Modulation enzymatique des réseaux périneuronaux par la désintégrine et métalloprotéinase à motifs thrombospondines de type 4 (ADAMTS-4) et l'activateur tissulaire du plasminogène (tPA)

Matthieu Lépine

▶ **To cite this version:**

Matthieu Lépine. Modulation enzymatique des réseaux périneuronaux par la désintégrine et métalloprotéinase à motifs thrombospondines de type 4 (ADAMTS-4) et l'activateur tissulaire du plasminogène (tPA). Médecine humaine et pathologie. Normandie Université, 2020. Français. NNT : 2020NORMC425 . tel-03889367

HAL Id: tel-03889367
https://theses.hal.science/tel-03889367

Submitted on 8 Dec 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

Modulation enzymatique des réseaux périneuronaux par la désintégrine et métalloprotéinase à motifs thrombospondines de type 4 (ADAMTS-4) et l'activateur tissulaire du plasminogène (tPA)

Présentée et soutenue par
Matthieu LEPINE

Thèse soutenue publiquement le 07/12/2020 devant le jury composé de		
Mme MARIE-CHRISTINE BOUTON	Directeur de recherche, Faculté de Médecine Xavier Bichat, Paris	Rapporteur du jury
M. ARIEL DI NARDO	Chargé de recherche, COLLEGE DE FRANCE	Rapporteur du jury
M. BRUNO CAULI	Directeur de recherche au CNRS, Université Paris 6 Pierre et Marie Curie	Membre du jury
M. SIMON DE MEYER	Professeur, Katholieke Universiteit Leuven- Belgique	Membre du jury
M. DENIS VIVIEN	Professeur des universités PraticienHosp, Université Caen Normandie	Président du jury
Mme CARINE ALI	Professeur des universités, Université Caen Normandie	Directeur de thèse

Thèse dirigée par CARINE ALI, 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

Remerciements

Je tiens tout d'abord à remercier Denis Vivien de m'avoir accueilli dans son laboratoire, pour m'avoir donné les moyens de réaliser mes projets, ainsi que pour avoir contribué à la réalisation de cette thèse.

Je remercie également Carine Ali pour m'avoir encadré durant cette thèse et pour m'avoir donné très rapidement une pleine autonomie pour effectuer ces travaux. Merci pour tous tes conseils durant la rédaction de ce manuscrit.

Mes remerciements vont également aux rapporteurs de cette thèse, le Dr. Marie-Christine Bouton et le Dr. Ariel Di Nardo, pour avoir accepté et pris le temps d'évaluer ces travaux de thèse. De la même façon, je remercie le Dr. Bruno Cauli et le Pr. Simon De Meyer d'avoir accepté de faire partie de ce jury de thèse.

Un grand merci Mathilde pour m'avoir formé et m'avoir transmis tes connaissances. Je garde un très bon souvenir de mon arrivée au laboratoire grâce à toi. Merci à Sara M pour ton aide, tes nombreux conseils, tes encouragements, ainsi que ta bonne humeur.

Je tiens à remercier l'ensemble des personnes de l'unité PhIND et du CURB qui ont contribué à ce travail, et plus particulièrement Yannick et Lolo pour votre aide et votre bonne humeur, que ce soit le midi ou au VandB.

Je remercie chaleureusement toutes les personnes avec qui j'ai pu partager de très bons moments durant cette thèse (et qui ont également su me supporter) : Zuba, Knackie, Brody, Jenny/Potz, Élo, Hhhhéloïse, Eugénie, Mervé, Sylvaine, Jojo, Antoine A, Fofie, Aurélu, Charly et ma BFF autoproclamée Anastasia Lanquetin.

Un merci tout particulier à Fanny (Jenny/potz) pour avoir pris le temps de relire cette thèse.

Je remercie mes parents pour leur soutien, leur écoute et leur compréhension durant ces quatre dernières années.

Et enfin, un très grand merci à toi Sara pour ta présence au quotidien…

Avant-propos

L'unité INSERM U1237, dans laquelle j'ai réalisé ma thèse s'intitule « Physiopathology and Imaging of Neurological Disorders » (PhIND). Depuis sa création, l'unité s'intéresse tout particulièrement à l'activateur tissulaire du plasminogène ou tPA. Cette sérine protéase, connue pour son rôle dans la fibrinolyse est, à ce jour, le seul traitement pharmacologique autorisé et utilisé dans la phase aigüe des accidents vasculaires cérébraux (AVC) ischémiques. Outre la fibrinolyse, le tPA endogène est également un acteur clef dans divers aspects de la physiopathologie cérébrale. Ainsi, l'objectif premier de l'unité vise à élucider les mécanismes cellulaires et moléculaires sous-jacents aux différentes fonctions du tPA dans le système nerveux.

De manière intéressante, une étude transcriptomique au sein du laboratoire a conduit à la découverte d'un nouveau substrat du tPA : la désintégrine et métalloprotéinase à motifs thrombospondines de type 4, ou ADAMTS-4. Cette protéase est principalement connue pour dégrader les chondroïtines sulfates protéoglycanes (CSPGs) retrouvés au sein des différentes formes de matrice extracellulaire (MEC). L'une de ces formes, les réseaux périneuronaux (*perineuronal nets*, PNNs), inhibent la plasticité cérébrale en formant une structure condensée autour de certains neurones. Néanmoins, la dégradation enzymatique des PNNs restaure la plasticité cérébrale et ouvre ainsi d'intéressantes perspectives thérapeutiques afin d'améliorer la récupération fonctionnelle dans certaines pathologies, dont les AVC ischémiques.

Au vu de ces informations, ADAMTS-4 semble être un excellent candidat pour moduler la structure des PNNs. La première partie de mes travaux de thèse visait à définir si la récupération fonctionnelle lors des AVC ischémiques peut être favorisée par la digestion enzymatique des PNNs par ADAMTS-4 endogène, seule ou couplée à une rééducation intensive (étude 1). Dans une deuxième étude, nous avons cherché à déterminer si le tPA dégrade les PNNs en condition physiologique, et si oui, par quel mécanisme. Nous nous sommes tout particulièrement intéressés au tPA issu des interneurones à parvalbumine, une source cellulaire que nous avons identifiée grâce à un nouvel outil rapporteur (étude 2).

Afin de présenter ces travaux de thèse, nous débuterons l'introduction par une description des PNNs et des différentes protéases capables de moduler leur structure, afin de faire le lien avec la 2ème et 3ème partie portant respectivement sur ADAMTS-4 et le tPA. Nous terminerons cette introduction en parlant des AVC ischémiques, pathologie dans laquelle nous avons étudié les PNNs.

Sommaire

INTRODUCTION **1**

1. LES RESEAUX PERINEURONAUX **3**

1.1 UNE DECOUVERTE CONTROVERSEE 3

1.2 GENERALITES 3

1.3 STRUCTURE ET COMPOSITION DES PNNS 5

1.3.1 Les chondroïtines sulfates protéoglycanes *6*

1.3.2 L'acide hyaluronique *13*

1.3.3 Les ténascines *14*

1.3.4 Les protéines de liaison *15*

1.4 PERIODES CRITIQUES ET MISE EN PLACE DES RESEAUX PERINEURONAUX 17

1.4.1 Les périodes critiques de plasticité *17*

1.4.2 La mise en place des réseaux périneuronaux *19*

1.5 FONCTIONS ASSOCIEES AUX RESEAUX PERINEURONAUX 20

1.5.1 Une surface d'interaction *20*

1.5.2 Une barrière physique à la fois protectrice et inhibitrice *22*

1.6 DEGRADATION ENZYMATIQUE DES RESEAUX PERINEURONAUX 26

1.6.1 Les « metzincines » *27*

1.6.2 Le plasminogène et son activateur tissulaire *29*

2. LA DESINTEGRINE ET METALLOPROTEINASE A MOTIFS THROMBOSPONDINES DE TYPE 4 ..... **34**

2.1 GENERALITES 34

2.2 STRUCTURE 34

2.3 SYNTHESE D'ADAMTS-4 36

2.3.1 Dans le compartiment vasculaire *37*

2.3.2 Dans le système nerveux central *37*

2.3.3 Les régulateurs d'ADAMTS-4 ..... *40*

2.4 LES SUBSTRATS D'ADAMTS-4 42

2.5 FONCTIONS D'ADAMTS-4 DANS LE SNC 43

2.5.1 En condition physiologique *43*

2.5.2 En conditions pathologiques *45*

3. L'ACTIVATEUR TISSULAIRE DU PLASMINOGENE **48**

3.1 INFORMATIONS HISTORIQUES 48

3.2 STRUCTURE 48
3.3 SYNTHESE DU TPA 50
3.3.1 Dans le compartiment vasculaire 50
3.3.2 Dans le système nerveux central 51
3.3.3 Les inhibiteurs endogènes du tPA 53
3.4 FONCTIONS DU TPA 55
3.4.1 Fonctions vasculaires 55
3.4.2 Fonctions cérébrales en condition physiologique 59
3.4.3 Fonctions cérébrales en conditions pathologiques 65

4. LES ACCIDENTS VASCULAIRES CEREBRAUX 69

4.1 GENERALITES 69
4.2 LES DIFFERENTES FORMES D'AVC HEMORRAGIQUES 69
4.3 LES DIFFERENTES FORMES D'AVC ISCHEMIQUES 70
4.4 LES FACTEURS DE RISQUES DE L'AVC 70
4.4.1 Les facteurs de risques non modifiables 70
4.4.2 Les facteurs de risques modifiables 71
4.5 PHYSIOPATHOLOGIE DE L'AVC ISCHEMIQUE 72
4.5.1 Lésion ischémique et débit sanguin cérébral 73
4.5.2 Les mécanismes cellulaires 74
4.6 LES RESEAUX PERINEURONAUX POST-ISCHEMIQUES 78

OBJECTIFS 81

RESULTATS 85

ÉTUDE 1 : IMPLICATION D'ADAMTS-4 DANS L'EVOLUTION DE L'INFARCTUS CEREBRAL : UN LIEN DANS LA DEGRADATION ENZYMATIQUE DES PNNS ? 87

1. Présentation de l'étude 87
2. Matériel et méthodes 90
3. Résultats 95

ÉTUDE 2 : LE TPA ORIGINAIRE DES INTERNEURONES A PARVALBUMINE CONTROLE LE REMODELAGE DES RESEAUX PERINEURONAUX 107

1. Présentation de l'étude 107

DISCUSSION 145

1. IMPLICATION D'ADAMTS-4 DANS L'EVOLUTION DE L'INFARCTUS CEREBRAL : UN LIEN DANS LA DEGRADATION ENZYMATIQUE DES PNNS ? (ETUDE 1) 147

1.1 EFFET DE L'ENTRAINEMENT PHYSIQUE 147
1.2 EFFET PROTECTEUR D'ADAMTS-4 DANS L'INFARCTUS 148
1.2.1 Expression vasculaire d'ADAMTS-4 149
1.2.2 Régulation de l'expression vasculaire d'ADAMTS-4 150
1.2.3 ADAMTS-4 et inflammation : une boucle de rétrocontrôle potentielle ? 151
1.2.4 Le versican vasculaire : une cible enzymatique d'ADAMTS-4 dans l'ischémie ? 151
1.2.5 Un effet indépendant de la dégradation des PNNs ? 152

2. IMPLICATION D'ADAMTS-4 DANS L'AVC HEMORRAGIQUE : LES ANEVRISMES INTRACRANIENS 153

2.1 PRESENTATION DES AI 153
2.2 ADAMTS-4 : UN EFFET BENEFIQUE DANS LA FORMATION ET/OU RUPTURE DES AI ? 153
2.2.1 Un mécanisme d'action commun d'ADAMTS-4 pour tous les anévrismes ? 155
2.2.2 Expression d'ADAMTS-4 dans les AI 156
2.3 ADAMTS-4 : UN MARQUEUR PREDICTIF DES AI EN CLINIQUE ? 158
2.4 ADAMTS-4 : UNE PROTEASE D'INTERET POUR LES AVC 158

3. LE TPA ORIGINAIRE DES INTERNEURONES A PARVALBUMINE CONTROLE LE REMODELAGE DES RESEAUX PERINEURONAUX (ETUDE 2) 159

3.1 EXPRESSION DU TPA AU SEIN DU SNC 159
3.1.1 AAV-Plat-GFP : une nouvelle approche moléculaire pour étudier le tPA 159
3.1.2 Expression du tPA par les interneurones PV enveloppés de PNNs 159
3.2 LE TPA REGULE LA DEGRADATION DES PNNS, *VIA* LA CONVERSION DU PLASMINOGENE EN PLASMINE 160
3.2.1 In vivo 160
3.2.2 In vitro 161
3.2.3 Expression du plasminogène 163
3.3 IMPLICATION DU TPA DANS LES FONCTIONS PHYSIOLOGIQUES DES PNNS 164
3.3.1 Plasticité cérébrale 164
3.3.2 Régulation de l'activité neuronale 164
3.3.3 Neuroprotection 165
3.4 IMPLICATION DU TPA DANS LES FONCTIONS PATHOLOGIQUES DES PNNS 167
3.5 ROLE DU TPA EXPRIME PAR LES INTERNEURONES PV 167

CONCLUSION GENERALE 171
AUTRES TRAVAUX 175
BIBLIOGRAPHIE 197

Index des figures

Figure 1 : Représentations des réseaux périneuronaux au cours du temps. ... 3
Figure 2 : Structure des réseaux périneuronaux. ... 5
Figure 3 : Représentation simplifiée des chaînes de sucre CS-GAG et leurs profils de sulfatation. ... 6
Figure 4 : Représentation simplifiée des lecticans et de leurs isoformes. ... 8
Figure 5 : Représentation schématique et étude immunohistochimique de phosphacan. ... 12
Figure 6 : La Tn-R et la Hapln1 sont indispensables à la condensation des PNNs. ... 14
Figure 7 : Mesure de l'OD après une privation monoculaire entre un chaton et un chat adulte. ... 18
Figure 8 : Évolution de la plasticité cérébrale en présence ou non des PNNs. ... 20
Figure 9 : L'internalisation neuronale d'Otx2 par les PNNs permet de réguler les périodes critiques. ... 22
Figure 10 : Les PNNs hippocampiques régulent la plasticité synaptique via la transmission GABAergique. ... 23
Figure 11 : ADAMTS-4 favorise la dégradation des PNNs dans la moelle épinière. ... 29
Figure 12 : Structure du plasminogène et de sa forme active en plasmine. ... 30
Figure 13 : Le tPA participe à la plasticité de la dominance oculaire. ... 31
Figure 14 : Structure d'ADAMTS-4 et de ses isoformes. ... 36
Figure 15 : Expression transcriptionnelle d'ADAMTS-4 dans le SNC en conditions physiopathologiques. ... 38
Figure 16 : Expression indirecte d'ADAMTS-4 par les oligodendrocytes matures myélinisants. ... 39
Figure 17 : Le tPA favorise la maturation de la forme inactive (p100) d'ADAMTS-4. ... 41
Figure 18 : Structure des deux formes du tPA et leurs fonctions. ... 49
Figure 19 : Localisation du tPA dans les différentes régions du SNC. ... 51
Figure 20 : Expression du tPA au sein des neurones excitateurs hippocampiques et corticaux. ... 52
Figure 21 : Mécanisme d'action de la cascade fibrinolytique. ... 56
Figure 22 : La barrière hémato-encéphalique. ... 57
Figure 23 : Seul le sc-tPA potentialise l'influx calcique en présence de NMDA. ... 60
Figure 24 : Le sc-tPA accroît la mort neuronale en présence de NMDA. ... 61
Figure 25 : Fonction du tPA et son expression dans la LTP. ... 63
Figure 26 : L'injection tardive de tPA accroît la taille de l'infarctus. ... 67
Figure 27 : Évolution de la lésion ischémique dans les premières heures. ... 73
Figure 28 : Cascade des évènements cellulaires délétères prenant place suite à une occlusion artérielle. ... 74
Figure 29 : Mécanismes simplifiés prenant place suite à une ischémie cérébrale. ... 75
Figure 30 : Mécanismes inflammatoires potentiels mis en place à la suite d'une ischémie cérébrale. ... 77
Figure 31 : L'environnement enrichi réduit le nombre de PNNs en périphérie de la lésion ischémique. ... 79
Figure 32 : Protocole d'entraînement physique post-ischémique (Cohorte 2). ... 91
Figure 33 : Description du modèle thromboembolique. ... 92

Figure 34 : ADAMTS-4 endogène réduit la taille de l'infarctus dans un modèle ischémique permanent. 95
Figure 35 : ADAMTS-4 endogène réduit la taille de l'infarctus dans un modèle thromboembolique. 96
Figure 36 : L'ischémie thromboembolique induit un déficit de la patte avant gauche chez la souris. 97
Figure 37 : ADAMTS-4 améliore la récupération fonctionnelle post-ischémique tardive. 98
Figure 38 : L'entraînement physique et le génotype n'induisent pas de variation pondérale. 99
Figure 39 : L'entraînement physique et/ou la délétion d'ADAMTS-4 n'entraînent pas de modification du nombre de PNNs dans le cortex somatosensoriel 21 jours après ischémie. 101
Figure 40 : L'entraînement physique et/ou la délétion d'ADAMTS-4 n'entraînent pas de modification du nombre de PNNs dans le cortex moteur 21 jours après ischémie. 102
Figure 41 : L'entraînement physique et/ou la délétion d'ADAMTS-4 n'entraînent pas de modification dans la proportion des différentes populations de PNNs dans le cortex somatosensoriel et moteur 21 jours post-ischémiques. 103
Figure 42 : L'absence d'ADAMTS-4 ne modifie pas le nombre de PNNs dans le cortex somatosensoriel. 104
Figure 43 : L'absence d'ADAMTS-4 ne modifie pas le nombre de PNNs dans le cortex moteur. 105
Figure 44 : Expression vasculaire d'ADAMTS-4 au sein de la lésion ischémique. 150
Figure 45 : L'inflammation induit l'expression vasculaire d'ADAMTS-4. 151
Figure 46 : L'absence d'ADAMTS-4 réduit la formation des AI. 154
Figure 47 : Accumulation d'un fragment de versican dans la paroi vasculaire. 156
Figure 48 : ADAMTS-4 est exprimée au cœur et en périphérie des AI. 157
Figure 49 : Système potentiel de régulation du tPA sur la dégradation des PNNs. 163
Figure 50 : Expression de la sous-unité GluN2B des récepteurs NMDA dans les interneurones PV. 165
Figure 51 : Le tPA potentialise la mort excitotoxique dans des cultures d'interneurones. 166
Figure 52 : Caractérisation comportementale des souris cKO. 168

Index des tableaux

Tableau 1 : Synthèse des différentes populations neuronales enveloppées de PNNs dans le SNC. 4

Tableau 2 : Synthèse de tous les membres des PNNs et de leurs isoformes dans le SNC murin. 16

Tableau 3 : Liste des substrats d'ADAMTS-4. 42

Tableau 4 : % de risques attribuables pour les AVC. 72

Liste des abréviations

AAV : *adeno associated virus*
ACM : artère cérébrale moyenne
ADAMTS : *a disintegrin and metalloproteinase with thrombospondin motifs*
ADAMTS-4 : une désintégrine et métalloprotéinase à motifs thrombospondines de type 4
AH : acide hyaluronique
AI : anévrisme intracrânien
AIF : *apoptosis-inducing factor*
AIT : accidents ischémiques transitoires
AMPA : *a-amino-3-hydroxy-5-methylisoxazole- 4-propionic acid*
ATP : adénosine triphosphate
AVC : accidents vasculaires cérébraux
β-Gal : β-Galactosidase
BHE : barrière hématoencéphalique
BNST : *bed nucleus of the stria terminalis*
Bral : *brain-specific hyaluronan-binding protein*
chABC : chondroïtinase ABC
COMP : *cartilage oligomeric matrix protein*
CS-GAG : *chondroitin sulfate glycosaminoglycan*
CSPGs : chondroïtines sulfates protéoglycanes
DSC : débit sanguin cérébral
EGF : *epidermal growth factor*
FADD : Fas-*Associated protein with Death Domain*
Fas : *Fibroblast Associated*
FS-PV : *fast-spiking parvalbumine*
GABA : *gamma-aminobutyric acid*
GAG : glycosaminoglycane
GalNac : N-acétylgalactosamine
GlcA : acide glucuronique
GPI : glycosylphosphatidylinositol
HABP : *Hyaluronan Binding Protein*
Hapln : *Hyaluronan and proteoglycan link protein*
HAS : *Hyaluronan synthase*
IFN-y : interféron gamma
IL : interleukine
KO : *Knock-Out*
KS-GAG : *keratane sulfate glycosaminoglycan*
LBS : *lysine binding site*

LPS : lipopolysaccharide
LRP : *low-density lipoprotein receptor-related protein*
LTD : *Long Term Depression* (dépression à long terme)
LTP : *Long Term Potentiation* (potentialisation à long terme)
MD : *monocular deprivation* (privation monoculaire)
MEC : matrice extracellulaire
MMPs : métalloprotéinases matricielles
NMDA : N-methyl-D-aspartate
NO : *nitric oxyde*
Nptx2 : *Neuronal pentraxin 2*
OD : *ocular dominance* (dominance oculaire)
Otx2 : *orthodenticle homeobox 2*
PAI-1 : *plasminogen inhibitor*
PDGF-CC : *platelet derived growth factor*-CC
Plat : *Plasminogen activator tissue type*
PN-1 : *protéase nexine-1*
PNN : *perineuronal net* (réseau périneuronal)
PV : à parvalbumine
RAP : *receptor- associated protein*
RPTPβ : *receptor protein tyrosin phosphatase beta*
RT-PCR *: Reverse Transcriptase Polymerase Chain Reaction*
sc-tPA : *single-chain tPA* (tPA simple chaîne)
SLA : sclérose latérale amyotrophique
SLRP : *small leucine-rich proteoglycan*
SNC : système nerveux central
SPARC : *secreted protein, acidic and rich in cysteine*
tc-tPA : *two-chain tPA* (tPA double chaîne)
TGF-β : *transforming growth factor- β*
TIMP : *tissue inhibitor of metalloproteinase*
Tn : tesnacine
TNF : *tumor necrosis factor*
tPA : *tissue plasminogen activator* (l'activateur tissulaire du plasminogène)
uPA : *urokinase-type plasminogen activator* (urokinase)
VEGF : *vascular endothelial growth factor*
VIP : *vasointestinal peptide*
VWF : *von Willebrand factor*
WFA : *Wisteria floribunda agglutinin*
WT : *Wild Type*

Introduction

1. Les réseaux périneuronaux

1.1 Une découverte controversée

Vers la fin du XIXème siècle, Camillo Golgi observa pour la première fois un « manteau délicat » enveloppant le corps et les dendrites de certaines cellules nerveuses. Il émit l'hypothèse que cette enveloppe n'était pas une structure neuronale mais une sorte de corset en kératine pouvant altérer les courants nerveux. Cette découverte reposant sur l'utilisation de sa « réaction noire », à base de nitrate d'argent, fut très vite qualifiée d'artéfact histologique par ses confrères. Il faudra attendre les années 1970, grâce au développement de l'immunohistologie, pour confirmer l'existence de cette structure appelée réseau périneuronal (*perineuronal net,* PNN) (Celio *et al.,* 1998) **(Figure 1)**.

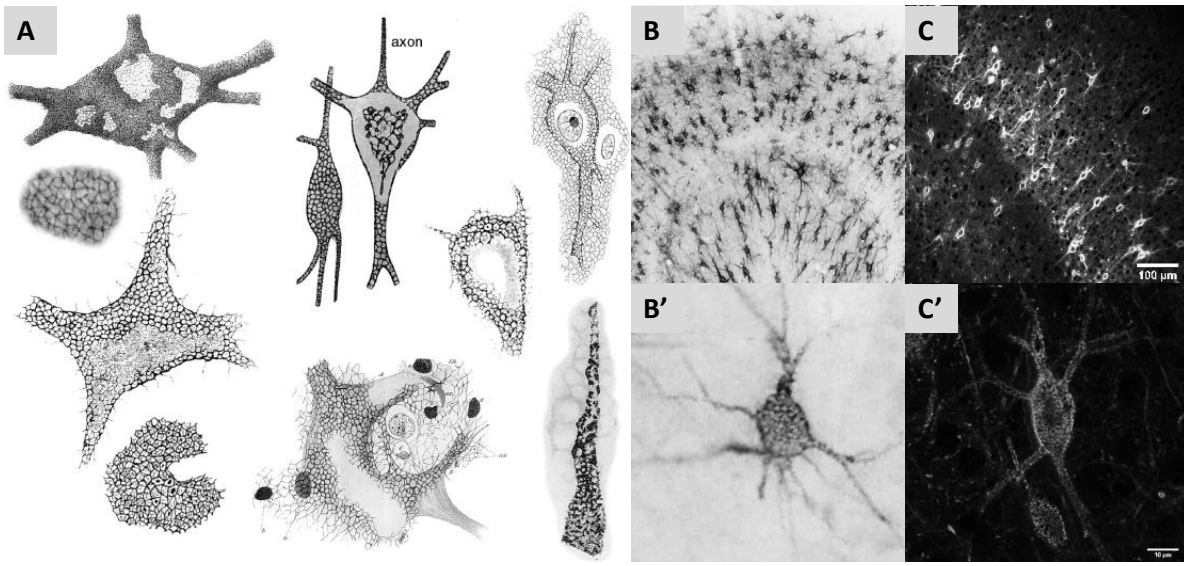


Figure 1 : Représentations des réseaux périneuronaux au cours du temps.
A) Premières illustrations des PNNs datant de la fin du XIXème et du début du XXème siècle. Immunohistochimies des PNNs corticaux, révélés par la lectine WFA (*Wisteria Floribunda Agglutinin*), datant de 1997 (B-B'), ou d'aujourd'hui (C-C'). Adapté de (Lander *et al.,* 1997 ; Celio *et al.,* 1998).

1.2 Généralités

Les PNNs sont des structures spécialisées et condensées de la matrice extracellulaire (MEC), qui enveloppent à la fois le soma et les dendrites de certains neurones et parfois le segment initial de leur axone. De plus, les synapses formées au niveau de ces régions sont également entourées et intégrées au sein des PNNs (Fawcett *et al.,* 2019). Les PNNs sont largement distribués dans de nombreuses

régions du système nerveux central (SNC) et tout particulièrement dans les régions corticales. Ils sont principalement associés aux interneurones à décharge rapide exprimant de la parvalbumine (*fast-spiking parvalbumin*, FS-PV) (Kosaka and Heizmann, 1989 ; Lüth *et al.,* 1992 ; Rossier *et al.,* 2015), mais peuvent également envelopper d'autres populations neuronales en fonction de leur localisation **(Tableau 1)** :

Tableau 1 : Synthèse des différentes populations neuronales enveloppées de PNNs dans le SNC.

Régions du SNC	**Types de neurones**	**Localisation**	**Références**
Cortex (++)	Interneurones FS-PV (¤¤), neurones pyramidaux et neurones exprimant de la calbindine.	Cortex somatosensoriel, visuel, moteur, entorhinal et auditif.	(Brückner *et al.,* 1999 ; Rossier *et al.,* 2015 ; Mueller *et al.,* 2016 ; Lensjø *et al.,* 2017a)
Hippocampe	Neurones pyramidaux et interneurones PV.	CA1, CA2 (++), CA3 et gyrus denté.	(Yamada *et al.,* 2015 ; Lensjø *et al.,* 2017a)
Amygdale	Interneurones PV, neurones excitateurs CamKII positifs (¤¤) et neurones exprimant de la calbindine.	Noyau basal et latéral.	(Wolfgang *et al.,* 1995 ; Morikawa *et al.,* 2017)
Thalamus	Interneurones PV + une autre population non identifiée.	Noyau latéral géniculé ventral.	(Sabbagh *et al.,* 2019)
Hypothalamus	Interneurones PV.	Noyau latéral hypothalamique.	(Horii-hayashi *et al.,* 2016 ; Blacktop *et al.,* 2017)
Cervelet	Cellules de Golgi, cellules de Purkinje et neurones excitateurs.	Cortex cérébelleux et noyau cérébelleux profond.	(Mabuchi *et al.,* 2001 ; Carulli *et al.,* 2006 ; Mueller *et al.,* 2016)
Moelle épinière	Motoneurones.	Corne ventrale et dorsale.	(Lander *et al.,* 1997 ; Lemarchant *et al.,* 2016b ; Mueller *et al.,* 2016)

(++) : Forte expression ; (¤¤) Importante co-localisation.

Au sein des couches corticales, différents profils de distribution des PNNs sont observés. En effet, bien que les PNNs enveloppent majoritairement les interneurones FS-PV de la couche IV dans le cortex visuel et somatosensoriel (Faini *et al.,* 2018 ; Ueno *et al.,* 2019), ils sont exclusifs des couches II et III du cortex entorhinal, dans lesquelles ils enveloppent également des interneurones PV (Lensjø *et al.,* 2017b). Cependant, ils semblent principalement entourer les neurones pyramidaux des couches III et V du cortex moteur et de la couche III du cortex auditif (Brückner *et al.,* 1999).

1.3 Structure et composition des PNNs

La structure condensée des PNNs repose sur différents composants de la MEC comprenant de l'acide hyaluronique (AH), différents chondroïtines sulfates protéoglycanes (CSPGs), des tesnacines R (Tn-R) ainsi que des protéines de liaison (Fawcett *et al.,* 2019) **(Figure 2)**.

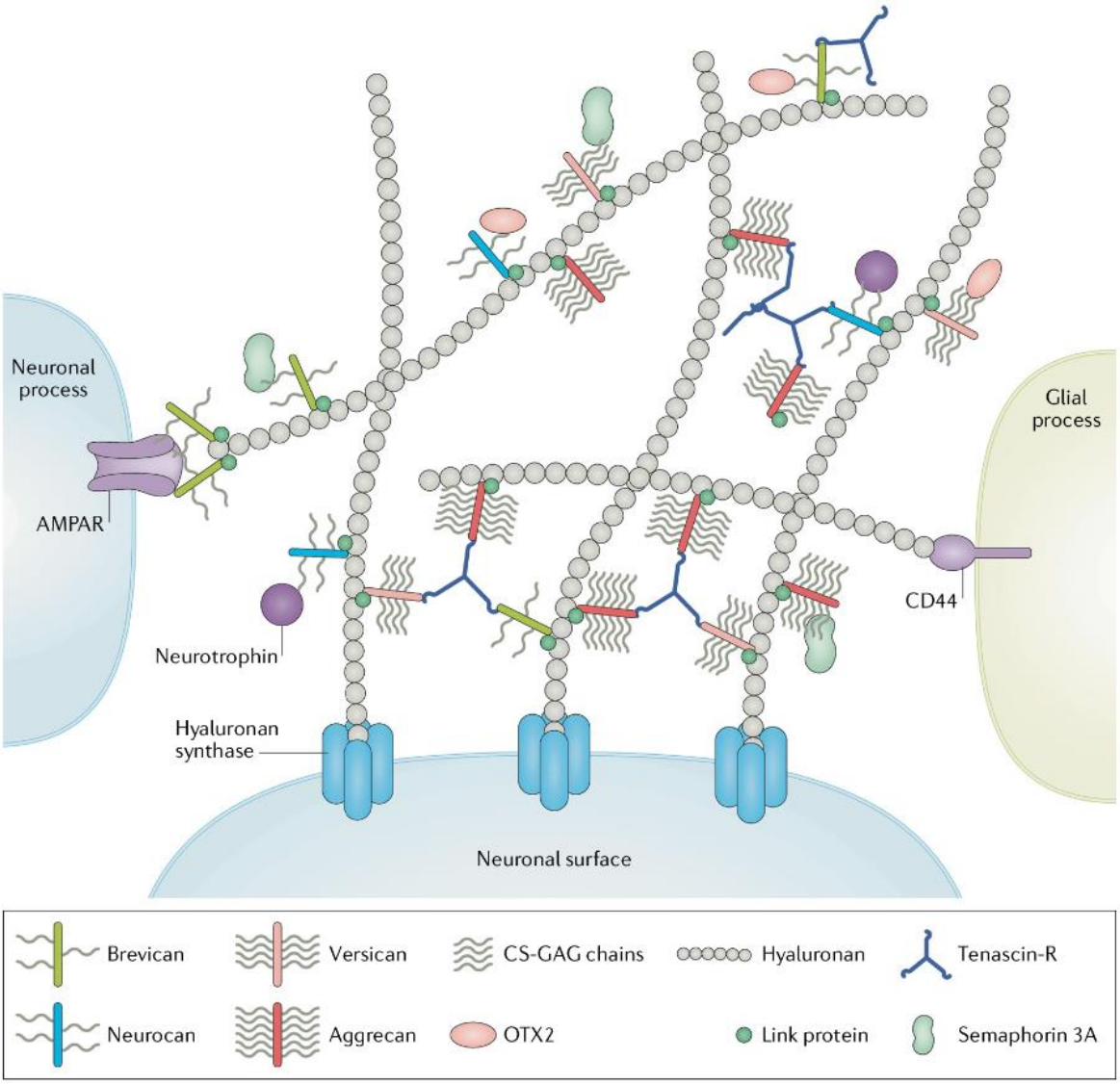


Figure 2 : Structure des réseaux périneuronaux.
Synthétisé à la membrane des neurones, l'AH sert de point d'ancrage à la formation des PNNs. Les lecticans (aggrecan, brevican, neurocan et versican) peuvent ainsi venir se greffer dessus par l'intermédiaire des protéines de liaison. Les Tn-R servent, quant à elles, à relier les lecticans entre eux pour ainsi former une structure condensée (Fawcett *et al.,* 2019).

1.3.1 Les chondroïtines sulfates protéoglycanes

Les CSPGs sont une famille de macromolécules constituées d'un corps protéique auquel sont rattachées des chaînes de sucres sulfatées de type CS-GAG (*chondroitin sulfate glycosaminoglycan*). Les CSPGs sont particulièrement abondants au sein du SNC et peuvent être diffus dans la matrice interstitielle ou condensés en PNNs. Les CSPGs retrouvés au sein des PNNs sont les membres de la famille des lecticans (incluant aggrecan, brevican, neurocan et versican) et le phosphacan.

1.3.1.1 Les glycosaminoglycanes de type chondroïtine sulfate (CS-GAG)

Les chaînes CS-GAG sont des longs polymères linéaires composés de plusieurs répétitions du disaccharide GlcA-GalNac (acide glucuronique + N-acétylgalactosamine). Elles sont reliées aux résidus sérine du corps protéique par l'intermédiaire d'un tétrasaccharide (Xylose-Galactose-Galactose-Glucuronate). Durant leur synthèse, les chaînes CS-GAG peuvent être sulfatées au niveau des carbones de GalNac et/ou de GlcA, suivant différents profils : 4S, 6S, 2S/6S et 4S/6S **(Figure 3)**.

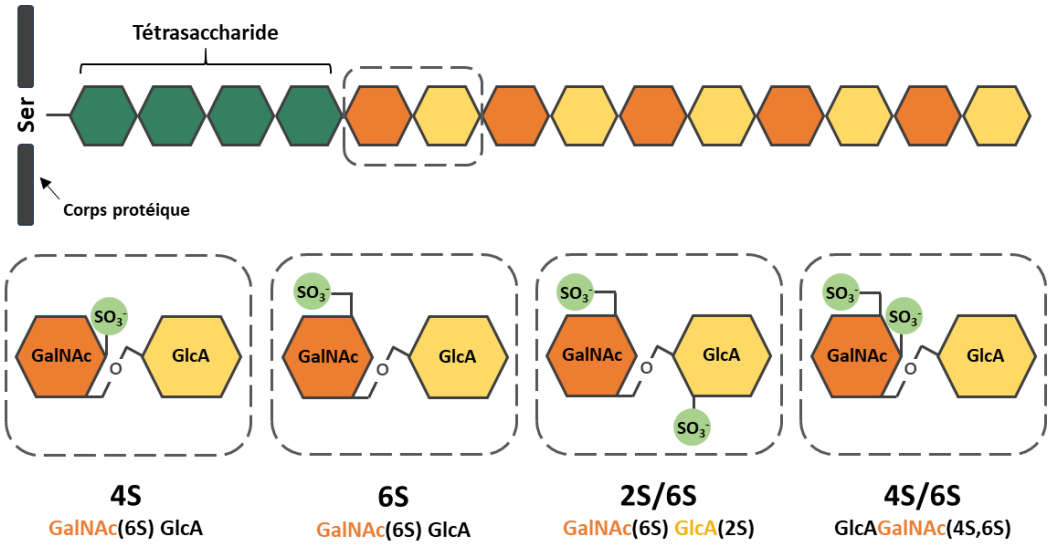


Figure 3 : Représentation simplifiée des chaînes de sucre CS-GAG et leurs profils de sulfatation.
Le corps protéique des CSPGs contient des résidus sérine capables de se fixer au tétrasaccharide situé en amont des chaînes CS-GAG. Ces chaînes sont formées par les répétitions du disaccharide GlcA-GalNac et peuvent être sulfatées au niveau du ou des carbone(s) : C4 de GalNac (4S) ; C6 de GalNac (6S) ; C2 de GlcA et C6 de GalNac (2S/6S) et C4 et C6 de GalNac (4S/6S). Les profils 4S et 6S sont prédominants dans le cerveau, alors que dans le cervelet, c'est le profil 2S/6S. Le profil 4S/6S est fortement présent dans les PNNs. Adapté de (Kwok *et al.,* 2011b ; Dyck and Karimi-Abdolrezaee, 2015).

Ces profils de sulfatation sont déterminants dans la fonction des chaînes CS-GAG. Bien que le profil 6S favorise la pousse axonale et la plasticité cérébrale, le profil 4S s'y oppose (Wang *et al.,* 2008 ; Lin *et al.,* 2011). La sulfatation en 6S est majoritaire dans les phases précoces du développement, puis diminue progressivement en faveur de la sulfatation en 4S. Ce changement dans le profil de sulfatation augmente le ratio 4S/6S responsable de la maturation des PNNs (Miyata *et al.,* 2012), ainsi que de leurs propriétés inhibitrices (Foscarin *et al.,* 2017). Ce profil 4S/6S permet aux PNNs d'interagir spécifiquement avec l'homéoprotéine Otx2 (*orthodenticle homeobox 2)* (Sugiyama *et al.,* 2008 ; Beurdeley *et al.,* 2012) ou encore avec la sémaphorine 3A (Dick *et al.,* 2013), deux molécules participant respectivement à la maturation et aux propriétés inhibitrices des PNNs **(Figure 2)**. Récemment, Van't Spijker et collaborateurs ont montré que la molécule Nptx2 (*Neuronal pentraxin 2)* peut également interagir avec les chaînes 4S/6S et accélère la formation des PNNs *in vitro* (Van't Spijker *et al.,* 2019). Nptx2 pourrait également réguler les décharges rapides des interneurones PV au travers de cette interaction (Chang *et al.,* 2010).

Les chaînes CS-GAG possèdent la particularité d'être reconnues par la lectine WFA (*Wisteria floribunda agglutinin*). Cette dernière se lie spécifiquement à GalNac et est principalement utilisée dans la détection des PNNs en histologie (Berretta *et al.,* 2015).

1.3.1.2 Les lecticans : aggrecan, brevican, neurocan et versican

Le corps protéique des lecticans est constitué d'un domaine globulaire G1 en N-terminal capable de se lier avec l'AH après stabilisation par une protéine de liaison et un domaine globulaire G3 en C-terminal capable de se lier aux Tn-R (Stanton *et al.,* 2011) **(Figure 2)**. Les deux domaines sont connectés par une région centrale de structure variable contenant le site d'attachement aux chaînes CS-GAG. Celui-ci peut accueillir 1 à 100 chaînes en fonction du lectican. L'aggrecan est le seul lectican possédant un domaine globulaire supplémentaire (G2) situé juste après G1 et séparé de celui-ci par un court domaine interglobulaire (IGD). Bien que similaire à G1 sur le plan structurel, G2 ne semble pas pouvoir se lier à l'AH (Avram *et al.,* 2014) **(Figure 4)**.

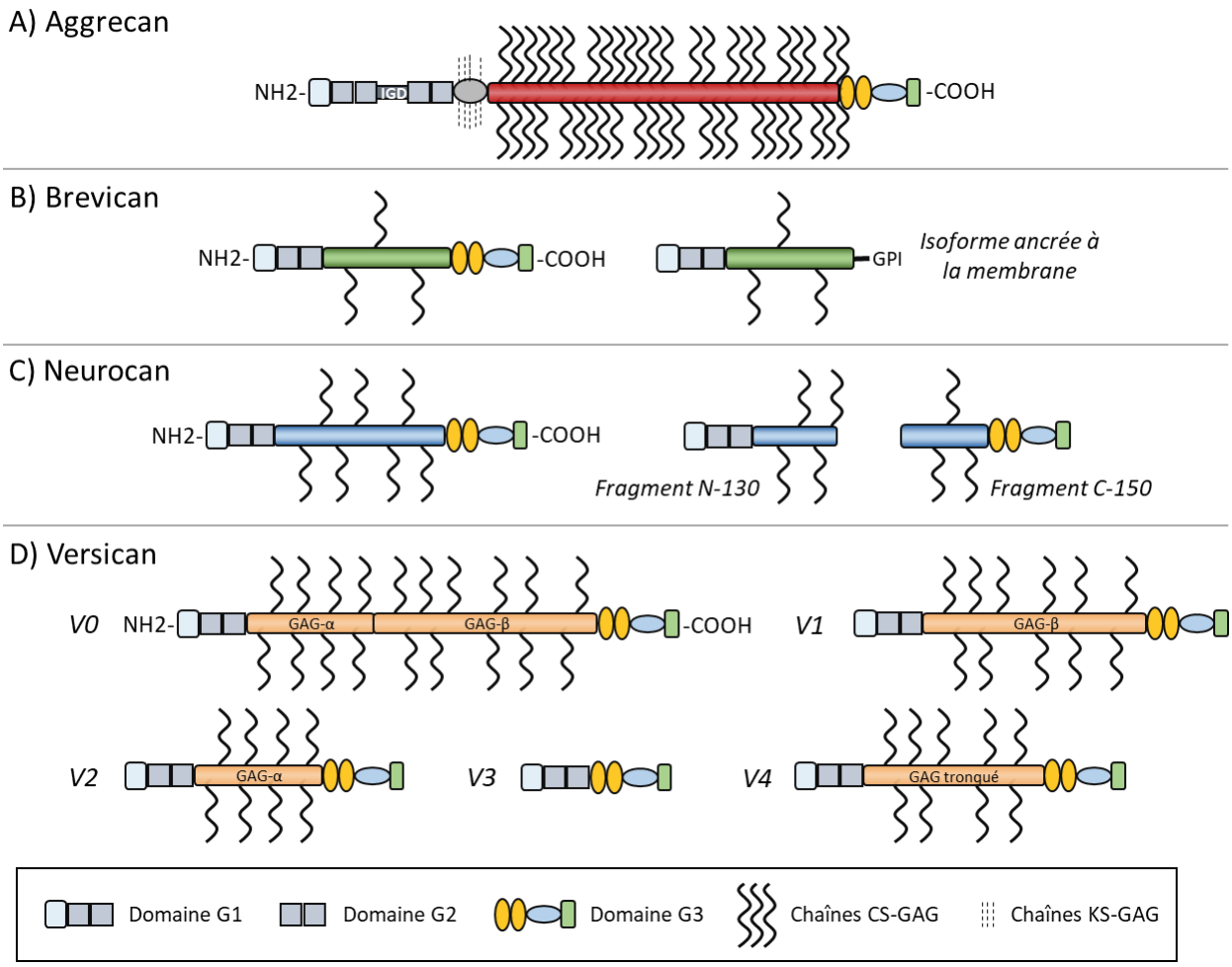


Figure 4 : Représentation simplifiée des lecticans et de leurs isoformes.
A) L'aggrecan, B) le brevican, C) le neurocan et D) le versican possèdent tous un domaine G1 en N-terminal capable de se lier à l'AH et un domaine G3 en C-terminal capable de se lier aux tesnacines. Seul Aggrecan possède un domaine supplémentaire (G2) ainsi qu'un site d'attachement aux chaînes KS-GAG. Adapté de (Stanton *et al.,* 2011).

A) Aggrecan

L'aggrecan se distingue des autres lecticans non seulement par la taille de son corps protéique (environ 250kDa) mais aussi par la centaine de chaînes CS-GAG qui peuvent y être attachées. Il est le seul lectican à posséder, en plus du domaine G2, une région d'attachement aux chaînes de type kératane sulfate (KS-GAG : formées par la répétition du disaccharide Galactose-N-acétylglucosamine) **(Figure 4A)**. Ces chaînes sont connues pour inhiber la régénération axonale (Letourneau *et al.,* 1994), mais leurs fonctions exactes au sein d'aggrecan sont encore mal connues.

Très faible aux stades précoces du développement du SNC, l'expression protéique d'aggrecan augmente brusquement 21 jours après la naissance et perdure jusqu'à l'âge adulte chez le rat (Matthews *et al.,* 2002). Il est fortement détecté dans le cortex somatosensoriel, l'hippocampe, le cervelet, le thalamus ainsi que dans certains noyaux du tronc cérébral. L'aggrecan semble être exprimé uniquement par les neurones et plus particulièrement par les interneurones FS-PV dans les régions corticales (Morawski *et al.,* 2012a).

L'aggrecan est très fortement exprimé au sein des PNNs (Matthews *et al.,* 2002 ; Giamanco and Matthews, 2012). La mise en place des PNNs semble être associée à une augmentation d'expression des ARNm d'aggrecan au niveau des noyaux cérébelleux (Carulli *et al.,* 2007). Des expériences ont montré que l'utilisation de cellules corticales issues de souris déficientes en aggrecan ou l'utilisation d'un ARN interférent dirigé contre l'aggrecan empêchent la formation des PNNs *in vitro* (Giamanco *et al.,* 2010 ; Kwok *et al.,* 2010). Des données similaires sont obtenues *in vivo* après la délétion d'aggrecan du SNC chez la souris. Il est intéressant de constater que cette perte de PNNs *in vivo* induit une restauration de la plasticité (Rowlands *et al.,* 2018). Finalement, les rats présentant un phénotype de type dépressif suite à un stress chronique présentent une perte d'aggrecan associée à une diminution des PNNs dans le cortex préfrontal (Yu *et al.,* 2020). Ainsi, en condition basale ou pathologique, l'aggrecan apparaît comme un composant structurel et fonctionnel indispensable aux PNNs.

