophysiologiques permettant d'évaluer le volume du milieu extracellulaire et ses variations après activation neuronale par optogénétique. Ces expériences complètent ce travail en renforçant nos conclusions sur la présence d'œdème des cellules gliales. Le travail de postdoctorat d'Ophélie Vacca dans notre équipe montre l'absence d'altération majeure de la perméabilité, suggérant que les jonctions serrées ne sont pas altérées, ce que j'ai confirmé par mes analyses semi-quantitatives des marqueurs d'intégrité des jonctions serrées. Certaines petites molécules passent cependant plus facilement la BHE chez les souris Dp71-null, ce qui l'altération d'autres mécanismes de transports, peut-être du fait d'une altération de la lame basale ou d'autres types de jonctions. J'ai observé l'altération d'une des protéines des jonctions adhérentes, la VE-cadhérine ce qui pourrait en effet affecter de manière minime et non drastique la perméabilité de la BHE. Ce travail collaboratif donnera lieu à une publication qui est en cours de préparation (Vacca et al.).

## **DISCUSSION GENERALE**



Les premières études sur la souris Dp71-null ont confirmé la localisation de la Dp71 dans les pieds des cellules gliales, tel que les cellules gliales de Müller de la rétine (Daloz et al., 2003) et les cellules de Bergmann du cervelet (Nicchia et al., 2008a). Dans notre étude, nous avons confirmé l'expression de la Dp71 le long des capillaires de la couche moléculaire (MCL) et de la glia limitans du cervelet c'est-à-dire dans les pieds des cellules de Bergmann. De manière similaire, nous avons mis en évidence la localisation subcellulaire de la Dp71 dans les pieds des astrocytes périvasculaires de l'hippocampe. Le marquage de la Dp71 ne se superpose pas à celui de la lectine endothéliale, ce qui confirme sa localisation à la membrane du pied astrocytaire faisant face aux cellules endothéliales.

Nous avons commencé notre étude en analysant l'impact moléculaire de la perte de Dp71 dans le cervelet, révélant une expression résiduelle d'AQP4 dans la couche granulaire (gcl) et la matière blanche, dans lesquels nous ne détectons aucune dystrophine au moyen de notre anticorps anti-dystrophine pan-spécifique. Ces résultats sont en accord avec une étude précédente (Nicchia et al., 2008) chez le même modèle de souris, démontrant que la perte de Dp71 impacte en premier lieu l'expression d'AQP4 et ses deux isoformes majeures impliquées dans la formation d'OAP (orthogonal arrays of particules) dans le cervelet, AQP4-M1 et AQP4-M23. En revanche, des pools d'AQP4 indépendants de la Dp71 formant des OAPs de plus petites tailles dans les couches granulaires (gcl) et la matière blanche du cervelet ne sont pas altérés. Nos résultats ont confirmé que les pools d'AQP4 indépendants de la Dp71 sont maintenus dans la gcl et la matière blanche, et que le marquage AQP4 se superpose en partie à celui de la GFAP dans la gcl, correspondant à un certain type d'astrocytes composant la couche granulaire appelé « velate astrocyte » (Nicchia et al., 2008).

Par contre, l'expression d'AQP4 est fortement réduite dans la MCL le long des capillaires, mais il reste une expression résiduelle d'environ 30%. Nous avons utilisé des approches semi-quantitatives afin d'estimer le taux d'expression résiduelle d'AQP4 dans les pieds gliaux périvasculaires le long des vaisseaux du cervelet à la fois par analyse d'imagerie confocale de l'immunofluorescence d'AQP4 et par analyse du marquage immunogold d'AQP4 par microscopie électronique. Les deux méthodes montrent une réduction de 30% de l'expression des canaux AQP4, ce qui démontrent que la perte de l'expression polarisée des canaux AQP4 dans les cellules gliales de Bergmann est partielle. Nous observons également dans la même structure, une perte partielle de l'expression du canal potassique Kir4.1, moins drastique que pour AQP4 (réduction de 30-40%).



Dans l'hippocampe, des analyses par imagerie confocale montrent dans les couches *stratum oriens* et *stratum radiatum* une réduction importante d'AQP4, avec là aussi une expression résiduelle de 30 %, au niveau de la membrane des pieds des astrocytes périvasculaires de la région CA1 de l'hippocampe. L'expression polarisée d'AQP4 semble donc aussi partiellement préservée dans les astrocytes périvasculaires du cerveau antérieur. Ceci a été confirmé par notre étude sur vaisseaux isolés à partir d'échantillons de cerveau antérieur, qui montre une expression résiduelle d'AQP4 caractérisée par un marquage ponctiforme le long des capillaires de souris Dp71-null au lieu d'un marquage continu chez les souris WT.

Dans ces mêmes régions de l'hippocampe et du cervelet, nous pouvons observer une expression résiduelle du  $\beta$ -dystroglycane de 50 à 60 % le long des capillaires alors que celle de l' $\alpha$ 1-syntrophine est absente. L'altération de la distribution de  $\beta$ -dystroglycane et d'AQP4 renforce l'hypothèse que la Dp71 est la protéine principalement responsable de la stabilisation du complexe DAPC et de l'ancrage d'AQP4 à la membrane des pieds périvasculaires (Neely et al., 2001 ; Amiry-Moghaddam et al., 2004). Mais la Dp71 semble être également requise pour l'expression de l' $\alpha$ 1-syntrophine via l'interaction entre les domaines PDZ des deux protéines (Adams et al., 2017) ainsi que pour déterminer la taille des OAP à l'interface glio-vasculaire (Hoddevik et al., 2017). Il a été suggéré qu'une réduction proportionnelle d'AQP4 et d' $\alpha$ 1-syntrophine a lieu chez la souris Dp71-null (Nicchia et al., 2008a) or dans notre étude, l' $\alpha$  - syntrophine n'est pas détectée du tout alors qu'on met en évidence une expression d'AQP4 résiduelle de 30%. D'autres protéines du complexe DAPC sont aussi impliquées dans l'adressage d'AQP4 et la formation d'OAP, tel que le  $\beta$ -dystroglycane (Noël et al., 2011) dont l'expression est partiellement diminuée dans notre modèle, l' $\alpha$ -dystrobrevine (Bragg et al., 2010 ; Lien et al., 2012) ou l'AQPex (Palazzo et al., 2019). Nos résultats montrent que la perte de Dp71 altère différemment l'expression des DAPs dont certaines peuvent contribuer au maintien de l'expression d'AQP4 au niveau des membranes des astrocytes périvasculaires. Il est possible que l' $\alpha$ 1-syntrophine soit spécifiquement associée au complexe de la Dp71 alors que d'autres DAPs, notamment le dystroglycane, ont une expression plus ubiquitaire et peuvent interagir avec d'autres dystrophines et avec les utrophines. Les utrophines, paralogues des dystrophines, pourraient être aussi impliquées. Cependant, leur expression est plutôt au niveau des neurones et des cellules endothéliales mais n'a pas été montrée au niveau des cellules gliales qui contactent les capillaires (Knussel et al., 2000 ; Haenggi et al., 2004 ; Perronnet et Vaillend, 2010 ; Perronnet et al., 2012). Dans notre étude nous n'avons pas pu montrer leur expression

au contact des capillaires. Dans tous les cas, aucun marquage de la dystrophine n'as été mis en évidence ni dans les capillaires isolés du cerveau antérieur, ni dans les capillaires analysés sur tranches de tissu, suggérant que d'autre dystrophines ne pourraient pas compenser la perte de Dp71 dans l'ancrage de l'AQP4 résiduel mis en évidence au niveau périvasculaire.

De manière intéressante, nous avons mis en évidence que l'expression relative d'AQP4 et de  $\beta$ -dystroglycane n'est pas modifiée entre souris WT et Dp71-null dans la *stratum lacunosum moleculare* (SLM), même si l' $\alpha$ 1-syntrophine est absente de cette couche. La SLM est une couche spécifique dans laquelle se trouve la fissure hippocampique contenant les artérioles de large diamètre et séparant les couches dendritiques du CA1 et du gyrus denté. Une expression hétérogène d'AQP4 a été mise en évidence dans du cerveau, au sein des sous-régions laminaires de certaines structures. En particulier dans l'hippocampe, où l'expression d'AQP4 est la plus diffuse et importante dans la SLM en comparaison aux autres couches où AQP4 n'est distribué que le long des vaisseaux (Hubbard et al., 2015). Nous avons observé un intense marquage autour des vaisseaux de large diamètre, correspondant aux artérioles pénétrantes et à leurs subdivisions en artérioles précapillaires, dont on sait qu'elles sont présentes le long de la fissure hippocampique de la SLM. Ceci a été confirmé par nos expériences sur artérioles et artérioles précapillaires isolées, où chez la souris Dp71-null, le marquage d'AQP4 le long des artérioles est discontinu au lieu d'être continu comme chez la souris WT. Sur tranches d'hippocampe, nous précisons que cette expression d'AQP4 est gliale puisqu'elle se situe aux endroits où la GFAP est présente et entoure les artérioles de gros diamètre, ce qui indique que l'AQP4 est gliale au niveau des artérioles.

Nous avons également mis en évidence que l'utrophine peut être exprimée aussi bien au niveau des cellules endothéliales que des régions gliales de ces artérioles, suggérant une potentielle implication des utrophines dans l'expression résiduelle d'AQP4. De manière intéressante, la dystrophine est aussi détectée dans ces domaines aussi bien gliaux que dans l'espace entre le pied astrocytaire et la cellule endothéliale de l'artériole, même chez la souris Dp71.

L'expression de la dystrophine Dp427 dans la cellule endothéliale était déjà mise en évidence dans les muscles squelettiques (Palladino et al., 2013). Nous démontrons ici que le marquage observé entre la glie et les vaisseaux correspond à celui de la Dp427 dans les muscles lisses localisés autour des vaisseaux de large diamètre, telles que les artérioles et le segment initial des artérioles précapillaires (Rauch et al., 2012). L'expression de la Dp427 localisée dans le muscle lisse pourrait jouer un rôle protecteur en réponse à certains accidents vasculaires

(Rauch et al., 2012), et la surexpression de la Dp427 mise en évidence par western blot pourrait refléter une compensation de la perte de Dp71 au niveau des artérioles. En effet, le muscle lisse des artérioles est important pour la régulation du flux et de la pression sanguine dans l'ensemble de l'arbre vasculaire cérébral (Hill et al., 2015 ; Yoshida et al., 2005).

Dans notre étude, la Dp427 n'était pas détectée dans les cellules endothéliales en utilisant un anticorps spécifique monoclonal alors que l'utilisation d'un anticorps polyclonal dirigé contre la partie C-terminale de toutes les dystrophines révèle la présence d'un marquage endothélial également présent chez la souris Dp71-null. Ce marquage se retrouve à la fois au niveau des domaines lectine-positif et GFAP-positif entourant les artérioles de la SLM de l'hippocampe. Ces observations suggèrent qu'une dystrophine autre que la Dp71 ou la Dp427 est exprimée au niveau des cellules gliales et endothéliales entourant les artérioles précapillaires. Étant donné que la Dp260 et la Dp116 sont exprimées à d'autres niveaux, la rétine ou le système nerveux périphérique, le candidat le plus probable serait la Dp140. Son expression est mise en évidence durant le développement embryonnaire et à de plus faibles niveaux dans le cerveau adulte (Morris et al., 1995 ; Soutou et al., 2019), mais l'étude de son expression cellulaire n'est pas encore très claire. Cependant, une étude met en évidence l'expression de la Dp140 dans les vaisseaux du cerveau adulte (Lidov et al., 1995), de plus, il est clairement établi que la Dp140 peut présenter une expression ectopique dans les structures du cerveau adulte de la souris Dp71-null (Benabdesselam et al., 2010 ; 2012).

Nous avons regroupé ces résultats dans le tableau 2 ci-dessous afin d'effectuer une comparaison des altérations moléculaires dans les deux structures cérébrales, ses sous-couches et sous types cellulaires. Nous avons mis en évidence une altération partielle de l'AQP4 et du  $\beta$ -dystroglycane et totale d' $\alpha$ 1-syntrophine dans les deux structures étudiées, cervelet et hippocampe (cadrants verts, Tableau. 2). Dans chacune de ces structures, des différences en fonction du sous-type cellulaire ont été observées. En effet, indépendamment des structures, la perte de Dp71 altère l'expression d'AQP4 au niveau des astrocytes périvasculaires qui entourent les capillaires et spécifiquement dans le cervelet au niveau des cellules gliales de Bergmann en contact avec les capillaires et le LCR. En revanche, au niveau des astrocytes de type « velate » de la couche granulaire du cervelet ou des astrocytes entourant les artérioles de l'hippocampe, l'expression d'AQP4 reste préservée (cadrants rouges, Tableau 2). Dans l'hippocampe, il y a donc une différence majeure en ce qui concerne l'expression d'AQP4 et  $\beta$ -DG en fonction du type de vaisseau (cadrant jaune, Tableau 2) et/ou d'astrocyte en contact

avec ce dernier, notamment dans une région spécifique de l'hippocampe (*SLM*) où pénètrent les artérioles précapillaires. A cet endroit, des candidats protéiques (Dp427 et utrophine) détectés au niveau des artérioles ont été testés afin d'expliquer la présence d'AQP4 résiduel en l'absence de Dp71. Ni la Dp427 (muscle lisse) ni l'utrophine (endothéliale) ne compensent la Dp71 au niveau des pieds astrocytaires, en revanche la Dp140 pourrait être impliquée dans l'adressage et/ou clustering des canaux AQP4 au niveau des pieds des astrocytes en contact avec les artérioles de la SLM.

Structure cérébrale	Cervelet				Hippocampe		
	WM	GCL	MCL	GL	SO/SR	SLM	
Sous-couches							
Sous type cellulaire	Oligodendrocytes	Velate	Astrocytes péricapillaires / Capillaires	Bergmann / Capillaires	Bergmann / LCR	Astrocytes péricapillaires / Capillaires	Astrocytes / Artérioles
AQP4	+	+	↓	↓	↓	↓	+
β-DG	-	-	↓	↓	↓	↓	+
α-syn	-	-	-	-	-	-	-
Dp427						-	+
Utrophine						-	+
Dp140						-	+

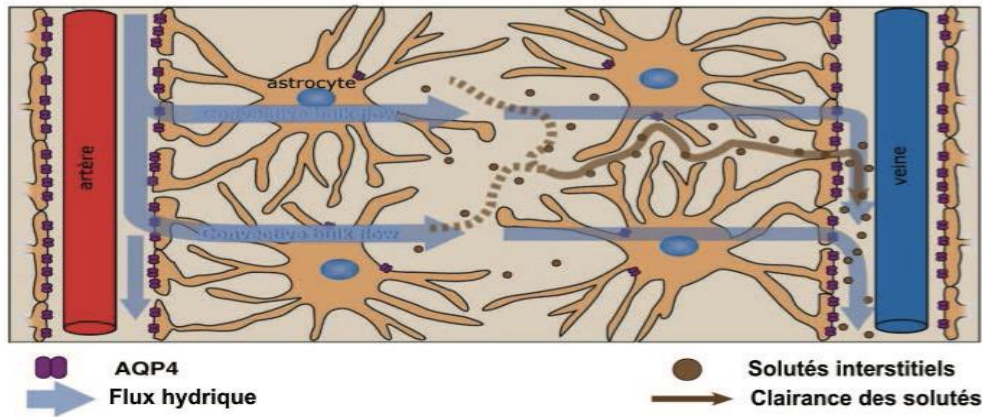
**Tableau 2 – Comparaison des altérations moléculaires dans les deux structures cérébrales, leurs sous-couches et sous types cellulaires.**

Notre seconde étude qui porte sur l'impact fonctionnel de la perte de Dp71 nous a permis de mettre en évidence par microscopie électronique une augmentation de l'épaisseur des pieds gliaux entourant les capillaires et bordant la glia limitans externe du cervelet. Ceci reflète vraisemblablement une augmentation d'eau intracellulaire dans les pieds en l'absence de Dp71, mais ceci n'est pas perceptible lorsqu'on analyse les quantités d'eau dans le cerveau par des méthodes de déshydratation ou avec plusieurs paramètres d'IRM in vivo. Des études suggèrent que du fait de la diminution des canaux AQP4 polarisés au niveau de la membrane des pieds péricapillaires et de la déficience du clustering en OAP des canaux AQP4, le flux d'eau entre la vascularisation et le parenchyme cérébral serait diminué (Amiry-Moghaddam et al., 2003a).

L'isoforme M23 permet un meilleur transport d'eau que l'isoforme M1 (Silberstein et al., 2004), et par conséquent, le rapport M1/M23 des isoformes d'AQP4 pouvant être modifié par l'absence de Dp71 (Nicchia et al., 2008), l'eau ne peut pas être rapidement évacuée, et elle s'accumulerait et conduirait à une hypertrophie des pieds gliaux. La perte partielle des canaux Kir4.1 polarisés a sans doute également un impact sur l'homéostasie hydrique et le tamponnage du potassium, puisque ces deux mécanismes sont en partie fonctionnellement couplés (Nagelhus et al., 1999 ; Kofuji et al., 2000 ; Dalloz et al., 2003 ; Chever et al., 2010).

Dans ce travail de thèse nous montrons que cette altération de l'homéostasie hydrique se concrétise tout d'abord par un gonflement des pieds des cellules de Bergmann du cervelet (microscopie électronique) et des astrocytes de l'hippocampe où des analyses d'immunofluorescence ont révélé une immunoréactivité plus forte de GFAP et AIDH1L1 dans la *stratum radiatum* en l'absence de Dp71. Des expériences complémentaires d'électrophysiologie effectuée par nos collaborateurs (M Galante, Neuro-PSI, non publié) montrent une diminution de l'espace extracellulaire dans le cervelet, ce qui confirme nos résultats suggérant une hypertrophie gliale en l'absence de Dp71.

On peut supposer également que la perte partielle d'AQP4 perturbe les mouvements d'eau du système vasculaire vers le parenchyme. Dans les conditions non basales, après intoxication hydrique, les souris Dp71-null présentent une courbe de survie qui montre une plus forte résistance à l'œdème associée à une diminution de l'ADC moins importante que les souris WT, car un plus grand nombre de souris Dp71-null possèdent un ADC supérieur à 60% de la valeur basale (avant l'intoxication à l'eau). Comment les souris Dp71-null possédant moins de canaux AQP4 peuvent-elles être plus résistante à l'œdème ? Ce résultat contre-intuitif de premier abord s'explique par le fait que les mouvements d'eau au travers des canaux AQP4 entre la circulation sanguine et le parenchyme cérébral sont bidirectionnels (Figure 43). En lien avec cette hypothèse, un nouveau concept découvert par l'équipe de Maiken Nedergaard (Ilf et al., 2012), propose l'existence d'un système spécifique de clairance des déchets produits par les neurones dans le liquide interstitiel vers le LCR puis le réseau veineux, qu'elle nomme système "glymphatique" car médié par la glie et qui s'apparente au système lymphatique.



**Figure 43 – Modèle hypothétique de clairance des solutés interstitiels médiée par les canaux AQP4.** Mise en évidence de la diffusion bidirectionnelle du flux hydrique au travers des canaux AQP4 permettant une évacuation des solutés interstitiels du tissu vers la circulation sanguine (Figure modifiée provenant de Iliff et al., 2012).

L'altération de l'homéostasie hydrique que nous avons mise en évidence ne semble cependant pas impacter la perméabilité vasculaire et se restreint au niveau de la cellule gliale. En effet, le travail de postdoctorat d'Ophélie Vacca montre que nous n'observons pas d'œdème vasogénique dont les caractéristiques sont l'altération des jonctions serrées (ZO-1, claudine-5 et occludine) ni de fuite de molécules de taille assez importante au travers de la barrière hémato-encéphalique. En revanche, certaines petites molécules peuvent passer plus facilement la BHE chez les souris Dp71-null. Mes analyses semi-quantitatives des marqueurs d'intégrité des jonctions serrées n'ont montré aucune altération de ces dernières mais j'ai observé l'altération de la VE-cadhérine, protéine des jonctions adhérentes, qui pourrait affecter la perméabilité de la BHE de façon moins importante ou spécifiquement le transport de certaines molécules (Vacca et al., *en préparation*) via des mécanismes de phosphorylation de la VE-cadhérine (Dejana et al., 2008 ; Gavard et al., 2014). Par ailleurs, d'autres mécanismes, comme l'altération de la lame basale, pourraient aussi être mis en cause. Cependant, nos résultats d'immunofluorescence sur l'expression des laminines, protéines extracellulaires liées au complexe des dystrophines et composant la lame basale, ne mettent pas en évidence d'altérations à ce niveau.

Nous avons regroupé ces résultats concernant la souris Dp71-null et les avons comparé à d'autres modèles de souris déficientes en protéines associées à la dystrophine dans le tableau 3 ci-dessous.

KO	Protéines du complexe DAPC				Protéines des jonctions Lame basale					Aspects Fonctionnels	
	$\alpha$ -syn	AQP4	Kir4.1	DG	ZO-1	Cld-5	Occl	VE-cadh	lam	Swelling astrocyte	BHE
Dp71	—	↘	↘	↘				↘		+	+/-
$\alpha$ -syn		↘	↘						?	+	
AQP4	↘	—	délais clairance K <sup>+</sup>						?	+	
Kir4.1									?		
$\alpha/\beta$ -DG		↘						↘	?	?	+
$\alpha$ -DB	↘	↘		↘			↘	?	↘	+	+
$\alpha$ 2-lam		↘		↘		↘	↘	↘		+	+

**Tableau 3 – Comparaison des altérations moléculaires et fonctionnelles des modèles KO-DAPs et Dp71-null.**

Les modèles de souris qui présentent une altération majeure de la barrière hémato-encéphalique associée à un swelling (gonflement) des astrocytes sont ceux possédant une altération de la dystrobrevine ( $\alpha$ -DB) ou de la laminine ( $\alpha$ 2-lam) (Menezes et al.2014 ; Lien et al., 2012). Les modèles KO-AQP4 et KO- $\alpha$ -syntrophine ne présentent quant à eux qu'un swelling des astrocytes sans aucun signe d'altération de la BHE. Le point commun de l'ensemble des modèles est que ceux qui présentent un swelling des astrocytes sont systématiquement associés à une diminution de l'AQP4. Notre modèle de souris Dp71-null ne possède pas une absence totale mais partielle d'AQP4 et de dystroglycane et cependant une absence totale de syntrophine. Ainsi, la souris Dp71-null partage totalement le trait caractéristique du swelling astrocytaire avec la KO-syntrophine et ne partage que partiellement le phénotype des modèles KO- $\alpha$ 2-laminine et KO-  $\alpha$ -dystrobrevine (Menezes et al.2014 ; Lien et al., 2012). En effet, la caractéristique de fuite de la BHE qui est beaucoup moins drastique ne concerne que des molécules de petite taille dans notre modèle. Peut-être que dans ces modèles dont la barrière est largement altérée, à la fois le transport au travers de la cellule endothéliale dit transcellulaire (pour des molécules > à 3nm comme l'albumine) et celui au travers des jonctions endothéliales dit paracellulaire (< à 3nm : ions, glucose) sont affectés.

Tandis que seul le transport paracellulaire via la VE-cadhérine serait altéré en l'absence de Dp71. Cependant, dans la rétine des souris Dp71-null, la barrière hémato-rétinienne (BHR) est compromise. En effet, l'albumine passe beaucoup plus facilement la BHR en l'absence de Dp71 (Sene et al., 2009). On peut se demander pourquoi la perte de Dp71 dans la cellule gliale de Müller de la rétine altère la perméabilité de la BHR, tandis que dans le cerveau la BHE n'est pas considérablement affectée. Bien que la BHR ait des propriétés similaires à celle de la BHE, leur perméabilité peut être différente dans certaines circonstances (Toda et al., 2011 ; Lightman et al., 1987). Par ailleurs, les isoformes de la Dp71 sont en proportion différente dans le cerveau comparativement à la rétine. En effet, la Dp71f est majoritaire dans la rétine alors que la Dp71d prédomine dans le cerveau, mais on ne sait pas si ces différentes isoformes jouent des rôles différents dans ces tissus et/ou peuvent plus facilement être compensées par d'autres protéines au cours du développement. La BHE pourrait être moins fragile que la BHR du fait de compensations différentes. Dans la rétine, des phénomènes inflammatoires ont été mis en évidence chez la souris Dp71-null, qui participent vraisemblablement aux altérations vasculaires observées (El Mathari et al., 2015 ; Giocanti-Auregan et al., 2016), mais ces aspects de la pathologie n'ont pas été étudiés dans le cerveau. Cette question que soulève notre étude reste à étudier et pourrait faire l'objet d'expériences futures.

Dans des conditions non basales, quand nous avons perturbé le système physiologique normal des souris, nous observons des altérations qui renforcent nos conclusions sur la présence d'œdème des cellules gliales. D'une part, des expériences réalisées en collaboration avec O.Vacca mettent en évidence que l'induction d'œdème par intoxication hydrique couplée à l'administration de vasopressine hyponatrémiant est protecteur pour les souris Dp71-null, sans doute du fait de la réduction des échanges d'eau entre le réseau vasculaire et le parenchyme cérébral. La Dp71 aurait donc un rôle facilitateur dans les échanges d'eau via la stabilisation et la polarisation des aquaporines AQP4 en OAP à la membrane des pieds gliaux périvasculaires. D'autre part, des approches électrophysiologiques réalisées par Micaela Galante dans l'équipe d'Hervé Daniel (Neuro-Psi, Orsay) dans le cadre du projet ANR collaboratif coordonné par C.Vaillend, ont permis d'évaluer le volume du milieu extracellulaire après activation neuronale par optogénétique, apportant un argument supplémentaire en faveur de l'importance de la Dp71 dans la régulation du volume cellulaire.

En résumé, la perte de la Dp71 est associée à une forte réduction de la distribution des canaux AQP4 dans les pieds gliaux périvasculaires du cervelet et de l'hippocampe. Cependant,



il subsiste une expression résiduelle d'AQP4 (de 30%) et de  $\beta$ -dystroglycane (>40%) au niveau des pieds autour des capillaires, ne dépendant pas de mécanismes compensatoires impliquant les dystrophines. En revanche, au niveau des artérioles précapillaires de l'hippocampe de la souris Dp71-null, l'expression de la Dp427 localisée dans le muscle lisse peut jouer un rôle protecteur en réponse à un endommagement de la circulation sanguine (Rauch et al., 2012), le muscle lisse des artérioles étant important pour la régulation du flux sanguin cérébral (Hill et al., 2015 ; Yoshida et al., 2005). Enfin, la Dp140 et l'utrophine peuvent potentiellement contribuer au maintien de l'expression résiduelle d'AQP4 au niveau des pieds astrocytaires des artérioles de la SLM. La perte partielle d'AQP4, et donc de son clustering en OAP à la membrane des pieds astrocytaires, conduit à une diminution des échanges d'eau et de potassium avec pour conséquence un œdème cytotoxique. Ce dernier est caractérisé par un gonflement des pieds gliaux périvasculaires et une altération mineure de la perméabilité vasculaire pour de petites molécules, probablement parce que la VE-cadhérine, protéine des jonctions adhérentes, est réduite en l'absence de Dp71.

Par ailleurs, des études suggèrent que l'AQP4 joue un rôle central dans les processus de mémoire (Skucas et al., 2011 ; Fan et al., 2013). Nous avons donc comparé dans le Tableau 4 les déficits neurophysiologiques et comportementaux des modèles KO-AQP4 et Dp71-null. On peut observer des similitudes dans les deux modèles caractérisés par une réduction de la clairance du potassium et de la plasticité synaptique (LTP) dans l'hippocampe (Fan et al., 2013 ; Yang et al., 2013 ; Li et al., 2012) ainsi qu'une réduction de la mémoire de reconnaissance spatiale (Sharfman et Binder, 2013) et de l'apprentissage spatial en piscine de Morris (Skucas et al., 2011). En revanche, l'augmentation de la transmission glutamatergique basale et l'anxiété observées dans notre modèle Dp71-null ne sont pas retrouvés chez le KO-AQP4. De plus, ce dernier présente une altération de la mémoire de peur hippocampe et amygdale dépendant alors que la perte de Dp71 n'est pas associée à ces déficits.

Les différences comportementales et neurophysiologiques observées entre les deux modèles peuvent s'expliquer par le fait que l'AQP4 n'est pas totalement absent mais reste exprimé de manière résiduelle comme cela a été décrit précédemment. D'autre part, ces déficits mnésiques peuvent être la conséquence d'une altération différente de l'homéostasie potassique entre ces modèles. Enfin, la part de contribution neuronale ou gliale dans les déficits cognitifs n'étant pas aisée à discriminer en raison des limites imposées par notre modèle de souris, la Dp71 neuronale pourrait aussi participer aux différences.

	KO-AQP4	Dp71-null
Transmission basale	—	↗
LTP (hipp)	↓	↓
Clairance K+	↓	↓
Anxiété	—	↗
Mémoire de reconnaissance spatiale	↓	↓
Apprentissage spatial	↓	↓
Contextual fear memory (hipp)	↓	—
Cued fear memory (amygdale)	↓	—

**Tableau 4 - Comparaison des modèles KO-AQP4 et Dp71-null : plasticité synaptique, mémoire et apprentissage spatial.**

La perte de l'expression polarisée d'AQP4 dans les cellules gliales est un symptôme majeur et communément partagé par de nombreuses pathologies telles que les dystroglycanopathies, l'épilepsie (Eid et al., 2005), la maladie d'Alzheimer (Yang et al., 2011) et les accidents vasculaires cérébraux (Frydenlund et al., 2006). Notre modèle de souris déficient en Dp71 apporte des données nouvelles et intéressantes qui permettent d'avancer dans une meilleure compréhension des mécanismes moléculaires à l'origine des altérations de l'expression d'AQP4 et de certaines protéines du complexe DAPC. Ainsi, la souris Dp71-null qui partage certaines caractéristiques sans pour autant ressembler à un modèle complètement déficient en AQP4 s'approche plutôt du modèle déficient en  $\alpha$ -syntrophine dont le rôle est déterminant pour les fonctions gliovasculaires. La souris Dp71-null serait donc un modèle utile afin de comprendre les bases de l'homéostasie hydrique et du flux d'eau bidirectionnel entre le parenchyme cérébral et la circulation sanguine (Amiry-Moghaddam et al., 2003a). De plus, ce modèle est intéressant pour l'étude de l'homéostasie potassique (Amiry-Moghaddam, 2003b), des facteurs conduisant à l'œdème cytotoxique (Amiry-Moghaddam et al., 2004 ; Papadopoulos et Verkman, 2005 ; Hoddevik et al., 2017) et de la fonction de la barrière hémato-encéphalique (Wolburg-Buchholz et al., 2009 ; Fukuda and Badaut, 2012 ; Vacca et al., 2014). Des études ultérieures seront déterminantes pour élucider les mécanismes participant aux déficits cognitifs et neurophysiologiques associés à la perte de la Dp71 dans la DMD.

