Influences de l'activateur tissulaire du plasminogène à la synapse neuronale

Alexandre Varangot

▶ **To cite this version:**

Alexandre Varangot. Influences de l'activateur tissulaire du plasminogène à la synapse neuronale. Médecine humaine et pathologie. Normandie Université, 2021. Français. NNT : 2021NORMC431 . tel-03613452

HAL Id: tel-03613452
https://theses.hal.science/tel-03613452

Submitted on 18 Mar 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.

Normandie Université

THÈSE

Pour obtenir le diplôme de doctorat

Spécialité ASPECTS MOLECULAIRES ET CELLULAIRES DE LA BIOLOGIE

Préparée au sein de l'Université de Caen Normandie

Influences de l'activateur tissulaire du plasminogène à la synapse neuronale

Présentée et soutenue par
ALEXANDRE VARANGOT

Thèse soutenue le 17/12/2021 devant le jury composé de		
MME LYDIA DANGLOT	Chargé de recherche HDR, Université Paris 7 Paris Diderot	Rapporteur du jury
M. LAURENT GROC	Directeur de recherche au CNRS, Université Bordeaux 2 Victor Segalen	Rapporteur du jury
M. FREDERIC SAUDOU	Professeur des universités, Université Grenoble Alpes	Membre du jury
M. MATTHIJS VERHAGE	Professeur, Vrije Universiteit Amsterdam	Membre du jury
M. BRUNO GONZALEZ	Directeur de recherche, Université Rouen Normandie	Président du jury
M. DENIS VIVIEN	Professeur des universités PraticienHosp, Université Caen Normandie	Directeur de thèse

Thèse dirigée par DENIS VIVIEN, Physiopathologie et imagerie des troubles neurologiques

UNIVERSITÉ CAEN NORMANDIE

ED 497 NBISE
Normande de Biologie Intégrative, Santé, Environnement

Inserm
La science pour la santé
From science to health

Résumé

La découverte de l'expression neuronale de l'activateur tissulaire du plasminogène (tPA) a ouvert de nouvelles voies de recherche, par des fonctions importantes dans la physiopathologie du système nerveux central. Par exemple, ses interactions avec les récepteurs synaptiques (NMDAR, LRP1, Annexine II et EGFR) et son rôle dans la maturation du BDNF lui donne la capacité de moduler la plasticité synaptique et la survie neuronale. Ainsi, une meilleure description des mécanismes régulant le trafic neuronal du tPA serait importante pour mieux comprendre comment il peut influencer le fonctionnement physiologique et pathologique cerveau.

Dans cette étude, par l'utilisation l'imagerie de cellules vivantes en haute résolution et un panel d'approches génétiques innovantes, nous avons révélé que l'activité neuronale contrôle directement le trafic dendritique et axonal du tPA. Nous avons en premier lieu décrit précisément le trafic dendritique et axonal des vésicules contenant le tPA sous différents paradigmes d'activations et d'inhibitions neuronales. Nous avons remarqué que l'activation neuronale affecte le transport et la libération dendritique et axonal des vésicules contenant le tPA. Étonnamment, l'inhibition neuronale n'a eu aucun effet sur le trafic et l'exocytose du tPA, mettant en évidence un mécanisme de sécrétion constitutif de tPA dans les neurones corticaux. De plus, les vésicules antérogrades axonales du tPA montrent des similitudes avec les vésicules contenant VAMP2 en conditions de repos et d'activation des neurones suggérant un co-trafic dans les mêmes vésicules. Nous avons également observé que la libération synaptique de tPA entraînait une augmentation de l'exocytose des vésicules VGlut1 positives contenant du glutamate. Enfin, nous avons décrit des altérations du trafic et de l'exocytose du tPA neuronal dans un modèle de maladie d'Alzheimer. Ensemble, ces données fournissent de nouvelles informations sur le trafic neuronal du tPA, contribuant à une meilleure compréhension de ses implications dans le contrôle de la neurotransmission glutamatergique.

Mots-clés : tPA ; trafic vésiculaire ; VAMP2 ; VGlut1 ; Tauopathie

Abstract

The discovery of the neuronal expression of the serine protease tissue type plasminogen activator (tPA) has opened new avenues of research, with important functions of tPA in the physiopathology of the central nervous system. For example, its interactions with synaptic receptors (NMDAR, LRP1, Annexin II, and EGFR) and its role in the maturation of BDNF have been reported to mediate its ability to control synaptic plasticity and neuronal survival. Thus, a better description of the mechanisms regulating the neuronal trafficking of tPA is important to better understand how tPA can influence brain functions and dysfunctions.

Here, using high-resolution live cell imaging and a panel of innovative genetic approaches, we revealed that neuronal activity directly control the dendritic and axonal trafficking of tPA. We first unmasked the dynamic characteristics of the dendritic and axonal trafficking of tPA-containing vesicles under different paradigms of neuronal activations and inhibitions. We described that neuronal activity affect dendritic and axonal tPA trafficking, in particular in an activating state. Surprisingly, neuronal inhibition had no effect on tPA vesicles trafficking and exocytosis, highlighting a constitutive secretion mechanism of tPA in cortical neurons. Moreover, the axonal anterograde vesicles of tPA shown similarities with VAMP2 positives vesicles in resting and activating state of neurons suggesting a cotrafficking in the same vesicles. We also observed that the synaptic release of tPA led to an increase of the exocytosis of VGlut1 positives vesicles containing glutamate. Finally, we described alterations of the trafficking and exocytosis of the neuronal tPA in an Alzheimer disease (AD) model. Altogether, these data provide new insights about the neuronal trafficking of tPA, contributing to a better knowledge in the understanding of its implications in the control of the glutamatergic neurotransmission and subsequent brain functions and dysfunctions.

Keywords: tPA; vesicular trafficking; VAMP2; VGlut1; Tauopathy

Table des matières

Introduction
I - La synapse glutamatergique 1
A. Généralités 2
B. Morphologie de la synapse excitatrice 5
1 - Les épines dendritiques 5
2 - La densité postsynaptique 8
C. La plasticité synaptique 11
1 - La plasticité à court terme 12
1.1 - La facilitation synaptique 13
1.2 - La dépression synaptique 13
1.3 - La potentialisation et augmentation synaptique 14
2 - La plasticité à long terme 15
2.1 - La potentialisation à long terme 16
2.2 - Modèles d'induction expérimentale de LTP 21
2.3 - La dépression à long terme 23
2.4 - Modèles d'induction de l'inhibition neuronale 25
II – Le trafic vésiculaire 27
A- Les bases moléculaires du transport vésiculaire 27
1 – Les moteurs moléculaires 27
1.1 - Les dynéines 28
1.2 – Le complexe dynactine 30
1.3 – Les kinésines 31
1.4 - Les myosines 35
2 - Mécanisme du mouvement des moteurs moléculaires 36
3 - Le transport des vésicules à cœur dense 39
B – L'exocytose, étape clé du cycle vésiculaire. 42
1 – Généralités 42
2 - Les protéines SNAREs 43
3 – Les différentes étapes de l'exocytose 46
III – L'activateur tissulaire du plasminogène 51
A. Historique 51
B. Biochimie structurale 53
C – Synthèse et régulation de l'expression du tPA 58

1 – Synthèse du tPA 58
1.1 - Une sérine protéase synthétisée dans l'organisme 58
1.2 - Le tPA dans la circulation sanguine 59
1.3 - Expression du tPA dans le système nerveux central 60
1.3.1 Dans les différentes régions cérébrales 60
1.3.2 Dans les différents types cellulaires 64
2 – Régulation de l'expression du tPA 68
3 – Les inhibiteurs du tPA 70
3.1 – PAI-1 72
3.2 – La neuroserpine 73
D - Implications du tPA dans les fonctions de l'organisme 74
1 – Implications du tPA dans le compartiment vasculaire 74
1.1 – Le tPA dans l'hémostase 74
1.2 - Le tPA et la barrière hématoencéphalique 75
2 - Implications du tPA dans le SNC 78
2.1 - Rôle du tPA dans le développement cérébral 78
2.2- Interaction tPA et R-NMDA 81
2.3 - Rôle du tPA dans la plasticité synaptique 85
2.4 - Le tPA dans l'apoptose 88
2.5 - Le tPA dans l'inflammation 89
2.6 - Implications du tPA dans les processus cognitifs 93
2.7 - Le tPA et la substance blanche 94

Projet de thèse 97

Résultats 101
Article 1: Post-synaptic Release of the Neuronal Tissue-Type Plasminogen Activator (tPA) . 102
Article 2: Modulations of the neuronal trafficking of the tissue-type plasminogen activator (tPA) influences the glutamate release: a mechanism impaired in a model of tauopathy. .. 122

Discussion 175
Article n°1: Post-synaptic release of the neuronal tissue-type plasminogen activator (tPA). 176
1 – Le développement d'un outil original pour étudier le tPA neuronal. 176
2 - Etude descriptive du trafic du tPA 179
2.1 - Transport du tPA dans les neurones 179

2.2 - L'exocytose du tPA dans les neurones 180

Article n°2: Modulations of the neuronal trafficking of tissue-type plasminogen activator (tPA) influences the glutamate release: a mechanism impaired in a model of tauopathy. .. 181

1 - Etude du trafic du tPA en conditions d'activation neuronale 181

1.1 - Impact de l'activation des neurones sur le transport du tPA 181

1.2 - Impact de l'activation des neurones sur l'exocytose du tPA. 183

2 - Etude du trafic du tPA en conditions d'inhibition neuronale..... 186

3 - Comparaison du trafic tPA/VAMP2..... 187

4 – Influence du tPA sur la libération du glutamate**.** 189

5 – Etude du trafic du tPA dans le contexte pathologique de la tauopathie. 192

Autres travaux 195

Références..... 237

Index des figures

Figure 1 : La synapse glutamatergique (historique). 1
Figure 2 : Image brute d'une synapse et sa reconstruction 3D. 2
Figure 3 : Neurotransmission glutamatergique. 4
Figure 4 : Les épines existent selon un continuum de morphologies et de fonctions allant des structures de type filopode non fonctionnelles aux grandes épines matures. 6
Figure 5 : Organisation cytosquelettique des épines dendritiques. 7
Figure 6 : Image de synapse excitatrice acquise en microscopie électronique à transmission. 8
Figure 7 : Organisations complexes de protéines médiées par des protéines d'échafaudage dans les synapses excitatrices. 11
Figure 8 : L'activité électrique induit une plasticité synaptique au niveau de la synapse géante du calmar. 14
Figure 9 : Imagerie de l'activation de CaMKII pendant l'induction de la LTP en microscopie biphotonique. 18
Figure 10 : Ajout de R-AMPA postsynaptqiues durant la LTP. 19
Figure 11 : La LTP favorise la formation de nouvelles synapses. 20
Figure 12 : Mécanismes responsables des modifications durables de la transmission synaptique. 21
Figure 13 : L'activité déclenche l'exocytose des endosomes des épines dendritiques sur des sites latéraux à la PSD. 23
Figure 14 : Récipiendaires du prix Nobel de médecine 2013. 27
Figure 15 : Structure schématique du complexe de la dynéine cytoplasmique. 29
Figure 16 : Schéma illustrant l'emplacement et les caractéristiques structurelles approximatives des sous-unités de la dynactine. 31
Figure 17 : Structures schématiques des kinésine-1, kinésine-2 et kinésine-3. 32
Figure 18 : Modèle du cycle mécanochimique d'un domaine moteur dynéine cytoplasmique. 37
Figure 19 : La régulation locale de la dynamique cytosquelettique et motrice dicte la livraison précise des composants présynaptiques. 40
Figure 20 : Régulation cytosquelettique des composants postsynaptiques. 41
Figure 21 : Schéma de la machinerie moléculaire responsable de la fusion de vésicules déclenchée par le Ca2+. 44
Figure 22 : Schéma représentant les protéines SNAREs impliquées dans l'exocytose vésiculaire. 46
Figure 23 : Mécanisme d'action des SNARE dans l'exocytose. 49
Figure 24 : Galerie de portraits. 52
Figure 25 : Autoradiographie en grain d'argent correspondant à l'hybridation de sondes d'ADNc du tPA sur le chromosome 8. 54
Figure 26 : Structure et fonctions du tPA. 55
Figure 27 : La diversité des tPAs. 58
Figure 28 : Activité du tPA dans des extraits de tissus humains 58
Figure 29 : Systèmes possibles de reconnaissance des récepteurs pour le tPA et la RPK dans le foie de rat normal. 60
Figure 30 : Localisation du tPA dans le SNC chez la souris. 61

Figure 31 : Analyse immunohistochimique de l'expression du tPA dans l'hippocampe de souris avec le rapporteur PlatGAL. 62
Figure 32 : La protéine de fusion tPA-Cerulean est exprimée de manière prédominante dans les structures limbiques et les vaisseaux sanguins du cerveau murin adulte. 63
Figure 33 : Expression du tPA dans les cellules du SNC chez la souris adulte. 64
Figure 34 : Le tPA est présent dans des vésicules à cœur denses au sein des épines dendritiques. 65
Figure 35 : Caractérisation morphologique et moléculaire des neurones exprimant du tPA. 66
Figure 36 : Libération et recapture du tPA au niveau de la fente synaptique. 67
Figure 37 : Les fonctions de base et le mécanisme inhibiteur des serpines. 71
Figure 38 : Constituants cellulaires de la barrière hémato-encéphalique. 77
Figure 39 : Effet du tPA sur la barrière hématoencéphalique. 78
Figure 40 : Effet de l'absence de tPA sur la migration des neurones granulaires du cervelet. 79
Figure 41 : Le tPA affecte la migration neuronale corticale. 80
Figure 42 : Les souris tPA KO sont résistantes à la dégénérescence neuronale induite par l'excitotoxicité dans l'hippocampe. 82
Figure 43 : Le tPA augmente sélectivement la diffusion extrasynaptique des GluN1-NMDAR. 83
Figure 44 : Synthèse d'ARN messager du tPA suite à une activation neuronale. 86
Figure 45 : Le tPA protège les neurones de l'apoptose induite par un sevrage en sérum. 89
Figure 46 : Effets du tPA actif et inactif (S478A tPA) sur la mort neuronale induite par une injection de kaïnate dans l'hippocampe et sur l'activation microgliale. 90
Figure 47 : LRP1 médie l'activation microgliale induite par le tPA après une MCAO. 91
Figure 48 : Effets du tPA sur l'activation des neutrophiles. 92
Figure 49 : La dégénérescence axonale et la démyélinisation sont exacerbées chez les souris déficientes en tPA après écrasement du nerf sciatique. 95
Figure 50 : Schéma montrant le fonctionnement de la technologie HaloTag® ainsi que le tPA-HaloTag®. 177
Figure 51 : Les mouvements des vésicules contenant le tPA sont calqués sur les pics d'activité calcique. 182
Figure 52 : Exemple d'application de plaques microfluidiques, ici dans la reconstitution d'un circuit neuronal corticocortical. 185
Figure 53 : Schéma montrant le fonctionnement de la protéine fusion VAMP2-SEP. 187
Figure 54 : Le trafic axonal du tPA ressemble fortement à celui des endosomes de signalisation. 188
Figure 55 : L'abolition de l'interaction entre le tPA et les R-NMDA modifie le flux rétrograde axonal des vésicules contenant le tPA. 190
Figure 56 : Les astrocytes sont capables d'exprimer et de libérer le tPA. 192

Liste des abréviations

AA	acide aminé
AAA	*ATPases Associated with others Activities*
ADAMTS	*alpha desintegrin and metalloproteinase with thrombospondin motifs*
ADP	*adenosine diphosphate*
AMPA	*alpha-amino-3-hydroxy-5-méthyl-4-isoxazolepropionic acid*
AMPc	*cyclic adenosine monophosphate*
AP-2	*adaptor protein-2*
APC	*adenomatous polyposis coli*
APP	*amyloid precursor protein*
APV	(2R) -amino-5-phosphonovalerique
ARNm	acides ribonucléiques messagers
Arp	protéine liée à l'actine
Asn	asparagine
ATP	adenosine triphosphate
AVC	accident vasculaire cérébral
BDNF	*brain derived neurotrophic factor*
BHE	barrière hémato-encéphalique
CA1	corne d'Ammon 1
Ca2+	calcium
CaM	calmoduline
CaMKII	*calcium/calmodulin-dependent protein kinase 2*
CBP	*CREB-binding protein*
CCK	cholécystokinine
CNQX	*cyanquixaline*
CPEB	*Cytoplasmic Polyadenylation Element Binding protein*
CREB	*cAMP responsive element binding protein*
CSPG	*chondroïtines sulfate protéoglycanes*

DAG *diaglycérol*

DCV *dense core vesicles*

Dlg1 *drosophila disc large tumor suppressor 1*

EAAT *excitatory amino acid transporter*

EGF *epidermal growth factor*

EM *Electronic microscopy*

ERK *extracellular signal-regulated kinase*

EZ zone d'endocytose

GABA *gamma-aminobutyric acid*

GRASP *GRIP associated protein*

GRIP 1 *glutamate receptor-interacting protein*

GTP guanosine triphosphate

GUK *guanylate kinase*

HAP1 *Huntingtin-associated protein 1*

HAT histone acétyltransférase

HDAC histone désacétylase

HGF *hepatocyte growth factor*

IP_3 *inositol triphosphate*

JIP1 *c-jun NH-terminal kinase-interacting protein 1*

JNK *c-Jun N-terminal kinases*

KAP *kinesin associated protein*

KCl *potassium chloride*

KIF *"kinesin superfamily"*

KO *knock-out*

LBS *lysine binding site*

LIS1 *lissencephaly-1 homolog*

LRP *low density lipoprotein receptor-related protein*

LTD *long term depression*

LTP *long term potentiation*

MAGUK *membrane-associated guanylate kinase*

mBDNF *mature BDNF*

MEC matrice extracellulaire

mEPSC *miniature excitatory postsynaptic current*

Met méthionine

mGluR *metabotropic glutamate receptors*

MMP *matrix metalloproteinase*

MT microtubule

Munc *mammalian uncoordinated*

NADE *neurotrophin associated cell death executor*

NF-κB *nuclear factor-kappa B*

NGF *nerve growth factor*

NMDA N-Methyl-D-Aspartate

NRAGE *neurotrophin-receptor-interacting melanoma antigen-encoding protein*

NRIF *neurotrophin-receptor interacting factor*

NSF *N-ethylmaleimide-sensitive factor*

NSF *Nethylmaleimide-Sensitive Factor*

NT neurotrophine

PA potentiel d'action

PAI-1 *plasminogen activator inhibitor 1*

PC 1/3 *proprotein convertase 1/3*

PCAF *P300/CBP-Associated Factor*

PCR *polymerase chain reaction*

PDGF *platelet derived growth factor-CC*

PDGFR-α *platelet-derived growth factor receptor alpha*

PI3K *phosphatidylinositol-3-Kinase*

PK *protein kinase*

PKC protéine kinase C

PLAT *plasminogen activator tissue type*

PLCγ *phospholipase C gamma*

PPSE *potentiels postsynaptiques excitateurs*

PSD *postsynaptic density*

Rab *ras-associated binding protein*

R-AMPA *AMPA receptor*

Ras *rat sarcoma virus*

RCL *reactive center loop*

RGC *retinal ganglion cells*

RhoA *ras homolog gene family, member A*

RIP2 *receptor-interacting protein 2*

R-NMDA *NMDA receptor*

Sb2 *synaptobrévine 2*

Sc RT-PCR *single-cell reverse transcription polymerase chain reaction*

SC1 schwann cell 1

sc-tPA *single chain tPA*

SH3 *Src homology 3*

Shc *src homologous and collagen*

SNAP *soluble NSF attachment protein*

SNAP-25 *synaptosomal-associated protein 25*

SNARE *soluble N-ethylmaleimide-sensitive factor attachment protein Receptor*

SNC système nerveux central

Stx *syntaxine*

SynGAP *synaptic ras GTPase-activating protein*

Syp *synaptophysine*

Syt *synaptotagmine*

TANC2 *tetratricopeptide repeat, ankyrin repeat and coiled-coil containing 2*

tc-tPA *two chain tPA*

TGN *trans-golgi network*

tPA *tissue-type plasminogen activator*

TRAF6 *tumor necrosis factor- receptor associated factors 6*

Trk *tropomyosin-related kinase*

t-SNARE *target-SNARE*

uPA *urokinase-type plasminogen activator*

UTR *unstranslated region*

Val valine

VAMP vesicle-associated membrane protein

VGLUT1 *vesicular glutamate transporter 1*

v-SNARE *vesicular SNARE*

VWF *von Willebrand factor*

WT *wild-type*

ZO-1 *Zona occludens 1*

Introduction

I - La synapse glutamatergique

C'est à la fin du XIX^{e} siècle que Santiago Ramon y Cajal élabora la théorie du neurone, établissant ainsi l'un des plus grands piliers de nos neurosciences modernes. Cette théorie fût formulée par l'observation grâce à la mise au point d'une coloration par imprégnation (coloration argentique) de la contiguïté des cellules nerveuses. On retrouve dans le cerveau humain pas moins de 200 types de neurones différents pour un nombre total avoisinant 10^{11}. En 1897, sir Charles Scott Sherrington utilise pour la première fois le terme de "synapse" afin de décrire les zones fonctionnelles de contact qui se forment entre deux neurones, ou même entre un neurone et un autre type cellulaire du cerveau. On estime que chaque neurone peut établir environ 10^{4} connexions, ce qui représenterait 10^{15} synapses pour un cerveau entier (Garner *et al.* 2002).

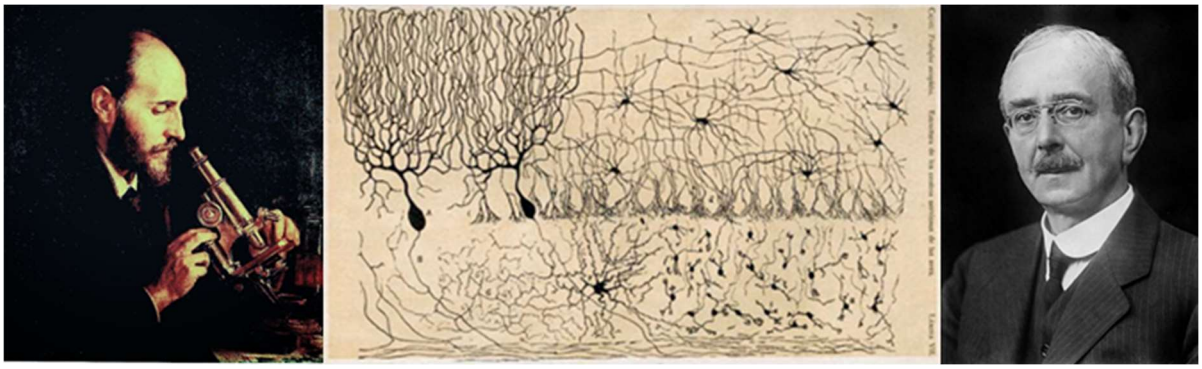


Figure 1 : La synapse glutamatergique (historique).
A gauche : Portrait de Santiago Ramon y Cajal (1852 – 1934) par Ricardo de Madrazo, 1910. **Au centre** : dessin de cellules granuleuses de Santiago Ramon y Cajal. **A droite** : photo portrait de Sir Charles Scott Sherrington (1857 – 1952).

On peut distinguer 2 types de synapses :

- les synapses électriques se définissent par un contact direct entre les membranes plasmiques des cellules ; ce sont les jonctions communicantes. Ainsi, les différents signaux électriques passent directement d'un neurone à l'autre sans l'utilisation d'un messager chimique.

- les synapses chimiques, majoritaires (à 99%) dans le système nerveux central (SNC) des vertébrés, utilisent des molécules appelées neurotransmetteurs pour propager l'information. Le schéma classique de ces synases est composé de trois parties distinctes :

l'élément présynaptique responsable de la libération de neurotransmetteurs, l'élément postsynaptique qui reçoit ces neurotransmetteurs, et enfin la fente synaptique située entre les deux qui correspond à un espace de quelques dizaines de nanomètres dans lequel est libéré le neurotransmetteur (Schikorski and Stevens 1997).

On compte plusieurs types de synapses chimiques différentes en fonction du neurotransmetteur principalement utilisé. On peut citer par exemple les synapses excitatrices, qui sont les plus abondantes du SNC (environ 80% des synapses chimiques) qui utilisent le glutamate comme neurotransmetteur. Il y a aussi les synapses inhibitrices qui utilisent principalement l'acide γ-aminobutyrique (GABA) ou encore des synapses modulatrices (dopamine, sérotonine...). On observe en microscopie électronique à transmission la plupart du temps une zone sombre et dense aux électrons au niveau de l'extrémité postsynaptique. C'est une zone riche en protéines nécessaire à l'entretien de la transmission synaptique appelée densité postsynaptique (*postsynaptic density*, PSD). Cette caractéristique est une signature des synapses dites par conséquent asymétriques en grande partie glutamatergiques.

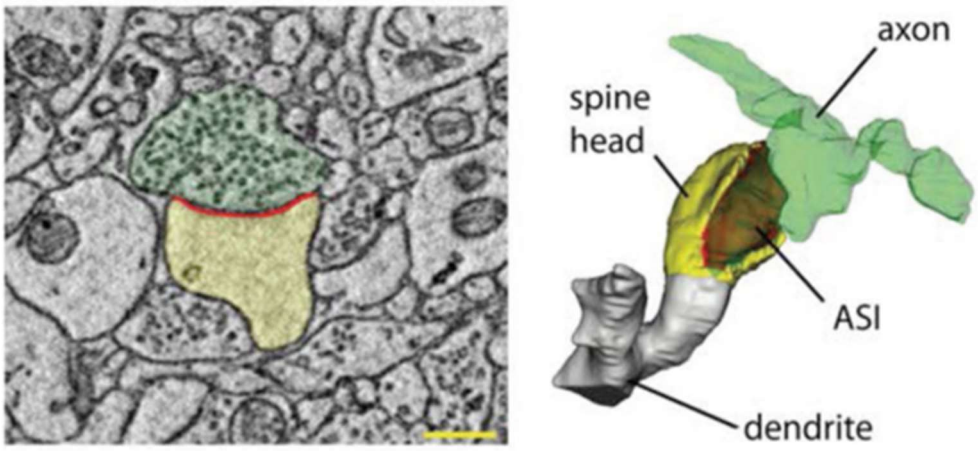


Figure 2 : Image brute d'une synapse et sa reconstruction 3D.
On aperçoit en vert l'extrémité présynaptique et en jaune l'extrémité postsynaptique, au niveau de la ligne rouge se trouve la fente synaptique. Barre d'échelle = 350 nm, d'après de Vivo *et al.* 2017.

A. Généralités

Le glutamate est un acide aminé (AA), il est la forme ionisée de l'acide glutamique qui rentre dans la composition de protéines. Curtis et collaborateurs décrivent en 1959 que le glutamate possède un effet excitateur et dépolarisant sur les neurones (Curtis *et al.* 1959). Le

rôle du glutamate dans le SNC a été longtemps controversé, avant d'être finalement considéré comme le principal neurotransmetteur excitateur du SNC des vertébrés (Watkins 2000).

Dans le SNC des vertébrés, le glutamate se retrouve stocké au niveau de l'élément présynaptique dans un grand nombre de vésicules (plusieurs centaines) qui vont être libérées par l'arrivée de potentiels d'action (PA). Cette zone contenant les vésicules de glutamate à proximité immédiate de la fente synaptique porte le nom de bouton présynaptique. La propagation du PA le long de l'axone va amener l'ouverture de canaux calciques voltage dépendants à la terminaison présynaptique. Il s'en suit rapidement la fusion des vésicules grâce à l'action de molécules calcium dépendantes avec la membrane plasmique, au niveau de sites bien spécifiques que l'on appelle zones actives (Burns and Augustine 1995). Le glutamate est alors libéré dans la fente synaptique et va pouvoir se lier et activer à un certain nombre de récepteurs glutamatergiques majoritairement situés sur la membrane postsynaptique. Les récepteurs activés vont permettre la formation de flux ioniques engendrant une dépolarisation locale de l'élément postsynaptique. Il en découle l'activation de canaux voltage-dépendants et de cascades moléculaires de signalisation.

On compte deux groupes de récepteur au glutamate : les récepteurs métabotropiques (mGluR) transmembranaires à sept domaines couplés aux protéines G et les récepteurs canaux ionotropiques transmembranaires perméables aux cations. Il existe trois types de récepteurs ionotropiques classés en fonction des différents agonistes pharmacologiques pouvant les activer (Watkins *et al.* 2021) :

- **les récepteurs de type AMPA** (alpha-amino-3-hydroxy-5-méthylisoxazol-4-propionate) sont perméables au sodium et au potassium, ils jouent un rôle majeur dans la transmission excitatrice rapide entre les neurones.

- **Les récepteurs de type NMDA** (N-méthyl-D-aspartate) sont perméables aux cations monovalents tels que le sodium et le potassium, ainsi qu'au calcium. Ils sont fortement impliqués dans les phénomènes de modulation de la transmission synaptique comme la potentialisation à long terme (*long term potentiation*, LTP) et la dépression à long terme (*Long term depression*, LTD).

- **Les récepteurs de type Kaïnate** sont perméables au sodium et au potassium. La

fonction de ces récepteurs n'est pas bien connue, il s'agit du type de récepteur au glutamate le moins étudié. Il est situé aussi bien sur la membrane pré et postsynaptique. Ils pourraient aussi bien réguler la libération du glutamate de l'élément présynaptique que participer aux courants postsynaptiques excitateurs (Huettner 2003).

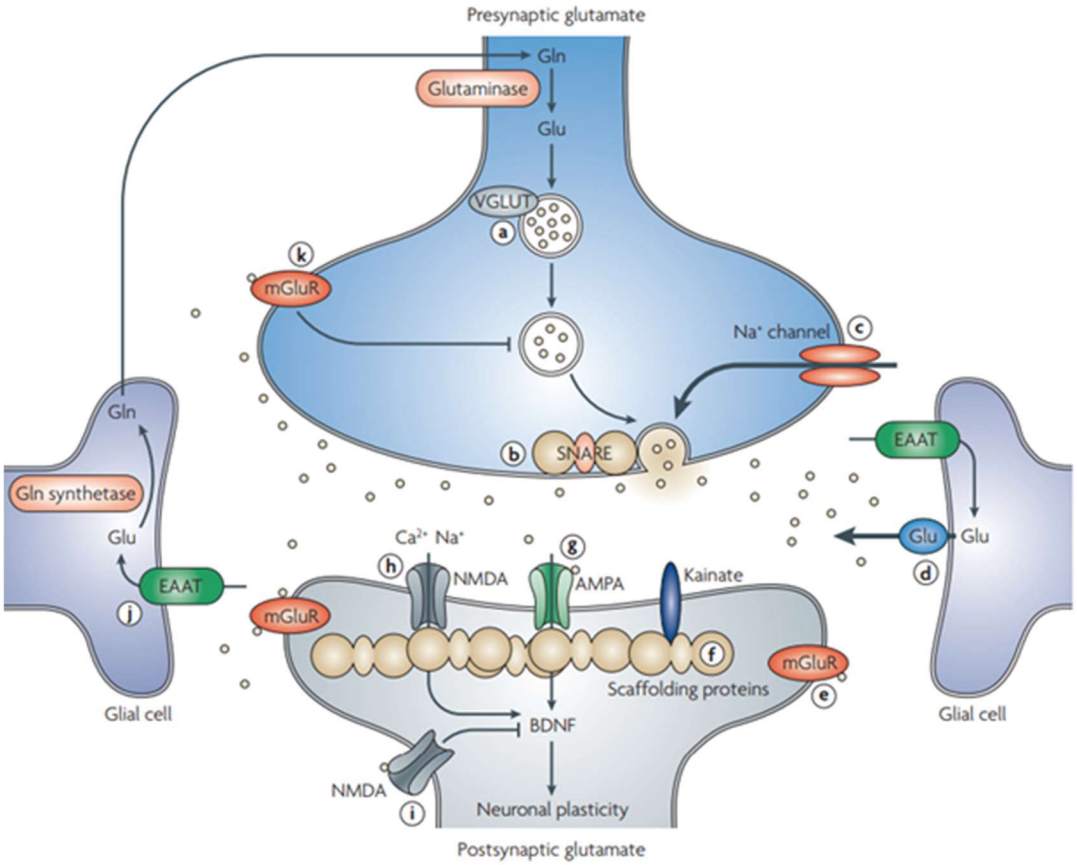


Figure 3 : Neurotransmission glutamatergique.
Le glutamate est conditionné dans des vésicules présynaptiques par les transporteurs vésiculaires de Glu (VGLUT) et libéré du neurone de manière dépendante de l'activité neuronale grâce à ses interactions avec des protéines solubles du récepteur d'attachement au facteur sensible au N-éthylmaléimide (SNARE). Le glutamate est éliminé de l'espace extracellulaire par des transporteurs d'acides aminés excitateurs (EAAT) présents principalement sur les cellules gliales. Dans les cellules gliales, le glutamate est converti en Glutamine par la Glutamine synthétase. Divers récepteurs au glutamate sont présents sur les neurones présynaptiques et postsynaptiques ainsi que sur les cellules gliales. Ceux-ci incluent les trois récepteurs ionotropes AMPA, NMDA et kainate ainsi que les récepteurs métabotropiques au glutamate. L'effet du glutamate est déterminé par le sous-type de récepteur, la localisation et les interactions avec divers protéines d'échafaudage et de signalisation dans la densité postynaptique. L'activation des récepteurs glutamatergiques entraîne non seulement des effets ionotropes, mais joue aussi un rôle dans la plasticité synaptique à long terme (Sanacora *et al.* 2008).

L'efficacité de la transmission dans les synapses glutamatergique peut être régulée à différents niveaux : tout d'abord au niveau présynaptique, en fonction de la fréquence des PA et de la quantité de glutamate libéré. Au niveau de la fente synaptique il y a une modulation de la concentration de glutamate par la présence des cellules gliales, en particulier celle des

astrocytes. Enfin cette efficacité dépend du nombre de récepteurs glutamatergiques présents sur la membrane postsynaptique et de la taille de la PSD.

B. Morphologie de la synapse excitatrice

Les synapses glutamatergiques présentent donc la particularité d'être asymétriques et sont caractérisées par les aspects morphologiques et fonctionnels de la membrane postsynaptique, ou plus précisément de la densité post synaptique (Figure 2). On retrouve la PSD généralement au sein de petites excroissances dendritiques que l'on appelle les épines dendritiques. Ces petites structures sont visibles sur les neurones pyramidaux du néocortex (Spaek and Hartmann 1983), de l'hippocampe (Harris and Stevens 1989), ainsi que sur les cellules de Purkinje du cervelet (Harris and Stevens 1988).

1 - Les épines dendritiques

Les synapses excitatrices vont la plupart du temps se former sur ces épines dendritiques. Les premières épines apparaissent durant le développement, juste après la croissance et l'allongement des dendrites depuis le corps cellulaire. Ces épines vont constituer des espaces physiquement délimités, qui possèdent leurs propres microdomaines et leurs protéines de régulation.

Au départ, avant de parler réellement d'épine, la dendrite d'un neurone va émettre un filopode, un petit prolongement fin et allongé. Ces filopodes sont des prolongements extrêmement dynamiques (Zuo *et al.* 2005) et présentent une vie moyenne de quelques minutes à quelques heures (Dunaevsky *et al.* 1999). Lorsque les filopodes grandissent et s'épaississent, ils vont former des épines immatures. Ces épines restent encore très dynamiques (Majewska and Sur 2003) et ont une vie moyenne d'environ deux jours (Holtmaat *et al.* 2005). Les épines immatures constituent environ 20% des épines chez les jeunes adultes (Cane *et al.* 2014). Enfin quand les épines deviennent matures elles présentent un aspect "en champignon" (*mushroom spines* en anglais), elles mesurent entre 1 à 2 µm de hauteur pour un volume moyen de 0.05µm^3 et sont rattachées à la dendrite par un cou long et étroit faisant 0.5-2 µm de long (**Figure 4**; Hering and Sheng 2001). Une fois mature les épines deviennent stables avec une vie moyenne d'environ 1 an (Zuo *et al.* 2005; Holtmaat *et al.* 2005) et se mettent à exprimer la protéine stabilisatrice PSD-95 (*postsynaptic density protein*-95). En effet, des études ont rapporté que 80% des épines du cerveau adulte sont matures et très peu

dynamiques (Trachtenberg *et al.* 2002; Grutzendler *et al.* 2002; Zuo *et al.* 2005; Cane *et al.* 2014). Ces épines matures ont donc pour signature l'expression de PSD-95, une protéine qui vient interagir aux niveaux des sites postsynaptiques pour former des échafaudages multimériques permettant le regroupement de récepteurs, canaux ioniques et de leurs protéines de signalisation associées.

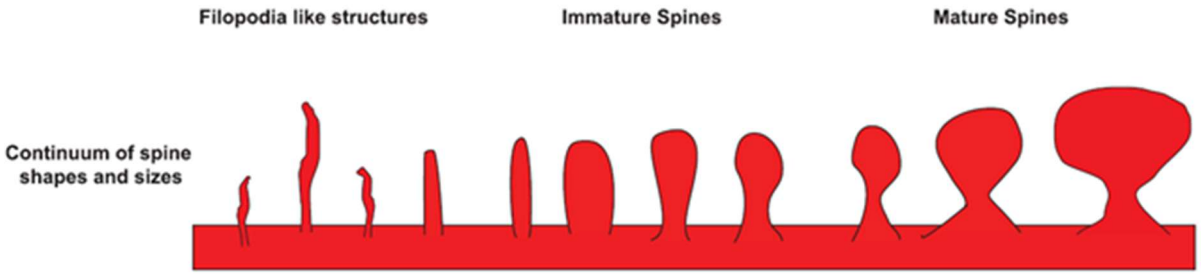


Figure 4 : Les épines existent selon un continuum de morphologies et de fonctions allant des structures de type filopode non fonctionnelles aux grandes épines matures.
Diagramme montrant le continuum de formes de la colonne vertébrale. Ces épines peuvent être regroupées en trois catégories distinctes : les structures ressemblant à des filopodes, les épines immatures et épines matures. La distinction de ces catégories en fonction de leur morphologie est extrêmement difficile en raison de la résolution limitée de la microscopie optique. D'après Berry and Nedivi 2017.

Les épines vont en réalité subir des changements incessants de leur forme (Matsuzaki *et al.* 2004; Richards *et al.* 2005)et un *turn-over* continu, c'est à dire qu'en permanence elles apparaissent et disparaissent. Leur aptitude à changer de forme est possible grâce à la présence d'un réseau complexe et mobile de protéines du cytosquelette en grande partie composé d'actine (**Figure 5**; Hotulainen and Hoogenraad 2010). Des études *in vitro* ont montré que le *turn-over* va logiquement dépendre de l'activité des neurones mais aussi de phénomènes comme la LTP (Maletic-Savatic *et al.* 1999; Engert and Bonhoeffer 1999). Des travaux *in vivo* ont mis en évidence qu'une privation sensorielle chez le rat modifie le turn-over des épines de neurones du cortex sensoriel primaire (Trachtenberg *et al.* 2002; Holtmaat *et al.* 2006).

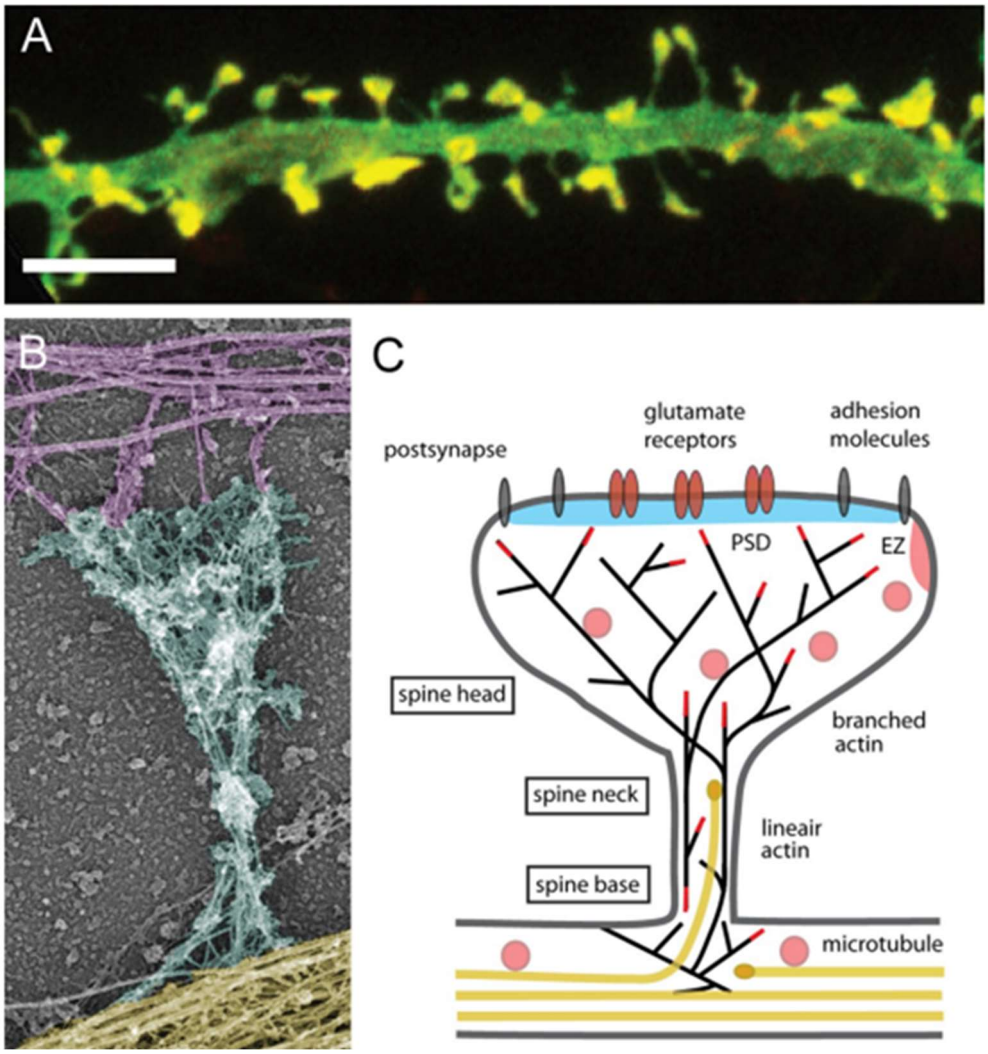


Figure 5 : Organisation cytosquelettique des épines dendritiques.
(**A**) Morphologie de l'épine dendritique (vert) et localisation de la F-actine (rouge) dans les neurones hippocampiques en culture. Le rouge et le vert fusionnés sont représenté en jaune. Barre : 5 µm. (**B**) Organisation du cytosquelette d'actine et de microtubules dans une épine dendritique mature à partir de neurones hippocampiques en culture, visualisé par microscopie électronique (EM). Cytosquelette axonal, violet; arbre dendritique, jaune; épine dendritique, cyan. La tête de l'épine contient généralement un réseau dense de courts filaments d'actine ramifiés réticulés, tandis que le cou contient des filaments lâches d'actine longitudinaux, à la fois ramifiés et linéaires. La base de l'épine contient également des filaments ramifiés, qui résident souvent directement sur le réseau de microtubules dans la tige dendritique. (**C**) Schéma d'une épine dentritique mature en forme de « champignon » montrant la membrane postsynaptique contenant la densité postsynaptique (bleu), l'adhésion moléculaire (gris), les récepteurs du glutamate (brun), l'actine (lignes noires), le cytosquelette des microtubules (jaune) et les organites (rose). La zone d'endocytose (EZ) est située latéralement par rapport à la PSD dans les régions extrasynaptiques de l'épine et des endosomes de recyclage (roses) qui se trouvent dans la tige et les épines. Les épines dendritiques présentent un réseau continu de filaments d'actine droits et ramifiés (lignes noires). Le réseau d'actine se propage dans la base de l'épine, se resserre dans le cou, subit une ramification étendue à la jonction cou-tête, et reste très ramifié dans la tête de la colonne vertébrale. Les extrémités barbelées polymérisant l'actine sont indiquées en lignes rouges. Les réseaux de microtubules stables sont principalement présents dans la tige dendritique. Une petite fraction de microtubules dans les dendrites matures sont dynamiques et s'écartent de l'arbre dendritique. Les extrémités des microtubules sont symbolisées par des ovales jaunes. D'après Hotulainen and Hoogenraad 2010.

Les épines dendritiques vont avoir pour fonction à la fois d'accroître et d'optimiser la surface de connectivité des dendrites, et à la fois de constituer des compartiments postsynaptiques plus ou moins autonomes. Ces compartiments regroupent les différents outils et acteurs impliqués dans la transmission synaptique et sa régulation. On y trouve les organelles qui vont être responsables de la synthèse et du trafic protéique, mais aussi de la transmission synaptique. On retrouve également les récepteurs au glutamate avec leurs protéines associées (protéines d'ancrage et de signalisation) et les différents éléments du cytosquelette (réseau d'actine). C'est la synergie de l'ensemble de ces constituants qui va permettre le développement et la stabilité des connections synaptiques, ils vont par ailleurs participer à la structure de la PSD.

2 - La densité postsynaptique

C'est au niveau de l'élément postsynaptique des synapses glutamatergiques que l'on retrouve cette région caractéristique qui a la particularité d'être dense aux électrons : la densité postsynaptique. Elle a été mise en évidence grâce à des études en microscopie électronique à transmission durant les années 1950, et apparait comme une membrane plus épaisse, noircit sur les images (**Figure** 6; Palay and Palade 1955). Cet aspect provient d'une concentration très forte en protéine, qui peut avoisiner 100mg.ml^{-1}. Les PSD présentent des tailles très variables avec une épaisseur allant de 30 à 40 nm et un diamètre oscillant entre 300 et 400 nm en moyenne (Carlin *et al.* 1980).

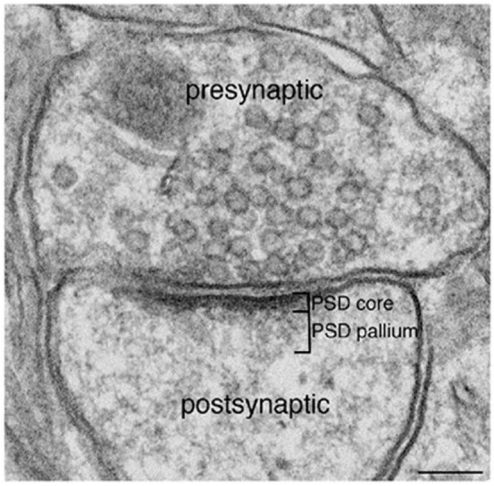


Figure 6 : Image de synapse excitatrice acquise en microscopie électronique à transmission.
Les synapses glutamatergiques excitatrices présentent généralement une zone importante de densité électronique juxtaposée à la membrane postsynaptique, traditionnellement connue sous le nom de densité postsynaptique. S'étendant plus profondément que le cœur de la PSD (*PSD core*), il y a une région spécialisée que nous appelons le pallium PSD. Barre d'échelle : 0,1 µm (Dosemeci *et al.* 2016).

Grâce à la purification de synaptosomes (terminaisons synaptiques isolées de neurones) par fractionnement cellulaire suivit de spectrométrie de masse, des travaux ont réussi à déterminer la nature des protéines qui constitue la PSD (Boeckers 2006). On y retrouve en forte concentration des protéines d'échafaudages (protéines interagissant entre elles et avec les récepteurs à la membrane), des protéines du cytosquelette (surtout de l'actine), des protéines d'adhésion ainsi que des intermédiaires métaboliques des voies de transduction. L'ensemble de ces protéines vont permettre l'ancrage des récepteurs et des canaux ioniques à la membrane permettant ainsi d'établir, de maintenir et de réguler la transmission synaptique sous la forme d'une matrice structurale complexe.

Les interactions que vont avoir les récepteurs glutamatergiques avec les protéines d'échafaudages de la PSD vont déterminer leur localisation synaptique. Ces protéines d'échafaudages possèdent un domaine PDZ, acronyme venant des 3 noms des protéines dans lesquelles il a été les premières fois observé. A savoir **P**SD-95, une protéine synaptique uniquement retrouvé dans le cerveau. Le suppresseur de tumeur à large disque de drosophile (*Drosophila disc large tumor suppressor 1,* **D**lg1) et la *Zona occludens 1* (**Z**O-1) qui sont deux protéines jouant des rôles important dans les complexes de signalisation cellulaire et l'adhésion cellulaire. Les domaines PDZ sont globulaires, constitué de 90 acides aminés et sont capables de lier des tétra-peptides spécifiques situés au niveau des extrémités C-terminales à la fois des récepteurs mais aussi d'autres protéines d'échafaudages.

Les protéines PDZ que l'on retrouve en plus grande nombre dans les PSD appartiennent à la famille des guanylates kinases associées à la membrane (MAGUK) comme par exemple PSD-93, PSD-95, SAP-97 et SAP-102) (Kim and Sheng 2004; Elias and Nicoll 2007). Les protéines de cette famille présentent toutes trois domaines : un domaine PDZ, un domaine SH3 (Src homology 3) ainsi q'un domaine GUK (guanylate kinase) (Montgomery and Madison 2004). La PSD-95 est la protéine la plus étudiée des MAGUK, elle permet l'ancrage des récepteurs AMPA à la PSD. Cette interaction indirecte se produit entre les protéines par l'intermédiaire d'une protéine transmembranaire associée aux R-AMPA, la stargazine (Chen *et al.* 2000). C'est une autre protéine : PICK1 (Protéine qui interagit avec la kinase C) qui va maintenir les R-AMPA au niveau de la membrane postsynaptique (Xia *et al.* 1999). On peut citer aussi d'autres associations qui aboutissent à la formation de complexes capables de se lier aux voies de signalisation dépendantes des protéines G de la famille Ras, comme R-NMDA et SynGAP

(protéine activatrice de la GTPase synaptique Ras) ou R-AMPA et GRASP-1 (protéine associé à GRIP 1) (Kim *et al.* 1998; Ye *et al.* 2000).

La stabilité de la morphologie synaptique est aussi une fonction importante des protéines de la PSD. Elle va dépendre de l'interaction de protéines à la fois avec l'élément présynaptique et à la fois avec les éléments du cytosquelette. On peut noter par exemple que la PSD-95 est capable d'interagir avec des protéines d'adhésion postsynaptiques appelées neuroligines de type I. Les neuroligines vont pouvoir à leur tour se fixer aux protéines d'adhésion présynaptiques appelées β-neurexines et former des jonctions responsables de maintenir le lien physique entre les deux éléments pré et posynaptiques (Kim and Sheng 2004). D'autres protéines appartenant à la famille Shank (protéines ayant aussi un domaine PDZ) vont assurer le lien avec les éléments du cytosquelette (filaments d'actine), permettant de réguler la structure des épines dendritiques (Sala *et al.* 2001). Par exemple la protéine DAP-1 (*Disks large-associated protein 1*) peut se lier aux domaines PDZ et donc interagir avec la famille Shank, ou encore avec la PSD-95.

Les épines dendritiques sont des structures très riches en F-actine (Matus *et al.* 1982). Il a été montré durant la morphogénèse des épines que la dégradation des filaments d'actine produisait un démantèlement considérable de la structure de la PSD (Allison *et al.* 2000; Zhang *et al.* 2001). Le fonctionnement de la PSD est donc basé sur l'ajustement et la coordination de nombreux partenaires protéiques (Scannevin and Huganir 2000). C'est l'adaptation de la taille de la PSD qui coïncide avec son abondance en protéines (récepteurs, protéines d'échafaudage...), ce qui va moduler en grande partie l'efficacité de la transmission synaptique.

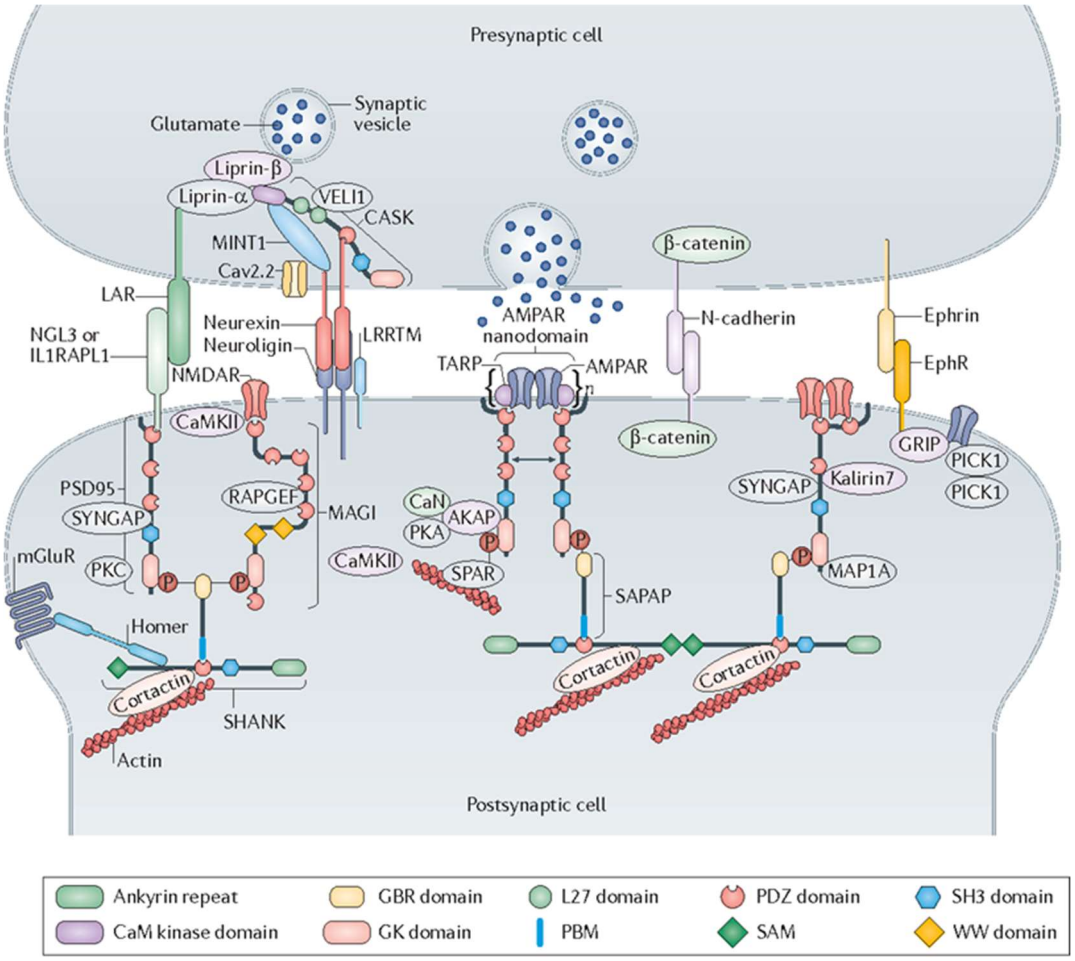


Figure 7 : Organisations complexes de protéines médiées par des protéines d'échafaudage dans les synapses excitatrices.
AKAP, protéine d'ancrage A-kinase; CaMKII, protéine kinase II calcium/calmoduline-dépendante; CaN, calcineurine; Cav2.2, sous-unité du canal calcique voltage-dépendant-α Cav2.2; EphR, récepteur d'éphrine; GBR, région de liaison GK; GK, de type guanylate kinase; GRIP, protéine interagissant avec le récepteur du glutamate; L27, LIN2–LIN7 ; LAR, lié à l'antigène commun des leucocytes; LRRTM, protéine transmembranaire répétée riche en leucine; MAGI, guanylate kinase associée à la membrane inversée; MAP1A, protéine 1A associée aux microtubules ; mGluR, récepteur métabotropique du glutamate; NGL-3, ligand nétrine-G3; NMDAR, récepteur du glutamate de type NMDA; PBM, motif de liaison PDZ; PDZ, PSD95–DLG1–Zonula occludens 1 ; PKA, protéine kinase A; PKC, protéine kinase C; PICK1, protéine interagissant avec la C kinase 1 ; SAM, motif stérile ; TARP, protéine régulatrice AMPAR transmembranaire; VELI1, vertébré lin-7 homologue 1. D'après Zhu *et al.* 2016.

C. La plasticité synaptique

On peut comparer l'ensemble des neurones et leurs connexions à un réseau de câbles formant la base des circuits cérébraux. La particularité de ce réseau est qu'il est en changement permanent sous l'effet de l'activité neuronale ou sous l'action d'autres facteurs. Les différentes variations dans la connectivité entre les neurones vont avoir un impact sur l'efficacité de la transmission synaptique. Ces variations possèdent plusieurs formes et

présentent une échelle de temps qui varie de quelques millisecondes à plusieurs années, dites respectivement à court ou à long termes. Enfin la plasticité synaptique représente aussi la capacité des synapses à conserver plus ou moins longtemps une trace de ces modulations (Asok *et al.* 2019).

Les formes de plasticité synaptique à court terme vont principalement affecter la quantité de neurotransmetteurs libérée par les terminaisons présynaptiques dans la fente synaptique à la suite d'un PA. On observe des formes qui vont augmenter la libération des neurotransmetteurs (facilitation, augmentation et potentialisation), ce qui va avoir pour conséquence une action persistante des ions calciums au sein de l'élément présynaptique. Mais il y a aussi des formes qui vont diminuer la quantité de neurotransmetteurs libérés, comme dans le cas de la dépression synaptique, qui se manifeste par la déplétion des vésicules synaptiques prêtes à être exocytées (Purves *et al.* 2015).

Il existe également des formes de plasticité à long terme qui vont affecter la transmission synaptique sur des durées supérieures à 30min. Elles résultent de mécanismes moléculaires dont l'action varie au cours du temps. La transmission synaptique est remaniée initialement par des modifications postraductionnelles des protéines existantes, et surtout par des changements dans le nombre et le trafic des récepteurs aux glutamates. Des modifications tardives vont s'observer par la suite, principalement dues à des changements de l'expression des gènes. On note que ces bouleversements dans l'expression des gènes vont altérer durablement la transmission synaptique et leurs actions importantes sur la croissance des synapses peuvent engendrer des modifications permanentes des fonctions cérébrales (Purves *et al.* 2015).

1 - La plasticité à court terme

Les synapses chimiques sont très souvent sujettes à des changements dans leur efficacité de transmission. On observe des mécanismes qui vont soit renforcer soit affaiblir cette transmission dans des délais très courts, ne dépassant pas plusieurs minutes, qui sont englobé sous le terme de plasticité à court terme. Ces phénomènes sont aujourd'hui facilement visibles durant l'activation de manière répétée de n'importe quelle synapse chimique. Les différentes formes de plasticité à court terme diffèrent par les mécanismes qui les sous-tendent et par leur déclin temporel.

1.1 - La facilitation synaptique

La facilitation synaptique représente une rapide accentuation de la force synaptique qui se produit après l'arrivée d'au moins deux PA au niveau de la terminaison présynaptique à seulement quelques ms d'intervalle. On note que plus l'intervalle de temps entre les stimuli présynaptiques est petit, plus le taux de facilitation est grand (Charlton and Bittner 1978). La survenue de cette facilitation serait due à l'augmentation prolongée de la concentration présynaptique en Ca^{2+} consécutive à l'activité neuronale. Cette augmentation viendrait de la différence de temps qu'il y a entre les mécanismes permettant l'entrée du Ca2+ dans la terminaison présynaptique après l'arrivée d'un PA (très rapide) et les processus permettant le retour à ses niveaux de repos (beaucoup plus lents). Cette forte concentration en calcium va permettre une libération plus importante de neurotransmetteur lors de la survenue du PA suivant. Les cibles moléculaires de cette abondance de calcium seraient les protéines du système SNARE impliquées dans l'arrimage et l'exocytose des vésicules contenant les neurotransmetteurs.

1.2 - La dépression synaptique

On peut décrire la dépression synaptique comme étant l'opposé de la facilitation synaptique. C'est à dire que durant une activité synaptique continue, la dépression se manifeste par la diminution de la libération des neurotransmetteurs. Ce phénomène dépendrait de la quantité de neurotransmetteurs libéré à chaque PA. Par exemple, plus on augmente la quantité de Ca2+ dans la terminaison presynaptique afin d'augmenter le quantum de neurotransmetteurs libérés plus la survenue de la dépression synaptique est forte et rapide (**Figure 8** ; Swandulla *et al.* 1991). C'est résultats ont abouti sur l'hypothèse que la dépression serait amenée par la déplétion progressive du lot de vésicules synaptiques susceptibles d'être exocytées. Plus ce lot s'amenuise vite plus la dépression est accentuée et inversement. Enfin cette dépression serait à l'origine du déclin de la force de transmission synaptique jusqu'à observer une augmentation de la quantité de vésicules disponibles par mobilisation du stock de réserve.

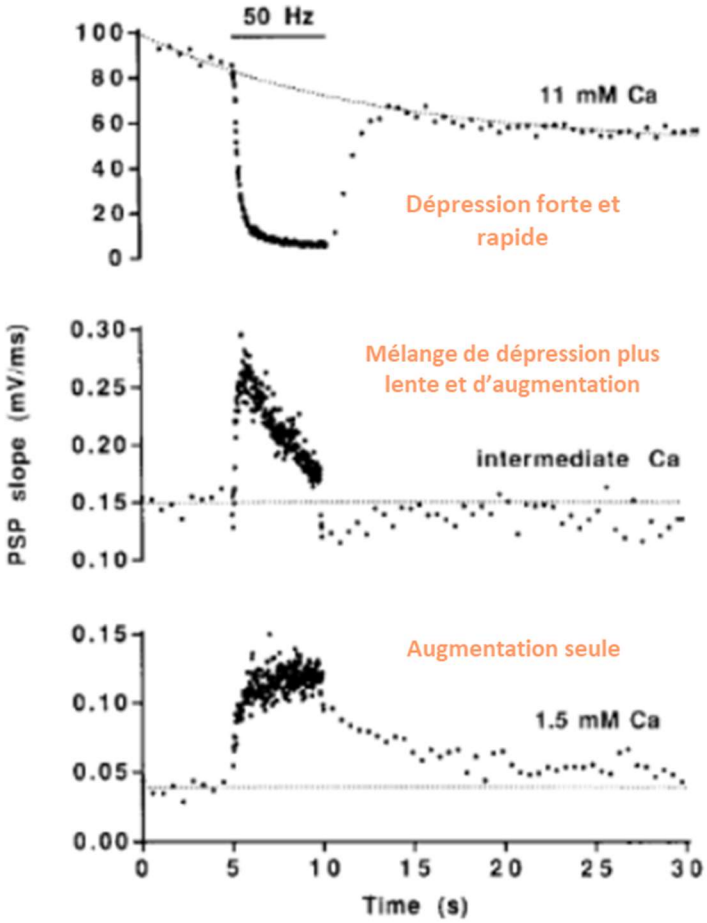


Figure 8 : L'activité électrique induit une plasticité synaptique au niveau de la synapse géante du calmar. Dans les conditions physiologiques normales, une tétanisation à haute fréquence (barre en pointillée horizontale) provoque une dépression marquée des potentiels postsynaptiques excitateurs (PPSE) au niveau de la synapse géante du calmar (en haut). En abaissant la concentration du Ca2+ externe jusqu'à un niveau intermédiaire, on réduit la libération de neurotransmetteurs et on obtient un mélange de dépression et d'augmentation (au milieu). Une réduction plus forte du calcium externe fait disparaitre la dépression et ne laisse que l'augmentation (en bas). Adapté de Swandulla *et al.* 1991; Purves *et al.* 2015.

1.3 - La potentialisation et augmentation synaptique

Une activité synaptique répétitive peut engendrer également des phénomènes de potentialisation et d'augmentation qui vont favoriser l'accroissement de la libération de neurotransmetteurs. L'augmentation serait un phénomène plutôt bref dans le temps (quelques secondes), alors que la potentialisation aurait tendance à s'étendre plus longtemps (quelques minutes). La potentialisation nait d'une stimulation à haute fréquence dite "tétanique", d'où son appellation de potentialisation post-tétanique (Lev-Tov *et al.* 1983; Swandulla *et al.* 1991).

Comme la facilitation, ces deux formes de plasticité à court terme augmentent la concentration en Ca^{2+} dans les terminaisons présynaptiques. A l'inverse de la facilitation les mécanismes en jeu de ces formes sont encore aujourd'hui peu connus. La facilitation permet d'augmenter la libération des neurotransmetteurs de manière directe, c'est à dire que le Ca^{2+} vient directement agir sur la fusion des vésicules. Alors que pour ces deux formes il s'agirait d'une action indirecte du Ca^{2+} qui activerait ou désactiverait certaines voies métaboliques. Il semblerait que dans le cas de l'augmentation le Ca^{2+} amplifierait l'action de la protéine munc-13 (*mammalian uncoordinated -13*) dans les terminaisons présynaptiques. Tandis que la potentialisation passerait par l'activation de protéines kinases présynaptiques, responsables de la phosphorylation d'un certain nombre de substrats comme la synapsine, protéine qui régule la libération des neurotransmetteurs (Purves *et al.* 2015).

Ces différentes formes de plasticité à court terme peuvent interagir les unes avec les autres durant une activité synaptique répétitive, amenant ainsi des bouleversements complexes dans la transmission synaptique. Bien que leur participation respective change d'une synapse à l'autre, elles touchent l'ensemble des synapses chimiques et de façon dynamique. Elles modulent la transmission en regard de l'activité qu'elles ont connue dans un proche passé.

2 - La plasticité à long terme

La plasticité à long terme englobe l'ensemble des mécanismes qui vont modifier durablement la transmission synaptique. En effet, les mécanismes mis en jeu vont affecter profondément les neurones, en jouant sur l'expression génétique de nombreuses protéines. Grâce à son étendue dans le temps, allant de quelques minutes à plusieurs jours et années, seule la plasticité à long terme provoque des modifications de la morphologie des synapses. Aujourd'hui nous sommes capables de voir les traces de ces changements.

La découverte de cette plasticité est arrivée par l'étude de la mémoire, en particulier de la mémoire à long terme. Pour faire simple, trois découvertes majeures du milieu du XXe siècle ont déclenché la recherche des mécanismes moléculaires responsables des traces de mémoire à long terme et donc de la plasticité. Premièrement, à la fin des années 1940, Donald Hebb formalise la théorie selon laquelle les mémoires à long terme requièrent l'activation et

le renforcement concomitant des neurones pré et postsynaptique (Hebb, 1949). Deuxièmement, au milieu des années 1950, Milner et ses collègues identifient que la région de l'hippocampe est indispensable pour la formation explicite des mémoires à long terme (Scoville and Milner 1957; Penfield and Milner 1958). Enfin, au début des année 1970, Bliss et Lomo découvre que la potentialisation à long terme (*long term potentiation*, LTP), en d'autres mots l'amélioration de la transmission présynaptique et l'excitabilité postsynaptique, sont indispensables dans la mémoire à long terme (Bliss and Lomo 1973). Ces trois découvertes ont renforcé l'idée que la LTP, la dépression à long terme (*long term depression*, LTD) ainsi que la plasticité par modulation temporelle (*spike-timing-dependent plasticity*) (Markram *et al.* 2011) peuvent fournir un mécanisme complexe pour l'acquisition et la consolidation des mémoires à long terme. Par la suite, Eric Kandel et ses collègues à l'université de Columbia University, ont étudié chez le gastéropode marin *Aplysia californica* les différentes formes de plasticité à long terme. Bien que les rôles *in vivo* de la LTP et de la LTD dans l'apprentissage et la mémoire ont été longtemps débattu (Malenka and Bear 2004; Nabavi *et al.* 2014), il existe aujourd'hui un consensus général sur le fait que la consolidation des mémoires à long terme par les mécanismes de plasticité nécessite la transcription de nouveaux ARNm ainsi que la synthèse de nouvelles protéines (Scharf MT et al., 2004). Ainsi c'est par l'étude de la mémoire qu'a surgit le concept de plasticité synaptique. Au départ fortement étudié dans l'hippocampe, zone de sa découverte (Bliss and Lomo 1973), des travaux s'intéressent maintenant à la plasticité dans d'autres zones du cerveau.

Nous allons à la suite de cette introduction sur la plasticité à long terme décrire succinctement ses deux mécanismes principaux à savoir la LTP et la LTD.

2.1 - La potentialisation à long terme

L'un des processus principaux qui régule les fonctions de mémoire et d'apprentissage est la potentialisation à long terme (*long terme potentiation*, LTP). Une étude a permis de mettre en évidence expérimentalement que ce phénomène de LTP formait le support cellulaire et moléculaire de ces deux fonctions (Nabavi *et al.* 2014). Ce phénomène existe aussi dans d'autres régions comme le cortex (Iriki *et al.* 1989) ou le striatum (Uno and Ozawa 1991). Assez rapidement, l'implication du système glutamatergique dans ce mécanisme de LTP a été montré, en particulier celle des récepteurs NMDA (Collingridge *et al.*

1983). Le processus de LTP est décrit aujourd'hui comme étant composé de deux mécanismes différents qui vont permettre d'améliorer l'efficacité de la transmission synaptique :

- Le premier concerne la **phase précoce** de la LTP (les quelques premières heures), c'est ce mécanisme qui est le plus étudié et le mieux connu. Elle englobe des mécanismes enzymatiques qui augmentent l'efficacité synaptique notamment par la phosphorylation et la mobilisation du pool de récepteurs AMPA.

- Le deuxième survient lors de la **phase tardive** de la LTP (plusieurs jours). Elle permet des changements dans l'expression des gènes ainsi qu'une augmentation de la synthèse de protéines contribuant à améliorer la transmission synaptique (Malenka and Bear 2004).

- **La phase précoce**

Une fois que l'on stimule le neurone présynaptique à haute fréquence, on observe la libération de grandes quantités de glutamate. Dans la synapse, le glutamate va aller se fixer sur ses différentes cibles postsynaptiques. On note dans un premier temps son action sur les récepteurs ionotropiques de type AMPA (alpha-amino-3-hydroxyl-5-méthylisoxazol-4-propionate). L'activation de ces récepteurs amène alors une dépolarisation locale et rapide du neurone postsynaptique. Le glutamate va se fixer également sur les R-NMDA provoquant un changement conformationel de ces récepteurs qui vont commencer à ouvrir leur pore. C'est la dépolarisation menée par les récepteurs AMPA en premier lieu qui va permettre d'expulser les ions magnésium et libérer le canal des R-NMDA et engendrer l'entrée de calcium dans l'élément postsynaptique (Nicoll *et al.* 1988).

Le calcium va activer un certains nombres de cascades moléculaires dans l'élément postsynaptique *via* des kinases Ca^{2+} dépendantes comme la protéine-kinase-Ca^{2+}-calmoduline dépendante (CaMKII) ou la protéine kinase C (PKC) responsable du renforcement synaptique. Il a été montré que l'inhibition pharmacologique de la CaMKII tout comme la délétion de son gène empêche la survenue de la LTP (**Figure 9**; Lee *et al.* 2009). De plus, la CaMKII serait capable de se phosphoryler elle-même, ce qui pourrait entrainer son activation durable et prolonger la durée de la LTP (Lisman *et al.* 2012).

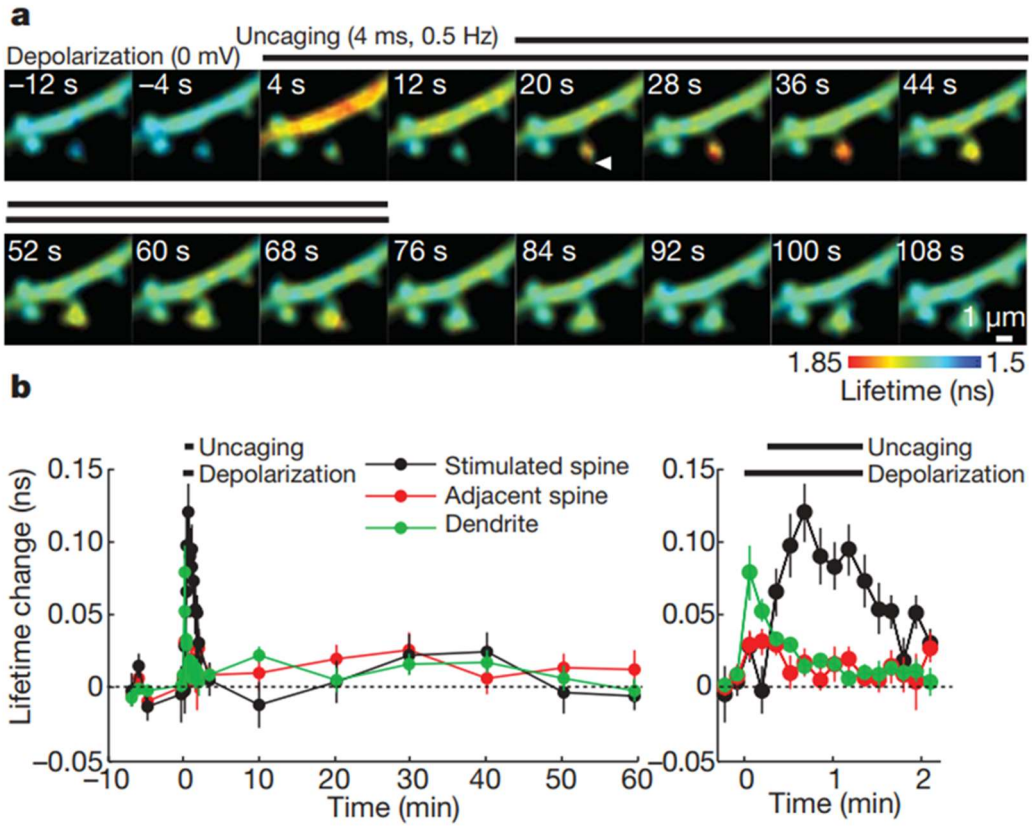


Figure 9 : Imagerie de l'activation de CaMKII pendant l'induction de la LTP en microscopie biphotonique.
a, Le degré d'activité ainsi que la durée de vie de la CaMKII (en pseudo-couleurs) dans une épine dendritique augmente lors d'une stimulation induisant de la LTP. **b**, Décours temporel du changement d'activité de la CaMKII lors du déclenchement de la LTP. D'après Lee *et al.* 2009; Purves *et al.* 2015.

Il parait maintenant clair que durant la LTP le renforcement de la transmission synaptique provient en grande partie de l'augmentation de la sensibilité du neurone postsynaptique. Les synapses sont capables de réguler de manière fine et dynamique la quantité de leurs récepteurs postsynaptiques (Granger and Nicoll 2014). Autant les R-NMDA jouent un rôle fondamental dans l'induction de la LTP, autant son entretien va reposer sur l'insertion de R-AMPA dans la membrane postsynaptique (Lledo *et al.* 1998; Park *et al.* 2004; Wu *et al.* 2017). En effet, on observe une densité plus importante de R-AMPA au niveau de l'épine postsynaptique qui amène une réponse plus forte du neurone postsynaptique au glutamate aussi longtemps que va durer la LTP (**Figure 10** :Matsuzaki *et al.* 2004). Des travaux ont montrés également que dans les neurones hippocampiques, une bonne partie des R-AMPA extrasynaptiques diffusent librement suivant un mouvement brownien, avant d'être réversiblement confiné et piégé dans la synapses (Opazo *et al.* 2010; Opazo and Choquet 2011). De plus, l'activation postsynaptique dépendante de l'activité de la protéine CaMKII

induit une immobilisation des R-AMPA au niveau des synapses (Borgdorff and Choquet 2002; Opazo *et al.* 2010). D'autres travaux disent même qu'il existerait préalablement un pool de R-AMPA extrasynaptiques favorable à l'expression de la LTP (Granger *et al.* 2013). Enfin, les mouvements latéraux ainsi que l'exocytose des R-AMPA pourrait contribuer à la LTP (Makino and Malinow 2009).

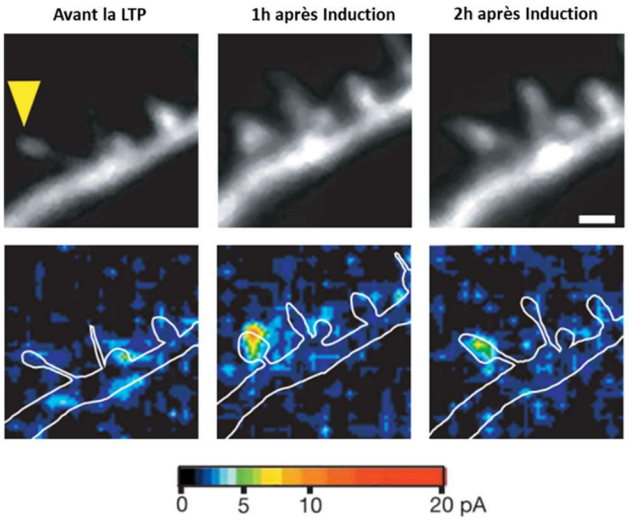


Figure 10 : Ajout de R-AMPA postsynaptqiues durant la LTP.
Carte spaciale de la sensibilité au glutamate d'une dendrite de neurone hippocampique avant (à gauche), 1h après (au centre) puis 2h après (à droite) l'induction d'une LTP. L'échelle indique l'amplitude des réponses à des applications de glutamate extrêmement localisées. La LTP provoque une augmentation de la réponse de l'épine dendritique au glutamate. Cette augmentation est due à l'augmentation du nombre de R-AMPA sur la surface de l'épine. Adapté de Matsuzaki *et al.* 2004; Purves *et al.* 2015.

- **La phase tardive**

La phase tardive de la LTP va consister en des changements dans l'expression des gènes ainsi qu'en la synthèse de nouvelles protéines et va être importante pour faire durer la LTP. Sa contribution propre peut être mise en évidence par l'utilisation de drogues qui inhibent la synthèse protéique, elle amène une disparition du phénomène de LTP (Frey and Morris 1997). Cette phase plus tardive commence avec l'effet de la protéine kinase A qui va être responsable de l'activation de facteurs de transcription, comme la CREB (*cAMP Response Element Binding protein*) qui vont stimuler l'expression protéique. On ne connaît pas encore aujourd'hui l'identité de toutes les protéines qui sont nouvellement synthétisées par le neurone postsynaptique. On sait que l'on retrouve parmi elles d'autres facteurs de transcription, des protéines kinases ou encore des R-AMPA (Squire and Kandel 1999). Durant le phénomène de LTP, des modifications morphologiques visibles ont lieu au niveau des synapses. On a des

preuves de l'augmentation du nombre et de la taille des contacts synaptiques, visibles en microscopie (**Figure 11** ; Engert and Bonhoeffer 1999).

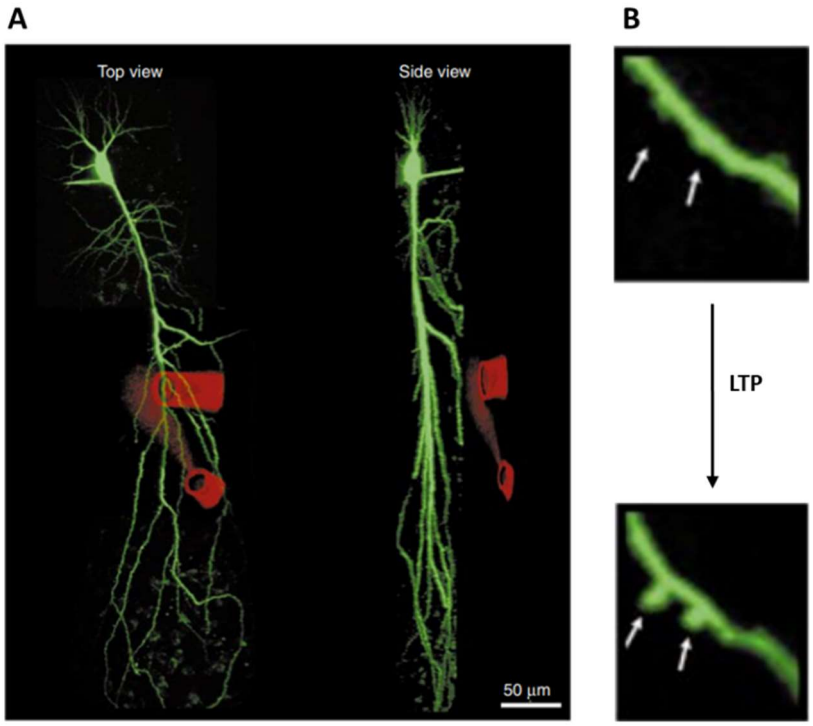


Figure 11 : La LTP favorise la formation de nouvelles synapses.
A. Arborisation dendritique d'un neurone pyramidal de la région CA1 de l'hippocampe marquée par la surexpression d'une GFP. **B**. Formation de nouvelles épines dendritiques une heure après induction d'une LTP. Adapté de Engert and Bonhoeffer 1999; Purves *et al.* 2015.

En d'autres termes la LTP, va permettre de renforcer la transmission synaptique entre deux neurones, principalement par l'augmentation conjointe de la surface de connexion de l'élément postsynaptique à l'élément présynaptique ainsi que de la force synaptique (qui correspond à la richesse des protéines impliquées dans la transmission du signal présentes dans l'élément postsynaptique, comme les récepteurs ou les protéines échafaudages) (**Figure 12**). Mais il est important de savoir que le phénomène opposé de la LTP dans la plasticité est la dépression à long terme (*Long terme depression,* LTD). Elle va quant à elle réduire la transmission synaptique entre deux neurones.

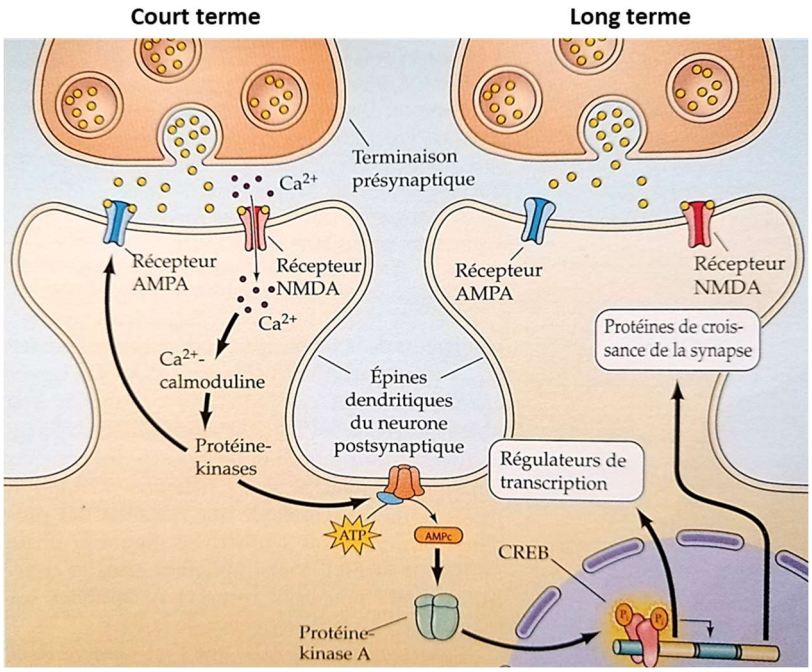


Figure 12 : Mécanismes responsables des modifications durables de la transmission synaptique.
La phase tardive est due à l'activation de la PKA, d'un régulateur de la transcription, la CREB ; celle-ci déclenche l'expression de divers gènes qui provoquent des modifications durables de l'activité de la PKA et de la structure de la synapse. D'après Purves *et al.* 2015.

2.2 - Modèles d'induction expérimentale de LTP

Il existe des méthodes d'induction électrophysiologiques et chimiques qui ont été développés pour l'amélioration persistante de la transmission synaptique dans les différents modèles expérimentaux. La stimulation physique des neurones par l'intermédiaire d'une électrode ne va activer qu'une petite fraction des synapses, rendant difficile l'observation des changements moléculaires et cellulaires associés à la LTP. Pour les analyses biochimiques ainsi que pour les études d'imagerie il est nécessaire d'avoir une proportion élevée de synapses potentialisées. C'est pour cela qu'une gamme de stratégies a été mise au point pour induire chimiquement la LTP dans la majorité des synapses. Au départ ces inductions chimiques de LTP étaient développées pour des études électrophysiologiques sur des tranches de cerveau. Depuis certaines de ces procédures ont été adoptées et utilisées avec succès pour l'étude des évènements moléculaires et cellulaires associée à la LTP dans des cultures de neurones (Molnár 2011). L'objectif, ici, n'est pas de cataloguer l'ensemble de ces méthodes, mais d'en décrire quelques-unes, notamment celles utilisées dans les travaux de cette thèse.

Une solution de L-glutamate exogène (50µM dans un tampon tyrode avec du magnésium libre) peut induire la LTP dans les cultures de neurones. L'application de glutamate

produit une LTP de la fréquence des courants postsynaptiques excitateurs miniatures spontanées et évoqués (*miniature excitatory postsynaptic currents*, mEPSC). Cette mini-fréquence est initiée directement au niveau postsynaptique et provoque un afflux de Ca2+ dans les neurones via des R-NMDA activés (Malgaroli and Tsien 1992).

Un modèle encore plus utilisé est l'induction de LTP par la glycine, qui est un neuromodulateur allostérique positif des R-NMDA. La stimulation par la glycine (100-200µM) dans un milieu sans magnésium avec souvent une concentration en Ca2+ élevé aux alentours de 3mM permettent de développer une LTP dans les neurones en culture (Shahi and Baudry 1993; Lu *et al.* 2001; Goldin and Segal 2003). L'activation transitoire des R-NMDA améliore l'activité du réseau dans la culture et permet la synchronisation entre les neurones adjacents. Cela va entrainer un renforcement durable des connexions excitatrices ainsi qu'un affaiblissement des connexions inhibitrices entre les neurones jusqu'à une heure après le conditionnement (Ivenshitz and Segal 2006). La LTP alors obtenue est associée à une augmentation de la fréquence ainsi que de l'amplitude des mEPSC (Lu *et al.* 2001; Oh and Derkach 2005), à une augmentation de l'autophosphorylation de la CaMKII (Oh and Derkach 2005), à une expansion des épines dendritiques R-NMDA dépendante (Lin *et al.* 2004; Park *et al.* 2006; Korkotian and Segal 2007; Fortin *et al.* 2010) ainsi qu'à la formation de nouvelles synapses (Ovtscharoff *et al.* 2008). Cette LTP par la glycine va faciliter l'insertion rapide des R-AMPA à la surface des membranes postsynaptiques (Man *et al.* 2003; Huang *et al.* 2005; Sharma *et al.* 2006), qui par ailleurs peut être bloquée par la toxine tétanique, indiquant que ces R-AMPA sont insérés à la synapse par une exocytose dépendante des protéines SNARE (Lu *et al.* 2001). La stimulation de la LTP par la glycine peut être accompagnée et renforcée avec l'ajout de bicuculline (30µM), qui va inhiber de manière compétitive les récepteurs GABAa des interneurones inhibiteurs (**Figure 13**; Kennedy *et al.* 2010).

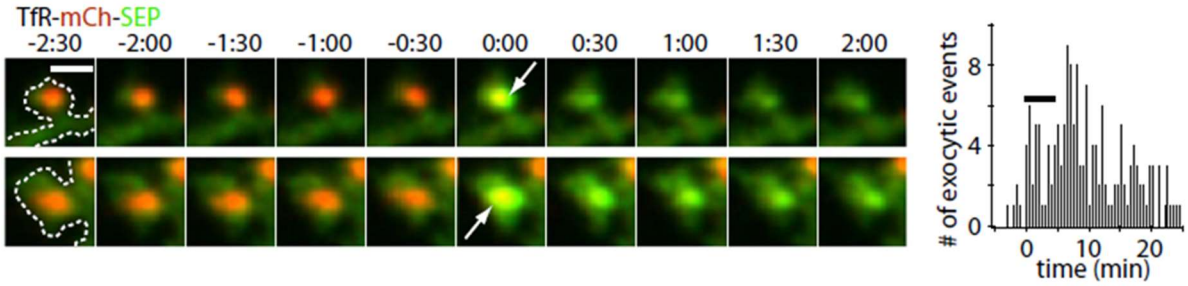


Figure 13 : L'activité déclenche l'exocytose des endosomes des épines dendritiques sur des sites latéraux à la PSD.
A gauche : La fusion des endosomes de recyclage avec la membrane plasmique des épines est visualisée (flèches) avec la construction TfR-mCh-SEP (*Transferrin receptor – mCherry - superecliptic pHluorin*) après stimulation avec Bicuculline/Glycine (Bic/Gly). A droite : Analyse d'histogramme des événements exocytaires d'épines avant, pendant et après un traitement de 5 minutes avec Bic/Gly (barre horizontale). La fréquence de l'exocytose dans les épines augmente avec l'activité. D'après Kennedy *et al.* 2010.

Les cultures de neurones sont capables de subir des modifications à long terme de leur activité suite à une brève dépolarisation par du potassium en concentration élevé. En effet l'utilisation du potassium chloride (KCl) pour induire une augmentation de l'activité synaptique est aussi très utilisée (50-90mM) (Fitzjohn *et al.* 2001; Pickard *et al.* 2001; Nash *et al.* 2010). La dépolarisation transitoire et rapide induite par le KCl va dépendre des R-NMDA, du Ca2+ postsynaptique et s'exprime par une augmentation de la fréquence des mEPSCs mais sans modifications de leur amplitude (Fitzjohn *et al.* 2001). Elle implique également l'insertion de R-AMPA à la membrane au niveau de sites qui en étaient auparavant dépourvus (Pickard *et al.* 2001). Cette dépolarisation implique des interactions protéiques impliquant la protéine SAP97 et la myosine VI (Nash *et al.* 2010).

Il existe encore bien d'autres formes de LTP induites que nous ne décrirons pas dans ce manuscrit. Il est tout de même important de noter que la plupart de ces méthodes d'induction sont réversibles par l'ajout de molécules responsables de l'inhibition des récepteurs aux glutamate ou encore de molécules capables de chélater le Ca^{2+}. Ces molécules sont aussi utilisées pour induire la LTD dans les modèles expérimentaux que nous allons aborder par la suite.

2.3 - La dépression à long terme

La dépression synaptique à long terme (*long term depression*, LTD) joue globalement le rôle opposé de la LTP. Elle correspond à la réduction durable de l'efficacité de la transmission synaptique. Afin de pouvoir faire du renforcement des synapses un mécanisme

efficace de codage de l'information, il faut que d'autres phénomènes viennent sélectivement affaiblir les ensembles synaptiques.

Le facteur majeur qui détermine la survenue d'une LTP ou d'une LTD est la concentration en Ca^{2+} dans le neurone postsynaptique. En effet, de faibles et lentes augmentation de Ca^{2+} amènent une dépression, alors que des augmentations rapides et massives provoquent une potentialisation. Cette diminution d'entrée de Ca^{2+} pendant la LTD dans l'élément postsynaptique proviendrait d'une diminution de la fréquence de stimulation de la part du neurone présynaptique (Mulkey *et al.* 1993). Elle amène l'activation de voies de signalisation différentes, comme l'activation de phosphatases qui vont être responsables de la déphosphorylation de molécules cibles. Il semblerait en plus que l'inhibition de ces phosphatases empêche la LTD de se produire, alors qu'elle n'affecte en rien la LTP. Les substrats de ces phosphatases ne sont pas encore bien connus aujourd'hui, mais il serait possible que les protéines-kinases activées lors de la LTP et les phosphatases activées pendant la LTD phosphorylent et déphosphorylent les mêmes protéines régulatrices pour moduler l'efficacité de la transmission synaptique. De plus, la LTD amènerait une réduction du nombre de R-AMPA à la surface de la membrane postsynaptique due à des mécanismes d'endocytose dépendant de la clathrine (Sakurai 1987; Purves *et al.* 2015). Enfin, en étudiant une forme légèrement différente de LTD dans le cervelet, une équipe a mis en évidence la contribution de récepteurs métabotropes du glutamate qui déclencheraient une cascade de seconds messagers permettant la production d'inositol triphosphate (IP_3) ainsi que de diacylglycérol (DAG) (Chung *et al.* 2003). Elle conduirait à l'activation de la protéine kinase C (PKC) qui induirait la recapture des R-AMPA dépendante de la clathrine.

Il est clair aujourd'hui que l'on est loin de tout connaître sur ce phénomène, indispensable à la plasticité à long terme. Mais on peut dire que l'ensemble des évènements qui ont lieu durant la LTD, c'est à dire la diminution de la survenue de potentiels postsynaptiques excitateurs, la réduction du taux de Ca^{2+} dans l'élément postsynaptique, la déphosphorylation de molécules cibles par l'intermédiaire de phosphatases ainsi que l'internalisation des R-AMPA amènent un affaiblissement dans l'excitabilité et l'efficacité de la transmission neuronale et donc de la force synaptique.

2.4 - Modèles d'induction de l'inhibition neuronale

Comme pour la LTP, il est possible aussi d'induire une inhibition neuronale. Globalement moins étudiée, la recherche sur la LTD a donné moins de modèles que la LTP. D'ailleurs ils ne sont jamais décrits dans la littérature comme des modèles d'induction de LTD, mais plutôt comme des modèles permettant de bloquer la LTP. Nous allons aborder succinctement quelques exemples de modèles d'induction d'inhibition chimiques.

L'un des modes d'inductions le plus utilisé consiste à inhiber les différents récepteurs synaptiques au glutamate. En effet, l'inhibition des courants ioniques synaptiques va amener une diminution très efficace de la transmission synaptique. On peut citer parmi les molécules utilisées la cyanquixaline (CNQX, 50µM), antagoniste compétitif et sélectif des R-AMPA et R-kaïnate (Attwell *et al.* 1999; Traynelis *et al.* 2010). L'utilisation de l'acide (2R) -amino-5-phosphonovalerique (APV, 50-100µM) est très utilisée aussi (Morris 1989), c'est un antagoniste compétitif sélectif des R-NMDA, par ailleurs souvent conjointement administré à la CNQX (Hanus *et al.* 2014) pour inhiber l'ensemble des récepteurs au glutamate. Ces inhibiteurs vont empêcher les échanges entre les extrémités pré et postsynaptiques amenant les synapses à un état silencieux.

Une autre méthode d'inhibition consiste à venir bloquer la propagation des PA au niveau axonal. On peut citer une molécule très utilisée dans ce champ : la tétrodotoxine (0.5-2µM), qui est une toxine qui va bloquer de manière très sélective les pores des canaux sodiques voltage dépendant *in vivo* comme *in vitro* (Santschi *et al.* 1999a; Cichon and Gan 2015). Ainsi elle va empêcher la propagation des PA le long des axones et diminuer voire arrêter l'excitation de la membrane postsynaptique et fatalement conduire à une chute de la concentration en Ca^{2+} dans l'élément postsynaptique.

Enfin il est possible de bloquer la LTP par l'utilisation de chélateur de Ca^{2+} comme le BAPTA (acide 1,2-bis(o-aminophénoxy)éthane-N,N,N',N'-tétraacétique) qui est un acide aminopolycarboxylique spécifique des ions Ca^{2+}. Il possède quatre fonctions acide carboxylique qui vont lui permettre de lier deux ions Ca^{2+}. Cette capacité à capturer le calcium en fait une molécule très utilisée notamment pour faire chuter les concentrations pré et postsynaptiques (Lu *et al.* 2001).

Pour résumer, cette première partie nous a permis de revenir sur les bases fondamentales qui régissent les synapses excitatrices.

La synapse glutamatergique correspond à une zone restreinte dans laquelle va préférentiellement avoir lieu la transmission de l'information d'un neurone présynaptique (bouton présynaptique) à un neurone postsynaptique (épine dendritique). Elle est reconnaissable par sa structure particulière : on retrouve au niveau postsynaptique une région dynamique et dense aux électrons (PSD), synonyme d'une grande richesse de protéines impliquées dans la transmission synaptique.

Elle est le siège de changements adaptatifs dans sa structure. Son efficacité de transmission du signal dépend des tâches à accomplir et de l'environnement qui gravite autour de l'individu, c'est la plasticité synaptique. Cette faculté d'adaptation va permettre au cerveau d'encoder efficacement les informations et de les utiliser afin de développer des fonctions complexes comme l'apprentissage ou encore la mémoire.

II – Le trafic vésiculaire

Le trafic de vésicules dans les cellules joue un rôle essentiel, c'est lui qui va permettre aux cellules de dialoguer entre elles, d'entretenir leur membrane plasmique ainsi que leur matrice extracellulaire (MEC). Ce trafic vésiculaire correspond à la coopération de nombreuses protéines qui vont interagir avec le cytosquelette de la cellule. Ce trafic varie en fonction du type de prolongement (dendrite ou axone) et en fonction du compartiment dans lequel se trouve la vésicule. Nous devons la majorité des avancées dans le domaine à trois scientifiques : James Rothman, Randy Scheckman et Thomas Südhof, prix Nobel de physiologie ou médecine en 2013.

Figure 14 : Récipiendaires du prix Nobel de médecine 2013.
A gauche : James Rothman, au centre : Thomas Südhof et à droite : Randy Scheckman.

Dans cette deuxième partie nous allons dans un premier temps aborder les bases moléculaires du transport vésiculaire, puis nous allons décrire une étape du cycle vésiculaire qui a principalement été étudié dans ces travaux de thèse, l'exocytose.

A- Les bases moléculaires du transport vésiculaire

1 – Les moteurs moléculaires

On compte aujourd'hui trois grandes familles de moteurs moléculaires, les kinésines et les dynéines qui évoluent le long des microtubules (MTs), et les myosines qui se déplacent le long des filaments d'actine. Les MTs sont fibres constitutives du cytosquelette composées de dimères de tubulines (tubuline α et tubuline β). Ces dimères de tubulines sont polarisés et

sont orientés aussi de manière polarisée le long de chaque protofilament. De cette façon une extrémité des MTs va présenter que des tubuline α alors que l'autre ne présentera que des tubuline β. Ces deux extrémités sont respectivement appelées (–) et (+). L'assemblage de ces dimères (les MTs sont des polymères) va être extrêmement dynamique, les extrémités des MTs se polymérisent et se dépolymérisent en permanence, donnant l'aspect d'un tapis roulant.

Les kinésines et dynéines possèdent toutes un point commun qui est d'avoir un domaine catalytique que l'on appelle « tête » caractérisé par la présence de deux sites de liaisons : un site de liaison pour l'ATP et un site de liaison aux microtubules (MTs). C'est l'hydrolyse de l'ATP qui est responsable du mouvement de ces moteurs. En dehors de cette tête, ces deux familles de protéines sont considérablement différentes, ce qui suggère des différences fonctionnelles et la présence d'autres domaines sur leur structure respective.

1.1 - Les dynéines

La famille des dynéines est constituée de deux grands groupes, les dynéines cytoplasmiques et les dynéines axonémales. Ce sont des enzymes mécaniques qui se déplacent le long des microtubules (MTs) en hydrolysant l'adénosine triphosphate (ATP). Tout d'abord, les dynéines cytoplasmiques, elles forment d'imposants complexes protéiques (~1.5 MDa) qui jouent un rôle dans le trafic intracellulaire. Elles sont constituées de plusieurs sous-unités polypeptidiques (**Figure 15**; Karki and Holzbaur 1999; Pfister *et al.* 2005) :

- Deux chaines lourdes (520Kda) qui portent une activité ATPasique et vont permettre le déplacement. Chaque chaine lourde est composée de trois domaines. Une tige située dans la région C-terminal qui représente le domaine de liaison aux MTs. Une tête qui contient le domaine d'hydrolyse de l'ATP responsable de la génération de l'énergie de translocation. Enfin, une queue située dans la région N-terminale qui se lie à la cargaison et responsable de la dimérisation et des chevauchements entre la chaine légère intermédiaire légère de la dynéine et la chaine intermédiaire lourde de la dynéine (Kikkawa 2013).
- Deux chaines intermédiaires lourdes de 74kDa, elles se lient directement au chaines lourdes et relieraient les moteurs à leur cargaison (Paschal *et al.* 1992; Steffen *et al.* 1997).

- Quatre chaines intermédiaires légères de 33-59kDa qui interagissent directement avec les chaines lourdes, leur contribution n'est pas encore bien comprise mais il semblerait qu'elles soient douées d'une activité ATPase impliquée dans la motilité (Tynan *et al.* 2000).
- Plusieurs chaines légères de 10-14 KDa situées à la base du complexe moteur impliquées dans le recrutement de cargaisons spécifiques (King *et al.* 1998; Chuang *et al.* 2001).

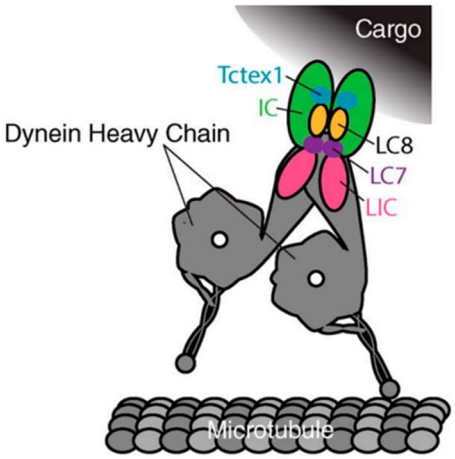


Figure 15 : Structure schématique du complexe de la dynéine cytoplasmique.
Avec en gris les deux chaines lourdes, en vert les deux chaines intermédiaires lourdes (IC), en rose les chaines intermédiaires légères (LIC), en violet, jaune et bleu les chaines légères de la dynéine (LC). D'après Kikkawa 2013.

La dynéine est étroitement régulée par la liaison de co-facteurs supplémentaires comme le complexe multi-sous-unités de la dynactine et LIS1 (*lissencephaly-1 homolog*), ainsi qu'à des adaptateurs activateurs spécifiques de la cargaison appartenant aux familles de protéines BICD (*Bicaudal D cargo adaptator*), HOOK et HAP/ TRAK (Olenick *et al.* 2018; Markus *et al.* 2020). Le complexe tripartite stable dynéine-dynactine-activateur d'adaptateur entraîne la motilité processive vers l'extrémité négative du MT à une vitesses de 1 mm/sec (Olenick and Holzbaur 2019).

Les cellules eucaryotes expriment beaucoup de dynéines, cependant seul un petit nombre d'entre elles participent au transport. Seule la dynéine cytoplasmique à chaine lourde 1 (Dync1h1) prend part au transport rétrograde à la fois dans l'axone et dans les dendrites. La dynéine cytoplasmique a la particularité de se déplacer vers les extrémités négatives des MTs et permet dans les portions distales des prolongements le trafic rétrograde des cargos, tandis

que dans la portion proximale des dendrites elle assure le transport dans les deux directions. Dyn1h1 permet le transport vésiculaire entre autre au niveau dendritique des récepteurs de la glycine (Fuhrmann *et al.* 2002; Maas *et al.* 2006) et des endosomes Rab5 et Rab 7 (Johansson *et al.* 2007; Satoh *et al.* 2008). La dynéine cytoplasmique en prenant part au transport endosomal régule la dégradation protéique. En effet, deux protéines RILP et ORP1L ont été identifiées dans des complexes avec la dynéine, elles sont capables d'interagir avec la forme Rab7-GTP qui contrôle la localisation des lysosomes (Johansson *et al.* 2007).

Les dynéines axonèmales sont quant à elles fixées à l'un des MT des doublets présents en périphérie d'un axonème (structure axiale composant les cils et les flagelles, constitué de 9 doublets de MTs). Par une activité ATPasique, elles font glisser les MTs entre eux, provoquant leur courbure. Tous les MTs glissant simultanément, les cils et les flagelles sont ainsi mis en mouvement. Etant donné que ces dynéines ne sont pas impliquées dans le trafic des organites intracellulaire, nous nous attarderons pas davantage sur leur description.

1.2 – Le complexe dynactine

La dynactine n'est pas un moteur moléculaire en soi, elle se retrouve associée à la dynéine et va réguler son activité. Le complexe de la dynactine comporte deux domaines majeurs, une tige qui permet la liaison de la protéine à différentes structures et un bras saillant qui contient deux terminaisons globulaires avec des sites de liaison aux MTs (Schroer 2004).

Le domaine de la tige ressemble à un court filament d'actine. Il est composé de huit monomères de la protéine 1 liée à l'actine (Arp1), qui a une extrémité associée à la protéine de coiffe CapZ (Schafer *et al.* 1994) et l'autre associée à la protéine 11 liée à l'actine (Arp11) (Eckley *et al.* 1999) ainsi qu'à la sous-unité de la dynactine p62 (Schafer *et al.* 1994). La sous-unité p62 s'associe à son tour aux sous-unité p25 et p27 de la dynactine pour former un complexe à l'extrémité de la tige Arp1 (Eckley *et al.* 1999). Arp1 a la capacité de se lier directement aux spectrines (Holleran *et al.* 1996), ce qui permet à la dynactine d'interagir avec différentes structures cellulaires.