B) Brevican

Le brevican est le lectican possédant le plus petit corps protéique (97kDa), d'où son nom (*brevis* signifiant court en latin). C'est également le lectican possédant le moins de chaînes de sucres avec seulement une à trois chaîne(s). Cependant, il est le CSPG le plus abondant du SNC, dont il est spécifique.

Le brevican possède deux formes : une forme secrétée et une forme ancrée à la membrane grâce à une attache GPI (glycosylphosphatidylinositol) **(Figure 4B)**. La forme secrétée serait principalement produite par les neurones tandis que la forme ancrée serait plutôt produite par les cellules gliales (Novak and Kaye, 2000 ; Hamel *et al.,* 2005 ; John *et al.,* 2006). Cette dernière est issue d'un épissage alternatif et ne possède pas de domaine G3. Malgré sa très faible expression par rapport à la forme secrétée, cette isoforme est importante dans la maturation des synapses excitatrices (Favuzzi *et al.,* 2017), mais son implication au sein des PNNs reste encore à déterminer.

La forme secrétée de brevican est exprimée dès les phases précoces du développement et semble atteindre un plateau à l'adolescence. Elle est largement distribuée dans le cortex, l'hippocampe, le cervelet et le thalamus (Seidenbecher *et al.,* 1998 ; Viapiano *et al.,* 2003). Cette forme est à la fois diffuse dans la MEC et condensée au sein des PNNs (Giamanco and Matthews, 2012). En absence de brevican chez la souris, les PNNs se forment normalement (Brakebusch *et al.,* 2002 ; Suttkus *et al.,* 2014), mais on note un déficit de mémoire spatiale et de mémoire à court terme (Favuzzi *et al.,* 2017). Favuzzi et collaborateurs expliquent que le brevican des PNNs contrôle la plasticité en régulant la localisation des canaux potassiques et des récepteurs AMPA (*a-amino-3-hydroxy-5-methylisoxazole-4-propionic acid)* **(Figure 2)** à la membrane des interneurones PV (Favuzzi *et al.,* 2017). Le brevican ne participerait donc pas de manière critique à la formation des PNNs, mais serait majeur dans la régulation de leurs fonctions.

C) Neurocan

Le neurocan est, comme le brevican, spécifique du SNC. Durant le développement cérébral, le neurocan est exprimé sous sa forme complète (275kDa), puis seuls les fragments issus d'un clivage protéolytique (fragment N-term : 130kDa et fragment C-term : 150kDa) sont retrouvés chez l'adulte (Dyck and Karimi-Abdolrezaee, 2015) **(Figure 4C)**. L'expression de neurocan est très forte durant la gestation puis diminue après la naissance et ce, jusqu'à l'âge adulte. De façon surprenante, la présence de brevican semble réguler celle de neurocan (Brakebusch *et al.,* 2002). Le neurocan est retrouvé dans le cortex préfrontal, le cervelet, la moelle épinière, le thalamus ou l'hypothalamus (Zhou *et al.,* 2001b ; Sullivan *et al.,* 2018). Les neurones (Engel *et al.,* 1996), les astrocytes (Matsui *et al.,* 2002) et les précurseurs des oligodendrocytes (Asher *et al.,* 2000) sont responsables de son expression.

Le neurocan peut être diffus dans la MEC ou associé aux PNNs sous sa forme clivée de 130kDa (Miyata *et al.,* 2005 ; Deepa *et al.,* 2006). Les souris déficientes en neurocan ne présentent pas de modification des PNNs corticaux mais montrent néanmoins une diminution de la plasticité synaptique accompagnée d'une réduction de la potentialisation à long terme (*Long Term Potentiation*, LTP) (Zhou *et al.,* 2001b). Ces changements pourraient être liés à la capacité de neurocan à stabiliser les synapses des interneurones PV corticaux, *via* son interaction avec la molécule d'adhésion NCAM (*Neural cell adhesion molecule*) (Sullivan *et al.,* 2018). Enfin, une diminution d'expression de neurocan a été

observée dans le cortex préfrontal chez des rats vulnérables au stress, en lien avec une diminution des PNNs (Yu *et al.,* 2020).

D) Versican

Le versican est le seul lectican possédant deux régions centrales d'attachement aux CS-GAG, appelées domaines GAGα et GAGβ. Ces deux domaines sont soumis à des épissages alternatifs, générant cinq isoformes de versican (allant de V0 à V4**) (Figure 4D)**. V0 contient les domaines GAGα et GAGβ, V1 ne contient que le domaine GAGβ, V2 contient uniquement le domaine GAGα tandis que V3 ne contient pas un seul domaine central ni de chaîne CS-GAG. V4 est similaire à V1 mais avec un domaine GAGβ tronqué (Nandadasa *et al.,* 2014).

Toutes les isoformes sont retrouvées dans la paroi vasculaire (Stanton *et al.,* 2011), alors que dans le SNC, on trouve essentiellement les isoformes V0, V1 et V2. Une étude d'immunohistochimie, utilisant des anticorps dirigés contre le domaine GAGα ou GAGβ, a permis de mettre en évidence la présence de V0, V1 et V2 dans les stades embryonnaires, tandis que chez l'adulte, seuls V0 et V2 subsistent (Horii-Hayashi *et al.,* 2015). Le versican est exprimé préférentiellement par les oligodendrocytes (Asher *et al.,* 2002 ; Carulli *et al.,* 2006) mais aussi par les précurseurs neuronaux et astrocytaires (Gu *et al.,* 2007).

La présence de versican dans les PNNs a été confirmée au niveau du cortex, de l'hippocampe et du cervelet (Bignami *et al.,* 1993 ; Carulli *et al.,* 2006 ; Deepa *et al.,* 2006), principalement autour des neurones pyramidaux et les cellules de Purkinje (Horii-hayashi *et al.,* 2008). Son expression est également retrouvée dans les PNNs enveloppant les motoneurones de la moelle épinière dans un modèle de sclérose latérale amyotrophique chez le rat (Forostyak *et al.,* 2014). De façon surprenante, l'étude immunohistochimique de Horii et collaborateurs indique que le marquage de versican enveloppant les neurones ne co-localise pas avec la lectine WFA (un marqueur des PNNs) mais uniquement avec la lectine HABP (*Hyaluronan Binding Protein* : un marqueur de l'AH) (Horii-hayashi *et al.,* 2008). Ces données suggèrent l'existence de plusieurs populations de PNNs basées sur leur composition.

1.3.1.3 Le phosphacan

Le phosphacan est un CSPG de haut poids moléculaire (>800kDa) spécifique du SNC. Sa forme sécrétée dans la MEC est le résultat d'un épissage alternatif du récepteur RPTPβ (*receptor protein tyrosin phosphatase beta*). Le phosphacan comprend un domaine anhydrase carbonique, un domaine fibronectine de type III, un domaine *spacer* et une région d'attachement aux chaînes CS-GAG, mais, à la différence de son récepteur RPTPβ, le phosphacan ne possède pas de domaine transmembranaire ni de domaine tyrosine phosphatase **(Figure 5A)**. Comme les lecticans, le phosphacan peut interagir avec les Tn-R (Garwood *et al.,* 2003 ; Zimmermann and Dours-Zimmermann, 2008).

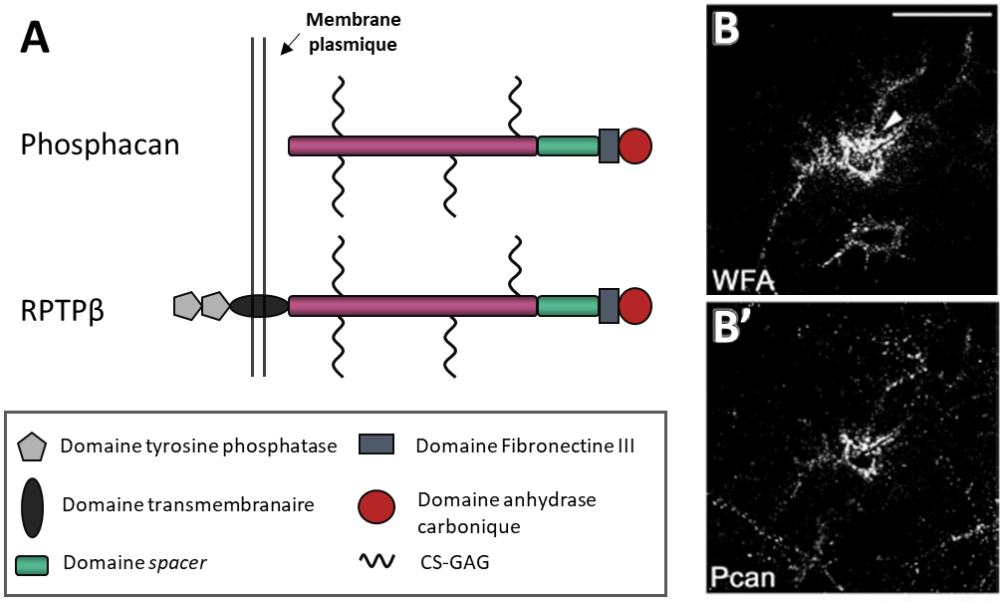


Figure 5 : Représentation schématique et étude immunohistochimique de phosphacan.
A) Le phosphacan est issu d'un épissage alternatif à partir de RPTPβ et correspondent à la partie extracellulaire de celui-ci. (B et B') Co-localisation du marquage WFA avec celui de phosphacan *in vitro* (Échelle de 50µm). Adapté de (Garwood *et al.,* 2003 ; Miyata *et al.,* 2005).

L'expression de phosphacan atteint son maximum autour du 15ème jour post-natal, avant de diminuer progressivement chez la souris adulte (Miyata and Kitagawa, 2016). Le phosphacan est exprimé par les neurones, essentiellement les neurones hippocampiques et cérébelleux, les astrocytes et les précurseurs des oligodendrocytes (Grimpe and Silver, 2002 ; Dobbertin *et al.,* 2003 ; Hayashi *et al.,* 2005).

Le phosphacan participe à la structure des PNNs (Miyata *et al.,* 2005) **(Figure 5B)**, et plus particulièrement ceux enveloppant les interneurones PV corticaux (Haunsø *et al.,* 1999) et les neurones excitateurs des noyaux cérébelleux profonds (Carulli *et al.,* 2006). Très récemment, une étude *in vivo* a fourni des preuves que le récepteur RPTPβ situé dans la membrane plasmique des neurones sert d'ancrage aux PNNs et est donc indispensable à leur formation (Eill *et al.,* 2020).

1.3.2 L'acide hyaluronique

L'AH (ou hyaluronane) est un polymère d'une centaine de répétitions du disaccharide GlC-GlcNac (acide glucuronique + N-acétyl-glucosamine). Il fait partie des glycosaminoglycanes (GAG), mais ne peut être ni sulfaté ni rattaché à un corps protéique à la différence des GAG constituant les différents protéoglycanes (Testa *et al.,* 2019).

L'AH est très largement exprimé dans la MEC par des synthétases HAS (*hyaluronan synthase*) ancrées à la membrane plasmique des neurones ou des astrocytes (Fowke *et al.,* 2017). Il existe trois isoformes d'HAS allant de 1 à 3 aux propriétés de synthèse différentes. En effet, HAS3 permet la formation de polymères d'AH pouvant aller de 100 à 1000 kDa, tandis que HAS1 et HAS2 génèrent des polymères allant de 200 à 2000 kDa et ce, dix fois plus rapidement (Itano *et al.,* 1999 ; Kwok *et al.,* 2011a). L'expression de ces isoformes peut varier en fonction des régions du SNC. Dans le cervelet, seules HAS2 et HAS3 sont exprimées, tandis qu'elles sont toutes exprimées dans le SNC notamment par les neurones hippocampiques (Carulli *et al.,* 2006).

L'AH permet le maintien et l'architecture des PNNs en servant de squelette sur lequel viennent se greffer les lecticans et les protéines de liaison ; sa fonction est donc primordiale. Il est intéressant de constater que la mise en place des PNNs coïncide avec la surexpression des ARNm des différentes HAS (Carulli *et al.,* 2007). Une expérience *in vitro* a démontré que la transfection de HAS3 dans des cellules embryonnaires humaines engendre la formation et la condensation des PNNs (Kwok *et al.,* 2010). Dans des cultures neuronales dépourvues d'astrocytes, l'AH peut naturellement former des PNNs, notamment autour des interneurones PV (Miyata *et al.,* 2005 ; Giamanco and Matthews, 2012 ; Fowke *et al.,* 2017). Cependant, dans des cultures mixtes (neurones et astrocytes), l'AH semble former une matrice péri-cellulaire autour des astrocytes au détriment des neurones (Maleski and Hockfield, 1997). Ueno et collaborateurs montrent, par une étude immunohistochimique, qu'il existe une forte population de neurones corticaux WFA^+ $HABP^-$ (marqueur de l'AH). Cependant, nous ne savons pas à

quel point la structure condensée des PNNs peut impacter la liaison des lectines avec leur site de fixation. Cette étude démontre néanmoins l'existence de neurones $HABP^+$ WFA^- dans la couche corticale I (Ueno *et al.,* 2018), suggérant de nouveau l'existence de plusieurs populations de PNNs.

1.3.3 Les ténascines

Les ténascines (Tn) forment une famille de quatre glycoprotéines (Tn-C, Tn-R, Tn-W et Tn-X) constituées de 4 domaines fonctionnels : une région riche en cystéine en N-terminal, un domaine semblable à l'EGF (*epidermal growth factor),* un domaine semblable à la fibronectine et un dernier semblable au fibrinogène en C-terminal (Anlar and Gunel-Ozcan, 2012). Grâce à leur région riche en cystéine, les Tn peuvent former un homo-trimère (forme R) ou homo-hexamère (formes C et W) (Kwok *et al.,* 2011b). Elles sont fortement exprimées durant les stades embryonnaires (Jones and Jones, 2000).

Dans le SNC, on retrouve principalement les formes R et C, exprimées par les neurones et les cellules gliales. Seule la forme R fait partie des PNNs, où elle relie trois lecticans entre eux grâce à sa partie C-terminal et le domaine G3 des lecticans (Kwok *et al.,* 2011b) **(Figure 2)**. La Tn-R peut également interagir avec le phosphacan et son récepteur RPTPβ (Zimmermann and Dours-Zimmermann, 2008). Comme le démontre l'utilisation de souris déficientes, le Tn-R est nécessaire à la condensation et la maturation des PNNs (Brückner *et al.,* 2000 ; Suttkus *et al.,* 2014) **(Figure 6)**.

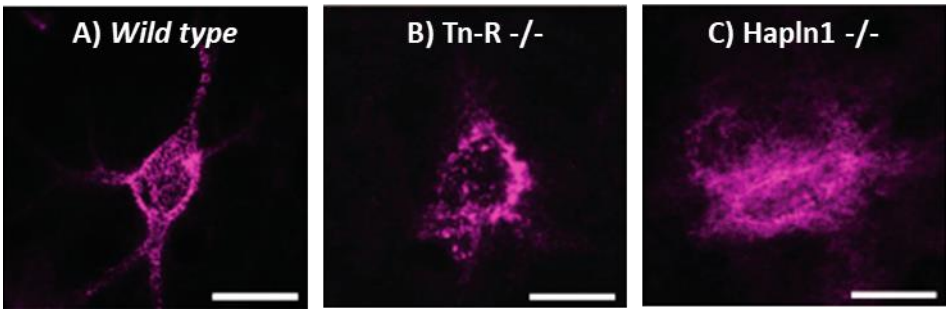


Figure 6 : La Tn-R et la Hapln1 sont indispensables à la condensation des PNNs.
Formes des PNNs en présence (A) ou non de la Tn-R (B) ou de la Hapln1 (C), révélées par la lectine WFA dans le cortex somatosensoriel (Échelle de 20µm). Adapté de (Suttkus *et al.,* 2014).

1.3.4 Les protéines de liaison

La famille des protéines de liaison comporte quatre membres connus également sous les appellations Hapln (*hyaluronan and proteoglycan link protein*), ou Bral (*brain-specific hyaluronan-binding protein*) pour ceux spécifiques du SNC. Elles partagent une structure similaire : une séquence signal en N-terminal, un domaine immunoglobuline et deux modules de liaison consécutifs (Kwok *et al.,* 2011a). Leur rôle est d'associer l'AH aux différents lecticans.

Trois des quatre membres de cette famille sont retrouvés dans le SNC : Hapln1, Hapln2/Bral1 et Hapln4/Bral2. Hapln2/Bral1 peut à la fois être exprimée par les neurones et les oligodendrocytes et est associée aux nœuds de Ranvier (Oohashi *et al.,* 2002 ; Carulli *et al.,* 2006). Les Hapln1 et Hapln4/Bral2 sont exclusivement exprimées par les neurones et sont retrouvées aux sein des PNNs (Bekku *et al.,* 2003 ; Carulli *et al.,* 2006). Dans le cortex visuel, l'expression de Hapln1 connaît un pic 15 jours après la naissance avant de diminuer chez l'adulte, tandis que Hapln4/Bral2 semble atteindre un plateau 21 jours après la naissance (Carulli *et al.,* 2010). On notera une prédominance de Hapln4/Bral2 pour les PNNs localisés dans le cervelet et le tronc cérébral (Bekku *et al.,* 2012).

Dans le SNC, Hapln1 est exclusivement retrouvée au sein des PNNs et son expression est dépendante de leur mise en place (Carulli *et al.,* 2007 ; Kwok *et al.,* 2011a). Plusieurs expériences, aussi bien *in vitro* que *in vivo*, s'accordent à montrer que Hapln1 est indispensable pour lier et condenser les différentes protéines qui constituent les PNNs (Kwok *et al.,* 2010 ; Suttkus *et al.,* 2014) **(Figure 6)**. Son absence induit une restauration de la plasticité (Carulli *et al.,* 2010). Les PNNs ont donc besoin de garder une forme condensée pour maintenir leurs propriétés inhibitrices. Des résultats très similaires à ceux de Hapln1 ont été obtenus avec la délétion de Hapln4/Bral2 (Bekku *et al.,* 2012).

Tableau 2 : Synthèse de tous les membres des PNNs et de leurs isoformes dans le SNC murin.

	Type cellulaire d'expression	Stade d'expression	Région(s) observée(s)	Interaction(s) au sein des PNNs	Fonction(s) connue(s) au sein des PNNs
Aggrecan	Neurones dont interneurones PV (++)	21 jours après naissance (++)	Cortex, hippocampe, cervelet, thalamus et tronc cérébral	N-term : AH *via* Hapln1 ou Hapln4/Bral2 ; C-term : 2 CSPGs *via* Tn-R	Structure et rôle inhibiteur des PNNs
Brevican **(2 isoformes)**	Neurones et cellules gliales	Plateau à l'adolescence (++)	Cortex, hippocampe, cervelet et thalamus		Régule inhibition des PNNs
Neurocan **(+2 fragments de clivage)**	Neurones, astrocytes et précurseurs des oligodendrocytes	Gestation (++) puis diminue après la naissance	Cortex préfrontal, cervelet, moelle épinière, thalamus et hypothalamus		Maintien des PNNS dans le cortex préfrontal
Versican **(3 isoformes)**	Oligodendrocytes (++), précurseurs neuronaux et astrocytaires	Du stade embryonnaire à l'adulte pour V0 et V2	Cortex, hippocampe et cervelet		ND
Phosphacan **(+RPTPβ)**	Neurones, astrocytes et oligodendrocytes	15 jours après la naissance (++)	Cortex et cervelet	Tn-R	Structure (squelette des PNNs)
AH	Neurones et astrocytes (par les HAS ancré à la membrane)	Développement	ND	Lecticans + Hapln1 ou Hapln4/Bral2	Structure (squelette des PNNs)
Ténascines **(2 membres)**	Neurones et cellules gliales	Stade embryonnaire (++)	ND	3 CSPGs (lecticans et/ou phosphacan)	Structure (condensation des PNNs)
Protéines de liaison **(3 membres)**	Neurones et oligodendrocytes (uniquement pour Hapln2/Bral1)	Entre 15 et 21 jours après la naissance (++)	ND pour Hapln1 Cervelet et tronc cérébral pour Hapln4/Bral2	Lie l'AH aux lecticans	Structure (condensation des PNNs)

(++) : Expression importante ; ND : non décrit

1.4 Périodes critiques et mise en place des réseaux périneuronaux

La maturation des réseaux périneuronaux s'effectue durant le développement post-natal et plus particulièrement à la fin de périodes de grande plasticité, appelées périodes critiques, que nous allons maintenant décrire.

1.4.1 Les périodes critiques de plasticité

Les périodes critiques correspondent à des intervalles de temps distincts durant lesquels la plasticité synaptique est grandement accrue, et se retrouve particulièrement sensible aux stimuli environnementaux. Elles s'accompagnent de modifications anatomiques permanentes conduisant à l'acquisition de certaines fonctions (sens, mémoire, cognition ou comportement). Le début ainsi que la durée des périodes critiques varient en fonction des régions cérébrales. Les premières commencent dans les aires sensorielles (odorat, audition, vision), suivies des régions impliquées dans le langage (chez l'Homme), puis celles impliquées dans les fonctions motrices et enfin celles responsables des fonctions cognitives avancées (Hensch and Bilimoria, 2012). L'ouverture des périodes critiques associées aux aires sensorielles est généralement dépendante de l'acquisition des premières informations sensorielles. En effet, des études ont pu mettre en évidence que l'exposition à l'obscurité (*dark rearing*) ou à un environnement bruyant (*noise rearing*) depuis la naissance entraîne un retard dans l'ouverture de la période critique du cortex visuel ou auditif (Mower, 1991 ; Chang and Merzenich, 2003).

La découverte des périodes critiques repose sur les travaux de Hubel et Wiesel sur la plasticité de la dominance oculaire (*ocular dominance*, OD). Le cortex visuel de chaque hémisphère comporte des neurones répondant préférentiellement aux informations transmises par un œil ou l'autre. Cette variabilité d'activation neuronale correspond à la dominance oculaire **(Figure 7A)**.

Hubel et Wiesel ont montré que la fermeture d'un œil (par suture de la paupière), ou privation monoculaire (*monocular deprivation*, MD), durant plusieurs jours chez le chaton entraîne une amblyopie (différence d'acuité visuelle entre les deux yeux d'origine non lésionnelle). Cette amblyopie reflète un décalage de l'OD qui se traduit par une augmentation des afférences associées à l'œil ouvert (ipsilatéral) au détriment des afférences de l'œil temporairement fermé (controlatéral) (Wiesel and Hubel, 1965) **(Figure 7B)**. Cependant, une MD de longue durée (un an) chez le chat adulte n'entraîne pas de modification de l'OD et, par conséquent, aucune amblyopie (Hubel and Wiesel, 1970) **(Figure**

7C). Cette différence de plasticité est le reflet d'une période critique ouverte chez le chaton à la différence du chat adulte.

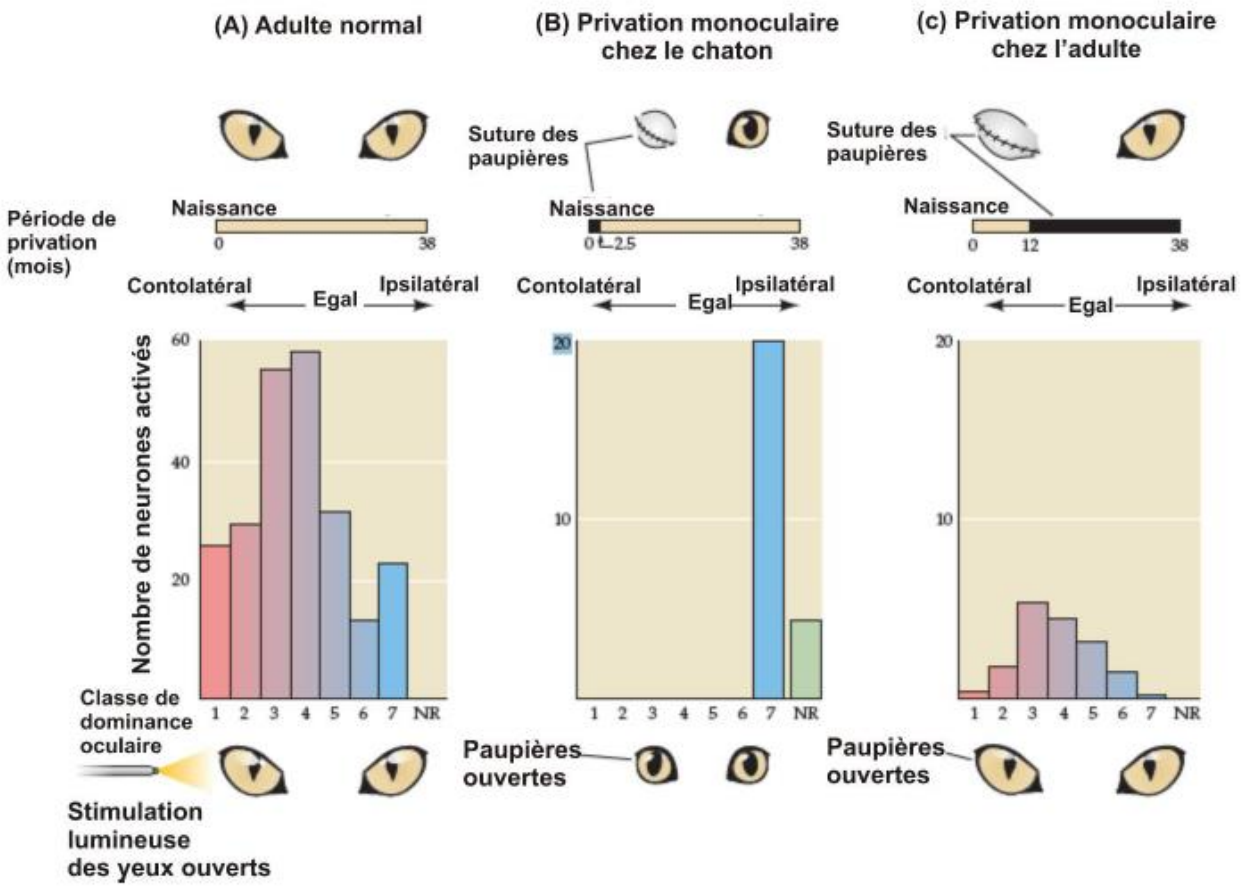


Figure 7 : Mesure de l'OD après une privation monoculaire entre un chaton et un chat adulte.
A) Après stimulation lumineuse, les neurones du cortex visuel peuvent être classés par en fonction de leur activation : réponse d'activation spécifique à l'œil controlatéral (classe 1), en passant par la réponse équivalente pour les deux yeux (classe 4) pour finir par réponse d'activation spécifique à l'œil ipsilatéral (classe 7). NR représente les neurones non activés. En condition physiologique, le chat présente une activation neuronale plus importante pour l'œil controlatéral par rapport à l'hémisphère enregistré. B) La suture brève d'une paupière chez le chaton, induit une OD en faveur de l'œil non suturé (ipsilatéral). C) La suture d'une paupière de longue durée chez le chat adulte, n'induit pas de modification de l'OD. D'après (Neurosciences, 5ème édition Purves *et al.,* 2015).

Par la suite, des résultats similaires ont été obtenus chez différentes espèces telles que la souris ou le macaque (Gordon and Stryker, 1996 ; Horton and Hocking, 1997). Il est intéressant de constater que la privation binoculaire (suture des deux paupières) durant la période critique de la souris n'induit

pas de décalage de l'OD, suggérant qu'une compétition entre les deux yeux est nécessaire pour instaurer de la plasticité (Gordon and Stryker, 1996).

1.4.2 La mise en place des réseaux périneuronaux

Dans le cortex visuel de la souris, la mise en place des PNNs débute aux alentours du 14ème jour après la naissance (au moment de l'ouverture des yeux) et prend fin vers le 40ème jour postnatal, au moment de la fermeture de la période critique du cortex visuel (Ye and Miao, 2013). La maturation des PNNs accompagne la fermeture des périodes critiques et varie donc en fonction des différentes régions cérébrales. La maturation des PNNs est également dépendante des expériences sensorielles puisque l'exposition des animaux à l'obscurité induit non seulement un retard dans la mise en place de la période critique mais également un retard dans la formation des PNNs dans le cortex visuel (Mower, 1991 ; Ye and Miao, 2013). De façon surprenante, il est possible de contrebalancer ces effets en associant l'exposition des animaux à l'obscurité avec un environnement enrichi (Bartoletti *et al.,* 2004). Enfin, la suppression des vibrisses chez des nouveaux nés altère la maturation des PNNs dans le cortex somatosensoriel (Ueno *et al.,* 2017).

Une MD réalisée au point culminant de la période critique (vers les 28 jours postnataux), entraîne un décalage de l'OD ainsi qu'un remodelage des PNNs dans le cortex visuel (Kelly *et al.,* 2015). La maturation des PNNs à la fin des périodes critiques aurait donc pour fonction de consolider les synapses mises en place durant la période critique. Cette consolidation entraîne la fermeture de la plasticité, mettant fin aux périodes critiques. De fait, l'altération des PNNs chez les souris déficientes en Hapln1 ou pour une enzyme de synthèse des chaînes CS-GAG, induit un retard dans la fermeture des périodes critiques (Carulli *et al.,* 2010 ; Hou *et al.,* 2017). De manière intéressante, la dégradation des PNNs chez l'adulte entraîne une restauration de la plasticité mise en place durant les périodes critiques **(Figure 8)**. En effet, Pizzorusso et collaborateurs ont démontré que l'injection dans le cortex visuel adulte d'une enzyme bactérienne nommée la chondroïtinase ABC (chABC), permet non seulement la dégradation des PNNs mais également un décalage de l'OD en faveur de l'œil encore ouvert après une MD (Pizzorusso *et al.,* 2002). Il est intéressant de constater que si l'œil affecté par la MD est rouvert, l'injection de chABC induit, dans ce cas précis, une récupération complète de l'amblyopie (Pizzorusso *et al.,* 2006).

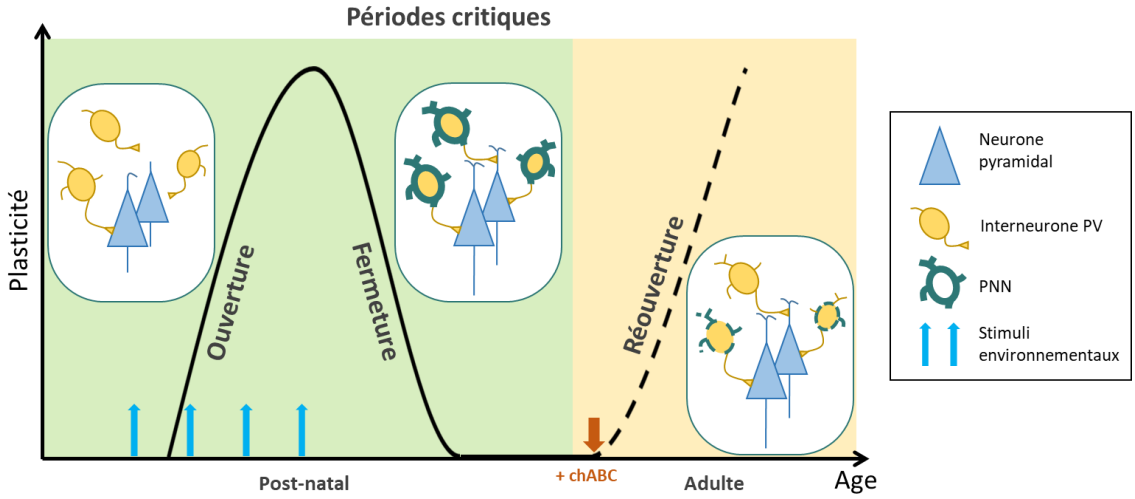


Figure 8 : Évolution de la plasticité cérébrale en présence ou non des PNNs.
La maturation des PNNs entraîne la fermeture de la période critique et ainsi la diminution de la plasticité cérébrale. Cependant, la dégradation de ces PNNs *via* l'injection de chABC, permet de restaurer la plasticité cérébrale en ouvrant de nouveau les périodes critiques.

La modulation des PNNs constitue donc une piste thérapeutique intéressante afin d'accroître la plasticité dans des pathologies neurodégénératives telles que la maladie d'Alzheimer ainsi que pour accroître la récupération fonctionnelle dans le cas des lésions cérébrales telles que les accidents vasculaires cérébraux (AVC) ischémiques.

1.5 Fonctions associées aux réseaux périneuronaux

1.5.1 Une surface d'interaction

1.5.1.1 Ionique

Les PNNs sont des structures constituées majoritairement de sucres chargés négativement au travers des CSPGS et de l'AH, ce qui leur confère des propriétés polyanioniques (Brückner *et al.,* 1993). Cette particularité permet aux PNNs d'interagir plus facilement avec les cations de la MEC tels que le sodium, le potassium et le calcium. Les PNNs agiraient alors comme des réservoirs à cations favorisant la dépolarisation neuronale et plus particulièrement les décharges rapides des interneurones FS-PV (Härtig *et al.,* 1999). Les PNNs pourraient également interagir avec des ions métalliques dont le Fe^{3+}, protégeant ainsi les neurones contre le stress oxydatif (Reinert *et al.,* 2003 ; Morawski *et al.,* 2004 ;

Cabungcal *et al.,* 2013). En effet, la délétion de certains composants des PNNs (aggrecan, brevican, Tn-R ou Hapln1) chez la souris accroît les lésions suite à l'injection de chlorure de fer ($FeCl_3$) (Suttkus *et al.,* 2014).

1.5.1.2 Protéique

Comme nous l'avons précédemment mentionné **(cf 1.3.1.1 Les glycosaminoglycanes de type chondroïtine sulfate (CS-GAG))**, les chaînes CS-GAG des PNNs sont majoritairement sulfatées en 4S/6S ce qui leur permet d'interagir avec différentes molécules de la MEC. La localisation de la sémaphorine 3A dans les régions corticales est dépendante de la présence de PNNs. En effet, leur déplétion à l'aide de chABC ou chez des souris déficientes en Hapln1 conduit à une délocalisation de la sémaphorine 3A autour des interneurones PV (Vo *et al.,* 2013). La sémaphorine 3A est connue pour ses propriétés chémorépulsives sur la croissance axonale et peut interagir avec les chaînes de sucres des PNNs (Dick *et al.,* 2013). Les PNNs peuvent également interagir avec la Nptx2, une molécule impliquée à la fois dans la mobilité des récepteurs AMPA et dans la régulation des décharges rapides des interneurones FS-PV (O'Brien *et al.,* 1999 ; Chang *et al.,* 2010 ; Van't Spijker *et al.,* 2019).

Sugiyama et collaborateurs ont découvert que le facteur de transcription Otx2 produit au niveau des plexus choroïdes peut s'accumuler au sein des interneurones PV en fonction de l'expérience visuelle. Une administration exogène d'Otx2 accélère le développement des interneurones PV ainsi que la fermeture de la période critique (Sugiyama *et al.,* 2008), tandis que sa délétion entraîne des résultats opposés (Lee *et al.,* 2017). En réalité, Otx2 est internalisé par les interneurones PV par l'intermédiaire des PNNs. Cette interaction dépend du ratio de sulfatation 4S/6S des chaînes CS-GAG (Beurdeley *et al.,* 2012 ; Miyata *et al.,* 2012). Ainsi, l'accumulation d'Otx2 autour des interneurones PV peut être abolie par une administration de chABC. Il est intéressant de constater que la diminution de l'internalisation d'Otx2 réduit en retour la mise en place des PNNs et donc la plasticité, créant ainsi une boucle de rétrocontrôle (Beurdeley *et al.,* 2012) **(Figure 9)**.

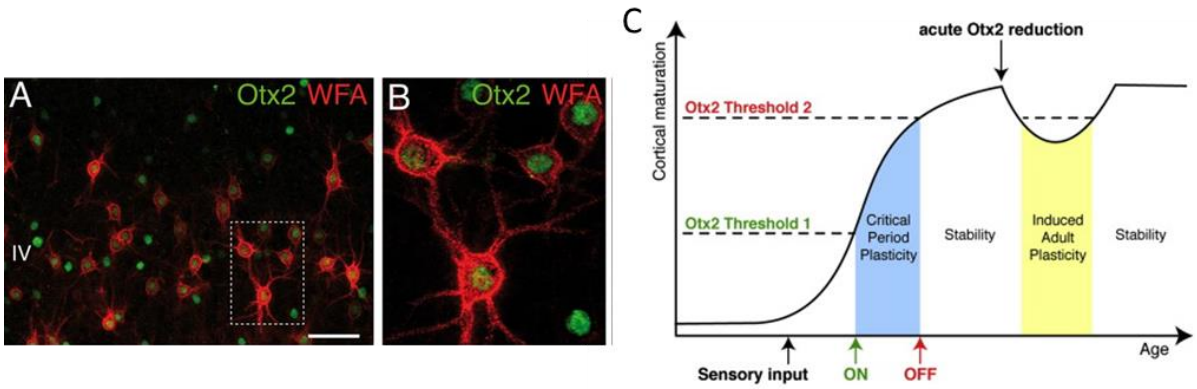


Figure 9 : L'internalisation neuronale d'Otx2 par les PNNs permet de réguler les périodes critiques. (A et B) Immunohistochimie d'Otx2 (en vert) et des PNNs marqués par la lectine WFA (en rouge) (Échelle de 50µm). C) L'augmentation d'Otx2 au sein des interneurones PV permet leur maturation et celle des PNNs, ce qui conduit à la fermeture des périodes critiques. À l'inverse, la réduction de l'internalisation d'Otx2 altère la mise en place des PNNs et permet de rouvrir les périodes critiques. Adapté de (Beurdeley *et al.,* 2012 ; Prochiantz and Di Nardo, 2015).

1.5.2 Une barrière physique à la fois protectrice et inhibitrice

1.5.2.1 En condition physiologique

A) Plasticité structurelle & synaptique

La structure condensée des PNNs forme en réalité une barrière physique autour des neurones, consolidant les synapses mises en place durant les périodes critiques. Cependant, la formation de cette barrière physique limite en retour la plasticité structurelle des neurones.

Suite à l'injection de chABC dans le cervelet de rat adulte, la perte de PNNs favorise la croissance neuritique des cellules de Purkinje (Corvetti and Rossi, 2005). *In vitro*, l'administration de chABC accroît à la fois la synaptogenèse ainsi que la mobilité des épines dendritiques (Pyka *et al.,* 2011 ; Orlando *et al.,* 2012). Une augmentation de la mobilité des épines dendritiques a également été constatée *in vivo* après injection de chABC dans le cortex visuel de souris adultes (De Vivo *et al.,* 2013).

De nombreuses études démontrent une implication des PNNs dans plusieurs formes de plasticité synaptique. Ces formes regroupent la plasticité à court terme désignant une modification transitoire de l'efficacité synaptique (quelques millisecondes à quelques minutes) et celle à long terme (plusieurs heures à plusieurs jours) comprenant la LTP et la LTD (*Long Term Depression*). Dans le cas d'une LTP, la stimulation prolongée des neurones à haute fréquence permet un renforcement synaptique par

l'incorporation des récepteurs AMPA au niveau de la densité post-synaptique, puis plus tardivement par la synthèse de nouvelles protéines (Baltaci *et al.,* 2019). À l'inverse, une LTD induite par une stimulation prolongée des neurones à basse fréquence engendre un affaiblissement de l'efficacité synaptique notamment par l'endocytose des récepteurs AMPA situés au niveau de la densité post-synaptique (Citri and Malenka, 2008).

Frischknecht et collaborateurs ont été les premiers à démontrer que la déplétion des PNNs dans une culture de neurones hippocampiques facilite la mobilité des récepteurs AMPA et la plasticité à court terme (Frischknecht *et al.,* 2009). Une récente étude confirme ces données en précisant que le brevican contenu dans les PNNs régule la localisation des récepteurs AMPA et des canaux potassiques à la membrane des interneurones PV (Favuzzi *et al.,* 2017). Enfin, les PNNs pourraient également réguler la mobilité des récepteurs AMPA à la membrane par son interaction avec la molécule Nptx2 (O'Brien *et al.,* 1999 ; Van't Spijker *et al.,* 2019).

Il est intéressant de noter que l'utilisation de chABC ou la délétion de Tn-R induit une réduction de la LTP dans le CA1 de l'hippocampe (Bukalo *et al.,* 2001 ; Saghatelyan *et al.,* 2001). Il est cependant possible de contrebalancer cette diminution de la LTP induite par la chABC, en bloquant la transmission GABA (*gamma-aminobutyric acid*) à l'aide d'un antagoniste des récepteurs GABA-A, la picrotoxine (Shi *et al.,* 2019) **(Figure 10)**.

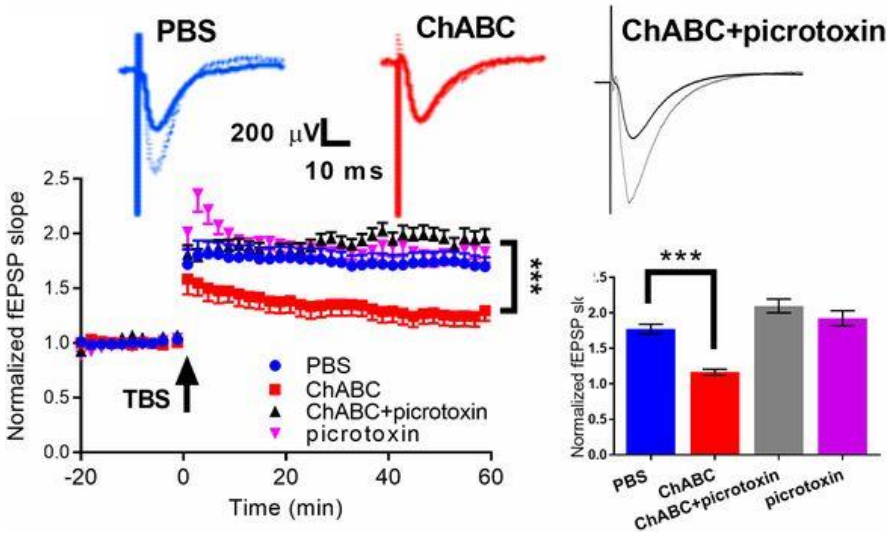


Figure 10 : Les PNNs hippocampiques régulent la plasticité synaptique *via* la transmission GABAergique. La LTP induite par une stimulation « *theta-burst* » dans le CA1, n'est pas maintenue après administration de chABC. L'utilisation d'un inhibiteur des récepteurs GABA-A, la picrotoxine, permet de restaurer ce déficit. Adapté de (Shi *et al.,* 2019).

Au contraire, l'injection de chABC dans le CA2 de l'hippocampe permet d'induire une LTP chez des neurones habituellement résistants (Carstens *et al.,* 2016). De plus, la digestion enzymatique des CSPGs du CA1 diminue également la LTD (Bukalo *et al.,* 2001). À l'inverse, les souris déficientes en Hapln1 ou la digestion des PNNs par la chABC facilite la LTD et entraîne une augmentation des performances mnésiques dans le cortex périrhinal (Romberg *et al.,* 2013).

Toutes ces données laissent supposer que les différents effets des PNNs varient selon les régions cérébrales et les réseaux neuronaux associés. De plus, il est important de noter que l'utilisation de chABC ou la délétion de certains composants affectent non seulement la structure des PNNs mais également la matrice interstitielle.

B) Régulation de l'activité neuronale

Plusieurs études montrent que les PNNs contrôlent l'activité des neurones qu'ils entourent. Les résultats sont cependant contradictoires en fonction du modèle d'étude utilisé. Dans des cultures hippocampiques, la perte de PNNs n'affecte pas le nombre et la distribution des contacts des interneurones GABA mais augmente néanmoins leur excitabilité (Dityatev *et al.,* 2007). À l'inverse, l'incubation de chABC sur des tranches corticales de souris réduit la fréquence des décharges des interneurones PV (Balmer, 2016). *In vivo*, l'administration de chABC dans le CA1, induit 7 jours après, une réduction de l'intensité du marquage PV en lien avec une réduction de l'expression de l'ARNm de la parvalbumine (Yamada *et al.,* 2015). Dans le cortex préfrontal, la dégradation des PNNs diminue la fréquence des courants inhibiteurs, ce qui a pour conséquence de lever une partie de l'inhibition des cellules pyramidales (Slaker *et al.,* 2015). Enfin, si la délétion des PNNs est réalisée durant la période critique du cortex visuel, celle-ci empêche la maturité des récepteurs GABA retrouvés au niveau de la couche IV (Liu *et al.,* 2013).

1.5.2.2 En conditions pathologiques

A) Maladie d'Alzheimer

La maladie d'Alzheimer est une maladie neurodégénérative qui se caractérise par un déclin progressif des fonctions cognitives, dont la mémoire. Cette pathologie est déclenchée par l'agrégation de la protéine Tau et par l'accumulation de peptides amyloïdes-β (Aβ) en plaques neurotoxiques. De manière intéressante, il est possible de restaurer la perte de mémoire observée chez des souris

transgéniques présentant une hyperphosphorylation de la protéine Tau, en dégradant les PNNs du cortex périrhinal *via* une injection de chABC (Yang *et al.,* 2015). Les souris transgéniques surexprimant le peptide Aβ (souche APP/PS1) présentent, quant à elles, un déficit de mémoire émotionnelle ainsi qu'un plus grand nombre de PNNs hippocampiques que leurs homologues sauvages. Néanmoins, une administration de chABC au sein de l'hippocampe permet de restaurer les performances mnésiques chez des souris APP/PS1 de 3 mois (Végh *et al.,* 2014). Cependant, des analyses post-mortem des cerveaux de patients atteints par la maladie d'Alzheimer ne révèlent pas de modification du nombre de PNNs dans les régions riches en plaques amyloïdes ou en présence de la protéine Tau (Baig *et al.,* 2005 ; Morawski *et al.,* 2012b). Plusieurs études suggèrent aussi que la présence des PNNs dans cette pathologie serait neuroprotectrice face au stress oxydatif (Morawski *et al.,* 2004), ou à l'exposition du peptide Aβ comme le démontre une étude *in vitro* (Miyata *et al.,* 2007).