# **PERSPECTIVES**

Dans les cas les plus sévères de déficience intellectuelle associée à la dystrophie musculaire de Duchenne (DMD), l'ensemble des dystrophines (Dp71 incluse) sont absentes (Daoud et al., 2009), alors que la perte de Dp71 seule peut induire une déficience intellectuelle sans dystrophie musculaire associée (Brouwer et al., 2014). L'expression abondante de la Dp71 à l'interface gliovasculaire dans le cerveau adulte suggère qu'une altération de la fonction gliale pourrait contribuer à la déficience intellectuelle (Ricotti et al., 2011).

Des études convergentes mettent en évidence que la perte de Dp71 diminue l'adressage et/ou la polarisation des aquaporines AQP4 au niveau de la membrane des pieds gliaux entourant les capillaires, ce qui induit des altérations de l'homéostasie hydrique et ionique cérébrale, de la perméabilité vasculaire, de la plasticité synaptique et des fonctions cognitives (Amiry-Moghaddam et al., 2010 ; Szu et al., 2016 ; Hubbard et al., 2018). Comme expliqué plus haut, des études restent à mener pour déterminer l'impact possible de ces altérations sur la perméabilité vasculaire et l'angiogénèse. Notre modèle congénital de souris Dp71-null présente ses limites et il sera difficile de déterminer si la Dp71 gliale est responsable des déficits mentionnés précédemment, du fait de la présence de la Dp71 en plus faible quantité dans les neurones, ou de la présence d'isoformes spécifiques de Dp71 dans les synapses (Dp71f, Dp40). Des altérations neuronales/synaptiques participent donc sans doute aussi aux déficits cognitifs liés à la perte de Dp71. Cependant, d'autres modèles d'étude pourraient être développés afin de tester : (1) Une souris knock-out conditionnelle privée uniquement de la Dp71 gliale afin d'étudier le comportement et la plasticité synaptique dans ces conditions pathophysiologiques spécifiques ; (2) Des ARN interférents pouvant être administrés à des souris WT afin de réduire spécifiquement l'expression de la Dp71 chez l'adulte, puis, de même, analyser leur phénotype comportemental et leur plasticité synaptique ; (3) Ré-exprimer la Dp71 via l'injection d'un vecteur dont le sérotype est spécifique de la glie ou via un promoteur glial. Nous pourrions également envisager d'induire la ré-expression d'isoformes spécifiques de Dp71. Ces dernières options correspondent aux nouveaux projets que nous avons commencé dans l'équipe. En effet, O.Vacca a déjà expérimenté l'injection intravitreuse de vecteurs AAV qui pénètrent bien dans la rétine des souris Dp71-null. En effet, les laminines composant la lame basale sont altérées et facilitent le passage du vecteur AAV au travers de la barrière hémato-rétinienne (Vacca et al., 2014). Elle a montré une restauration de la localisation d'AQP4 dans les pieds des cellules gliales de Müller ainsi qu'une récupération de la fonction de la barrière hémato-rétinienne qui était altérée (Vacca et al., 2016). Des approches similaires ont été développées dans le cerveau (postdoc d'O. Vacca), qui permettront d'évaluer la faisabilité d'une approche de thérapie génique pour restaurer les fonctions de la Dp71.

# ANNEXES

# **Partial disruption of the molecular scaffold anchoring AQP4 channels in brain glial endfeet of Dp71-null mice**

Belmaati Cherkaoui M<sup>1</sup>, Vacca O<sup>1</sup>, Isabelle C<sup>1</sup>, Boulay AC<sup>2</sup>, Claire Boulogne<sup>3</sup>, Cynthia Gillet<sup>3</sup>, Barnier JV<sup>1</sup>, Rendon A<sup>4</sup>, Cohen-Salmon M<sup>2</sup> and Vaillend C<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Neuroscience Paris-Saclay Institute (Neuro-PSI), UMR 9197, Université Paris Sud, CNRS, Université Paris Saclay, Orsay, France

<sup>2</sup>Collège de France, Center for Interdisciplinary Research in Biology (CIRB)/Centre National de la Recherche Scientifique CNRS, Unité Mixte de Recherche 7241/Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale INSERM, U1050/75231, Paris Cedex 05, France.

<sup>3</sup>*Institute for Integrative Biology of the Cell (I2BC), CEA, CNRS, Univ. Paris-Sud, Université Paris-Saclay, 91198 Gif-sur-Yvette cedex, France*

<sup>4</sup>Sorbonne Universités, UPMC Université Paris 06, INSERM, CNRS, Institut de la Vision, Paris, France.

**KEYWORDS:** Dp71d, Dp140, brain dystrophin, glial-vascular interface, intellectual disability.

**RUNNING TITLE:** Dp71 deficiency in glial cells

## **ABSTRACT**

Intellectual disability in Duchenne muscular dystrophy was associated with the loss of Dp71, the main dystrophin-gene product in the adult brain. Dp71 shows major expression in perivascular glial endfeet, suggesting dysfunctional glial mechanisms contribute to cognitive dysfunctions. In the present study we investigated the main molecular alterations induced by a selective loss of Dp71 in mice. Using semi-quantitative immunogold analyses in electron microscopy and/or immunofluorescence (IF) and confocal image analyses in tissue sections, we demonstrate a drastic but partial reduction (70%) of the polarized distribution of AQP4 channels in macroglial endfeet adjacent to capillaries in cerebellum and hippocampus, with a reduction of  $\beta$ -dystroglycan (>50%) and complete loss of  $\alpha$ 1-syntrophin. This did not depend on compensation by other brain dystrophins and was confirmed in a preparation of purified forebrain capillaries. We also identified Dp71-independent pools of AQP4 channels in specific

lamellar regions. AQP4 expression was also preserved in precapillary arterioles along the hippocampal fissure. We detected other dystrophins in arterioles, including Dp427 in smooth muscle and Dp140 in glial endfeet, which might protect them against injuries. In Dp71-null mice the absence of  $\alpha$ 1-syntrophin and reduced AQP4 polarized distribution in macroglial endfeet may likely alter water homeostasis and blood-brain barrier functions and contribute to synaptic and cognitive defects.

## INTRODUCTION

Duchenne muscular dystrophy (DMD) is a common and lethal X-linked neuromuscular syndrome caused by mutations in the *dmd* gene that encodes the dystrophin proteins (Dps). DMD is associated with variable degrees of intellectual and behavioral disabilities, depending on the position of the mutations that may lead to the cumulative loss of several brain dystrophins normally produced from distinct and independent internal promoters in a cell-specific manner (Desguerre et al., 2009). The main brain dystrophins are named Dp427, Dp140 and Dp71, due to their different molecular weights (427, 140 and 71kDa), but they contain a common C-terminal domain interacting with the dystrophin-associated protein complex (DAPC) that bridges proteins of the extracellular matrix to the actin cytoskeleton and cytosolic signaling proteins. The loss of Dp71 is a pivotal aggravating factor for cognitive status in DMD (Daoud et al., 2009), more frequently associated with intellectual disability and comorbid diagnosis of neuropsychiatric disturbances such as autism-spectrum disorders (Ricotti et al., 2016). Recent studies in mice with a selective loss of Dp71 (Dp71-null mice) unveiled presence of specific cognitive and executive dysfunctions associated with unbalanced neuronal network excitability and impaired plasticity in various brain structures involved in cognitive processes (Daoud et al., 2008; Helleringer et al., 2018; Chaussonot et al., 2019). However, the molecular and cellular mechanisms underlying Dp71-dependent brain dysfunctions are still poorly understood.

Dp71 is the most abundant *dmd*-gene product in the adult brain. It has been detected in cultured astrocytes and neurons, in the perivascular glial endfeet of brain astrocytes and retinal Müller cells, and in distinct subcellular domains of neurons, including nucleus and synapses. Multiple roles have been suggested for Dp71, including in cell cycle, cell differentiation, nuclear and membrane architecture, synaptic structure and function, and ion homeostasis by anchoring potassium and water channels in glial cells (Perronnet and Vaillend, 2010; Tadayoni et al., 2012; for reviews). Moreover, a range of alternatively spliced Dp71 isoforms have been identified in the central nervous system (CNS) (Austin et al., 2000; Aragon et al., 2018); they

might play distinct roles in this variety of cellular processes, yet their precise cellular distribution and how they are regulated is still unclear. Nonetheless, we recently showed that a subgroup of Dp71 isoforms, the Dp71d group (in which exon 78 is not spliced out), constitutes the majority of the Dp71 isoforms (around 80%) in the adult brain (Aragon et al., 2018). Importantly, most of the antibodies directed against the C-terminal part of dystrophins only recognize this group of Dp71 isoforms, which appears to have a selective expression in perivascular glial endfeet in the adult brain (Haenggi et al., 2005; Nicchia et al., 2008a; Enger et al., 2012).

In glial cells, Dp71 interacts with specific components of the DAPC, notably with  $\beta$ -dystroglycan, a key transmembrane component of the dystroglycan subcomplex that links the DAPC to extracellular laminins, and with  $\alpha$ -dystrobrevin and  $\alpha$ -syntrophin that have a role in regulating the clustering and distribution of potassium (Kir4.1) and water (AQP4) channels at the glial endfeet membrane (Tadayoni et al., 2012). The loss of Dp71 is expected to alter brain ion and water homeostasis considerably (Amiry-Moghaddam et al., 2004; Kofuji and Newman, 2004). This is supported by several studies that evidenced retinal defects in Dp71-null mice, showing that the selective deficiency of Dp71 in Müller glial cells is associated with a delocalization of AQP4 and Kir4.1 channels in perivascular endfeet, altered potassium buffering, defective osmoregulation, increased blood-retinal barrier permeability and sensitivity to edema (Daloz et al., 2003; Sene et al., 2009; Vacca et al., 2016). Importantly, AQP4 is exclusively expressed in glia and was recently associated with language-associated learning in humans (Woo et al., 2018), while its loss in mice induces phenotypes reminiscent to those we previously reported in Dp71-null mice (Daoud et al., 2008; Chausseot et al., 2019), such as impaired hippocampal synaptic plasticity and spatial learning deficits (Hubbard et al., 2018). Therefore, it seems likely that altered AQP4 distribution in glial cells contributes to the cognitive deficits associated with Dp71 loss of function in DMD.

In the present study, we estimated the distribution of AQP4 and dystrophin-associated proteins in Dp71-null mice by means of semi-quantitative immunogold analyses in electron microscopic preparations and/or immunofluorescence techniques with double labelling of glial and vascular elements followed by semi-quantitative confocal image analyses. We compared expression profiles in distinct layers of cerebellum and hippocampus, two structures that have been associated with cognitive deficits in this mouse model, and we further detailed immunofluorescence reactivity in arterioles, precapillary arterioles and capillaries purified from forebrain extracts. Our study demonstrates the presence of Dp71-independent pools of AQP4



in selective cerebellar and hippocampal layers and in specific vascular elements, as well as residual expression in glial endfeet surrounding capillaries and forming limiting membranes, highlighting the specificity of this mouse model and extending our understanding of the molecular alterations induced by Dp71 deficiency in brain tissues.

## **MATERIALS AND METHODS**

### **Animals**

Dp71-null breeders were kindly provided by Pr David Yaffe (Weizmann Institute of Science, Rehovot, Israel), who originally produced this mouse line by homologous recombination, by replacing most of the first and unique exon and a small part of the first intron of Dp71 with the promoterless gene encoding a  $\beta$ -Gal-neomycin resistance chimeric protein. This specifically abolished expression of Dp71 without interfering with other *dmd*-gene products (Sarig et al., 1999). Dp71-null mice were backcrossed for >10 generations to C57BL/6JRj mice (Janvier Labs, France) by Dr Alvaro Rendon (Institut de la Vision, Paris, France) at CDTA (CNRS, Orléans, France). Production and maintenance was undertaken in our facility by crossing heterozygous females with C57BL/6JRj males to generate Dp71-null and littermate control males (WT). Genotypes were determined by PCR analysis of tail DNA. Animals were kept under a 12 h light-dark cycle (light on 7.00 am) with food and water *ad libitum*. Brain tissues were collected in adult mice (2.5-5 mo) following guidelines of mouse facility (agreement #D91-471-104) in compliance with European Directive 2010/63/EU, French National Committee (87/848) and local Ethics Committee (Paris Centre et Sud, #59).

### **Real-time quantitative RT-PCR**

Following cervical dislocation, the hippocampus and cerebellar vermis were dissected out and total RNA was extracted following manufacturer's instruction using the NucleoSpin RNA isolation kit (Macherey-Nagel, Invitrogen). The integrity of RNA was evaluated by Nanodrop® 2000c (ThermoFischer) and Experion RNA StdSens™ (BioRad). The cDNA was synthesized using the Reverse Transcriptase iScript kit (BioRad) from samples diluted 1:10 to obtain 0.5  $\mu$ g/ $\mu$ l of RNA in a final volume of 13  $\mu$ l (2  $\mu$ l nuclease-free water, 4  $\mu$ l reaction mix 5X, 1  $\mu$ l iScript). RT-PCR was run with a Mastercycler personal® thermocycler (Eppendorf) as follows: 25°C for 5 min, 42°C for 30 min and 85°C for 5 min. The qPCR was performed with triplicate samples and three calibrating housekeeping genes (HPRT1, UBC and PGM1). Quantities of

cDNA corresponding to 0.5 µg per µl of mRNA were added to the SYBR Green Master Mix (BioRad) with 375 nM of each primer to a final volume of 20 µl, and then placed into a CFX96 Touch Real-Time PCR Detection System (Biorad) at 95 °C for 3 min, followed by 40 cycles at 95 °C for 10 s and 60 °C for 1 min. For relative comparison, the Ct values of real-time PCR results were analyzed using the  $\Delta\Delta C_t$  method. Primers designed using the A Plasmid Editor software (Sun Microsystems, USA) are detailed in [Supplementary Table S1](#).

### **Antibodies and cell immunomarkers**

The rabbit polyclonal IgG antibodies were: H4 directed against exons 78-79 of the C-terminus dystrophin (1:400), LG5 anti- $\beta$ -dystroglycan (1:400) and K7 anti-utrophin (1:200) (gift from D. Mornet, Montpellier), anti-Aquaporin-4 (AQP4 300-314) and anti-alpha-1 syntrophin (1:200; Alomone labs, Israël), anti-alpha smooth muscle actin (anti-SMA; 1:200; Sigma) and anti-Glial Fibrillary Acidic Protein (anti-GFAP; 1:1000, Dako, Denmark). The mouse monoclonal antibodies were: Anti-GFAP (1:500, Sigma-Aldrich) and anti-Dp427 N-terminal NCL-Dys1 (diluted 1/3; Leica Biosystem). The secondary antibodies were: goat anti-rabbit conjugated to Cy3 (diluted 1:400, Jackson ImmunoResearch, USA) and goat anti-mouse IgG H&L (diluted 1:400 Alexa Fluor® 647, Abcam). The *Lycopersicon esculentum* lectin Dy-Light 488 (1/100, Vector laboratories), specific of N-acetyl-D-glucosamin and N-acetyl-polylactosamine oligomers ([Kawashima et al., 1990](#); [Porter et al., 1990](#)), was used as an endothelial marker to study the vascularization and as a control for normalization of immunofluorescence quantifications.

### **Western blots**

Following cervical dislocation, the hippocampus was dissected out and frozen in liquid nitrogen with ceramic beads (MO Bio kit, Qiagen). Samples were homogenized by centrifugation (6800g, 20s, 2-3 times) in a RIPA-SDS lysis buffer with Halt protease inhibitor cocktail (1X). Protein content was quantified using the Pierce™ BCA protein assay kit (Life Technologies, France). Proteins (50 µg) were separated on NuPAGE® Tris-Acetate 4–12% gradient gels (Invitrogen) at 150V for 1h15 and electrotransferred (30V, 1h) onto polyvinylidene difluoride membranes (PVDF; Millipore, USA). PVDF membranes were blocked for 1h at RT in Pierce™ Milk Blocking buffer (Life Technologies, France) and then incubated overnight at 4°C in the same blocking buffer with the primary pan-specific polyclonal antibodies directed against dystrophins (H4, 1:5000). Membranes were then washed and incubated for 1h RT with a goat anti-rabbit secondary antibody conjugated to horseradish peroxidase (Jackson

Immunoresearch laboratories). A monoclonal anti- $\beta$ -actin antibody (1/15000, Sigma-Aldrich) was used as loading controls to normalize expression levels in each sample. Chemiluminescence was performed using ECL plus Western blotting detection system (GE Healthcare, Germany) and gels were analysed using a C-Digit Li-Cor scanner and Image Studio software.

## **Immunofluorescence studies**

### *Preparation of tissue sections*

Brains were dissected out following cervical dislocation, fresh frozen in powdered dry ice. Sagittal cerebellar sections (formalin fixed: 12  $\mu$ m thick; fresh-frozen: 30 $\mu$ m thick) were cut in a cryostat and collected on SuperFrost Plus glass slides (Roth, France) and stored at -80°C. Tissue sections were postfixated in acetone-methanol (1:1, -20°C, 5 min) before immunocytochemistry, as previously described (Daoud et al., 2009; Vaillend et al., 2010).

### *Isolation of brain vessels*

Mechanical purification of brain vessels from 7-month-old mice was performed as described in Boulay AC, 2015. Brains were placed in 20 ml of buffer B1 (1.5 ml of HEPES 1M to 150 ml of HBSS). Then, using two scalpels, brains were manually cut in small pieces (~2 mm). Brain tissue were homogenized with an automatized Dounce homogenizer performing 20 strokes at 400 rpm. The homogenate was transferred to centrifugation at 2,000 g for 10 min at 4°C and the supernatant was removed. The pellet remained was resuspended in 10 ml of a second buffer B2 (3.6 g of Dextran to 20 ml of B1), vigorously shaken for 1 min and centrifuged at 3,200 g for 15 min at 4°C. Myelin form a white layer at the surface of the supernatant. After discarding myelin with supernatant, the pellet was resuspended in 1 ml of a third buffer B3 (1 g of BSA to 100 ml of B1) by pipetting up and down with low-bindings tips. The vessel preparation was filtered onto a 100  $\mu$ m-mesh filter to preferentially retain larger vessels while the flow-through containing microvessels is filtered on a 20  $\mu$ m-mesh filter as above. At least, the filters were immersed in a beaker containing the B3 solution. The vessels were detached from the filter and then poured in a plastic tube to centrifugation at 2,000 g for 5 min at 4°C. Purified brain vessels were immobilized on a glass slide coated with Cell Tak (Corning) and fixed with 4% Paraformaldehyde for 15 min before immunocytochemistry.

### *Immunocytochemistry*

Briefly, tissue sections and purified vessels were washed 3 times in 0.1 M phosphate-buffered saline (PBS), incubated for 45 min in a blocking solution containing 10% normal goat serum, 0.3% Triton X-100, and 1% bovine serum albumin, then overnight at 4°C with the primary antibodies and Lycopersicon esculentum lectin Dy-Light 488 (Vector laboratories). They were then washed, incubated 1h at RT with secondary antibodies (1:500) conjugated to Alexa fluor (Invitrogen, France) or Cyanine 3 (Jackson ImmunoResearch, USA) and coverslipped using a medium containing an instant-blue nuclear probe fluorescing (405 nm) compound (DAPI Fluoromount-G, Clinisciences, France). No staining was observed when primary antibody was omitted.

### *Confocal image analyses.*

Images were collected using a laser scanning confocal microscope LSM 700 (Zeiss) at 555 nm, 488 nm, 647 nm (or 694 nm for anti-rat secondary antibody) and 405 nm for DAPI. Sequential dual-channel recording of multi-labelled sections were taken at equivalent locations and exposure times in both genotypes and the intensity of the excitation lines for secondary antibodies and DAPI was adjusted to avoid cross-excitation of the fluorochromes. For quantification, stacks of images (106.7µm x 106.7µm) spaced by 300 nm were imported using EC Plan-Neofluar x40 objectives and taken with constant settings (1024 x 1024 px; 313nm/px resolution). Images were processed with ImageJ using a maximum intensity projection of all the z-stack images and were then Z projected. The fluorescence area was quantified with the ImageJ software and a total tissue surface of 39 375 µm<sup>2</sup> per mouse was sampled. Relative expression of the target proteins expressed along the walls of blood vessels was normalized to that of the endothelial marker lectin, i.e. as a parameter reflecting the vascular density in each image.

### **Immunogold electron microscopy**

Mice were deeply anesthetized by intraperitoneal injection of a ketamine (60mg/kg) / domitor (1mg/kg) mix and received intracardiac injection of 0.1ml heparin (500 UI). They were then intracardially perfused (7.5ml/min) with a 0.1M phosphate buffer (PB) containing heparin (10 UI) for 30s and then with 60ml of a fixative solution containing 4% PFA and 1.2% picric acid in 0.1 M PB (pH 7.3-7.4). Brains were removed from skull and postfixed overnight in 4% PFA. The cerebellum was then cut as 300µm-thick sagittal slabs with a vibrating microtome (VT

1000 S, Leica, Vienna, Austria). Pieces of cerebellar lobules were dissected under stereomicroscope (1-2mm, 5th-6th lobules around primary fissure, lateral 1.68-0.84) (Paxinos and Franklin 2001) and cryoprotected by immersion in graded concentrations of glycerol (10, 20, 30 %). Punches of tissue section (1 mm in diameter) including glia limitans, molecular cell and Purkinje cell layers were cryofixed by High Pressure Freezing (EMPACT2, Leica). The samples were then processed and sectioned as previously described (Puwarawuttipanit et al., 2006), briefly: a freeze-substitution in 1% uranyl acetate in methanol at -90°C for 12h (AFS2, Leica) and embedding in Lowicryl HM20 resin (EMS, #14345) at -45°C for 2 days. For immunolabeling, 70nm-sections cut with a 35° diamond knife were floated successively 5 min in 0.5% Tween-PBS, 10min in 50mM Glycine-PBS, 30min in Blocking solution (Aurion, #905.002), 10min in 0.1% BSAc\_PBS (Aurion, #900.099) and incubated overnight at 4°C in the rabbit polyclonal anti-AQP4 primary antibody (1:40; Alomone, Israel). The sections were then washed several times in PBS-BSA-c and incubated 30 min RT with a 1:20 dilution of a goat F(ab')<sub>2</sub> anti-rabbit secondary antibody conjugated to 10-nm gold particles (Aurion). They were rinsed several times in PBS and ultrapure water and contrasted with uranyl acetate (10 min) and lead citrate (5 min). Control sections were obtained by omitting the primary antibody. Transmission Electron microscopic micrographs were obtained at 7000x using a JEOL1400 microscope operating at 80 kV and equipped with a digital camera (Gatan Orius). Experiments were conducted in 2 mice of each genotype (3 grids and at least 25 images per mouse). Quantification was obtained by manually counting the gold beads located at the glial endfeet membranes along cross-sectional capillaries (n>10 capillaries, and > 180µm membrane length per genotype) and glia limitans (>140 µm membrane length per genotype). Membrane lengths were measured using the Fiji software (<https://fiji.sc/>) by boundary tracing of membranes from mosaic images in order to express counts as the number of gold beads per µm.

## **Statistics**

Data are expressed as means ± SEM. Semi-quantitative changes are shown as fold changes in comparison with WT mice. Genotype effects were evaluated by Mann-Whitney nonparametric tests considering P-values <0.05 as statistically significant.

## RESULTS

### **Figure 1**

The H4 polyclonal antibody directed against the C-terminal part of dystrophins revealed a strong immunoreactivity (IR) along the walls of blood vessels in all layers of hippocampus and cerebellar lobules in WT mice, as well as in the glial foot processes under the pia mater (glia limitans, GL) in the cerebellum (Fig. 1A). This labelling was completely absent in tissue sections from Dp71-null mice, indicating that it selectively corresponded to Dp71 expression. High-resolution confocal images taken at higher magnification in tissue sections double-stained with H4 antibody and *Lycopersicon esculentum* lectin, a marker of mouse vascular endothelium, confirmed that Dp71-IR surrounded the abluminal side of the capillaries. No overlap between the two IR signals was detected in WT mice (Fig. 1B). This confirms that Dp71 expression is distributed along the membrane of perivascular astrocyte endfeet, as previously demonstrated by others (Haengy et al., 2004; 2006; Enger et al., 2012).

There are converging evidence that Dp71 plays a key role in anchoring and/or stabilizing AQP4 channels at the membrane of glial cell endfeet in the central nervous system (Daloz et al., 2003; Haenggi et al., 2004; Nicchia et al., 2004; Enger et al., 2012). In a first experiment we analysed the expression levels of AQP4 mRNA in both hippocampus and cerebellum using qRT-PCR (Fig. 1C). Interestingly, this revealed that the AQP4 mRNA was upregulated in hippocampus while its level of expression was unchanged in the cerebellum. Although AQP4 mRNA upregulation has been previously reported in the retina of Dp71-null mice (El Mathari et al., 2015; Vacca et al., 2016), our present result suggested that AQP4 transcription is differently regulated in hippocampus and cerebellum in Dp71-null mice, which prompted us to investigate expression of AQP4 and other Dp71-related proteins in these two main brain structures.

### **Figure 2**

Using immunofluorescence techniques and confocal image analyses, we first characterized the expression of aquaporin-4 channels (AQP4) in cerebellar sections from WT and Dp71-null mice. As shown in Fig. 2 A, in WT mice AQP4 was not only detected along the walls of capillaries and GL, but also in astroglial processes in the granular cell layer (GCL) (see details in Supplementary Fig. S1) and in the White Matter (WM). The glial cell subtype present in the MCL is the Bergmann glial cell, which radial processes pass through the MCL to form the glia

limitans and the glial-vascular interface around capillaries. The anti-AQP4 antibody strongly stained the walls of capillaries in MCL and the glia limitans, suggesting a selective expression of AQP4 with Dp71 at the glial endfeet of Bergmann glial cells. In Dp71-null mice, the loss of Dp71 was associated with a strong downregulation of the AQP4 protein along the walls of capillaries in the molecular cell layer (MCL). However, our confocal image analysis revealed a residual expression along blood vessels in the MCL, which was estimated about 30% of WT levels by our semi-quantitative analysis. It likely corresponded to a glial expression since it did not appear to show overlap with lectin in high magnification images of capillary's transversal planes (Supplementary Fig. S2). There was also a residual expression along the glia limitans, while the expression levels of AQP4 was largely preserved in the GCL and WM in Dp71-null mice (Fig. 2B; Supplementary Fig. S1). This suggests that Dp71 is only involved in the polarized distribution of AQP4 channels at the membrane of perivascular glial endfeet. The residual expression in other cerebellar layers and cell types likely corresponded to expression of a distinct Dp71-independent pool of AQP4, as suggested by others (Nicchia et al., 2008a). To further characterize AQP4 expression and distribution in the endfeet of Bergmann glial cells, we quantified AQP4 immunogold labelling in transmission electron microscopy (TEM) micrographs (Fig. 2 C-D). The density of immunogold beads was normalized to the length of the sampled glial-endfeet membranes and non-specific binding was minimal when the primary antibody was omitted (histograms in Fig. 2 C-D). AQP4 channels were observed in the endfeet surrounding capillaries (Fig. 2C) and forming the glia limitans (Fig. 2D). The density of AQP4 channels was significantly decreased in glial endfeet of Dp71-null mice for both capillaries and glia limitans (Fig. 2 C-D). The level of residual expression of AQP4 was again estimated about 30% of WT levels, which further supported the reliability of the semi-quantitative analysis in our immunofluorescence study. Moreover, this confirms Dp71 implication in AQP4 distribution in Bergmann glial endfeet surrounding blood vessels and forming the glia limitans.

### **Figure 3**

Because the correct distribution of AQP4 in perivascular astrocytes has also been shown to depend on expression of other dystrophin-associated proteins (DAPs), we also quantified expression of the transmembrane  $\beta$ -dystroglycan (Fig. 3A) and cytosolic  $\alpha$ -syntrophin (Fig. 3B), two main components of the dystrophin-associated protein complex interacting with extracellular-matrix and intracellular signaling proteins, respectively. Both DAPs showed a Dp71-like expression pattern in the perivascular regions and along the glia limitans in WT mice.



In Dp71-null mice, the expression of  $\beta$ -dystroglycan was reduced by about 50-60% while  $\alpha$ -syntrophin was virtually absent (Fig. 3 A-B; Supplementary Fig. S2). This confirms that Dp71 loss differently alters the expression of distinct DAPs (Nicchia et al., 2008a), which might in part contribute to maintain a residual expression of AQP4 in perivascular domains.

#### **Figure 4**

We then analyzed expression of Dp71-associated proteins in the hippocampus (Fig. 4), another brain structure in which Dp71-dependent alterations likely contribute to the genesis of cognitive deficits in Dp71-null mice (Daoud et al., 2008; Chausseot et al., 2019). Alike in cerebellum, AQP4 IR was strongly reduced along the walls of capillaries in all hippocampal layers (Fig. 4A). While AQP4 mRNA was overexpressed in hippocampal extracts (see Fig. 1C), AQP4 IR was clearly reduced by >50% in hippocampal SO and SR (Fig. 4A). Residual expression of AQP4 (Fig. 4A) and  $\beta$ -dystroglycan (Fig. 4B) in Dp71-null mice was demonstrated in perivascular domains of capillaries, while  $\alpha$ -syntrophin was almost undetectable in all hippocampal layers (Fig. 4C; Supplementary Fig. S2). Interestingly, while the residual expressions of AQP4 and  $\beta$ -dystroglycan in Dp71-null mice were estimated <50% in dendritic layers of *stratum oriens* (SO) and *stratum radiatum* (SR), their expression levels were comparable to WT levels in the *stratum lacunosum moleculare* (SLM). High expression of AQP4 in the SLM, not restricted to perivascular regions, has been previously reported (Hubbard et al., 2015). However, one particularity of the SLM, compared to the other hippocampal layers, is the presence of large-diameter arterioles and precapillary arterioles. In this hippocampal layer, there was a clear downregulation of AQP4 and  $\beta$ -dystroglycan along the walls of capillaries, as in the other hippocampal layers. But in marked contrast, there was an intense IR for AQP4 and  $\beta$ -dystroglycan surrounding the arterioles and precapillary arterioles that are scattered along the hippocampal fissure between the SLM and the dentate gyrus. This suggests that the loss of Dp71 did not affect AQP4 polarization in these specific large-diameter vascular elements in the hippocampal SLM.