Le bras quant à lui se compose de quatre exemplaires de dynamitine, de deux exemplaires de p150Glued et de deux p24/22. Les deux p150Glued forment un dimère donnant une structure à deux têtes globulaires au bout du bras, qui possède un domaine CAP-Gly (*cytoskeleton associated protein-glycine rich*). C'est ce dernier domaine qui va se lier aux

MTs afin d'augmenter la processivité (Waterman-Storer *et al.* 1995; Vaughan *et al.* 2002). La protéine p150Glued interagit avec la dynéine via la chaine intermédiaire de la dynéine et peut également lier la kinésine-2 et la kinésine-5 (Vaughan and Vallee 1995; Karki and Holzbaur 1999; King *et al.* 2003). Les fonctions de la dynactine seraient alors d'agir en tant que coordinateur du transport bidirectionnel en régulant à la fois les activités motrices antérogrades et rétrogrades et de relier les cargaisons aux MTs **(Figure 16)**.

Le complexe dynéine-dynactine va participer à un large champ de fonctions cellulaires comme la séparation des chromosomes, la migration nucléaire, le positionnement de certains organites comme l'appareil de Golgi ainsi que le transport rétrograde. Il n'est donc pas surprenant que l'inhibition de l'un d'entre eux soit mortelle pour l'embryon (Gepner *et al.* 1996; Harada *et al.* 1998). On s'aperçoit de l'importance de ce complexe dans le transport axonal de par son implication dans les maladies neurodégénératives.

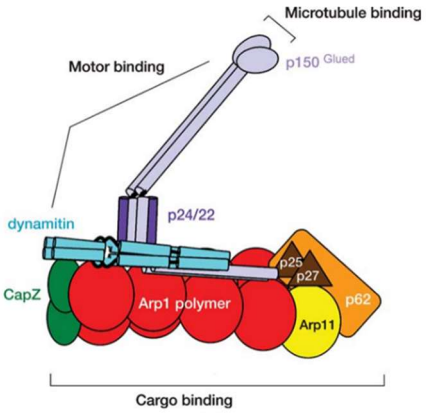


Figure 16 : Schéma illustrant l'emplacement et les caractéristiques structurelles approximatives des sous-unités de la dynactine.
D'après Schroer 2004.

1.3 – Les kinésines

Les kinésines ou KIFs sont membres d'une vaste superfamille de moteurs moléculaires, comprenant en tout 15 familles différentes allant de la kinésine 1 à la kinésine 14B. Morphologiquement, ces KIFs peuvent être classés selon la position du domaine moteur dans la molécule, en C, M ou N-kinésines. Le transport antérograde est alimenté par les N-kinésines, dans lesquelles le domaine moteur occupe la région N-terminale. Les C-kinésines contiennent leur domaine moteur dans la région C-terminale de la molécule et, à l'inverse de la plupart des kinésines impliquées dans le transport, elles se déplacent de manière rétrograde. Les M-

kinésines quant à elles jouent un rôle dans la dépolymération des MTs et présentent le domaine moteur au centre de la molécule (Hirokawa *et al.* 2010). En plus de leur rôle dans le transport intracellulaire, les kinésines interviennent dans d'autres fonctions cellulaires, notamment dans les différentes étapes de la mitose et de la dépolymérisation des MTs. Nous nous focaliserons par la suite uniquement sur les kinésines impliquées dans le transport.

Les membres de la famille de la kinésine 1 ont été les premiers à être identifiés et sont connus pour être des kinésines conventionnelles. Elles sont composées de (Figure 17) :

- deux chaines lourdes de 120 kDa qui contiennent une tête globulaire suivie d'un domaine du cou, d'un pédoncule (ou tige) et d'une queue (Hirokawa *et al.* 2010). La tête située dans la partie N-terminale de la molécule contient le domaine moteur qui se lie aux MTs et à l'ATP. La tige contient des domaines en spirale, siège de l'interaction entre les deux chaines lourdes, qui vont permettre la dimérisation. La queue située dans la région C-terminale, s'associe à la chaine légère et participe à la régulation de l'activité motrice et à la fixation de la cargaison.

- deux chaines légères de 64 kDa qui contiennent une région d'interaction avec les chaines lourdes ainsi que des motifs tétratricopeptide (TPR) qui participent à la liaison de la cargaison Adio *et al.* 2006; Verhey and Hammond 2009).

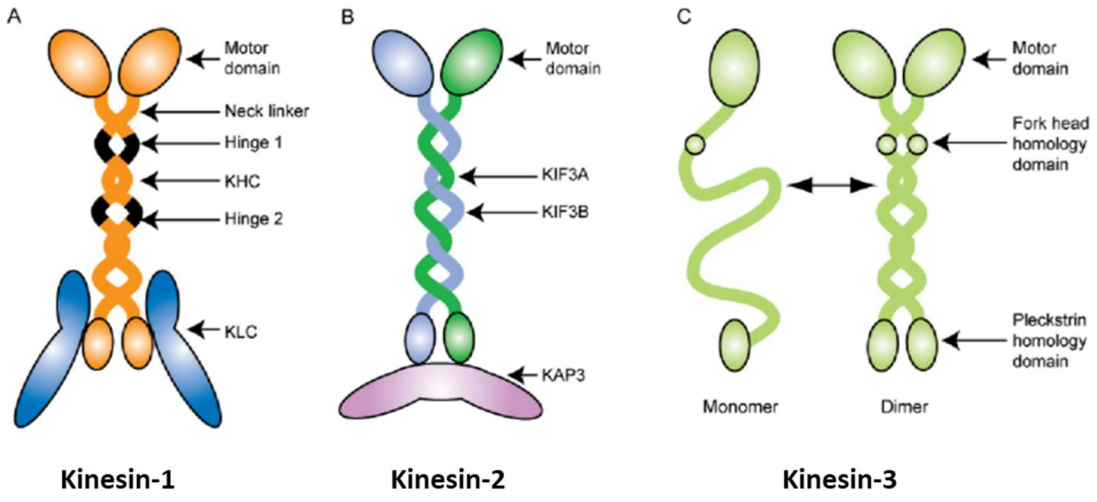


Figure 17 : Structures schématiques des kinésine-1, kinésine-2 et kinésine-3.
D'après Brownhill 2010.

La famille des kinésines 1 est représentée par trois isoformes : KIF5A, KIF5B et KIF5C, toutes les trois retrouvées et exprimées dans les neurones. Leur liaison à d'autres protéines adaptatrices leur permet de transporter des cargaisons distinctes. Par exemple, la protéine précurseur amyloïde (APP) est transportée par KIF5. Le modèle qui a été proposé suggère que l'APP se lie directement à la chaine lourde, fonctionnant comme un adaptateur impliqué dans le transport axonal des récepteurs tyrosine kinase, βsecretase et préséniline-1 (Kamal *et al.* 2001; Lazarov *et al.* 2005). Une autre hypothèse a suggéré que l'APP serait transportée par l'interaction de KIF5 avec la protéine JIP1 (*c-Jun NH2-terminal kinase-interacting protein 1*) qui à son tour interagit avec l'APOER2 (*apolipoprotein E receptor 2*) vésiculaire ou l'APP phosphorylée (Verhey *et al.* 2001; Muresan and Muresan 2005). La syntabuline s'associe avec KIF5 et agit comme un adaptateur pour reconnaître les vésicules de syntaxine (Su *et al.* 2004; Cai *et al.* 2007b). KIF5 est également impliqué dans le transport des mitochondries à travers le complexe de Milton-Miro (Stowers *et al.* 2002; Guo *et al.* 2005), des vésicules BDNF (*Brain-derived neurotrophic factor*) par l'interaction avec la Huntingtine (HTT) et la protéine 1 associée à la Huntingtine (HAP1) (Gauthier *et al.* 2004; Colin *et al.* 2008). Via HAP1, KIF5 peut aussi transporter les récepteurs GABAergiques (Twelvetrees *et al.* 2010). Egalement, KIF5 transporte de manière antéragrade les moteurs rétrogrades par interaction avec le complexe LIS1-NDEL (*Nuclear distribution protein nudE-like 1*) (Yamada *et al.* 2008). Une étude a indiqué que KIF5 est capable de se lier avec la GRIP (*glutamate receptor interacting protein*), protéine qui interagit avec GluA2, et que cette liaison permettrait le transport des R-AMPA (Setou *et al.* 2002). Pour finir, des travaux ont mis en évidence que KIF5 pouvait interagir avec des complexes d'ARNm afin de les amener dans les dendrites au niveau de sites spécialisés dans la synthèse locale de protéines (Ohashi *et al.* 2002; Kanai *et al.* 2004; Ling *et al.* 2004).

La famille de la kinésine 2 est hétérodimérique, composée de deux sous-unités contenant le domaine moteur de la famille KIF3 et d'une protéine accessoire non motrice connue sous le nom de protéine associée à la kinésine (KAP). Similaires aux chaines lourdes de la kinésine 1, les polypeptides KIF3 sont constitués d'un domaine moteur, d'un cou, d'un pédoncule et d'une queue. Il existe des preuves substantielles que KIF3A et KIF3B forment des hétérodimères par liaison de leur domaine situés sur leur tige, la sous-unité KAP quant à elle ne s'y lie qu'après la formation de cet hétérodimère (**Figure 17**; Yamazaki *et al.* 1996; Doodhi *et al.* 2009; Brunnbauer *et al.* 2010). On compte parmi les cargaisons transportées par les

moteurs de la famille kinésine 2 notamment les vésicules associées à la fodrine (Takeda *et al.* 2000), les vésicules contenant la N-cadhérine (Teng *et al.* 2005) ainsi que le canal potassique Kv1 (Gu *et al.* 2006).

On sait aujourd'hui que KIF17, membre de la famille des kinésine 2, interagit avec la protéine mLin-10, membre d'un complexe multimérique qui inclue également mLin-2, mLin-7 et les sous-unités GluN2B des R-NMDA (Setou *et al.* 2000). Il a été montré qu'un mutant de la protéine KIF17 ne pouvant pas interagir avec mLin10, conserve sa motricité mais ne peut plus embarquer de vésicules contenant GluN2B. Cela indique bien que la liaison avec mLin-10 est primordiale pour le transport vésiculaire dépendant de KIF17 (Setou *et al.* 2000). Une autre étude a mis en évidence dans des cultures de neurones hippocampiques que la diminution de l'expression de KIF17 amène une diminution de l'expression de GluN2B. De plus, les sous-unités GluN2A et GluN2C, deux autres sous-unités constituant les R-NMDA, ne faisant pas partie du complexe avec KIF17, se retrouvent respectivement soit trop régulées, soit inaffectées (Guillaud *et al.* 2003). Toujours dans cette même étude, l'utilisation d'un dominant négatif de KIF17 amenuise le nombre de synapses contenant GluN2B, mais n'influence pas la quantité totale de GluN2B dans les synapses. Cela montre bien l'implication très importante et spécifique de KIF17 dans le transport de GluN2B jusqu'à la PSD.

Les membres de **la famille de la kinésine 3** sont des protéines globulaires avec un domaine moteur en N-terminal, dont le comportement est cohérent avec celui d'une molécule monomère (Okada *et al.* 1995). Cependant plus récemment, il a été démontré qu'il peut exister des dimères de ces protéines, et que cette dimérisation est essentielle pour la motilité à haute vitesse (**Figure 17**; Hammond *et al.* 2009). Comme pour les moteurs de la famille des kinésines 1, ce sont les protéines adaptatrices qui assurent le transport des différentes cargaisons. KIF1A et KIF1Bβ sont connues pour transporter de manière antérograde Rab3 qui porte les précurseurs de vésicules synaptiques *via* le DENN/MADD (*differentially expressed in normal and neoplastic cells domain/MAP kinase-activated death domain protein*) ou Liprin-α (Okada *et al.* 1995; Zhao *et al.* 2001; Niwa *et al.* 2008; Wagner *et al.* 2009). KIF1Bβ d'autre part transporte les mitochondries *via* l'interaction avec KBP (*potassium binding protein*) (Wozniak *et al.* 2005). KIF1Balpha peut interagir avec les protéines d'échafaudages PSD95 et SAP90, pouvant indiquer que cette molécule joue vraisemblablement un rôle dans le transport de constituants de la PSD (Mok *et al.* 2002).

1.4 - Les myosines

La famille des myosines regroupe 18 protéines différentes (Foth *et al.* 2006). Ces protéines présentent la particularité d'interagir avec les filaments d'actine. Elles vont comme les autres moteurs moléculaires, utiliser l'hydrolyse de l'ATP pour se déplacer. On retrouve des types de myosines qui diffèrent en fonction du nombre de têtes présentes (entre une ou deux) ainsi que de la longueur des différentes parties des constituants. On note que la myosine de type I que l'on qualifie de non conventionnelle, agit sous la forme d'un monomère, elle va notamment transporter les vésicules d'endocytose ou d'exocytose le long des filaments. La myosine de type II dite conventionnelle, agit quant à elle sous la forme d'un dimère et est connue pour constituer l'appareil contractile de muscle strié squelettique. Elles présentent la propriété de se déplacer vers l'extrémité positive des filaments. Elles se composent de :

- Deux chaines lourdes de 2000 AA qui contiennent une tête globulaire suivie d'un cou puis d'une queue. La tête globulaire en N-terminale contient le domaine moteur qui se lie aux MTs et à l'ATP. Le cou va interagir avec les chaines légères de la myosine. La queue en C-terminal dont l'extrémité est composée d'hélice alpha surenroulées, permet à la myosine d'adopter la forme d'un bâtonnet rigide de 180nm de long. C'est elle qui va venir se fixer à la cargaison à transporter.
- Deux paires de chaines légères, l'une dite essentielle et l'autre régulatrice. Elles s'associent avec les chaines lourdes au niveau du cou pour stabiliser la structure.

Les myosines sont impliquées dans de nombreuses fonctions comme la contraction musculaire, les mouvements ciliaires, la cytogénèse et le trafic intracellulaire. Il a été mis en évidence que les myosines Va et VI interviennent dans le trafic des vésicules au sein des épines dendritiques. On retrouve la myosine Va localisée dans la PSD mais aussi dans des fractions vésiculaires. Des mutations de celle-ci sont retrouvées dans le syndrome de Griscelli, qui se manifeste par de graves symptômes neurologiques tel que le retard mental (Pastural *et al.* 1997). Une étude a montré aussi que des souris déficientes en myosine Va présentaient de sévères altérations neuronales (Mercer *et al.* 1991). D'autre part on observe chez les souris déficiente en myosine VI que les neurones de l'hippocampe présentent une diminution importante du nombre de synapses ainsi qu'une réduction de la taille des épines dendritiques

(Avraham *et al.* 1995). Il est important de noter que la myosine VI a la particularité d'être l'unique membre de sa famille à permettre des déplacements vers les terminaisons négatives des filaments d'actine (Wells *et al.* 1999). Il se pourrait donc qu'elle soit impliquée dans l'internalisation et le transport rétrograde de vésicules au niveau des épines dendritiques. Elle est notamment impliquée dans l'internalisation de TrkB, récepteur du BDNF de manière indirecte par l'intermédiaire de la protéine adaptatrice GIPC1 (*GIPC PDZ domain containing family, member 1*) (Yano *et al.* 2006). Enfin la myosine VI peut transporter les R-AMPA jusqu'à la PSD *via* la protéine SAP97 qui se lie à la sous-unité GluA1 (*via* le PDZ) (Wu *et al.* 2002).

2 - Mécanisme du mouvement des moteurs moléculaires

Les kinésines emmènent leurs cargaisons en évoluant de manière processive et antérograde le long des MTs. Ce mouvement se produit par un mécanisme de croisement des têtes des kinésines : en alternant la position de chaque tête, cela va générer un pas de 8nm. Les kinésines possèdent deux têtes motrices identiques avec des domaines catalytiques dans la région N-terminale, opposée à l'emplacement où les cargaisons vont venir se fixer. Les deux têtes sont associées à de l'ADP (adénosine diphosphate) et se déplacent librement dans la cellule jusqu'à ce que l'une des deux entre en contact avec un MT. A ce moment précis, lorsque la tête se lie étroitement au MT, cela provoque la libération de l'ADP et son échange rapide par de l'ATP. Il s'en suit un changement de conformation qui pousse la tête arrière détachée à avancer vers l'extrémité positive du MT, où elle rencontrera et se liera au MT devant sa partenaire. La tête attachée va hydrolyser l'ATP et se détacher du MT et le mouvement va se répéter de manière cyclique (Rice *et al.* 1999; Asbury 2005; Asenjo *et al.* 2006; Gennerich and Vale 2009).

Les kinésines, lorsqu'elles ne sont pas liées à une cargaison se trouvent dans un état inactif par un mécanisme d'autoinhibition. En effet, en l'absence d'une vésicule à transporter la kinésine adopte une conformation repliée (Hackney *et al.* 1992; Verhey *et al.* 1998; Coy *et al.* 1999; Friedman and Vale 1999; Stock *et al.* 1999). Dans cette conformation, les régions C-terminales des chaines lourdes vont interagir avec les domaines moteurs, bloquant l'activité ATPase et la liaison aux MTs. Les chaines légères vont également participer à cette autoinhibition en séparant physiquement les deux domaines moteurs (Cai *et al.* 2007a). A tout moment l'autoinhibition peut être levée par la liaison d'une cargaison (Coy *et al.* 1999;

Imanishi *et al.* 2006). Deux protéines vont alors venir se fixer sur la kinésine, la protéine FEZ1 (*fasciculation and elongation zeta protein 1*) se lie à la région C-terminale des chaines lourdes et la protéine JIP1 aux chaines légères, permettant ainsi à la kinésine de retrouver sa faculté à lier les MTs et sa motilité processive (Blasius *et al.* 2007).

Contrairement à la kinésine, la dynéine transporte des cargaisons vers l'extrémité (-) des MTs. C'est un moteur processif qui se déplace le long des MTs en faisant fréquemment des pas de 8 nm, bien que l'on puisse observer fréquemment des pas plus longs, des pas latéraux et arrières (Reck-Peterson *et al.* 2006). La dynéine se lie aux MTs *via* le domaine de sa tige. Pendant le transport, la tige reste liée aux MTs et en raison d'un changement conformationnel nucléotide-dépendant, le ligand de la chaine lourde de la dynéine, étroitement lié au MT, se détache et déplace l'autre tête vers l'extrémité négative du MT. Cette tête se reconnecte au MT, permettant au cycle de continuer et faire marcher le complexe de dynéine (**Figure 18**; Roberts *et al.* 2013).

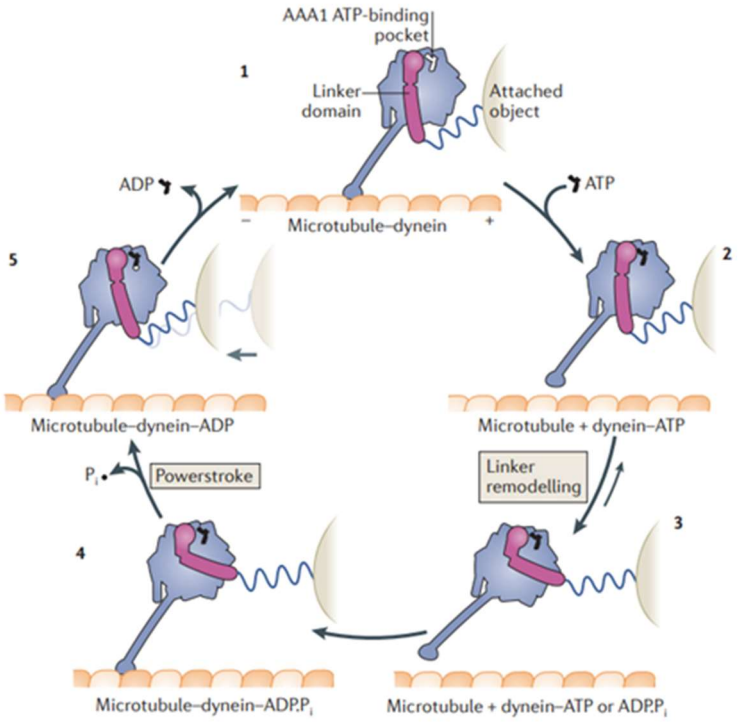


Figure 18 : Modèle du cycle mécanochimique d'un domaine moteur dynéine cytoplasmique.
Les signes + et - indiquent la polarité des microtubules. Le domaine moteur de la dynéine se déplace vers l'extrémité négative du microtubule. La force exercée sur la cargaison attachée est représenté schématiquement par l'étirement d'un ressort. Sans nucléotide lié au site ATPase, le domaine moteur de la dynéine est étroitement lié au microtubule (**1**). La liaison à l'ATP induit la dissociation rapide du microtubule (**2**). Un changement plus lent entraîné par l'ATP (~200s) entraîne le remodelage du domaine de liaison (**3**). Le remodelage du lieur étend la plage de recherche du domaine de liaison aux MTs le long du MT. Après hydrolyse de l'ATP en ADP et phosphate inorganique (Pi), on pense que le domaine moteur engage un nouveau site de liaison sur le microtubule,

initialement *via* une interaction faible (**4**). Une forte liaison au microtubule accélère la libération de Pi, induisant le lieur à revenir à sa forme droite (**5**). Enfin, l'ADP est libéré et le cycle redémarre. D'après Roberts *et al.* 2013.

Généralement une cargaison (vésicule, organite) est transportée à travers la cellule par l'action combinée de différents moteurs, qui détermineront la direction de son mouvement. De plus, il est assez rare que le transport d'un organite soit un mouvement continu et rectiligne, on observe que l'organite fait des pauses, puis repart dans une direction qui peut être identique ou opposée à la précédente. La manière dont les moteurs partagent leur charge, ainsi que l'organisation qu'ils adoptent pour les commutations vers les extrémités positives ou négatives des MTs pour diriger un transport, restent aujourd'hui mal comprises. Des expériences *in vitro* montrent que les kinésines sont des molécules incapables de coordonner leur mouvement collectivement (Jamison *et al.* 2010), contrairement aux dynéines qui seraient plus efficaces dans la coopération avec leurs partenaires (Soppina *et al.* 2009). Des travaux plus récents ont montrés que les dynéines sont capables de coopérer dans le partage de charges. Cette coopération est efficace car la dynéine qui mène un transport avec un groupe d'autres dynéines, peut réduire son pas, pour permettre aux dynéines qui sont derrières de la rattraper par des pas plus grands. De cette façon elles partagent la charge pour devenir plus efficaces. A l'inverse plusieurs kinésines qui transportent une cargaison ne peuvent pas changer l'amplitude de leur pas, donc les molécules à la traine ne peuvent pas rattraper le leader et la charge ne peut pas être répartie entre les membres du groupe. Le résultat est que la kinésine principale supporte la plus grande partie de la charge et se détache plus facilement des MTs (Rai *et al.* 2013). Cependant, ceci est en contradiction avec d'autres études où la vitesse des vésicules APP semble dépendre de la quantité de kinésine (Encalada *et al.* 2011; Reis *et al.* 2012).

Le devenir d'un transport se complique lorsque l'on sait que des moteurs aux polarités opposées peuvent s'attacher à la même cargaison (Hendricks *et al.* 2010). Dans ce cas, comment la direction est déterminée, et comment une cargaison peut-elle changer le sens du mouvement ? L'hypothèse qui a été proposée est que les groupes de moteurs vont chacun tirer dans des directions opposées, et comme lors d'un bras de fer, l'équipe la plus forte déterminera la direction du mouvement. Il a été décrit à partir d'expériences réalisées sur des vésicules purifiées de cerveaux de souris que sur une seule vésicule on retrouve en moyenne 2.8 ± 1.6 dynéines et 1.7 ± 1.0 kinésines. De plus, il semble que les moteurs de polarités

contraires peuvent simultanément interagir fonctionnellement avec un organite. Des études in vitro de motilité réalisées sur ces vésicules montrent qu'elles parcourent de faibles distances et changent fréquemment de direction (Hendricks *et al.* 2010). Une étude a mis au point un système permettant de contrôler le type de moteur, leur nombre, leur espacement ainsi que leur orientation *in vitro*. Grâce à ce système il a été décrit que la modification du rapport dynéine/kinésine influence la direction d'une cargaison. Lorsqu'une cargaison immobile et liée aux deux types de moteurs est libérée de l'un de ces deux types, elle commence à se déplacer suivant la polarité du type restant. Cette expérience soutient le modèle de bras de fer (Derr *et al.* 2012).

3 - Le transport des vésicules à cœur dense

Les vésicules à cœur dense (*dense core vesicles*, DCV) sont décrites comme étant les organites qui transportent les neuropeptides (ex: neuropeptide Y), les facteurs de croissances (ex: BDNF) et ce qui va nous intéresser particulièrement l'activateur tissulaire du plasminogène (tPA) (Lochner *et al.* 1998; Kwinter *et al.* 2009; Schlager *et al.* 2010).

- Trafic axonal des DCV :

De nombreuses DCVs contiennent des composants des zones actives, lieux synaptiques stratégiques où s'effectue l'exocytose dans le neurone présynaptique. En effet, quand elles sont transportées dans l'axone et qu'elles atteignent les extrémités présynaptiques, leurs cargaisons sont utilisées pour entretenir la zone active. Il a été montré récemment que les DCVs contiennent la synaptotagmine-4 (Syt4), une protéine présynaptique, et qu'elles sont transportées par la kinésine-3 KIF1A (Bharat *et al.* 2017). L'interaction Syt4-KIF1A est régulée par phosphorylation grâce à la kinase JNK (*c-Jun N-terminal kinases*). Lorsque les DCVs arrivent aux abords des extrémités présynaptiques actives, JNK phosphoryle la Syt-4 pour déstabiliser la liaison Syt-4/KIF1A, conduisant à la capture des DCVs par l'actine (**Figure 19**; Bharat *et al.* 2017). Cette étude montre à quel point les modifications locales de l'interaction cargaison/moteur sont subtiles et peuvent avoir des conséquences importantes sur le transport à longue distance. Les DCVs axonales peuvent aussi être transportées vers l'extrémité présynaptique par la kinésine-3 KIF1C (Siddiqui *et al.* 2019). De nouvelles données révèlent que l'autoinhibition du dimère KIF1C peut être levée par la protéine tyrosine

phosphatase N21 (PTPN21) et également par la liaison de l'adaptateur vésiculaire Hook3. Cette activation motrice stimule le transport des cargaisons de la KIF1C dont font partie les DCVs (Siddiqui *et al.* 2019). Comme Hook3 active à la fois le complexe dynéine-dynactine (Olenick *et al.* 2016) et KIF1C (Siddiqui *et al.* 2019), cela indiquerait l'intégration du transport bidirectionnel des DCVs. Cela-dit, le mécanisme qui permet le déchargement des KIF1C au niveau des extrémités présynaptiques reste encore à déterminer. Il est possible que KIF1C partage un mécanisme similaire à celui de la KIF1A (famille de la kinésine-3) conduisant à un détachement préférentiel des cargaisons au niveau des zones présynaptiques riches en GTP-tubuline (Guedes-Dias *et al.* 2019).

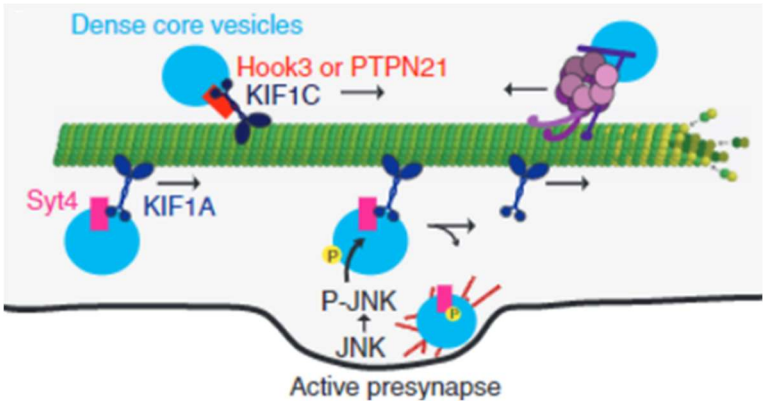


Figure 19 : La régulation locale de la dynamique cytosquelettique et motrice dicte la livraison précise des composants présynaptiques.
Les DCVs (bleu) peuvent être transportées par voie axonale par KIF1C, une fois que l'autoinhibition de ce moteur a été levée par Hook3 ou PTPN21106, ou par KIF1A lié à la synaptotagmine-4 (Syt4). Au niveau des extrémités présynaptiques actives, JNK phosphoryle Syt4, ce qui déstabilise la liaison KIF1A-Syt4 pour favoriser la capture des DCV libérés par l'actine105. Les DCV subissent également une circulation axonale longue distance via un moteur kinésine (antérograde) et dynéine (rétrograde). D'après Aiken and Holzbaur 2021.

En plus du trafic antérograde mené par les kinésines, la transport rétrograde des DCVs par la dynéine peut également aider à former des synapses dites "en passant" (synapses situées le long de l'axone, visibles généralement par de petites varicosités ou turgescences axonales). Dans les motoneurones de drosophile, 90% des DCVs se déplacent de manière antérograde, elles contournent les synapses pour atteindre la pointe de l'axone, puis changent de direction et reviennent le long de l'axone portées par la dynéine (Wong *et al.* 2012). Parmi ces DCVs rétrogrades, 10% sont capturées lorsqu'elles passent devant un bouton, un taux similaire est observé pour la population se déplaçant de manière antérograde. Chose intéressante, les DCVs non capturées ne s'arrêtent pas une fois le soma atteint, mais changent

à nouveau de direction et recommencent leur marche antérograde et redescendent jusqu'à la pointe de l'axone. Cela suggère un mode "conveyor belt " (tapis roulant) du réapprovisionnement synaptique, avec des DCVs circulant d'avant en arrière le long de l'axone avec une capture sporadique au niveau des synapses « en passant » (Wong *et al.* 2012; Moughamian and Holzbaur 2012). Cependant, ce mécanisme de circulation axonale des DCVs à longue distance n'a pas été encore déterminé chez les mammifères.

- Trafic dendritiques des DCVs :

Alors que de nombreuses DCVs font l'objet d'un trafic axonal vers l'extrémité présynaptique, certaines contenant des neuropeptides tels que le BDNF sont transportées le long de la dendrite vers les régions postsynaptiques. Le Ca^{2+} lié à la calmoduline (CaM) lie directement le domaine de la tige de la KIF1A pour favoriser le chargement des DCVs et améliorer la motilité de KIF1A (Stucchi *et al.* 2018). Une fois que ces DCVs pilotées par KIF1A atteignent les épines dendritiques, les protéines statiques liprine-α et TANC2 (*Tetratricopeptide Repeat, Ankyrin Repeat And Coiled-Coil Containing 2*) de la densité postsynaptique les capturent (**Figure 20**; Stucchi *et al.* 2018).

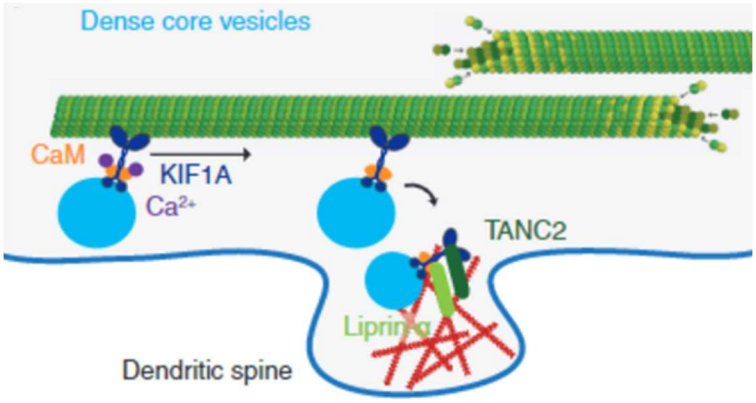


Figure 20 : Régulation cytosquelettique des composants postsynaptiques.
Pour le trafic dendritique des DCVs (bleu), le calcium stimule le chargement des DCVs sur les moteurs KIF1A en favorisant la liaison KIF1A-calmoduline (CaM). Au niveau des épines dendritiques, les protéines de densité postsynaptique TANC2 et liprine-α interagissent directement avec KIF1A pour capturer les DCVs.

Fait intéressant, ce mécanisme Ca^{2+}-CaM dirige le chargement des cargaisons de KIF1A destinées aux synapses. Ce qui est différent des mécanismes de déchargements Ca^{2+}-dépendants précédemment observés tels que la perturbation des cargaisons KIF17 par la protéine kinase II Ca2+-calmoduline-dépendante (CaMKII) ou le blocage des mitochondries par la Ca2+-mitochondrial Rho GTPase (MIRO). On ne sait pas encore si KiF1A est libéré par la

capture des DCVs par la liprine-α et TANC2, mais comme les concentrations de Ca2+ sont généralement plus élevées au niveau des épines postsynaptiques, l'interaction KIF1A-DCV médiée par l'association Ca2+-CaM peut être maintenue.

B – L'exocytose, étape clé du cycle vésiculaire.

Le cycle vésiculaire correspond aux différentes étapes de la vie d'une vésicule dans la cellule. Il englobe à la fois la formation et le remplissage des vésicules mais aussi leur libération, leur recapture ainsi que leur dégradation ou recyclage. Nous allons nous intéresser particulièrement à l'étape de l'exocytose des vésicules.

1 – Généralités

L'exocytose est un mécanisme moléculaire mis en place par les cellules afin d'assurer la fusion d'une vésicule de sécrétion avec la membrane plasmique. Il en résulte la libération du contenu de la vésicule dans le milieu extracellulaire. Ce mécanisme met en jeu un certain nombre de protéines, notamment les SNAREs et leurs protéines accessoires. Les lipides de la membrane plasmique eux-mêmes vont jouer un rôle important dans l'exocytose. Ils vont permettre de recruter, interagir et activer certaines protéines mais vont aussi être capable d'induire grâce à leurs propriétés des déformations de la membrane (Ammar *et al.* 2013). L'exocytose est impliquée dans de nombreuses fonctions cellulaires comme la signalisation et sa régulation (ex: libération de neurotransmetteurs et hormones) mais aussi dans la production de macromolécules qui vont jouer un rôle une fois sécrétées à l'extérieur de la cellule (ex: composants de la MEC, récepteurs membranaires...) et également dans l'élimination des déchets (Wu *et al.* 2014).

Dans les neurones, l'exocytose va jouer un rôle très important au niveau des synapses. Les synapses sont le siège de la communication entre les cellules nerveuses, c'est à cet endroit que les signaux électriques du neurone présynaptique vont être convertis en signaux chimiques transmis au neurone postsynaptiques et aux cellules gliales environnantes. Les signaux chimiques se traduisent par la libération très rapide de neurotransmetteurs dans la fente synaptique à la suite d'une modification de la concentration en Ca^{2+}. Après ces étapes d'exocytose, un processus de recyclage des différents composants (récepteurs et

neurotransmetteurs notamment) a lieu pour permettre la survenue d'un nouveau signal (Heuser and Reese 1973).

L'exocytose est un mécanisme cellulaire très général qui peut survenir dans les différents compartiments cellulaires. La fusion des membranes (membrane vésiculaire et membrane plasmique) est loin d'être un phénomène spontané, car il est nécessaire de vaincre une barrière énergétique importante. L'association de trois protéines SNAREs situées à la surface des membranes plasmique et vésiculaire, va aboutir à la formation d'une super hélice qui va permettre le rapprochement physique des deux membranes nécessaire à la fusion. L'exocytose synaptique a deux particularités : elle est dépendante du Ca^{2+} et elle est très rapide, car seulement quelques centaines de microsecondes séparent l'entrée présynaptique de Ca^{2+} et l'activation des récepteurs postsynaptiques. Ces deux propriétés sont régulées par des protéines spécifiques du SNC que sont la synaptotagmine et la complexine.

2 - Les protéines SNAREs

La fusion des membranes nécessite une spécificité et une énergie qui vont être apportées par l'interaction de protéines SNARE complémentaires, l'une présente sur le compartiment donneur et l'autre sur le compartiment receveur. On distingue deux grandes familles de SNARE : Les SNARE cibles (*target-SNARE*, t-SNARE) et les SNARE vésiculaire (*vesicular SNARE* ou v-SNARE). Les t-SNARE sont localisées au niveau de la membrane plasmique et vont agir par complémentarité avec les v-SNARE situées sur les membranes vésiculaires. Il en résulte la formation de complexes qui vont favoriser et amener la fusion des membranes (**Figure 21**).

Les principales t-SNARE appartiennent à la famille des syntaxines et des SNAP (*Synaptosomal-associated protein*) et les principales v-SNARE connues appartiennent à la famille des VAMP (*Vesicle-associated membrane protein* ou synaptobrévine). Bien que les protéines SNARE soient classées de par leur fonction (v ou t-SNARE), elles peuvent aussi être classées de par leur composition chimique. On distingue alors deux types de SNARE : les SNARE R riches en arginine et les SNARE Q riches en glutamine, ces dernières elles-mêmes subdivisées en Qa,Qb et Qc en fonction de la composition en AA de la séquence du domaine SNARE. La plupart du temps les R-SNARE se comportent comme les v-SNARE et les Q-SNARE comme t-

SNARE. Les protéines SNARE présentent toutes un ou deux motifs SNARE, l'association de quatre motifs permet au complexe d'obtenir une conformation qui favorise le rapprochement des deux membranes et qui déclenche la fusion membranaire (**Figure 20**; Hanson *et al.* 1997; Chen and Scheller 2001).

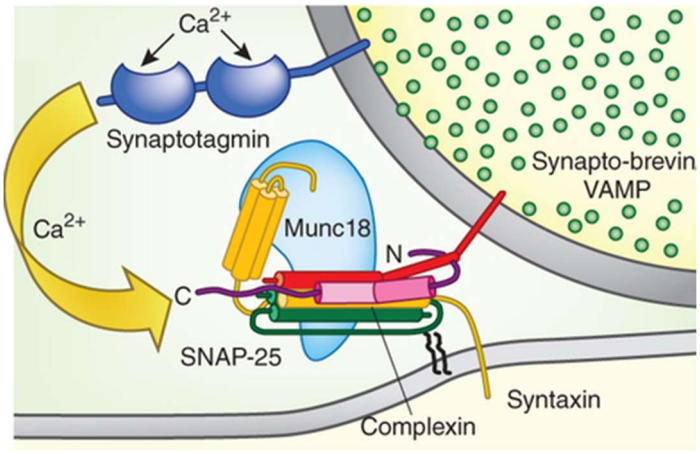


Figure 21 : Schéma de la machinerie moléculaire responsable de la fusion de vésicules déclenchée par le Ca2+. Suite à une dépolarisation, le calcium entre dans la cellule et se lie à la synaptotagmine-1 ce qui provoque un rapprochement des vésicules avec la membrane plasmique. Les vésicules sont ainsi recrutées à la membrane grâce à l'interaction entre les protéines RIM, Munc13, Rab3/Rab27 et les canaux calciques. Ce recrutement permet aux protéines v-SNARE (synaptobrévine/VAMP) présentes à la surface des vésicules d'interagir avec les protéines t-SNARE (Syntaxine et SNAP-25) localisées sur la surface de la membrane plasmique mais également avec la protéine SM (Munc18). La formation de ce complexe appelé *trans*-SNARE va permettre la fusion des vésicules synaptiques avec la membrane (Südhof 2013).

<u>Les principales SNARE impliquées dans l'exocytose vésiculaire :</u>

- **La synaptobrévine 2** (syb2 ou VAMP2) est la protéine la plus abondante des vésicules synaptiques, on dénombre environ 70 copies par vésicules (Takamori *et al.* 2006). Cette v-SNARE se compose de 118 AA, elle possède une extrémité N-terminale intra-luminale et une extrémité C-terminale transmembranaire ainsi qu'un motif SNARE. C'est une protéine très abondante dans les neurones ainsi que dans les cellules neuroendocrines, en revanche on ne la retrouve qu'en infime quantité dans les tissus non nerveux. Les souris déficientes en VAMP2 ($VAMP2^{-/-}$) meurent à la naissance à cause d'une libération vésiculaire quasiment absente (Schoch *et al.* 2001). Il s'avère que les neurones $VAMP2^{-/-}$ gardent néanmoins un niveau faible de libération spontanée. Cependant des études montrent qu'aucune autre SNARE, même ressemblant beaucoup à la VAMP2 comme la synaptobrévine 1 ou encore VAMP3 à des

concentrations physiologiques ne peut compenser l'absence de VAMP2 chez les souris VAMP2$^{-/-}$ (Trimble *et al.* 1990; McMahon *et al.* 1993). Des travaux plus récent ont mis en évidence que la libération vésiculaire dans les neurones hippocampiques en culture issus de souris VAMP2$^{-/-}$, peut être restaurée par une surexpression de VAMP2 ou VAMP3 (Deák *et al.* 2006).

- **La syntaxine 1** (stx1) est une t-SNARE constituée de 288 AA et d'un motif Qa-SNARE. Comme la VAMP2, elle est très abondante dans les neurones ainsi que dans les cellules neuroendocrines et absente des cellules non neuronales. Elle possède deux isoformes 1A et 1B de 35 kDa présentant 84% d'homologie (Bennett *et al.* 1992). On la retrouve massivement au niveau des sites synaptiques actifs. Les souris déficientes en stx1A survivent à la naissance et ne présentent aucun déficit apparent par rapport aux souris sauvages (Fujiwara *et al.* 2006). Des travaux montrent que les neurones d'hippocampe en culture stx1A$^{-/-}$ ont une transmission synaptique normale, alors que des tranches d'hippocampes stx1A$^{-/-}$ présentent une LTP déficiente. Chose intéressante, les souris stx1B$^{-/-}$ quant à elles meurent dans les jours après la naissance, et le double KO stx1A$^{-/-}$ et stx1B$^{-/-}$ lui est létal au stade embryonnaire (Mishima *et al.* 2014). La syntaxine joue un rôle indispensable pour la survie des neurones et est nécessaire au docking et à la fusion des vésicules. De plus, la stx1A est retrouvée dans les neurones sous deux formes : une forme fermée et une forme ouverte qui peut s'associer au complexe SNARE. La protéine Munc18 a la capacité de se fixer à la sxt1A afin de réguler le passage de son état fermé à ouvert (Dawidowski and Cafiso 2013).

- **La SNAP-25** (*25 kDa synaptsome-associated protein*) est une t-SNARE constituée de 208 AA et de deux motifs SNARES (Qb et Qc). Elle est ancrée à la face cytosolique des membranes par des chaînes latérales palmitoylées liées de manière covalente aux résidus cystéines dans le domaine de liaison central de la molécule. Donc cette SNARE présente la particularité de ne pas avoir de domaine transmembranaire (Chapman 2002). Une mutation SNAP25$^{-/-}$ est létale au stade embryonnaire chez la souris (Washbourne *et al.* 2002). Comme pour la VAMP2, les neurones hippocampiques en culture ainsi que des tranches de cortex SNAP25$^{-/-}$ montre encore un faible niveau de libération spontanée.

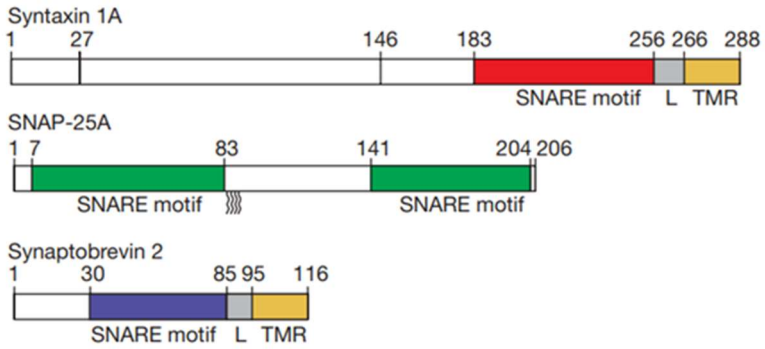


Figure 22 : Schéma représentant les protéines SNAREs impliquées dans l'exocytose vésiculaire.
D'après Stein *et al.* 2009.

3 – Les différentes étapes de l'exocytose

Avant même le phénomène d'exocytose, les vésicules vont se charger en neurotransmetteurs. Le chargement des vésicules se fait grâce à un transporteur membranaire utilisant un gradient de concentration de protons entre le cytoplasme et la vésicule. Ce gradient provient du transporteur de protéines qui agit par l'hydrolyse de l'ATP. Les vésicules vont subir une succession d'étapes de maturation qui vont leur apporter les propriétés indispensables à la fusion. Une fois matures c'est le Ca^{2+} qui va déclencher l'exocytose et la libération des neurotransmetteurs dans la fente synaptique, mécanisme primordiale pour la communication entre les neurones (Pang and Südhof 2010). Il est important de savoir que le Ca^{2+} n'est pas le seul à pouvoir réguler l'exocytose, il y a aussi l'AMPc (adénosine monophosphate cyclique) (Szaszák *et al.* 2008) ou encore l'activation de certaines protéines kinases (Zeniou-Meyer *et al.* 2008; Jewell *et al.* 2011).

On observe deux types d'exocytoses :

- **L'exocytose constitutive** retrouvée dans toutes les cellules qui va permettre de manière continue de renouveler la membrane plasmique ainsi que la MEC. Les protéines à destinées membranaires vont être enchâssées dans la membrane des vésicules et incorporées dans la membrane plasmique au moment de la fusion de la vésicule. Alors que les protéines de sécrétion à destinée extracellulaire sont dans la lumière de la vésicule. La grande majorité des vésicules de sécrétion constitutives sont reconnaissables par leur revêtement riche en protéines ARF (*ADP ribosylation factors*) et FAPP (*four-phosphate AdaPtor Protein*). Lorsque les vésicules sont dirigées vers les rafts lipidiques, elles présentent un manteau riche en cavéolines.

Il est important de noter que cette exocytose nécessite quand même une augmentation du Ca^{2+} intracellulaire.

- **L'exocytose régulée** va être déclenchée par un signal extracellulaire spécifique le plus souvent calcique. Cette augmentation en Ca^{2+} va désorganiser le cortex sous membranaire composé de filaments d'actine, notamment par l'intervention de la gelsoline. Cette action permet de faciliter l'accès des vésicules à la membrane plasmique pour leur arrimage, puis leur amorçage pour enfin fusionner et libérer leur contenu. Cette exocytose régulée se fait par l'intermédiaire de vésicules recouvertes de clathrine.

Les différentes étapes qui composent le phénomènes d'exocytose sont les suivantes (**Figure 23** ; Südhof 2013) :

- **L'arrimage** : après la survenue d'une stimulation, le Ca^{2+} intracellulaire va se fixer sur la synaptotagmine située à la surface des vésicules et permet à la vésicule de pouvoir se positionner à proximité des canaux calciques pour interagir avec eux via les protéines d'accrochage RIM, Munc13 et Rab3/Rab27. Par cette interaction la vésicule se rapproche de la membrane plasmique et permet aux v-SNARE (VAMP2) de former des complexes avec les t-SNARE (syt1 et SNAP-25). Pour toute fusion, peu importe le compartiment membranaire, il faut la présence de 4 motifs SNAREs venant de 3 ou 4 protéines SNARE. Chacune des membranes à fusionner doit avoir au moins une protéine SNARE pour servir d'ancrage membranaire. Lorsque le complexe SNARE se met en place, composé des trois protéines VAMP2, Syt1A et SNAP25, les motifs SNAREs adoptent une structure de quatre hélice α (une hélice VAMP, une hélice syntaxine et deux hélices SNAP-25). Ce changement de conformation va leur permettre de s'aligner parallèlement pour former une super hélice twistée (Jahn *et al.* 2003). Elles forment alors un complexe dit *trans*-SNARE grâce au motif SNARE qui vont être progressivement assemblés depuis leur extrémité N-terminale vers leur extrémité C-terminale afin de clamper ensemble les deux membranes.

- **L'amorçage** : La syt1A va alors changer de conformation provoquant la liaison de Mun18. Le complexe *trans*-SNARE étant parfaitement assemblé, l'enroulement des hélices permet un rapprochement des deux compartiments et déclenche la fusion des membranes.

- **La fusion** : L'énergie libérée au moment où la super hélice est formée permet sans doute de franchir la barrière de fusion. Ensuite, durant la fusion, le complexe change de conformation pour adopter une conformation *cis*-SNARE, très stable. Une fois la fusion terminée, les protéines SNAREs sont toutes retrouvées dans la membrane plasmique avec une conformation cis, et nécessite l'action de l'ATPase NSF (*Nethylmaleimide-Sensitive Factor*) pour se désassembler (Söllner *et al.* 1993). Cette protéine appartient à la famille des AAA-protéines (*ATPases Associated with others Activities*) qui requière la présence d'un cofacteur SNAP (*Soluble NSF Attachement Protein*). La SNAP va en premier lieu se fixer au complexe cis-SNARE pour recruter dans un second temps le NSF qui va utiliser son activité ATPase. Le désassemblage va s'effectuer grâce à l'hydrolyse de l'ATP provoquant un changement conformationnel du complexe qui va libérer les différentes protéines qui par la suite vont pouvoir être réemployées. C'est la protéine NSF qui va alors charger les SNAREs monomérique en énergie, qui sera par la suite utilisée lors d'une nouvelle fusion par formation du complexe SNARE.

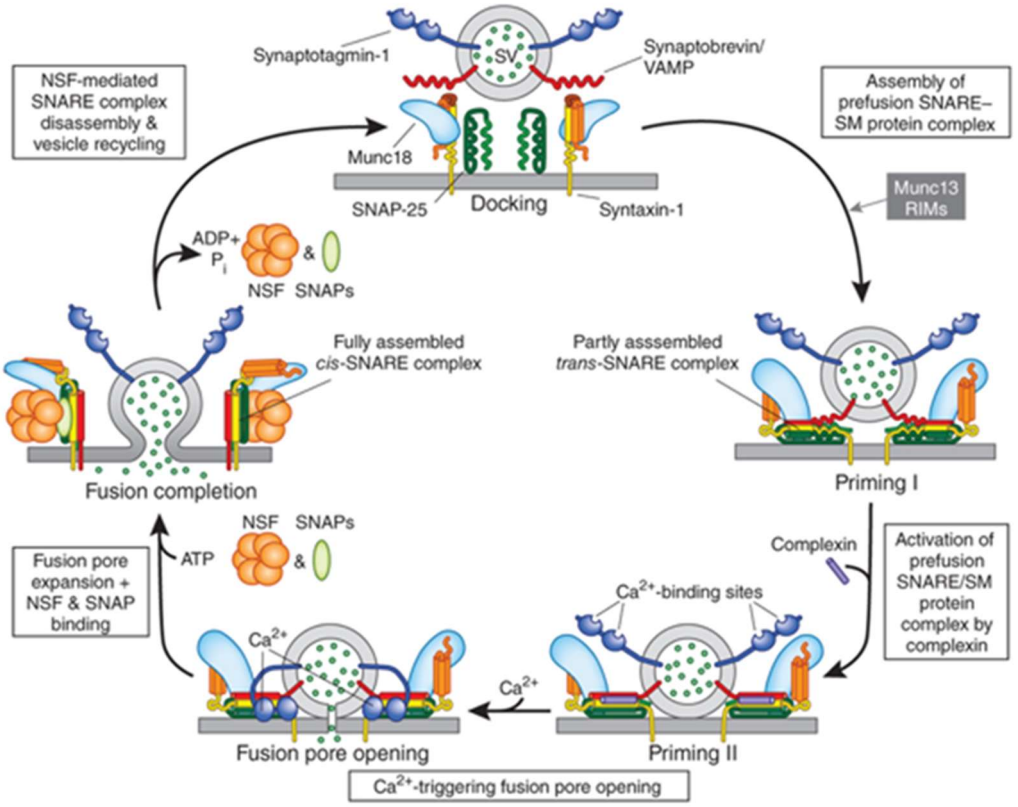


Figure 23 : Mécanisme d'action des SNARE dans l'exocytose.
Schéma représentant les protéines impliquées dans l'exocytose. Les protéines v-SNARE (VAMP, en rouge) présentes au niveau des vésicules vont interagir avec les protéines t-SNARE (Syntaxine en orange) présentes à la surface de la membrane plasmique. A) assemblage partiel : les v-SNARE et les t-SNARE vont se complexer pour former un complexe *trans*-SNARE, celui-ci va interagir avec une protéine SM (Munc18, en bleu) et les protéines SNAP-25. B) Les hélices du complexe SNARE vont s'enrouler permettant un rapprochement de la vésicule avec la membrane mais cela va également permettre une ouverture du pore de fusion. C) Durant la phase de fusion, le complexe *trans*-SNARE se relâche et passe dans une configuration cis-SNARE, ce dernier va ensuite se désassembler grâce à la protéine NSF conduisant ainsi au recyclage de la vésicule. Le pore de fusion va continuer de s'agrandir, libérant alors le contenu de la vésicule dans le milieu extracellulaire d'après Südhof 2013.

Pour résumer, cette deuxième partie nous a permis de revenir sur les bases fondamentales du trafic vésiculaire, indispensable à la survie et à la communication cellulaire.

Dans les neurones, les neurotransmetteurs et les protéines sont transportées encapsulées dans des vésicules qui sont prises en charge par des moteurs moléculaires (Kinésines et dynéines) se déplaçant le long du cytosquelette. Ces vésicules sont captées en fonction de certains signaux au niveau de sites actifs (bouton présynaptique, épine dendritique) pour y être relâché dans le milieu extracellulaire par un mécanisme d'exocytose (*via* les SNARE comme les VAMP).

Le trafic vésiculaire va permettre une distribution sélective des molécules internalisées vers les différents compartiments intracellulaires. Grâce à ce système, les cellules peuvent avoir contrôle spatio-temporel sur les effets des multiples protéines qu'elles expriment et recapturent, leur permettant d'accomplir leurs fonctions.

III – L'activateur tissulaire du plasminogène

L'activateur tissulaire du plasminogène (*tissue-type plasminogen activator*, tPA) est une protéine synthétisée par le corps humain découverte au cours du 20e siècle. Cette glycoprotéine appartient à la famille des sérines protéases et est principalement retrouvée dans la circulation sanguine. C'est en effet au niveau vasculaire qu'elle joue son rôle le plus important en clivant aux abords des caillots sanguins le plasminogène en plasmine active. La plasmine va être capable à son tour de casser les chaines de fibrines, constituant principal des caillots. De cette activation va donc dépendre le processus physiologique de fibrinolyse, dernière étape de l'hémostase, permettant la réparation des brèches vasculaires. L'activité protéolytique du tPA lui vaut d'être le seul traitement pharmacologique de la phase aiguë des accidents vasculaires cérébraux (AVC) ischémiques depuis 1995 (NINDS, 1995).

En dehors du compartiment vasculaire, le tPA est aussi retrouvé dans le cerveau. Il est exprimé dans un certain nombre de structures cérébrales (cortex, hippocampe, amygdale…) par plusieurs types cellulaires différents (neurones, cellules gliales, cellules microgliales). Au sein du parenchyme cérébral, le tPA est capable de jouer directement ou indirectement, grâce à ses différents domaines protéiques, avec de multiples partenaires. Ces interactions l'implique dans de nombreuses fonctions, que cela soit au niveau synaptique comme au cours du développement cérébral. Nous pouvons conclure cette brève introduction en affirmant que la présence du tPA en dehors des vaisseaux est rarement sans lien avec un remodelage matriciel et tissulaire, que ce soit en condition physiologique ou pathologique.

A. Historique

Avant de parler du tPA, il est intéressant de revenir sur les premières observations du système fibrinolytique qui seront à l'origine de sa découverte des siècles plus tard. Ce système a depuis longtemps intrigué les plus curieux car c'est à lui qu'on doit en partie la connaissance des différents états du sang.

La provenance des premières observations remonterait jusqu'à la Grèce antique. C'est au siècle de Périclès (Ve siècle avant J.C.), où Hippocrate de Cos serait le premier à observer que le sang des personnes décédées de mort naturelle ne coagulait pas, ou du moins pas

directement. Il est important de préciser que le sang d'une personne qui meurt au combat ou de blessure va coaguler plus rapidement. De sus, il n'était pas rare dans ce siècle, ravagé par les guerres, car cloisonné entre les guerres médiques et par la guerre du Péloponnèse, de voir des gens mourir au combat ou de blessure.

Il faudra par la suite attendre des siècles et des siècles, pour que cette observation oubliée soit redécouverte. C'est au XVIIIe siècle que les travaux du britannique John Hunter, et en particulier ceux de l'italien Jean-Baptiste Morgagni, remettent le domaine de la fibrinolyse au goût du jour (Morgagni, 1761). Nous devons aujourd'hui beaucoup à Morgagni car il est à l'origine de bon nombre de descriptions princeps sur le système vasculaire et les conséquences de ses atteintes au niveau des viscères. Il sera le premier à confirmer que la lésion cérébrale dans l'apoplexie (ancienne dénomination des AVC) est retrouvée au niveau du côté opposé de l'hémiplégie observée. En 1838, Prosper Sylvain Denis observe quant à lui la dissolution spontanée du sang (Denis, 1838). Quelques années plus tard, Gabriel Andral, en 1844, est le premier à avancer l'hypothèse que le sang une fois coagulé est capable de se liquéfier à nouveau. Depuis, considéré comme le fondateur de l'hématologie, Andral a permis d'amorcer tout un pan de recherche sur ce qu'allait devenir le système fibrinolytique (Andral, 1845). En 1889, Denys et De Marbaix sont les premiers à mentionner l'existence d'une enzyme endogène « dormante » responsable de la fibrinolyse (Denys and de Marbaix, 1889). C'est à Albert Dastre, en 1893, que nous devons le terme même de fibrinolyse (Dastre 1893, p.19).

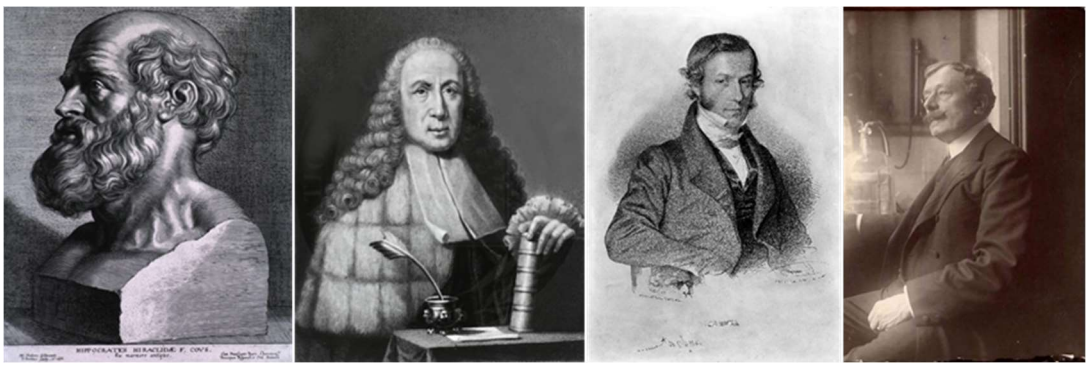


Figure 24 : **Galerie de portraits**.
De gauche à droite : buste d'Hippocrate de Cos (-460 ; -370 avant J.C.), Giovanni Battista Morgagni (1682 ; 1771), Gabriel Andral (1797 ; 1876) et Albert Dastre (1844 ; 1917).

Au début du XXe siècle, Conradi met en évidence que l'addition de l'extrait de certains organes permet de dégrader les caillots sanguins (Conradi, 1902). A peu près au même moment, Hedin identifie, dans la fraction des globulines du sérum, une activité protéolytique (Hedin, 1903). Plus tard, nous retrouverons dans cette même fraction le plasminogène qui s'avère être le précurseur de la plasmine, enzyme responsable de la lyse des caillots (Christensen and Macleod 1945). En 1952, Tage Astrup et Agnete Stage réussissent à isoler la protéine responsable de cette activité protéolytique par l'utilisation d'agents chaotropiques qu'ils nomment « fibrinokinase » (Astrup and Stage 1952). C'est en 1979 que la fibrinokinase est finalement purifiée et caractérisée à la fois dans l'utérus et dans la circulation sanguine. En effet, Binder et collaborateurs la purifie à partir de vaisseaux de cadavres humains (Binder *et al.,* 1979), alors que Rijken et collaborateurs l'isole à partir de cinq kilogrammes d'utérus humain pour récolter à l'arrivée seulement un milligramme de cette fibrinokinase (Rijken *et al.* 1979). Par la suite, c'est grâce à la collaboration de Rijken avec Désiré Collen que la fibrinokinase est purifiée du surnageant de cultures de cellules de mélanomes humains. Ils réussissent à isoler environ 2 grammes de fibrinokinase qui permettront les premières études biochimiques et physiologiques sérieuses sur la protéine. C'est à ce moment-là que cette protéine est rebaptisée « activateur tissulaire du plasminogène » (Rijken and Collen 1981a).

Nous devons la première utilisation du tPA chez l'Homme à Weimar chez deux patients atteints de thromboses veineuses au niveau du rein (Weimar *et al.* 1981). En 1983, une équipe parvient à cloner le gène du tPA ouvrant ainsi la porte à la production de tPA par des bactéries *E. coli* (Pennica *et al.* 1983b). La production à grande échelle du tPA a permis la survenue rapide des premiers essais cliniques, notamment sur des patients atteints d'infarctus du myocarde. Enfin en 1995, un essai met en évidence l'efficacité de l'injection du tPA chez des patients souffrant d'AVC ischémiques (NINDS 1995). Depuis cette étude, aucune molécule n'a montré de bénéfices équivalents ou supérieurs à ceux du tPA, faisant de cette protéine encore à ce jour le seul traitement pharmacologique de la phase aigüe des AVC ischémiques.

B. Biochimie structurale

Le tPA est une glycoprotéine codée par le gène *PLasminogen Activator Tissue type* (pLAT) situé sur le chromosome 8 (Yang-Feng *et al.* 1986). Ce gène s'étend sur 32.7 kb et possède 14

exons qui seront à l'origine des différents motifs structuraux de la protéine (Browne *et al.* 1985; Fisher *et al.* 1985; Degen *et al.* 1986).

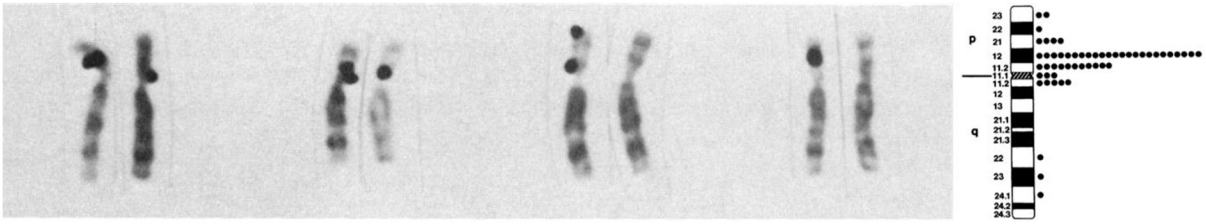


Figure 25 : Autoradiographie en grain d'argent correspondant à l'hybridation de sondes d'ADNc du tPA sur le chromosome 8.
Nous retrouvons les sondes fixées entre les bandes 8p12 et 8q11.2, correspondant à la localisation du tPA (Yang-Feng *et al.* 1986).

Le tPA est synthétisé sous la forme d'un précurseur monochaine constitué de 526 AA d'une masse moléculaire de 69 kDa (Pennica *et al.* 1983). Les premiers résidus de 1 à 22 et de 24 à 32 vont former respectivement le peptide signal et le propeptide. Ces deux régions vont disparaître avant que la molécule ne soit stockée dans des vésicules et libérée dans le milieu extracellulaire. La forme mature du tPA quant à elle va être constituée de 17 ponts disulfures, 4 sites de glycosylations et de 5 domaines répartis en deux chaines. La chaine A (ou chaine lourde) est formée d'un domaine finger composé des résidus 1 à 43, d'un domaine EGF-*like* (homologue au facteur de croissance épidermique (EGF – *Epidermal Growth Factor*) humain et murin) composé des résidus 44 à 91, et de deux domaines kringle (K), K1 composé des résidus 92 à 173 et K2 des résidus 174 à 275. La chaine B (chaine légère) comprend le domaine sérine protéase (SP) avec les 230 derniers résidus. Cette chaine est en charge de l'activité catalytique du tPA et forme la triade catalytique formée de trois résidus reliés par des liaisons hydrogènes : Asp371- His322- Ser478.

Trois des quatre sites de glycosylation sont retrouvés sur la chaine A : un site d'O-glycosylation au niveau de la thréonine^{61} dans le domaine EGF (Harris *et al.* 1991) et deux sites de N-glycosylation, un constitutif dans le domaine K1 sur l'asparagine (Asn)^{117} et un variable dans le domaine K2 sur l'Asn^{184}. Le quatrième site sur la chaine B, est un site de N-glycosylation constitutif dans son domaine catalytique sur l'Asn^{448}. Des trois sites de glycosylation résultent l'existence de deux glycoformes du tPA : le tPA de type I avec les trois N-glycosylations et le tPA de type II avec seulement les deux N-glycosylations constitutives

(Pohl *et al.* 1984). L'Asn184 permet la communication entre les résidus de liaison à la fibrine et le site catalytique du domaine SP (Rathore *et al.* 2012). Sa glycosylation (type I) diminue la capacité du tPA à cliver le plasminogène en plasmine, ainsi que sa liaison à la fibrine (Einarsson *et al.* 1985; Wittwer *et al.* 1989; Wittwer and Howard 1990; Berg *et al.* 1993).

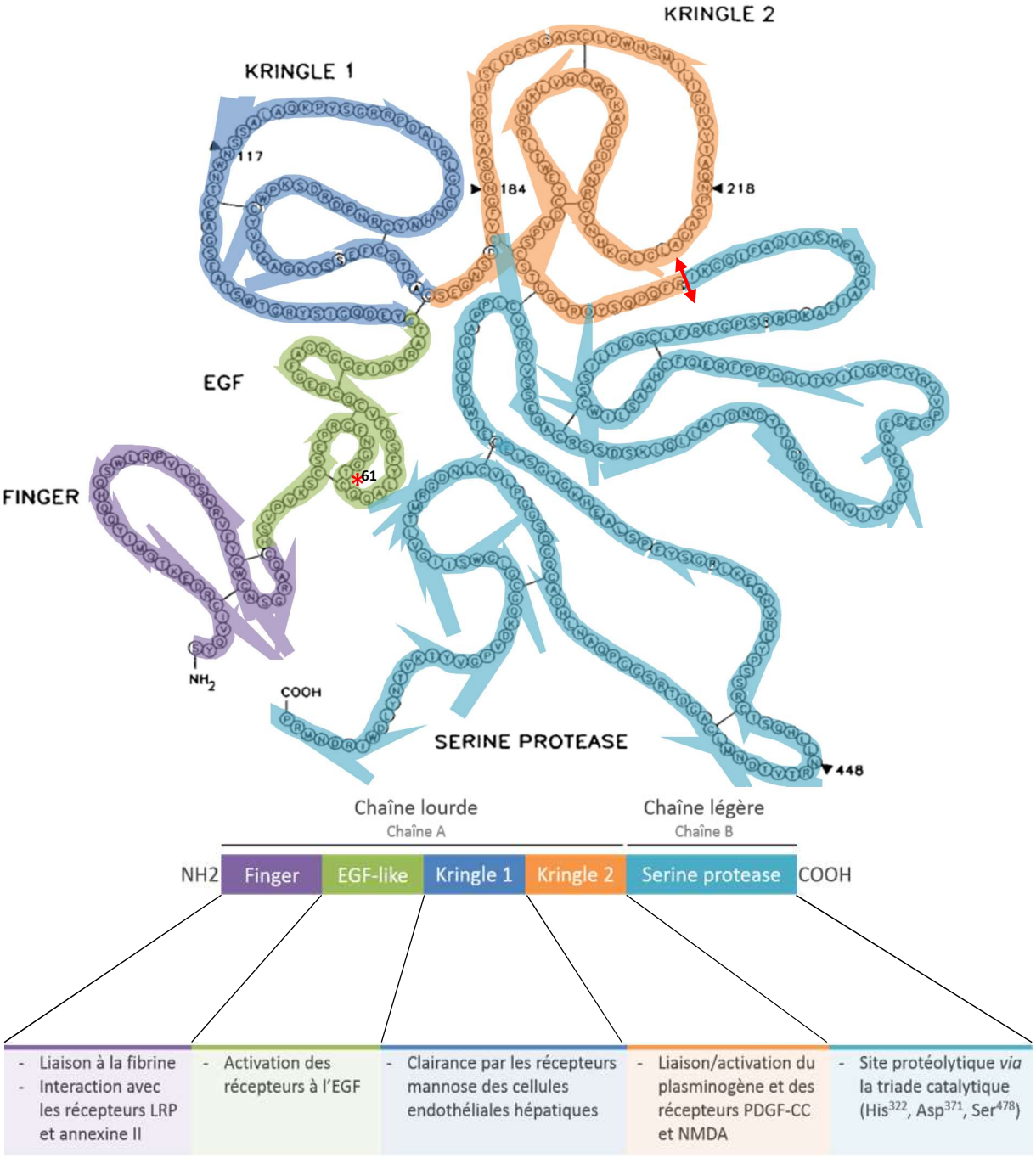


Figure 26 : Structure et fonctions du tPA.
Schéma représentant le tPA sous ses formes simple (sc-tPA) et double chaîne (tc-tPA) montrant ses cinq domaines (finger, EGF, kringle1, kringle2 et sérine protéase), les 17 ponts disulfures, les quatre sites de glycosylations ainsi que le site de clivage (adapté de : Chevilley *et al.* 2015).

Le tPA est composé, comme dit précédemment, par 5 domaines repartis en deux chaines, dont la structure tertiaire va être étroitement associée aux fonctions de ces chaînes. Tout d'abord, sur la chaine A (chaine lourde) située du côté de l'extrémité amino-terminale, nous retrouvons les 4 domaines suivants dans l'ordre :

- **Finger** : nommé ainsi car il présente une forte homologie et vraisemblablement une même origine avec le premier domaine finger de la fibronectine de type I (Bányai *et al.* 1983). Ce domaine est responsable de la fonction fibrinolytique du tPA. Ce domaine présente une forte affinité avec la fibrine et va permettre au tPA de s'y fixer et former un complexe ternaire avec le plasminogène. Ce domaine est capable d'interagir avec des récepteurs membranaires, notamment avec les récepteurs de faible densité (LRP – *Low Density Lipoprotein Receptor-related Protein*) et avec les récepteurs de l'annexine-II (Hajjar *et al.* 1994).
- **EGF** : nommé également ainsi car il possède une forte homologie avec le facteur de croissance épidermique. Il participe à la stimulation fibrinolytique et à la clairance hépatique en formant avec le domaine finger un cœur hydrophobe (Urano *et al.* 1989; Smith *et al.* 1995). Ce domaine rend le tPA capable de se fixer et d'activer les récepteurs à l'EGF (Ortiz-Zapater *et al.* 2007; Correa *et al.* 2011a; Lemarchand *et al.* 2015).
- **Kringle 1** : ces domaines (kringle) présentent un site de forte affinité pour la lysine (*Lysine Binding Site*, LBS). Le domaine K1 possède une poche hydrophobe dans sa structure tertiaire formée par la présence de deux AA aromatiques à hétérocycle indole (Tryptophane^{242} et Tryptophane^{253}). Etant donné que son LBS est non fonctionnel, le rôle de ce domaine reste flou. Il permettrait la recapture et la clairance du tPA par les cellules endothéliales hépatiques grâce à la présence de la glycosylation sur l'Asn^{117} qui peut alors interagir avec les récepteurs à mannose (Kuiper *et al.* 1996). Il jouerait de plus probablement un rôle dans l'inhibition de la prolifération des cellules endothéliales (Kim *et al.* 2003).
- **Kringle 2** : dispose d'un domaine de liaisons à la lysine (LBS) fonctionnel, ce qui lui a valu d'être plus étudié que le K1. Il intervient dans les mécanismes aboutissant à l'ouverture de la barrière hémato-encéphalique (BHE) par l'activation du facteur de croissance dérivé des plaquettes (PDGF-CC – *Platelet-Derived Growth Factor CC*) (Fredriksson *et al.* 2004a;

Fredriksson *et al.* 2005). De plus, il est capable d'agir *via* le LBS avec la sous-unité GluN1 des récepteurs au N-méthyl-D-aspartate (R-NMDA) (Lopez-Atalaya *et al.* 2008a).

La chaine B (chaine légère) n'est composée quant à elle d'un seul domaine :

- **Sérine protéase** (domaine catalytique) : possède un site trypsine double avec une sérine catalytique (Ser^{478}) qui forme le site actif en s'associant avec l'His^{322} et l'Asp^{371} (Pennica *et al.* 1983). Ces trois AA vont former une structure appelée triade catalytique, responsable de l'activation du plasminogène en plasmine.

Cette sérine protéase existe sous deux formes actives distinctes : une forme native, simple chaîne (*single chain tPA* ou sc-tPA) et une forme double chaîne (*two chain tPA* ou tc-tPA) (Rijken and Collen 1981b). Elle est d'abord sécrétée sous sa forme sc-tPA et la conversion sous la forme double chaine (tc-tPA) se fait par hydrolyse de la liaison peptidique reliant l'Arg275 à l'Ile276. Cette hydrolyse est réalisée par d'autres sérines protéases comme la plasmine (Wallén *et al.* 1982a) ou les kallikréines (Ichinose *et al.* 1984). Les deux parties alors formées restent reliées par un pont disulfure entre les cystéines 299 (chaine A) et 430 (chaine B) ainsi qu'avec la formation d'un pont salin entre l'arginine 302 (chaine A) et l'acide glutamique 445 (chaine B) (Lamba *et al.* 1996).

Le tPA est une sérine protéase qui présente la particularité d'être actif sous ses deux formes sc-tPA et tc-tPA (Rijken *et al.* 1982; Hoylaerts *et al.* 1982). La plupart des sérines protéases sont synthétisées sous une forme simple chaîne dite zymogène, c'est-à-dire dépourvu d'activité enzymatique, et ce n'est qu'une fois leur conversion en forme double chaîne qu'elles deviennent actives. Ces deux formes possèdent la capacité de se lier avec la fibrine et en présence de ce régulateur allostérique, elles présentent la même activité catalytique. En revanche, en l'absence de fibrine le tc-tPA affiche une activité cinq fois supérieure à celle du sc-tPA (Wallén *et al.* 1982; Petersen *et al.* 1988). Bien entendu, de par la quasi-similitude de leur structure ces deux formes de tPA connaissent des fonctions communes, mais par leur légère différence aussi des fonctions propres qui seront décrites par la suite.

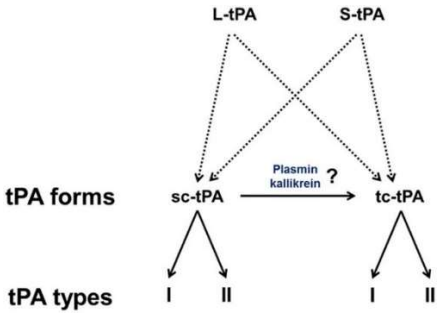


Figure 27 : La diversité des tPAs.
L-tPA et S-tPA ont été décrits sous leur forme simple chaine (sc-tPA), avec une possibilité de clivage dans leur forme double chaine (tc-tPA) par la plasmine ou les kallikréines. Chaque forme de tPA existe dans deux états glycosylés, les types I et II (d'après : Chevilley *et al.*, 2015).

C – Synthèse et régulation de l'expression du tPA

1 – Synthèse du tPA

1.1 - Une sérine protéase synthétisée dans l'organisme

Historiquement découvert dans le sang, le tPA est exprimée et libéré essentiellement dans la circulation sanguine par les cellules endothéliales (Binder *et al.* 1979). Nous retrouvons une expression du tPA dans bon nombre d'organes comme les poumons, les testicules, la prostate, les reins, le cœur ou encore les muscles (Rouf *et al.* 1996a). De manière générale, la synthèse de tPA dans les tissus est la plupart du temps associée à un remodelage tissulaire en condition physiologique comme en condition pathologique. Il est exprimé par exemple dans les ovaires durant l'ovulation, également dans l'utérus pour la mise en place de l'endomètre, l'implantation de l'embryon et est impliqué dans le déclenchement des menstruations (Lockwood and Schatz 1996). C'est d'ailleurs dans ce dernier organe que le tPA a été purifié dans les années 80.

Tissue	Activity (units/g fresh tissue)	Tissue	Activity (units/g fresh tissue)
Uterus	720	Pituitary	140
Adrenal	410	Kidney	119
Lymph node	378	Muscle	110
Prostate	334	Heart	82
Thyroid	325	Brain	35
Lung	223	Testis	25
Ovary	210	Liver	0

Figure 28 : Activité du tPA dans des extraits de tissus humains
(Rouf *et al.* 1996)

1.2 - Le tPA dans la circulation sanguine

Comme mentionné plus haut, c'est au sein du tissu circulant que va être retrouvé le tPA en majorité. Il y est synthétisé par les cellules endothéliales des vaisseaux et semblerait stocké dans des vésicules denses aux électrons d'aspect strié appelées corps de Weibel-Palade. C'est au sein de ces organites que sont aussi entreposés le facteur von Willebrand (*von Willebrand factor*, VWF) et la P-sélectine, autres molécules importantes dans l'hémostase (Weibel and Palade 1964). Le tPA est sécrété dans le compartiment plasmatique sous sa forme simple chaine et retrouvé en grande partie dans les micro-vaisseaux (<100µm de diamètre) (Levin and del Zoppo 1994; Levin *et al.* 1997; Schreiber *et al.* 1998). Il circule dans le sang à une concentration de 70 pM (Rijken and Lijnen 2009) et possède une demi-vie d'environ 6 minutes (Verstraete *et al.* 1985). Il peut être libéré par ces cellules de deux manières distinctes : à la fois de manière constitutive (Angles-Cano *et al.* 1985) ou en réponse à un stimulus spécifique. Par exemple cette libération peut être stimulée en réponse à l'action de facteurs de la cascade de coagulation, ou encore l'hypoxie (Diamond *et al.* 1989; Emeis *et al.* 1997). Ce mécanisme a un rôle prédominant pour empêcher la formation de thrombi occlusifs (Österlund *et al.* 2002). C'est le foie qui sera responsable en grande partie de la clairance du tPA grâce à une recapture efficace par les hépatocytes et les cellules endothéliales hépatiques (Kuiper *et al.* 1988). Les récepteurs impliqués au niveau des hépatocytes sont les récepteurs LRP (Orth *et al.* 1994) et les récepteurs impliqués dans la voie des galectines (**Figure 29 ;** Nagaoka *et al.* 2002), alors qu'au niveau des cellules endothéliales hépatiques ce sont les récepteurs à mannose (Biessen *et al.* 1997). A ceci, il faut rajouter la présence dans les vaisseaux de l'inhibiteur circulant principal du tPA : l'inhibiteur de l'activateur du plasminogène de type 1 ou PAI-1 (*plasminogen activator inhibitor 1*) qui va faciliter et augmenter la clairance du tPA (Chandler *et al.*, 1997).

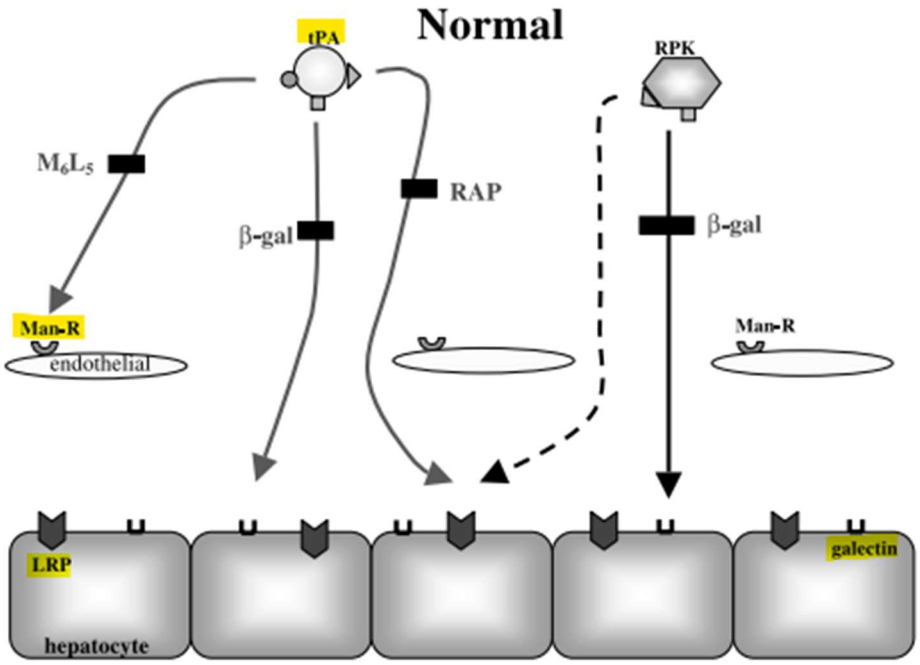


Figure 29 : Systèmes possibles de reconnaissance des récepteurs pour le tPA et la RPK dans le foie de rat normal.
M6L5 : mannoside synthétique ; β-gal : β-galactosides ; RAP : protéine associée au récepteur *(receptor-associated protein)* ; Man-R : récepteur du mannose ; LRP : protéine liée au récepteur des lipoprotéines de basse densité ; ▬ : inhibition ; ligne pointillée : cheminement possible, (d'après : Nagaoka et al., 2002).

1.3 Expression du tPA dans le système nerveux central

1.3.1 Dans les différentes régions cérébrales

Le tPA est une protéine qui va être également exprimée dans le SNC par un certain nombre de types cellulaires différents. Les premiers travaux qui ont mentionnés la présence de tPA dans le parenchyme cérébral remontent à 1981. En effet, les chercheurs ont observé le tPA au niveau de l'endothélium des vaisseaux cérébraux mais aussi dans les neurones à différents stades du développement chez le rongeur (Soreq and Miskin 1981). C'est la première étude qui indique que le tPA pourrait avoir potentiellement d'autres rôles que son action dans la fibrinolyse. Par la suite, en 1993 Sappino et ses collaborateurs mettent en évidence les acides ribonucléiques messagers (ARNm) codant pour le tPA dans différentes structures du SNC, notamment dans le cortex, le cervelet, l'hippocampe et le striatum **(Figure 30**; Sappino *et al.* 1993).

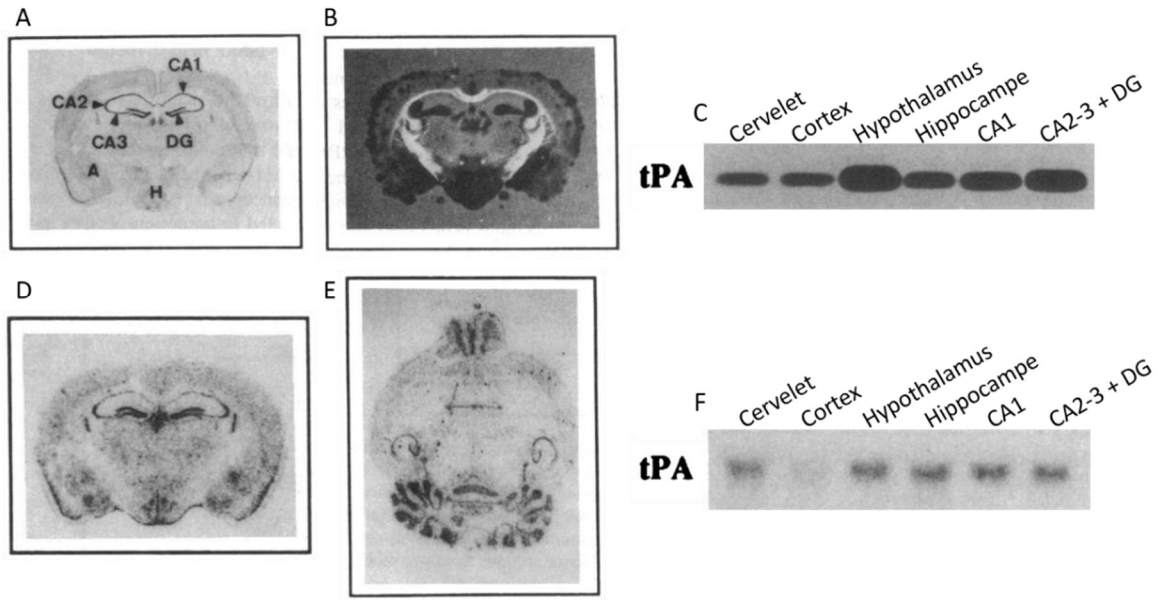


Figure 30 : Localisation du tPA dans le SNC chez la souris.
A) Coloration au crésyl violet d'une coupe coronale de cerveau de souris : A = amygdale, H = hypothalamus, DG = gyrus denté, CA1, 2 et 3 = corne d'Ammon. B) Activité protéolytique du tPA détectée par zymographie *in situ* sur une coupe coronale de cerveau de souris. C) Activité protéolytique du tPA détectée par zymographie *in situ* au sein de différentes régions du cerveau. D) et E) ARNm du tPA mis en évidence par hybridation *in situ* sur une coupe coronale (D) et horizontale (E) de cerveau de souris. F) Northern blot mettant en évidence les ARNm du tPA selon différentes régions du cerveau (adapté de : Sappino et al., 1993).

Il est important de noter que l'expression d'ARNm n'est pas toujours synonyme de la présence de la protéine active. Nous pouvons prendre pour exemple l'hippocampe : bien qu'il y ait l'expression d'ARNm du tPA dans toutes ses régions, nous observons une absence d'activité enzymatique au niveau de la corne d'Ammon 1 (CA1). Il semblerait que dans cette région, comme d'en d'autres, il y aurait une forte concentration d'inhibiteurs de l'activité protéolytique du tPA tels que la neuroserpine (NSP) ou PAI-1 (Sappino *et al.*, 1993).

Durant le développement embryonnaire, nous apercevons chez la souris que les quantités d'ARNm codant pour le tPA varient au cours du temps en fonction des différentes régions cérébrales (prosencéphale, mésencéphale et rhombencéphale). Pour prendre l'exemple du cervelet, durant les 17 premiers jours de la gestation il n'y a qu'une faible expression d'ARNm codant pour le tPA, puis nous pouvons observer un pic d'expression lors des premiers instants de vie (P1-P7), pour enfin visualiser une expression amoindrie et stable à l'âge adulte (Friedman and Seeds 1995a).

En 2004, une étude a été menée chez l'homme par Teesalu et collaborateurs qui ont mis en évidence par hybridation *in situ* la présence d'ARNm du tPA dans d'autres régions du

cerveau. Nous découvrons que ces ARNm sont retrouvés dans les plexus choroïdes, le tronc cérébral, les noyaux thalamiques ainsi que dans la moelle épinière ou l'hypophyse (Teesalu *et al.* 2004).

Plus récemment au sein de notre laboratoire, des travaux ont réussi à précisément authentifier les régions corticales capables d'exprimer le tPA. On compte parmi elles les cortex somatosensoriel primaire, piriforme, périrhinal et retrosplénial où 10 à 15% environ des neurones expriment le tPA (Louessard *et al.* 2016).

Chose intéressante, une autre équipe en 2018 a regardé l'expression du tPA dans ces mêmes régions en utilisant des souris transgéniques hétérozygotes sur lesquelles le promoteur du tPA a été fusionné à la séquence bactérienne du gène de la β-galactosidase. Sur des tranches de cerveau ils observent que l'expression du gène du tPA (pLAT) diffère d'une immunohistochimie dirigée contre le tPA (**Figure 31 ;** Stevenson and Lawrence 2018). Le tPA reste fortement exprimé dans les couches de cellules granulaires du gyrus denté ainsi que dans les couches de cellules pyramidales des régions hippocampiques CA1-CA3. Alors que la protéine synthétisée quant à elle est présente au niveau du Hile et du Stratum lucidum, c'est-à-dire plutôt au niveau des zones de projections des axones (fibres moussues par exemple) de ces mêmes cellules.

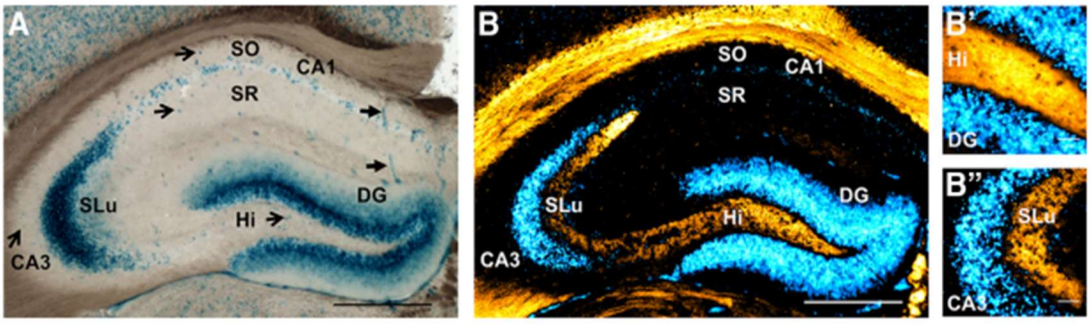


Figure 31 : Analyse immunohistochimique de l'expression du tPA dans l'hippocampe de souris avec le rapporteur PlatGAL.
A, Image représentative (10x) d'une coupe hippocampique de 50µm d'une souris hétérozygote pour le rapporteur PlatβGAL. **B**, Analyse immunohistochimique d'une image représentative (10x) d'une coupe hippocampique de 50 µm d'une souris hétérozygote pour le rapporteur PlatβGAL utilisant des anticorps dirigés contre le tPA murin (orange). Contrairement au colorant β-Gal (cyan), le tPA n'est pas exprimé dans les couches des corps cellulaires, mais dans les axones des fibres moussues des cellules granulaires dentées dans le hile et le stratum lucidum lamina (B', B'', 40). Pour visualiser la coloration β-Gal colorée dans l'image immunofluorescente capturée montrant l'immunoréactivité du tPA, un résultat négatif de l'image fluorescente a été généré et pseudo-coloré en cyan. La coloration β-Gal est également présente dans les vaisseaux sanguins de l'hippocampe (flèches pleines). Slu, stratum lucidum ; Hi, hile ; DG, gyrus denté. Barres d'échelle : 500 µm (A, B) et 50 µm (B', B'') (d'après : Stevenson and Lawrence 2018).

Cette même équipe en utilisant cette fois-ci une protéine rapportrice du tPA, confirme ces résultats en montrant une synthèse forte de celle-ci dans les structures du système limbique. Nous pouvons le voir en particulier dans l'hippocampe (fibres moussues, hile, stratum lucidum), l'amygdale (noyaux central et médial), la strie terminale (noyaux du lit) ainsi que la substance grise périaqueducale. Ils observent bien sûr une synthèse très forte du tPA dans les vaisseaux de l'ensemble du cerveau. Ils retrouvent aussi de la synthèse de tPA dans un certain nombre d'autres structures cérébrales mais en faible quantité, nous pouvons citer par exemple les cortex piriforme et entorhinal, le globus pallidus interne et externe, l'hypothalamus et le thalamus (**Figure 32** ; Stevenson and Lawrence 2018).

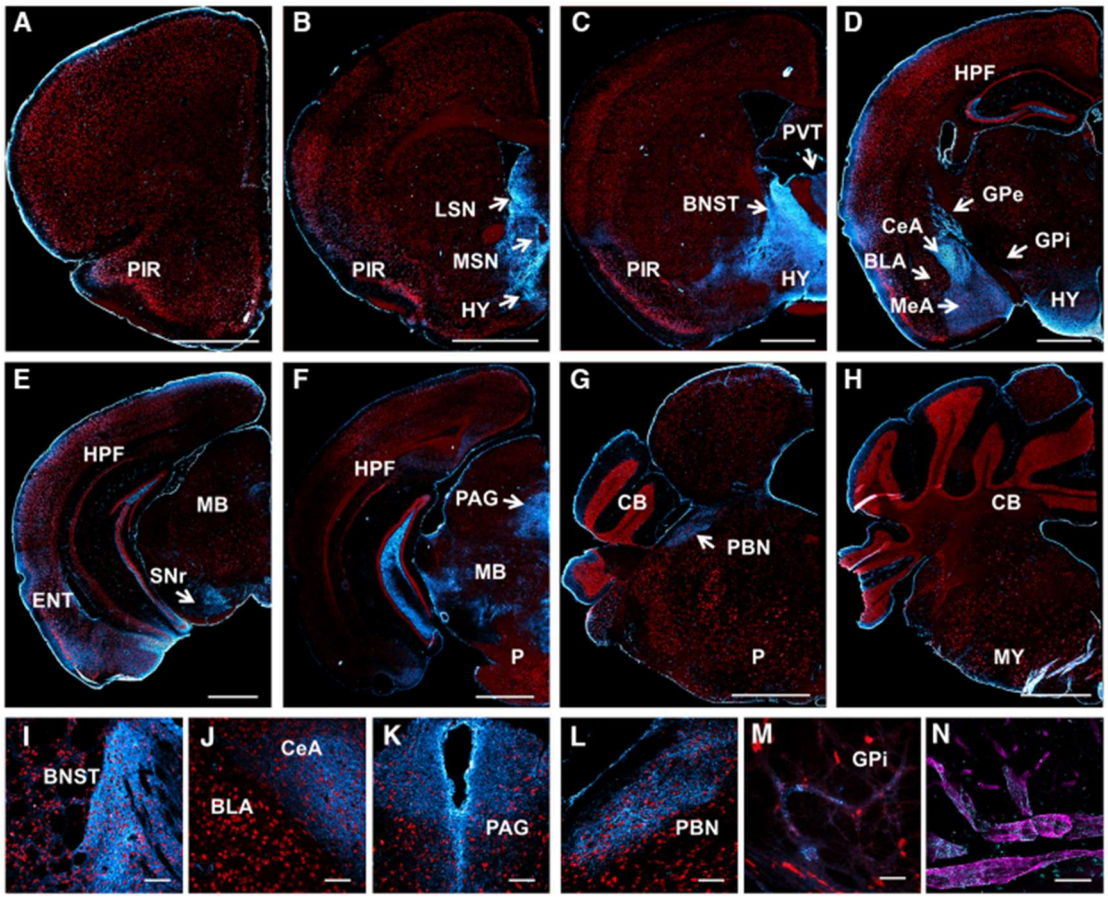


Figure 32 **: La protéine de fusion tPA-Cerulean est exprimée de manière prédominante dans les structures limbiques et les vaisseaux sanguins du cerveau murin adulte**.
Les images montrées représentent des coupes coronales en série de souris transgéniques tPA^{BAC}-Cer (n=3) capturées sur un microscope grand champ (A–H, 10x ; I–L, 20x ; M, 40x) ou microscope confocal (N, 63x). En rouge les neurones (NeuN), en cyan le tPA-Cerulean, en magenta les vaisseaux sanguins cérébraux (CD31). PIR, cortex piriforme ; ENT, cortex entorhinal ; LS, noyaux septaux latéraux ; MS, noyaux du septum médial ; BNST, noyau du lit de la strie terminale ; PVT, noyau paraventriculaire du thalamus; HY, hypothalamus ; HPF, formation hippocampique; CeA, noyau central de l'amygdale ; AEM, noyau médial de l'amygdale; BLA, noyau basolatéral de l'amygdale ; PAG, substance grise périaqueducale ; PBN, noyau parabrachial ; GPe, segment externe du globus pallidus ; GPi, segment interne du globus pallidus ; SNr, substantia nigra pars reticulata; MB, mésencéphale ; P, pons ; CB, cervelet ; MON, moelle. Barres d'échelle : 1 mm (A–H), 100 µm (I–M) et 50 µm (K, N) (d'après : Stevenson and Lawrence 2018).

1.3.2 Dans les différents types cellulaires

Cela fait environ une vingtaine d'années que nous savons que de multiples types cellulaires présents dans le SNC sont capables de synthétiser du tPA. Parmi ces cellules on compte les neurones (Salles and Strickland 2002), les oligodendrocytes (Correa *et al.* 2011), les astrocytes (Buisson *et al.* 1998; Docagne *et al.* 1999), mais aussi des cellules d'origine non neuroblastique comme la microglie (Siao *et al.* 2003), les mastocytes (Sillaber *et al.* 1999), les péricytes (Yamamoto *et al.* 2005) et les épendymocytes (**Figure 33** ; Ware *et al.*, 1995).

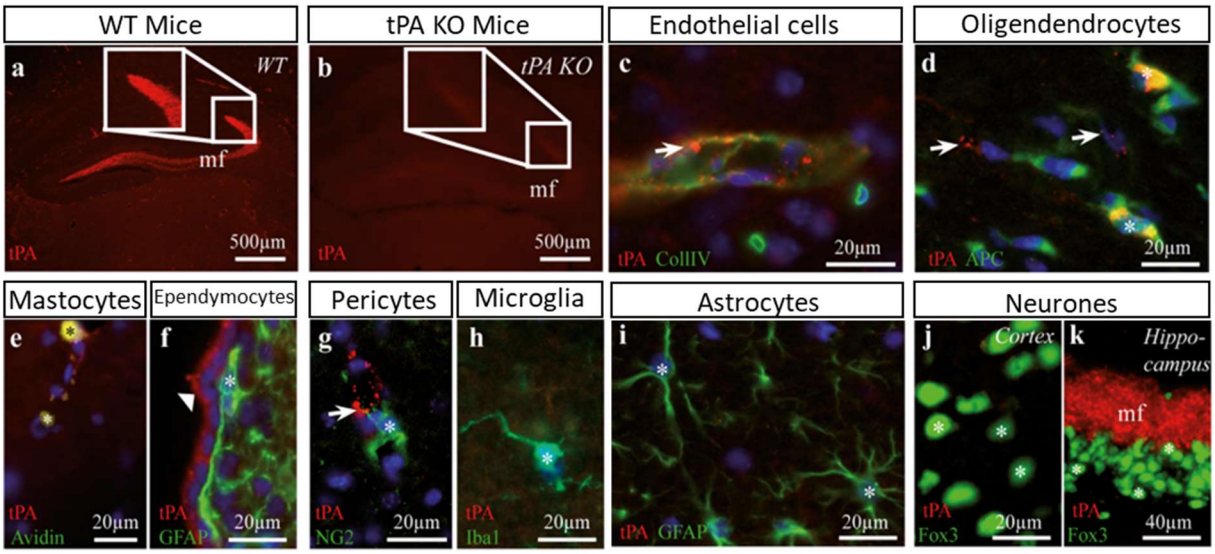


Figure 33 : Expression du tPA dans les cellules du SNC chez la souris adulte.
a, b Spécificité des immunohistochimies du tPA (rouge). Alors qu'aucune immunoréactivité n'a été détectée dans la fibre moussue (mf) de la souris adulte tPA knockout (tPA KO) (b), une immunohistochimie positive a été révélée chez la souris adulte de type sauvage (WT) (a). (c) Le tPA est présent dans les cellules endothéliales (marquage CollIV positif en vert), (d) dans les oligodendrocytes (marquage APC positif en vert), (e) dans les mastocytes (marquage avidine positif en vert), (f) dans les épendymocytes. En revanche, le tPA est absent dans (g) les péricytes, (h) les cellules microgliales (marquage Ib1 positif en vert), (i) les astrocytes (marquage GFAP positif en vert) ainsi que dans le soma des neurones corticaux et des neurones hippocampiques (k) (marquage Fox3 positif en vert). (Adapté de : Louessard *et al.*, 2016).

- Les neurones :

Il a été montré par Shin et collaborateurs que dans des neurones hippocampiques en culture, il y a la présence de tPA et d'ARNm du tPA dans les dendrites et au niveau de la région synaptique. Ils en concluent alors que ces neurones sont probablement capables de synthétiser le tPA directement aux synapses (Shin *et al.* 2004). Il apparait que le tPA peut aussi être stocké dans des vésicules de sécrétion, capables d'être transportées dans les deux sens antérograde et rétrograde dans les dentrites et axones (Parmer *et al.* 1997). La libération de ces vésicules contenant le tPA au niveau des cônes de croissance permet l'élongation axonale (Lochner *et al.* 1998). Plus

récemment, il a été montré que le tPA est stocké dans des vésicules à cœur dense (*dense core vesicles*, DCV) aux électrons, positives au marquage à la secretogranine II (ou chromogranine II), qui transportent entre autres les hormones peptidiques et neuropeptides. Cette étude montre que le tPA est présent dans des DCV au sein des épines dendritiques de neurones d'hippocampe en culture. Ils ont également observé que lors d'une dépolarisation neuronale induite au chlorure de potassium (KCl, 50mM), il y a une augmentation de l'exocytose de ces vésicules dépendant de la concentration extracellulaire de calcium (Ca^{2+}). Ainsi, le tPA une fois libéré pourrait alors agir sur les R-NMDA et moduler un certain nombre de fonctions cérébrales comme la mémoire ou encore l'apprentissage (Lochner *et al.* 2006).

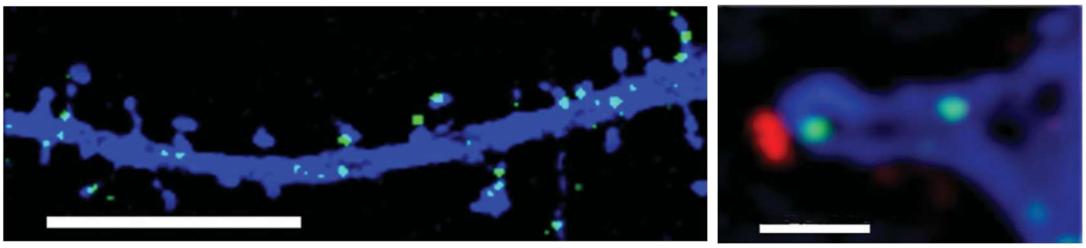


Figure 34 : Le tPA est présent dans des vésicules à cœur denses au sein des épines dendritiques.
A gauche : image montrant la distribution des DCG contenant du tPA-EYFP dans les épines et la dendrite associée dans un neurone hippocampique à DIV 14 après 24 h d'expression d'ECFP (bleu) et de tPA-EYFP (jaune), barre d'échelle = 20µm. A droite : Image d'une synapse dérivée d'un neurone hippocampique DIV 17 exprimant le tPA-EYFP (jaune) et l'ECFP (bleu) et immunocytochimie pour la synapsine I (rouge), barre d'échelle = 1µm (adapté de : Lochner *et al.*, 2006).

Le tPA est donc un neuromodulateur car cette molécule remplit quatre des cinq critères pour être un neurotransmetteur :

1- C'est une molécule qui est synthétisée au niveau de l'élément présynaptique.
2- Elle est présente et stockée dans des vésicules (DCV) au niveau des terminaisons présynaptiques.
3- Elle est libérée au niveau de la fente synaptique en réponse à un stimulus présynaptique, dépendant ou non du Ca^{2+}.
4- A la synapse le tPA peut moduler un certain nombre de récepteurs comme les R-NMDA. Il peut enfin être recapturé, notamment par les astrocytes.

Le seul critère que ne coche pas le tPA pour pouvoir être appelé neurotransmetteur est l'absence d'un récepteur synaptique qui lui est propre.

Enfin une étude plus récente du laboratoire a mis en évidence que tous les neurones n'expriment pas le tPA, et que son expression serait réduite à un sous type de neurones pyramidaux glutamatergiques. De plus, ils ont montré que le tPA est stocké dans des vésicules synaptiques synaptobrévine 2 (Syb 2 ou *Vesicle-associated membrane protein 2,* Vamp2) positives (**Figure 35** ; Louessard *et al.,* 2016).

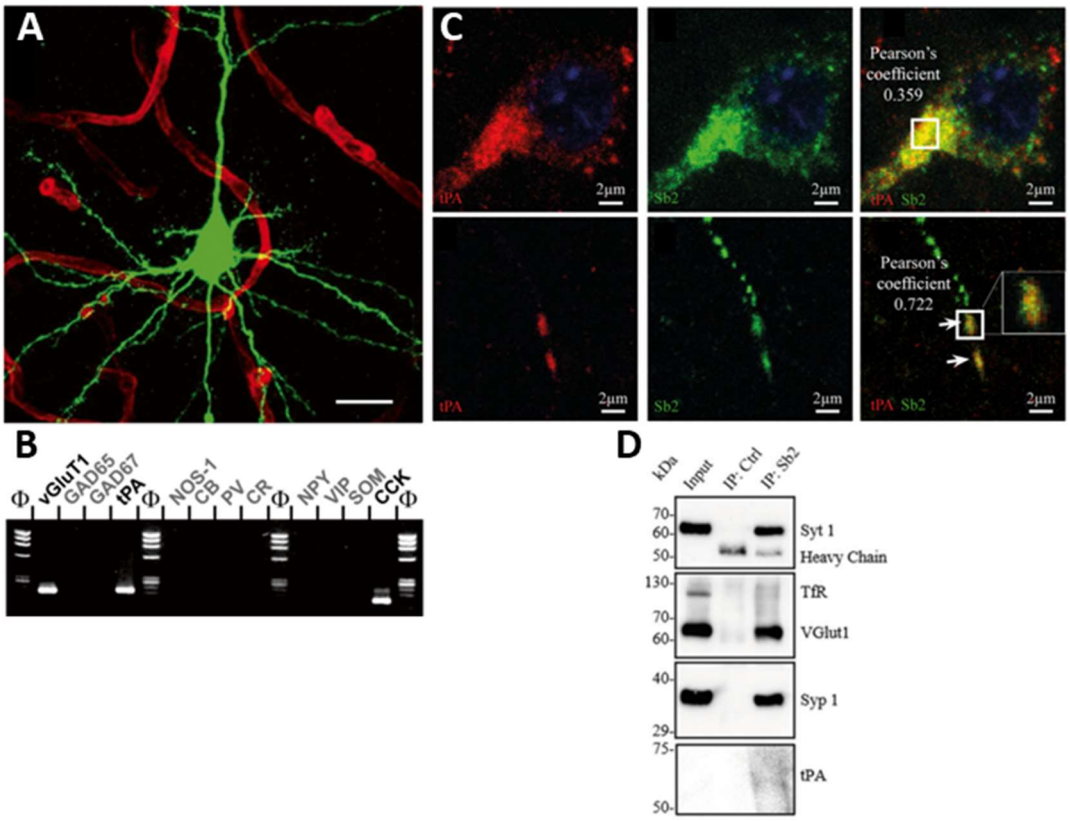


Figure 35 : Caractérisation morphologique et moléculaire des neurones exprimant du tPA.
A) Image en microscopie confocale représentative d'un neurone exprimant le tPA (en vert). B) Analyse d'une transcription inverse puis réaction en chaîne par polymérase sur une cellule (en anglais : single-cell reverse transcription polymerase chain reaction ou sc RT-PCR) révélant l'expression du tPA ainsi que le transporteur au glutamate (en anglais : vesicular glutamate transporter 1 ou VGLUT1) et de la cholécystokinine (CCK). C) Immunohistochimie sur coupe de cerveau de souris montrant la colocalisation du tPA (en rouge) avec des vésicules synaptobrévine 2 positives (en vert, Sb2). D) Immunoprécipitation montrant la présence du tPA dans des vésicules synaptobrévine 2 positives (Sb2), synaptotagmine 1 positive (Syt 1), synaptophysine 1 (Syp 1) et VGlut1 positive (adapté de : Louessard *et al.,* 2016).