B) Épilepsie et schizophrénie

L'épilepsie se caractérise par une sur-activation neuronale au sein du foyer épileptique en lien avec une altération de la transmission GABAergique. En effet, l'activation optogénétique des interneurones PV en périphérie du foyer épileptique permet de limiter la propagation de l'épilepsie (Sessolo *et al.,* 2015). L'induction d'une crise d'épilepsie dans des modèles expérimentaux engendre une diminution des PNNs enveloppant les interneurones FS-PV corticaux et hippocampiques (McRae and Porter, 2012 ; Pollock *et al.,* 2014). Tewari et collaborateurs prouvent que la survenue des crises épileptiques dans un modèle tumoral est dépendante de la diminution des décharges rapides des interneurones FS-PV, provoquée par la déplétion des PNNs autour de ces derniers (Tewari *et al.,* 2018). La perte de PNNs est associée à une augmentation de l'expression des métalloprotéinases matricielles (MMPs). En effet, l'utilisation de la doxycycline, un inhibiteur des MMPs, empêche la déplétion des PNNs ainsi que la survenue des crises épileptiques (Pollock *et al.,* 2014 ; Dubeya *et al.,* 2017). Les patients souffrant de schizophrénie présentent une diminution du nombre de PNNs dans l'amygdale et le cortex préfrontal (Mauney *et al.,* 2013 ; Pantazopoulos *et al.,* 2015). Cabungcal et collaborateurs proposent que la perte des PNNs expose les interneurones PV au stress oxydatif retrouvé chez les patients atteints de schizophrénie (Cabungcal *et al.,* 2013).

C) Lésions cérébrales

La déplétion des PNNs pourrait également être bénéfique dans plusieurs pathologies impliquant des lésions cérébrales. Ces maladies s'accompagnent par une mise en place d'une cicatrice gliale qui s'avère bénéfique pour limiter l'extension de la lésion, préserver les tissus sains et moduler l'inflammation (Rolls *et al.,* 2009). Cependant, elle devient vite un obstacle à la pousse neuritique due à la présence des CSPGs (Yiu and He, 2006 ; Pendleton *et al.,* 2013 ; Lemarchant *et al.,* 2014). Bien que l'administration de chABC promeuve la plasticité en facilitant la repousse axonale et la récupération fonctionnelle suite à un traumatisme crânien (Harris *et al.,* 2013) ou médullaire (Massey *et al.,* 2006 ; Galtrey and Fawcett, 2007 ; Lee *et al.,* 2010), rien ne garantit que ces effets soient dus à la dégradation des PNNs ou uniquement à celle de la cicatrice gliale.

Cependant, suite à un traumatisme crânien, la perte progressive de l'inhibition corticale survient après une augmentation du stress oxydatif. Ces évènements sont corrélés avec une diminution du nombre de PNNs, suivie par celle des interneurones PV. L'ordre des évènements suggère un effet protecteur des PNNs face au stress oxydatif, mais qui s'avère insuffisant sur le long terme (Hsieh *et al.,* 2017). Dans un modèle de lésion médullaire, le nombre de PNNs en périphérie de la lésion diminue tandis que leur densité est accrue en s'éloignant (Lipachev *et al.,* 2019). Cette hétérogénéité reflète la capacité des PNNs à s'adapter à leur environnement.

La première étude de cette thèse s'intéresse aux fonctions des PNNs dans la récupération fonctionnelle après un AVC ischémique. Cette pathologie ainsi que les fonctions connues des PNNs dans celle-ci seront détaillées dans la 4ème partie de cette introduction **(cf 4 Les accidents vasculaires cérébraux)**.

1.6 Dégradation enzymatique des réseaux périneuronaux

Les réseaux périneuronaux sont des structures dynamiques en fonction de leur environnement physiopathologique, et plus particulièrement enzymatique. Outre la chABC qui permet la dégradation des PNNs *via* le clivage des chaînes CS-GAGs, plusieurs familles de protéases endogènes sont capables de cliver directement le corps protéique des CSPGs.

1.6.1 Les « metzincines »

Les protéases appartenant à la superfamille des « metzincines » se caractérisent par la présence d'un domaine catalytique constitué d'une séquence commune de liaison au zinc (HExxHxxGxxH) suivie d'un résidu méthionine conservé (Jones and Riley, 2005). Elles sont exprimées de façon ubiquitaire sous une forme zymogène inactive en raison d'un pro-domaine qui empêche l'accès au domaine catalytique. La suppression de ce pro-domaine est nécessaire à l'activation de ces protéases (Jones and Riley, 2005 ; Wong *et al.,* 2015 ; Rempe *et al.,* 2016). Cette superfamille des « metzincines » comprend les MMPs, les ADAMTS (*a disintegrin and metalloproteinase with thrombospondin motifs*) ainsi que les ADAM. Parmi elles, plusieurs membres des MMPs et les ADAMTS sont largement décrits pour cliver les CSPGs.

1.6.1.1 Les métalloprotéinases matricielles

La famille des MMPs comportent actuellement 24 membres connus qui peuvent soit être sécrétés dans la MEC, transmembranaires ou ancrés à la membrane grâce à une attache GPI (Fujioka *et al.,* 2012). Au sein du SNC, les ARNm des MMPs-2, -3, -7, -9, -10, -11, -12, -13, -14, -15 et -24 ont été détectés (Ulrich *et al.,* 2005). Cependant, la majorité des études se concentre sur les MMPs-2, -3 et -9 car elles sont les plus faciles à détecter. Ces trois protéases sont exprimées par les neurones, les astrocytes et la microglie (Gottschall and Deb, 1996). Elles peuvent cliver l'aggrecan sur différents sites, le versican (les formes V0 et V2) ainsi que le brevican (à l'exception de MMP-9) (Fosang *et al.,* 1992 ; Büttner *et al.,* 1998 ; Nakamura *et al.,* 2000 ; Ajmo *et al.,* 2010 ; Howell and Gottschall, 2012). Bien qu'un site de clivage ait été prédit pour le neurocan, il n'existe aucune évidence d'un clivage *in vivo* (Howell and Gottschall, 2012). Enfin, les MMPs peuvent également cliver la partie extracellulaire du récepteur RPTPβ, ce qui laisse supposer qu'elles peuvent également cliver le phosphacan (Chow *et al.,* 2008).

Comme nous l'avons mentionné précédemment, l'utilisation d'un inhibiteur des MMPs (la doxycycline) prévient la perte de PNNs et permet de restaurer la transmission inhibitrice dans un modèle d'épilepsie (Pollock *et al.,* 2014). De plus, Alaiyed et collaborateurs ont récemment montré que l'administration d'un antidépresseur (Venlafaxine) accroît l'expression de MMP-9 et atténue le nombre de PNNs au sein de l'hippocampe de la souris. Les effets de cet antidépresseur ne sont cependant pas retrouvés chez les souris déficientes en MMP-9 (Alaiyed *et al.,* 2019). Les souris

déficientes en Fmr1 (un gène codant associé avec le syndrome de l'X fragile), présentent également une augmentation de l'expression de MMP-9 associée à un retard de formation des PNNs autour des interneurones PV dans le cortex auditif au cours du développement. Dans ce modèle, la déficience génétique de MMP-9 restaure la formation des PNNs (Wen *et al.,* 2018). Finalement, une privation monoculaire (MD) réalisée durant la période critique du cortex visuel, n'induit pas de diminution de la densité des PNNs chez les animaux déficients en MMP-9. Ces animaux montrent également une réduction de la plasticité de la dominance oculaire en réponse à la MD (Kelly *et al.,* 2015).

1.6.1.2 Les désintégrines et métalloprotéinases à motifs thrombospondines

Parmi les 19 membres qui constituent la famille des ADAMTS **(cf 2.1 Généralités)**, seuls ADAMTS-1, -4, -5, -8, -9, -15, -20 peuvent cliver les CSPGs. Dans le SNC, ces protéases peuvent être exprimées par les neurones, les astrocytes et les oligodendrocytes (Sasaki *et al.,* 2001 ; Cross *et al.,* 2006a ; Lemarchant *et al.,* 2016b ; Pruvost *et al.,* 2017). De manière intéressante, une analyse transcriptomique par *single-cell Reverse Transcriptase Polymerase Chain Reaction* (RT-PCR) révèle que les protéases ADAMTS-8 et -15 sont spécifiquement exprimées par les interneurones FS-PV (Rossier *et al.,* 2015). Les ADAMTS peuvent cliver tous les lecticans ainsi que le phosphacan, sur des sites de clivage distincts de ceux des MMPs (Matthews *et al.,* 2000 ; Lemons *et al.,* 2001 ; Sandy *et al.,* 2001 ; Tauchi *et al.,* 2012 ; Dancevic *et al.,* 2013). Les ADAMTS possèdent pas moins de sept sites de clivage différents sur le corps protéique de l'aggrecan (Lemons *et al.,* 2001), ce qui suggère une plus grande affinité par rapport aux MMPs.

L'expression d'ADAMTS-4 chez la souris adulte est la plus élevée comparée aux ADAMTS-1,-5 et -9. Dans un modèle de sclérose latérale amyotrophique ($SOD1^{G93A}$), l'injection d'ADAMTS-4 dans les ventricules cérébraux favorise la neurodégénérescence de la moelle épinière ainsi que la déplétion des PNNs enveloppant les motoneurones (Lemarchant *et al.,* 2016b) **(Figure 11)**.

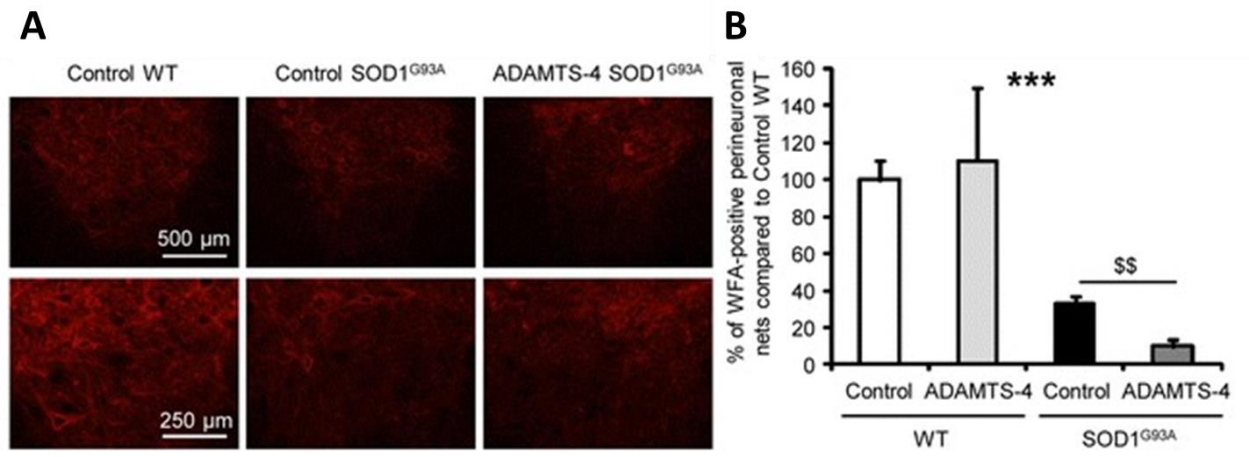


Figure 11 : ADAMTS-4 favorise la dégradation des PNNs dans la moelle épinière.
A) Immunohistochimie de PNNs marqués par la lectine WFA dans la moelle épinière de souris sauvages, $SOD1^{G93A}$ et $SOD1^{G93A}$ plus une administration d'ADAMTS-4 au niveau des ventricules cérébraux. B) Quantification du nombre de PNNs. Adapté de (Lemarchant *et al.,* 2016b).

La première étude de cette thèse s'intéresse aux fonctions d'ADAMTS-4 dans l'ischémie cérébrale et notamment son rôle dans la récupération fonctionnelle post-ischémique par la modulation enzymatique des PNNs. La protéase ADAMTS-4 sera détaillée dans le prochain chapitre de cette introduction **(cf 2 La désintégrine et métalloprotéinase à motifs thrombospondines de type 4)**.

1.6.2 Le plasminogène et son activateur tissulaire

Le plasminogène est une glycoprotéine hépatique connue principalement pour son rôle dans la fibrinolyse (Raum *et al.,* 1980) **(cf 3.4.1.1 La fibrinolyse)**. Il correspond à la forme zymogène inactive de la plasmine. Le plasminogène comporte 791 acides aminés répartis en sept domaines comprenant un peptide (Glu^{1}-Lys^{77}) N-terminal, cinq domaines kringles et un domaine catalytique à activité sérine protéase C-terminal. Les domaines kringles 1 à 4 possèdent des sites LBS (*lysine binding site*), facilitant leurs interactions avec les résidus lysine de la fibrine. Le domaine kringle 5 possède un site LBS modifié qui reconnaît spécifiquement les résidus lysine du peptide (Glu^{1}-Lys^{77}) permettant au plasminogène d'être sous une forme fermée, le Glu-plasminogène. Il existe également une forme ouverte dit Lys-plasminogène formée par le clivage du peptide (Glu^{1}-Lys^{77}) par la plasmine (Plawinski *et al.,* 2011). Le Glu-plasminogène peut adopter une conformation ouverte en interagissant avec une surface d'activation telle que la fibrine ou certains récepteurs membranaires. Cette configuration ouverte est

nécessaire afin de permettre à l'activateur tissulaire du plasminogène (*tissue plasminogen activator,* tPA) ou l'urokinase (*urokinase-type plasminogen activator,* uPA), l'accès au site de clivage (Arg^{561}-Val^{562}) et la conversion du plasminogène en plasmine. Suite à ce clivage, la plasmine présente deux chaînes reliées par deux ponts disulfures : une chaîne lourde en N-terminal contenant au minimum les cinq domaines kringles ; et une chaîne légère en C-terminal porteuse de l'activité enzymatique (Law *et al.,* 2013) **(Figure 12)**.

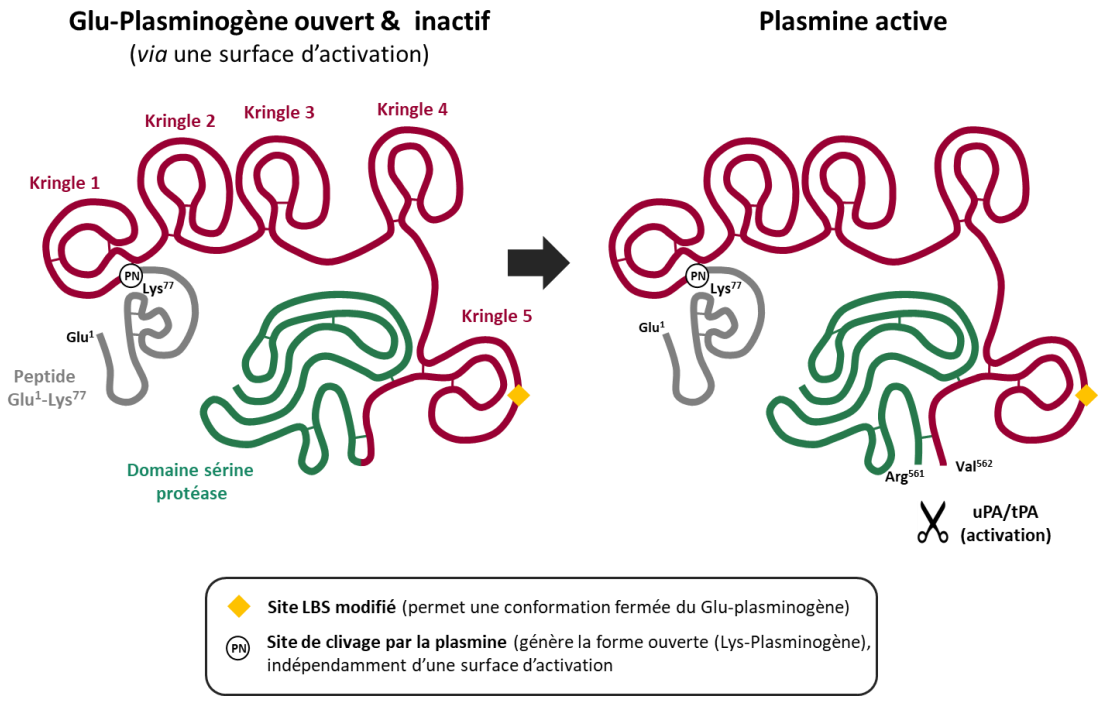


Figure 12 : Structure du plasminogène et de sa forme active en plasmine.
Afin de permettre la conversion en plasmine, le plasminogène doit être dans une configuration ouverte permettant aux activateurs uPA/tPA d'accéder au site de clivage (Arg^{561}-Val^{562}). Cette configuration ouverte est permise par l'interaction de la forme Glu-plasminogène avec une surface d'activation telle que la fibrine, ou par le clivage du peptide (Glu^{1}-Lys^{77}) par la plasmine pour générer la forme Lys-plasminogène. D'après (Plawinski *et al.,* 2011 ; Law *et al.,* 2013).

Majoritairement sécrété dans le compartiment vasculaire, le plasminogène est également retrouvé dans le cortex, l'hippocampe, l'hypothalamus et le cervelet, où il est exprimé par les neurones pyramidaux et potentiellement par les interneurones PV (Tsirka *et al.,* 1997 ; Basham and Seeds, 2001 ; Taniguchi *et al.,* 2011). Bien que les astrocytes n'expriment pas le plasminogène, ils sont responsables de leurs clairance par endocytose et servent de surface d'activation pour faciliter leur

conversion en plasmine (Briens *et al.,* 2017). La plasmine possède de nombreux substrats comprenant notamment la fibrine (Lijnen, 2001), les zymogènes des MMPs (Hahn-Dantona *et al.,* 1999 ; Davis *et al.,* 2001 ; Monea *et al.,* 2002), ainsi que plusieurs CSPGs retrouvés au sein des PNNs. En effet, plusieurs études démontrent un clivage direct du neurocan , du versican (V0 et V1) et du phosphacan par la plasmine (Wu *et al.,* 2000 ; Kenagy *et al.,* 2002). Un site prédictif a également été suggéré pour l'aggrecan, mais aucune donnée ne permet à ce jour de le confirmer (Kiani *et al.,* 2002).

Suite à une MD réalisée durant la période critique du cortex visuel, les souris déficientes en plasminogène présentent une diminution de la plasticité de l'OD (Mataga *et al.,* 2004). Des données similaires sont retrouvées chez les souris déficientes en tPA, un des activateurs du plasminogène **(Figure 13)**. Néanmoins, il est possible de restaurer cette plasticité par une infusion de tPA recombinant (Mataga *et al.,* 2002).

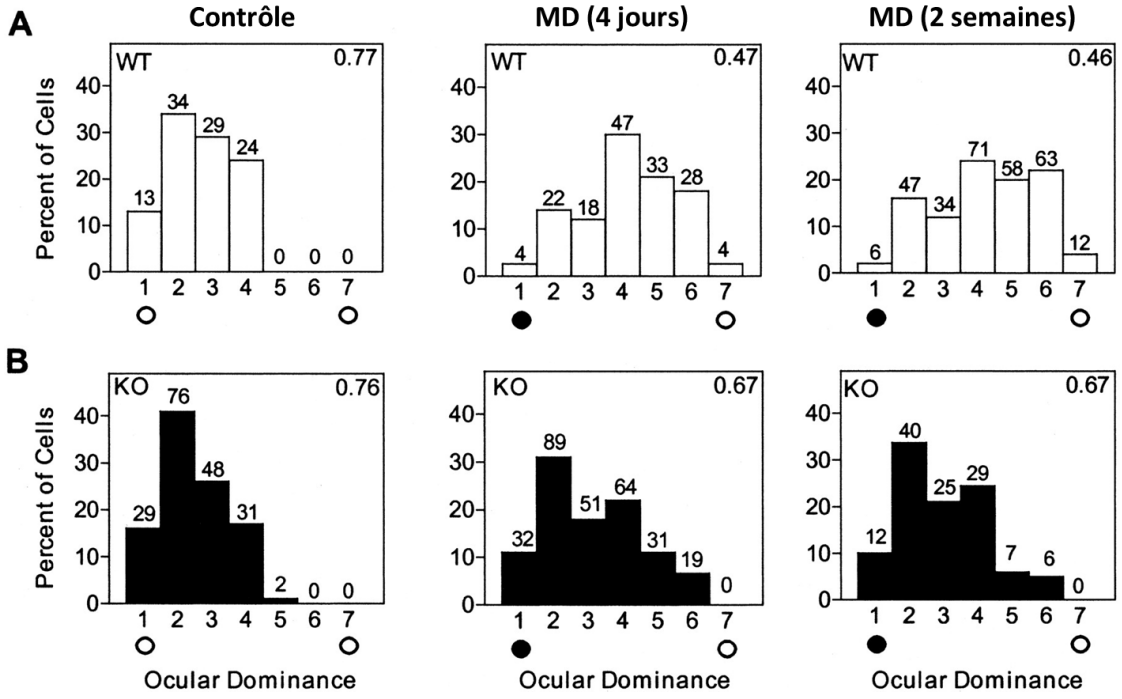


Figure 13 : Le tPA participe à la plasticité de la dominance oculaire.
A) L'induction d'une privation monoculaire de courte durée (4 jours), ou de longue durée (2 semaines) durant la période critique du cortex visuel, induisent un décalage de l'OD chez des animaux sauvages (*Wild Type*, WT). B) Cette plasticité de l'OD n'est pas retrouvée chez les animaux déficients en tPA (*Knock-Out*, KO). Adapté de (Mataga *et al.,* 2002).

En réalité, l'induction d'un MD dans la période critique induit une augmentation de l'activité du tPA dans le cortex visuel de souris sauvages (Mataga *et al.,* 2002). La privation des vibrisses dès la naissance, induit, quant à elle, une augmentation de son expression dans le cortex somatosensoriel (Chen *et al.,* 2015). Au sein des régions corticales, le tPA semble donc être régulé par les expériences sensorielles.

L'ensemble de ces informations suggère que le système tPA/plasmine pourrait participer à la dégradation des PNNs et, par conséquent, à la régulation de la plasticité cérébrale. Cette hypothèse fait d'ailleurs l'objet de la seconde étude de cette thèse. Le tPA sera ainsi le sujet du 3ème chapitre de cette introduction **(cf 3 L'activateur tissulaire du plasminogène)**.

Pour résumer :

- Les PNNS sont des **structures condensées de la MEC** qui enveloppent le soma, les dendrites, les synapses et parfois le segment axonal des neurones.
- Ils sont formés par l'agencement des lecticans (**aggrecan, brevican, neurocan et versican**) et du **phosphacan** qui viennent se greffer sur l'**AH** à l'aide des **protéines de liaison**. Les **Tn-R** participent à l'interaction des lecticans et du phosphacan entre eux.
- Ils enveloppent majoritairement les **interneurones FS-PV** ainsi que d'autres populations de neurones excitatrices ou inhibitrices.
- Les PNNs sont distribués dans de nombreuses régions avec une forte proportion pour les régions corticales.
- La maturation des PNNs permet de clôturer des périodes juvéniles hautement plastiques, appelées les périodes critiques.
- **La dégradation des PNNS chez l'adulte restaure les périodes critiques.**
- Les PNNs peuvent à la fois **inhiber** et **protéger** les neurones qu'ils entourent.

Les PNNs constituent un intérêt thérapeutique majeur dans différentes pathologies cérébrales, puisque leur digestion enzymatique restaure la plasticité. Il existe de nombreuses protéases endogènes capables de dégrader les composants des PNNS. Une meilleure connaissance de ces mécanismes enzymatiques pourrait nous permettre de moduler à façon la structure des PNNs et de surcroît la plasticité. Parmi toutes ces protéases, nous avons fait le choix de nous intéresser à deux d'entre elles : ADAMTS-4 et le tPA. Ces deux protéases sont respectivement décrites dans le 1er et le 2ème chapitre de cette introduction.

2. La désintégrine et métalloprotéinase à motifs thrombospondines de type 4

2.1 Généralités

La désintégrine et métalloprotéinase à motifs thrombospondines de type 4 (ADAMTS-4, *a disintegrin and metalloproteinase with thrombospondin type 4* en anglais) fait partie de la famille des ADAMTS. Cette famille de métalloprotéinases est composée de 19 membres aux structures semblables, que l'on peut classer en cinq catégories selon la nature de leurs substrats (Kelwick *et al.,* 2015) :

- Les protéoglycanases : ADAMTS-1, -4, -5, -8, -9, -15, -20
- Les pro-collagénases : ADAMTS-2, -3, -14
- Les protéases de la protéine matricielle oligomérique du cartilage (COMP) : ADAMTS-7, -12
- La protéase du facteur de Von-Willebrand (*von Willebrand factor*, VWF) : ADAMTS-13
- Les ADAMT orphelines : ADAMTS-6, -10, -16, -17, -18, -19

Les ADAMTS sont exprimées dans tout l'organisme et la diversité de leurs substrats les impliquent dans de nombreux processus physiopathologiques tels que le développement (squelette, peau et cœur), l'ovulation, l'arthrose, les cancers (dont le gliome), l'hypertension, l'angiogenèse, l'hémostase, l'athérosclérose ainsi que plusieurs pathologies cérébrales (Stanton *et al.,* 2011 ; Kelwick *et al.,* 2015).

ADAMTS-4 a été initialement décrite en 1999 par Tortorella et collaborateurs, grâce à l'identification d'un nouveau site de clivage sur l'aggrecan. Au vu de sa fonction, Tortorella et collaborateurs décidèrent de la surnommer aggrecanase-1 (Tortorella *et al.,* 1999). La plupart des études menées à ce jour sur ADAMTS-4 concerne l'arthrose, une maladie chronique engendrée par la perte progressive des composants qui forment la matrice articulaire, tels que l'aggrecan et le collagène. Dans le SNC, la découverte d'ADAMTS-4 remonte aux années 2000 (Matthews *et al.,* 2000), mais son étude à ce jour reste limitée.

2.2 Structure

Plus petit membre de sa famille, ADAMTS-4 est une protéoglycanase composée de 837 acides aminés. Parmi tous les domaines communs à cette famille, ADAMTS-4 se distingue par un domaine

spacer légèrement plus court ainsi que par la présence d'un seul domaine à motifs thrombospondines. Cette protéase est également la seule de sa famille à ne pas être glycosylée (Stanton *et al.,* 2011).

La structure d'ADAMTS-4 comprend sept domaines **(Figure 14)** :

- Un **peptide signal** permettant son adressage au réticulum endoplasmique.
- Un **pro-domaine** dont le rôle est de maintenir la protéase dans un état latent, en empêchant l'accès du substrat au domaine catalytique. La suppression de ce domaine est nécessaire pour assurer l'activité enzymatique (Tortorella *et al.,* 2005), et ce grâce à différents sites de clivage **(cf 2.3.3.1 Les activateurs endogènes)**. Il est aussi essentiel pour assurer le bon repliement de la protéine.
- Un **domaine catalytique** correspondant à la région active permettant, après fixation, l'hydrolyse protéique. Ce domaine possède une séquence de fixation au zinc (HELGHVFNMLH) indispensable au maintien de l'activité catalytique. En effet, une mutation de l'acide glutamique (E) entraîne l'inactivation de cette région.
- Un **domaine désintégrine** dont le rôle reste inconnu. Cependant, une hypothèse suggère qu'il régule, de par son emplacement, l'activité protéolytique en fournissant une surface de liaison aux substrats auxiliaires (Stanton *et al.,* 2011).
- Un **domaine à motifs thrombospondines de type I** indispensable pour son interaction protéique et sa spécificité. Il permet l'interaction aux GAGs retrouvés dans les protéoglycanes (Tortorella *et al.,* 2000).
- Un **domaine riche en cystéine** et **un domaine *spacer*** qui permettent sa localisation dans la MEC ainsi que la reconnaissance de ses substrats. Ils reconnaissent notamment les chaînes de sucre qui forment les protéoglycanes (Kashiwagi *et al.,* 2004). Ces domaines participent également à sa clairance par le récepteur LRP1 (*low-density lipoprotein receptor-related protein)* (Yamamoto *et al.,* 2014).

Il est intéressant de constater que chaque domaine contribue à réguler l'activité d'ADAMTS-4. Seul, le domaine catalytique est inactif et semble dépendant du domaine à motifs thrombospondines pour fonctionner (Tortorella *et al.,* 2000 ; Gendron *et al.,* 2007). De plus, la suppression des deux derniers domaines entraîne l'augmentation du nombre de substrats, confirmant leur fonction à réguler les substrats présentés à ADAMTS-4 (Kashiwagi *et al.,* 2004).

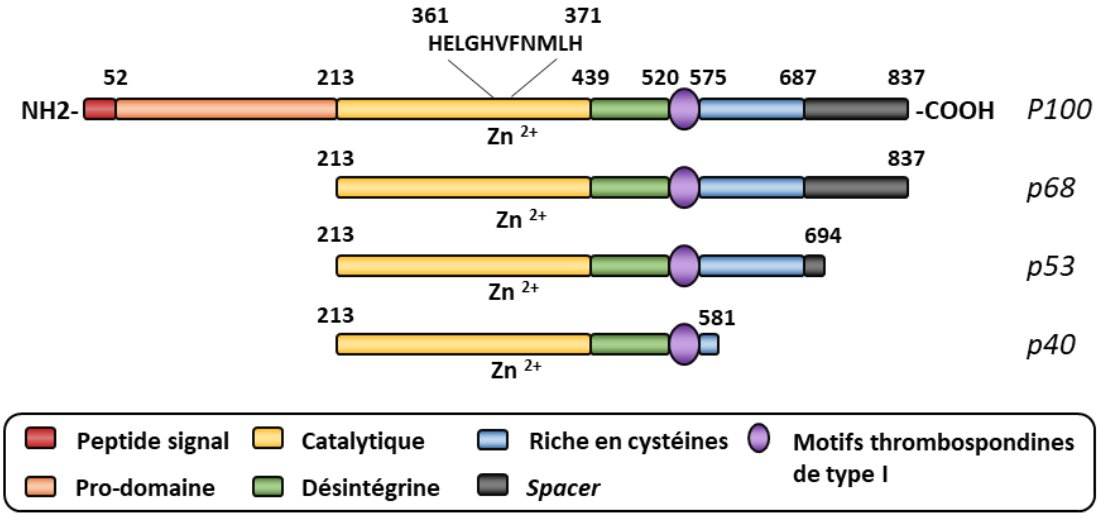


Figure 14 : Structure d'ADAMTS-4 et de ses isoformes.
La forme latente (p100) comprend tous les domaines, la forme active (p68) est générée après clivage du pro-domaine. La forme p68 permet la formation de deux isoformes, par un clivage dans le *spacer* générant la forme p53 ; ou dans le domaine riche en cystéines générant la forme p40. Toutes les isoformes possèdent une séquence (HELGHVFNMLH) de liaison au zinc nécessaire pour l'activité protéolytique d'ADAMTS-4.

Il existe plusieurs isoformes d'ADAMTS-4 : la forme latente (p100), la forme active (p60), une forme tronquée dans le domaine *spacer* (p53) et une dernière tronquée dans le domaine riche en cystéines (p40) **(Figure 14)**. Les plus petites isoformes (p53 et p40) sont des produits post-traductionnels de la forme active (p68) d'ADAMTS-4, générés par autoclivage ou par l'action de MMP-17. Ils possèdent les domaines nécessaires à l'activité protéolytique mais présentent néanmoins une moindre capacité à se lier aux GAGs (Flannery *et al.,* 2002). L'isoforme p53 semble être limitée à la membrane plasmique où elle peut interagir avec le protéoglycane transmembranaire syndecan-1 (Gao *et al.,* 2002).

2.3 Synthèse d'ADAMTS-4

ADAMTS-4 est exprimée dans plusieurs tissus et structures, notamment le cartilage, les ovaires, le pancréas, les poumons, les vaisseaux, la moelle épinière et le cerveau (Stanton *et al.,* 2011 ; Kelwick *et al.,* 2015 ; Pruvost *et al.,* 2017). Cependant, nous nous focaliserons spécifiquement sur son expression dans le compartiment vasculaire et le SNC.

2.3.1 Dans le compartiment vasculaire

ADAMTS-4 est exprimée dans le compartiment vasculaire et plus particulièrement dans la paroi artérielle (Sandy *et al.,* 2001). L'expression du transcrit d'ADAMTS-4 est confirmée dans deux lignées de cellules endothéliales : HUVECs (*Human umbilical vein endothelial cells*) et HuDMECs *(Human dermal microvascular endothelial cells*). Les auteurs de cette étude suggèrent que l'expression d'ADAMTS-4 diminue la différenciation et la prolifération des cellules endothéliales par un mécanisme dépendant de son interaction avec le VEGF (*Vascular endothelial growth factor*) (Hsu *et al.,* 2012).

La concentration sanguine d'ADAMTS-4 est aux alentours de 47,5 ng/mL chez des patients sains, mais atteint 100 ng/mL chez des patients souffrant d'athérosclérose (Zha *et al.,* 2010 ; Chen *et al.,* 2011). Dans cette pathologie, ADAMTS-4 est exprimée par les macrophages et les cellules musculaires lisses (Wagsäter *et al.,* 2008 ; Pelisek *et al.,* 2015). Son expression semble d'ailleurs grandement liée au développement des plaques d'athérosclérose (Dong *et al.,* 2017). L'expression d'ADAMTS-4 par ces deux types cellulaires a également été constatée chez des patients souffrant d'anévrisme aortique thoracique ou de dissection aortique thoracique (Ren *et al.,* 2013 ; Li *et al.,* 2017). Finalement, des études *in vitro* sur une lignée de monocytes (THP-1) démontrent que l'expression d'ADAMTS-4 augmente suite à la différenciation des monocytes en macrophages et aux traitements par l'interféron gamma (IFN-γ) ou au TNF (*tumor necrosis factor)* (Wagsäter *et al.,* 2008 ; Ashlin *et al.,* 2013). Des études indiquent que le TGF-β (*transforming growth factor- β*) diminue le transcrit d'ADAMTS-4 alors que d'autres suggèrent qu'il augmente son expression protéique *in vitro* (Ashlin *et al.,* 2013 ; Ren *et al.,* 2013).

2.3.2 Dans le système nerveux central

Dans le SNC, l'expression d'ADAMTS-4 a été retrouvée dans plusieurs structures telles que le cortex, l'hippocampe, le striatum, le corps calleux et la moelle épinière (Krstic *et al.,* 2012 ; Pelisek *et al.,* 2015 ; Lemarchant *et al.,* 2016a ; Pruvost *et al.,* 2017). Sa transcription connaît une forte croissance du 8ème au 28ème jour postnatal, avant de diminuer chez la souris l'adulte. Son expression restent néanmoins 8 fois plus importante que celle des autres protéoglycanases (ADAMTS-1, -5, -9) présentes dans le cortex et la moelle épinière de souris adultes (Howell *et al.,* 2012 ; Lemarchant *et al.,* 2016b) **(Figure 15A,B)**. ADAMTS-4 peut être exprimée par les neurones, les astrocytes, la microglie et les oligodendrocytes.

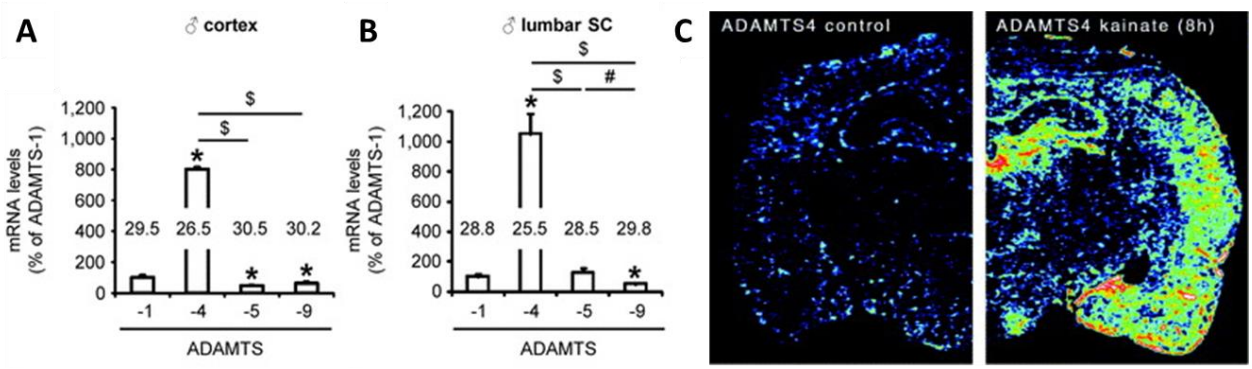


Figure 15 : Expression transcriptionnelle d'ADAMTS-4 dans le SNC en conditions physiopathologiques. Quantification du transcrit d'ADAMTS-1, -4, -5 et -9 dans le cortex (A) ou la moelle épinière (B) de souris adulte par RT-PCR. C) Hybridation *in situ* après injection parenchymateuse de kaïnate chez le rat adulte. Adapté de (Yuan *et al.,* 2002 ; Lemarchant *et al.,* 2016b).

2.3.2.1 Les neurones

Yuan et collaborateurs démontrent, par hybridation *in situ,* la présence d'ARNm d'ADAMTS-4 au niveau des neurones pyramidaux et des neurones granulaires du gyrus denté. De plus, l'injection parenchymateuse de kaïnate accroît considérablement l'expression de ce transcrit au sein du cortex, de l'hippocampe, de l'amygdale et de l'hypothalamus (Yuan *et al.,* 2002) **(Figure 15C)**. Plus récemment, une étude immunohistochimique rapporte une co-localisation d'ADAMTS-4 avec les motoneurones dans la moelle épinière de souris (Lemarchant *et al.,* 2016b).

2.3.2.2 Les astrocytes

Plusieurs études rapportent la présence de l'ARNm d'ADAMTS-4 dans des cultures primaires d'astrocytes (murins ou humains). Les cytokines pro-inflammatoires (TNF ou à l'interleukine 1 (IL-1)), ainsi que le stress oxydatif induit par le peptide Aβ augmentent l'expression de son transcrit (Satoh *et al.,* 2000 ; Cross *et al.,* 2006a ; Lemarchant *et al.,* 2016b). Des études immunohistochimiques de la moelle épinière murine ont permis de constater la co-localisation d'ADAMTS-4 avec les astrocytes en condition physiologique (Lemarchant *et al.,* 2016b), mais aussi dans un modèle d'encéphalite auto-immune (Cross *et al.,* 2006b). Des données similaires ont été obtenues sur des moelles épinières post-mortem de personnes atteintes de sclérose en plaques (Haddock *et al.,* 2006). Enfin, Zamanian et collaborateurs démontrent que l'expression de l'ARNm d'ADAMTS-4 par les astrocytes est stimulée en réponse à une ischémie cérébrale. Cette augmentation de l'expression n'est cependant pas

retrouvée suite à l'injection intrapéritonéale chez la souris d'une forte dose (5 mg/kg) de LPS (Lipopolysaccharide), ce qui suggère que les processus inflammatoires retrouvés après une ischémie ne sont pas responsables de l'augmentation du transcrit d'ADAMTS-4 (Zamanian *et al.,* 2012).

2.3.2.3 La microglie

À ce jour, seule une étude transcriptionnelle sur des cultures de microglies de souris démontre une expression d'ADAMTS-4 dans ce type cellulaire (Lemarchant *et al.,* 2016b).

2.3.2.4 Les oligodendrocytes

Sharma et collaborateurs ont constaté dans une étude protéomique chez la souris, qu'ADAMTS-4 fait partie des protéines fortement exprimées par les oligodendrocytes (Sharma *et al.,* 2015). Cette expression oligodendrocytaire a également été retrouvée par hybridation *in situ* dans le cortex et l'hippocampe de souris âgées de 21 jours, ainsi que par immunohistochimie dans la moelle épinière de souris adultes (Levy *et al.,* 2015 ; Lemarchant *et al.,* 2016b). Au laboratoire, nous disposons de souris exprimant de la β-Galactosidase sous le contrôle du promoteur d'ADAMTS-4. Des études immunohistochimiques sur ces souris adultes, nous ont permis de déterminer que l'expression d'ADAMTS-4 est fortement associée à la substance blanche du SNC et plus particulièrement aux oligodendrocytes matures myélinisants. Cependant, notre analyse ne révèle pas d'expression d'ADAMTS-4 par les autres types cellulaires en condition basale (Pruvost *et al.,* 2017) **(Figure 16)**.

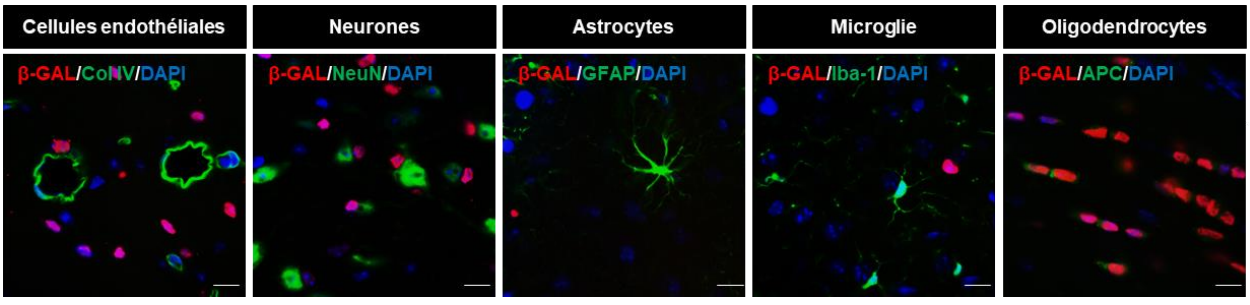


Figure 16 : Expression indirecte d'ADAMTS-4 par les oligodendrocytes matures myélinisants.
L'expression de la β-Galactosidase est sous le contrôle du promoteur d'ADAMTS-4. Immunohistochimie dirigée contre la β-Galactosidase (en rouge) dans différents types cellulaires (en vert) : les cellules endothéliales (Col IV), les neurones (NeuN), les astrocytes (GFAP), la microglie (Iba1) et les oligodendrocytes matures myélinisants (APC) (Échelle de 50 µm). Adapté de (Pruvost *et al.,* 2017).

À l'exception des travaux de Levy et collaborateurs (Levy *et al.,* 2015), nos données divergent de celles précédemment mentionnées. Deux hypothèses permettent d'expliquer cette différence : 1) la plupart des études se placent dans un contexte pathologique pour regarder l'expression protéique d'ADAMTS-4 ; 2) les anticorps dirigés contre la protéine ADAMTS-4 murine manquent de spécificité.

*2.3.3 Les régulateurs d'*ADAMTS-4

2.3.3.1 Les activateurs endogènes

Comme nous l'avons précédemment mentionné, le clivage du pro-domaine en N-terminal est nécessaire pour permettre l'activité enzymatique, passant de la forme inactive (p100) à sa forme active (p68) (Tortorella *et al.,* 2005) **(Figure 14)**. Les différents sites de clivage retrouvés sur le pro-domaine révèlent que l'activation d'ADAMTS-4 est régulée par différentes protéases.

La furine est une sérine protéase dépendante du calcium dont l'expression est ubiquitaire. Toutes les ADAMTS possèdent au niveau de leur pro-domaine au moins un site de clivage à la furine (Kelwick *et al.,* 2015), et ADAMTS-4 ne fait pas exception, avec ses trois sites de clivage différents. Le clivage par la furine est réalisé au niveau de l'appareil de Golgi. La furine est l'une des principales protéases dans la régulation de l'activité enzymatique d'ADAMTS-4. Cependant, la présence de formes actives d'ADAMTS-4 est observée dans une lignée de cellules déficientes en furine (RPE.40), suggérant l'intervention d'autres protéases (Wang *et al.,* 2004). Une étude menée par Tortorella et collaborateurs permet l'identification de deux protéases capables de cliver ADAMTS-4 sur un site commun à la furine, à savoir PACE4 et PC5/6. ADAMTS-4 possède également des sites de clivage dédiés à la trypsine et la MMP-9. ADAMTS-4 est capable de cliver elle-même son pro-domaine en milieu basique (pH 8-10) (Tortorella *et al.,* 2005).

Le tPA, une autre sérine protéase, permet à forte concentration (150 nM), de cliver le pro-domaine d'ADAMTS-4 indépendamment de la plasmine, augmentant ainsi son activité enzymatique (Lemarchant *et al.,* 2014) **(Figure 17)**. En raison de sa faible activité en condition basale, le tPA n'apparaît pas comme un régulateur important d'ADAMTS-4. Cependant, en réponse à des situations pathologiques, ou lors d'une fibrinolyse pharmacologique, le niveau d'expression/activité du tPA augmente fortement, permettant ainsi une nouvelle voie d'activation d'ADAMTS-4.

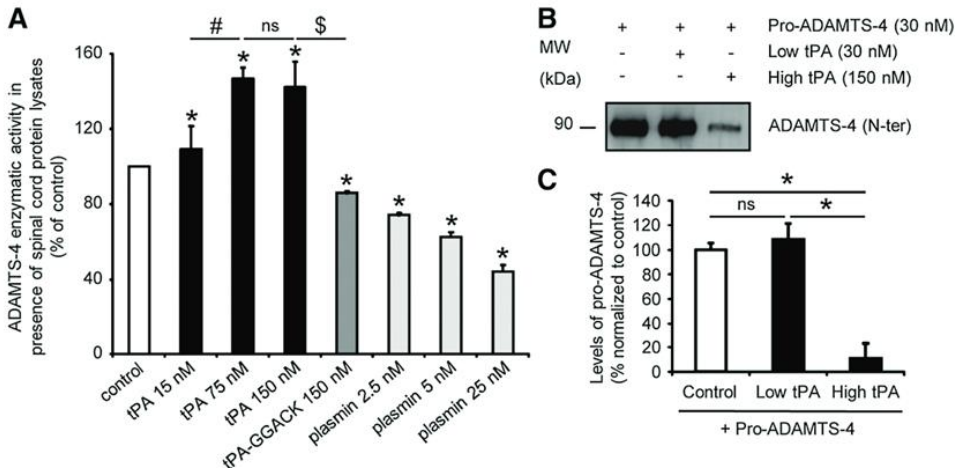


Figure 17 : Le tPA favorise la maturation de la forme inactive (p100) d'ADAMTS-4.
A) Augmentation de l'activité enzymatique d'ADAMTS-4 après ajout de tPA sur des extraits protéiques issus de moelle épinière des souris. (B et C) Le tPA permet le clivage d'ADAMTS-4 à forte concentration (Lemarchant *et al.,* 2014).