#### **Figure 5**

Analysis of AQP4 and  $\beta$ -dystroglycan in purified forebrain precapillary arterioles and arterioles confirmed their expression in face of lectin-positive vascular walls in WT mice (Fig. 5). In Dp71-null mice, both precapillary arterioles and capillaries displayed a residual expression of



AQP4 and  $\beta$ -dystroglycan, which was characterized by a punctate IR along vascular walls compared to the continuous IR seen in vessels from WT mice. Hence, the reduced expression of AQP4 and  $\beta$ -dystroglycan in Dp71-null mice was associated with their altered spatial distribution, thus highlighting the major role of Dp71 in the polarized clustering of these proteins at the glial endfeet membrane.

## **Figure 6**

Triple immunofluorescence staining was then performed in hippocampal tissue sections using the anti-AQP4 antibody, an anti-GFAP glial marker and the endothelial marker, lectin, to further determine the subcellular residual expression of AQP4 in precapillary arterioles of the hippocampal SLM region (Fig. 6A). In both WT and Dp71-null mice, AQP4-IR overlapped GFAP-IR, thus indicating that both normal and residual expression of AQP4 was at the membrane of glial endfeet contacting precapillary arterioles. Using the H4 antibody directed against the C-terminal part of dystrophins revealed expression of dystrophin products in both GFAP-positive and lectin-positive domains (Fig. 6B). In WT mice, most of dystrophin-IR was in GFAP-positive elements surrounding the arterioles. In Dp71-null mice, dystrophin-IR was clearly present in lectin-positive domains, suggesting the presence of another brain dystrophin-gene product, such as Dp427 or Dp140. There was also a punctate expression of dystrophin IR in GFAP-positive domains in Dp71-null mice. This suggests that one of these dystrophins could also contribute to AQP4 clustering or polarization in glial elements contacting precapillary arterioles (Barnea et al., 1990; Chelly et al., 1990; Lidov et al., 1995), even in the absence of Dp71. Expression of  $\beta$ -dystroglycan (Fig. 6C) and utrophins (Fig. 6D) were also found surrounding precapillary arterioles in both WT and Dp71-null mice. Only one part of the staining obtained using our pan-specific antibody recognizing all utrophin-gene products overlapped with lectin, suggesting that some utrophin-gene products could be expressed in endothelial and/or glial compartments around precapillary arterioles. In capillaries of tissue sections (small vessels in Fig. 6D) and purified vessels (not shown), however, the two markers seemed to overlap, and due to their small diameter it was not possible to conclude on a possible expression of utrophins in glial endfeet surrounding capillaries. Utrophins were also detected in purified forebrain precapillary arterioles with the same antibody, without showing any obvious alteration of their expression in Dp71-null mice (Fig. 6E). This antibody can detect all utrophin-gene products, as it is directed against the C-terminal part of the protein common to all utrophins (Perronnet et al., 2012). Therefore, we cannot rule out that distinct utrophins were

expressed in glial and vascular elements, as well as in arterioles versus capillaries. The presence of some dystrophin-IR was also clearly confirmed along the walls of purified precapillary arterioles from Dp71-null mice, but not in their capillaries (Fig. 6F). Hence, if another dystrophin participates to the residual AQP4 clustering surrounding precapillary arterioles in Dp71-null mice, this may not explain its residual expression in capillaries.

### **Figure 7**

To further determine the presence of other dystrophins that may contribute to some compensatory mechanisms in hippocampus, we used our pan-specific anti-dystrophin antibody in Western blots. We performed a semi-quantitative evaluation of dystrophins expression levels (Dp427, Dp140, Dp71) in the hippocampus of WT and Dp71-null mice. As expected Dp71 was not expressed in the transgenic mouse, but more surprisingly we detected a significant overexpression of the full-length dystrophin, Dp427, in the Dp71-null mice (Fig. 7A). We then used the monoclonal DYS1 antibody directed against the N-terminal part of the full-length dystrophin in immunofluorescence assays, to determine a putative compensatory expression of Dp427 in vascular elements. In hippocampal tissue sections, we confirmed that Dp427 has a neuronal expression characterized by punctate staining in synapses of CA1-3 pyramidal neurons, while it was absent in the capillaries (not shown). A vascular Dys1-positive staining was only found in the large-diameter vascular elements scattered within the SLM, suggesting that Dp427 was expressed in arterioles and/or precapillary arterioles. Interestingly, there was a main staining located between GFAP-positive and lectin-positive domains, suggesting expression in smooth muscle rather than glial or endothelial structures (Fig. 7B). To further confirm this hypothesis, we used triple staining of Dp427, alpha-smooth muscle actin ( $\alpha$ -SMA) and lectin. As shown in Fig. 7C, the anti- $\alpha$ -SMA antibody only labelled the larger segments of precapillary arterioles in hippocampal tissue sections, not the smaller lectin-positive precapillary arterioles and capillaries. Likewise, Dp427-IR was only found surrounding large-diameter arterioles but not in other lectin-positive vascular elements. This was confirmed by showing a full overlap of DYS1-IR and  $\alpha$ -SMA-IR in purified arterioles in both WT and Dp71-null mice, while the DYS1-IR showed no overlap with endothelial lectin (Fig. 7D). Hence, the vascular expression of Dp427 was restricted to arterioles containing smooth-muscle. The dystrophin-gene product detected in GFAP-positive cellular elements (Fig. 6B) may therefore correspond to the expression of Dp140.

## DISCUSSION

The most severe cases of intellectual disability (ID) in DMD occur when all dystrophins including Dp71 are missing (Daoud et al., 2009), yet it was also reported that a selective loss of Dp71 function can induce ID without muscular dystrophy (Brouwer et al., 2014). The major expression of Dp71 at the glial-vascular interface in the adult brain suggests that a dysfunctional glial mechanism contributes to ID in this syndrome (Ricotti et al., 2011). Converging evidence indicate that the loss of Dp71 impairs the clustering of aquaporin (AQP4) water channels in the glial endfeet adjacent to capillaries, which may induce critical alterations in water and ion brain homeostasis, vascular permeability, synaptic plasticity and cognitive functions (Amiry-Moghaddam et al., 2010; Hubbard et al., 2018). In the present study, we used the Dp71-null mouse to characterize the altered distribution of AQP4 channels in two main brain structures that have been associated with cognitive and neurophysiological defects in this mouse, the cerebellum (Helleringer et al., 2018) and the hippocampus (Daoud et al., 2008; Chausseot et al., 2019). We found there is a residual expression of AQP4 in selective layers of these brain structures and in specific gliovascular elements, thus highlighting that the loss of Dp71 cannot fully recapitulate the glial and vascular alterations reported in AQP4-KO mice.

The link between Dp71 and AQP4 channels in brain glial cells was originally investigated using pan-specific anti-dystrophin antibodies in mouse models lacking several dystrophin-gene products, such as the mdx3cv mouse, leaving some uncertainty regarding the specific impact of Dp71 loss on expression and distribution of Dp71-associated proteins (e.g., Haenggi et al., 2004; Nicchia et al., 2008b, Enger et al., 2012). Indeed, the lack of other dystrophins may also alter glial and endothelial structure and function. This is supported by the presence of a downregulation of AQP4 and increased vascular permeability in the Dp427-deficient mdx mouse (Nico et al., 2003), yet the underlying pathophysiological mechanisms are still unclear and perhaps indirect in this DMD mouse model (Nico et al., 2006). In the mdx3cv mouse, which is expected to lack all dystrophins, several studies pointed to the presence of low-level residual expression of dystrophin (Li et al., 2008; 2010) and upregulation of utrophin paralogues (Culligan et al., 2001), which might participate to compensatory mechanisms (e.g., Vaillend and Ungerer, 1999). Pioneer studies in the Dp71-null mouse however confirmed localization of Dp71 in the endfeet of radial glial cells, such as the Müller glial cells in the retina (Daloz et al., 2003) and in the Bergmann glial cells in the cerebellum (Nicchia et al., 2008a). In the present study, we confirmed the expression of Dp71 along the walls of capillaries in the molecular cell layer (MCL) and along the glia limitans of the cerebellum, i.e. in the endfeet of Bergmann glial cells. We further demonstrate a similar subcellular localization in the perivascular astrocyte

endfeet in the hippocampal formation. Dp71 immunostaining did not overlap with the endothelial marker lectin, thus confirming its localization at the membrane of glial endfeet in face of vascular endothelial cells.

In the cerebellum, there was a residual expression of AQP4 in the granular cell layer (gcl) and in the white matter, in which no dystrophin could be detected in WT mice with our pan-specific antibody. This is in agreement with a previous study performed in the same mouse model (Nicchia et al., 2008a), demonstrating that Dp71 deficiency primarily impacts expression of the two main AQP4 isoforms involved in the formation of large orthogonal arrays of particules (OAPs) in the cerebellum, AQP4-M1 and AQP4-M23, while Dp71-independent pools of AQP4 composing smaller OAPs in specific cerebellar layers were unaffected. Here our quantifications confirmed that the Dp71-independent pool of AQP4 is fully maintained in gcl and white matter, with partial overlapping of AQP4 IR with GFAP-positive processes in gcl, likely corresponding to velate astrocytes (Nicchia et al., 2008).

Importantly, even if AQP4 expression was drastically reduced along capillaries in the MCL, it was not completely abolished by the loss of Dp71. We used semi-quantitative approaches to estimate the amount of residual AQP4 expression in perivascular glial endfeet, either with confocal image analyses of AQP4 IR along vascular walls in cerebellar sections, or with electron microscopic analyses of immunogold labelling of AQP4 channels at the glial endfoot membrane contacting the basal lamina surrounding capillaries. Both methods detected a 30% residual expression of AQP4 channels, thus demonstrating a partial loss of AQP4 polarized expression in cerebellar Bergmann glial cells. Likewise, confocal image analyses revealed a 30-40% residual expression of AQP4 in astrocyte endfeet adjacent to capillaries in the dendritic areas of the CA1 hippocampal subfield (*stratum oriens* and *stratum radiatum*). AQP4 polarized expression was thus partially preserved in perivascular astrocytes of this forebrain structure. This was confirmed by our study of forebrain purified vessels, which showed a residual expression of AQP4 characterized by punctate staining along the walls of capillaries as compared to the continuous staining found in vessels from WT mice.

In the same cerebellar and hippocampal layers that showed a 30% residual expression of AQP4, the  $\beta$ -dystroglycan IR was reduced by about 50-60% along capillaries, while that of  $\alpha$ 1-syntrophin was undetectable. The alteration of  $\beta$ -dystroglycan and AQP4 distribution support the current hypothesis that Dp71 is the main dystrophin responsible for anchoring AQP4 and assembling the DAPC at the membrane of brain perivascular glial endfeet (Neely et al., 2001; Amiry-Moghaddam et al., 2004). Most strikingly, Dp71 appears to be required for  $\alpha$ 1-syntrophin expression and distribution in the glial endfeet. The  $\alpha$ 1-syntrophin isoform is a major

determinant of OAP size at the glial-vascular interface (Hoddevik et al., 2017), owing to the critical interactions between the PDZ domains of these two proteins (Adams et al., 2001). It has been suggested that a parallel reduction in AQP4 and  $\alpha$ -syntrophin occurs at the perivascular level in mice lacking Dp71 (Nicchia et al., 2008a). However, this was not found in the present study, as  $\alpha$ 1-syntrophin was undetectable while AQP4 showed a 30% residual expression. Other proteins interacting with the DAPC have been involved in the clustering of AQP4 and formation of OAPs, such as  $\beta$ -dystroglycan (Noell et al., 2011), which expression is only partly affected in Dp71-null mice,  $\alpha$ -dystrobrevin (Bragg et al., 2010; Lien et al., 2012) or AQPex (Palazzo et al., 2019). Our present results show that Dp71 loss differently alters the expression of distinct DAPs, some of which might contribute to maintain a residual expression of AQP4 in perivascular domains. We show the presence of some dystrophin paralogs, such as utrophins, in hippocampal capillaries, which might participate to putative compensation, yet it is rather believed that utrophin-gene products are expressed in endothelial cells forming the capillaries, not in the perivascular glial cell endfeet (Knuesel et al., 2000; Haenggi et al., 2004; Perronnet and Vaillend, 2010; Perronnet et al., 2012). In any cases, no dystrophin IR was detected in purified forebrain capillaries nor in capillaries analyzed in tissue sections, suggesting that other dystrophins did not compensate for Dp71 loss to maintain residual AQP4 expression in perivascular domains.

Interestingly, we found that the relative expression levels of AQP4 and  $\beta$ -dystroglycan in the *stratum lacunosum moleculare* (SLM) were comparable between Dp71-null and WT mice, even though  $\alpha$ 1-syntrophin was also absent of this layer. The SLM is a specific layer of the hippocampus that contains the hippocampal fissure separating the dendritic layers of CA1 and dentate gyrus. Heterogeneous expression of AQP4 in brain tissue parenchyma and neuropil of selective laminar regions was reported by others, particularly in the SLM where AQP4 shows its highest hippocampal levels, in marked contrast with the uniformly distributed staining along blood vessels throughout the hippocampus (Hubbard et al., 2015). Besides the diffuse AQP4 staining in this layer, we noticed an intense staining for AQP4 around large-diameter blood vessels, likely corresponding to arterioles and precapillary arterioles, which are known to be scattered along the hippocampal fissure in the SLM. This was confirmed in our preparations of purified forebrain arterioles and precapillary arterioles, yet the spatial distribution along the walls of arterioles was characterized by discontinued marking in Dp71-null mice compared to the continuous staining in WT mice. In hippocampal tissue sections of both WT and Dp71-null mice, AQP4 IR was in GFAP-positive domains surrounding these large-diameter vessels, indicating a glial expression. We also showed that some utrophin-gene products could be

expressed in endothelial as well as glial compartments surrounding arterioles, suggesting a putative involvement in AQP4 residual expression. Importantly, dystrophin expression was also detected in these domains, as well as in other cellular domains between the vessel subluminal region and GFAP-positive glial endfeet. We demonstrated that this latter staining corresponded to expression of the full-length Dp427 dystrophin in the smooth muscles of arterioles and in the largest segments of precapillary arterioles, as suggested earlier (Rauch et al., 2012).

Expression of a dystrophin-gene product in endothelial cells within skeletal muscles has been previously suggested (Palladino et al., 2013). In the present study, Dp427 was not detected in brain endothelial cells using a specific monoclonal antibody, while an IR signal was found using a polyclonal antibody directed against the C-terminal of dystrophins. Staining with this latter antibody was also detected in Dp71-null mice, in both lectin-positive cells and as punctate IR in GFAP-positive elements, around arterioles of the hippocampal SLM. This suggests that another brain dystrophin, not Dp71 or Dp427, was expressed in endothelial cells and glial endfeet around precapillary arterioles. Since Dp260 and Dp116 are expressed in retina and peripheral nerve, respectively, it follows that the most likely candidate is Dp140. Dp140 has a strong expression during embryonic development and is expressed at low levels in adult brain tissues (Morris et al., 1995; Soutou et al., 2019). Its cellular distribution is still unclear but it has been detected in brain blood vessels in a seminal study (Lidov et al., 1995). Moreover, it was previously reported that Dp140 could show ectopic induction in adult brain structures of Dp71-null mice (Benabdesselam et al., 2010; 2012).

In summary, a selective deficiency in Dp71 was associated with a drastic reduction of the polarized distribution of AQP4 channels in perivascular glial endfeet in both cerebellum and hippocampus. Nevertheless, there was a residual expression of AQP4 (around 30%) and  $\beta$ -dystroglycan (>40%) in dystrophin-negative glial endfeet surrounding capillaries, which therefore did not depend on compensatory mechanisms involving other dystrophin-gene products. In contrast, we also show that hippocampal precapillary arterioles of Dp71-null mice express Dp427 in vascular smooth muscle, which may likely protect arterioles against injuries (Rauch et al., 2012), while Dp140 and some putative utrophin-gene product may likely contribute to the partial maintenance of AQP4 channels in arteriole-associated glial endfeet.

A loss of the polarized expression of AQP4 in macroglial cells is a feature of several pathologies beyond dystrophinopathies, including epilepsy (Eid et al., 2005), Alzheimer's disease (Yang et al., 2011) and ischemic strokes (Frydenlund et al., 2006). A better understanding of the molecular mechanisms underlying defects in AQP4 polarized distribution in macroglial cells is therefore important for a range of clinical conditions. The present mouse model may provide



new interesting outcome measures caused by partial AQP4 delocalization. Although the Dp71-null mouse clearly cannot recapitulate the phenotypes displayed by AQP4 full knock-out models, it has a complete loss of  $\alpha$ -syntrophin, a major determinant of gliovascular functions. This mouse model may therefore be useful to understand the basis of bidirectional water flow between blood and brain (Amiry-Moghaddam et al., 2003a), potassium homeostasis (Amiry-Moghaddam, 2003b), risk factors for cytotoxic edema (Amiry-Moghaddam et al., 2004 ; Papadopoulos et Verkman, 2005 ; Hoddevik et al., 2017) and blood-brain barrier function (Wolburg-Buchholz et al., 2009; Fukuda and Badaut, 2012 ; Vacca et al., 2014). Future studies will determine whether such altered mechanisms participate to the neurophysiological and cognitive disturbances associated with Dp71 loss in DMD.

## **ACKNOWLEDGEMENTS**

This work has benefited from the platform and expertise of the Electron Microscopy Facility of I2BC (Gif-sur-Yvette, France). We are grateful to the Zootechnic platform of our institute for mouse breeding, care, and genotyping and to S Guyon for assistance with the confocal microscope.

## **FUNDING**

This work was supported by Centre National de la Recherche Scientifique (CNRS, France) and University Paris-Sud (France), by grants to C.V. from Association Française contre les Myopathies (AFM-Téléthon, France; grant number 17117), Agence Nationale de la Recherche (ANR, France; grant number ANR-14-CE13-0037-01) and Association Monégasque contre les Myopathies (AMM, Monaco), by a postdoctoral fellowship from AFM (#18944) to O.V. and a PhD fellowship from Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche (France) to M.B.

## **REFERENCES**

- Adams ME, Mueller HA, Froehner SC. In vivo requirement of the alpha-syntrophin PDZ domain for the sarcolemmal localization of nNOS and aquaporin-4. *J Cell Biol.* 2001 Oct 1;155(1):113-22.
- Amiry-Moghaddam M, Otsuka T, Hurn PD, Traystman RJ, Haug FM, Froehner SC, Adams ME, Neely JD, Agre P, Ottersen OP, Bhardwaj A. An alpha-syntrophin-dependent pool of AQP4 in astroglial end-feet confers bidirectional water flow between blood and brain. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2003a Feb 18;100(4):2106-11.

- Amiry-Moghaddam M, Williamson A, Palomba M, Eid T, de Lanerolle NC, Nagelhus EA, Adams ME, Froehner SC, Agre P, Ottersen OP. Delayed K<sup>+</sup> clearance associated with aquaporin-4 mislocalization: phenotypic defects in brains of alpha-syntrophin-null mice. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2003b Nov 11;100(23):13615-20
- Amiry-Moghaddam M, Frydenlund DS, Ottersen OP. Anchoring of aquaporin-4 in brain: molecular mechanisms and implications for the physiology and pathophysiology of water transport. *Neuroscience*. 2004;129(4):999-1010.
- Amiry-Moghaddam M, Hoddevik EH, Ottersen OP. Aquaporins: multifarious roles in brain. *Neuroscience*. 2010 Jul 28;168(4):859-61.
- Aragón J, González-Reyes M, Romo-Yáñez J, Vacca O, Aguilar-González G, Rendón A, Vaillend C, Montañez C. Dystrophin Dp71 Isoforms Are Differentially Expressed in the Mouse Brain and Retina: Report of New Alternative Splicing and a Novel Nomenclature for Dp71 Isoforms. *Mol Neurobiol*. 2018 Feb;55(2):1376-1386.
- Austin RC, Morris GE, Howard PL, Klamut HJ, Ray PN (2000) Expression and synthesis of alternatively spliced variants of Dp71 in adult human brain. *Neuromuscul Disord* 10(3):187–193.
- Barnea E, Zuk D, Simantov R, Nudel U, Yaffe D. Specificity of expression of the muscle and brain dystrophin gene promoters in muscle and brain cells. *Neuron*. 1990 Dec;5(6):881-8.
- Benabdesselam R, Sene A, Raison D, Benmessaoud-Mesbah O, Ayad G, Mornet D, Yaffe D, Rendon A, Hardin-Pouzet H, Dorbani-Mamine L. A deficit of brain dystrophin 71 impairs hypothalamic osmostat. *J Neurosci Res*. 2010 Feb 1;88(2):324-34.
- Benabdesselam R, Dorbani-Mamine L, Benmessaoud-Mesbah O, Rendon A, Mhaouty-Kodja S, Hardin-Pouzet H. Dp71 gene disruption alters the composition of the dystrophin-associated protein complex and neuronal nitric oxide synthase expression in the hypothalamic supraoptic and paraventricular nuclei. *J Endocrinol*. 2012 Jun;213(3):239-49.
- Blake DJ, Hawkes R, Benson MA, Beesley PW. Different dystrophin-like complexes are expressed in neurons and glia. *J Cell Biol*. 1999 Nov 1;147(3):645-58.
- Bragg AD, Das SS, Froehner SC. Dystrophin-associated protein scaffolding in brain requires alpha-dystrobrevin. *Neuroreport*. 2010;21(10):695–699.
- Chaussonot R, Amar M, Fossier P, Vaillend C. Dp71-Dystrophin Deficiency Alters Prefrontal Cortex Excitation-Inhibition Balance and Executive Functions. *Mol Neurobiol*. 2019 Apr;56(4):2670-2684.



- Chelly J, Hamard G, Koulakoff A, Kaplan JC, Kahn A, Berwald-Netter Y. Dystrophin gene transcribed from different promoters in neuronal and glial cells. *Nature*. 1990 Mar 1;344(6261):64-5.
- Culligan K, Glover L, Dowling P, Ohlendieck K. Brain dystrophin-glycoprotein complex: persistent expression of beta-dystroglycan, impaired oligomerization of Dp71 and up-regulation of utrophins in animal models of muscular dystrophy. *BMC Cell Biol*. 2001;2:2.
- Dalkara D, Rendon A. AAV-mediated gene therapy in Dystrophin-Dp71 deficient mouse leads to blood-retinal barrier restoration and oedema reabsorption. *Hum Mol Genet*. 2016 Jul 15;25(14):3070-3079
- Dalloz C, Sarig R, Fort P, Yaffe D, Bordais A, Pannicke T, Grosche J, Mornet D, Reichenbach A, Sahel J, Nudel U, Rendon A. Targeted inactivation of dystrophin gene product Dp71: phenotypic impact in mouse retina. *Hum Mol Genet*. 2003 Jul 1;12(13):1543-54.
- Daoud F, Candelario-Martínez A, Billard JM, Avital A, Khelifaoui M, Rozenvald Y, Guegan M, Mornet D, Jaillard D, Nudel U, Chelly J, Martínez-Rojas D, Laroche S, Yaffe D, Vaillend C. Role of mental retardation associated dystrophin-gene product Dp71 in excitatory synapse organization, synaptic plasticity and behavioral functions. *PLoS One*. 2008 Aug 10;4(8):e6574.
- Daoud F, Angeard N, Demerre B, Martie I, Benyaou R, Leturcq F, Cossée M, Deburgrave N, Saillour Y, Tuffery S, Urtizbera A, Toutain A, Echenne B, Frischman M, Mayer M, Desguerre I, Estournet B, Réveillère C, Penisson-Besnier, Cuisset JM, Kaplan JC, Héron D, Rivier F, Chelly J. Analysis of Dp71 contribution in the severity of mental retardation through comparison of Duchenne and Becker patients differing by mutation consequences on Dp71 expression. *Hum Mol Genet*. 2009 Oct 15;18(20):3779-94.
- Desguerre I, Christov C, Mayer M, Zeller R, Becane HM, Bastuji-Garin S, Leturcq F, Chiron C, Chelly J, Gherardi RK. Clinical heterogeneity of Duchenne muscular dystrophy (DMD): definition of sub-phenotypes and predictive criteria by long-term follow-up. *PLoS One*. 2009;4(2):e4347.
- Eid T, Lee TS, Thomas MJ, et al. Loss of perivascular aquaporin 4 may underlie deficient water and K<sup>+</sup> homeostasis in the human epileptogenic hippocampus. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2005;102(4):1193–1198.
- El Mathari B, Sene A, Charles-Messance H, Vacca O, Guillonneau X, Grepin C, Sennlaub F, Sahel JA, Rendon A, Tadayoni R. Dystrophin Dp71 gene deletion induces retinal vascular inflammation and capillary degeneration. *Hum Mol Genet*. 2015 Jul 15;24(14):3939-47.

Enger R, Gundersen GA, Haj-Yasein NN, Eilert-Olsen M, Thoren AE, Vindedal GF, Petersen PH, Skare Ø, Nedergaard M, Ottersen OP, Nagelhus EA. Molecular scaffolds underpinning macroglial polarization: an analysis of retinal Müller cells and brain astrocytes in mouse. *Glia*. 2012 Dec;60(12):2018-26.

Frydenlund DS, Bhardwaj A, Otsuka T, Mylonakou MN, Yasumura T, Davidson KG, Zeynalov E, Skare O, Laake P, Haug FM, Rash JE, Agre P, Ottersen OP, Amiry-Moghaddam M. Temporary loss of perivascular aquaporin-4 in neocortex after transient middle cerebral artery occlusion in mice. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2006 Sep 5 ;103(36):13532-6.

Fukuda AM, Badaut J. Aquaporin 4: a player in cerebral edema and neuroinflammation. *J Neuroinflammation*. 2012 Dec 27;9:279.

Górecki DC, Barnard EA. Specific expression of G-dystrophin (Dp71) in the brain. *Neuroreport*. 1995 Apr 19;6(6):893-6.

Haenggi T, Soontornmalai A, Schaub MC, Fritschy JM. The role of utrophin and Dp71 for assembly of different dystrophin-associated protein complexes(DPCs) in the choroid plexus and microvasculature of the brain. *Neuroscience*. 2004;129(2):403-13.

Haenggi T, Schaub MC, Fritschy JM. Molecular heterogeneity of the dystrophin-associated protein complex in the mouse kidney nephron: differential alterations in the absence of utrophin and dystrophin. *Cell Tissue Res*. 2005 Feb;319(2):299-313.

Helleringer R, Le Verger D, Li X, Izabelle C, Chaussenot R, Belmaati-Cherkaoui M, Dammak R, Decottignies P, Daniel H, Galante M, Vaillend C. Cerebellar synapse properties and cerebellum-dependent motor and non-motor performance in Dp71-null mice. *Dis Model Mech*. 2018 Jul 10;11(7).

Hoddevik EH, Khan FH, Rahmani S, Ottersen OP, Boldt HB, Amiry-Moghaddam M. Factors determining the density of AQP4 water channel molecules at the brain-blood interface. *Brain Struct Funct*. 2017 May;222(4):1753-1766.

Hubbard JA, Hsu MS, Seldin MM, Binder DK. Expression of the Astrocyte Water Channel Aquaporin-4 in the Mouse Brain. *ASN Neuro*. 2015 Oct 21;7(5).

Hubbard JA, Szu JI, Binder DK. The role of aquaporin-4 in synaptic plasticity, memory and disease. *Brain Res Bull*. 2018 Jan;136:118-129.

Kawashima H, Sueyoshi S, Li H, Yamamoto K, Osawa T. Carbohydrate binding specificities of several poly-N-acetyllactosamine-binding lectins. *Glycoconj J*. 1990;7(4):323-34.

Knuesel I, Bornhauser BC, Zuellig RA, Heller F, Schaub MC, Fritschy JM. Differential expression of utrophin and dystrophin in CNS neurons: an in situ hybridization and immunohistochemical study. *J Comp Neurol*. 2000 Jul 10;422(4):594-611.