- **Les astrocytes** :

Le tPA après être libéré dans la fente synaptique peut interagir avec les récepteurs LRP présents sur la surface des astrocytes par l'intermédiaire de son domaine Finger afin d'être recapturé **(Figure 36)**. Cette recapture est une endocytose constitutive dépendante de la clathrine. Une partie du tPA recapturée va transiter vers les endosomes précoces, puis vers les endosomes tardifs jusqu'aux lysosomes où cette

portion va être dégradée. La dégradation lysosomale du tPA suggère que les astrocytes participent bel et bien à sa clairance. La majeure partie du tPA recapturée va être autrement recyclée et relarguée dans le milieu extracellulaire par un mécanisme dépendant du glutamate. Sur les astrocytes nous retrouvons la présence des récepteurs au kaïnate qui vont agir comme régulateur de la libération du tPA en fonction de la concentration synaptique du glutamate. En effet, une fois que la concentration en glutamate devient importante, les récepteurs kaïnate vont inhiber le recyclage du tPA par activation de la protéine kinase C (PKC) (Cassé *et al.* 2012). Les astrocytes seraient également capables de synthétiser directement le tPA. En effet, une étude chez l'Homme menée par Hultman et collaborateurs met en évidence que les astrocytes peuvent exprimer et libérer de façon régulée le tPA. Cependant ce mécanisme serait observé uniquement dans les astrocytes activés, impliquant sans doute le tPA astrocytaire dans certains processus pathologique (Hultman *et al.* 2008).

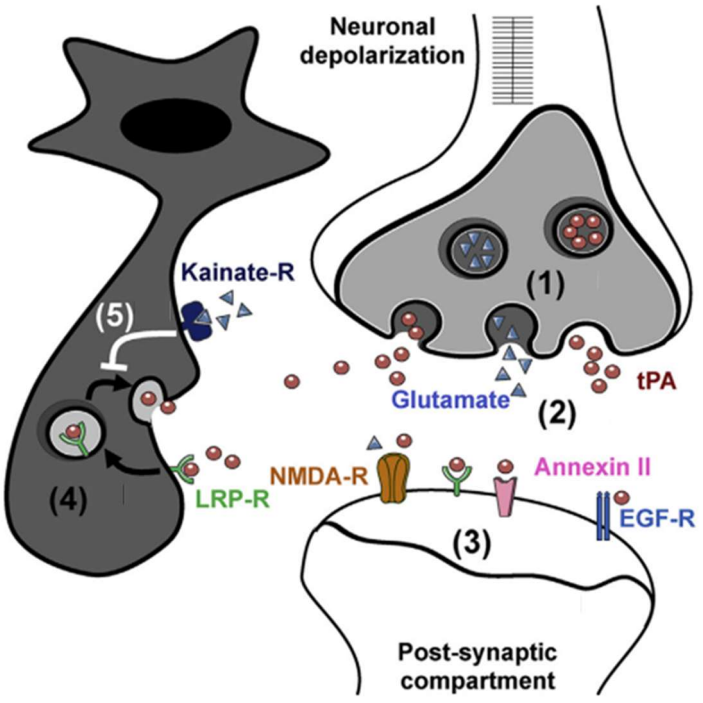


Figure 36 : Libération et recapture du tPA au niveau de la fente synaptique.
Le tPA est stocké dans les vésicules neuronales présynaptiques (1) et libéré dans la fente synaptique conjointement au glutamate suite à une dépolarisation neuronale (2). Une fois dans la fente synaptique, le tPA peut médier ses effets en différents mécanismes sur différentes cibles postsynaptiques (3). De plus, les astrocytes sont capables de réguler la quantité de tPA au niveau de la fente synaptique pour éviter un excès de tPA. En effet, ils peuvent endocytoser le tPA par un mécanisme impliquant son domaine Finger et médié par les récepteurs astrocytaires LRP (4), et le libérer par un mécanisme impliquant la voie de signalisation PKC et dépendant de l'activation des récepteurs kainate par le glutamate (5) (d'après : Hébert et al., 2015).

- **Les oligodendrocytes** :

  Ces cellules peuvent également synthétiser le tPA (**Figure 33**). Son expression connait un pic important au moment de la naissance chez les souris, en particulier durant les deux premiers mois de vie, période active de la myélinisation. A ce stade nous observons une expression importante du tPA au sein du corps calleux. La synthèse de tPA concerne les oligodendrocytes matures. Une étude a montré que le tPA est colocalisé dans cette structure avec le marqueur adenomatous polyposis coli (APC) et que ce tPA a un effet anti-apoptotique sur les oligodendrocytes (Correa *et al.*, 2011). De plus, durant le développement le tPA joue un rôle dans la migration des précurseurs oligodendrocytaires, et que ce même mécanisme permettrait à ces cellules de progresser vers les zones de lésion de la substance blanche afin qu'il y ait remyélinisation (Leonetti *et al.* 2017).

- **La microglie** :

  Les cellules microgliales vont également être en mesure d'exprimer le tPA (Tsirka *et al.* 1995; Rogove *et al.* 1999a), cela concerne à l'instar des astrocytes surtout les cellules activées. La libération de tPA par ces cellules contribuerait à certains processus inflammatoires et neurodégénératifs (Tsirka *et al.*, 1995). Des travaux ont décrit que le tPA lui-même serait en partie aussi à l'origine de cette activation. En effet, le tPA libéré par les neurones environnant se fixe par l'intermédiaire de son domaine finger sur les récepteurs de l'annexine II présents à la surface de la microglie. Cette interaction jouerait sur l'activation des cellules microgliales et sur leur capacité à libérer à leur tour le tPA (Siao and Tsirka 2002).

2 – Régulation de l'expression du tPA

Le gène du tPA présente plusieurs régions régulatrices dans sa séquence qui vont permettre d'adapter son expression dans le SNC. Parmi elles, la région du promoteur comprise entre -9kb et -3.5kb va déterminer la localisation de la traduction de l'ARNm de même que son induction au cours d'un stress inflammatoire. De plus, les 4kb situées au début du promoteur vont être importantes pour l'induction de la transcription du gène du tPA suite à un stress excitotoxique. On note par exemple, qu'après injection de kaïnate dans

l'hippocampe et stimulation de la voie perforante qui amène une potentialisation à long terme (*long terme potentiation*, LTP) dans les neurones granulaires du gyrus denté, que le gène du tPA est précocement induit (Qian *et al.* 1993).

La stimulation neuronale au glutamate a également montré une augmentation de la polyadénylation et de la traduction de l'ARNm du tPA. Elle serait induite par l'activation spécifique des récepteurs métabotropiques au glutamate (*metabotropic glutamate receptors*, mGluR) et des R-NMDA tout comme l'ARNm de la sous unité α de la protéine kinase Ca^{2+}/calmoduline II (*Calcium/calmoduline dependent kinase protein II*, CaMKII) (Wells *et al.* 2001; Huang *et al.* 2002). La polyadénylation de l'extrémité 3 non traduite (*Untranslated region*, UTR) de l'ARNm du tPA est aussi régulée par la protéine de liaison à l'élément cytoplasmique de polyadénylation (*Cytoplasmic Polyadenylation Element Binding protein*, CPEB). En réalité, cette protéine a pour rôle de favoriser la polyadénylation de l'extrémité 3'UTR de l'ensemble des ARNm de la cellule. La formation de la queue polyadénylée en 3' des ARNm est nécessaire pour leur stabilité et leur viabilité à l'extérieur du noyau cellulaire. Cependant, son implication a clairement été établie par une étude qui montre qu'effectivement, la liaison de la CPEB sur l'extrémité 3'UTR de l'ARNm du tPA augmente de manière subséquente la synthèse de tPA (Shin *et al.*, 2004).

Les travaux d'une autre équipe ont mis en évidence que l'expression du tPA est favorisée dans les neurones comme dans les astrocytes humains en culture par l'inhibition de la désacétylation de certaines histones. Cette inhibition permet notamment d'accroître l'acétylation des histones H3. Cette acétylation va décondenser l'ADN nucléaire facilitant ainsi l'accès au gène du tPA par les enzymes de la transcription. En plus, leur analyse de la méthylation de l'ADN de cultures de neurones et astrocytes humains ainsi que de tissus cérébraux humains, a permis de révéler un tronçon de dinucléotides CpG non méthylés dans la partie proximale du promoteur (-121 à +94) du tPA. Cette faible méthylation du promoteur du tPA favorise et augmente la transcription et l'expression du tPA. Ensemble, ces deux phénomènes suggèrent que les mécanismes épigénétiques sont importants pour la régulation de l'expression du gène du tPA (Olsson *et al.* 2016).

Nous pouvons mentionner également que dans les mêmes années les membres d'une autre équipe se sont intéressés aux aspects épigénétiques de l'expression du tPA au sein des cellules endothéliales. Ils montrent que l'expression du gène pLAT est augmentée dans ces

cellules quand les histones désacétylases (HDAC) de classe I sont inhibées. L'inhibition des HDAC favorise alors dans la foulée l'acétylation des histones H3 et H4 associées à la séquence du promoteur du tPA. Ils remarquent aussi lorsque l'on inhibe certaines histones acétyltransférases (HAT) comme p300/CBP et son facteur associé PCAF (*P300/CBP-Associated Factor*), qui sont des coactivateurs de la transcription, que l'on diminue l'expression de tPA et que l'on annule alors l'effet inhibiteur des HDAC. Chose intéressante, ils retrouvent plus ou moins la même séquence de dinucléotides CPG proximale non méthylée (-121 à +59) dans le promoteur du tPA au sein des cellules endothéliales. Ils sont allés voir cette même séquence dans les hépatocytes humains, connus pour exprimer moins de tPA, et s'aperçoivent que celle-ci est en revanche partiellement méthylée (Dunoyer-Geindre and Kruithof 2011).

Des travaux ont montré que l'expression du gène pLAT pouvait être modifiée lors de conditions particulières. Par exemple, l'inflammation ainsi que la privation en oxygène augmentent son expression (Carroll *et al.* 1994; Tsirka *et al.* 1995; Lee *et al.* 2008).

3 – Les inhibiteurs du tPA

Un certain nombre d'études se sont focalisées sur la localisation du tPA dans les différentes régions cérébrales. Pour la plupart, il en a résulté que dans certaines régions on détectait la présence d'ARNm du tPA sans y retrouver d'activité protéolytique de la protéine. Nous pouvons citer par exemple Sappino et collaborateurs, qui en 1993 avaient observé ce phénomène dans la région CA1 de l'hippocampe (Sappino *et al.,* 1993). Ils en avaient conclu qu'il était fortement probable que dans ces mêmes régions il y ait des inhibiteurs de l'activité protéolytique du tPA. Il s'avère qu'ils avaient raison, car plus tard on découvrit qu'il s'agissait de molécules faisant partie de la famille des serpines.

Les serpines sont un ensemble de protéines glycosylées et monomériques composées d'environ 350 à 400 AA pour une masse moléculaire variant de 40 à 60 kDa. Elles ont un domaine principal avec une structure secondaire composée de 3 feuillets β et de 8-9 hélices α. Elles ont aussi un domaine qui leur permet d'interagir avec leur cible, appelé boucle centrale réactive (*reactive center loop* ou RCL). C'est celui-ci qui va permettre aux serpines de se lier aux protéases. Pour ce faire les protéases vont cliver la boucle formant alors une liaison covalente entre les deux protéines qui provoque l'inhibition de l'activité protéase par une

conformation stable du complexe. Il existe des serpines ne pouvant pas se lier aux protéases qui sont sous forme latentes (Silverman and Muir 1993; Tang *et al.* 2015).

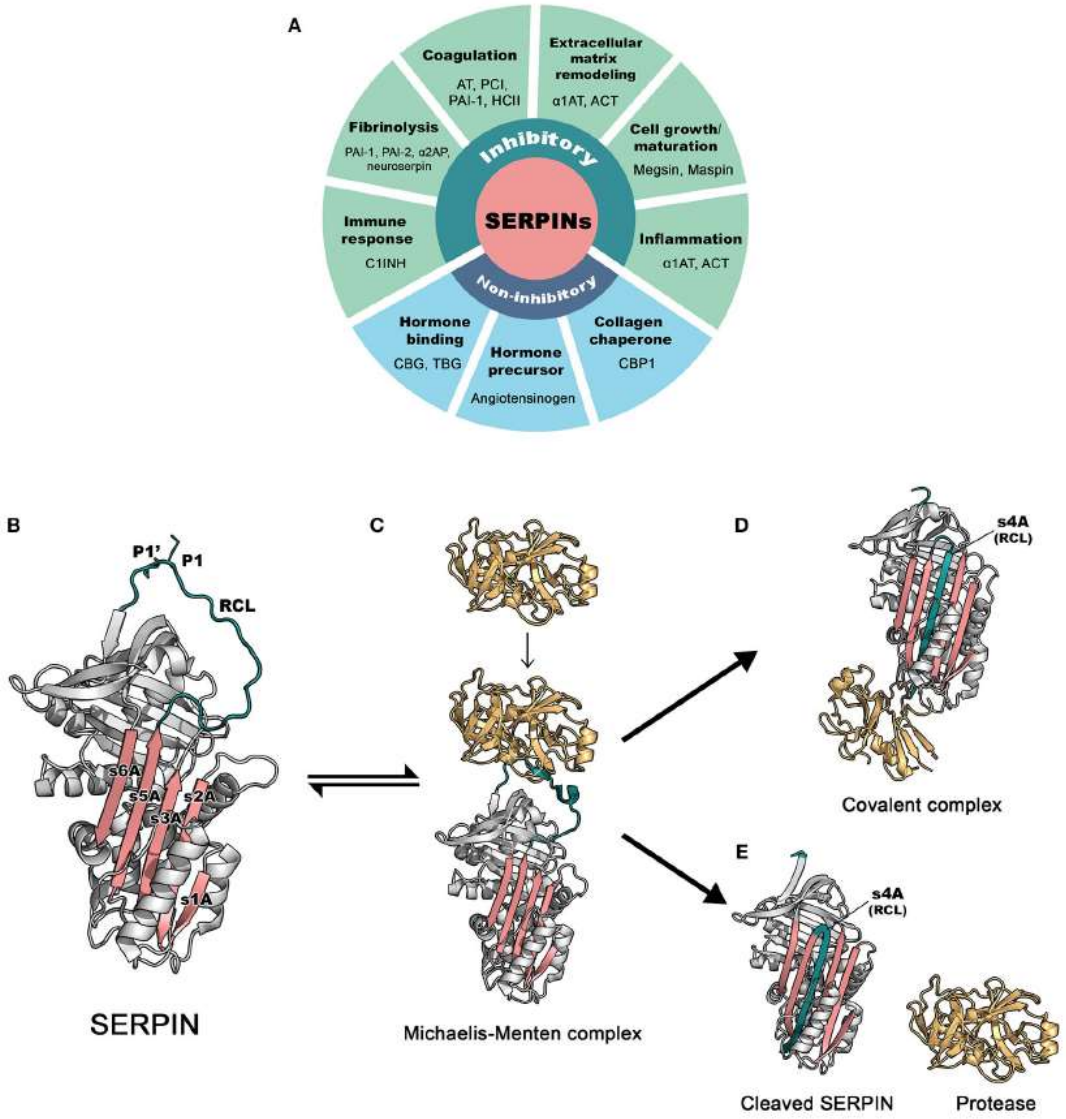


Figure 37 : **Les fonctions de base et le mécanisme inhibiteur des serpines**.
(**A**) Fonctions régulatrices des serpines (**B**) La structure de l'archétype natif α1-antitrypsine. La boucle centrale réactive (RCL) est en vert, contenant un site de clivage de protéase (P1-P1'). Le feuillet β A, composé de 5 brins (s1A, s2A, s3A, s5A et s6A) est en rose. Ces deux régions servent de caractéristiques principales, qui jouent un rôle important dans le changement conformationnel spectaculaire que subissent les serpines pendant l'inhibition. (**C**) Initialement, une protéase cible s'arrime et lie le site de reconnaissance, exposé sur le RCL. Cette étape conduit à la formation du complexe non covalent de Michaelis-Menten. (**D**) Lors du clivage à P1-P1', la serpine se replie spontanément dans une conformation hyperstable, où la partie N-terminale du RCL clivée est insérée entre le feuillet β central A. Ce changement de conformation de la serpine entraîne le « piégeage » de la protéase liée de manière covalente sous une forme inactive. Ce complexe serpine-protéase sera ensuite éliminé de la circulation. (**E**) Dans certains cas, une serpine peut agir comme un substrat, où la protéase et la serpine ne restent pas liées de manière covalente. Il en résulte une protéase active qui se dissocie de la serpine, ce qui laisse la serpine sous une forme clivée. AT : antithrombine ; PCI, inhibiteur de la protéine C; PAI-1, inhibiteur de l'activateur du plasminogène 1; PAI-2, inhibiteur 2 de l'activateur du plasminogène; HCII, cofacteur II de l'héparine; α1AT, 1-antitrypsine; ACT, antichymotrypsine; α2AP, α2-antiplasmine; C1INH, inhibiteur de la C1 estérase ; CBG, globuline liant les corticostéroïdes ; TBG, Thyroxine-binding globulin; CBP1, protéine de liaison au collagène 1 (Sanrattana *et al.* 2019).

Dans la famille des serpines aujourd'hui on sait que quatre d'entre elles peuvent inhiber le tPA : la neuroserpine, la protéase nexine-1, PAI-1 et PAI-2 (Sprengers and Kluft 1987). Les deux principales serpines inhibitrices du tPA dans le parenchyme cérébral sont la neuroserpine et PAI-1 (Osterwalder *et al.* 1996; Miranda and Lomas 2006), c'est sur elles que nous mettrons l'accent par la suite.

3.1 – PAI-1

PAI-1 est une protéine, comme le tPA, principalement retrouvée dans la circulation sanguine. Elle y est sécrétée en majorité par les cellules endothéliales mais aussi par les plaquettes ou encore les cellules musculaires lisses de la paroi des vaisseaux. En dehors du tissu circulant, PAI-1 peut être synthétisé dans un certain nombre de tissus comme les poumons, les reins, le cœur, le foie ou encore par le tissu adipeux. En d'autres termes cette protéine est exprimée plus ou moins dans les mêmes organes que ceux dans lesquels nous retrouvons du tPA. La structure de cette protéine comporte 379 AA pour un poids moléculaire de 50 kDa (Sprengers and Kluft 1987; Brogren *et al.* 2004).

La sécrétion de cet inhibiteur dans la circulation est nettement plus importante que le tPA, rendant ainsi la majeure partie du tPA circulant complexé à PAI-1. Cette inhibition s'effectue par deux fixations successives : une première stable au site catalytique et une deuxième sur les domaines finger et kringle 2. Ces fixations amènent une inhibition de son activité fibrinolytique ainsi qu'une incapacité du tPA à interagir avec la fibrine (Kaneko *et al.* 1992). PAI-1 possède la même affinité pour le tPA simple et double chaine, et inhibe ces deux formes de la même façon (Rijken and Lijnen 2009). La stabilité des complexes entre tPA et PAI-1 est très grande rendant plus ou moins définitive l'inhibition du tPA (Zhou *et al.* 2001). La présence de ces complexes n'empêche en rien la clairance du tPA par le foie. Les hépatocytes peuvent recapturer et dégrader le tPA qu'il soit libre ou qu'il soit associé et complexé avec PAI-1 (Nagaoka *et al.* 2002).

Dans le SNC, PAI-1 peut être synthétisé par les neurones et par les astrocytes mais plutôt en faible quantité (Buisson *et al.* 1998b; Hino *et al.* 2001). En condition pathologique,

comme par exemple au cours d'un AVC, PAI-1 peut être fortement exprimé par les astrocytes (Docagne *et al.* 1999).

3.2 – La neuroserpine

La neuroserpine (NS) est une protéine de 429 AA pour 54-60 kDa. Elle est principalement exprimée dans le SNC où elle est libérée à la synapse par les neurones (Osterwalder *et al.,* 1996) et les astrocytes (Docagne *et al.* 1999; Yepes and Lawrence 2004). A l'inverse de PAI-1, la NS n'est pas retrouvée dans la circulation sanguine, elle ne joue donc aucun rôle sur l'inhibition du tPA vasculaire. Nous retrouvons cependant son expression dans certains autres organes comme le cœur, le pancréas, les reins ou encore les testicules (Krueger *et al.* 1997; Schrimpf *et al.* 1997).

Dans le SNC la NS n'affecte que partiellement l'activité du tPA, car les complexes formés entre les deux s'avèrent être peu stables. Une des explications possible est que lors du clivage de la RCL, une boucle trop longue se forme, empêchant la stabilisation du complexe NS-tPA. Le tPA serait alors en mesure de retrouver son activité en hydrolysant la RCL de la NS (Barker-Carlson *et al.* 2002). En conséquence, la demi-vie moyenne de ces complexes ne dépasse pas dix minutes (Miranda and Lomas 2006). Chose intéressante, la NS présente une affinité plus importante pour le tc-tPA, mais forme des complexes beaucoup moins stables qu'avec le sc-tPA (Hastings *et al.* 1997). La synthèse de la NS lors de dépolarisations neuronales est augmentée, montrant que sa libération par les neurones est un phénomène régulé (Berger *et al.* 1999). La NS est capable d'être recapturée et dégradée par un mécanisme impliquant les récepteurs LRP. Ces derniers peuvent se lier tant avec la forme libre de la NS qu'avec le complexe NS-tPA, mais avec un dynamisme et une cinétique d'internalisation différente (Makarova *et al.* 2003). La NS intervient dans la régulation fine de l'activité physiopathologique des tPA simple et double chaines. En conditions physiologiques, elle intervient dans de multiples processus tels que la migration neuronale, la pousse neuritique, la mémoire ainsi que l'apprentissage. En conditions pathologiques, elle joue un rôle dans l'extension des lésions ischémiques (Yepes *et al.* 2000; Cinelli *et al.* 2001) ou encore elle agit sur les phénomènes épileptiques (Yepes *et al.* 2002).

D - Implications du tPA dans les fonctions de l'organisme

1 – Implications du tPA dans le compartiment vasculaire

1.1 – Le tPA dans l'hémostase

L'hémostase regroupe l'ensemble des mécanismes physiologiques qui permettent le maintien de l'intégrité vasculaire. Ainsi elle met en œuvre à la fois les cellules et molécules du sang circulant mais aussi les cellules de la paroi des vaisseaux. Elle va permettre de réguler les différents états du sang afin de permettre la réparation de brèches vasculaires. Nous pouvons décrire schématiquement l'hémostase en plusieurs étapes :

1 – **La réaction vasculaire**, suite à la formation d'une brèche vasculaire, on observe en premier lieu une vasoconstriction afin de diminuer le diamètre du vaisseau et ralentir le saignement. Cette étape dure moins d'une minute et a aussi pour but de freiner la circulation sanguine au niveau de la lésion pour faciliter le déroulement des étapes suivantes.

2 – **L'hémostase primaire**, les plaquettes circulantes vont venir interagir avec le collagène de la paroi lésée et vont s'agréger entre elles pour former le clou plaquettaire.

3 – **L'hémostase secondaire**, suite aux contacts de certaines molécules plasmatiques circulantes (facteur XII) avec les tissus, il va y avoir activation de la cascade de coagulation. Cette cascade implique un certain nombre de facteurs dont la finalité résulte en la formation de fibrine polymérisée (caillot sanguin) à partir du fibrinogène circulant grâce à la thrombine. Cette étape a lieu cinq minutes environ après la rupture du vaisseau.

4 – **Réparation**, une fois le caillot formé, cela va stimuler la croissance des cellules musculaires lisses et des fibroblastes de la paroi vasculaire pour colmater la brèche.

5 – **La fibrinolyse**, l'étape de la dissolution du caillot par la dégradation des chaines de fibrines par la plasmine. C'est principalement le tPA qui active le plasminogène circulant en plasmine aux abords du caillot. Il en résulte un retour à une circulation normale du sang et à une inhibition rapide du tPA par PAI-1, ainsi que de la plasmine par l'α2 – antiplasmine.

C'est durant la dernière étape de l'hémostase que le tPA joue un rôle essentiel. Il est important de noter cependant que le tPA n'est pas le seul activateur du plasminogène, il existe l'activateur du plasminogène de type urokinase (*urokinase-type plasminogen activator*, uPA) (Blasi *et al.* 1987). Ces deux activateurs ont la même capacité à activer le plasminogène en

plasmine bien qu'ils aient des caractéristiques distinctes. L'uPA a par exemple une affinité plus faible pour la fibrine que le tPA. Il faut mentionner que le tPA est un piètre activateur en l'absence de cofacteurs, la présence de fibrine va accentuer par cent sa proportion à activer le plasminogène (Hoylaerts *et al.,* 1982). En effet, la fibrine va permettre le rapprochement spatial du tPA et du plasminogène grâce à deux sites proches dans sa structure. Le premier va permettre de lier le tPA au niveau de ses domaines finger et kringle 2. Le deuxième agit avec un ou plusieurs domaines Kringle du plasminogène. La formation de ce complexe ternaire accélère et facilite grandement l'activation du plasminogène en plasmine par le tPA d'une part, mais permet de l'activer spécifiquement aux abords du caillot sanguin. Grâce à ce mécanisme, la plasmine peut induire la fibrinolyse efficacement, car elle se retrouve protégée en partie de ses inhibiteurs (Zorio *et al.* 2008). Comme mentionné précédemment, la plasmine va pouvoir à son tour cliver le sc-tPA en tc-Tpa. Ces deux formes conservent la même activité protéolytique en présence de fibrine (Rijken *et al.,* 1982).

Une fois la fibrinolyse terminée et le caillot sanguin dissous, un rétrocontrôle se met en place pour éviter l'hyperfibrinolyse. En effet, une activité fibrinolytique accrue en l'absence de caillots à dégrader peut entrainer une altération de la barrière hématoencéphalique (BHE) et augmenter le risque de survenue d'hémorragies (Marcos-Contreras *et al.* 2016). C'est pourquoi les enzymes de la fibrinolyse se retrouvent rapidement inhibées. L'α2-antiplasmine vient inhiber la plasmine (Holmes *et al.* 1987) et PAI-1 vient inhiber le tPA, ce qui amène de surcroit une diminution de concentration de plasmine circulante par l'inactivation de la conversion du plasminogène en plasmine.

Des travaux ont permis le développement de formes recombinantes de ces activateurs du plasminogène afin d'amplifier leur affinité avec la fibrine pour mieux dissoudre les caillots. Nous pouvons citer le ténectéplase et le rétéplase, deux formes recombinantes qui ont été administrées chez des patients atteints d'AVC ischémiques ou d'infarctus du myocarde lors d'essais cliniques (Thiebaut *et al.* 2018). Cependant, à l'heure actuelle, l'injection intraveineuse de tPA est le seul traitement pharmacologique de la phase aigüe des AVC ischémiques (NINDS 1995).

1.2 - Le tPA et la barrière hématoencéphalique

La BHE est une barrière physiologique placée dans l'interstice entre la circulation sanguine et le parenchyme cérébral. Elle joue un rôle très important dans l'homéostasie du

tissu cérébral. Cette barrière permet de filtrer sélectivement en conditions physiologiques seulement certaines molécules indispensables aux cellules du parenchyme cérébral. Nous pouvons citer notamment le glucose, l'eau et l'oxygène. Physiquement, la BHE est constituée de plusieurs éléments (de l'intérieur vers l'extérieur du vaisseau, **Figure 38**) :

- **Des cellules endothéliales** reliées entre elles par des jonctions serrées et des jonctions adhérentes.
- **De la membrane basale** de l'endothélium composée principalement de collagène IV, de fibronectine et de laminine sécrétés par les cellules endothéliales et les péricytes.
- **Des péricytes**, qui sont des cellules murales présentes dans la lame basale de l'endothélium des capillaires.
- **Des astrocytes**, ces cellules gliales vont recouvrir la quasi-totalité de la surface des capillaires avec leurs pieds astrocytaires. Ce sont ces structures qui seront notamment responsables du passage de l'eau à travers cette barrière *via* les aquaporines 4.
- **De la membrane basale des astrocytes,** cette membrane est sécrétée par les astrocytes afin de recouvrir les pieds astrocytaires et les ancrer aux capillaires.

Lors de conditions pathologiques, le tPA peut chambouler l'intégrité de la BHE à plusieurs niveaux. Premièrement, le tPA peut interagir avec les récepteurs LRP des cellules endothéliales, amenant un désengagement et une rétractation des pieds astrocytaires de la lame basale, déstabilisant la BHE (Cheng *et al.* 2006; Polavarapu *et al.* 2007). Le départ des astrocytes accroît le risque d'hémorragie et permet au tPA de franchir cette barrière pour passer dans le parenchyme cérébral (Yepes *et al.* 2003). Deuxièmement, le tPA pourrait activer des métalloprotéines matricielles (*matrix metalloproteinase*, MMP) comme les MMP-2, MMP-3 et MMP-9, qui seraient responsables à la fois de la dégradation de la matrice extracellulaire et de lame basale des vaisseaux (Wang *et al.* 2003; Suzuki *et al.* 2009). Ce mécanisme est confirmé par une étude chez des souris déficientes en MMP-3, ou en MMP9, qui ne montrent aucune atteinte de la BHE après thrombolyse (Asahi *et al.* 2000; Suzuki *et al.* 2007). Chez l'Homme, le risque de transformation hémorragique après une thrombolyse est corrélé avec le taux sanguin de MMP-9 (Montaner *et al.* 2003).

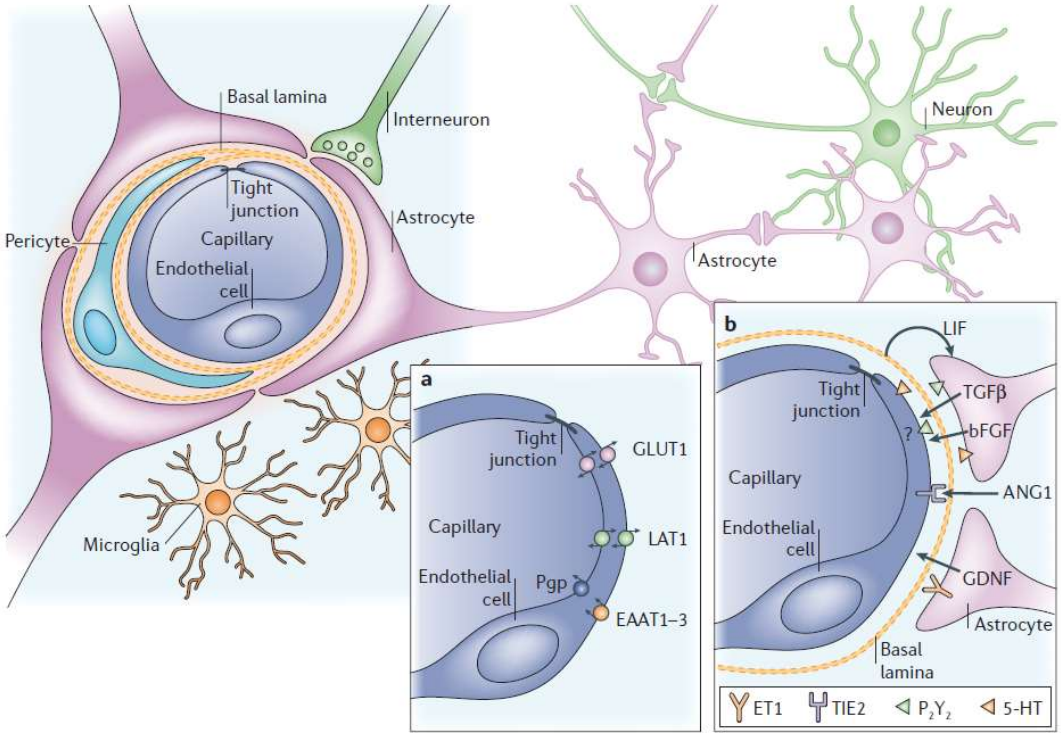


Figure 38 : Constituants cellulaires de la barrière hémato-encéphalique.
La barrière est formée de cellules endothéliales des capillaires, entourée par les péricytes, la lame basale et les pieds astrocytaires. Les astrocytes assurent le lien cellulaire avec les neurones. La figure montre également des cellules microgliales. **a**. Caractéristiques des cellules endothéliales cérébrales. Les cellules expriment un certain nombre de transporteurs et de récepteurs, dont certains sont indiqués. EAAT1-3, AA excitateur transporteurs 1-3; GLUT1, transporteur de glucose 1 ; LAT1, système L pour les gros acides aminés neutres ; Pgp, P-glycoprotéine. **b**. Exemples d'induction bidirectionnelle astrogliale – endothéliale nécessaire pour établir et maintenir la BHE. Certaines des caractéristiques des cellules endothéliales (récepteurs et transporteurs) sont présentées. 5-HT, 5-hydroxytryptamine (sérotonine); ANG1, angiopoétine 1; bFGF, facteur de croissance basique des fibroblastes ; ET1, endothéline 1; GDNF, neurotrophique dérivé de la lignée cellulaire gliale facteur; LIF, facteur inhibiteur de la leucémie; P2Y2, récepteur purinergique; TGFβ, facteur de croissance transformant-β; CRAVATE2, récepteur tyrosine kinase spécifique de l'endothélium 2. Données obtenues à partir de co-cultures astrogliales - endothéliales et de l'utilisation de milieu conditionné (d'après : Abbott *et al.* 2006).

Le tPA peut aussi être impliqué dans le clivage du facteur de croissance PDGF-CC *via* son domaine catalytique et son domaine Kringle 2. Une fois actif, il agit sur les récepteurs PDGF-α des astrocytes et péricytes provoquant l'ouverture de la BHE et une augmentation de la survenue d'hémorragies (Fredriksson *et al.* 2004b; Su *et al.* 2008). L'injection simultanée de tPA et d'imatinib (Gleevec®, inhibiteur de PDGF-α) diminue la proportion de transformation hémorragiques causées par le tPA (Wahlgren *et al.* 2017).

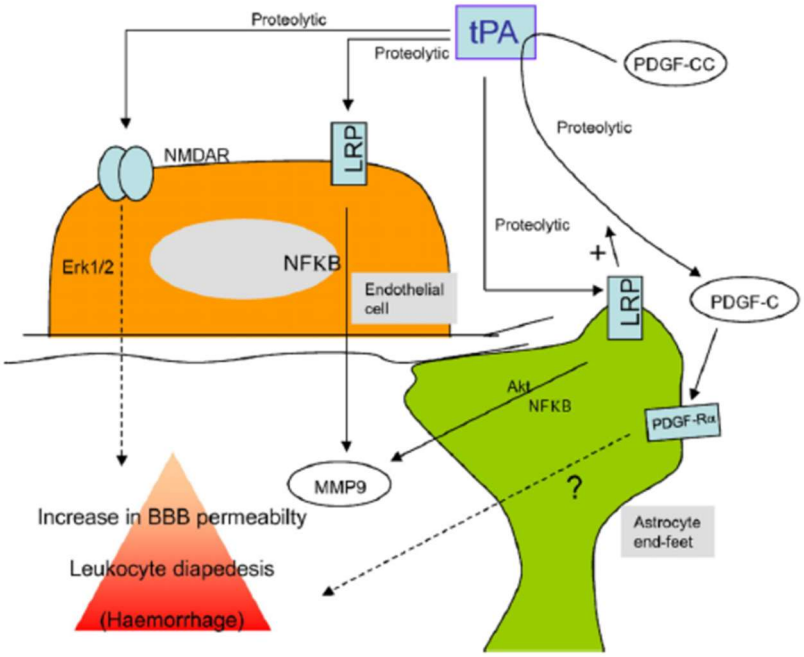


Figure 39 **: Effet du tPA sur la barrière hématoencéphalique.**
Le tPA interagit avec les récepteurs LRP sur les cellules endothéliales et sur les astrocytes, menant entre autres à la production de MMP-9 au sein de ces cellules. Les MMP-9 provoquent alors une altération de la BHE. De plus, l'activation du PDGF-CC par le tPA contribue également au détachement des pieds astrocytaires de la lame basale, par l'activation des récepteurs PDGFR-α. L'activation du PDGF-CC est facilitée par l'interaction du tPA avec les récepteurs LRP sur les astrocytes (Mehra *et al.* 2016).

2 - Implications du tPA dans le SNC

2.1 - Rôle du tPA dans le développement cérébral

Durant le développement cérébral, il a été montré que le tPA peut jouer sur deux mécanismes importants concernant la mise en place des neurones et leur croissance. Il intervient dans la migration neuronale, mécanisme précoce et fondamental qui va aboutir à l'organisation histologique du cortex cérébral en différentes couches cellulaires. Aussi, il va agir plus tard dans la pousse neuritique, mécanisme nécessaire aux neurones immatures afin d'établir des connexions pour former les différents réseaux neuronaux.

- Le tPA dans la migration neuronale : L'implication du tPA dans cette étape du développement a d'abord été mise en évidence dans le cervelet. A l'inverse de la migration des neurones corticaux qui a lieu durant la gestation, c'est pendant les premières semaines après la naissance qu'à lieu la mise en place des cellules granulaires du cervelet. Elles vont migrer à partir de la couche granulaire externe, traverser la couche moléculaire pour terminer dans la couche granulaire interne (Komuro and Yacubova 2003; Consalez and Hawkes 2012). Des travaux ont montré que les cellules granulaires peuvent libérer du tPA au niveau de leur

prolongement pendant le développement (Krystosek and Seeds 1981). Dans le cervelet, la quantité d'ARNm du tPA coïncide avec ce phénomène et suit les pics de migration cellulaire. On note une forte expression de l'ARNm du tPA au 7ème jour postnatal, en plein temps fort de la migration. Par ailleurs, une fois les cellules arrivées à leur emplacement définitif et la migration terminée, la quantité d'ARNm du tPA dans le cervelet diminue (Friedman and Seeds 1995). De plus, chez des souris déficientes en tPA, on observe une migration retardée des cellules granulaires qui se manifeste par leur accumulation anormale dans la couche moléculaire (**Figure 40**; Seeds *et al.* 1999). Cependant, Seeds et collaborateurs remarquent que durant le développement du cervelet, il y a aussi une expression abondante de l'ARNm du plasminogène. Par conséquent, ils conjecturent que pendant la migration des cellules granulaire, l'effet du tPA serait indirect et passerait par l'activation de la plasmine qui permettrait la dégradation de la matrice extracellulaire (Seeds *et al.* 1999; Basham and Seeds 2001).

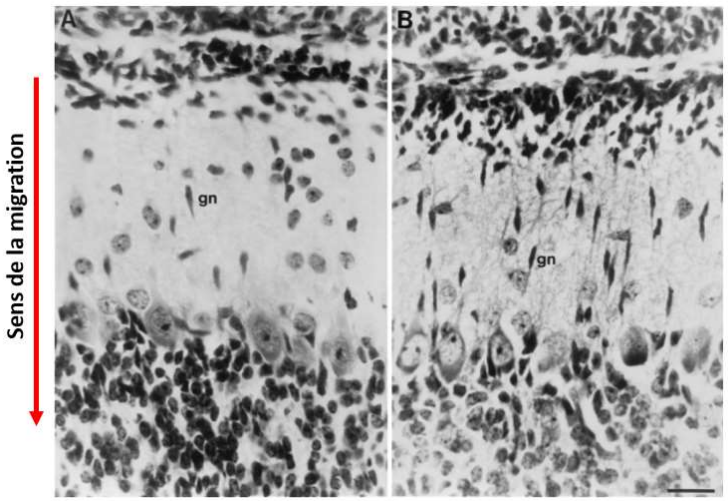


Figure 40 : Effet de l'absence de tPA sur la migration des neurones granulaires du cervelet.
Photographies montrant des cellules granulaires du cervelet dans la couche moléculaire chez les souris WT (A) ou déficientes en tPA (tPA -/- ; B) (d'après : Seeds *et al.*, 1999).

Plus récemment, des travaux du laboratoire ont permis de mettre en évidence l'implication du tPA dans la migration d'autres cellules au cours du développement. Par son interaction et l'activation des récepteurs à l'EGF, le tPA permet notamment la migration des progéniteurs des oligodendrocytes (Leonetti *et al.* 2017). Egalement, le tPA intervient durant la corticogénèse dans la migration des neuroblastes (progéniteurs de neurones). Les neuroblastes avant différenciation se mettent en place en migrant de la profondeur du

cerveau embryonnaire, appelée zone ventriculaire, vers la surface appelée plaque corticale. Pour se déplacer, ils vont utiliser un support de migration formé par une population de cellules transitoires appelée glie radiaire. Les cellules nouvellement formées au niveau de la zone ventriculaire migrent plus loin que les neuroblastes issus des divisions précédentes. Ainsi, la présence de perturbations dans la migration de ces cellules engendre des erreurs dans leur future localisation. Chez des souris tPA KO, on observe un retard dans la migration des neurones au 16ème jour de gestation. Ce retard provoque l'accumulation anormale de neuroblastes dans la zone intermédiaire et serait médié par les R-NMDA situés sur la surface de la glie radiaire (**Figure 41** ; Pasquet *et al.* 2019).

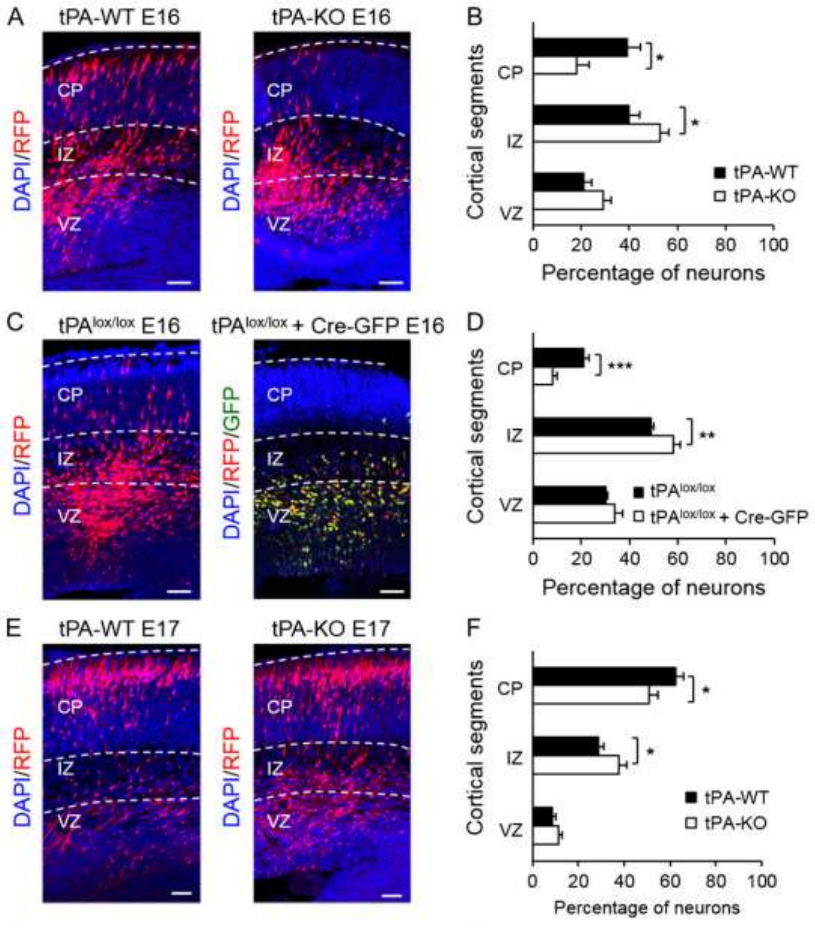


Figure 41 : Le tPA affecte la migration neuronale corticale.
Electroporation *in utero* du plasmide pCAG-RFP à E14 dans les cortex de souris tPA-WT et tPA-KO. (A, E, G) Images représentatives en microscopie confocale montrant la distribution des cellules neuronales électroporées (rouge) après immunomarquage DAPI (bleu) dans le cortex de souris tPA-WT et tPA-KO (E16 et E17, respectivement). (B, F) Quantification des neurones RFP-positifs dans chaque couche corticale. (C) Images représentatives en microscopie confocale montrant la distribution des cellules neuronales électroporées (rouge) après immunocoloration DAPI (bleu) dans le cortex du KO conditionnel du tPA dans les progéniteurs neuronaux tPAlox/lox adulte (E16). (D) Quantification des neurones RFP-positifs dans chaque couche corticale. Les graphiques montrent les moyennes + SEM. *P < 0,05 ; **P <0,01 ; ***P < 0,001. Les barres d'échelle représentent 50 um (d'après :Pasquet *et al.* 2019).

- Le tPA dans la pousse neuritique : A partir du moment où les cellules après migration ont rejoint leur place respective, elles vont se différencier et émettre des prolongements :. L'axone en cours de développement porte le nom de cône de croissance, celui-ci va être guidé dans son environnement par un ensemble de signaux et d'interactions cellulaires pour gagner ses cibles. Le tPA semblerait impliqué dans la croissance neuritique, à la fois dans l'élongation axonale que dans la mise en place de l'arborisation dendritique. En effet, il est libéré au niveau du cône de croissance où il active les MMPs et le plasminogène en plasmine. Le recrutement de ces protéases va permettre de dégrader la matrice extracellulaire, dégageant ainsi l'espace pour la croissance des prolongements (Pittman *et al.* 1989; García-Rocha *et al.* 1994). Des travaux ont confirmés ces résultats, lorsque l'on inhibe ou supprime l'expression du tPA, il y a un arrêt de la croissance axonale. Réciproquement, la surexpression ou l'addition de tPA exogène accroît la pousse neuritique (Pittman *et al.* 1989; Baranes *et al.* 1998; Lee *et al.* 2007). Une étude plus récente a mis en évidence, à l'aide de cultures de neurosphères, que l'ajout de tPA provoquait la phosphorylation des récepteurs LRP5 et LRP6, ainsi que l'activation de la voie de signalisation Wnt-β-caténine, induisant la pousse neuritique (Lee *et al.* 2014). Le tPA joue également dans le cervelet un rôle dans la survie et la croissance des cellules de Purkinje. En effet, chez des souris montrant des dégénérescences des cellules de Purkinje, l'excès de tPA provoque un défaut dans l'arborisation dendritique de même qu'une synaptogénèse anormale, il en résulte une dérégulation de l'épaisseur du cortex (Li *et al.* 2013).

2.2- Interaction tPA et R-NMDA

La découverte de l'interaction directe du tPA avec les R-NMDA découle des travaux réalisés sur l'implication du tPA dans l'excitotoxicité. En 1995, Tsirka et collaborateurs montrent que le tPA provoque une mort neuronale consécutive à l'injection d'agonistes des récepteurs glutamatergiques (acide quisqualique, agoniste des récepteurs AMPA ; acide quinolinique, agoniste des récepteurs NMDA ; acide kaïnique, agoniste des récepteurs KA) dans l'hippocampe (régions CA1, CA2 et CA3) de souris sauvages. Cette dégénération neuronale n'est en revanche pas retrouvée chez des souris déficientes en tPA (Tsirka *et al.* 1995). Ils montrent ensuite chez ces mêmes souris que l'injection de tPA puis d'acide kaïnique conduit à la même mort neuronale observée chez les souris sauvages. Ils s'aperçoivent

également que l'administration conjointe d'acide kaïnique et de PAI-1 protège les neurones de souris sauvages de mort excitotoxique (**Figure 42**; Tsirka *et al.* 1996). Enfin, réciproquement ils découvrent que des souris n'exprimant pas de plasminogène résistent à la dégénération induite par le kaïnate (Tsirka *et al.* 1997). Cette équipe part sur l'hypothèse que c'est la conversion du plasminogène en plasmine active qui est responsable de cette mort excitotoxique observée dans l'hippocampe.

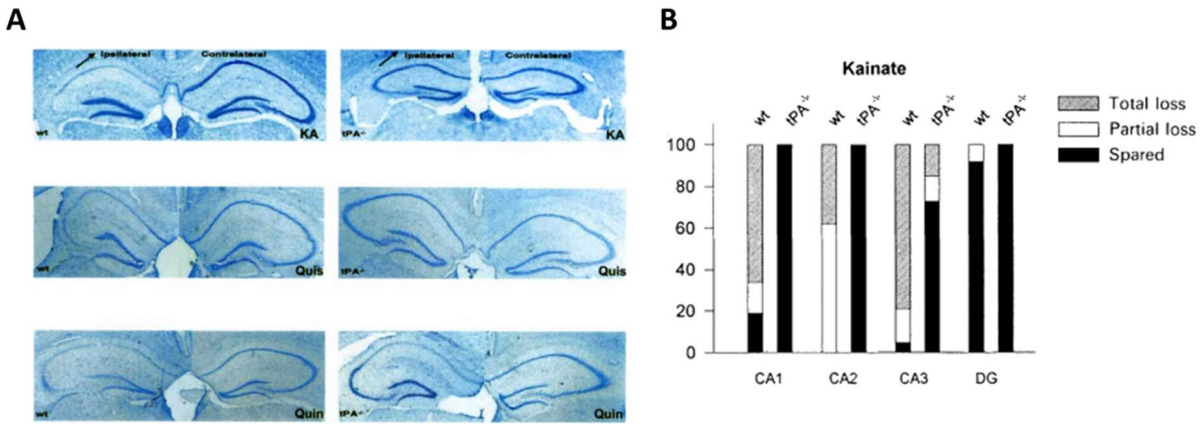


Figure 42 : Les souris tPA KO sont résistantes à la dégénérescence neuronale induite par l'excitotoxicité dans l'hippocampe.
A. Coloration au violet de crésyl de coupes coronales à travers l'hippocampe. Les agonistes glutamatergiques : kaïnate (KA, 1,5 nmol), quisqualate (Quis,20 nmol) et le quinolinate (Quin, 120 nmol) ont été injectés. Les cerveaux des souris ont été analysés 5 jours après l'injection. A gauche souris tPA WT; à droite, souris tPA KO. **B**. Mesure du pourcentage de la longueur de l'hippocampe présentant une perte neuronale totale, partielle ou pas de perte chez les souris tPA KO et WT. Les souris déficientes en tPA ne présentent pas de perte neuronale comparées aux souris sauvages (adapté de : Tsirka *et al.* 1995).

Des travaux du laboratoire ont montré en 2001, sur des neurones corticaux en culture cette fois ci, le lien direct entre le tPA et les R-NMDA. Le tPA est capable de venir cliver la portion N-terminale de la sous-unité GluN1 des NMDA-R. Le clivage va permettre de potentialiser l'influx de Ca^{2+} des récepteurs dans les neurones en présence de glutamate (Nicole *et al.* 2001). D'autres études de notre laboratoire ont caractérisé par la suite cette interaction entre les deux molécules. Il s'avère que le clivage se produit précisément au niveau de l'Arg^{260} de la sous-unité GluN1 des R-NMDA (Fernández-Monreal *et al.* 2004a). Grâce à la cristallographie et à des expériences de résonnance de surface plasmonique (SPR), il apparaitrait que le tPA puisse se fixer dans un premier temps sur la sous-unité GluN1 par le LBS de son domaine kringle 2. Puis dans un second temps, il cliverait par son domaine catalytique les sous unités GluN1 au niveau de l'Arg^{260} (Lopez-Atalaya *et al.* 2008). Seulement,

cette interaction n'est possible que si les deux protéines présentent des conformations adéquates. Plus précisément, seul le tPA simple chaine est en mesure de cliver la sous unité GluN1 (Parcq *et al.* 2012), et celui-ci clive de manière préférentielle les R-NMDA qui contiennent la sous unité GluN2D (Baron *et al.*, 2010). Enfin, en 2016 une étude de notre équipe a dévoilé que le tPA peut également venir se fixer sur la lysine^{178} des sous-unités GluN1. Cette interaction augmente la dynamique des NMDA-R extrasynaptiques qui seraient responsables de l'influx calcique nocif dans la cellule. (**Figure 43** ; Lesept *et al.*, 2016).

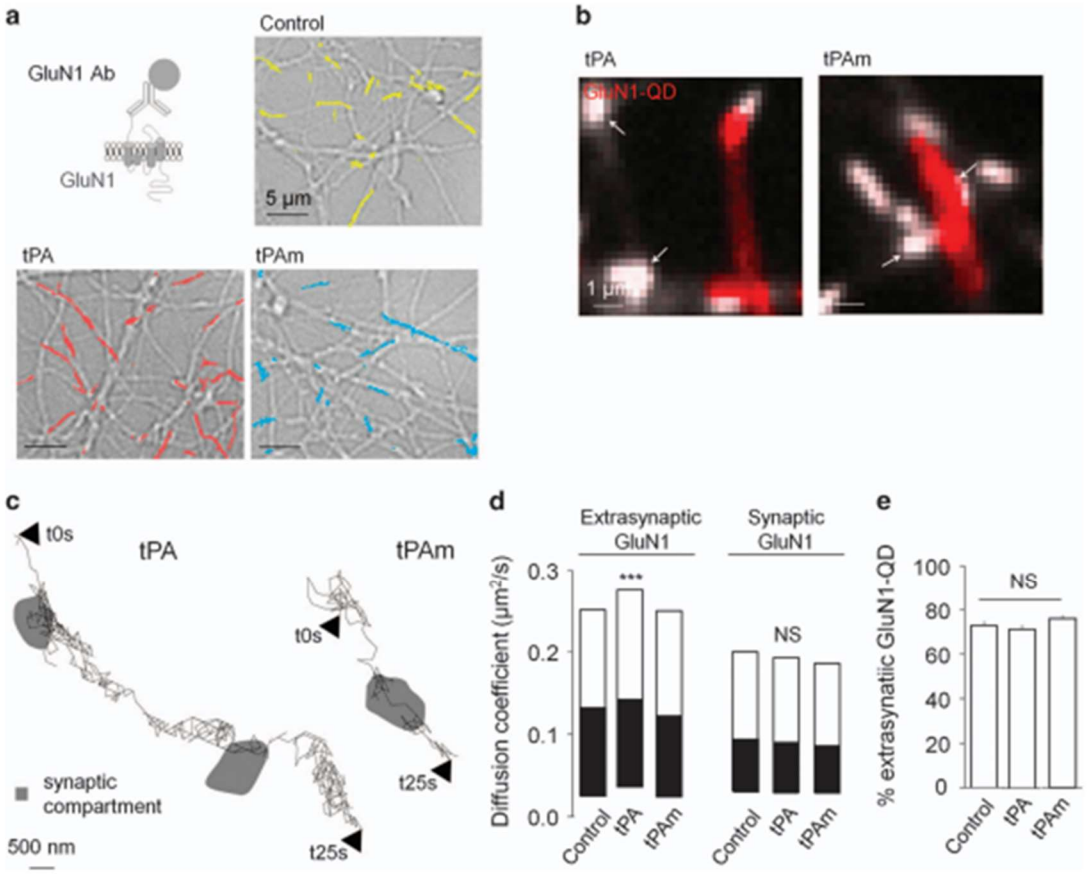


Figure 43 : Le tPA augmente sélectivement la diffusion extrasynaptique des GluN1-NMDAR.
(**a**) Représentation schématique du marquage de surface d'une sous-unité GluN1 à l'aide d'un seul complexe QD d'anticorps antiGluN1. Trajectoires représentatives de GluN1-QD (GluN1 QD) sur des neurones hippocampiques en culture (11-12 DIV) incubés 45 min avec un tampon (jaune), WT tPA (300 nM, rouge) ou un tPA non protéolytique (tPAm, 300 nM, cyan). (**b**) Trajectoires représentatives de la surface GluN1-QD (lignes rouges) à proximité et dans les synapses (flèches blanches). Les trajectoires synaptiques sont définies par leur colocalisation avec un étiquetage synaptique (Mitotracker, blanc), les trajectoires hors synapses étant considérées comme extrasynaptiques. (**c**) Trajectoires représentatives de GluN1-NMDAR suivies avec un anticorps contrôle GluN1 NTD (contrôle Ab) en présence de tPA ou de tPAm (300 nM les deux). (**d**) Distributions instantanées des coefficients de diffusion (médiane 25-75% IQR) des trajectoires extrasynaptiques versus GluN1-QD synaptique. Notez que la diffusion de surface de GluN1 est spécifiquement augmentée dans le compartiment extrasynaptique après incubation du tPA. (**e**) La fraction de GluN1-QD extrasynaptique est inchangée entre les différentes incubations (témoin 73 %, n = 18 ; tPAm 76 %, n = 20 ; tPA 71 %, n = 17 ; NS, non significatif, ANOVA à un facteur ; moyenne ± S.E.M (d'après : Lesept *et al.*, 2016).

En condition ischémique, le tPA est une protéine à double facettes. D'un côté elle intervient dans la dégradation du thrombus dans le compartiment vasculaire, et de l'autre elle potentialise la mort neuronale de type excitotoxique dans le parenchyme cérébral. Une équipe en 1999 a réalisé des occlusions de l'artère cérébrale moyenne chez des souris déficientes en tPA et chez des souris sauvages. Ils observent que l'absence de tPA chez les souris diminue de 50% les volumes de lésion, et que si on réalise une injection intra-parenchymateuse de tPA chez ces mêmes souris on augmente les volumes de lésion (Wang *et al.* 1998). Une autre étude plus récente décrit à l'inverse que le tPA atténue la mort neuronale de type excitotoxique. L'action du tPA passerait par des NMDA-R synaptiques contenant la sous-unité GluN2A qui sont responsables ensuite de l'activation de la voie Erk(1/2)-CREB-ATF3 (*cAMP response element binding-protein-activating transcription factor 3*)(Wu *et al.* 2013). Nous pouvons citer d'autres rôles, toujours dans le contexte ischémique, mais sans stimulation du NMDA-R. Le tPA peut activer la voie Akt/mTOR(*mammalian target of rapamycin*)/HIF1α (*hypoxia inducible factor1* α*),* qui entraine l'augmentation de la recapture du glucose ainsi qu'une neuroprotection (Wu *et al.,* 2012). Le tPA serait également neuroprotecteur par son rôle dans l'inhibition du stress du reticulum endoplasmique sur un modèle *in vitro* de privation de glucose et d'oxygène (Louessard *et al.,* 2017). Sur un modèle d'occlusion de l'artère carotide commune, nous observerons que le tPA provoque l'épaississement de la densité postsynaptique. Cela serait une réponse adaptative liée au stress métabolique de l'ischémie et permettrait de protéger la densité postsynaptique (Jeanneret *et al.,* 2016). Enfin, sur un modèle d'ischémie focale chez le rat, l'injection conjointe de tPA et d'un inhibiteur du protéasome est neuroprotecteur (Zhang *et al.,* 2010).

Notre équipe a developpé des stratégies moléculaires pour bloquer l'interaction tPA/ R-NMDA. En effet, la création d'un anticorps (Glunomab) dirigé spécifiquement contre la portion N-terminale de la sous-unité GluN1 permet d'empêcher la fixation du tPA. Cet anticorps a été testé dans un modèle d'ischémie thromboembolique chez la souris où il annule les effets délétères du tPA et permet de reculer la fenêtre thérapeutique d'injection du tPA (Macrez *et al.,* 2011). Il s'avère que l'administration seule de cet anticorps dans ce modèle suffit déjà à diminuer le volume de lésion (Macrez *et al.,* 2011). Le laboratoire a aussi développé des tPA modifiés comme le tPA-K2* qui présente un site LBS tronqué au sein de son domaine kringle 2. Dans des cultures de neurones corticaux ce tPA-K2* ne pouvant pas

interagir avec les R-NMDA, il ne potentialise pas la mort neuronale induite par le NMDA (Parcq *et al.,* 2013).

Une étude du laboratoire en 2012 montre que les deux formes sc-tPA et tc-tPA possèdent des effets sur la neurotransmission glutamatergique différents. Le tc-tPA ne présente pas d'effet pro-excitotoxique *in vivo* après injection striatale de NMDA, alors que le sc-tPA par sa fixation sur les NMDA-R potentialise l'entrée de Ca^{2+} dans les neurones et la mort neuronale de type excitotoxique. Au sein de cultures de neurones corticaux le tc-tPA diminue l'activation de la voie $Erk_{(1/2)}$ alors que le sc-tPA l'augmente (Parcq *et al.,* 2012). De plus, ces deux formes de tPA sont capables d'interagir avec les récepteurs à l'EGF. Lors de l'inhibition de ces récepteurs par l'AG1478 (inhibiteur spécifique des EGFR), on note que seul le tc-tPA peut induire la baisse de l'influx de Ca^{2+} aux dépens de ces récepteurs (Bertrand *et al.,* 2015). Les mécanismes impliqués dans ces différences d'effets sur la neurotransmission glutamatergique restent encore abstraits.

Il est possible également que le tPA active de manière indirecte les NMDA-R en passant par des interactions avec d'autres récepteurs comme les LRP1. En effet, des travaux ont observé que, sans clivage de la sous-unité GluN1 et sans plasminogène, le tPA potentialise quand même la signalisation des R-NMDA (Samson *et al.,* 2008). La même année une autre étude a été plus loin en précisant que cette potentialisation était liée aux LRP1. Cela est confirmé par l'ajout de RAP (inhibiteur de LRP1) sur des cultures de neurones d'hippocampes qui montre la disparition de la potentialisation calcique. Les auteurs pensent alors que par l'activation des LRP1 le tPA peut recruter la protéine d'échafaudage PSD-95, qui rapprocherait spatialement les R-NMDA et LRP1. Cette PSD-95 joue un rôle fondamental dans l'augmentation de la phosphorylation de $Erk_{(1/2)}$ et dans l'activation des NMDA-R (Martin *et al.,* 2008). Ces observations viennent enrichir l'idée que le tPA en jouant sur les NMDA-R et LRP1 peut moduler la plasticité de certaines régions du cerveau.

2.3 - Rôle du tPA dans la plasticité synaptique

En conditions physiologiques, le tPA est fortement exprimé dans les régions dans lesquelles nous retrouvons beaucoup ces phénomènes de LTP, comme l'hippocampe et l'amygdale (Sappino *et al.* 1993a; Teesalu *et al.* 2004). Une équipe a montré en 1993 que le tPA joue un rôle dans la LTP. Effectivement, après l'activation de neurones hippocampiques,

il y a une amplification rapide de la quantité d'ARNm du tPA (**Figure 44 ;** Qian *et al.* 1993). Il a aussi été observé que l'on avait une augmentation similaire de ces ARNm dans les cellules de Purkinje au sein de cervelet de rats soumis à l'apprentissage de tâches motrices (Seeds *et al.* 1995).

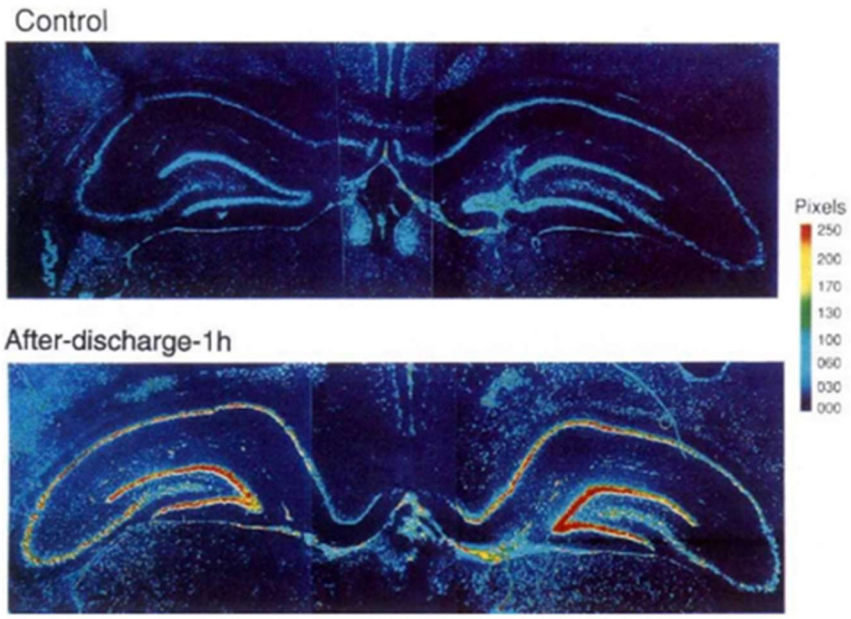


Figure 44 : Synthèse d'ARN messager du tPA suite à une activation neuronale.
Hybridation in situ des ARNm du tPA de rat au niveau de l'hippocampe après une stimulation électrique dans le gyrus dentelé (Qian *et al.* 1993).

Chose intéressante, l'ajout d'inhibiteurs du tPA dans des cultures de neurones interfère et affaiblit la phase tardive de la LTP. Au même titre que l'ajout de tPA exogène dans ces mêmes cultures favorise et potentialise cette phase tardive (Baranes *et al.* 1998). Pour aller encore plus loin, des travaux du laboratoire ont montré que l'effet du tPA sur la LTP serait principalement mené par le sc-tPA (Parcq *et al.* 2012a). L'effet du tPA dans la LTP est aussi visible au niveau du comportement des rongeurs. Des travaux montrent que des souris, qui expriment de manière disproportionnée le tPA, ont une augmentation des capacités d'apprentissage et de mémorisation par l'exacerbation de son implication dans la LTP (Madani *et al.* 1999). La réciproque est également vérifiée, les souris n'exprimant pas de tPA montrent un déficit dans ces capacités, ce déficit est gommé par l'infusion de tPA directement dans l'hippocampe (Pawlak *et al.* 2002).

La fixation du tPA sur d'autres récepteurs synaptiques peut aussi expliquer son rôle dans la LTP. En effet le tPA peut se fixer sur les récepteurs LRP, en particulier sur les LRP1

favorisant l'établissement de la LTP par l'activation de cascades moléculaires dépendantes de la protéine kinase A. De plus, l'ajout d'un inhibiteur des LRP bloque la potentialisation du tPA sur la LTP (Zhuo *et al.* 2000). Le tPA peut également venir se fixer sur les récepteurs à l'annexine II reportés comme pouvant potentiellement être les piliers de l'effet du tPA sur la plasticité (Lee *et al.* 2007).

Le tPA peut aussi participer indirectement à la phase tardive de la LTP en interagissant avec le plasminogène. Il peut par la conversion du plasminogène en plasmine active (Plow *et al.* 1995) dégrader les composants de la matrice extracellulaire et ainsi favoriser la croissance synaptique (Chen and Strickland 1997; Wu *et al.* 2000). De plus une fois la plasmine activée, elle va pouvoir convertir le pro-BDNF (*brain-derived neurotrophic factor*) en BDNF mature (Pang and Lu 2004), un facteur de croissance important dans le développement et la différenciation de nouveaux neurones et de nouvelles synapses. Ce rôle du tPA est confirmé par une étude menée sur des souris déficientes en tPA et en plasminogène. En effet, ces souris montrent des déficits dans l'établissement de la phase tardive de la LTP. L'ajout du précurseur inactif du BDNF, le pro-BDNF, chez ces souris n'amène aucune modification alors que l'addition de BDNF mature comble ces déficits (Pang *et al.* 2004).

Le tPA peut moduler le phénomène de LTP de manière complexe en agissant simultanément sur plusieurs mécanismes :

1 - Son interaction avec les R-NMDA (Qian *et al.* 1993).

2 - Sa fixation sur les récepteurs de type LRP1 passant par les cascades de signalisation activées par la protéine kinase A (Zhuo *et al.* 2000).

3 - Par la conversion du plasminogène en plasmine qui va permettre :

- La dégradation de la matrice extracellulaire facilitant la naissance de nouvelles synapses, ainsi que la croissance des synapses déjà formées en dégageant l'espace autour des structures synaptiques (Baranes *et al.* 1998).
- L'activation du Pro-BDNF en BDNF mature indispensable dans les phénomènes de plasticité, notamment la LTP (Pang *et al.* 2004).

4 - Par sa capacité à cliver la reeline, une protéine importante dans la régulation des fonctions synaptiques (Trotter *et al.* 2014).

2.4 - Le tPA dans l'apoptose

L'apoptose est le processus selon lequel les cellules déclenchent leur autodestruction en réponse à un signal. Elle représente l'une des voies de mort cellulaire qui a la particularité d'être physiologiquement et génétiquement programmée. Au contraire d'une autre voie de mort cellulaire comme la nécrose, l'apoptose ne provoque pas de réponse inflammatoire dans un premier temps car l'intégrité de la membrane plasmique de la cellule reste intacte. Assez rapidement les cellules empruntant cette voie vont exposer dans le feuillet externe de leur membrane plasmique de la phosphatidylsérine (d'ordinaire sur le feuillet interne), permettant d'être reconnues et phagocytées par les globules blancs (macrophages). L'apoptose est un processus très important durant le développement de l'organisme et également dans l'adaptation du système immunitaire, mais il peut jouer un rôle aussi dans de nombreuses pathologies.

Le rôle du tPA dans l'apoptose a été au départ controversé. Une étude lui attribuait plutôt un effet pro-apoptotique à la fois sur des cellules endothéliales soumises à une hypoxie et à la fois sur des neurones corticaux de souris traités au NMDA (Liu *et al.* 2004). Une autre étude montre qu'une activation microgliale peut aboutir à une exocytose de tPA qui serait responsable de l'activation d'une voie de signalisation menant à l'apoptose des neurones (Flavin *et al.* 2000). Plus récemment, d'autres études suggèrent plutôt un rôle anti-apoptotique du tPA. En effet, des travaux du laboratoire montrent que le tPA possède un effet anti-apoptotique sur des neurones corticaux de souris privées de sérum. Cette action passerait par une réduction du clivage de la protéine caspase 3 (protéine très importante de la cascade apoptotique) et ne serait pas liée à son activité protéolytique ni à une interaction avec LRP (**Figure 45** ; Liot *et al.* 2006). De plus, le tPA serait capable d'activer la voie phosphatidylinositol-3-Kinase (PI3K) /Akt dans les oligodendrocytes, les protégeant ainsi de l'apoptose, et éviterait les dommages de la substance blanche (Correa *et al.* 2011). L'utilisation de propofol (anesthésique) sur des neurones hippocampiques provoque la survenue d'apoptose. Une équipe a démontré que le traitement antérieur de ces neurones avec du tPA réduit la survenue de cette apoptose neuronale induite (Liang *et al.* 2016). Dernièrement, une autre équipe a observé qu'après un traumatisme crânien, l'inhibition du tPA endogène par la neuroserpine active la mort neuronale apoptotique (Zhao *et al.* 2020).

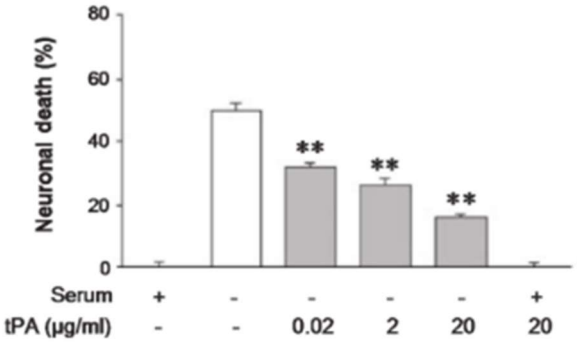


Figure 45 : **Le tPA protège les neurones de l'apoptose induite par un sevrage en sérum.**
(Liot *et al.* 2006)

Les récepteurs impliqués dans les effets du tPA sur le phénomène d'apoptose restent encore discutés. Des études suggèrent l'activation des récepteurs à l'annexine II (Lee *et al.* 2007), d'autres celle des NMDA-R qui contiennent la sous-unité GluN2A (Echeverry *et al.,* 2010), et plus récemment les derniers travaux mettent en avant le rôle des EGF-R (Correa *et al.* 2011b; Henry *et al.* 2013; Bertrand *et al.* 2015; Lemarchand *et al.* 2016). Il n'est bien entendu pas exclu qu'il y ait une collaboration de l'ensemble de ces récepteurs dans la conduite de l'effet du tPA dans l'apoptose.

2.5 - Le tPA dans l'inflammation

Dans le parenchyme cérébral, les cellules responsables des défenses immunitaires sont les cellules microgliales. Elles appartiennent à la lignée des macrophages, des cellules capables de phagocytose, et forme la seule population de cellules résidentes du SNC d'origine non neurectodermique. Elles sont décrites comme étant la plupart du temps quiescentes mais ont la particularité de s'activer suite à une lésion ou une attaque du SNC. Une fois actives, elles se mettent à sécréter un grand nombre de molécules pro-inflammatoires comme les cytokines et chemokines, qui peuvent être nocives pour les neurones avoisinants (Block and Hong 2005).

Chez des animaux déficients en tPA, après la survenue d'une lésion excitotoxique, on observe non seulement une réaction microgliale atténuée mais aussi une mort neuronale plus faible (**Figure 46** ; Rogove *et al.,* 1999). Le tPA peut activer directement les cellules microgliales en se fixant sur leurs récepteurs à l'annexine II *via* son domaine finger. La microglie activée va à son tour libérer de nombreux facteurs toxiques qui favorisent les processus neurodégénératifs (Siao and Tsirka 2002). Le tPA lui-même « peut » aussi être libéré comme

une cytokine et venir moduler la mort neuronale en activant diverses voies de signalisation (Siao *et al.* 2003a).

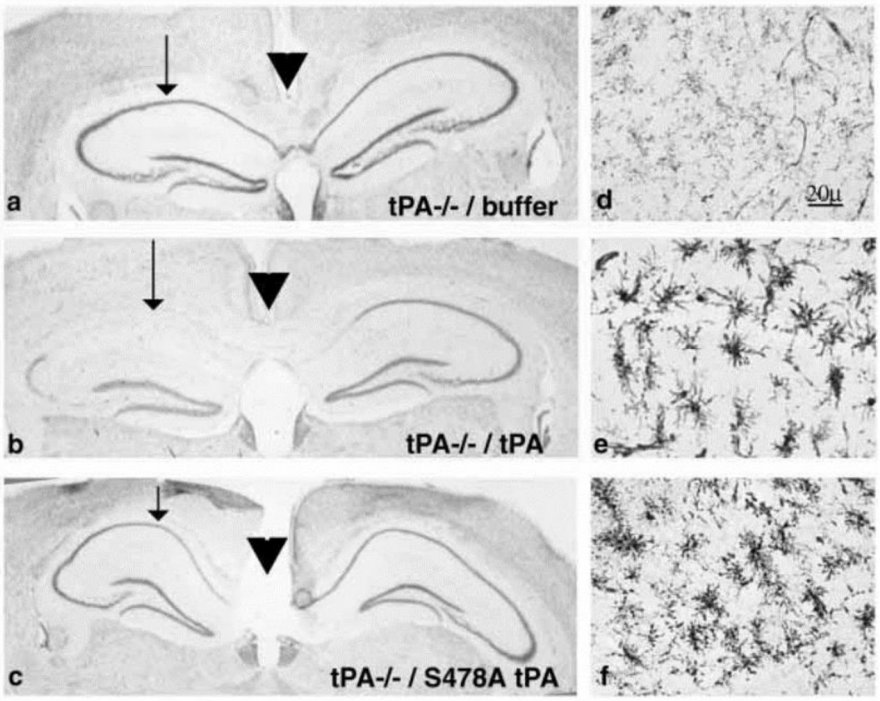


Figure 46 : Effets du tPA actif et inactif (S478A tPA) sur la mort neuronale induite par une injection de kaïnate dans l'hippocampe et sur l'activation microgliale.
(a) L'injection intra-hippocampique de kaïnate n'a pas d'effet sur la mort neuronale chez les souris déficientes en tPA (tPA -/-) et n'induit pas d'activation microgliale (d). L'injection de tPA et de kaïnate, chez des souris déficientes en tPA, induit une mort neuronale hippocampique (b) et une activation des cellules microgliales (e). L'injection de tPA inactif (S478A tPA) chez des souris déficientes en tPA, et en kaïnate n'entraine pas de mort neuronale hippocampique (c) mais engendre une activation des cellules microgliales (f). La mort neuronale est visualisée par une coloration au crésyl-violet sur des coupes de cerveaux de souris et l'activation microgliale est révélée par un anticorps contre l'antigène F4/80 (Rogove *et al.*, 1999).

Une équipe par la suite a mis en avant l'interaction du tPA avec les LRP qui activerait les cellules microgliales. Dans un modèle d'ischémie cérébrale, il s'avère que les souris déficientes en LRP microgliaux présentent un taux de MMP-9 réduit et un œdème cérébral moins important. Lors de l'injection exogène de tPA chez des souris tPA KO, il y a une augmentation de l'activation microgliale mais elle n'est pas observée sur les souris déficientes en LRP. Cette expérience montre bien qu'en condition ischémique les LRP sont impliqués dans la réponse inflammatoire (**Figure 47** ; Zhang *et al.*, 2009).

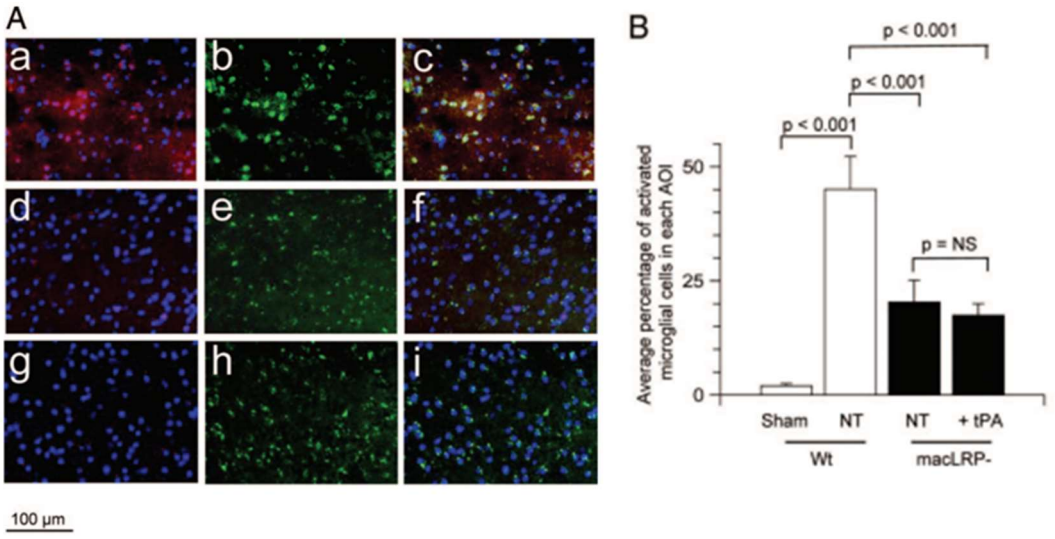


Figure 47 : LRP1 médie l'activation microgliale induite par le tPA après une MCAO.
A: Micrographies représentatives correspondant à l'analyse immunohistochimique pour β-isolectine et F4/80 dans les aires d'intérêt 24 heures après MCAO chez les souris de type sauvage (a–c) et macLRP$^{-/-}$ (d–i). g–i correspondent à des souris macLRP$^{-/-}$ traitées avec du tPA immédiatement après MCAO. c-f et représentent les images fusionnées. Le bleu est le DAPI, le rouge est F4/80 et le vert est β-isolectine. **B** : Le pourcentage moyen des cellules microgliales activées dans chaque aire d'intérêt 24 heures après MCAO chez les souris WT (barres blanches) et macLRP$^{-/-}$ (barres noires), non traitées (NT) ou injectées par voie intracérébrale avec du tPA immédiatement après la MCAO (+tPA) (d'après : Zhang *et al.*, 2009).

En plus d'agir sur les cellules de la microglie, le tPA est capable de recruter d'autres cellules du système immunitaire circulantes comme les polynucléaires neutrophiles. En effet, il a été montré que le tPA peut promouvoir la transmigration des neutrophiles en passant par l'activité de la MMP-9. Le tPA serait en mesure d'amener une dégranulation des neutrophiles qui se mettraient alors à libérer de la MMP-8, MMP-9, de l'élastase ou encore de la myéloperoxydase (Rosell *et al.* 2008; Carbone *et al.* 2015). Une équipe a montré que cette dégranulation induite par le tPA serait médiée par l'activation de la voie PI3K/Akt et la voie Erk$_{(½)}$ (Carbone *et al.* 2015). De plus, la conversion du plasminogène en plasmine par le tPA peut conduire également à l'activation de la pro-forme de MMP-9 amenant une activité plus importante de celle-ci dans la migration transmurale des neutrophiles. Le récepteur responsable de l'activation des neutrophiles par le tPA n'est à ce jour toujours pas connu. Ce que proposent les auteurs à présent, c'est que les propriétés protéolytiques et non protéolytiques du tPA sont en jeu dans ce phénomène de recrutement et de dégranulation. Les propriétés non protéolytiques du tPA lui permettraient de venir se fixer sur les neutrophiles pour les activer (possiblement *via* ses domaines kringles) et amener une dégranulation leucocytaire et amplifier la libération de MMP-9. Quant à ses propriétés

protéolytiques, elles lui permettraient, en passant par l'activation de la plasmine, d'entraîner la conversion de la pro-MMP-9 en MMP-9 active (**Figure 48**; Mehra *et al.* 2016).

Enfin, le tPA aurait la capacité d'activer les mastocytes, favorisant la production de médiateurs lipidiques (leucotriènes) qui accentueraient l'inflammation et la diapédèse des leucocytes (Uhl *et al.* 2014). Il est important de noter que ces mastocytes sont aussi une source de tPA (Valent *et al.* 2002) et donc qu'ils peuvent aussi jouer sur la migration des leucocytes.

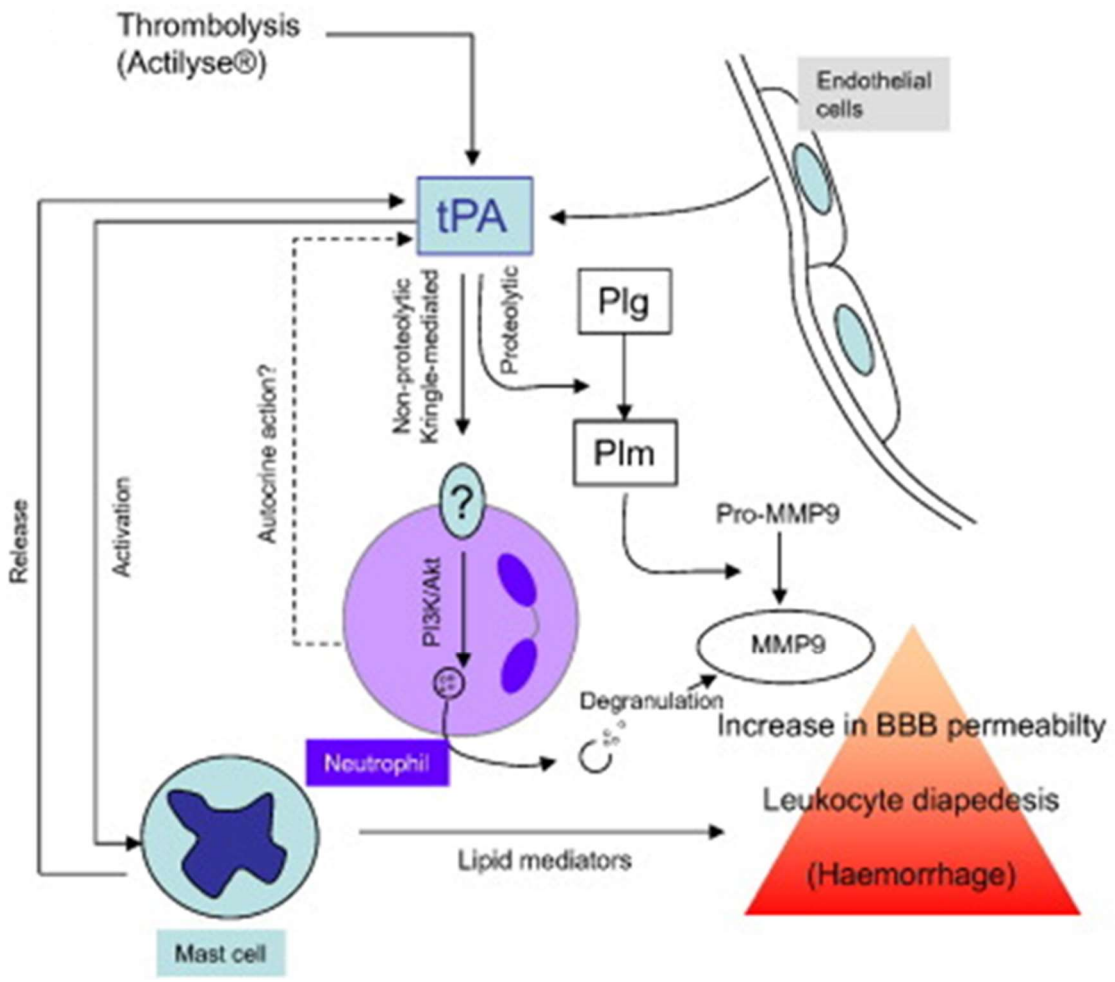


Figure 48 : **Effets du tPA sur l'activation des neutrophiles**.
Le tPA provoque la dégranulation des neutrophiles par une activation non-protéolytique d'un récepteur encore inconnu. Ceci engendre l'activation des voies PI3K et Akt, et conduit à la libération de MMP-9. En parallèle, par l'intermédiaire de son activité protéolytique, le tPA peut activer le pro-MMP-9 en MMP-9 active. MMP-9 augmente alors la perméabilité de la BHE et la diapédèse leucocytaire. En parallèle, le tPA orchestre une diaphonie entre les neutrophiles et les mastocytes : le tPA peut activer les mastocytes, qui libèrent alors des médiateurs lipidiques qui aggravent les effets sur la BHE. Les mastocytes, en retour, peuvent augmenter la production de tPA. (D'après : Mehra *et al.* 2016.)

2.6 - Implications du tPA dans les processus cognitifs

Chez l'Homme, les processus cognitifs correspondent à la succession d'opérations mentales en rapport avec l'assimilation des connaissances, leur stockage et leur traitement. Ces processus s'appliquent surtout à nos fonctions cérébrales complexes comme la perception, la mémoire, le langage ou encore la prise de décision. Lors de l'acquisition d'une nouvelle connaissance par le cerveau, il y a deux mécanismes fondamentaux qu'exploitent ces processus cognitifs. D'abord l'assimilation, qui représente l'appropriation d'une information et la manière dont on la décrypte : cela amène alors un changement de l'étendue des connaissances de l'individu. Puis l'accommodation, qui se met en place une fois que nous avons traité l'information et qui correspond à l'adaptation d'une conduite en réaction à notre environnement.

Le tPA est une protéine en grand partie exprimée par l'hippocampe et nous avons vu également que dans cette région comme d'en d'autre elle était impliquée dans le phénomène de plasticité synaptique. Des études ont mis en évidence que le tPA jouait un rôle dans l'apprentissage et la mémoire spatiale. En effet, des expériences de reconnaissance d'objets ont montré que les souris déficientes en tPA affichaient des déficits de mémoire spatiale et d'exploration (Calabresi *et al.* 2000; Benchenane *et al.* 2007). Plus précisément, c'est l'interaction entre le tPA et la sous-unité GluN1 des NMDA-R qui semble être le mécanisme mis en jeu dans la mémoire spatiale, car le blocage sélectif de cette interaction chez des souris sauvages amène les mêmes déficits (Benchenane *et al.* 2007). Une étude du laboratoire a montré ensuite que concernant la mémoire spatiale le tPA interagit spécifiquement avec les R-NMDA contenant la sous-unité GluN2D (Obiang *et al.* 2012).

En plus de l'hippocampe, nous retrouvons une forte expression du tPA au niveau de l'amygdale ainsi que dans le noyau de la strie terminale. Ces régions sont connues pour être le siège des phénomènes d'anxiété, de stress et de peur. Des études ont noté que les souris déficientes en tPA étaient de nature moins anxieuses que les souris sauvages (Pawlak *et al.* 2003; Matys *et al.* 2004). Réciproquement, des souris déficientes en neuroserpine (inhibiteur du tPA) présentent plus d'anxiété dans leur comportement que les souris sauvages (Madani *et al.* 2003). De plus, le tPA joue un rôle dans l'acquisition ainsi que dans le rappel des stimuli dans le contexte de peur (Huang *et al.* 1996; Calabresi *et al.* 2000).

2.7 - Le tPA et la substance blanche

Le tPA peut être retrouvé au niveau de la substance blanche du SNC, nous avons décrit précédemment que les oligodendrocytes sont en mesure de le sécréter. Lors de la survenue de lésions dans la substance blanche, le tPA intervient dans certains mécanismes tels que la régénération axonale et la remyélinisation. En conditions inflammatoires, on observe la formation de dépôts de fibrine dans la zone de la lésion. Ils vont être responsables de l'amplification de la réaction inflammatoire et vont aggraver la dégénération axonale. Le tPA grâce à son activité protéolytique dégrade ces dépôts de fibrine et joue un rôle protecteur contre ces dommages (**Figure 49** ; Akassoglou *et al.* 2000). Une deuxième étude observe que la régénération axonale médiée par le tPA passe par un mécanisme indépendant de la conversion du plasminogène en plasmine (Minor *et al.* 2009).

Le tPA a aussi été étudié dans des modèles neuro-inflammatoires tel que la sclérose en plaques. En effet, une équipe décrit que la dégradation des dépôts de fibrine par le tPA est nettement moins efficace dans cette pathologie, ceci étant lié à une augmentation de l'expression de PAI-1 et une réduction de celle du tPA (Gveric *et al.* 2001; Gveric *et al.* 2003). Toujours dans cette même pathologie, des études montrent que les souris déficientes en tPA présentent des symptômes plus sévères et récupèrent moins bien que les souris sauvages (Lu *et al.* 2002; East *et al.* 2005). Réciproquement, les souris cette fois déficientes en PAI-1 montrent un retard dans la survenue des symptômes et la sévérité de la pathologie est moins importante que chez les souris sauvages (East *et al.* 2008).

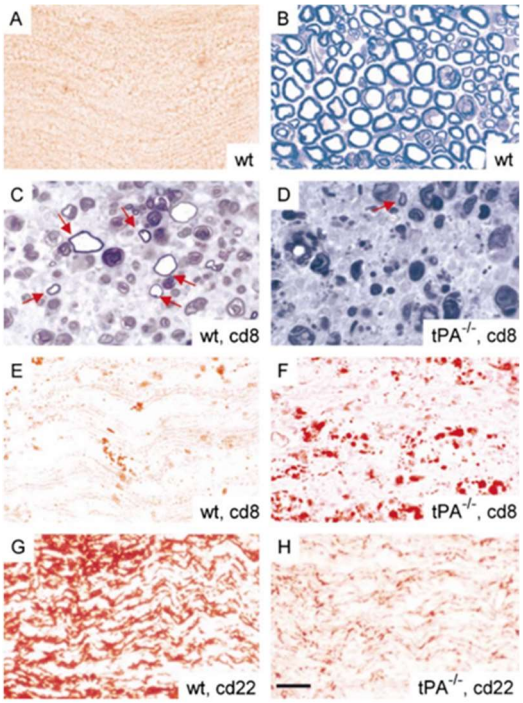


Figure 49 : La dégénérescence axonale et la démyélinisation sont exacerbées chez les souris déficientes en tPA après écrasement du nerf sciatique.
La Coloration à l'huile rouge O de sections de cryostat indemne de nerf sciatique de souris sauvages (**A**) a révélé une distribution normale de la myéline et la coloration en bleu de toluidine des sections transversales du nerf sciatique a montré une morphologie axonale normale (**B**). 8 jours après écrasement (cd8), la coloration au bleu de toluidine de sections transversales de souris sauvages (**C**) a montré plus d'axones myélinisés (flèches) que les souris tPA$^{-/-}$(**D**). La coloration à l'huile rouge O a montré une accumulation accrue de myéline et de débris lipidiques dans le nerf sciatique chez les souris tPA$^{-/-}$ (**F**) par rapport au type sauvage (**E**). 22 jours après écrasement (cd22), la coloration de la myéline par la protéine basique a révélé moins d'axones myélinisés dans les nerfs de souris tPA$^{-/-}$ (**H**) que chez les souris sauvages (**G**). Barre d'échelle : 18 mm (d'après : Akassoglou *et al.*, 2000).

Le tPA est capable par l'activation du plasminogène en plasmine de remodeler la MEC. Il va ainsi pouvoir dégrader notamment les chondroïtines sulfates et protéoglycanes (CSPGs) qui empêchent et inhibent la repousse axonale (Bukhari *et al.* 2011). Une étude réalisée dans notre équipe a montré que le tPA pouvait activer la protéine ADAMTS-4 (A disintegrin and metalloproteinase with thrombospondin motifs 4) capable de dégrader ces CSPGs. Cette activation va alors permettre de favoriser la repousse axonale ainsi que la récupération fonctionnelle dans un modèle de traumatisme médullaire (Lemarchant *et al.* 2014). Chose intéressante, ADAMTS-4 est une protéase sécrétée en conditions physiologiques par les oligodendrocytes pour favoriser la myélinisation (Pruvost *et al.*, 2017). Pour finir, lors d'une lésion de la substance blanche, le tPA aide à la migration et à la survie des oligodendrocytes en interagissant avec les EGF-R présents à leur membrane (Correa *et al.*, 2011 ; Leonetti *et al.*, 2017).

Pour résumer cette dernière partie de l'introduction, le tPA est une sérine protéase aux nombreuses fonctions. Par sa structure avec plusieurs domaines, le tPA possède un interactome conséquent avec de multiples protéines et récepteurs dans l'ensemble de l'organisme. Il existe sous deux formes distinctes (sc-tPA et tc-tPA) enzymatiquement actives aux rôles parfois opposés, complexifiant ainsi ces différentes implications.

Historiquement découvert dans le compartiment vasculaire, il joue un rôle central dans l'hémostase. C'est par cette fonction de clivage du plasminogène en plasmine, qu'il participe à la dégradation des caillots sanguins riches en fibrine, et qui lui vaut d'être utilisé comme agent pharmacologique dans le traitement des AVC ischémiques.

Le tPA est une protéine également exprimée dans le SNC par plusieurs types cellulaires différents. Au sein du parenchyme cérébral le tPA s'avère impliqué dans de nombreuses fonctions aussi bien bénéfiques (développement, plasticité, mémoire …) que délétères (altération de la BHE, apoptose, excitotoxicité…).

Au niveau des neurones, le tPA est considéré aujourd'hui comme un neuromodulateur. Il est exprimé, véhiculé et libéré par les neurones suite à une dépolarisation. Une fois dans la fente synaptique, il interagit avec de nombreux récepteurs postsynaptiques (NMDA, EGF, LRP…) et peut également être recapturé par les astrocytes.

Projet de thèse

Dans le SNC, le tPA est exprimé par un certain nombre de cellules, parmi lesquelles on compte les neurones. On considère aujourd'hui que le tPA est un neuromodulateur de la neurotransmission gutamatergique car il est synthétisé par les neurones et libéré à la suite d'une dépolarisation neuronale. De plus, il a la capacité d'interagir avec plusieurs récepteurs postsynaptiques et de se faire recapturer par les astrocytes avoisinants. En jouant ce rôle, le tPA se retrouvent par conséquent impliqué dans de nombreuses fonctions cérébrales à la fois bénéfiques (survie neuronale et plasticité synaptique) et délétères (inflammation, excitotoxicité). Des études ont montré que le tPA joue un rôle direct dans la plasticité synaptique en interagissant avec la sous-unité GluN1 des R-NMDAs et potentialisant ainsi l'influx de Ca^{2+} dans les neurones (Nicole *et al.* 2001), mais aussi indirect en activant des neurotrophines (par l'intermédiaire de la plasmine) comme le BDNF (Pang *et al.* 2004).

Il est admis à l'heure actuelle que le tPA est transporté dans les neurones par des DCVs (Lochner *et al.* 1998; Silverman *et al.* 2005) et libéré par exocytose au niveau des extrémités pré et postsynaptiques (Lochner *et al.* 2006; de Wit *et al.* 2009). De plus, le tPA a été mis en évidence dans un sous-type de DCVs contenant la synaptobrévine 2 (VAMP2) (Louessard *et al.* 2016). Cependant, aucune étude n'a à ce jour décrit précisément le comportement des vésicules à tPA dans les neurones corticaux dans différentes conditions d'activité (LTP/LTD). La mise en évidence de la présence d'une colocalisation entre le tPA et VAMP2 n'a jamais été montrée directement en microscopie.

L'implication du tPA dans la neurotransmission glutamatergique n'est plus a démontré, seulement il reste encore quelques zones d'ombres sur les répercussions de son interaction avec les R-NMDAs. Nous ne connaissons pas par exemple si l'amplification de l'influx de Ca^{2+} dans les neurones par le tPA amène une augmentation de la libération de vésicules synaptiques et même de DCVs. De nouvelles études décrivent en plus depuis plusieurs années l'existence de R-NMDAs présynaptiques complexifiant le rôle du tPA dans la potentialisation des élément pré et postsynaptiques. Des renseignements sur la manière dont est transporté et libéré le tPA dans les neurones permettraient de mieux comprendre sa fonction synaptique.

Mes travaux de thèse visent donc à caractériser de manière précise le trafic du tPA ainsi que sa libération dans les neurones corticaux en activité pour une meilleure compréhension de son implication dans les mécanismes physiopathologiques. Pour cela, nous avons utilisé l'incorporation de plasmides codant pour des protéines fusion du tPA (tPA-

HaloTag®, HaloTag®-tPA-SEP) pour le surexprimer *in vitro* dans des cultures de neurones corticaux.

Nous savons qu'actuellement peu d'études approfondissent le rôle du tPA dans les neurones, les données dont nous disposons à ce sujet sont les suivantes :

- Le tPA est exprimé par les neurones de différentes régions cérébrales
- Il est en majorité retrouvé dans des neurones excitateurs glutamatergiques
- Il est véhiculé dans des vésicules à cœur denses synaptobrévine 2 positives (VAMP2)
- Il est libéré à la synapse à la suite d'une dépolarisation neuronale
- Il peut se fixer sur différents récepteurs une fois libéré dans le milieu extracellulaire

Les questions que nous nous sommes posés dans le cadre de mon projet de thèse sont :

- Comment se comportent les vésicules contenant le tPA dans les dendrites et dans les axones des neurones corticaux en conditions de repos, d'activation et d'inhibition ?
- Comment le tPA est-il libéré au niveau des extrémités pré et postsynaptiques dans ces différentes conditions ?
- Le tPA et VAMP2 partagent-ils des similitudes dans leur trafic respectif ?
- Le tPA influence-t-il la libération de glutamate par les neurones ?
- Y a-t-il une altération du trafic du tPA dans un contexte pathologique des neurones (Tauopathie) ?

Ces travaux ont donné lieu à la rédaction de deux publications :

1 - «*Post-synaptic Release of the Neuronal Tissue-Type Plasminogen Activator (tPA)*» dans *Frontiers in Cellular Neuroscience* en 2019 en tant que deuxième auteur.

2 - «*Modulations of the neuronal trafficking of tPA influences the glutamate release: a mechanism impaired in a model of tauopathy*» en cours de preparation.

Résultats

Article 1: Post-synaptic Release of the Neuronal Tissue-Type Plasminogen Activator (tPA)

Lenoir S, **Varangot A**, Lebouvier L, Galli T, Hommet Y, Vivien D (2019). Post-synaptic Release of the Neuronal Tissue-Type Plasminogen Activator (tPA). *Frontiers in Cellular Neuroscience* 13, 164. doi:10.3389/fncel.2019.00164

Contexte bibliographique :

L'activateur tissulaire du plasminogène (tPA) est une serine protéase qui a initialement été découverte dans le compartiment vasculaire pour son implication dans la fibrinolyse. Le tPA peut être exprimé par un certain nombre de cellules du parenchyme cérébral comme les neurones. Le tPA a d'ores et déjà été décrit comme étant transporté dans les neurones dans des vésicules à cœur denses (Silverman *et al.* 2005), et comme étant libéré dans le milieu extracellulaire à la suite d'une dépolarisation neuronale (Nicole *et al.* 2001; Fernández-Monreal *et al.* 2004b; Lochner *et al.* 2006; de Wit *et al.* 2009). Cependant, la distribution et le trafic du tPA n'ont jamais été précisément décrit dans les différents compartiments neuronaux.

Objectifs de l'étude :

Au cours de cette étude, nous avons voulu mieux décrire la distribution et le trafic du tPA dans les neurones corticaux en conditions basales (sans modification de l'activité des neurones).

Principaux résultats :

- Il y a plus de vésicules à tPA statiques dans les dendrites que dans les axones ;
- Le tPA est présent dans des vésicules d'exocytose VAMP2 à la fois dans les axones et les dendrites ;
- Le tPA est majoritairement libéré par le compartiment post-synaptique;
- Le tPA est endocyté par des vésicules Rab5, recylé par des vésicules Rab11 et dégradé par des vésicules Rab7 ;
- Le tPA et le BDNF sont transportés et leur trafic s'effectue dans les mêmes vésicules synaptiques.

frontiers in Cellular Neuroscience

ORIGINAL RESEARCH
published: 24 April 2019
doi: 10.3389/fncel.2019.00164

Post-synaptic Release of the Neuronal Tissue-Type Plasminogen Activator (tPA)

Sophie Lenoir[1], *Alexandre Varangot*[1], *Laurent Lebouvier*[1], *Thierry Galli*[2], *Yannick Hommet*[1†] *and Denis Vivien*[1,3*†]

[1] *Physiopathology and Imaging of Neurological Disorders, UNICAEN, INSERM, UMR-S U1237, Normandie Université, Caen, France,* [2] *Membrane Traffic in Healthy & Diseased Brain, Center of Psychiatry and Neurosciences, INSERM U894, Sorbonne Paris-Cité, Université Paris Descartes, Paris, France,* [3] *Department of Clinical Research, Caen University Hospital, CHU Caen, Caen, France*

The neuronal serine protease tissue-type Plasminogen Activator (tPA) is an important player of the neuronal survival and of the synaptic plasticity. Thus, a better understanding the mechanisms regulating the neuronal trafficking of tPA is required to further understand how tPA can influence brain functions. Using confocal imaging including living cells and high-resolution cell imaging combined with an innovating labeling of tPA, we demonstrate that the neuronal tPA is contained in endosomal vesicles positives for Rabs and in exosomal vesicles positives for synaptobrevin-2 (VAMP2) in dendrites and axons. tPA-containing vesicles differ in their dynamics with the dendritic tPA containing-vesicles less mobile than the axonal tPA-containing vesicles, these laters displaying mainly a retrograde trafficking. Interestingly spontaneous exocytosis of tPA containing-vesicles occurs largely in dendrites.