2.3.3.2 Les inhibiteurs endogènes

Tous les membres de la famille des TIMPs (*tissue inhibitor of metalloproteinases)* peuvent inhiber l'activité protéolytique d'ADAMTS-4, mais TIMP-3 est la plus efficace (Hashimoto *et al.,* 2001). TIMP-3 interagit avec le domaine à motifs thrombospondines d'ADAMTS-4 (Troeberg *et al.,* 2009) avant de chélater l'atome de zinc nécessaire à son activité protéolytique (Murphy, 2011). Il est intéressant de noter que la présence d'aggrecan accroît l'inhibition de TIMP-3. Les chaînes sulfatées CS-GAG (principalement la forme 6S) d'aggrecan permettraient la formation d'un complexe augmentant la fixation de TIMP-3 sur ADAMTS-4 (Wayne *et al.,* 2007). Bien que le spectre d'inhibition de TIMP-3 ne se limite pas à ADAMTS-4, une mutation de son domaine N-terminal accroît sa spécificité envers les membres des ADAM et ADAMTS (Lim *et al.,* 2010).

En dehors des TIMPs, l'activité protéolytique d'ADAMTS-4 peut être inhibée par l'alpha-2 macroglobuline, une glycoprotéine plasmatique. ADAMTS-4 peut cliver la région charnière de cette glycoprotéine, induisant sa capture et son inhibition (Tortorella *et al.,* 2004). Ce mécanisme d'inhibition n'est cependant pas restreint à ADAMTS-4 puisqu'il est identique pour ADAMTS-5. La fibronectine, une glycoprotéine matricielle, peut, quant à elle, inhiber l'activité enzymatique en interagissant avec son domaine *spacer* (Hashimoto *et al.,* 2004).

2.4 Les substrats d'ADAMTS-4

Au vu des nombreux substrats d'ADAMTS-4 connus à ce jour **(Tableau 3)**, cette protéase pourrait réguler de nombreuses fonctions dans l'organisme. En condition physiologique, la grande majorité de ces substrats est retrouvée dans le SNC, à l'exception des protéines COMP (*cartilage oligomeric matrix protein*) et du fibrinogène.

Tableau 3 : Liste des substrats d'ADAMTS-4 (1ère partie).

Substrats	**Fonctions principales**	**Site(s) de clivage par ADAMTS-4**	**Références**
Aggrecan ***Lectican***	Protéoglycanes principales de la MEC interstitielle et des PNNs.	Glu373, Glu1545, Glu1714, Glu1819, et Glu1919	(Tortorella *et al.,* 2000 ; Westling *et al.,* 2004 ; Galtrey and Fawcett, 2007)
Brevican ***Lectican***	Important pour la structure de la MEC ; développement cérébral et les fonctions associées aux PNNs	Glu395	(Matthews *et al.,* 2000 ; Galtrey and Fawcett, 2007 ; Tauchi *et al.,* 2012)
Neurocan ***Lectican***	Rôle inhibiteur sur la pousse neuritique et la régénération axonale à l'exception de Versican V1 induit des effets opposés.	nd	(Galtrey and Fawcett, 2007 ; Tauchi *et al.,* 2012 ; Lemarchant *et al.,* 2014)
Versican ***Lectican***		***Vo*** : Glu405, Glu1428 ***V1*** **:** Glu441 ***V2*** : Glu405	(Sandy *et al.,* 2001 ; Westling *et al.,* 2004 ; Galtrey and Fawcett, 2007)
Phosphacan ***CSPGs***	Versican V2 et Brevican sont fortement associés au niveau des nœuds de Ranvier.	nd	(Tauchi *et al.,* 2012)
Rééline	Neuro-développement + plasticité chez l'adulte	Un site en N-term + un site en C-term	(Krstic *et al.,* 2012)
Biglycan ***SLRP***	Petits protéoglycanes riches en leucine. Interviennent dans la prolifération, la fibrose, l'inflammation et l'immunité.	Asn149-Cys150	(Gendron *et al.,* 2007)
Décorine ***SLRP***		nd	(Gendron *et al.,* 2007)
Keratocan ***SLRP***		nd	(Rees *et al.,* 2009)
Hevin ***SPARC***	Module interactions des cellules avec la MEC. Rôle dans le développement neuronal.	358 Glu-Ala-Glu-Arg-Met-His-Ser 364	(Weaver *et al.,* 2010)

SLRP *(small leucine-rich proteoglycan).*
SPARC (*secreted protein, acidic and rich in cysteine*).

Tableau 3 : Liste des substrats d'ADAMTS-4 (2ème partie).

Substrats	Fonctions principales	Site(s) de clivage par ADAMTS-4	Références
Matrilines	Organisation de la MEC. Forment des structures filamenteuses péri-cellulaires en association avec le collagène et les protéoglycanes.	***Matrilin-2*** : Asp851-Leu852 ***Matrilin-3*** : Glu435-Ala436 ***Matrilin-4*** : Glu571-Gly572	(Hills *et al.,* 2007 ; Ehlen *et al.,* 2009 ; Wang *et al.,* 2014)
Peptide bêta-amyloïde	Peut s'accumuler pour former des plaques dans le cerveau. Ces plaques sont une des principales causes de la maladie d'Alzheimer	***Aβ4-x*** : Glu3-Phe4	(Walter *et al.,* 2019)
Alpha-2 macroglobuline	Glycoprotéine inhibitrice plasmatique. Rôle dans la fibrinolyse.	Met690	(Tortorella *et al.,* 2004)
Plasminogène + plasmine	Enzyme plasmatique impliquée dans la fibrinolyse après sa conversion en plasmine, notamment par le tPA.	***Plasminogène*** : nd ***Plasmine*** : nd	Données non publiées du laboratoire
Fibrinogène	Glycoprotéine plasmatique, constituée de trois chaînes peptidiques (α, β et γ). Impliquée dans la coagulation du sang, *via* sa transformation en fibrine.	Site de clivage sur la chaîne alpha	Données non publiées du laboratoire
COMP	Glycoprotéine du cartilage, tendons et ligaments. Rôle structurel de la MEC. Leurs fragments sont associés à l'arthrite.	nd	(Acharya *et al.,* 2014)

COMP (*cartilage oligomeric matrix protein).*

2.5 Fonctions d'ADAMTS-4 dans le SNC

2.5.1 En condition physiologique

2.5.1.1 La pousse neuritique

ADAMTS-4 participe activement à la pousse neuritique. Des études *in vitro* montrent que l'ajout d'ADAMTS-4 recombinant dans des cultures de neurones corticaux ou de motoneurones de la moelle épinière améliore la pousse neuritique en réduisant l'inhibition des CSPGs *via* leur dégradation (Cua *et al.,* 2013 ; Lemarchant *et al.,* 2014). Cua et collaborateurs suggèrent qu'ADAMTS-4 participe plus efficacement à la pousse neuritique que la chABC ou les MMPs pour deux raisons : 1) les corps protéiques possèdent des propriétés inhibitrices indépendantes des chaînes CS-GAG (Lemons *et al.,* 2003), si bien que la déglycosylation des CSPGs provoquée par la chABC n'est pas autant efficace que le clivage du corps protéique par les MMPs ou ADAMTS-4 ; 2) à la différence des MMPs, ADAMTS-4 préserve la laminine et n'induit pas de neurotoxicité (Cua *et al.,* 2013). ADAMTS-4 peut également

intervenir sur la pousse neuritique indépendamment de son activité enzymatique. Cet effet passe par une activation de la voie kinase MAP/Erk 1/2 (Hamel *et al.,* 2008). Les auteurs émettent l'hypothèse que cette activation est dépendante de son domaine à motifs thrombospondines, en raison de sa forte ressemblance avec la thrombospondine connue pour améliorer la pousse neuritique (O'Shea *et al.,* 1991). Ces deux mécanismes distincts d'activation de la pousse neuritique suggèrent un rôle important d'ADAMTS-4 dans le développement cérébral, notamment durant les premières semaines qui suivent la naissance où son expression culmine (Howell *et al.,* 2012). Cette idée est renforcée par sa capacité à cliver la rééline, une protéine contrôlant non seulement la migration des neurones mais aussi leur croissance et leur maturation (Krstic *et al.,* 2012).

2.5.1.2 La myélinisation et la motricité

Au sein du laboratoire, nous avons découvert qu'ADAMTS-4 est fortement exprimée dans la substance blanche et plus particulièrement par les oligodendrocytes matures myélinisants (Pruvost *et al.,* 2017). La délétion d'ADAMTS-4 engendre des problèmes de myélinisation dans le corps calleux de la souris. Ce phénotype se caractérise par des axones myélinisés moins nombreux et de plus gros diamètre, suggérant un retard dans la mise en place de la myélinisation en absence d'ADAMTS-4 (Pruvost *et al.,* 2017). Une de nos hypothèses concernant ce processus est l'implication des CSPGs, connus pour inhiber *in vitro* la croissance des oligodendrocytes et la myélinisation des axones *via* l'activation du leur récepteur PTPσ (*tyrosine phosphatase sigma*) (Pendleton *et al.,* 2013).

De manière intéressante, les souris déficientes en ADAMTS-4 présentent également un déficit des performances motrices, caractérisé par une baisse de l'activité spontanée associée à des problèmes d'équilibre et de coordination (Pruvost *et al.,* 2017). Ce phénotype pourrait être la conséquence des problèmes de myélinisation retrouvés en absence d'ADAMTS-4. En effet, l'absence d'ADAMTS-4 conduit à une altération de l'activité électrique cérébrale (augmentation de l'amplitude de réponse à des potentiels évoqués somesthésiques). Bien que l'origine exacte de ce phénotype moteur reste à élucider, nous pouvons néanmoins exclure un problème de cartilage, puisque des souris adultes âgées d'un an ne présentent aucune anomalie osseuse en absence d'ADAMTS-4 (Glasson *et al.,* 2004).

Ainsi, l'existence de ces deux phénotypes en dépit de possibles mécanismes compensatoires par les autres membres de la famille des ADAMTS, souligne l'importance d'ADAMTS-4 en condition physiologique.

2.5.2 En conditions pathologiques

2.5.2.1 L'inflammation

Comme décrit précédemment, l'expression transcriptionnelle macrophagique et astrocytaire d'ADAMTS-4 est régulée par différentes cytokines (TNF, IFN-γ, IL-1 et TGF-β) (Cross *et al.,* 2006b, 2006a ; Wagsäter *et al.,* 2008 ; Ashlin *et al.,* 2013 ; Ren *et al.,* 2013). L'utilisation d'une chambre de Boyden, révèle un rôle d'ADAMTS-4 dans l'infiltration des macrophages (Ren *et al.,* 2013). Cependant, l'administration d'ADAMTS-4 exogène sur des cultures d'astrocytes ou microgliales, réduit l'inflammation provoquée par un traitement au LPS, tandis que l'utilisation d'un ARN interférant contre ADAMTS-4, permet au contraire d'exacerber les effets du LPS (Lemarchant *et al.,* 2016b). ADAMTS-4 semble donc pouvoir à la fois amplifier et réduire l'inflammation suivant les cellules environnantes.

2.5.2.2 Le traumatisme médullaire

Comme abordé précédemment **(cf 1.5.2.2 En conditions pathologiques)**, la mise en place d'une cicatrice gliale s'avère bénéfique dans un premier temps, avant de devenir délétère notamment par la présence inhibitrice des CSPGs (Yiu and He, 2006 ; Rolls *et al.,* 2009 ; Pendleton *et al.,* 2013).

Dans un modèle de traumatisme médullaire chez le rat (par compression), l'injection d'ADAMTS-4 recombinant un jour après la lésion, induit une dégradation des CSPGs associée à une augmentation de la croissance des fibres sérotoninergiques en dessous de la lésion. Cette régénération améliore ainsi la récupération fonctionnelle des animaux (Lemarchant *et al.,* 2014). Des résultats similaires sont obtenus dans un modèle de contusion de la moelle épinière, soit par infusion continue d'ADAMTS-4 soit par injection d'un AAV (*adeno associated virus*) codant pour ADAMTS-4 sous contrôle d'un promoteur astrocytaire (GfaABC1D) (Tauchi *et al.,* 2012 ; Griffin *et al.,* 2020). Ainsi, ADAMTS-4 crée un environnement propice à la régénération axonale par la dégradation des CSPGs et est une cible thérapeutique de choix dans le traitement des traumatismes médullaires.

2.5.2.3 La sclérose latérale amyotrophique

La sclérose latérale amyotrophique (SLA) est une maladie neurodégénérative caractérisée par la perte progressive des motoneurones. Des souris transgéniques $SOD1^{G93A}$, modélisant la SLA, présentent une diminution de l'expression d'ADAMTS-4 au niveau de la moelle épinière. L'injection d'ADAMTS-4 recombinant dans les ventricules cérébraux, en amont des premiers symptômes chez les souris $SOD1^{G93A}$, accélère le développement de la maladie en augmentant la dégénérescence des motoneurones lombaires. Ceci s'accompagne par la réduction d'expression du NGF (*Nerve growth factor)* ainsi que par une déplétion des PNNs autour des motoneurones (Lemarchant *et al.,* 2016b). Cette perte de PNNs pourrait notamment faciliter la dégénérescence des motoneurones en les exposant plus facilement au stress oxydatif (Morawski *et al.,* 2004 ; Suttkus *et al.,* 2014).

2.5.2.4 L'accident vasculaire cérébral ischémique

L'AVC ischémique se caractérise par la mort du tissu cérébral due à une insuffisance en nutriments provoquée par l'obstruction d'une artère cérébrale. Une augmentation du transcrit (6h et 24h) et protéique (3, 5 et 8 jours) d'ADAMTS-4 est observée dans des modèles expérimentaux d'AVC transitoire (par insertion d'un filament) et un permanent (par électrocoagulation) (Cross *et al.,* 2006a ; Lemarchant *et al.,* 2016a). Ces données sont corrélées avec la forte présence d'ADAMTS-4 dans des tissus post-mortem de patients décédés d'un AVC ischémique (Lemarchant *et al.,* 2016a). Son expression pourrait être induite par des phénomènes excitotoxiques mis en place dans les premières heures qui suivent l'occlusion (Yuan *et al.,* 2002) et/ou par les astrocytes formant la cicatrice gliale (Zamanian *et al.,* 2012). L'injection intraveineuse d'ADAMTS-4 recombinant suite à l'induction d'un AVC permanent, n'influence pas la taille de l'infarctus mais réduit la quantité d'astrocytes et de macrophages en périphérie de celui-ci (3 jours après occlusion). L'injection d'ADAMTS-4 semble donc réduire l'inflammation mise en place après un AVC ischémique (Lemarchant *et al.,* 2016a).

Au laboratoire, des données internes montrent que l'injection intraveineuse d'ADAMTS-4 facilite la fibrinolyse en présence de tPA (Pruvost et al. en préparation). D'un point de vue mécanistique, ADAMTS-4 pourrait diminuer la formation du caillot en clivant le fibrinogène tout en contribuant à sa dégradation par la conversion du plasminogène en plasmine.

Pour résumer :

- ADAMTS-4 est une protéoglycanase interagissant avec de nombreux substrats dont les principaux sont **les CSPGs (les lecticans + le phosphacan).**
- Dans le SNC, elle est exprimée par différents types cellulaires.
- Son activité protéolytique est régulée par différentes protéases dont **le tPA.**
- Elle participe à la **pousse neuritique**, la myélinisation et la motricité.
- En conditions pathologiques, elle est aussi bien **bénéfique** que **délétère.**
- Dans un modèle d'étude de la SLA, **son administration entraîne la dégradation des PNNs** enveloppant les motoneurones.

Toutes ces caractéristiques font d'ADAMTS-4 une protéase importante dans la physiopathologie cérébrale. Une grande partie de ses fonctions dépendent de son activité enzymatique, elle-même régulée par différentes protéases. Parmi ces dernières, figure le tPA, une protéase majeure dans la fibrinolyse mais aussi dans plusieurs fonctions cérébrales, comme décrit dans le chapitre suivant.

3. L'activateur tissulaire du plasminogène

3.1 Informations historiques

L'activateur tissulaire du plasminogène est une sérine protéase historiquement décrite dans la circulation sanguine. Sa découverte repose sur l'étude du système fibrinolytique, dans lequel elle joue un rôle crucial en convertissant le plasminogène en sa forme active, la plasmine, capable de dégrader les caillots sanguins riches en fibrine.

Le tPA a été initialement découvert en 1947, grâce aux travaux d'Astrup et Permin. Leurs observations les menèrent à caractériser une protéase responsable de la conversion du plasminogène en plasmine. Ils nommèrent cette protéase fibrinokinase (Astrup and Permin, 1947). Le tPA fût testé pour la toute première fois chez l'Homme en 1981, afin de traiter deux patients souffrant de thrombose de la veine rénale (Weimar *et al.,* 1981). Deux ans plus tard, la même équipe clona l'ADN codant du tPA humain et l'exprima dans E. Coli puis dans des cellules de mammifères (Pennica *et al.,* 1983). En 1995, le tPA est proposé comme agent thrombolytique afin de lutter contre les AVC ischémiques (The National Institute of Neurological Disorders and Stroke rt-PA Stroke Study Group, 1995). À ce jour, le tPA est le seul traitement pharmacologique dans la prise en charge aigüe des AVC ischémiques.

3.2 Structure

Le tPA est une glycoprotéine appartenant à la famille des sérines protéases, codé par le gène Plat (*Plasminogen activator tissue type*) situé sur le chromosome 8. Il est synthétisé sous la forme d'une chaîne polypeptidique composée de 527 acides aminés, pour une masse moléculaire de 69 kDa. Le tPA comporte 5 domaines différents **(Figure 18)** :

- Un **domaine finger** capable de se lier à la fibrine. Cette interaction est nécessaire pour former un complexe ternaire avec le plasminogène (Kagitani *et al.,* 1985). Il permet également la liaison avec les récepteurs LRP et annexine II (Bu *et al.,* 1992 ; Hajjar *et al.,* 1994), ainsi qu'à l'un de ses inhibiteurs PAI-1 (Kaneko *et al.,* 1992).
- Un **domaine EGF-*like*** qui possède une forte homologie avec le facteur de croissance épidémique EGF avec lequel il peut se lier. La O-glycosylation de ce domaine intervient dans la recapture et la clairance hépatique du tPA (Hajjar *et al.,* 1994).

- Un **domaine kringle 1** dont la glycosylation permet la recapture hépatique du tPA par l'intermédiaire des récepteurs au mannose situés au niveau des cellules endothéliales (Kuiper *et al.,* 1996). Ce domaine est dépourvu de site LBS à la différence du kringle 2 (Kim *et al.,* 2003).
- Un **domaine kringle 2** caractérisé par un site LBS primordial pour l'interaction du tPA avec le plasminogène, la sous-unité GluN1 du récepteur NMDA (N-methyl-D-aspartate) ainsi que le facteur de croissance PDGF-CC (*platelet derived growth factor*-CC) (Fredriksson *et al.,* 2004 ; Lopez-Atalaya *et al.,* 2008). Ce domaine permet également de lier le PAI-1 mais uniquement pour la forme double chaîne du tPA (Kaneko *et al.,* 1992).
- Un **domaine catalytique** permettant la conversion du plasminogène en plasmine grâce à une triade catalytique (His 322, Asp 371, and Ser 478) (Pennica *et al.,* 1983).

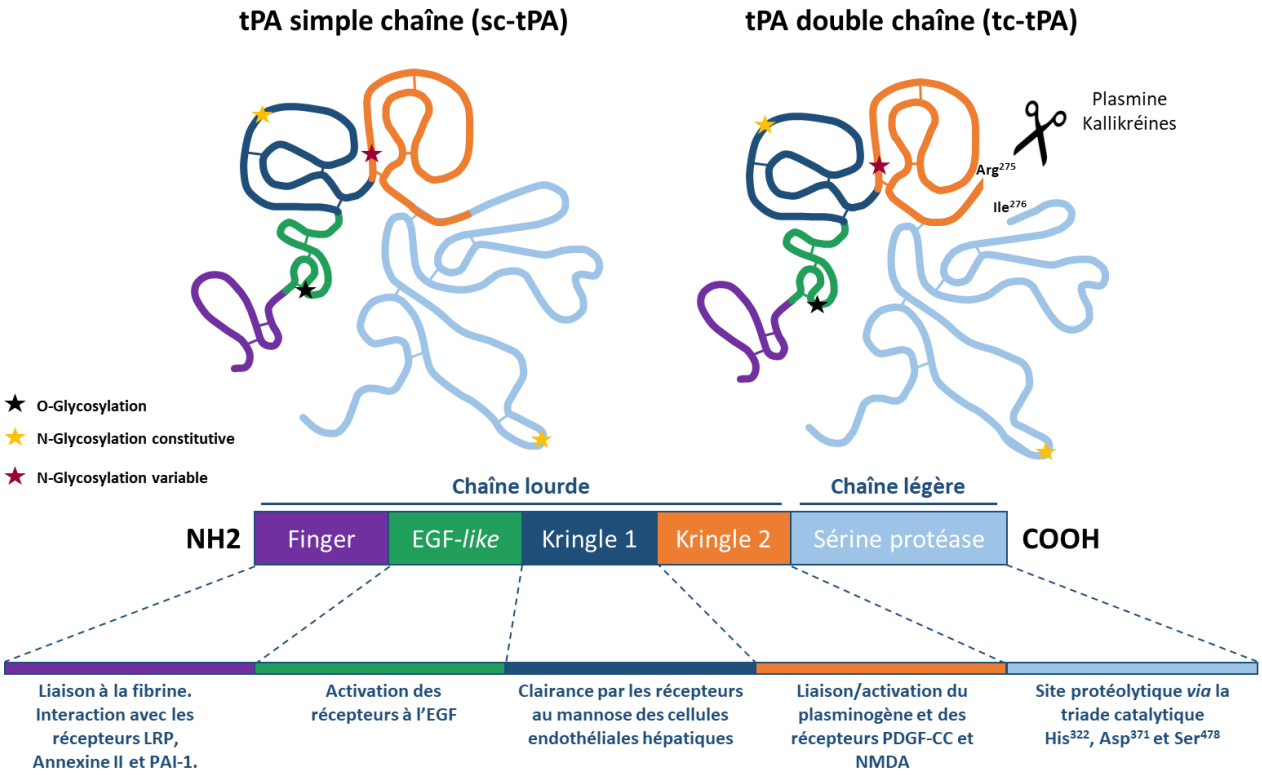


Figure 18 : Structure des deux formes du tPA et leurs fonctions.
La forme tc-tPA (à droite) provient de la forme sc-tPA (à gauche) après clivage de celle-ci par la plasmine ou les kallikréines. Ces deux formes sont constituées de 5 domaines (finger, EGF-*like*, Kringle 1, Kringle 2 et un domaine catalytique) répartis en une chaîne lourde et une chaîne légère. Les deux formes du tPA possèdent 17 ponts disulfures ainsi que différentes glycosylations. Elles sont toutes les deux protéolytiquement actives. Adapté de (Chevilley *et al.,* 2015 ; Hébert *et al.,* 2016).

Les cinq domaines sont répartis sur une chaîne lourde comprenant les quatre premiers domaines N-terminaux et une chaîne légère formée uniquement par le domaine catalytique. Certaines protéases telles que le plasminogène ou les kallikréines peuvent hydrolyser la liaison (Arg275-Ile276) située à l'intersection de ces deux chaînes donnant ainsi naissance à une forme double chaîne du tPA (tc-tPA, *two-chain tPA*) (Wallén *et al.,* 1982 ; Ichinose *et al.,* 1984). Les deux chaînes du tc-tPA restent reliées par l'intermédiaire d'un pont disulfure et d'un pont salin (Lamba *et al.,* 1996). La forme non clivée est dite forme simple chaîne (sc-tPA). En présence de fibrine, les deux formes du tPA présentent une activité enzymatique équivalente (Thelwell and Longstaff, 2007). Cependant en absence de fibrine l'activité enzymatique du tc-tPA est 8 fois plus importante que celle du sc-tPA (Wallén *et al.,* 1982). Les deux formes possèdent chacune 17 ponts disulfures leur permettant de maintenir leur structure tridimensionnelle.

3.3 Synthèse du tPA

L'expression du tPA est rapportée dans plusieurs structures telles que les ovaires, les testicules, les poumons, le cœur, la prostate, le compartiment vasculaire ainsi que le SNC (Soreq and Miskin, 1981 ; Rouf *et al.,* 1996 ; Hébert *et al.,* 2016). Comme pour la précédente partie, nous détaillerons uniquement l'expression de cette protéase dans le compartiment vasculaire et le SNC.

3.3.1 Dans le compartiment vasculaire

Le tPA est particulièrement présent dans la circulation sanguine, avec une concentration circulante d'environ 70 pM (Collen and Lijnen, 2009). Jusqu'à récemment, les cellules endothéliales étaient considérées comme la principale source de tPA vasculaire (Levin and Del Zoppo, 1994), mais une récente étude suggère qu'elle pourrait en fait être hépatocytaire (Zheng *et al.,* 2019). Au niveau des cellules endothéliales, le tPA serait stocké au sein des corps de Weibel-Palade contenant du VWF (Huber *et al.,* 2002), et/ou dans des vésicules de plus petite taille (Emeis *et al.,* 1997). Le tPA est libéré de façon constitutive ou en réponse à différents stimuli tels que la thrombine ou le VEGF, les forces de cisaillement, ou encore l'hyperoxie (Diamond *et al.,* 1989 ; Levin *et al.,* 1997 ; Huber *et al.,* 2002). Cette libération conditionnelle du tPA est cruciale afin de limiter la formation de caillots sanguins (Österlund *et al.,* 2002). La demi-vie du tPA circulant est d'environ 6 minutes. Sa clairance s'effectue

principalement par les hépatocytes et les cellules endothéliales du foie *via* des récepteurs au mannose (Kuiper *et al.,* 1996), des récepteurs LRP (Yepes *et al.,* 2003) ou la voie dépendante des galectines (Nagaoka *et al.,* 2002).

3.3.2 Dans le système nerveux central

La présence de tPA dans le SNC a été initialement décrite par autoradiographie en 1981 (Soreq and Miskin, 1981). Le tPA est majoritairement retrouvé dans le cortex, de l'hippocampe, l'amygdale, l'hypothalamus et le cervelet (Louessard *et al.,* 2016 ; Stevenson and Lawrence, 2018) **(Figure 19)**. Il est exprimé par de nombreux types cellulaires comprenant les neurones, les astrocytes, la microglie, les oligodendrocytes, les épendymocytes, les mastocytes ou encore les péricytes (Siao *et al.,* 2003 ; Hultman *et al.,* 2008 ; Louessard *et al.,* 2016).

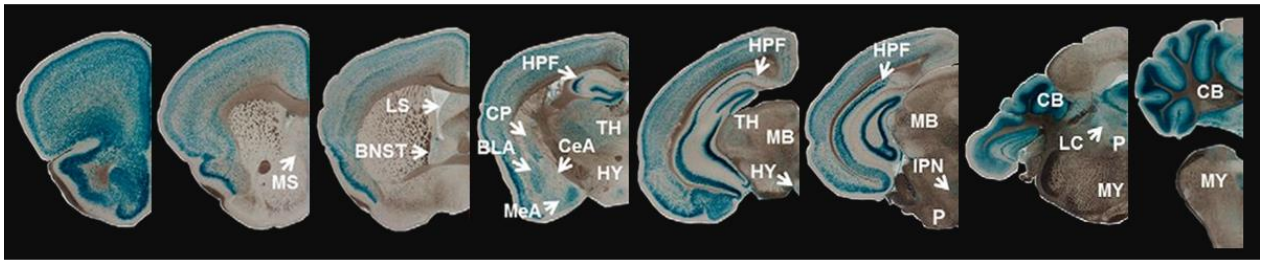


Figure 19 : Localisation du tPA dans les différentes régions du SNC.
Visualisation indirecte du tPA chez des souris transgéniques exprimant la bêta-galactosidase (en bleu) sous contrôle du promoteur Plat : MS (*medial septal nuclei*), LS (*lateral septal nuclei*), BNST (*bed nucleus of the stria terminalis*), HPF (*hippocampal formation*), TH (thalamus), CP (caudé/putamen), BLA (*basolateral nucleus of the amygdala*), CeA (*central nucleus of the amygdala*), MeA (*medial nucleus of the amygdala*), HY (hypothalamus), MB (midbrain), IPN (*interpeduncular nucleus*), P (pont), LC (*locus coeruleus*) ; CB (*cerebellum*), MY (medulla). Adapté de (Stevenson and Lawrence, 2018).

3.3.2.1 Les neurones

Shin et collaborateurs démontrent dans des cultures hippocampiques, que le tPA est localisé au niveau des dendrites et des synapses. La présence de l'ARNm du tPA au niveau synaptique, suggère une synthèse locale (Shin *et al.,* 2004). Néanmoins, le tPA est aussi transporté le long des neurites et des axones au sein de vésicules de sécrétion (Lochner *et al.,* 1998). Ces dernières sont VAMP-2 (*Vesicle-associated membrane protein)* positives et sont retrouvées aussi bien en présynaptique que

en postsynaptique (Lenoir *et al.,* 2019). Leur sécrétion se fait majoritairement au niveau dendritique (Lenoir *et al.,* 2019).

En raison de son transport vésiculaire le long des dendrites et des axones, la détection du tPA par immunohistochimie est difficile. En utilisant de la colchicine afin de bloquer ce transport vésiculaire, le laboratoire a réussi à démasquer la présence de tPA dans les neurones glutamatergiques dont les neurones granulaires et pyramidaux. Cette expression est confirmée par *single-cell* RT-PCR en patchant des neurones de la couche V du cortex (Louessard *et al.,* 2016) **(Figure 20)**, ainsi que par l'utilisation de souris transgéniques exprimant de la bêta-galactosidase sous le contrôle du promoteur Plat au niveau de l'hippocampe (Stevenson and Lawrence, 2018).

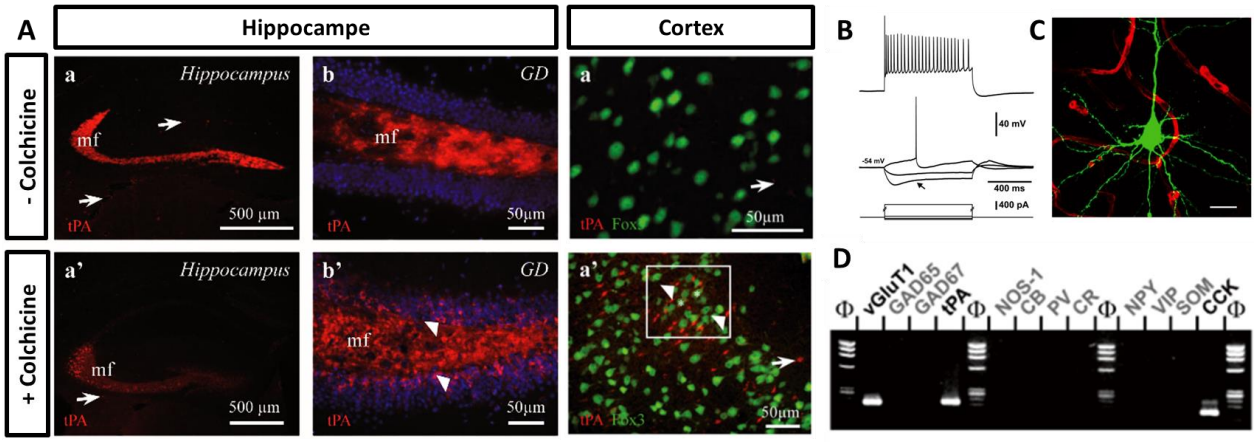


Figure 20 : Expression du tPA au sein des neurones excitateurs hippocampiques et corticaux.
A) Immunohistochimie révélant la présence de tPA dans les fibres moussues de l'hippocampe en condition basale, ainsi que dans les neurones granulaires du gyrus denté de l'hippocampe et dans les neurones corticaux Fox3 (en vert) après injection de colchicine. (B et C) Profil de décharge d'un neurone pyramidal de la couche V corticale exprimant le tPA, et sa morphologie (en vert) après injection de biocytine (échelle de 20µm). D) S*ingle-cell* RT-PCR sur les neurones de la couche V du cortex, révélant l'expression du transcrit du tPA avec ceux du transporteur au glutamate VGLUT1 (*vesicular glutamate transporter 1*) et de la cholécystokinine (CCK). Adapté de (Louessard *et al.,* 2016).

Outre les neurones excitateurs, quelques études immunohistochimiques ont révélé la présence de tPA par les interneurones PV et VIP (*vasointestinal peptide*) (Chu *et al.,* 2015 ; Fredriksson *et al.,* 2015). Les souris transgéniques Plat- bêta-galactosidase révèlent, quant à elles, une expression du tPA par les interneurones à somatostatine (Stevenson and Lawrence, 2018).

3.3.2.2 Les astrocytes

Des études *in vitro* et *in vivo* chez la souris, bien que controversées, ont montré une synthèse astrocytaire du tPA en condition physiologique (Toshniwal *et al.,* 1987; Stevenson and Lawrence, 2018). Chez l'Homme, l'expression du tPA est retrouvée dans les astrocytes activés (Hultman *et al.,* 2008). En dehors d'une synthèse, les astrocytes peuvent également capturer le tPA libéré au niveau de la fente synaptique par les neurones, *via* leurs récepteurs LRP. Ces astrocytes peuvent alors libérer le tPA par un mécanisme dépendant des récepteurs kaïnate qui servent de senseurs du glutamate extracellulaire (Cassé *et al.,* 2012). Ce recyclage astrocytaire sert à réguler la concentration de tPA à la synapse et ses effets sur les récepteurs NMDA.

3.3.2.3 La microglie

En mesurant la conversion du plasminogène en plasmine, des études ont pu mettre en évidence la sécrétion de tPA par la microglie en culture (Rogove *et al.,* 1999 ; Flavin *et al.,* 2000). *In vivo*, l'expression microgliale est démontrée dans un modèle de lésion excitotoxique (Siao *et al.,* 2003). En condition inflammatoire, le tPA joue un rôle crucial dans l'activation de la microglie. Cet effet est dépendant de l'interaction de son domaine finger avec le récepteur à l'annexine 2 et ne dépend pas de son activité enzymatique (Siao and Tsirka, 2002).

3.3.2.4 Les oligodendrocytes

L'expression du tPA par les oligodendrocytes a été rapportée dans plusieurs études. Cette expression semble cependant diminuer chez l'adulte (Correa *et al.,* 2011 ; Louessard *et al.,* 2016). Le tPA oligodendrocytaire régule la migration des précurseurs des oligodendrocytes au niveau du cerveau et de la moelle épinière durant le développement mais également durant les phases de remyélinisaton après lésion de la substance blanche (Leonetti *et al.,* 2017).

3.3.3 Les inhibiteurs endogènes du tPA

Les inhibiteurs du tPA appartiennent à la famille des serpines (*serine proteinase inhibitor*s), des glycoprotéines de 350 à 500 acides aminés. Ces serpines possèdent un domaine RCL (*reactive center loop*) leur permettant de s'accrocher à différentes protéases telles que le tPA. Ce dernier se retrouve

contraint de cliver ce domaine, ce qui entraîne en retour son inhibition par la formation d'une liaison covalente (Silverman *et al.,* 2001). Au sein du SNC, l'inhibition du tPA peut être réalisée par quatre inhibiteurs : PAI-1 (*plasminogen inhibitor*), PAI-2, la neuroserpine et la protéase nexine-1 (PN-1).

PAI-1 (ou serpinE1) est présent en abondance dans le plasma grâce aux cellules endothéliales, les cellules musculaires lisses, les plaquettes (Sprengers and Kluft, 1987) et les hépatocytes (Bouton *et al.,* 2012). Dans la circulation, PAI-1 est présent en excès par rapport au tPA. La formation d'un complexe entre ces deux protéines est très stable, ce qui rend l'inhibition du tPA presque définitive (Zhou *et al.,* 2001a). PAI-1 peut inhiber les deux formes du tPA en fonction de son interaction, soit par le domaine finger dans le cas du sc-tPA, soit le domaine kringle 2 pour le tc-tPA (Kaneko *et al.,* 1992). En présence de fibrinogène, PAI-1 possède une plus grande affinité pour la forme sc-tPA ; cependant en présence de fibrine, le PAI-1 inhibe les deux formes mais avec moins d'efficacité (Thelwell and Longstaff, 2007). Au sein du SNC, PAI-1 est exprimé en faible quantité par les neurones et les astrocytes (Hino *et al.,* 2001). Néanmoins, sa synthèse astrocytaire augmente dans un modèle excitotoxique ou à la suite d'un AVC ischémique (Docagne *et al.,* 1999 ; Sallés and Strickland, 2002). Une récente étude estime que la quantité d'ARNm de PAI-1 est multipliée 237 fois après un AVC ischémique transitoire. Cette forte expression contribuerait alors à accroître les dommages cérébraux (Griemert *et al.,* 2019).

PAI-2 n'est pas détectable dans le plasma en condition physiologique. Il y serait néanmoins libéré pendant la grossesse par les cellules trophoblastiques et les macrophages (Åstedt *et al.,* 1998). PAI-2 est synthétisé dans le SNC après un AVC ischémique, dans lequel il ne semble pas jouer de rôle particulier (Griemert *et al.,* 2019).

PN-1 (ou serpinE2) est à peine détectable dans le plasma, malgré son expression dans les trois tuniques de la paroi vasculaire (cellules endothéliales, cellules musculaires lisses et fibroblastes) et par certaines cellules sanguines (les plaquettes et les monocytes) (Bouton *et al.,* 2012). PN-1 possède un large spectre d'inhibition, incluant le tPA, l'uPA, la plasmine et plus particulièrement la thrombine (Scott *et al.,* 1985; Evans *et al.,* 1991; Bouton *et al.,* 2012). Elle possède la capacité d'inhiber le tPA ou la plasmine attachés à la fibrine (Boulaftali *et al.,* 2011), ce qui lui confère un plus grand pouvoir inhibiteur que PAI-1 en présence de thrombus. Les différents substrats de PN-1 lui permettent à la

fois de réguler la formation des thrombus et leur dissolution **(Figure 21)**. Dans le SNC, PN1 est exprimée par les neurones et les cellules gliales (Simpson *et al.,* 1994 ; Giau *et al.,* 2005).

La neuroserpine est majoritairement exprimée dans le SNC, par les astrocytes et surtout par les neurones (Docagne *et al.,* 1999 ; Miranda and Lomas, 2006). La neuroserpine peut inhiber le tPA, l'uPA et la plasmine, mais ne possède aucune activité inhibitrice envers la thrombine à la différence de la PN-1 (Osterwalder *et al.,* 1998). A cause de l'instabilité du complexe tPA/neuroserpine et de sa rapide dissociation, la neuroserpine est considérée comme une protéine inhibitrice transitoire du tPA (Barker-carlson *et al.,* 2002). Une étude par hybridation *in situ* a mis en évidence son expression durant les phases tardives de la neurogenèse et dans les régions plastiques chez l'adulte (Osterwalder *et al.,* 1996), suggérant un rôle dans les fonctions plastiques du tPA.

3.4 Fonctions du tPA

3.4.1 Fonctions vasculaires

3.4.1.1 La fibrinolyse

La fibrinolyse est un processus hautement régulé permettant la dégradation des caillots riches en fibrine au sein des vaisseaux sanguins. L'acteur principal de ce mécanisme est une sérine protéase hépatique, le plasminogène. Sa forme active, la plasmine, clive les chaînes de fibrine permettant la dissolution du caillot. La conversion du plasminogène en plasmine est permise par ses activateurs : le tPA ou l'uPA (Collen and Lijnen, 1991). En présence de fibrine, la conversion du plasminogène en plasmine par le tPA est cent fois plus efficace (Hoylaerts *et al.,* 1982). Ce mécanisme permet ainsi au tPA de réguler spécifiquement l'activité de la plasmine au niveau du caillot de fibrine, tout en empêchant à la plasmine d'être trop rapidement inhibée par l'α2-antiplasmine et l'α2-macroglobuline (Holmes *et al.,* 1987 ; Thiebaut *et al.,* 2018). Cette régulation inhibitrice est cruciale afin d'éviter une perméabilisation de la barrière hématoencéphalique (BHE) engendrée par hyperfibrinolyse (Marcos-Contreras *et al.,* 2016) **(Figure 21)**.

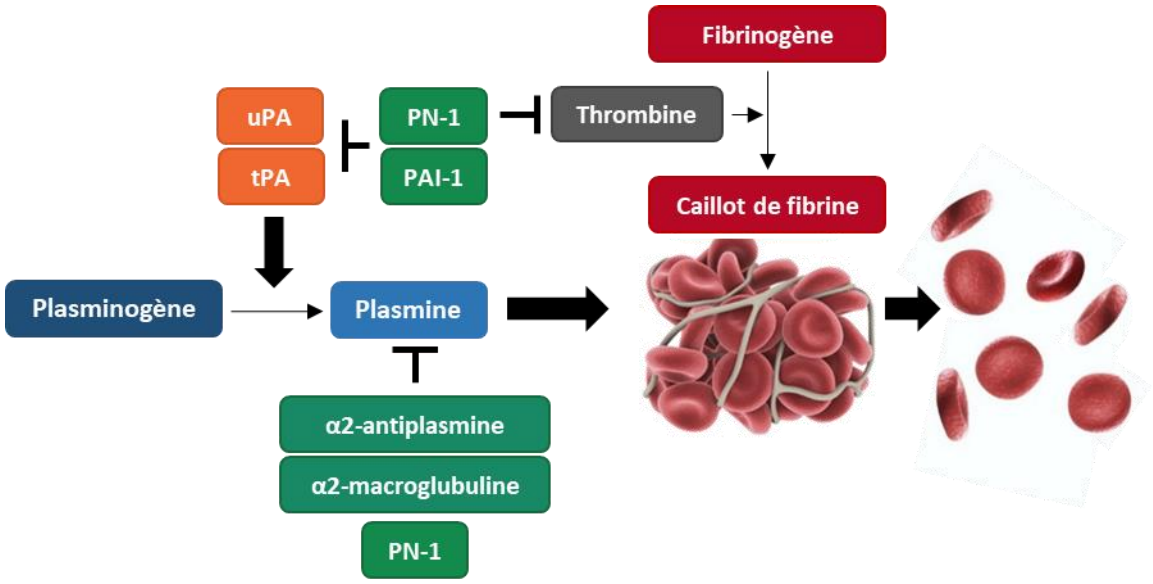


Figure 21 : Mécanisme d'action de la cascade fibrinolytique.
Le tPA et l'uPA permettent la conversion du plasminogène en plasmine. Ce dernier dissout les caillots sanguins en clivant les chaînes de fibrine. Ce mécanisme est finement régulé par plusieurs protéines inhibant l'activité du tPA ou de l'uPA (PAI-1 et PN-1), de la plasmine (α2-antiplasmine, α2-macroglobuline et PN-1) mais aussi au niveau de la protéase permettant la conversion de fibrinogène en fibrine, la thrombine (PN-1). Parmi ces protéines inhibitrices, PAI-1 et l'α2-antiplasmine se placent comme les inhibiteurs principaux de la fibrinolyse (Longstaff and Kolev, 2015).

3.4.1.2 Ouverture de la BHE

La barrière hématoencéphalique participe au maintien de l'homéostasie cérébrale, en contrôlant les échanges bidirectionnels entre le compartiment vasculaire et le parenchyme. La BHE est constituée de cellules endothéliales maintenues entre elles à l'aide de jonctions serrées ou adhérentes, de lames basales (composées de collagène de type IV, de laminine et de fibronectine), de péricytes et des pieds astrocytaires (Weiss *et al.,* 2009 ; de Wit *et al.,* 2017) **(Figure 22)**.

A l'heure actuelle, le tPA est l'unique traitement pharmacologique utilisé dans le traitement de la phase aigüe des AVC ischémiques. Cependant, l'injection intraveineuse de tPA peut s'avérer délétère en augmentant les risques hémorragiques chez les patients (Tanne *et al.,* 2002 ; Lansberg *et al.,* 2007). En absence d'ischémie, l'injection de tPA dans le liquide cérébro-spinal conduit à une perméabilité de la BHE de manière dose-dépendante. Ce déficit est bloqué par l'administration d'un

antagoniste des récepteurs LRP dénommé RAP (*receptor- associated protein*), suggérant d'un mécanisme dépendant de l'interaction du tPA avec les récepteurs LRP (Yepes *et al.,* 2003).

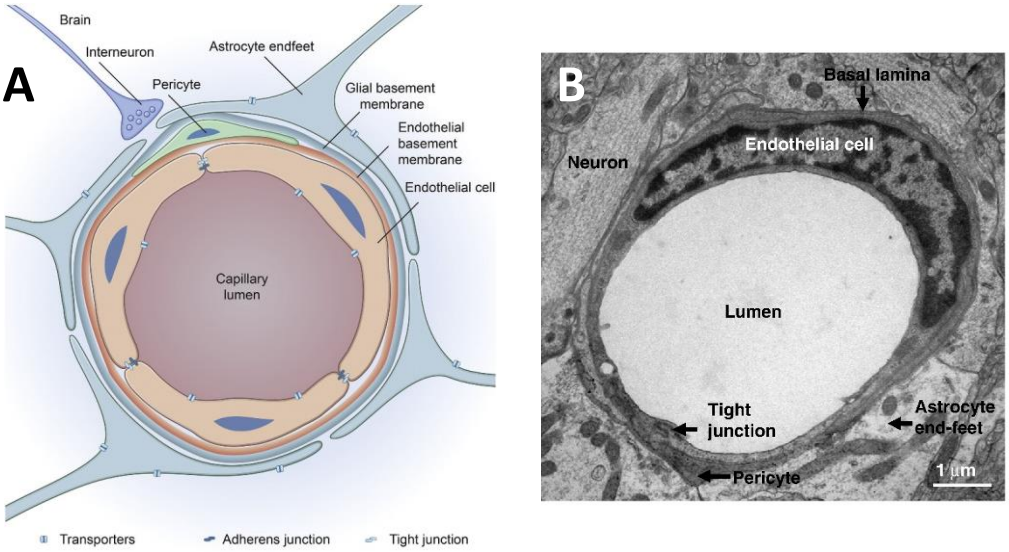


Figure 22 : La barrière hémato-encéphalique.
A) La BHE est composée de cellules endothéliales soutenues par des péricytes, des extrémités astrocytaires et deux lames basales. Les cellules endothéliales sont scellées par des jonctions serrées et des jonctions adhérentes. B) Microscopie électronique d'une coupe de cerveau de rat. Adapté de (Weiss *et al.,* 2009 ; de Wit *et al.,* 2017).