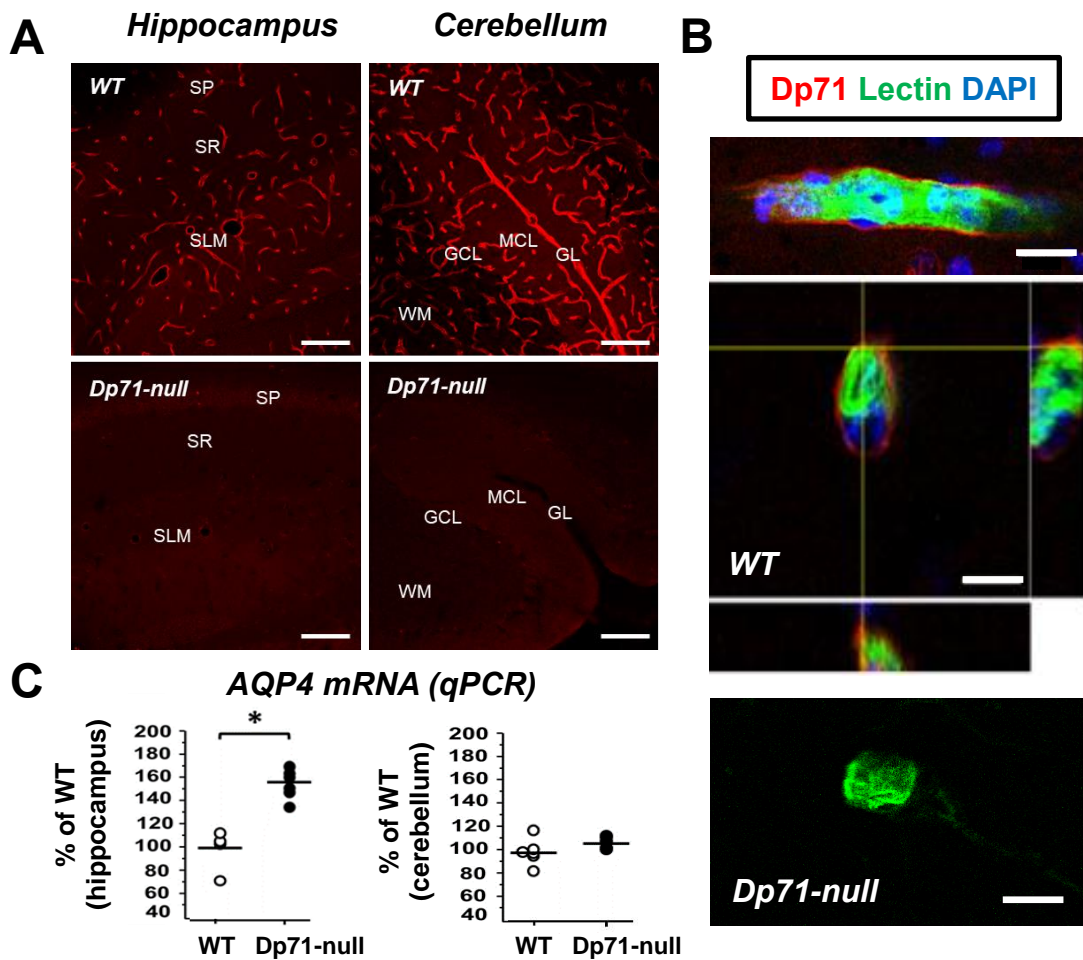
- Kofuji P, Newman EA. Potassium buffering in the central nervous system. *Neuroscience*. 2004;129(4):1045-56.
- Li D, Yue Y, Duan D. Marginal level dystrophin expression improves clinical outcome in a strain of dystrophin/utrophin double knockout mice. *PLoS One*. 2010 Dec 20;5(12):e15286. doi: 10.1371/journal.pone.0015286.
- Li D, Yue Y, Duan D. Preservation of muscle force in Mdx3cv mice correlates with low-level expression of a near full-length dystrophin protein. *Am J Pathol*. 2008 May;172(5):1332-41.
- Lidov HG, Selig S, Kunkel LM. Dp140: a novel 140 kDa CNS transcript from the dystrophin locus. *Hum Mol Genet*. 1995 Mar;4(3):329-35.
- Lien CF, Mohanta SK, Frontczak-Baniewicz M, Swinny JD, Zablocka B, Górecki DC. Absence of glial  $\alpha$ -dystrobrevin causes abnormalities of the blood-brain barrier and progressive brain edema. *J Biol Chem*. 2012 Nov 30;287(49):41374-85.
- Neely JD, Amiry-Moghaddam M, Ottersen OP, Froehner SC, Agre P, Adams ME. Syntrophin-dependent expression and localization of Aquaporin-4 water channel protein. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2001 Nov 20;98(24):14108-13.
- Nicchia GP, Nico B, Camassa LM, Mola MG, Loh N, Dermietzel R, Spray DC, Svelto M, Frigeri A. The role of aquaporin-4 in the blood-brain barrier development and integrity: studies in animal and cell culture models. *Neuroscience*. 2004;129(4):935-45.
- Nicchia GP, Rossi A, Nudel U, Svelto M, Frigeri A. Dystrophin-dependent and -independent AQP4 pools are expressed in the mouse brain. *Glia*. 2008a Jun;56(8):869-76.
- Nicchia GP, Cogotzi L, Rossi A, Basco D, Brancaccio A, Svelto M, Frigeri A. Expression of multiple AQP4 pools in the plasma membrane and their association with the dystrophin complex. *J Neurochem*. 2008b Jun 1;105(6):2156-65.
- Nico B, Frigeri A, Nicchia GP, Corsi P, Ribatti D, Quondamatteo F, Herken R, Girolamo F, Marzullo A, Svelto M, Roncali L. Severe alterations of endothelial and glial cells in the blood-brain barrier of dystrophic mdx mice. *Glia*. 2003 May;42(3):235-51. PubMed PMID: 12673830.
- Nico B, Corsi P, Ria R, Crivellato E, Vacca A, Roccaro AM, Mangieri D, Ribatti D, Roncali L. Increased matrix-metalloproteinase-2 and matrix-metalloproteinase-9 expression in the brain of dystrophic mdx mouse. *Neuroscience*. 2006 Jul 7;140(3):835-48.
- Noell S, Wolburg-Buchholz K, Mack AF, Beedle AM, Satz JS, Campbell KP, Wolburg H, Fallier-Becker P (2011) Evidence for a role of dystroglycan regulating the membrane architecture of astroglial endfeet. *Eur J Neurosci* 33:2179–2186.

- Palazzo C, Buccoliero C, Mola MG, Abbrescia P, Nicchia GP, Trojano M, Frigeri A. AQP4ex is crucial for the anchoring of AQP4 at the astrocyte end-feet and for neuromyelitis optica antibody binding. *Acta Neuropathol Commun.* 2019 Apr;7(1):51.
- Palladino M, Gatto I, Neri V, Straino S, Smith RC, Silver M, Gaetani E, Marcantoni M, Giarretta I, Stigliano E, Capogrossi M, Hlatky L, Landolfi R, Pola R. Angiogenic impairment of the vascular endothelium: a novel mechanism and potential therapeutic target in muscular dystrophy. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2013 Dec;33(12):2867-76.
- Papadopoulos MC, Verkman AS. Aquaporin-4 gene disruption in mice reduces brain swelling and mortality in pneumococcal meningitis. *J Biol Chem.* 2005 Apr 8;280(14):13906-12.
- Paxinos G, Franklin KBJ. 2001. The mouse brain in stereotaxic coordinates. 2nd ed.. San Diego (CA): Academic Press.
- Perronnet C, Vaillend C. Dystrophins, utrophins, and associated scaffolding complexes: role in mammalian brain and implications for therapeutic strategies. *J Biomed Biotechnol.* 2010;2010:849426.
- Perronnet C, Chagneau C, Le Blanc P, Samson-Desvignes N, Mornet D, Laroche S, De La Porte S, Vaillend C. Upregulation of brain utrophin does not rescue behavioral alterations in dystrophin-deficient mice. *Hum Mol Genet.* 2012 May 15;21(10):2263-76.
- Porter GA, Palade GE, Milici AJ. Differential binding of the lectins Griffonia simplicifolia I and Lycopersicon esculentum to microvascular endothelium: organ-specific localization and partial glycoprotein characterization. *Eur J Cell Biol.* 1990 Feb;51(1):85-95.
- Puwarawuttipanit W, Bragg AD, Frydenlund DS, Mylonakou MN, Nagelhus EA, Peters MF, Kotchabhakdi N, Adams ME, Froehner SC, Haug FM, Ottersen OP, Amiry-Moghaddam M. Differential effect of alpha-syntrophin knockout on aquaporin-4 and Kir4.1 expression in retinal macroglial cells in mice. *Neuroscience.* 2006;137(1):165-75.
- Rauch U, Shami A, Zhang F, Carmignac V, Durbeej M, Hultgårdh-Nilsson A. Increased neointimal thickening in dystrophin-deficient mdx mice. *PLoS One.* 2012;7(1):e29904.
- Ricotti V, Roberts RG, Muntoni F. Dystrophin and the brain. *Dev Med Child Neurol.* 2011 Jan;53(1):12.
- Ricotti V, Mandy WP, Scoto M, Pane M, Deconinck N, Messina S, Mercuri E, Skuse DH, Muntoni F. Neurodevelopmental, emotional, and behavioural problems in Duchenne muscular dystrophy in relation to underlying dystrophin gene mutations. *Dev Med Child Neurol.* 2016 Jan;58(1):77-84.

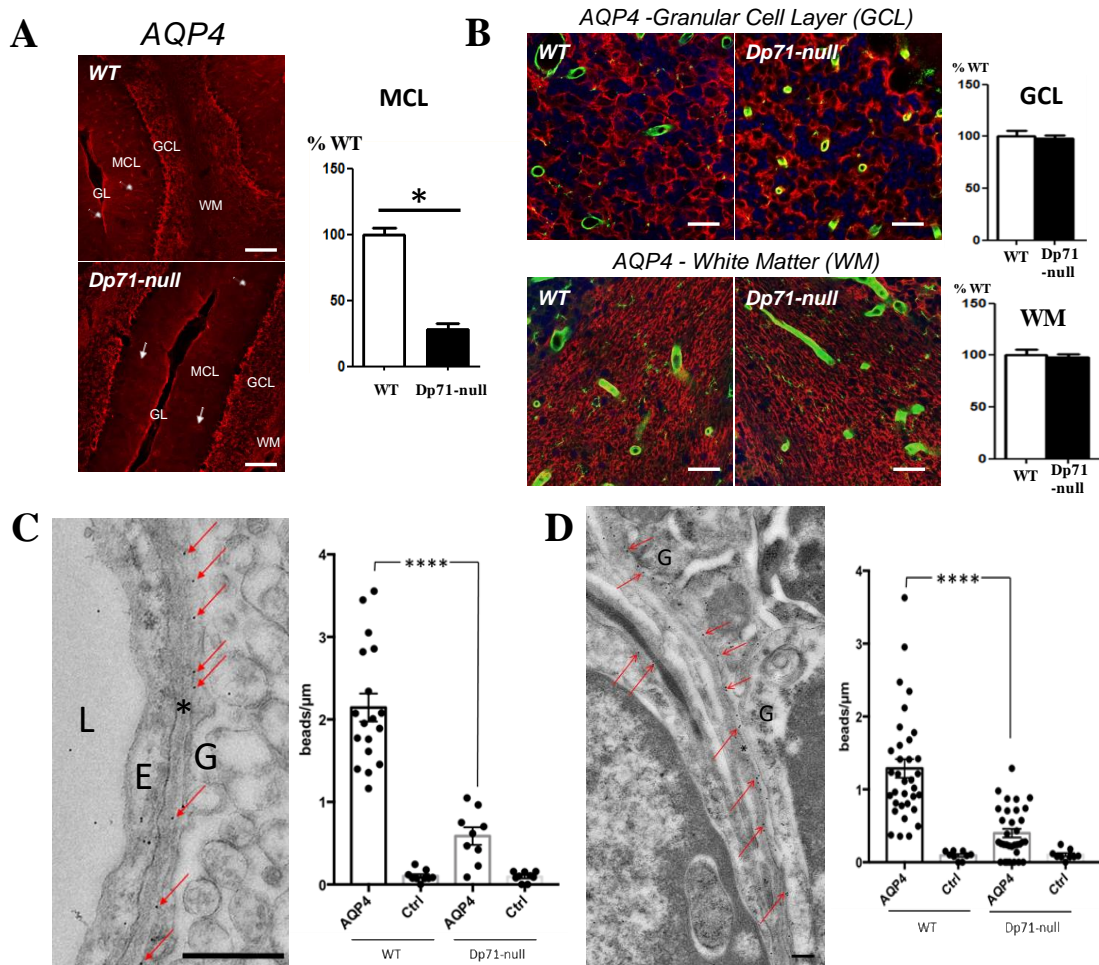
- Sarig R, Mezger-Lallemand V, Gitelman I, Davis C, Fuchs O, Yaffe D, Nudel U (1999) Targeted inactivation of Dp71, the major non-muscle product of the DMD gene: differential activity of the Dp71 promoter during development. *Hum Mol Genet.* 8(1):1-10.
- Sene A, Tadayoni R, Pannicke T, Wurm A, El Mathari B, Benard R, Roux MJ, Yaffe D, Mornet D, Reichenbach A, Sahel JA, Rendon A. Functional implication of Dp71 in osmoregulation and vascular permeability of the retina. *PLoS One.* 2009 Oct 7;4(10):e7329.
- Souttou S, Benabdesselam R, Siqueiros-Marquez L, Sifi M, Deliba M, Vacca O, Charles-Messance H, Vaillend C, Rendon A, Guillonneau X, Dorbani-Mamine L. Expression and localization of dystrophins and  $\beta$ -dystroglycan in the hypothalamic supraoptic nuclei of rat from birth to adulthood. *Acta Histochem.* 2019 Feb;121(2):218-226.
- Tadayoni R, Rendon A, Soria-Jasso LE, Cisneros B. Dystrophin Dp71: the smallest but multifunctional product of the Duchenne muscular dystrophy gene. *Mol Neurobiol.* 2012 Feb;45(1):43-60.
- Vacca O, Darche M, Schaffer DV, Flannery JG, Sahel JA, Rendon A, Dalkara D. AAV-mediated gene delivery in Dp71-null mouse model with compromised barriers. *Glia.* 2014 Mar;62(3):468-76.
- Vacca O, Charles-Messance H, El Mathari B, Sene A, Barbe P, Fouquet S, Aragón J, Darche M, Giocanti-Aurégan A, Paques M, Sahel JA, Tadayoni R, Montañez C, Dalkara D, Rendon A. AAV-mediated gene therapy in Dystrophin-Dp71 deficient mouse leads to blood-retinal barrier restoration and oedema reabsorption. *Hum Mol Genet.* 2016 Jul 15;25(14):3070-3079.
- Vaillend C, Ungerer A. Behavioral characterization of mdx3cv mice deficient in C-terminal dystrophins. *Neuromuscul Disord.* 1999 Jul;9(5):296-304.
- Vaillend C, Perronnet C, Ros C, Gruszczynski C, Goyenvallé A, Laroche S, Danos O, Garcia L, Peltekian E. (2010) Rescue of a dystrophin-like protein by exon skipping in vivo restores GABAA-receptor clustering in the hippocampus of the mdx mouse. *Mol Ther.* 18(9), 1683-8.
- Wolburg-Buchholz K, Mack AF, Steiner E, Pfeiffer F, Engelhardt B, Wolburg H. Loss of astrocyte polarity marks blood-brain barrier impairment during experimental autoimmune encephalomyelitis. *Acta Neuropathol.* 2009 Aug;118(2):219-33.
- Woo J, Kim JE, Im JJ, Lee J, Jeong HS, Park S, Jung SY, An H, Yoon S, Lim SM, Lee S, Ma J, Shin EY, Han YE, Kim B, Lee EH, Feng L, Chun H, Yoon BE, Kang I, Dager SR, Lyoo IK, Lee CJ. Astrocytic water channel aquaporin-4 modulates brain plasticity in both mice

and humans: a potential gliogenetic mechanism underlying language-associated learning. *Mol Psychiatry*. 2018 Apr;23(4):1021-1030.

Yang J, Lunde LK, Nuntagij P, Oguchi T, Camassa LM, Nilsson LN, Lannfelt L, Xu Y, Amiry-Moghaddam M, Ottersen OP, Torp R. Loss of astrocyte polarization in the tg-ArcSwe mouse model of Alzheimer's disease. *J Alzheimers Dis*. 2011;27(4):711-22.

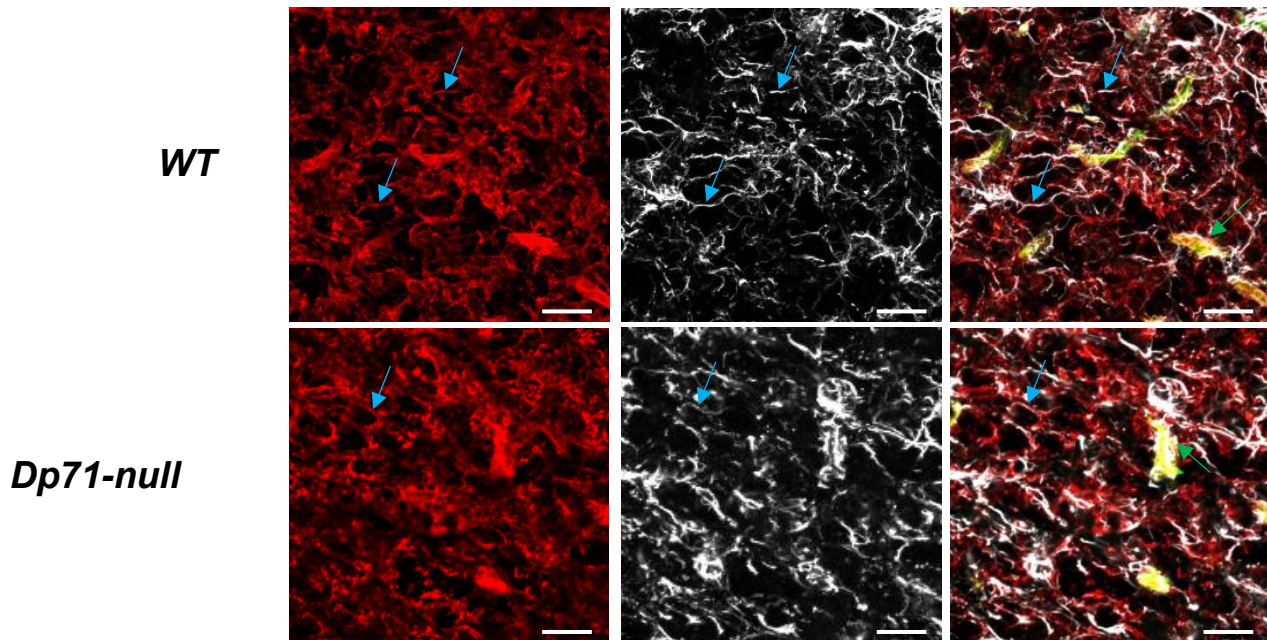


**Fig. 1. Localization of Dp71 in hippocampus and cerebellum and its deficiency in Dp71-null mice.** (A) Representative image-stack projections obtained by confocal laser scanning microscopy, showing dystrophin-IR revealed by the H4 anti-dystrophin antibody in hippocampus and cerebellum of WT and Dp71-null mice. IR was distributed along the walls of capillaries in all layers of hippocampal Hamon's horn and cerebellar vermis, as well as along the cerebellar glia limitans (GL) in WT mice, but not in Dp71-null mice, indicating it selectively reflected Dp71 expression. SP: *stratum pyramidale*, SR: *stratum radiatum*, SLM: *stratum lacunosum moleculare*, MCL: *molecular cell layer*, GL: *Glia limitans*, GCL: *granular cell layer*, WM: *white matter*. Scale bars: 100  $\mu$ m. (B) Merged triple immunofluorescence staining of Dp71 (red), endothelial marker lectin (green) and nuclear marker DAPI (blue) at high magnification (x63). Both longitudinal (top panel, scale bar: 20 $\mu$ m) and transversal views with x/y orthogonal projections (below, scale bar: 10 $\mu$ m) showed no overlap between Dp71-IR and lectin, confirming Dp71 expression in perivascular domains and its absence in Dp71-null mice. (C) Expression level of AQP4 channel mRNA quantified by qRT-PCR and expressed as per cent of WT mean level of expression (n=5 mice per genotype, 3 replicates per mouse). Group means are represented by a horizontal line while individual values are shown as circles. Note the different regulation in hippocampus (overexpressed) and cerebellum (unchanged) in Dp71-null mice compared to expression levels in WT littermate mice. \*p<0.05.

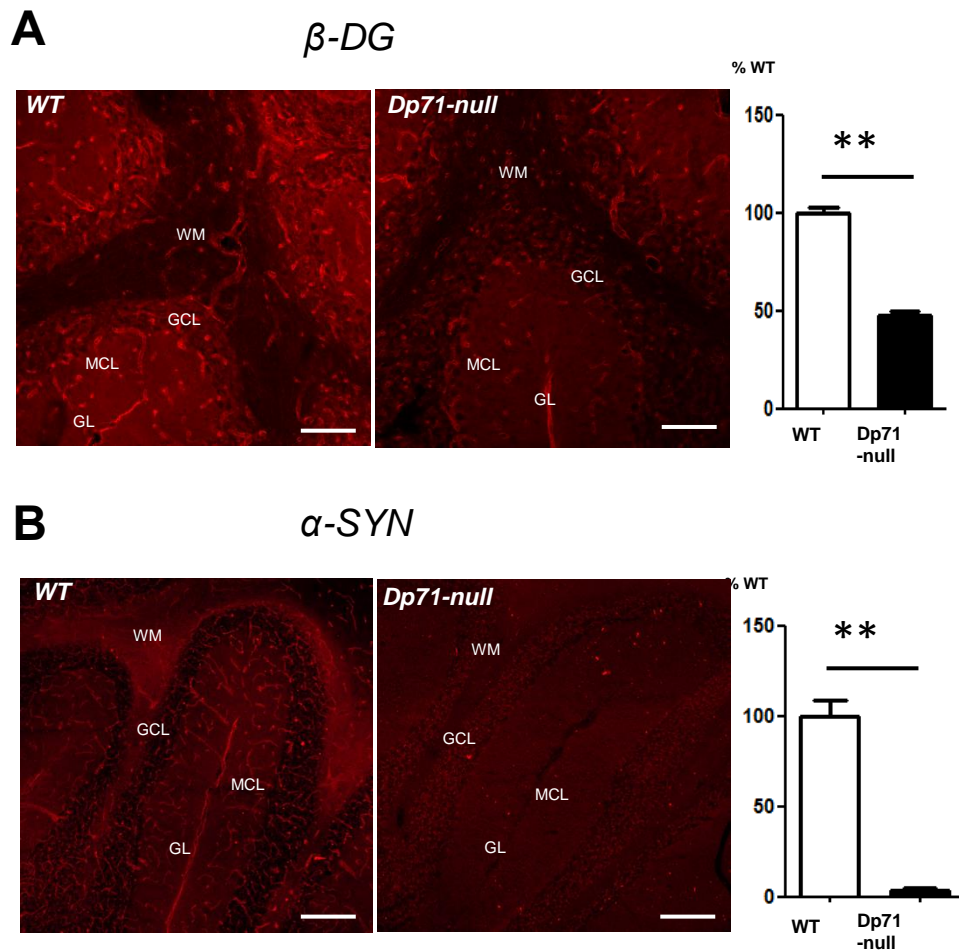


**Fig. 2. Immunolocalisation of AQP4 channels in cerebellum of WT and Dp71-null mice.** Representative image-stack projections obtained by confocal laser scanning microscopy. (A) AQP4-IR (red, scale bars: 100 $\mu$ m) in all layers of the cerebellar vermis in WT mice, with strong perivascular signal in the MCL and along the GL (arrows). In Dp71-null mice, AQP4-IR along the walls of capillaries of the MCL was drastically reduced, yet a low-intensity signal was still detectable in some capillaries (arrows); AQP4-IR was apparently preserved in WM and GCL. The residual IR in perivascular domains of the MCL in Dp71-null mice was estimated 30% of WT levels by semi-quantitative analysis (histogram, MCL). (B) AQP4-IR was comparable in both genotypes in the GCL and WM (scale bars: 20 $\mu$ m). Most of the IR showed no overlap with lectin (green), suggesting a main expression in astroglial processes in the GCL and in fibres of the WM. MCL: molecular cell layer, GL: Glia limitans, GCL: granular cell layer, WM: white matter. \* $p < 0.05$ , significantly different from WT levels,  $n = 4$  WT and 5 Dp71-null mice. (C-D) Quantification of AQP4 channels in the cerebellar MCL by immunogold electron microscopy. Sample micrographs show AQP4 immunogold labelling (red arrows) in macroglial membrane domains surrounding the vascular endothelium in the molecular cell layer (C) and along the glia limitans (D). The density of AQP4 channels is expressed as the number of beads per  $\mu$ m of glial membrane in perivascular membranes (A; WT: 18 capillaries, 292  $\mu$ m; Dp71-null: 9 capillaries, 187  $\mu$ m) and glia limitans (B; WT: 213  $\mu$ m; Dp71-null: 149  $\mu$ m) in 2 mice per genotype. Control sections without primary antibody were used to evaluate non-specific labelling (Ctrl). Scale bars, 500 nm. E: endothelium; L: capillary lumen; G: glial endfoot; asterisk: basal lamina. Data as means  $\pm$  SEM; dots are individual data. \*\*\*\* $p < 0.0001$ , significantly different from WT.

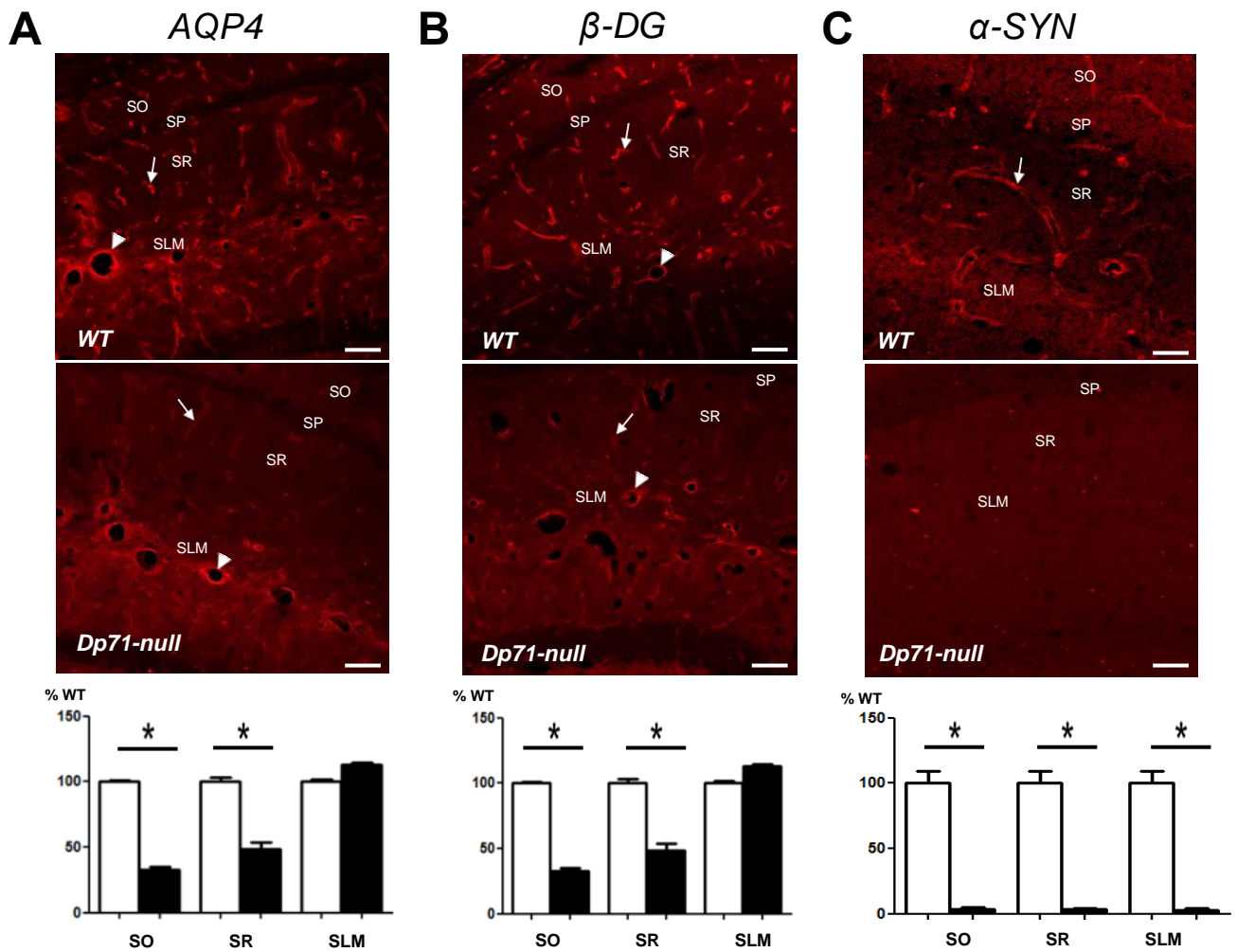




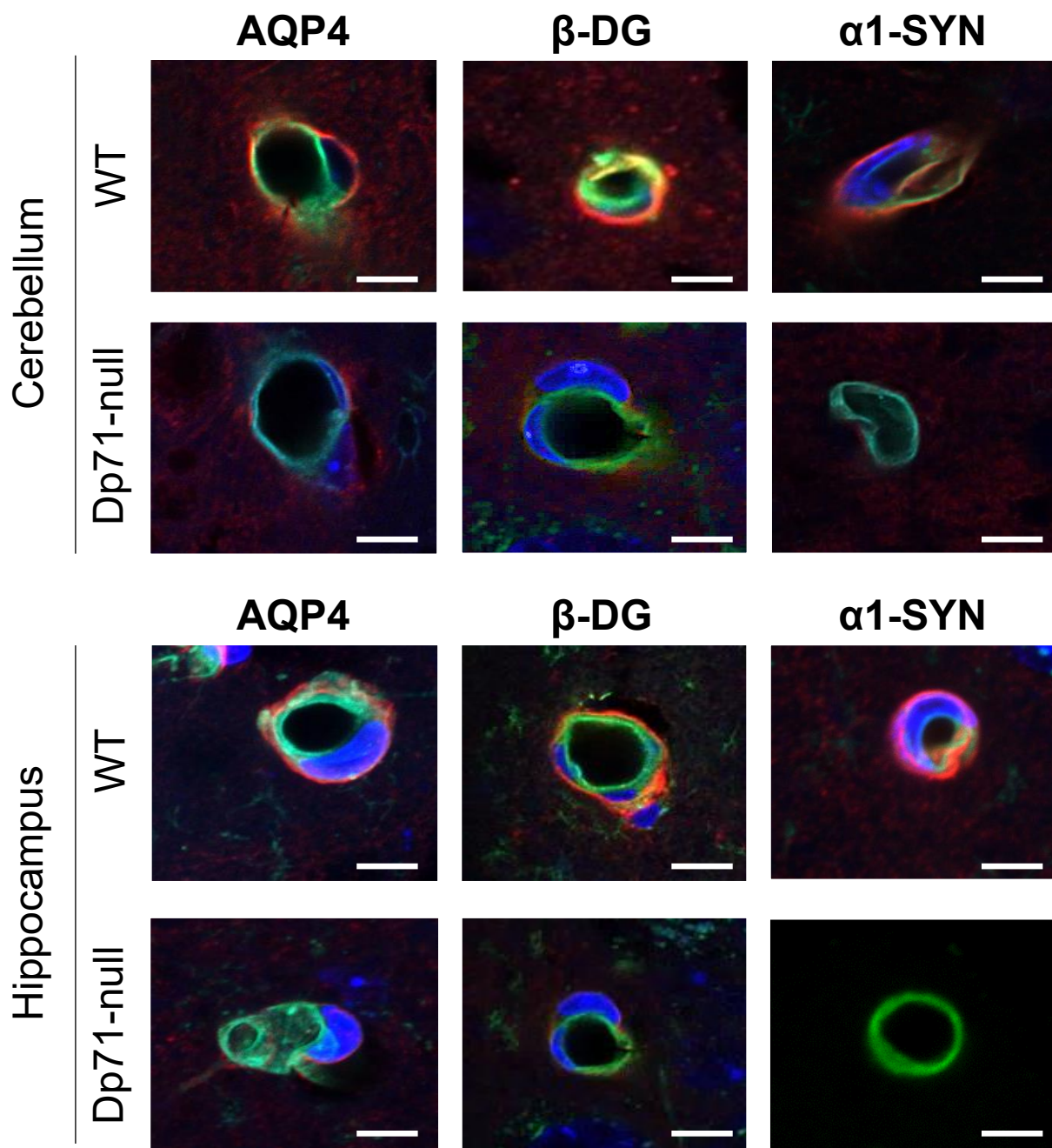
**Supplementary Fig. S1. Immunolocalisation of AQP4 channels in granule cell layer of cerebellum.** Representative image-stack projections obtained by confocal laser scanning microscopy following triple fluorescent staining of AQP4 (red, left panels), GFAP (white, middle panels) and lectin (green, merged in right panels). The merged IR signals shows co-localization of the 3 markers in perivascular regions in both genotypes (green arrows) and partial co-localization of AQP4-IR with GFAP-IR (blue arrows). Scale bars: 20 $\mu$ m.