Keywords: tissue-type plasminogen activator, trafficking, vesicles, synapses, neurons

OPEN ACCESS

Edited by:
Marco Martina,
Northwestern University, United States

Reviewed by:
Zhuan Zhou,
Peking University, China
Marina Guizzetti,
Oregon Health & Science University, United States

****Correspondence:***
Denis Vivien
vivien@cyceron.fr

[†] These authors have contributed equally to this work

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

Received: *29 January 2019*
Accepted: *08 April 2019*
Published: *24 April 2019*

Citation:
Lenoir S, Varangot A, Lebouvier L, Galli T, Hommet Y and Vivien D (2019) Post-synaptic Release of the Neuronal Tissue-Type Plasminogen Activator (tPA). Front. Cell. Neurosci. 13:164. doi: 10.3389/fncel.2019.00164

INTRODUCTION

Tissue-type plasminogen activator (tPA) is a serine protease which was first shown to be produced by endothelial cells and released in the blood stream, where it plays roles in clotting and fibrinolysis (Astrup and Stage, 1952). Most of its vascular functions are associated with its ability to promote the conversion of plasminogen, bound to fibrin or cells, into plasmin (Hoylaerts et al., 1982; Briens et al., 2017). In the brain parenchyma, tPA is expressed in neurons and possibly in a subset of glial cells (Tsirka et al., 1995; Hultman et al., 2008; Louessard et al., 2016). It is involved in cell migration, neuronal plasticity, neuronal survival, maintenance of the blood-brain barrier integrity and in the control of inflammatory processes (Hébert et al., 2016). When released into the extracellular space, tPA mediates generation of plasmin which in turn regulates the degradation of the extracellular matrix (Baricos et al., 1995) and the conversion of growth factors, chemokines precursors, neurotrophins into their active forms (Bruno and Cuello, 2006; Lee et al., 2007; Su et al., 2008; Rodier et al., 2014). For example, tPA was reported to promote the conversion of pro-BDNF (Brain-Derived Neurotrophic Factor) into its mature form (m-BDNF) through a plasmin-dependent mechanism (Pang et al., 2004). tPA can also bind to various receptors including the N-methyl-D- aspartate receptor (NMDAR), the low-density lipoprotein receptor-related protein (LRP), Platelet Derived Growth Factor-CC and annexin-II (Hajjar et al., 1994; Nicole et al., 2001; An et al., 2008; Su et al., 2008). tPA is thus now considered as a neuromodulator and the mechanisms that govern its distribution at the synapse should play an important role.

As such, we showed in a previous study (Fernández-Monreal et al., 2004) that the tPA released by neurons upon depolarization was recaptured by astrocytes, through a LRP-dependent mechanism (Cassé et al., 2012). In turn, astrocytes can release tPA at the synaptic cleft by a mechanism dependent on the concentration of extracellular glutamate (Cassé et al., 2012). More recently, we revealed that, when released from neurons, the tPA can promote the conversion of pro-BDNF into m-BNDF by a mechanism dependent on the activation of plasminogen bound to the surface of astrocytes (Briens et al., 2017).

Although tPA was reported to be present at the synapse (Wu et al., 2015), co-immunoisolated with synaptobrevin-2 (VAMP2) positive vesicles (Louessard et al., 2016) and associated with an increased synaptic endocytosis (Yepes et al., 2016), its localization at the synapse and the mechanisms that govern its neuronal trafficking are largely unknown. The present study attempted to examine in detail the neuronal trafficking of tPA (Lenoir, 2018). The results indicate that: (i) the tPA is present in VAMP2 positives vesicles in axons and dendrites; (ii) with the pre-synaptic dendritic vesicles that contain tPA that are more statics than the axonal vesicles that are also positives for tPA; (iii) in basal conditions the release of tPA-containing vesicles is higher in dendrites than in axons and; (iv) the tPA is also present in endosomal vesicles that are positives for Rabs.

MATERIALS AND METHODS

Reagents

Recombinant human tPA (Actilyse®) was purchased from Boehringer Ingelheim (Ingelheim am Rhein, Germany). Fetal bovine serum, horse serum, lipofectamine® 2000 reagent, B27 supplement, glutamine, laminin, neurobasal medium, and penicillin/streptomycin were purchased from ThermoFisher (Waltham, Massachusetts, USA). Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM), poly-D-lysine, phosphate-buffered saline (PBS), paraformaldehyde, albumin from bovine serum, ammonium chloride (NH_4Cl), potassium chloride (KCl), and rabbit polyclonal antibody were purchased from Sigma-Aldrich (St Louis, MO, USA). Aprotinin (Trasylol) was purchased from Bayer (Leverkusen, Germany). HaloTag® TMR ligand was purchased from Promega (Madison, Wisconsin, USA). Human Embryonic Kidney HEK-293 cells were purchased from ATCC (Teddinghton, UK). The following primary antibodies were used for immunocytochemistry: mouse monoclonal anti-HaloTag® (dilution 1:1,000; Promega; G9211) rabbit anti-tPA polyclonal antibody (dilution 1:1 500; generous gift from R. Lijnen, Leuven), chicken anti-Microtubule-associated protein 2 (MAP2) polyclonal antibody (dilution 1:8 000; Abcam, Cambridge, UK; ab5392), rabbit anti-tau polyclonal antibody (dilution 1:500; Abcam; ab64193), guinea pig anti-synapsin polyclonal antibody (dilution 1:500; Synaptic System; 106 004) and rabbit anti-homer-1C polyclonal antibody (dilution 1:500; Synaptic System; 160 003). Primary antibodies were used for immunoblotting are: anti-tPA (dilution 1:10 000; rabbit polyclonal antibody; Abcam; ab62763) and anti-HaloTag® (dilution 1:1,000; mouse monoclonal antibody; Promega; G9211). Secondary fluorescent antibodies (Alexa647 or Cy2; dilution 1:800) were purchased from Jackson Immunoresearch (Bar Harbor, ME, USA) and secondary peroxidase antibodies for immunoblotting: anti-mouse (IgG A9044 1:80,000), anti-rabbit (IgG A0545 1:80,000) from Sigma-Aldrich (St Louis, MO, USA).

Plasmid Constructs

The cDNA encoding for amino acids 1 to 32 of the peptide signal of human tPA was amplified from the full-length human tPA cDNA. The corresponding Polymerase Chain Reaction (PCR) product was subcloned into the eukaryotic expression plasmid pCDNA5.1 between NheI and BamHI. Then, the full length coding sequence for mature human tPA was PCR amplified and subcloned downstream of the "peptide signal−6xHis" between BamHI and XhoI restriction sites to generate a cDNA encoding for the mature 6xHis human tPA (tPAwt). The cDNA of HaloTag® without the Tobacco Etch Virus protease (TEV) cleavage site was PCR amplified from the plasmid pFC14A (Promega, France) and subcloned into pCDNA5.1-tPA between the end of the sequence encoding for tPA and the STOP codon at the end of the Halo-Tag®, then fused in BamHI between the His-tag and the beginning of the cDNA for tPA (HD-Fusion technologies from Clontech, USA). For synapsin promote-driven constructs, we replaced the CMV promotor of the plasmid pCI by the cDNA of the synapsin promotor subcloned between BglII and NheI. For pCMV_HaloTag®-tPA-SEP, the cDNA encoding for the pH sensitive GFP (pHluorin) was subcloned by fusion into pCMV_HaloTag®-tPA between the end of the sequence of tPA and the STOP codon. The constructs pCMV_GFP-homer-1C, pCMV_GFP-VAMP2, pCMV_GFP-Rab pCMV_CFP-Rab and pCAG_RFP were provided by Thierry Galli (Paris, France). pCMV_GFP (pAcGFP1-N1 Vector, Cat#632469) and pPLAT_GFP were purchased from Takara Bio (Kusatsu, Japan) and Genecopoeia (Rockville, Maryland, USA), respectively. All the constructs were amplified in *Escherichia coli* DH5α cells and purified by a Nucleobond endotoxin-free plasmid DNA PC 2000 kit (Macherey-Nagel) according to the manufacturer's instructions.

Immunobloted

Fifty nanograms of tPA (Actilyse®), tPA-HaloTag® (coming from tPA-HaloTag®-transfected HEK cells) were loaded in 10% polyacrylamide gel. Polyacrylamide gels were then transferred on a PVDF membrane and immunoblotted with the primary antibodies. After incubation with the secondary antibodies, proteins were visualized with an enhanced chemiluminescence western blot detection reagent (ECL Prime Western Blotting System; GE Healthcare; RPN2232) using ImageQuant LAS 4000 Camera (GE Healthcare, Chicago, IL, USA).

Fibrin-Agar Zymography Assay

The presence of active tPA-HaloTag® (coming from tPA-HaloTag®-transfected HEK-293 cells) was detected by laying the sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel onto a fibrin-agar layer containing plasminogen (SDS-PAGE) performed as previously described (Gaussem et al., 1993). Fifty nanograms of purified tPA-HaloTag® and Actilyse® (control) were subjected

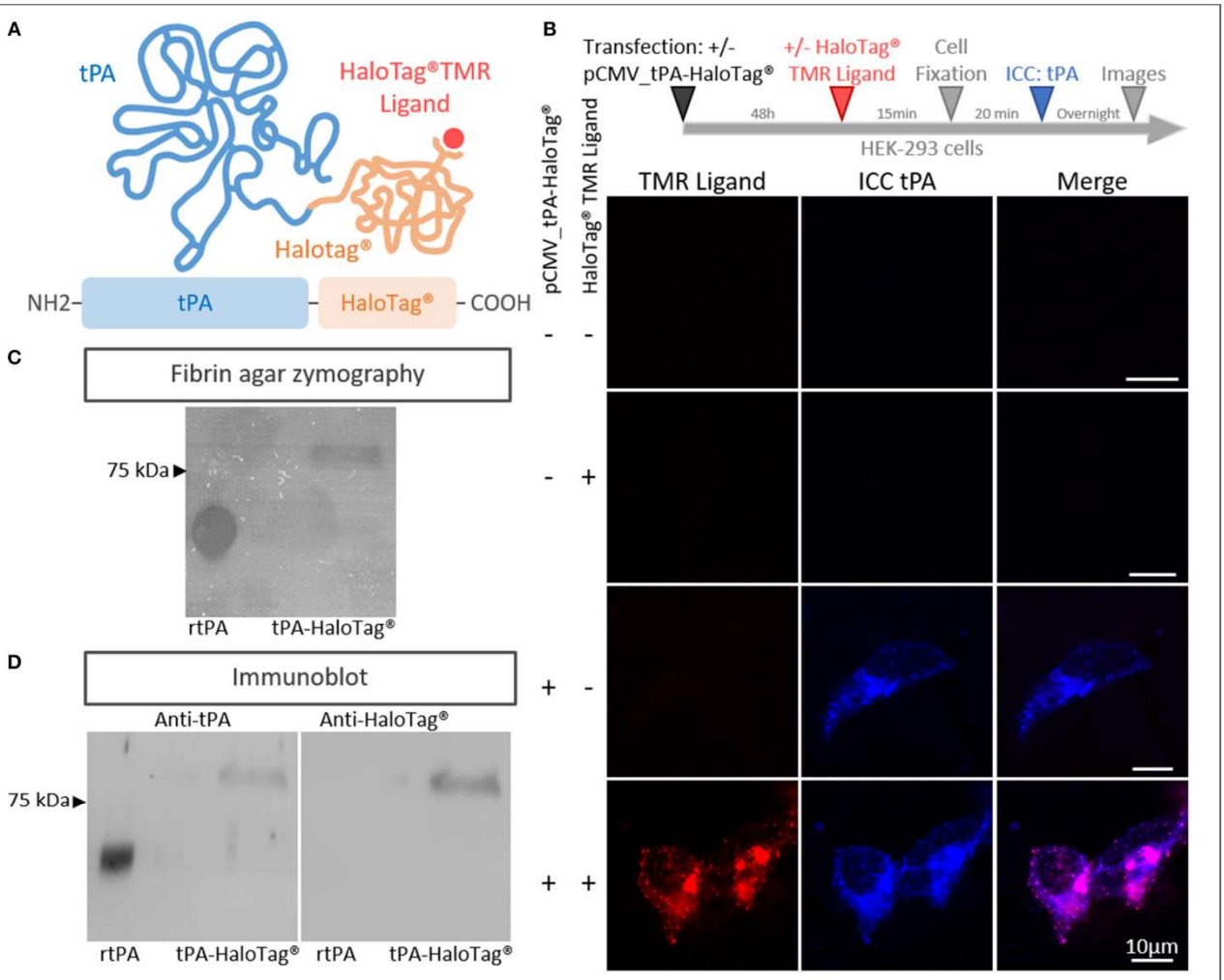


FIGURE 1 | Generation of the tPA-HaloTag®. **(A)** Scheme of the tPA-HaloTag® protein: tPA in blue (69 kDa), HaloTag® in orange (33 kDa) and the specific fluorescent exogenous ligand (HaloTag® TMR Ligand) in red. **(B)** Representative confocal images of HEK-293 cells transfected (+) or not (–) with pCMV_tPA-HaloTag®, incubated 48 h later (+) or not (–) in the presence of the HaloTag® TMR ligand, followed by immunocytochemistry (ICC) raised against tPA (blue). Scale Bar: 10 µm. **(C)** Fibrin–agar zymography showing the fibrinolytic activity of recombinant tPA (rtPA) as control and tPA-HaloTag® produced by HEK 293 transfected cells. **(D)** Immunoblots of recombinant tPA (rtPA) and proteins from HEK-293 cells culture transfected with pCMV_tPA-HaloTag® revealed with antibodies raised against either tPA or HaloTag®. Control tPA (rtPA).

to SDS electrophoresis (10% polyacrylamide gels, under non-reducing conditions). SDS was then exchanged with 2.5% Triton X-100. After washing off excess Triton X-100 with distilled water, the gel was carefully overlaid on a 1% agarose gel containing 1 mg/mL bovine fibrinogen, 100 nM plasminogen and 0.2 NIH U/mL of bovine thrombin. Zymograms were allowed to develop at 37°C for 12 h and photographed at regular intervals using dark-ground illumination.

Cell Cultures

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

Primary cultures of cortical or hippocampal neurons were prepared from fetal mice (embryonic day 14) as previously described (Buisson et al., 1998). Cortices or hippocampi were dissected and dissociated in DMEM and plated (250 000 cell/mL) on glass bottom microwell dishes (MatTek Corporation,

P35G-1.5-14-C, Ashland, MA, USA) earlier coated with poly-D-lysine (0.1 mg/ml) and laminin (0.02 mg/ml). Cells were cultured in Neurobasal Medium supplemented with 0.4 mM of glutamine, 2% B27 supplement 50X, 10% horse serum and penicillin/streptomycin (10,000 IU/ml; 10,000 UG/ml). After 1 h, media were replaced by glio-conditioned medium obtained from primary cultures of astrocytes (see above). Cultures were maintained at 37 °C in a humidified 5% CO_2 atmosphere. One third of medium was changed one time weekly by fresh glio-conditioned medium.

Neuronal Transfection

Transfections were performed at Day *In Vitro* (DIV) 12 or DIV 20. Neuronal cultures were washed with HEPES and Bicarbonate Buffered Salt Solution (HBBSS; NaCl: 116 mM, KCl: 5.4 mM, $CaCl_2$: 1.8 mM, $MgSO_4$: 0.8 mM, HEPES: 12 mM, NaH_2PO_4: 0.34 mM, D-glucose: 5.5 mM, $NaHCO_3$: 25 mM and Glycine: 10 μM) prior a 8 h incubation in the presence of the mentioned cDNAs and lipofectamine® 2000-containing HBSS, HBSS is then replaced by regular media as described above (cell cultures section). The transfection efficiency is 10–20%.

tPA-HaloTag® Detection With HaloTag® TMR Ligand

After 24–48 h, neuronal cultures were washed with HBBSS, HaloTag® TMR ligand was added during 15 min and neuronal cultures were washed again with HBBSS (to remove unbound ligand).

Immunocytochemistry

Neuronal cultures were washed with HBBSS, fixed in paraformaldehyde 4% for 20 min at room temperature, washed in PBS (0.1 M) and blocked 1 h in PBS containing 0.3% Triton X100 and albumin (4%). The primary and secondary fluorescent antibodies were used (see reagent section) and confocal laser-scanning microscopy was performed (see the next section).

Laser Scanning Confocal Microscopy

Laser-scanning confocal microscopy (LSCM) was performed using an inverted Leica SP5 confocal microscope (Leica Microsystems SAS; Leica, Wetzlar, Germany) equipped with an Argon Gas laser and a X40 NA = 1.3 oil immersion objective. Culture was scanned at room temperature with 458-, 488-, 561, 633-nm, laser lines to detect the CFP, GFP or SEP or Cy2, HaloTag® TMR ligand and Alexa647, respectively and high-resolution images (1024 × 1024, 12 bits) of optical sections (z stack, step: 0.45 μm) were captured using sequential line (mean of three) scanning. Colocalizations of two or three fluorophores were qualitatively assessed in the x, y, and z planes of each optical section. Maximal projection images of confocal z series (stacks) were generated where indicated in the figure legends. Minimal adjustments to image contrast and intensity were made in ImageJ software using the levels or contrast/brightness functions.

Live Imaging

Time-lapse images were collected at a 512 × 512–pixel resolution (8 bit). A short interval (0.648 s) for a total of 465 images in a non-sequential mode was used to maximize vesicles resolution trajectories. A relatively low laser intensity was used to minimize laser-induced cellular damage. All acquisitions were performed using a temperature control system ("cube & box," life imaging services, Basel, Switzerland) at 37°C.

STED Microscopy

Confocal and STED images were acquired with a Leica TCS SP8 Confocal/STED 3× microscope with an oil-immersion 100×, 1.44-N.A. objective. Dual-color sequential confocal scans were followed by dual-color sequential STED scans by using a STED microscope. HaloTag® TMR ligand and GFP were excited with 555 and 488-nm white light lasers respectively, at 2–5% of laser power in this particular order. During STED scanning, GFP, and HaloTag® TMR ligand signals were depleted with 592 nm and 660 nm time-gated depletion lasers.

Image Analysis

Confocal images were analyzed with the ImageJ software. The numbers of vesicles per 100 μm (**Figures 3**, **5**, **6** and **Supplementary 4**) were analyzed with the "cell counter" (for the number of puncta) and "straight line" functions (for the distance). Localization of tPA-HaloTag® at the synapse was determined with the "RGB plot profile" function (**Figure 4**). Colocalization between tPA-HaloTag® and other proteins was studied with the "Pearson's correlation" function (Plugins JACoP; **Figures 5**, **7**) and the "Cell counter" function was used to calculate the percentage of colocalization (**Figures 5**, **7**). Live –cell video-acquisitions of tPA-HaloTag® and Halotag®-tPA-SEP were analyzed using kymographs generated using kymographbuilder plugin for ImageJ with a variable length between of 60 to 100 μm (x-axis) and a total time of 5 min (y-axis) to extract kinetics parameters: velocity (μm/s), dynamic (**Figures 3**, **6** and **Supplementary 3**, **4**). For the flow analysis, all kymographs were generated with a length of 60 μm and a total time of 5 min. Imaris x64 7.7.2 software (Bitplane) was used to model the two configurations of tPA at the synapse: pre-synaptic tPA and post-synaptic tPA (**Figure 4**).

Analysis of tPA Containing Vesicle Motility

tPA-HaloTag® motility analysis was analyzed in both axonal and dendritic processes. Axons were distinguished from dendrites firstly based on known morphological characteristics: greater length, thin and uniform diameter, and sparse branching (Banker and Cowan, 1979). After a dozen retrospective immunostainings with an anti-MAP2 antibody of each neurite, a kymograph type profile for each neuronal process has been established and used as a basis for neurite distinction. We selected the proximal region of axons and dendrites for time-lapse imaging analysis. Only those that appeared to be single axons and separate from other processes in the field were chosen for recording axonal tPA-HaloTag® transport. Regions where crossing or fasciculation occurred were excluded from analysis. A tPA-HaloTag® vesicle has been considered stationary if it remained immotile for the

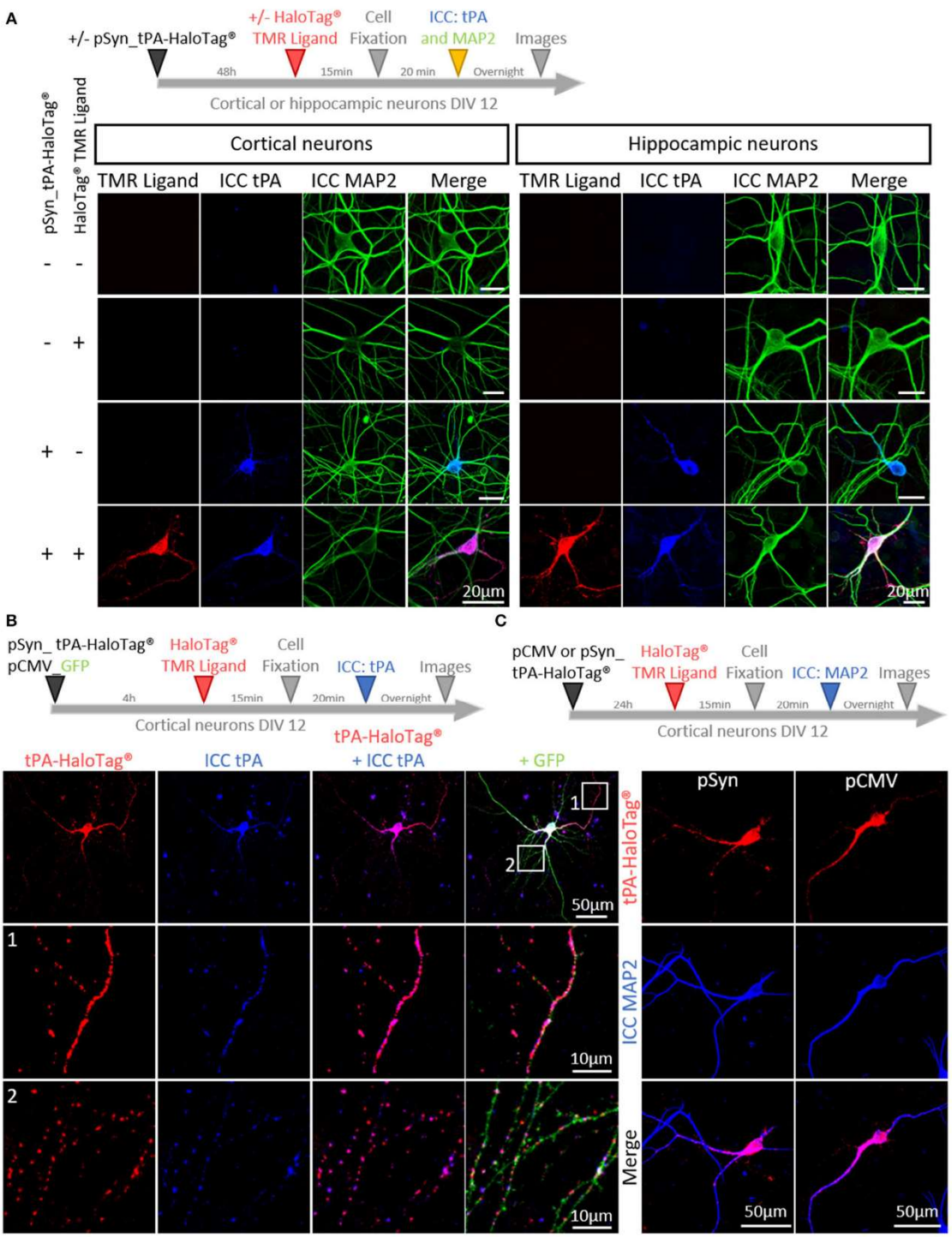


FIGURE 2 | Characterization of tPA-HaloTag® plasmids. **(A)** Timeline of the experiments. Representative confocal images of cortical and hippocampal neurons transfected (+) or not (–) at DIV12 (Day *In Vitro*) with pSyn_tPA-HaloTag® and exposed 48 h later (+) or not (–) to the HaloTag® TMR ligand, together with an immunocytochemistries (ICC) against tPA (blue) and MAP2 (green). Scale Bar: 20 µm. **(B)** Transfection of cortical neurons at DIV 12 with pSyn_tPA-HaloTag® (red) and pCMV_GFP (green) plasmids, exposed 4 h later to the HaloTag® TMR ligand and ICC performed to reveal tPA (in blue). Z-stack and scale Bar: 50 µm (whole neuron) and 10 µm (1 and 2: whole neuron zoom). **(C)** Timeline of the experiments. Transfections of pCMV_tPA-HaloTag® or pSyn_tPA-HaloTag® (both revealed in red) and immunochemistry raised against MAP2 (in blue) show similar neuronal expressions of tPA-HaloTag® with the two constructs. Scale of tPA-HaloTag® with the two constructs. Scale Bar: 50 µm (whole neuron).

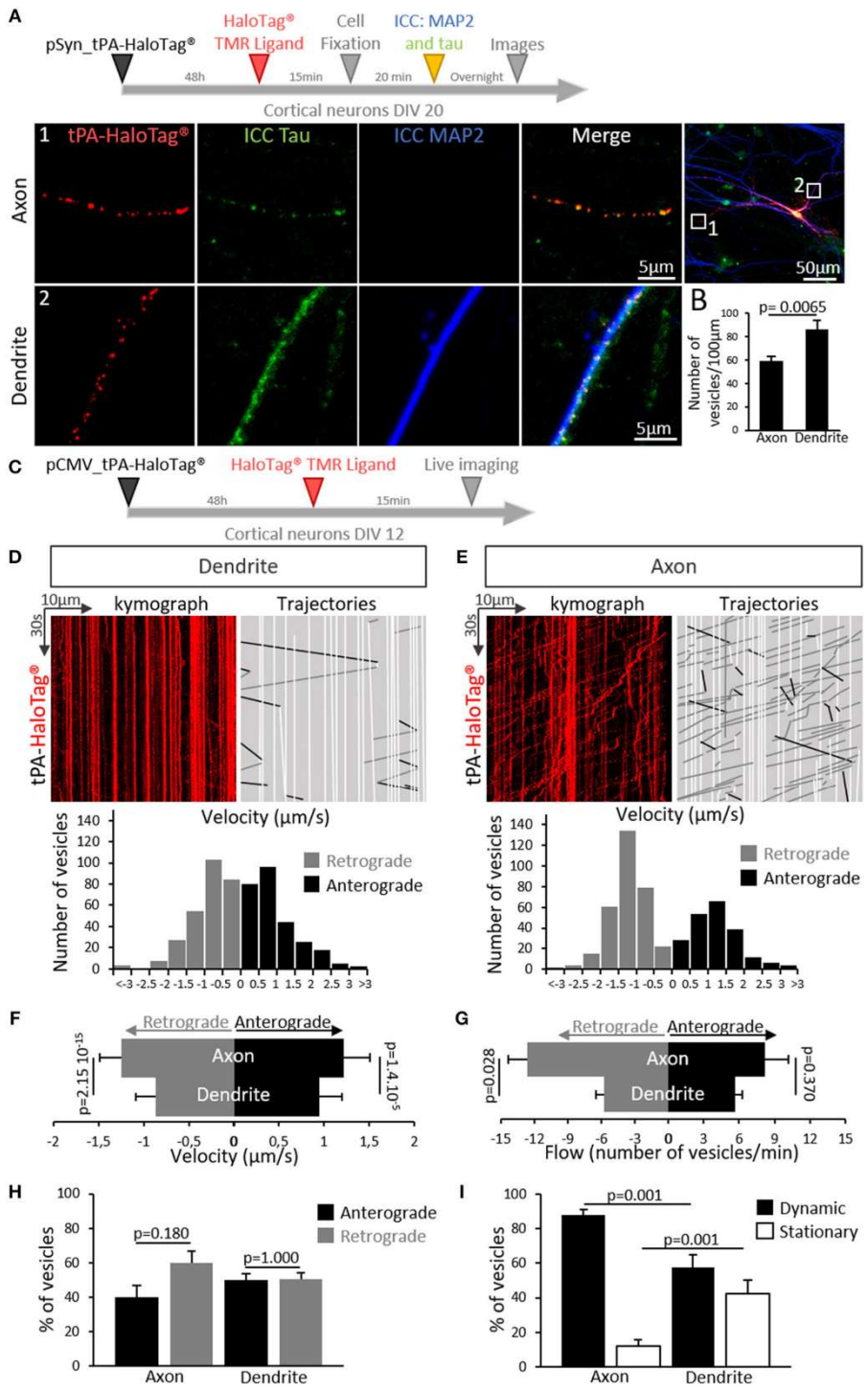


FIGURE 3 | tPA is present and transported in axons and dendrites. **(A)** Timeline of the experiments. Representative z-stack confocal images of cortical neurons (at DIV 20) transfected with pSyn_tPA-HaloTag®, incubated in the presence of the HaloTag® TMR ligand (in red) and subjected to immunocytochemistries raised against tau (tubulin-associated unit, in green) and MAP2 (microtubule associated protein 2, in blue). tPA-HaloTag® is present in axons (1; MAP2 – and tau +) and in dendrites (2; MAP2 + and tau +). Scale Bar: 5 or 50 µm (whole neuron). **(B)** Quantification of the number of TMR positive puncta per 100 µm along the axons (59 puncta/100 µm) and dendrites (86 puncta/100 µm). $n = 15$ and $n = 22$ neurons respectively, from $N = 6$ independent cultures; $p = 0.0065$. **(C)** Timeline of

(Continued)

FIGURE 3 | experiments. **(D)** Transport of tPA-HaloTag® in cortical dendrites. Representative kymographs generated from dendrites (in red) and analyzed trajectories of vesicles are shown with a color code, black for anterograde, gray for retrograde and white for static vesicles. Down, representative diagrams of the distribution of vesicles velocities (μm/s) from seven analyzed kymographs (270 anterograde vesicles, 278 retrograde vesicles, $n = 7$ neurons from 5 independent cultures). **(E)** Transport of tPA-HaloTag® in cortical axons. Representative kymographs generated from axons and analyzed trajectories of vesicles are shown with the same color code viewed previously in **(D)**. Down, diagrams illustrate the distribution of vesicles velocities (μm/s) from five analyzed kymographs (209 anterograde vesicles, 317 retrograde vesicles from $n = 5$ neurons from 4 independent cultures). **(F)** Histograms recapitulate dendritic and axonal vesicles velocities (μm/s) in anterograde way (axons: 1.22 μm/s; dendrites: 0.95 μm/s) and in retrograde way (axons: 1.24 μm/s; dendrites: 0.87 μm/s). (Anterograde: 209 vesicles for axons and 270 for dendrites; $p = 1.4.10^{-5}$. Retrograde 317 vesicles for axons and 278 for dendrites; $p = 2.15.10^{-15}$, $n = 5$ and $n = 7$ neurons respectively, from $N = 9$ independent cultures). Student's *t*-test. **(G)** Histograms show the tPA-HaloTag® vesicles flow (number of vesicles per min) repartition in anterograde and retrograde directions in dendrites and axons on a time proportion (anterograde: 8 vesicles for axons and 5 for dendrites per min; $p = 0.370$. Retrograde 13 vesicles for axons and 6 for dendrites per min; $p = 0.028$. $N = 5$ and $N = 7$ neurons respectively, from $N = 9$ independent cultures). Mann-Whitney's *U test*. **(H)** Histograms showing the percentages of tPA positives vesicles repartition in both ways in axons (anterograde: 40%; retrograde: 60%, $p = 0.180$) and in dendrites (anterograde: 49%; retrograde: 51%, $p = 1.0$) (axons $N = 5$ and dendrites $N = 7$ neurons, from $N = 9$ independent cultures). Mann and Whitney' *U test*. **(I)** Histograms showing percentages of dynamic tPA positives (TMR positive puncta, in red) vesicles in axons (88%) and dendrites (57%); $p = 0.001$, and the percentages of stationary tPA vesicles in axons (12%) and in dendrites (43%); $p = 0.001$, ($N = 10$ neurons for axons and $N = 7$ neurons for dendrites, from $N = 6$ independent cultures). Student's *t*-test.

entire recording period; a vesicle has been considered mobile only if the displacement was ≥2 μm during 5 min.

Experimental Design and Statistical Analysis

The values of charts are presented as mean ± SEM. All analyses were completed from a minimum of two to nine independent cultures. Each experiment was performed from independent dish of cultured cortical neurons. The number of sample, named "n" corresponds to either the number of independent neurons analyzed (all figures excepted **Figure 3**) or to the number of independent vesicles analyzed (**Figure 3**). All statistical analyses were performed with the Statistica® software. A non-parametric Mann-Whitney U test was performed for all analyses unless for charts D and G of the **Figure 3** for which we used a Student's *t*-test. Vesicular intensities in NH_4Cl experiments were analyzed with a non-parametric Wilcoxon signed-rank test for matched samples (**Supplementary 3**).

RESULTS

Axonal and Dendritic Trafficking of tPA

In order to track neuronal tPA in live cells, we inserted a HaloTag® at its C-terminal end (tPA-HaloTag®, **Figure 1A**). The tag HaloTag® is a modified haloalkane dehalogenase designed to covalently bind chloroalkane coupled with fluorophore (HaloTag® ligands) (Encell et al., 2012). This technology offers a wide range of ligands allowing a multitude of applications (localization, pulse chase, protein interactions) (England et al., 2015). In our study, we used a cell permeable exogenous fluorescent ligands, the HaloTag® TMR Ligand (555Ex/585Em). When tPA-HaloTag® was expressed in HEK-293 cells as control, it was detected by either the "HaloTag® TMR Ligand" or an antibody raised against tPA in the intracellular compartment (**Figure 1B**). Accordingly, a recombinant proteolytically active tPA-HaloTag® was detected from protein extracts of transfected HEK-293 cells (69 kDa for tPA plus 33 kDa for the HaloTag®) (**Figure 1C**) also revealed with antibodies raised against either tPA or HaloTag® (**Figure 1D**). Control experiments were also performed from cortical and hippocampal mouse neuronal cultures (**Figures 2A,B**), confirming the neuronal expression of tPA-HaloTag®, revealed either by the HaloTag® TMR Ligand or with an antibody raised against tPA. Expression of tPA-HaloTag® were driven either by a viral promoter pCMV (CytoMegaloVirus) or by the neuronal specific promoter synapsin (pSyn), with similar profiles of expression (**Figure 2C**) which suggest that the two promoters can be used in parallel. Similarly, the position of the HaloTag®, either N-terminal or C-terminal of tPA did not change its neuronal distribution (**Supplementary 1**). Furthermore, cortical neurons in culture are able to activate tPA promotor (**Supplementary 2**).

We then aimed to determine whether the expression of neuronal tPA was polarized. Primary cultures of mouse cortical neurons (DIV 20) were transiently transfected for 48 h with the pSyn_tPA-HaloTag® plasmid and subjected to immunostainings for either MAP2 (microtubule-associated protein 2) or tau (tubulin-associated unit) (**Figure 3A**). We found the presence of tPA in dendrites (MAP2 and tau positive) and axons (tau positive only), with a mean number of 86 puncta of tPA-HaloTag® per 100 μm in dendrites vs. 59 puncta per 100 μm in axons ($n = 22$ neurons and $n = 15$ neurons respectively, from 6 independent neuronal cultures, $p = 0.0065$, Mann and Whitney' *U test*). The distribution of neuronal tPA was thus not fully polarized, although the number of tPA dots was higher (+45%) in dendrites than in axons (**Figure 3B**). We then investigated the motility of tPA-containing vesicles in axons and dendrites (**Figure 3C**). Kymograph analyses of the trajectories showed that tPA-containing vesicles moved bidirectionally in axons and dendrites (**Figures 3D,E**). Interestingly, the velocity of vesicles, both retrograde and anterograde, was higher in axons than in dendrites; Anterograde: 1.21 μm/s in axons vs. 0.94 μm/s in dendrites; $p = 1.4.10^{-5}$, Student's *t*-test, ($n = 270$ and 209 vesicles respectively, measured from 5 independent neurons of 4 independent neuronal cultures)–Retrograde: 1.24 μm/s in axons vs. 0.86 μm/s in dendrites $p = 2.15.10^{-15}$, Student's *t*-test ($n = 278$ and 317 vesicles respectively, measured from 7 independent neurons of 5 independent neuronal cultures) (**Figure 3F**). The number of mobile vesicles was higher in axons (mainly retrograde) than in dendrites (anterograde: 8 vesicles/min in axons vs. 5 vesicles/min in dendrites; $p = 0.370$, Mann-Whitney's *U test* and retrograde: 13 vesicles/min in axons vs. 6 vesicles/min in dendrites; $p = 0.028$, Mann-Whitney's *U*

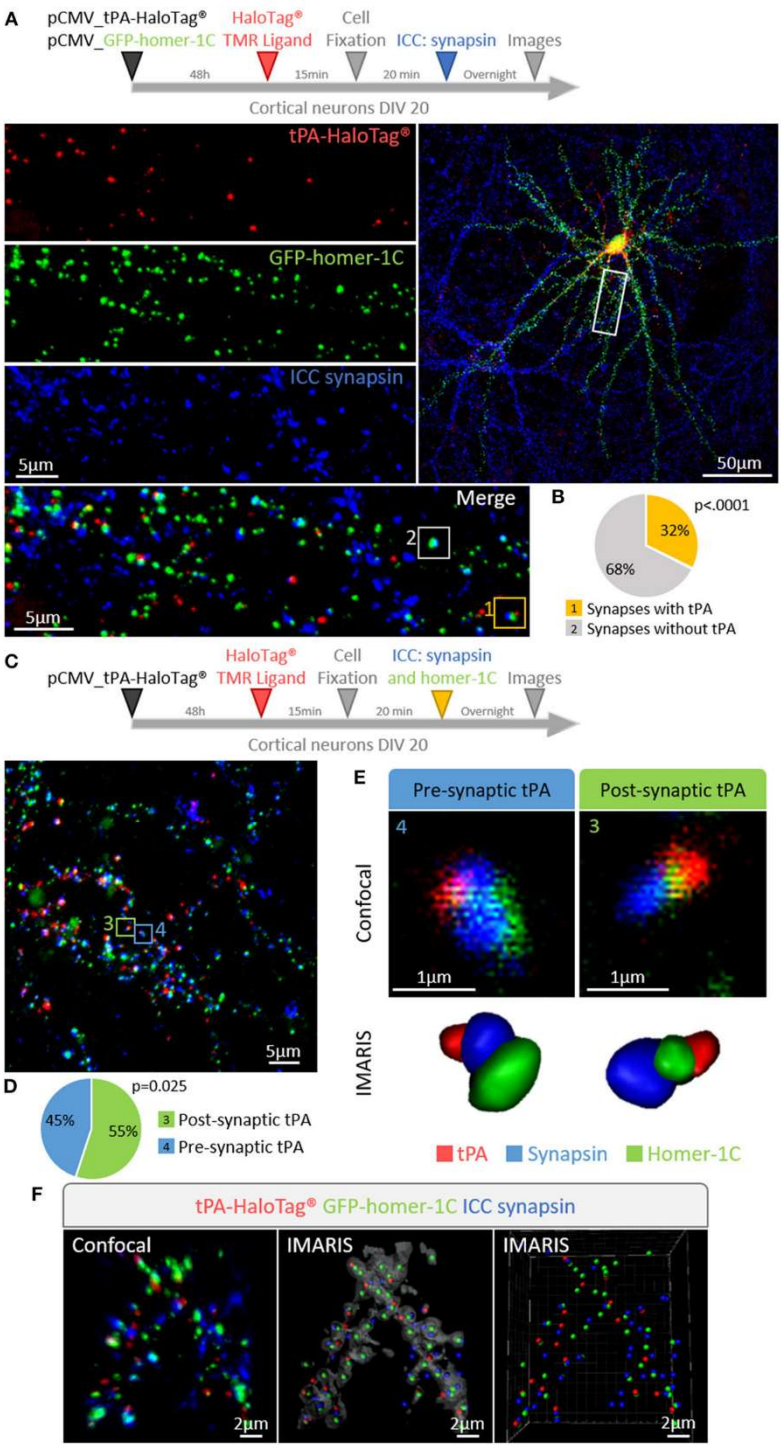


FIGURE 4 | tPA is present in pre- and post-synaptic elements. **(A)** Timeline of the experiments. Representative z-stack confocal images of cortical neurons (at DIV 20) co-transfected with pCMV_tPA-HaloTag® and pCMV_GFP-homer-1C plasmids followed by immunocytochemistry raised against synapsin. tPA-HaloTag® (TMR ligand, in red) is present at synapses revealed by the presence of GFP-homer-1C (post-synaptic protein, green) and synapsin (pre-synaptic protein, blue). Scale Bar: 5 or 50 µm (whole neuron). **(B)** Representative diagrams showing the percentages of synapses containing or not tPA-HaloTag®. TMR staining (i.e., tPA) is

(Continued)

FIGURE 4 | present in 32% of all synapses (yellow frame: 1) and 68% of synapses are negative for tPA (white frame: 2), $N = 21$ neurons from $N = 6$ independent cultures and $p < 0.0001$. **(C)** Timeline of the experiments. Cortical neurons at DIV 20 were transfected with pCMV_tPA-HaloTag® plasmid, ICC raised against synaspin and homer-1C were performed. Representative z-stack confocal images and diagrams show the percentages of tPA located either pre or post-synaptically. Scale Bar: 5 μm. **(D)** 55% of all synaptic tPA is post-synaptic (green frame in confocal image; 3) and 45% of all synaptic tPA is pre-synaptic (blue frame in confocal image; 4). $N = 10$ neurons from $N = 2$ independent cultures and $p = 0.025$. **(E)** IMARIS reconstructions from confocal images C of pre-synaptic tPA (blue frame; 4) and post-synaptic tPA (green frame; 3). **(F)** Representative 3D-confocal images of co-transfected cortical neurons (at 3D-confocal images of co-transfected cortical neurons (at DIV20) with pCMV_tPA-HaloTag® (in red) and pCMV_GFP-homer-1-C (in green) plasmids followed by immunocytochemistry raised against synapsin (in blue). IMARIS reconstruction from confocal images. Scale Bar: 2 μm.

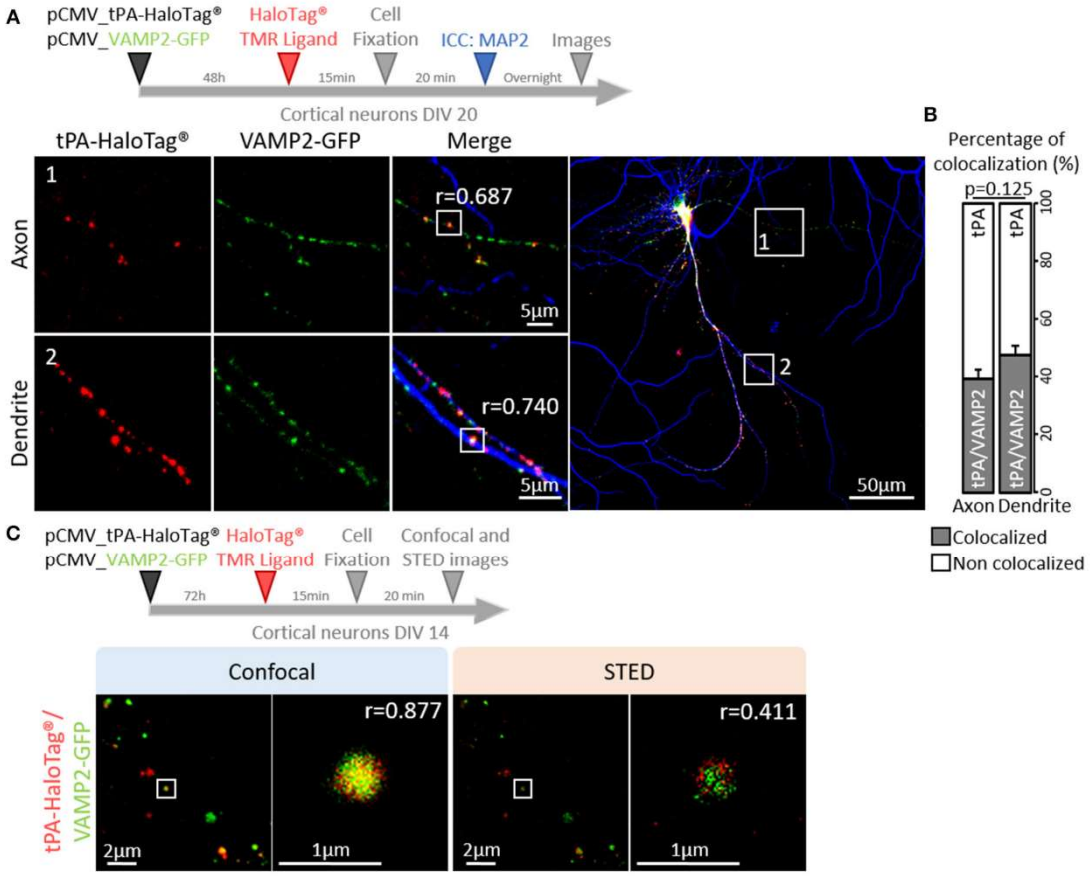


FIGURE 5 | tPA is associated with VAMP2 proteins. **(A)** Timeline of the experiments. Representative z-stack images of co-transfected cortical neurons (at DIV20) with pCMV_tPA-HaloTag® (TMR ligand, in red) and pCMV VAMP2-GFP (in green), followed by ICC raised against MAP2 (in blue). tPA-HaloTag® colocalizes with VAMP2-GFP (exosome) in axons (MAP2-; frame 1) and in dendrites (MAP2+; frame 2) with Pearson's coefficients, respectively: $r = 0.687$ and $r = 0.740$. Scale Bar: 5 or 50μm (whole neuron). **(B)** Representative diagrams of the percentages of colocalization between tPA-HaloTag® and VAMP2-GFP in function of total tPA-HaloTag® puncta. There are 39% of colocalization in axons and 48% in dendrites ($p = 0.125$). **(C)** Representative images of co-transfected cortical neurons cortical neurons (at DIV14) with pCMV_tPA-HaloTag® (reveals by TMR ligand, in red) and pCMV_VAMP2-GFP (in green). tPA-HaloTag® and VAMP2-GFP colocalize, when revealed by confocal and super-resolution microscopy: Stimulated Emission Depletion (STED) with Pearson's coefficients, respectively: $r = 0.877$ and $r = 0.411$. Scale Bar: 2 or 1 μm.

test, $n = 5$ and 7 neurons respectively, from 9 independents neuronal cultures) (**Figure 3G** and **Supplementary movies 1**, **2**). Interestingly, although all axonal tPA-containing vesicles were mobile, around half of the dendritic tPA-containing vesicles were stationary (mobile/stationary: for axons: 88/12%, for dendrites: 57/43%) (**Figures 3H,I**) ($n = 10$ neurons for axons and $n = 7$ neurons for dendrites from 6 independent neuronal cultures, $p = 0.001$, Student's t-test). To characterize further the location of tPA at the synapse, neurons were co-transfected with a vector encoding for the postsynaptic marker GFP-homer-1C and immunostained for the presynaptic marker synapsin (**Figure 4A**). We found that 32% of synapses were tPA-positives ($n = 21$ neurons from 6 independent neuronal cultures, $p < 0.0001$ Mann and Whitney' U *test*, **Figure 4B**).

Furthermore, 55% of synaptic tPA was located post-synaptically, as shown in neurons immunostained for homer-1C and synapsin (**Figures 4C,F**, $n = 10$ neurons from 2 independent neuronal cultures, $p = 0.025$, Mann and Whitney' *U test*).

tPA Is Contained in Vesicles Displaying a Constitutive Post-synaptic Release

Trafficking of synaptic vesicles includes their formation, intracellular movement and exocytosis. Each of these processes is driven by dedicated proteins, named V-SNARE (Vesicular Soluble N-ethylmaleimide-sensitive-factor Attachment protein) (Chaineau et al., 2009). VAMP2 (aka Synaptobrevin 2) is the main v-SNARE of synaptic vesicles. Neurons (DIV 20) expressing tPA-HaloTag® were thus co-transfected with GFP-tagged VAMP2 (**Figure 5A**) and subjected to immunostainings against MAP-2. In axons, VAMP2-GFP positive spots co-localized with 39% of the total tPA puncta (Pearson's coefficient $r = 0.687$). In dendrites VAMP2-GFP positive spots co-localized with 48% of the total tPA puncta ($r = 0.740$) (**Figures 5 A,B**; $n = 6$ and $n = 10$ neurons respectively, from 6 independent neuronal cultures, $p = 0.125$, Mann and Whitney' *U test*). The presence of VAMP2 positive vesicles containing tPA was confirmed by using high resolution STED imaging (**Figure 5C**). We then engineered a dual color reporter HaloTag®-tPA-SEP construct with the pH sensitive GFP variant super ecliptic PHluorin (SEP) as a sensor of tPA-containing vesicles exocytosis (**Figures 6A,B**). Control treatment with ammonium chloride to buffer HaloTag®-tPA-SEP-containing vesicles led to the switch of GFP negative tPA-containing vesicles (normally acid) to GFP positive tPA-containing vesicles (NH_4Cl inducing capture of protons), as previously reported (Shen et al., 2014) (**Supplementary 3**). Using live cell imaging (**Figure 6C**) we observed that, under resting conditions, the constitutive exocytosis of tPA was higher in dendrites than in axons (11 SEP positive vesicles per 100 µm in dendrites (19% of the total number of tPA positive vesicles) vs. 6 in axons (9% of the total number of tPA positive vesicles, $p = 0.007$, Mann and Whitney' *U test*), $n = 11$ and $n = 13$ neurons respectively, from 5 independent neuronal cultures, $p = 0.034$, Mann and Whitney' *U test*; **Figures 6D,E**). We also examined exocytosis after neuronal depolarization (KCl treatment; 50 mM) and we found an increase of the tPA release in both dendrites and axons ($p = 0.025$ and $p = 0.026$, respectively) with an increase of the percentage of stationary vesicles (**Supplementary 4**).

tPA Is Contained in Rabs Positive Vesicles

Additional experiments were performed by co-expressing GFP-Rab5 (early endosome), CFP-Rab7 (late endosome) or GFP-Rab11 (recycling endosome), which play complementary functions in recycling of synaptic molecules (Stenmark, 2009). We found colocalization of tPA-HaloTag® with: i/ GFP-Rab5 puncta in axons (42% of the total tPA puncta, $r = 0.822$) and dendrites (36% of the total tPA puncta, $r = 0.649$) (**Figures 7B,C**; $n = 3$ and $n = 8$ neurons respectively, from 4 independent neuronal cultures, $p = 0.414$, Mann and Whitney' *U test*), ii/ CFP-Rab7 in axons (18% of the total tPA puncta, $r = 0.833$) and dendrites (16% of the total tPA puncta, $r = 0.761$) (**Figures 7D,E**; $n = 3$ and $n = 10$ neurons respectively, from 4 independent neuronal cultures, $p = 0.735$, Mann and Whitney' *U test*) and iii/ GFP-Rab11 in axons (57% of the total tPA puncta, $r = 0.720$) and dendrites (44% of the total tPA puncta, $r = 0.671$) (**Figures 7F,G**; $n = 6$ and $n = 7$ neurons respectively, from 2 independent neuronal cultures, $p = 0.253$, Mann and Whitney' *U test*).

DISCUSSION

tPA was first shown to be produced and released in the circulation by endothelial cells, where it plays roles in inflammation and fibrinolysis (Hoylaerts et al., 1982; Zhang et al., 1999). In addition to its roles in the vascular system, tPA plays crucial functions in the central nervous system (CNS) acting either as an enzyme or as a growth-factor-like molecule (Thiebaut et al., 2018). Thus, tPA is involved in several physiological and pathological CNS processes, including corticogenesis, neuronal survival, learning and memory, anxiety, epilepsy, stroke and Alzheimer's disease (Qian et al., 1993; Baranes et al., 1998; Madani et al., 1999; Pawlak et al., 2003; Alvarez et al., 2013; Oh et al., 2014; Hébert et al., 2017; Pasquet et al., 2018). Its neuronal functions are achieved through plasminogen-dependent or plasminogen-independent effects (Melchor and Strickland, 2005).

Neurons represent an ultimate example of polarized cells with a complex network of membrane trafficking pathways which is necessary to allow efficient communication over long distances (Goldstein and Yang, 2000). Axonal and dendritic transports are essentials for neuronal survival and maturation. One of the most convincing demonstration of the crucial role of axonal transport in neuronal homeostasis is the causal link between defects in this process and neurodegeneration (Holzbaur, 2004). Cortical and hippocampal neurons can express endogenous tPA *in vivo* and *in vitro* (Fernández-Monreal et al., 2004; Louessard et al., 2016), in this study, we also demonstrate that neurons can activate the tPA promoter *in vitro*. Moreover, we have previously shown that tPA is mainly expressed in excitatory neurons and more particularly present in a subset of pyramidal glutamatergic neurons (Louessard et al., 2016). tPA has been identified in the presynaptic terminals within dense-core vesicles (Lochner et al., 2006). A previous study also indicated that tPA could activate the mechanism of endocytosis of synaptic vesicles (Wu et al., 2015).

In the present study, by studying the intra neuronal dynamics of tPA in cortical neurons, we showed that tPA is localized in closed proximity with VAMP2 positive vesicles in axons and dendrites. VAMP2 is known to mediate the exocytosis of synaptic vesicles in neurons and neuroendocrine cells (Schiavo et al., 1992). The use of confocal imaging is a possible limitation of this study, allowing us to reveal a synaptic localization of tPA, without affirming a vesicular colocalization. Although highly dynamic in axons (1.22 µm/s against 0.9 µm/s in dendrites), tPA-containing vesicles are more static in dendrites, possibly stopped at the post-synapse prior to their release. These data are in agreement with the literature for the velocity of dense-core vesicles (Lochner et al., 1998; Kwinter et al., 2009). After neuronal stimulation (KCl or NMDA exposures), there is an increase of the exocytosis of tPA in cultured cortical neurons (Nicole et al., 2001; Fernández-Monreal et al., 2004). Although

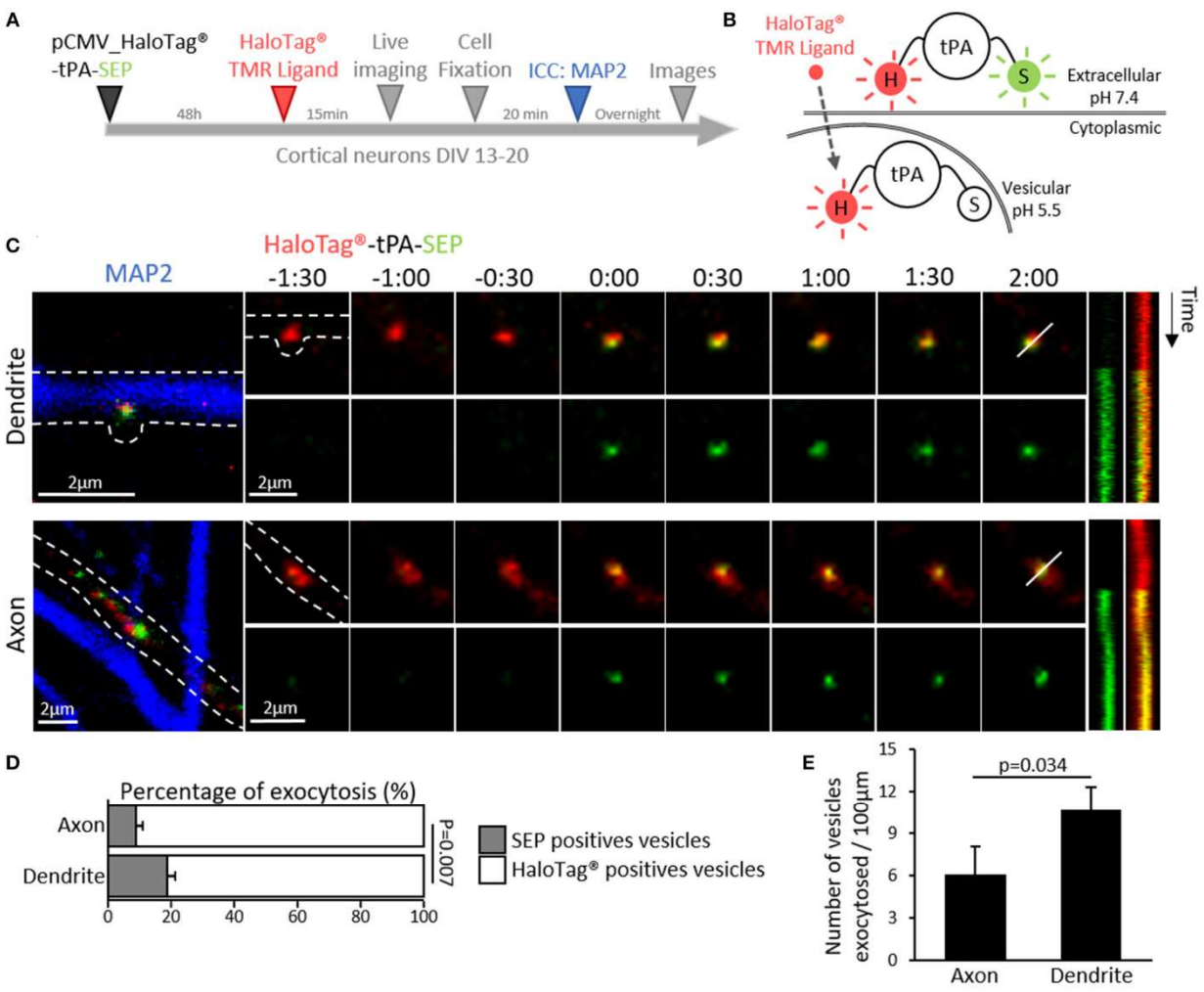


FIGURE 6 | Dendritic and axonal release of tPA. **(A)** Timeline of the experiment. **(B)** Schematic diagrams of a dual color reporter for neuronal tPA. tPA fused to a HaloTag® site and the superecliptic pHluorin (SEP) allows simultaneous visualization of total (HaloTag®) and extraneuronal (SEP) tPA molecules. **(C)** Representative z-stack confocal images of transfected cortical neurons (DIV12) with pCMV_HaloTag®-tPA-SEP plasmid (TMR ligand; in red and SEP; in green), time-lapse were acquired in 2 dimensions every 30 s ($t = 0$ was assigned of exocytosis; Time is in min:sec). After live imaging ICCs were performed to reveal MAP2 (in blue) and thus to differentiate axons from dendrites (an example of each are shown). Respective kymographs of HaloTag®-tPA-SEP exocytosis are shown. Scale bar represents 2 µm. **(D)** Histograms show the percentages of exocytotic tPA-containing vesicles (SEP positives puncta, in green) compared to the total pool of tPA-containing vesicles (TMR positives puncta, in red) in axons (9%) and in dendrites (19%) ($N = 16$ and $N = 14$ neurons respectively, from $N = 7$ independent cultures, $p = 0.007$). **(E)** Schematic histograms of the number of vesicles exocytosed per 100µm in axons (6) and dendrites (11) ($N = 13$ and $N = 11$ neurons respectively, from $N = 5$ independent cultures, $p = 0.034$).

the spontaneous release of tPA is more important in dendrites than in axons (**Figure 6E**), KCl treatment mainly promotes its axonal release (**Supplementary 4E,G**). This finding is consistent with the fact that for their maturation neurons need to release proteases such as tPA, plasmin or metalloproteinases to degrade the extracellular matrix, a process needed for spines formation (Seeds et al., 1992; Kim et al., 2017). This spontaneous release of tPA could be also involved in the maturation of pro-BDNF into mBDNF (via plasmin formation) (Pang et al., 2004; Briens et al., 2017) or in the interaction of tPA with various receptors at the synapse such as NMDAR (Lopez-Atalaya et al., 2008), LRP-1 (An et al., 2008), Annexin-II (Hajjar et al., 1994) to mediate its neuronal functions (Chevilley et al., 2015), including late phase of Long-Term Potentiation (LTP) (Qian et al., 1993; Baranes et al., 1998; Pang et al., 2004). A axonal release of tPA-containing vesicles was also observed, but at a lower level. Endocytosis is an important cellular mechanism, it is responsible of recycling and degradation of molecules (Sudhof, 2004; Stenmark, 2009). Here we show that the tPA can be stored in early endosome (Rab5 positive vesicles), late endosome (Rab7 positive vesicles) and recycling endosome (Rab11 positive vesicles). Several studies have shown that tPA can be recaptured by clathrin dependent

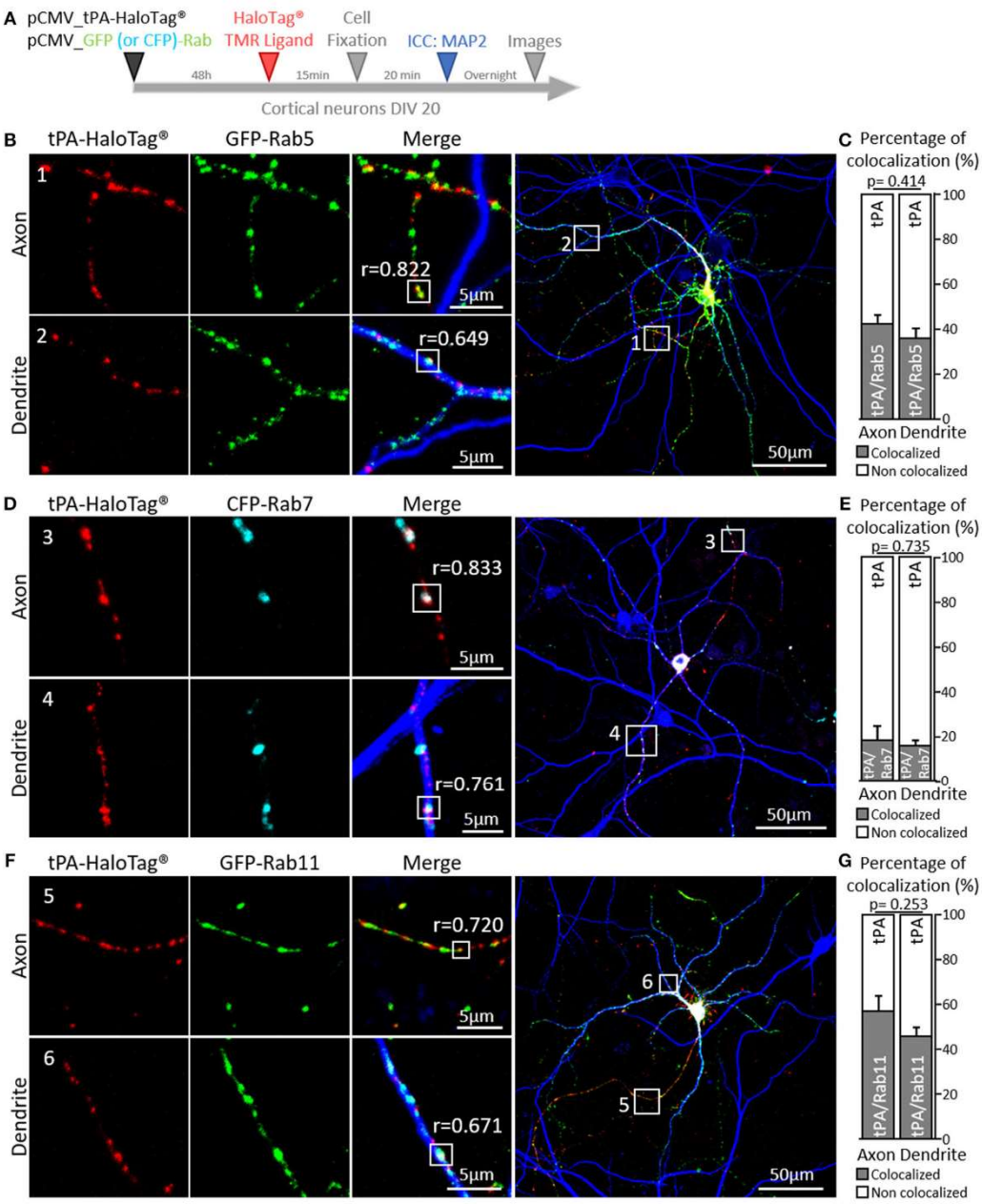


FIGURE 7 | tPA is associated with Rabs proteins. **(A)** Timeline of experiments. **(B)** Representative z-stack images of co-transfected cortical neurons (DIV20) with pCMV_tPA-HaloTag® (TMR ligand, in red) and pCMV_GFP-Rab5 (in green), followed by ICCs raised against MAP2 (in blue). tPA-HaloTag® colocalizes with GFP-Rab5 (early endosome) in axons (MAP2–; frame 1) and in dendrites (MAP2+; frame 2) with Pearson's coefficients respectively, of $r = 0.822$ and $r = 0.649$. **(C)** Representative diagrams of the diagrams of the percentages of colocalization between tPA-HaloTag® and GFP-Rab5 in function of total tPA-HaloTag® puncta. There are 42% of colocalization in axons and 36% in dendrites ($N = 3$ and $N = 8$ neurons respectively, from 4 independent cultures, $p = 0.414$). **(D)** Representative images of co-transfected cortical neurons (at DIV20) with pCMV_tPA-HaloTag® (reveals by TMR ligand, in red) and pCMV_CFP-Rab7 (in cyan), followed by ICCs raised against MAP2 (in blue). tPA-HaloTag® colocalizes with CFP-Rab7 (late endosome and lysosome degradation) in axons (MAP2–; frame 3) and in dendrites (MAP2+; frame 4) with Pearson's coefficients respectively of $r = 0.833$ and $r = 0.761$). **(E)** Representative diagrams of the percentages of colocalization between tPA-HaloTag® and CFP-Rab7 in function of total tPA-HaloTag® puncta. There are 18% of colocalization in axons and 16% in dendrites ($N = 3$ and $N = 10$ neurons respectively, from 4 independent cultures and $p = 0.735$). **(F)** Representative z-stack images of co-transfected cortical neurons (at DIV 20) with pCMV_tPA-HaloTag® (TMR ligand, in red) and pCMV_GFP-Rab11 (in green), followed by ICCs raised against MAP2 (in blue). tPA-HaloTag® colocalizes with GFP-Rab11 (recycling endosome) in axons (MAP2–; frame 5) and in dendrites (MAP2+; frame 6) with Pearson's coefficients respectively, of $r = 0.720$ and $r = 0.671$. **(G)** Representative diagrams of the percentages of colocalization between Representative diagrams of the percentages of colocalization between tPA-HaloTag® and GFP-Rab11 in function of total tPA-HaloTag® puncta. There are 57% of colocalization in axons and 46% in dendrites ($N = 6$ and $N = 7$ neurons respectively, from 2 independent cultures and $p = 0.253$). For all images: scale Bar: 5 or 50 µm (whole neuron).

endocytosis *via* LRP receptors (Narita et al., 1995; Benchenane et al., 2005; Briens et al., 2017). It is then interesting to note that such distribution displays similarities with the trafficking of the neuronal BDNF (Hartmann et al., 2001; Brigadski et al., 2005; Bucci et al., 2014; Shimojo et al., 2015). One hypothesis could be a non-specific internalization of tPA by macropinocytosis, as previously reported for BDNF (Philippidou et al., 2011). This type of endocytosis is important for neuronal survival thank to a retrograde transport of these proteins to the nucleus (Kononenko et al., 2017). These data are in agreement with the present retrograde transport of tPA in axons show in this study.

Since decades, we know that neuronal proteins storage is concentrated in dense core vesicles (DCV). It is also admitted that the neuronal tPA circulates within these vesicles as others proteins implicated in neuronal plasticity and neuronal transmission, such as BDNF and neuropeptides (Kwinter et al., 2009). All of them play a role, directly or indirectly in synaptic functions. Our present data confirm these observations, with tPA possibly contained in VAMP2 positive vesicles with a diameter similar to this of DCV. Our data show an opening of fusion pore, without clearly demonstrating a release of tPA, which could be explained by a kiss-and-run phenomenon (He et al., 2006). Postsynaptic DCV exocytosis is clearly define to be driven by Ca^{2+}/Calmodulin dependent protein kinases (CaMK) (Shakiryanova et al., 2007; Wu et al., 2017; Stucchi et al., 2018). Here we revealed DCV tPA positives vesicles with their constitutive exocytosis higher in dendrites than in axons. These findings agree with the literature concerning exocytosis of DCV (de Wit et al., 2009; van de Bospoort et al., 2012). This dendritic release of tPA could be involved in the late phase of LTP *via* its interaction with the GluN1 subunit of synaptic NMDAR (Baranes et al., 1998; Lopez-Atalaya et al., 2008; Samson et al., 2008; Bouvier et al., 2018). In addition, tPA has a potential action on postsynaptic removal of AMPAR by an indirect phosphorylation of GluR1 subunit via a Ca^{2+}/calmodulin-dependent protein kinase IIα (pCaMKIIα) dependent mechanism in a low Ca^{2+} level environment (Jeanneret et al., 2016). It could be also involved in the extracellular matrix degradation to promote spines formation (Seeds et al., 1992; Kim et al., 2017). Finally, tPA is also described as an indirect activator of pro-BDNF by a plasmin dependent mechanism involving astrocytes (Pang et al., 2004; Briens et al., 2017).

Altogether, we provide here a set of important information about the neuronal trafficking of tPA which should help to further understand brain functions of tPA.

ETHICS STATEMENT

This study was carried out in accordance with the recommendations of EU guidelines (directive 2010/63/EU) and the French National Committee (2010/63) for care and use of laboratory animals.

The protocol was approved by the French National Committee (2010/63).

AUTHOR CONTRIBUTIONS

YH and DV have designed the study. SL, AV, LL, TG, and YH have performed the experiments. SL and AV have analyzed the data. SL, AV, YH, and DV wrote the manuscript. All authors have read and have approved the final manuscript.

ACKNOWLEDGMENTS

We thank Rudy Huis and Clément Laigle from LEICA for the STED acquisitions. We also thank Pr. Carine Ali, Dr. Fabian Docagne, and Dr. Benoit Roussel for their suggestions during the elaboration of the manuscript. This work was supported by grants from the Institut National de la Santé Et de la Recherche Médicale (INSERM), the Regional Council of Normandie and the University of Caen Normandie. This manuscript contains results which first appeared in Dr. Lenoir's thesis (Lenoir, 2018).

SUPPLEMENTARY MATERIAL

The Supplementary Material for this article can be found online at: https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fncel.2019.00164/full#supplementary-material

REFERENCES

Alvarez, V., Rossetti, A. O., Papavasileiou, V., and Michel, P. (2013). Acute seizures in acute ischemic stroke: does thrombolysis have a role to play? *J. Neurol.* 260, 55–61. doi: 10.1007/s00415-012-6583-6

An, J., Zhang, C., Polavarapu, R., Zhang, X., Zhang, X., and Yepes, M. (2008). Tissue-type plasminogen activator and the low-density lipoprotein receptor-related protein induce Akt phosphorylation in the ischemic brain. *Blood* 112, 2787–2794. doi: 10.1182/blood-2008-02-141630

Astrup, T., and Stage, A. (1952). Isolation of a soluble fibrinolytic activator from animal tissue. *Nature* 170:929. doi: 10.1038/170929a0

Banker, G. A., and Cowan, W. M. (1979). Further observations on hippocampal neurons in dispersed cell culture. *J. Comp. Neurol.* 187, 469–493. doi: 10.1002/cne.901870302

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

Baricos, W. H., Cortez, S. L., el-Dahr, S. S., and Schnaper, H. W. (1995). ECM degradation by cultured human mesangial cells is mediated by a PA/plasmin/MMP-2 cascade. *Kidney Int.* 47, 1039–1047.

Benchenane, K., Berezowski, V., Ali, C., Fernández-Monreal, M., López-Atalaya, J. P., Brillault, J., et al. (2005). Tissue-type plasminogen activator crosses the intact blood-brain barrier by low-density lipoprotein receptor-related protein-mediated transcytosis. *Circulation* 111, 2241–2249. doi: 10.1161/01.CIR.0000163542.48611.A2

Bouvier, G., Larsen, R. S., Rodríguez-Moreno, A., Paulsen, O., and Sjöström, P. J. (2018). Towards resolving the presynaptic NMDA receptor debate. *Curr. Opin. Neurobiol.* 51, 1–7. doi: 10.1016/j.conb.2017.12.020

Briens, A., Bardou, I., Lebas, H., Miles, L. A., Parmer, R. J., Vivien, D., et al. (2017). Astrocytes regulate the balance between plasminogen

activation and plasmin clearance via cell-surface actin. *Cell Discov.* 3:17001. doi: 10.1038/celldisc.2017.1

Brigadski, T., Hartmann, M., and Lessmann, V. (2005). Differential vesicular targeting and time course of synaptic secretion of the mammalian neurotrophins. *J. Neurosci.* 25, 7601–7614. doi: 10.1523/JNEUROSCI.1776-05.2005

Bruno, M. A., and Cuello, A. C. (2006). Activity-dependent release of precursor nerve growth factor, conversion to mature nerve growth factor, and its degradation by a protease cascade. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 103, 6735–6740. doi: 10.1073/pnas.0510645103

Bucci, C., Alifano, P., and Cogli, L. (2014). The role of rab proteins in neuronal cells and in the trafficking of neurotrophin receptors. *Membranes* 4, 642–677. doi: 10.3390/membranes4040642

Buisson, A., Nicole, O., Docagne, F., Sartelet, H., Mackenzie, E. T., and Vivien, D. (1998). Up-regulation of a serine protease inhibitor in astrocytes mediates the neuroprotective activity of transforming growth factor beta1. *FASEB J.* 12, 1683–1691.

Cassé, F., Bardou, I., Danglot, L., Briens, A., Montagne, A., Parcq, J., et al. (2012). Glutamate controls tPA recycling by astrocytes, which in turn influences glutamatergic signals. *J. Neurosci.* 32, 5186–5199. doi: 10.1523/JNEUROSCI.5296-11.2012

Chaineau, M., Danglot, L., and Galli, T. (2009). Multiple roles of the vesicular-SNARE TI-VAMP in post-Golgi and endosomal trafficking. *FEBS Lett.* 583, 3817–3826. doi: 10.1016/j.febslet.2009.10.026

Chevilley, A., Lesept, F., Lenoir, S., Ali, C., Parcq, J., and Vivien, D. (2015). Impacts of tissue-type plasminogen activator (tPA) on neuronal survival. *Front. Cell. Neurosci.* 9:415. doi: 10.3389/fncel.2015.00415

de Wit, J., Sylwestrak, E., O'Sullivan, M. L., Otto, S., Tiglio, K., Savas, J. N., et al. (2009). LRRTM2 interacts with Neurexin1 and regulates excitatory synapse formation. *Neuron* 64, 799–806. doi: 10.1016/j.neuron.2009.12.019

Encell, L. P., Friedman Ohana, R., Zimmerman, K., Otto, P., Vidugiris, G., Wood, M. G., et al. (2012). Development of a dehalogenase-based protein fusion tag capable of rapid, selective and covalent attachment to customizable ligands. *Curr. Chem. Genomics* 6, 55–71. doi: 10.2174/1875397301206010055

England, C. G., Luo, H., and Cai, W. (2015). HaloTag technology: a versatile platform for biomedical applications. *Bioconjug. Chem.* 26, 975–986. doi: 10.1021/acs.bioconjchem.5b00191

Fernández-Monreal, M., López-Atalaya, J. P., Benchenane, K., Léveill,é, F., Cacquevel, M., Plawinski, L., et al. (2004). Is tissue-type plasminogen activator a neuromodulator? *Mol. Cell. Neurosci.* 25, 594–601. doi: 10.1016/j.mcn.2003.11.002

Gaussem, P., Grailhe, P., and Anglés-Cano, E. (1993). Sodium dodecyl sulfate-induced dissociation of complexes between human tissue plasminogen activator and its specific inhibitor. *J. Biol. Chem.* 268, 12150–12155.

Goldstein, L. S., and Yang, Z. (2000). Microtubule-based transport systems in neurons: the roles of kinesins and dyneins. *Annu. Rev. Neurosci.* 23, 39–71. doi: 10.1146/annurev.neuro.23.1.39

Hajjar, K. A., Jacovina, A. T., and Chacko, J. (1994). An endothelial cell receptor for plasminogen/tissue plasminogen activator. I. Identity with annexin II. *J. Biol. Chem.* 269, 21191–21197.

Hartmann, M., Heumann, R., and Lessmann, V. (2001). Synaptic secretion of BDNF after high-frequency stimulation of glutamatergic synapses. *EMBO J.* 20, 5887–5897. doi: 10.1093/emboj/20.21.5887

He, L., Wu, X.-S., Mohan, R., and Wu, L.-G. (2006). Two modes of fusion pore opening revealed by cell-attached recordings at a synapse. *Nature* 444, 102–105. doi: 10.1038/nature05250

Hébert, M., Anfray, A., Chevilley, A., Martinez de Lizarrondo, S., Quenault, A., Louessard, M., et al. (2017). Distant space processing is controlled by tPA-dependent NMDA receptor signaling in the entorhinal cortex. *Cereb. Cortex* 1991 27, 4783–4796. doi: 10.1093/cercor/bhw275

Hébert, M., Lesept, F., Vivien, D., and Macrez, R. (2016). The story of an exceptional serine protease, tissue-type plasminogen activator (tPA). *Rev. Neurol.* 172, 186–197. doi: 10.1016/j.neurol.2015.10.002

Holzbaur, E. L. (2004). Motor neurons rely on motor proteins. *Trends Cell Biol.* 14, 233–240. doi: 10.1016/j.tcb.2004.03.009

Hoylaerts, M., Rijken, D. C., Lijnen, H. R., and Collen, D. (1982). Kinetics of the activation of plasminogen by human tissue plasminogen activator. Role of fibrin. *J. Biol. Chem.* 257, 2912–2919.

Hultman, K., Tjärnlund-Wolf, A., Fish, R. J., Wilhelmsson, U., Rydenhag, B., Pekny, M., et al. (2008). Retinoids and activation of PKC induce tissue-type plasminogen activator expression and storage in human astrocytes. *J. Thromb. Haemost.* 6, 1796–1803. doi: 10.1111/j.1538-7836.2008.03084.x

Jeanneret, V., Wu, F., Merino, P., Torre, E., Diaz, A., Cheng, L., et al. (2016). Tissue-type plasminogen activator (tPA) modulates the postsynaptic response of cerebral cortical neurons to the presynaptic release of glutamate. *Front. Mol. Neurosci.* 9:121. doi: 10.3389/fnmol.2016.00121

Kim, S. Y., Cheon, S. Y., Kim, E. J., Lee, J. H., Kam, E. H., Kim, J. M., et al. (2017). Isoflurane postconditioning inhibits tpa-induced matrix metalloproteinases activation after hypoxic injury via low-density lipoprotein receptor-related protein and extracellular signal-regulated kinase pathway. *Neurochem. Res.* 42, 1533–1542. doi: 10.1007/s11064-017-2211-2

Kononenko, N. L., Claßen, G. A., Kuijpers, M., Puchkov, D., Maritzen, T., Tempes, A., et al. (2017). Retrograde transport of TrkB-containing autophagosomes via the adaptor AP-2 mediates neuronal complexity and prevents neurodegeneration. *Nat. Commun.* 8:14819. doi: 10.1038/ncomms14819

Kwinter, D. M., Lo, K., Mafi, P., and Silverman, M. A. (2009). Dynactin regulates bidirectional transport of dense-core vesicles in the axon and dendrites of cultured hippocampal neurons. *Neuroscience* 162, 1001–1010. doi: 10.1016/j.neuroscience.2009.05.038

Lee, S.-R., Guo, S.-Z., Scannevin, R. H., Magliaro, B. C., Rhodes, K. J., Wang, X., et al. (2007). Induction of matrix metalloproteinase, cytokines and chemokines in rat cortical astrocytes exposed to plasminogen activators. *Neurosci. Lett.* 417, 1–5. doi: 10.1016/j.neulet.2007.01.017

Lenoir, S. (2018). *Trafic Neuronal De L'activateur Tissulaire du Plasminogène (tPA).* Available online at: https://tel.archives-ouvertes.fr/tel-01884522/document (accessed January 30, 2019).

Lochner, J. E., Honigman, L. S., Grant, W. F., Gessford, S. K., Hansen, A. B., Silverman, M. A., et al. (2006). Activity-dependent release of tissue plasminogen activator from the dendritic spines of hippocampal neurons revealed by live-cell imaging. *J. Neurobiol.* 66, 564–577. doi: 10.1002/neu.20250

Lochner, J. E., Kingma, M., Kuhn, S., Meliza, C. D., Cutler, B., and Scalettar, B. A. (1998). Real-time imaging of the axonal transport of granules containing a tissue plasminogen activator/green fluorescent protein hybrid. *Mol. Biol. Cell* 9, 2463–2476.

Lopez-Atalaya, J. P., Roussel, B. D., Levrat, D., Parcq, J., Nicole, O., Hommet, Y., et al. (2008). Toward safer thrombolytic agents in stroke: molecular requirements for NMDA receptor-mediated neurotoxicity. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* 28, 1212–1221. doi: 10.1038/jcbfm.2008.14

Louessard, M., Lacroix, A., Martineau, M., Mondielli, G., Montagne, A., Lesept, F., et al. (2016). Tissue plasminogen activator expression is restricted to subsets of excitatory pyramidal glutamatergic neurons. *Mol. Neurobiol.* 53, 5000–5012. doi: 10.1007/s12035-015-9432-7

Madani, R., Hulo, S., Toni, N., Madani, H., Steimer, T., Muller, D., et al. (1999). Enhanced hippocampal long-term potentiation and learning by increased neuronal expression of tissue-type plasminogen activator in transgenic mice. *EMBO J.* 18, 3007–3012. doi: 10.1093/emboj/18.11.3007

Melchor, J. P., and Strickland, S. (2005). Tissue plasminogen activator in central nervous system physiology and pathology. *Thromb. Haemost.* 93, 655–660. doi: 10.1160/TH04-12-0838

Narita, M., Bu, G., Herz, J., and Schwartz, A. L. (1995). Two receptor systems are involved in the plasma clearance of tissue-type plasminogen activator (t-PA) *in vivo*. *J. Clin. Invest.* 96, 1164–1168. doi: 10.1172/JCI118105

Nicole, O., Docagne, F., Ali, C., Margaill, I., Carmeliet, P., MacKenzie, E. T., et al. (2001). The proteolytic activity of tissue-plasminogen activator enhances NMDA receptor-mediated signaling. *Nat. Med.* 7, 59–64. doi: 10.1038/83358

Oh, S. B., Byun, C. J., Yun, J.-H., Jo, D.-G., Carmeliet, P., Koh, J.-Y., et al. (2014). Tissue plasminogen activator arrests Alzheimer's disease pathogenesis. *Neurobiol. Aging* 35, 511–519. doi: 10.1016/j.neurobiolaging.2013.09.020

Pang, P. T., Teng, H. K., Zaitsev, E., Woo, N. T., Sakata, K., Zhen, S., et al. (2004). Cleavage of proBDNF by tPA/plasmin is essential for long-term hippocampal plasticity. *Science* 306, 487–491. doi: 10.1126/science.1100135

Pasquet, N., Douceau, S., Naveau, M., Lesept, F., Louessard, M., Lebouvier, L., et al. (2018). Tissue-type plasminogen activator controlled corticogenesis through a mechanism dependent of NMDA receptors expressed on radial glial cells. *Cereb. Cortex* doi: 10.1093/cercor/bhy119. [Epub ahead of print].

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

Philippidou, P., Valdez, G., Akmentin, W., Bowers, W. J., Federoff, H. J., and Halegoua, S. (2011). Trk retrograde signaling requires persistent, Pincher-directed endosomes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 108, 852–857. doi: 10.1073/pnas.1015981108

Qian, Z., Gilbert, M. E., Colicos, M. A., Kandel, E. R., and Kuhl, D. (1993). Tissue-plasminogen activator is induced as an immediate-early gene during seizure, kindling and long-term potentiation. *Nature* 361, 453–457. doi: 10.1038/361453a0

Rodier, M., Prigent-Tessier, A., Béjot, Y., Jacquin, A., Mossiat, C., Marie, C., et al. (2014). Exogenous t-PA administration increases hippocampal mature BDNF levels. Plasmin- or NMDA-dependent mechanism? *PLoS ONE* 9:e92416. doi: 10.1371/journal.pone.0092416

Samson, A. L., Nevin, S. T., Croucher, D., Niego, B., Daniel, P. B., Weiss, T. W., et al. (2008). Tissue-type plasminogen activator requires a co-receptor to enhance NMDA receptor function. *J. Neurochem.* 107, 1091–1101. doi: 10.1111/j.1471-4159.2008.05687.x

Schiavo, G., Benfenati, F., Poulain, B., Rossetto, O., Polverino de Laureto, P., DasGupta, B. R., et al. (1992). Tetanus and botulinum-B neurotoxins block neurotransmitter release by proteolytic cleavage of synaptobrevin. *Nature* 359, 832–835. doi: 10.1038/359832a0

Seeds, N. W., Verrall, S., Friedman, G., Hayden, S., Gadotti, D., Haffke, S., et al. (1992). Plasminogen activators and plasminogen activator inhibitors in neural development. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 667, 32–40.

Shakiryanova, D., Klose, M. K., Zhou, Y., Gu, T., Deitcher, D. L., Atwood, H. L., et al. (2007). Presynaptic ryanodine receptor-activated calmodulin kinase II increases vesicle mobility and potentiates neuropeptide release. *J. Neurosci.* 27, 7799–7806. doi: 10.1523/JNEUROSCI.1879-07.2007

Shen, Y., Rosendale, M., Campbell, R. E., and Perrais, D. (2014). pHuji, a pH-sensitive red fluorescent protein for imaging of exo- and endocytosis. *J. Cell Biol.* 207, 419–432. doi: 10.1083/jcb.201404107

Shimojo, M., Courchet, J., Pieraut, S., Torabi-Rander, N., Sando, R., Polleux, F., et al. (2015). SNAREs controlling vesicular release of BDNF and development of callosal axons. *Cell Rep.* 11, 1054–1066. doi: 10.1016/j.celrep.2015.04.032

Stenmark, H. (2009). Rab GTPases as coordinators of vesicle traffic. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 10, 513–525. doi: 10.1038/nrm2728

Stucchi, R., Plucińska, G., Hummel, J. J. A., Zahavi, E. E., Guerra San Juan, I., Klykov, O., et al. (2018). Regulation of KIF1A-driven dense core vesicle transport: Ca^{2+}/CaM controls DCV binding and liprin-α/TANC2 recruits DCVs to postsynaptic sites. *Cell Rep.* 24, 685–700. doi: 10.1016/j.celrep.2018.06.071

Su, E. J., Fredriksson, L., Geyer, M., Folestad, E., Cale, J., Andrae, J., et al. (2008). Activation of PDGF-CC by tissue plasminogen activator impairs blood-brain barrier integrity during ischemic stroke. *Nat. Med.* 14, 731–737. doi: 10.1038/nm1787

Sudhof, T. C. (2004). The synaptic vesicle cycle. *Annu. Rev. Neurosci.* 27, 509–547. doi: 10.1146/annurev.neuro.26.041002.131412

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

Tsirka, S. E., Gualandris, A., Amaral, D. G., and Strickland, S. (1995). Excitotoxin-induced neuronal degeneration and seizure are mediated by tissue plasminogen activator. *Nature* 377, 340–344. doi: 10.1038/377340a0

van de Bospoort, R., Farina, M., Schmitz, S. K., de Jong, A., de Wit, H., Verhage, M., et al. (2012). Munc13 controls the location and efficiency of dense-core vesicle release in neurons. *J. Cell Biol.* 199, 883–891. doi: 10.1083/jcb.201208024

Wu, D., Bacaj, T., Morishita, W., Goswami, D., Arendt, K. L., Xu, W., et al. (2017). Postsynaptic synaptotagmins mediate AMPA receptor exocytosis during LTP. *Nature* 544, 316–321. doi: 10.1038/nature21720

Wu, F., Torre, E., Cuellar-Giraldo, D., Cheng, L., Yi, H., Bichler, E. K., et al. (2015). Tissue-type plasminogen activator triggers the synaptic vesicle cycle in cerebral cortical neurons. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* 35, 1966–1976. doi: 10.1038/jcbfm.2015.155

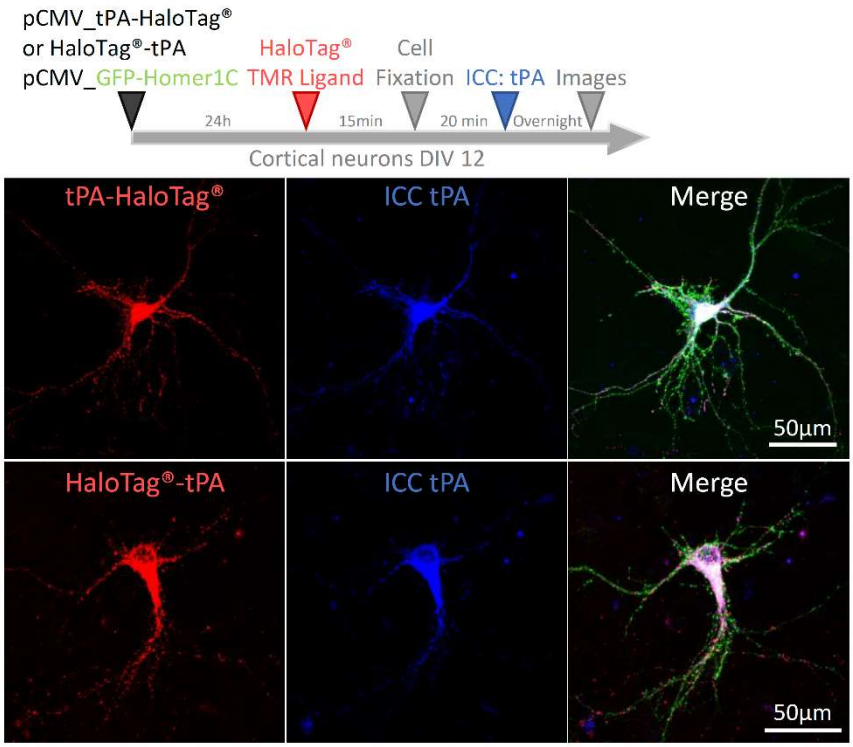
Yepes, M., Wu, F., Torre, E., Cuellar-Giraldo, D., Jia, D., and Cheng, L. (2016). Tissue-type plasminogen activator induces synaptic vesicle endocytosis in cerebral cortical neurons. *Neuroscience* 319, 69–78. doi: 10.1016/j.neuroscience.2016.01.046

Zhang, R. L., Zhang, Z. G., Chopp, M., and Zivin, J. A. (1999). Thrombolysis with tissue plasminogen activator alters adhesion molecule expression in the ischemic rat brain. *Stroke* 30, 624–629.

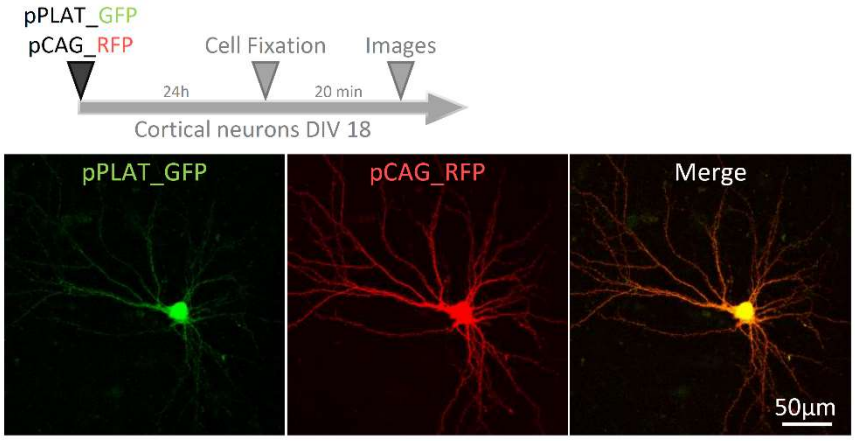
Conflict of Interest Statement: The authors declare that the research was conducted in the absence of any commercial or financial relationships that could be construed as a potential conflict of interest.

Copyright © 2019 Lenoir, Varangot, Lebouvier, Galli, Hommet and Vivien. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (CC BY). The use, distribution or reproduction in other forums is permitted, provided the original author(s) and the copyright owner(s) are credited and that the original publication in this journal is cited, in accordance with accepted academic practice. No use, distribution or reproduction is permitted which does not comply with these terms.

Post-synaptic release of the neuronal tissue-type plasminogen activator (tPA)

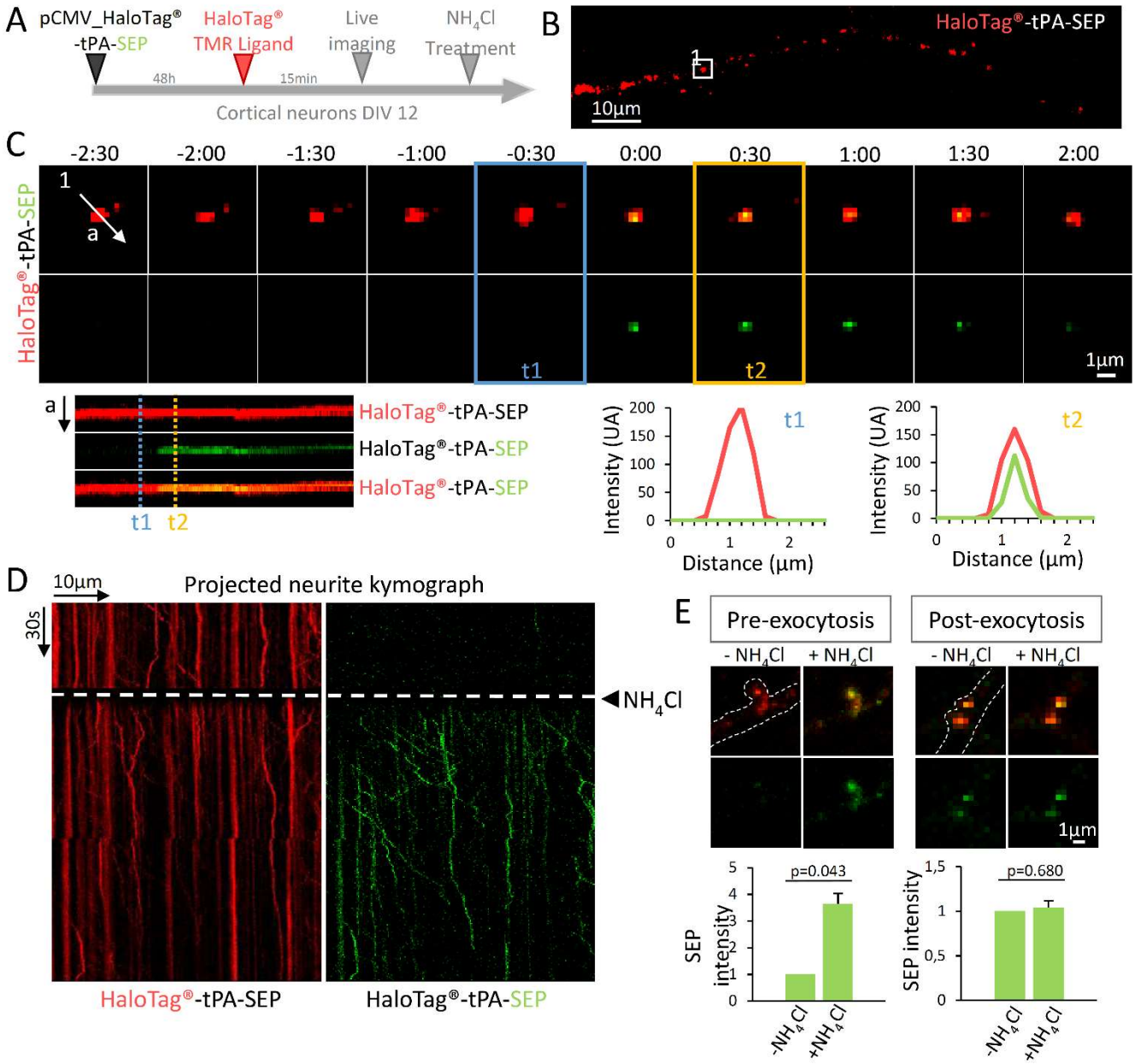


Supplementary 1: Characterization of tPA-HaloTag® plasmid. Timeline of the experiments. Co-Transfections of pCMV_tPA-HaloTag® or pCMV_HaloTag®-tPA (both in red) with pCMV_GFP-Homer-1C (in green) and immunochemistry raised against tPA (in blue) show that the position of the HaloTag®, either N-terminal or C-terminal of tPA did not change its neuronal distribution. Scale Bar: 50µm (whole neuron).



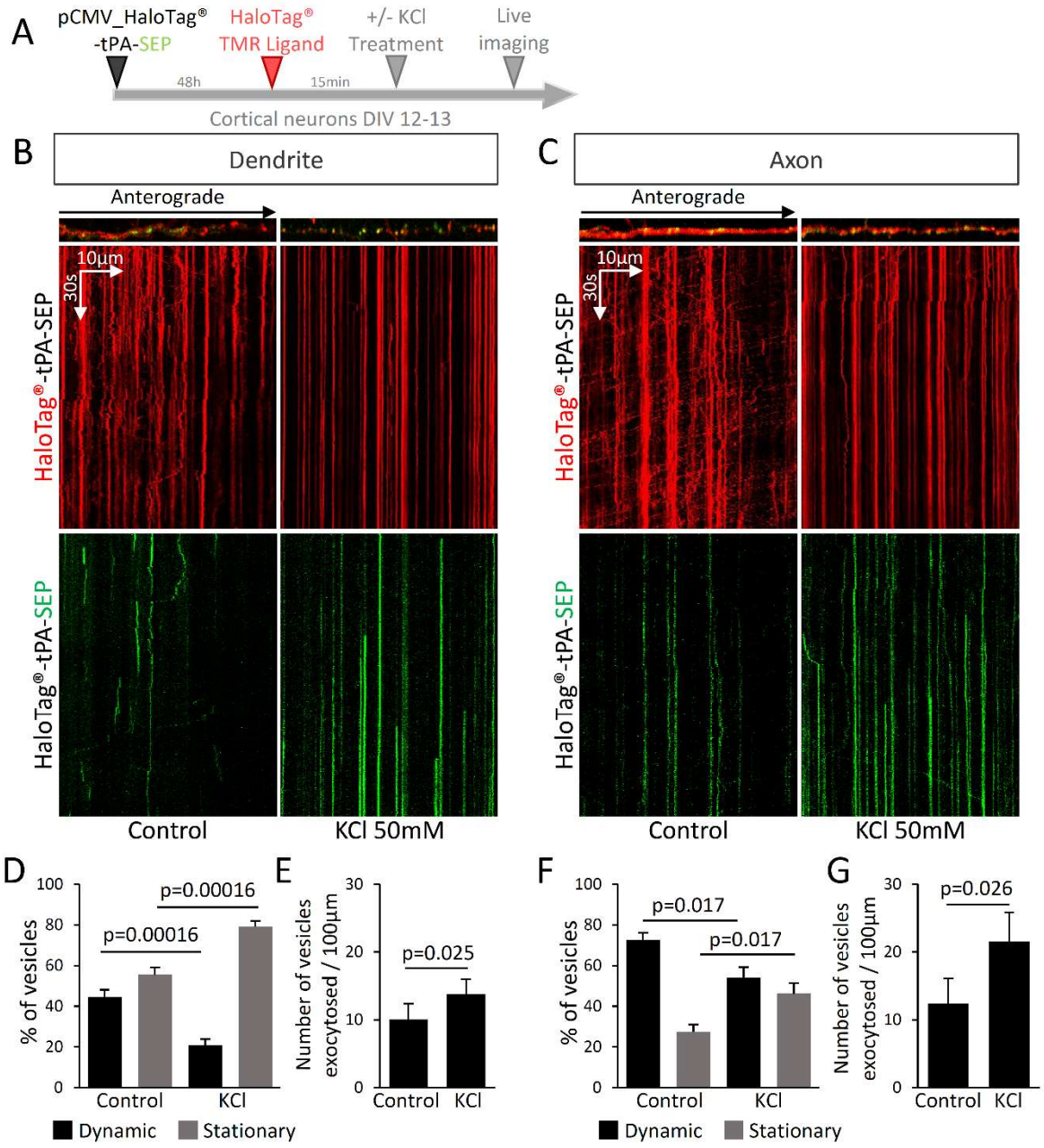
Supplementary 2: Endogenous expression of tPA in neurons. Timeline of the experiments. Representative z-stack confocal images of co-transfected cortical neurons (at DIV18) with pPLAT_GFP (tPA promotor, in green) and pCAG_RFP (control of transfection, in red). Cortical neurons can express GFP by activation of the tPA promotor. Scale Bar: 50 µm (whole neuron).

Post-synaptic release of the neuronal tissue-type plasminogen activator (tPA)



Supplementary 3: HaloTag®-tPA-SEP functionality. (A) Timeline of the experiments. **(B)** Representative confocal z-stack of cortical neurite expressing HaloTag®-tPA-SEP. Scale bar: 10µm. **(C)** Timeline imaging of a HaloTag®-tPA-SEP vesicle (white frame in B) exocytosis in basal condition. SEP fluorescence variation is shown by timeline generated kymographs and fluorescence intensity graphs analysis at t1 and t2 stages (Time in min:sec and Scale bar: 1µm). **(D)** Projected neurite kymograph transfected with HaloTag®-tPA-SEP before, before and after NH_4Cl (50mM) treatment which reveals total intracellular SEP positives vesicles pool. **(E)** SEP fluorescence analysis before (pre-exocytosis) and after (post-exocytosis) exocytosis with or without NH_4Cl (50mM). (Pre-exocytosis (p=0.043) and post-exocytosis (p=0.680) n=5 neurons from N=4 cultures). Scale bar: 1 µm. Wilcoxon's test.

Post-synaptic release of the neuronal tissue-type plasminogen activator (tPA)



Supplementary 4: Exocytosis of tPA in response to KCl-induced neuronal activity. **(A)** Timeline of the experiments. **(B-C)** Representative kymographs of exocytosis with and without KCl treatment (50mM) on dendrites and axons of cultured cortical neurons (DIV12-13). Scale bar 10 µm, during 10 min. **(D)** Histograms showing the percentages of dynamic tPA positive vesicles in dendrites (TMR positive puncta, in red) in control (45%) and KCl treated cells (21%) and the percentages of stationary tPA positive vesicles in control (56%) and KCl treated cells (79%) (p=0.00016). **(E)** Schematic histograms of the number of vesicles exocytosed (SEP positives puncta, in green) per 100 µm in dendrites for control experiments (10) and after KCl treatments

(14) (p=0.025). **(D-E)** n= 23 neurons for control and n=10 neurons for KCl treatments, from N=3 and N=2 independent cultures, respectively. **(F)** Histograms showing the percentages of dynamic tPA positive vesicles in axons (TMR positive puncta, in red) in control (73%) and in KCl treated cells (54%) and the percentages of stationary tPA positive vesicles in control (27%) and in KCl treated cells (46%) (p=0.017). **(G)** Schematic histograms of the number of vesicles exocytosed (SEP positives puncta, in green) per 100 µm in axon for control experiments (12) and after KCl treatments (22) (p=0.026). **(F-G)** n= 10 neurons for control and n=10 neurons for KCl treatments, from N=3 and N=2 independent cultures, respectively. After KCl application we can observe an increase of stationary vesicles correlated to the number of vesicles exocytosed.

Supplementary movie 1: Trafficking of tPA positives vesicles in dendrites. Representative time lapse of dendritic trafficking (related to Figure 3) of cortical neurons (DIV13) transfected with pCMV_HaloTag®-tPA-SEP (TMR ligand, in red). Time lapse duration: 5min, scale bar: 10 µm and the white arrow points soma.

Supplementary movie 2: Trafficking of tPA positives vesicles in axon. Representative time lapse of axonal trafficking (related to Figure 3) of cortical neurons (DIV13) transfected with pCMV_HaloTag®-tPA-SEP (TMR ligand, in red). Time lapse duration: 5min, scale bar: 10 µm and the white arrow points soma.

Article 2: Modulations of the neuronal trafficking of the tissue-type plasminogen activator (tPA) influences the glutamate release: a mechanism impaired in a model of tauopathy.

Running title: Trafficking of tPA at the neuronal synapse

Alexandre Varangot[1], Simon Lebatard[1], Mathys Bellemain[1], Laurent Lebouvier[1], Yannick Hommet[1], Denis Vivien[1,2] *. *En préparation*

Contexte bibliographique :

Le tPA est une sérine protéase exprimée par les neurones dans différentes régions cérébrales. Il est décrit comme étant véhiculé par un sous-type de DCVs contenant la synaptobrévine 2 (VAMP2) mais aussi par des endosomes précoces (Rab5+), des endosomes tardifs (Rab7+) ainsi que dans des endosomes de recyclage (Rab11+) dans les axones et les dendrites. Des données existent sur sa libération par les neurones en conditions de repos et en conditions d'activations. Mais aucune étude a réellement décrit avec précision le transport et la libération du tPA dans différentes conditions d'activation et d'inhibition neuronale dans les prolongements de neurones corticaux. De plus, l'étude du trafic du tPA dans un modèle d'atteinte du cytosquelette des neurones comme la tauopathie n'a jamais été réalisée.

Objectifs de l'étude :

Le but de ces travaux est de décrire le comportement des vésicules contenant le tPA dans différentes conditions d'activité des neurones corticaux et de corréler les données issues du transport de ces vésicules avec celles de leur libération. Nous souhaitons mieux comprendre l'influence du tPA sur la neurotransmission glutamatergique, ainsi qu'étudier le trafic de cette protéine dans un contexte pathologique.

Principaux résultats :

- L'activation des neurones provoque une augmentation de la libération du tPA ;
- L'inhibition des neurones n'affecte pas le trafic du tPA ;
- Le tPA et VAMP2 circule dans les mêmes vésicules de sécrétion axonales ;
- L'ajout de tPA exogène sur les neurones favorise la libération de glutamate ;
- Dans un contexte de tauopathie, le transport et la libération du tPA sont altérés.