Le tPA, par son interaction avec les LRP, peut accroître l'expression de MMP-3 et MMP-9 *in vitro* (Wang *et al.,* 2003 ; Suzuki *et al.,* 2009). Ces MMPs sont connues pour perméabiliser la BHE en dégradant la laminine et le collagène formant les lames basales (Lakhan *et al.,* 2013). Le tPA intervient *via* la conversion du plasminogène en plasmine, dans l'activation de la forme mature des MMPs (Lijnen, 2001), et participe à la dégradation de la laminine et du collagène (Liotta *et al.,* 1981).

Une étude du laboratoire montre que le tPA est capable de traverser les cellules endothéliales par un mécanisme de transcytose dépendant des LRP (Benchenane *et al.,* 2005). Ce passage pourrait permettre au tPA d'interagir avec les LRP situés au niveau des pieds astrocytaires. A la suite d'un AVC ischémique, cette interaction entraîne le détachement des pieds astrocytaires conduisant à une perméabilisation de la BHE (Polavarapu *et al.,* 2007). La hausse d'expression des récepteurs LRP 6h et 24h après un AVC ischémique pourrait faciliter tous ces mécanismes délétères du tPA sur la BHE (Polavarapu *et al.,* 2007 ; Suzuki *et al.,* 2009).

Outre son interaction avec les LRP, le tPA peut également activer le PDGF-CC. Cette activation entraîne celle des récepteurs PDGFR-α (*Platelet-Derived Growth Factor Receptor α*) situés au niveau des astrocytes, réduisant alors l'intégrité de la BHE (Su *et al.,* 2008). En activant la plasmine, le tPA intervient dans le clivage de MCP-1 (*Monocyte Chemoattractant Protein-1*), conduisant ainsi à la perméabilisation de la BHE (Yao and Tsirka, 2011).

Dans des cultures de cellules endothéliales humaines traitées au TNF, la fixation du tPA sur le récepteur NMDA endothélial engendre l'ouverture de la BHE (Mehra *et al.,* 2020). Il est intéressant de constater que bloquer l'interaction tPA/récepteur NMDA permet de réduire la perméabilisation de la BHE suite à une ischémie cérébrale ou dans un modèle de sclérose en plaques. Dans ce modèle de sclérose en plaques, la préservation de la BHE prévient l'infiltration des leucocytes et permet ainsi de stopper la progression de la maladie (Macrez *et al.,* 2011, 2016).

3.4.1.3 Le couplage neurovasculaire

Le couplage neurovasculaire correspond à la relation étroite entre l'activité neuronale locale et le flux sanguin cérébral. Cipolla et collaborateurs ont été les premiers à démontrer que l'injection de tPA dans la circulation sanguine réduisait la réactivité vasculaire lors d'un AVC ischémique (Cipolla *et al.,* 2000). En condition physiologique, le tPA induit une vasodilatation des vaisseaux par un mécanisme dépendant de la libération de NO (*nitric oxide*). Ce mécanisme de libération pourrait être la raison des déficits hémodynamiques retrouvés lors d'une ischémie cérébrale après l'administration de tPA (Armstead *et al.,* 2004). Les souris déficientes en tPA présentent une diminution de la réponse hémodynamique en réponse à une stimulation des vibrisses. L'application locale de tPA (au niveau de la fenêtre crânienne) permet de compenser ce déficit. Les auteurs suggèrent que l'interaction du tPA avec les récepteurs NMDA post-synaptiques influence la production de NO ce qui a pour conséquence d'induire une vasodilation (Park *et al.,* 2008). Cependant, de récents travaux du laboratoire montrent que la réponse hémodynamique du tPA, après une stimulation des vibrisses, passe plutôt par son interaction avec les récepteurs NMDA endothéliaux (Anfray *et al.,* 2019).

3.4.2 Fonctions cérébrales en condition physiologique

3.4.2.1 Le neurodéveloppement

Friedman et collaborateurs, par une analyse par hybridation *in situ*, ont montré que l'expression du tPA coïncide avec les stades de prolifération et de migration cellulaires (Friedman and Seeds, 1994). L'utilisation de souris déficientes en tPA, a alors permis de découvrir un retard de la migration des cellules granulaires au niveau du cervelet (Seeds *et al.,* 1999). En plus du cervelet, l'absence de tPA induit également un retard de la migration des neurones corticaux. L'implication du tPA dans la corticogenèse semble liée à son interaction avec le récepteur NMDA situé au niveau de la glie radiaire (Pasquet *et al.,* 2019).

Cependant, d'autres mécanismes pourraient également participer au rôle du tPA dans la migration neuronale. Le premier est bien entendu sa capacité à convertir le plasminogène en plasmine. En effet, l'inhibition enzymatique de la plasmine par l'εACA (*ε-amino caproïc acid*), ralentit la migration des cellules granulaires (Moonen *et al.,* 1982). Par son activité enzymatique, le tPA peut également cliver la réeline (Trotter *et al.,* 2014). Comme nous l'avons mentionné précédemment, la réeline est cruciale dans la migration mais aussi dans la croissance et la maturation des neurones. Enfin, le tPA influence *in vitro* et *in vivo* la migration des progéniteurs oligodendrocytes par un mécanisme dépendant des récepteurs à l'EGF (Leonetti *et al.,* 2017).

Plusieurs études se sont intéressées au rôle du tPA dans la pousse neuritique. Krystosek et collaborateurs rapportent une sécrétion du tPA au niveau du cône de croissance dans des cultures de neuroblastes (Krystosek and Seeds, 1981). La surexpression du tPA *in vitro* ou son administration dans des cultures de neurones permettent de confirmer son rôle dans la pousse neuritique (Pittman and DiBenedetto, 1995 ; Lee *et al.,* 2007). Cet effet bénéfique peut être contrebalancé par l'utilisation de PAI-1, d'un inhibiteur exogène (le tPA stop) mais aussi par des ARN interférents dirigés contre le tPA et contre les récepteurs LRP5/6 (Lee *et al.,* 2014). Lee et collaborateurs démontrent ainsi que le tPA agit sur la pousse neuritique par son activité enzymatique et son interaction avec les récepteurs LRP5/6. Deux études permettent de démontrer que l'activité enzymatique du tPA dans la pousse neuritique passe aussi par l'activation de deux protéases, la plasmine et/ou ADAMTS-4. Ces deux protéases facilitent la pousse neuritique en dégradant les CSPGs présents dans la MEC (Wu *et al.,* 2000 ; Lemarchant *et al.,* 2014) **(cf 2.5.1.1 La pousse neuritique)**.

3.4.2.1 La transmission glutamatergique

En tant que principal neurotransmetteur excitateur du SNC, le glutamate possède un large éventail d'actions physiopathologiques grâce à ses différents récepteurs ionotropiques (NMDA, AMPA et Kaïnate) et métabotropiques. En cas d'excès de glutamate au niveau de la fente synaptique, l'entrée massive de Ca^{2+} dans la cellule par les récepteurs NMDA devient neurotoxique (Arundine and Tymianski, 2003) **(cf 4.5.2.1 Excitotoxicité post-ischémique et vagues de dépolarisation)**.

En 2001, le laboratoire a démontré que le tPA peut cliver la sous-unité GluN1 des récepteurs NMDA. En présence de glutamate, cette modification structurelle conduit à une potentialisation de l'influx calcique dans les neurones (Nicole *et al.,* 2001). De manière surprenante, seule la forme simple chaîne du tPA permet de potentialiser l'influx calcique dans les neurones (Parcq *et al.,* 2012) **(Figure 23)**. Le clivage de la sous-unité GluN1 du récepteur NMDA dépend de son interaction avec le domaine kringle 2 du tPA et est réalisé sur l'arginine 260 (Fernández-Monreal *et al.,* 2004 ; Lopez-Atalaya *et al.,* 2008). De fait, ce mécanisme permet au tPA d'agir comme un neuromodulateur en potentialisant la transmission glutamatergique.

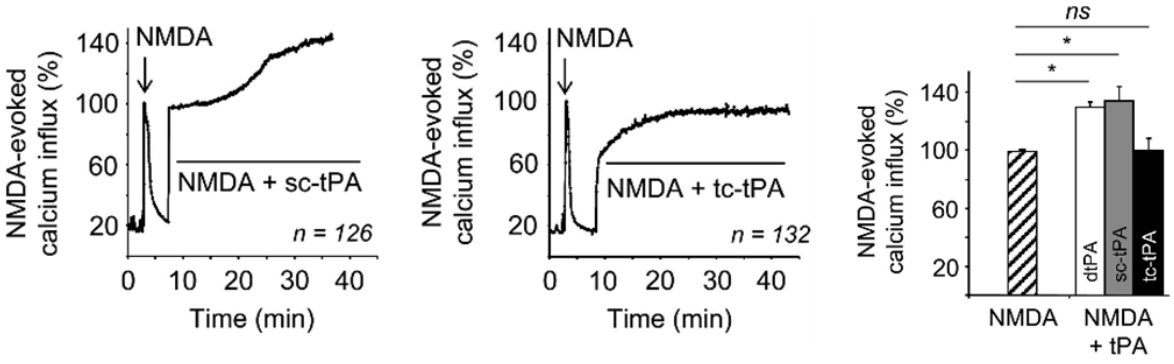


Figure 23 : Seul le sc-tPA potentialise l'influx calcique en présence de NMDA.
Dans des neurones corticaux stimulés au NMDA, le sc-tPA potentialise l'entrée de calcium dans les neurones à la différence du tc-tPA. Adapté de (Parcq *et al.,* 2012).

Dans un contexte excitotoxique, le tPA favorise la mort neuronale induite par l'ajout de NMDA (Nicole *et al.,* 2001 ; Liot *et al.,* 2004 ; Parcq *et al.,* 2012) **(Figure 24)**. L'utilisation d'un anticorps bloquant spécifiquement l'interaction du tPA avec la sous-unité GluN1 réduit les lésions excitotoxiques induites par l'injection de NMDA (Benchenane *et al.,* 2007) et par une ischémie cérébrale (Macrez *et al.,* 2010). De récents travaux de l'équipe expliquent que l'interaction du tPA

avec la sous-unité GluN1 facilite la mobilité des récepteurs NMDA au niveau extra-synaptique. Ce processus favoriserait la mort neuronale dans un contexte excitotoxique (Lesept *et al.,* 2016).

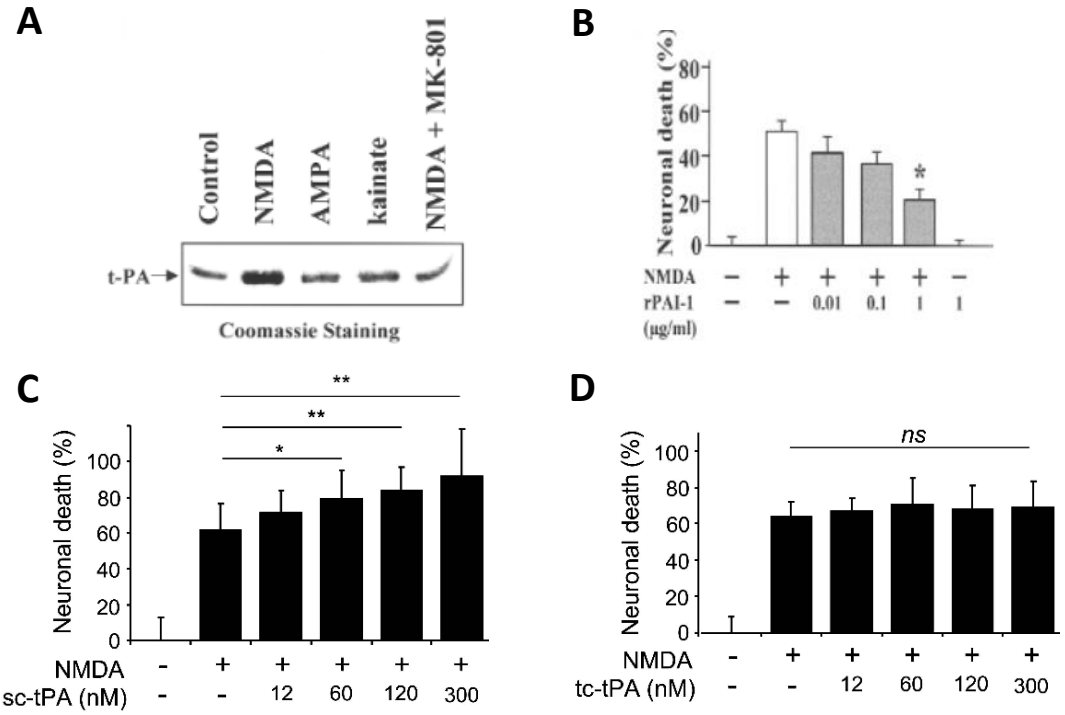


Figure 24 : Le sc-tPA accroît la mort neuronale en présence de NMDA.
A) La dépolarisation des neurones corticaux induite par un traitement au NMDA augmente la libération de tPA *in vitro.* Cette libération n'est pas retrouvée avec les traitements AMPA, Kaïnate ou NMDA + un inhibiteur (MK-801). B) La mort neuronale induite par NMDA est diminuée en présence de PAI-1. C) L'ajout exogène de sc-tPA augmente de façon dose-dépendante la mort neuronale induite par le NMDA ; D) tandis que le tc-tPA n'induit pas de modification. Adapté de (Nicole *et al.,* 2001 ; Parcq *et al.,* 2012).

Ce mécanisme de potentialisation de l'influx calcique dans les neurones par le tPA a été discuté. En effet, Samson et collaborateurs montrent que le clivage de la sous-unité GluN1 du récepteur NMDA est effectué par la plasmine, et non le tPA. Ils proposent que la potentialisation du tPA sur la signalisation des récepteurs NMDA passe par le recrutement des récepteurs LRP. L'ajout d'un antagoniste des récepteurs LRP dénommé RAP (*receptor- associated protein*) contrebalance l'influx calcique permis par le tPA *in vitro* (Samson *et al.,* 2008). Mannaioni et collaborateurs démontrent que la plasmine permet bien la potentialisation de l'influx de calcium *via* les récepteurs NMDA. Cette potentialisation serait néanmoins dépendante de l'activation de PAR-1 (*Protease-activated*

receptor-1) situé au niveau des astrocytes (Mannaioni *et al.,* 2008). Enfin, la mort neuronale induite par la plasmine dans un modèle excitotoxique au kaïnate, est confirmée par l'injection intraparenchymateuse d'α-2-antiplasmine (Tsirka *et al.,* 1997).

3.4.2.2 L'apoptose

L'apoptose, ou mort cellulaire programmée, est un mécanisme induisant la clairance des cellules avec un minimum de dommages pour les tissus alentours. Ce processus est aussi bien crucial pour débarrasser l'organisme des cellules non désirées au cours du développement, comme pour éliminer des cellules trop endommagées pour être réparées dans certaines pathologies (D'Arcy, 2019).

Les études cherchant à définir le rôle du tPA dans l'apoptose neuronale sont contradictoires. Des études suggèrent que le tPA possède des effets pro-apoptotiques dans des cultures de neurones hippocampiques et des neurones corticaux traités au NMDA (Liu *et al.,* 2004 ; Medina *et al.,* 2005). À l'inverse, Liot et collaborateurs démontrent un effet anti-apoptotique du tPA sur des neurones corticaux privés en sérum, par un mécanisme non protéolytique dépendant de l'activation de la voie de signalisation phosphatidylinositol-3-Kinase (PI3K) (Liot *et al.,* 2006). Cet effet anti-apoptotique pourrait faire intervenir différents récepteurs tels que le récepteur à l'EGF (Bertrand *et al.,* 2015 ; Lemarchand *et al.,* 2016), le récepteur annexine II (Lee *et al.,* 2007) ou encore le récepteur Grp78 (*78 kD glucose-regulated protein*) (Louessard *et al.,* 2017). Dans des cultures d'oligodendrocytes, le tPA exerce ses propriétés anti-apoptotiques grâce à son interaction avec le récepteur à l'EGF (Correa *et al.,* 2011).

Le tPA peut également participer à l'apoptose par l'activation de la plasmine. Une étude dévoile que la conversion du plasminogène en plasmine par le tPA provoque un détachement des neurones et leur apoptose *in vitro* (Ho-Tin-Noé *et al.,* 2009), un effet bloqué par PN-1 (Rossignol *et al.,* 2004). De manière intéressante, une étude suggère que les cellules en apoptose expriment plus de sites de liaison à la lysine, permettant à la cellule de servir de surface d'activation pour le plasminogène et son activateur (Mullane and Baker, 1998). Cette surface d'activation pourrait ainsi permettre d'accélérer l'apoptose cellulaire.

3.4.2.3 La plasticité synaptique

Comme nous l'avons abordé précédemment, la LTP tardive se caractérise par la synthèse de nouvelles protéines (Baltaci *et al.,* 2019), parmi lesquelles on se trouve le tPA. Qian et collaborateurs ont été les premiers à décrire une augmentation de l'ARNm du tPA dans les neurones granulaires du gyrus denté en réponse à l'induction d'une LTP au niveau de l'hippocampe de rat (Qian *et al.,* 1993) **(Figure 25A)**. Par la suite, l'utilisation de souris déficientes en tPA ou de différents inhibiteurs (PAI-1 et le tPA stop) a permis de découvrir l'implication du tPA en faveur des phases tardives de la LTP mais sans affecter la phase précoce (Huang *et al.,* 1996 ; Baranes *et al.,* 1998 ; Pang *et al.,* 2004). Finalement, des travaux menés au laboratoire prouvent que seul le sc-tPA améliore la phase tardive de la LTP (Parcq *et al.,* 2012) **(Figure 25B)**. Un mécanisme d'action potentiel du tPA sur la LTP serait une nouvelle fois lié au recrutement des récepteurs LRP, présents en abondance au niveau des neurones hippocampiques. En effet, l'application de RAP (antagoniste des récepteurs LRP) sur des coupes d'hippocampe, permet de bloquer les effets potentialisateurs du tPA exogène sur la phase tardive de la LTP (Zhuo *et al.,* 2000).

La plasmine peut également intervenir dans la LTP par son activité enzymatique. Elle serait capable de maintenir la phase tardive de la LTP en activant le pro-BDNF en BDNF (*brain-derived neurotrophic factor*). Il est intéressant de constater que l'application de BDNF mature sur des coupes organotypiques d'hippocampe, suffit à restaurer le déficit de LTP provoqué par la délétion de tPA (Pang *et al.,* 2004). Au contraire, la plasmine pourrait également perturber la LTP en dégradant la laminine retrouvée dans la MEC (Nakagami *et al.,* 2000).

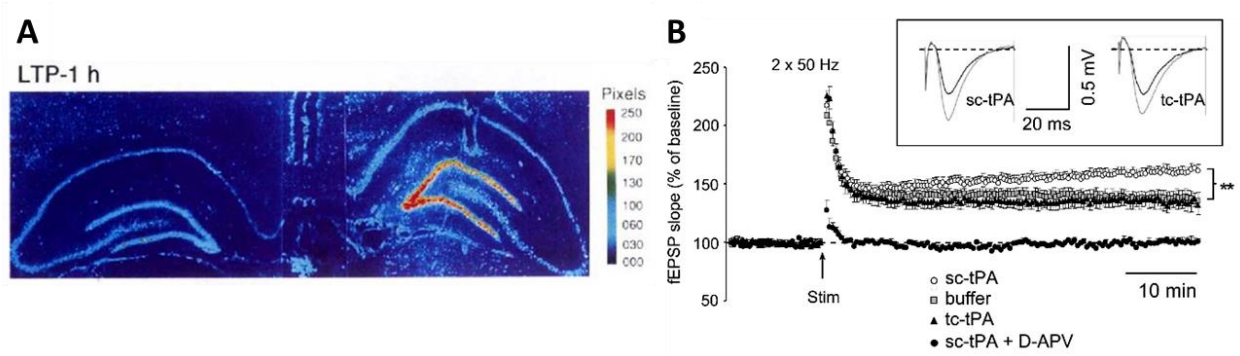


Figure 25 : Fonction du tPA et son expression dans la LTP.
A) Augmentation de l'expression de l'ARNm du tPA au niveau du gyrus denté de l'hippocampe en réponse à une stimulation à haute fréquence. B) L'application seule de sc-tPA sur des tranches hippocampiques améliore la phase tardive de le LTP, à la différence de son application avec un antagoniste des récepteurs NMDA (APV) ou du tc-tPA. Adapté de (Qian *et al.,* 1993 ; Parcq *et al.,* 2012).

Calabresi et collaborateurs ont constaté que la LTD induit également une augmentation de l'expression de l'ARNm du tPA dans le striatum de rat (Calabresi *et al.,* 2000). De plus, l'utilisation de sc-tPA sur des coupes hippocampiques renverse les effets de la LTD (Parcq *et al.,* 2012). Ces données suggèrent un rôle du tPA dans le maintien de de la densité post-synaptique.

3.4.2.4 Les processus cognitifs

Comme nous venons de le voir, le tPA module différentes formes de plasticité synaptique nécessaire à l'apprentissage et la mémoire. Des études ont ainsi constaté que l'absence de tPA chez la souris provoque un déficit dans la reconnaissance d'objet (Benchenane *et al.,* 2007), ainsi que dans la mémoire spatiale (Calabresi *et al.,* 2000). Dans cette dernière, l'interaction du tPA avec les récepteurs NMDA semble être cruciale. En effet, l'immunisation systémique à l'aide d'un anticorps bloquant spécifiquement cette interaction provoque des déficits de mémoire spatiale chez des souris sauvages (Benchenane *et al.,* 2007 ; Obiang *et al.,* 2012). Des résultats similaires sont obtenus après injection de cet anticorps dans le cortex entorhinal (Hébert *et al.,* 2017). Ainsi, la diminution de l'activité protéolytique du tPA qui survient au cours du vieillissement dans l'hippocampe et le cortex entorhinal pourrait être associée à ces déficits de cognition spatiale (Roussel *et al.,* 2009 ; Hébert *et al.,* 2017). Il est intéressant de constater que l'environnement enrichi permet de contrebalancer cette diminution de tPA en plus des déficits spatiaux chez la souris âgée (Obiang *et al.,* 2011).

Le tPA est fortement exprimé dans des régions cérébrales impliquées dans la régulation des émotions telles que l'hippocampe, l'amygdale, l'hypothalamus et la strie terminale (Pawlak *et al.,* 2003 ; Matys *et al.,* 2004, 2005 ; Louessard *et al.,* 2016 ; Stevenson and Lawrence, 2018). Le tPA semble, en effet, participer à la peur conditionnée (Calabresi *et al.,* 2000). Les souris déficientes en tPA présentent également un phénotype moins anxieux en réponse à un stress par rapport à leurs homologues sauvages (Pawlak *et al.,* 2003 ; Matys *et al.,* 2004). Ces données sont confortées par le phénotype anxieux retrouvé chez les souris déficientes en neuroserpine (Madani *et al.,* 2003).

3.4.3 Fonctions cérébrales en conditions pathologiques

3.4.3.1 Altération de la substance blanche

Plusieurs études rapportent un rôle bénéfique du tPA dans les lésions de la substance blanche par différents mécanismes. En effet, l'injection de tPA dans le corps calleux suite à une ischémie cérébrale diminue les lésions de la substance blanche. Néanmoins, cet effet disparaît avec une injection de tPA muté sur son domaine d'interaction avec le récepteur à l'EGF (domaine EGF-like) (Correa *et al.,* 2011), suggérant un mécanisme protecteur du tPA dépendant de son interaction avec le récepteur à l'EGF.

Dans un modèle de démyélinisation par injection de lysolécithine dans le corps calleux, les souris déficientes en tPA présentent un retard de remyélinisation (Leonetti *et al.,* 2017). La dégénérescence axonale est généralement la conséquence d'une augmentation de l'inflammation provoquée par une altération de la BHE. Dans ces conditions, des dépôts de fibrine viennent se former autour des axones, accentuant la dégénérescence axonale. Dans des modèles de sclérose en plaques ou de lésion du nerf sciatique, le tPA peut réduire les dommages axonaux en dégradant la fibrine *via* la conversion du plasminogène en plasmine (Akassoglou *et al.,* 2000 ; Gverić *et al.,* 2003). Cette conversion améliore également la régénération axonale en dégradant les CSGPs qui s'accumulent dans la cicatrice gliale suite à un traumatisme médullaire (Bukhari et al., 2011). Quelques années plus tard, Lemarchant et collaborateurs montrent des résultats similaires en proposant un mécanisme dépendant de l'activation d'ADAMTS-4 (Lemarchant *et al.,* 2014). Comme la plasmine, ADAMTS-4 dégrade les CSPGs néfastes pour la régénération axonale dans un modèle de traumatisme médullaire. Ainsi, le tPA peut être bénéfique dans cette pathologie par deux mécanismes d'action.

3.4.3.2 Les AVC hémorragiques

Une des formes les plus sévères des AVC sont les hémorragies intracérébrales spontanées. La présence d'un hématome étant néfaste pour le cerveau, plusieurs études se sont tournées vers une thérapie fibrinolytique par injection de tPA recombinant (Altéplase) au niveau de l'hématome, avant de le drainer. Dans un modèle d'hémorragie intracérébrale chez le cochon par injection de sang hétérologue, Rohde et collaborateurs démontrent que le tPA est tout d'abord efficace pour réduire l'hématome avant de favoriser la formation d'œdèmes (Rohde *et al.,* 2002). Des effets similaires sont obtenus dans un modèle d'hémorragie intraventriculaire chez le rat (Gaberel *et al.,* 2014).

Récemment, une étude clinique de phase 3 (MISTIE III) visant à étudier cette procédure fibrinolytique couplée au drainage, s'est révélée infructueuse en n'améliorant pas la récupération fonctionnelle des patients atteints par une hémorragie intracérébrale (Hanley *et al.,* 2019).

Néanmoins, quelques études se sont tournées vers les propriétés pro-excitotoxiques du tPA liées à son interaction avec les récepteurs NMDA. L'utilisation d'un anticorps bloquant cette interaction améliore la récupération fonctionnelle dans un modèle d'hémorragie par injection de collagénase chez le rat (Gaberel *et al.,* 2013). De plus, dans un modèle similaire à celui de Rohde et collaborateurs, l'injection d'un tPA muté sur son site d'interaction avec le NMDA limite la mort excitotoxique des neurones en comparaison avec l'Altéplase (Goulay *et al.,* 2018).

Une des causes de l'AVC hémorragique est la rupture spontanée d'un anévrisme intracrânien (AI) qui se caractérise par une hémorragie sous-arachnoïdienne. Au laboratoire, une étude a mis en évidence une expression accrue de tPA au sein de la paroi anévrismale humaine, accompagnée par la présence de plasminogène/plasmine. Dans un modèle expérimental d'AI, l'absence de tPA entraîne une augmentation de la survie des animaux en lien avec une diminution du nombre de souris formant au moins un AI. Des résultats totalement opposés sont observés chez des souris déficientes en PAI-1, suggérant un rôle du tPA dépendant de son activité enzymatique (Labeyrie *et al.,* 2017).

3.4.3.3 Les AVC ischémiques

Comme nous l'avons précédemment mentionné, le tPA est le seul traitement pharmacologique utilisé à ce jour pour lutter contre les AVC ischémiques. Wang et collaborateurs ont montré que les souris déficientes en tPA présentaient une réduction d'environ 50% des volumes de lésion suite à une occlusion transitoire de l'ACM (insertion d'un filament) (Wang *et al.,* 1998). Cela sera confirmé plus tard dans un modèle mimant la formation d'un caillot de fibrine à l'aide d'une injection de thrombine dans l'artère cérébrale moyenne (ACM) (Macrez *et al.,* 2011). Cependant, la thrombolyse peut présenter des effets délétères. En effet, l'injection tardive de tPA dans la circulation aggravent les lésions aussi bien chez des souris sauvages et déficientes en tPA (Wang *et al.,* 1998) **(Figure 26)**.

Ces risques délétères de la thrombolyse passent par la perméabilisation de la BHE mais aussi par son effet pro-excitotoxique (Yepes *et al.,* 2003 ; Macrez *et al.,* 2011). Ces effets délétères se traduisent par la survenue de crises d'épilepsie chez des patients thrombolysés (Alvarez *et al.,* 2013). En 2016,

l'étude OPHELIE (*Outcome of Patients Treated by IV Rt-PA for Cerebral Ischaemia According to the Ratio Sc-tPA/Tc-tPA*) démontra que les patients thrombolysés, à base d'une préparation d'Altéplase contenant plus de sc-tPA, ont un plus grand risque de développer des crises épileptiques ; tandis que les patients traités par une préparation contenant plus de tc-tPA présentent un risque accru d'hémorragie cérébrale (Leys *et al.,* 2016).

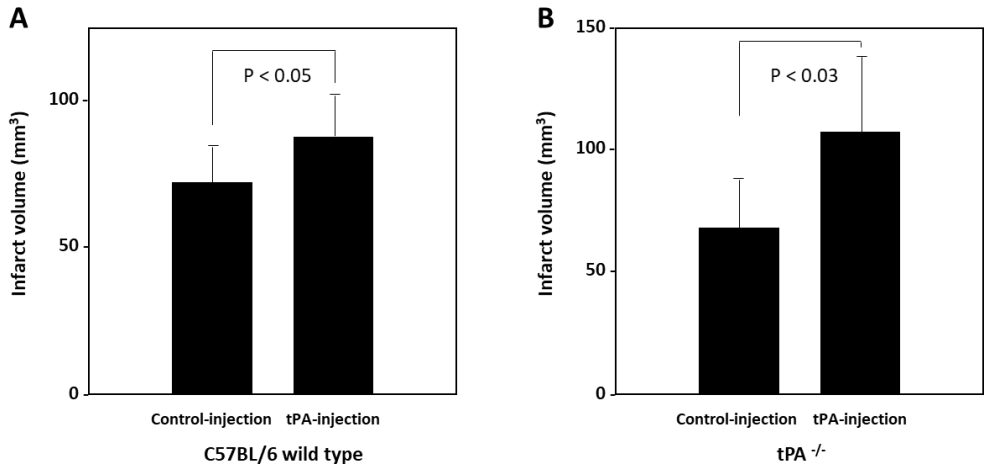


Figure 26 : L'injection tardive de tPA accroît la taille de l'infarctus.
Injection réalisée 2 heures après l'occlusion transitoire de l'ACM à l'aide d'un filament, chez des souris sauvages (A) et déficientes en tPA (B). Adapté de (Wang *et al.,* 1998).

Les risques de la thrombolyse expliquent en partie la faible durée de sa fenêtre thérapeutique, limitée à 4h30 après le début des symptômes. Ainsi, seuls 5% des patients bénéficient d'un traitement thrombolytique. Pour pallier à ce problème, de nouvelles stratégies ont été mises en place dont le développement de la ténecteplase, un tPA recombinant plus spécifique de la fibrine et qui possède une demi-vie supérieure ; ou la mise en place de la thrombectomie qui consiste à retirer mécaniquement le caillot sanguin. Cette dernière s'avère particulièrement bénéfique dans les gros vaisseaux (Alberts *et al.,* 2015). Une étude clinique s'est intéressée aux effets de la ténecteplase par rapport à l'Altéplase avant thrombectomie. La ténecteplase permet dans un premier temps de thrombolyser un plus grand nombre de patients comparée à Altéplase (22% *vs* 10%). Ce mutant permet également une meilleure récupération fonctionnelle des patients (Campbell *et al.,* 2018).

Pour résumer :

- Dans le SNC, le tPA est synthétisé par de nombreux types cellulaires.
- Son expression dans la circulation sanguine semble être assurée par le foie.
- Le tPA permet la **conversion du plasminogène en plasmine**, **l'activation de la protéase ADAMTS-4** et le clivage de la sous-unité GluN1 des récepteurs NMDA.
- Ces fonctions sont majoritairement dépendantes de son interaction avec le plasminogène, les récepteurs LRP et NMDA ainsi que ses inhibiteurs endogènes.
- En condition physiopathologique, le tPA est aussi bien **bénéfique** que **délétère.**
- **Le tPA peut dégrader les CSPGs *via* la plasmine.**

Le tPA est le seul traitement pharmacologique utilisé à ce jour dans la prise en charge des AVC ischémiques. Cependant, son utilisation est limitée en raison d'effets délétères non négligeables (excitotoxicité et ouverture de la BHE). Afin d'améliorer la qualité de vie des personnes non traitées et souffrant de séquelles graves, plusieurs études s'intéressent aux mécanismes régulant la récupération fonctionnelle post-ischémique. Dans cette dernière partie, nous donnerons une description plus détaillée des AVC ischémiques et feront le lien avec les réseaux périneuronaux.

4. Les accidents vasculaires cérébraux

4.1 Généralités

En 2016, 13,7 millions de personnes dans le monde ont souffert d'un accident vasculaire cérébral (AVC), dont 5,5 millions en sont morts. En France, on recense un peu plus de 130 000 nouveaux cas par an, pour 40 000 décès (Johnson *et al.,* 2019). A la suite d'un AVC, 40% des patients gardent des séquelles neurologiques importantes qui se caractérisent généralement par des déficits moteurs, des troubles du langage ou des troubles sensoriels. Enfin, 30% des patients tombent en dépression dans l'année suivant un AVC. Ainsi, l'AVC est considéré comme la première cause de handicap acquis chez l'adulte, la deuxième cause de mortalité et la deuxième cause de démence dans le monde (selon les données par l'Inserm).

On distingue deux formes d'AVC : les AVC hémorragiques et les AVC ischémiques. Les AVC hémorragiques représentent environ 20% des cas et se caractérisent par une extravasation du sang dans la boîte crânienne. Les AVC ischémiques sont plus fréquents, avec environ 80% des cas et résultent de l'obstruction d'une artère cérébrale par un caillot sanguin.

4.2 Les différentes formes d'AVC hémorragiques

Bien que moins fréquents, les AVC hémorragiques sont à l'origine de 50% des décès causés par un AVC en 2016 (2,8 millions), ce qui font d'elles les formes les plus létales parmi les AVC (Johnson *et al.,* 2019). Il existe deux grands types d'AVC hémorragiques :

- **Les hémorragies intra-parenchymateuses** (environ 75% des cas). Elles s'accompagnent généralement d'un déversement de sang dans les ventricules cérébraux. Ces hémorragies proviennent souvent de la fragilisation de petites artères causées principalement par de l'hypertension artérielle chronique ou une angiopathie amyloïde (Morotti and Goldstein, 2016). La thrombolyse peut également être à l'origine d'hémorragies intra-parenchymateuses **(cf 3.4.1.2 Ouverture de la BHE)**.
- **Les hémorragies méningées ou sous-arachnoïdiennes** (environ 25% des cas). Les causes les plus fréquentes sont la rupture spontanée d'un anévrisme intracrânien à la surface du cerveau, ainsi que les traumatismes crâniens (Caceres and Goldstein, 2012).

4.3 Les différentes formes d'AVC ischémiques

La classification de TOAST (*Trial of ORG 10172 in Acute Stroke Treatment subtype classification*) permet de distinguer cinq formes d'AVC ischémiques (Adams *et al.,* 1993) :

- **Les ischémies d'origine athéromateuse** (30% des cas). La formation progressive des plaques d'athérosclérose peut conduire à l'obstruction complète des artères. De plus, les plaques instables peuvent se détacher et former des thrombus.
- **Les ischémies d'origine cardio-embolique** (25% des cas). Elles touchent principalement les grosses artères (souvent la carotide ou l'ACM) causant ainsi d'importantes lésions cérébrales.
- **Les occlusions des petites artères (ou infarctus lacunaires)** (20% des cas). Ces dernières forment des lésions de petites tailles (≤ 1,5 cm de diamètre) et sont souvent localisées au niveau des artères pénétrantes qui irriguent les structures profondes du cerveau (Jackson and Sudlow, 2005).
- **Les « autres étiologies ».** Cette catégorie regroupe les causes rares telles que les dissections artérielles (déchirure de la paroi artérielle dans laquelle le sang s'engouffre), les thrombophilies (prédisposition aux thromboses, héréditaire ou acquise) ou l'hyperhomocystéinémie.
- **Les ischémies d'origine inconnue (ou cryptogéniques).**

Il existe également les accidents ischémiques transitoires (AIT), qui partagent les mêmes causes et les mêmes symptômes que les AVC ischémiques, mais sans lésion apparente en imagerie conventionnelle (Easton *et al.,* 2009). Suite à un AIT, 5% des patients développent un AVC ischémique dans les premières 48h et 10% sur les premiers 90 jours (Duca and Jagoda, 2016). Cette forme représente donc un facteur de risque pour les patients.

4.4 Les facteurs de risques de l'AVC

4.4.1 Les facteurs de risques non modifiables

- **Le vieillissement** est le principal facteur de risque dans les AVC, avec une moyenne d'âge à 62 ans dans le monde (O'Donnell *et al.,* 2016). L'incidence des AVC ischémiques est doublée pour chaque décennie après 55 ans ; tandis qu'elle augmente après 45 ans dans le cas des AVC hémorragiques. Cependant, les récentes méta-analyses montrent toutes une augmentation

significative des AVC chez des personnes jeunes ces dernières années (Boehme *et al.,* 2017 ; Feigin *et al.,* 2017).

- **Le sexe** est également un facteur de risque. Les femmes d'un jeune âge ont plus de risques de développer un AVC que leur équivalent masculin. Ce risque est majoritairement lié à la grossesse, à la dépression post-partum, ainsi qu'aux pilules contraceptives (Boehme *et al.,* 2017). Néanmoins, les hommes semblent présenter le plus de risque au cours du vieillissement, puisque ces derniers représentaient 59,6% des AVC en 2016, tous âges confondus (O'Donnell *et al.,* 2016).
- **L'ethnicité**, avec un risque accru d'AVC pour les populations asiatiques. Aux Etats-Unis, les populations afro-américaines et hispaniques sont les plus à risques et présentent le plus de mortalité associée. Cependant, pour ces derniers, l'une des raisons est probablement le manque d'accès aux soins (Morotti and Goldstein, 2016 ; O'Donnell *et al.,* 2016).
- **La génétique** affecte également la formation des AVC. Les risques génétiques varient en fonction de l'âge, du sexe, de l'ethnicité. Plusieurs gènes à risque ont été identifiés et sont pour la plupart associés avec d'autres pathologies vasculaires (exemple : le gène PITX2 également impliqué dans les fibrillations atriales) (Boehme *et al.,* 2017).

4.4.2 Les facteurs de risques modifiables

Une méta-analyse réalisée entre 2007 et 2015, a comparé différents facteurs de risque modifiables dans les AVC ischémiques et hémorragiques sur 26919 personnes provenant de 32 pays différents (O'Donnell *et al.,* 2016) :

Tableau 4 : % de risques attribuables pour les AVC.

Facteurs de risques modifiables	% de RA* pour les AVC ischémiques	% de RA* pour les AVC hémorragiques
L'hypertension	45,7%	56,4%
Le tabac	15,1%	3,6%
Indice de masse corporel	20,4%	13,1%
L'alimentation	22,4%	24,5%
L'activité physique régulière	33,4%	34,6%
La consommation d'alcool	4,6%	9,8%
Cholestérol (Apolipoprotéines B/A1)	34%	1,2%
Diabètes	7,5%	-7%
Maladies cardiaques	11,4%	1,4%
Facteurs psychologiques	15,1%	24,7%
TOUS les facteurs modifiables	**91.5%**	**87,1%**

RA* : risque attribuable correspond à la proportion des cas qui seraient évités si le facteur de risque était absent

Cette étude permet de constater que 90% des AVC résultent de 10 facteurs de risques. Parmi eux, l'hypertension est de loin le facteur de risque principal pour les deux formes des AVC. D'autres méta-analyses proposent également des facteurs modifiables environnementaux (pollution de l'air et exposition au plomb). Ces derniers sont particulièrement dangereux dans les pays peu développés (Feigin *et al.,* 2016). Ainsi, bien que certains facteurs de risques modifiables possèdent une composante génétique, ces études permettent de conclure qu'une bonne hygiène de vie permet de grandement diminuer les risques de développer un AVC.

4.5 Physiopathologie de l'AVC ischémique

D'origine locale (thrombose) ou périphérique (embolie), la présence d'un caillot sanguin entraîne une obstruction partielle voire complète d'une artère. Si la fibrinolyse s'avère insuffisante pour permettre la dissolution de ce caillot, dans les cas les plus graves, une ischémie cérébrale s'installe. Cette dernière se caractérise par une chute importante du débit sanguin cérébral (DSC) conduisant à des dommages cérébraux par différents mécanismes cellulaires (Khoshnam *et al.,* 2017 ; Chen *et al.,* 2019).

4.5.1 Lésion ischémique et débit sanguin cérébral

Dans les premières minutes qui suivent l'occlusion d'une artère, une lésion hétérogène se forme dans le parenchyme en fonction du DSC (estimé chez un adulte sain à 50-55 mL/min/100g de tissu). Cette lésion peut être divisée en trois régions (Kaufmann *et al.,* 1999) **(Figure 27)** :

- **Le foyer ischémique** est la zone la plus impactée. Elle est située en aval de l'occlusion et enregistre une importante chute de DSC (<10 mL/min/100g) qui entraîne une mort cellulaire rapide et irréversible.
- **La pénombre ischémique** entoure le foyer. La réduction du DSC est progressive et moins importante (entre 10 et 20 mL/min/100g) et dépend notamment de la capacité des artères collatérales à compenser la perte de DSC. La pénombre est caractérisée par des cellules en souffrance dont la survie dépend de la reperfusion. Ainsi, plus la thrombolyse sera réalisée rapidement et plus grandes seront les chances de sauver la pénombre. Une fois que la lésion gagne toute la pénombre, la thrombolyse devient néfaste.
- **La zone d'oligémie** subit une faible diminution du DSC (entre 20 à 40 ml/min/100g), insuffisante pour entraîner des dommages.

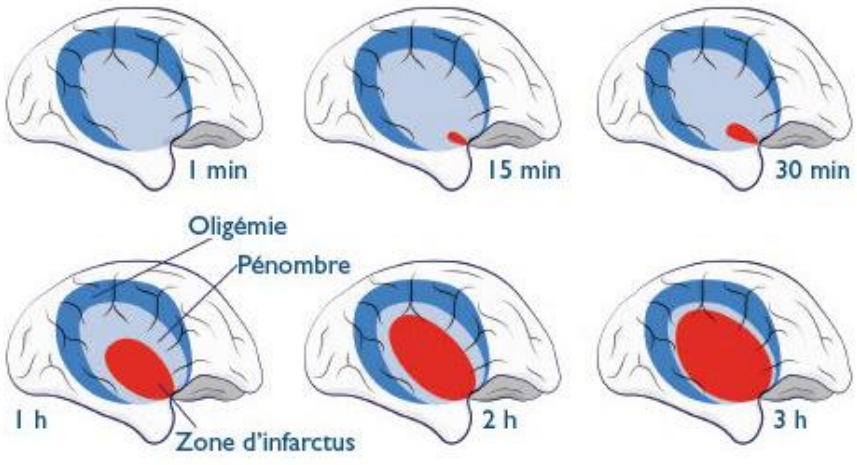


Figure 27 : Évolution de la lésion ischémique dans les premières heures.
Trois régions se distinguent en fonction du DSC : le foyer ischémique (en rouge), la pénombre (en bleu ciel) et l'oligémie (en bleu foncé). Si la reperfusion du tissu est réalisée rapidement, il est possible de sauver une partie de la pénombre, dans le cas contraire celle-ci devient l'expansion du foyer comme on peut le voir avec les temps 1h, 2h et 3h (Von Düring *et al.,* 2015).

4.5.2 Les mécanismes cellulaires

Immédiatement après une ischémie cérébrale, les neurones sont incapables de maintenir leur gradient ionique transmembranaire et leur homéostasie. Cela a pour conséquence de déclencher plusieurs processus menant à la mort cellulaire : excitotoxicité, apoptose et inflammation. Ces mécanismes sont liés entre eux, et se déclenchent mutuellement pour exacerber la mort des neurones et des cellules gliales (Dirnagl *et al.,* 1999 ; Khoshnam *et al.,* 2017) **(Figure 28)**.

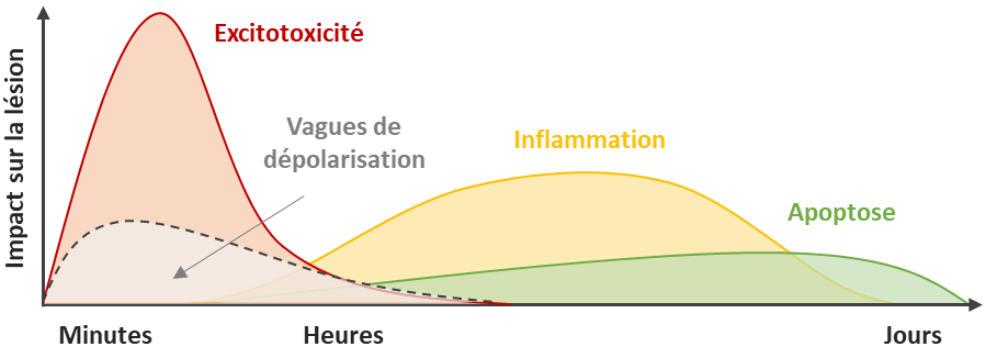


Figure 28 : Cascade des évènements cellulaires délétères prenant place suite à une occlusion artérielle. En seulement quelques minutes, les neurones du foyer ischémique meurent par nécrose provoquée par un mécanisme excitotoxique. Cette excitotoxicité se propage autour du foyer, facilitant l'apoptose des neurones de la pénombre. Enfin, des phénomènes inflammatoires prennent place en parallèle. Tous ces processus sont étroitement liés et étendent la lésion ischémique. Adapté de (Dirnagl *et al.,* 1999).