**Fig. 3. Immunolocalisation of Dp71-associated proteins in cerebellum.** (A) The IR for  $\beta$ -dystroglycan ( $\beta$ -DG), distributed along walls of capillaries and along the GL, was reduced by about 50% in Dp71-null mice. Scale bars: 80 $\mu$ m. (B) The IR for  $\alpha$ -synuclein ( $\alpha$ -SYN) distributed along walls of capillaries and along the GL in WT mice, was completely absent in Dp71-null mice. Scale bars: 100 $\mu$ m. MCL: molecular cell layer, GL: Glia limitans, GCL: granular cell layer, WM: white matter. \*\* $p$ <0.01, significantly different from WT levels,  $n$ = 4 WT and 5 Dp71-null mice.

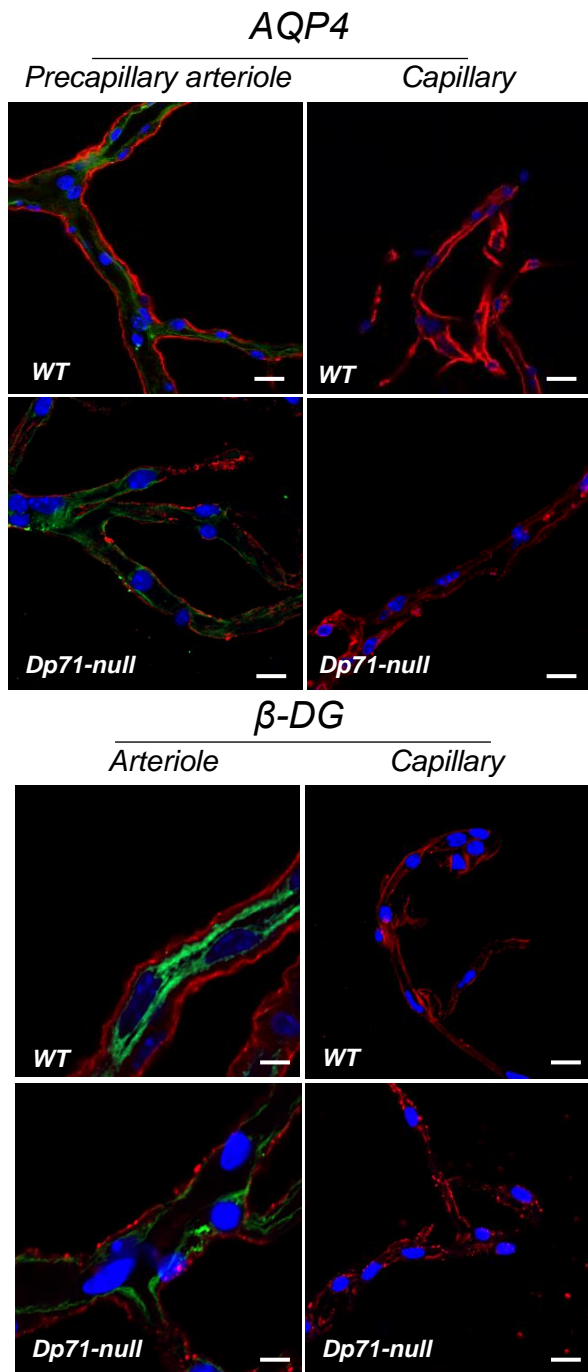


**Fig. 4. Immunolocalisation of Dp71-associated proteins in hippocampus.** (A-C) The IR for AQP4 (A),  $\beta$ -dystroglycan (B) and  $\alpha$ -syntrophin (C) was distributed in perivascular domains surrounding capillaries (arrows) and arterioles (arrowheads). Histograms show that expression of AQP4 and  $\beta$ -dystroglycan were significantly reduced in Dp71-null mice (black bars) compared to WT (white bars) in SO and SR layers, but not in the SLM, likely due to the residual expression seen in Dp71-null mice surrounding arterioles along the hippocampal fissure (arrowheads). The  $\alpha$ -Syntrophin-IR was completely absent in Dp71-null mice in all layers (C). SO: *stratum oriens*, SP: *stratum pyramidale*, SR: *stratum radiatum*, SLM: *stratum lacunosum moleculare*. \* $p < 0.05$ , significantly different from WT levels, Mann-Whitney U tests,  $n = 4$  WT and 5 Dp71-null mice. Scale bars: 50  $\mu$ m.

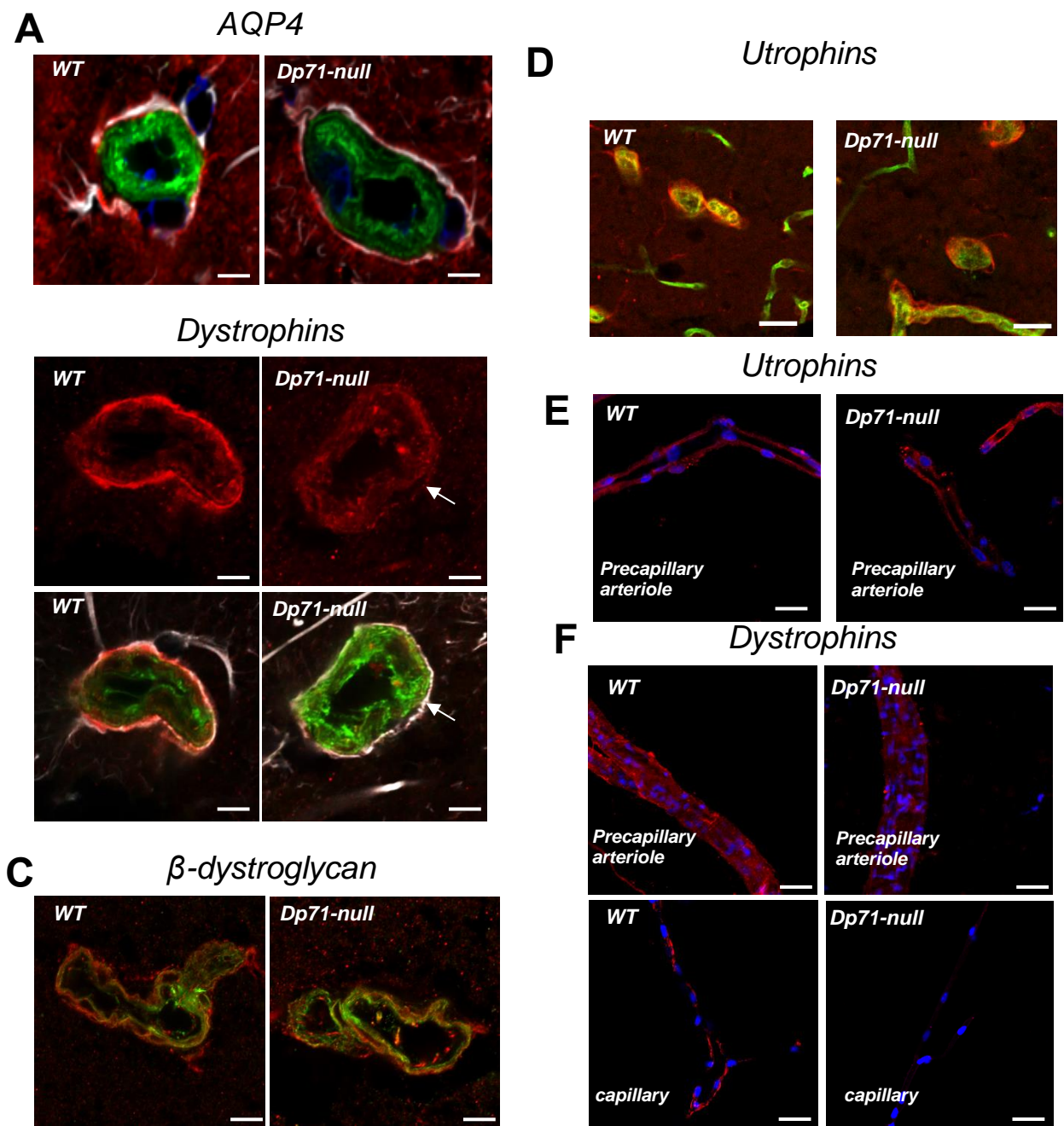


**Supplementary Fig. S2. Subcellular localization of Dp71-associated proteins in brain capillaries.** Transversal planes showing double labelling of capillaries from cerebellum and hippocampus, as indicated. IR obtained with primary antibodies directed against AQP4,  $\beta$ -dystroglycan and  $\alpha$ 1-syntrophin. Vascular endothelial cells were labelled with lectin (green) and DAPI (blue) was used as nuclear stain. Confocal images were taken with a 63X objective (Zoom 1.5). Scale bar: 5 $\mu$ m.

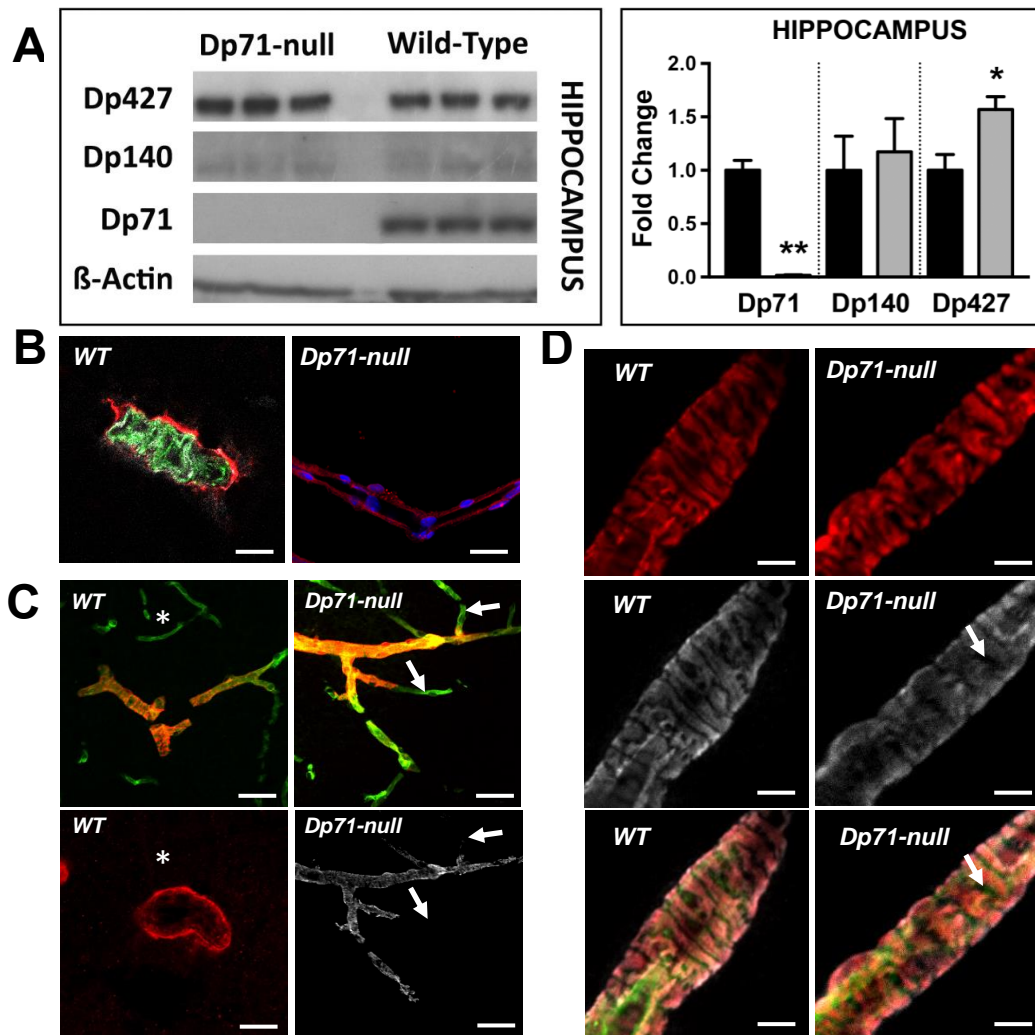




**Fig. 5. Immunolocalisation of AQP4 and  $\beta$ -dystroglycan in purified forebrain blood vessels.** IR for AQP4 (top panel, red) or  $\beta$ -dystroglycan ( $\beta$ -DG, bottom panel, red) was analysed in purified precapillary arterioles (10-30 $\mu$ m in diameter) and/or arterioles ( $\geq$ 30 $\mu$ m in diameter) (left panels) and in capillaries (right panels; 5-10 $\mu$ m in diameter). Multiple staining with the endothelial marker lectin (green) and nuclei (DAPI, blue) were also performed. AQP4- and  $\beta$ -DG-IR did not overlap with lectin in precapillary arterioles and arterioles, thus confirming expression in perivascular domains. Analyses in blood vessels from Dp71-null mice confirmed residual expression characterized by punctate IR suggesting altered polarized distribution along the membrane of perivascular astrocyte endfeet. Scale bars: 15 $\mu$ m (40X objective).



**Fig. 6. Dystrophins and associated/related proteins in hippocampal SLM arterioles and in purified forebrain blood vessels.** (A-D) Transversal sections of arterioles (diameter:  $\geq 30\mu\text{m}$ ) in hippocampal (CA1) tissue sections, showing IR for AQP4 (A), dystrophins (B),  $\beta$ -dystroglycan (C) and utrophins (D) in red, lectin in green (A-D), and GFAP in white (A-B). The arrow in B shows dystrophin IR in GFAP-positive elements surrounding arterioles in Dp71-null mice. (E-F) IR for utrophins (E) and dystrophins (F) in purified precapillary arterioles (10-30 $\mu\text{m}$  in diameter) and/or capillaries (5-10 $\mu\text{m}$  in diameter), as indicated; nuclei are stained in blue by DAPI. Scale bars: 10 $\mu\text{m}$  in A-C, 25 $\mu\text{m}$  in D, 15 $\mu\text{m}$  in E-F.



**Fig. 7. Immunolocalisation of Dp427 dystrophin in the vascular compartment.** (A) Western blots showing expression of dystrophins (Dp427, Dp140, Dp71) and reporter protein  $\beta$ -actin in WT and Dp71-null mice ( $n=6$  per genotype). The histogram shows that Dp427 was significantly overexpressed in Dp71-null mice compared to WT. (B) Detection of Dp427 (white), GFAP (red) and lectin staining (green) in arterioles (diameter:  $\geq 30\mu\text{m}$ ) of the hippocampal stratum lacunosum moleculare (SLM). (C) The upper panels show double labelling of arterioles, precapillary arterioles and capillaries (asterisk in upper left image) with smooth-muscle marker  $\alpha$ -SMA (red) and lectine (green) in a hippocampal tissue section. Note that overlapping IR (yellow-orange) is only present in large diameter vascular elements (i.e., arterioles and initial segment of precapillary arterioles). The lower panels show Dp427 IR in the same vessels; IR was restricted to the large-diameter precapillary arterioles (white), not in smaller precapillary arterioles (arrows) or capillaries (asterisk). (D) Detection of the smooth-muscle marker  $\alpha$ -SMA (red), Dp427 (white) and lectin (green) in purified arterioles. Note that Dp427 and  $\alpha$ -SMA IR is localized in the same vascular subdomains but does not overlap with the IR of endothelial marker lectin (arrow). Scale bars:  $10\mu\text{m}$  in A (63X zoom),  $15\mu\text{m}$  in B and  $20\mu\text{m}$  in C (40X objective).

## **REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES**



Abbott NJ, Rönnbäck L, Hansson E. Astrocyte-endothelial interactions at the blood-brain barrier. *Nat Rev Neurosci*. 2006 Jan;7(1):41-53. Review.

Abbott NJ, Patabendige AA, Dolman DE, Yusof SR, Begley DJ. Structure and function of the blood-brain barrier. *Neurobiol Dis*. 2010 Jan;37(1):13-25 Review.

Acharyya S, Villalta SA, Bakkar N, Bupha-Intr T, Janssen PM, Carathers M, Li ZW, Beg AA, Ghosh S, Sahenk Z, Weinstein M, Gardner KL, Rafael-Fortney JA, Karin M, Tidball JG, Baldwin AS, Guttridge DC. Interplay of IKK/NF-kappaB signaling in macrophages and myofibers promotes muscle degeneration in Duchenne muscular dystrophy. *J Clin Invest*. 2007 Apr;117(4):889-901

Adams ME, Mueller HA, Froehner SC. In vivo requirement of the alpha-syntrophin PDZ domain for the sarcolemmal localization of nNOS and aquaporin-4. *J Cell Biol*. 2001 Oct 1;155(1):113-22

Adams ME, Kramarcy N, Fukuda T, Engel AG, Sealock R, Froehner SC. Structural abnormalities at neuromuscular synapses lacking multiple syntrophin isoforms. *J Neurosci*. 2004 Nov 17;24(46):10302-9. Erratum in: *J Neurosci*. 2004 Dec 15;24(50):11481

Adams ME, Tesch Y, Percival JM, Albrecht DE, Conhaim JI, Anderson K, Froehner SC. Differential targeting of nNOS and AQP4 to dystrophin-deficient sarcolemma by membrane-directed alpha-dystrobrevin. *J Cell Sci*. 2008 Jan 1;121(Pt 1):48-54

Ahn AH, Kunkel LM. The structural and functional diversity of dystrophin. *Nat Genet*. 1993 Apr;3(4):283-91. Review.

Aird WC. Phenotypic heterogeneity of the endothelium: II. Representative vascular beds. *Circ Res*. 2007 Feb 2;100(2):174-90. Review

Albrecht DE, Froehner SC. Syntrophins and dystrobrevins: defining the dystrophin scaffold at synapses. *Neurosignals*. 2002 May-Jun;11(3):123-9. Review

Albrecht DE, Sherman DL, Brophy PJ, Froehner SC. The ABCA1 cholesterol transporter associates with one of two distinct dystrophin-based scaffolds in Schwann cells. *Glia*. 2008 Apr 15;56(6):611-8

Alessi A, Bragg AD, Percival JM, Yoo J, Albrecht DE, Froehner SC, Adams ME. gamma-Syntrophin scaffolding is spatially and functionally distinct from that of the alpha/beta syntrophins. *Exp Cell Res*. 2006 Oct 1;312(16):3084-95

Allaman I, Bélanger M, Magistretti PJ. Astrocyte-neuron metabolic relationships: for better and for worse. *Trends Neurosci*. 2011 Feb;34(2):76-87.

Allikian MJ, McNally EM. Processing and assembly of the dystrophin glycoprotein complex. *Traffic*. 2007 Mar;8(3):177-83. Epub 2007 Jan 26. Review.

Alvarez JI, Dodelet-Devillers A, Kebir H, Ifergan I, Fabre PJ, Terouz S, Sabbagh M, Wosik K, Bourbonnière L, Bernard M, van Horssen J, de Vries HE, Charron F, Prat A. The Hedgehog

pathway promotes blood-brain barrier integrity and CNS immune quiescence. *Science*. 2011 Dec 23;334(6063):1727-31.

Alvarez JI, Cayrol R, Prat A. Disruption of central nervous system barriers in multiple sclerosis. *Biochim Biophys Acta*. 2011 Feb;1812(2):252-64

Alvarez JI, Katayama T, Prat A. Glial influence on the blood brain barrier. *Glia*. 2013 Dec;61(12):1939-58. doi: 10.1002/glia.22575.

Amiry-Moghaddam M, Williamson A, Palomba M, Eid T, de Lanerolle NC, Nagelhus EA, Adams ME, Froehner SC, Agre P, Ottersen OP. Delayed K<sup>+</sup> clearance associated with aquaporin-4 mislocalization: phenotypic defects in brains of alpha-syntrophin-null mice. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2003 Nov 11;100(23):13615-20

Amiry-Moghaddam M, Ottersen OP. The molecular basis of water transport in the brain. *Nat Rev Neurosci*. 2003 Dec;4(12):991-1001. Review

Amiry-Moghaddam M, Xue R, Haug FM, Neely JD, Bhardwaj A, Agre P, Adams ME, Froehner SC, Mori S, Ottersen OP. Alpha-syntrophin deletion removes the perivascular but not endothelial pool of aquaporin-4 at the blood-brain barrier and delays the development of brain edema in an experimental model of acute hyponatremia. *FASEB J*. 2004 Mar;18(3):542-4

Amiry-Moghaddam M, Frydenlund DS, Ottersen OP. Anchoring of aquaporin-4 in brain: molecular mechanisms and implications for the physiology and pathophysiology of water transport. *Neuroscience*. 2004;129(4):999-1010. Review

Andriopoulou P, Navarro P, Zanetti A, Lampugnani MG, Dejana E. Histamine induces tyrosine phosphorylation of endothelial cell-to-cell adherens junctions. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 1999 Oct;19(10):2286-97

Aragón J, Romo-Yáñez J, Martínez-Herrera A, Ceja V, Rendon A, Montañez C. Characterization of Dp71 $\Delta$ (78-79), a novel dystrophin mutant that stimulates PC12 cell differentiation. *J Neurochem*. 2011 Nov;119(4):697-707

Aragón J, González-Reyes M, Romo-Yáñez J, Vacca O, Aguilar-González G, Rendón A, Vaillend C, Montañez C. Dystrophin Dp71 Isoforms Are Differentially Expressed in the Mouse Brain and Retina: Report of New Alternative Splicing and a Novel Nomenclature for Dp71 Isoforms. *Mol Neurobiol*. 2018 Feb;55(2):1376-1386

Argaw AT, Zhang Y, Snyder BJ, Zhao ML, Kopp N, Lee SC, Raine CS, Brosnan CF, John GR. IL-1 $\beta$  regulates blood-brain barrier permeability via reactivation of the hypoxia-angiogenesis program. *J Immunol*. 2006 Oct 15;177(8):5574-84

Argaw AT, Gurfein BT, Zhang Y, Zameer A, John GR. VEGF-mediated disruption of endothelial CLN-5 promotes blood-brain barrier breakdown. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2009 Feb 10;106(6):1977-82.

Argaw AT, Asp L, Zhang J, Navrazhina K, Pham T, Mariani JN, Mahase S, Dutta DJ, Seto J, Kramer EG, Ferrara N, Sofroniew MV, John GR. Astrocyte-derived VEGF-A drives blood-brain barrier disruption in CNS inflammatory disease. *J Clin Invest*. 2012 Jul;122(7):2454-68.

Armulik A, Genové G, Mäe M, Nisancioglu MH, Wallgard E, Niaudet C, He L, Norlin J, Lindblom P, Strittmatter K, Johansson BR, Betsholtz C. Pericytes regulate the blood-brain barrier. *Nature*. 2010 Nov 25;468(7323):557-61.

Asahi M, Wang X, Mori T, Sumii T, Jung JC, Moskowitz MA, Fini ME, Lo EH. Effects of matrix metalloproteinase-9 gene knock-out on the proteolysis of blood-brain barrier and white matter components after cerebral ischemia

Austin RC, Howard PL, D'Souza VN, Klamut HJ, Ray PN. Cloning and characterization of alternatively spliced isoforms of Dp71. *Hum Mol Genet*. 1995 Sep;4(9):1475-83.

Aveleira CA, Lin CM, Abcouwer SF, Ambrósio AF, Antonetti DA. TNF- $\alpha$  signals through PKC $\zeta$ /NF- $\kappa$ B to alter the tight junction complex and increase retinal endothelial cell permeability. *Diabetes*. 2010;59(11):2872–2882.

Baby SM, Bogdanovich S, Willmann G, Basu U, Lozynska O, Khurana TS. Differential expression of utrophin-A and -B promoters in the central nervous system (CNS) of normal and dystrophic mdx mice. *Brain Pathol*. 2010 Mar;20(2):323-42.

Badaut J, Ashwal S, Adami A, Tone B, Recker R, Spagnoli D, Ternon B, Obenaus A. Brain water mobility decreases after astrocytic aquaporin-4 inhibition using RNA interference. *J Cereb Blood Flow Metab*. 2011 Mar;31(3):819-31

Bataveljić D, Nikolić L, Milosević M, Todorović N, Andjus PR. Changes in the astrocytic aquaporin-4 and inwardly rectifying potassium channel expression in the brain of the amyotrophic lateral sclerosis SOD1(G93A) rat model. *Glia*. 2012 Dec;60(12):1991-2003

Banks WA, Owen JB, Erickson MA. Insulin in the brain: there and back again. *Pharmacol Ther*. 2012;136(1):82–93.

Bar S, Barnea E, Levy Z, Neuman S, Yaffe D, Nudel U. A novel product of the Duchenne muscular dystrophy gene which greatly differs from the known isoforms in its structure and tissue distribution. *Biochem J*. 1990 Dec 1;272(2):557-60

Barbour B, Brew H, Attwell D. Electrogenic glutamate uptake in glial cells is activated by intracellular potassium. *Nature*. 1988 Sep 29;335(6189):433-5

Barboni MTS, Vaillend C, Joachimsthaler A, Liber AMP, Khabou H, Roux MJ, Vacca O, Vignaud L, Dalkara D, Guillonneau X, Ventura DF, Rendon A, Kremers J. Rescue of defective electroretinographic responses in Dp71-null mice with AAV-mediated re-expression of Dp71 in retinal glial Müller cells. *IOVS*. 2020. Sous presse

Barnea E, Zuk D, Simantov R, Nudel U, Yaffe D. Specificity of expression of the muscle and brain dystrophin gene promoters in muscle and brain cells. *Neuron*. 1990 Dec;5(6):881-8

Bazzoni G, Martinez-Estrada OM, Orsenigo F, Cordenonsi M, Citi S, Dejana E. Interaction of junctional adhesion molecule with the tight junction components ZO-1, cingulin, and occludin. *J Biol Chem*

- Beal MF. Mitochondria take center stage in aging and neurodegeneration. *Ann Neurol*. 2005 Oct;58(4):495-505. Review
- Beiersdorfer A, Wolburg H, Grawe J, Scheller A, Kirchhoff F, Lohr C. Sublamina-specific organization of the blood brain barrier in the mouse olfactory nerve layer. *Glia*. 2020 Mar;68(3):631-645
- Benabdesselam R, Sene A, Raison D, Benmessaoud-Mesbah O, Ayad G, Mornet D, Yaffe D, Rendon A, Hardin-Pouzet H, Dorbani-Mamine L. A deficit of brain dystrophin 71 impairs hypothalamic osmostat. *J Neurosci Res*. 2010 Feb 1;88(2):324-34
- Benfenati V, Caprini M, Dovizio M, Mylonakou MN, Ferroni S, Ottersen OP, Amiry-Moghaddam M. An aquaporin-4/transient receptor potential vanilloid 4 (AQP4/TRPV4) complex is essential for cell-volume control in astrocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2011 Feb 8;108(6):2563-8
- Ben-Yosef T, Belyantseva IA, Saunders TL, Hughes ED, Kawamoto K, Van Itallie CM, Beyer LA, Halsey K, Gardner DJ, Wilcox ER, Rasmussen J, Anderson JM, Dolan DF, Forge A, Raphael Y, Camper SA, Friedman TB. Claudin 14 knockout mice, a model for autosomal recessive deafness DFNB29, are deaf due to cochlear hair cell degeneration. *Hum Mol Genet*. 2003 Aug 15;12(16):2049-61
- Beyer EC, Paul DL, Goodenough DA. Connexin family of gap junction proteins. *J Membr Biol*. 1990 Jul;116(3):187-94. Review
- Bhat SS, Ali R, Khanday FA. Syntrophins entangled in cytoskeletal meshwork: Helping to hold it all together. *Cell Prolif*. 2019 Mar;52(2):e12562.
- Biernacki K, Prat A, Blain M, Antel JP. Regulation of Th1 and Th2 lymphocyte migration by human adult brain endothelial cells. *J Neuropathol Exp Neurol*. 2001 Dec;60(12):1127-36
- Bies RD, Phelps SF, Cortez MD, Roberts R, Caskey CT, Chamberlain JS. 1992. Human and murine dystrophin mRNA transcripts are differentially expressed during skeletal muscle, heart, and brain development. *Nucleic Acids Res* 20(7):1725-31
- Binder DK, Yao X, Zador Z, Sick TJ, Verkman AS, Manley GT. Increased seizure duration and slowed potassium kinetics in mice lacking aquaporin-4 water channels. *Glia*. 2006 Apr 15;53(6):631-6
- Blake DJ, Schofield JN, Zuellig RA, et al. G-utrophin, the autosomal homologue of dystrophin Dp116, is expressed in sensory ganglia and brain. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1995;92(9):3697-3701.
- Blake DJ, Hawkes R, Benson MA, Beesley PW. Different dystrophin-like complexes are expressed in neurons and glia. *J Cell Biol*. 1999;147(3):645-658. doi:10.1083/jcb.147.3.645
- Blake DJ, Weir A, Newey SE, Davies KE. Function and genetics of dystrophin and dystrophin-related proteins in muscle. *Physiol Rev*. 2002 Apr;82(2):291-329. Review.

Bockenbauer D, Feather S, Stanescu HC, Bandulik S, Zdebik AA, Reichold M, Tobin J, Lieberer E, Sterner C, Landoure G, Arora R, Sirimanna T, Thompson D, Cross JH, van't Hoff W, Al Masri O, Tullus K, Yeung S, Anikster Y, Klootwijk E, Hubank M, Dillon MJ, Heitzmann D, Arcos-Burgos M, Knepper MA, Dobbie A, Gahl WA, Warth R, Sheridan E, Kleta R. Epilepsy, ataxia, sensorineural deafness, tubulopathy, and KCNJ10 mutations. *N Engl J Med*. 2009 May 7;360(19):1960-70

Boulay AC, Saubaméa B, Cisternino S, et al. The Sarcoglycan complex is expressed in the cerebrovascular system and is specifically regulated by astroglial Cx30 channels. *Front Cell Neurosci*. 2015;9:9. Published 2015 Feb 2. doi:10.3389/fncel.2015.00009

Boulay AC, Gilbert A, Oliveira Moreira V, et al. Connexin 43 Controls the Astrocyte Immunoregulatory Phenotype. *Brain Sci*. 2018;8(4):50. Published 2018 Mar 22. doi:10.3390/brainsci8040050

Bragg AD, Das SS, Froehner SC. Dystrophin-associated protein scaffolding in brain requires alpha-dystrobrevin. *Neuroreport*. 2010;21(10):695–699.