Modulations of the neuronal trafficking of tissue-type plasminogen activator (tPA) influences the glutamate release: a mechanism impaired in a model of tauopathy.

Running title: Trafficking of tPA at the neuronal synapse

Alexandre Varangot[1], Simon Lebatard[1], Mathys Bellemain[1], Laurent Lebouvier[1], Yannick Hommet[1], Denis Vivien[1,2] *

Affiliations :

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

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

Corresponding author (*):

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

Keywords: tPA, VAMP2, VGlut1, vesicle trafficking, synapse, tauopathy.

ABSTRACT

The discovery of the neuronal expression of the serine protease tissue type plasminogen activator (tPA) has opened new avenues of research, with important functions of tPA in the physiopathology of the central nervous system. For example, its interactions with synaptic receptors (NMDAR, LRP1, Annexin II, and EGFR) and its role in the maturation of BDNF have been reported to mediate its ability to control synaptic plasticity and neuronal survival. Thus, a better description of the mechanisms regulating the neuronal trafficking of tPA is important to better understand how tPA can influence brain functions and dysfunctions. Here, using high-resolution live cell imaging and a panel of innovative genetic approaches, we revealed that neuronal activity directly control the dendritic and axonal trafficking of tPA. We first unmasked the dynamic characteristics of the dendritic and axonal trafficking of tPA-containing vesicles under different paradigms of neuronal activations and inhibitions. The then report a constitutive exocytosis of tPA- and VAMP2-positive vesicles, dramatically increased in conditions of neuronal activations (and not in inhibitory conditions), with a pattern which is mainly dendritic and thus post-synaptic. We also observed that the synaptic release of tPA led to an increase of the exocytosis of VGlut1 positives vesicles containing glutamate. Finally, we described alterations of the trafficking and exocytosis of the neuronal tPA in an Alzheimer disease (AD) model. Altogether, these data provide new insights about the neuronal trafficking of tPA, contributing to a better knowledge in the understanding of its implications in the control of the glutamatergic neurotransmission and subsequent brain functions and dysfunctions.

INTRODUCTION

The serine protease tissue type plasminogen activator (tPA) is synthesized and released in the blood-stream from both endothelial cells and hepatocytes (Binder *et al.* 1979) but it is also produced by brain cells such as neurons (Salles and Strickland 2002) and glial cells (Buisson *et al.* 1998; Docagne *et al.* 1999; Siao *et al.* 2003; Correa *et al.* 2011). tPA was reported to contribute to several cerebral physiological processes, such as neuronal migration (Pasquet *et al.* 2019), neurite outgrowth (Seeds *et al.* 1999), long-term potentiation (Baranes *et al.* 1998), synaptic plasticity (Samson and Medcalf 2006), neurovascular coupling (Anfray *et al.* 2020), learning and memory (Madani *et al.* 1999; Calabresi *et al.* 2000; Pawlak *et al.* 2002; Benchenane *et al.* 2007; Obiang *et al.* 2011; Obiang *et al.* 2012) and anxiety (Pawlak *et al.* 2003). To mediate this set of brain effects, tPA interacts with various receptors (Chevilley *et al.* 2015) leading mainly to modulations of the glutamatergic neurotransmission.

Indeed, on neurons tPA is well known to influence N-Methyl-D-Aspartate Receptors (NMDARs) signaling, dependent or not of its proteolytic activity (Melchor and Strickland 2005), with several, even opposite, actions reported so far. It is thus well established that tPA interacts with the common GluN1 subunit of NMDAR either directly (Nicole *et al.* 2001) or through Low Density Lipoprotein Related Protein-1(LRP-1) (Cassé *et al.* 2012). By interacting with GluN2A subunit-containing NMDARs, tPA activates either the Akt/mTOR/p70S6K/HIF1α (Wu *et al.* 2012) or the Erk1/2/CREB/ATF3 signaling pathway (Wu *et al.* 2013). tPA, by a plasmin dependent mechanism also cleaves the NMDAR GluN2A subunit (Echeverry *et al.* 2010). In addition, its capacity to interact with Grp78, to activate EGF receptor and to activate the pro-BDNF into BDNF (Pang *et al.* 2004), have also been reported. tPA can thus be considered as a neuromodulator and the mechanisms that govern how it is distributed at the synapse is important to better understand its brain functions.

Accordingly, it is now well admitted that the neuronal tPA circulates within intracellular vesicles as others proteins involved in neuronal functions, such as BDNF and neuropeptides (Kwinter *et al.* 2009). In addition, tPA can be released by activated neurons (Wu *et al.* 2015) and recaptured from the synaptic cleft by astrocytes through a LRP-dependent mechanism (Cassé *et al.* 2012). In turn, astrocytes can release tPA depending on the concentration of

extracellular glutamate present at the synapse (Cassé *et al.* 2012). When released from neurons, tPA promotes the conversion of pro-BDNF into m-BNDF at the surface of astrocytes (Briens *et al.* 2017). In neurons tPA colocalizes with synaptobrevin-2 (VAMP2) positive vesicles (Louessard *et al.* 2016; Lenoir *et al.* 2019), with its release mainly found at the post-synaptic dendritic side (Lenoir *et al.* 2019) and possibly in endocytotic vesicles (Yepes *et al.* 2016; Lenoir *et al.* 2019). However, the mechanisms that govern its neuronal trafficking are largely unknown.

Interestingly, tPA is not only involved in the brain physiology, but also in a number of brain disorders (Chevilley *et al.* 2015). For example, in the context of ischemic brain, in addition of its pro-thrombotic activity, it was reported either to protect neurons at its physiological concentration (Wu *et al.* 2013) by reducing apoptosis (Liot *et al.* 2006; Liang *et al.* 2016) and reticulum stress (Louessard *et al.* 2017) or to promote neuronal death when present at higher concentrations (exogenous tPA) mainly due to an overactivation of NMDARs (Nicole *et al.* 2001; Samson *et al.* 2008; Martin *et al.* 2008). tPA was also reported to contribute to the evolution of Alzheimer's Disease (AD) (Melchor *et al.* 2003; Cacquevel *et al.* 2007; Jacobsen *et al.* 2008). Indeed, reduced levels of active tPA have been observed with ageing, a phenomenon exacerbated in AD brains (AD) (Cacquevel *et al.* 2007). Through its proteolytic activity, tPA has been reported to contribute to the degradation of A-beta (Melchor *et al.* 2003), with its lack associated with impaired neurovascular coupling (Park *et al.* 2020) and corresponding deficits on behavioral and cognitive functions in rodents (Park *et al.* 2020) .

Briefly, our present data provide new inputs about the neuronal trafficking of tPA, thus contributing to our better understanding of its functions and dysfunctions at the brain level. We thus reveal that only the neuronal activation increases the number of VAMP2 positive and tPA-containing vesicles docked at the membrane and their subsequent exocytosis, with an impact mainly observed at the post-synaptic level. When release at the synaptic cleft, tPA can thus promote release of glutamate. We also revealed that these physiological processes are dramatically altered in a model of Alzheimer's disease, induced by a hyperphosphorylation of Tau.

RESULTS

Neuronal activation drives the traffic of tPA containing vesicles

Using live-cell microscopy, we explored whether the neuronal trafficking of tPA-containing vesicles was influenced under different conditions of neuronal activation. Following the expression of a reporter tPA-HaloTag® in cultured cortical neurons (13-14 days in vitro) and incubation of a cell permeable exogenous fluorescent ligand (HaloTag® TMR ligand, 555Ex/585Em) to reveal intracellular tPA, we used two paradigms of chemical Long Term Potentiation (LTP). We subjected neurons to either a bicuculline/glycine (Bic/Gly, 30µM/200µM) treatment to act on synaptic currents, or a potassium chloride (KCl, 50mM) treatment to increase neuronal depolarization (showed in Fig. 1A). After analyses of the kymographs generated from neuronal processes films, we observed a dendritic increase of the number of tPA containing static vesicles during neuronal activation (55.47% to 80.78% for Bic/Gly, $p<0.0001$ and to 76.42% for KCl, $p=0.0006$), corresponding to a docking of vesicles on plasma membrane (Fig. 1B, 1D and 1E). It is then interesting to note that Bic/Gly treatments had no effect on the total pool of dendritic tPA containing vesicles at the opposite of KCl treatments (Fig. 1E). Interestingly, Bic/Gly treatment affected dendritic trafficking of mobile tPA vesicles by an overall decrease of the vesicles velocity as well as of the distance traveled, especially in the anterograde direction (Fig. 1C) (anterograde velocity: 0.79 µm.s-1 to 0.57 µm.s-1 for Bic/Gly, $p=0.004$, and to 0.576 µm.s-1 for KCl, $p<0.0001$. Anterograde cumulative distance: 34.25 µm to 27.55 µm for Bic/Gly, $p<0.0286$, to 19.11µm for KCl, $p<0.0001$). Furthermore, the intracellular increase of calcium concentrations ([Ca2+]) caused by chemical neuronal activation improved the percentage of time spent by tPA containing vesicles on stop (Fig. S1D), shown by a tendency to reduce kymographs indices of vesicles duration state (Fig. S1A, S1B and S1C). A similar effect of neuronal activation is also found in axons, with an increased percentage of tPA-containing static vesicles (Fig. 1F, 1H and 1I) (27.43% to 47.56% for Bic/Gly, $p=0.0119$, to 49.67% for KCl, $p=0.0051$) and a rise of the total pool of vesicles under the two activating treatments (Fig. 1I) (0.41 vesicles/µm to 0.62 vesicles/µm for Bic/Gly, $p=0.0487$, to 0.71 vesicles/µm for KCl, $p=0.0031$). Neuronal activation also lower the velocity and the distance traveled by the vesicles in axons, but rather in the retrograde way, in particular under KCl condition (Fig. 1G) (retrograde velocity: 1.11 µm.s-1 to 0.92 µm.s-1 for Bic/Gly, $p<0.0001$, and to 0.66 µm.s-1 for KCl, $p<0.0001$. Retrograde cumulative distance: 47.47 µm to 46.01 µm for Bic/Gly, $p=0.0735$, to 44.24 µm for KCl, $p<0.0001$). Axonal

kymographs also revealed an increase of the percentage of time spent by vesicles on pause (Fig. S1G), and a reduction of kymographs indices of vesicles duration state (Fig. S1E and S1F). These first set of results show that neuronal activation influences the neuronal trafficking of tPA by an increased number of static vesicles, supporting the idea that these vesicles are docked to the plasma membrane to be imminently exocytosed in the extracellular compartment.

Neuronal inhibition has no impact on tPA-containing vesicles trafficking, revealing a constitutive synaptic release of tPA.

We then investigated whether neuronal inhibition has consequences on tPA neuronal trafficking. We thus used two inhibitory paradigms, which will respectively play roughly opposite effects. First, addition of tetrodotoxin (TTX, 1.5 µM) on neuronal cultures is known to cause inhibition of voltage-gated sodium channels and to reduce propagation of action potentials (Santschi *et al.* 1999). Secondly, we added a combination of cyanquixaline (CNQX, 50µM) and (2R)-amino-5-phosphonovaleric acid (APV, 50µM), to inhibit glutamatergic receptors and synaptic activating currents (Hanus *et al.* 2014). Interestingly, exposures to these inhibitory treatments had no effect on dendritic trafficking of tPA-containing vesicles. We observed approximatively the same percentage of dynamic and static vesicles between control conditions and inhibitory conditions (44.53% to 36.64% for TTX, p=0.3130, and to 47.49% to 53.25% for CNQX/APV, p=0.7919, concerning dynamic vesicles. 55.46% to 63.35% for TTX, p=0.3130, and to 52.50% to 46.74% for CNQX/APV, p=0.7919, concerning static vesicles) (Fig. 2A and 2C). It is interesting to note that neuronal inhibitions did not affect the number of docked vesicles and did not modify the total pool of tPA-containing vesicles in dendrites (Fig. 2D). By examining the dynamic of these vesicles, inhibitory treatments did not change neither the velocity nor the distance traveled by the vesicles (Fig. 2B) (anterograde velocity: 0.79 µm.s-1 to 0.694 µm.s-1 for TTX, p=0.3774, and to 0.60 µm.s-1 to 0.663 µm.s-1 for CNQX/APV, p>0.9999. Retrograde velocity: 0.74 µm.s-1 to 0.62 µm.s-1 for TTX, p=0.2156, and to 0.611 µm.s-1 to 0.612 µm.s-1 for CNQX/APV, p>0.9999). Moreover, we observed no difference concerning kymographs indices between control conditions and inhibitory conditions (Fig. S2A, S2B and S2C). Neuronal inhibition did not affect axonal trafficking any more, with almost the same percentage of dynamic and static vesicles with or without inhibitory treatments (Fig. 2E and 2G) (72.57% to 73.90% for TTX, p=0.9964, and to 68.88% to

73.10% for CNQX/APV, p=0.8696, concerning dynamic vesicles. 27.43% to 26.10% for TTX, p=0.9964, and to 31.12% to 26.90% for CNQX/APV, p=0.8696, concerning static vesicles). Similarly, inhibitory treatments had no effect on the number of docked vesicles and on the total pool of tPA-containing vesicles present in axons (Fig. 2H). Relating to dynamic vesicles data, there was mostly no change, excepted for the anterograde velocity, for which CNQX/APV application on neuronal cultures significatively reduced the axonal anterograde velocity of tPA-containing vesicles (Fig 2 F) (anterograde velocity: 0.90 µm.s-1 to 0.845 µm.s-1 for TTX, p=0.2834, and to 1.01 µm.s-1 to 0.7533 µm.s-1 for CNQX/APV, p=0.0383; Retrograde velocity: 1.11 µm.s-1 to 1.06 µm.s-1 for TTX, p>0.9999, and to 1.12 µm.s-1 to 1.15 µm.s-1 for CNQX/APV, p>0.9999). Although no modification of kymographs indices was noted (Fig. S2D and S2E), an increase of the time spent by the vesicles in the retrograde direction and a reduction of the time spent in the anterograde direction were observed with the two inhibitory treatments (Fig. S2F) (57.45% to 67.27% for TTX, p=0.0327, and to 62.63% to 71.98% for CNQX/ APV, p=0.0126 for the time spend retrograde. 24.47% to 15.73% for TTX, p=0.0091 and to 20.57% to 12.90% for CNQX/APV, p=0.0459 for the time spend anterograde). Together, these data show that neuronal inhibition does not significantly affect the neuronal trafficking of tPA-containing vesicles both in dendrites and axons. This unchanged tPA trafficking during inhibitory treatments are in favor of a constitutive secretion of tPA in neuronal processes.

Neuronal activation affects the release of tPA containing vesicles.

We then decided to investigate more in detail whether neuronal activation may control exocytosis of tPA-containing vesicles. We thus transiently transfected neuronal cultures with a construct encoding for a dual color reporter of tPA with a HaloTag® site as described before fused with the super-ecliptic-pHluorin (SEP). We were then capable to simultaneously observed the pool of intracellular neuronal tPA (TMR-HaloTag®-tPA) and its extracellular release (tPA-SEP) (Fig. 3A and 3B). In cortical neurons cultures (div 13-14) we unmasked tPA exocytotic events in both dendrites (MAP2 positive) and axons (MAP2 negative) (Fig. 3C and 3D). Interestingly, after exocytosis, some spots of tPA remain apparent at the synapse from tens of seconds to minutes (Fig. 3C, 3D, 3E and 3F), suggesting that when released the tPA stay close to the neuronal membrane. After applying chemical LTP on neuronal cultures as described above (Fig. 1) (Bic/Gly and KCl), we noted an important increase of the number of docking vesicles in dendrites and in axons (Fig. 3E and 3F). This docking was accompanied by

an increase of the number of vesicles exocytosed per µm (Fig. 3G and 3I) (6.25 to 18.75 vesicles exocytosed per µm for Bic/Gly, p<0.0001, 6.25 to 13.90 vesicles exocytosed per µm for KCl, p=0.0046 concerning dendrites. 8.9 to 24.16 vesicles exocytosed per µm for Bic/Gly, p=0.0039, 6.25 to 22.38 vesicles exocytosed per µm for KCl, p=0.0036 concerning axons) and by an increase of the number exocytosis events on kymographs (Fig. S3A, S3B, S3F and S3G). Surprisingly, when we measured the ratio of the number of vesicles of tPA exocytosed on the number of total vesicles containing tPA, a significant increase of tPA exocytosis was only observed at the postsynaptic compartment under Bic/Gly treatment (Fig. 3H, 3J, S3E and S3J). At the presynaptic compartment, we also observed more exocytosis of tPA (Fig. 3F and 3I) but because of an increase number of tPA-containing vesicles in axons following activation compared to the control conditions (Fig. 3J). We can also observe more exocytosis events (Fig. S3F, S3G) and interestingly more endocytosis events under KCl condition (S3H). These data confirm the hypothesis made on Fig. 1, that neuronal activation leads to an increased number of docked tPA-containing vesicles and subsequent exocytosis both in dendrites and axons, with an increase of the percentage of the post-synaptic release of tPA.

Neuronal inhibition reveals a pre- and postsynaptic constitutive secretion of tPA.

We then decided to investigate whether neuronal inhibition may control exocytosis of tPA-containing vesicles, using the same procedure as above (Fig. 3). After applying chemical LTD on neuronal cultures as described above (Fig. 2) (TTX 1.5µM or CNQX 50µM +APV 50µM), we noted no significant increase of the number of docking vesicles in dendrites (Fig. 4A) and in axons (Fig. 4B) and no significant increase of the number of vesicles exocytosed per µm (Fig. 4C and 4E) (10 to 9.57 vesicles exocytosed per µm for TTX, p>0.9999, 10.3 to 8.22 vesicles exocytosed per µm for CNQX/APV, p>0.9999 concerning dendrites. 12.3 to 12 vesicles exocytosed per µm for TTX, p>0.9999, 16.4 to 8.9 vesicles exocytosed per µm for CNQX/APV, p=0.456 concerning axons). We also noted no difference in the ratio of the number of vesicles of tPA exocytosed on the number of total vesicles containing tPA both in dendrites and axons (Fig. 4D, 4F, S3O and S3T). The number of exocytic and endocytic events of tPA vesicles are the same between control conditions and inhibitory conditions (Fig. S3K, S3L, S3M, S3P, S3Q and S3R). Together, these data show, in agreement with the previously observed trafficking of tPA-containing vesicles that neuronal inhibition does not significantly affect the exocytosis

of tPA both in dendrites and axons. However, we nevertheless observed constitutive exocytosis of tPA both in dendrites and axons with similar ranges (Fig. 4).

VAMP2-positives vesicles and tPA-containing vesicles show similarities in their axonal anterograde trafficking suggesting a co-trafficking.

tPA was reported to be present in synaptobrevin-2 (VAMP2) vesicles showing by co-immunoisolation (Louessard *et al.* 2016) and by co-immunolocalization (Lenoir *et al.* 2019) in glutamatergic neurons. However, no study has compared so far their respective traffic on living cultures of cortical neurons. We thus investigated and compared the traffic of VAMP2-positives vesicles and tPA-containing vesicles in different conditions of neuronal modulation. First, we analyzed retrograde and anterograde trajectories of tPA and VAMP2 in conditions of neuronal activation in dendrites and in axons following applications of Bic/Gly (30µM/200µM). Bic/Gly treatments led to a considerable increase in the docking of these vesicles (Fig. 5A). Interestingly, we also observed that VAMP2- and tPA-containing vesicles displayed the same average anterograde velocity (Fig. 5A and 5D) (0.90 $\mu m.s^{-1}$ for tPA vs 0.95 $\mu m.s^{-1}$ for VAMP2 under control condition, $p>0.9999$; 0.94 $\mu m.s^{-1}$ for tPA vs 0.87 $\mu m.s^{-1}$ for VAMP2 under Bic/Gly condition, $p>0.9999$) and the same average cumulative distance travelled (Fig. 5A and 5E) (37.2 µm for tPA vs 42.5 µm for VAMP2 under control condition, $p=0.4395$; 36.4 µm for tPA vs 39.9 µm for VAMP2 under Bic/Gly condition, $p= 0.5301$) in control and in activating conditions. Nevertheless, when we focused on the times spend by axonal vesicles in both anterograde and retrograde direction, tPA-containing vesicles appeared predominantly retrograde while VAMP2-containing vesicles were largely anterograde (Fig. 5A, S5B), neuronal activation leading to an overall decrease in the speeds and distances traveled by the two types of vesicles (Fig. 5B, 5C, 5D, 5E and S5A). During neuronal inhibition (CNQX/APV (50µM/50µM)), we lost the similarities observed between tPA and VAMP2-containing vesicles. Indeed, although the neuronal inhibition failed to influence the trafficking of tPA (Fig. 2 and S2), an increase of the average retrograde velocity (Fig.5F and 5G) (0.66 $\mu m.s^{-1}$ to 1.13 $\mu m.s^{-1}$, $p<0.0001$) and of the average retrograde cumulative distance (Fig. 5F and 5H) (18.2 µm to 27.8 µm, $p<0.0001$) was observed for the dendritic VAMP2 positive vesicles, associated with a reduction of the percentage of vesicles pausing time (Fig. S5C) (60.4% to 42.1%, $p=0.0002$). Unlike activation, inhibition also revealed a different pattern of the axonal anterograde transport between tPA and VAMP2. We thus observed a higher average anterograde velocity (Fig. 5F and 5I) (0.75

µm.s^{-1} for tPA vs 1.36 µm.s^{-1} for VAMP2 under CNQX/APV condition, p<0.0001) and a higher average distance travelled (Fig. 5F and 5J) (28.9 µm for tPA vs 45.15 µm, p<0.0001) for VAMP2 positive vesicles compared to tPA-containing vesicles. As observed under paradigms of neuronal activation, axonal VAMP2 positive vesicles spent most of their time in the anterograde way while axonal tPA positive vesicles spent most of their time in the retrograde way (Fig.S5D). During inhibition the two type of vesicles spent the same pausing time (Fig. S5D). All of these data suggest that VAMP2 and tPA present a co-trafficking in axonal anterograde way both in neuronal resting state or activating state. When neurons are inhibited, traffic parameters indicated that VAMP2 vesicles display a pattern, particularly in dendrites, at the opposite of tPA vesicles.

Synaptic tPA increases the release of VGlut1 positives vesicles.

For over twenty years, we know that tPA is capable to modulate glutamatergic neurotransmission by interacting with the neuronal NMDAR (Nicole *et al.* 2001). Here, we wanted to know if tPA could influence or not the release of glutamate by cortical neurons. In this experiment, we used the vesicular glutamate transporter 1 (VGlut1) coupled with a pHluorin to follow in real time the exocytosis of glutamate (Fig. 6A). Using live spinning disk imaging, we were capable to reveal, in high timing resolution, the fusion events of VGlut1-SEP positive vesicles in both dendrites and axons with or without tPA treatment (Fig. 6B and 6C). Interestingly, tPA treatment (300nM) significantly increase the average number of VGlut1-SEP positives vesicles presents on the dendrites surface (Fig. 6D) (11.9 to 29 vesicles exocytosed per 100 µm, +140%, p<0.0001) and on the axons surface (Fig. 6E) (16.7 to 22.9 vesicles exocytosed per 100µm, +37%, p=0.0279) compared to control condition. These results showed that tPA is capable to increase the release of synaptic glutamate.

Alteration of the axonal trafficking of tPA-containing vesicles in the THY-Tau22 mouse model of tauopathy.

In order to further analyze the traffic of neuronal tPA, we decided to use the THY-Tau22 (Tau22) mouse model of tauopathy previously characterized by an hyperphosphorylation of the Tau protein, subsequent ends up unhooking of the microtubules, Tau aggregates, paired helical filaments and neurofibrillary tangles (NFTs) (Schindowski *et al.* 2006) (Fig. 7A). At the dendritic level, we observed the same percentage of dynamic and static tPA-containing

vesicles between wild type (WT) and Tau22 cultured cortical neurons (46.75% to 43.31% for dynamic vesicles, p=0.5765. And 53.25% to 56.69% concerning static vesicles, p=0.5765) (Fig. 7 B and 7D). Similarly, tauopathy did not affect the number of docked vesicles and did not modify the total pool of tPA-containing vesicles in dendrites (Fig. 7B and 7E). By examining the dynamic of these vesicles, the tauopathy did not change neither the velocity nor the distance traveled by the vesicles (Fig. 7C) (anterograde velocity: 0.6 µm.s^{-1} for WT and 0.65 µm.s^{-1} for Tau22, p=0.5706. Retrograde velocity: 0.578 µm.s^{-1} to for WT and 0.58 µm.s^{-1} for Tau22, p=0.7218). Moreover, there was no difference concerning the others kymographs indices between dendrites of WT and Tau22 cultured cortical neurons (Fig. S5A, S5B and S5D). However, microtubule destabilization induced by Tau hyperphosphorylation in corresponding axons leads to an impaired trafficking of tPA-containing vesicles, with an increased percentage of static vesicles (Fig. 7F and 7H) (83% to 67% for dynamic vesicles, p=0.0140. And 17% to 33% concerning static vesicles, p=0.0140) and of the number of docked vesicles for a same amount of tPA-containing vesicles (Fig. 7I). Tau22 neurons presented a drastic decrease of both anterograde and retrograde velocities of tPA positive vesicles and of the cumulative distance travelled by these vesicles (Fig. 7G) (anterograde velocity: 1.3 µm.s^{-1} to for WT and 0.82 µm.s^{-1} for Tau22, p<0.0001. Retrograde velocity: 1.66 µm.s^{-1} to for WT and 0.93 µm.s^{-1} for Tau22, p<0.0001). We also revealed the same modifications of kymographs indices (Fig. S5E, S5F and S5G), and an increase of the time spend by dynamic tPA-containing vesicles in pause in Tau22 axons (Fig. S5H). (4.1% to 22.8% time in pause, p<0.0001). Taken together, these data show that the presence of hyperphosphorylated tau proteins causes a profound upheaval in the trafficking of axonal tPA-containing vesicles.

The upheaval of axonal trafficking in the Tau22 mouse model promotes the exocytosis of axonal tPA.

We then investigated the consequences of the hyperphosphorylation of Tau (Tau22) on the exocytosis of tPA-containing vesicles. We observed neither significant difference in the number of exocytosed vesicles per 100µm (Fig. 8A and 8B) (8.33 vesicles exocytosed per µm for WT and 6.65 vesicles exocytosed per µm for Tau22, p=0.1393), nor in the ratio of the number of vesicles of tPA exocytosed on the number of total vesicles containing tPA between WT and Tau22 neurons (Fig. 8C and 8D) (10.9% for WT vs 9.32% for Tau22, p=0.4728). Regarding the number of exocytosis and endocytosis events, there were also almost identical

(Fig. 8E and 8F) and the number of motile SEP positives vesicles too between WT and Tau22 neurons. At the axonal level, we noted a significant increase in the number of exocytosed vesicles per 100µm in the Tau22 neurons compared to WT cells (Fig. 8H and 8I) (5.44 vesicles exocytosed per µm for WT vs 13.5 vesicles exocytosed per µm for Tau22, p=0.0045), in addition of a significant difference in the ratio of the number of vesicles of tPA exocytosed on the number of total vesicles containing tPA (Fig. 8J and 8K) (13.4% for Wt vs 20.1% for Tau2, p=0.3048). Concerning the number of exocytosis and endocytosis events, no difference was observed between WT and Tau22 neurons (Fig. 8L and 8M), as well as for the number of motile exocytosed tPA (SEP positives) (Fig. 8N). These data show that the THY-Tau22 model provokes mainly axonal disorders including an increase of the docking of tPA-containing vesicles and of a subsequent increase in their exocytosis.

Discussion

Long distance transports of cargoes and organelles in neuronal processes are essentials for neuronal maturation and survival. They make possible neuronal communication by the transport and release of neurotransmitters. We knew that impairments of axonal transports due to microtubules motor proteins mutations cause disruption of neuronal homeostasis and neurodegeneration (Holzbaur 2004). tPA is a serine-protease described to be present and transported by neurons of several brain regions and used as a neuromodulator of glutamatergic transmission (Nicole et al. 2001). Surprisingly there are only few studies about the neuronal trafficking of tPA.

In this study, we investigated the trafficking of the secreted tPA in cortical neurons in physiological and in a pathological context. We saw firstly that neuronal activity affected dendritic and axonal tPA trafficking, in particular in an activating state. Indeed, we revealed that the neuronal activation leads globally to a decrease the tPA vesicles velocity and distance traveled, notably by an increase of pausing time and docking of these vesicles (Fig. 1 and S1). Interestingly, we noticed that Bic/Gly treatment particularly influences the bidirectional tPA trafficking in dendrites while at the axonal level it is particularly the KCl treatment. It seems that this would come from the stimulation mechanism linked to each of these treatments. The Bic/Gly treatment inhibits interneurons GABAa receptors by the bicuculline and activates NMDAR by glycine, it therefore promotes the enrichment of postsynaptic currents (Ivenshitz and Segal 2006; Kennedy *et al.* 2010). The KCl treatment promotes rapid depolarization of neurons and leads to an increase of the number of action potentials in axons and presynaptic terminal (Fitzjohn *et al.* 2001; Pickard *et al.* 2001). This behavior of tPA vesicles trafficking is correlated to an increase of exocytosis both in dendrites and axons (Fig 3 and S3). We agree with the literature where studies showed that depolarization induced by the GABA receptor antagonist bicuculline or by a high concentration in K+ increased the neuronal release of tPA (Centonze *et al.* 2002; Lochner *et al.* 2006; de Wit *et al.* 2009). We also observed that the exocytosis of tPA caused by these chemical LTPs reveal different release mechanisms at the dendritic and axonal level. At the dendritic level, an increase of exocytosis is observed with the same number of vesicles like control condition which mobilizes the vesicles pool while at the axonal level LTP causes an increase in the number of vesicles and docking vesicles present on processes (Fig. 3).

Surprisingly, neuronal inhibition had no effect on tPA vesicles trafficking and exocytosis (Fig. 2, S2, S3 and 4). TTX and CNQX/APV treatments were chosen because they play the opposite roles of the two activator treatments. The decrease of intracellular Ca^{2+} concentration does not affect pre and postsynaptic tPA trafficking. It is possible that the tPA overexpression in neurons compensates chemicals inhibitors treatments by potentiating Ca^{2+} influx due to its interaction with NMDAR, thus allowing to maintain high levels of Ca2+ concentration in the pre and postsynaptic compartments. This first hypothesis is unlikely because the transfection efficacy when using lipofectamine on cell cultures is low. It is also very likely that this inhibition highlights a constitutive secretion of tPA by neurons (Shin *et al.* 2004). Indeed tPA could be secreted by this route to remove and maintain the extracellular matrix by a plasminogen/plasmin dependent mechanism (Seeds *et al.* 1992; Kim *et al.* 2017).

The axonal anterograde vesicles of tPA shown similarities with VAMP2 positives vesicles in resting and activating state of neurons suggesting a co-trafficking in the same vesicles (Fig 5 and S4). tPA has been identified in dense core vesicles (DCVs) (Silverman *et al.* 2005) and in a subset of DCVs-containing VAMP2 (Tobin *et al.* 2012; Louessard *et al.* 2016). Here we wanted to see if the traffic of tPA and the traffic of the v-SNARE VAMP2 showed similarities in live cell imaging. We found that tPA and VAMP2 had the same axonal anterograde vesicle velocity and the same vesicle distance traveled in control and in activating conditions (Fig. 5). In opposite to tPA positive vesicles, VAMP2 postive vesicles responded well to inhibitory treatments. Interestingly, despite common axonal anterograde motor parameters, the majority of axonal VAMP2 positive vesicles are anterograde (Nabb and Bentley 2021) and tPA positive vesicles retrograde (Fig. 1, 2 and 5; Lenoir *et al.* 2019). This is explained by the function of these two proteins, VAMP2 is predominantly present in the secretion and fusion compartment, while tPA is found in all compartment in dendrites and axons. tPA is described to be co-localized with endosomal family markers protein Rab, notably tPA is found in early endosomes positive for Rab5, late endosomes (Rab7) and in recycling endosomes (Rab 11) in both axons and dendrites (Lenoir *et al.* 2019). The abundant retrograde trajectories representative of axonal kymographs of tPA resemble closely of signaling endosomes trajectories with the same average speed (Barford *et al.* 2018). Our data also suggest that during a neuronal inhibition, the potential axonal constitutive secretion of tPA passes through other organelles than the VAMP2 positive DCVs.

Interestingly, we also observed that exogenous tPA was capable to increase the exocytosis of VGlut1 positives vesicles containing glutamate (Fig. 6), in agreement with its capacity to modulated glutamatergic transmission (Nicole *et al.* 2001). In agreement with the literature, we also observed VGlut1 positives vesicles in the postsynaptic compartment (Zilberter 2000; Gabellec *et al.* 2007). Addition of tPA leads to an increase the the fusion of VGlut1-SEP positives vesicles both at the dendritic and axonal surface. The existence of presynaptic NMDARs is also reported (Bouvier *et al.* 2018), which could explain our presynaptic observations. It is possible for tPA to interact with both pre and postsynaptic NMDARs to increase glutamate release in dendrites and axons. It is therefore not impossible that a neuron activates itself by releasing tPA. All of our present experiments were performed on mixed cell cultures contained astrocytes. Astrocytes are able to recapture synaptic tPA to recycle it and release it into the extracellular medium by a glutamate dependent mechanism (Cassé *et al.* 2012). Moreover, astrocytes are also described to concentrate on their surface the plasminogen, which can be activated by the tPA released from astrocytes and neurons (Briens *et al.* 2017). The plasmin then generated is able in turn to activate other molecules such as growth factors like pro-BDNF in mature BDNF (Pang *et al.* 2004), known to promote neuronal and synaptic growth, to maintain LTP and to promote the release of glutamate (Acheson *et al.* 1995; Boulanger and Poo 1999; Jovanovic *et al.* 2000; Yamada and Nabeshima 2003).

We finally studied the trafficking of tPA in THY-Tau22 cortical neurons presenting an increase of the hyperphosphorylation of the protein tau. We observed that this impairment of the Tau proteins uniquely affect the axonal trafficking of tPA, by an impressive reduction of tPA vesicles velocity and distance traveled (Fig. 7). Moreover, trajectories of axonal vesicles of tPA showed an increase of pausing time (Fig.S5) with an increase of the number of tPA positive vesicles docked in THY-Tau22 axons (Fig. 6). These results are correlated with an increased exocytosis of tPA in THY-Tau22 neurons (Fig. 8). We found no alteration of the trafficking of the dendritic tPA neither of its exocytosis, probably due to the absence of NFTs formation at the stage. It was described in THY-Tau22 mice that the NFTs are formed around 6 months (Schindowski *et al.* 2006). It is very likely that the 14 days of *in vitro* life of our cultured neurons are not enough for NFTs formation, but sufficient to observe heavy deficits in axonal traffic. Our data are in agreement with the recent literature in other AD models reporting a decrease

of the vesicular speeds in THY-Tau22 axons (Combs *et al.* 2021).

Altogether, we provide here a robust description and analyses of the trafficking of tPA in cortical neurons under different neuronal activities. We thus described both presynaptic and postsynaptic behavior of tPA vesicles and showed that they could be altered in a mouse model of AD. Briefly, we revealed an axonal constitutive VAMP2-mediated release of tPA, promoted by neuronal activation, leading to a tPA-mediated increase of the release of the excitatory neurotransmitter, glutamate.

MATERIAL AND METHODS

Reagents

Recombinant human tPA (Actilyse®) was purchased from Boehringer Ingelheim (Ingelheim am Rhein, Germany). Fetal bovine serum, horse serum, lipofectamine R 2000 reagent, B27 supplement, glutamine, laminin, neurobasal medium, and penicillin/streptomycin were purchased from ThermoFisher (Waltham, Massachusetts, USA). Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM), poly-D-lysine, phosphate-buffered saline (PBS), Glycine (Gly), paraformaldehyde, albumin from bovine serum, ammonium chloride (NH4Cl), potassium chloride (KCl), and rabbit polyclonal antibody were purchased from Sigma-Aldrich (St Louis, MO, USA). Tetrodotoxin citrate (TTX), cyanquixaline (CNQX), (2R)-amino-5-phosphonovaleric acid (APV) and bicuculline methiodide (Bic) were purchased from Tocris (Bristol, UK). Aprotinin (Trasylol) was purchased from Bayer (Leverkusen, Germany). HaloTag® TMR ligand was purchased from Promega (Madison, Wisconsin, USA). The following primary antibodies were used for immunocytochemistry: mouse monoclonal anti-HaloTag® (dilution 1:1,000; Promega; G9211) rabbit anti-tPA polyclonal antibody (dilution 1:1 500; generous gift from R. Lijnen, Leuven), chicken anti-Microtubule-associated protein 2 (MAP2) polyclonal antibody (dilution 1:8 000; Abcam, Cambridge, UK; ab5392), guinea pig anti-synapsin polyclonal antibody (dilution 1:500; Synaptic System; 106 004) and rabbit antihomer-1C polyclonal antibody (dilution 1:500; Synaptic System; 160 003). Secondary fluorescent antibodies (Alexa647; dilution 1:800) were purchased from Jackson Immunoresearch (Bar Harbor, ME, USA).

Plasmid Constructs

The cDNA encoding for amino acids 1 to 32 of the peptide signal of human tPA was amplified from the full-length human tPA cDNA. The corresponding Polymerase Chain Reaction (PCR) product was subcloned into the eukaryotic expression plasmid pCDNA5.1 between NheI and BamHI. Then, the full length coding sequence for mature human tPA was PCR amplified and subcloned downstream of the "peptide signal–6xHis" between BamHI and XhoI restriction sites to generate a cDNA encoding for the mature 6xHis human tPA (tPAwt). The cDNA of HaloTag® without the Tobacco Etch Virus protease (TEV) cleavage site was PCR amplified from the plasmid pFC14A (Promega, France) and subcloned into pCDNA5.1-tPA between the end of the sequence encoding for tPA and the STOP codon at the end of the Halo-Tag®, then fused in

BamHI between the His-tag and the beginning of the cDNA for tPA (HD-Fusion technologies from Clontech, USA). For synapsin promote-driven constructs, we replaced the CMV promotor of the plasmid pCI by the cDNA of the synapsin promotor subcloned between BglII and NheI. For pCMV_HaloTag®-tPA-SEP, the cDNA encoding for the pH sensitive GFP (pHluorin) was subcloned by fusion into pCMV_HaloTag® - tPA between the end of the sequence of tPA and the STOP codon. The constructs of pCMV_GFP_VAMP2, and pCAG_RFP were provided by Thierry Galli (Paris, France). The constructs of pCMV_SEP_VAMP2 and pCMV_SEP_VGlut1 were provided by Frédéric Saudou (Grenoble, France) and Timothy Ryan (New York, USA) respectively. pCMV_GFP (pAcGFP1-N1 Vector, Cat#632469) was purchased from Takara Bio (Kusatsu, Japan). All the constructs were amplified in Escherichia coli DH5a cells and purified by a Nucleobond endotoxin-free plasmid DNA PC 2000 kit (Macherey-Nagel) according to the manufacturer's instructions.

Cell Cultures

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

Primary cultures of cortical neurons were prepared from fetal mice (embryonic day 14) as previously described (Buisson et al., 1998). Cortices or hippocampi were dissected and dissociated in DMEM and plated (250 000 cell/ mL) on glass bottom microwell dishes (MatTek Corporation, P35G-1.5-14-C, Ashland, MA, USA) earlier coated with polyD-lysine (0.1 mg/ml) and laminin (0.02 mg/ml). Cells were cultured in Neurobasal Medium supplemented with 0.4 mM of glutamine, 2% B27 supplement 50X, 10% horse serum and penicillin/streptomycin (10,000 IU/ml; 10,000 UG/ml). After 1 h, media were replaced by glio-conditioned medium obtained from primary cultures of astrocytes (see above). Cultures were maintained at 37 ◦C

in a humidified 5% CO2 atmosphere. One third of medium was changed one time weekly by fresh glioconditioned medium.

Neuronal Transfection

Transfections were performed at Day In Vitro (DIV) 12 or DIV 13. Neuronal cultures were washed with HEPES and Bicarbonate Buffered Salt Solution (HBBSS; NaCl: 116 mM, KCl: 5.4 mM, CaCl2: 1.8 mM, MgSO4: 0.8 mM, HEPES: 12 mM, NaH2PO4: 0.34 mM, D-glucose: 5.5 mM, NaHCO3: 25 mM and Glycine: 10µM) prior a 8 h incubation in the presence of the mentioned cDNAs and lipofectamine R 2000-containing HBBSS. Regular media as described above (cell cultures section) then replace HBBSS. The transfection efficiency is 10–20%

tPA-HaloTag® Detection With HaloTag® TMR Ligand

After 24–48 h, neuronal cultures were washed 3 times with HBBSS, HaloTag® TMR ligand was added during 15 min and neuronal cultures were washed 3 times again with HBBSS (to remove unbound ligand) and 30 min later a last wash was performed 3 times with HBBSS (to remove astrocytic release of captured unbound ligand).

Immunocytochemistry

Neuronal cultures were washed with HBBSS, fixed in paraformaldehyde 4% for 20 min at room temperature, washed in PBS (0.1 M) and blocked 1 h in PBS containing 0.3% Triton X100 and albumin (4%). The primary and secondary fluorescent antibodies were used (see reagent section) and confocal laser-scanning microscopy was performed (see the next section).

Microscopy

Laser Scanning Confocal Microscopy

Laser-scanning confocal microscopy (LSCM) was performed using an inverted Leica SP5 confocal microscope and a Leica TCS SP8 Confocal/STED microscope (Leica Microsystems SAS; Leica, Wetzlar, Germany) equipped with an Argon Gas laser and a X40 NA = 1.3 oil immersion objective. Culture was scanned at room temperature with 458-, 488-, 561, 633-nm, laser lines to detect the CFP, GFP or SEP or Cy2, HaloTag® TMR ligand and Alexa647, respectively and high resolution images (1024 × 1024, 12 bits) of optical sections (z stack, step: 0.45µm) were captured using sequential line (mean of three) scanning. Colocalizations of two or three

fluorophores were qualitatively assessed in the x, y, and z planes of each optical section. Maximal projection images of confocal z series (stacks) were generated where indicated in the figure legends. Minimal adjustments to image contrast and intensity were made in ImageJ software using the levels or contrast/brightness functions.

Live Imaging

Live imaging experiments were achieved using 3 different microscopes. Protein trafficking and fusion acquisitions were performed with a Leica SP5 confocal microscope and a Leica TCS SP8 Confocal/STED microscope (Leica Microsystems SAS; Leica, Wetzlar, Germany) using a x40 oil immersion objective. All time-lapse images were collected with the same parameters on these two microscopes at a 512 × 512–pixel resolution (8 bit). A short interval (1.29 s) for 465 images in a sequential mode was used to maximize vesicles resolution trajectories during 10 minutes. A relatively low laser intensity was used to minimize laser-induced cellular damage. All acquisitions were performed using a temperature control system ("cube & box," life imaging services, Basel, Switzerland) at 37◦C. VGlut1 time-lapse acquisitions were performed with a Leica Spinning disk with a x40 oil immersion objective in a sequential mode with a time interval of 600ms between each images during 5 minutes.

STED Microscopy

Confocal and STED images were acquired with a Leica TCS SP8 Confocal/STED 3× microscope with a glycerol-immersion 100×, 1.44-N.A. objective. Dual-color sequential confocal scans were followed by dual-color sequential STED scans by using a STED microscope. HaloTag® TMR ligand and GFP were excited with 555 and 488-nm white light lasers respectively, at 2–5% of laser power in this particular order. During STED scanning, GFP, and HaloTag® TMR ligand signals were depleted with 592 nm and 660 nm time-gated depletion lasers.

Image Analysis

Analysis of Proteins Containing Vesicle Motility

tPA and VAMP2 motility analysis was analyzed in both axonal and dendritic processes. Axons were distinguished from dendrites firstly based on known morphological characteristics: greater length, thin and uniform diameter, and sparse branching (Banker and Cowan, 1979). After a dozen retrospective immunostainings with an anti-MAP2 antibody of each neurite, a

kymograph type profile for each neuronal process has been established and used as a basis for neurite distinction. We selected the proximal region of axons and dendrites for time-lapse imaging analysis. Only those that appeared to be single axons and separate from other processes in the field were chosen for recording axonal transport. Regions where crossing or fasciculation occurred were excluded from analysis. A vesicle has been considered stationary if it remained immotile for the entire recording period; a vesicle has been considered mobile only if the displacement was ≥2µm during 5 min.

Protein Trafficking

tPA and VAMP2 trajectories were generated and analyzed using the KymoToolbox, a ImageJ plugin developed by Fabrice P. Cordelières. This plug-in allows the generation of multiple kymographs that are calibrated in space (x axis in µm) and time (y axis in s). All of kymographs are generated here with a length of 60µm during 10 minutes. Kymographs were then analyzed manually by drawing the vesicles trajectories. The plug-in extracts the dynamic parameters directly from the trajectories and also reports the tracked particles on the original video with a color directionality code (red for anterograde, green for retrograde and blue for stationary dynamics).

Protein Fusion

tPA and VAMP2 fusion event were measured on kymographs after generation using KymoToolbox plugin. Kymographs were generated with various length but like protein trafficking only during 10 minutes. VGlut1 fusion were measured using detect particles from the ComDet plugin on FIJI. ComDet quantified each pictures from each time-lapse acquisition, and finally a mean of VGlut1-SEP positives puncta was made for each process.

Experimental Design and Statistical Analyses

The values of charts are presented as mean ± SEM. All analyses were completed from a minimum of two to nine independent cultures. Each experiment was performed from independent dish of cultured cortical neurons. The number of sample, named “n” corresponds to either the number of independent neurons analyzed (all figures excepted Figure 3) or to the number of independent vesicles analyzed. Data have been analysed with Prism (Graphpad) software. Shapiro-Wilk tests were used to ensure a normal distribution. Comparisons of two data sets were performed using unpaired two-tailed Student’s t-test for

normally distributed data sets and Mann–Whitney test for non-normally distributed data sets. Comparisons for multiple data sets were performed using one-way analysis of variance with Tukey's post-hoc test for normally distributed data sets and Kruskal–Wallis test with Dunn's multiple comparison test for non-normally distributed data sets.

Paired group comparisons of two data sets were performed using paired t-test for normally distributed data sets and Wilcoxon signed-rank tests for non-normally distributed data sets. Comparisons of multiple non-parametric paired data sets were performed using a Friedman's test.Significance levels were defined as * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$, **** $P < 0.0001$, ns : not significant.

Figure legends

Figure 1: Neuronal activation disrupts the traffic of tPA-containing vesicles

A. Timeline of the experiments, the star represents the time of treatment. Cultures of cortical primary neurons and glial cells and the imaging of both dendritic and axonal tPA-HaloTag® transduced in primary cortical neurons. **B**. Representative kymographs of dendritic tPA-containing vesicles after treatments: control HBBSS, bicuculline/glycine (Bic/Gly, 30µM/200µM respectively) and potassium chloride (KCl, 50mM). **C**. Kymographs analysis of anterograde and retrograde velocities in $\mu m.s^{-1}$ and their respective cumulative distances in µm for each conditions. Control n= 167; Bic/Gly n= 154; KCl n= 140 vesicles for retrograde trafficking and Control n= 177; Bic/Gly n= 166; KCl n=138 vesicles for anterograde trafficking. **D**. Pourcentage of dynamic or static vesicles for each dendrite. Control n= 24; Bic/Gly n= 21; KCl n= 18 dendrites. **E**. Number of docked vesicles and the total vesicles pool for each dendrite per µm. Control n= 24; Bic/Gly n=21; KCl n=18 dendrites (**C**-**E**) from 10 to 12 neurons from 2 to 5 independent cultures. **F**. Representative kymographs of dendritic tPA-containing vesicles after treatments: control, Bic/Gly (30µM/200µM) and KCl (50mM). **G**. Kymographs analysis of anterograde and retrograde velocities in $\mu m.s^{-1}$ and their respective cumulative distances in µm for each conditions. Control n= 200; Bic/Gly n= 379; KCl n=367 vesicles for retrograde trafficking and Control n= 103; Bic/Gly n= 185; KCl n=193 vesicles for anterograde trafficking from 11 to 20 neurons from 2 to 5 independent cultures. **H**. Pourcentage of dynamic or static vesicles for each dendrite. Control n= 13; Bic/Gly n=14; KCl n=14 axons. **I**. Number of docked vesicles and the total vesicles pool for each dendrite per µm. Control n= 13; Bic/Gly n=14; KCl n=14 axons (**H**,**I**) from 13 to 14 neurons from 2 to 5 independent cultures. **C**,**G.** Kruskal-Wallis's test followed by a Dunn's multiple comparisons test were used. Error bars = SD. **D**,**E**,**H**,**I.** one-way ANOVA and a Tukey's post hoc test were used. Error bars = SEM. **B**, **F**. kymographs scale: x=40µm, y=10min. * p<0.05, ** p<0.01*** p<0.005, **** p<0.0001, ns: not significant.

Figure 2: Neuronal inhibition has no impact on tPA containing vesicles trafficking.

A. Representative kymographs of dendritic tPA containing vesicles after treatments: control HBBSS, control DMSO, Tetrodotoxin (TTX, 1.5 µM) and Cyanquixaline/Acide 2-amino-5-phosphonovalérique (CNQX/APV, 50µM/50µM respectively). **B**. Kymographs analysis of anterograde and retrograde velocities in $\mu m.s^{-1}$ and their respective cumulative distances in

µm for each conditions. Control n= 167; DMSO n= 181; TTX n= 199 and CNQX/APV n= 155 vesicles for retrograde trafficking and Control n= 177; DMSO n= 180; TTX n=212 and CNQX/APV n= 169 vesicles for anterograde trafficking. **C**. Percentage of dynamic or static vesicles for each dendrite. Control n= 24; DMSO n= 16; TTX n= 27 and CNQX/APV n= 19. **D**. Number of docked vesicles and the total vesicles pool for each dendrite per µm. Control n= 24; DMSO n= 16; TTX n= 27 and CNQX/APV n= 19 dendrites (**B**-**D**) from 11 to 14 neurons from 2 to 5 independent cultures. **E**. Representative kymographs of axonal tPA-containing vesicles after treatments: control HBBSS, DMSO, TTX (1.5 µM) and CNQX/APV (50mM/50mM). **F**. Kymographs analysis of anterograde and retrograde velocities in $\mu m.s^{-1}$ and their respective cumulative distances in µm for each conditions. Control n= 200; DMSO n= 549; TTX n= 394 and CNQX/APV n= 252 vesicles for retrograde trafficking and Control n= 103; DMSO n= 250; TTX n= 136 and CNQX/APV n= 81 vesicles for anterograde trafficking from 11 to 23 neurons from 2 to 5 independent cultures. **G**. Percentage of dynamic or static vesicles for each axon. Control n= 13; DMSO n= 17; TTX n= 14 and CNQX/APV n= 16 axons. **H**. Number of docked vesicles and the total vesicles pool for each axon per µm. Control n= 13; DMSO n= 17; TTX n= 14 and CNQX/APV n= 16 axons (**G**,**H**) from 10 to 23 neurons from 2 to 5 independent cultures. **B**,**F.** Kruskal-Wallis's test followed by a Dunn's multiple comparisons test were used. Error bars = SD. **C**,**D**,**G**,**H.** one-way ANOVA and a Tukey's post hoc test were used. Error bars = SEM. **A**, **E**. kymograph scale: x=40µm, y=10min. * p<0.05, ** p<0.01*** p<0.005, **** p<0.0001, ns: not significant.

Figure 3: Neuronal activation increases exocytosis of tPA containing vesicles.

A. Schematic diagrams of a dual color reporter for neuronal tPA. The tPA produced display in addition to the halotag® which makes possible to highlight the total pool of vesicles containing tPA, a superecliptic pHluorin (SEP) allowing to observe the phenomena of exocytosis of these vesicles, as well as the extracellular pool of tPA. **B**. Graphic showing fluoresence profiles of TMR-HaloTag® and SEP before (1) and after (2) a tPA exocytosis, corresponding of the two situations in the schematic representation in A. **C**, **D**. Example of a dendritic tPA exocytosis in C (process MAP2 positive; in cyan) and of an axonal tPA exocytosis in D (process MAP2 negative) in basal condition. At the top, a representative z-stack confocal images of transfected cortical neurons (DIV13) with pCMV_HaloTag®-tPA-SEP plasmid (TMR ligand; in magenta and SEP; in yellow), a first zoom on the observed process, and a second zoom on the vesicle followed just below (white arrow). At the bottom, time-lapse were acquired in 2 dimensions

every 30 s (t = 0 was assigned of exocytosis; Time is in min:sec), nearby respective kymographs of HaloTag®-tPA-SEP exocytosis are shown. **E**, **F**. Representative stacks of processes time lapse and their associated kymographs displaying HaloTag®-tPA-SEP during neuronal activation with Bic/Gly (30µM/200µM) and KCl (50mM) treatments in dendrites (E) and in axons (F). All process showed in E and F measures 40µm, and all kymographs represents 40µm horizontally and 10 minutes vertically. **G**. Number of vesicles exocytosed per 100µm in dendrites. Control n=22, Bic/Gly n= 21, KCl n=16 neurons. **H**. Number of vesicles exocytosed (SEP positive) as ratio of the total pool of tPA vesicles (TMR-HaloTag® positives) on dendrites. Control n=22, Bic/Gly n= 21, KCl n=16 neurons (G,H) from 2 to 5 independents cultures. **I**. Number of vesicles exocytosed per 100µm in dendrites. Control n=12, Bic/Gly n= 14, KCl n=14 neurons. **J**. Number of vesicles exocytosed (SEP positive) as ratio of the total pool of tPA vesicles (TMR-HaloTag® positives) on axons. Control n=12, Bic/Gly n= 14, KCl n=14 neurons (G,H) from 2 to 5 independents cultures. **G**,**H**,**I**,**J**. one-way ANOVA and a Tukey's post hoc test were used. Error bars = SEM. **C**,**D**. Scale bar, (top) left : 60µm, middle : 15µm, right : 1µm, and (bottom) 1µm. **E**,**F**. kymographs scale : x=40µm, y=10min. * $p<0.05$, ** $p<0.01$*** $p<0.005$, **** $p<0.0001$, ns: not significant.

Figure 4: Neuronal inhibition reveals a constitutive exocytosis of tPA.

A, **B**. Representative stacks of processes time lapse and their associated kymographs displaying HaloTag®-tPA-SEP during neuronal inhibition with TTX (1.5µM) and CNQX/APV (50mM/50mM) treatments in dendrites (A) and in axons (B). All process showed in A and B measures 40µm, and all kymographs represents 40µm horizontally and 10 minutes vertically. **C**. Number of vesicles exocytosed per 100µm in dendrites. Control n=24, DMSO n=16, TTX n=27, CNQX/APV n=19 neurons. **D**. Number of vesicles exocytosed (SEP positive) as ratio of the total pool of tPA vesicles (TMR-HaloTag® positives) on dendrites. Control n=24, DMSO n=16, TTX n=27, CNQX/APV n=19 neurons (C, D) from 2 to 6 independents cultures. **E**. Number of vesicles exocytosed per 100µm in axons. Control n=13, DMSO n=17, TTX n=14, CNQX/APV n=16 neurons. **F**. Number of vesicles exocytosed (SEP positive) as ratio of the total pool of tPA vesicles (TMR-HaloTag® positives) on axons. Control n=13, DMSO n=17, TTX n=14, CNQX/APV n=16 neurons (E, F) from 2 to 4 independents cultures. C, D, E, F. Kruskal-Wallis's test followed

by a Dunn's multiple comparisons test were used. Error bars = SEM. A, B. kymographs scale: x=40µm, y=10min. * p<0.05, ** p<0.01*** p<0.005, **** p<0.0001, ns: not significant.

Figure 5: tPA-containing vesicles show similarities in their anterograde axonal trafficking under basal and activating conditions with VAMP2 positive vesicles.

A. Representative kymographs of dendritic (high) and axonal (down) tPA-containing vesicles and VAMP2 positives vesicles after treatments: control HBBSS or bicuculline/glycine (Bic/Gly, 30µM/200µM respectively). **B**. Kymographs analysis of anterograde and retrograde velocity in $\mu m.s^{-1}$ and (**C**) their respective cumulative distances in dendrites in µm for each conditions. Control tPA n= 106; Control VAMP2 n= 106; Bic/Gly tPA n= 154; Bic/Gly VAMP2 n= 155 vesicles for retrograde trafficking and Control tPA n= 177; Control VAMP2 n= 112; Bic/Gly tPA n= 166; Bic/Gly VAMP2 n= 144 vesicles for anterograde trafficking from 10 to 15 neurons from 3 to 5 independent cultures. **D**. Kymographs analysis of anterograde and retrograde velocity in $\mu m.s^{-1}$ and (**E**) their respective cumulative distances in axons in µm for each conditions. Control tPA n= 200; Control VAMP2 n= 108; Bic/Gly tPA n= 379; Bic/Gly VAMP2 n= 70 vesicles for retrograde trafficking and Control tPA n= 104; Control VAMP2 n= 168; Bic/Gly tPA n= 185; Bic/Gly VAMP2 n= 136 vesicles for anterograde trafficking from 10 to 15 neurons from 3 to 6 independent cultures. **F**. Representative kymographs of dendritic (high) and axonal (down) tPA containing vesicles after treatments: control DMSO or cyanquixaline/Acide 2-amino-5-phosphonovalérique (CNQX/APV, 50mM/50mM respectively). **G**. Kymographs analysis of anterograde and retrograde velocity in $\mu m.s^{-1}$ and (**H**) their respective cumulative distances in dendrites in µm for each conditions. Control tPA n= 181; Control VAMP2 n= 110; CNQX/APV tPA n= 155; CNQX/APV VAMP2 n=118 vesicles for retrograde trafficking and Control tPA n= 180; Control VAMP2 n= 119; CNQX/APV tPA n= 169; CNQX/APV VAMP2 n= 113 vesicles for anterograde trafficking from 11 to 13 neurons from 2 to 5 independent cultures. **I**. Kymographs analysis of anterograde and retrograde velocity in $\mu m.s^{-1}$ and (**J**) their respective cumulative distances in dendrites in µm for each conditions. Control tPA n= 549; Control VAMP2 n= 67; CNQX/APV tPA n= 252; CNQX/APV VAMP2 n=120 vesicles for retrograde trafficking and Control tPA n= 250; Control VAMP2 n= 140; CNQX/APV tPA n= 81; CNQX/APV VAMP2 n= 219 vesicles for anterograde trafficking from 10 to 17 neurons from 3 to 5 independent cultures. **B**-**E**, **G**-**J**. Kruskal-Wallis's test followed by a Dunn's multiple

comparisons test were used. Error bars = SD. **A**, **F**. kymographs scale: x=40µm, y=10min. * p<0.05, ** p<0.01*** p<0.005, **** p<0.0001, ns: not significant.

Figure 6: tPA increases the pre and postsynaptic release of VGlut1 vesicles.

A. Schematic representation and function of VGlut1-SEP to measure the exocytosis of glutamate-containing vesicles. **B, C.** Representative stacks of processes time lapse displaying a RFP (black and white) and Vglut1-SEP (pseudo-color) during control HBBSS or tPA (300nM) treatment. **D**. Quantifications of the average number of VGlut1-SEP positives spots per 100µm in dendrites in control HBBSS condition or after addition of exogenous tPA (300nM). Control n= 18, tPA n= 19 dendrites from 10 to 12 neurons from 3 to 4 independents cultures. **E**. Quantifications of the average number of VGlut1-SEP positives spots per 100µm in axons in control HBBSS condition or after addition of exogenous tPA (300nM). Control n= 15, tPA n= 15 dendrites from 15 neurons from 4 independents cultures. Statistical tests: unpaired t test, *$p<0.05$, **** $p<0.0001$. Error bars indicate SD. Scale bar = 10µm.

Figure 7: The trafficking of the axonal tPA containing vesicles is altered in the Tau22 mouse model of tauopathy.

A. Diagram showing the formation of neurofibrillary tangles (NFTs) by the hyperphosphorylation of tau protein in the mouse model Tau22 of tauopathy. **B**. Representative kymographs of dendritic tPA-containing vesicles in WT neurons and Tau22 neurons. **C**. Kymographs analysis of anterograde and retrograde velocity in $\mu m.s^{-1}$ and their respectives cumulative distance in µm for each conditions. WT n= 196; Tau22 n= 241 vesicles for retrograde trafficking and WT n= 210; Tau22 n= 241 vesicles for anterograde trafficking. **D**. Pourcentage of dynamic or static vesicles for each dendrite. WT n= 18; Tau22 n= 19. **E**. Number of docked vesicles and the total vesicles pool for each dendrite per µm. WT n= 18; Tau22 n= 19 (**C**-**E**) from 15 to 16 neurons from 3 to 4 independent cultures. **F**. Representative kymographs of axonal tPA containing vesicles in WT neurons and Tau22 neurons. **G**. Kymographs analysis of anterograde and retrograde velocity in $\mu m.s^{-1}$ and their respective cumulative distances in µm for each conditions. WT n= 252; Tau22 n= 377 vesicles for retrograde trafficking and WT n= 144; Tau22 n= 201 vesicles for anterograde trafficking from

13 to 14 neurons from 3 to 4 independent cultures. **H**. Percentage of dynamic or static vesicles for each axon. WT n= 13; Tau22 n= 14. **I**. Number of docked vesicles and the total vesicles pool for each axon per µm. WT n= 13; Tau22 n= 14 (**H**,**I**) from 13 to 14 neurons from 3 to 4 independent cultures. **C**, **D**, **E**, **G**, **H**. Samples were drawn from at least three independent experiments. Statistical tests: two-tailed Mann-Whitney test, * *p<0.05,* *** *p*<0.005, **** *p*<0.0001, ns: not significant. Kymograph scales: x=40µm, y=10min.

Figure 8: Tauopathy increases exocytosis of axonal tPA.

A, **H**. Representative stacks of processes time lapse and their associated kymographs displaying HaloTag®-tPA-SEP in WT and Tau22 neurons in dendrites (A) and in axons (H). All process showed in A and H measures 40µm, and all kymographs represents 40µm horizontally and 10 minutes vertically. **B**. Number of vesicles exocytosed per 100µm in dendrites. **C**. Number of vesicles exocytosed (SEP positive) as ratio of the total pool of tPA vesicles (TMR-HaloTag® positives) on dendrites. **D**. Pie charts representing the percentage of exocytosed HaloTag-tPA-SEP vesicles (SEP positives, in yellow) and intracellular HaloTag-tPA-SEP vesicles (SEP negatives, in magenta) in dendrites. **E**, **F**. Number of tPA-SEP exocytosis (E) and endocytosis (F) events observed in basal conditions. **G.** Number of dendritic motile tPA-SEP positives vesicles. (**B**-**G**) WT n=20 and Tau22 n=19 (C, D) from 3 independents cultures. **I**. Number of vesicles exocytosed per 100µm in axons. **J**. Number of vesicles exocytosed (SEP positive) as ratio of the total pool of tPA vesicles (TMR-HaloTag® positives) on axons. **K**. Pie charts representing the percentage of exocytosed HaloTag-tPA-SEP vesicles (SEP positives, in yellow) and intracellular HaloTag-tPA-SEP vesicles (SEP negatives, in magenta) in axons. **L**, **M**. Number of tPA-SEP exocytosis (L) and endocytosis (M) events observed in axons in basal conditions. **N**. Number of axonal motile tPA-SEP positives vesicles. (**I**-**N**) WT n=14 and Tau22 n=13 (C, D) from 3 independents cultures. **B**-**G** and **I**-**K** Samples were drawn from at least three independent experiments. Statistical tests: two-tailed Mann-Whitney test, ** p<0.01, ns: not significant. Kymograph scales: x=40µm, y=10min.

Extended Data Fig. 1 : Neuronal activation decreases the vesicles distance travelled by increasing the time they spend on pause.

A. Schematic representation and equation of the kymograph persistence indice. **B**, **E**. Persitance indice of tPA containing vesicles in dendrites (**B**) and in axons (**E**) in basal condition or neuronal activation (mean ± SEM). **C**, **F**. Minimal distance between the start and the end of each trajectory of dendritic (**C**) and axonal (**F**) tPA-containing vesicles (mean ± SD). **D**, **G**. Time spent by dendritic (**D**) and axonal (**G**) vesicles in the retrograde and the anterograde direction or in pause as percentage (mean ± SD). **B**,**C**,**D** Control n= 207 ; Bic/Gly n= 193; KCl n=157 vesicles from 10 to 13 neurons from 2 to 5 independent cultures. **E**,**F**,**G** Control n= 259; Bic/Gly n= 475; KCl n=451 vesciles from 11 to 20 neurons from 2 to 5 independent cultures. **B**-**G** Kruskal-Wallis's test followed by a Dunn's multiple comparisons test were used. * $p<0.05$, ** $p<0.01$*** $p<0.005$, **** $p<0.0001$, ns: not significant.

Extended Data Fig. 2 : Neuronal inhibition does not disrupt dendritic tPA-containing vesicles trafficking but increases the time spent by axonal tPA vesicles in the retrograde direction.

A, **D**. Persitance indice of tPA containing vesicles in dendrites (**A**) and in axons (**D**) in basal condition or neuronal inhibition (Error bars = SD). **B**, **E**. Minimal distance between the start and the end of each trajectory of dendritic (**B**) and axonal (**E**) tPA-containing vesicles (Error bars = SEM). **C**, **F**. Time spent by dendritic (**C**) and axonal (**F**) vesicles in the retrograde and the anterograde direction or in pause as percentage (Error bars = SD). **A**,**B**,**C** Control n= 201 ; DMSO n= 198; TTX n= 235 and CNQX/APV n= 182 vesicles from 11 to 14 neurons from 2 to 5 independent cultures. **D**,**E**,**F** Control n= 258 ; DMSO n= 690; TTX n= 463 and CNQX/APV n= 286 vesciles from 10 to 23 neurons from 2 to 5 independent cultures. **A**-**F** Kruskal-Wallis's test followed by a Dunn's multiple comparisons test were used. * $p<0.05$, ** $p<0.01$*** $p<0.005$, **** $p<0.0001$, ns: not significant.

Extended Data Fig. 3: Only neuronal activation modifies endocytotic and exocytotic events of tPA-containing vesicles.

A. Representative kymographs of tPA-SEP traces in dendrites during chemical LTP with following a schematic representation of analyses made on it. **B**, **C**. Number of tPA-SEP exocytosis (B) and endocytosis (C) events observed in dendrites during neuronal activation. **D**. Percentage of dendritic motile tPA-SEP positives vesicles. **E**. Pie charts representing the percentage of exocytosed HaloTag-tPA-SEP vesicles (SEP positives, in yellow) and intracellular HaloTag-tPA-SEP vesicles (SEP negatives, in magenta) in dendrites, (**B**-**E**) Control n=22, Bic/Gly n= 21, KCl n=16 neurons from 2 to 5 independents cultures. **F**. Representative kymographs of tPA-SEP traces in axons during chemical LTP. **G**, **H**. Number of tPA-SEP exocytosis (G) and endocytosis (H) events observed in axons during neuronal activation. **I** . Percentage of axonal motile tPA-SEP positives vesicles. **J**. Pie charts representing the percentage of exocytosed HaloTag-tPA-SEP vesicles (SEP positives, in yellow) and intracellular HaloTag-tPA-SEP vesicles (SEP negatives, in magenta) in axons, (**G**-**J**) Control n=12, Bic/Gly n= 14, KCl n=14 neurons from 2 to 5 independents cultures. **K**. Representative kymographs of tPA-SEP traces in dendrites during neuronal inhibition. **L**, **M**. Number of tPA-SEP exocytosis (L) and endocytosis (M) events observed in dendrites during neuronal inhibition. **N**. Percentage of dendritic motile tPA-SEP positives vesicles. **O**. Pie charts representing the percentage of dendritic exocytosed HaloTag-tPA-SEP vesicles (SEP positives, in yellow) and intracellular HaloTag-tPA-SEP vesicles (SEP negatives, in magenta) in dendrites, (**L**-**O**) Control n=24, DMSO n=16, TTX n=27, CNQX/APV n=19 neurons from 2 to 6 independents cultures. **P**. Representative kymographs of tPA-SEP traces in axons during neuronal inhibition. **Q**, **R**. Number of tPA-SEP exocytosis (L) and endocytosis (M) events observed in axons during neuronal inhibition. **S**. Percentage of axonal motile tPA-SEP positives vesicles. **T**. Pie charts representing the percentage of exocytosed HaloTag-tPA-SEP vesicles (SEP positives, in yellow) and intracellular HaloTag-tPA-SEP vesicles (SEP negatives, in magenta) in axons, (**Q**-**T**) Control n=13, DMSO n=17, TTX n=14, CNQX/APV n=16 neurons from 2 to 4 independents cultures. **B**-**D**, **G**-**I**, **L**-**N** and **Q**-**S**. Kruskal-Wallis's test followed by a Dunn's multiple comparisons test were used. **A**, **F**, **K** and **P** kymograph scale: x=40µm, y=10min. ** $p<0.05$, ** $p<0.01$*** $p<0.005$, **** $p<0.0001$*, ns: not significant.

Extended Data Fig. 4: Neuronal activation decreases the vesicles distance travelled by increasing the time they spend on pause.

A, **B**. Time spent by dendritic (A) and axonal (B) vesicles in the retrograde and the anterograde direction or in pause as percentage in basal condition or neuronal activation (Error bars = SD). A. Control tPA n= 106; Control VAMP2 n= 106; Bic/Gly tPA n= 154; Bic/Gly VAMP2 n= 155 vesicles for retrograde trafficking and Control tPA n= 177; Control VAMP2 n= 112; Bic/Gly tPA n= 166; Bic/Gly VAMP2 n= 144 vesicles for anterograde trafficking from 10 to 15 neurons from 3 to 5 independent cultures. B. Control tPA n= 200; Control VAMP2 n= 108; Bic/Gly tPA n= 379; Bic/Gly VAMP2 n= 70 vesicles for retrograde trafficking and Control tPA n= 104; Control VAMP2 n= 168; Bic/Gly tPA n= 185; Bic/Gly VAMP2 n= 136 vesicles for anterograde trafficking from 10 to 15 neurons from 3 to 6 independent cultures. **C**, **D**. Time spent by dendritic (C) and axonal (D) vesicles in the retrograde and the anterograde direction or in pause as percentage in basal condition or neuronal inhibition (Error bars = SD). C. Control tPA n= 181; Control VAMP2 n= 110; CNQX/APV tPA n= 155; CNQX/APV VAMP2 n=118 vesicles for retrograde trafficking and Control tPA n= 180; Control VAMP2 n= 119; CNQX/APV tPA n= 169; CNQX/APV VAMP2 n= 113 vesicles for anterograde trafficking from 11 to 13 neurons from 2 to 5 independent cultures. D. Control tPA n= 549; Control VAMP2 n= 67; CNQX/APV tPA n= 252; CNQX/APV VAMP2 n=120 vesicles for retrograde trafficking and Control tPA n= 250; Control VAMP2 n= 140; CNQX/APV tPA n= 81; CNQX/APV VAMP2 n= 219 vesicles for anterograde trafficking from 10 to 17 neurons from 3 to 5 independent cultures. **A**-**D** Kruskal-Wallis's test followed by a Dunn's multiple comparisons test were used. ** $p<0.05$, ** $p<0.01$*** $p<0.005$*, ***** $p<0.0001$*, ns: not significant.

Extended Data Fig. 5: Dynamic axonal vesicles spend more time off when neurons have tauopathy.

A, **F**. Representative kymographs of dendritic (**A**) and axonal (**F**) tPA containing vesicles in WT neurons and Tau22 neurons **B**, **F**. Persitence indice of tPA containing vesicles in dendrites (**B**) and in axons (**F**) in WT or Tau22 neurons (Error bars = SEM). **C**, **G**. Minimal distance between the start and the end of each trajectory of dendritic (**C**) and axonal (**G**) tPA containing vesicles (Error bars = SD). **D**, **H**. Time spent by dendritic (**D**) and axonal (**H**) vesicles in the retrograde and the anterograde direction or in pause as percentage (Error bars = SD). **B**, **C, D** WT n= 233; Tau22 n= 279 vesicles from 15 to 16 neurons from 3 to 4 independent cultures. **F**, **G, H** WT n=

342 ; Tau22 n= 453 vesicles from 13 to 14 neurons from 3 to 4 independent cultures. **B**, **C**, **D**, **F**, **G** and **H**. Samples were drawn from at least three independent experiments. Statistical tests: two-tailed Mann-Whitney test* $p<0.05$, **** $p<0.0001$, ns: not significant.

References

Acheson A, Conover JC, Fandl JP, DeChiara TM, Russell M, Thadani A, Squinto SP, Yancopoulos GD, Lindsay RM (1995). A BDNF autocrine loop in adult sensory neurons prevents cell death. *Nature* **374**, 450–453. doi:10.1038/374450a0

Anfray A, Drieu A, Hingot V, Hommet Y, Yetim M, Rubio M, Deffieux T, Tanter M, Orset C, Vivien D (2020). Circulating tPA contributes to neurovascular coupling by a mechanism involving the endothelial NMDA receptors. *Journal of Cerebral Blood Flow and Metabolism: Official Journal of the International Society of Cerebral Blood Flow and Metabolism* **40**, 2038–2054. doi:10.1177/0271678X19883599

Baranes D, Lederfein D, Huang YY, Chen M, Bailey CH, Kandel ER (1998). Tissue plasminogen activator contributes to the late phase of LTP and to synaptic growth in the hippocampal mossy fiber pathway. *Neuron* **21**, 813–825. doi:10.1016/s0896-6273(00)80597-8

Barford K, Keeler A, McMahon L, McDaniel K, Yap CC, Deppmann CD, Winckler B (2018). Transcytosis of TrkA leads to diversification of dendritic signaling endosomes. *Scientific Reports* **8**, 4715. doi:10.1038/s41598-018-23036-8

Benchenane K, Castel H, Boulouard M, Bluthé R, Fernandez-Monreal M, Roussel BD, Lopez-Atalaya JP, Butt-Gueulle S, Agin V, Maubert E, Dantzer R, Touzani O, Dauphin F, Vivien D, Ali C (2007). Anti-NR1 N-terminal-domain vaccination unmasks the crucial action of tPA on NMDA-receptor-mediated toxicity and spatial memory. *Journal of Cell Science* **120**, 578–585. doi:10.1242/jcs.03354

Binder BR, Spragg J, Austen KF (1979). Purification and characterization of human vascular plasminogen activator derived from blood vessel perfusates. *The Journal of Biological Chemistry* **254**, 1998–2003.

Boulanger L, Poo MM (1999). Gating of BDNF-induced synaptic potentiation by cAMP. *Science (New York, N.Y.)* **284**, 1982–1984. doi:10.1126/science.284.5422.1982

Bouvier G, Larsen RS, Rodríguez-Moreno A, Paulsen O, Sjöström PJ (2018). Towards resolving the presynaptic NMDA receptor debate. *Current Opinion in Neurobiology* **51**, 1–7. doi:10.1016/j.conb.2017.12.020

Briens A, Bardou I, Lebas H, Miles LA, Parmer RJ, Vivien D, Docagne F (2017). Astrocytes regulate the balance between plasminogen activation and plasmin clearance via cell-surface actin. *Cell Discovery* **3**, 17001. doi:10.1038/celldisc.2017.1

Buisson A, Nicole O, Docagne F, Sartelet H, Mackenzie ET, Vivien D (1998). Up-regulation of a serine protease inhibitor in astrocytes mediates the neuroprotective activity of transforming growth factor beta1. *FASEB journal: official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* **12**, 1683–1691.

Cacquevel M, Launay S, Castel H, Benchenane K, Chéenne S, Buée L, Moons L, Delacourte A, Carmeliet P, Vivien D (2007). Ageing and amyloid-beta peptide deposition contribute to an impaired brain tissue plasminogen activator activity by different mechanisms. *Neurobiology of Disease* **27**, 164–173. doi:10.1016/j.nbd.2007.04.004

Calabresi P, Napolitano M, Centonze D, Marfia GA, Gubellini P, Teule MA, Berretta N, Bernardi G, Frati L, Tolu M, Gulino A (2000). Tissue plasminogen activator controls multiple forms of synaptic plasticity and memory. *The European Journal of Neuroscience* **12**, 1002–1012. doi:10.1046/j.1460-9568.2000.00991.x

Cassé F, Bardou I, Danglot L, Briens A, Montagne A, Parcq J, Alahari A, Galli T, Vivien D, Docagne F (2012). Glutamate controls tPA recycling by astrocytes, which in turn influences glutamatergic signals. *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience* **32**, 5186–5199. doi:10.1523/JNEUROSCI.5296-11.2012

Centonze D, Napolitano M, Saulle E, Gubellini P, Picconi B, Martorana A, Pisani A, Gulino A, Bernardi G, Calabresi P (2002). Tissue plasminogen activator is required for corticostriatal long-term potentiation. *The European Journal of Neuroscience* **16**, 713–721. doi:10.1046/j.1460-9568.2002.02106.x

Chevilley A, Lesept F, Lenoir S, Ali C, Parcq J, Vivien D (2015). Impacts of tissue-type plasminogen activator (tPA) on neuronal survival. *Frontiers in Cellular Neuroscience* **9**, 415. doi:10.3389/fncel.2015.00415

Combs B, Christensen KR, Richards C, Kneynsberg A, Mueller RL, Morris SL, Morfini G, Brady ST, Kanaan NM (2021). FTLD mutant tau impairs axonal transport through a protein phosphatase 1γ-dependent mechanism. *Journal of Neuroscience*. doi:10.1523/JNEUROSCI.1914-20.2021

Correa F, Gauberti M, Parcq J, Macrez R, Hommet Y, Obiang P, Hernangómez M, Montagne A, Liot G, Guaza C, Maubert E, Ali C, Vivien D, Docagne F (2011). Tissue plasminogen activator prevents white matter damage following stroke. *The Journal of Experimental Medicine* **208**, 1229–1242. doi:10.1084/jem.20101880

Docagne F, Nicole O, Marti HH, MacKenzie ET, Buisson A, Vivien D (1999). Transforming growth factor-beta1 as a regulator of the serpins/t-PA axis in cerebral ischemia. *FASEB journal: official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* **13**, 1315–1324. doi:10.1096/fasebj.13.11.1315

Echeverry R, Wu J, Haile WB, Guzman J, Yepes M (2010). Tissue-type plasminogen activator is a neuroprotectant in the mouse hippocampus. *The Journal of Clinical Investigation* **120**, 2194–2205. doi:10.1172/JCI41722

Fitzjohn SM, Pickard L, Duckworth JK, Molnar E, Henley JM, Collingridge GL, Noël J (2001). An electrophysiological characterisation of long-term potentiation in cultured dissociated hippocampal neurones. *Neuropharmacology* **41**, 693–699. doi:10.1016/s0028-3908(01)00128-9

Gabellec M-M, Panzanelli P, Sassoè-Pognetto M, Lledo P-M (2007). Synapse-specific localization of vesicular glutamate transporters in the rat olfactory bulb. *European Journal of Neuroscience* **25**, 1373–1383. doi:10.1111/j.1460-9568.2007.05400.x

Hanus C, Kochen L, tom Dieck S, Racine V, Sibarita J-B, Schuman EM, Ehlers MD (2014). Synaptic Control of Secretory Trafficking in Dendrites. *Cell Reports* **7**, 1771–1778. doi:10.1016/j.celrep.2014.05.028

Holzbaur ELF (2004). Motor neurons rely on motor proteins. *Trends in Cell Biology* **14**, 233–240. doi:10.1016/j.tcb.2004.03.009

Ivenshitz M, Segal M (2006). Simultaneous NMDA-dependent long-term potentiation of EPSCs and long-term depression of IPSCs in cultured rat hippocampal neurons. *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience* **26**, 1199–1210. doi:10.1523/JNEUROSCI.2964-05.2006

Jacobsen JS, Comery TA, Martone RL, Elokdah H, Crandall DL, Oganesian A, Aschmies S, Kirksey Y, Gonzales C, Xu J, Zhou H, Atchison K, Wagner E, Zaleska MM, Das I, Arias RL, Bard J, Riddell D, Gardell SJ, Abou-Gharbia M, Robichaud A, Magolda R, Vlasuk GP, Bjornsson T, Reinhart PH, Pangalos MN (2008). Enhanced clearance of Abeta in brain by sustaining the plasmin proteolysis cascade. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **105**, 8754–8759. doi:10.1073/pnas.0710823105

Jovanovic JN, Czernik AJ, Fienberg AA, Greengard P, Sihra TS (2000). Synapsins as mediators of BDNF-enhanced neurotransmitter release. *Nature Neuroscience* **3**, 323–329. doi:10.1038/73888

Kennedy MJ, Davison IG, Robinson CG, Ehlers MD (2010). Syntaxin-4 Defines a Domain for Activity-Dependent Exocytosis in Dendritic Spines. *Cell* **141**, 524–535. doi:10.1016/j.cell.2010.02.042

Kim SY, Cheon SY, Kim EJ, Lee JH, Kam EH, Kim JM, Park M, Koo B-N (2017). Isoflurane Postconditioning Inhibits tPA-Induced Matrix Metalloproteinases Activation After Hypoxic Injury via Low-Density Lipoprotein Receptor-Related Protein and Extracellular Signal-Regulated Kinase Pathway. *Neurochemical Research* **42**, 1533–1542. doi:10.1007/s11064-017-2211-2

Kwinter DM, Lo K, Mafi P, Silverman MA (2009). Dynactin regulates bidirectional transport of dense-core vesicles in the axon and dendrites of cultured hippocampal neurons. *Neuroscience* **162**, 1001–1010. doi:10.1016/j.neuroscience.2009.05.038

Lenoir S, Varangot A, Lebouvier L, Galli T, Hommet Y, Vivien D (2019). Post-synaptic Release of the Neuronal Tissue-Type Plasminogen Activator (tPA). *Frontiers in Cellular Neuroscience* **13**, 164. doi:10.3389/fncel.2019.00164

Liang C, Ding M, Du F, Cang J, Xue Z (2016). Tissue plasminogen activator (tPA) attenuates propofol-induced apoptosis in developing hippocampal neurons. *SpringerPlus* **5**, 475. doi:10.1186/s40064-016-2091-y

Liot G, Roussel BD, Lebeurrier N, Benchenane K, López-Atalaya JP, Vivien D, Ali C (2006). Tissue-type plasminogen activator rescues neurones from serum deprivation-induced apoptosis through a mechanism independent of its proteolytic activity. *Journal of Neurochemistry* **98**, 1458–1464. doi:10.1111/j.1471-4159.2006.03982.x

Lochner JE, Honigman LS, Grant WF, Gessford SK, Hansen AB, Silverman MA, Scalettar BA (2006). Activity-dependent release of tissue plasminogen activator from the dendritic spines of hippocampal neurons revealed by live-cell imaging. *Journal of Neurobiology* **66**, 564–577. doi:10.1002/neu.20250

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

Louessard M, Lacroix A, Martineau M, Mondielli G, Montagne A, Lesept F, Lambolez B, Cauli B, Mothet J-P, Vivien D, Maubert E (2016). Tissue Plasminogen Activator Expression Is Restricted to Subsets of Excitatory Pyramidal Glutamatergic Neurons. *Molecular Neurobiology* **53**, 5000–5012. doi:10.1007/s12035-015-9432-7

Madani R, Hulo S, Toni N, Madani H, Steimer T, Muller D, Vassalli JD (1999). Enhanced hippocampal long-term potentiation and learning by increased neuronal expression of tissue-type plasminogen activator in transgenic mice. *The EMBO journal* **18**, 3007–3012. doi:10.1093/emboj/18.11.3007

Martin AM, Kuhlmann C, Trossbach S, Jaeger S, Waldron E, Roebroek A, Luhmann HJ, Laatsch A, Weggen S, Lessmann V, Pietrzik CU (2008). The Functional Role of the Second NPXY Motif of the LRP1 β-Chain in Tissue-type Plasminogen Activator-mediated Activation of N-Methyl-D-aspartate Receptors*. *Journal of Biological Chemistry* **283**, 12004–12013. doi:10.1074/jbc.M707607200

Melchor JP, Pawlak R, Strickland S (2003). The tissue plasminogen activator-plasminogen proteolytic cascade accelerates amyloid-beta (Abeta) degradation and inhibits Abeta-induced neurodegeneration. *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience* **23**, 8867–8871.

Melchor JP, Strickland S (2005). Tissue plasminogen activator in central nervous system physiology and pathology. *Thrombosis and Haemostasis* **93**, 655–660. doi:10.1160/TH04-12-0838

Nabb AT, Bentley M (2021). NgCAM and VAMP2 Reveal that Direct Delivery and Dendritic Degradation Maintain Axonal Polarity. *Molecular Biology of the Cell*, mbcE21080425. doi:10.1091/mbc.E21-08-0425

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

Obiang P, Macrez R, Jullienne A, Bertrand T, Lesept F, Ali C, Maubert E, Vivien D, Agin V (2012). GluN2D subunit-containing NMDA receptors control tissue plasminogen activator-mediated spatial memory. *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience* **32**, 12726–12734. doi:10.1523/JNEUROSCI.6202-11.2012

Obiang P, Maubert E, Bardou I, Nicole O, Launay S, Bezin L, Vivien D, Agin V (2011). Enriched housing reverses age-associated impairment of cognitive functions and tPA-dependent maturation of BDNF. *Neurobiology of Learning and Memory* **96**, 121–129. doi:10.1016/j.nlm.2011.03.004

Pang PT, Teng HK, Zaitsev E, Woo NT, Sakata K, Zhen S, Teng KK, Yung W-H, Hempstead BL, Lu B (2004). Cleavage of proBDNF by tPA/plasmin is essential for long-term hippocampal plasticity. *Science (New York, N.Y.)* **306**, 487–491. doi:10.1126/science.1100135

Park L, Zhou J, Koizumi K, Wang G, Anfray A, Ahn SJ, Seo J, Zhou P, Zhao L, Paul S, Anrather J, Iadecola C (2020). tPA Deficiency Underlies Neurovascular Coupling Dysfunction by Amyloid-β. *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience* **40**, 8160–8173. doi:10.1523/JNEUROSCI.1140-20.2020

Pasquet N, Douceau S, Naveau M, Lesept F, Louessard M, Lebouvier L, Hommet Y, Vivien D, Bardou I (2019). Tissue-Type Plasminogen Activator Controlled Corticogenesis Through a Mechanism Dependent of NMDA Receptors Expressed on Radial Glial Cells. *Cerebral Cortex* **29**, 2482–2498. doi:10.1093/cercor/bhy119

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

Pawlak R, Nagai N, Urano T, Napiorkowska-Pawlak D, Ihara H, Takada Y, Collen D, Takada A (2002). Rapid, specific and active site-catalyzed effect of tissue-plasminogen activator on hippocampus-dependent learning in mice. *Neuroscience* **113**, 995–1001. doi:10.1016/s0306-4522(02)00166-5

Pickard L, Noël J, Duckworth JK, Fitzjohn SM, Henley JM, Collingridge GL, Molnar E (2001). Transient synaptic activation of NMDA receptors leads to the insertion of native AMPA receptors at hippocampal neuronal plasma membranes. *Neuropharmacology* **41**, 700–713. doi:10.1016/s0028-3908(01)00127-7

Qian Z, Gilbert ME, Colicos MA, Kandel ER, Kuhl D (1993). Tissue-plasminogen activator is induced as an immediate–early gene during seizure, kindling and long-term potentiation. *Nature* **361**, 453–457. doi:10.1038/361453a0

Salles FJ, Strickland S (2002). Localization and regulation of the tissue plasminogen activator-plasmin system in the hippocampus. *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience* **22**, 2125–2134.

Samson AL, Medcalf RL (2006). Tissue-type plasminogen activator: a multifaceted modulator of neurotransmission and synaptic plasticity. *Neuron* **50**, 673–678. doi:10.1016/j.neuron.2006.04.013

Samson AL, Nevin ST, Croucher D, Niego B, Daniel PB, Weiss TW, Moreno E, Monard D, Lawrence DA, Medcalf RL (2008). Tissue-type plasminogen activator requires a co-receptor to enhance N-Methyl-D-Aspartate receptor function. *Journal of neurochemistry* **107**, 1091–1101. doi:10.1111/j.1471-4159.2008.05687.x

Santschi L, Reyes-Harde M, Stanton PK (1999). Chemically Induced, Activity-Independent LTD Elicited by Simultaneous Activation of PKG and Inhibition of PKA. *Journal of Neurophysiology* **82**, 1577–1589. doi:10.1152/jn.1999.82.3.1577

Schindowski K, Bretteville A, Leroy K, Bégard S, Brion J-P, Hamdane M, Buée L (2006). Alzheimer's disease-like tau neuropathology leads to memory deficits and loss of functional synapses in a novel mutated tau transgenic mouse without any motor deficits. *The American Journal of Pathology* **169**, 599–616. doi:10.2353/ajpath.2006.060002

Seeds NW, Basham ME, Haffke SP (1999). Neuronal migration is retarded in mice lacking the tissue plasminogen activator gene. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **96**, 14118–14123. doi:10.1073/pnas.96.24.14118

Seeds NW, Verrall S, Friedman G, Hayden S, Gadotti D, Haffke S, Christensen K, Gardner B, McGuire P, Krystosek A (1992). Plasminogen activators and plasminogen activator inhibitors in neural development. *Annals of the New York Academy of Sciences* **667**, 32–40. doi:10.1111/j.1749-6632.1992.tb51592.x

Shin CY, Kundel M, Wells DG (2004). Rapid, activity-induced increase in tissue plasminogen activator is mediated by metabotropic glutamate receptor-dependent mRNA translation. *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience* **24**, 9425–9433. doi:10.1523/JNEUROSCI.2457-04.2004

Siao C-J, Fernandez SR, Tsirka SE (2003). Cell type-specific roles for tissue plasminogen activator released by neurons or microglia after excitotoxic injury. *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience* **23**, 3234–3242.

Silverman MA, Johnson S, Gurkins D, Farmer M, Lochner JE, Rosa P, Scalettar BA (2005). Mechanisms of Transport and Exocytosis of Dense-Core Granules Containing Tissue Plasminogen Activator in Developing Hippocampal Neurons. *The Journal of Neuroscience* **25**, 3095–3106. doi:10.1523/JNEUROSCI.4694-04.2005

Tobin V, Schwab Y, Lelos N, Onaka T, Pittman QJ, Ludwig M (2012). Expression of exocytosis proteins in rat supraoptic nucleus neurones. *Journal of Neuroendocrinology* **24**, 629–641. doi:10.1111/j.1365-2826.2011.02237.x

de Wit J, Toonen RF, Verhage M (2009). Matrix-dependent local retention of secretory vesicle cargo in cortical neurons. *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience* **29**, 23–37. doi:10.1523/JNEUROSCI.3931-08.2009

Wu F, Echeverry R, Wu J, An J, Haile WB, Cooper DS, Catano M, Yepes M (2013). Tissue-type Plasminogen Activator Protects Neurons from Excitotoxin-induced Cell Death via Activation of the ERK ½ -CREB-ATF3 Signaling Pathway. *Molecular and cellular neurosciences* **52**, 9–19. doi:10.1016/j.mcn.2012.10.001

Wu F, Torre E, Cuellar-Giraldo D, Cheng L, Yi H, Bichler EK, García PS, Yepes M (2015). Tissue-type plasminogen activator triggers the synaptic vesicle cycle in cerebral cortical neurons. *Journal of Cerebral Blood Flow and Metabolism: Official Journal of the International Society of Cerebral Blood Flow and Metabolism* **35**, 1966–1976. doi:10.1038/jcbfm.2015.155

Wu F, Wu J, Nicholson AD, Echeverry R, Haile WB, Catano M, An J, Lee AK, Duong D, Dammer EB, Seyfried NT, Tong FC, Votaw JR, Medcalf RL, Yepes M (2012). Tissue-Type Plasminogen Activator Regulates the Neuronal Uptake of Glucose in the Ischemic Brain. *The Journal of Neuroscience* **32**, 9848–9858. doi:10.1523/JNEUROSCI.1241-12.2012

Yamada K, Nabeshima T (2003). Brain-derived neurotrophic factor/TrkB signaling in memory processes. *Journal of Pharmacological Sciences* **91**, 267–270. doi:10.1254/jphs.91.267

Yepes M, Wu F, Torre E, Cuellar-Giraldo D, Jia D, Cheng L (2016). Tissue-type plasminogen activator induces synaptic vesicle endocytosis in cerebral cortical neurons. *Neuroscience* **319**, 69–78. doi:10.1016/j.neuroscience.2016.01.046

Zilberter Y (2000). Dendritic release of glutamate suppresses synaptic inhibition of pyramidal neurons in rat neocortex. *The Journal of Physiology* **528**, 489–496. doi:10.1111/j.1469-7793.2000.00489.x

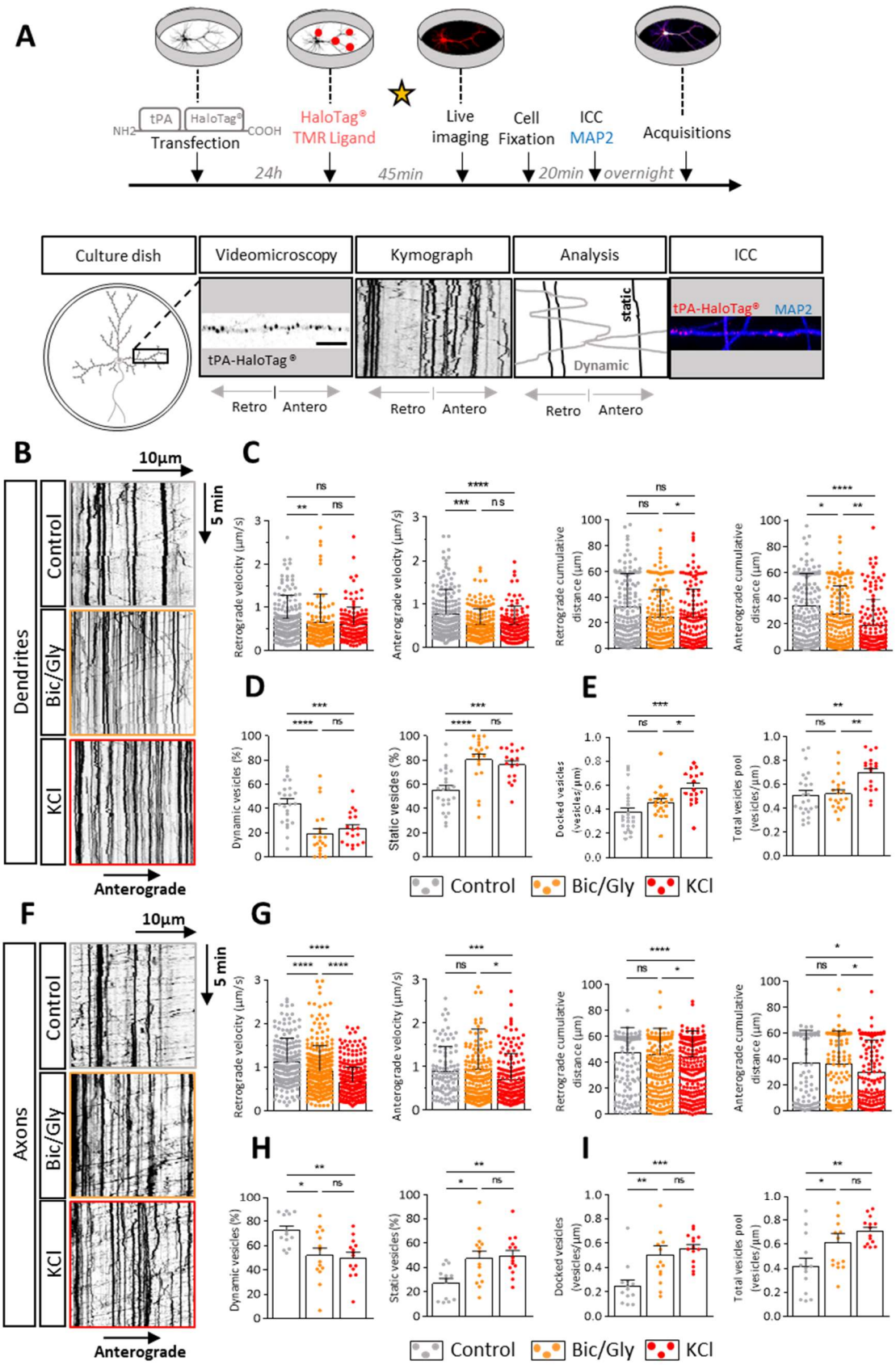


Figure 1: Neuronal activation disrupts the traffic of tPA containing vesicles

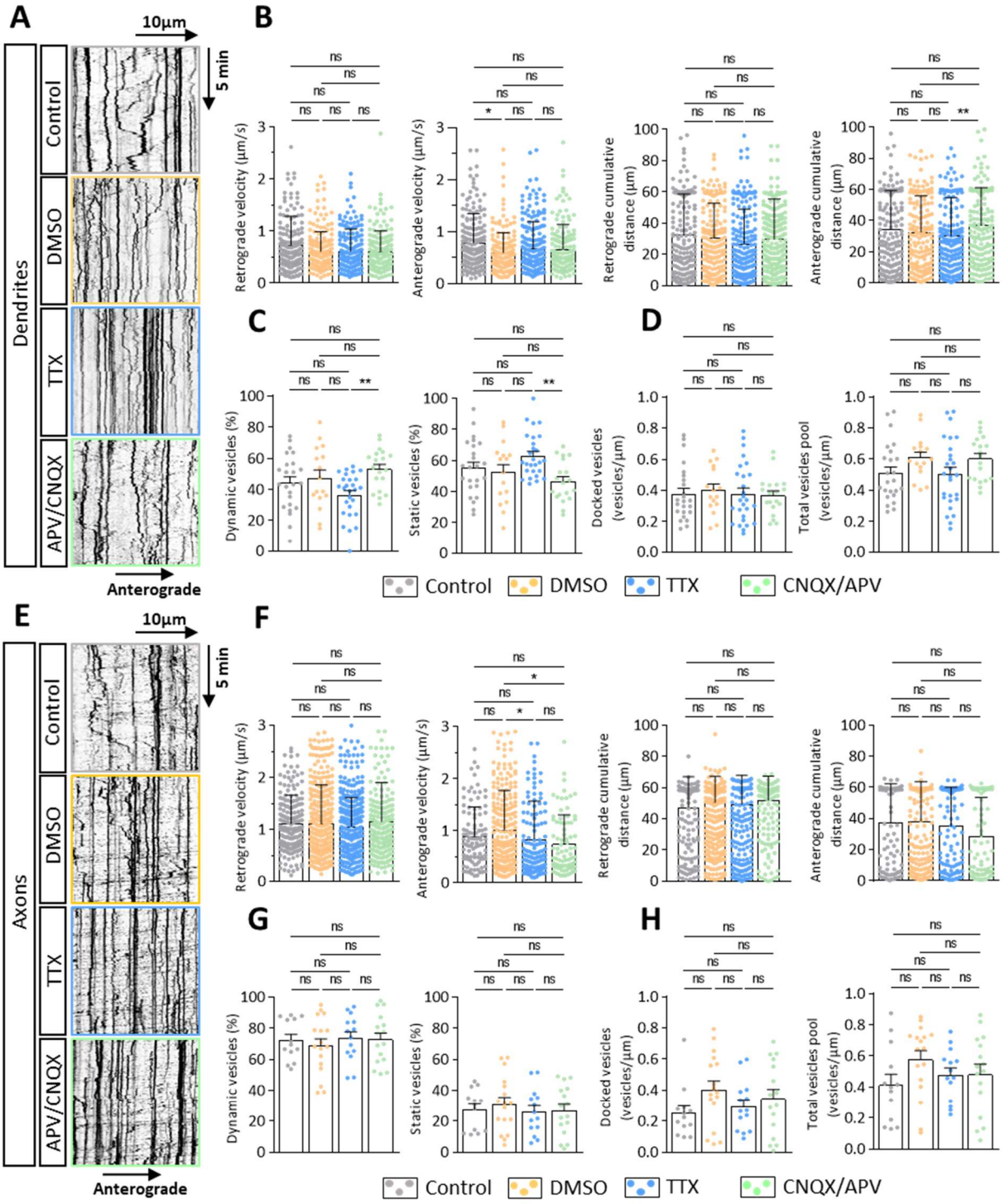


Figure 2 : Neuronal inhibition has no impact on tPA containing vesicles trafficking.

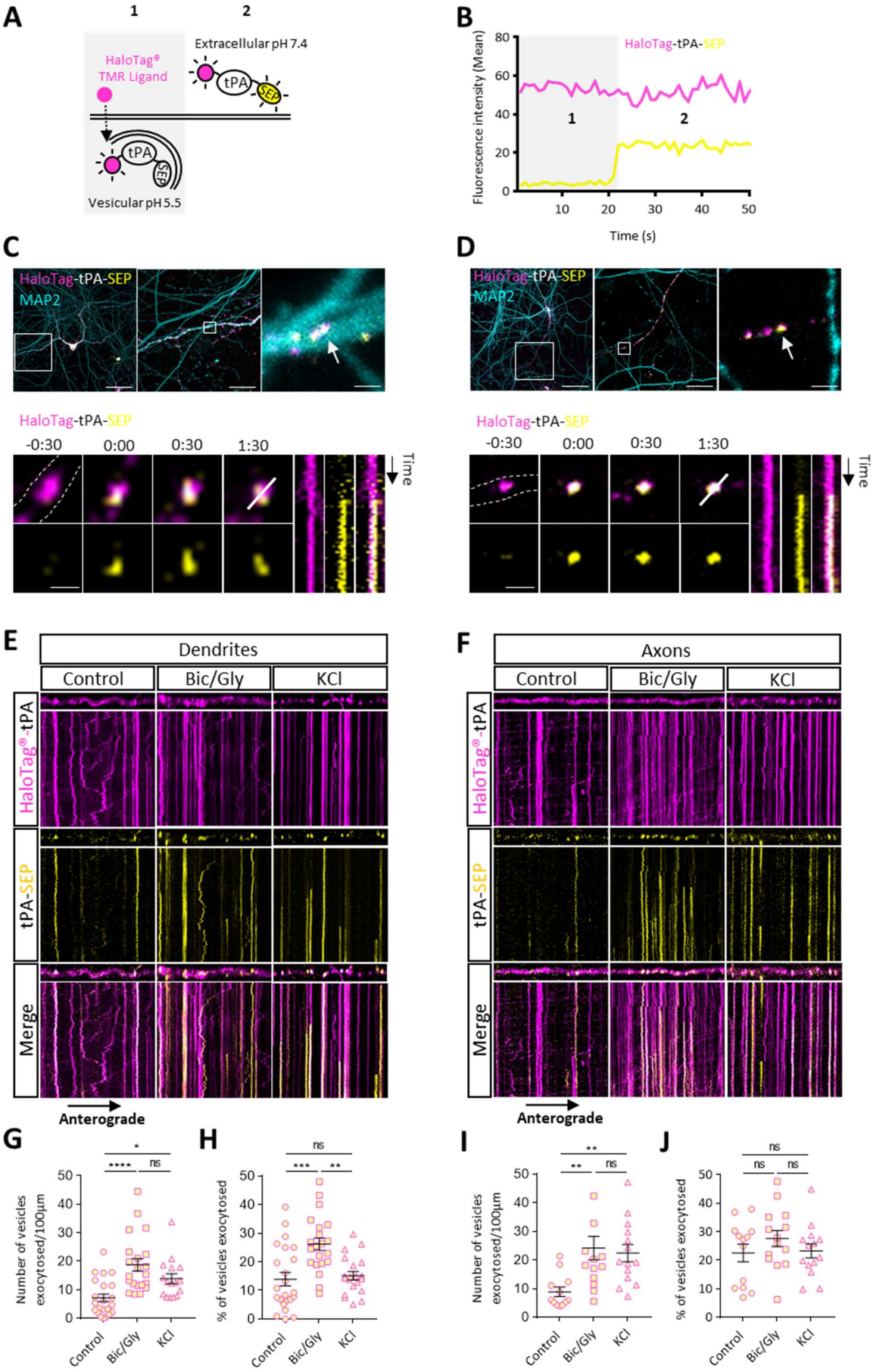


Figure 3 : Neuronal activation increase tPA containing vesicles exocytosis.