4.5.2.1 Excitotoxicité post-ischémique et vagues de dépolarisation

Comme nous l'avons mentionné auparavant, la mort excitotoxique est causée par une libération massive de glutamate dans la fente synaptique qui entraîne une entrée importante et mortelle de Ca^{2+} dans le neurone post-synaptique (Arundine and Tymianski, 2003) **(cf 3.4.2.1 La transmission glutamatergique)**.

Suite à l'obstruction des artères, l'absence d'oxygène et de glucose cause une perturbation de la chaîne mitochondriale et un arrêt de la synthèse d'ATP (adénosine triphosphate). En seulement 2 minutes, les réserves cellulaires d'ATP sont consommées et les pompes sodium-potassium (Na^+ /K^+) ATPases cessent alors de fonctionner. Ce dysfonctionnement empêche le potentiel de repos d'être rétabli et conduit à une dépolarisation excessive du neurone. Le manque énergétique prévient

également les pompes Ca^{2+} ATPase de maintenir une faible concentration de Ca^{2+} dans la cellule. En résulte une augmentation intracellulaire de Ca^{2+} qui contribue au dysfonctionnement mitochondriale, à l'activation de plusieurs systèmes enzymatiques (lipases, protéases et endonucléases) et la libération de radicaux libres (tels que le NO) (Dirnagl *et al.,* 1999). La dépolarisation excessive conduit à une libération importante de glutamate au niveau de la fente synaptique, propageant ainsi la dépolarisation et amplifiant l'influx calcique intracellulaire. Enfin, l'amplification de l'influx sodique par les récepteurs glutamatergiques entraînerait un œdème cytotoxique, causé par une importante entrée d'eau dans la cellule (Ayata and Ropper, 2002). La cellule finit par gonfler et éclater. Ainsi, tous ces phénomènes excitotoxiques induisent une mort cellulaire par nécrose (Doyle *et al.,* 2008 ; Khoshnam *et al.,* 2017) **(Figure 29)**.

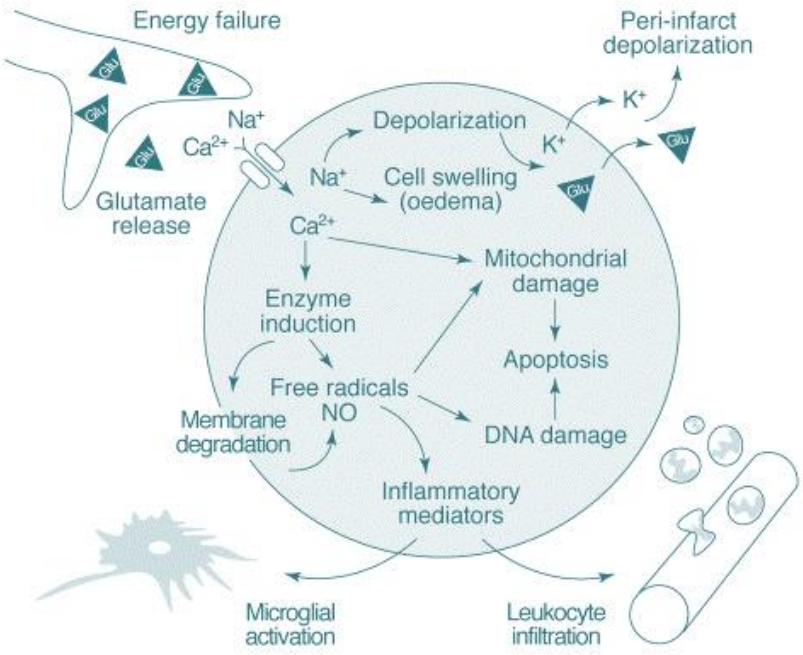


Figure 29 : Mécanismes simplifiés prenant place suite à une ischémie cérébrale.
La défaillance énergétique conduit à la dépolarisation des neurones. Le glutamate libéré provoque une entrée massive de Ca^{2+} et de Na^{+} au sein du neurone post-synaptique, tandis que le K^{+} est expulsé. L'entrée massive de Ca^{2+} engendre un dysfonctionnement mitochondrial et active plusieurs systèmes enzymatiques (protéases, lipases, endonucléases...). Des radicaux libres sont générés contribuant aux dommages mitochondriaux, à la dégradation de la membrane et à l'inflammation. La diffusion du glutamate et du K^{+} dans l'espace extracellulaire propage la dépolarisation neuronale jusqu'à la pénombre. L'entrée massive de Na^{+} finit par provoquer un œdème et l'éclatement de la cellule (Dirnagl *et al.,* 1999).

Les neurones localisés au niveau de la pénombre reçoivent des vagues de dépolarisation en provenance du foyer ischémique (dépolarisation péri-lésionnelle). Ces vagues accélèrent la diminution des réverses énergétiques, déjà amoindries par la chute du DSC et favorisent leur mort de type apoptotique (Won *et al.,* 2002) **(Figure 29)**.

4.5.2.2 L'apoptose post-ischémique

L'ischémie cérébrale induit également la mort cellulaire par apoptose. Ce type de mort se met en place plus tardivement notamment dans la pénombre ischémique, lieu où l'énergie est encore suffisante pour permettre d'induire la mort programmée. Deux voies apoptotiques sont retrouvées après une ischémie : la voie intrinsèque et la voie extrinsèque (Love, 2003 ; Broughton *et al.,* 2009).

Dans la voie intrinsèque, l'augmentation de calcium intracellulaire induit la libération de cytochrome c ou de AIF (*apoptosis-inducing factor*) par la mitochondrie (Culmsee *et al.,* 2005). Le cytochrome c, en présence d'ATP, peut se lier avec le facteur d'activation de la peptidase apoptotique 1 et la procaspase-9 pour former un complexe permettant l'activation de la caspase-9, qui à son tour permet l'activation de la caspase-3. La caspase-3 active va cliver les enzymes de réparations à l'ADN, induisant sa fragmentation (Namura *et al.,* 1998). Le facteur AIF, quant à lui, est transféré dans le noyau où il promeut la fragmentation de l'ADN à grande échelle, mais indépendamment des caspases (Culmsee *et al.,* 2005). Enfin, les dommages de l'ADN induisent la phosphorylation et l'activation de p53, un facteur de transcription qui facilite l'apoptose (Endo *et al.,* 2006).

Dans la voie extrinsèque, la libération du ligand de Fas (*Fibroblast Associated*) permet son interaction avec son récepteur Fas-R, ce qui induit le recrutement de la protéine FADD (*Fas-Associated protein with Death Domain*) puis celle de la procaspase-8. Ce complexe FasL–Fas–FADD–procaspase-8 permet l'activation de la caspase-8. Cette dernière pourrait directement agir sur la mitochondrie pour libérer du cytochrome c ou activer directement la caspase 3 (Scaffidi *et al.,* 1998). Dans les deux cas, les mécanismes rejoignent ceux décrits dans la voie intrinsèque.

4.5.2.3 L'inflammation post-ischémique

L'inflammation est un mécanisme majeur prenant place quelques heures après le début de l'occlusion et qui perdure dans le temps. La microglie est le premier médiateur de l'inflammation, et pourrait être activée en réponse aux neurones en souffrance. En effet, ces derniers auraient la capacité de produire du TNF, une cytokine participant à la modification du phénotype de la microglie en phénotype pro-inflammatoire (Janelsins *et al.,* 2008). Ce profil pro-inflammatoire permet à la microglie de libérer à son tour des cytokines (IL-1, IL-6 et TNF) et des radicaux libres. Ces cytokines exacerbent l'activation des cellules endothéliales, au travers de l'augmentation de l'expression des molécules d'adhésion, la rétractation des jonctions serrées et la synthèse de chemokines. Ainsi, ces processus facilitent l'infiltration des leucocytes dans le parenchyme cérébral (Simats *et al.,* 2016 ; Drieu *et al.,* 2018) **(Figure 30)**.

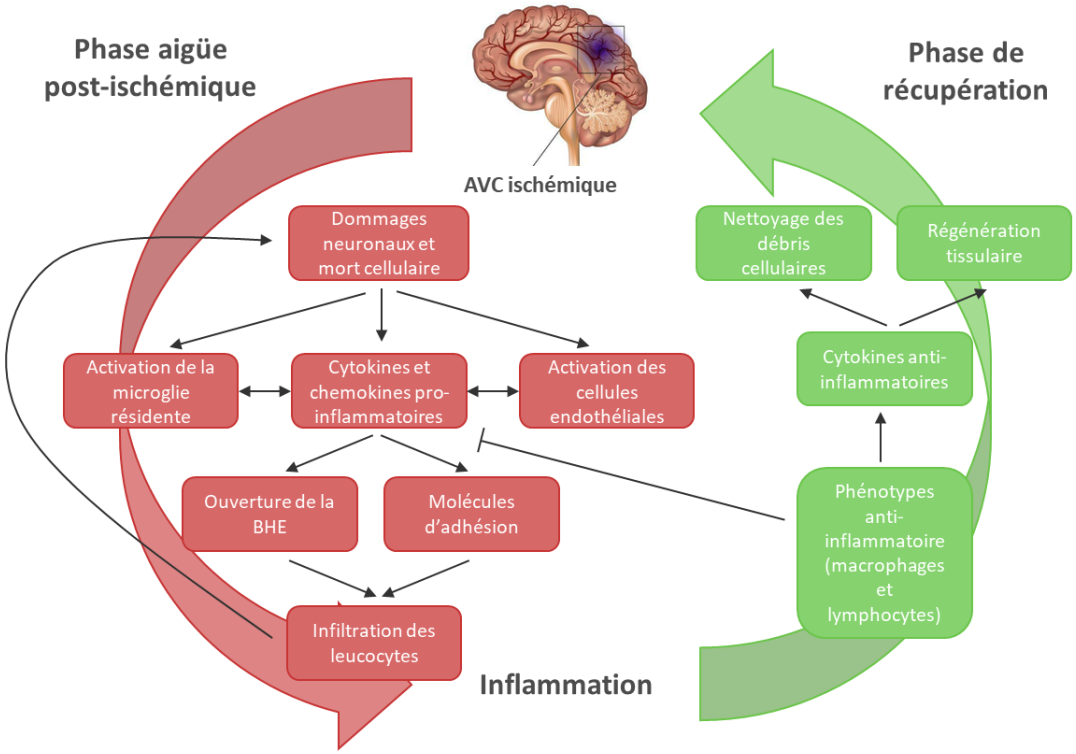


Figure 30 : Mécanismes inflammatoires potentiels mis en place à la suite d'une ischémie cérébrale. Dans les premières heures, les cellules inflammatoires contribuent aux dommages cérébraux, mais finissent par être bénéfiques sur le long terme en favorisant la récupération tissulaire. Adapté de (Simats *et al.,* 2016).

Les premiers leucocytes à envahir le parenchyme sont les macrophages. Leur présence induit une amplification de la réaction inflammatoire. Par la suite, les macrophages sont rejoints par les neutrophiles puis les lymphocytes (Drieu *et al.,* 2019). En plus d'exacerber les dommages cellulaires, les cytokines et les radicaux libres produits par les cellules inflammatoires permettent l'expression des MMP-3 et MMP-9, qui induisent l'ouverture de la BHE par la dégradation de la laminine. Cette ouverture induit une entrée d'eau dans le parenchyme, créant un œdème vasogénique. Cet œdème favorise les risques hémorragiques et contribue à son tour aux lésions neuronales (Gidday *et al.,* 2005 ; Yang and Rosenberg, 2016).

Finalement sur le long terme, l'inflammation est considérée comme bénéfique pour permettre l'élimination des déchets et la régénération tissulaire *via* la neurogenèse, l'angiogenèse ou encore l'oligodendrogenèse. Ces effets bénéfiques passent notamment par la mise en place d'une cicatrice gliale permettant de limiter la lésion (Rolls *et al.,* 2009) **(Figure 30)**.

4.6 Les réseaux périneuronaux post-ischémiques

Comme nous l'avons déjà détaillé, la dégradation des réseaux périneuronaux dans plusieurs pathologies s'avère bénéfique en promouvant la plasticité **(cf 1.5 Fonctions associées aux réseaux périneuronaux)**. Les PNNs constituent donc une piste intéressante pour améliorer la plasticité après un AVC ischémique.

Dans un modèle ischémique par injection corticale d'endothéline-1 (un agent vasoconstricteur) chez le rat, les injections de chABC en périphérie de l'infarctus soit directement après l'occlusion (+ un rappel une semaine après), soit deux semaines après l'occlusion (+ un rappel une semaine après) induisent une récupération fonctionnelle (Gherardini *et al.,* 2015). Dans un modèle similaire chez des rats âgés de 16 mois, l'injection de chABC dans la moelle épinière 3 jours après l'occlusion, permet également d'améliorer la récupération fonctionnelle *via* une augmentation de la pousse neuritique des fibres corticospinales (Soleman *et al.,* 2012). Bien entendu, ces injections de chABC affectent aussi bien les CSPGs contenus dans les PNNs que ceux de la matrice interstitielle, mais permettent néanmoins de confirmer le rôle inhibiteur de ces CSPGs sur la plasticité post-ischémique.

Karetko et collaborateurs ont été les premiers à observer une perte des PNNs en périphérie de l'infarctus dans un modèle ischémique permanent par photothrombose de l'ACM. La quantité des PNNs WFA^+ diminue progressivement entre 4h et 24h après la lésion avant d'augmenter entre 7 et

30 jours (dernier temps de l'étude), sans pour autant atteindre un niveau comparable au côté controlatéral. Néanmoins, les PNNs Aggrecan$^+$ diminuent entre 24h et 7 jours, avant de retrouver un niveau comparable au côté controlatéral 30 jours après l'occlusion (Karetko-Sysa *et al.,* 2011). Par la suite, cette déplétion des PNNs a été retrouvée dans plusieurs modèles expérimentaux d'AVC ischémique réalisés chez différentes espèces (souris, rat et mouton) (Hobohm *et al.,* 2005 ; Härtig *et al.,* 2017 ; Dzyubenko *et al.,* 2018). Récemment, Dzyubenko et collaborateurs démontrent qu'une hypoperfusion modérée induit un réarrangement structurel des PNNs qui persiste 10 jours après la chirurgie (Dzyubenko *et al.,* 2018). Finalement, l'exposition des animaux à un environnement enrichi pendant 5 jours dans un modèle ischémique par photothrombose dans le cortex moteur, ne modifie pas la taille de l'infarctus mais réduit le nombre de PNNs en périphérie de la lésion et améliore la récupération fonctionnelle **(Figure 31)**. Ces effets s'accompagnent d'une augmentation de l'expression de MMP-9 et du tPA dans le cortex somatosensoriel (Quattromani *et al.,* 2017).

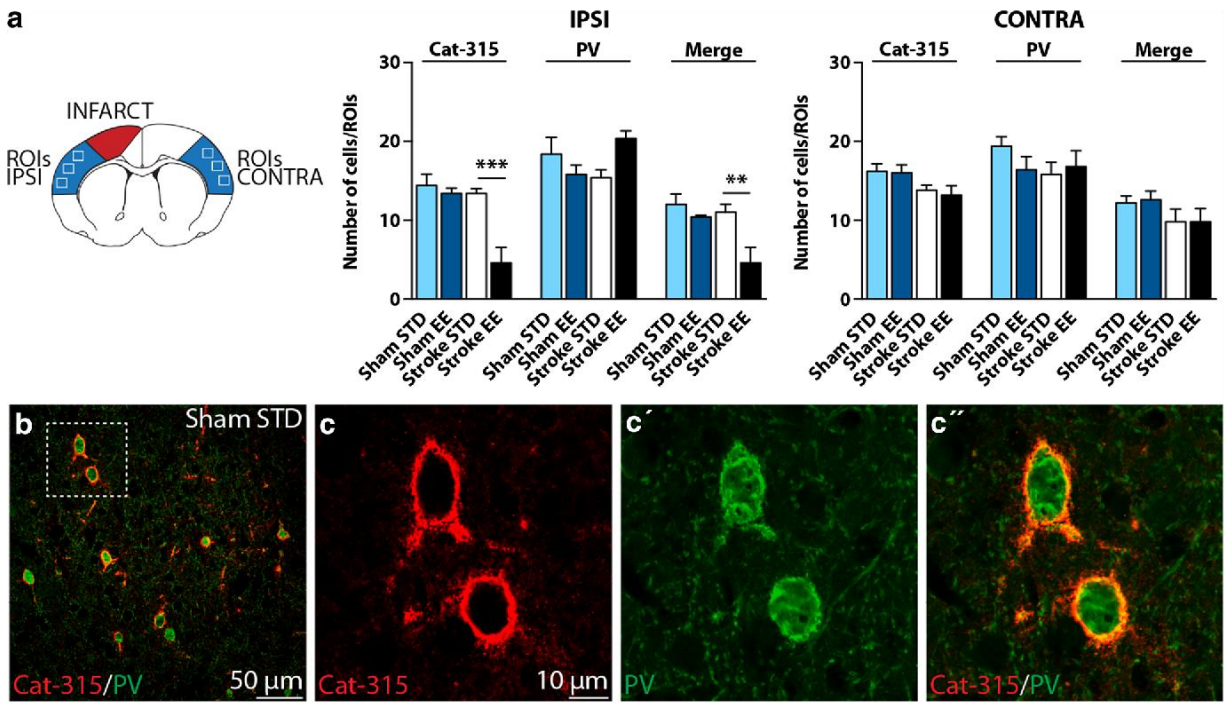


Figure 31 : L'environnement enrichi réduit le nombre de PNNs en périphérie de la lésion ischémique.
A) Quantification du nombre de PNNs en périphérie de la lésion (7 jours post-ischémie) entre des animaux contrôles et des animaux exposés ou non à un environnement enrichi durant 5 jours après une ischémie cérébrale par photothrombose (B et C). Quantification réalisée par immunohistochimie avec des anticorps dirigés contre l'aggrecan (en rouge) et contre les interneurones PV (en vert) (Quattromani *et al.,* 2017).

Pour résumer :

- Les AVC représentent la 2ème cause de mortalité dans le monde et la **1ère cause de handicap acquis chez l'adulte.**
- **80% des AVC sont d'origine ischémique** contre 20% d'origine hémorragique.
- Dans l'AVC ischémique, l'excitotoxicité, l'apoptose et l'inflammation sont les principaux mécanismes responsables de la mort cellulaire.
- **La dégradation des PNNs en périphérie de la lésion, améliore la récupération fonctionnelle suite à une AVC ischémique.**

Les PNNs constituent une véritable cible thérapeutique afin de restaurer la plasticité après une ischémie cérébrale. Ainsi, il s'avère donc primordial de mieux comprendre les mécanismes enzymatiques qui régulent leur dégradation.

Objectifs

Les PNNs sont des structures uniques enrichies en CSPGs, qui se condensent autour du soma, des dendrites et du segment axonal de certains neurones. Ils sont très largement distribués dans de nombreuses régions cérébrales, dans lesquelles ils enveloppent majoritairement les interneurones FS-PV. Leur mise en place durant le développement consolide les synapses nouvellement formées, mais inhibe en retour la plasticité cérébrale. Néanmoins, leur dégradation enzymatique par une protéase d'origine bactérienne, la chondroïtinase ABC, restaure la plasticité cérébrale et ouvre d'intéressantes perspectives thérapeutiques pour améliorer la récupération fonctionnelle dans plusieurs pathologies. Il est donc primordial d'accroître notre compréhension des mécanismes enzymatiques modulant les PNNs.

Mes travaux de thèse s'inscrivent dans cette problématique, en s'intéressant particulièrement à deux protéases endogènes susceptibles de réguler la structure des PNNs, en condition physiologique ou durant la phase tardive des AVC ischémiques.

<u>Étude 1</u> : Implication d'ADAMTS-4 dans l'évolution de l'infarctus cérébral : un lien dans la dégradation enzymatique des PNNs ?

Cette première étude se base sur quatre éléments :

- ADAMTS-4 clive tous les CSPGs retrouvés dans les PNNs (Howell and Gottschall, 2012).
- L'expression d'ADAMTS-4 est accrue après un AVC ischémique (Cross *et al.,* 2006a ; Lemarchant *et al.,* 2016a).
- La déplétion des PNNs en périphérie de l'infarctus, après exposition des animaux à un environnement enrichi, améliore la récupération fonctionnelle après une ischémie cérébrale (Quattromani *et al.,* 2017).
- L'injection intraveineuse d'ADAMTS-4 est bénéfique en réduisant l'inflammation autour de l'infarctus (Lemarchant *et al.,* 2016a).

Cette première étude visait à répondre à trois questions :

- Peut-on moduler la plasticité cérébrale mise en place par la dégradation des PNNs en mimant la rééducation physique des patients atteints par une ischémie ?
- Quel est le rôle d'ADAMTS-4 endogène lors des AVC ischémiques ?
- Est-ce qu'ADAMTS-4 influence la dégradation des PNNs dans l'ischémie ?

<u>Étude 2</u> : Le tPA originaire des interneurones à parvalbumine contrôle le remodelage des réseaux périneuronaux.

Cette seconde étude se base sur trois éléments :

- Le tPA semble être exprimé par les interneurones FS-PV (Chu *et al.,* 2015).
- Le tPA intervient durant les périodes critiques du cortex visuel (Mataga *et al.,* 2002).
- Le substrat principal du tPA, la plasmine, peut cliver certains CSPGs (Wu *et al.,* 2000 ; Kenagy *et al.,* 2002).

Cette seconde étude visait à répondre à deux questions :

- Peut-on identifier de nouveaux types cellulaires exprimant le tPA, par l'utilisation d'une nouvelle approche moléculaire ?
- Est-ce que le tPA régule la structure des PNNs en condition physiologique, si oui, par quel mécanisme ?

Résultats

Étude 1 : Implication d'ADAMTS-4 dans l'évolution de l'infarctus cérébral : un lien dans la dégradation enzymatique des PNNs ?

1. Présentation de l'étude

Contexte de l'étude

En 2016, les AVC ont touché 13,7 millions de personnes dans le monde (Johnson *et al.,* 2019). Représentant 80% des cas, l'AVC ischémique résulte d'une obstruction d'une artère cérébrale par un caillot sanguin. À ce jour, les seules approches thérapeutiques utilisées sont la thrombolyse pharmacologique par l'injection de tPA, et/ou mécanique par la thrombectomie. Cependant, un grand nombre de patients ne bénéficie pas de ces procédures, soit à cause de la fenêtre thérapeutique dans le cas d'une administration de tPA (Hacke *et al.,* 2008 ; Lees *et al.,* 2016), soit à cause de l'emplacement du caillot dans le cas de la thrombectomie (El Tawil and Muir, 2017).

Après un AVC, environ 45% des patients souffrent de séquelles neurologiques parfois lourdes et invalidantes, comme des déficits moteurs, des troubles du langage ou des troubles sensoriels. Ainsi, des programmes de rééducation fonctionnelle ont été mis en place afin de stimuler la plasticité cérébrale. Plusieurs études démontrent que l'entraînement physique (course à pieds, marche, …) ou des technologies plus récentes comme les *serious games* et la réalité virtuelle, permettent d'améliorer les performances motrices des patients. Ces améliorations sont d'autant plus efficaces quand les exercices sont répétitifs ou de forte intensité (Langhorne *et al.,* 2009 ; Mang *et al.,* 2013 ; Noveletto *et al.,* 2020). Néanmoins, l'efficacité des programmes de rééducation varie considérablement d'un patient à un autre. Il est donc primordial de mieux comprendre les phénomènes de plasticité mis en place après un AVC ischémique.

Les réseaux périneuronaux (PNNs) sont des structures condensées riches en CSPGs, capables d'inhiber la plasticité cérébrale. De fait, leur dégradation par une enzyme bactérienne restaure la plasticité et promeut la récupération fonctionnelle (Pizzorusso *et al.,* 2002, 2006). Dans un modèle expérimental d'AVC ischémique, l'exposition des animaux à un environnement enrichi réduit le nombre de PNNs en périphérie de la lésion et facilite la récupération fonctionnelle. Ces effets s'accompagnent notamment d'une augmentation d'activité de protéases matricielles (Quattromani *et al.,* 2017). La dégradation des PNNs apparait donc comme une piste prometteuse afin de

promouvoir la récupération fonctionnelle après un AVC ischémique. Il serait donc intéressant d'identifier des protéases endogènes capables de réguler les PNNs. Parmi ces protéases, ADAMTS-4 est en théorie capable de dégrader tous les CSPGs formant la structure des PNNs (Matthews *et al.,* 2000; Tortorella *et al.,* 2000; Sandy *et al.,* 2001; Tauchi *et al.,* 2012). Son expression est également augmentée à la suite d'un AVC ischémique (Cross *et al.,* 2006a; Lemarchant *et al.,* 2016a). ADAMTS-4 pourrait donc faciliter la dégradation des PNNs dans un contexte ischémique.

Objectifs de l'étude

- Dans cette étude, nous avons émis l'hypothèse qu'un entraînement physique faciliterait la dégradation des PNNs ainsi que la récupération fonctionnelle dans un modèle d'AVC thromboembolique chez la souris.
- Cette étude visait également à déterminer si ADAMTS-4 possède un rôle dans l'AVC ischémique et si celui-ci passe par une dégradation enzymatique des PNNs.

Principales méthodes utilisées

Afin de déterminer le rôle d'ADAMTS-4 endogène dans l'ischémie cérébrale, nous avons débuté cette étude en comparant les volumes de lésion des souris Adts4$^{+/+}$ et Adts4$^{-/-}$ dans un modèle d'AVC ischémique permanent par électrocoagulation de l'artère cérébrale moyenne (ACM). Puis, nous avons utilisé un modèle thromboembolique plus proche de la pathologie humaine. Ce modèle permet la formation d'un caillot riche en fibrine grâce à une injection de thrombine au sein de l'ACM. Cette expérience a été couplée à un protocole d'entraînement physique, visant à mimer les programmes de rééducation fonctionnelle des patients. Cet entraînement physique consistait à faire courir les souris 6 fois par semaine, pendant 3 semaines sur un tapis roulant. Durant toute la durée du protocole, nous avons comparé différents paramètres entre nos 4 groupes de souris (Adts4$^{+/+}$ et Adts4$^{-/-}$ avec et sans entraînement) :

- Les volumes de lésion ont été déterminés par IRM 1 et 7 jours après l'ischémie.
- La récupération fonctionnelle a été évaluée par les performances au Grip-test.
- Une quantification des PNNs a été réalisée dans les cortex somatosensoriel et moteur par immunohistochimie (lectine WFA + anticorps anti-aggrecan) 21 jours après ischémie. Ces données ont ensuite été comparées à une analyse similaire réalisée en condition physiologique.

Principaux résultats

- ADAMTS-4 endogène réduit les lésions ischémiques après occlusion permanente ou transitoire de l'ACM.
- En présence d'ADAMTS-4, la récupération fonctionnelle tardive est améliorée.
- Le protocole d'entraînement physique choisi n'améliore pas la récupération fonctionnelle et ne modifie pas le nombre de PNNs au sein des cortex somatosensoriel et moteur.
- L'absence d'ADAMTS-4 n'influence pas la quantité de PNNs dans les cortex somatosensoriel et moteur, aussi bien en condition physiologique que 21 jours après une ischémie transitoire.

2. Matériel et méthodes

Animaux

Les expériences ont été réalisées sur des souris Adts4$^{+/+}$ et Adts4$^{-/-}$ âgées de 8 semaines (poids compris entre 20 et 25g), de chez Jackson Laboratory. Brièvement, le génome des souris Adts4$^{-/-}$ (B6.129P2-Adamts4tm1Dgen/J) possède un gène bactérien LacZ au sein de l'exon 4, de telle sorte que le promoteur endogène d'ADAMTS-4 dirige l'expression de la β-Galactosidase (β-Gal). En raison d'une séquence NLS (*nuclear localization signal*) localisée en amont du gène LacZ, la protéine rapportrice β-Gal reste localisée au sein des noyaux.

Les souris ont été hébergées au sein de notre animalerie conventionnelle locale (Centre Universitaire de Ressources Biologiques, Université de Caen-Normandie, numéro d'agrément E14 118 001), dans des conditions de température (21°±1C) et d'humidité contrôlées, avec un cycle lumineux allant de 6h45 à 18h45. Les souris ont été placées par groupe de cinq, dans des cages standards en polypropylène (Charles River, France), avec un accès libre à l'eau et à la nourriture. Toutes les expériences ont été menées dans le respect du bien-être animal, en accord avec les réglementations françaises (décret 2013-118) et aux directives du Conseil des Communautés européennes (2010/63/UE). Les protocoles ont été approuvés par un comité d'éthique local et par le ministère de la Recherche et de l'Enseignement Supérieur (numéro d'agrément : 02658.02).

Dans cette première étude, les animaux utilisés sont répartis en 3 cohortes :

- **Cohorte 1** : induction d'une ischémie focale permanente par électrocoagulation de l'ACM.
- **Cohorte 2** : réalisation d'un protocole d'entraînement physique à la suite d'une ischémie cérébrale induite par l'injection de thrombine dans l'ACM **(Figure 32)**.
- **Cohorte 3** : analyse et quantification immunohistochimie des PNNs en condition basale.

Description du protocole d'entraînement physique post-ischémique

Dans ce protocole, les souris Adts4$^{+/+}$ et Adts4$^{-/-}$ (Cohorte 2) ont été habituées durant 6 jours au tapis roulant (8 cm/sec pendant 10min/jour). Un jour après la chirurgie, les souris ont été réparties aléatoirement dans un groupe contrôle et un groupe entraînement (durant 30min, avec une vitesse

maximale de 20cm/sec) (Endres *et al.*, 2003). Ainsi, quatre groupes ont été formés : Adts4$^{+/+}$ et Adts4$^{-/-}$; Adts4$^{+/+}$ + entraînement et Adts4$^{-/-}$ + entraînement. Les souris ont été entraînées durant 3 semaines, avec un jour de repos par semaine. Des acquisitions IRM (❶), des mesures de Grip-test (❷) et un suivi pondéral (❸) ont été réalisés à différents temps du protocole **(Figure 32)**. Ces tests ont été réalisés suivant un schéma journalier, en commençant par le Grip-test et le suivi pondéral le matin, l'entraînement physique en début d'après-midi et l'IRM en fin de journée. Une fois le protocole d'entraînement terminé (+21J), les cerveaux des souris ont été prélevés afin de réaliser des quantifications du nombre de PNNs au niveau de la région lésée et en controlatéral.

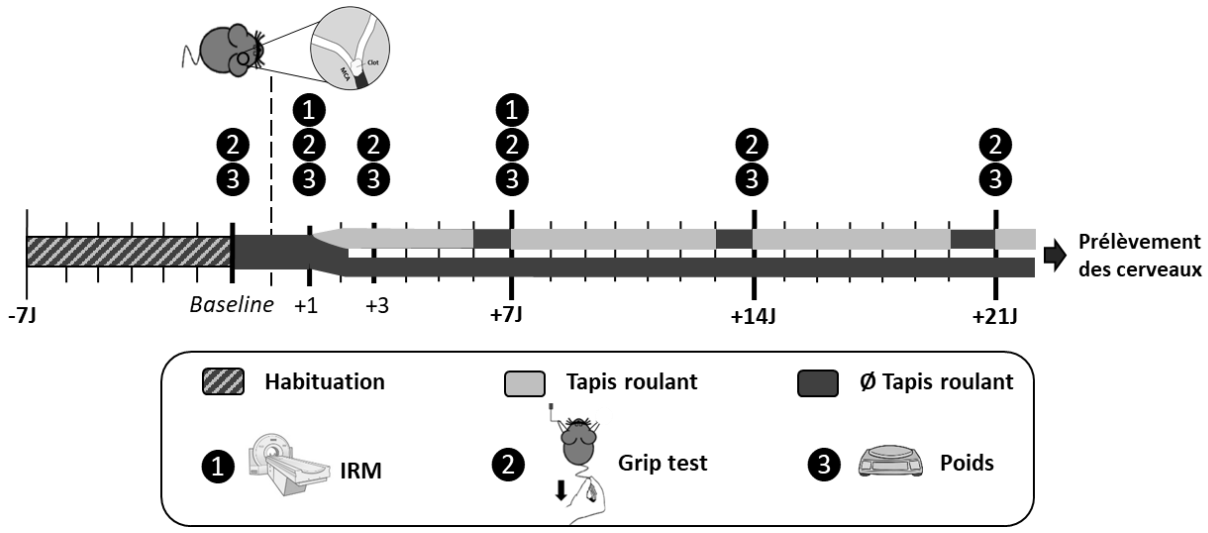


Figure 32 : Protocole d'entraînement physique post-ischémique (Cohorte 2).

Exclusions : 5 souris ont présenté un œdème de la patte arrière gauche dans les 72 heures qui suivent l'occlusion. Suite à une nécrose de la patte arrière après quelques jours, 3 souris ont dues être euthanasiées. Les deux dernières ont, quant à elles, complètement récupéré après la résorption de l'œdème et sont incluses dans les analyses.

<u>Occlusion de l'artère cérébrale moyenne (ACM)</u>

Afin d'évaluer le rôle endogène d'ADAMTS-4 dans l'ischémie cérébrale, deux modèles expérimentaux ont été utilisés chez les souris Adts4$^{+/+}$ et Adts4$^{-/-}$: un modèle permanent par électrocoagulation et un modèle thromboembolique développé au laboratoire (Orset *et al.*, 2007) (**Figure 33)**. Ces deux modèles partagent une approche commune jusqu'au dégagement de l'ACM.

Les souris ont été placées sous anesthésie générale induite par isoflurane (5% isoflurane dans un mélange de 70%/30% de N_2O/O_2, puis maintenues sous anesthésie générale (2% d'isoflurane dans un mélange de 70%/30% de N_2O/O_2) dans un cadre stéréotaxique (Havard Apparatus). Durant toute la procédure, les animaux ont été thermo-régulés à 37±0.5°C à l'aide d'une couverture chauffante, et leur température corporelle a été suivie par une sonde rectale. La peau entre l'œil et l'oreille du côté droit a été incisée, le muscle temporal recouvrant l'os pariétal a été dégagé, et une craniotomie a été réalisée au-dessus d'une bifurcation de l'ACM.

- **Ischémie permanente par électrocoagulation** : l'ACM a été électro-coagulée par des pinces chirurgicales de coagulation (AESCULAPTyp TB 50 Electrosurgical Unit Bipolar Coagulator), avant d'être coupée par des micro-ciseaux pour valider l'occlusion permanente.
- **Ischémie thromboembolique** : une fois la dure-mère retirée, 1µl de thrombine murine (1,5 UI/µl ; Enzyme Research Laboratories) a été injectée directement au sein de l'ACM *via* une micropipette en verre **(Figure 33)**. La pipette a été maintenue en place pendant 10 minutes afin de garantir la stabilisation du caillot. Un laser doppler utilisant une sonde à fibre optique (Oxford Optronix) a permis de suivre le débit sanguin cérébral avant et jusqu'à 45 minutes après l'occlusion afin de vérifier et d'exclure toutes les souris présentant une reperfusion spontanée. Aucune souris n'a été exclue pour ce critère.

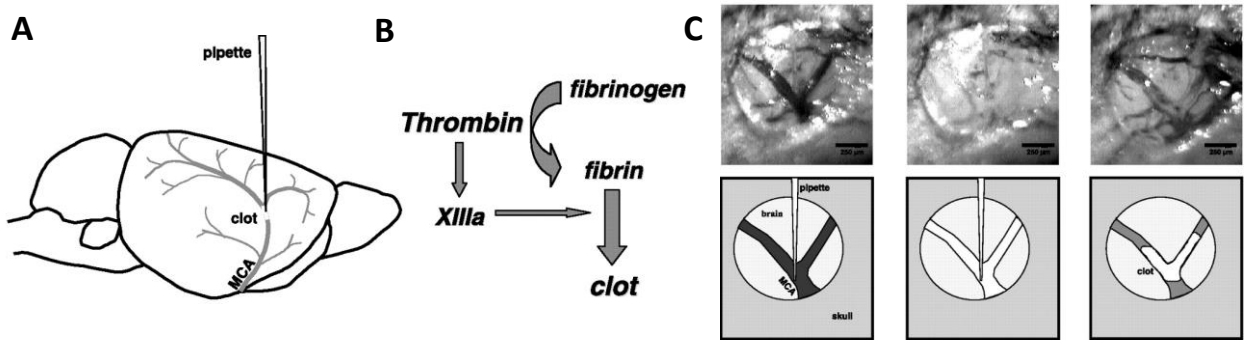


Figure 33 : Description du modèle thromboembolique.
A) Approche chirurgicale schématique. B) L'injection de thrombine clive le fibrinogène et active le facteur XIII pour générer un caillot de fibrine. C) Représentation de la formation du caillot au niveau de la bifurcation de l'ACM lors de l'injection de thrombine. Adapté de (Orset et al., 2007).

Imagerie par résonance magnétique (IRM)

Les souris ont été profondément anesthésiées par de l'isoflurane 5% puis maintenues avec de l'isoflurane 1,5 à 2% (dans un mélange de 70%/30% de N_2O/O_2). Les acquisitions ont été effectuées à l'aide d'une IRM 7T (Pharmascan, Bruker). Les lésions ischémiques ont été détectées en utilisant une séquence pondérée en T2 : TE = 11.377, TR=2351.676, avec une résolution de 0,07 x 0,07 x 0,5 mm. Les volumes de lésions ont été quantifiés en aveugle en utilisant le logiciel ImageJ. Toutes les souris présentant à 24h, une lésion sous-corticale (5 souris dans la 2ème cohorte) ou inférieure à 5 mm^3 (4 souris dans la 2ème cohorte) ont été exclues de l'analyse.

Évaluation de la récupération fonctionnelle par le test d'agrippement (Grip-test)

Le Grip-test (BIOSEB, France) permet d'évaluer les fonctions neuromusculaires chez la souris en déterminant la force de l'animal par rapport au réflexe de saisie de la patte avant. Avant le début du test, les animaux ont été acclimatés à la pièce expérimentale pendant 45 minutes. Pour évaluer la force individuelle de chaque patte, la patte d'intérêt a été positionnée au-dessus d'une clef Allen connectée à l'appareil tandis que l'autre était positionnée au-dessus d'une clef non connectée. Une fois que chaque patte a été saisie sur leur barre respective, une force est doucement appliquée au niveau de la queue de la souris pour réaliser un essai. La force de saisie finale pour chaque patte est une moyenne de quatre essais par animal, avec 30 secondes de repos entre chaque essai.

Protocole de rééducation physique par le tapis roulant

Un tapis roulant (BIOSEB, France) a été utilisé afin d'étudier les effets d'un entraînement physique contrôlé sur la récupération fonctionnelle post-ischémique, en lien avec une modulation enzymatique des PNNs entre des souris $Adts4^{+/+}$ et $Adts4^{-/-}$. Les souris ont tout d'abord été familiarisées avec l'appareil en utilisant une vitesse de marche de 8 cm/sec pendant 10min, durant 6 jours consécutifs. Un jour après l'induction de thrombine dans l'ACM, les souris ont été divisées aléatoirement en deux sous-groupes : un groupe entraînement et un groupe contrôle. Les souris ont été entraînées 6 jours consécutifs par semaine durant 3 semaines à une vitesse croissante (+ 2 cm/sec/min les 5 premières minutes) afin d'atteindre une vitesse de course finale de 20 cm/sec maintenue durant 25 minutes (Endres *et al.,* 2003). Afin de minimiser le stress, aucun choc électrique n'a été utilisé durant tout le protocole. Les souris du groupe contrôle partageaient leur cage avec celles du groupe entraînement et ont été dans la même pièce durant toute la durée des entraînements.

Immunohistochimie

Les souris ont été profondément anesthésiées et perfusées par voie transcardiaque avec une solution saline héparinée froide (15 ml) suivie de 100 ml de fixateur (PBS 0,1 M. pH 7,4 contenant 4% de paraformaldéhyde). Les cerveaux ont été post-fixés durant 24h avant d'être cryoprotégés (saccharose 20% dans du PBS ; 24 h) puis congelés dans du Tissue-Tek (Miles Scientific). Des coupes de cryostat de 10 µm ont été collectées sur des lames Poly-Lysine et stockées à -80 ° C. Les coupes de cerveaux ont par la suite été incubées une nuit entière à température ambiante avec un anticorps anti-Aggrecan (lapin, 1 : 1000, AB1031, Merck), la lectine WFA (Biotinylated Wisteria floribunda Agglutinin, 1 : 1000, L1516, Sigma Aldrich) et du DAPI (4',6-diamidino-2-phénylindole, 1 : 1000, D9542, Sigma Aldrich) dans une solution de PBS contenant 0,25% de Triton. Les anticorps primaires ont été révélés grâce à des anticorps secondaires conjugués à des fragments Fab'2, dilués au 1: 800 (Jackson Immunoresearch). Les acquisitions ont été réalisées à l'aide d'une caméra CoolSnap couplée au microscope Leica DM6000.

Toutes les quantifications ont été effectuées sur le logiciel ImageJ. La quantification des PNNs a été réalisée manuellement et en aveugle, tandis que celle des noyaux a été réalisée automatiquement par l'intermédiaire d'une macro. Chaque animal correspond à la somme des évènements (PNNs ou noyaux) quantifiés sur un minimum de 3 acquisitions, et ce pour chaque région d'intérêt.

Analyses statistiques

Toutes les analyses statistiques ont été effectuées à l'aide du logiciel GraphPad Prism 8. Des comparaisons entre échantillons indépendants ont été effectuées en utilisant un test de Mann-Whitney (2 échantillons) ou un test de Kruskal-Wallis (4 échantillons) et son test post-hoc approprié (Test de Dun). Un test de Wilcoxon a été utilisé pour comparer l'évolution longitudinale de la force d'agrippement (Grip-test) et du poids. Un seuil de $P < 0,05$ a été défini comme statistiquement significatif. Les résultats sont présentés en tant qu'erreur standard (*Standard error,* SD). Le nombre d'animaux utilisé est précisé dans chaque légende des figures.

3. Résultats

Implication d'ADAMTS-4 endogène dans l'ischémie cérébrale

Nous avons débuté cette étude en réalisant une ischémie permanente par électrocoagulation de l'ACM chez des souris Adts4$^{+/+}$ et Adts4$^{-/-}$. De manière intéressante, les souris déficientes en ADAMTS-4 présentent un volume de lésion significativement plus élevé à 24h, que leurs homologues sauvages (+54,5% ; Test de Mann-Whitney, p<0,05 ; n=10). En effet, les souris Adts4$^{-/-}$ possèdent un volume de lésion moyen de 27 mm^3 contre 17,5 mm^3 pour les souris Adts4$^{+/+}$ **(Figure 34)**. Ces résultats montrent qu'ADAMTS-4 endogène limite la progression de l'infarctus dans un modèle ischémique permanent.

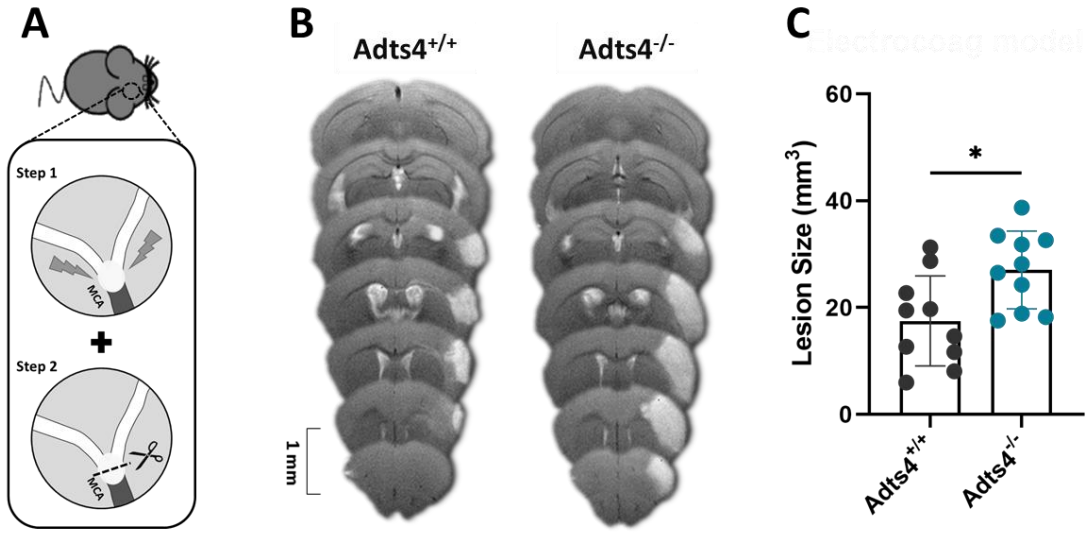


Figure 34 : ADAMTS-4 endogène réduit la taille de l'infarctus dans un modèle ischémique permanent.
A) Représentation schématique du modèle d'électrocoagulation de l'ACM. B) Acquisitions IRM obtenues par une séquence pondérée T2, représentant les volumes de lésions moyens entre des souris Adts4$^{+/+}$ et Adts4$^{-/-}$, 24h après une ischémie permanente par électrocoagulation. C) Quantification de ces volumes de lésions (Moyenne ± SD ; Test de Mann-Whitney, * : p<0,05 ; n=10 par groupe).

Nous avons ensuite utilisé un modèle d'AVC ischémique expérimental plus proche de la pathologie humaine, dans lequel l'injection *in situ* de thrombine permet la formation d'un caillot riche en fibrine

dans l'ACM. Ce modèle a été suivi ou non d'un entraînement physiquement afin de mimer les programmes de rééducation fonctionnelle chez l'Homme **(Figure 32)**.