Bainbridge JW, Smith AJ, Barker SS, Robbie S, Henderson R, Balaggan K, Viswanathan A, Holder GE, Stockman A, Tyler N and others. 2008. Effect of gene therapy on visual function in Leber's congenital amaurosis. *N Engl J Med* 358(21):2231-9

Byers TJ, Lidov HG, Kunkel LM. An alternative dystrophin transcript specific to peripheral nerve. *Nat Genet*. 1993 May;4(1):77-81

Carmeliet P, Lampugnani MG, Moons L, Breviario F, Compernelle V, Bono F, Balconi G, Spagnuolo R, Oosthuysen B, Dewerchin M, Zanetti A, Angellilo A, Mattot V, Nuyens D, Lutgens E, Clotman F, de Ruiter MC, Gittenberger-de Groot A, Poelmann R, Lupu F, Herbert JM, Collen D, Dejana E. Targeted deficiency or cytosolic truncation of the VE-cadherin gene in mice impairs VEGF-mediated endothelial survival and angiogenesis. *Cell*. 1999 Jul 23;98(2):147-57

Cattellino A, Liebner S, Gallini R, Zanetti A, Balconi G, Corsi A, Bianco P, Wolburg H, Moore R, Oreda B, Kemler R, Dejana E. The conditional inactivation of the  $\beta$ -catenin gene in endothelial cells causes a defective vascular pattern and increased vascular fragility. *J Cell Biol*. 2003 Sep 15; 162(6): 1111–1122.

Cayrol R, Wosik K, Berard JL, Dodelet-Devillers A, Ifergan I, Kebir H, Haqqani AS, Kreymborg K, Krug S, Moundjian R, Bouthillier A, Becher B, Arbour N, David S, Stanimirovic D, Prat A. Activated leukocyte cell adhesion molecule promotes leukocyte trafficking into the central nervous system. *Nat Immunol*. 2008 Feb;9(2):137-45

Cereijido M, Valdes J, Shoshani L, Contreras RG. Role of tight junctions in establishing and maintaining cell polarity. *Annu Rev Physiol*. 1998;60:161–177

Cerna J, Cerecedo D, Ortega A, García-Sierra F, Centeno F, Garrido E, Mornet D, Cisneros B. Dystrophin Dp71f associates with the beta1-integrin adhesion complex to modulate PC12 cell adhesion. *J Mol Biol*. 2006 Oct 6;362(5):954-65

Chan P, Gonzalez-Maeso J, Ruf F, Bishop DF, Hof PR, Sealfon SC. Epsilon-sarcoglycan immunoreactivity and mRNA expression in mouse brain. *J Comp Neurol.* 2005 Jan 31;482(1):50-73

Chaussonot R, Edeline JM, Le Bec B, El Massioui N, Laroche S, Vaillend C. Cognitive dysfunction in the dystrophin-deficient mouse model of Duchenne muscular dystrophy: A reappraisal from sensory to executive processes. *Neurobiol Learn Mem.* 2015 Oct;124:111-22

Chaussonot R, Amar M, Fossier P, Vaillend C. Dp71-Dystrophin Deficiency Alters Prefrontal Cortex Excitation-Inhibition Balance and Executive Functions. *Mol Neurobiol.* 2019 Apr;56(4):2670-2684.

Cheng J, Van Norstrand DW, Medeiros-Domingo A, Valdivia C, Tan BH, Ye B, Kroboth S, Vatta M, Tester DJ, January CT, Makielski JC, Ackerman MJ. Alpha1-syntrophin mutations identified in sudden infant death syndrome cause an increase in late cardiac sodium current. *Circ Arrhythm Electrophysiol.* 2009 Dec;2(6):667-76

Chever O, Djukic B, McCarthy KD, Amzica F. Implication of Kir4.1 channel in excess potassium clearance: an in vivo study on anesthetized glial-conditional Kir4.1 knock-out mice. *J Neurosci.* 2010 Nov 24;30(47):15769-77.

Cia D. 2014. Slight alteration of the electroretinogram in mice lacking dystrophin Dp71, In press. *Ophthalmic Research*

Cisneros B, Rendon A, Genty V, Aranda G, Marquez F, Mornet D, Montanez C. 1996. Expression of dystrophin Dp71 during PC12 cell differentiation. *Neurosci Lett* 213(2):107-10.

Claudepierre T, Rodius F, Frasson M, Fontaine V, Picaud S, Dreyfus H, Mornet D, Rendon A. 1999. Differential distribution of dystrophins in rat retina. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 40(7):1520-9.

Claudepierre T, Dalloz C, Mornet D, Matsumura K, Sahel J, Rendon A. Characterization of the intermolecular associations of the dystrophin-associated glycoprotein complex in retinal Müller glial cells. *J Cell Sci.* 2000 Oct;113 Pt 19:3409-17

Claudepierre T, Mornet D, Pannicke T, Forster V, Dalloz C, Bolanos F, Sahel J, Reichenbach A, Rendon A. 2000b. Expression of Dp71 in Muller glial cells: a comparison with utrophin- and dystrophin-associated proteins. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 41(1):294- 304.

Clements R, Turk R, Campbell KP, Wright KM. Dystroglycan Maintains Inner Limiting Membrane Integrity to Coordinate Retinal Development. *J Neurosci.* 2017 Aug 30;37(35):8559-8574

Colella P, Auricchio A. AAV-mediated gene supply for treatment of degenerative and neovascular retinal diseases. *Curr Gene Ther.* 2010 Oct;10(5):371-80. Review

Cojocaru IM, Cojocaru M, Miu G, Sapira V. Study of interleukin-6 production in Alzheimer's disease. *Rom J Intern Med.* 2011;49(1):55-8

Connors NC, Kofuji P. Dystrophin Dp71 is critical for the clustered localization of potassium channels in retinal glial cells. *J Neurosci*. 2002 Jun 1;22(11):4321-7.

Connors NC, Adams ME, Froehner SC, Kofuji P. The potassium channel Kir4.1 associates with the dystrophin-glycoprotein complex via alpha-syntrophin in glia. *J Biol Chem*. 2004 Jul 2;279(27):28387-92

Connors NC, Kofuji P. Potassium channel Kir4.1 macromolecular complex in retinal glial cells. *Glia*. 2006 Jan 15;53(2):124-31

Cornford EM, Hyman S, Swartz BE. The human brain GLUT1 glucose transporter : ultrastructural localization to the blood-brain barrier endothelia. *J Cereb Blood Flow Metab*. 1994 Jan;14(1):106-12

Cramer SP, Simonsen H, Frederiksen JL, Rostrup E, Larsson HB. Abnormal blood-brain barrier permeability in normal appearing white matter in multiple sclerosis investigated by MRI. *Neuroimage Clin*. 2013;4:182–189. Published 2013 Dec 10.

Crane JM, Verkman AS. Determinants of aquaporin-4 assembly in orthogonal arrays revealed by live-cell single-molecule fluorescence imaging. *J Cell Sci*. 2009 Mar 15;122(Pt 6):813-21.

Crosbie RH, Lebakken CS, Holt KH, et al. Membrane targeting and stabilization of sarcospan is mediated by the sarcoglycan subcomplex. *J Cell Biol*. 1999;145(1):153–165.

Culligan K, Ohlendieck K. Diversity of the Brain Dystrophin-Glycoprotein Complex. *J Biomed Biotechnol*. 2002;2(1):31-36

Daloz C, Sarig R, Fort P, Yaffe D, Bordais A, Pannicke T, Grosche J, Mornet D, Reichenbach A, Sahel J and others. 2003. Targeted inactivation of dystrophin gene product Dp71: phenotypic impact in mouse retina. *Hum Mol Genet* 12(13):1543-54

Daneman R, Zhou L, Agalliu D, Cahoy JD, Kaushal A, Barres BA. The mouse blood-brain barrier transcriptome: a new resource for understanding the development and function of brain endothelial cells. *PLoS One*. 2010 Oct 29;5(10)

Daneman R, Zhou L, Kebede AA, Barres BA. Pericytes are required for blood-brain barrier integrity during embryogenesis. *Nature*. 2010 Nov 25;468(7323):562-6. doi: 10.1038/nature09513.

Daneman R. The blood-brain barrier in health and disease. *Ann Neurol*. 2012 Nov;72(5):648-72. Review

Daoud F, Candelario-Martínez A, Billard JM, Avital A, Khelifaoui M, Rozenvald Y, Guegan M, Mornet D, Jaillard D, Nudel U, Chelly J, Martínez-Rojas D, Laroche S, Yaffe D, Vaillend C. Role of mental retardation-associated dystrophin-gene product Dp71 in excitatory synapse organization, synaptic plasticity and behavioral functions. *PLoS One*. 2008 Aug 10;4(8):e6574.

Daoud F, Angeard N, Demerre B, Martie I, Benyaou R, Leturcq F, Cossée M, Deburgrave N, Saillour Y, Tuffery S, Urtizberea A, Toutain A, Echenne B, Frischman M, Mayer M, Desguerre

I, Estournet B, Réveillère C, Penisson-Besnier, Cuisset JM, Kaplan JC, Héron D, Rivier F, Chelly J. Analysis of Dp71 contribution in the severity of mental retardation through comparison of Duchenne and Becker patients differing by mutation consequences on Dp71 expression. *Hum Mol Genet.* 2009 Oct 15;18(20):3779-94.

Deconinck AE, Rafael JA, Skinner JA, Brown SC, Potter AC, Metzinger L, Watt DJ, Dickson JG, Tinsley JM, Davies KE. Utrophin-dystrophin-deficient mice as a model for Duchenne muscular dystrophy. *Cell.* 1997 Aug 22;90(4):717-27.

De Eulate RG, Goñi I, Galiano A, Vidorreta M, Recio M, Riverol M, Zubieta JL, Fernández-Seara MA. Reduced Cerebral Blood Flow in Mild Cognitive Impairment Assessed Using Phase-Contrast MRI. *J Alzheimers Dis.* 2017;58(2):585-595

Dejana E, Orsenigo F, Lampugnani MG: The role of adherens junctions and VE-cadherin in the control of vascular permeability. *J Cell Sci* 2008; 121: 2115—2122.

De León MB, Montañez C, Gómez P, Morales-Lázaro SL, Tapia-Ramírez V, Valadez-Graham V, Recillas-Targa F, Yaffe D, Nudel U, Cisneros B. Dystrophin Dp71 expression is down-regulated during myogenesis: role of Sp1 and Sp3 on the Dp71 promoter activity. *J Biol Chem.* 2005 Feb 18;280(7):5290-9

DiSabato DJ, Quan N, Godbout JP. Neuroinflammation: the devil is in the details. *J Neurochem.* 2016 Oct;139 Suppl 2:136-153

Djukic B, Casper KB, Philpot BD, Chin LS, McCarthy KD. Conditional knock-out of Kir4.1 leads to glial membrane depolarization, inhibition of potassium and glutamate uptake, and enhanced short-term synaptic potentiation. *J Neurosci.* 2007 Oct 17;27(42):11354-65 Dodelet-Devillers A, Cayrol R, van Horssen J, Haqqani AS, de Vries HE, Engelhardt B, Greenwood J, Prat A. Functions of lipid raft membrane microdomains at the blood-brain barrier. *J Mol Med (Berl).* 2009 Aug;87(8):765-74

D'Souza VN, Nguyen TM, Morris GE, Karges W, Pillers DA, Ray PN. A novel dystrophin isoform is required for normal retinal electrophysiology. *Hum Mol Genet.* 1995 May;4(5):837-42

Durbeej M, Jung D, Hjalt T, Campbell KP, Ekblom P. Transient expression of Dp140, a product of the Duchenne muscular dystrophy locus, during kidney tubulogenesis. *Dev Biol.* 1997 Jan 15;181(2):156-67

Durbeej M. Laminins. *Cell Tissue Res.* 2010 Jan;339(1):259-68.Review

Eid T, Lee TS, Thomas MJ, et al. Loss of perivascular aquaporin 4 may underlie deficient water and K<sup>+</sup> homeostasis in the human epileptogenic hippocampus. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2005;102(4):1193–1198.

Eilert-Olsen M, Haj-Yasein NN, Vindedal GF, Enger R, Gundersen GA, Hoddevik EH, Petersen PH, Haug FM, Skare Ø, Adams ME, Froehner SC, Burkhardt JM, Thoren AE, Nagelhus EA. Deletion of aquaporin-4 changes the perivascular glial protein scaffold without disrupting the brain endothelial barrier. *Glia.* 2012 Mar;60(3):432-40



- El Mathari B, Sene A, Charles-Messance H, Vacca O, Guillonneau X, Grepin C, Sennlaub F, Sahel JA, Rendon A, Tadayoni R. Dystrophin Dp71 gene deletion induces retinal vascular inflammation and capillary degeneration. *Hum Mol Genet.* 2015 Jul 15;24(14):3939-47
- Engelhardt B. Immune cell entry into the central nervous system: involvement of adhesion molecules and chemokines. *J Neurol Sci.* 2008 Nov 15;274(1-2):23-6. Review
- Erickson MA, Banks WA. Blood-brain barrier dysfunction as a cause and consequence of Alzheimer's disease. *J Cereb Blood Flow Metab.* 2013 Oct;33(10):1500-13
- Ervasti JM, Campbell KP. A role for the dystrophin-glycoprotein complex as a transmembrane linker between laminin and actin. *J Cell Biol.* 1993 Aug;122(4):809-23
- Esapa CT, Waite A, Locke M, Benson MA, Kraus M, McIlhinney RA, Sillitoe RV, Beesley PW, Blake DJ. SGCE missense mutations that cause myoclonus-dystonia syndrome impair epsilon-sarcoglycan trafficking to the plasma membrane: modulation by ubiquitination and torsinA. *Hum Mol Genet.* 2007 Feb 1;16(3):327-42
- Esser S, Lampugnani MG, Corada M, Dejana E, Risau W. Vascular endothelial growth factor induces VE-cadherin tyrosine phosphorylation in endothelial cells. *J Cell Sci.* 1998 Jul;111 ( Pt 13):1853-65
- Ettinger AJ, Feng G, Sanes JR. epsilon-Sarcoglycan, a broadly expressed homologue of the gene mutated in limb-girdle muscular dystrophy 2D. *J Biol Chem.* 1997 Dec 19;272(51):32534-8
- Evans NP, Misyak SA, Robertson JL, Bassaganya-Riera J, Grange RW. Immune-mediated mechanisms potentially regulate the disease time-course of duchenne muscular dystrophy and provide targets for therapeutic intervention. *PM R.* 2009 Aug;1(8):755-68
- Ezan P, André P, Cisternino S, Saubaméa B, Boulay AC, Doutremer S, Thomas MA, Quenech'du N, Giaume C, Cohen-Salmon M. Deletion of astroglial connexins weakens the blood-brain barrier. *J Cereb Blood Flow Metab.* 2012 Aug;32(8):1457-67.
- Fabene PF, Laudanna C, Constantin G. Leukocyte trafficking mechanisms in epilepsy. *Mol Immunol.* 2013 Aug;55(1):100-4
- Fan Y, Zhang J, Sun XL, Gao L, Zeng XN, Ding JH, Cao C, Niu L, Hu G. Sex- and region-specific alterations of basal amino acid and monoamine metabolism in the brain of aquaporin-4 knockout mice. *J Neurosci Res.* 2005 Nov 15;82(4):458-64
- Fanning AS, Ma TY, Anderson JM. Isolation and functional characterization of the actin binding region in the tight junction protein ZO-1. *FASEB J.* 2002 Nov;16(13):1835-7
- Feener CA, Koenig M, Kunkel LM. 1989. Alternative splicing of human dystrophin mRNA generates isoforms at the carboxy terminus. *Nature* 338(6215):509-11
- Fillit H, Ding WH, Buee L, Kalman J, Altstiel L, Lawlor B, Wolf-Klein G. Elevated circulating tumor necrosis factor levels in Alzheimer's disease. *Neurosci Lett.* 1991 Aug 19;129(2):318-20

- Fischer S, Wobben M, Marti HH, Renz D, Schaper W. Hypoxia-induced hyperpermeability in brain microvessel endothelial cells involves VEGF-mediated changes in the expression of zonula occludens-1. *Microvasc Res.* 2002 ;63(1):70-80
- Fort PE, Sene A, Pannicke T, Roux MJ, Forster V, Mornet D, Nudel U, Yaffe D, Reichenbach A, Sahel JA, Rendon A. Kir4.1 and AQP4 associate with Dp71- and utrophin-DAPs complexes in specific and defined microdomains of Müller retinal glial cell membrane. *Glia.* 2008 Apr 15;56(6):597-610
- Frigeri A, Nicchia GP, Nico B, Quondamatteo F, Herken R, Roncali L, Svelto M. Aquaporin-4 deficiency in skeletal muscle and brain of dystrophic mdx mice. *FASEB J.* 2001 Jan;15(1):90-98
- Fritschy JM, Schweizer C, Brünig I, Lüscher B. Pre- and post-synaptic mechanisms regulating the clustering of type A gamma-aminobutyric acid receptors (GABAA receptors). *Biochem Soc Trans.* 2003 Aug;31(Pt 4):889-92. Review
- Frydenlund DS, Bhardwaj A, Otsuka T, Mylonakou MN, Yasumura T, Davidson KG, Zeynalov E, Skare O, Laake P, Haug FM, Rash JE, Agre P, Ottersen OP, Amiry-Moghaddam M. Temporary loss of perivascular aquaporin-4 in neocortex after transient middle cerebral artery occlusion in mice. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2006 Sep 5;103(36):13532-6
- Fujimoto T, Itoh K, Yaoi T, Fushiki S. Somatodendritic and excitatory postsynaptic distribution of neuron-type dystrophin isoform, Dp40, in hippocampal neurons. *Biochem Biophys Res Commun.* 2014 Sep 12;452(1):79-84
- Fukuda AM, Badaut J. Aquaporin 4: a player in cerebral edema and neuroinflammation. *J Neuroinflammation.* 2012 Dec 27;9:279.Review
- Fukuda AM, Adami A, Pop V, Bellone JA, Coats JS, Hartman RE, Ashwal S, Obenaus A, Badaut J. Posttraumatic reduction of edema with aquaporin-4 RNA interference improves acute and chronic functional recovery. *J Cereb Blood Flow Metab.* 2013 Oct;33(10):1621-32
- Furman CS, Gorelick-Feldman DA, Davidson KG, Yasumura T, Neely JD, Agre P, Rash JE. Aquaporin-4 square array assembly: opposing actions of M1 and M23 isoforms. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2003 Nov 11;100(23):13609-14
- Furuse M, Itoh M, Hirase T, Nagafuchi A, Yonemura S, Tsukita S, Tsukita S. Direct association of occludin with ZO-1 and its possible involvement in the localization of occludin at tight junctions. *J Cell Biol.* 1994 Dec;127(6 Pt 1):1617-26.
- Furuse M, Hata M, Furuse K, Yoshida Y, Haratake A, Sugitani Y, Noda T, Kubo A, Tsukita S. Claudin-based tight junctions are crucial for the mammalian epidermal barrier: a lesson from claudin-1-deficient mice. *J Cell Biol.* 2002 Mar 18;156(6):1099-111
- Gavard J: Endothelial permeability and VE-cadherin: A wacky comradeship. *Cell Adhesion & Migration* 2014; 8: 158—164.

- Gavard J, Gutkind JS. VEGF controls endothelial-cell permeability by promoting the beta-arrestin-dependent endocytosis of VE-cadherin. *Nat Cell Biol.* 2006 Nov;8(11):1223-34.
- Gavard J, Gutkind JS. VE-cadherin and claudin-5: it takes two to tango. *Nat Cell Biol.* 2008;10(8):883–885.
- Gee SH, Madhavan R, Levinson SR, Caldwell JH, Sealock R, Froehner SC. Interaction of muscle and brain sodium channels with multiple members of the syntrophin family of dystrophin-associated proteins. *J Neurosci.* 1998 Jan 1;18(1):128-37
- Giampietro C, Taddei A, Corada M, Sarra-Ferraris GM, Alcalay M, Cavallaro U, Orsenigo F, Lampugnani MG, Dejana E. Overlapping and divergent signaling pathways of N-cadherin and VE-cadherin in endothelial cells. *Blood.* 2012 Mar 1;119(9):2159-70.
- Giaume C, Fromaget C, el Aoumari A, Cordier J, Glowinski J, Gros D. Gap junctions in cultured astrocytes: single-channel currents and characterization of channel-forming protein. *Neuron.* 1991 Jan;6(1):133-43
- Gilbert A, Vidal XE, Estevez R, Cohen-Salmon M, Boulay AC. Postnatal development of the astrocyte perivascular MLC1/GlialCAM complex defines a temporal window for the gliovascular unit maturation. *Brain Struct Funct.* 2019 Apr;224(3):1267-1278.
- Giocanti-Auregan A, Vacca O, Bénard R, Cao S, Siqueiros L, Montañez C, Paques M, Sahel JA, Sennlaub F, Guillonneau X, Rendon A, Tadayoni R. Altered astrocyte morphology and vascular development in dystrophin-Dp71-null mice. *Glia.* 2016 May;64(5):716-29
- Ginn SL, Alexander IE, Edelstein ML, Abedi MR, Wixon J. 2013. Gene therapy clinical trials worldwide to 2012 - an update. *J Gene Med* 15(2):65-77.
- Gordon GR, Mulligan SJ, MacVicar BA. Astrocyte control of the cerebrovasculature. *Glia.* 2007 Sep;55(12):1214-21. Review.
- Gordon GR, Howarth C, MacVicar BA. Bidirectional control of arteriole diameter by astrocytes. *Exp Physiol.* 2011 Apr;96(4):393-9.
- Górecki DC, Monaco AP, Derry JM, Walker AP, Barnard EA, Barnard PJ. Expression of four alternative dystrophin transcripts in brain regions regulated by different promoters. *Hum Mol Genet.* 1992 Oct;1(7):505-10
- Górecki DC, Barnard EA. Specific expression of G-dystrophin (Dp71) in the brain. *Neuroreport.* 1995 Apr 19;6(6):893-6
- Gory S, Vernet M, Laurent M, Dejana E, Dalmon J, Huber P. The vascular endothelial-cadherin promoter directs endothelial-specific expression in transgenic mice. *Blood.* 1999 Jan 1;93(1):184-92
- Gow A, Southwood CM, Li JS, Pariali M, Riordan GP, Brodie SE, Danias J, Bronstein JM, Kachar B, Lazzarini RA. CNS myelin and sertoli cell tight junction strands are absent in Osp/claudin-11 null mice

Gracida-Jiménez V, Mondragón-González R, Vélez-Aguilera G, Vásquez-Limeta A, Laredo-Cisneros MS, Gómez-López JD, Vaca L, Gourlay SC, Jacobs LA, Winder SJ, Cisneros B. Retrograde trafficking of  $\beta$ -dystroglycan from the plasma membrane to the nucleus. *Sci Rep*. 2017 Aug 29;7(1):9906

Grady RM, Teng H, Nichol MC, Cunningham JC, Wilkinson RS, Sanes JR. Skeletal and cardiac myopathies in mice lacking utrophin and dystrophin: a model for Duchenne muscular dystrophy. *Cell*. 1997 Aug 22;90(4):729-38

Greenwood J, Heasman SJ, Alvarez JI, Prat A, Lyck R, Engelhardt B. Review: leucocyte-endothelial cell crosstalk at the blood-brain barrier: a prerequisite for successful immune cell entry to the brain. *Neuropathol Appl Neurobiol*. 2011 Feb;37(1):24-39

Gu Y, Zheng G, Xu M, Li Y, Chen X, Zhu W, Tong Y, Chung SK, Liu KJ, Shen J. Caveolin-1 regulates nitric oxide-mediated matrix metalloproteinases activity and blood-brain barrier permeability in focal cerebral ischemia and reperfusion injury. *J Neurochem*. 2012 Jan;120(1):147-56

Gumbiner B, Lowenkopf T, Apatira D. Identification of a 160-kDa polypeptide that binds to the tight junction protein ZO-1. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1991 Apr 15;88(8):3460-4

Günzel D, Yu AS. Claudins and the modulation of tight junction permeability. *Physiol Rev*. 2013 Apr;93(2):525-69. doi: 10.1152/physrev.00019.2012. Review

Haenggi T, Fritschy JM. Role of dystrophin and utrophin for assembly and function of the dystrophin glycoprotein complex in non-muscle tissue. *Cell Mol Life Sci*. 2006 Jul;63(14):1614-31. Review

Haj-Yasein NN, Vindedal GF, Eilert-Olsen M, Gundersen GA, Skare Ø, Laake P, Klungland A, Thorén AE, Burkhardt JM, Ottersen OP, Nagelhus EA. Glial-conditional deletion of aquaporin-4 (Aqp4) reduces blood-brain water uptake and confers barrier function on perivascular astrocyte endfeet. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2011 Oct 25;108(43):17815-20

Hamilton NB, Attwell D, Hall CN. Pericyte-mediated regulation of capillary diameter: a component of neurovascular coupling in health and disease. *Front Neuroenergetics*. 2010 May 21;2. pii: 5. doi: 10.3389/fnene.2010.00005.

Haskins J, Gu L, Wittchen ES, Hibbard J, Stevenson BR. ZO-3, a novel member of the MAGUK protein family found at the tight junction, interacts with ZO-1 and occludin. *J Cell Biol*. 1998 Apr 6;141(1):199-208.

Hauswirth WW, Aleman TS, Kaushal S, Cideciyan AV, Schwartz SB, Wang L, Conlon TJ, Boye SL, Flotte TR, Byrne BJ and others. 2008. Treatment of leber congenital amaurosis due to RPE65 mutations by ocular subretinal injection of adeno-associated virus gene vector: short-term results of a phase I trial. *Hum Gene Ther* 19(10):979-90

Helleringer R, Le Verger D, Li X, Isabelle C, Chausseot R, Belmaati-Cherkaoui M, Dammak R, Decottignies P, Daniel H, Galante M, Vaillend C. Cerebellar synapse properties and cerebellum-dependent motor and non-motor performance in Dp71-null mice. *Dis Model Mech*. 2018 Jul 10;11(7). pii: dmm033258

Henninger DD, Gerritsen ME, Granger DN. Low-density lipoprotein receptor knockout mice exhibit exaggerated microvascular responses to inflammatory stimuli. *Circ Res.* 1997 Aug;81(2):274-81

Herrera-Salazar A, García-Villegas R, Aragón J, Sánchez-Trujillo A, Ceja V, Martínez-Herrera A, Merino-Jiménez C, Montañez C. Overexpression of mutant dystrophin Dp71[INCREMENT]<sub>78-79</sub> stimulates cell proliferation. *Neuroreport.* 2016 Jan 6;27(1):6-11

Hibino H, Inanobe A, Furutani K, Murakami S, Findlay I, Kurachi Y. Inwardly rectifying potassium channels: their structure, function, and physiological roles. *Physiol Rev.* 2010 Jan;90(1):291-366. doi: 10.1152/physrev.00021.2009. Review.

Higashi K, Fujita A, Inanobe A, Tanemoto M, Doi K, Kubo T, Kurachi Y. An inwardly rectifying K(+) channel, Kir4.1, expressed in astrocytes surrounds synapses and blood vessels in brain. *Am J Physiol Cell Physiol.* 2001 Sep;281(3):C922-31

Hinson SR, Roemer SF, Lucchinetti CF, Fryer JP, Kryzer TJ, Chamberlain JL, Howe CL, Pittock SJ, Lennon VA. Aquaporin-4-binding autoantibodies in patients with neuromyelitis optica impair glutamate transport by down-regulating EAAT2. *J Exp Med.* 2008 Oct 27;205(11):2473-81

Hirt L, Fukuda AM, Ambadipudi K, Rashid F, Binder D, Verkman A, Ashwal S, Obenaus A, Badaut J. Improved long-term outcome after transient cerebral ischemia in aquaporin-4 knockout mice. *J Cereb Blood Flow Metab.* 2017 Jan;37(1):277-290

Hill RA, Tong L, Yuan P, Murikinati S, Gupta S, Grutzendler J. Regional Blood Flow in the Normal and Ischemic Brain Is Controlled by Arteriolar Smooth Muscle Cell Contractility and Not by Capillary Pericytes. *Neuron.* 2015 Jun 23

Hjermind LE, Vissing J, Asmus F, Krag T, Lochmüller H, Walter MC, Erdal J, Blake DJ, Nielsen JE. No muscle involvement in myoclonus-dystonia caused by epsilon-sarcoglycan gene mutations. *Eur J Neurol.* 2008 May;15(5):525-9

Hoddevik EH, Khan FH, Rahmani S, Ottersen OP, Boldt HB, Amiry-Moghaddam M. Factors determining the density of AQP4 water channel molecules at the brain-blood interface. *Brain Struct Funct.* 2017 May;222(4):1753-1766

Holmberg J, Durbeej M. Laminin-211 in skeletal muscle function. *Cell Adh Migr.* 2013 Jan-Feb;7(1):111-21. doi: 10.4161/cam.22618. Epub 2012 Nov 15. Review

Huang ZG, Xue D, Preston E, Karbalai H, Buchan AM. Biphasic opening of the blood-brain barrier following transient focal ischemia: effects of hypothermia. *Can J Neurol Sci.* 1999 Nov;26(4):298-304

Huang J, Upadhyay UM, Tamargo RJ. Inflammation in stroke and focal cerebral ischemia. *Surg Neurol.* 2006 Sep;66(3):232-45. Review

Hubbard JA, Hsu MS, Seldin MM, Binder DK. Expression of the Astrocyte Water Channel Aquaporin-4 in the Mouse Brain. *ASN Neuro.* 2015 Oct 21;7(5). pii: 1759091415605486

Hugnot JP, Gilgenkrantz H, Vincent N, Chafey P, Morris GE, Monaco AP, Berwald-Netter Y, Koulakoff A, Kaplan JC, Kahn A, et al. Distal transcript of the dystrophin gene initiated from an alternative first exon and encoding a 75-kDa protein widely distributed in nonmuscle tissues. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1992 Aug 15;89(16):7506-10

Hunter DD, Porter BE, Bullock JW, Adams SP, Merlie JP, Sanes JR. Primary sequence of a motor neuron-selective adhesive site in the synaptic basal lamina protein S-laminin. *Cell*. 1989 Dec 1;59(5):905-13

Ibraghimov-Beskrovnya O, Ervasti JM, Leveille CJ, Slaughter CA, Sernett SW, Campbell KP. Primary structure of dystrophin-associated glycoproteins linking dystrophin to the extracellular matrix. *Nature*. 1992 Feb 20;355(6362):696-702

Illarionova NB, Gunnarson E, Li Y, Brismar H, Bondar A, Zelenin S, Aperia A. Functional and molecular interactions between aquaporins and Na,K-ATPase. *Neuroscience*. 2010 Jul 28;168(4):915-25

Israeli D, Tanne D, Daniels D, Last D, Shneur R, Guez D, Landau E, Roth Y, Ocherashvili A, Bakon M, Hoffman C, Weinberg A, Volk T, Mardor Y. The application of MRI for depiction of subtle blood brain barrier disruption in stroke. *Int J Biol Sci*. 2010 Dec 26;7(1):1-8

Itoh M, Nagafuchi A, Moroi S, Tsukita S. Involvement of ZO-1 in cadherin-based cell adhesion through its direct binding to alpha catenin and actin filaments. *J Cell Biol*. 1997 Jul 14;138(1):181-92

Itoh M, Furuse M, Morita K, Kubota K, Saitou M, Tsukita S. Direct binding of three tight junction-associated MAGUKs, ZO-1, ZO-2, and ZO-3, with the COOH termini of claudins. *J Cell Biol*. 1999;147(6):1351-1363.