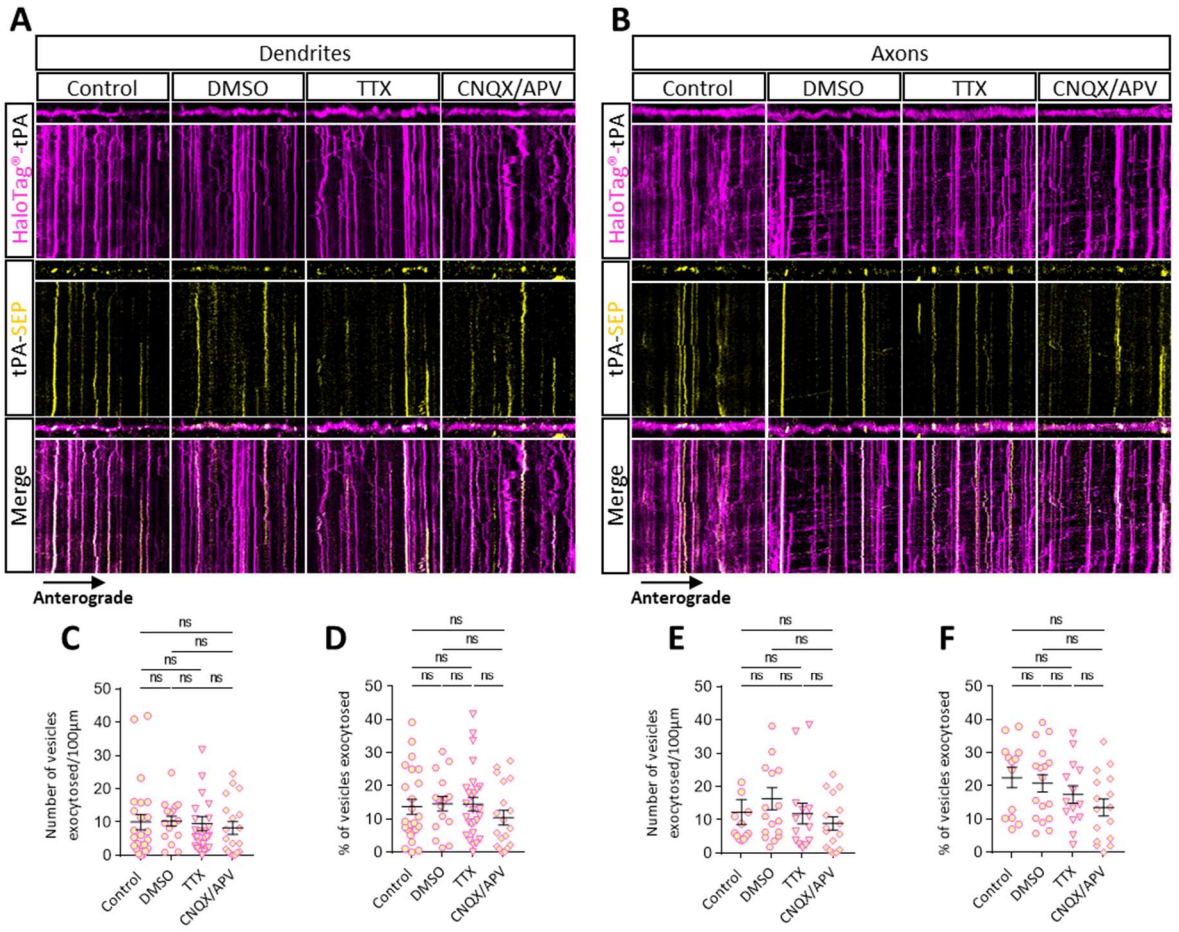


Figure 4 : Neuronal inhibition reveal a constitutive exocytosis of tPA.

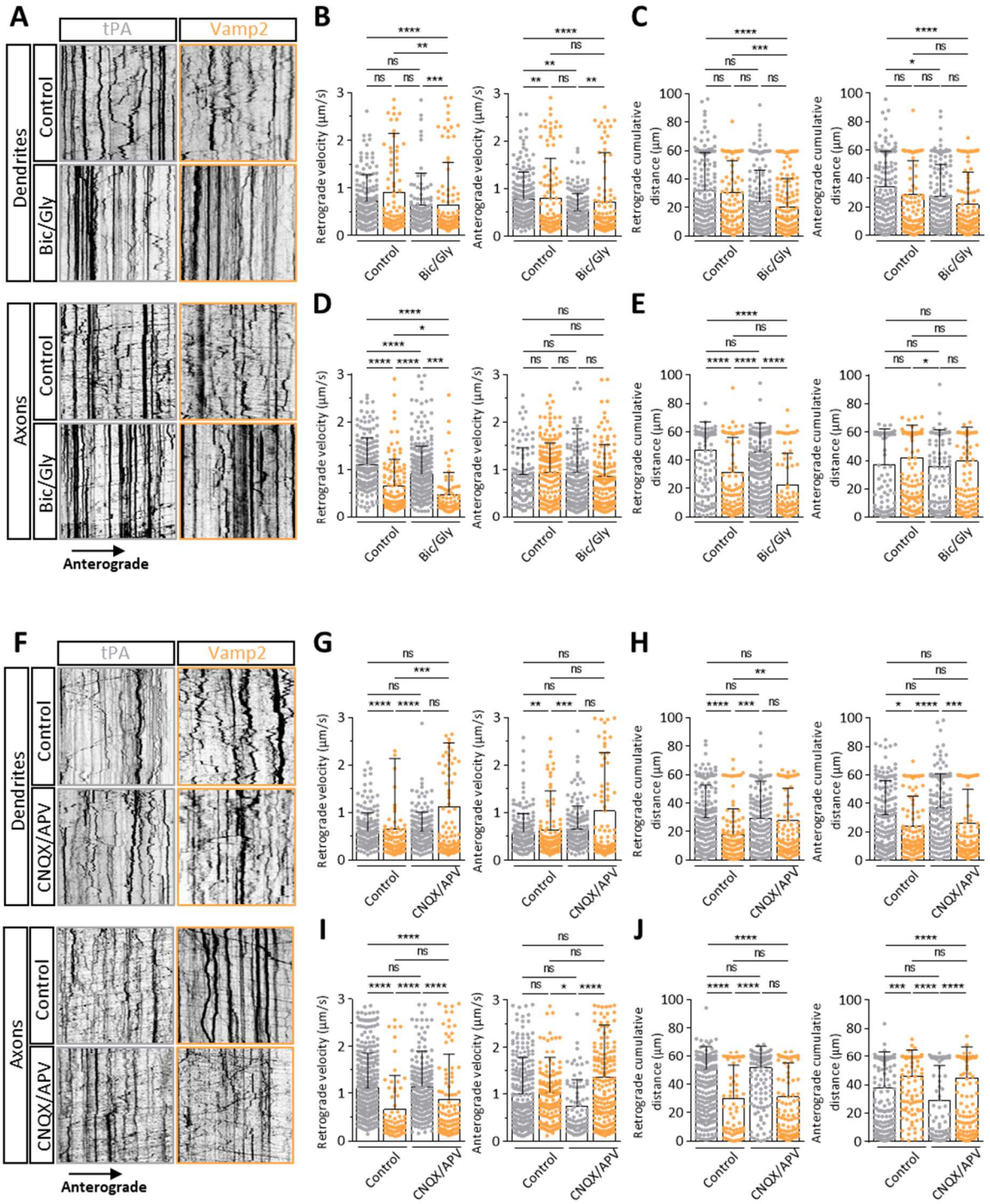


Figure 5 : Vesicles containing tPA show similarities in their anterograde axonal trafficking under basal and activating conditions with vamp2 positive vesicles.

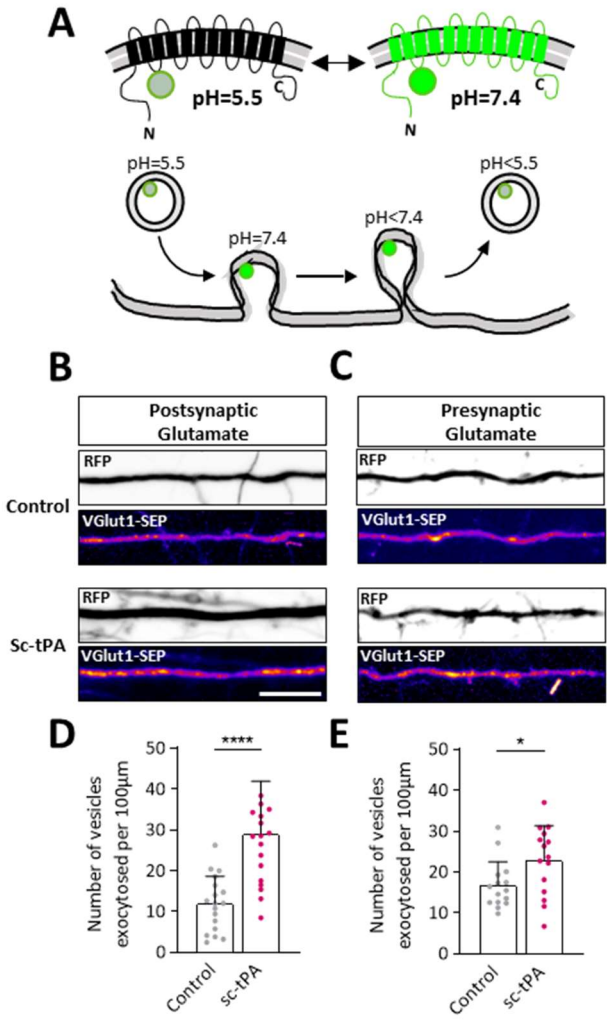


Figure 6 : Sc-tPA increase the pre and postsynaptic release of VGlut1 vesicles.

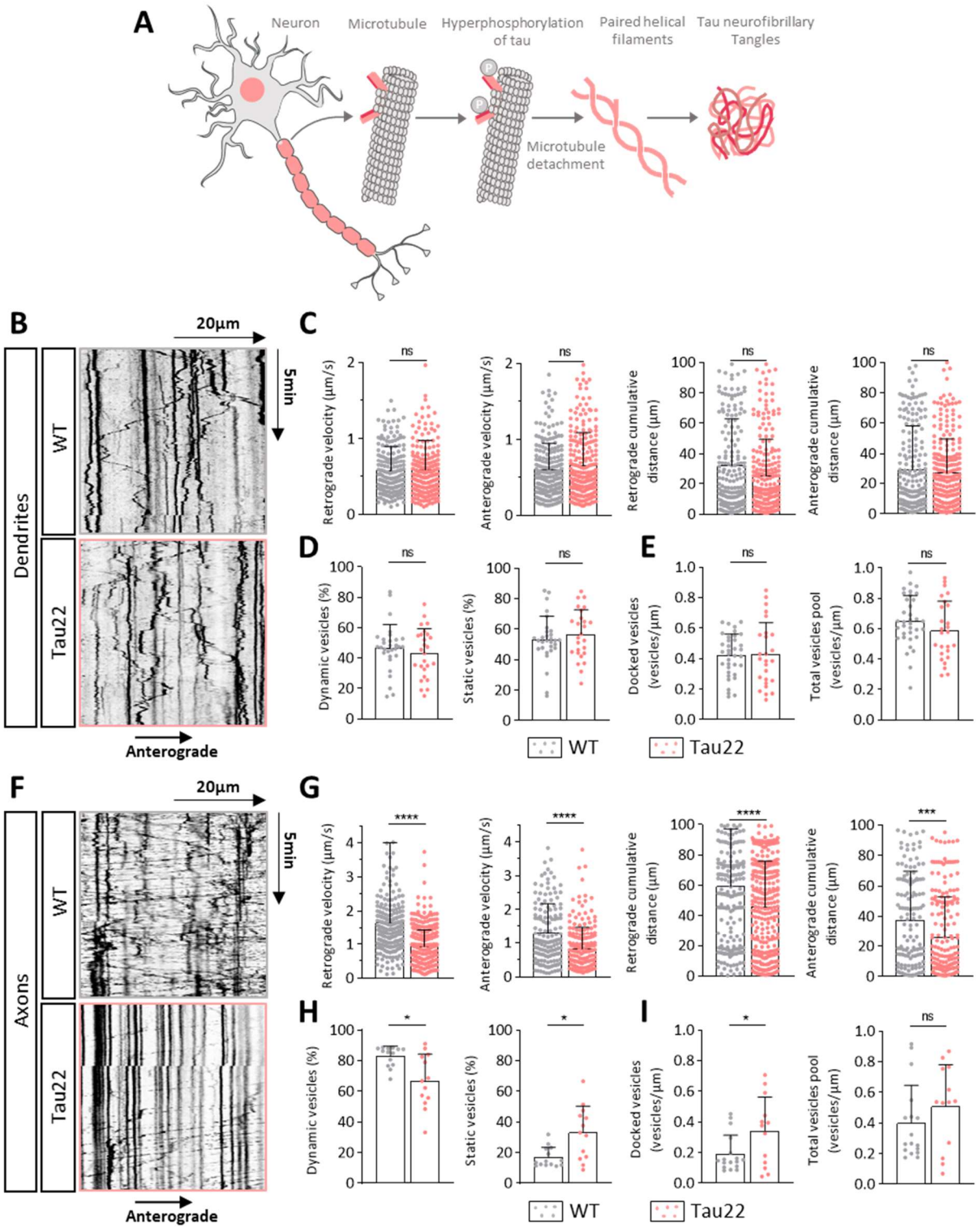


Figure 7 : Axonal tPA containing vesicles trafficking is altered in the Tau22 mouse model of tauopathy.

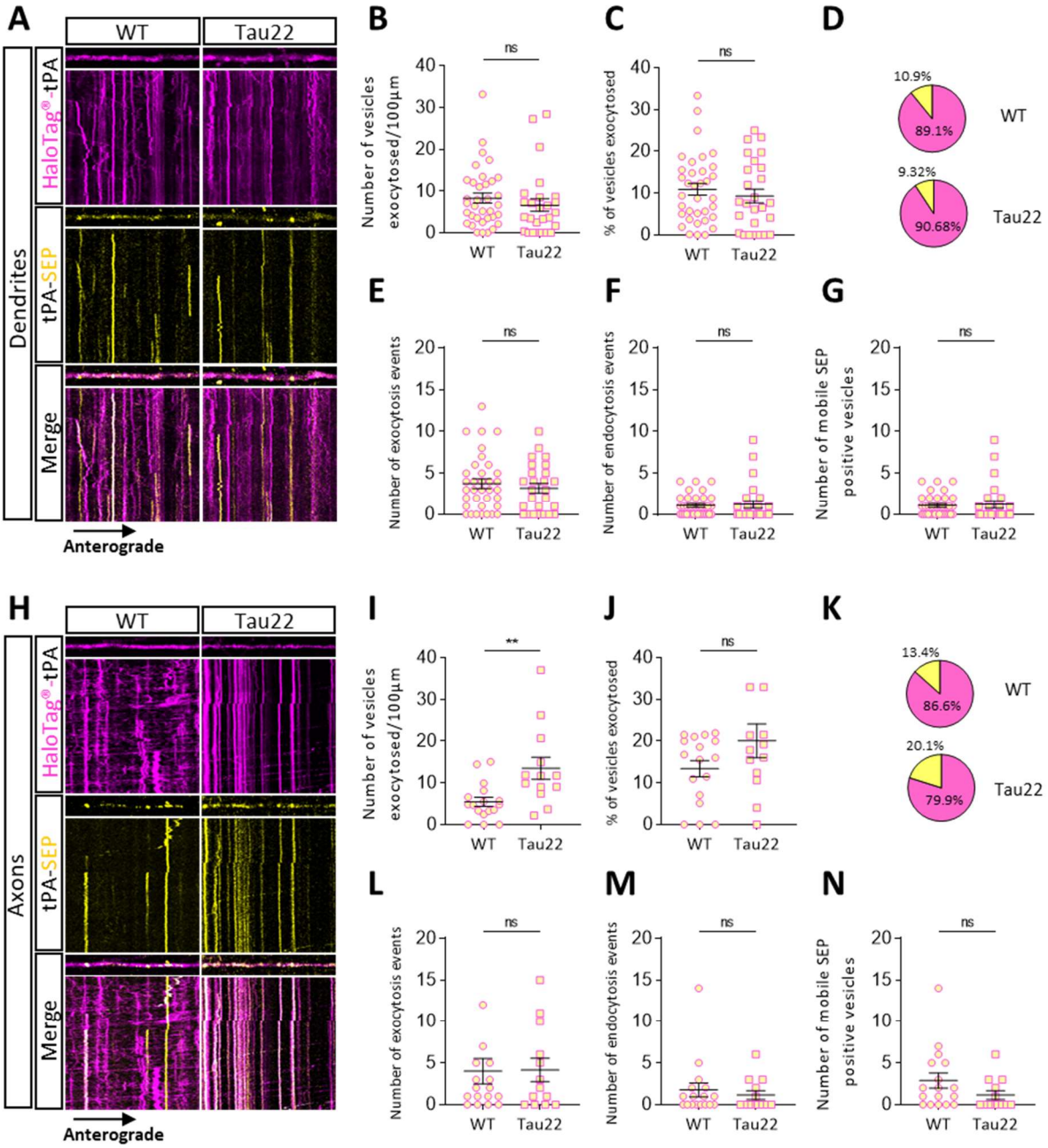
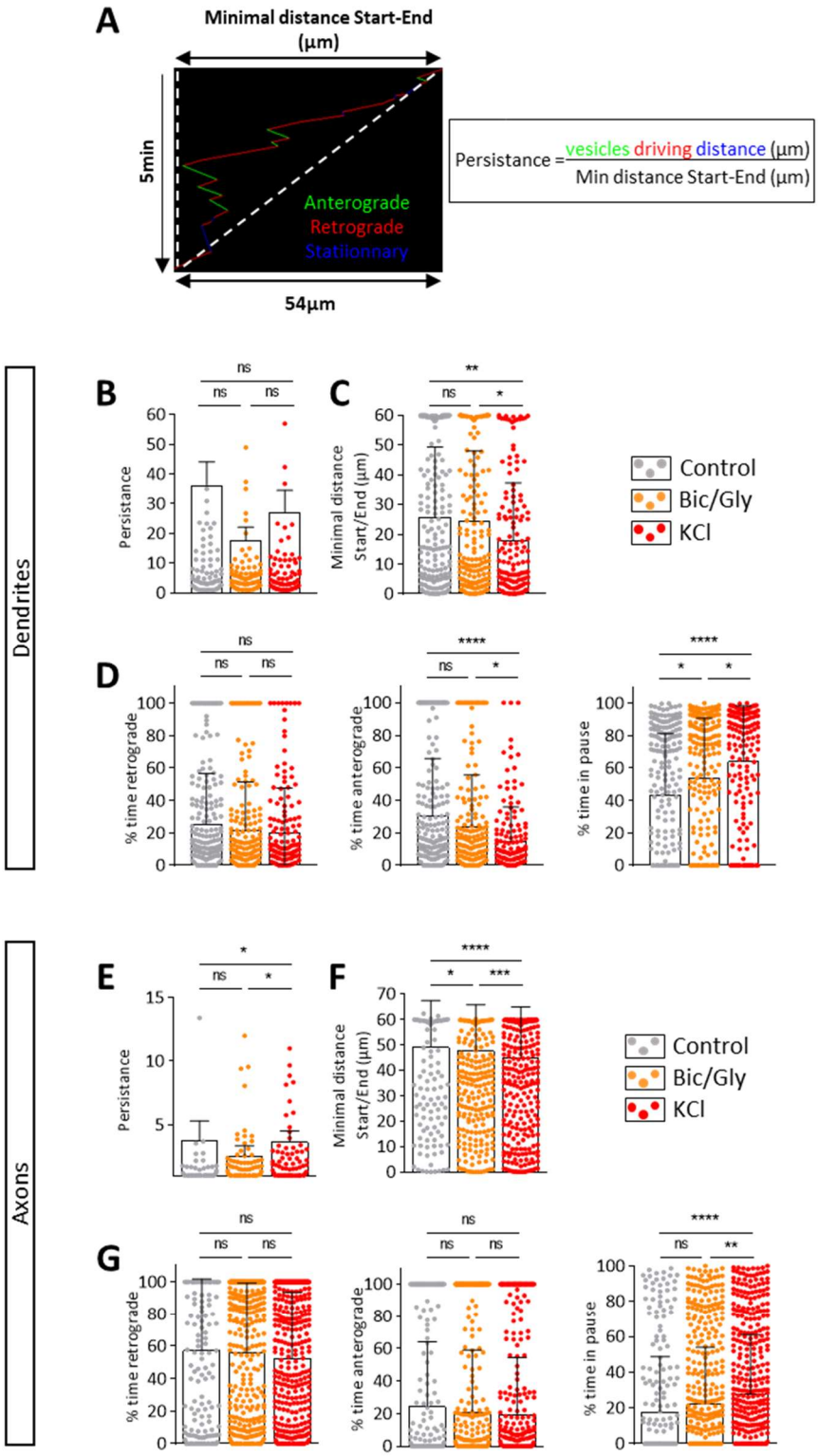
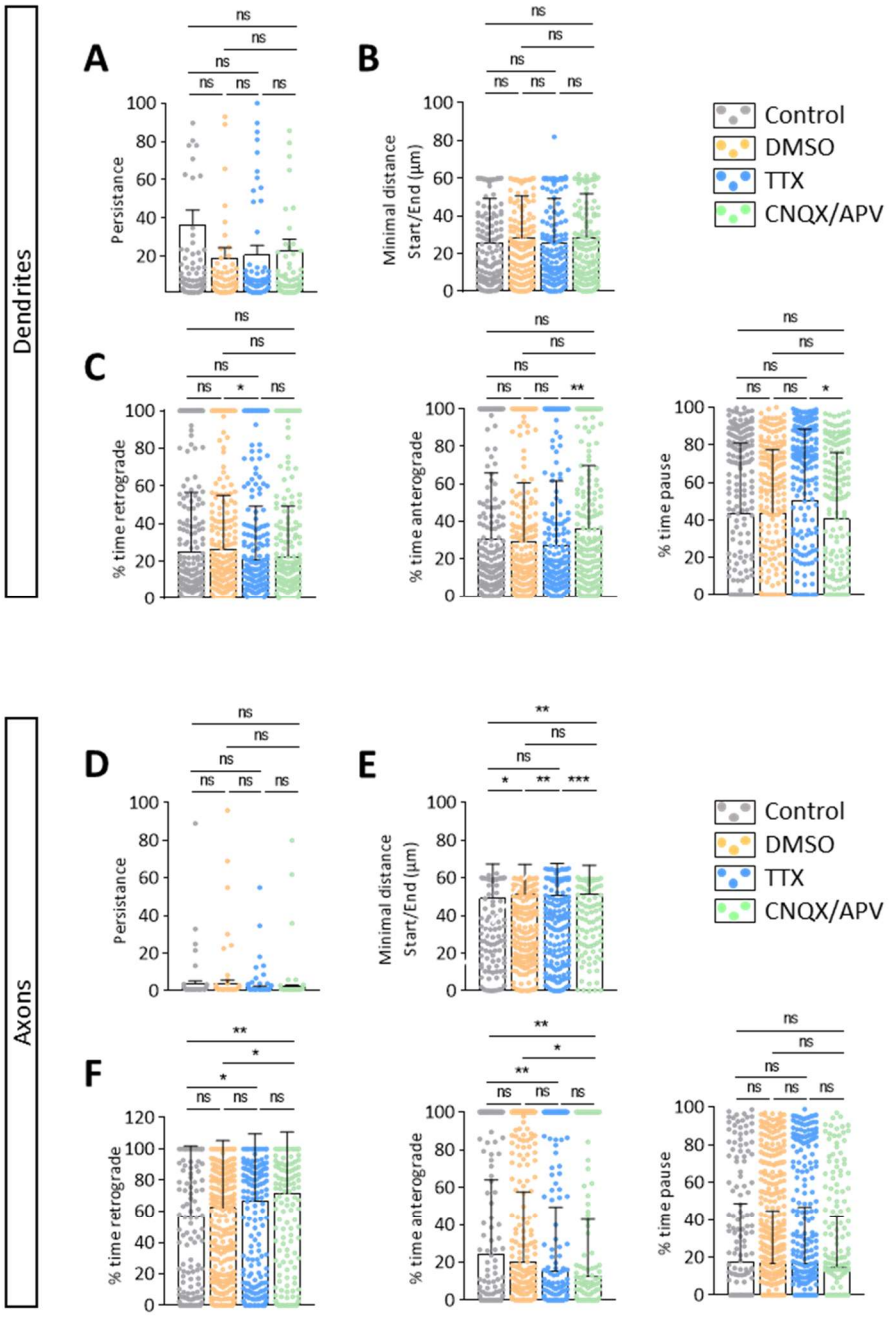


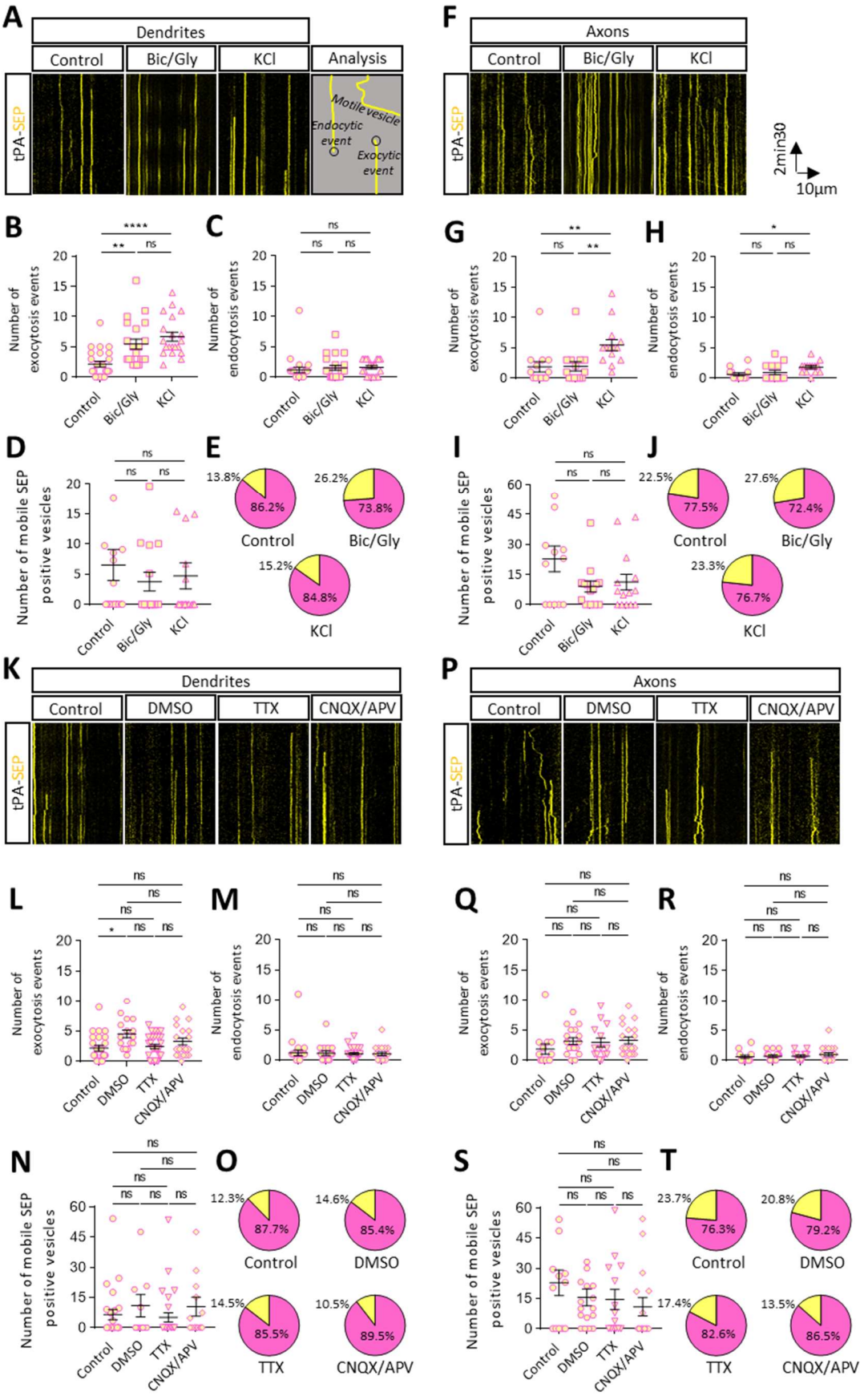
Figure 8 : Tauopathy increase axonal tPA exocytosis.



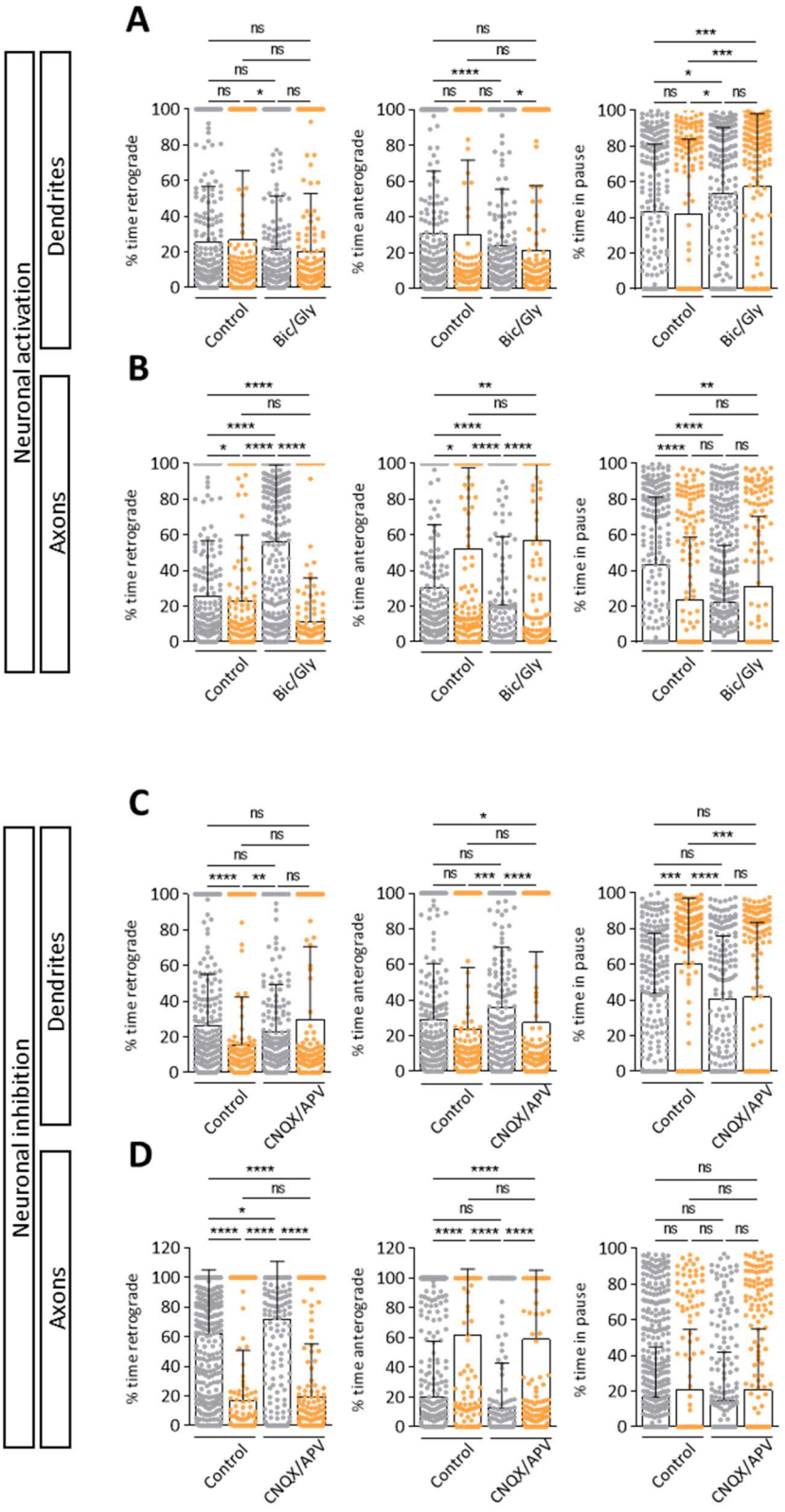
Extended Data Fig. 1 : Neuronal activation decreases the vesicles distance travelled by increasing the time they spend on pause.



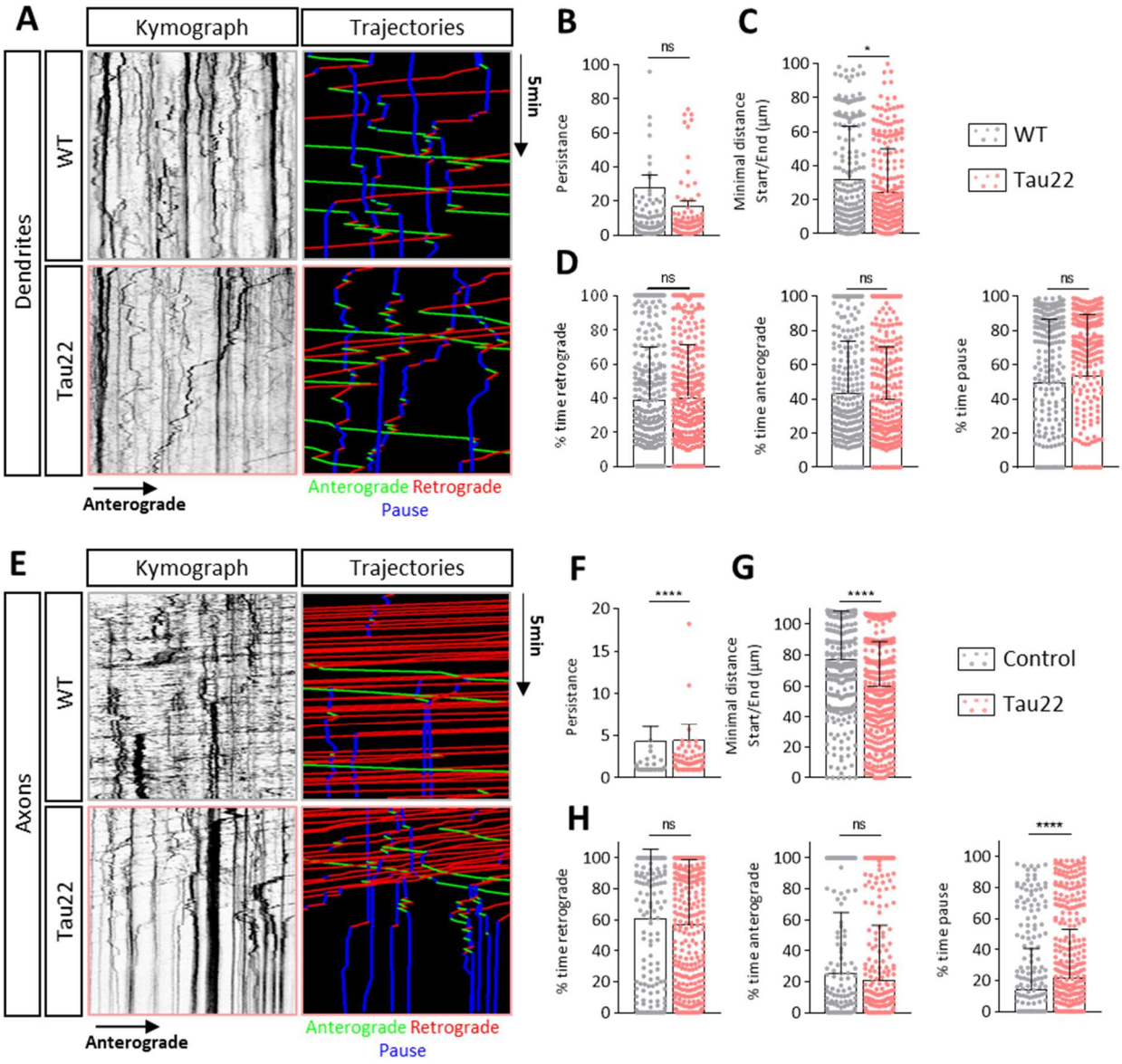
Extended Data Fig. 2 : Neuronal inhibition does not disrupt dendritic tPA containing vesicles trafficking but increases the time spent by axonal tPA vesicles in the retrograde direction.



Extended Data Fig. 3 : Only neuronal activation modify endocytosis and exocytosis events of tPA containing vesicles.



Extended Data Fig. 4 : Neuronal activation decreases the vesicles distance travelled by increasing the pausing time.



Extended Data Fig. 5 Dynamic axonal vesicles spend more time off when neurons have tauopathy.

Discussion

Article n°1: Post-synaptic release of the neuronal tissue-type plasminogen activator (tPA).

Nous avons vu dans l'introduction que le tPA joue un rôle dans de nombreux mécanismes physiopathologiques dans le SNC. Il est par conséquent important de mieux connaître précisément, quelle est la localisation du tPA et comment celui-ci trafique dans les neurones. Cela nous permettrait d'expliquer les différentes implications du tPA neuronal mais aussi ses fonctions dans le SNC.

Dans cette première étude nous avons montré que le tPA est une protéine présente dans des vésicules à la fois dans les dendrites et dans les axones. De plus, nous le retrouvons libéré au niveau de la synapse. En concordance avec la littérature et grâce à différents outils moléculaires (HaloTag®-tPA-SEP), nous avons pu voir que le tPA est contenu dans des vésicules d'exocytose VAMP2 positives et qu'il peut être libéré par les neurones à la fois au niveau pré et postsynaptique (Silverman *et al.* 2005; Lochner *et al.* 2006; Louessard *et al.* 2016). De plus le tPA est retrouvé également dans des vésicules d'endocytose (Rab5), dans des endosomes tardifs (Rab7) pour être dégradé et dans des endosomes (Rab11) pour être recyclé. L'ensemble de ces vésicules sont transportées dans les dendrites et les axones à la fois de façon antérograde et rétrograde.

1 – Le développement d'un outil original pour étudier le tPA neuronal.

Aujourd'hui, il est très dur de pouvoir observer le tPA dans les neurones corticaux car ils l'expriment en trop petite quantité et les anticorps qui existent contre le tPA ne sont pas assez efficaces pour mettre en évidence une aussi faible concentration. Chez le rongeur en conditions *in vivo*, le seul moyen de détecter le tPA est d'utiliser un traitement à la colchicine. En effet, ce traitement va désorganiser le cytosquelette des neurones en se fixant sur la tubuline libre empêchant sa polymérisation dans les dendrites et les axones, inhibant ainsi le transport vésiculaire. L'arrêt du transport entraîne une accumulation dans le corps cellulaire des neurones de protéines nouvellement formées. De cette manière, il est alors possible de mettre en évidence le tPA par immunohistochimie (Louessard *et al.* 2016). Néanmoins, *in vitro*, l'utilisation de colchicine ne marche pas, en conséquence il est très difficile d'étudier le

tPA dans les neurones corticaux en cultures. Il est nécessaire en culture de passer par l'incorporation de plasmides pour surexprimer le tPA, comme d'ailleurs bon nombre d'autres protéines intracellulaires aujourd'hui étudiées. Dans cette étude nous avons choisi des plasmides codant pour des protéines fusions du tPA possédant un site HaloTag®. Ce site présente de nombreux avantages qu'une protéine fusion classique tPA-GFP n'a pas. L'haloTag® est une haloalcane déshalogénase modifiée, c'est une enzyme bactérienne qui a la capacité de transformer des chloroalcanes en alcools ; ici la fixation de l'enzyme à son substrat (chloroalcanes) est irréversible (Encell *et al.* 2012). L'haloTag® possède deux groupes : un groupe fonctionnel et un groupe de liaison pour interagir avec l'enzyme. C'est le groupe fonctionnel de la protéine Halotag® qui lui apporte ses multiples rôles car il peut se lier à une multitude de ligands différents (fluorochromes, ligands réactifs, résine, ...). Dans cette étude, c'est principalement l'utilisation de ligands couplés à des fluorochromes qui ont retenu notre attention pour aller étudier le tPA-HaloTag® dans les neurones corticaux en imagerie microscopique. Cependant, cette technique amène aussi certains inconvénients, notamment celle de modifier la structure de la protéine naturelle en lui ajoutant un site HaloTag® de 33 kDa, augmentant considérablement sa taille (69 kDa).

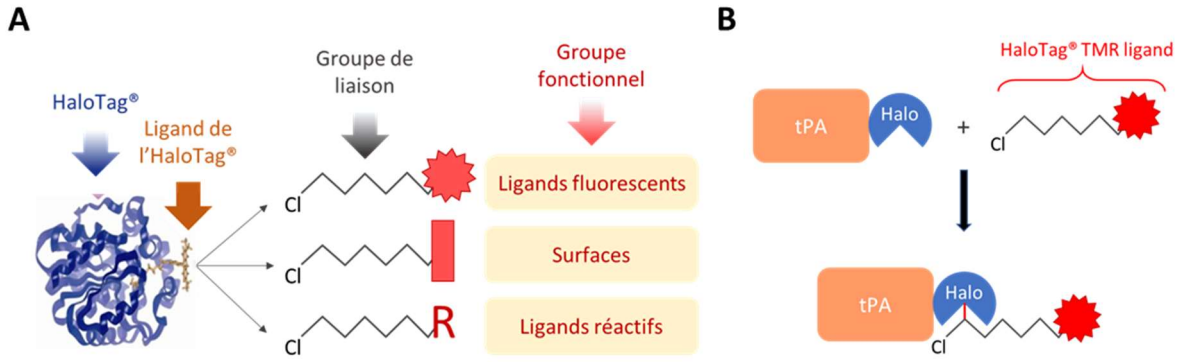


Figure 50 : **Schéma montrant le fonctionnement de la technologie HaloTag® ainsi que le tPA-HaloTag®.**
A. L'HaloTag® (en bleu) est une haloalcane déshalogénase mutée. Cette mutation lui permet de se lier de façon spécifique et covalente à son substrat : les chloroalcanes (« ligand de l'HaloTag® », en marron). Les chloroalcanes possèdent un groupe de liaison, reconnu spécifiquement par les halocalcanes déshalogénases (en gris) et un groupe fonctionnel (en rouge). Les ligands, en fonction du groupe fonctionnel, peuvent conférer des fonctions différentes à une protéine de fusion HaloTag. **B**. Dans notre étude le tPA (orange) est fusionné avec l'HaloTag® (en bleu), lors de l'ajout du substrat de l'HaloTag® : « l'HaloTag® TMR ligand » sur nos cultures de neurones. Ce ligand va aller se fixer de manière spécifique et irréversible sur la protéine fusion : tPA-HaloTag®. La mutation dans la séquence de l'HaloTag® va l'empêcher de cliver le chloroalcane et une liaison covalente va se former entre l'enzyme et le ligand (trait rouge) (adapté de : Urh and Rosenberg 2012).

Nous avons dans un premier temps confirmé le bon fonctionnement de la protéine : tPA-HaloTag® codée et produite par ce nouveau plasmide. Nous avons également vérifié que le ligand fluorescent (TMR ligand) se lie bien spécifiquement à l'HaloTag® **(Article 1 ; Figure 1 et Figure supplémentaire 1)**. Nous avons aussi vérifié que l'addition de l'HaloTag® au niveau de l'extrémité C-terminal du tPA ne modifie pas son activité protéolytique **(Article 1; Figure 1)**. Dans un second temps, nous avons regardé si les promoteurs pSYN (synaptophysine : promoteur spécifique des neurones), pCMV (Cytomégalovirus : promoteur viral) ainsi que la localisation de l'HaloTag® au niveau de l'extrémité N- ou C-terminal sur le tPA influençaient son expression et son adressage dans les neurones **(Article 1 ; Figure supplémentaire 1)**.

Nous avions montré dans une étude précédente que certains neurones du cortex sont capables in vivo d'exprimer et de synthétiser du tPA (Louessard *et al.* 2016). Nous avons voulu vérifier si les neurones corticaux en culture pouvaient également synthétiser du tPA, d'abord sans surexpression. Pour cela nous avons transfecté des cultures de neurones avec un plasmide portant la séquence du promoteur du tPA suivie de la séquence qui code pour la protéine pPLAT-tPA-HaloTag®. Après l'addition de TMR ligand nous avons observé la présence de tPA, preuve que les neurones sont capables de l'exprimer. De plus, nous obtenons une distribution neuronale de la protéine fusion similaire à celle exprimée par les autres promoteurs : pSYN et pCMV **(Article 1 ; Figure supplémentaire 1)**. Le promoteur du tPA (pPLAT) étant un promoteur faible, nous avons préféré l'utilisation des plasmides codant pour la protéine fusion présentant des promoteurs fort.

Nous avons voulu savoir par la suite si notre protéine tPA-HaloTag® était adressée au bon endroit dans les neurones. Les plasmides codant pour le tPA-HaloTag® comprennent à la fois bien entendu la séquence du tPA mais aussi la séquence de son peptide signal. Le peptide signal est une chaine peptidique qui dirige les protéines en cours d'élongation (en cours de synthèse par les ribosomes) vers le réticulum endoplasmique, ce signal va permettre d'adresser les protéines dans un compartiment cellulaire spécifique (ex : protéines membranaires, protéines de sécrétion, protéines luminales de certains organites). Dès que la protéine est arrivée au bon endroit, si le peptide signal est situé à une des extrémités de la chaine protéique, celui-ci va être clivé par des protéases (Coleman *et al.* 1985; Kapp *et al.* 2013). La présence du peptide signal dans nos plasmides permet donc un bon adressage de

nos protéines fusions. Il est donc primordial d'indiquer que l'ensemble des protéines fusions surexprimées dans ces deux études sont toutes synthétisées avec leur peptide signal.

Dans la mesure où les travaux de cette thèse dans cette première étude se sont focalisés sur l'étude dynamique du tPA en microscopie confocale en temps réel, nous allons par la suite discuter uniquement de ces résultats.

2 - Etude descriptive du trafic du tPA

2.1 - Transport du tPA dans les neurones

Dans cette première étude, nous avons décrit en conditions basales (sans modification de l'activité des neurones) que le tPA peut être retrouvé et transporté à la fois dans les dendrites et les axones de neurones corticaux en culture. Ce tPA est véhiculé à la fois de manière rétrograde et de manière antérograde. Ces vésicules transportant le tPA s'avèrent être en moyenne plus rapides dans les axones que dans les dendrites (1.22 µm/s contre 0.9 µm/s) **(Article 1; Figure 3)**. Les vitesses vésiculaires que nous avons analysées sont en accord avec celles déjà décrites dans la littérature, en particulier avec celles des vésicules à cœur denses (Lochner *et al.* 1998; Kwinter *et al.* 2009). De plus, nous avons observé que le flux de vésicules à tPA passant dans les prolongements était également plus important au niveau des axones en particulier dans le sens rétrograde. Enfin, nous avons montré que ces vésicules sont bien plus dynamiques (en mouvement) au niveau axonal qu'au niveau dendritique où l'on observe une population plus importante de vésicules stationnaires **(Article 1; Figure 3)**. Il est fort probable que les vésicules contenant le tPA au niveau des dendrites soient arrimées à la membrane plasmique, afin d'y être prochainement exocytées après la survenue d'une dépolarisation. De manière intéressante, les vésicules contenant le tPA dans les axones sont beaucoup plus dynamiques, en particulier dans le sens rétrograde. Il est possible que le tPA retourne vers le corps cellulaire pour y être dégradé dans les lysosomes ou alors aussi pour aller modifier l'expression de certains gènes du noyau. Ce trafic rétrograde ressemble aussi beaucoup au trafic des endosomes de signalisation, notamment ceux contenant les récepteurs TrkA activés (Barford *et al.* 2018). Donc le transport axonal rétrograde du tPA peut également avoir une fonction protectrice comme pour le BDNF en venant modifier l'expression de gènes régissant la survie cellulaire (Philippidou *et al.* 2011). Ce type de transport serait en adéquation avec les mécanismes décris dans la littérature du tPA dans la

survie neuronale (Liot *et al.* 2006; Correa *et al.* 2011b; Wu *et al.* 2013). Cependant, pour que le tPA se retrouve dans ces organites, il y a de grandes chances qu'il soit libéré dans le milieu extracellulaire et recapturé par endocytose par les neurones. Enfin, il possible aussi que cet important transport rétrograde permette de redistribuer et recycler le tPA dans d'autres compartiments, comme dans les dendrites.

2.2 - L'exocytose du tPA dans les neurones

Une précédente étude du laboratoire a montré que le tPA est contenu dans un sous-type de vésicules à cœur dense synaptobrévine 2 (VAMP2) positives (Louessard *et al.* 2016). Des travaux ont également mis en évidence que le tPA peut être libéré par les neurones à la suite d'une dépolarisation neuronale causée par une forte concentration en K^+ (Gualandris *et al.* 1996; Fernández-Monreal *et al.* 2004c; Lochner *et al.* 2006; de Wit *et al.* 2009), par le NMDA (Nicole *et al.* 2001) ou encore par l'utilisation de la bicuculline, inhibiteur des interneurones GABA (Centonze *et al.* 2002).

Nous avons pu montrer ici que le tPA peut être co-localisé dans des vésicules VAMP2 positives **(Article 1 ; Figure 5)**. De plus, grâce à l'utilisation d'un autre outil original : un plasmide codant pour le HaloTag®-tPA-SEP, nous avons pu observer la libération du tPA **(Article 1 ; Figure 6)**. La SEP (*superecliptic pHluorin*) est une GFP qui présente la particularité d'émettre de la fluorescence uniquement dans un environnement à 7.4 de pH extracellulaire. Lorsque que la protéine fusion HaloTag®-tPA-SEP est synthétisée et stockée dans des vésicules à pH acide (pH 5.5), la SEP n'émet donc aucune fluorescence. Ainsi avec cette protéine fusion nous pouvons visualiser le tPA intravésiculaire en fluorescence rouge grâce au TMR ligand fixé à l'HaloTag® et aussi observer son exocytose par la SEP en fluorescence verte **(Article 1 ; Figure 6B et 6C)**. Dans cette étude, nous avons mis en évidence qu'en conditions basales les neurones corticaux peuvent libérer du tPA au niveau pré et postsynaptique. Dans ces conditions on observe un pourcentage de vésicules à tPA exocytées (ratio entre vésicules seulement rouges ou intracellulaire et les vésicules rouges et vertes à la fois, alors exocytées) ainsi qu'un nombre de vésicules à tPA exocytées par µm plus important dans les dendrites que dans les axones **(Article 1 ; Figure 6D et 6E)**. A ce stade et dans ces cultures on ne peut pas affirmer qu'il s'agisse d'une exocytose constitutive ou régulée. En effet, nous ne modifions pas l'activité des neurones par un traitement (activateur ou inhibiteur), ce qui indiquerait plutôt une sécrétion constitutive or rien ne nous indique que les neurones en conditions basales ne libèrent pas ce

tPA à la suite d'une dépolarisation provoquée par le neurone voisin. Cela n'exclut pas non plus que l'exocytose du tPA que nous observons ne soit pas un mélange de ces deux voies de sécrétion différentes.

Article n°2: Modulations of the neuronal trafficking of tissue-type plasminogen activator (tPA) influences the glutamate release: a mechanism impaired in a model of tauopathy.

Dans cette deuxième étude, nous avons présenté une description et une analyse du trafic du tPA dans les neurones corticaux dans différentes conditions d'activité neuronale. L'activation des neurones provoque un chamboulement dans le trafic dendritique et axonal du tPA qui se manifeste par une diminution de la vitesse globale des vésicules, ainsi que de la distance qu'elles parcourent. Ces phénomènes sont associés à une augmentation de l'arrimage des vésicules contenant le tPA et à une accentuation de l'exocytose de ces vésicules. L'inhibition quant à elle des neurones ne modifie en rien le trafic des vésicules, au niveau de leur transport et de leur libération, dévoilant une sécrétion constitutive du tPA dans les éléments pré et postsynaptiques. Il s'avère que l'étude conjointe du trafic de la v-SNARE VAMP2 montre de grandes similitudes dans le transport axonal antérograde que cela soit en conditions contrôle (sans modification de l'activité basale des cultures) qu'en condition d'activation neuronale, soulignant un co-transport des deux protéines. De plus, nous avons regardé l'effet de l'addition exogène de tPA sur la libération de glutamate sur les cultures de neurones corticaux, et nous avons observé une augmentation de l'exocytose des vésicules VGlut1 à la surface des dendrites et des axones. Enfin, nous avons étudié le trafic du tPA dans un modèle de maladie d'Alzheimer qui montre une exacerbation du transport et de la libération du tPA axonal sans modification de son comportement dendritique.

1 - Etude du trafic du tPA en conditions d'activation neuronale

1.1 - Impact de l'activation des neurones sur le transport du tPA

Après avoir étudié le trafic du tPA dans les neurones corticaux en condition d'activité basale, nous voulions aller plus loin en examinant ce trafic en condition d'activation neuronale. Nous savons aujourd'hui que c'est la concentration en Ca^{2+} qui régit le trafic des

vésicules, comme l'attachement et le détachement des moteurs moléculaires, ou encore l'activation des protéines du système SNARE, responsable de l'arrimage et de la fusion des vésicules avec la membrane plasmique. Il a déjà été montré que les changements de direction dans la trajectoire des vésicules, ainsi que l'arrimage de ces vésicules se produisent lors d'un pic d'activité calcique (Hanus *et al.* 2014). Dans ces expériences nous avons reproduit la même chose que pour la première étude, c'est à dire la surexpression de nos protéines fusion tPA-HaloTag® dans les cultures et l'utilisation d'un ligand fluorescent (HaloTag® TMR ligand) perméable aux membranes cellulaire pour observer le tPA. Nous avons reproduit l'expérience de Hanus et collaborateurs en transfectant conjointement à notre tPA-HaloTag® un marqueur fluorescent de l'activité calcique (GCaMP3fast) qui émet des pics d'intensité proportionnels à la quantité de Ca^{2+} présente dans son environnement proche (Hanus *et al.* 2014). Nous avons en effet observé que les changements de direction des vésicules à tPA ou leur arrimage coïncidaient avec les pics de fluorescence calcique **(Figure 51)**. Sachant cela, nous voulions vérifier si les vésicules contenant tPA étaient sujettes à une sécrétion régulée ou non.

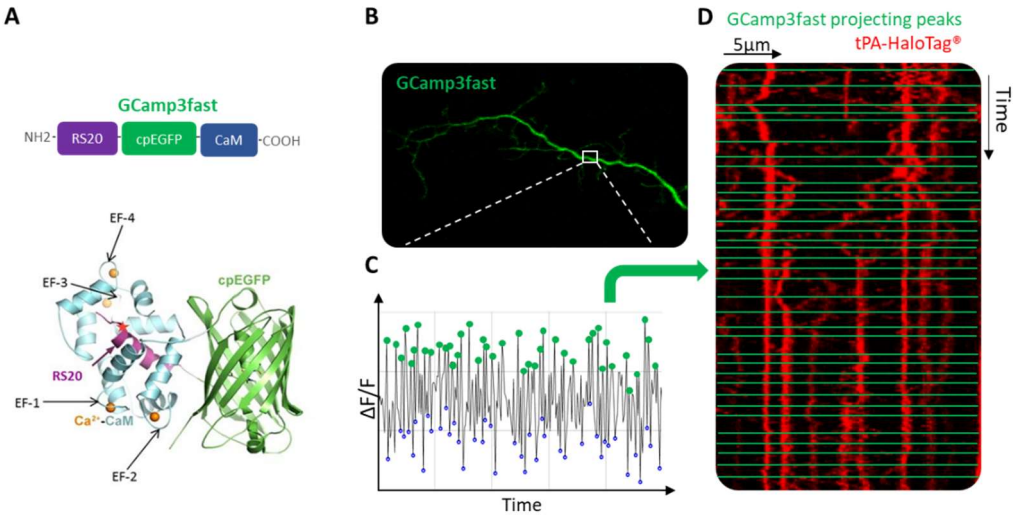


Figure 51 : Les mouvements des vésicules contenant le tPA sont calqués sur les pics d'activité calcique.
A. Schéma représentant la séquence ainsi que la structure tridimensionnelle du marqueur calcique encodé génétiquement GCaMP3fast. Il résulte de l'assemblage d'une protéine fluorescente verte (eGFP), d'une protéine modulable par le Ca^{2+} (calmoduline, CaM) ainsi que d'un peptide RS20 ici, d'une kinase à chaine légère régulatrice de la myosine II. La fixation du Ca^{2+} sur la calmoduline provoque son changement conformationnel menant à la permutation circulaire de l'eGFP, qui émet alors de la fluorescence. **B**. Image montrant la dendrite d'un neurone cortical transfecté avec la GCaMP3fast. **C**. Graphique montrant les variations de fluorescence de la GCaMP3fast au cours du temps au niveau de la région d'intérêt encadrée en B. Cette variation de fluorescence est proportionnelle à la quantité de Ca^{2+} présent dans l'environnement proche de la GCaMP3fast. **D**. Kymographe montrant les trajectoires des vésicules contenant le tPA-HaloTag® révélé par l'ajout sur les cultures de l'HaloTag® TMR ligand (rouge), ainsi que les pics d'intensité de la GCaMP3fast (traits verts). On observe que les changements de direction dans les trajectoires des vésicules contenant le tPA-HaloTag® coïncident avec les pics d'activité calcique.

Nous avons choisi d'utiliser des modèles de LTP chimiques répandus dans la littérature pour stimuler nos cultures. Nous avons pris deux traitements activateurs ayant des effets sur chaque côté de la synapse, à savoir un traitement au KCl (50mM) qui va agir sur l'extrémité présynaptique et le traitement Bicuculline/Glycine (30µM/200µM) qui va plutôt agir au niveau postsynaptique. Le but de ces expériences est de vérifier si le transport et la libération du tPA change lorsque l'on modifie les concentrations intracellulaires en Ca^{2+}. Après analyse, nous avons vu que l'augmentation de cette concentration dans les neurones transfectés provoquait une réduction des vitesses vésiculaires moyennes (antérogrades et rétrogrades) associée à une diminution des distances moyennes qu'elles parcourent à la fois dans les dendrites et les axones. De plus, le temps moyen passé par les vésicules à l'arrêt dans une trajectoire augmente dans les dendrites et dans les axones. Nous observons également que cette hausse intracellulaire en Ca^{2+} augmente l'arrimage des vésicules contenant le tPA, suggérant une exocytose prochaine de leur contenu dans le milieu extracellulaire **(Article 2; Figure 1 et Supplémentaire 1)**. Ces paramètres dynamiques sont en accord avec la littérature des vésicules à coeur denses (Lochner *et al.* 2006; Kwinter *et al.* 2009; de Wit *et al.* 2009; Yin *et al.* 2011; Bharat *et al.* 2017). De manière intéressante, nous avons observé que le traitement Bic/Gly affectait plus particulièrement le trafic bidirectionnel du tPA dans les dendrites alors que dans les axones c'est plutôt le traitement au KCl. Ces petites différences seraient probablement liées à leur mécanisme d'action respectif. Le traitement Bic/Gly permet par la bicuculline d'inhiber les interneurones GABA inhibiteurs dans les cultures, et par la glycine d'activer les R-NMDA amenant un enrichissement des courants postsynaptiques (Ivenshitz and Segal 2006; Kennedy *et al.* 2010). Le traitement au KCl va lui favoriser la dépolarisation rapide et mener à une augmentation du nombre de potentiels d'actions au niveau de l'axone et des extrémités présynaptiques (Fitzjohn *et al.* 2001; Pickard *et al.* 2001). Ces résultats indiquent que le transport du tPA est sensible aux variations de Ca^{2+} intracellulaire suggérant fortement une sécrétion régulée.

1.2 - Impact de l'activation des neurones sur l'exocytose du tPA.

A la suite de ces premiers résultats nous voulions vérifier si cette activation neuronale provoquait une variation dans l'exocytose des vésicules contenant le tPA. Les données sur le transport du tPA étaient manquantes dans la littérature, en revanche il existe déjà un certain

nombre d'études qui ont décrit qu'à la suite d'une dépolarisation neuronale le tPA était libéré (Gualandris *et al.* 1996; Nicole *et al.* 2001; Centonze *et al.* 2002; Fernández-Monreal *et al.* 2004c; Lochner *et al.* 2006; de Wit *et al.* 2009). Seulement très peu de ces études ont pu regarder cette libération en temps réel sur des neurones corticaux.

Pour observer cela, nous avons transfecté des plasmides codant pour la protéine HaloTag®-tPA-SEP pour voir à la fois le transport intracellulaire du tPA (en rouge avec le HaloTag® TMR ligand) et sa libération (en vert avec la SEP) **(Article 2; Figure 3 et supplémentaire 3)**. Nous retrouvons effectivement les données de la littérature, après activation des neurones nous avons observé une augmentation du nombre de vésicules exocytées par µm. De plus, nous avons pu constater également une augmentation du nombre d'évènements de fusion sur les kymographes. Comme pour le transport des vésicules, il y a un effet plus marqué du traitement Bic/Gly sur l'exocytose du tPA dendritique alors que le KCl accentue quant à lui l'exocytose axonale du tPA. Cependant nous avons révélé des mécanismes différents dans les dendrites et dans les axones. En effet, lors de l'activation, nous avons remarqué une augmentation du nombre de vésicules contenant le tPA dans les axones par rapport au contrôle. De ce fait, on retrouve plus de vésicules arrimées à la membrane et plus d'exocytoses. Il est très probable que la hausse de Ca^{2+} dans les axones provoque un arrêt et une accumulation des vésicules à la membrane plasmique amenant une libération plus importante du tPA dans le milieu extracellulaire. Au niveau des dendrites, sous le traitement Bic/Gly nous avons aperçu un phénomène différent. Dans cette condition, il y a plus de vésicules à tPA exocytées mais pour un même nombre de vésicules présentes dans les dendrites par rapport au contrôle.

Il est important de souligner que ces résultats ne reflètent pas la réalité. Tout d'abord il y a fort à parier que l'exocytose de tPA axonal ne soit pas aussi importante dans des conditions *in vivo.* En effet, en dehors bien entendu de la surexpression du tPA, les neurones de nos cultures sont amyéliniques, offrant ainsi plus facilement des zones de contact le long des axones avec les neurones voisins. Pour cela, il pourrait être intéressant d'utiliser des plaques microfluidiques qui sont des dispositifs permettant d'isoler les axones dans des microcanaux **(Figure 52)**. L'isolement d'une grande portion des axones dans ces microcanaux permettrait de voir si l'exocytose est maintenue en l'absence de contact avec les autres neurones.

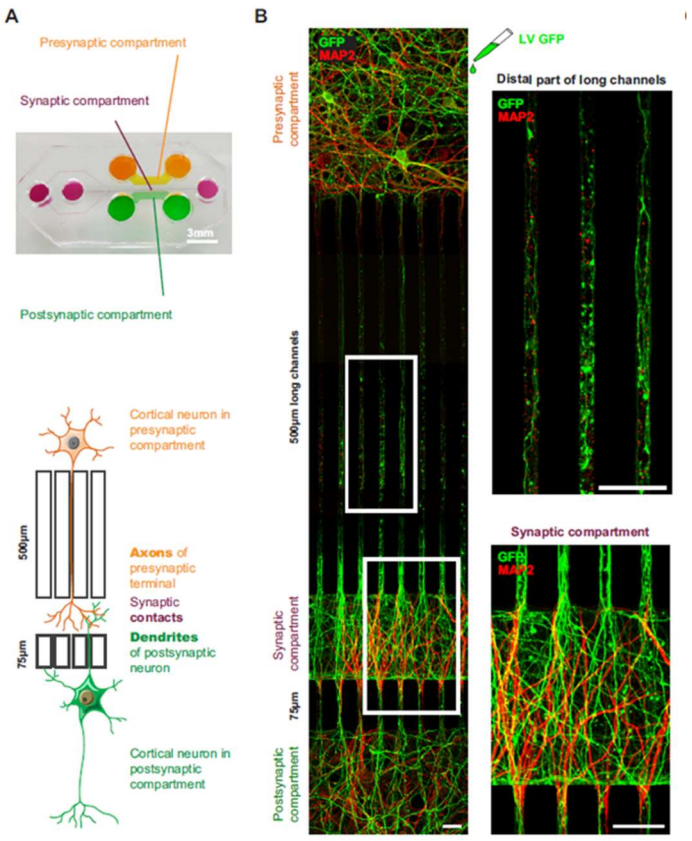


Figure 52 : Exemple d'application de plaques microfluidiques, ici dans la reconstitution d'un circuit neuronal corticocortical.
(**A**) Image et représentation schématique de la chambre microfluidique à 3 compartiments qui permet la reconstitution d'un réseau corticocortical mature compatible avec l'imagerie des cellules vivantes, des axones et des dendrites. (**B**) Les neurones présynaptiques ont été transfecté avec une GFP (vert) pour visualiser les axones dans les microcanaux et l'immunomarquage MAP2 (rouge) a été appliqué sur l'ensemble de la microchambre à DIV13. Le grossissement montre les axones dans la partie distale du long microcanal mais pas les dendrites positives pour MAP2. Adapté de Bruyère *et al.* 2020.

De plus, ces dispositifs peuvent contenir des chambres qui communiquent avec ces portions d'axones, ce qui rend possible la culture d'oligodendrocytes pour leur myélinisation. L'isolation des axones dans les gaines de myélines va à coup sûr favoriser une accélération du trafic des vésicules, par la diminution de zones accessibles contenant des canaux au Ca^{2+} et réduire l'exocytose, ou du moins la restreindre dans des régions bien spécifiques de l'axone. Enfin, Il est possible aussi que la modification du tPA en lui ajoutant à la fois un HaloTag® et une SEP, encombre et réduise sa capacité à interagir avec ces cibles. Cela pourrait par exemple expliquer le fait qu'une fois exocyté, le tPA reste longtemps dans le milieu extracellulaire (visibles sur les kymographes), et qu'il ne soit pas rapidement recapturé. Cependant, nous sommes en accord avec une étude qui a montré que lorsque l'on stimulait des neurones avec

une forte concentration en K^+ (KCl), le phénomène d'exocytose persiste jusqu'à plusieurs minutes (de Wit *et al.* 2009).

2 - Etude du trafic du tPA en conditions d'inhibition neuronale

Nous avons par la suite voulu regarder le trafic du tPA cette fois-ci dans l'inhibition neuronale. A l'inverse de l'activation, il n'y a que peu de données dans la littérature. De manière réciproque, nous avons utilisé deux traitements inhibiteurs qui induisent les effets opposés aux deux traitements activateurs que nous avons décrits précédemment. L'application de tétrodotoxine (TTX, 1.5µM) va engendrer l'inhibition des canaux sodiques voltage dépendant, bloquant ainsi la propagation des potentiels d'action au niveau axonal, et réduisant la concentration présynaptique en Ca^{2+}(Santschi *et al.* 1999b; Cichon and Gan 2015). Le deuxième traitement CNQX/APV (50µM/50µM) va permettre quant à lui de bloquer l'ensemble des récepteurs synaptiques au glutamate, provoquant l'appauvrissement des courants postsynaptiques et réduisant la concentration postsynaptique en Ca^{2+} (Attwell *et al.* 1999; Traynelis *et al.* 2010).

De manière surprenante, nous n'avons observé aucune modification du trafic du tPA dans ces conditions. La diminution intracellulaire de la concentration en Ca2+ n'a apporté aucun changement dynamique du tPA au niveau pré et postsynaptique **(Article 2; Figure 2 et supplémentaire 2)**. De plus, nous n'avons constaté aucune modification non plus dans la libération du tPA que ce soit dans les dendrites ou dans les axones **(Article 2 ; Figure 4 et supplémentaire 3)**. Ces résultats suggèrent l'existence d'une sécrétion constitutive du tPA au niveau pré et postsynaptique.

Il y a plusieurs hypothèses possibles pour expliquer ce que nous avons remarqué. Tout d'abord il est possible que la surexpression du tPA dans les neurones compense les traitements inhibiteurs. Effectivement, le tPA pourrait potentialiser l'influx de Ca2+ grâce à son interaction avec les R-NMDA maintenant les concentrations pré et postsynaptique en Ca2+ à des niveaux de repos. Cette première hypothèse est la moins probable, car l'ensemble des transfections a été réalisé avec de la lipofectamine, connue pour avoir des rendements de transfection relativement faibles. Cela indiquerait que le tPA serait libéré par un neurone, lui donnant la possibilité de s'activer lui-même grâce à l'interaction tPA/R-NMDA. La deuxième hypothèse, plus probable est que cette inhibition dévoile une sécrétion constitutive du tPA

par les neurones (Shin *et al.* 2004b). Par cette voie de sécrétion le tPA pourrait être libéré pour entretenir et réguler la matrice extracellulaire par un mécanisme dépendant de la conversion du plasminogène en plasmine (Seeds *et al.* 1995; Kim *et al.* 2017).

3 - Comparaison du trafic tPA/VAMP2

Comme nous l'avons mentionné plus haut, le tPA a été identifié dans des vésicules à cœur dense (DCVs) (Silverman *et al.* 2005), puis dans une sous population de DCVs synaptobrévine 2 (VAMP2) positives (Tobin *et al.* 2012; Louessard *et al.* 2016). L'objectif de cette expérience était de comparer le trafic respectif du tPA et de VAMP2 dans les neurones corticaux afin de déceler un potentiel co-transport.

Dans cette expérience nous avons transfecté un plasmide codant pour une protéine VAMP2 fusion : la VAMP2-GFP. A la différence du tPA qui est une protéine sécrétée et donc qui se situe dans la lumière des vésicules, VAMP2 est une protéine enchâssée dans la membrane des vésicules synaptiques et des DCVs **(Figure 53)**. Elle appartient à la famille des v-SNARE impliquée dans la fusion de la membrane des vésicules avec la membrane plasmique.

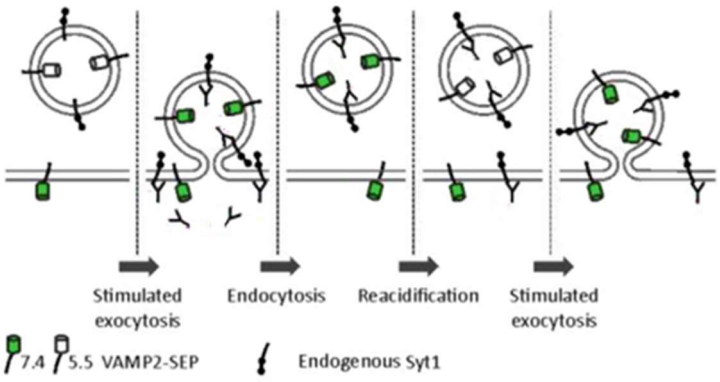


Figure 53 : Schéma montrant le fonctionnement de la protéine fusion VAMP2-SEP.
Comme pour l'HaloTag®-tPA-SEP, la VAMP2-SEP émet une fluorescence uniquement en présence d'un pH =7.4. Lorsqu'elle est encapsulée dans des vésicules au pH acide il n'y a aucune émission de fluorescence (Martineau *et al.* 2017).

Nous nous sommes aperçu que les vésicules contenant le tPA et les vésicules VAMP2 positives présentaient des similarités importantes dans leur transport axonal antérograde, en conditions de repos comme en condition d'activation. En effet, nous avons trouvé que les trajectoires de ces vésicules montrent la même vitesse vésiculaire antérograde moyenne ainsi que les mêmes distances moyennes parcourues en condition contrôle et Bic/Gly **(Article 2;**

Figure 5 et supplémentaire 4). Chose intéressante, à l'inverse des vésicules contenant le tPA, les vésicules VAMP2 répondent au traitement inhibiteur. Cependant, malgré des paramètres moteurs axonaux antérogrades identiques qui indiquent un transport commun des deux molécules dans les mêmes vésicules, la majorité des vésicules axonales VAMP2 sont antérogrades (Nabb and Bentley 2021) et les vésicules à tPA rétrogrades **(Article 2; Figure 1, 2 et 5)**. Cette différence s'explique de par la nature et la fonction des deux protéines, VAMP2 est retrouvée de manière prédominante dans le compartiment de sécrétion, alors que le tPA est retrouvé dans de nombreux compartiments des différents organites, dans les dendrites et les axones. Nous décrivons le tPA comme étant co-localisé avec les protéines Rab qui sont des marqueurs de la famille des endosomes, notamment dans les endosomes précoces (Rab5+), dans les endosomes tardifs (Rab7+) ou encore dans les endosomes de recyclage (Rab11+) dans les dendrites et dans les axones **(Article 1; Figure 7)**. L'abondance des trajectoires rétrogrades du tPA ressemble beaucoup à celles des endosomes de signalisation décrite dans la littérature, de plus la vitesse est semblable (**Figure 54** ; Lehigh *et al.* 2017; Barford *et al.* 2018).

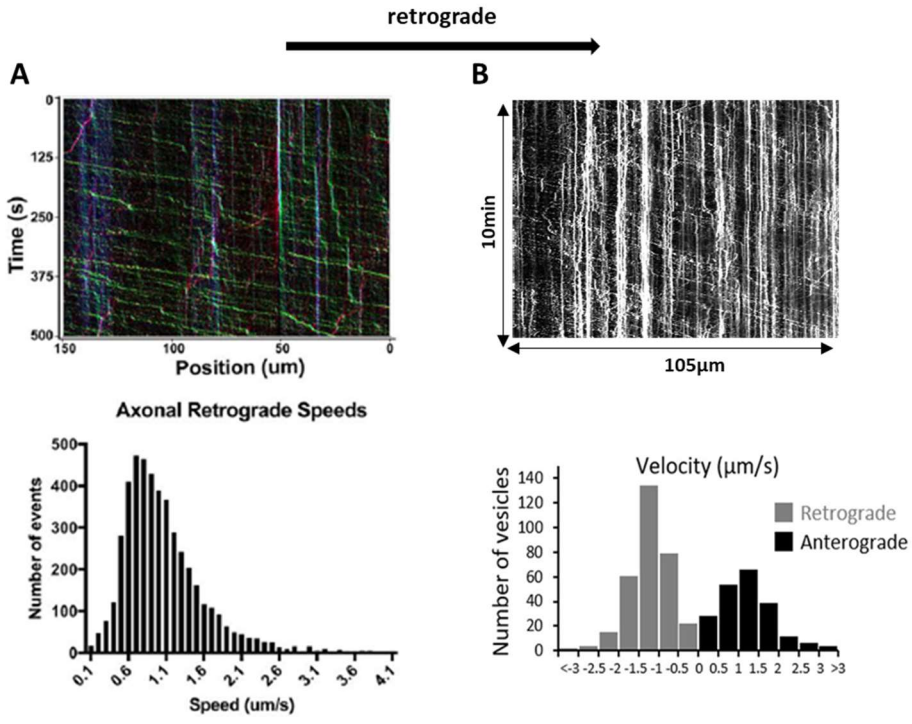


Figure 54 : Le trafic axonal du tPA ressemble fortement à celui des endosomes de signalisation.
A. En haut : kymographe représentatif des trajectoires rétrogrades axonales des endosomes de signalisation contenant les récepteurs TrkA (FLAG-TrkA). En bas : graphes montrant la répartition des vitesses rétrogrades en µm/s des endosomes de signalisation contenant TrkA dans les axones (Barford *et al.* 2018). **B**. En haut : kymographe représentatif des trajectoires rétrogrades axonales des vésicules contenant le tPA (tPA-HaloTag®). En bas : graphes montrant la répartition des vitesses rétrogrades en µm/s des vésicules contenant le tPA-HaloTag® dans les axones **(article 1 ; Figure 3)**.

En effet, le tPA pourrait être libéré et recapturé par le même neurone et pris en charge par des endosomes de recyclage et de signalisation (Rab11+) pour être redistribué soit dans des zones à proximité (autres boutons présynaptiques), soit dans des zones éloignées (dans les dendrites). Nous ne sommes pas en mesure de connaître pour l'instant l'origine de cette recapture, elle pourrait être médiée par des récepteurs (R-NMDA, LRP1), ou bien par une transcytose rétrograde.

Enfin, la comparaison du trafic tPA/VAMP2 durant l'inhibition des neurones montre que la potentielle sécrétion constitutive du tPA se passerait à travers d'autres vésicules que les DCVs VAMP2 positives. Les points communs retrouvés entre le transport rétrograde du tPA et les endosomes de signalisation donnent une bonne piste pour trouver une réponse à notre question : comment expliquer le trafic axonal majoritairement rétrograde du tPA ?

4 – Influence du tPA sur la libération du glutamate.

Dans la suite de cette étude nous avons regardé si le tPA exogène était capable de moduler la transmission glutamatergique. Nous savons que le tPA est capable de se fixer sur plusieurs récepteurs présents à la synapse ou dans son environnement proche (R-NMDA, LRP1, récepteurs à l'annexine II, REGF) lui valant d'être impliqué dans un certain nombre de fonctions dans le SNC (Chevilley *et al.* 2015a; Jeanneret and Yepes 2017; Thiebaut *et al.* 2018b). Des études ont d'ores et déjà montré l'implication du tPA dans le déclenchement du cycle des vésicules synaptiques, et dans la libération présynaptique de glutamate qui permettrait d'activer les R-NMDA postsynaptiques et ainsi provoquer la phosphorylation de la CaMKII et de la recruter dans la PSD (Wu *et al.* 2015; Jeanneret *et al.* 2016).

Nous avons choisi pour cette expérience la surexpression du transporteur vésiculaire du glutamate 1 (VGlut1) associé à une SEP pour mettre en évidence la libération des vésicules synaptiques contenant le glutamate (VGlut1-SEP) dans les neurones corticaux. L'addition de tPA exogène (300nM) sur nos cultures de neurones a provoqué une augmentation de l'exocytose du glutamate à la fois au niveau des extrémités pré et postsynaptiques **(Article 2 ; Figure 6)**. La première surprise que nous avons rencontrée a été l'observation de la présence de vésicules VGlut1 dans les dendrites. Il s'avère que nous sommes finalement en accord avec la littérature qui décrit que les dendrites peuvent effectivement en contenir et en libérer dans le milieu extracellulaire (Zilberter 2000; Gabellec *et al.* 2007). De plus, nous connaissons

l'existence depuis quelques années des R-NMDA présynaptiques (Bouvier *et al.* 2018), qui pourrait expliquer en partie la présence de ces vésicules à glutamate postsynaptiques. Il serait donc possible pour le tPA de se fixer au R-NMDA pré et postsynaptique pour augmenter la libération de glutamate à la surface des dendrites et des axones. Donc il n'est pas exclu qu'un neurone puisse s'activer lui-même en libérant du tPA. De surcroît, une petite expérience que nous avons réalisée irait dans ce sens. Grâce à l'utilisation de mutants du tPA modifiés au niveau des domaines Kringle 2 (K2*-tPA-HaloTag®) et Finger (ΔF-tPA-HaloTag®) les empêchant d'interagir respectivement avec les R-NMDAR et les LRP1, nous avons regardé si le trafic axonal rétrograde du tPA pouvait venir d'une recapture présynaptique médiée par des récepteurs (Figure 55).

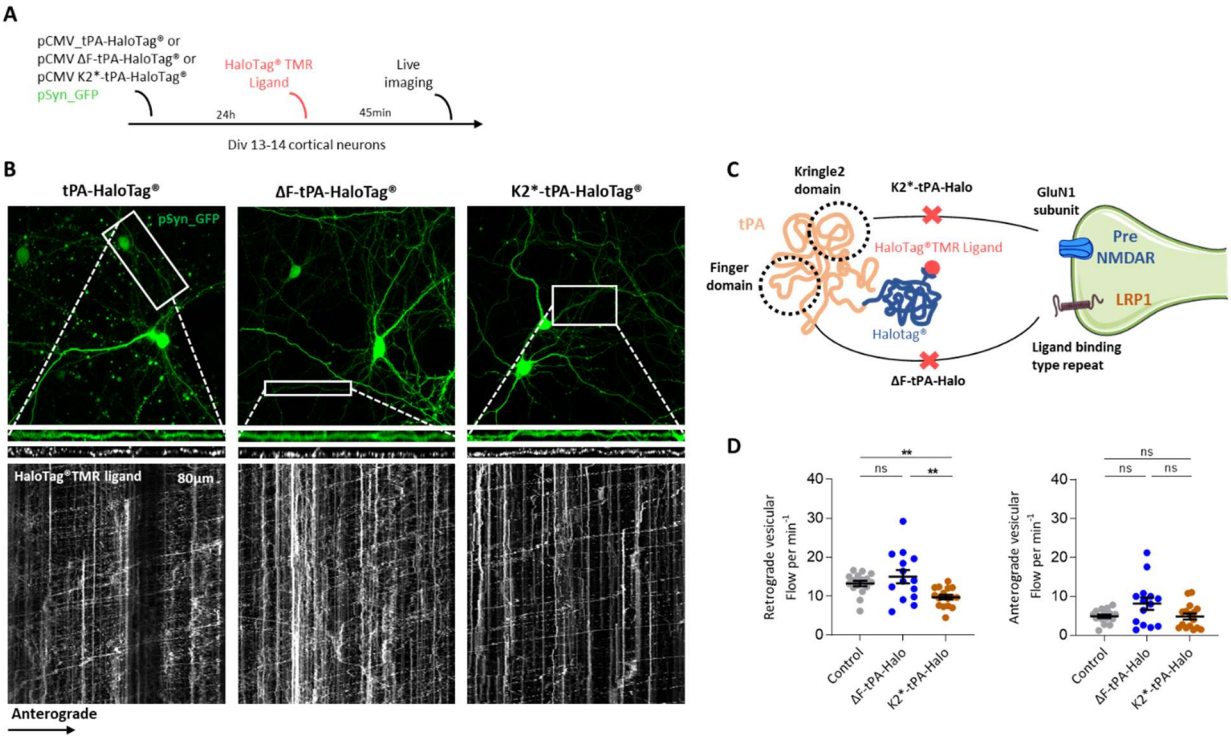


Figure 55 : L'abolition de l'interaction entre le tPA et les R-NMDA modifie le flux rétrograde axonal des vésicules contenant le tPA.

A. Frise montrant le déroulé de l'expérience. B. Images obtenues en microscopie confocale de neurones surexprimant une GFP avec soit le tPA-HaloTag®, soit le ΔF-tPA-HaloTag® ou soit le K2*-tPA-HaloTag®dans lesquelles ont été réalisé les acquisitions axonales en temps réel montrées en dessous par les kymographes (longueur= 80µm, temps= 10min). **C**. Schéma représentant les domaines mutés chez chacun des mutants annulant leur interaction avec la sous-unité GluN1 des R-NMDAs (pour le K2*-tPA-HaloTag®) ou avec les LRP1 (pour le ΔF-tPA-HaloTag®). **D**. Graphes montrant les quantifications des flux vésiculaires rétrogrades (à gauche) et antérograde (à droite) axonaux dans des neurones surexprimant soit le tPA-HaloTag®, soit le ΔF-tPA-HaloTag® ou le K2*-tPA-HaloTag®. tPA-HaloTag® n = 16, ΔF-tPA-HaloTag®n = 14, K2*-tPA-HaloTag® n= 16 axones issues de 3 à 6 expériences indépendantes. Un test de Kruskal-Wallis a été réalisé suivi d'un test de Dunn de comparaison multiple, **p<0.01, ns : non significatif.

En effet, lorsque nous avons inhibé l'interaction entre le tPA et la sous-unité GluN1 des R-NMDAR, nous avons observé une diminution du flux vésiculaire rétrograde axonal des neurones, qui n'est pas retrouvé en empêchant l'interaction tPA/LRP1 **(Figure 55)**. On peut en conclure qu'il est possible qu'une partie du tPA présynaptique soit sécrété et recapturé par le même neurone *via* les R-NMDAs, qui le redistribue soit par l'intermédiaire d'endosomes de signalisation (Rab11+) soit par des endosomes (Rab7+) qui remontent vers le corps cellulaire pour y être dégradés dans les lysosomes. Il faudrait cependant approfondir cette expérience, en augmentant le nombre d'axones analysés par conditions, puis en regardant aussi ce qu'il se passe au niveau des dendrites. De plus, il serait intéressant d'avoir une signature électrophysiologique qui puisse confirmer que cette interaction à bien lieu et qu'elle provoque des changements dans les courants présynaptiques.

Pour finir, tous les résultats qui ont été présentés dans les articles 1 et 2 ont été obtenus dans des cultures mixtes issues de cortex de souris, qui contiennent donc aussi beaucoup d'astrocytes. Or nous savons que les astrocytes sont capables de recapturer le tPA synaptique, de le recycler puis de le libérer de nouveau dans le milieu extracellulaire par un mécanisme dépendant de la concentration synaptique en glutamate (Cassé *et al.* 2012). De plus, les astrocytes ont été décrit aussi pour concentrer à leur surface le plasminogène, pouvant être activé par le tPA relâché par ces astrocytes ainsi que par les neurones (Briens *et al.* 2017). La plasmine alors générée est capable à son tour d'activer d'autres molécules comme des facteurs de croissance notamment le pro-BDNF en BDNF mature (Pang *et al.* 2004), connu pour promouvoir la croissance neuronale et synaptique, ainsi que de maintenir la LTP en favorisant la libération de glutamate (Acheson *et al.* 1995; Boulanger and Poo 1999; Jovanovic *et al.* 2000; Yamada and Nabeshima 2003). D'autre part il n'est pas exclu non plus que les astrocytes puissent exprimer directement le tPA et le libérer à la synapse pour agir sur la neurotransmission glutamatergique. Même si ce point est encore source de débats dans la littérature, nous avons quelques pistes qui nous apportent un début de réponse. Nous avons réussi à surexprimer le HaloTag®-tPA-SEP dans les astrocytes en cultures **(Figure 56)**, et cela a montré qu'ils sont capables de l'exprimer, mais aussi de le transporter et de le libérer dans le milieu extracellulaire **(Figure 55C)**.

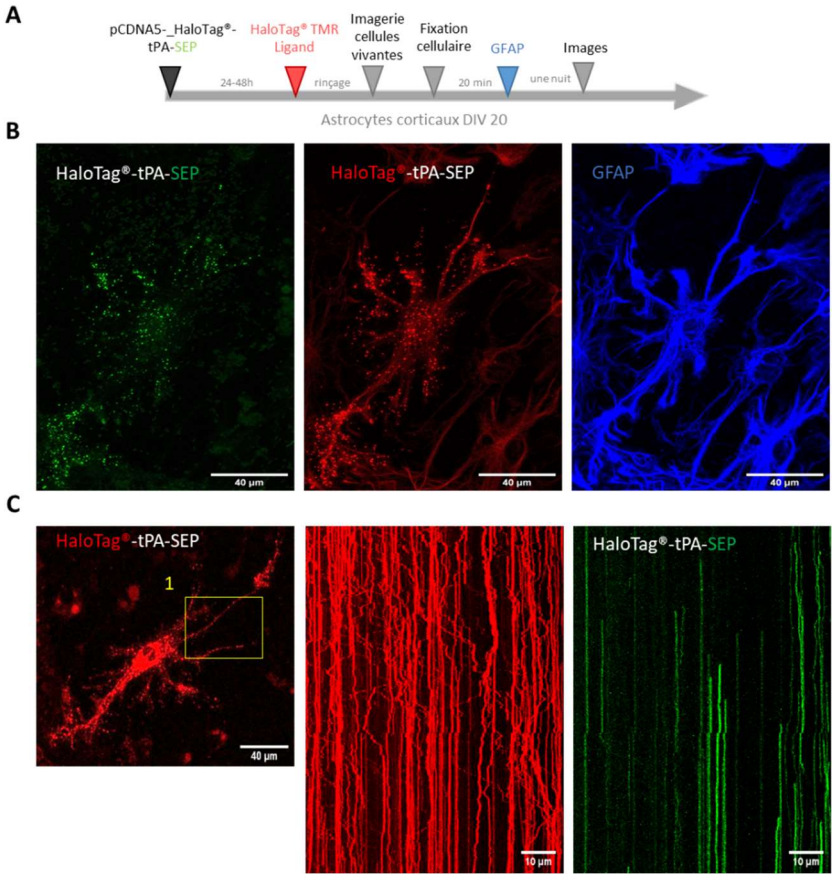


Figure 56 : Les astrocytes sont capables d'exprimer et de libérer le tPA.
A. Frise montrant le déroulé de l'expérience. **B.** Immunocytochimie montrant l'expression du HaloTag®-tPA-SEP dans un astrocyte positif au marquage de la protéine fibrillaire gliale (GFAP). **C.** Image de microscopie confocale en temps réel montrant un astrocyte exprimant le HaloTag®-tPA-SEP. La région d'intérêt en jaune montre le prolongement sur lequel a été réalisé l'acquisition à l'origine des kymographes à droite. Les kymographes montrent que le tPA est capable d'être transporté dans des vésicules et libéré (exocytose montrées par l'apparition de fluorescence verte) par les astrocytes.

5 – Etude du trafic du tPA dans le contexte pathologique de la tauopathie.

Dans ces travaux de thèse nous montrons des résultats obtenus dans des neurones issus d'un modèle de souris développant une tauopathie. En effet, ces souris expriment une protéine Tau hyperphoshorylée l'empêchant d'interagir avec les microtubules. Cette protéine Tau est une protéine nécessaire à la stabilisation axonale des microtubules, indispensables pour le transport des organites tels que les vésicules de sécrétion notamment. Ce modèle est connu pour reproduire un certain nombre de symptômes retrouvés dans la maladie d'Alzheimer comme les dépôts neurofibrillaires, la gliose, des changements dans la LTP et LTD,

la mort neuronale ou encore les troubles cognitifs (Schindowski *et al.* 2006; Belarbi *et al.* 2011; Lo *et al.* 2013).

Nous avons observé que les neurones THY-Tau22 en culture présentent un trouble du transport axonal des vésicules contenant le tPA. Nous avons remarqué que ce contexte pathologique amenait une chute importante à la fois de la vitesse des vésicules et de la distance qu'elles parcourent, que ce soit dans le sens antérograde et rétrograde **(Article 2 ; Figure 7)**. De plus, les trajectoires de ces vésicules montrent une augmentation importante du temps qu'elles passent à l'arrêt **(Article 2 ; figure supplémentaire 5)**. Nous avons vu également que les axones présentent un nombre plus grand de vésicules arrimées à la membrane contenant le tPA **(Article 2 ; figure 7).** De plus, il s'avère que ces résultats concernant le transport du tPA sont corrélés avec une augmentation importante de l'exocytose de ces vésicules à la surface des axones **(Article 2 ; figure 8)**. De manière intéressante, nous n'avons vu aucune altération ni du transport ni de la libération du tPA dans les dendrites des neurones THY-Tau22. La plupart des modèles de tauopathie et de maladie d'Alzheimer reproduisent les enchevêtrements neurofibrillaires dans les axones et dans les dendrites, c'est le cas de notre modèle. Cependant, dans ce modèle-ci on note l'apparition de ces enchevêtrements neurofibrillaires chez les souris qu'aux alentours de six mois après la naissance (Schindowski *et al.* 2006). Il est important de rappeler que nos neurones en cultures n'ont que 13 à 14 jours de vie *in vitro*, une période vraisemblablement trop courte pour observer la formation de ces enchevêtrements, mais suffisante pour observer de forts déficits du trafic axonal. Enfin, nous retrouvons des résultats similaires à ceux d'études récentes sur d'autres modèles mimant la maladie d'Alzheimer, à savoir une réduction des vitesses vésiculaires et une augmentation du temps passé par ces vésicules à l'arrêt sur l'ensemble de leur trajectoire (Combs *et al.* 2021).

Autres travaux

TWO CHAINS TISSUE PLASMINOGEN ACTIVATOR UNIFIES MET AND NMDA RECEPTOR SIGNALLING TO CONTROL NEURONAL SURVIVAL

Running title: MET and NMDA neuronal crosstalk

Élodie Hédou[1], Sara Douceau[1], Arnaud Chevilley[1], Alexandre Varangot[1], Audrey M Thiebaut[1], Hortense Triniac[1], Isabelle Bardou[1], Carine Ali[1], Mike Maillasson[2], Tiziana Crepaldi[3], Paolo Comoglio[3], Eloïse Lemarchand[4], Véronique Agin[1], Benoit D Roussel[1†], Denis Vivien[1,5 †*]

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

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

[3] Candiolo Cancer Institute IRCCS-FPO, Candiolo, Turin, Italy.

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

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

[†]: These authors contributed equally to this work.

Corresponding authors:

- Prof. Denis Vivien, PhD; UMR-S Normandie Univ, UNICAEN, INSERM U1237, Etablissement Français du Sang (EFS), Physiopathology and Imaging of Neurological Disorders (PhIND), GIP CYCERON, Institut Blood and Brain @ Caen-Normandie (BB@C), Bvd Becquerel, BP 5229, 14074 Caen Cedex, France; Tel: + 33 2 31470166; Fax: + 33 2 31470222; E-mail: vivien@cyceron.fr
- Dr Benoit Roussel, PhD; UMR-S Normandie Univ, UNICAEN, INSERM U1237, Etablissement Français du Sang (EFS), Physiopathology and Imaging of Neurological Disorders (PhIND), GIP CYCERON, Institut Blood and Brain @ Caen-Normandie (BB@C), Bvd Becquerel, BP 5229, 14074 Caen Cedex, France; Tel: + 33 2 31470213; Fax: + 33 2 31470222; E-mail: broussel@cyceron.fr

Conflict of interest: The authors declare no competing interests.

Key words: Neuronal death, tissue-type Plasminogen Activator, NMDA receptor, MET receptor

Abbreviations: DIV: days *in vitro*; GluN1: NMDA receptor subunit 1; HGF: hepatocyte growth factor; NMDARs: N-methyl-D-Aspartate receptors; HGFR/MET: tyrosine-protein kinase Met or hepatocyte growth factor receptor (HGFR). PLA: proximity ligation assay; sc-tPA: single-chain tissue-type Plasminogen Activator; tc-tPA: two-chains tissue-type Plasminogen Activator.

ABSTRACT

Tissue-type plasminogen activator (tPA) plays roles in the development and the plasticity of the nervous system. Here, we demonstrate in neurons, that by opposition to the single chain form (sc-tPA), the two-chains form of tPA (tc-tPA) activates MET receptor, leading to the recruitment of *N*-Methyl-D-Aspartate receptors (NMDARs) and to the endocytosis and proteasome-dependent degradation of NMDARs containing the GluN2B subunit. Accordingly, tc-tPA down-regulated GluN2B-NMDAR-driven signalling, a process prevented by blockers of HGFR/MET and mimicked by its agonists, leading to a modulation of neuronal death. Thus, our present study unmasks a new mechanism of action of tPA, with its two-chains form mediating a crosstalk between MET and the GluN2B subunit of NMDARs to control neuronal survival.

INTRODUCTION

Tissue-type plasminogen activator (tPA) is a widely expressed protease of the central nervous system[1, 2]. Its initially described activity was its ability to activate plasminogen into plasmin[3]. tPA is synthesized and released as a single-chain form (sc-tPA) that is processed into a two-chains form (tc-tPA) within the circulation and/or in the extracellular space[4], both forms displaying proteolytic activity[5]. Extending its functions above the conversion of plasminogen into plasmin, tPA interferes with a variety of neuronal receptors, including *N*-Methyl-D-Aspartate receptors (NMDARs)[6]. Interestingly, sc-tPA, was reported to promote NMDARs calcium and ERK signalling, while at the opposite, tc-tPA was reported to decrease NMDARs signalling and death[7].

Hepatocyte growth factor (HGF) and its tyrosine kinase receptor MET, are also present in the central nervous system[8, 9]. Pro-HGF is converted into its active form by an extracellular serine protease-dependent proteolytic processing[10]. It has also been reported *in vitro* that both urokinase PA (uPA) and tPA, as well as factor XII, are able to activate pro-HGF[11, 12, 13]. In cultured neuronal cells, HGF enhances neurite extension and branching, maturation of the dendritic spine and membrane translocation of NMDARs[14, 15]. HGF induces phosphorylation of the GluN2B subunit of NMDARs[15] and protects neurons from aging-related cell death in culture[16] and ischemia[17, 18]. Interestingly, HGF enhances NMDA currents and synaptic plasticity in the hippocampus, by activating long-term potentiation (LTP) of the CA1 region *in vitro*[19]. Accordingly, the HGF-MET axis contributes to the activity-dependent regulation of physiological learning and memory performances in the adult brain[20], at least partially by interacting with the NMDARs[15].

Since the pioneer work of Tsirka and colleagues in 1995[21], a large number of studies have reported a pro-neurotoxic effect of tPA on NMDAR-mediated excitotoxicity[6, 22]. However, it is now well established that tPA can promote both neuronal survival and death[23]. For

example, although tPA increases NMDARs signaling and subsequent excitotoxicity[6], it protects the postsynaptic density from the deleterious effects of ischemic injury[24]. These results are consistent with more recent findings showing that tPA is also able to decrease both deleterious endoplasmic reticulum stress[25] and autophagy- (Thiebaut AM et al, Autophagy In Press) mediated neuronal death. However, several questions related to the influence of tPA on neuronal survival and death still remain to be elucidated.

In the present study, we found that among the two forms of tPA (sc- and tc-tPA), only the tc-tPA activates neuronal MET independently from the conversion of pro-HGF into active HGF, leading to a proteasome dependent down-regulation of the GluN2B subunit-containing NMDARs, reduced subsequent NMDARs signalling and control of neuronal survival. At the opposite, sc-tPA promotes NMDAR signalling, independently from MET, leading to an increased excitotoxic neuronal death. Altogether, these data propose that both forms of tPA contribute differentially to neuronal survival and death with the tc-tPA promoting a crosstalk between NMDARs and MET.

RESULTS

tPA isoforms (sc- and tc-tPA) differentially regulate neuronal activation of MET. Because the two forms of tPA, sc- and tc-tPA, display differential neuronal functions[7, 26], we compared their effects on MET signalling. Although tc-tPA induced the phosphorylation of MET (+156% of phosphoMET/β-actin, $p = 0.0476$; +171% of phospho/total, $p = 0.0022$; $n = 6$ from 6 independent treated cultures), sc-tPA slightly decreased it (-22% of phosphoMET/actin, $p = 0.0476$; -22% of phospho/total, $p = 0.0476$; $n = 6$ from 6 independent treated cultures) (Fig. 1a-c). Control experiments confirmed MET activation upon HGF exposure (+217% of phosphoMET/β-actin, $p = 0.0022$; +284% of phospho/total, $p = 0.0022$; $n = 6$ from 6 independent treated cultures) (Fig. 1a-c). As expected, the specific inhibitor of MET, JNJ-38877605, reversed HGF-induced MET phosphorylation (-68.15% compared to HGF of phosphoMET/β-actin, $p = 0.0495$, -69.02% compared to HGF of phospho/total, $P = 0.0495$; $n = 3$ from 3 independent experiments (Fig. 1d-f). Of note, the expression of total MET did not vary with sc-, tc-tPA, or HGF treatments (98%, 88%, 90%, 104% of control for sc-tPA, tc-tPA, HGF, and HGF + JNJ respectively, ns = non-significant; $n = 6$ and $n = 3$ for HGF + JNJ) (Fig. 1b,e). The activation of MET by tc-tPA was independent of the conversion of pro-HGF into active HGF, as *in vitro*, we could not observe the cleavage of pro-HGF by both forms of tPA (data not shown).

MET and NMDA receptors form complexes at the neuronal surface. tPA has already been intensively described as interfering with NMDARs signalling[6]. Interestingly, the two forms of tPA have opposite effects on NMDARs signalling: while sc-tPA promotes it by increasing calcium influx, tc-tPA decreases it[26] (Fig. 5). We investigated whether MET and NMDARs could form complexes thanks to co-immunoprecipitation assays. The GluN1 subunit co-immunoprecipitated with MET receptor (Fig. 2a, representative blots of 3

independent experiments), confirming the presence of MET/NMDARs complexes under basal conditions. We also performed proximity ligation assay (PLA) to determine whether MET/NMDARs complexes were present at the neuronal surface. PLA performed in cultured neurons showed MET/NMDARs complexes (GluN1/MET) (Fig. 2b, representative pictures of 4 independent neuronal cultures). There was virtually no PLA signal in the absence of either primary antibody or the PLA probe. Next, we investigated whether treatment with sc- or tc-tPA influenced the formation of MET/NMDARs complexes. PLA showed that tc-tPA increased the number of MET/NMDARs complexes at the cell surface (+41%, p = 0.0211 when compared to tPA buffer condition) whereas sc-tPA decreased the number of MET/NMDARs complexes (-33.2%, p <0.05 when compared to tPA buffer condition; n = 28 for tPA buffer, n = 19 for sc- and tc-tPA (300 nM) from 4 independent neuronal cultures; Fig. 2b,c). Control experiments with HGF, also increased the formation of MET/NMDARs complexes (+128%, p = 0.0096 when compared to HGF buffer, n = 18 for both HGF buffer and HGF from 4 independent neuronal cultures; Fig. 4b,c). As positive control, we also performed PLA experiments to determine MET/EGFR complexes. The number of MET/EGFR complexes was not modified when sc- or tc-tPA were added in the culture medium (p<0.05; compared to tPA buffer condition; n = 38 for tPA buffer, n = 29 for sc-tPA and tc-tPA (300 nM) from 4 independent neuronal cultures; Fig. 2d). Moreover, MET/EGFR complexes were significantly increased in the presence of HGF (+155.62%; p<0.0001 when compared to HGF buffer; n = 18 for both HGF buffer and HGF from 4 independent neuronal cultures; Fig. 2d).

tc-tPA dependent MET signalling promotes the endocytosis and degradation of neuronal GluN2B-containing NMDA receptors. We then wondered if the effect of tc-tPA on MET/NMDAR complexes could affect NMDAR signalisation. Sc-tPA had no effect on

GluN2B phosphorylation (Fig. 3a and corresponding densitometry Fig. 3b) (-1.2%, -21.4%, -15.2% of phospho-GluN2B compared to control at 10, 30, and 60 minutes respectively, p : ns; n = 5 from 5 independent neuronal cultures), neither on total GluN2B (Fig. 3a and corresponding densitometry Fig. 3c) (-4%, -21.37%, -10.35% of total GluN2B compared to control at 10, 30, and 60 minutes respectively, p : ns; n = 5 from 5 independent neuronal cultures). By contrast, tc-tPA induced an early (from 10 minutes to 60 minutes) down-regulation of phospho-GluN2B (Fig. 3d and corresponding densitometry Fig. 3e) (-44.26%, -53.18%, -46.61% of control at 10, 30, and 60 minutes respectively, p = 0.0139; n = 4 from 4 independent neuronal cultures) and total GluN2B subunits of NMDARs (Fig. 3d and corresponding densitometry Fig. 3f) (-53.69%, -27.84%, -49.54% of control of total GluN2B at 10, 30, and 60 minutes respectively, p = 0.0139; n = 4 from 4 independent neuronal cultures). Levels of both phosphorylated and total GluN2A subunits of NMDARs were not affected by tPA treatments (Fig. 3a-f). A moderate but significant reduction of the common GluN1 subunit of NMDARs was also observed 10 minutes after tc-tPA exposure but was not significant at 30 and 60 minutes (Fig. 3d,f) (-9.46%, -2.78%, -21% of GluN1 at 10, 30, and 60 minutes respectively, p = 0.0139; n = 4 from 4 independent neuronal cultures). As expected, sc-tPA did not influence GluN1 expression (Fig. 3a,c) (-0.9%, -0.8%, -22.2% of GluN1 at 10, 30, and 60 minutes respectively, p : ns; n = 5 from 5 independent neuronal cultures). Importantly, the tc-tPA-induced down-regulation of GluN2B subunit-containing NMDARs was reversed by the presence of the specific inhibitor of MET phosphorylation, JNJ-38877605 (Fig. 3g, h) (+35.2% of phospho-GluN2B compared to tc-tPA, p = 0.0433; +4.6% of total GluN2B compared to tc-tPA, ns; n = 4 from 4 independent experiments for phospho-GluN2B and total GluN2B). Altogether, these data suggest a tc-tPA dependent endocytosis and degradation of GluN2B-containing NMDARs, mediated by MET signalling. In order to validate this hypothesis, similar experiments were performed in the presence of Lactacystin

(5µM), an inhibitor of the proteasome (Fig. 4a). Our data revealed that the tc-tPA-dependent down-regulation of GluN2B-containing NMDARs (-30.95% of total GluN2B compared to control, p = 0.0286) (Fig. 4a) was reversed by a pre-treatment with Lactacystin (2 hours before tc-tPA, Lactacystin and tc-tPA: +24.49% of total GluN2B compared to tc-tPA alone, p = 0.0286; n = 4 from 4 independent experiments) (Fig.4a). We confirmed this by immunocytochemistry of total GluN2B in permeabilized conditions with either sc- (Fig. 4c-f) or tc-tPA (Fig. 4c,d,g,h) treatment. In dendrites, tc-tPA decreased total GluN2B at 10 minutes (-68.3% compared to control, p <0.0001) and 30 minutes (-52.92 % compared to control, p = 0.0001), whereas sc-tPA had no effect (n = 23 dendrites for control, n = 41 dendrites for sc-tPA and n = 50 dendrites for tc-tPA, from around 66 neurons from 13 independent neuronal cultures). In axons, tc-tPA decreased total GluN2B at 10 minutes (-80.3% compared to control, p < 0.0001) and 30 minutes (-55.72% compared to control, p = 0.0003), while sc-tPA had only a slight effect at 10 minutes only (-48.628% compared to control for 10 minutes, p < 0.0094 and NS at 30 minutes) (n = 11 axons for control, n = 31 axons for sc-tPA and n = 28 axons for tc-tPA from around 70 neurons from 7 independent neuronal cultures). This is possibly due to conversion of sc-tPA into tc-tPA in the corresponding bathing media.

tc-tPA-dependent MET signalling controls NMDA receptors-mediated calcium influx. As previously reported[7], addition of tc-tPA to the neuronal culture media decreased the NMDA-induced calcium influx (-10.66%, p < 0.001; n = 98 from 3 independent neuronal cultures), while sc-tPA treatment was stimulatory (+27.29%, p < 0.001; n = 77 from 3 independent neuronal cultures) (Fig. 5a; corresponding mean Fig. 5b). Interestingly, the specific MET inhibitor, JNJ-38877605, reversed the inhibitory effect of tc-tPA (-10.66%, for tc-tPA alone versus +26.6% for tc-tPA + JNJ-38877605, p < 0.001; n = 98 from 3 independent neuronal cultures) (Fig. 5a and corresponding mean Fig. 5b). Similar results were

obtained with another MET inhibitor, SU11274, which competes with the ATP binding site within the MET activation loop[27] (-11.24% for tc-tPA alone versus +8.30% for tc-tPA + SU11274, $p < 0.0001$) (Fig. 5c and corresponding mean Fig. 5d). Accordingly, addition of HGF (Fig. 6a and corresponding mean Fig. 6b) or DO-24 (a monoclonal antibody agonist of MET) (Fig. 6c and corresponding mean Fig. 6d) did not affect the action of tc-tPA, but reduced the stimulatory effect of sc-tPA on NMDARs signalling (+27.44% for sc-tPA alone versus +14.69% for sc-tPA + HGF, $p < 0.001$; $n = 93$ for sc-tPA and $n = 89$ for sc-tPA and HGF from 3 independent neuronal cultures; Fig. 6a, b; and +31.57% for sc-tPA alone versus +3.30% for sc-tPA + DO24, $p < 0.001$; $n = 86$ for sc-tPA and $n = 94$ for sc-tPA and DO-24 from 3 independent neuronal cultures; Fig. 6c and d). Altogether, these data demonstrate dual effects of tPA isoforms, with sc-tPA promoting NMDARs signalling while tc-tPA reduced it. Similarly, HGF prevented the potentiation of NMDA-mediated calcium influx by sc-tPA and the MET agonist DO-24 antibody completely blocked the stimulatory effect of sc-tPA (Fig. 6c and d). The blockage of MET activation by JNJ-38877605 (Fig. 5a and b) or SU11274 (Fig. 5c and d) did not affect the potentiating effect of sc-tPA. We also combined sc-tPA with increasing concentrations of tc-tPA and evaluated the corresponding NMDA-induced neuronal calcium influx (Supplementary Fig. 1a and b). In agreement with our above data, tc-tPA counteracted the effect of sc-tPA on NMDAR signalling (-22.26% at 100nM of tc-tPA, -32.74% at 200nM of tc-tPA and -33.20% at 300nM of tc-tPA, $p < 0.0001$).

tc-tPA protects from NMDA-mediated excitotoxicity through MET activation. We then investigated whether the tc-tPA dependent MET signalling also influenced the NMDAR-mediated neuronal death. As previously reported[26], sc-tPA promoted NMDA-induced excitotoxicity (+20.86%, $p = 0.025$) and tc-tPA did not (-1.69%, ns) (Fig. 7). In agreement with the above data, inhibition of MET by the JNJ-38877605 (Fig. 7b) and the SU11274 (Fig.