Vingt-quatre heures après l'induction de l'AVC thromboembolique, les souris Adts4$^{-/-}$ possèdent un volume de lésion significativement plus grand que les souris Adts4$^{+/+}$ (+53% ; Test de Mann-Whitney, p<0,05 ; n=17). Dans ce modèle ischémique transitoire, les souris Adts4$^{-/-}$ ont un volume de lésion moyen de 36,9 mm^3 contre 24,1 mm^3 pour les souris Adts4$^{+/+}$ **(Figure 35)**. Ces données soulignent l'importance d'ADAMTS-4 endogène pour limiter la progression de l'infarctus.

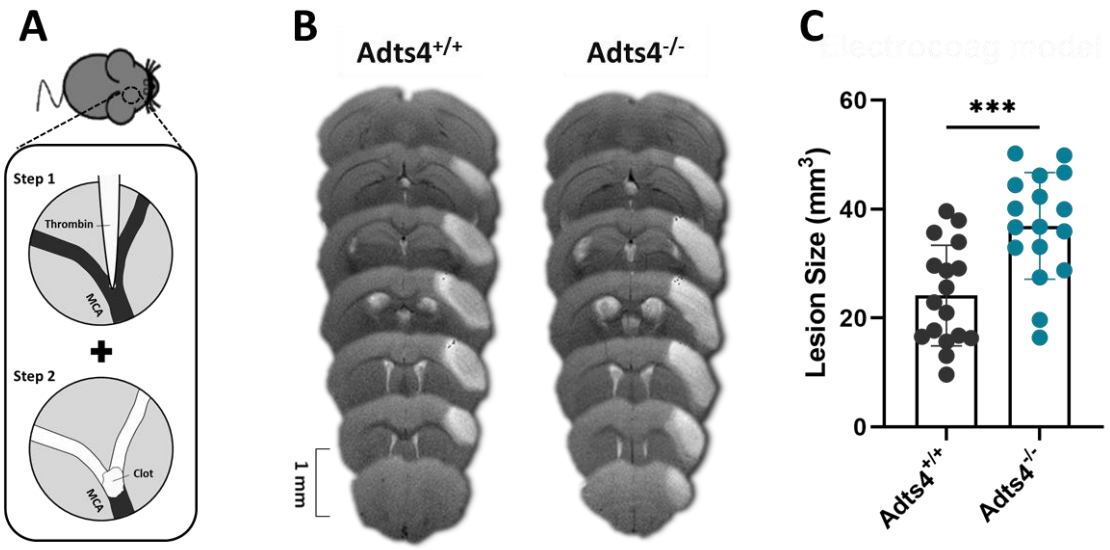


Figure 35 : ADAMTS-4 endogène réduit la taille de l'infarctus dans un modèle thromboembolique.
A) Représentation schématique du modèle thromboembolique par injection de thrombine dans l'ACM. B) Acquisitions IRM obtenues par une séquence pondérée T2, représentant les volumes de lésions moyens entre des souris Adts4$^{+/+}$ et Adts4$^{-/-}$, 24h après une ischémie thromboembolique. C) Quantification de ces volumes de lésions (Moyenne ± SD ; Test de Mann-Whitney, *** : p<0,001 ; n=17 par groupe).

Nous montrons ainsi par deux modèles expérimentaux, qu'ADAMTS-4 endogène est protecteur face aux infarctus cérébraux.

Effet génotypique ou de l'entraînement physique sur la récupération fonctionnelle post-ischémique

Afin d'évaluer les effets de l'entraînement physique sur la récupération fonctionnelle, nous avons réalisé des mesures de la force d'agrippement des pattes avant des souris, en amont et en aval de la chirurgie. Les données obtenues par le Grip-test confirment que l'ischémie thromboembolique induit bien un déficit au niveau de la patte avant gauche. En effet, l'ischémie réduit significativement la force d'agrippement de la patte gauche dans nos deux souches de souris (-12,5% pour les Adts4$^{+/+}$ et -9,2% pour les Adts4$^{-/-}$; Test de Wilcoxon, p<0,01 ; n=17). Nous ne retrouvons aucune différence entre nos deux souches de souris, ainsi qu'au niveau de la patte droite (Test de Wilcoxon, p>0,05) **(Figure 36)**.

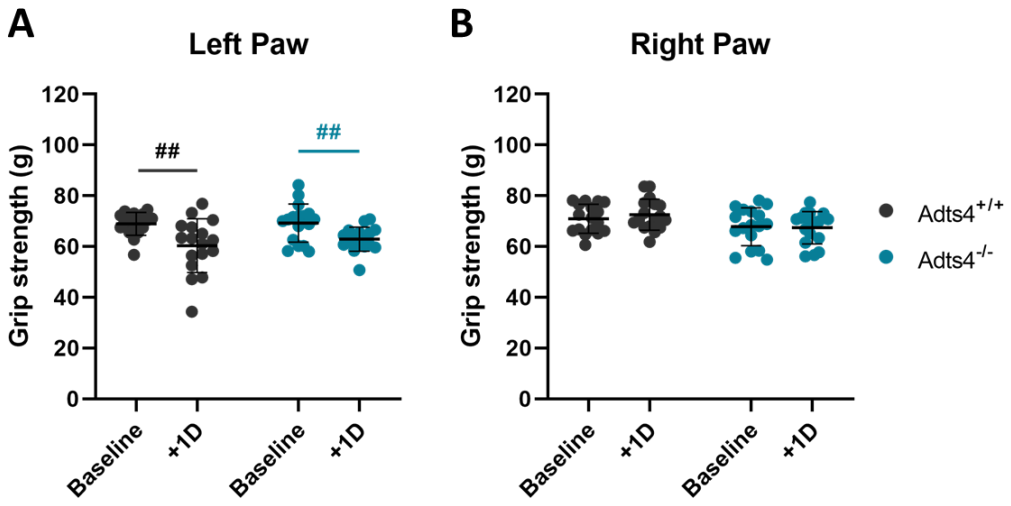


Figure 36 : L'ischémie thromboembolique induit un déficit de la patte avant gauche chez la souris.
Comparaison de la force d'agrippement basale (*baseline*) par rapport à celle retrouvée 24h après une occlusion thromboembolique chez la souris. La force d'agrippement est mesurée par un dispositif de Grip-test, (A) sur la patte avant gauche et (B) sur la patte avant droite (Moyenne ± SD ; Test de Wilcoxon, ## : p<0,01 ; n=17 par groupe).

Par la suite, les souris de nos deux souches ont été réparties aléatoirement afin d'obtenir 4 groupes : Adts4$^{+/+}$ et Adts4$^{-/-}$; Adts4$^{+/+}$ + entraînement et Adts4$^{-/-}$ + entraînement. Un suivi sur 3 semaines, révèle que toutes les souris présentent une augmentation significative de leur force d'agrippement par rapport au 1er jour post-ischémique, reflet d'une récupération fonctionnelle. Néanmoins, la vitesse de récupération entre les groupes diffère entre les groupes. Elle débute le 3ème jour post-ischémique pour les souris Adts4$^{+/+}$ (+11%), le 7ème jour post-ischémique pour les souris Adts4$^{+/+}$ + entraînement (+22,4%) et Adts4$^{-/-}$ + entraînement (+12,2%) et le 14ème jour post-ischémique

pour les souris Adts4$^{-/-}$ (+13,5%) (Test de Wilcoxon, p<0,05 et p<0,01 ; n=7 pour les groupes sans entraînement et n=10 pour ceux avec entraînement). De manière intéressante, ADAMTS-4 améliore la récupération fonctionnelle post-ischémique tardive. En effet, les souris Adts4$^{+/+}$ possèdent une force d'agrippement significativement plus grande que les souris Adts4$^{-/-}$ au 21ème jour post-ischémique (+17% ; Test de Dunn, p<0,05 ; n=7). Cependant, un entraînement physique quotidien (tapis roulant) sur 3 semaines, n'améliore pas la récupération fonctionnelle par rapport aux souris contrôles (Test de Dunn, p>0,05 ; n=7 pour les groupes sans entraînement et n=10 pour ceux avec entraînement) **(Figure 37A)**.

Nous avons également mesuré le pourcentage de résorption de l'œdème entre le 7ème et le 1er jour post-ischémique. Nos analyses ne révèlent aucun effet bénéfique de l'entraînement ou du génotype sur ce paramètre. En effet, tous nos groupes présentent une résorption de l'œdème moyenne de 70% (Test de Kruskal-Wallis p>0,05 ; n=7 pour les groupes sans entraînement et n=10 pour ceux avec entraînement) **(Figure 37B)**.

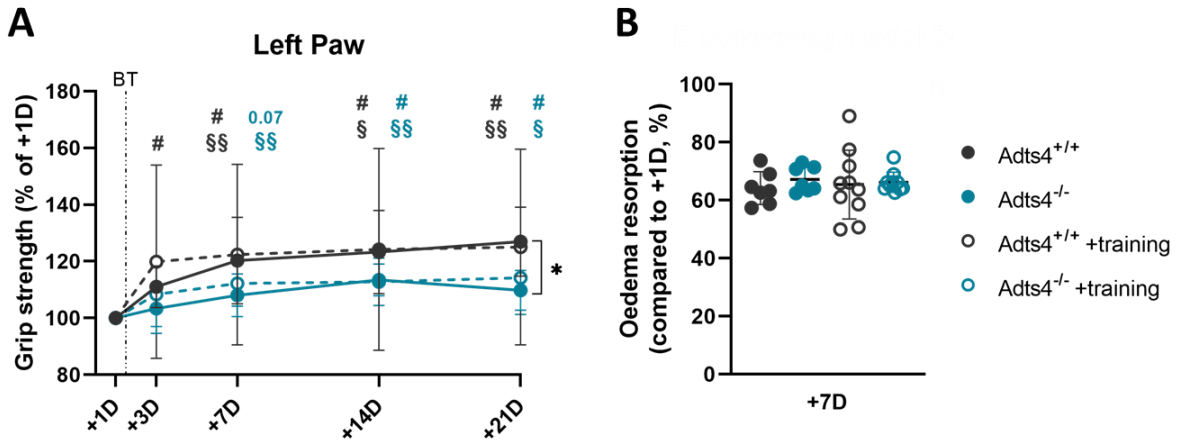


Figure 37 : ADAMTS-4 améliore la récupération fonctionnelle post-ischémique tardive.
A) Pourcentage de la force d'agrippement de la patte gauche entre le 3ème, 7ème, 14ème et 21ème post-ischémique et le 1er post-ischémique chez la souris. BT : *Beginning of the training*. (Moyenne ± SD ; Test de Dunn, * : p<0,05 ; Test de Wilcoxon, # : p<0,05, ## : p<0,01 (Adts4$^{+/+}$ et Adts4$^{-/-}$) et § : p<0,05, §§ : p<0,01 (Adts4$^{+/+}$ + entraînement et Adts4$^{-/-}$ + entraînement) ; n=7 pour les souris Adts4$^{+/+}$ et Adts4$^{-/-}$, et n=10 pour les souris Adts4$^{+/+}$ + entraînement et Adts4$^{-/-}$ + entraînement). B) Pourcentage de résorption de l'œdème entre le 7ème jour et le 1er jour post-ischémique, calculé à partir d'acquisitions IRM (Moyenne ± SD ; Test de Kruskal-Wallis p>0,05 ; n=7 pour les souris Adts4$^{+/+}$ et Adts4$^{-/-}$, et n=10 pour les souris Adts4$^{+/+}$ + entraînement et Adts4$^{-/-}$ + entraînement).

Le suivi pondéral, réalisé sur tous nos animaux durant la durée du protocole, ne montre aucune variation provoquée par un effet du génotype ou de l'entraînement physique (Test de Kruskal-Wallis p>0,05 ; n=7 pour les groupes sans entraînement et n=10 pour ceux avec entraînement) **(Figure 38)**.

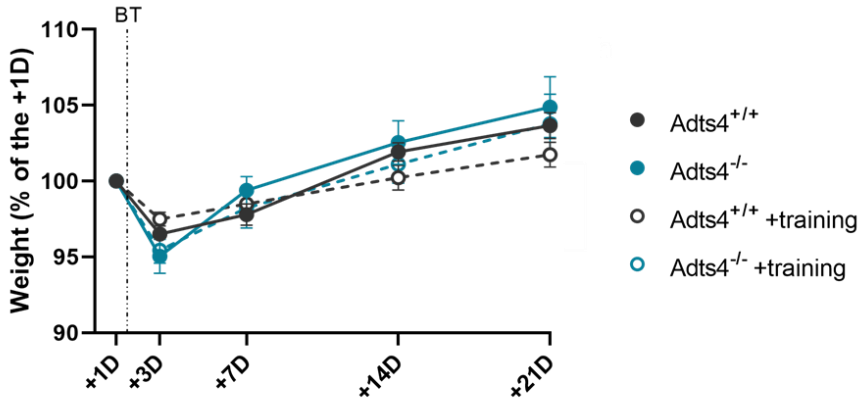


Figure 38 : L'entraînement physique et le génotype n'induisent pas de variation pondérale.
Pourcentage pondéral entre 3ème, 7ème, 14ème et 21ème post-ischémique et le 1er post-ischémique chez la souris. BT : *Beginning of the training*. (Moyenne ± SD ; Test de Kruskal-Wallis p>0,05 ; n=7 pour les souris Adts4$^{+/+}$ et Adts4$^{-/-}$, et n=10 pour les souris Adts4$^{+/+}$ + entraînement et Adts4$^{-/-}$ + entraînement).

En conclusion, le protocole d'entraînement physique utilisé (tapis roulant) n'améliore pas la récupération fonctionnelle dans un modèle thromboembolique. Néanmoins, les souris Adts4$^{+/+}$ présentent une meilleure récupération que les souris Adts4$^{-/-}$, ce qui conforte l'idée qu'ADAMTS-4 est protecteur dans l'AVC ischémique.

Effet génotypique ou de l'entraînement physique sur la dégradation des PNNs suite à une ischémie

Nous avons regardé si notre protocole d'entraînement physique induit une modification du nombre de cellules et/ou de PNNs 21 jours après ischémie, et ce dans deux régions : le cortex somatosensoriel qui correspond à la région affectée par l'ischémie et le cortex moteur qui est la région la plus sensible à l'entraînement physique.

Dans le cortex somatosensoriel, la comparaison du nombre de noyaux (révélés par le Dapi) montre que seules les souris Adts4$^{+/+}$ (+/- entraînement) présentent une diminution significative du nombre de cellules en ipsilatéral par rapport au côté controlatéral (-10,4% pour Adts4$^{+/+}$ et -9,7% pour les Adts4$^{+/+}$ + entraînement ; Test de Mann-Whitney, #: $p<0,05$ (ipsilatéral *vs* controlatéral) ; n=4 par groupe). La comparaison du nombre de PNNs (WFA^{+} et/ou Aggrecan^{+}) indique que tous les groupes présentent une perte de PNNs dans la région lésée par rapport au côté opposé (-26,7% pour les Adts4$^{+/+}$, -36,5% pour les Adts4$^{+/+}$, -35,5% pour les Adts4$^{+/+}$ + entraînement et -39,8% pour les Adts4$^{-/-}$ + entraînement ; Test de Mann-Whitney, #: $p<0,05$ (ipsilatéral *vs* controlatéral) ; n=4 par groupe). De manière intéressante, les souris Adts4$^{+/+}$ tendent à perdre moins de PNNs que les souris déficientes en ADAMTS-4. Néanmoins, nous n'avons pas observé d'effet de l'entraînement (Test de Kruskal-Wallis $p>0,05$; n=4 par groupe) **(Figure 39)**.

Dans le cortex moteur, l'entraînement physique et l'absence d'ADAMTS-4 n'induisent aucune modification du nombre de cellules et de PNNs 21 jours après ischémie (Test de Mann-Whitney et Test de Kruskal-Wallis $p>0,05$; n=4 par groupe) **(Figure 40)**.

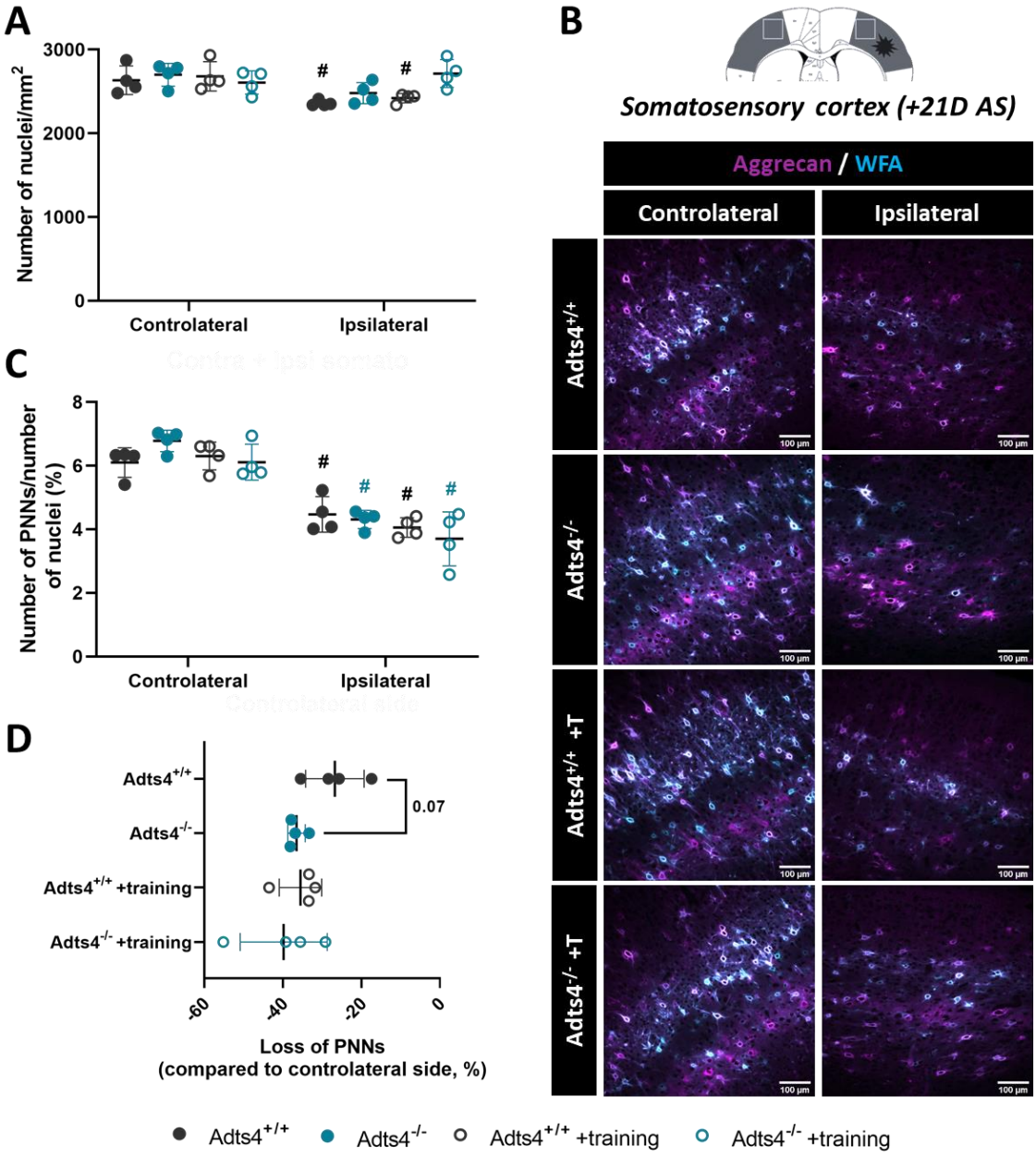


Figure 39 : L'entraînement physique et/ou la délétion d'ADAMTS-4 n'entraînent pas de modification du nombre de PNNs dans le cortex somatosensoriel 21 jours après ischémie.

Analyses du cortex somatosensoriel ipsilatéral et controlatéral, 21 jours après l'induction d'un modèle thromboembolique chez la souris. A) Quantification du nombre de noyaux révélés par le Dapi. B) Immunohistochimies des PNNs révélés par un anticorps anti-aggrecan (en magenta) et la lectine WFA (en cyan). Échelle de 100µm. AS : *After stroke*. C) Nombre de PNNs (WFA^+ et/ou $Aggrecan^+$) rapporté au nombre de noyaux (en %). D) Pourcentage de la perte des PNNs en ipsilatéral par rapport au côté controlatéral (Moyenne ± SD ; Test de Mann-Whitney, # : $p<0,05$ (ipsilatéral *vs* controlatéral) ; Test de Kruskal-Wallis, $p>0,05$; n=4 par groupe).

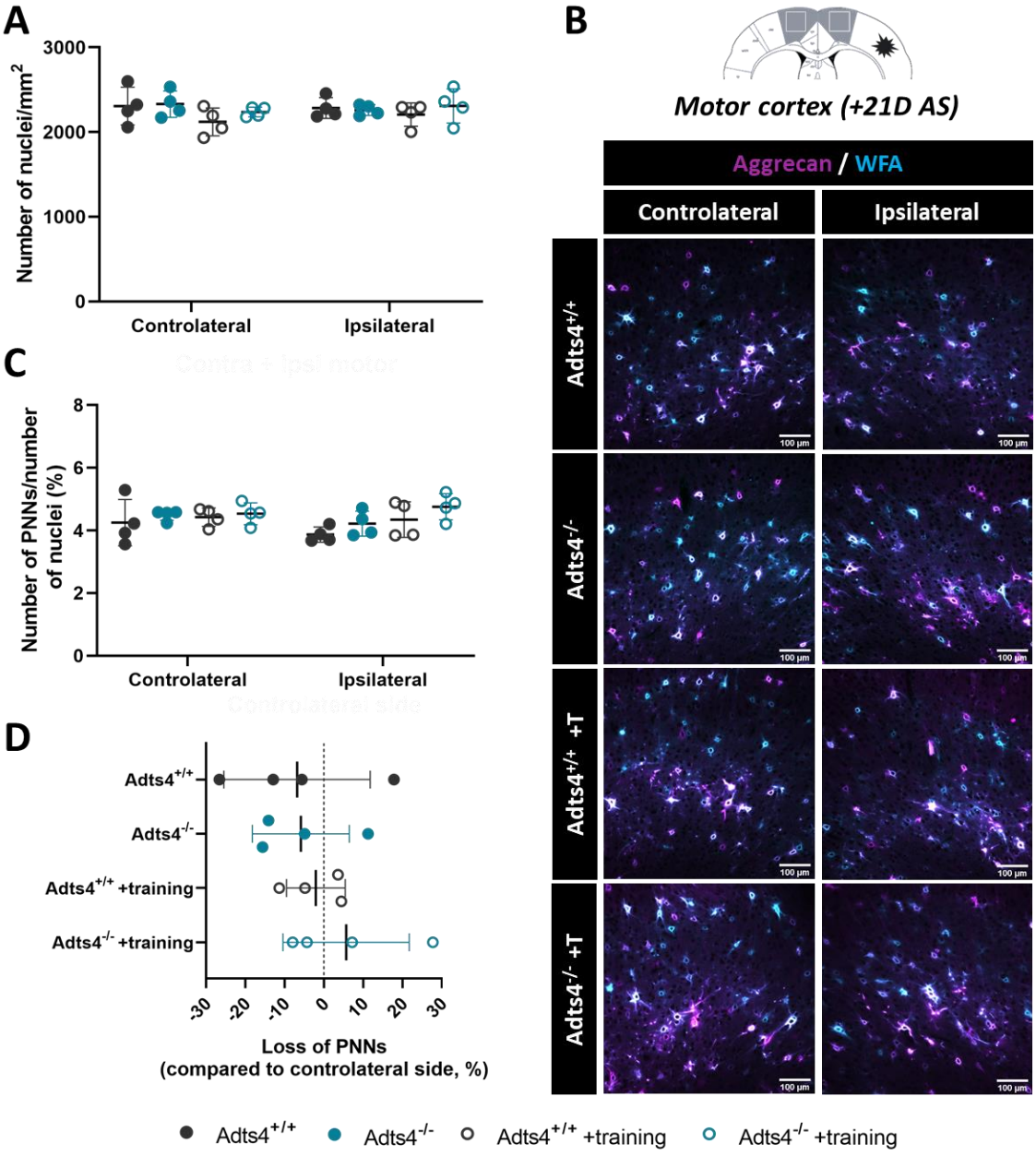


Figure 40 : L'entraînement physique et/ou la délétion d'ADAMTS-4 n'entraînent pas de modification du nombre de PNNs dans le cortex moteur 21 jours après ischémie.

Analyses du cortex moteur ipsilatéral et controlatéral, 21 jours après l'induction d'un modèle thromboembolique chez la souris. A) Quantification du nombre de noyaux révélés par le Dapi. B) Immunohistochimies des PNNs révélés par un anticorps anti-aggrecan (en magenta) et la lectine WFA (en cyan). Échelle de 100µm. AS : *After stroke*. C) Nombre de PNNs (WFA$^+$ et/ou Aggrecan$^+$) rapporté au nombre de noyaux (en %). D) Pourcentage de la perte des PNNs en ipsilatéral par rapport au côté controlatéral (Moyenne ± SD ; Test de Mann-Whitney p>0,05 (ipsilatéral *vs* controlatéral) ; Test de Kruskal-Wallis p>0,05 ; n=4 par groupe).

Nous avons réalisé une analyse immunohistochimique plus poussée, en comparant les différentes populations de PNNs au sein de nos régions d'intérêts. Ces populations sont détectées par la lectine WFA, un anticorps dirigé contre aggrecan ou les deux. Nos données montrent qu'il n'y a pas de différence entre nos 4 groupes, suggérant que ni l'entraînement, ni la présence d'ADAMTS-4 influence la composition des PNNs 21 jours après ischémie (Test de Kruskal-Wallis p>0,05 ; n=4 par groupe) **(Figure 41)**.

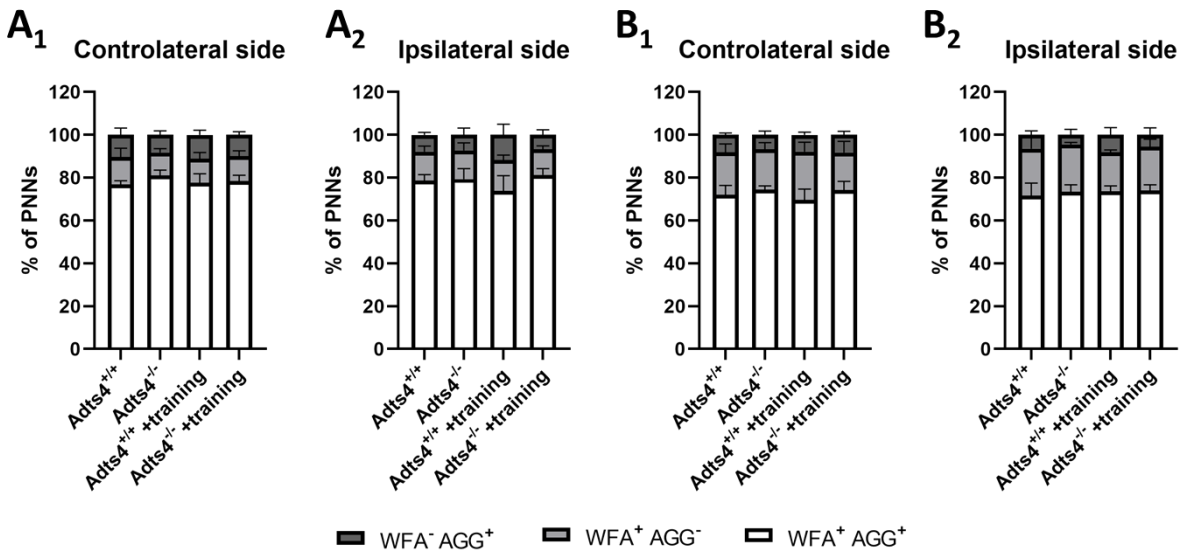


Figure 41 : L'entraînement physique et/ou la délétion d'ADAMTS-4 n'entraînent pas de modification dans la proportion des différentes populations de PNNs dans le cortex somatosensoriel et moteur 21 jours post-ischémiques.

Pourcentage des différentes populations de PNNs marquées soit par la lectine WFA, soit par l'anticorps anti-aggrecan ou les deux dans le cortex somatosensoriel ipsilatéral (A1) et controlatéral (A2) ; ainsi que dans le cortex moteur ipsilatéral (B1) et controlatéral (B2), 21 jours après l'induction d'un modèle thromboembolique chez la souris (Moyenne ± SD ; Test de Kruskal-Wallis p>0,05 ; n=4 par groupe).

En conclusion, ni le protocole d'entraînement physique utilisé ni ADAMTS-4 endogène ne modifient le nombre de PNNs ou leur composition dans les cortex somatosensoriel et moteur, 21 jours après une ischémie thromboembolique.

Implication d'ADAMTS-4 dans la digestion des PNNs en condition basale

Finalement, afin de déterminer l'implication physiologique d'ADAMTS-4 sur la dégradation des PNNs, nous avons renouvelé notre analyse immunohistochimique en travaillant cette fois-ci sur des souris Adts4$^{+/+}$ et Adts4$^{-/-}$ en condition basale. Nos données montrent que l'absence d'ADAMTS-4 dans le cortex somatosensoriel n'induit pas de modification du nombre de cellules et de PNNs. De plus, le pourcentage des différentes populations de PNNs, marqués soit par la lectine WFA, l'anticorps anti-aggrecan ou les deux, est identique dans nos deux souches (Test de Mann-Whitney p>0,05 ; n=5 par groupe) **(Figure 42)**.

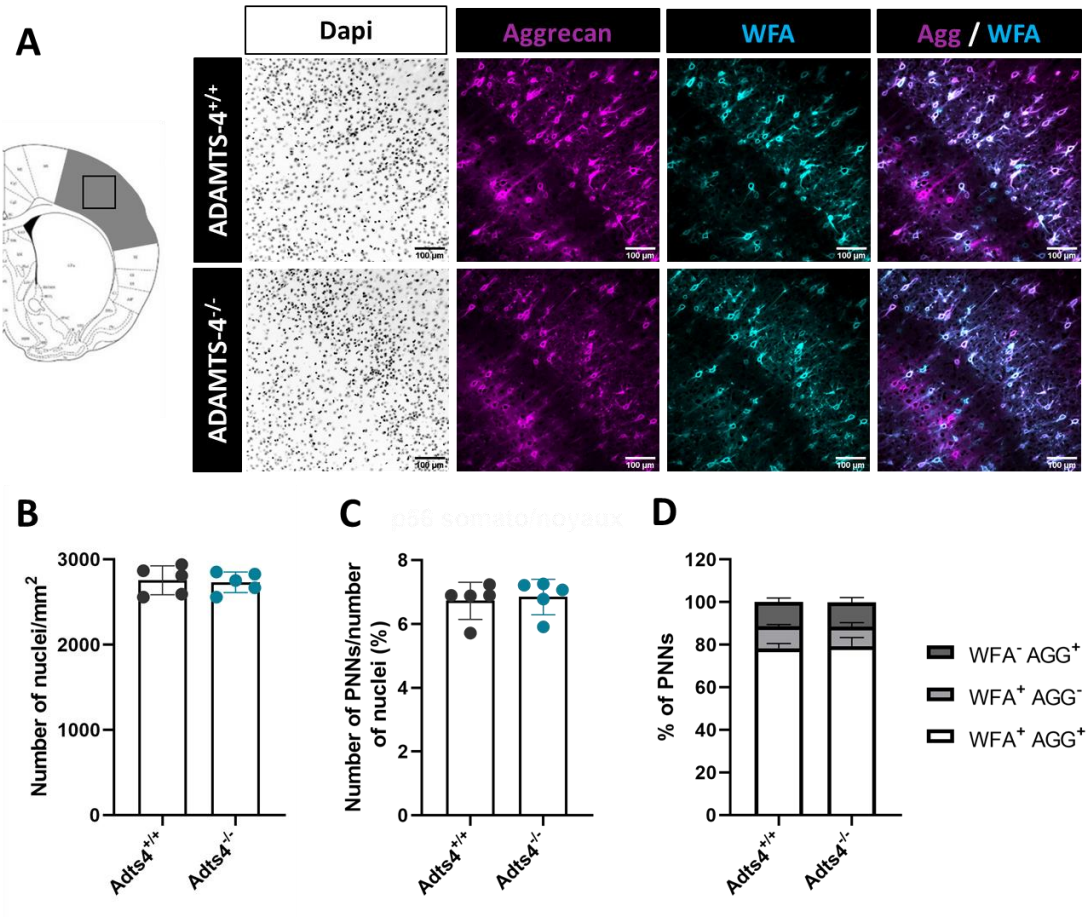


Figure 42 : L'absence d'ADAMTS-4 ne modifie pas le nombre de PNNs dans le cortex somatosensoriel.
A) Immunohistochimie du cortex somatosensoriel, avec les noyaux révélés par le Dapi (en noir) et les PNNs révélés par un anticorps anti-aggrecan révélés par un anticorps anti-aggrecan (en magenta) et la lectine WFA (en cyan), en condition basale. Échelle de 100µm. Quantification : (B) du nombre de noyaux; (C) du nombre de PNNs rapportés à celui des noyaux (en %) et (D) des différentes populations de PNNs marquées soit par la lectine WFA, soit par l'anticorps anti-aggrecan ou les deux (en %), dans le cortex somatosensoriel de souris adultes en condition basale (Moyenne ± SD ; Test de Mann-Whitney p>0,05 ; n=5 par groupe).

De même, les souris déficientes en ADAMTS-4 ne présentent pas de différence significative du nombre de cellules, de PNNs ou dans le pourcentage des différentes populations des PNNs dans le cortex moteur (Test de Mann-Whitney p>0,05 ; n=5 par groupe) **(Figure 43)**.

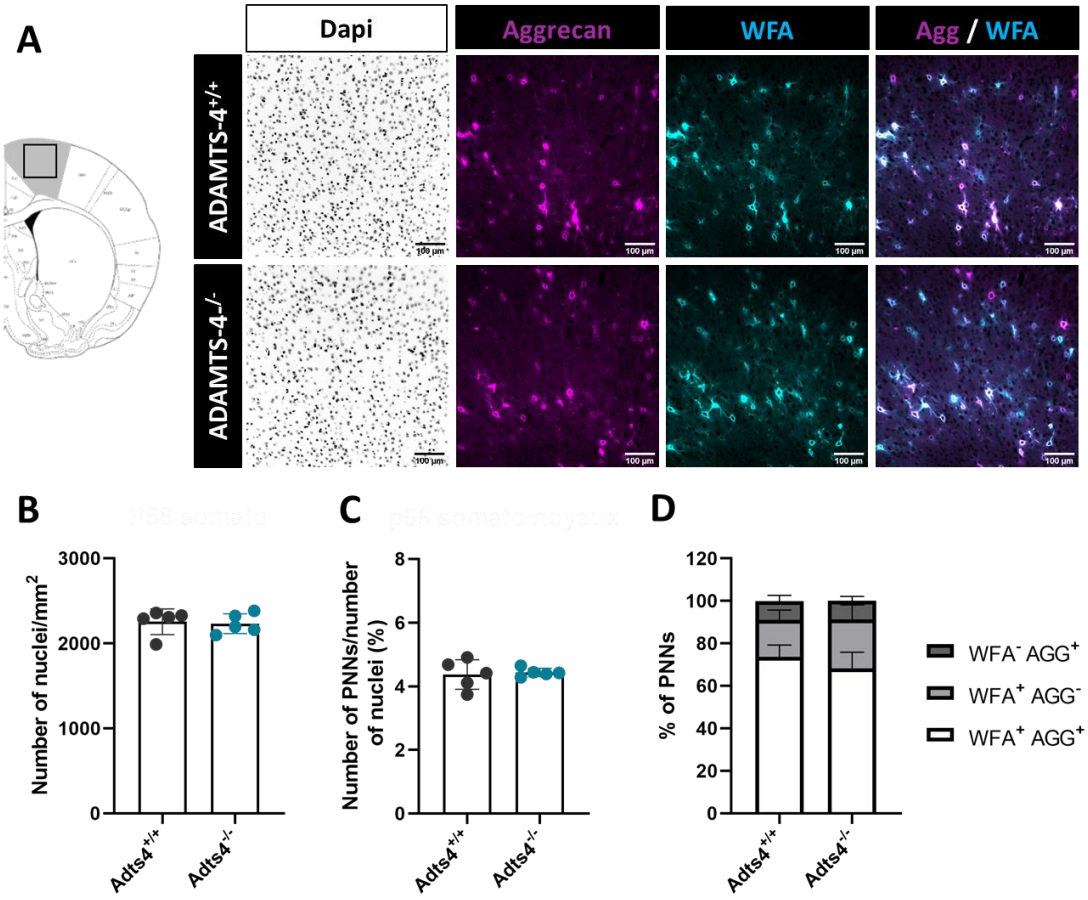


Figure 43 : L'absence d'ADAMTS-4 ne modifie pas le nombre de PNNs dans le cortex moteur.
A) Immunohistochimie du cortex somatosensoriel, avec les noyaux révélés par le Dapi (en noir) et les PNNs révélés par un anticorps anti-aggrecan révélés par un anticorps anti-aggrecan (en magenta) et la lectine WFA (en cyan), en condition basale. Échelle de 100µm. Quantification : (B) du nombre de noyaux; (C) du nombre de PNNs rapportés à celui des noyaux (en %) et (D) des différentes populations de PNNs marquées soit par la lectine WFA, soit par l'anticorps anti-aggrecan ou les deux (en %), dans le cortex moteur de souris adultes en condition basale (Moyenne ± SD ; Test de Mann-Whitney p>0,05 ; n=5 par groupe).

En conclusion, l'absence d'ADAMTS-4 en condition physiologique ne modifie pas le nombre de PNNs totaux ou leur composition dans les cortex somatosensoriel et moteur. Ces résultats rejoignent ceux observés 21 jours après une ischémie thromboembolique.

Étude 2 : Le tPA originaire des interneurones à parvalbumine contrôle le remodelage des réseaux périneuronaux

1. Présentation de l'étude

Contexte de l'étude

Les PNNs sont des structures condensées de la MEC, qui enveloppent préférentiellement les interneurones FS-PV (Kosaka and Heizmann, 1989 ; Lüth *et al.,* 1992 ; Rossier *et al.,* 2015). La mise en place des PNNs lors du développement, coïncide avec la fermeture de périodes de haute plasticité nommées les périodes critiques. Bien que les PNNs offrent une protection aux neurones qu'ils entourent (Suttkus *et al.,* 2014), ils constituent en retour un frein pour la plasticité. Néanmoins, leur dégradation enzymatique restaure la plasticité cérébrale (Pizzorusso *et al.,* 2002), ce qui offre d'intéressantes perspectives thérapeutiques pour diverses pathologies. Il est donc nécessaire de mieux comprendre les différents mécanismes enzymatiques qui régulent la structure des PNNs.

Le tPA est une sérine protéase intervenant dans de nombreuses fonctions physiopathologiques, directement ou par la conversion du plasminogène en plasmine (Collen and Lijnen, 1991; Ho-Tin-Noé *et al.,* 2009; Bukhari *et al.,* 2011). Au sein du SNC, le tPA est largement exprimé par de nombreux types cellulaires, dont les neurones (Siao *et al.,* 2003 ; Hultman *et al.,* 2008 ; Louessard *et al.,* 2016). De manière intéressante, le tPA semble être exprimé par les interneurones FS-PV (Chu *et al.,* 2015). Durant la période critique du cortex visuel, la privation monoculaire accroît l'expression du tPA. Néanmoins en son absence, les souris présentent une réduction de la dominance oculaire en réponse à une privation monoculaire (Mataga *et al.,* 2002). Au vu des liens étroits entre la privation monoculaire et la modulation structurelle des PNNs (Kelly *et al.,* 2015), le tPA apparaît donc comme un candidat potentiel dans la régulation des PNNs.

Objectifs de l'étude

- Cette étude avait pour premier objectif d'identifier de nouveaux types cellulaires exprimant le tPA, par l'utilisation d'une nouvelle approche moléculaire.
- Le second objectif visait à déterminer si le tPA est un mécanisme de régulation des PNNs.

Principales méthodes utilisées

Afin d'identifier de nouveaux types cellulaires exprimant le tPA, nous avons débuté cette étude en injectant dans le cortex somatosensoriel, un AAV codant pour une GFP (*Green Fluorescent Protein*) sous contrôle du promoteur Plat (promoteur du tPA). L'expression du tPA a ensuite été confirmée par de l'électrophysiologie couplée à de la *single-cell* RT-PCR, sur des neurones issus des couches IV et V du cortex visuel.

Afin d'étudier le rôle du tPA endogène sur la modulation des PNNs *in vivo*, nous avons croisé des souris tPA Flox$^{+/+}$ avec des souris exprimant de la Cre sous contrôle d'un promoteur spécifique à la parvalbumine, afin de générer une souche conditionnelle de souris sélectivement déficientes en tPA dans les interneurones PV (cKO : tPAFlox$^{+/+}$; PV-Cre$^{+/-}$). La comparaison de ces souris à des souris contrôles tPAFlox$^{-/-}$; PV-Cre$^{+/-}$, nous ont permis de réaliser une quantification immunohistochimique du nombre d'interneurones PV et de PNNs, ainsi que l'intensité des PNNs marqués par la lectine WFA dans le cortex somatosensoriel.

Afin de disséquer les mécanismes d'action du tPA, nous avons utilisé des cultures de neurones enrichies en interneurones, en prélevant l'éminence ganglionnaire médiale sur des embryons (E14) (Franchi *et al.,* 2018). Après maturation, les interneurones PV sont entourés de PNNs *in vitro*. Sur des cultures issues de souris sauvages ou déficientes en tPA, nous avons utilisé diverses approches pharmacologiques pour définir le mécanisme d'action potentiel du tPA sur le PNN (tPA, plasminogène, plasmine, aprotinine et TIMP-3).

Principaux résultats

- Le tPA est exprimé par les interneurones FS-PV.
- Les souris spécifiquement déficientes en tPA dans les interneurones PV, présentent une population de PNNs à la structure plus dense que leurs homologues sauvages.
- Le tPA régule la dégradation des PNNs, *via* la conversion du plasminogène en plasmine.
- La plasmine permet la dégradation des PNNs, notamment par le clivage d'aggrecan.

tPA originating from parvalbumin interneurons controls the remodeling of perineuronal nets

(***article en préparation***)

Matthieu Lépine[1]*, Sara Douceau[1]*, Gabrielle Devienne[2], Paul Prunotto[1], Sophie Lenoir[1], Laurent Lebouvier[1], Yannick Hommet[1], Véronique Agin[1], Bertrand Lambolez[2], Bruno Cauli[2], Carine Ali*[1], Denis Vivien*[1,3]

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

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

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

* Authors with equal contribution

Corresponding author: Pr. Carine Ali

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

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

ABSTRACT

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

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

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

INTRODUCTION

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

While functional studies abound, clear and consensual descriptions on the cellular and subcellular distribution of tPA in the CNS are lacking. So far, the expression of tPA by endothelial cells, oligodendrocytes, and hippocampal neurons seems well admitted (Louessard *et al.,* 2016; Leonetti *et al.,* 2017; Stevenson and Lawrence, 2018a). Microglia and astrocytes are discussed as sources of tPA under physiological conditions but might be under pathological conditions (Adhami *et al.,* 2008; Wang *et al.,* 2009). While hippocampal mossy fibers are easily immunostained for tPA, blocking axo-dendritic transport with colchicine is necessary to reveal immunopositive cortical fibers (Louessard *et al.,* 2016). In addition, electrophysiological and transcriptional analyses have shown the expression of tPA in a subset of pyramidal neurons in several cerebral cortices (Louessard *et al.,* 2016). This confirms a previous study showing tPA staining in neurons expressing neurogranin, a putative marker of excitatory neurons (Chu *et al.,* 2015). By using a transgenic mouse line expressing a tPA/cerulean-fluorescent protein fusion protein, Stevenson and Lawrence (2018) reported the existence of a subclass of somatostatin (Sst) interneurons with tPA positive somas in the stratum oriens-lacunosum

moleculare of the hippocampus (Stevenson and Lawrence, 2018). This contrasts with Chu's observations who found no staining in Sst interneurons in the cortex (Chu *et al.,* 2015). This last study also suggested an expression of tPA by parvalbumin positive interneurons, but overall, convincing data to determine which interneuron subpopulations express tPA are sparse.

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

Understanding the metabolism of PNNs is crucial, as accumulating evidence show its impact on the reciprocal control between pyramidal neurons and FS-PV. Indeed, up-regulation of PNNs or its degradation profoundly affect synaptic plasticity during development or pathological conditions (Pizzorusso *et al.,* 2002; Bartoletti *et al.,* 2004; Wang and Fawcett, 2012; Devienne *et al.,* 2019; Murthy *et al.,* 2019; Shi *et al.,* 2019; Alaiyed *et al.,* 2020). PNN (re)modelings occur in plastic periods: their formation/condensation closes developmental plastic periods, while their degradation reopens plasticity. Monocular deprivation has been an extremely helpful paradigm to study PNNs remodeling and to identify matrix metalloproteinase 9 (MMP9) as an endogenous protease involved in PNNs plasticity (Kelly *et al.,* 2015; Wen *et al.,* 2018). The expression and activity of tPA increase after sensorial deprivation and are thought to participate in plasticity in this process (Müller and Griesinger, 1998; Mataga *et al.,* 2002, 2004; Chen *et al.,* 2015). However, in these studies, no evidence link tPA-driven plasticity to PNNs.

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

MATERIALS AND METHODS

Animals:

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

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

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

Whole-Cell Recordings in Acute Slices:

G42 mice were deeply anesthetized with isoflurane. After decapitation, brains were quickly removed and placed into ice-cold oxygenated artificial cerebrospinal fluid (aCSF) containing (in mM): 126 NaCl, 2.5 KCl, 1.25 NaH_2PO_4, 2 $CaCl_2$, 1 $MgCl_2$, 26 $NaHCO_3$, 10 glucose, 15 sucrose, and 1 kynurenic acid (Sigma). Coronal slices (300 µm thick) containing the primary visual cortex were cut with a vibratome (VT1000S; Leica) and allowed to recover at room temperature for at least 30min in aCSF saturated with O_2/CO_2 (95 %/5 %). Patch pipettes (4–6 MΩ) pulled from borosilicate glass were filled with 8 µl of RNAse free internal solution containing in (mM): 144 K-gluconate, 3 $MgCl_2$, 0.5 EGTA, 10 HEPES, pH 7.2 (285/295 mOsm). Whole-cell recordings were performed at room temperature using a patch-

clamp amplifier (MultiClamp *700B*, MDS). Membrane potentials were not corrected for liquid junction potential. Data were filtered at 10 kHz and digitized at 20 kHz using an acquisition board (Digidata 1440, MDS). Cells were set at -60 mV by continuous current injection and submitted to current pulses (800 ms, from –100 to 280 pA with 20 pA increments).