Iwata Y, Sampaolesi M, Shigekawa M, Wakabayashi S. Syntrophin is an actin-binding protein the cellular localization of which is regulated through cytoskeletal reorganization in skeletal muscle cells. *Eur J Cell Biol*. 2004 Oct;83(10):555-65

Jancsik V, Hajós F. The demonstration of immunoreactive dystrophin and its developmental expression in perivascular astrocytes. *Brain Res*. 1999 Jun 12;831(1-2):200-5.

Jansen LA, Uhlmann EJ, Crino PB, Gutmann DH, Wong M. Epileptogenesis and reduced inward rectifier potassium current in tuberous sclerosis complex-1-deficient astrocytes. *Epilepsia*. 2005 Dec;46(12):1871-80

Jin H, Tan S, Hermanowski J, Bohm S, Pacheco S, McCauley JM, Greener MJ, Hinitz Y, Hughes SM, Sharpe PT and others. 2007. The dystrotelin, dystrophin and dystrobrevin superfamily: new paralogues and old isoforms. *BMC Genomics* 8:19

Jullienne A, Fukuda AM, Ichkova A, Nishiyama N, Aussudre J, Obenaus A, Badaut J. Modulating the water channel AQP4 alters miRNA expression, astrocyte connectivity and water diffusion in the rodent brain. *Sci Rep*. 2018 Mar 8;8(1):4186

Jung D, Filliol D, Metz-Boutigue MH, Rendon A (1993) Characterization and subcellular localization of the dystrophin-protein 71 (Dp71) from brain. *Neuromuscul Disord* 3: 515–518.

Katoozi S, Skauli N, Rahmani S, Camassa LMA, Boldt HB, Ottersen OP, Amiry-Moghaddam M. Targeted deletion of Aqp4 promotes the formation of astrocytic gap junctions. *Brain Struct Funct.* 2017 Dec;222(9):3959-3972

Katsuno T, Umeda K, Matsui T, Hata M, Tamura A, Itoh M, Takeuchi K, Fujimori T, Nabeshima Y, Noda T, Tsukita S, Tsukita S. Deficiency of zonula occludens-1 causes embryonic lethal phenotype associated with defected yolk sac angiogenesis and apoptosis of embryonic cells. *Mol Biol Cell.* 2008 Jun;19(6):2465-75.

Keaney J, Campbell M. The dynamic blood-brain barrier. *FEBS J.* 2015 Nov;282(21):4067-79. doi: 10.1111/febs.13412. Epub 2015 Sep 8. Review

Kebir H, Kreymborg K, Ifergan I, Dodelet-Devillers A, Cayrol R, Bernard M, Giuliani F, Arbour N, Becher B, Prat A. Human TH17 lymphocytes promote blood-brain barrier disruption and central nervous system inflammation. *Nat Med.* 2007 Oct;13(10):1173-5

Kneussel M, Brandstätter JH, Laube B, Stahl S, Müller U, Betz H. Loss of postsynaptic GABA(A) receptor clustering in gephyrin-deficient mice. *J Neurosci.* 1999 Nov 1;19(21):9289-97

Knipe DM HP, Griffin DE, Lamb RA, Martin MA, Roizman B et al. 2006. *Field's Virology*

Knowland D, Arac A, Sekiguchi KJ, Hsu M, Lutz SE, Perrino J, Steinberg GK, Barres BA, Nimmerjahn A, Agalliu D. Stepwise recruitment of transcellular and paracellular pathways underlies blood-brain barrier breakdown in stroke. *Neuron.* 2014 May 7;82(3):603-17

Koenig M, Monaco AP, Kunkel LM. The complete sequence of dystrophin predicts a rod-shaped cytoskeletal protein. *Cell.* 1988 Apr 22;53(2):219-28

Kofuji P, Ceelen P, Zahs KR, Surbeck LW, Lester HA, Newman EA. Genetic inactivation of an inwardly rectifying potassium channel (Kir4.1 subunit) in mice: phenotypic impact in retina. *J Neurosci.* 2000 Aug 1;20(15):5733-40

Kofuji P, Biedermann B, Siddharthan V, Raap M, Iandiev I, Milenkovic I, Thomzig A, Veh RW, Bringmann A, Reichenbach A. Kir potassium channel subunit expression in retinal glial cells: implications for spatial potassium buffering. *Glia.* 2002 Sep;39(3):292-303

Kose N, Asashima T, Muta M, Iizasa H, Sai Y, Terasaki T, Nakashima E. Altered expression of basement membrane-related molecules in rat brain pericyte, endothelial, and astrocyte cell lines after transforming growth factor-beta1 treatment. *Drug Metab Pharmacokinet.* 2007 Aug;22(4):255-66

Krause G, Winkler L, Mueller SL, Haseloff RF, Piontek J, Blasig IE. Structure and function of claudins. *Biochim Biophys Acta.* 2008 Mar;1778(3):631-45. Epub 2007 Oct 25. Review

Kuroiwa T, Ting P, Martinez H, Klatzo I. The biphasic opening of the blood-brain barrier to proteins following temporary middle cerebral artery occlusion. *Acta Neuropathol.* 1985;68(2):122-9

Lampugnani MG, Corada M, Caveda L, Breviario F, Ayalon O, Geiger B, Dejana E. The molecular organization of endothelial cell to cell junctions: differential association of plakoglobin, beta-catenin, and alpha-catenin with vascular endothelial cadherin (VE-cadherin). *J Cell Biol.* 1995 Apr;129(1):203-17

Larochelle C, Alvarez JI, Prat A. How do immune cells overcome the blood-brain barrier in multiple sclerosis? *FEBS Lett.* 2011 Dec 1;585(23):3770-80

LeBlanc MA, Penney LS, Gaston D, Shi Y, Aberg E, Nightingale M, Jiang H, Gillett RM, Fahiminiya S, Macgillivray C, Wood EP, Acott PD, Khan MN, Samuels ME, Majewski J, Orr A, McMaster CR, Bedard K. A novel rearrangement of occludin causes brain calcification and renal dysfunction. *Hum Genet.* 2013 Nov;132(11):1223-34

Lederfein D, Levy Z, Augier N, Mornet D, Morris G, Fuchs O, Yaffe D, Nudel U. A 71-kilodalton protein is a major product of the Duchenne muscular dystrophy gene in brain and other nonmuscle tissues. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1992 Jun 15;89(12):5346-50

Lederfein D, Yaffe D, Nudel U. A housekeeping type promoter, located in the 3' region of the Duchenne muscular dystrophy gene, controls the expression of Dp71, a major product of the gene. *Hum Mol Genet.* 1993 Nov;2(11):1883-8

Lee S, Chen TT, Barber CL, Jordan MC, Murdock J, Desai S, Ferrara N, Nagy A, Roos KP, Iruela-Arispe ML. Autocrine VEGF signaling is required for vascular homeostasis. *Cell.* 2007 Aug 24;130(4):691-703

Lepelletier FX, Mann DM, Robinson AC, Pinteaux E, Boutin H. Early changes in extracellular matrix in Alzheimer's disease. *Neuropathol Appl Neurobiol.* 2017 Feb;43(2):167-182. doi: 10.1111/nan.12295

Lenglet S, Montecucco F, Mach F, Schaller K, Gasche Y, Copin JC. Analysis of the expression of nine secreted matrix metalloproteinases and their endogenous inhibitors in the brain of mice subjected to ischaemic stroke. *Thromb Haemost.* 2014 Aug;112(2):363-78

Li G, Liu X, Liu Z, Su Z. Interactions of connexin 43 and aquaporin-4 in the formation of glioma-induced brain edema. *Mol Med Rep.* 2015 Feb;11(2):1188-94.

Li H, Mittal A, Makonchuk DY, Bhatnagar S, Kumar A. Matrix metalloproteinase-9 inhibition ameliorates pathogenesis and improves skeletal muscle regeneration in muscular dystrophy. *Hum Mol Genet.* 2009 Jul 15;18(14):2584-98

Li J, Verkman AS. Impaired hearing in mice lacking aquaporin-4 water channels. *J Biol Chem* 2001 ; 276 : 31233-7.

Li J, Patil RV, Verkman AS. Mildly abnormal retinal function in transgenic mice without Müller cell aquaporin-4 water channels. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2002 Feb;43(2):573-9



- Liebner S, Czupalla CJ, Wolburg H. Current concepts of blood-brain barrier development. *Int J Dev Biol*. 2011;55(4-5):467-76. doi: 10.1387/ijdb.103224sl. Review
- Lien CF, Mohanta SK, Frontczak-Baniewicz M, Swinny JD, Zablocka B, Górecki DC. Absence of glial  $\alpha$ -dystrobrevin causes abnormalities of the blood-brain barrier and progressive brain edema. *J Biol Chem*. 2012 Nov 30;287(49):41374-85.
- Lidov HG, Byers TJ, Kunkel LM. The distribution of dystrophin in the murine central nervous system: an immunocytochemical study. *Neuroscience*. 1993 May;54(1):167-87
- Lightman S, Rechthand E, Latker C, Palestine A, Rapoport S. Assessment of the permeability of the blood-retinal barrier in hypertensive rats. *Hypertension*. 1987 Oct;10(4):390-5
- Liu J, Jin X, Liu KJ, Liu W. Matrix metalloproteinase-2-mediated occludin degradation and caveolin-1-mediated claudin-5 redistribution contribute to blood-brain barrier damage in early ischemic stroke stage. *J Neurosci*. 2012;32(9):3044–3057.
- Long Tham DK, Joshi B, Moukhles H. Aquaporin-4 Cell-Surface Expression and Turnover Are Regulated by Dystroglycan, Dynamins, and the Extracellular Matrix in Astrocytes. *PLoS One*. 2016 ;11(10):e0165439. Published 2016 Oct 27.
- Lorenzl S, Albers DS, Relkin N, Ngyuen T, Hilgenberg SL, Chirichigno J, Cudkowicz ME, Beal MF. Increased plasma levels of matrix metalloproteinase-9 in patients with Alzheimer's disease. *Neurochem Int*. 2003 Aug;43(3):191-6
- Love DR, Hill DF, Dickson G, Spurr NK, Byth BC, Marsden RF, Walsh FS, Edwards YH, Davies KE. An autosomal transcript in skeletal muscle with homology to dystrophin. *Nature*. 1989 May 4;339(6219):55-8.
- Lu DC, Zhang H, Zador Z, Verkman AS. Impaired olfaction in mice lacking aquaporin-4 water channels. *FASEB J*. 2008 Sep;22(9):3216-23
- Lu M, Hu G. Targeting metabolic inflammation in Parkinson's disease: implications for prospective therapeutic strategies. *Clin Exp Pharmacol Physiol*. 2012 Jun;39(6):577-85
- Lumeng CN, Phelps SF, Rafael JA, Cox GA, Hutchinson TL, Begy CR, Adkins E, Wiltshire R, Chamberlain JS. 1999. Characterization of dystrophin and utrophin diversity in the mouse. *Hum Mol Genet* 8(4):593-9
- Lyssand JS, Lee KS, DeFino M, Adams ME, Hague C. Syntrophin isoforms play specific functional roles in the  $\alpha$ 1D-adrenergic receptor/DAPC signalosome. *Biochem Biophys Res Commun*. 2011 Sep 9;412(4):596-601
- MacAulay N, Hamann S, Zeuthen T. Water transport in the brain: role of cotransporters. *Neuroscience*. 2004;129(4):1031-44. Review
- Madrid R, Le Maout S, Barrault MB, Janvier K, Benichou S, Mérot J. Polarized trafficking and surface expression of the AQP4 water channel are coordinated by serial and regulated interactions with different clathrin-adaptor complexes. *EMBO J*. 2001 Dec 17;20(24):7008-21

Maguire AM, Simonelli F, Pierce EA, Pugh EN, Jr., Mingozzi F, Bennicelli J, Banfi S, Marshall KA, Testa F, Surace EM and others. 2008. Safety and efficacy of gene transfer for Leber's congenital amaurosis. *N Engl J Med* 358(21):2240-8.

Mammucari C, Milan G, Romanello V, Masiero E, Rudolf R, Del Piccolo P, Burden SJ, Di Lisi R, Sandri C, Zhao J, Goldberg AL, Schiaffino S, Sandri M. FoxO3 controls autophagy in skeletal muscle in vivo. *Cell Metab.* 2007 Dec;6(6):458-71

Manley GT, Fujimura M, Ma T, Noshita N, Filiz F, Bollen AW, Chan P, Verkman AS. Aquaporin-4 deletion in mice reduces brain edema after acute water intoxication and ischemic stroke. *Nat Med.* 2000 Feb;6(2):159-63

Marchiando AM, Shen L, Graham WV, Weber CR, Schwarz BT, Austin JR 2nd, Raleigh DR, Guan Y, Watson AJ, Montrose MH, Turner JR. Caveolin-1-dependent occludin endocytosis is required for TNF-induced tight junction regulation in vivo. *J Cell Biol.* 2010 Apr 5;189(1):111-26

Marquez FG, Cisneros B, Garcia F, Ceja V, Velazquez F, Depardon F, Cervantes L, Rendon A, Mornet D, Rosas-vargas H and others. 2003. Differential expression and subcellular distribution of dystrophin Dp71 isoforms during differentiation process. *Neuroscience* 118(4):957-66

Masaki H, Wakayama Y, Hara H, et al. Immunocytochemical studies of aquaporin 4, Kir4.1, and  $\alpha$ 1-syntrophin in the astrocyte endfeet of mouse brain capillaries. *Acta Histochem Cytochem.* 2010;43(4):99–105.

Mazaré N, Gilbert A, Boulay AC, Rouach N, Cohen-Salmon M. Connexin 30 is expressed in a subtype of mouse brain pericytes. *Brain Struct Funct.* 2018 Mar;223(2):1017-1024.

McGrail KM, Phillips JM, Sweadner KJ. Immunofluorescent localization of three Na,K-ATPase isozymes in the rat central nervous system: both neurons and glia can express more than one Na,K-ATPase. *J Neurosci.* 1991 Feb;11(2):381-91

McNally EM, Passos-Bueno MR, Bönnemann CG, Vainzof M, de Sá Moreira E, Lidov HG, Othmane KB, Denton PH, Vance JM, Zatz M, Kunkel LM. Mild and severe muscular dystrophy caused by a single gamma-sarcoglycan mutation. *Am J Hum Genet.* 1996 Nov;59(5):1040-7

Medina R, Rahner C, Mitic LL, Anderson JM, Van Itallie CM. Occludin localization at the tight junction requires the second extracellular loop. *J Membr Biol.* 2000 Dec 1;178(3):235-47

Menezes MJ, McClenahan FK, Leiton CV, Aranmolate A, Shan X, Colognato H. The extracellular matrix protein laminin  $\alpha$ 2 regulates the maturation and function of the blood-brain barrier. *J Neurosci.* 2014 Nov 12;34(46):15260-80

Migliati ER, Amiry-Moghaddam M, Froehner SC, Adams ME, Ottersen OP, Bhardwaj A. Na(+)-K (+)-2Cl (-) cotransport inhibitor attenuates cerebral edema following experimental stroke via the perivascular pool of aquaporin-4. *Neurocrit Care.* 2010 Aug;13(1):123-31

- Miner JH, Patton BL, Lentz SI, et al. The laminin alpha chains: expression, developmental transitions, and chromosomal locations of alpha1-5, identification of heterotrimeric laminins 8 11, and cloning of a novel alpha3 isoform. *J Cell Biol.* 1997;137(3):685–701.
- Miranda R, Sébrié C, Degrouard J, Gillet B, Jaillard D, Laroche S, Vaillend C. Reorganization of inhibitory synapses and increased PSD length of perforated excitatory synapses in hippocampal area CA1 of dystrophin-deficient mdx mice. *Cereb Cortex.* 2009 Apr;19(4):876-88
- Miranda R, Nudel U, Laroche S, Vaillend C. Altered presynaptic ultrastructure in excitatory hippocampal synapses of mice lacking dystrophins Dp427 or Dp71. *Neurobiol Dis.* 2011 Jul;43(1):134-41. doi: 10.1016/j.nbd.2011.02.017. Epub 2011 Mar 22.
- Mogi M, Horiuchi M. Neurovascular coupling in cognitive impairment associated with diabetes mellitus. *Circ J.* 2011;75(5):1042-8. Epub 2011 Mar 25. Review
- Moizard MP, Toutain A, Fournier D, Berret F, Raynaud M, Billard C, Andres C, Moraine C. Severe cognitive impairment in DMD: obvious clinical indication for Dp71 isoform point mutation screening. *Eur J Hum Genet.* 2000 Jul;8(7):552-6
- Montagne A, Barnes SR, Sweeney MD, Halliday MR, Sagare AP, Zhao Z, Toga AW, Jacobs RE, Liu CY, Amezcua L, Harrington MG, Chui HC, Law M, Zlokovic BV. Blood-brain barrier breakdown in the aging human hippocampus. *Neuron.* 2015 Jan 21;85(2):296-302
- Morita K, Sasaki H, Furuse M, Tsukita S. Endothelial claudin: claudin-5/TMVCF constitutes tight junction strands in endothelial cells. *J Cell Biol.* 1999 Oct 4;147(1):185-94
- Moylan JS, Reid MB. Oxidative stress, chronic disease, and muscle wasting. *Muscle Nerve.* 2007 Apr;35(4):411-29. Review
- Müller SL, Portwich M, Schmidt A, Utepbergenov DI, Huber O, Blasig IE, Krause G. The tight junction protein occludin and the adherens junction protein alpha-catenin share a common interaction mechanism with ZO-1. *J Biol Chem.* 2005 Feb 4;280(5):3747-56
- Muntoni F, Torelli S, Ferlini A. Dystrophin and mutations: one gene, several proteins, multiple phenotypes. *Lancet Neurol.* 2003 Dec;2(12):731-40. Review
- Nagasawa K, Chiba H, Fujita H, Kojima T, Saito T, Endo T, Sawada N. Possible involvement of gap junctions in the barrier function of tight junctions of brain and lung endothelial cells. *J Cell Physiol.* 2006 Jul;208(1):123-32
- Nagelhus EA, Horio Y, Inanobe A, Fujita A, Haug FM, Nielsen S, Kurachi Y, Ottersen OP. Immunogold evidence suggests that coupling of K<sup>+</sup> siphoning and water transport in rat retinal Müller cells is mediated by a coenrichment of Kir4.1 and AQP4 in specific membrane domains. *Glia.* 1999 Mar;26(1):47-54
- Nagelhus EA, Ottersen OP. Physiological roles of aquaporin-4 in brain. *Physiol Rev.* 2013 Oct;93(4):1543-62

Nakayama S, Amiry-Moghaddam M, Ottersen OP, Bhardwaj A. Conivaptan, a Selective Arginine Vasopressin V1a and V2 Receptor Antagonist Attenuates Global Cerebral Edema Following Experimental Cardiac Arrest via Perivascular Pool of Aquaporin-4. *Neurocrit Care*. 2016 Apr;24(2):273-82

Neely JD, Amiry-Moghaddam M, Ottersen OP, Froehner SC, Agre P, Adams ME. Syntrophin-dependent expression and localization of Aquaporin-4 water channel protein. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2001 Nov 20;98(24):14108-13

Newman EA. Voltage-dependent calcium and potassium channels in retinal glial cells. *Nature*. 1985 Oct 31-Nov 6;317(6040):809-11

Newman E, Reichenbach A. The Müller cell: a functional element of the retina. *Trends Neurosci*. 1996 Aug;19(8):307-12. Review

Nguyen TM, Ellis JM, Love DR, Davies KE, Gatter KC, Dickson G, Morris GE. Localization of the DMDL gene-encoded dystrophin-related protein using a panel of nineteen monoclonal antibodies: presence at neuromuscular junctions, in the sarcolemma of dystrophic skeletal muscle, in vascular and other smooth muscles, and in proliferating brain cell lines. *J Cell Biol*. 1991 Dec;115(6):1695-700

Nico B, Frigeri A, Nicchia GP, Corsi P, Ribatti D, Quondamatteo F, Herken R, Girolamo F, Marzullo A, Svelto M, Roncali L. Severe alterations of endothelial and glial cells in the blood-brain barrier of dystrophic mdx mice. *Glia*. 2003 May;42(3):235-51

Nico B, Corsi P, Vacca A, Roncali L, Ribatti D. Vascular endothelial growth factor and vascular endothelial growth factor receptor-2 expression in mdx mouse brain. *Brain Res*. 2002 Oct 25;953(1-2):12-6

Nico B, Paola Nicchia G, Frigeri A, Corsi P, Mangieri D, Ribatti D, Svelto M, Roncali L. Altered blood-brain barrier development in dystrophic MDX mice. *Neuroscience*. 2004;125(4):921-35

Nico B, Corsi P, Ria R, Crivellato E, Vacca A, Roccaro AM, Mangieri D, Ribatti D, Roncali L. Increased matrix-metalloproteinase-2 and matrix-metalloproteinase-9 expression in the brain of dystrophic mdx mouse. *Neuroscience*. 2006 Jul 7;140(3):835-48.

Nico B, Tamma R, Annese T, Mangieri D, De Luca A, Corsi P, Benagiano V, Longo V, Crivellato E, Salmaggi A, Ribatti D. Glial dystrophin-associated proteins, laminin and agrin, are downregulated in the brain of mdx mouse. *Lab Invest*. 2010 Nov;90(11):1645-60.

Nicchia GP, Rossi A, Nudel U, Svelto M, Frigeri A. Dystrophin-dependent and -independent AQP4 pools are expressed in the mouse brain. *Glia*. 2008 Jun;56(8):869-76

Nielsen S, Nagelhus EA, Amiry-Moghaddam M, Bourque C, Agre P, Ottersen OP. Specialized membrane domains for water transport in glial cells: high-resolution immunogold cytochemistry of aquaporin-4 in rat brain. *J Neurosci*. 1997 Jan 1;17(1):171-80

Nilius B. Is the volume-regulated anion channel VRAC a "water-permeable" channel ? *Neurochem Res*. 2004 Jan;29(1):3-8

- Nishiyama A, Endo T, Takeda S, Imamura M. Identification and characterization of epsilon-sarcoglycans in the central nervous system. *Brain Res Mol Brain Res*. 2004 Jun 18;125(1-2):1-12
- Nitta T, Hata M, Gotoh S, Seo Y, Sasaki H, Hashimoto N, Furuse M, Tsukita S. Size-selective loosening of the blood-brain barrier in claudin-5-deficient mice. *J Cell Biol*. 2003 May 12;161(3):653-60
- Noell S, Fallier-Becker P, Beyer C, Kröger S, Mack AF, Wolburg H. Effects of agrin on the expression and distribution of the water channel protein aquaporin-4 and volume regulation in cultured astrocytes. *Eur J Neurosci*. 2007 Oct;26(8):2109-18
- Noell S, Fallier-Becker P, Deutsch U, Mack AF, Wolburg H. Agrin defines polarized distribution of orthogonal arrays of particles in astrocytes. *Cell Tissue Res* 2009 ; 337:185–195
- Noell S, Wolburg-Buchholz K, Mack AF, Beedle AM, Satz JS, Campbell KP, Wolburg H, Fallier-Becker P. Evidence for a role of dystroglycan regulating the membrane architecture of astroglial endfeet. *Eur J Neurosci* 2011 ; 33:2179–2186
- Noell S, Wolburg-Buchholz K, Mack AF, Ritz R, Tatagiba M, Beschorner R, Wolburg H, Fallier-Becker P. Dynamics of expression patterns of AQP4, dystroglycan, agrin and matrix metalloproteinases in human glioblastoma. *Cell Tissue Res*. 2012 Feb;347(2):429-41
- Nudel U, Zuk D, Einat P, Zeelon E, Levy Z, Neuman S, Yaffe D. Duchenne muscular dystrophy gene product is not identical in muscle and brain. *Nature*. 1989 Jan 5;337(6202):76-8
- O'Driscoll MC, Daly SB, Urquhart JE, et al. Recessive mutations in the gene encoding the tight junction protein occludin cause band-like calcification with simplified gyration and polymicrogyria. *Am J Hum Genet*. 2010;87(3):354–364.
- Overduin M, Harvey TS, Bagby S, Tong KI, Yau P, Takeichi M, Ikura M. Solution structure of the epithelial cadherin domain responsible for selective cell adhesion. *Science*. 1995 Jan 20;267(5196):386-9
- Ozawa E, Mizuno Y, Hagiwara Y, Sasaoka T, Yoshida M. Molecular and cell biology of the sarcoglycan complex. *Muscle Nerve*. 2005 Nov;32(5):563-76. Review
- Padmawar P, Yao X, Bloch O, Manley GT, Verkman AS. K<sup>+</sup> waves in brain cortex visualized using a long-wavelength K<sup>+</sup>-sensing fluorescent indicator. *Nat Methods*. 2005 Nov;2(11):825-7.
- Papadopoulos MC, Manley GT, Krishna S, Verkman AS. Aquaporin-4 facilitates reabsorption of excess fluid in vasogenic brain edema. *FASEB J*. 2004 Aug;18(11):1291-3
- Papadopoulos MC, Verkman AS. Aquaporin-4 gene disruption in mice reduces brain swelling and mortality in pneumococcal meningitis. *J Biol Chem*. 2005 Apr 8;280(14):13906-12

- Papadopoulos MC, Verkman AS. Aquaporin water channels in the nervous system. *Nat Rev Neurosci.* 2013 Apr;14(4):265-77
- Paris D, Patel N, DelleDonne A, Quadros A, Smeed R, Mullan M. Impaired angiogenesis in a transgenic mouse model of cerebral amyloidosis. *Neurosci Lett.* 2004;366:80–85
- Peppiatt CM, Howarth C, Mobbs P, Attwell D. Bidirectional control of CNS capillary diameter by pericytes. *Nature.* 2006 Oct 12;443(7112):700-4.
- Perronnet C, Vaillend C. Dystrophins, utrophins, and associated scaffolding complexes: role in mammalian brain and implications for therapeutic strategies. *J Biomed Biotechnol.* 2010;2010:849426.
- Pescatori M, Broccolini A, Minetti C, Bertini E, Bruno C, D'amico A, Bernardini C, Mirabella M, Silvestri G, Giglio V, Modoni A, Pedemonte M, Tasca G, Galluzzi G, Mercuri E, Tonali PA, Ricci E. Gene expression profiling in the early phases of DMD: a constant molecular signature characterizes DMD muscle from early postnatal life throughout disease progression. *FASEB J.* 2007 Apr;21(4):1210-26
- Pflanzner T, Janko MC, André-Dohmen B, Reuss S, Weggen S, Roebroek AJ, Kuhlmann CR, Pietrzik CU. LRP1 mediates bidirectional transcytosis of amyloid- $\beta$  across the blood-brain barrier. *Neurobiol Aging.* 2011 Dec;32(12):2323.e1-11
- Pillers DA, Bulman DE, Weleber RG, Sigesmund DA, Musarella MA, Powell BR, Murphey WH, Westall C, Panton C, Becker LE, et al. Dystrophin expression in the human retina is required for normal function as defined by electroretinography. *Nat Genet.* 1993 May;4(1):82-6
- Piluso G, Mirabella M, Ricci E, Belsito A, Abbondanza C, Servidei S, Puca AA, Tonali P, Puca GA, Nigro V. Gamma1- and gamma2-syntrophins, two novel dystrophin-binding proteins localized in neuronal cells. *J Biol Chem.* 2000 May 26;275(21):15851-60
- Pivonkova H, Benesova J, Butenko O, Chvatal A, Anderova M. Impact of global cerebral ischemia on K<sup>+</sup> channel expression and membrane properties of glial cells in the rat hippocampus. *Neurochem Int.* 2010 Dec;57(7):783-94
- Prat A, Biernacki K, Wosik K, Antel JP. Glial cell influence on the human blood-brain barrier. *Glia.* 2001 Nov;36(2):145-55. Review
- Preston JE, Joan Abbott N, Begley DJ. Transcytosis of macromolecules at the blood-brain barrier. *Adv Pharmacol.* 2014;71:147-63
- Puwarawuttipanit W, Bragg AD, Frydenlund DS, Mylonakou MN, Nagelhus EA, Peters MF, Kotchabhakdi N, Adams ME, Froehner SC, Haug FM, Ottersen OP, Amiry-Moghaddam M. Differential effect of alpha-syntrophin knockout on aquaporin-4 and Kir4.1 expression in retinal macroglial cells in mice. *Neuroscience.* 2006;137(1):165-75
- Rash JE, Davidson KG, Yasumura T, Furman CS. Freeze-fracture and immunogold analysis of aquaporin-4 (AQP4) square arrays, with models of AQP4 lattice assembly. *Neuroscience.* 2004;129(4):915–934

- Rees ML, Lien CF, Górecki DC. Dystrobrevins in muscle and non-muscle tissues. *Neuromuscul Disord*. 2007 Feb;17(2):123-34. Epub 2007 Jan 23. Review
- Ricotti V, Jäggle H, Theodorou M, Moore AT, Muntoni F, Thompson DA. Ocular and neurodevelopmental features of Duchenne muscular dystrophy: a signature of dystrophin function in the central nervous system. *Eur J Hum Genet*. 2016 Apr;24(4):562-8.
- Rocheffort C, Lefort JM, Rondi-Reig L. The cerebellum: a new key structure in the navigation system. *Front Neural Circuits*. 2013;7:35. Published 2013 Mar 13.
- Rouach N, Giaume C. Connexins and gap junctional communication in astrocytes are targets for neuroglial interaction. *Prog Brain Res*. 2001;132:203-14. Review.
- Rouach N, Koulakoff A, Abudara V, Willecke K, Giaume C. Astroglial metabolic networks sustain hippocampal synaptic transmission. *Science*. 2008 Dec 5;322(5907):1551-5
- Rothstein JD, Dykes-Hoberg M, Pardo CA, Bristol LA, Jin L, Kuncl RW, Kanai Y, Hediger MA, Wang Y, Schielke JP, Welty DF. Knockout of glutamate transporters reveals a major role for astroglial transport in excitotoxicity and clearance of glutamate. *Neuron*. 1996 Mar;16(3):675-86
- Rubenstein E, Possin K, Saul TA. The cerebrospinal fluid production rate is reduced in dementia of the Alzheimer's type. *Neurology*. 2001 Nov 27;57(10):1763-6
- Ruiz-Ederra J, Zhang H, Verkman AS. Evidence against functional interaction between aquaporin-4 water channels and Kir4.1 potassium channels in retinal Müller cells. *J Biol Chem*. 2007 Jul 27;282(30):21866-72
- Saadoun S, Tait MJ, Reza A, Davies DC, Bell BA, Verkman AS, Papadopoulos MC. AQP4 gene deletion in mice does not alter blood-brain barrier integrity or brain morphology. *Neuroscience*. 2009 Jul 7;161(3):764-72
- Salomon D, Ayalon O, Patel-King R, Hynes RO, Geiger B. Extrajunctional distribution of N-cadherin in cultured human endothelial cells. *J Cell Sci*. 1992 May;102 ( Pt 1):7-17
- Sarig R, Mezger-Lallemand V, Gitelman I, Davis C, Fuchs O, Yaffe D, Nudel U. Targeted inactivation of Dp71, the major non-muscle product of the DMD gene: differential activity of the Dp71 promoter during development. *Hum Mol Genet*. 1999 Jan;8(1):1-10.
- Savettieri G, Di Liegro I, Catania C, Licata L, Pitarresi GL, D'Agostino S, Schiera G, De Caro V, Giandalia G, Giannola LI, Cestelli A. Neurons and ECM regulate occludin localization in brain endothelial cells. *Neuroreport*. 2000 Apr 7;11(5):1081-4
- Sene A, Tadayoni R, Pannicke T, Wurm A, El Mathari B, Benard R, Roux MJ, Yaffe D, Mornet D, Reichenbach A and others. 2009. Functional implication of Dp71 in osmoregulation and vascular permeability of the retina. *PLoS One* 4(10):e7329
- Serlin Y, Shelef I, Knyazer B, Friedman A. Anatomy and physiology of the blood-brain barrier. *Semin Cell Dev Biol*. 2015;38:2–6. doi:10.1016/j.semcdb.2015.01.002

Scarmeas N, Honig LS, Choi H, Cantero J, Brandt J, Blacker D, Albert M, Amatniek JC, Marder K, Bell K, Hauser WA, Stern Y. Seizures in Alzheimer disease: who, when, and how common? *Arch Neurol*. 2009 Aug;66(8):992-7

Schaffer DV, Koerber JT, Lim KI. 2008. Molecular engineering of viral gene delivery vehicles. *Annu Rev Biomed Eng* 10:169-94.