7d), converted the neuroprotective effect of tc-tPA to a pro-excitotoxic effect (+14.46% for tc-tPA + JNJ-38877605, P =0.0253 (n = 7 from 7 independent experiments); +18.81% for tc-tPA + SU11274, p = 0.0472; n = 5 from 5 independent experiments). Thus, sc-tPA potentiated NMDA-induced excitotoxicity was prevented by co-application of either rHGF (Fig. 7a) (+20.86% for sc-tPA alone versus -3.73% for sc-tPA + rHGF, p = 0.0374; n = 6 from 6 independent experiments) or by the agonist MET antibody DO-24 (Fig. 7c) (+25.31% for sc-tPA alone versus -0.73% for sc-tPA + DO-24, p = 0.0472; n = 5 from 5 independent experiments).

DISCUSSION

We provide here a novel mechanism of the actions of tPA in the central nervous system, with the first demonstration that the serine protease tPA, especially its two chain form (tc-tPA) contributes to a neuronal crosstalk between MET and GluN2B subunit-containing NMDARs. We then demonstrate that this mechanism relies on the formation of proximal complexes between MET and NMDARs at the neuronal surface that leads to a proteasomal degradation, subsequent down-regulation of the total number of surface GluN2B-containing NMDARs and finally to a reduced NMDARs signalling and neuroprotection *in vitro*.

Several studies demonstrated the physical interaction between NMDAR subunits and other receptors, including Dopamine D1 receptor (D1R)[28], VEGF receptor (VEGFR2)[29], and Ephrin-B2[30]. Ligand-dependent activation of VEGFR2 induces a rapid redistribution of GluN2B at synaptic sites influencing the consolidation of emotional memory[29]. Here, we provide evidence that tc-tPA leads to a connection between NMDARs and MET at the neuronal surface, and that the dynamic of these interactions plays a critical role in the control of NMDARs signalling and neuronal fate. These data are in agreement with recent reports supporting that genes encoding for NMDARs subunits are part of the interactome of MET, with roles in the modulation of synapses formation[31] and of neurodevelopmental disorders such as ASD[32].

Like all members of the plasminogen activator family, the secreted sc-tPA is processed into tc-tPA by plasmin or kallikrein[33]. However, sc-tPA is an unusual zymogen that does not require proteolytic processing to be activated, but relies on the presence of an allosteric regulator, such as fibrin[5]. It has been reported that sc-tPA, but not tc-tPA, promotes NMDARs signalling and neurotoxicity in cortical neurons[7, 26]. Here, we provide a mechanistic explanation of this differential function of the two forms of tPA. We demonstrate that, although tc-tPA prompts the formation of proximal complexes between MET and NMDARs,

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

tPA is known to mediate signalling through a set of receptors and/or binding proteins including the Low Density Lipoprotein Related Receptors (LRPs), annexin-II, Epidermal Growth Factor Receptor (EGFR) and NMDARs, among others[34]. Although there is a consensus about the capacity of tPA to modulate NMDAR signalling and functions, some opposite results are reported in the literature[6, 35]. When interacting with the GluN2A subunit, tPA activates either the Akt/mTOR/p70S6K/HIF1α signalling pathway, leading to neuroprotection and to an increase of glucose uptake[36] or the Erk1/2/CREB/ATF3 signalling pathway to decrease excitotoxicity[37]. tPA was also reported to interact[38] and possibly cleave the GluN2B subunit of NMDAR to change its pharmacological properties. GluN2B-dependent effects were associated with roles of tPA in acute stress[39] and on seizures induced by alcohol withdrawal[38]. The sc-tPA was reported to interact with the GluN1 subunit of NMDARs either directly[6] or through LRP1[40] to promote NMDARs signalling and excitotoxicity. Our study may reconcile all these data. Indeed, we evidence here that sc-tPA and tc-tPA differentially influence NMDARs signalling, with sc-tPA leading, as previously reported[26], to an activation of NMDARs, due to its ability to bind the common GluN1 subunit[6], and tc-tPA leading to a specific down-regulation of GluN2B-containing NMDARs, a mechanism dependent on MET activation.

NMDARs are mainly found on the postsynaptic membrane at excitatory synapses but are also present at extrasynaptic positions[41]. It is believed that their localization at the synapse might

explain their roles in the neuronal fate. Indeed, extrasynaptic NMDARs have been reported to be neurotoxic[42], and more importantly, the subunit composition of the receptors, and essentially the GluN2 subunit, is a key determinant of their effect on the neuronal fate, with GluN2B associated to cell death[43]. This is in line with previous data showing that tPA increases the diffusion of extrasynaptic NMDARs[24] and the current work showing that tc-tPA increases the degradation of GluN2B-containing NMDAR through MET to decrease NMDA-mediated excitotoxicity.

Altogether, our data reveal a new mechanism of action of tPA in the central nervous system, with a differential role of its sc and tc forms, with the tc-tPA capable to activate MET, thus promoting the formation of complexes with GluN2B-containing NMDARs, their endocytosis and proteasomal down-regulation, subsequent reduced signaling and finally neurotoxicity.

MATERIAL AND METHODS

Chemicals

N-methyl-D-aspartate (NMDA) was purchased from Tocris (Pittsburgh, USA). Human tPA (Actilyse®) was from Boehringer Ingelheim (Paris, France). Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM), poly-D-lysine, glutamine, cytosine β-D-arabinoside (Ara-C), glycine, foetal bovine serum, horse serum, Triton X-100, anti-rabbit (A0545) peroxidase antibody, protease inhibitor cocktail (P8340), phosphatase inhibitor cocktail (P5726) and Lactate dehydrogenase (LDH) detection kit and Lactacystin (CAS1258004) were from Sigma-Aldrich (Saint-Quentin Fallavier, France). Pierce BCA Protein Assay Kit (23225) ECL-Plus detection system (32132) and lipofectamine® 2000 reagent was purchased from Thermo Fisher Scientific (Illkrich-Graffenstaden, France).

Preparation of sc-tPA and tc-tPA

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

Neuronal cell cultures

Culture of cortical neurons were prepared from foetal mice (embryonic day 14) as previously described [44]. Cortices were dissected and mechanically dissociated in DMEM, seeded on 24 well plates or on dishes previously coated with poly-D-lysine (0.1mg/mL; Sigma-Aldrich P6407) and laminin (0.02mg/mL; Life Technologies 23017-015). Cells were cultured in DMEM (Sigma-Aldrich D5671) supplemented with 5% foetal bovine serum (Sigma-Aldrich F9665), 5% horse serum (Sigma-Aldrich H1138) and 2 mM glutamine (Sigma-Aldrich G3156). Cultures were maintained at 37 °C in a humidified 5% CO_2 atmosphere. Cytosine β-D-arabinoside (10 µmol/l; Sigma-Aldrich C1768) was added after 3 day *in vitro* (DIV) to inhibit glial proliferation.

Hypodense neuronal cultures

Primary cultures of cortical neurons were prepared from fetal mice (embryonic day 14) as described above. Cortices were dissected and dissociated in DMEM and plated (250 000 cell/mL) on glass bottom microwell dishes (MatTek Corporation, P35G-1.5-14-C, Ashland, MA, USA) earlier coated with poly-D-lysine (0.1mg/ml) and laminin (0.02mg/ml). Cells were cultured in Neurobasal Medium supplemented with 0.4 mM of glutamine, 2% B27 supplement 50X, 10% horse serum and penicillin/streptomycin (10 000 IU/ml; 10 000 UG/ml). After 1 hour, media were replaced by conditioned medium (Neurobasal Medium supplemented with 0.4 glutamine, 2% B27 supplement 50X and penicillin/streptomycin (10 000 IU/ml; 10 000 UG/ml) obtained from primary cultures of astrocytes. Cultures were maintained at 37 °C in a humidified 5% CO_2 atmosphere. Cytosine β-D-arabinoside (10 µmol/l; Sigma-Aldrich C1768) was added after 3 DIV. Cultures have been used for neuronal transfection and immunocytochemistry.

Proximity ligation assay

The proximity ligation assay was performed using the Duolink In Situ Kit (Olink Bioscience, Uppsala, Sweden) according to the manufacturer's instructions with the following modifications: cell dishes were treated with buffer, rHGF, sc-tPA and tc-tPA for 1 hour, then fixed with paraformaldehyde 4% supplemented with 4% sucrose. PLA probe incubation was 2 hours and amplification step was extended to 2 hours. Blocking (1 hour at room temperature) and primary antibody (overnight at 4 °C) incubations were performed in a 4% bovine serum albumin and 0.2% Triton X-100 solution. Goat anti-GluN1 (1:250; Santa-Cruz Biotechnology sc-1467, Dallas, TX, USA), rabbit anti-MET (1:250; Santa-Cruz Biotechnology sc-161), and rat anti-EGFR (1:250, abcam ab231) were diluted in the blocking solution. The anti-rabbit (+) PLA probe (1:5) along with an anti-rat (−) probe (1:100) were diluted in the blocking solution. A Goat anti-rat (Jackson Immuno Research Inc., Suffok, UK) was used to make a probe anti-rat according to the manufacturer's instructions using the Duolink Probemaker (Olink Bioscience,Uppsala, Sweden). The negative control represents the PLA without primary antibodies. Ten stacks of picture (0.40 µm per section) were taken from 10 different areas of every well with a confocal inverted microscope (Leica SP5, Leica, Nanterre, France). Imaris–modeling: A "cell function" analysis was performed in order to label neuronal cell bodies, then the "spot" function was used to detect positive PLA puncta prior counting. This procedure was performed blinded by using a Z stack-projection from 10 independent areas per condition and per experiment of a total of 4 independent experiments. Concerning the quantification, for each area, the quantity of puncta has been subtracted to the mean quantity of buffer and then, data were normalised to the tPA buffer condition.

Immunoblotting.

Immunoblottings were performed from treated-cortical neurons (DIV12/13). Cells were dissociated in ice-cold TNT buffer (50 mMTris-HCl, pH 7.4, 150 mMNaCl, and 0.5% Triton

X-100) supplemented with a cocktail of protease and phosphatase inhibitors. Protein quantification was performed according to the BCA method. Proteins (20 µg) were resolved on polyacrylamide gel under denaturing conditions and transferred onto a polyvinylidene difluoride membrane. Membranes were blocked with Tris-buffered saline (10 mM Tris and 200 mM NaCl, pH 7.4) containing 0.1% Tween 20 and 1% BSA for 1h at room temperature. Blots were incubated overnight with primary antibodies at 4°C. The primary antibodies used were anti-phospho-MET (Y1234/1235) (Santa Cruz Biotechnology, sc-101736, diluted 1:1000), anti-Met (R&D systems, AF527, diluted 1:1000), anti-HGF (Invitrogen, SBF5, diluted 1:1000), anti-GluN2B (abcam, ab65783, diluted 1:1000), anti-phospho-GluN2B (Y1474) (abcam, ab194923, diluted 1:1000), anti-GluN2A (Y1325) (abcam, ab16646, diluted 1:1000), anti-GluN2A (abcam, ab14596, diluted 1:1000), anti-GluN1 (Santa-Cruz Biotechnology, sc1467, diluted 1:1000), anti-actin (Sigma-Aldrich, A2066, diluted 1:1000). This step was followed by incubation with the appropriate peroxydase-conjugated secondary antibody which were goat anti-rabbit (Sigma, A05445, diluted 1:50 000), rabbit anti-goat (Sigma, A8919, diluted 1:160 000). Immunoblots were revealed with an enhanced chemoluminescence ECL-Plus immunoblotting detection system and imaged in an Image Quant LAS 4000 Device (GE Heathcare, Orsay, France).

Excitotoxic neuronal death.

Neurons (12-13 DIV) were rinsed three times with serum-free medium (DMEM) supplemented with glycine (20 µM), excitotoxicity was induced by exposure to NMDA (10 µM) in serum-free DMEM supplemented with 20 µM of glycine for twenty-four hours[44]. NMDA was applied alone or in the presence of either sc-tPA (300nM), tc-tPA (300nM), recombinant HGF (50ng/mL; rHGF), DO-24 antibody (50ng/mL; agonist of MET), JNJ-38877605 (500nM; antagonists of MET) or SU11274 (2µM; inhibitor of MET activation)

alone or in combination, as mentioned in the legend of the corresponding figures. Twenty-four hours later, neuronal death was quantified by measurement of lactate dehydrogenase (LDH) released from damaged cells.

Crossed immunoprecipitation assays

Supernatants from TNT buffer (50 mM Tris-HCl, pH 7.4, 150 mM NaCl and 0.5% Triton X-100)-lysed cultured cortical neurons (13 DIV) (100 µg of total proteins) were incubated overnight at 4 °C with an antibody (raised against the GluN1 subunit of NMDAR (1µg, Santa-cruz Biotechnology, Dallas, USA, sc-1467). This antibody was coupled to protein G-sepharose beads as described by the manufacturer (GE Healthcare, Buc, France) for immunoprecipation procedures, including repeated washes in TNT buffer. Then, immunoprecipitated proteins were separated by 10% SDS-PAGE and immunoblots were revealed with either an antibody raised against total GluN1 (Santa-Cruz Biotechnology, sc-1467, diluted 1:1000) or an antibody raised against total MET (R&D systems, Noyal Châtillon sur Seiche, France, AF527, diluted 1: 1000) by following the procedure described above (see « Immunoblotting » section).

Calcium video microscopy

Experiments were performed at room temperature on the stage of an inverted calcium microscope (Leica DMI6000B, Nanterre, France) equipped with a 150 W Xenon high stability lamp and a Leica 40×, 1.3 numerical aperture epifluorescence oil immersion objective. Fura-2 ratio images were acquired with a Digital CMOS camera (ORCA-Flash2.8 C11440-10C, Hamamatsu, Japan) and digitized (2048*2048) using Metafluor® 6.1 software (Universal Imaging Corporation). Cultures were transferred into a serum-free HEPES-buffered saline solution (HBBSS: NaCl 116mM, KCl 5.4mM, $CaCl_2$ 1.8mM, $MgSO_4$ 0.8mM,

HEPES 12mM, NaH_2PO_4 0.34mM, D-Glucose 5.5mM, $NaHCO_3$ 25mM, Glycine 10µM) at DIV 12 and loaded with Fura-2-AM (10µM; Invitrogen, Life Technologies F1201, Saint Aubin, France) diluted in pluronic acid (Life Technologies P-3000MP) for 45 min at 37°C. The Ca^{2+} bound form of Fura-2 gets excited at 340nm, the Ca^{2+} unbound form at 380nm and both recorded at 510nm. Neurons were washed with HBBSS flux and NMDA stimulations (2 X 25µM for 30s) were applied using a peristaltic pump. Prior to a second run of NMDA stimulations, neurons were incubated for 45 min with either sc-tPA (300nM), tc-tPA (300nM), recombinant HGF (50ng/mL; rHGF; Gibco, Life Technologies PHG0254, Saint Aubin, France), anti-HGF blocking (50ng/mL; Santa-Cruz Biotechnology sc-1356), DO-24 antibody (50ng/mL; agonist of MET), JNJ-38877605 (500nM; antagonist of MET) or SU11274 (2µM; inhibitor of MET activation; Selleckchem S1080, Houston, TX, USA) or Glunomab® (antagonist of the action of tPA on the GluN1 subunit of NMDAR) alone or in combination. For each cell, the area under curve (AUC) corresponding to the intracellular calcium influx induced by NMDA (ratio 340/380) was calculated before (AUCb) (mean of the two first NMDA stimulations) and after treatment (AUCa) (mean of the two second post-treatment stimulations). We then compared, for each cell, the amount of NMDA-induced calcium influx after treatment with the NMDA-induced calcium influx recorded before treatment. Thus, each cell is its own control with an expression of the modification of the NMDA-induced calcium influx due to the treatment or their excipient performed between the two rounds of stimulations, expressed as a percentage of response to treatments (% of responsiveness). % of responsiveness= [(AUC)a/(AUC)b]*100 with (AUC)a : sum of area under curve of Fura-2 ratio during both NMDA stimulations after treatment and (AUC)b : sum of area under curve of Fura-2 ratio during NMDA stimulations before treatment.

Neuronal transfection

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

Immunocytochemistry

Hypodense neuron cultures (13 DIV) were used to visualize neural extensions. Cultures treated with tc-tPA (300nM) for 10 or 30 min and washed with HBBSS. Neurons were fixed in paraformaldehyde 4% for 20min at room temperature, washed in PBS (0.1M) followed by a 1 hour blockage in PBS supplemented either with BSA 4% and 0.3% Triton X100 for the permeability conditions or either with BSA 4% for the surface experiments. A rabbit anti-GluN2B N-term antibody (Alomone Labs, AGC-003, diluted 1:500) with a chicken anti-MAP2 antibody (abcam, ab5392, diluted 1:8000) were incubated overnight at 4°C. Neurons were subsequently rinsed 3 times with PBS (0.1M) and were incubated 1 hour and a half at room temperature with a Cy3-conjugated anti-rabbit and an Alexa-647-conjugated anti-chicken secondary antibodies (Jackson Immunoresearch, West Grove, PA, USA, 1:800). Immunocytochemistry were examined with a Leica TCS SP8 confocal /STED microscope 3x microscope with an oil-immersion 40x, 1.44-N.A objective and further processed using ImageJ software (NIH; Bethesda, MD, USA). The number of punctua per 100µm on processes was calculated with the plugin"Trackmate".

Statistics

Data have been analysed with Prism (Graphpad) software. Shapiro-Wilk tests were used to ensure a normal distribution. Comparisons of two data sets were performed using unpaired two-tailed Student's t-test for normally distributed data sets and Mann–Whitney test for non-

normally distributed data sets. Comparisons for multiple data sets were performed using one-way analysis of variance with Tukey's post-hoc test for normally distributed data sets and Kruskal–Wallis test with Dunn's multiple comparison test for non-normally distributed data sets.

REFERENCES

1. Teesalu T, Kulla A, Simisker A, Siren V, Lawrence DA, Asser T, *et al.* Tissue plasminogen activator and neuroserpin are widely expressed in the human central nervous system. *Thrombosis and haemostasis* 2004, **92**(2)**:** 358-368.

2. Louessard M, Lacroix A, Martineau M, Mondielli G, Montagne A, Lesept F, *et al.* Tissue Plasminogen Activator Expression Is Restricted to Subsets of Excitatory Pyramidal Glutamatergic Neurons. *Molecular neurobiology* 2016, **53**(7)**:** 5000-5012.

3. Collen D, Lijnen HR. Tissue-type plasminogen activator: a historical perspective and personal account. *Journal of thrombosis and haemostasis : JTH* 2004, **2**(4)**:** 541-546.

4. Rijken DC, Collen D. Purification and characterization of the plasminogen activator secreted by human melanoma cells in culture. *J Biol Chem* 1981, **256**(13)**:** 7035-7041.

5. Thelwell C, Longstaff C. The regulation by fibrinogen and fibrin of tissue plasminogen activator kinetics and inhibition by plasminogen activator inhibitor 1. *Journal of thrombosis and haemostasis : JTH* 2007, **5**(4)**:** 804-811.

6. Nicole O, Docagne F, Ali C, Margaill I, Carmeliet P, MacKenzie ET, *et al.* The proteolytic activity of tissue-plasminogen activator enhances NMDA receptor-mediated signaling. *Nat Med* 2001, **7**(1)**:** 59-64.

7. Bertrand T, Lesept F, Chevilley A, Lenoir S, Aimable M, Briens A, *et al.* Conformations of tissue plasminogen activator (tPA) orchestrate neuronal survival by a crosstalk between EGFR and NMDAR. *Cell death & disease* 2015, **6:** e1924.

8. Jung W, Castren E, Odenthal M, Vande Woude GF, Ishii T, Dienes HP, *et al.* Expression and functional interaction of hepatocyte growth factor-scatter factor and its receptor c-met in mammalian brain. *J Cell Biol* 1994, **126**(2)**:** 485-494.

9. Naldini L, Weidner KM, Vigna E, Gaudino G, Bardelli A, Ponzetto C, *et al.* Scatter factor and hepatocyte growth factor are indistinguishable ligands for the MET receptor. *EMBO J* 1991, **10**(10)**:** 2867-2878.

10. Naka D, Ishii T, Yoshiyama Y, Miyazawa K, Hara H, Hishida T, *et al.* Activation of hepatocyte growth factor by proteolytic conversion of a single chain form to a heterodimer. *J Biol Chem* 1992, **267**(28)**:** 20114-20119.

11. Mars WM, Zarnegar R, Michalopoulos GK. Activation of hepatocyte growth factor by the plasminogen activators uPA and tPA. *Am J Pathol* 1993, **143**(3)**:** 949-958.

12. Miyazawa K, Shimomura T, Kitamura N. Activation of hepatocyte growth factor in the injured tissues is mediated by hepatocyte growth factor activator. *J Biol Chem* 1996, **271**(7)**:** 3615-3618.

13. Naldini L, Tamagnone L, Vigna E, Sachs M, Hartmann G, Birchmeier W, *et al.* Extracellular proteolytic cleavage by urokinase is required for activation of hepatocyte growth factor/scatter factor. *EMBO J* 1992, **11**(13)**:** 4825-4833.

14. Tyndall SJ, Walikonis RS. Signaling by hepatocyte growth factor in neurons is induced by pharmacological stimulation of synaptic activity. *Synapse* 2007, **61**(4): 199-204.

15. Akita H, Takagi N, Ishihara N, Takagi K, Murotomi K, Funakoshi H, *et al.* Hepatocyte growth factor improves synaptic localization of the NMDA receptor and intracellular signaling after excitotoxic injury in cultured hippocampal neurons. *Exp Neurol* 2008, **210**(1): 83-94.

16. Machide M, Kamitori K, Nakamura Y, Kohsaka S. Selective activation of phospholipase C gamma1 and distinct protein kinase C subspecies in intracellular signaling by hepatocyte growth factor/scatter factor in primary cultured rat neocortical cells. *J Neurochem* 1998, **71**(2): 592-602.

17. Date I, Takagi N, Takagi K, Kago T, Matsumoto K, Nakamura T, *et al.* Hepatocyte growth factor improved learning and memory dysfunction of microsphere-embolized rats. *J Neurosci Res* 2004, **78**(3): 442-453.

18. Niimura M, Takagi N, Takagi K, Mizutani R, Ishihara N, Matsumoto K, *et al.* Prevention of apoptosis-inducing factor translocation is a possible mechanism for protective effects of hepatocyte growth factor against neuronal cell death in the hippocampus after transient forebrain ischemia. *J Cereb Blood Flow Metab* 2006, **26**(11): 1354-1365.

19. Qiu S, Zhang M, Liu Y, Guo Y, Zhao H, Song Q, *et al.* GluA1 phosphorylation contributes to postsynaptic amplification of neuropathic pain in the insular cortex. *J Neurosci* 2014, **34**(40): 13505-13515.

20. Kato T, Funakoshi H, Kadoyama K, Noma S, Kanai M, Ohya-Shimada W, *et al.* Hepatocyte growth factor overexpression in the nervous system enhances learning and memory performance in mice. *J Neurosci Res* 2012, **90**(9): 1743-1755.

21. Tsirka SE, Gualandris A, Amaral DG, Strickland S. Excitotoxin-induced neuronal degeneration and seizure are mediated by tissue plasminogen activator. *Nature* 1995, **377**(6547): 340-344.

22. Mantuano E, Lam MS, Gonias SL. LRP1 assembles unique co-receptor systems to initiate cell signaling in response to tissue-type plasminogen activator and myelin-associated glycoprotein. *J Biol Chem* 2013, **288**(47): 34009-34018.

23. Chevilley A, Lesept F, Lenoir S, Ali C, Parcq J, Vivien D. Impacts of tissue-type plasminogen activator (tPA) on neuronal survival. *Frontiers in cellular neuroscience* 2015, **9**: 415.

24. Lesept F, Chevilley A, Jezequel J, Ladepeche L, Macrez R, Aimable M, *et al.* Tissue-type plasminogen activator controls neuronal death by raising surface dynamics of extrasynaptic NMDA receptors. *Cell death & disease* 2016, **7**(11): e2466.

25. Louessard M, Bardou I, Lemarchand E, Thiebaut AM, Parcq J, Leprince J, *et al.* Activation of cell surface GRP78 decreases endoplasmic reticulum stress and neuronal death. *Cell Death Differ* 2017, **24**(9)**:** 1518-1529.

26. Parcq J, Bertrand T, Montagne A, Baron AF, Macrez R, Billard JM, *et al.* Unveiling an exceptional zymogen: the single-chain form of tPA is a selective activator of NMDA receptor-dependent signaling and neurotoxicity. *Cell Death Differ* 2012, **19**(12)**:** 1983-1991.

27. Sattler M, Pride YB, Ma P, Gramlich JL, Chu SC, Quinnan LA, *et al.* A novel small molecule met inhibitor induces apoptosis in cells transformed by the oncogenic TPR-MET tyrosine kinase. *Cancer research* 2003, **63**(17)**:** 5462-5469.

28. Cahill E, Pascoli V, Trifilieff P, Savoldi D, Kappes V, Luscher C, *et al.* D1R/GluN1 complexes in the striatum integrate dopamine and glutamate signalling to control synaptic plasticity and cocaine-induced responses. *Molecular psychiatry* 2014, **19**(12)**:** 1295-1304.

29. De Rossi P, Harde E, Dupuis JP, Martin L, Chounlamountri N, Bardin M, *et al.* A critical role for VEGF and VEGFR2 in NMDA receptor synaptic function and fear-related behavior. *Molecular psychiatry* 2016, **21**(12)**:** 1768-1780.

30. Planaguma J, Haselmann H, Mannara F, Petit-Pedrol M, Grunewald B, Aguilar E, *et al.* Ephrin-B2 prevents N-methyl-D-aspartate receptor antibody effects on memory and neuroplasticity. *Annals of neurology* 2016, **80**(3)**:** 388-400.

31. Qiu S, Lu Z, Levitt P. MET receptor tyrosine kinase controls dendritic complexity, spine morphogenesis, and glutamatergic synapse maturation in the hippocampus. *J Neurosci* 2014, **34**(49)**:** 16166-16179.

32. Xie Z, Eagleson KL, Wu HH, Levitt P. Hepatocyte Growth Factor Modulates MET Receptor Tyrosine Kinase and beta-Catenin Functional Interactions to Enhance Synapse Formation. *eNeuro* 2016, **3**(4).

33. Ichinose A, Kisiel W, Fujikawa K. Proteolytic activation of tissue plasminogen activator by plasma and tissue enzymes. *FEBS letters* 1984, **175**(2)**:** 412-418.

34. Thiebaut AM, Gauberti M, Ali C, Martinez De Lizarrondo S, Vivien D, Yepes M, *et al.* The role of plasminogen activators in stroke treatment: fibrinolysis and beyond. *Lancet neurology* 2018, **17**(12)**:** 1121-1132.

35. Matys T, Strickland S. Tissue plasminogen activator and NMDA receptor cleavage. *Nat Med* 2003, **9**(4)**:** 371-372; author reply 372-373.

36. Wu F, Wu J, Nicholson AD, Echeverry R, Haile WB, Catano M, *et al.* Tissue-type plasminogen activator regulates the neuronal uptake of glucose in the ischemic brain. *J Neurosci* 2012, **32**(29)**:** 9848-9858.

37. Wu F, Echeverry R, Wu J, An J, Haile WB, Cooper DS, *et al.* Tissue-type plasminogen activator protects neurons from excitotoxin-induced cell death via

activation of the ERK1/2-CREB-ATF3 signaling pathway. *Molecular and cellular neurosciences* 2013, **52:** 9-19.

38. Pawlak R, Melchor JP, Matys T, Skrzypiec AE, Strickland S. Ethanol-withdrawal seizures are controlled by tissue plasminogen activator via modulation of NR2B-containing NMDA receptors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2005, **102**(2)**:** 443-448.

39. Pawlak R, Magarinos AM, Melchor J, McEwen B, Strickland S. Tissue plasminogen activator in the amygdala is critical for stress-induced anxiety-like behavior. *Nature neuroscience* 2003, **6**(2)**:** 168-174.

40. Samson AL, Nevin ST, Croucher D, Niego B, Daniel PB, Weiss TW, *et al.* Tissue-type plasminogen activator requires a co-receptor to enhance NMDA receptor function. *J Neurochem* 2008, **107**(4)**:** 1091-1101.

41. Tovar KR, Westbrook GL. Mobile NMDA receptors at hippocampal synapses. *Neuron* 2002, **34**(2)**:** 255-264.

42. Hardingham GE, Fukunaga Y, Bading H. Extrasynaptic NMDARs oppose synaptic NMDARs by triggering CREB shut-off and cell death pathways. *Nature neuroscience* 2002, **5**(5)**:** 405-414.

43. Liu Y, Wong TP, Aarts M, Rooyakkers A, Liu L, Lai TW, *et al.* NMDA receptor subunits have differential roles in mediating excitotoxic neuronal death both in vitro and in vivo. *J Neurosci* 2007, **27**(11)**:** 2846-2857.

44. Roussel BD, Mysiorek C, Rouhiainen A, Jullienne A, Parcq J, Hommet Y, *et al.* HMGB-1 promotes fibrinolysis and reduces neurotoxicity mediated by tissue plasminogen activator. *Journal of cell science* 2011, **124**(Pt 12)**:** 2070-2076.

ACKNOWLEDGMENTS:

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

AUTHOR CONTRIBUTION

EH, BDR and DV performed study concept and design; EH, SD, AV, IB, MM, EL, VA, BDR and DV performed development of methodology and writing, review and revision of the paper; EH, SD, AC, AV, AMT, HT, IB, MM, EL, BDR provided acquisition, analysis and interpretation of data, and statistical analysis; CA, TC, PC provided technical and material support. All authors read and approved the final paper.

LEGENDS

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

Figure 2. NMDAR and MET form complexes at the neuronal surface modulating by sc-tPA, tc-tPA and HGF. (**a**) Immunoprecipitations with GluN1 antibody revealed by western blot against either MET or GluN1 on primary cultures of cortical neurons (representative blot of three independent experiments). (**b**) Representative confocal microscopy images of PLA staining on primary cultures of cortical neurons treated with tPA buffer, HGF buffer, sc-tPA (300nM), tc-tPA (300nM) or recombinant HGF (50ng/ml) for 45min. Magenta fluorescent profiles represent regions of PLA signal amplifications denoting MET and NMDAR proximity. (**c**) Quantitative analysis of MET/NMDAR PLA signals normalized to tPA buffer condition. $N = 18$ concerning HGF buffer and HGF conditions, $N = 19$ for sc-tPA (300nM)

and tc-tPA (300nM) conditions and, N = 28 for tPA buffer from 4 independent cultures. (**d**) Quantitative analysis of MET/EGFR PLA signals normalized to tPA buffer condition. N = 18 concerning HGF buffer and HGF conditions, N = 29 for sc-tPA (300nM), tc-tPA (300nM) conditions, and N = 29 for tPA buffer condition, from 4 independent cultures. Data are represented as mean ± SEM; * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ and **** $p < 0.0001$ indicate significantly different from the corresponding control by Mann-Whitney tests.

Figure 3. The tc-tPA induces a decrease of GluN2B phosphorylation (Y1474) and total GluN2B through MET receptor. (**a**) Representative western blot and (**b**) corresponding density of the band for pGluN2A (Y1325) and pGluN2B (Y1474) of cultured cortical neurons incubated with sc-tPA (300nM for 10-30-60 minutes; n = 5 independent experiments). (**c**) Corresponding density of the band for total GluN2A, total GluN2B and total GluN1 (n = 5 independent experiments for GluN2B and GluN1, n = 3 for GluN2A). (**d**) Representative western blot (**e**) and corresponding density of the band for pGluN2A (Y1325) and pGluN2B (Y1474) of cultured cortical neurons incubated with tc-tPA (300nM for 10-30-60 minutes; n = 4 independent experiments for GluN2B (Y1474) and n = 7 for pGluN2A (Y1325) at 10-30 minutes and n = 4 at 60 minutes). (**f**) Corresponding density of the band for total GluN2A, total GluN2B and total GluN1 (n = 4 independent experiments for GluN2B and GluN1, n = 7 for GluN2A at 10-30 minutes and n = 4 at 60 minutes). (**g**) Representative western blot and (**h**) corresponding density of the band for pGluN2B (Y1474) after treatment on cortical neurons with tc-tPA (300nM) for 10 min alone or in combination with JNJ-38877605 (500nM). (n = 4 independent experiments). All data are represented as mean ± SEM; * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ indicate significantly different from the corresponding control by Mann-Whitney test. $^{\#}$ $p < 0.05$ indicate significantly different between treatments by Mann-Whitney test. ns = non-significant.

Figure 4: The tc-tPA induces an early endocytosis and degradation of GluN2B. (**a**) Representative western blot and corresponding density for GluN2B of 13 DIV neurons pre-treated or not for 2 hours with Lactacystin (5µM), followed by a 10 minutes treatment with tc-tPA (300nM) (n = 4 independent experiments). All data are represented as mean ± SEM; * $p <$ 0.05 indicate significantly different from the corresponding control by Mann-Whitney test. $^{\#}p < 0.05$ indicate significantly different between treatments by Mann-Whitney test. (**b**) Timeline of the immunocytochemistry experiments. (**c**) Representative images of 13 DIV cortical neurons treated or not with sc- or tc-tPA for 10 or 30 minutes showing the whole neuronal body in blue (GFP), GluN2B (magenta) and the dendrites in yellow (MAP2). (**d**) Representative images of dendrites and axons used for analyzes under different conditions: control, sc-tPA (300nM during 10min or 30min) or tc-tPA (300nM during 10min or 30min). GluN2B puncta/100µM in dendrites (**e** and **g**) and in axons (**f** and **h**) under sc-tPA (**e** and **f**) or tc-tPA (**g** and **h**) treatments (300nM for 10 or 30 min) (**e**, Control: n = 23 dendrites, N = 13 neurons; tc-tPA 10min: n = 24 dendrites, N = 13 neurons; tc-tPA 30min: n = 17 dendrites, N = 12 neurons; **f**, Control: n = 11 axons, N = 11 neurons; tc-tPA 10min: n = 18 axons, N = 18 neurons; tc-tPA 30min: n = 13 axons, N = 13 neurons; **g**, Control: n = 23 dendrites, N = 16 neurons; tc-tPA 10min: n = 29 dendrites, N = 13 neurons; tc-tPA 30min: n = 21 dendrites, N = 15 neurons; **h**, Control: n = 11 axons, N = 11 neurons; tc-tPA 10min: n = 13 axons, N = 13 neurons; tc-tPA 30min: n = 15 axons, N = 15 neurons). A Shapiro-Wilk test is used to test the normality of data distribution. (**e**,**f**) Kruskal-Wallis's test followed by a Dunn's multiple comparisons test were used. (**g**,**h**) One-way ANOVA and a Tukey's post hoc test were used. Scale bar: 100µm (**c**). * $p<0.05$, ** $p<0.01$ *** $p<0.005$, **** $p<0.0001$, ns: not significant.

Figure 5. Inhibition of the HGF-MET axis counteracts the tc-tPA-dependent decrease of NMDAR-mediated neuronal calcium influx. Calcium video imaging performed on primary cultures of cortical neurons (13 DIV). After control NMDA stimulations (25 mM) used as baseline, neurons were incubated for 45min with (**a** and **b**) JNJ-38877605 buffer + tPA buffer (control, n = 88 cells), JNJ-38877605 (500nM; n = 91 cells), sc-tPA (300nM; n = 77 cells) and tc-tPA (300nM; n = 98 cells) alone or combined with JNJ-38877605 (n = 82 cells and n = 98 cells respectively); or (**c** and **d**) SU11274 buffer + tPA buffer (control, n = 78 cells), SU11274 (2µM; n = 93 cells), sc-tPA (300nM; n = 118 cells) and tc-tPA (300nM; n = 108 cells) alone or in combination (n = 111 cells and n = 121 cells respectively). Each dot represents one cell. (**b** and **d**) Percentage of stimulation or inhibition after incubation were calculated for each individual cell and reported as the percentages of responsiveness for each group (n = 3 independent experiments, mean ± SEM). # indicates significant difference for the comparison of pre- and post-incubation responses by Wilcoxon signed-rank test ($p < 0.0001$). **** indicates significantly different from the corresponding control by Kruskal-Wallis and Mann-Whitney tests ($p < 0.0001$).

Figure 6. Activation of the HGF-MET axis counteracts the sc-tPA-dependent increase of NMDAR-mediated neuronal calcium influx.

Calcium video imaging performed on primary cultures of cortical neurons (13 DIV). After control NMDA stimulations (25 mM) used as baseline, neurons were incubated for 45min with (**a** and **b**) HGF buffer + tPA buffer (control, n = 96 cells), rHGF (50ng/mL; n = 91 cells), sc-tPA (300nM; n = 93 cells) and tc-tPA (300nM; n = 100 cells) alone or combined with rHGF (n = 89 cells and n = 88 respectively); or (**c** and **d**) DO-24 buffer + tPA buffer (control, n = 95 cells), DO-24 (50ng/mL; n = 88 cells), sc-tPA (300nM; n = 86 cells) and tc-tPA (300nM; n = 100 cells) alone or combined with DO-24 (n = 94 cells and n = 86 cells

respectively). Each dot represents one cell. (**b** and **d**) Percentage of stimulation or inhibition after incubation were calculated for each individual cell and reported as the percentages of responsiveness for each group (n = 3 independent experiments, mean ± SEM). # indicates significant difference for the comparison of pre- and post-incubation responses by Wilcoxon signed-rank test ($p < 0.0001$). **** indicates significantly different from the corresponding control by Kruskal-Wallis and Mann-Whitney tests ($p < 0.0001$).

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

Figure 1

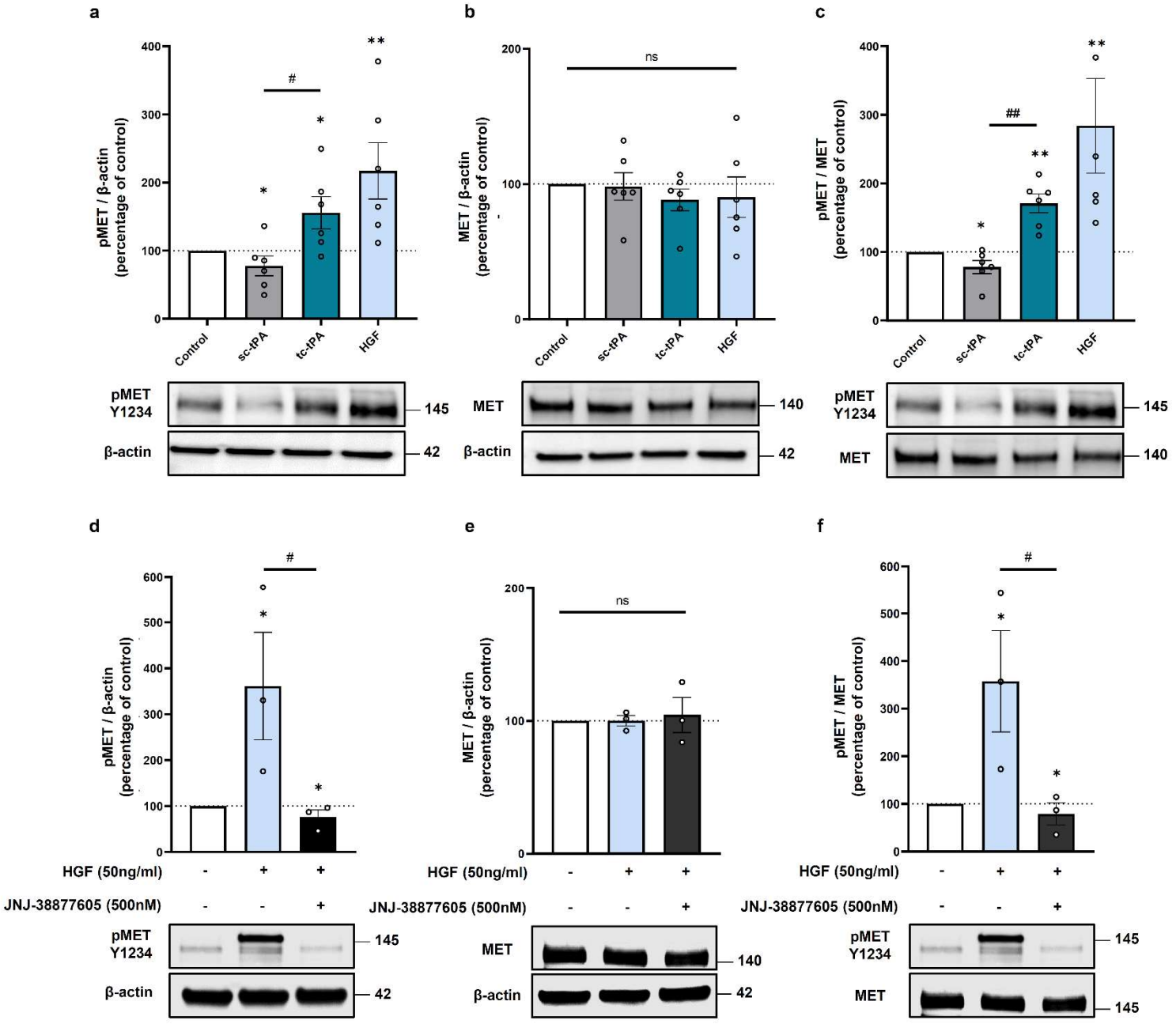
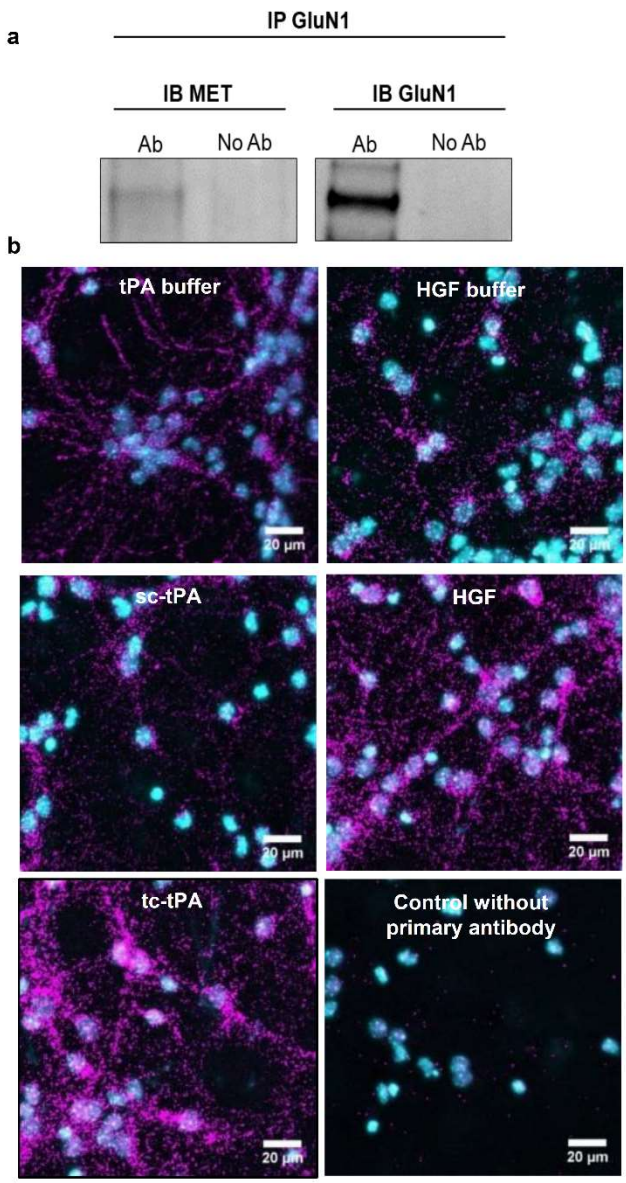

a
pMET / β-actin (percentage of control)
400
300
200
100
0
#
**
*
*
Control
sc-tPA
tc-tPA
HGF
pMET Y1234
145
β-actin
42
b
MET / β-actin (percentage of control)
200
100
0
ns
Control
sc-tPA
tc-tPA
HGF
MET
140
β-actin
42
c
pMET / MET (percentage of control)
400
300
200
100
0
##
**
*
Control
sc-tPA
tc-tPA
HGF
pMET Y1234
145
MET
140
d
pMET / β-actin (percentage of control)
600
500
400
300
200
100
0
#
*
*
HGF (50ng/ml) - + +
JNJ-38877605 (500nM) - - +
pMET Y1234
145
β-actin
42
e
MET / β-actin (percentage of control)
200
100
0
ns
HGF (50ng/ml) - + +
JNJ-38877605 (500nM) - - +
MET
140
β-actin
42
f
pMET / MET (percentage of control)
600
500
400
300
200
100
0
#
*
*
HGF (50ng/ml) - + +
JNJ-38877605 (500nM) - - +
pMET Y1234
145
MET
145

Figure 2


a
IP GluN1
IB MET
IB GluN1
Ab
No Ab
Ab
No Ab
b
tPA buffer
HGF buffer
sc-tPA
HGF
tc-tPA
Control without primary antibody
20 µm

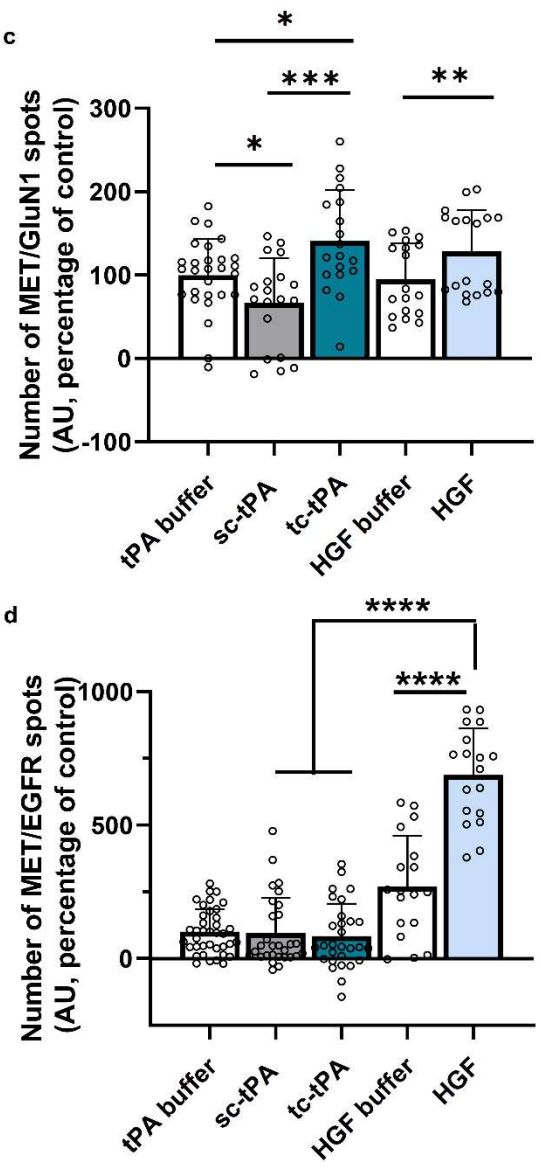

c
Number of MET/GluN1 spots (AU, percentage of control)
300
200
100
0
-100
*
***
**
*
tPA buffer
sc-tPA
tc-tPA
HGF buffer
HGF
d
Number of MET/EGFR spots (AU, percentage of control)
1000
500
0
****
****
tPA buffer
sc-tPA
tc-tPA
HGF buffer
HGF

Figure 3

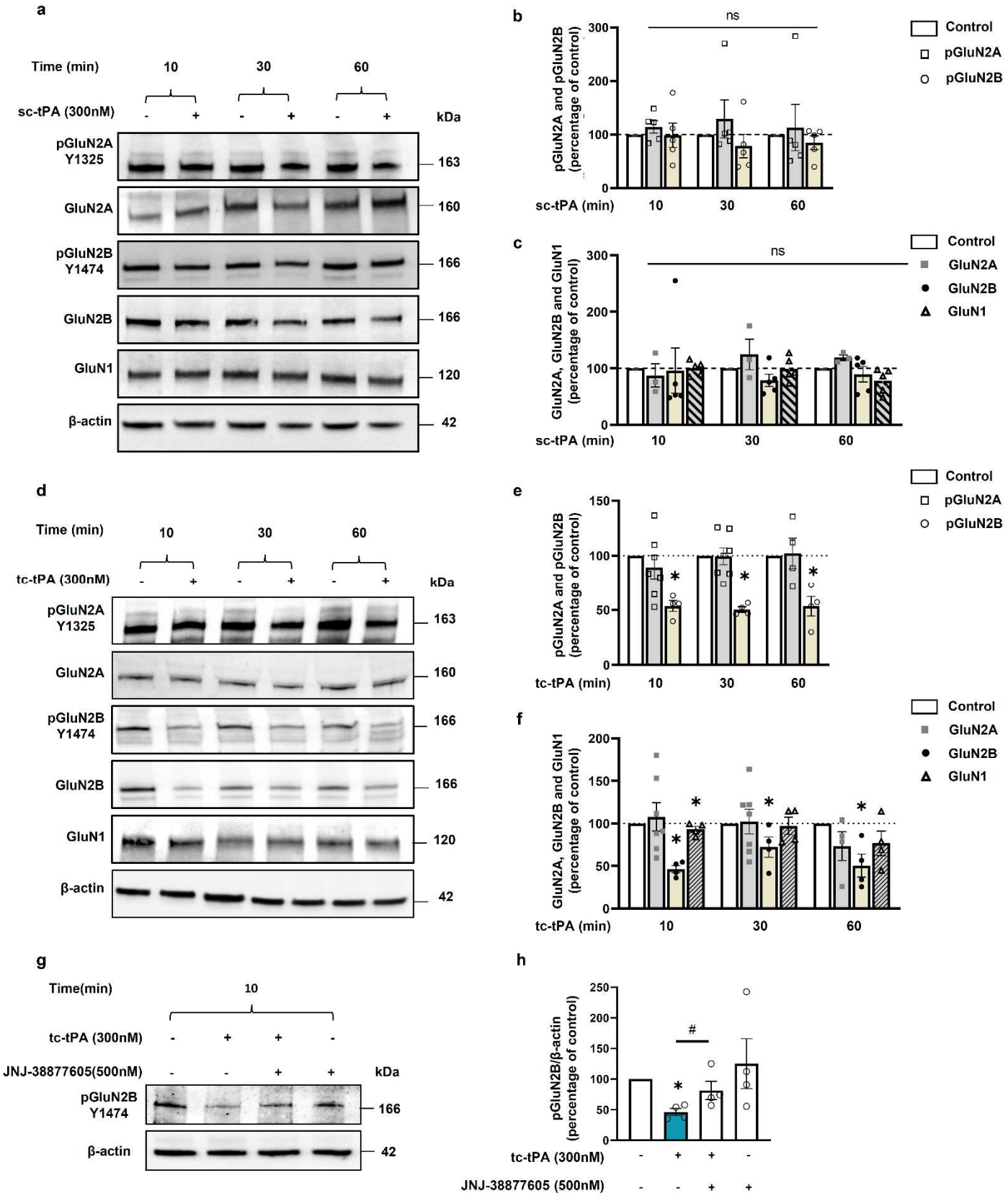

a
Time (min)
10
30
60
sc-tPA (300nM)
- + - + - +
kDa
pGluN2A Y1325
163
GluN2A
160
pGluN2B Y1474
166
GluN2B
166
GluN1
120
β-actin
42
b
ns
pGluN2A and pGluN2B (percentage of control)
300
200
100
0
sc-tPA (min)
10
30
60
Control
pGluN2A
pGluN2B
c
ns
GluN2A, GluN2B and GluN1 (percentage of control)
300
200
100
0
sc-tPA (min)
10
30
60
Control
GluN2A
GluN2B
GluN1
d
Time (min)
10
30
60
tc-tPA (300nM)
- + - + - +
kDa
pGluN2A Y1325
163
GluN2A
160
pGluN2B Y1474
166
GluN2B
166
GluN1
120
β-actin
42
e
pGluN2A and pGluN2B (percentage of control)
150
100
50
0
tc-tPA (min)
10
30
60
Control
pGluN2A
pGluN2B
f
GluN2A, GluN2B and GluN1 (percentage of control)
200
150
100
50
0
tc-tPA (min)
10
30
60
Control
GluN2A
GluN2B
GluN1
g
Time(min)
10
tc-tPA (300nM)
- + + -
JNJ-38877605(500nM)
- - + +
kDa
pGluN2B Y1474
166
β-actin
42
h
pGluN2B/β-actin (percentage of control)
250
200
150
100
50
0
#
tc-tPA (300nM)
- + + -
JNJ-38877605 (500nM)
- - + +

Figure 4

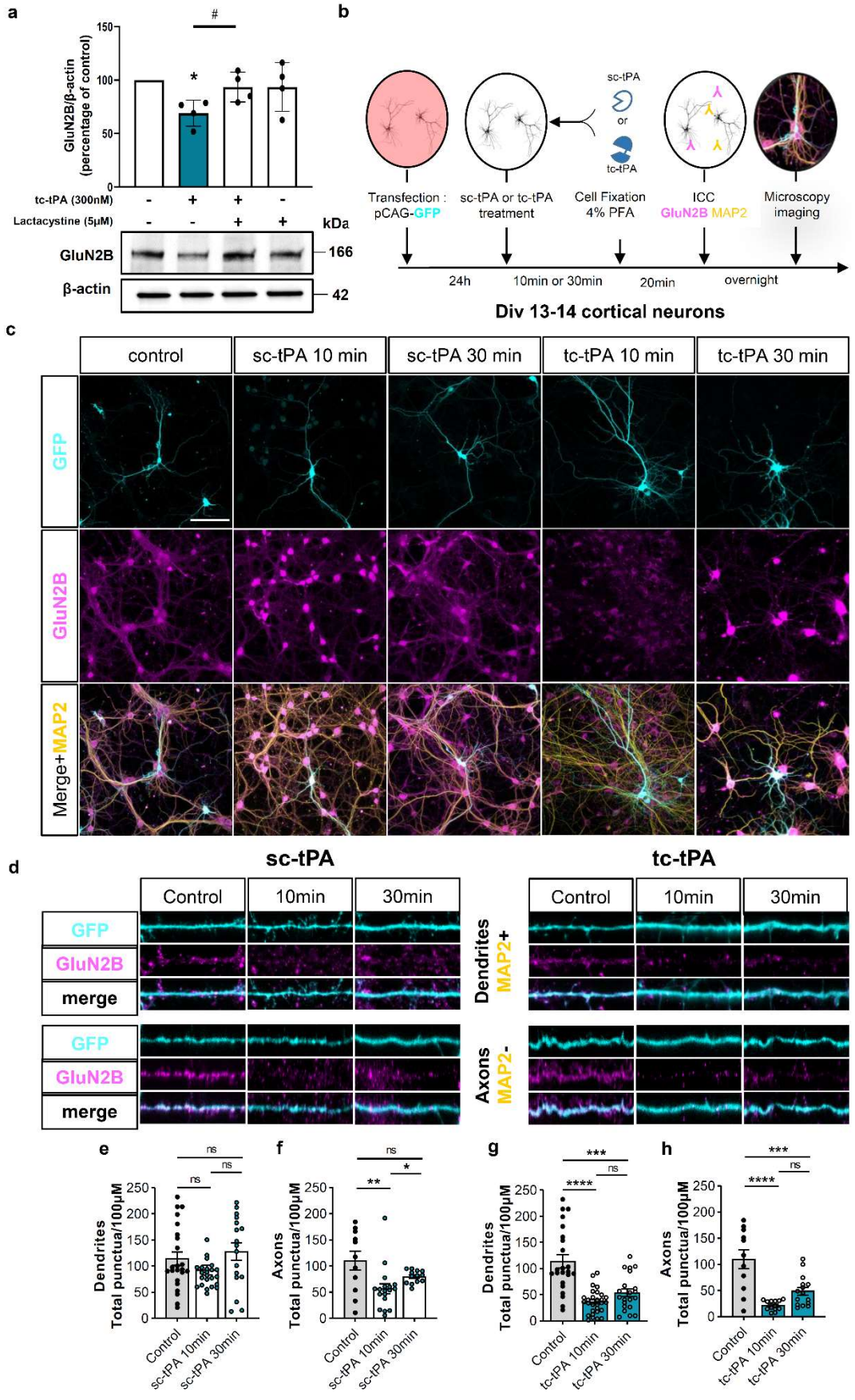

a
GluN2B/β-actin (percentage of control)
tc-tPA (300nM)
Lactacystine (5µM)
kDa
GluN2B
β-actin
166
42
b
sc-tPA
or
tc-tPA
Transfection : pCAG-GFP
sc-tPA or tc-tPA treatment
Cell Fixation 4% PFA
ICC GluN2B MAP2
Microscopy imaging
24h
10min or 30min
20min
overnight
Div 13-14 cortical neurons
c
control
sc-tPA 10 min
sc-tPA 30 min
tc-tPA 10 min
tc-tPA 30 min
GFP
GluN2B
Merge+MAP2
d
sc-tPA
tc-tPA
Control
10min
30min
GFP
GluN2B
merge
Dendrites MAP2+
Axons MAP2-
e
Dendrites Total punctua/100µM
f
Axons Total punctua/100µM
g
Dendrites Total punctua/100µM
h
Axons Total punctua/100µM
Control
sc-tPA 10min
sc-tPA 30min
tc-tPA 10min
tc-tPA 30min

Figure 5

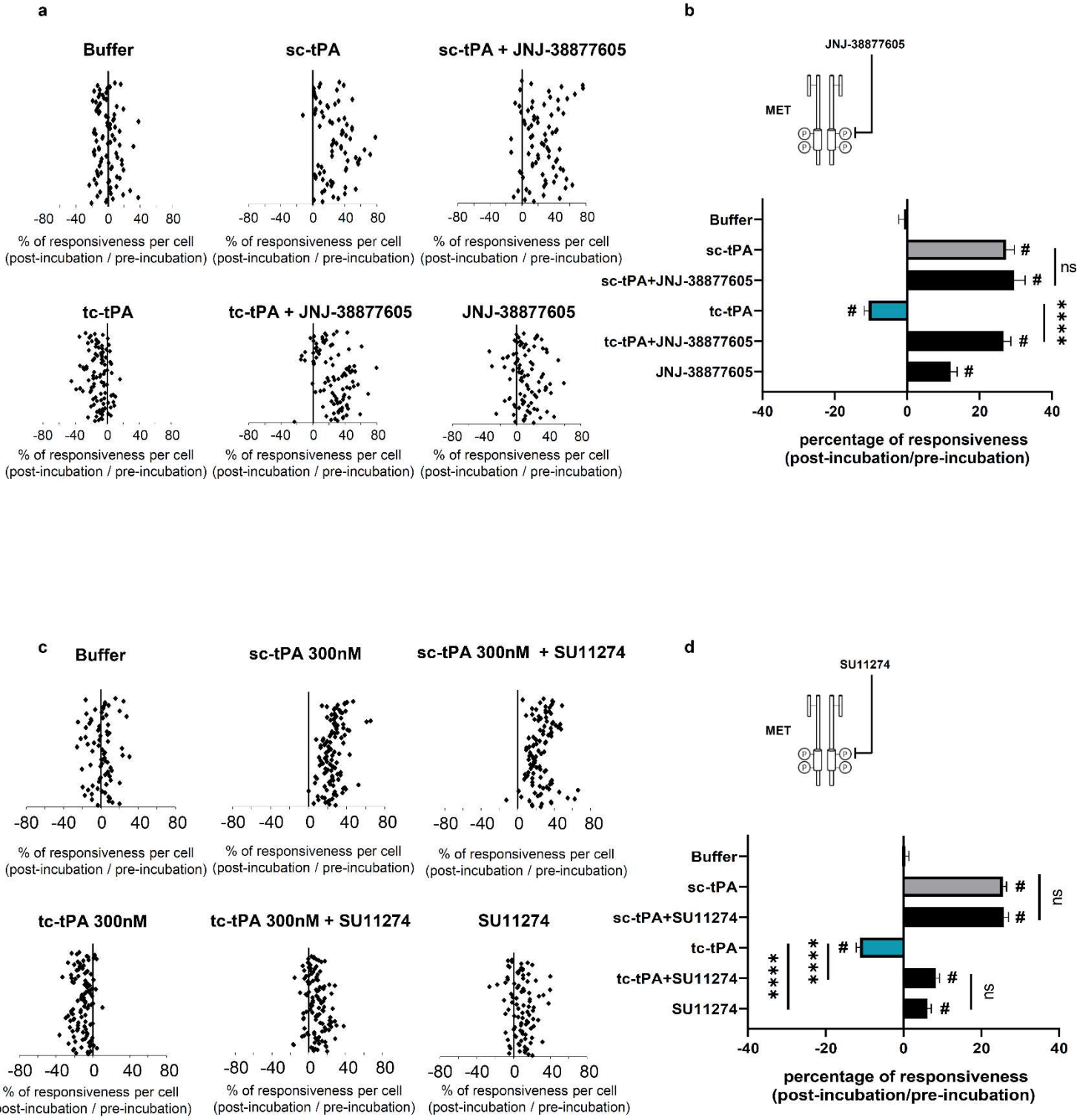

a
Buffer
sc-tPA
sc-tPA + JNJ-38877605
tc-tPA
tc-tPA + JNJ-38877605
JNJ-38877605
-80 -40 0 40 80
% of responsiveness per cell
(post-incubation / pre-incubation)
b
JNJ-38877605
MET
Buffer
sc-tPA
sc-tPA+JNJ-38877605
tc-tPA
tc-tPA+JNJ-38877605
JNJ-38877605
#
ns
****
-40 -20 0 20 40
percentage of responsiveness
(post-incubation/pre-incubation)
c
Buffer
sc-tPA 300nM
sc-tPA 300nM + SU11274
tc-tPA 300nM
tc-tPA 300nM + SU11274
SU11274
-80 -40 0 40 80
% of responsiveness per cell
(post-incubation / pre-incubation)
d
SU11274
MET
Buffer
sc-tPA
sc-tPA+SU11274
tc-tPA
tc-tPA+SU11274
SU11274
#
ns
****
-40 -20 0 20 40
percentage of responsiveness
(post-incubation/pre-incubation)

Figure 6

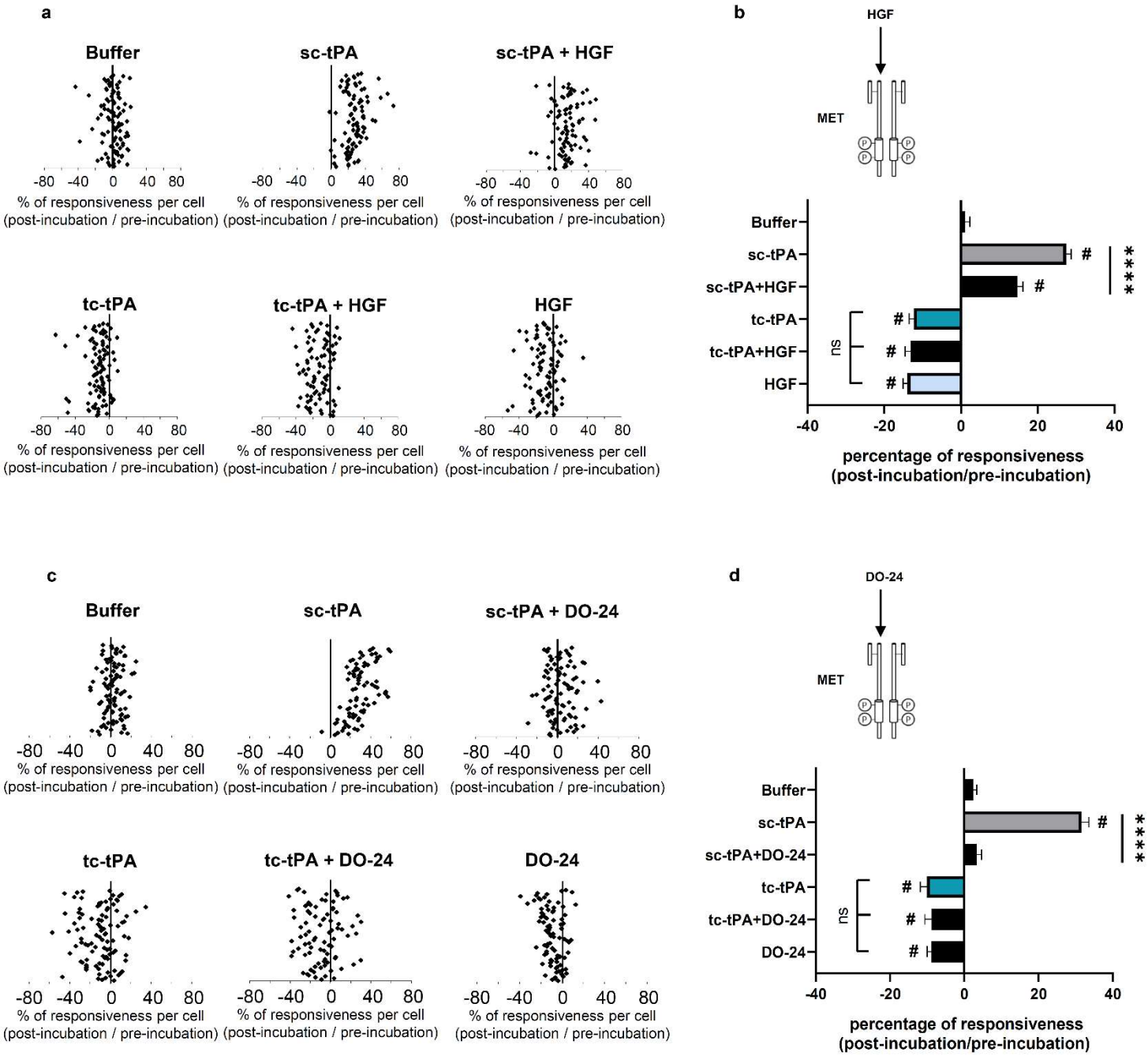
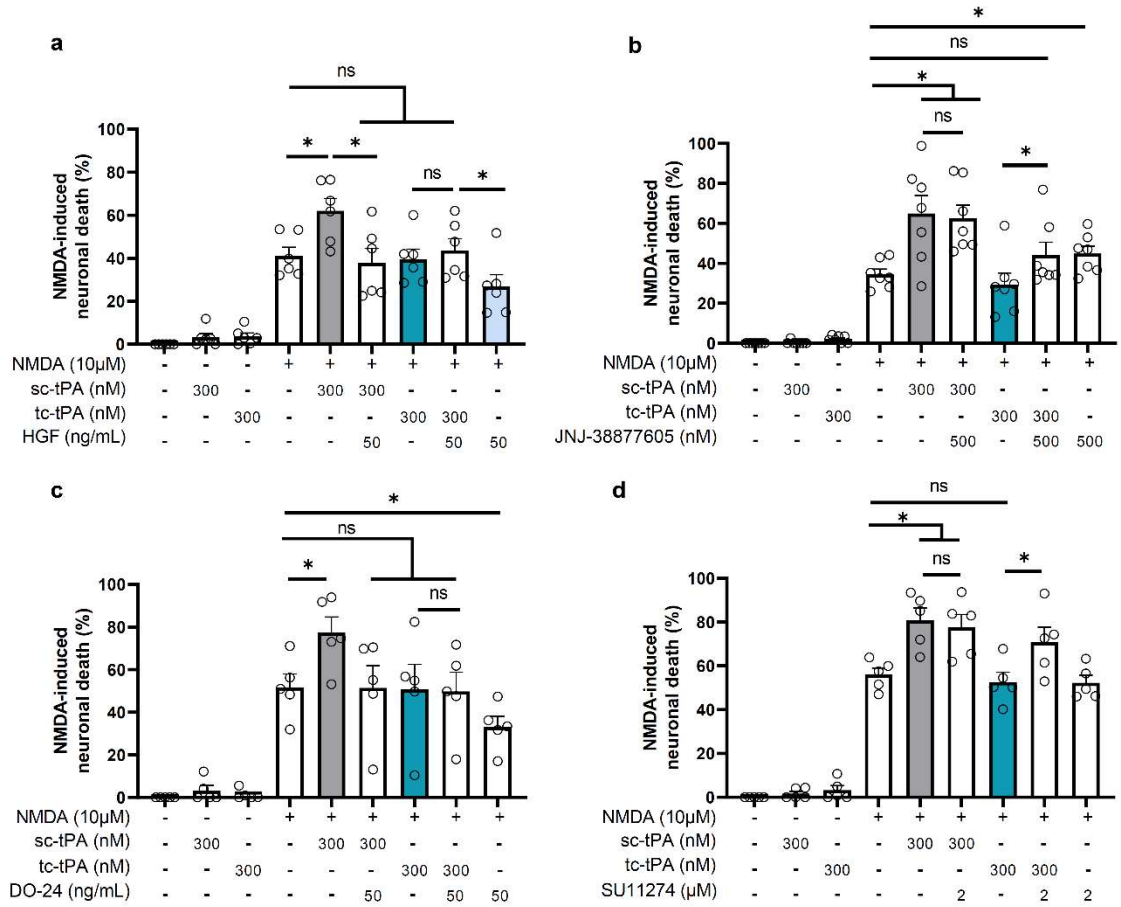

a
Buffer
sc-tPA
sc-tPA + HGF
tc-tPA
tc-tPA + HGF
HGF
-80 -40 0 40 80
% of responsiveness per cell
(post-incubation / pre-incubation)
b
HGF
MET
Buffer
sc-tPA
sc-tPA+HGF
tc-tPA
tc-tPA+HGF
HGF
ns
#
****
-40 -20 0 20 40
percentage of responsiveness
(post-incubation/pre-incubation)
c
Buffer
sc-tPA
sc-tPA + DO-24
tc-tPA
tc-tPA + DO-24
DO-24
-80 -40 0 40 80
% of responsiveness per cell
(post-incubation / pre-incubation)
d
DO-24
MET
Buffer
sc-tPA
sc-tPA+DO-24
tc-tPA
tc-tPA+DO-24
DO-24
ns
#
****
-40 -20 0 20 40
percentage of responsiveness
(post-incubation/pre-incubation)

Figure 7


a
NMDA-induced neuronal death (%)
NMDA (10µM)
sc-tPA (nM)
tc-tPA (nM)
HGF (ng/mL)
b
NMDA-induced neuronal death (%)
NMDA (10µM)
sc-tPA (nM)
tc-tPA (nM)
JNJ-38877605 (nM)
c
NMDA-induced neuronal death (%)
NMDA (10µM)
sc-tPA (nM)
tc-tPA (nM)
DO-24 (ng/mL)
d
NMDA-induced neuronal death (%)
NMDA (10µM)
sc-tPA (nM)
tc-tPA (nM)
SU11274 (µM)

Références

Abbott NJ, Rönnbäck L, Hansson E (2006). Astrocyte–endothelial interactions at the blood–brain barrier. *Nature Reviews Neuroscience* **7**, 41–53. doi:10.1038/nrn1824

Acheson A, Conover JC, Fandl JP, DeChiara TM, Russell M, Thadani A, Squinto SP, Yancopoulos GD, Lindsay RM (1995). A BDNF autocrine loop in adult sensory neurons prevents cell death. *Nature* **374**, 450–453. doi:10.1038/374450a0

Adio S, Reth J, Bathe F, Woehlke G (2006). Review: regulation mechanisms of Kinesin-1. *Journal of Muscle Research and Cell Motility* **27**, 153–160. doi:10.1007/s10974-005-9054-1

Aiken J, Holzbaur ELF (2021). Cytoskeletal regulation guides neuronal trafficking to effectively supply the synapse. *Current Biology* **31**, R633–R650. doi:10.1016/j.cub.2021.02.024

Akassoglou K, Kombrinck KW, Degen JL, Strickland S (2000). Tissue Plasminogen Activator–Mediated Fibrinolysis Protects against Axonal Degeneration and Demyelination after Sciatic Nerve Injury. *The Journal of Cell Biology* **149**, 1157–1166.

Allison DW, Chervin AS, Gelfand VI, Craig AM (2000). Postsynaptic Scaffolds of Excitatory and Inhibitory Synapses in Hippocampal Neurons: Maintenance of Core Components Independent of Actin Filaments and Microtubules. *The Journal of Neuroscience* **20**, 4545–4554. doi:10.1523/JNEUROSCI.20-12-04545.2000

Ammar MR, Kassas N, Chasserot-Golaz S, Bader M-F, Vitale N (2013). Lipids in Regulated Exocytosis: What are They Doing? *Frontiers in Endocrinology* **4**, 125. doi:10.3389/fendo.2013.00125

Andral, G., 1845. Essai d'hématologie pathologique. *Paris*, p.p113 et suiv.

Anfray A, Drieu A, Hingot V, Hommet Y, Yetim M, Rubio M, Deffieux T, Tanter M, Orset C, Vivien D (2020). Circulating tPA contributes to neurovascular coupling by a mechanism involving the endothelial NMDA receptors. *Journal of Cerebral Blood Flow and Metabolism: Official Journal of the International Society of Cerebral Blood Flow and Metabolism* **40**, 2038–2054. doi:10.1177/0271678X19883599

Angles-Cano E, Balaton A, Le Bonniec B, Genot E, Elion J, Sultan Y (1985). Production of monoclonal antibodies to the high fibrin-affinity, tissue-type plasminogen activator of human plasma. Demonstration of its endothelial origin by immunolocalization. *Blood* **66**, 913–920.

Asahi M, Asahi K, Jung JC, del Zoppo GJ, Fini ME, Lo EH (2000). Role for matrix metalloproteinase 9 after focal cerebral ischemia: effects of gene knockout and enzyme inhibition with BB-94. *Journal of Cerebral Blood Flow and Metabolism: Official Journal of the International Society of Cerebral Blood Flow and Metabolism* **20**, 1681–1689. doi:10.1097/00004647-200012000-00007

Asbury CL (2005). Kinesin: world's tiniest biped. *Current Opinion in Cell Biology* **17**, 89–97. doi:10.1016/j.ceb.2004.12.002

Asenjo AB, Weinberg Y, Sosa H (2006). Nucleotide binding and hydrolysis induces a disorder-order transition in the kinesin neck-linker region. *Nature Structural & Molecular Biology* **13**, 648–654. doi:10.1038/nsmb1109

Asok A, Leroy F, Rayman JB, Kandel ER (2019). Molecular Mechanisms of the Memory Trace. *Trends in Neurosciences* **42**, 14–22. doi:10.1016/j.tins.2018.10.005

Astrup T, Stage A (1952). Isolation of a soluble fibrinolytic activator from animal tissue. *Nature* **170**, 929. doi:10.1038/170929a0

Attwell PJ, Rahman S, Ivarsson M, Yeo CH (1999). Cerebellar cortical AMPA-kainate receptor blockade prevents performance of classically conditioned nictitating membrane responses. *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience* **19**, RC45.

Avraham KB, Hasson T, Steel KP, Kingsley DM, Russell LB, Mooseker MS, Copeland NG, Jenkins NA (1995). The mouse Snell's waltzer deafness gene encodes an unconventional myosin required for structural integrity of inner ear hair cells. *Nature Genetics* **11**, 369–375. doi:10.1038/ng1295-369

B

Bányai L, Váradi A, Patthy L (1983). Common evolutionary origin of the fibrin-binding structures of fibronectin and tissue-type plasminogen activator. *FEBS letters* **163**, 37–41. doi:10.1016/0014-5793(83)81157-0

Baranes D, Lederfein D, Huang YY, Chen M, Bailey CH, Kandel ER (1998). Tissue plasminogen activator contributes to the late phase of LTP and to synaptic growth in the hippocampal mossy fiber pathway. *Neuron* **21**, 813–825. doi:10.1016/s0896-6273(00)80597-8

Barford K, Keeler A, McMahon L, McDaniel K, Yap CC, Deppmann CD, Winckler B (2018). Transcytosis of TrkA leads to diversification of dendritic signaling endosomes. *Scientific Reports* **8**, 4715. doi:10.1038/s41598-018-23036-8

Barker-Carlson K, Lawrence DA, Schwartz BS (2002). Acyl-enzyme complexes between tissue-type plasminogen activator and neuroserpin are short-lived in vitro. *The Journal of Biological Chemistry* **277**, 46852–46857. doi:10.1074/jbc.M207740200

Basham ME, Seeds NW (2001). Plasminogen expression in the neonatal and adult mouse brain. *Journal of Neurochemistry* **77**, 318–325. doi:10.1046/j.1471-4159.2001.t01-1-00239.x

Belarbi K, Burnouf S, Fernandez-Gomez F-J, Desmercières J, Troquier L, Brouillette J, Tsambou L, Grosjean M-E, Caillierez R, Demeyer D, Hamdane M, Schindowski K, Blum D, Buée L (2011). Loss of medial septum cholinergic neurons in THY-Tau22 mouse model: what

links with tau pathology? *Current Alzheimer Research* **8**, 633–638. doi:10.2174/156720511796717230

Benchenane K, Castel H, Boulouard M, Bluthé R, Fernandez-Monreal M, Roussel BD, Lopez-Atalaya JP, Butt-Gueulle S, Agin V, Maubert E, Dantzer R, Touzani O, Dauphin F, Vivien D, Ali C (2007). Anti-NR1 N-terminal-domain vaccination unmasks the crucial action of tPA on NMDA-receptor-mediated toxicity and spatial memory. *Journal of Cell Science* **120**, 578–585. doi:10.1242/jcs.03354

Bennett MK, Calakos N, Scheller RH (1992). Syntaxin: a synaptic protein implicated in docking of synaptic vesicles at presynaptic active zones. *Science (New York, N.Y.)* **257**, 255–259. doi:10.1126/science.1321498

Berg DT, Burck PJ, Berg DH, Grinnell BW (1993). Kringle glycosylation in a modified human tissue plasminogen activator improves functional properties. *Blood* **81**, 1312–1322.

Berger P, Kozlov S V., Cinelli P, Krüger SR, Vogt L, Sonderegger P (1999). Neuronal Depolarization Enhances the Transcription of the Neuronal Serine Protease Inhibitor Neuroserpin. *Molecular and cellular neuroscience* **14**, 455–467. doi:10.1006/mcne.1999.0804

Berry KP, Nedivi E (2017). Spine dynamics: Are they all the same? *Neuron* **96**, 43–55. doi:10.1016/j.neuron.2017.08.008

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

Bharat V, Siebrecht M, Burk K, Ahmed S, Reissner C, Kohansal-Nodehi M, Steubler V, Zweckstetter M, Ting JT, Dean C (2017). Capture of Dense Core Vesicles at Synapses by JNK-Dependent Phosphorylation of Synaptotagmin-4. *Cell Reports* **21**, 2118–2133. doi:10.1016/j.celrep.2017.10.084

Biessen EA, van Teijlingen M, Vietsch H, Barrett-Bergshoeff MM, Bijsterbosch MK, Rijken DC, van Berkel TJ, Kuiper J (1997). Antagonists of the mannose receptor and the LDL receptor-related protein dramatically delay the clearance of tissue plasminogen activator. *Circulation* **95**, 46–52. doi:10.1161/01.cir.95.1.46

Binder B, Spragg J, Austen K (1979a). Purification and characterization of human vascular plasminogen activator derived from blood vessel perfusates. *Journal of biological chemistry* **254**, 1998-2003.

Binder BR, Spragg J, Austen KF (1979b). Purification and characterization of human vascular plasminogen activator derived from blood vessel perfusates. *The Journal of Biological Chemistry* **254**, 1998–2003.

Blasi F, Vassalli JD, Danø K (1987). Urokinase-type plasminogen activator: proenzyme, receptor, and inhibitors. *The Journal of Cell Biology* **104**, 801–804. doi:10.1083/jcb.104.4.801

Blasius TL, Cai D, Jih GT, Toret CP, Verhey KJ (2007). Two binding partners cooperate to activate the molecular motor Kinesin-1. *The Journal of Cell Biology* **176**, 11–17. doi:10.1083/jcb.200605099

Bliss TV, Lomo T (1973). Long-lasting potentiation of synaptic transmission in the dentate area of the anaesthetized rabbit following stimulation of the perforant path. *The Journal of Physiology* **232**, 331–356. doi:10.1113/jphysiol.1973.sp010273

Block ML, Hong J-S (2005). Microglia and inflammation-mediated neurodegeneration: multiple triggers with a common mechanism. *Progress in Neurobiology* **76**, 77–98. doi:10.1016/j.pneurobio.2005.06.004

Boeckers TM (2006). The postsynaptic density. *Cell and Tissue Research* **326**, 409–422. doi:10.1007/s00441-006-0274-5

Borgdorff AJ, Choquet D (2002). Regulation of AMPA receptor lateral movements. *Nature* **417**, 649–653. doi:10.1038/nature00780

Boulanger L, Poo MM (1999). Gating of BDNF-induced synaptic potentiation by cAMP. *Science (New York, N.Y.)* **284**, 1982–1984. doi:10.1126/science.284.5422.1982

Bouvier G, Larsen RS, Rodríguez-Moreno A, Paulsen O, Sjöström PJ (2018). Towards resolving the presynaptic NMDA receptor debate. *Current Opinion in Neurobiology* **51**, 1–7. doi:10.1016/j.conb.2017.12.020

Briens A, Bardou I, Lebas H, Miles LA, Parmer RJ, Vivien D, Docagne F (2017). Astrocytes regulate the balance between plasminogen activation and plasmin clearance via cell-surface actin. *Cell Discovery* **3**, 17001. doi:10.1038/celldisc.2017.1

Brogren H, Karlsson L, Andersson M, Wang L, Erlinge D, Jern S (2004). Platelets synthesize large amounts of active plasminogen activator inhibitor 1. *Blood* **104**, 3943–3948. doi:10.1182/blood-2004-04-1439

Browne MJ, Chapman CG, Carey JE, Dodd I (1985). Isolation of a human tissue-type plasminogen-activator genomic DNA clone and its expression in mouse L cells. *Gene* **33**, 279–284.

Brownhill K (2010). Function and regulation of kinesin-1, -2 and -3. *undefined*. Available at: https://www.semanticscholar.org/paper/Function-and-regulation-of-kinesin-1%2C-2-and-3-Brownhill/39525e9da6b2f14afd37acc6eaf62dfbd27a32d3 [accessed 3 November 2021]

Brunnbauer M, Mueller-Planitz F, Kösem S, Ho TH, Dombi R, Gebhardt JCM, Rief M, Okten Z (2010). Regulation of a heterodimeric kinesin-2 through an unprocessive motor domain that is turned processive by its partner. *Proceedings of the National Academy*

of Sciences of the United States of America **107**, 10460–10465. doi:10.1073/pnas.1005177107

Bruyère J, Abada Y-S, Vitet H, Fontaine G, Deloulme J-C, Cès A, Denarier E, Pernet-Gallay K, Andrieux A, Humbert S, Potier M-C, Delatour B, Saudou F (2020). Presynaptic APP levels and synaptic homeostasis are regulated by Akt phosphorylation of huntingtin. *eLife* **9**, e56371. doi:10.7554/eLife.56371

Buisson A, Nicole O, Docagne F, Sartelet H, Mackenzie ET, Vivien D (1998a). Up-regulation of a serine protease inhibitor in astrocytes mediates the neuroprotective activity of transforming growth factor beta1. *The FASEB journal* **12**, 1683–1691.

Buisson A, Nicole O, Docagne F, Sartelet H, Mackenzie ET, Vivien D (1998b). Up-regulation of a serine protease inhibitor in astrocytes mediates the neuroprotective activity of transforming growth factor beta1. *FASEB journal: official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* **12**, 1683–1691.

Bukhari N, Torres L, Robinson JK, Tsirka SE (2011). Axonal regrowth after spinal cord injury via chondroitinase and the tissue plasminogen activator (tPA)/plasmin system. *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience* **31**, 14931–14943. doi:10.1523/JNEUROSCI.3339-11.2011

Burns ME, Augustine GJ (1995). Synaptic structure and function: Dynamic organization yields architectural precision. *Cell* **83**, 187–194. doi:10.1016/0092-8674(95)90160-4

C

Cacquevel M, Launay S, Castel H, Benchenane K, Chéenne S, Buée L, Moons L, Delacourte A, Carmeliet P, Vivien D (2007). Ageing and amyloid-beta peptide deposition contribute to an impaired brain tissue plasminogen activator activity by different mechanisms. *Neurobiology of Disease* **27**, 164–173. doi:10.1016/j.nbd.2007.04.004

Cai D, Hoppe AD, Swanson JA, Verhey KJ (2007a). Kinesin-1 structural organization and conformational changes revealed by FRET stoichiometry in live cells. *The Journal of Cell Biology* **176**, 51–63. doi:10.1083/jcb.200605097

Cai Q, Pan P-Y, Sheng Z-H (2007b). Syntabulin-kinesin-1 family member 5B-mediated axonal transport contributes to activity-dependent presynaptic assembly. *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience* **27**, 7284–7296. doi:10.1523/JNEUROSCI.0731-07.2007

Calabresi P, Napolitano M, Centonze D, Marfia GA, Gubellini P, Teule MA, Berretta N, Bernardi G, Frati L, Tolu M, Gulino A (2000). Tissue plasminogen activator controls multiple forms of synaptic plasticity and memory. *The European Journal of Neuroscience* **12**, 1002–1012. doi:10.1046/j.1460-9568.2000.00991.x

Cane M, Maco B, Knott G, Holtmaat A (2014). The Relationship between PSD-95 Clustering and Spine Stability In Vivo. *Journal of Neuroscience* **34**, 2075–2086. doi:10.1523/JNEUROSCI.3353-13.2014

Carbone F, Vuilleumier N, Bertolotto M, Burger F, Galan K, Roversi G, Tamborino C, Casetta I, Seraceni S, Trentini A, Dallegri F, da Silva AR, Pende A, Artom N, Mach F, Coen M, Fainardi E, Montecucco F (2015). Treatment with recombinant tissue plasminogen activator (r-TPA) induces neutrophil degranulation in vitro via defined pathways. *Vascular Pharmacology* **64**, 16–27. doi:10.1016/j.vph.2014.11.007

Carlin RK, Grab DJ, Cohen RS, Siekevitz P (1980). Isolation and characterization of postsynaptic densities from various brain regions: enrichment of different types of postsynaptic densities. *The Journal of Cell Biology* **86**, 831–845. doi:10.1083/jcb.86.3.831

Carroll PM, Tsirka SE, Richards WG, Frohman MA, Strickland S (1994). The mouse tissue plasminogen activator gene 5' flanking region directs appropriate expression in development and a seizure-enhanced response in the CNS. *Development (Cambridge, England)* **120**, 3173–3183.

Cassé F, Bardou I, Danglot L, Briens A, Montagne A, Parcq J, Alahari A, Galli T, Vivien D, Docagne F (2012). Glutamate controls tPA recycling by astrocytes, which in turn influences glutamatergic signals. *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience* **32**, 5186–5199. doi:10.1523/JNEUROSCI.5296-11.2012

Centonze D, Napolitano M, Saulle E, Gubellini P, Picconi B, Martorana A, Pisani A, Gulino A, Bernardi G, Calabresi P (2002). Tissue plasminogen activator is required for corticostriatal long-term potentiation. *The European Journal of Neuroscience* **16**, 713–721. doi:10.1046/j.1460-9568.2002.02106.x

Chapman ER (2002). Synaptotagmin: a Ca(2+) sensor that triggers exocytosis? *Nature Reviews. Molecular Cell Biology* **3**, 498–508. doi:10.1038/nrm855

Charlton MP, Bittner GD (1978). Presynaptic potentials and facilitation of transmitter release in the squid giant synapse. *Journal of General Physiology* **72**, 487–511. doi:10.1085/jgp.72.4.487

Chen L, Chetkovich DM, Petralia RS, Sweeney NT, Kawasaki Y, Wenthold RJ, Bredt DS, Nicoll RA (2000). Stargazin regulates synaptic targeting of AMPA receptors by two distinct mechanisms. *Nature* **408**, 936–943. doi:10.1038/35050030

Chen YA, Scheller RH (2001). SNARE-mediated membrane fusion. *Nature Reviews. Molecular Cell Biology* **2**, 98–106. doi:10.1038/35052017

Chen ZL, Strickland S (1997). Neuronal death in the hippocampus is promoted by plasmin-catalyzed degradation of laminin. *Cell* **91**, 917–925. doi:10.1016/s0092-8674(00)80483-3

Cheng T, Petraglia AL, Li Z, Thiyagarajan M, Zhong Z, Wu Z, Liu D, Maggirwar SB, Deane R, Fernández JA, LaRue B, Griffin JH, Chopp M, Zlokovic BV (2006). Activated protein C

inhibits tissue plasminogen activator-induced brain hemorrhage. *Nature Medicine* **12**, 1278–1285. doi:10.1038/nm1498

Chevilley A, Lesept F, Lenoir S, Ali C, Parcq J, Vivien D (2015a). Impacts of tissue-type plasminogen activator (tPA) on neuronal survival. *Frontiers in Cellular Neuroscience* **9**, 415. doi:10.3389/fncel.2015.00415

Chevilley A, Lesept F, Lenoir S, Ali C, Parcq J, Vivien D (2015b). Impacts of tissue-type plasminogen activator (tPA) on neuronal survival. *Frontiers in cellular neuroscience* **9**, 415. doi:10.3389/fncel.2015.00415

Christensen LR, Macleod CM (1945). A PROTEOLYTIC ENZYME OF SERUM: CHARACTERIZATION, ACTIVATION, AND REACTION WITH INHIBITORS. *The Journal of General Physiology* **28**, 559–583. doi:10.1085/jgp.28.6.559

Chuang JZ, Milner TA, Sung CH (2001). Subunit heterogeneity of cytoplasmic dynein: Differential expression of 14 kDa dynein light chains in rat hippocampus. *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience* **21**, 5501–5512.

Chung HJ, Steinberg JP, Huganir RL, Linden DJ (2003). Requirement of AMPA receptor GluR2 phosphorylation for cerebellar long-term depression. *Science (New York, N.Y.)* **300**, 1751–1755. doi:10.1126/science.1082915

Cichon J, Gan W-B (2015). Branch-specific dendritic Ca(2+) spikes cause persistent synaptic plasticity. *Nature* **520**, 180–185. doi:10.1038/nature14251

Cinelli P, Madani R, Tsuzuki N, Vallet P, Arras M, Zhao CN, Osterwalder T, Rülicke T, Sonderegger P (2001). Neuroserpin, a neuroprotective factor in focal ischemic stroke. *Molecular and cellular neuroscience* **18**, 443–457. doi:10.1006/mcne.2001.1028

Coleman J, Inukai M, Inouye M (1985). Dual functions of the signal peptide in protein transfer across the membrane. *Cell* **43**, 351–360. doi:10.1016/0092-8674(85)90040-6

Colin E, Zala D, Liot G, Rangone H, Borrell-Pagès M, Li X-J, Saudou F, Humbert S (2008). Huntingtin phosphorylation acts as a molecular switch for anterograde/retrograde transport in neurons. *The EMBO journal* **27**, 2124–2134. doi:10.1038/emboj.2008.133

Collingridge GL, Kehl SJ, McLennan H (1983). Excitatory amino acids in synaptic transmission in the Schaffer collateral-commissural pathway of the rat hippocampus. *The Journal of Physiology* **334**, 33–46. doi:10.1113/jphysiol.1983.sp014478

Combs B, Christensen KR, Richards C, Kneynsberg A, Mueller RL, Morris SL, Morfini G, Brady ST, Kanaan NM (2021). FTLD mutant tau impairs axonal transport through a protein phosphatase 1γ-dependent mechanism. *Journal of Neuroscience*. doi:10.1523/JNEUROSCI.1914-20.2021

Conradi H (1902). Uber die Beziehung der Autolyse zur Blutgerinnung. *Beitr. Chem. Physiol. Path* **1**.

Consalez GG, Hawkes R (2012). The compartmental restriction of cerebellar interneurons. *Frontiers in Neural Circuits* **6**, 123. doi:10.3389/fncir.2012.00123

Correa F, Gauberti M, Parcq J, Macrez R, Hommet Y, Obiang P, Hernangómez M, Montagne A, Liot G, Guaza C, Maubert E, Ali C, Vivien D, Docagne F (2011a). Tissue plasminogen activator prevents white matter damage following stroke. *The Journal of Experimental Medicine* **208**, 1229–1242. doi:10.1084/jem.20101880

Correa F, Gauberti M, Parcq J, Macrez R, Hommet Y, Obiang P, Hernangómez M, Montagne A, Liot G, Guaza C, Maubert E, Ali C, Vivien D, Docagne F (2011b). Tissue plasminogen activator prevents white matter damage following stroke. *The Journal of experimental medicine* **208**, 1229–1242. doi:10.1084/jem.20101880

Coy DL, Hancock WO, Wagenbach M, Howard J (1999). Kinesin's tail domain is an inhibitory regulator of the motor domain. *Nature Cell Biology* **1**, 288–292. doi:10.1038/13001

Curtis DR, Phillis JW, Watkins JC (1959). The depression of spinal neurones by γ-amino-n-butyric acid and β-alanine. *The Journal of Physiology* **146**, 185–203. doi:10.1113/jphysiol.1959.sp006188

D

Dastre A (1893). Fibrinolyse dans le sang.

Dawidowski D, Cafiso DS (2013). Allosteric control of syntaxin 1a by Munc18-1: characterization of the open and closed conformations of syntaxin. *Biophysical Journal* **104**, 1585–1594. doi:10.1016/j.bpj.2013.02.004

Deák F, Shin O-H, Kavalali ET, Südhof TC (2006). Structural determinants of synaptobrevin 2 function in synaptic vesicle fusion. *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience* **26**, 6668–6676. doi:10.1523/JNEUROSCI.5272-05.2006

Degen SJ, Rajput B, Reich E (1986). The human tissue plasminogen activator gene. *Journal of biological chemistry* **261**, 6972–6985.

Denis P-S (1799-1863) A du texte (1838). 'Essai sur l'application de la chimie à l'étude physiologique du sang de l'homme et à l'étude physiologico-pathologique, hygiénique et thérapeutique des maladies de cette humeur : ouvrage présenté à l'Académie des sciences, le 2 janvier 1838 / par P.-S. Denis,...' Available at: https://gallica.bnf.fr/ark:/12148/bpt6k91987f [accessed 16 September 2021]

Denys J, de Marbaix H (1889). 'Les peptonisations provoque´es par le chloroforme.' Cellule.

Derr ND, Goodman BS, Jungmann R, Leschziner AE, Shih WM, Reck-Peterson SL (2012). Tug-of-war in motor protein ensembles revealed with a programmable DNA origami scaffold. *Science (New York, N.Y.)* **338**, 662–665. doi:10.1126/science.1226734

Diamond SL, Eskin SG, McIntire LV (1989). Fluid flow stimulates tissue plasminogen activator secretion by cultured human endothelial cells. *Science (New York, N.Y.)* **243**, 1483–1485. doi:10.1126/science.2467379

Docagne F, Nicole O, Marti HH, MacKenzie ET, Buisson A, Vivien D (1999a). Transforming growth factor-beta1 as a regulator of the serpins/t-PA axis in cerebral ischemia. *The FASEB journal* **13**, 1315–1324.

Docagne F, Nicole O, Marti HH, MacKenzie ET, Buisson A, Vivien D (1999b). Transforming growth factor-beta1 as a regulator of the serpins/t-PA axis in cerebral ischemia. *FASEB journal: official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* **13**, 1315–1324. doi:10.1096/fasebj.13.11.1315

Doodhi H, Ghosal D, Krishnamurthy M, Jana SC, Shamala D, Bhaduri A, Sowdhamini R, Ray K (2009). KAP, the accessory subunit of kinesin-2, binds the predicted coiled-coil stalk of the motor subunits. *Biochemistry* **48**, 2248–2260. doi:10.1021/bi8018338

Dosemeci A, Weinberg RJ, Reese TS, Tao-Cheng J-H (2016). The Postsynaptic Density: There Is More than Meets the Eye. *Frontiers in Synaptic Neuroscience* **8**, 23. doi:10.3389/fnsyn.2016.00023

Dunaevsky A, Tashiro A, Majewska A, Mason C, Yuste R (1999). Developmental regulation of spine motility in the mammalian central nervous system. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **96**, 13438–13443. doi:10.1073/pnas.96.23.13438

Dunoyer-Geindre S, Kruithof EKO (2011). Epigenetic control of tissue-type plasminogen activator synthesis in human endothelial cells. *Cardiovascular research* **90**, 457–463. doi:10.1093/cvr/cvr028

E

East E, Baker D, Pryce G, Lijnen HR, Cuzner ML, Gverić D (2005). A role for the plasminogen activator system in inflammation and neurodegeneration in the central nervous system during experimental allergic encephalomyelitis. *The American Journal of Pathology* **167**, 545–554. doi:10.1016/S0002-9440(10)62996-3

East E, Gverić D, Baker D, Pryce G, Lijnen HR, Cuzner ML (2008). Chronic relapsing experimental allergic encephalomyelitis (CREAE) in plasminogen activator inhibitor-1 knockout mice: the effect of fibrinolysis during neuroinflammation. *Neuropathology and Applied Neurobiology* **34**, 216–230. doi:10.1111/j.1365-2990.2007.00889.x

Echeverry R, Wu J, Haile WB, Guzman J, Yepes M (2010). Tissue-type plasminogen activator is a neuroprotectant in the mouse hippocampus. *The Journal of Clinical Investigation* **120**, 2194–2205. doi:10.1172/JCI41722

Eckley DM, Gill SR, Melkonian KA, Bingham JB, Goodson HV, Heuser JE, Schroer TA (1999). Analysis of dynactin subcomplexes reveals a novel actin-related protein associated

with the arp1 minifilament pointed end. *The Journal of Cell Biology* **147**, 307–320. doi:10.1083/jcb.147.2.307

Einarsson M, Brandt J, Kaplan L (1985). Large-scale purification of human tissue-type plasminogen activator using monoclonal antibodies. *Biochimica et biophysica acta* **830**, 1–10. doi:10.1016/0167-4838(85)90123-2

Elias GM, Nicoll RA (2007). Synaptic trafficking of glutamate receptors by MAGUK scaffolding proteins. *Trends in Cell Biology* **17**, 343–352. doi:10.1016/j.tcb.2007.07.005

Emeis JJ, van den Eijnden-Schrauwen Y, van den Hoogen CM, de Priester W, Westmuckett A, Lupu F (1997). An endothelial storage granule for tissue-type plasminogen activator. *The Journal of Cell Biology* **139**, 245–256. doi:10.1083/jcb.139.1.245

Encalada SE, Szpankowski L, Xia C, Goldstein LSB (2011). Stable kinesin and dynein assemblies drive the axonal transport of mammalian prion protein vesicles. *Cell* **144**, 551–565. doi:10.1016/j.cell.2011.01.021

Encell LP, Friedman Ohana R, Zimmerman K, Otto P, Vidugiris G, Wood MG, Los GV, McDougall MG, Zimprich C, Karassina N, Learish RD, Hurst R, Hartnett J, Wheeler S, Stecha P, English J, Zhao K, Mendez J, Benink HA, Murphy N, Daniels DL, Slater MR, Urh M, Darzins A, Klaubert DH, Bulleit RF, Wood KV (2012). Development of a dehalogenase-based protein fusion tag capable of rapid, selective and covalent attachment to customizable ligands. *Current Chemical Genomics* **6**, 55–71. doi:10.2174/1875397301206010055

Engert F, Bonhoeffer T (1999). Dendritic spine changes associated with hippocampal long-term synaptic plasticity. *Nature* **399**, 66–70. doi:10.1038/19978

F

Fernández-Monreal M, López-Atalaya JP, Benchenane K, Cacquevel M, Dulin F, Le Caer J-P, Rossier J, Jarrige A-C, Mackenzie ET, Colloc'h N, Ali C, Vivien D (2004a). Arginine 260 of the amino-terminal domain of NR1 subunit is critical for tissue-type plasminogen activator-mediated enhancement of N-methyl-D-aspartate receptor signaling. *The Journal of Biological Chemistry* **279**, 50850–50856. doi:10.1074/jbc.M407069200

Fernández-Monreal M, López-Atalaya JP, Benchenane K, Léveillé F, Cacquevel M, Plawinski L, MacKenzie ET, Bu G, Buisson A, Vivien D (2004b). Is tissue-type plasminogen activator a neuromodulator? *Molecular and Cellular Neuroscience* **25**, 594–601. doi:10.1016/j.mcn.2003.11.002

Fernández-Monreal M, López-Atalaya JP, Benchenane K, Léveillé F, Cacquevel M, Plawinski L, MacKenzie ET, Bu G, Buisson A, Vivien D (2004c). Is tissue-type plasminogen activator a neuromodulator? *Molecular and Cellular Neurosciences* **25**, 594–601. doi:10.1016/j.mcn.2003.11.002

Fisher R, Waller EK, Grossi G, Thompson D, Tizard R, Schleuning WD (1985). Isolation and characterization of the human tissue-type plasminogen activator structural gene including its 5' flanking region. *Journal of biological chemistry* **260**, 11223–11230.

Fitzjohn SM, Pickard L, Duckworth JK, Molnar E, Henley JM, Collingridge GL, Noël J (2001). An electrophysiological characterisation of long-term potentiation in cultured dissociated hippocampal neurones. *Neuropharmacology* **41**, 693–699. doi:10.1016/s0028-3908(01)00128-9

Flavin MP, Zhao G, Ho LT (2000). Microglial tissue plasminogen activator (tPA) triggers neuronal apoptosis in vitro. *Glia* **29**, 347–354.