Scharfman, H. E., and Binder, D. K. (2013). Aquaporin-4 water channels and synaptic plasticity in the hippocampus. *Neurochem. Int.* 63, 702–711

Scherer SS, Wrabetz L. Molecular mechanisms of inherited demyelinating neuropathies. *Glia*. 2008;56(14):1578–1589. doi:10.1002/glia.20751

Schlageter NL, Carson RE, Rapoport SI. Examination of blood-brain barrier permeability in dementia of the Alzheimer type with [68Ga]EDTA and positron emission tomography. *J Cereb Blood Flow Metab*. 1987 Feb;7(1):1-8

Schoch HJ, Fischer S, Marti HH. Hypoxia-induced vascular endothelial growth factor expression causes vascular leakage in the brain. *Brain*. 2002 Nov;125(Pt 11):2549-57

Scholl UI, Dave HB, Lu M, Farhi A, Nelson-Williams C, Listman JA, Lifton RP. SeSAME/EAST syndrome--phenotypic variability and delayed activity of the distal convoluted tubule. *Pediatr Nephrol*. 2012 Nov;27(11):2081-2090

Schubert S, Knoch KP, Ouwendijk J, Mohammed S, Bodrov Y, Jäger M, Altkrüger A, Wegbrod C, Adams ME, Kim Y, Froehner SC, Jensen ON, Kalaidzidis Y, Solimena M.  $\beta$ 2-Syntrophin is a Cdk5 substrate that restrains the motility of insulin secretory granules. *PLoS One*. 2010 Sep 23;5(9):e12929

Schuler F, Sorokin LM. Expression of laminin isoforms in mouse myogenic cells in vitro and in vivo. *J Cell Sci*. 1995 Dec;108 ( Pt 12):3795-805

Schulzke JD, Gitter AH, Mankertz J, Spiegel S, Seidler U, Amasheh S, Saitou M, Tsukita S, Fromm M. Epithelial transport and barrier function in occludin-deficient mice. *Biochim Biophys Acta*. 2005 May 15;1669(1):34-42

Shapiro L, Fannon AM, Kwong PD, Thompson A, Lehmann MS, Grübel G, Legrand JF, Als-Nielsen J, Colman DR, Hendrickson WA. Structural basis of cell-cell adhesion by cadherins. *Nature*. 1995 Mar 23;374(6520):327-37

Shen F, Walker EJ, Jiang L, Degos V, Li J, Sun B, Heriyanto F, Young WL, Su H. Coexpression of angiopoietin-1 with VEGF increases the structural integrity of the blood-brain barrier and reduces atrophy volume. *J Cereb Blood Flow Metab*. 2011 Dec;31(12):2343-51. doi: 10.1038/jcbfm.2011.97.

Sherman DL, Wu LM, Grove M, Gillespie CS, Brophy PJ. Drp2 and periaxin form Cajal bands with dystroglycan but have distinct roles in Schwann cell growth. *J Neurosci*. 2012 Jul 4;32(27):9419-28



Sheth KN, Simard JM, Elm J, Kronenberg G, Kunte H, Kimberly WT. Human Data Supporting Glyburide in Ischemic Stroke. *Acta Neurochir Suppl.* 2016;121:13-8. doi: 10.1007/978-3-319-18497-5\_3. Review.

Shibata M, Yamada S, Kumar SR, Calero M, Bading J, Frangione B, Holtzman DM, Miller CA, Strickland DK, Ghiso J, Zlokovic BV. Clearance of Alzheimer's amyloid-ss(1-40) peptide from brain by LDL receptor-related protein-1 at the blood-brain barrier. *J Clin Invest.* 2000 Dec;106(12):1489-99

Silberstein C, Bouley R, Huang Y, Fang P, Pastor-Soler N, Brown D, Van Hoek AN. Membrane organization and function of M1 and M23 isoforms of aquaporin-4 in epithelial cells. *Am J Physiol Renal Physiol.* 2004 Sep;287(3):F501-11

Silverberg GD, Heit G, Huhn S, Jaffe RA, Chang SD, Bronte-Stewart H, Rando TA, Disatnik MH, Yu Y, Franco A. Muscle cells from mdx mice have an increased susceptibility to oxidative stress. *Neuromuscul Disord.* 1998 Feb;8(1):14-21

Simard JM, Chen M, Tarasov KV, Bhatta S, Ivanova S, Melnitchenko L, Tsymbalyuk N, West GA, Gerzanich V. Newly expressed SUR1-regulated NC(Ca-ATP) channel mediates cerebral edema after ischemic stroke. *Nat Med.* 2006 Apr;12(4):433-40. Epub 2006 Mar 19. PubMed PMID: 16550187; PubMed Central PMCID: PMC2740734

Siqueiros-Marquez L, Bénard R, Vacca O, Charles-Messance H, Bolaños-Jimenez R, Guilloneau X, Sennlaub F, Montañez C, Sahel JA, Rendon A, Tadayoni R, Giocanti-Aurégan A. Protection of Glial Müller Cells by Dexamethasone in a Mouse Model of Surgically Induced Blood-Retinal Barrier Breakdown. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2017 Feb 1;58(2):876-886

Sixt M, Engelhardt B, Pausch F, Hallmann R, Wendler O, Sorokin LM. Endothelial cell laminin isoforms, laminins 8 and 10, play decisive roles in T cell recruitment across the blood-brain barrier in experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Cell Biol.* 2001 May 28;153(5):933-46

Soe R, Macaulay N, Klaerke DA. Modulation of Kir4.1 and Kir4.1-Kir5.1 channels by small changes in cell volume. *Neurosci Lett.* 2009 Jun 26;457(2):80-4

Sofroniew MV, Vinters HV. Astrocytes: biology and pathology. *Acta Neuropathol.* 2010 Jan;119(1):7-35. doi: 10.1007/s00401-009-0619-8. Review

Sotgia F, Lee H, Bedford MT, Petrucci T, Sudol M, Lisanti MP. Tyrosine phosphorylation of beta-dystroglycan at its WW domain binding motif, PPxY, recruits SH2 domain containing proteins. *Biochemistry.* 2001 Dec 4;40(48):14585-92

Spence HJ, Dhillon AS, James M, Winder SJ. Dystroglycan, a scaffold for the ERK-MAP kinase cascade. *EMBO Rep.* 2004 May;5(5):484-9

Starr JM, Farrall AJ, Armitage P, McGurn B, Wardlaw J. Blood-brain barrier permeability in Alzheimer's disease: a case-control MRI study. *Psychiatry Res.* 2009 Mar 31;171(3):232-41

Stevenson BR, Siliciano JD, Mooseker MS, Goodenough DA. Identification of ZO-1: a high molecular weight polypeptide associated with the tight junction (zonula occludens) in a variety of epithelia. *J Cell Biol.* 1986 Sep;103(3):755-66

Storck SE, Meister S, Nahrath J, Meißner JN, Schubert N, Di Spiezio A, Baches S, Vandenbroucke RE, Bouter Y, Prikulis I, Korth C, Weggen S, Heimann A, Schwaninger M, Bayer TA, Pietrzik CU. Endothelial LRP1 transports amyloid- $\beta$ (1-42) across the blood-brain barrier. *J Clin Invest.* 2016 Jan;126(1):123-36

Stokum JA, Kwon MS, Woo SK, Tsybalyuk O, Vennekens R, Gerzanich V, Simard JM. SUR1-TRPM4 and AQP4 form a heteromultimeric complex that amplifies ion/water osmotic coupling and drives astrocyte swelling. *Glia.* 2018 Jan;66(1):108-125

Stratman AN, Malotte KM, Mahan RD, Davis MJ, Davis GE. Pericyte recruitment during vasculogenic tube assembly stimulates endothelial basement membrane matrix formation. *Blood.* 2009 Dec 3;114(24):5091-101. doi: 10.1182/blood-2009-05-222364. Epub 2009 Oct 12

Sweadner KJ. Isozymes of the Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase. *Biochim Biophys Acta.* 1989 May 9;988(2):185-220. Review

Szabo A, Jancsik V, Mornet D, Kalman M. 2004. Immunofluorescence mapping of dystrophin in the rat brain: astrocytes contain the splice variant Dp71f, but this is confined to subpopulations. *Anat Embryol (Berl)* 208(6):463-77.

Tadayoni R. 2009. Tesis Title : Normal and abnormal retinal vascularisation : role of dystrophin protein 71 (Dp71): Paris Diderot. 119 p

Tadayoni R BR, Dupas B, Sene A, Gaudric A, Sennlaub F, Sahel JA, Rendon A. 2010. Implication of Dystrophin Protein 71 (Dp71) in Retinal Angiogenesis, poster presentaion #30/A77. ARVO Annual Meeting

Tadayoni R, Rendon A, Soria-Jasso LE, Cisneros B. 2012. Dystrophin Dp71: the smallest but multifunctional product of the Duchenne muscular dystrophy gene. *Mol Neurobiol* 45(1):43-60

Taddei A, Giampietro C, Conti A, Orsenigo F, Breviario F, Pirazzoli V, Potente M, Daly C, Dimmeler S, Dejana E. Endothelial adherens junctions control tight junctions by VE-cadherin-mediated upregulation of claudin-5. *Nat Cell Biol.* 2008 Aug;10(8):923-34

Takeichi M. Functional correlation between cell adhesive properties and some cell surface proteins. *J Cell Biol.* 1977 Nov;75(2 Pt 1):464-74.

Takumi T, Ishii T, Horio Y, Morishige K, Takahashi N, Yamada M, Yamashita T, Kiyama H, Sohmiya K, Nakanishi S, et al. A novel ATP-dependent inward rectifier potassium channel expressed predominantly in glial cells. *J Biol Chem.* 1995 Jul 7;270(27):16339-46

Tan S, Zhao S, Chen Z, Ma Q, Wang W, Cheng S, Wen Q, Tan S, Xie J. Altered Biological Properties in Dp71 Over-Expressing HBE Cells. *Cell Physiol Biochem.* 2017;43(5):2022-2036

- Tanoue A, Nasa Y, Koshimizu T, Shinoura H, Oshikawa S, Kawai T, Sunada S, Takeo S, Tsujimoto G. The alpha(1D)-adrenergic receptor directly regulates arterial blood pressure via vasoconstriction. *J Clin Invest*. 2002 Mar;109(6):765-75
- Taylor PJ, Betts GA, Maroulis S, Gilissen C, Pedersen RL, Mowat DR, Johnston HM, Buckley MF. Dystrophin gene mutation location and the risk of cognitive impairment in Duchenne muscular dystrophy. *PLoS One*. 2010 Jan 20;5(1):e8803.
- Theis M, Söhl G, Eiberger J, Willecke K. Emerging complexities in identity and function of glial connexins. *Trends Neurosci*. 2005 Apr;28(4):188-95. Review
- Tidball JG, Vallalta SA. Regulatory interactions between muscle and the immune system during muscle regeneration. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*. 2010 May;298(5):R1173-87. doi: 10.1152/ajpregu.00735.2009. Epub 2010 Mar 10. Review
- Timpl R, Rohde H, Robey PG, Rennard SI, Foidart JM, Martin GR. Laminin—a glycoprotein from basement membranes. *J Biol Chem*. 1979 Oct 10;254(19):9933-7
- Tinsley JM, Blake DJ, Roche A, Fairbrother U, Riss J, Byth BC, Knight AE, Kendrick-Jones J, Suthers GK, Love DR, et al. Primary structure of dystrophin-related protein. *Nature*. 1992 Dec 10;360(6404):591-3.
- Toda R, Kawazu K, Oyabu M, Miyazaki T, Kiuchi Y. Comparison of drugpermeabilities across the blood-retinal barrier, blood-aqueous humor barrier, and blood-brain barrier. *J Pharm Sci*. 2011 Sep;100(9):3904-11
- Tönnies E, Trushina E. Oxidative Stress, Synaptic Dysfunction, and Alzheimer's Disease. *J Alzheimers Dis*. 2017;57(4):1105-1121. doi: 10.3233/JAD-161088. Review
- Tornavaca O, Chia M, Dufton N, Almagro LO, Conway DE, Randi AM, Schwartz MA, Matter K, Balda MS. ZO-1 controls endothelial adherens junctions, cell-cell tension, angiogenesis, and barrier formation. *J Cell Biol*. 2015 Mar 16;208(6):821-38
- Tozawa T, Itoh K, Yaoi T, Tando S, Umekage M, Dai H, Hosoi H, Fushiki S. 2012. The shortest isoform of dystrophin (Dp40) interacts with a group of presynaptic proteins to form a presumptive novel complex in the mouse brain. *Mol Neurobiol* 45(2):287-97
- Trajkovski M, Mziaut H, Schubert S, Kalaidzidis Y, Altkrüger A, Solimena M. Regulation of insulin granule turnover in pancreatic beta-cells by cleaved ICA512. *J Biol Chem*. 2008 Nov 28;283(48):33719-29
- Ueda K, Valdivia C, Medeiros-Domingo A, Tester DJ, Vatta M, Farrugia G, Ackerman MJ, Makielski JC. Syntrophin mutation associated with long QT syndrome through activation of the nNOS-SCN5A macromolecular complex. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2008 Jul 8;105(27):9355-60
- Vacca O, Darche M, Schaffer DV, Flannery JG, Sahel JA, Rendon A, Dalkara D. AAV-mediated gene delivery in Dp71-null mouse model with compromised barriers. *Glia*. 2014 Mar;62(3):468-76

Vacca O, Charles-Messance H, El Mathari B, Sene A, Barbe P, Fouquet S, Aragón J, Darche M, Giocanti-Aurégan A, Paques M, Sahel JA, Tadayoni R, Montañez C, Dalkara D, Rendon A. AAV-mediated gene therapy in Dystrophin-Dp71 deficient mouse leads to blood-retinal barrier restoration and oedema reabsorption. *Hum Mol Genet.* 2016 Jul 15;25(14):3070-3079.

Vaillend C, Rendon A, Misslin R, Ungerer A. Influence of dystrophin-gene mutation on mdx mouse behavior. I. Retention deficits at long delays in spontaneous alternation and bar-pressing tasks. *Behav Genet.* 1995 Nov;25(6):569-79.

Vaillend C, Ungerer A. Behavioral characterization of mdx3cv mice deficient in C-terminal dystrophins. *Neuromuscul Disord.* 1999 Jul;9(5):296-304

Vaillend C, Billard JM, Laroche S. Impaired long-term spatial and recognition memory and enhanced CA1 hippocampal LTP in the dystrophin-deficient Dmd(mdx) mouse. *Neurobiol Dis.* 2004 Oct;17(1):10-20

Vaillend C, Chaussonnet R. Relationships linking emotional, motor, cognitive and GABAergic dysfunctions in dystrophin-deficient mdx mice. *Hum Mol Genet.* 2017 Mar 15;26(6):1041-1055.

Vajda Z, Pedersen M, Füchtbauer EM, Wertz K, Stødkilde-Jørgensen H, Sulyok E, Dóczi T, Neely JD, Agre P, Frøkiaer J, Nielsen S. Delayed onset of brain edema and mislocalization of aquaporin-4 in dystrophin-null transgenic mice. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2002 Oct 1;99(20):13131-6

Vandebrouck A, Sabourin J, Rivet J, Balghi H, Sebille S, Kitzis A, Raymond G, Cognard C, Bourmeyster N, Constantin B. Regulation of capacitative calcium entries by alpha1-syntrophin: association of TRPC1 with dystrophin complex and the PDZ domain of alpha1-syntrophin. *FASEB J.* 2007 Feb;21(2):608-17

Van Hoek AN, Ma T, Yang B, Verkman AS, Brown D. Aquaporin-4 is expressed in basolateral membranes of proximal tubule S3 segments in mouse kidney. *Am J Physiol Renal Physiol.* 2000 Feb;278(2):F310-6

Van Itallie CM, Fanning AS, Holmes J, Anderson JM. Occludin is required for cytokine-induced regulation of tight junction barriers. *J Cell Sci.* 2010 Aug 15;123(Pt 16):2844-52.

Viboolvorakul S, Patumraj S. Exercise training could improve age-related changes in cerebral blood flow and capillary vascularity through the upregulation of VEGF and eNOS. *Biomed Res Int.* 2014;2014:230791. doi:10.1155/2014/230791

Wallace BG. Agrin-induced specializations contain cytoplasmic, membrane, and extracellular matrix-associated components of the postsynaptic apparatus. *J Neurosci.* 1989 Apr;9(4):1294-302

Waite A, Tinsley CL, Locke M, Blake DJ. The neurobiology of the dystrophin-associated glycoprotein complex. *Ann Med.* 2009;41(5):344-59

Waite A, Brown SC, Blake DJ. The dystrophin-glycoprotein complex in brain development and disease. *Trends Neurosci.* 2012 Aug;35(8):487-96. doi: 10.1016/j.tins.2012.04.004

Waite AJ, Carlisle FA, Chan YM, Blake DJ. Myoclonus dystonia and muscular dystrophy:  $\epsilon$  sarcoglycan is part of the dystrophin-associated protein complex in brain. *Mov Disord.* 2016;31(11):1694–1703. doi:10.1002/mds.26738

Webersinke G, Bauer H, Amberger A, Zach O, Bauer HC. Comparison of gene expression of extracellular matrix molecules in brain microvascular endothelial cells and astrocytes. *Biochem Biophys Res Commun.* 1992 Dec 15;189(2):877-84

Weir AP, Burton EA, Harrod G, Davies KE. A- and B-utrophin have different expression patterns and are differentially up-regulated in mdx muscle. *J Biol Chem.* 2002 Nov 22;277(47):45285-90

Wersinger E, Bordais A, Schwab Y, Sene A, Bénard R, Alunni V, Sahel JA, Rendon A, Roux MJ. Reevaluation of dystrophin localization in the mouse retina. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2011 Oct 7;52(11):7901-8

Wertz K, Füchtbauer EM. Dmd(mdx-beta geo): a new allele for the mouse dystrophin gene. *Dev Dyn.* 1998 Jun;212(2):229-41.

Wheeler MT, Zarnegar S, McNally EM. Zeta-sarcoglycan, a novel component of the sarcoglycan complex, is reduced in muscular dystrophy. *Hum Mol Genet.* 2002 Sep 1;11(18):2147-54

Willecke K, Eiberger J, Degen J, Eckardt D, Romualdi A, Güldenagel M, Deutsch U, Söhl G. Structural and functional diversity of connexin genes in the mouse and human genome. *Biol Chem.* 2002 May;383(5):725-37. Review

Wisniewski HM, Vorbrodth AW, Wegiel J. Amyloid angiopathy and blood-brain barrier changes in Alzheimer's disease. *Ann N Y Acad Sci.* 1997 Sep 26;826:161-72

Wolburg-Buchholz K, Mack AF, Steiner E, Pfeiffer F, Engelhardt B, Wolburg H. Loss of astrocyte polarity marks blood-brain barrier impairment during experimental autoimmune encephalomyelitis. *Acta Neuropathol.* 2009 Aug;118(2):219-33

Wosik K, Cayrol R, Dodelet-Devillers A, Berthelet F, Bernard M, Moumdjian R, Bouthillier A, Reudelhuber TL, Prat A. Angiotensin II controls occludin function and is required for blood brain barrier maintenance: relevance to multiple sclerosis. *J Neurosci.* 2007 Aug 22;27(34):9032-42

Wu Z, Asokan A, Samulski RJ. Adeno-associated virus serotypes: vector toolkit for human gene therapy. *Mol Ther.* 2006 Sep;14(3):316-27. Epub 2006 Jul 7. Review

Yamakawa H, Oyama S, Mitsuhashi H, Sasagawa N, Uchino S, Kohsaka S, Ishiura S. Neuroligins 3 and 4X interact with syntrophin-gamma2, and the interactions are affected by autism-related mutations. *Biochem Biophys Res Commun.* 2007 Mar 30;355(1):41-6

Yao Y. Basement membrane and stroke. *J Cereb Blood Flow Metab.* 2019 Jan;39(1):3-19. doi:10.1177/0271678X18801467.

- Yoshida T, Owens GK. Molecular determinants of vascular smooth muscle cell diversity. *Circ Res*. 2005 Feb 18;96(3):280-91. Review.
- Yousif S, Marie-Claire C, Roux F, Scherrmann JM, Declèves X. Expression of drug transporters at the blood-brain barrier using an optimized isolated rat brain microvessel strategy. *Brain Res*. 2007 Feb 23;1134(1):1-11
- Yousif LF, Di Russo J, Sorokin L. Laminin isoforms in endothelial and perivascular basement membranes. *Cell Adh Migr*. 2013;7(1):101–110. doi:10.4161/cam.22680
- Zeuthen T. Water-transporting proteins. *J Membr Biol*. 2010 Apr;234(2):57-73. doi: 10.1007/s00232-009-9216-y. Epub 2009 Nov 30. Review
- Zhang H, Verkman AS. Aquaporin-4 independent Kir4.1 K<sup>+</sup> channel function in brain glial cells. *Mol Cell Neurosci*. 2008;37(1):1–10.
- Zhang Y, Barres BA. Astrocyte heterogeneity: an underappreciated topic in neurobiology. *Curr Opin Neurobiol*. 2010 Oct;20(5):588-94.
- Zhao LN, Yang ZH, Liu YH, Ying HQ, Zhang H, Xue YX. Vascular endothelial growth factor increases permeability of the blood-tumor barrier via caveolae-mediated transcellular pathway. *J Mol Neurosci*. 2011 Jun;44(2):122-9
- Zimprich A, Grabowski M, Asmus F, Naumann M, Berg D, Bertram M, Scheidtmann K, Kern P, Winkelmann J, Müller-Myhsok B, Riedel L, Bauer M, Müller T, Castro M, Meitinger T, Strom TM, Gasser T. Mutations in the gene encoding epsilon-sarcoglycan cause myoclonus-dystonia syndrome. *Nat Genet*. 2001 Sep;29(1):66-9
- Zipser BD, Johanson CE, Gonzalez L, Berzin TM, Tavares R, Hulette CM, Vitek MP, Hovanesian V, Stopa EG. Microvascular injury and blood-brain barrier leakage in Alzheimer's disease. *Neurobiol Aging*. 2007 Jul;28(7):977-86
- Zlokovic BV. The blood-brain barrier in health and chronic neurodegenerative disorders. *Neuron*. 2008 Jan 24;57(2):178-201. doi: 10.1016/j.neuron.2008.01.003. Review
- Zlokovic BV. Neurovascular pathways to neurodegeneration in Alzheimer's disease and other disorders. *Nat Rev Neurosci*. 2011 Nov 3;12(12):723-38 Review
- Zonta M, Angulo MC, Gobbo S, Rosengarten B, Hossmann KA, Pozzan T, Carmignoto G. Neuron-to-astrocyte signaling is central to the dynamic control of brain microcirculation. *Nat Neurosci*. 2003 Jan;6(1):43-50.

**Titre :** Rôle gliovasculaire de la dystrophine Dp71 : Altérations moléculaires et fonctionnelles chez un modèle murin déficient en Dp71

**Mots-clés :** Dystrophine, Dp71, dystrophie musculaire de Duchenne, déficience intellectuelle, astrocyte, cellules macrogliales, barrière hématoencéphalique, canal aquaporine 4.

**Abstract :** La déficience intellectuelle chez les patients atteints de myopathie de Duchenne a été associée à la perte de dystrophine Dp71, produit du gène *dmd* le plus abondant dans le cerveau adulte. La Dp71 est exprimée au cœur d'un complexe macromoléculaire impliqué dans l'ancrage de canaux ioniques (AQP4, Kir4.1) au niveau des pieds des cellules gliales périvasculaires, ce qui suggère qu'une altération de la fonction gliale pourrait contribuer aux déficits cognitifs. Dans notre étude, nous avons caractérisé les altérations moléculaires présentes au niveau macroglial et vasculaire du fait de la perte sélective de Dp71 chez la souris Dp71-null. Dans un premier temps, au moyen d'analyses semi-quantitatives par microscopie électronique et/ou par immunofluorescence et microscopie confocale sur sections de tissu, nous démontrons la présence d'une réduction drastique mais partielle (70%) de l'expression polarisée des canaux AQP4 au niveau des pieds des cellules gliales entourant les capillaires du cervelet et de l'hippocampe, avec une réduction du  $\beta$ -dystroglycane (>50%) et une perte totale d' $\alpha$ 1-syntrophine.

L'expression résiduelle d'AQP4 dans les capillaires n'est pas liée à une compensation par d'autres dystrophines mais pourrait impliquer des protéines paralogues. Par contre, l'expression d'AQP4 autour des vaisseaux de gros calibres (artérioles précapillaires) est totalement préservée dans l'hippocampe. Nos résultats suggèrent l'implication d'une autre dystrophine au niveau glial et endothelial, la Dp140, et de la Dp427 au niveau des muscles lisses de ces gros vaisseaux. Dans une seconde partie de ce travail de thèse, une étude collaborative a permis de mettre en évidence un oedème des pieds des cellules gliales et des altérations modérées de l'intégrité de la barrière hémato-encéphalique. L'ensemble de ces résultats suggère que chez la souris Dp71-null, l'absence d' $\alpha$ 1-syntrophine et la réduction de la distribution polarisée des canaux AQP4 au niveau des pieds des cellules gliales altère l'homéostasie hydrique et certaines fonctions de la barrière vasculaire, ce qui pourrait contribuer aux déficits synaptiques et cognitifs décrits dans ce modèle.

**Title:** Dystrophin Dp71 gliovascular function: Molecular and functional alterations of a mouse model lacking dystrophin Dp71

**Keywords:** Dystrophin, Dp71, Duchenne muscular dystrophy, intellectual disability, astrocyte, macroglial cells, blood-brain barrier, aquaporin 4 channel

**Abstract:** Intellectual disability in Duchenne muscular dystrophy patients was associated with the loss of Dp71, the main *dmd* gene product in the adult brain. Dp71 is a core component of a macromolecular complex involved in the anchoring of ionic channels (AQP4, Kir4.1) in perivascular glial endfeet, suggesting that a dysfunctional glial mechanism could contribute to cognitive dysfunctions. In our study, we characterized the molecular alterations present in macroglial and vascular domains due to the selective loss of Dp71 in Dp71-null mice. First, using semi-quantitative immunogold analyses in electron microscopy and/or immunofluorescence and confocal image analyses in tissue sections, we demonstrate the presence of a drastic but partial reduction (70%) of the polarized distribution of AQP4 channels in the glial cell endfeet that surround capillaries in cerebellum and hippocampus, along with a reduction of  $\beta$ -dystroglycan (>50%) and complete loss of

$\alpha$ 1-syntrophin. Residual expression of AQP4 in capillaries did not depend on compensation by other brain dystrophins but could involve paralogous proteins. In contrast, expression of AQP4 in large-diameter vessels (precapillary arterioles) is totally preserved in hippocampus. Our results suggest the involvement of another dystrophin at the glial and endothelial levels, the Dp140, and that of Dp427 in the smooth muscle of large vessels. In a second part of this thesis work, a collaborative study allowed us to demonstrate presence of glial-endfeet edema and moderate alterations of the blood-brain barrier integrity. In all, these results suggest that in Dp71-null mice the absence of  $\alpha$ 1-syntrophin and reduction of polarized distribution of AQP4 channels in glial endfeet alters water homeostasis and certain functions of the vascular barrier, which might contribute to the synaptic and cognitive defects reported in this model.