Fortin DA, Davare MA, Srivastava T, Brady JD, Nygaard S, Derkach VA, Soderling TR (2010). Long-term potentiation-dependent spine enlargement requires synaptic Ca2+-permeable AMPA receptors recruited by CaM-kinase I. *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience* **30**, 11565–11575. doi:10.1523/JNEUROSCI.1746-10.2010

Foth BJ, Goedecke MC, Soldati D (2006). New insights into myosin evolution and classification. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **103**, 3681–3686. doi:10.1073/pnas.0506307103

Fredriksson L, Ehnman M, Fieber C, Eriksson U (2005). Structural Requirements for Activation of Latent Platelet-derived Growth Factor CC by Tissue Plasminogen Activator*. *Journal of biological chemistry* **280**, 26856-26862. doi:10.1074/jbc.M503388200

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

Fredriksson L, Li H, Fieber C, Li X, Eriksson U (2004b). Tissue plasminogen activator is a potent activator of PDGF-CC. *The EMBO journal* **23**, 3793–3802. doi:10.1038/sj.emboj.7600397

Frey U, Morris RG (1997). Synaptic tagging and long-term potentiation. *Nature* **385**, 533–536. doi:10.1038/385533a0

Friedman GC, Seeds NW (1995a). Tissue plasminogen activator mRNA expression in granule neurons coincides with their migration in the developing cerebellum. *The Journal of Comparative Neurology* **360**, 658–670. doi:10.1002/cne.903600410

Friedman GC, Seeds NW (1995b). Tissue plasminogen activator mRNA expression in granule neurons coincides with their migration in the developing cerebellum. *The Journal of Comparative Neurology* **360**, 658–670. doi:10.1002/cne.903600410

Fuhrmann JC, Kins S, Rostaing P, El Far O, Kirsch J, Sheng M, Triller A, Betz H, Kneussel M (2002). Gephyrin interacts with Dynein light chains 1 and 2, components of motor protein complexes. *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience* **22**, 5393–5402. doi:20026552

Fujiwara T, Mishima T, Kofuji T, Chiba T, Tanaka K, Yamamoto A, Akagawa K (2006). Analysis of knock-out mice to determine the role of HPC-1/syntaxin 1A in expressing synaptic plasticity. *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience* **26**, 5767–5776. doi:10.1523/JNEUROSCI.0289-06.2006

Gabellec M-M, Panzanelli P, Sassoè-Pognetto M, Lledo P-M (2007). Synapse-specific localization of vesicular glutamate transporters in the rat olfactory bulb. *European Journal of Neuroscience* **25**, 1373–1383. doi:10.1111/j.1460-9568.2007.05400.x

García-Rocha M, Avila J, Armas-Portela R (1994). Tissue-type plasminogen activator (tPA) is the main plasminogen activator associated with isolated rat nerve growth cones. *Neuroscience Letters* **180**, 123–126. doi:10.1016/0304-3940(94)90502-9

Garner CC, Zhai RG, Gundelfinger ED, Ziv NE (2002). Molecular mechanisms of CNS synaptogenesis. *Trends in Neurosciences* **25**, 243–250. doi:10.1016/S0166-2236(02)02152-5

Gauthier LR, Charrin BC, Borrell-Pagès M, Dompierre JP, Rangone H, Cordelières FP, De Mey J, MacDonald ME, Lessmann V, Humbert S, Saudou F (2004). Huntingtin controls neurotrophic support and survival of neurons by enhancing BDNF vesicular transport along microtubules. *Cell* **118**, 127–138. doi:10.1016/j.cell.2004.06.018

Gennerich A, Vale RD (2009). Walking the walk: how kinesin and dynein coordinate their steps. *Current Opinion in Cell Biology* **21**, 59–67. doi:10.1016/j.ceb.2008.12.002

Gepner J, Li M, Ludmann S, Kortas C, Boylan K, Iyadurai SJ, McGrail M, Hays TS (1996). Cytoplasmic dynein function is essential in Drosophila melanogaster. *Genetics* **142**, 865–878. doi:10.1093/genetics/142.3.865

Goldin M, Segal M (2003). Protein kinase C and ERK involvement in dendritic spine plasticity in cultured rodent hippocampal neurons. *The European Journal of Neuroscience* **17**, 2529–2539. doi:10.1046/j.1460-9568.2003.02694.x

Granger AJ, Nicoll RA (2014). LTD expression is independent of glutamate receptor subtype. *Frontiers in Synaptic Neuroscience* **6**, 15. doi:10.3389/fnsyn.2014.00015

Granger AJ, Shi Y, Lu W, Cerpas M, Nicoll RA (2013). LTP requires a reserve pool of glutamate receptors independent of subunit type. *Nature* **493**, 495–500. doi:10.1038/nature11775

Grutzendler J, Kasthuri N, Gan W-B (2002). Long-term dendritic spine stability in the adult cortex. *Nature* **420**, 812–816. doi:10.1038/nature01276

Gu C, Zhou W, Puthenveedu MA, Xu M, Jan YN, Jan LY (2006). The microtubule plus-end tracking protein EB1 is required for Kv1 voltage-gated K+ channel axonal targeting. *Neuron* **52**, 803–816. doi:10.1016/j.neuron.2006.10.022

Gualandris A, Jones TE, Strickland S, Tsirka SE (1996). Membrane depolarization induces calcium-dependent secretion of tissue plasminogen activator. *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience* **16**, 2220–2225.

Guedes-Dias P, Nirschl JJ, Abreu N, Tokito MK, Janke C, Magiera MM, Holzbaur ELF (2019). Kinesin-3 Responds to Local Microtubule Dynamics to Target Synaptic Cargo Delivery to the Presynapse. *Current biology: CB* **29**, 268-282.e8. doi:10.1016/j.cub.2018.11.065

Guillaud L, Setou M, Hirokawa N (2003). KIF17 dynamics and regulation of NR2B trafficking in hippocampal neurons. *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience* **23**, 131–140.

Guo X, Macleod GT, Wellington A, Hu F, Panchumarthi S, Schoenfield M, Marin L, Charlton MP, Atwood HL, Zinsmaier KE (2005). The GTPase dMiro is required for axonal transport of mitochondria to Drosophila synapses. *Neuron* **47**, 379–393. doi:10.1016/j.neuron.2005.06.027

Gveric D, Hanemaaijer R, Newcombe J, van Lent NA, Sier CF, Cuzner ML (2001). Plasminogen activators in multiple sclerosis lesions: implications for the inflammatory response and axonal damage. *Brain: A Journal of Neurology* **124**, 1978–1988. doi:10.1093/brain/124.10.1978

Gveric D, Herrera B, Petzold A, Lawrence DA, Cuzner ML (2003). Impaired fibrinolysis in multiple sclerosis: a role for tissue plasminogen activator inhibitors. *Brain: A Journal of Neurology* **126**, 1590–1598. doi:10.1093/brain/awg167

H

Hajjar KA, Jacovina AT, Chacko J (1994). An endothelial cell receptor for plasminogen/tissue plasminogen activator. I. Identity with annexin II. *Journal of biological chemistry* **269**, 21191–7.

Hammond JW, Cai D, Blasius TL, Li Z, Jiang Y, Jih GT, Meyhofer E, Verhey KJ (2009). Mammalian Kinesin-3 motors are dimeric in vivo and move by processive motility upon release of autoinhibition. *PLoS biology* **7**, e72. doi:10.1371/journal.pbio.1000072

Hanson PI, Heuser JE, Jahn R (1997). Neurotransmitter release - four years of SNARE complexes. *Current Opinion in Neurobiology* **7**, 310–315. doi:10.1016/s0959-4388(97)80057-8

Hanus C, Kochen L, tom Dieck S, Racine V, Sibarita J-B, Schuman EM, Ehlers MD (2014). Synaptic Control of Secretory Trafficking in Dendrites. *Cell Reports* **7**, 1771–1778. doi:10.1016/j.celrep.2014.05.028

Harada A, Takei Y, Kanai Y, Tanaka Y, Nonaka S, Hirokawa N (1998). Golgi vesiculation and lysosome dispersion in cells lacking cytoplasmic dynein. *The Journal of Cell Biology* **141**, 51–59. doi:10.1083/jcb.141.1.51

Harris K, Stevens J (1989). Dendritic spines of CA 1 pyramidal cells in the rat hippocampus: serial electron microscopy with reference to their biophysical characteristics. *The Journal of Neuroscience* **9**, 2982–2997. doi:10.1523/JNEUROSCI.09-08-02982.1989

Harris K, Stevens J (1988). Dendritic spines of rat cerebellar Purkinje cells: serial electron microscopy with reference to their biophysical characteristics. *The Journal of Neuroscience* **8**, 4455–4469. doi:10.1523/JNEUROSCI.08-12-04455.1988

Harris RJ, Leonard CK, Guzzetta AW, Spellman MW (1991). Tissue plasminogen activator has an O-linked fucose attached to threonine-61 in the epidermal growth factor domain. *Biochemistry* **30**, 2311–2314. doi:10.1021/bi00223a004

Hastings GA, Coleman TA, Haudenschild CC, Stefansson S, Smith EP, Barthlow R, Cherry S, Sandkvist M, Lawrence DA (1997). Neuroserpin, a brain-associated inhibitor of tissue plasminogen activator is localized primarily in neurons. Implications for the regulation of motor learning and neuronal survival. *The Journal of Biological Chemistry* **272**, 33062–33067. doi:10.1074/jbc.272.52.33062

Hedin SG (1903). On the presence of a proteolytic enzyme in the normal serum of the ox. *The Journal of Physiology* **30**, 195–201. doi:10.1113/jphysiol.1903.sp000989

Hendricks AG, Perlson E, Ross JL, Schroeder HW, Tokito M, Holzbaur ELF (2010). Motor coordination via a tug-of-war mechanism drives bidirectional vesicle transport. *Current biology: CB* **20**, 697–702. doi:10.1016/j.cub.2010.02.058

Henry VJ, Lecointre M, Laudenbach V, Ali C, Macrez R, Jullienne A, Berezowski V, Carmeliet P, Vivien D, Marret S, Gonzalez BJ, Leroux P (2013). High t-PA release by neonate brain microvascular endothelial cells under glutamate exposure affects neuronal fate. *Neurobiology of Disease* **50**, 201–208. doi:10.1016/j.nbd.2012.10.020

Hering H, Sheng M (2001). Dentritic spines : structure, dynamics and regulation. *Nature Reviews Neuroscience* **2**, 880–888. doi:10.1038/35104061

Heuser JE, Reese TS (1973). Evidence for recycling of synaptic vesicle membrane during transmitter release at the frog neuromuscular junction. *The Journal of Cell Biology* **57**, 315–344. doi:10.1083/jcb.57.2.315

Hino H, Akiyama H, Iseki E, Kato M, Kondo H, Ikeda K, Kosaka K (2001). Immunohistochemical localization of plasminogen activator inhibitor-1 in rat and human brain tissues. *Neuroscience Letters* **297**, 105–108. doi:10.1016/s0304-3940(00)01679-7

Hirokawa N, Niwa S, Tanaka Y (2010). Molecular motors in neurons: transport mechanisms and roles in brain function, development, and disease. *Neuron* **68**, 610–638. doi:10.1016/j.neuron.2010.09.039

Holleran EA, Tokito MK, Karki S, Holzbaur EL (1996). Centractin (ARP1) associates with spectrin revealing a potential mechanism to link dynactin to intracellular organelles. *The Journal of Cell Biology* **135**, 1815–1829. doi:10.1083/jcb.135.6.1815

Holmes WE, Lijnen HR, Nelles L, Kluft C, Nieuwenhuis HK, Rijken DC, Collen D (1987). Alpha 2-antiplasmin Enschede: alanine insertion and abolition of plasmin inhibitory activity. *Science (New York, N.Y.)* **238**, 209–211. doi:10.1126/science.2958938

Holtmaat A, Wilbrecht L, Knott GW, Welker E, Svoboda K (2006). Experience-dependent and cell-type-specific spine growth in the neocortex. *Nature* **441**, 979–983. doi:10.1038/nature04783

Holtmaat AJGD, Trachtenberg JT, Wilbrecht L, Shepherd GM, Zhang X, Knott GW, Svoboda K (2005). Transient and Persistent Dendritic Spines in the Neocortex In Vivo. *Neuron* **45**, 279–291. doi:10.1016/j.neuron.2005.01.003

Holzbaur ELF (2004). Motor neurons rely on motor proteins. *Trends in Cell Biology* **14**, 233–240. doi:10.1016/j.tcb.2004.03.009

Hotulainen P, Hoogenraad CC (2010). Actin in dendritic spines: connecting dynamics to function. *The Journal of Cell Biology* **189**, 619–629. doi:10.1083/jcb.201003008

Hoylaerts M, Rijken DC, Lijnen HR, Collen D (1982a). Kinetics of the activation of plasminogen by human tissue plasminogen activator. Role of fibrin. *The Journal of Biological Chemistry* **257**, 2912–2919.

Hoylaerts M, Rijken DC, Lijnen HR, Collen D (1982b). Kinetics of the activation of plasminogen by human tissue plasminogen activator. Role of fibrin. *The Journal of Biological Chemistry* **257**, 2912–2919.

Huang Y, Man H-Y, Sekine-Aizawa Y, Han Y, Juluri K, Luo H, Cheah J, Lowenstein C, Huganir RL, Snyder SH (2005). S-nitrosylation of N-ethylmaleimide sensitive factor mediates surface expression of AMPA receptors. *Neuron* **46**, 533–540. doi:10.1016/j.neuron.2005.03.028

Huang Y-S, Jung M, Sarkissian M, Richter JD (2002). N-methyl-D-aspartate receptor signaling results in Aurora kinase-catalyzed CPEB phosphorylation and alphaCaMKII mRNA polyadenylation at synapses. *The EMBO journal* **21**, 2139–2148. doi:10.1093/emboj/21.9.2139

Huang YY, Bach ME, Lipp HP, Zhuo M, Wolfer DP, Hawkins RD, Schoonjans L, Kandel ER, Godfraind JM, Mulligan R, Collen D, Carmeliet P (1996). Mice lacking the gene encoding tissue-type plasminogen activator show a selective interference with late-phase long-term potentiation in both Schaffer collateral and mossy fiber pathways. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **93**, 8699–8704. doi:10.1073/pnas.93.16.8699

Huettner JE (2003). Kainate receptors and synaptic transmission. *Progress in Neurobiology* **70**, 387–407. doi:10.1016/S0301-0082(03)00122-9

Hultman K, Tjärnlund-Wolf A, Fish RJ, Wilhelmsson U, Rydenhag B, Pekny M, Kruithof EKO, Jern C (2008). Retinoids and activation of PKC induce tissue-type plasminogen activator expression and storage in human astrocytes. *Journal of thrombosis and haemostasis: JTH* **6**, 1796–1803. doi:10.1111/j.1538-7836.2008.03084.x

I

Ichinose A, Kisiel W, Fujikawa K (1984). Proteolytic activation of tissue plasminogen activator by plasma and tissue enzymes. *FEBS letters* **175**, 412–418.

Imanishi M, Endres NF, Gennerich A, Vale RD (2006). Autoinhibition regulates the motility of the C. elegans intraflagellar transport motor OSM-3. *The Journal of Cell Biology* **174**, 931–937. doi:10.1083/jcb.200605179

Iriki A, Pavlides C, Keller A, Asanuma H (1989). Long-term potentiation in the motor cortex. *Science (New York, N.Y.)* **245**, 1385–1387. doi:10.1126/science.2551038

Ivenshitz M, Segal M (2006). Simultaneous NMDA-dependent long-term potentiation of EPSCs and long-term depression of IPSCs in cultured rat hippocampal neurons. *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience* **26**, 1199–1210. doi:10.1523/JNEUROSCI.2964-05.2006

J

Jacobsen JS, Comery TA, Martone RL, Elokdah H, Crandall DL, Oganesian A, Aschmies S, Kirksey Y, Gonzales C, Xu J, Zhou H, Atchison K, Wagner E, Zaleska MM, Das I, Arias RL, Bard J, Riddell D, Gardell SJ, Abou-Gharbia M, Robichaud A, Magolda R, Vlasuk GP, Bjornsson T, Reinhart PH, Pangalos MN (2008). Enhanced clearance of Abeta in brain by sustaining the plasmin proteolysis cascade. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **105**, 8754–8759. doi:10.1073/pnas.0710823105

Jahn R, Lang T, Südhof TC (2003). Membrane fusion. *Cell* **112**, 519–533. doi:10.1016/s0092-8674(03)00112-0

Jamison DK, Driver JW, Rogers AR, Constantinou PE, Diehl MR (2010). Two kinesins transport cargo primarily via the action of one motor: implications for intracellular transport. *Biophysical Journal* **99**, 2967–2977. doi:10.1016/j.bpj.2010.08.025

Jeanneret V, Wu F, Merino P, Torre E, Diaz A, Cheng L, Yepes M (2016). Tissue-type Plasminogen Activator (tPA) Modulates the Postsynaptic Response of Cerebral Cortical Neurons to the Presynaptic Release of Glutamate. *Frontiers in Molecular Neuroscience* **9**, 121. doi:10.3389/fnmol.2016.00121

Jeanneret V, Yepes M (2017). Tissue-type plasminogen activator is a homeostatic regulator of synaptic function in the central nervous system. *Neural Regeneration Research* **12**, 362. doi:10.4103/1673-5374.202924

Jewell JL, Oh E, Ramalingam L, Kalwat MA, Tagliabracci VS, Tackett L, Elmendorf JS, Thurmond DC (2011). Munc18c phosphorylation by the insulin receptor links cell signaling directly to SNARE exocytosis. *The Journal of Cell Biology* **193**, 185–199. doi:10.1083/jcb.201007176

Johansson M, Rocha N, Zwart W, Jordens I, Janssen L, Kuijl C, Olkkonen VM, Neefjes J (2007). Activation of endosomal dynein motors by stepwise assembly of Rab7-RILP-p150Glued, ORP1L, and the receptor betalll spectrin. *The Journal of Cell Biology* **176**, 459–471. doi:10.1083/jcb.200606077

Jovanovic JN, Czernik AJ, Fienberg AA, Greengard P, Sihra TS (2000). Synapsins as mediators of BDNF-enhanced neurotransmitter release. *Nature Neuroscience* **3**, 323–329. doi:10.1038/73888

K

Kamal A, Almenar-Queralt A, LeBlanc JF, Roberts EA, Goldstein LS (2001). Kinesin-mediated axonal transport of a membrane compartment containing beta-secretase and presenilin-1 requires APP. *Nature* **414**, 643–648. doi:10.1038/414643a

Kanai Y, Dohmae N, Hirokawa N (2004). Kinesin transports RNA: isolation and characterization of an RNA-transporting granule. *Neuron* **43**, 513–525. doi:10.1016/j.neuron.2004.07.022

Kaneko M, Sakata Y, Matsuda M, Mimuro J (1992). Interactions between the finger and kringle-2 domains of tissue-type plasminogen activator and plasminogen activator inhibitor-1. *Journal of Biochemistry* **111**, 244–248. doi:10.1093/oxfordjournals.jbchem.a123744

Kapp K, Schrempf S, Lemberg MK, Dobberstein B (2013). 'Post-Targeting Functions of Signal Peptides'. (Landes Bioscience) Available at: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK6322/ [accessed 11 November 2021]

Karki S, Holzbaur EL (1999). Cytoplasmic dynein and dynactin in cell division and intracellular transport. *Current Opinion in Cell Biology* **11**, 45–53. doi:10.1016/S0955-0674(99)80006-4

Kennedy MJ, Davison IG, Robinson CG, Ehlers MD (2010). Syntaxin-4 Defines a Domain for Activity-Dependent Exocytosis in Dendritic Spines. *Cell* **141**, 524–535. doi:10.1016/j.cell.2010.02.042

Kikkawa M (2013). Big steps toward understanding dynein. *Journal of Cell Biology* **202**, 15–23. doi:10.1083/jcb.201304099

Kim E, Sheng M (2004). PDZ domain proteins of synapses. *Nature Reviews Neuroscience* **5**, 771–781. doi:10.1038/nrn1517

Kim H-K, Lee SY, Oh H-K, Kang B-H, Ku H-J, Lee Y, Shin J-Y, Hong Y-K, Joe YA (2003). Inhibition of endothelial cell proliferation by the recombinant kringle domain of tissue-type plasminogen activator. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **304**, 740–746. doi:10.1016/s0006-291x(03)00656-9

Kim JH, Liao D, Lau L-F, Huganir RL (1998). SynGAP: a Synaptic RasGAP that Associates with the PSD-95/SAP90 Protein Family. *Neuron* **20**, 683–691. doi:10.1016/S0896-6273(00)81008-9

Kim SY, Cheon SY, Kim EJ, Lee JH, Kam EH, Kim JM, Park M, Koo B-N (2017). Isoflurane Postconditioning Inhibits tPA-Induced Matrix Metalloproteinases Activation After Hypoxic Injury via Low-Density Lipoprotein Receptor-Related Protein and Extracellular Signal-Regulated Kinase Pathway. *Neurochemical Research* **42**, 1533–1542. doi:10.1007/s11064-017-2211-2

King SJ, Brown CL, Maier KC, Quintyne NJ, Schroer TA (2003). Analysis of the dynein-dynactin interaction in vitro and in vivo. *Molecular Biology of the Cell* **14**, 5089–5097. doi:10.1091/mbc.e03-01-0025

King SM, Barbarese E, Dillman JF, Benashski SE, Do KT, Patel-King RS, Pfister KK (1998). Cytoplasmic dynein contains a family of differentially expressed light chains. *Biochemistry* **37**, 15033–15041. doi:10.1021/bi9810813

Komuro H, Yacubova E (2003). Recent advances in cerebellar granule cell migration. *Cellular and molecular life sciences: CMLS* **60**, 1084–1098. doi:10.1007/s00018-003-2248-z

Korkotian E, Segal M (2007). Morphological constraints on calcium dependent glutamate receptor trafficking into individual dendritic spine. *Cell Calcium* **42**, 41–57. doi:10.1016/j.ceca.2006.11.006

Krueger SR, Ghisu GP, Cinelli P, Gschwend TP, Osterwalder T, Wolfer DP, Sonderegger P (1997). Expression of neuroserpin, an inhibitor of tissue plasminogen activator, in the developing and adult nervous system of the mouse. *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience* **17**, 8984–8996.

Krystosek A, Seeds NW (1981). Plasminogen activator secretion by granule neurons in cultures of developing cerebellum. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **78**, 7810–7814. doi:10.1073/pnas.78.12.7810

Kuiper J, Otter M, Rijken DC, van Berkel TJ (1988). Characterization of the interaction in vivo of tissue-type plasminogen activator with liver cells. *The Journal of Biological Chemistry* **263**, 18220–18224.

Kuiper J, Van't Hof A, Otter M, Biessen EA, Rijken DC, van Berkel TJ (1996). Interaction of mutants of tissue-type plasminogen activator with liver cells: effect of domain deletions. *The Biochemical Journal* **313 (Pt 3)**, 775–780. doi:10.1042/bj3130775

Kwinter DM, Lo K, Mafi P, Silverman MA (2009). Dynactin regulates bidirectional transport of dense-core vesicles in the axon and dendrites of cultured hippocampal neurons. *Neuroscience* **162**, 1001–1010. doi:10.1016/j.neuroscience.2009.05.038

L

Lamba D, Bauer M, Huber R, Fischer S, Rudolph R, Kohnert U, Bode W (1996). The 2.3 A crystal structure of the catalytic domain of recombinant two-chain human tissue-type plasminogen activator. *Journal of Molecular Biology* **258**, 117–135. doi:10.1006/jmbi.1996.0238

Lazarov O, Morfini GA, Lee EB, Farah MH, Szodorai A, DeBoer SR, Koliatsos VE, Kins S, Lee VM-Y, Wong PC, Price DL, Brady ST, Sisodia SS (2005). Axonal transport, amyloid precursor protein, kinesin-1, and the processing apparatus: revisited. *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience* **25**, 2386–2395. doi:10.1523/JNEUROSCI.3089-04.2005

Lee H-Y, Hwang I-Y, Im H, Koh J-Y, Kim Y-H (2007). Non-proteolytic neurotrophic effects of tissue plasminogen activator on cultured mouse cerebrocortical neurons. *Journal of Neurochemistry* **101**, 1236–1247. doi:10.1111/j.1471-4159.2007.04417.x

Lee SH, Ko HM, Kwon KJ, Lee J, Han S-H, Han DW, Cheong JH, Ryu JH, Shin CY (2014). tPA regulates neurite outgrowth by phosphorylation of LRP5/6 in neural progenitor cells. *Molecular Neurobiology* **49**, 199–215. doi:10.1007/s12035-013-8511-x

Lee S-JR, Escobedo-Lozoya Y, Szatmari EM, Yasuda R (2009). Activation of CaMKII in single dendritic spines during long-term potentiation. *Nature* **458**, 299–304. doi:10.1038/nature07842

Lee SY, Kim HJ, Lee WJ, Joo SH, Jeon S-J, Kim JW, Kim HS, Han S-H, Lee J, Park SH, Cheong JH, Kim W-K, Ko KH, Shin CY (2008). Differential regulation of matrix metalloproteinase-9 and tissue plasminogen activator activity by the cyclic-AMP system in lipopolysaccharide-stimulated rat primary astrocytes. *Neurochemical Research* **33**, 2324–2334. doi:10.1007/s11064-008-9737-2

Lehigh KM, West KM, Ginty DD (2017). Retrogradely Transported TrkA Endosomes Signal Locally within Dendrites to Maintain Sympathetic Neuron Synapses. *Cell Reports* **19**, 86–100. doi:10.1016/j.celrep.2017.03.028

Lemarchand E, Gauberti M, Martinez de Lizarrondo S, Villain H, Repessé Y, Montagne A, Vivien D, Ali C, Rubio M (2015). Impact of alcohol consumption on the outcome of ischemic stroke and thrombolysis: role of the hepatic clearance of tissue-type plasminogen activator. *Stroke* **46**, 1641–1650. doi:10.1161/STROKEAHA.114.007143

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

Lemarchant S, Pruvost M, Hébert M, Gauberti M, Hommet Y, Briens A, Maubert E, Gueye Y, Féron F, Petite D, Mersel M, do Rego J-C, Vaudry H, Koistinaho J, Ali C, Agin V, Emery E, Vivien D (2014). tPA promotes ADAMTS-4-induced CSPG degradation, thereby enhancing neuroplasticity following spinal cord injury. *Neurobiology of Disease* **66**, 28–42. doi:10.1016/j.nbd.2014.02.005

Lenoir S, Varangot A, Lebouvier L, Galli T, Hommet Y, Vivien D (2019). Post-synaptic Release of the Neuronal Tissue-Type Plasminogen Activator (tPA). *Frontiers in Cellular Neuroscience* **13**, 164. doi:10.3389/fncel.2019.00164

Leonetti C, Macrez R, Pruvost M, Hommet Y, Bronsard J, Fournier A, Perrigault M, Machin I, Vivien D, Clemente D, De Castro F, Maubert E, Docagne F (2017). Tissue-type plasminogen activator exerts EGF-like chemokinetic effects on oligodendrocytes in white matter (re)myelination. *Molecular Neurodegeneration* **12**, 20. doi:10.1186/s13024-017-0160-5

Lesept F, Chevilley A, Jezequel J, Ladépêche L, Macrez R, Aimable M, Lenoir S, Bertrand T, Rubrecht L, Galea P, Lebouvier L, Petersen K-U, Hommet Y, Maubert E, Ali C, Groc L, Vivien D (2016). Tissue-type plasminogen activator controls neuronal death by raising surface dynamics of extrasynaptic NMDA receptors. *Cell Death & Disease* **7**, e2466. doi:10.1038/cddis.2016.279

Levin E, Santell L, Osborn K (1997). The expression of endothelial tissue plasminogen activator in vivo: a function defined by vessel size and anatomic location. *Journal of cell science* **110**, 139–148.

Levin EG, del Zoppo GJ (1994). Localization of tissue plasminogen activator in the endothelium of a limited number of vessels. *The American journal of pathology* **144**, 855–861.

Lev-Tov A, Pinter MJ, Burke RE (1983). Posttetanic potentiation of group Ia EPSPs: possible mechanisms for differential distribution among medial gastrocnemius motoneurons. *Journal of Neurophysiology* **50**, 379–398. doi:10.1152/jn.1983.50.2.379

Li J, Yu L, Gu X, Ma Y, Pasqualini R, Arap W, Snyder EY, Sidman RL (2013). Tissue plasminogen activator regulates Purkinje neuron development and survival. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **110**, E2410-2419. doi:10.1073/pnas.1305010110

Liang C, Ding M, Du F, Cang J, Xue Z (2016). Tissue plasminogen activator (tPA) attenuates propofol-induced apoptosis in developing hippocampal neurons. *SpringerPlus* **5**, 475. doi:10.1186/s40064-016-2091-y

Lin H, Huganir R, Liao D (2004). Temporal dynamics of NMDA receptor-induced changes in spine morphology and AMPA receptor recruitment to spines. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **316**, 501–511. doi:10.1016/j.bbrc.2004.02.086

Ling S-C, Fahrner PS, Greenough WT, Gelfand VI (2004). Transport of Drosophila fragile X mental retardation protein-containing ribonucleoprotein granules by kinesin-1 and

cytoplasmic dynein. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **101**, 17428–17433. doi:10.1073/pnas.0408114101

Liot G, Roussel BD, Lebeurrier N, Benchenane K, López-Atalaya JP, Vivien D, Ali C (2006). Tissue-type plasminogen activator rescues neurones from serum deprivation-induced apoptosis through a mechanism independent of its proteolytic activity. *Journal of Neurochemistry* **98**, 1458–1464. doi:10.1111/j.1471-4159.2006.03982.x

Lisman J, Yasuda R, Raghavachari S (2012). Mechanisms of CaMKII action in long-term potentiation. *Nature Reviews. Neuroscience* **13**, 169–182. doi:10.1038/nrn3192

Liu D, Cheng T, Guo H, Fernández JA, Griffin JH, Song X, Zlokovic BV (2004). Tissue plasminogen activator neurovascular toxicity is controlled by activated protein C. *Nature Medicine* **10**, 1379–1383. doi:10.1038/nm1122

Lledo PM, Zhang X, Südhof TC, Malenka RC, Nicoll RA (1998). Postsynaptic membrane fusion and long-term potentiation. *Science (New York, N.Y.)* **279**, 399–403. doi:10.1126/science.279.5349.399

Lo AC, Iscru E, Blum D, Tesseur I, Callaerts-Vegh Z, Buée L, De Strooper B, Balschun D, D'Hooge R (2013). Amyloid and tau neuropathology differentially affect prefrontal synaptic plasticity and cognitive performance in mouse models of Alzheimer's disease. *Journal of Alzheimer's disease: JAD* **37**, 109–125. doi:10.3233/JAD-122296

Lochner JE, Honigman LS, Grant WF, Gessford SK, Hansen AB, Silverman MA, Scalettar BA (2006). Activity-dependent release of tissue plasminogen activator from the dendritic spines of hippocampal neurons revealed by live-cell imaging. *Journal of Neurobiology* **66**, 564–577. doi:10.1002/neu.20250

Lochner JE, Kingma M, Kuhn S, Meliza CD, Cutler B, Scalettar BA (1998). Real-Time Imaging of the Axonal Transport of Granules Containing a Tissue Plasminogen Activator/Green Fluorescent Protein Hybrid Ed M Beckerle. *Molecular Biology of the Cell* **9**, 2463–2476. doi:10.1091/mbc.9.9.2463

Lockwood CJ, Schatz F (1996). A Biological Model for the Regulation of Peri-Implantational Hemostasis and Menstruation. *Journal of the society for gynecologic investigation* **3**, 159–165. doi:10.1177/107155769600300401

Lopez-Atalaya JP, Roussel BD, Levrat D, Parcq J, Nicole O, Hommet Y, Benchenane K, Castel H, Leprince J, To Van D, Bureau R, Rault S, Vaudry H, Petersen K-U, Santos JSO, Ali C, Vivien D (2008a). Toward safer thrombolytic agents in stroke: molecular requirements for NMDA receptor-mediated neurotoxicity. *Journal of cerebral blood flow and metabolism* **28**, 1212–1221. doi:10.1038/jcbfm.2008.14

Lopez-Atalaya JP, Roussel BD, Levrat D, Parcq J, Nicole O, Hommet Y, Benchenane K, Castel H, Leprince J, To Van D, Bureau R, Rault S, Vaudry H, Petersen K-U, Santos JSO, Ali C, Vivien D (2008b). Toward safer thrombolytic agents in stroke: molecular requirements for NMDA receptor-mediated neurotoxicity. *Journal of Cerebral Blood Flow and*

Metabolism: Official Journal of the International Society of Cerebral Blood Flow and Metabolism **28**, 1212–1221. doi:10.1038/jcbfm.2008.14

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

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

Louessard M, Lacroix A, Martineau M, Mondielli G, Montagne A, Lesept F, Lambolez B, Cauli B, Mothet J-P, Vivien D, Maubert E (2016). Tissue Plasminogen Activator Expression Is Restricted to Subsets of Excitatory Pyramidal Glutamatergic Neurons. *Molecular Neurobiology* **53**, 5000–5012. doi:10.1007/s12035-015-9432-7

Lu W, Bhasin M, Tsirka SE (2002). Involvement of tissue plasminogen activator in onset and effector phases of experimental allergic encephalomyelitis. *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience* **22**, 10781–10789.

Lu W, Man H, Ju W, Trimble WS, MacDonald JF, Wang YT (2001). Activation of synaptic NMDA receptors induces membrane insertion of new AMPA receptors and LTP in cultured hippocampal neurons. *Neuron* **29**, 243–254. doi:10.1016/s0896-6273(01)00194-5

M

Maas C, Tagnaouti N, Loebrich S, Behrend B, Lappe-Siefke C, Kneussel M (2006). Neuronal cotransport of glycine receptor and the scaffold protein gephyrin. *The Journal of Cell Biology* **172**, 441–451. doi:10.1083/jcb.200506066

Macrez R, Obiang P, Gauberti M, Roussel B, Baron A, Parcq J, Cassé F, Hommet Y, Orset C, Agin V, Bezin L, Berrocoso TG, Petersen KU, Montaner J, Maubert E, Vivien D, Ali C (2011). Antibodies Preventing the Interaction of Tissue-Type Plasminogen Activator With N-Methyl-d-Aspartate Receptors Reduce Stroke Damages and Extend the Therapeutic Window of Thrombolysis. *Stroke* **42**, 2315–2322. doi:10.1161/STROKEAHA.110.606293

Madani R, Hulo S, Toni N, Madani H, Steimer T, Muller D, Vassalli JD (1999). Enhanced hippocampal long-term potentiation and learning by increased neuronal expression of tissue-type plasminogen activator in transgenic mice. *The EMBO journal* **18**, 3007–3012. doi:10.1093/emboj/18.11.3007

Madani R, Kozlov S, Akhmedov A, Cinelli P, Kinter J, Lipp H-P, Sonderegger P, Wolfer DP (2003). Impaired explorative behavior and neophobia in genetically modified mice lacking or overexpressing the extracellular serine protease inhibitor neuroserpin. *Molecular and Cellular Neurosciences* **23**, 473–494. doi:10.1016/s1044-7431(03)00077-0

Majewska A, Sur M (2003). Motility of dendritic spines in visual cortex in vivo: Changes during the critical period and effects of visual deprivation. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **100**, 16024–16029. doi:10.1073/pnas.2636949100

Makarova A, Mikhailenko I, Bugge TH, List K, Lawrence DA, Strickland DK (2003). The low density lipoprotein receptor-related protein modulates protease activity in the brain by mediating the cellular internalization of both neuroserpin and neuroserpin-tissue-type plasminogen activator complexes. *Journal of biological chemistry* **278**, 50250–50258. doi:10.1074/jbc.M309150200

Makino H, Malinow R (2009). AMPA receptor incorporation into synapses during LTP: the role of lateral movement and exocytosis. *Neuron* **64**, 381–390. doi:10.1016/j.neuron.2009.08.035

Malenka RC, Bear MF (2004). LTP and LTD: an embarrassment of riches. *Neuron* **44**, 5–21. doi:10.1016/j.neuron.2004.09.012

Maletic-Savatic M, Malinow R, Svoboda K (1999). Rapid Dendritic Morphogenesis in CA1 Hippocampal Dendrites Induced by Synaptic Activity. *Science* **283**, 1923–1927. doi:10.1126/science.283.5409.1923

Malgaroli A, Tsien RW (1992). Glutamate-induced long-term potentiation of the frequency of miniature synaptic currents in cultured hippocampal neurons. *Nature* **357**, 134–139. doi:10.1038/357134a0

Man H-Y, Wang Q, Lu W-Y, Ju W, Ahmadian G, Liu L, D'Souza S, Wong TP, Taghibiglou C, Lu J, Becker LE, Pei L, Liu F, Wymann MP, MacDonald JF, Wang YT (2003). Activation of PI3-kinase is required for AMPA receptor insertion during LTP of mEPSCs in cultured hippocampal neurons. *Neuron* **38**, 611–624. doi:10.1016/s0896-6273(03)00228-9

Marcos-Contreras OA, Martinez de Lizarrondo S, Bardou I, Orset C, Pruvost M, Anfray A, Frigout Y, Hommet Y, Lebouvier L, Montaner J, Vivien D, Gauberti M (2016). Hyperfibrinolysis increases blood-brain barrier permeability by a plasmin- and bradykinin-dependent mechanism. *Blood* **128**, 2423–2434. doi:10.1182/blood-2016-03-705384

Markram H, Gerstner W, Sjöström PJ (2011). A history of spike-timing-dependent plasticity. *Frontiers in Synaptic Neuroscience* **3**, 4. doi:10.3389/fnsyn.2011.00004

Markus SM, Marzo MG, McKenney RJ (2020). New insights into the mechanism of dynein motor regulation by lissencephaly-1 Eds AP Carter, A Akhmanova. *eLife* **9**, e59737. doi:10.7554/eLife.59737

Martin AM, Kuhlmann C, Trossbach S, Jaeger S, Waldron E, Roebroek A, Luhmann HJ, Laatsch A, Weggen S, Lessmann V, Pietrzik CU (2008). The Functional Role of the Second NPXY Motif of the LRP1 β-Chain in Tissue-type Plasminogen Activator-mediated Activation of N-Methyl-D-aspartate Receptors*. *Journal of Biological Chemistry* **283**, 12004–12013. doi:10.1074/jbc.M707607200

Martineau M, Somasundaram A, Grimm JB, Gruber TD, Choquet D, Taraska JW, Lavis LD, Perrais D (2017). Semisynthetic fluorescent pH sensors for imaging exocytosis and endocytosis. *Nature Communications* **8**, 1412. doi:10.1038/s41467-017-01752-5

Matsuzaki M, Honkura N, Ellis-Davies GCR, Kasai H (2004). Structural basis of long-term potentiation in single dendritic spines. *Nature* **429**, 761–766. doi:10.1038/nature02617

Matus A, Ackermann M, Pehling G, Byers HR, Fujiwara K (1982). High actin concentrations in brain dendritic spines and postsynaptic densities. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **79**, 7590–7594. doi:10.1073/pnas.79.23.7590

Matys T, Pawlak R, Matys E, Pavlides C, McEwen BS, Strickland S (2004). Tissue plasminogen activator promotes the effects of corticotropin-releasing factor on the amygdala and anxiety-like behavior. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **101**, 16345–16350. doi:10.1073/pnas.0407355101

McMahon HT, Ushkaryov YA, Edelmann L, Link E, Binz T, Niemann H, Jahn R, Südhof TC (1993). Cellubrevin is a ubiquitous tetanus-toxin substrate homologous to a putative synaptic vesicle fusion protein. *Nature* **364**, 346–349. doi:10.1038/364346a0

Mehra A, Ali C, Parcq J, Vivien D, Docagne F (2016). The plasminogen activation system in neuroinflammation. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease* **1862**, 395–402. doi:10.1016/j.bbadis.2015.10.011

Melchor JP, Pawlak R, Strickland S (2003). The tissue plasminogen activator-plasminogen proteolytic cascade accelerates amyloid-beta (Abeta) degradation and inhibits Abeta-induced neurodegeneration. *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience* **23**, 8867–8871.

Melchor JP, Strickland S (2005). Tissue plasminogen activator in central nervous system physiology and pathology. *Thrombosis and Haemostasis* **93**, 655–660. doi:10.1160/TH04-12-0838

Mercer JA, Seperack PK, Strobel MC, Copeland NG, Jenkins NA (1991). Novel myosin heavy chain encoded by murine dilute coat colour locus. *Nature* **349**, 709–713. doi:10.1038/349709a0

Minor K, Phillips J, Seeds NW (2009). Tissue plasminogen activator promotes axonal outgrowth on CNS myelin after conditioned injury. *Journal of Neurochemistry* **109**, 706–715. doi:10.1111/j.1471-4159.2009.05977.x

Miranda E, Lomas DA (2006). Neuroserpin: a serpin to think about. *Cellular and molecular life sciences: CMLS* **63**, 709–722. doi:10.1007/s00018-005-5077-4

Mishima T, Fujiwara T, Sanada M, Kofuji T, Kanai-Azuma M, Akagawa K (2014). Syntaxin 1B, but not syntaxin 1A, is necessary for the regulation of synaptic vesicle exocytosis and of the readily releasable pool at central synapses. *PloS One* **9**, e90004. doi:10.1371/journal.pone.0090004

Mok H, Shin H, Kim S, Lee J-R, Yoon J, Kim E (2002). Association of the kinesin superfamily motor protein KIF1Balpha with postsynaptic density-95 (PSD-95), synapse-associated protein-97, and synaptic scaffolding molecule PSD-95/discs large/zona occludens-1 proteins. *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience* **22**, 5253–5258. doi:20026553

Molnár E (2011). Long-term potentiation in cultured hippocampal neurons. *Seminars in Cell & Developmental Biology* **22**, 506–513. doi:10.1016/j.semcdb.2011.07.017

Montaner J, Molina CA, Monasterio J, Abilleira S, Arenillas JF, Ribó M, Quintana M, Alvarez-Sabín J (2003). Matrix metalloproteinase-9 pretreatment level predicts intracranial hemorrhagic complications after thrombolysis in human stroke. *Circulation* **107**, 598–603. doi:10.1161/01.cir.0000046451.38849.90

Montgomery JM, Madison DV (2004). Discrete synaptic states define a major mechanism of synapse plasticity. *Trends in Neurosciences* **27**, 744–750. doi:10.1016/j.tins.2004.10.006

Morgagni G (1761). 'De sedibus et causis morborum'

Morris RG (1989). Synaptic plasticity and learning: selective impairment of learning rats and blockade of long-term potentiation in vivo by the N-methyl-D-aspartate receptor antagonist AP5. *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience* **9**, 3040–3057.

Moughamian AJ, Holzbaur ELF (2012). Synaptic vesicle distribution by conveyor belt. *Cell* **148**, 849–851. doi:10.1016/j.cell.2012.02.007

Mulkey RM, Herron CE, Malenka RC (1993). An essential role for protein phosphatases in hippocampal long-term depression. *Science (New York, N.Y.)* **261**, 1051–1055. doi:10.1126/science.8394601

Muresan Z, Muresan V (2005). c-Jun NH2-terminal kinase-interacting protein-3 facilitates phosphorylation and controls localization of amyloid-beta precursor protein. *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience* **25**, 3741–3751. doi:10.1523/JNEUROSCI.0152-05.2005

N

Nabavi S, Fox R, Proulx CD, Lin JY, Tsien RY, Malinow R (2014). Engineering a memory with LTD and LTP. *Nature* **511**, 348–352. doi:10.1038/nature13294

Nabb AT, Bentley M (2021). NgCAM and VAMP2 Reveal that Direct Delivery and Dendritic Degradation Maintain Axonal Polarity. *Molecular Biology of the Cell*, mbcE21080425. doi:10.1091/mbc.E21-08-0425

Nagaoka MR, Strital E, Kouyoumdjian M, Borges DR (2002). Participation of a galectin-dependent mechanism in the hepatic clearance of tissue-type plasminogen activator

and plasma kallikrein. *Thrombosis Research* **108**, 257–262. doi:10.1016/s0049-3848(02)00393-6

Nash JE, Appleby VJ, Corrêa SAL, Wu H, Fitzjohn SM, Garner CC, Collingridge GL, Molnár E (2010). Disruption of the interaction between myosin VI and SAP97 is associated with a reduction in the number of AMPARs at hippocampal synapses. *Journal of Neurochemistry* **112**, 677–690. doi:10.1111/j.1471-4159.2009.06480.x

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

Nicoll RA, Kauer JA, Malenka RC (1988). The current excitement in long term potentiation. *Neuron* **1**, 97–103. doi:10.1016/0896-6273(88)90193-6

NINDS (1995). Tissue Plasminogen Activator for Acute Ischemic Stroke. *New England Journal of Medicine* **333**, 1581–1588. doi:10.1056/NEJM199512143332401

Niwa S, Tanaka Y, Hirokawa N (2008). KIF1Bbeta- and KIF1A-mediated axonal transport of presynaptic regulator Rab3 occurs in a GTP-dependent manner through DENN/MADD. *Nature Cell Biology* **10**, 1269–1279. doi:10.1038/ncb1785

O

Obiang P, Macrez R, Jullienne A, Bertrand T, Lesept F, Ali C, Maubert E, Vivien D, Agin V (2012). GluN2D subunit-containing NMDA receptors control tissue plasminogen activator-mediated spatial memory. *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience* **32**, 12726–12734. doi:10.1523/JNEUROSCI.6202-11.2012

Obiang P, Maubert E, Bardou I, Nicole O, Launay S, Bezin L, Vivien D, Agin V (2011). Enriched housing reverses age-associated impairment of cognitive functions and tPA-dependent maturation of BDNF. *Neurobiology of Learning and Memory* **96**, 121–129. doi:10.1016/j.nlm.2011.03.004

Oh MC, Derkach VA (2005). Dominant role of the GluR2 subunit in regulation of AMPA receptors by CaMKII. *Nature Neuroscience* **8**, 853–854. doi:10.1038/nn1476

Ohashi S, Koike K, Omori A, Ichinose S, Ohara S, Kobayashi S, Sato T-A, Anzai K (2002). Identification of mRNA/protein (mRNP) complexes containing Puralpha, mStaufen, fragile X protein, and myosin Va and their association with rough endoplasmic reticulum equipped with a kinesin motor. *The Journal of Biological Chemistry* **277**, 37804–37810. doi:10.1074/jbc.M203608200

Okada Y, Yamazaki H, Sekine-Aizawa Y, Hirokawa N (1995). The neuron-specific kinesin superfamily protein KIF1A is a unique monomeric motor for anterograde axonal transport of synaptic vesicle precursors. *Cell* **81**, 769–780. doi:10.1016/0092-8674(95)90538-3

Olenick MA, Dominguez R, Holzbaur ELF (2018). Dynein activator Hook1 is required for trafficking of BDNF-signaling endosomes in neurons. *Journal of Cell Biology* **218**, 220–233. doi:10.1083/jcb.201805016

Olenick MA, Holzbaur ELF (2019). Dynein activators and adaptors at a glance. *Journal of Cell Science* **132**, jcs227132. doi:10.1242/jcs.227132

Olenick MA, Tokito M, Boczkowska M, Dominguez R, Holzbaur ELF (2016). Hook Adaptors Induce Unidirectional Processive Motility by Enhancing the Dynein-Dynactin Interaction. *The Journal of Biological Chemistry* **291**, 18239–18251. doi:10.1074/jbc.M116.738211

Olsson M, Hultman K, Dunoyer-Geindre S, Curtis MA, Faull RLM, Kruithof EKO, Jern C (2016). Epigenetic Regulation of Tissue-Type Plasminogen Activator in Human Brain Tissue and Brain-Derived Cells. *Gene regulation and systems biology* **10**, 9–13. doi:10.4137/GRSB.S30241

Opazo P, Choquet D (2011). A three-step model for the synaptic recruitment of AMPA receptors. *Molecular and Cellular Neurosciences* **46**, 1–8. doi:10.1016/j.mcn.2010.08.014

Opazo P, Labrecque S, Tigaret CM, Frouin A, Wiseman PW, De Koninck P, Choquet D (2010). CaMKII triggers the diffusional trapping of surface AMPARs through phosphorylation of stargazin. *Neuron* **67**, 239–252. doi:10.1016/j.neuron.2010.06.007

Orth K, Willnow T, Herz J, Gething MJ, Sambrook J (1994). Low density lipoprotein receptor-related protein is necessary for the internalization of both tissue-type plasminogen activator-inhibitor complexes and free tissue-type plasminogen activator. *The Journal of Biological Chemistry* **269**, 21117–21122.

Ortiz-Zapater E, Peiró S, Roda O, Corominas JM, Aguilar S, Ampurdanés C, Real FX, Navarro P (2007). Tissue plasminogen activator induces pancreatic cancer cell proliferation by a non-catalytic mechanism that requires extracellular signal-regulated kinase 1/2 activation through epidermal growth factor receptor and annexin A2. *The American Journal of Pathology* **170**, 1573–1584. doi:10.2353/ajpath.2007.060850

Österlund B, Andersson B, Häggmark S, Jern C, Johansson G, Seeman-Lodding H, Biber B (2002). Myocardial ischemia induces coronary t-PA release in the pig. *Acta Anaesthesiologica Scandinavica* **46**, 271–278. doi:10.1034/j.1399-6576.2002.t01-1-460308.x

Osterwalder T, Contartese J, Stoeckli ET, Kuhn TB, Sonderegger P (1996a). Neuroserpin, an axonally secreted serine protease inhibitor. *The EMBO journal* **15**, 2944–2953.

Osterwalder T, Contartese J, Stoeckli ET, Kuhn TB, Sonderegger P (1996b). Neuroserpin, an axonally secreted serine protease inhibitor. *The EMBO journal* **15**, 2944–2953.

Ovtscharoff W, Segal M, Goldin M, Helmeke C, Kreher U, Greenberger V, Herzog A, Michaelis B, Braun K (2008). Electron microscopic 3D-reconstruction of dendritic spines in

cultured hippocampal neurons undergoing synaptic plasticity. *Developmental Neurobiology* **68**, 870–876. doi:10.1002/dneu.20627

P

Palay SL, Palade GE (1955). THE FINE STRUCTURE OF NEURONS. *The Journal of Biophysical and Biochemical Cytology* **1**, 69–88.

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

Pang PT, Teng HK, Zaitsev E, Woo NT, Sakata K, Zhen S, Teng KK, Yung W-H, Hempstead BL, Lu B (2004). Cleavage of proBDNF by tPA/plasmin is essential for long-term hippocampal plasticity. *Science (New York, N.Y.)* **306**, 487–491. doi:10.1126/science.1100135

Pang ZP, Südhof TC (2010). Cell biology of Ca2+-triggered exocytosis. *Current Opinion in Cell Biology* **22**, 496–505. doi:10.1016/j.ceb.2010.05.001

Parcq J, Bertrand T, Baron AF, Hommet Y, Anglès-Cano E, Vivien D (2013). Molecular requirements for safer generation of thrombolytics by bioengineering the tissue-type plasminogen activator A chain. *Journal of Thrombosis and Haemostasis* **11**, 539–546. doi:10.1111/jth.12128

Parcq J, Bertrand T, Montagne A, Baron AF, Macrez R, Billard JM, Briens A, Hommet Y, Wu J, Yepes M, Lijnen HR, Dutar P, Anglés-Cano E, Vivien D (2012a). Unveiling an exceptional zymogen: the single-chain form of tPA is a selective activator of NMDA receptor-dependent signaling and neurotoxicity. *Cell Death and Differentiation* **19**, 1983–1991. doi:10.1038/cdd.2012.86

Parcq J, Bertrand T, Montagne A, Baron AF, Macrez R, Billard JM, Briens A, Hommet Y, Wu J, Yepes M, Lijnen HR, Dutar P, Anglés-Cano E, Vivien D (2012b). Unveiling an exceptional zymogen: the single-chain form of tPA is a selective activator of NMDA receptor-dependent signaling and neurotoxicity. *Cell Death and Differentiation* **19**, 1983–1991. doi:10.1038/cdd.2012.86

Park L, Zhou J, Koizumi K, Wang G, Anfray A, Ahn SJ, Seo J, Zhou P, Zhao L, Paul S, Anrather J, Iadecola C (2020). tPA Deficiency Underlies Neurovascular Coupling Dysfunction by Amyloid-β. *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience* **40**, 8160–8173. doi:10.1523/JNEUROSCI.1140-20.2020

Park M, Penick EC, Edwards JG, Kauer JA, Ehlers MD (2004). Recycling endosomes supply AMPA receptors for LTP. *Science (New York, N.Y.)* **305**, 1972–1975. doi:10.1126/science.1102026

Park M, Salgado JM, Ostroff L, Helton TD, Robinson CG, Harris KM, Ehlers MD (2006). Plasticity-induced growth of dendritic spines by exocytic trafficking from recycling endosomes. *Neuron* **52**, 817–830. doi:10.1016/j.neuron.2006.09.040

Parmer RJ, Mahata M, Mahata S, Sebald MT, O'Connor DT, Miles LA (1997). Tissue plasminogen activator (t-PA) is targeted to the regulated secretory pathway. Catecholamine storage vesicles as a reservoir for the rapid release of t-PA. *The Journal of Biological Chemistry* **272**, 1976–1982. doi:10.1074/jbc.272.3.1976

Paschal BM, Mikami A, Pfister KK, Vallee RB (1992). Homology of the 74-kD cytoplasmic dynein subunit with a flagellar dynein polypeptide suggests an intracellular targeting function. *The Journal of Cell Biology* **118**, 1133–1143. doi:10.1083/jcb.118.5.1133

Pasquet N, Douceau S, Naveau M, Lesept F, Louessard M, Lebouvier L, Hommet Y, Vivien D, Bardou I (2019). Tissue-Type Plasminogen Activator Controlled Corticogenesis Through a Mechanism Dependent of NMDA Receptors Expressed on Radial Glial Cells. *Cerebral Cortex* **29**, 2482–2498. doi:10.1093/cercor/bhy119

Pastural E, Barrat FJ, Dufourcq-Lagelouse R, Certain S, Sanal O, Jabado N, Seger R, Griscelli C, Fischer A, de Saint Basile G (1997). Griscelli disease maps to chromosome 15q21 and is associated with mutations in the myosin-Va gene. *Nature Genetics* **16**, 289–292. doi:10.1038/ng0797-289

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

Pawlak R, Nagai N, Urano T, Napiorkowska-Pawlak D, Ihara H, Takada Y, Collen D, Takada A (2002). Rapid, specific and active site-catalyzed effect of tissue-plasminogen activator on hippocampus-dependent learning in mice. *Neuroscience* **113**, 995–1001. doi:10.1016/s0306-4522(02)00166-5

Penfield W, Milner B (1958). Memory deficit produced by bilateral lesions in the hippocampal zone. *A.M.A. Archives of Neurology and Psychiatry* **79**, 475–497. doi:10.1001/archneurpsyc.1958.02340050003001

Pennica D, Holmes WE, Kohr WJ, Harkins RN, Vehar G a, Ward C a, Bennet WF, Yelverton E, Seeburg PH, Heynecker HL, Goeddel D V, Collen D (1983a). Cloning and expression of human tissu-type plasminogen activator cDNA in E.coli. *Nature* **301**, 214–221. doi:10.1038/301214a0

Pennica D, Holmes WE, Kohr WJ, Harkins RN, Vehar GA, Ward CA, Bennett WF, Yelverton E, Seeburg PH, Heyneker HL, Goeddel DV, Collen D (1983b). Cloning and expression of human tissue-type plasminogen activator cDNA in E. coli. *Nature* **301**, 214–221. doi:10.1038/301214a0

Petersen LC, Johannessen M, Foster D, Kumar A, Mulvihill E (1988). The effect of polymerised fibrin on the catalytic activities of one-chain tissue-type plasminogen activator as revealed by an analogue resistant to plasmin cleavage. *Biochimica Et Biophysica Acta* **952**, 245–254. doi:10.1016/0167-4838(88)90123-9

Pfister KK, Fisher EMC, Gibbons IR, Hays TS, Holzbaur ELF, McIntosh JR, Porter ME, Schroer TA, Vaughan KT, Witman GB, King SM, Vallee RB (2005). Cytoplasmic dynein nomenclature. *Journal of Cell Biology* **171**, 411–413. doi:10.1083/jcb.200508078

Philippidou P, Valdez G, Akmentin W, Bowers WJ, Federoff HJ, Halegoua S (2011). Trk retrograde signaling requires persistent, Pincher-directed endosomes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **108**, 852–857. doi:10.1073/pnas.1015981108

Pickard L, Noël J, Duckworth JK, Fitzjohn SM, Henley JM, Collingridge GL, Molnar E (2001). Transient synaptic activation of NMDA receptors leads to the insertion of native AMPA receptors at hippocampal neuronal plasma membranes. *Neuropharmacology* **41**, 700–713. doi:10.1016/s0028-3908(01)00127-7

Pittman RN, Ivins JK, Buettner HM (1989). Neuronal plasminogen activators: cell surface binding sites and involvement in neurite outgrowth. *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience* **9**, 4269–4286.

Plow EF, Herren T, Redlitz A, Miles LA, Hoover-Plow JL (1995). The cell biology of the plasminogen system. *FASEB journal: official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* **9**, 939–945. doi:10.1096/fasebj.9.10.7615163

Pohl G, Källström M, Bergsdorf N, Wallén P, Jörnvall H (1984). Tissue plasminogen activator: peptide analyses confirm an indirectly derived amino acid sequence, identify the active site serine residue, establish glycosylation sites, and localize variant differences. *Biochemistry* **23**, 3701–3707. doi:10.1021/bi00311a020

Polavarapu R, Gongora MC, Yi H, Ranganthan S, Lawrence DA, Strickland D, Yepes M (2007). Tissue-type plasminogen activator-mediated shedding of astrocytic low-density lipoprotein receptor-related protein increases the permeability of the neurovascular unit. *Blood* **109**, 3270–3278. doi:10.1182/blood-2006-08-043125

Purves D, Augustine GJ, Fitzpatrick D, Coquery J-M, Tajeddine N, Gailly P, Volterra A, Jeannerod M (2015). 'Neurosciences'. (De Boeck Supérieur: Louvain-la-Neuve)

Q

Qian Z, Gilbert ME, Colicos MA, Kandel ER, Kuhl D (1993a). Tissue-plasminogen activator is induced as an immediate–early gene during seizure, kindling and long-term potentiation. *Nature* **361**, 453–457.

Qian Z, Gilbert ME, Colicos MA, Kandel ER, Kuhl D (1993b). Tissue-plasminogen activator is induced as an immediate–early gene during seizure, kindling and long-term potentiation. *Nature* **361**, 453–457. doi:10.1038/361453a0

R

Rai AK, Rai A, Ramaiya AJ, Jha R, Mallik R (2013). Molecular adaptations allow dynein to generate large collective forces inside cells. *Cell* **152**, 172–182. doi:10.1016/j.cell.2012.11.044

Rathore YS, Rehan M, Pandey K, Sahni G, Ashish (2012). First structural model of full-length human tissue-plasminogen activator: a SAXS data-based modeling study. *The journal of physical chemistry. B* **116**, 496–502. doi:10.1021/jp207243n

Reck-Peterson SL, Yildiz A, Carter AP, Gennerich A, Zhang N, Vale RD (2006). Single-molecule analysis of dynein processivity and stepping behavior. *Cell* **126**, 335–348. doi:10.1016/j.cell.2006.05.046

Reis GF, Yang G, Szpankowski L, Weaver C, Shah SB, Robinson JT, Hays TS, Danuser G, Goldstein LSB (2012). Molecular motor function in axonal transport in vivo probed by genetic and computational analysis in Drosophila. *Molecular Biology of the Cell* **23**, 1700–1714. doi:10.1091/mbc.E11-11-0938

Rice S, Lin AW, Safer D, Hart CL, Naber N, Carragher BO, Cain SM, Pechatnikova E, Wilson-Kubalek EM, Whittaker M, Pate E, Cooke R, Taylor EW, Milligan RA, Vale RD (1999). A structural change in the kinesin motor protein that drives motility. *Nature* **402**, 778–784. doi:10.1038/45483

Richards DA, Mateos JM, Hugel S, de Paola V, Caroni P, Gahwiler BH, McKinney RA (2005). Glutamate induces the rapid formation of spine head protrusions in hippocampal slice cultures. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **102**, 6166–6171. doi:10.1073/pnas.0501881102

Rijken DC, Collen D (1981a). Purification and characterization of the plasminogen activator secreted by human melanoma cells in culture. *The Journal of Biological Chemistry* **256**, 7035–7041.

Rijken DC, Collen D (1981b). Purification and characterization of the plasminogen activator secreted by human melanoma cells in culture. *Journal of biological chemistry* **256**, 7035–41.

Rijken DC, Hoylaerts M, Collen D (1982). Fibrinolytic properties of one-chain and two-chain human extrinsic (tissue-type) plasminogen activator. *The Journal of Biological Chemistry* **257**, 2920–2925.

Rijken DC, Lijnen HR (2009). New insights into the molecular mechanisms of the fibrinolytic system. *Journal of thrombosis and haemostasis: JTH* **7**, 4–13. doi:10.1111/j.1538-7836.2008.03220.x

Rijken DC, Wijngaards G, Zaal-de Jong M, Welbergen J (1979). Purification and partial characterization of plasminogen activator from human uterine tissue. *Biochimica Et Biophysica Acta* **580**, 140–153. doi:10.1016/0005-2795(79)90205-8

Roberts AJ, Kon T, Knight PJ, Sutoh K, Burgess SA (2013). Functions and mechanics of dynein motor proteins. *Nature Reviews. Molecular Cell Biology* **14**, 713–726. doi:10.1038/nrm3667

Rogove A, Siao C, Keyt B, Strickland S, Tsirka S (1999a). Activation of microglia reveals a non-proteolytic cytokine function for tissue plasminogen activator in the central nervous system. *Journal of cell science* **112**, 4007–4016.

Rogove AD, Siao C, Keyt B, Strickland S, Tsirka SE (1999b). Activation of microglia reveals a non-proteolytic cytokine function for tissue plasminogen activator in the central nervous system. *Journal of Cell Science* **112 (Pt 22)**, 4007–4016.

Rosell A, Cuadrado E, Ortega-Aznar A, Hernández-Guillamon M, Lo EH, Montaner J (2008). MMP-9-positive neutrophil infiltration is associated to blood-brain barrier breakdown and basal lamina type IV collagen degradation during hemorrhagic transformation after human ischemic stroke. *Stroke* **39**, 1121–1126. doi:10.1161/STROKEAHA.107.500868

Rouf SA, Moo-Young M, Chisti Y (1996a). Tissue-type plasminogen activator: Characteristics, applications and production technology. *Biotechnology advances* **14**, 239–266.

Rouf SA, Moo-Young M, Chisti Y (1996b). Tissue-type plasminogen activator: characteristics, applications and production technology. *Biotechnology Advances* **14**, 239–266. doi:10.1016/0734-9750(96)00019-5

S

Sakurai M (1987). Synaptic modification of parallel fibre-Purkinje cell transmission in in vitro guinea-pig cerebellar slices. *The Journal of Physiology* **394**, 463–480. doi:10.1113/jphysiol.1987.sp016881

Sala C, Piëch V, Wilson NR, Passafaro M, Liu G, Sheng M (2001). Regulation of Dendritic Spine Morphology and Synaptic Function by Shank and Homer. *Neuron* **31**, 115–130. doi:10.1016/S0896-6273(01)00339-7

Salles FJ, Strickland S (2002). Localization and regulation of the tissue plasminogen activator-plasmin system in the hippocampus. *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience* **22**, 2125–2134.

Samson AL, Medcalf RL (2006). Tissue-type plasminogen activator: a multifaceted modulator of neurotransmission and synaptic plasticity. *Neuron* **50**, 673–678. doi:10.1016/j.neuron.2006.04.013

Samson AL, Nevin ST, Croucher D, Niego B, Daniel PB, Weiss TW, Moreno E, Monard D, Lawrence DA, Medcalf RL (2008a). Tissue-type plasminogen activator requires a co-receptor to enhance NMDA receptor function. *Journal of Neurochemistry* **107**, 1091–1101. doi:10.1111/j.1471-4159.2008.05687.x

Samson AL, Nevin ST, Croucher D, Niego B, Daniel PB, Weiss TW, Moreno E, Monard D, Lawrence DA, Medcalf RL (2008b). Tissue-type plasminogen activator requires a co-receptor to enhance N-Methyl-D-Aspartate receptor function. *Journal of neurochemistry* **107**, 1091–1101. doi:10.1111/j.1471-4159.2008.05687.x

Sanacora G, Zarate CA, Krystal JH, Manji HK (2008). Targeting the glutamatergic system to develop novel, improved therapeutics for mood disorders. *Nature Reviews Drug Discovery* **7**, 426–437. doi:10.1038/nrd2462

Sanrattana W, Maas C, de Maat S (2019). SERPINs—From Trap to Treatment. *Frontiers in Medicine* **6**, 25. doi:10.3389/fmed.2019.00025

Santschi L, Reyes-Harde M, Stanton PK (1999a). Chemically Induced, Activity-Independent LTD Elicited by Simultaneous Activation of PKG and Inhibition of PKA. *Journal of Neurophysiology* **82**, 1577–1589. doi:10.1152/jn.1999.82.3.1577

Santschi L, Reyes-Harde M, Stanton PK (1999b). Chemically induced, activity-independent LTD elicited by simultaneous activation of PKG and inhibition of PKA. *Journal of Neurophysiology* **82**, 1577–1589. doi:10.1152/jn.1999.82.3.1577

Sappino AP, Madani R, Huarte J, Belin D, Kiss JZ, Wohlwend A, Vassalli JD (1993a). Extracellular proteolysis in the adult murine brain. *The Journal of Clinical Investigation* **92**, 679–685. doi:10.1172/JCI116637

Sappino AP, Madani R, Huarte J, Belin D, Kiss JZ, Wohlwend A, Vassalli JD (1993b). Extracellular proteolysis in the adult murine brain. *The Journal of Clinical Investigation* **92**, 679–685. doi:10.1172/JCI116637

Satoh D, Sato D, Tsuyama T, Saito M, Ohkura H, Rolls MM, Ishikawa F, Uemura T (2008). Spatial control of branching within dendritic arbors by dynein-dependent transport of Rab5-endosomes. *Nature Cell Biology* **10**, 1164–1171. doi:10.1038/ncb1776

Scannevin RH, Huganir RL (2000). Postsynaptic organisation and regulation of excitatory synapses. *Nature Reviews Neuroscience* **1**, 133–141. doi:10.1038/35039075

Schafer DA, Gill SR, Cooper JA, Heuser JE, Schroer TA (1994). Ultrastructural analysis of the dynactin complex: an actin-related protein is a component of a filament that resembles F-actin. *The Journal of Cell Biology* **126**, 403–412. doi:10.1083/jcb.126.2.403

Schikorski T, Stevens CF (1997). Quantitative Ultrastructural Analysis of Hippocampal Excitatory Synapses. *The Journal of Neuroscience* **17**, 5858–5867. doi:10.1523/JNEUROSCI.17-15-05858.1997

Schindowski K, Bretteville A, Leroy K, Bégard S, Brion J-P, Hamdane M, Buée L (2006). Alzheimer's disease-like tau neuropathology leads to memory deficits and loss of functional synapses in a novel mutated tau transgenic mouse without any motor deficits. *The American Journal of Pathology* **169**, 599–616. doi:10.2353/ajpath.2006.060002

Schlager MA, Kapitein LC, Grigoriev I, Burzynski GM, Wulf PS, Keijzer N, de Graaff E, Fukuda M, Shepherd IT, Akhmanova A, Hoogenraad CC (2010). Pericentrosomal targeting of Rab6 secretory vesicles by Bicaudal-D-related protein 1 (BICDR-1) regulates neuritogenesis. *The EMBO journal* **29**, 1637–1651. doi:10.1038/emboj.2010.51

Schoch S, Deák F, Königstorfer A, Mozhayeva M, Sara Y, Südhof TC, Kavalali ET (2001). SNARE function analyzed in synaptobrevin/VAMP knockout mice. *Science (New York, N.Y.)* **294**, 1117–1122. doi:10.1126/science.1064335

Schreiber SS, Tan Z, Sun N, Wang L, Zlokovic B V (1998). Immunohistochemical localization of tissue plasminogen activator in vascular endothelium of stroke-prone regions of the rat brain. *Neurosurgery* **43**, 909–913.

Schrimpf SP, Bleiker AJ, Brecevic L, Kozlov SV, Berger P, Osterwalder T, Krueger SR, Schinzel A, Sonderegger P (1997). Human neuroserpin (PI12): cDNA cloning and chromosomal localization to 3q26. *Genomics* **40**, 55–62. doi:10.1006/geno.1996.4514

Schroer TA (2004). Dynactin. *Annual Review of Cell and Developmental Biology* **20**, 759–779. doi:10.1146/annurev.cellbio.20.012103.094623

Scoville WB, Milner B (1957). Loss of recent memory after bilateral hippocampal lesions. *Journal of Neurology, Neurosurgery, and Psychiatry* **20**, 11–21. doi:10.1136/jnnp.20.1.11

Seeds NW, Basham ME, Haffke SP (1999). Neuronal migration is retarded in mice lacking the tissue plasminogen activator gene. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **96**, 14118–14123. doi:10.1073/pnas.96.24.14118

Seeds NW, Verrall S, Friedman G, Hayden S, Gadotti D, Haffke S, Christensen K, Gardner B, McGuire P, Krystosek A (1992). Plasminogen activators and plasminogen activator inhibitors in neural development. *Annals of the New York Academy of Sciences* **667**, 32–40. doi:10.1111/j.1749-6632.1992.tb51592.x

Seeds NW, Williams BL, Bickford PC (1995). Tissue plasminogen activator induction in Purkinje neurons after cerebellar motor learning. *Science (New York, N.Y.)* **270**, 1992–1994. doi:10.1126/science.270.5244.1992

Setou M, Nakagawa T, Seog DH, Hirokawa N (2000). Kinesin superfamily motor protein KIF17 and mLin-10 in NMDA receptor-containing vesicle transport. *Science (New York, N.Y.)* **288**, 1796–1802. doi:10.1126/science.288.5472.1796

Setou M, Seog D-H, Tanaka Y, Kanai Y, Takei Y, Kawagishi M, Hirokawa N (2002). Glutamate-receptor-interacting protein GRIP1 directly steers kinesin to dendrites. *Nature* **417**, 83–87. doi:10.1038/nature743

Shahi K, Baudry M (1993). Glycine-induced changes in synaptic efficacy in hippocampal slices involve changes in AMPA receptors. *Brain Research* **627**, 261–266. doi:10.1016/0006-8993(93)90329-l

Sharma K, Fong DK, Craig AM (2006). Postsynaptic protein mobility in dendritic spines: long-term regulation by synaptic NMDA receptor activation. *Molecular and Cellular Neurosciences* **31**, 702–712. doi:10.1016/j.mcn.2006.01.010

Shin CY, Kundel M, Wells DG (2004a). Rapid, activity-induced increase in tissue plasminogen activator is mediated by metabotropic glutamate receptor-dependent mRNA translation. *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience* **24**, 9425–9433. doi:10.1523/JNEUROSCI.2457-04.2004

Shin CY, Kundel M, Wells DG (2004b). Rapid, Activity-Induced Increase in Tissue Plasminogen Activator Is Mediated by Metabotropic Glutamate Receptor-Dependent mRNA Translation. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* **24**, 9425–9433. doi:10.1523/JNEUROSCI.2457-04.2004

Siao C-J, Fernandez SR, Tsirka SE (2003a). Cell type-specific roles for tissue plasminogen activator released by neurons or microglia after excitotoxic injury. *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience* **23**, 3234–3242.

Siao C-J, Fernandez SR, Tsirka SE (2003b). Cell type-specific roles for tissue plasminogen activator released by neurons or microglia after excitotoxic injury. *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience* **23**, 3234–3242.

Siao C-J, Tsirka SE (2002). Tissue plasminogen activator mediates microglial activation via its finger domain through annexin II. *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience* **22**, 3352–3358. doi:20026281

Siddiqui N, Zwetsloot AJ, Bachmann A, Roth D, Hussain H, Brandt J, Kaverina I, Straube A (2019). PTPN21 and Hook3 relieve KIF1C autoinhibition and activate intracellular transport. *Nature Communications* **10**, 2693. doi:10.1038/s41467-019-10644-9

Sillaber C, Baghestanian M, Bevec D, Willheim M, Agis H, Kapiotis S, Füreder W, Bankl HC, Kiener HP, Speiser W, Binder BR, Lechner K, Valent P (1999). The mast cell as site of tissue-type plasminogen activator expression and fibrinolysis. *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)* **162**, 1032–1041.

Silverman J, Muir WW (1993). A review of laboratory animal anesthesia with chloral hydrate and chloralose. *Laboratory Animal Science* **43**, 210–216.

Silverman MA, Johnson S, Gurkins D, Farmer M, Lochner JE, Rosa P, Scalettar BA (2005). Mechanisms of Transport and Exocytosis of Dense-Core Granules Containing Tissue Plasminogen Activator in Developing Hippocampal Neurons. *The Journal of Neuroscience* **25**, 3095–3106. doi:10.1523/JNEUROSCI.4694-04.2005

Smith BO, Downing AK, Driscoll PC, Dudgeon TJ, Campbelll D (1995). The solution structure and backbone dynamics of the fibronectin type I and epidermal growth factor-like pair of modules of tissue-type plasminogen activator. *Structure* **3**, 823–833.

Söllner T, Bennett MK, Whiteheart SW, Scheller RH, Rothman JE (1993). A protein assembly-disassembly pathway in vitro that may correspond to sequential steps of synaptic

vesicle docking, activation, and fusion. *Cell* **75**, 409–418. doi:10.1016/0092-8674(93)90376-2

Soppina V, Rai AK, Ramaiya AJ, Barak P, Mallik R (2009). Tug-of-war between dissimilar teams of microtubule motors regulates transport and fission of endosomes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **106**, 19381–19386. doi:10.1073/pnas.0906524106

Soreq H, Miskin R (1981). Plasminogen activator in the rodent brain. *Brain Research* **216**, 361–374. doi:10.1016/0006-8993(81)90138-4

Spaek J, Hartmann M (1983). Three-Dimensional analysis of dendritic spines. , 22.

Sprengers ED, Kluft C (1987). Plasminogen activator inhibitors. *Blood* **69**, 381–387.

Squire LR, Kandel ER (1999). 'Memory: from mind to molecules'. (Scientific American Library : Distributed by W. H. Freeman and Co: New York)

Steffen W, Karki S, Vaughan KT, Vallee RB, Holzbaur EL, Weiss DG, Kuznetsov SA (1997). The involvement of the intermediate chain of cytoplasmic dynein in binding the motor complex to membranous organelles of Xenopus oocytes. *Molecular Biology of the Cell* **8**, 2077–2088. doi:10.1091/mbc.8.10.2077

Stein A, Weber G, Wahl MC, Jahn R (2009). Helical extension of the neuronal SNARE complex into the membrane. *Nature* **460**, 525–528. doi:10.1038/nature08156

Stevenson TK, Lawrence DA (2018). Characterization of Tissue Plasminogen Activator Expression and Trafficking in the Adult Murine Brain. *eNeuro* **5**, ENEURO.0119-18.2018. doi:10.1523/ENEURO.0119-18.2018

Stowers RS, Megeath LJ, Górska-Andrzejak J, Meinertzhagen IA, Schwarz TL (2002). Axonal transport of mitochondria to synapses depends on milton, a novel Drosophila protein. *Neuron* **36**, 1063–1077. doi:10.1016/s0896-6273(02)01094-2

Stucchi R, Plucińska G, Hummel JJA, Zahavi EE, Guerra San Juan I, Klykov O, Scheltema RA, Altelaar AFM, Hoogenraad CC (2018). Regulation of KIF1A-Driven Dense Core Vesicle Transport: Ca2+/CaM Controls DCV Binding and Liprin-α/TANC2 Recruits DCVs to Postsynaptic Sites. *Cell Reports* **24**, 685–700. doi:10.1016/j.celrep.2018.06.071

Su EJ, Fredriksson L, Geyer M, Folestad E, Cale J, Andrae J, Gao Y, Pietras K, Mann K, Yepes M, Strickland DK, Betsholtz C, Eriksson U, Lawrence DA (2008). Activation of PDGF-CC by tissue plasminogen activator impairs blood-brain barrier integrity during ischemic stroke. *Nature Medicine* **14**, 731–737. doi:10.1038/nm1787

Su Q, Cai Q, Gerwin C, Smith CL, Sheng Z-H (2004). Syntabulin is a microtubule-associated protein implicated in syntaxin transport in neurons. *Nature Cell Biology* **6**, 941–953. doi:10.1038/ncb1169

Südhof TC (2013). Neurotransmitter release: the last millisecond in the life of a synaptic vesicle. *Neuron* **80**, 675–690. doi:10.1016/j.neuron.2013.10.022

Suzuki Y, Nagai N, Umemura K, Collen D, Lijnen HR (2007). Stromelysin-1 (MMP-3) is critical for intracranial bleeding after t-PA treatment of stroke in mice. *Journal of thrombosis and haemostasis: JTH* **5**, 1732–1739. doi:10.1111/j.1538-7836.2007.02628.x

Suzuki Y, Nagai N, Yamakawa K, Kawakami J, Lijnen HR, Umemura K (2009). Tissue-type plasminogen activator (t-PA) induces stromelysin-1 (MMP-3) in endothelial cells through activation of lipoprotein receptor-related protein. *Blood* **114**, 3352–3358. doi:10.1182/blood-2009-02-203919

Swandulla D, Hans M, Zipser K, Augustine GJ (1991). Role of residual calcium in synaptic depression and posttetanic potentiation: Fast and slow calcium signaling in nerve terminals. *Neuron* **7**, 915–926. doi:10.1016/0896-6273(91)90337-Y

Szaszák M, Christian F, Rosenthal W, Klussmann E (2008). Compartmentalized cAMP signalling in regulated exocytic processes in non-neuronal cells. *Cellular Signalling* **20**, 590–601. doi:10.1016/j.cellsig.2007.10.020

T

Takamori S, Holt M, Stenius K, Lemke EA, Grønborg M, Riedel D, Urlaub H, Schenck S, Brügger B, Ringler P, Müller SA, Rammner B, Gräter F, Hub JS, De Groot BL, Mieskes G, Moriyama Y, Klingauf J, Grubmüller H, Heuser J, Wieland F, Jahn R (2006). Molecular anatomy of a trafficking organelle. *Cell* **127**, 831–846. doi:10.1016/j.cell.2006.10.030

Takeda S, Yamazaki H, Seog DH, Kanai Y, Terada S, Hirokawa N (2000). Kinesin superfamily protein 3 (KIF3) motor transports fodrin-associating vesicles important for neurite building. *The Journal of Cell Biology* **148**, 1255–1265. doi:10.1083/jcb.148.6.1255

Tang Z, Li D, Luan Y, Zhu L, Du H, Tao Y, Wang Y, Haddleton DM, Chen H (2015). Conjugation of polymers to proteins through an inhibitor-derived peptide: taking up the inhibitor 'berth'. *Chemical Communications (Cambridge, England)* **51**, 10099–10102. doi:10.1039/c5cc02659h

Teesalu T, Kulla A, Simisker A, Sirén V, Lawrence DA, Asser T, Vaheri A (2004). Tissue plasminogen activator and neuroserpin are widely expressed in the human central nervous system. *Thrombosis and Haemostasis* **92**, 358–368. doi:10.1160/TH02-12-0310

Teng J, Rai T, Tanaka Y, Takei Y, Nakata T, Hirasawa M, Kulkarni AB, Hirokawa N (2005). The KIF3 motor transports N-cadherin and organizes the developing neuroepithelium. *Nature Cell Biology* **7**, 474–482. doi:10.1038/ncb1249

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

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

Tobin V, Schwab Y, Lelos N, Onaka T, Pittman QJ, Ludwig M (2012). Expression of exocytosis proteins in rat supraoptic nucleus neurones. *Journal of Neuroendocrinology* **24**, 629–641. doi:10.1111/j.1365-2826.2011.02237.x

Trachtenberg JT, Chen BE, Knott GW, Feng G, Sanes JR, Welker E, Svoboda K (2002). Long-term in vivo imaging of experience-dependent synaptic plasticity in adult cortex. *Nature* **420**, 788–794. doi:10.1038/nature01273

Traynelis SF, Wollmuth LP, McBain CJ, Menniti FS, Vance KM, Ogden KK, Hansen KB, Yuan H, Myers SJ, Dingledine R (2010). Glutamate Receptor Ion Channels: Structure, Regulation, and Function. *Pharmacological Reviews* **62**, 405–496. doi:10.1124/pr.109.002451

Trimble WS, Gray TS, Elferink LA, Wilson MC, Scheller RH (1990). Distinct patterns of expression of two VAMP genes within the rat brain. *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience* **10**, 1380–1387.

Trotter JH, Lussier AL, Psilos KE, Mahoney HL, Sponaugle AE, Hoe H-S, Rebeck GW, Weeber EJ (2014). Extracellular proteolysis of reelin by tissue plasminogen activator following synaptic potentiation. *Neuroscience* **274**, 299–307. doi:10.1016/j.neuroscience.2014.05.046

Tsirka SE, Gualandris A, Amaral DG, Strickland S (1995). Excitotoxin-induced neuronal degeneration and seizure are mediated by tissue plasminogen activator. *Nature* **377**, 340–344.

Tsirka SE, Rogove AD, Bugge TH, Degen JL, Strickland S (1997). An extracellular proteolytic cascade promotes neuronal degeneration in the mouse hippocampus. *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience* **17**, 543–552.

Tsirka SE, Rogove AD, Strickland S (1996). Neuronal cell death and tPA. *Nature* **384**, 123–124. doi:10.1038/384123b0

Twelvetrees AE, Yuen EY, Arancibia-Carcamo IL, MacAskill AF, Rostaing P, Lumb MJ, Humbert S, Triller A, Saudou F, Yan Z, Kittler JT (2010). Delivery of GABAARs to synapses is mediated by HAP1-KIF5 and disrupted by mutant huntingtin. *Neuron* **65**, 53–65. doi:10.1016/j.neuron.2009.12.007

Tynan SH, Purohit A, Doxsey SJ, Vallee RB (2000). Light intermediate chain 1 defines a functional subfraction of cytoplasmic dynein which binds to pericentrin. *The Journal of Biological Chemistry* **275**, 32763–32768. doi:10.1074/jbc.M001536200

U

Uhl B, Zuchtriegel G, Puhr-Westerheide D, Praetner M, Rehberg M, Fabritius M, Hessenauer M, Holzer M, Khandoga A, Fürst R, Zahler S, Krombach F, Reichel CA (2014). Tissue plasminogen activator promotes postischemic neutrophil recruitment via its proteolytic and nonproteolytic properties. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology* **34**, 1495–1504. doi:10.1161/ATVBAHA.114.303721

Uno M, Ozawa N (1991). Long-term potentiation of the amygdalo-striatal synaptic transmission in the course of development of amygdaloid kindling in cats. *Neuroscience Research* **12**, 251–262. doi:10.1016/0168-0102(91)90115-f

Urano S, Metzger AR, Castellino FJ (1989). Plasmin-mediated fibrinolysis by variant recombinant tissue plasminogen activators (activity of variant tissue plasminogen activators/domains of tissue plasminogen activator/effectors of fibrinolysis). *Biochemistry* **86**, 2568–2571.

Urh M, Rosenberg M (2012). HaloTag, a Platform Technology for Protein Analysis. *Current Chemical Genomics* **6**. doi:10.2174/1875397301206010072

V

Valent P, Baghestanian M, Bankl HC, Sillaber C, Sperr WR, Wojta J, Binder BR, Lechner K (2002). New aspects in thrombosis research: possible role of mast cells as profibrinolytic and antithrombotic cells. *Thrombosis and Haemostasis* **87**, 786–790.

Vaughan KT, Vallee RB (1995). Cytoplasmic dynein binds dynactin through a direct interaction between the intermediate chains and p150Glued. *The Journal of Cell Biology* **131**, 1507–1516. doi:10.1083/jcb.131.6.1507

Vaughan PS, Miura P, Henderson M, Byrne B, Vaughan KT (2002). A role for regulated binding of p150(Glued) to microtubule plus ends in organelle transport. *The Journal of Cell Biology* **158**, 305–319. doi:10.1083/jcb.200201029

Verhey KJ, Hammond JW (2009). Traffic control: regulation of kinesin motors. *Nature Reviews. Molecular Cell Biology* **10**, 765–777. doi:10.1038/nrm2782

Verhey KJ, Meyer D, Deehan R, Blenis J, Schnapp BJ, Rapoport TA, Margolis B (2001). Cargo of kinesin identified as JIP scaffolding proteins and associated signaling molecules. *The Journal of Cell Biology* **152**, 959–970. doi:10.1083/jcb.152.5.959

Verstraete M, Bernard R, Bory M, Brower RW, Collen D, de Bono DP, Erbel R, Huhmann W, Lennane RJ, Lubsen J (1985). Randomised trial of intravenous recombinant tissue-type plasminogen activator versus intravenous streptokinase in acute myocardial infarction. Report from the European Cooperative Study Group for Recombinant Tissue-type Plasminogen Activator. *Lancet (London, England)* **1**, 842–847. doi:10.1016/s0140-6736(85)92208-1

de Vivo L, Bellesi M, Marshall W, Bushong EA, Ellisman MH, Tononi G, Cirelli C (2017). Ultrastructural evidence for synaptic scaling across the wake/sleep cycle. *Science (New York, N.Y.)* **355**, 507–510. doi:10.1126/science.aah5982

W

Wagner OI, Esposito A, Köhler B, Chen C-W, Shen C-P, Wu G-H, Butkevich E, Mandalapu S, Wenzel D, Wouters FS, Klopfenstein DR (2009). Synaptic scaffolding protein SYD-2 clusters and activates kinesin-3 UNC-104 in C. elegans. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **106**, 19605–19610. doi:10.1073/pnas.0902949106

Wahlgren N, Thorén M, Höjeberg B, Käll T-B, Laska A-C, Sjöstrand C, Höijer J, Almqvist H, Holmin S, Lilja A, Fredriksson L, Lawrence D, Eriksson U, Ahmed N (2017). Randomized assessment of imatinib in patients with acute ischaemic stroke treated with intravenous thrombolysis. *Journal of Internal Medicine* **281**, 273–283. doi:10.1111/joim.12576

Wallén P, Bergsdorf N, Rånby M (1982a). Purification and identification of two structural variants of porcine tissue plasminogen activator by affinity adsorption on fibrin. *Biochimica et biophysica acta* **719**, 318–28.

Wallén P, Bergsdorf N, Rånby M (1982b). Purification and identification of two structural variants of porcine tissue plasminogen activator by affinity adsorption on fibrin. *Biochimica Et Biophysica Acta* **719**, 318–328. doi:10.1016/0304-4165(82)90105-2

Wang X, Lee S-R, Arai K, Lee S-R, Tsuji K, Rebeck GW, Lo EH (2003). Lipoprotein receptor–mediated induction of matrix metalloproteinase by tissue plasminogen activator. *Nature Medicine* **9**, 1313–1317. doi:10.1038/nm926

Wang YF, Tsirka SE, Strickland S, Stieg PE, Soriano SG, Lipton SA (1998). Tissue plasminogen activator (tPA) increases neuronal damage after focal cerebral ischemia in wild-type and tPA-deficient mice. *Nature Medicine* **4**, 228–231. doi:10.1038/nm0298-228

Ware JH, Dibenedetto AJ, Pittman RN (1995). Localization of tissue plasminogen activator mRNA in adult rat brain. *Brain Research Bulletin* **37**, 275–281. doi:10.1016/0361-9230(95)00008-3

Washbourne P, Thompson PM, Carta M, Costa ET, Mathews JR, Lopez-Benditó G, Molnár Z, Becher MW, Valenzuela CF, Partridge LD, Wilson MC (2002). Genetic ablation of the t-SNARE SNAP-25 distinguishes mechanisms of neuroexocytosis. *Nature Neuroscience* **5**, 19–26. doi:10.1038/nn783

Waterman-Storer CM, Karki S, Holzbaur EL (1995). The p150Glued component of the dynactin complex binds to both microtubules and the actin-related protein centractin (Arp-1). *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **92**, 1634–1638. doi:10.1073/pnas.92.5.1634

Watkins JC (2000). l-Glutamate as a Central Neurotransmitter: Looking Back. *Biochemical Society Transactions* **28**, 297–310. doi:10.1042/bst0280297

Watkins JC, Evans RH, Bayés À, Booker SA, Gibb A, Mabb AM, Mayer M, Mellor JR, Molnár E, Niu L, Ortega A, Pankratov Y, Ramos-Vicente D, Rodríguez-Campuzano A, Rodríguez-Moreno A, Wang L-Y, Wang YT, Wollmuth L, Wyllie DJA, Zhuo M, Frenguelli BG (2021). 21st century excitatory amino acid research: A Q & A with Jeff Watkins and Dick Evans. *Neuropharmacology* **198**, 108743. doi:10.1016/j.neuropharm.2021.108743

Weibel ER, Palade GE (1964). NEW CYTOPLASMIC COMPONENTS IN ARTERIAL ENDOTHELIA. *The Journal of Cell Biology* **23**, 101–112. doi:10.1083/jcb.23.1.101

Weimar W, Stibbe J, van Seyen AJ, Billiau A, De Somer P, Collen D (1981). Specific lysis of an iliofemoral thrombus by administration of extrinsic (tissue-type) plasminogen activator. *Lancet (London, England)* **2**, 1018–1020. doi:10.1016/s0140-6736(81)91217-4

Wells AL, Lin AW, Chen LQ, Safer D, Cain SM, Hasson T, Carragher BO, Milligan RA, Sweeney HL (1999). Myosin VI is an actin-based motor that moves backwards. *Nature* **401**, 505–508. doi:10.1038/46835

Wells DG, Dong X, Quinlan EM, Huang YS, Bear MF, Richter JD, Fallon JR (2001). A role for the cytoplasmic polyadenylation element in NMDA receptor-regulated mRNA translation in neurons. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* **21**, 9541–9548.

de Wit J, Toonen RF, Verhage M (2009). Matrix-dependent local retention of secretory vesicle cargo in cortical neurons. *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience* **29**, 23–37. doi:10.1523/JNEUROSCI.3931-08.2009

Wittwer a J, Howard SC, Carr LS, Harakas NK, Feder J, Parekh RB, Rudd PM, Dwek R a, Rademacher TW (1989). Effects of N-glycosylation on in vitro activity of Bowes melanoma and human colon fibroblast derived tissue plasminogen activator. *Biochemistry* **28**, 7662–7669.

Wittwer AJ, Howard SC (1990). Glycosylation at Asn-184 inhibits the conversion of single-chain to two-chain tissue-type plasminogen activator by plasmin. *Biochemistry* **29**, 4175–4180.

Wong MY, Zhou C, Shakiryanova D, Lloyd TE, Deitcher DL, Levitan ES (2012). Neuropeptide delivery to synapses by long-range vesicle circulation and sporadic capture. *Cell* **148**, 1029–1038. doi:10.1016/j.cell.2011.12.036

Wozniak MJ, Melzer M, Dorner C, Haring H-U, Lammers R (2005). The novel protein KBP regulates mitochondria localization by interaction with a kinesin-like protein. *BMC cell biology* **6**, 35. doi:10.1186/1471-2121-6-35

Wu D, Bacaj T, Morishita W, Goswami D, Arendt KL, Xu W, Chen L, Malenka RC, Südhof TC (2017). Postsynaptic synaptotagmins mediate AMPA receptor exocytosis during LTP. *Nature* **544**, 316–321. doi:10.1038/nature21720

Wu F, Echeverry R, Wu J, An J, Haile WB, Cooper DS, Catano M, Yepes M (2013). Tissue-type Plasminogen Activator Protects Neurons from Excitotoxin-induced Cell Death via Activation of the ERK ½ -CREB-ATF3 Signaling Pathway. *Molecular and cellular neurosciences* **52**, 9–19. doi:10.1016/j.mcn.2012.10.001

Wu F, Torre E, Cuellar-Giraldo D, Cheng L, Yi H, Bichler EK, García PS, Yepes M (2015). Tissue-type plasminogen activator triggers the synaptic vesicle cycle in cerebral cortical neurons. *Journal of Cerebral Blood Flow and Metabolism: Official Journal of the International Society of Cerebral Blood Flow and Metabolism* **35**, 1966–1976. doi:10.1038/jcbfm.2015.155

Wu F, Wu J, Nicholson AD, Echeverry R, Haile WB, Catano M, An J, Lee AK, Duong D, Dammer EB, Seyfried NT, Tong FC, Votaw JR, Medcalf RL, Yepes M (2012). Tissue-Type Plasminogen Activator Regulates the Neuronal Uptake of Glucose in the Ischemic Brain. *The Journal of Neuroscience* **32**, 9848–9858. doi:10.1523/JNEUROSCI.1241-12.2012

Wu H, Nash JE, Zamorano P, Garner CC (2002). Interaction of SAP97 with minus-end-directed actin motor myosin VI. Implications for AMPA receptor trafficking. *The Journal of Biological Chemistry* **277**, 30928–30934. doi:10.1074/jbc.M203735200

Wu L-G, Hamid E, Shin W, Chiang H-C (2014). Exocytosis and endocytosis: modes, functions, and coupling mechanisms. *Annual Review of Physiology* **76**, 301–331. doi:10.1146/annurev-physiol-021113-170305

Wu YP, Siao CJ, Lu W, Sung TC, Frohman MA, Milev P, Bugge TH, Degen JL, Levine JM, Margolis RU, Tsirka SE (2000). The tissue plasminogen activator (tPA)/plasmin extracellular proteolytic system regulates seizure-induced hippocampal mossy fiber outgrowth through a proteoglycan substrate. *The Journal of Cell Biology* **148**, 1295–1304. doi:10.1083/jcb.148.6.1295

X

Xia J, Zhang X, Staudinger J, Huganir RL (1999). Clustering of AMPA Receptors by the Synaptic PDZ Domain–Containing Protein PICK1. *Neuron* **22**, 179–187. doi:10.1016/S0896-6273(00)80689-3

Y

Yamada K, Nabeshima T (2003). Brain-derived neurotrophic factor/TrkB signaling in memory processes. *Journal of Pharmacological Sciences* **91**, 267–270. doi:10.1254/jphs.91.267

Yamada M, Toba S, Yoshida Y, Haratani K, Mori D, Yano Y, Mimori-Kiyosue Y, Nakamura T, Itoh K, Fushiki S, Setou M, Wynshaw-Boris A, Torisawa T, Toyoshima YY, Hirotsune S (2008). LIS1 and NDEL1 coordinate the plus-end-directed transport of cytoplasmic dynein. *The EMBO journal* **27**, 2471–2483. doi:10.1038/emboj.2008.182

Yamamoto C, Sugato M, Fujiwara Y, Kaji T (2005). Selective promotion of plasminogen activator inhibitor-1 secretion by activation of proteinase-activated receptor-1 in cultured human brain microvascular pericytes: comparison with endothelial cells. *Biological & Pharmaceutical Bulletin* **28**, 208–211. doi:10.1248/bpb.28.208

Yamazaki H, Nakata T, Okada Y, Hirokawa N (1996). Cloning and characterization of KAP3: a novel kinesin superfamily-associated protein of KIF3A/3B. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **93**, 8443–8448. doi:10.1073/pnas.93.16.8443

Yang-Feng TL, Opdenakker G, Volckaert G, Francke U (1986). Human tissue-type plasminogen activator gene located near chromosomal breakpoint in myeloproliferative disorder. *American Journal of Human Genetics* **39**, 79–87.

Yano H, Ninan I, Zhang H, Milner TA, Arancio O, Chao MV (2006). BDNF-mediated neurotransmission relies upon a myosin VI motor complex. *Nature Neuroscience* **9**, 1009–1018. doi:10.1038/nn1730

Ye B, Liao D, Zhang X, Zhang P, Dong H, Huganir RL (2000). GRASP-1: A Neuronal RasGEF Associated with the AMPA Receptor/GRIP Complex. *Neuron* **26**, 603–617. doi:10.1016/S0896-6273(00)81198-8

Yepes M, Lawrence D a. (2004). Neuroserpin: A selective inhibitor of tissue-type plasminogen activator in the central nervous system. *Thrombosis and haemostasis* **91**, 457–464. doi:10.1160/TH03-12-0766

Yepes M, Sandkvist M, Coleman TA, Moore E, Wu J-Y, Mitola D, Bugge TH, Lawrence DA (2002). Regulation of seizure spreading by neuroserpin and tissue-type plasminogen activator is plasminogen-independent. *The Journal of Clinical Investigation* **109**, 1571–1578. doi:10.1172/JCI14308

Yepes M, Sandkvist M, Moore EG, Bugge TH, Strickland DK, Lawrence DA (2003). Tissue-type plasminogen activator induces opening of the blood-brain barrier via the LDL receptor-related protein. *The Journal of Clinical Investigation* **112**, 1533–1540. doi:10.1172/JCI19212

Yepes M, Sandkvist M, Wong MK, Coleman TA, Smith E, Cohan SL, Lawrence DA (2000). Neuroserpin reduces cerebral infarct volume and protects neurons from ischemia-induced apoptosis. *Blood* **96**, 569–576. doi:10.1161/01.str.26.3.361

Yepes M, Wu F, Torre E, Cuellar-Giraldo D, Jia D, Cheng L (2016). Tissue-type plasminogen activator induces synaptic vesicle endocytosis in cerebral cortical neurons. *Neuroscience* **319**, 69–78. doi:10.1016/j.neuroscience.2016.01.046

Yin X, Takei Y, Kido MA, Hirokawa N (2011). Molecular motor KIF17 is fundamental for memory and learning via differential support of synaptic NR2A/2B levels. *Neuron* **70**, 310–325. doi:10.1016/j.neuron.2011.02.049

Z

Zeniou-Meyer M, Liu Y, Béglé A, Olanich ME, Olanish M, Hanauer A, Becherer U, Rettig J, Bader M-F, Vitale N (2008). The Coffin-Lowry syndrome-associated protein RSK2 is implicated in calcium-regulated exocytosis through the regulation of PLD1. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **105**, 8434–8439. doi:10.1073/pnas.0710676105

Zhang C, An J, Strickland DK, Yepes M (2009). The Low-Density Lipoprotein Receptor-Related Protein 1 Mediates Tissue-Type Plasminogen Activator-Induced Microglial Activation in the Ischemic Brain. *The American Journal of Pathology* **174**, 586–594. doi:10.2353/ajpath.2009.080661

Zhang L, Zhang ZG, Buller B, Jiang J, Jiang Y, Zhao D, Liu X, Morris D, Chopp M (2010). Combination Treatment With VELCADE and Low-Dose Tissue Plasminogen Activator Provides Potent Neuroprotection in Aged Rats After Embolic Focal Ischemia. *Stroke; a journal of cerebral circulation* **41**, 1001–1007. doi:10.1161/STROKEAHA.109.577288

Zhang Q, Fan J-S, Zhang M (2001). Interdomain Chaperoning between PSD-95, Dlg, and Zo-1 (PDZ) Domains of Glutamate Receptor-interacting Proteins*. *Journal of Biological Chemistry* **276**, 43216–43220. doi:10.1074/jbc.M105996200

Zhao C, Takita J, Tanaka Y, Setou M, Nakagawa T, Takeda S, Yang HW, Terada S, Nakata T, Takei Y, Saito M, Tsuji S, Hayashi Y, Hirokawa N (2001). Charcot-Marie-Tooth disease type 2A caused by mutation in a microtubule motor KIF1Bbeta. *Cell* **105**, 587–597. doi:10.1016/s0092-8674(01)00363-4

Zhao J-J, Liu Z-W, Wang B, Huang T-Q, Guo D, Zhao Y-L, Song J-N (2020). Inhibiting endogenous tissue plasminogen activator enhanced neuronal apoptosis and axonal injury after traumatic brain injury. *Neural Regeneration Research* **15**, 667–675. doi:10.4103/1673-5374.266914

Zhou A, Carrell RW, Huntington JA (2001). The serpin inhibitory mechanism is critically dependent on the length of the reactive center loop. *The Journal of Biological Chemistry* **276**, 27541–27547. doi:10.1074/jbc.M102594200

Zhu J, Shang Y, Zhang M (2016). Mechanistic basis of MAGUK-organized complexes in synaptic development and signalling. *Nature Reviews Neuroscience* **17**, 209–223. doi:10.1038/nrn.2016.18

Zhuo M, Holtzman DM, Li Y, Osaka H, DeMaro J, Jacquin M, Bu G (2000). Role of tissue plasminogen activator receptor LRP in hippocampal long-term potentiation. *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience* **20**, 542–549.

Zilberter Y (2000). Dendritic release of glutamate suppresses synaptic inhibition of pyramidal neurons in rat neocortex. *The Journal of Physiology* **528**, 489–496. doi:10.1111/j.1469-7793.2000.00489.x

Zorio E, Gilabert-Estellés J, España F, Ramón LA, Cosín R, Estellés A (2008). Fibrinolysis: the key to new pathogenetic mechanisms. *Current Medicinal Chemistry* **15**, 923–929. doi:10.2174/092986708783955455

Zuo Y, Lin A, Chang P, Gan W-B (2005). Development of Long-Term Dendritic Spine Stability in Diverse Regions of Cerebral Cortex. *Neuron* **46**, 181–189. doi:10.1016/j.neuron.2005.04.001

Influence de l'activateur tissulaire du plasminogène (tPA) à la synapse glutamatergique

La découverte de l'expression neuronale de l'activateur tissulaire du plasminogène (tPA) a ouvert de nouvelles voies de recherche, par des fonctions importantes dans la physiopathologie du système nerveux central. Par exemple, ses interactions avec les récepteurs synaptiques (NMDAR, LRP1, Annexine II et EGFR) et son rôle dans la maturation du BDNF lui donne la capacité de moduler la plasticité synaptique et la survie neuronale. Ainsi, une meilleure description des mécanismes régulant le trafic neuronal du tPA serait importante pour mieux comprendre comment il peut influencer le fonctionnement physiologique et pathologique cerveau.

Dans cette étude, par l'utilisation l'imagerie de cellules vivantes en haute résolution et un panel d'approches génétiques innovantes, nous avons révélé que l'activité neuronale contrôle directement le trafic dendritique et axonal du tPA. Nous avons en premier lieu décrit précisément le trafic dendritique et axonal des vésicules contenant le tPA sous différents paradigmes d'activations et d'inhibitions neuronales. Nous avons remarqué que l'activation neuronale affecte le transport et la libération dendritique et axonal des vésicules contenant le tPA. Étonnamment, l'inhibition neuronale n'a eu aucun effet sur le trafic et l'exocytose du tPA, mettant en évidence un mécanisme de sécrétion constitutif de tPA dans les neurones corticaux. De plus, les vésicules antérogrades axonales du tPA montrent des similitudes avec les vésicules contenant VAMP2 en conditions de repos et d'activation des neurones suggérant un co-trafic dans les mêmes vésicules. Nous avons également observé que la libération synaptique de tPA entraînait une augmentation de l'exocytose des vésicules VGlut1 positives contenant du glutamate. Enfin, nous avons décrit des altérations du trafic et de l'exocytose du tPA neuronal dans un modèle de maladie d'Alzheimer. Ensemble, ces données fournissent de nouvelles informations sur le trafic neuronal du tPA, contribuant à une meilleure compréhension de ses implications dans le contrôle de la neurotransmission glutamatergique.

Mots-clés : tPA ; trafic vésiculaire ; VAMP2 ; VGlut1 ; Tauopathie

Influence of tissue-type plasminogen activator (tPA) at the glutamatergic synapse

The discovery of the neuronal expression of the serine protease tissue type plasminogen activator (tPA) has opened new avenues of research, with important functions of tPA in the physiopathology of the central nervous system. For example, its interactions with synaptic receptors (NMDAR, LRP1, Annexin II, and EGFR) and its role in the maturation of BDNF have been reported to mediate its ability to control synaptic plasticity and neuronal survival. Thus, a better description of the mechanisms regulating the neuronal trafficking of tPA is important to better understand how tPA can influence brain functions and dysfunctions.

Here, using high-resolution live cell imaging and a panel of innovative genetic approaches, we revealed that neuronal activity directly control the dendritic and axonal trafficking of tPA. We first unmasked the dynamic characteristics of the dendritic and axonal trafficking of tPA-containing vesicles under different paradigms of neuronal activations and inhibitions. We described that neuronal activity affect dendritic and axonal tPA trafficking, in particular in an activating state. Surprisingly, neuronal inhibition had no effect on tPA vesicles trafficking and exocytosis, highlighting a constitutive secretion mechanism of tPA in cortical neurons. Moreover, the axonal anterograde vesicles of tPA shown similarities with VAMP2 positives vesicles in resting and activating state of neurons suggesting a cotrafficking in the same vesicles. We also observed that the synaptic release of tPA led to an increase of the exocytosis of VGlut1 positives vesicles containing glutamate. Finally, we described alterations of the trafficking and exocytosis of the neuronal tPA in an Alzheimer disease (AD) model. Altogether, these data provide new insights about the neuronal trafficking of tPA, contributing to a better knowledge in the understanding of its implications in the control of the glutamatergic neurotransmission and subsequent brain functions and dysfunctions.

Keywords: tPA; vesicular trafficking; VAMP2; VGlut1; Tauopathy.