Cytoplasm Harvesting and scRT-PCR:

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

Unsupervised clustering:

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

Viral production:

Viral particles were provided by Gilles Bonvento and Alexis Bemelmans (INSERM U1169/MIRCen CEA, Fontenay aux Roses 92265, France). The clone encoding for a GFP under the control of a 1.2-kb sequence of the Human Plat promoter (spanning from -1035 to +207 bp from the transcription start codon) was purchased from GeneCopoeia (pPlat-GFP; Catalog No.: HPRM12655-PF02). For the pPlat-Cre-GFP, the cDNA encoding for the Cre recombinase was subcloned by fusion into the pPlat-GFP (In-fusion HD cloning Kit Clontech-Takarabio). The pPlat-GFP and the pPlat-Cre-GFP were then subcloned in the pDONR221 for AAV production. All the constructs were amplified in Escherichia coli JM109 cells and purified by a Nucleobond endotoxin-free plasmid DNA PC 2000 kit (Macherey-Nagel) according to the manufacturer's instructions. The vector used for this study was an AAV9 serotype. Self-complementary AAV vectors expressing the Plat-GFP construct were produced by transfecting HEK293 cells with the adenovirus helper plasmid (pXX6-80), the AAV packaging plasmid carrying the rep2 and the cap8 genes, and the AAV2 shuttle plasmid containing the Plat-GFP transgene in a sc genome. Recombinant vectors (rAAV) were purified by ultracentrifugation on a discontinuous iodixaniol density gradient followed by dialysis against the formulation buffer of the vector stocks, 0.5 mmol/l MgCl2 and 1.25 mmol/l KCl in phosphate-buffered saline (PBSMK; five buffer changes, 3 hours per round of dialysis). Physical particles were quantified by real-time PCR. Vector titers are expressed as viral genomes per milliliter (vg/mL).

Stereotaxic injection of AAV virus:

Animals were deeply anesthetized with isoflurane 5 %, and maintained with 2 % isoflurane in a 70 %/30 % mixture of NO_2/O_2 in a stereotaxic frame (Havard Apparatus). AAV9-Plat-GFP or AAV9-Plat-Cre-GFP ($1.25.10^{13}$ vp/mL) were injected through a glass micropipette in the right hemisphere in a volume of 0.5 µL at a rate of 0.2 µL/min. Coordinates (relative to bregma) according to the Paxinos Mouse Brain Atlas were as follows: AP: -2 mm; ML: -1 mm; DV: -1.8 mm for the hippocampus and AP: -0.25 mm; ML: -3.4 mm; DV: -0.4 mm and -0.8 mm for the somatosensory cortex. The needle was left in position for a further 5 minutes and then removed slowly from the brain. After recovery from surgery, mice were left undisturbed for 3 weeks for effective and stable transgene expression.

Antibodies:

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

Immunohistochemistry:

Three weeks post-AAV injection, mice were deeply anesthetized with isoflurane 5 % in 70 %/30 % mixture of NO_2/O_2. A transcardial perfusion was performed with ice cold 0.9 % NaCl with 3 % heparin followed by 150 ml of fixative solution containing 4 % paraformaldehyde (in PBS 0.1M, pH 7.4). Brains were removed and cryoprotected in 20 % sucrose solution (in PBS 0.1M, pH 7.4) for 24h and frozen in Tissue-Tek (Miles Scientific). Cryostat sections of 10 µm were collected on Poly-Lysine slides and stored at -80°C. Sections were incubated overnight at room temperature with primary antibodies. Corresponding Fab'2-conjugated secondary antibodies were diluted at 1:800 (Jackson Immunoresearch). Images were acquired using Leica DM6000 microscope-coupled CoolSnap camera, visualized with Metamorph 7.0 software (Molecular Devices), and further processed were realized using ImageJ software. For 3D reconstruction, images were acquired using Leica TCS SP8 Confocal/STED 3 × microscope with an oil-immersion 40 ×, 1.44-N.A. objective at a resolution of 512×512 pixels with 572 Hz speed and a step size of 0.22µm.

Histological analysis:

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

Primary cultures of interneurons:

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

In vitro treatments:

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

Immunocytochemistry:

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

PNNs quantification *in vitro*:

Confocal images were analyzed with the ImageJ software. Random PV-positive cells were imaged with 160 × 160 × 15 µm z-stack with 0.45 µm step size. A threshold was applied to the WFA channel or

aggrecan channel (range 0-255) and the area were quantified in 40 neurons from 4 independent experiments.

Matrix degradation assay:

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

Plasmin activity assay:

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

Statistics:

For sc-PCR analyses, between-group comparisons were performed using Mann–Whitney nonparametric test. Comparison of the occurrence of expressed genes between cell types was determined using Fisher's exact test. A p-value below 0.05 was considered statistically significant.
Otherwise, experiments were analyzed by investigators blinded to group allocation. Unblinding was made after completion of statistical analysis. All statistical analyses were performed using the GraphPad Prism 8 software. Comparisons between more than two independents samples were performed using two-tailed Kruskal-Wallis test and appropriate post-hoc test (Dunn's test). Mann-Whitney U-test was used for the comparisons of two independent samples. Plasmin activity was analyzed using 2 way Anova (Two-stage linear step-up procedure of Benjamini, Krieger and Yekutieli). Recombinant aggrecan degradation was analyzed using one-sample t-test (theorical value of 100 % for the 120 kDa fragment). A threshold of $P < 0.05$ was defined as statistically significant. All graph data are presented as the mean standard error mean (SEM). Sample sizes are indicated in each corresponding legend.

RESULTS

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

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

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

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

Twenty-eight neurons from deeper layers (IV-V) of the mouse primary visual cortex were analyzed by combining patch-clamp recordings and single cell RT-PCR (Cauli *et al.,* 1997) for electrophysiological and molecular characterization, respectively. The PCR protocol was designed to probe the expression of different cell-type specific markers (VGLUT1, GAD65 and GAD67, PV, S100β, Sst, APC and Akr1c18),

plasminogen activators (Plat and Plau) and extracellular matrix related genes (Ncan, Ptptrz1, Ptprr, Sema3a, Sdc4 and Mybpc1) (Supplementary Table 1). Pyramidal cells (n=14) were identified by the triangular shape of their soma and their regular spiking firing pattern characterized by broad spikes and marked frequency adaption. FS-PV interneurons were first visualized by the fluorescence of GFP they express in G42 mice (Chattopadhyaya *et al.,* 2004). These neurons were characterized by low input resistance and high rheobasic current (Kawaguchi, 1993). They typically, fired short duration action potentials with sharp after hyperpolarizing potentials and were able to sustain high firing rate with little or no spike frequency adaptation (Fig 3A). The molecular analysis of the FS-PV interneuron shown in Figure 3B confirmed the expression of PV and GAD65/67, as well as SST, APC, Akr1c18, Plat, Ncan, Ptprr and Sema3a.

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

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

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

(Fig. 4F). Overall, these observations support the idea that tPA released from PV interneurons contributes to PNNs metabolism *in vivo*.

We then used a model of primary murine interneuron cultures (Franchi *et al.,* 2018) to dissect the potential mechanism by which tPA could influence PNNs metabolism (Fig. 5A). Co-(immuno)cytochemistry confirmed the presence of PNNs, characterized by WFA labelling and expression of aggrecan and hyaluronic acid (Supplementary Fig. 3A). As expected, WFA staining was lost when cultures were treated with ChABC (Supplementary Fig 3B). We assessed the effect of tPA on PNNs integrity by treating interneuron cultures with tPA (200 nM) alone or in combination with its conventional substrate plasminogen (10 nM), with plasminogen alone (100 nM) or with active plasmin (200 nM) (Fig. 5B-C). After 24h, plasmin (-87.3 %) or the combination of plasminogen + tPA (-87.6 %) all led to PNNs degradation, assessed by WFA staining, while tPA alone did not alter PNNs metabolism. This suggested that tPA could not directly promote PNNs degradation. Accordingly, aprotonin (1.5 µM), a blocker of plasmin proteolytic activity, prevented PNNs degradation induced by plasminogen + tPA, (Fig. 5D-E) demonstrating that tPA promotes PNNs degradation by a plasmin-dependent mechanism. We found that plasminogen alone could also induce PNNs degradation (-88.4 %; Fig. 5B-C). This suggested that endogenous tPA released by interneurons is effective in the paradigm. To confirm this, a fluorescent assay of plasmin activity was performed and revealed the actual conversion of plasminogen in active plasmin in the cultures in the absence of exogenous tPA (Fig. 5F-G; Supplementary Fig. 4). Moreover, interneurons cultures obtained from tPA Null mice were treated with plasminogen (100 nM), plasmin (200 nM) or plasminogen + tPA (100 nM and 10 nM respectively) during 24 hours (Fig. 5H-I). Although plasmin and plasminogen + tPA significantly reduced WFA staining (-88.2 % for plasmin; -91.5 % for plasminogen + tPA), plasminogen alone did not (Fig. 5I), showing that PNNs degradation depends on endogenous tPA produced by interneurons. We also found that plasmin-dependent metabolism of PNNs *in vitro* was not sensitive to TIMP3, suggesting that matrix metalloproteinases are not a downstream effector of this effect (Supplementary Fig. 5).To further study the mechanism by which tPA may promote PNNs degradation, recombinant aggrecan core protein (G1-IGD-G2) (156 nM; 12 hours) was subjected to plasminogen (7.8 nM), plasmin (7.8 nM), tPA (7.8 nM) alone or in combination, and with or without aprotinin (78 nM) (Fig. 6A-C). ADAMTS-4 (7.8 nM) was used as a positive proteolytic control. Aggrecan degradation products were quantified following coomasie blue staining. Like ADAMTS-4 (-65.3 %), plasmin (-51 %) and plasminogen + tPA (-28.4 %) were capable to cleave the core protein of aggrecan. Moreover as

observed with WFA staining, immunolabelling of aggrecan in cell cultures revealed that tPA-dependent activation of plasminogen degrades perineuronal CSPGs *in situ* (Fig. 6D-E).

DISCUSSION

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

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

In the brain, the soma and proximal dendrites of PV interneurons often become enwrapped by a specialized extracellular matrix, PNNs, during critical periods of post-natal development (Fawcett *et al.,* 2019). PNNs can form a physical barrier preventing interaction between neurons and restricting receptor mobility at the synapse, a feature of synaptic plasticity. As such, PNNs metabolism is a full-fledged actor in brain plasticity, occurring under normal conditions and with clear clinical implications later in life.

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

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

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

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

Our findings show that in the presence of plasminogen, tPA released from FS-PV reduces PNNs. This could result in an imbalance between GABAergic and glutamatergic neurotransmissions, in favor of excitation. This could then impact on several functions associated with PNNs, including being a physical protective barrier (Miyata *et al.,* 2007; Frischknecht *et al.,* 2009; Cabungcal *et al.,* 2013), a contributor to pathogenic pathways (Orlando *et al.,* 2012; Madinier *et al.,* 2014; Yutsudo and Kitagawa, 2015; Lemarchant *et al.,* 2016), a modulator of synaptic plasticity (Orlando *et al.,* 2012;

Carstens *et al.,* 2016; Shi *et al.,* 2019) and of learning/memory processes (Gogolla *et al.,* 2009; Romberg *et al.,* 2013; Happel *et al.,* 2014; Shi *et al.,* 2019). In fact, several of these functions have also been associated with tPA (Tsirka *et al.,* 1997; Baranes *et al.,* 1998; Madani *et al.,* 1999; Bukhari *et al.,* 2011; Hébert *et al.,* 2017; Pu *et al.,* 2019). Future studies will help understanding the respective contribution of tPA and PNNs in these functions.

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

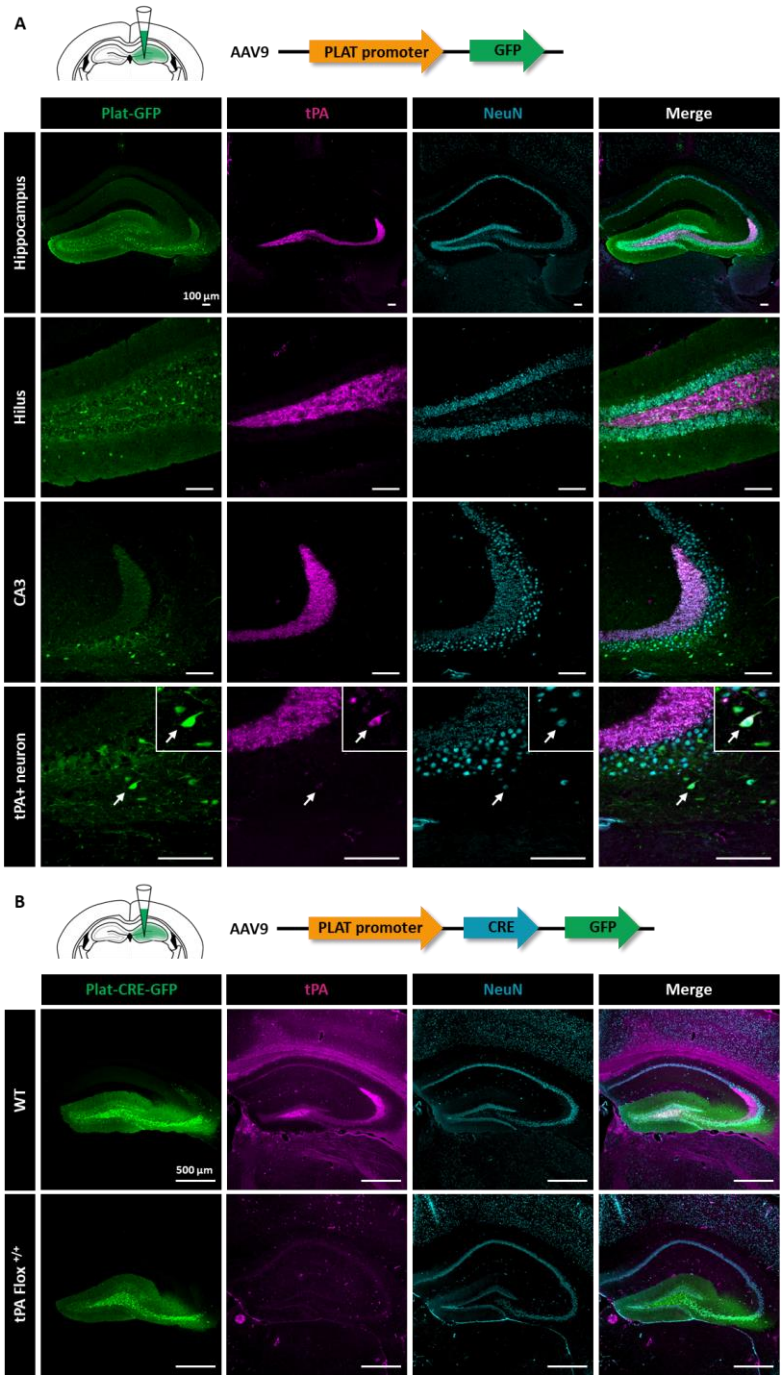


Figure 1: Characterization of a tPA-reporter construct, for in vivo investigations – AAV9-Plat-GFP
(A) AAV-Plat-GFP was injected in the dentate gyrus of adult wild-type mice. Co-Immunohistochemistry of the GFP reporter (green) with the neuronal marker NeuN (cyan) and tPA (magenta) in the hippocampus 3 weeks after injection. Co-localization of GFP with tPA is observed in mossy fibers in CA3. GFP reporter is also detected in dentate gyrus granular cells and mossy cells of the hilus. (B) AAV-Plat-Cre-GFP was injected in the dentate gyrus of tPAFlox$^{+/+}$ mice and WT mice. Co-immunohistochemistry of the GFP reporter (green) with the neuronal marker NeuN (cyan) and tPA (magenta) in the hippocampus 3 weeks after injection. The GFP reporter colocalized with tPA in mossy fibers projecting to CA3 in WT mice but is completely lost in tPAFlox$^{+/+}$ mice. Scale bar: 100 µm.

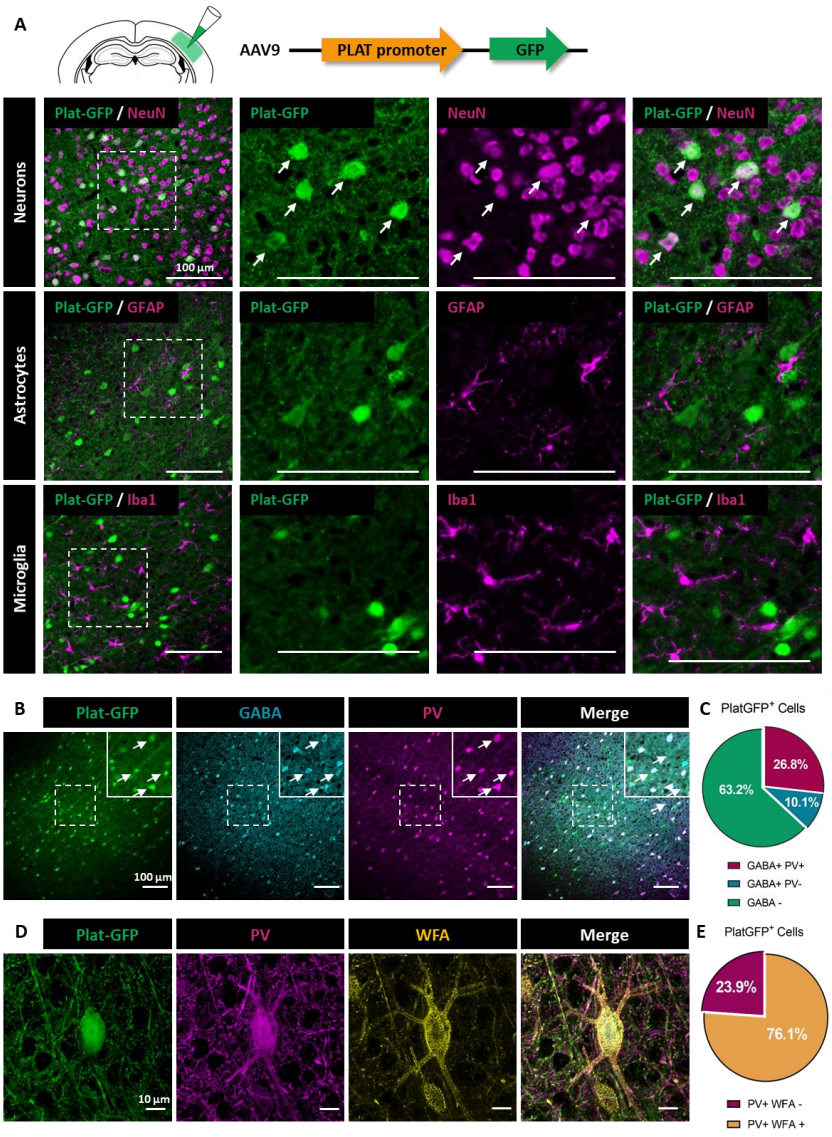


Figure 2: tPA is expressed in parvalbumin interneurons enwrapped with PNNs

(A) AAV-Plat-GFP was injected in the somatosensory cortex of adult wild-type mice. Co-Immunohistochemistry of the GFP reporter (green) with the neuronal marker NeuN (magenta), the astrocyte marker GFAP (magenta) and the microglial marker Iba-1 (magenta) in the somatosensory cortex of adult WT mice 3 weeks after AAV injection. AAV-Plat-GFP induces expression of GFP in neurons but not in astrocytes or microglia (Scale bar: 100 µm).(B-C) Co-localization of the Plat-GFP reporter (green) with GABA (cyan) and parvalbumin (magenta) markers following injection of AAV-Plat-GFP in the somatosensory cortex of WT mice (Scale bar: 100 µm). Quantitative analysis of Plat-mediated expression of GFP in relation to GABAergic positive neurons and parvalbumin interneurons (C). Around 37 % of Plat-GFP positive neurons are GABAergic interneurons and 73 % of them co-localized with PV marker (n=4 coronal sections from N=3 WT brains). (D) 3D reconstruction of a Plat-GFP positive neuron (green), co-labeled with PV (magenta) and the PNNs marker Wisteria floribunda agglutinin (WFA, yellow) (Scale bar: 10 µm). (E) Quantification of Plat-GFP neurons double stained with PV and WFA.

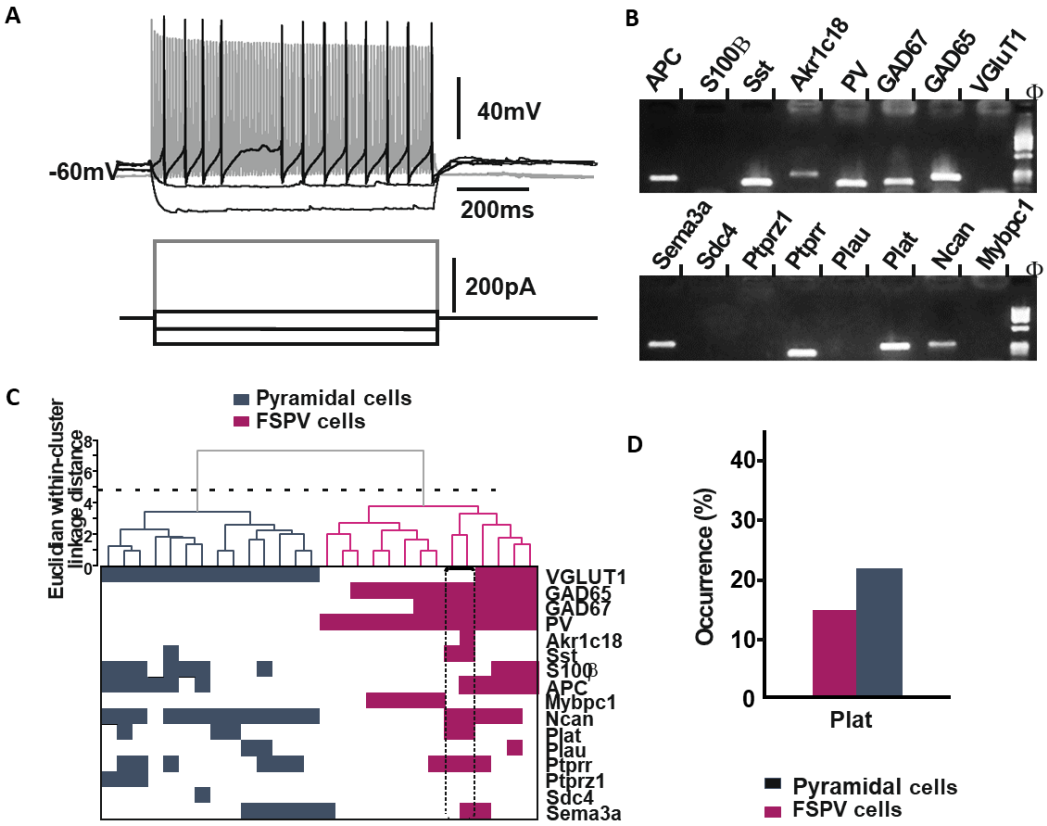


Figure 3: Electrophysiological and molecular characterization of tPA expressing FS-PV interneurons
(A-B) Characterization of Plat-expressing FS-PV cells. (A) Current-clamp recordings of a Plat-expressing FS-PV interneuron. Upper traces show voltage responses to current steps (bottom traces). This neuron typically displayed a low input resistance, a high rheobasic current (120 pA, black trace first depolarizing current step) and fired short duration action potentials with fast and large after hyperpolarizing potentials. A strong depolarizing current (380 pA) evoked a high and sustained firing rate with little or no spike frequency adaptation (shaded trace). (B) Agarose gel analysis of the RT-PCR products of the same FS-PV neuron showing expression of VGlut1, GAD65, GAD67, PV, Akr1c18, Sst, APC, Ncan, Plat, Ptprr and Sema3a. (C) Ward's clustering based on the expression of 16 genes performed on 28 cortical neurons (upper panel). The x axis represents individual cells and the y-axis the average Euclidian within-cluster linkage distance. Pyramidal (grey) and FS-PV (magenta) cells were segregated into two first-order clusters as suggested by Thorndike procedure (dotted line). Heatmap of genes expression across the different cell clusters (bottom panel). For each cell, colored and white squares indicate presence and absence of genes, respectively. Note the presence of VGlut1 in pyramidal cells and of PV in FS-PV cells. Plat-expressing FS-PV neurons (dotted box) displayed a similar gene expression profile and were segregated together. (D) Histograms depicting a similar occurrence of Plat in pyramidal and FS-PV cells.

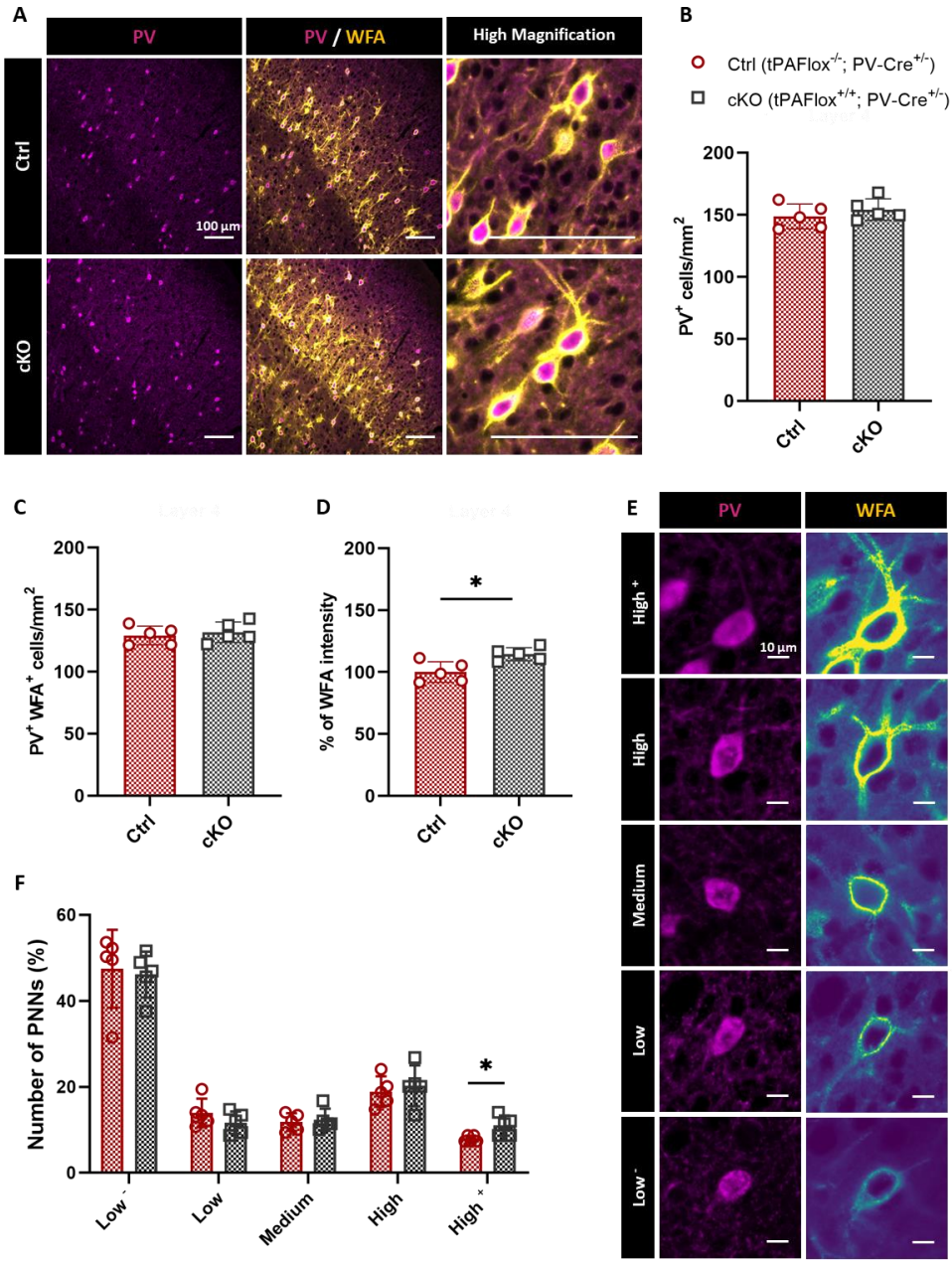


Figure 4: Specific deletion of tPA in PV interneurons affects PNN morphology

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

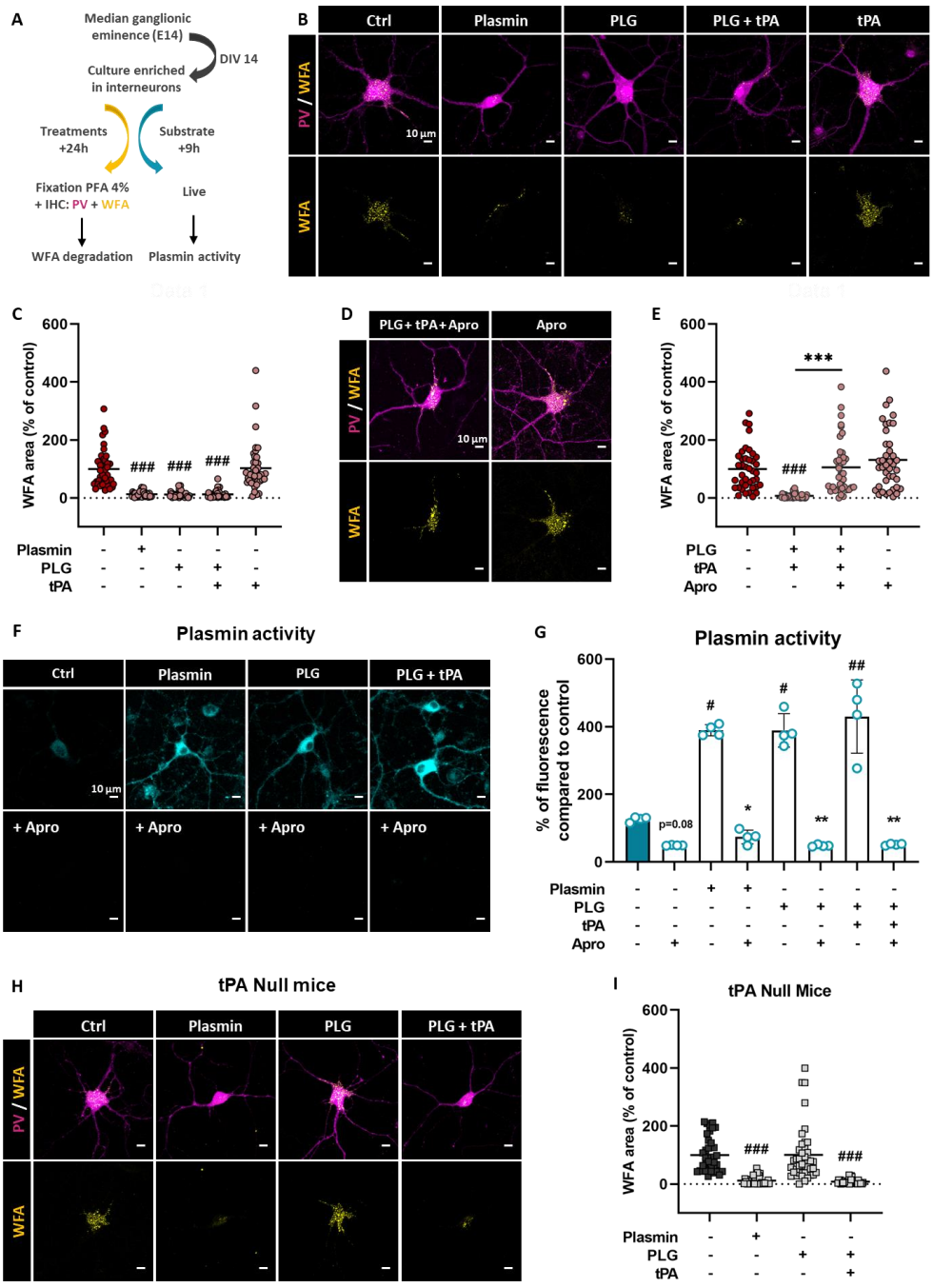


Figure 5: Endogenous tPA controls the remodeling of PNNs in a plasmin dependent manner

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

(F-G) Plasmin activity was assessed by measuring the fluorescence emission of a plasmin substrate at 500 nm following treatments of neuronal cultures with plasmin (positive control), plasminogen (PLG), tPA and aprotinin (Apro). Graph show means ± sem (n=4 independent experiments; Kruskall Wallis followed by Two-stage linear step-up procedure of Benjamini, Krieger and Yekutieli; #: p<0.05; ##: p<0.01; ###: p<0.001: compared to Control; *: p<0.05; **: p<0.01; ***: p<0.001: compared to respective aprotinin treatment. (H) Representative images of MGE-derived tPA Null interneuron cultures stained for PV (magenta) and WFA (yellow) 24h after treatment with plasmin (200 nM), plasminogen (100 nM) and tPA (10 nM). (I) WFA-positive area quantification reveals that plasmin induces the degradation of PNN-like in PV cells from tPA Null cultures whereas plasminogen fails to. Graph show mean ± sem (n=40 cells from 4 independent experiments). Kruskall-Wallis test followed by Dunn's post-hoc test for multiple comparisons; ###: p<0.001 (compared to Control). Scale bar: 10 µm.

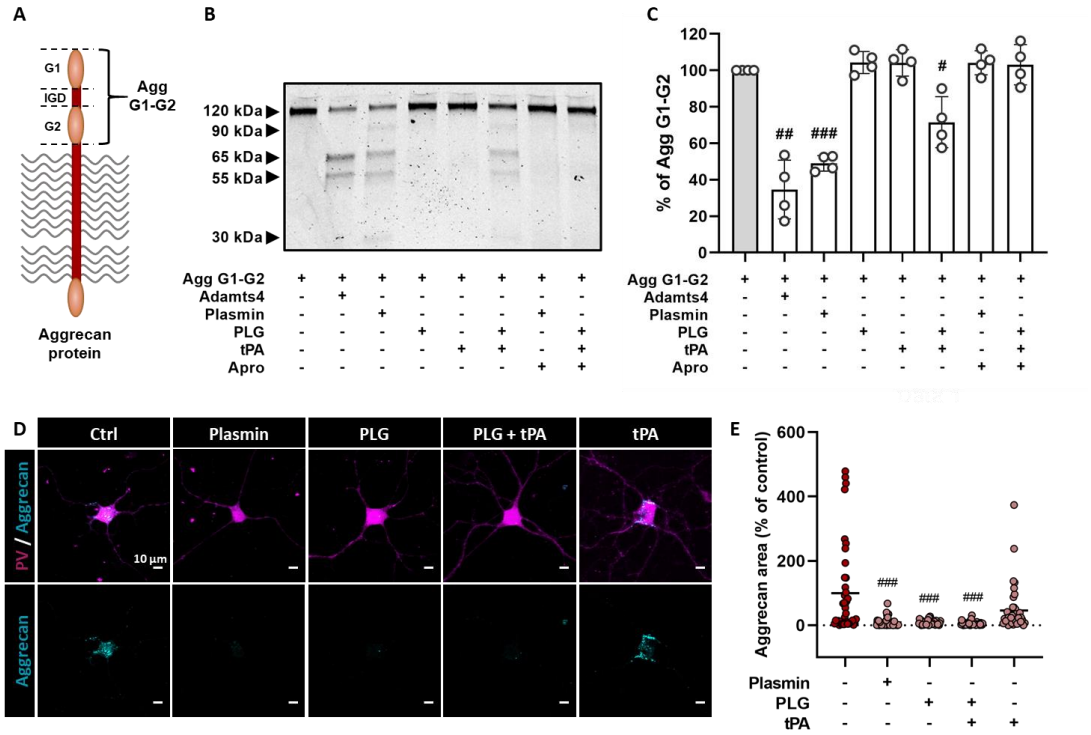
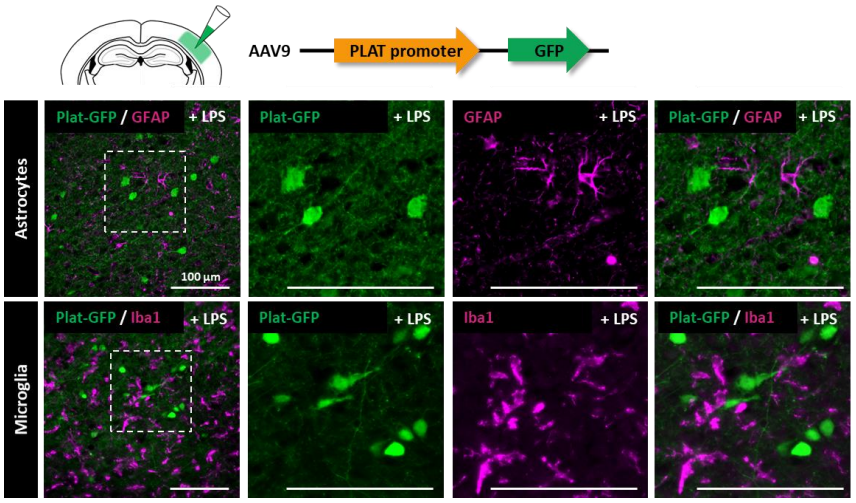
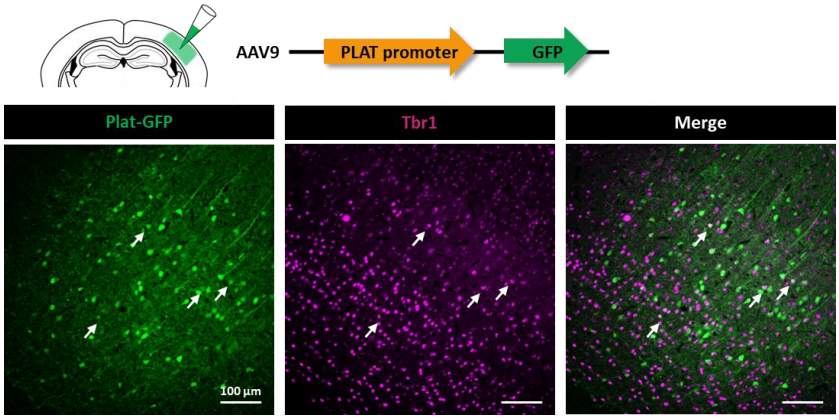


Figure 6: *In vitro* degradation of aggrecan by plasmin

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



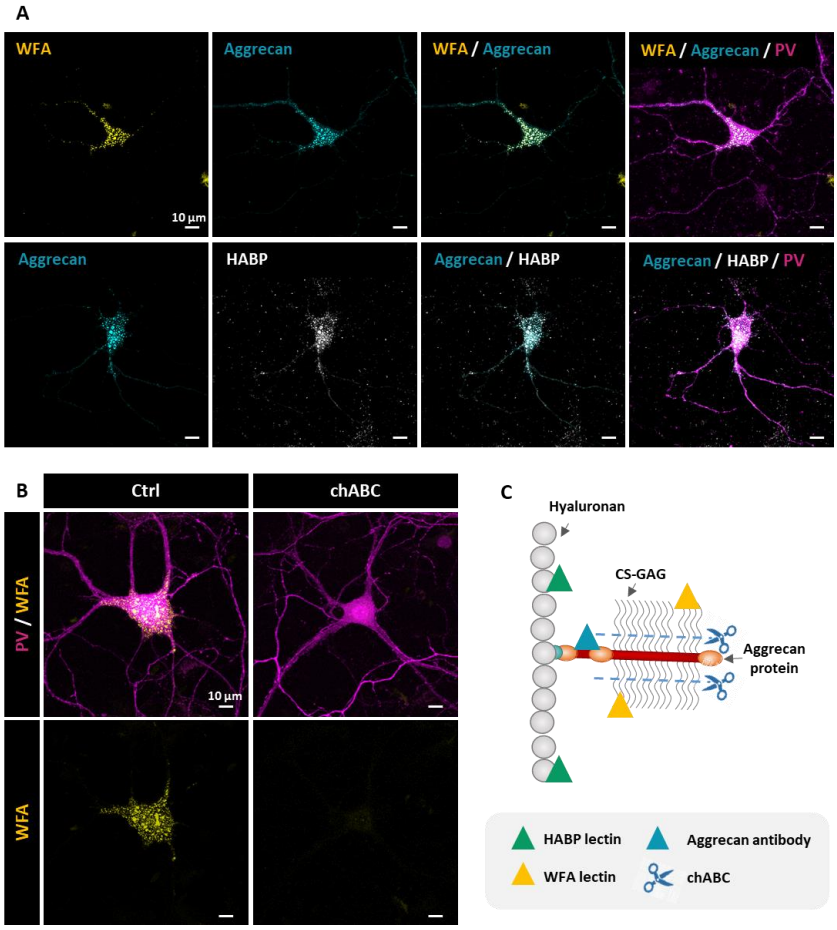
Supplementary Figure 1: Plat-GFP expression in the somatosensory cortex of LPS treated mice
AAV-Plat-GFP was injected in the somatosensory cortex of adult wild-type mice. Co-immunohistochemistry of the GFP reporter (green) with the astrocyte marker GFAP (magenta) and the microglial marker Iba-1 (magenta)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



Supplementary Figure 2: Plat-GFP expression in excitatory neurons in the somatosensory cortex
AAV-Plat-GFP was injected in the somatosensory cortex of adult WT mice. Immunohistochemistry of the GFP reporter (green) with the excitatory neuronal marker Tbr1 (magenta) shows a colocalization between Plat-GFP and excitatory neurons. Scale bar: 100 µm.

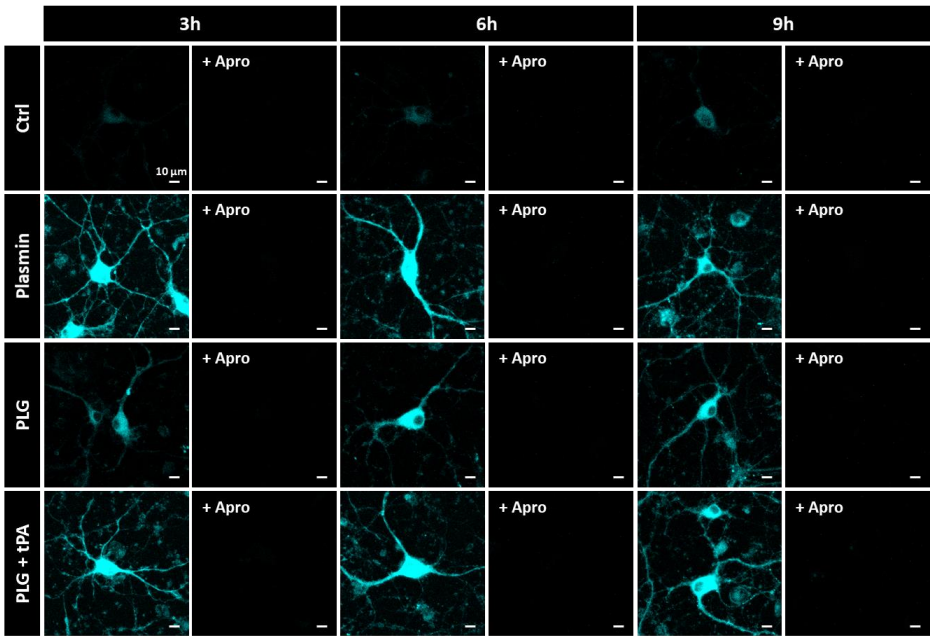
Genes accesion no.	First PCR primers	Size bp	Second PCR nested primers	Size, bp
VGluT1* NM_182993.2	Sense, 597: CCCTTAGAACGGAGTCGGCT Antisense, 1169: TATCCGACCACCAGCAGCAG	592	Sense, 621: ACGACAGCCTTTTGCGGTTC Antisense, 968: CAAAGTAGGCGGGCTGAGAG	366
GAD65* NM_008078.2	Sense, 99: CCAAAAGTTCACGGGCGG Antisense, 454: TCCTCCAGATTTTGCGGTTG	373	Sense, 219: CACCTGCGACCAAAAACCCT Antisense, 447 : GATTTTGCGGTTGGTCTGCC	247
GAD67* NM_008077.4	Sense, 83: ATGATACTTGGTGTGGCGTAGC Antisense, 314: GTTTGCTCCTCCCCGTTCTTAG	253	Sense, 159: CAATAGCCTGGAAGAGAAGAGTCG Antisense, 314: GTTTGCTCCTCCCCGTTCTTAG	178
PV* NM_013645.3	Sense, 104: GCCTGAAGAAAAAGAACCCG Antisense, 275: AATCTTGCCGTCCCCATCCT	191	Sense, 122: CGGATGAGGTGAAGAAGGTGT Antisense, 265: TCCCCATCCTTGTCTCCAGC	163
Akr1c18 NM_ 134066	Sense, 290: GGTCAACTTCCCATCGTCCA Antisense, 667 : GCACCATAGGCAACCAGAAC	397	Sense, 374 : ATCTCATTCATTTCCCAGTGTCTC Antisense, 610 : GCTCTGGTTGAGATAAAGATGGC	259
Sst NM_009215.1	Sense, 1: ATGCTGTCCTGCCGTCTCCA Antisense, 231: GCCTCATCTCGTCCTGCTCA	250	Sense, 41: GCATCGTCCTGGCTTTGGG Antisense, 191:GGGCTCCAGGGCATCATTCT	168
S100beta NM_009115.3	Sense, 57: CGGGCGAGAGGGTGACAA Antisense, 172: TCTTCGTCCAGCGTCTCCAT	133	Sense, 57: CGGGCGAGAGGGTGACAA Antisense, 133: TGTCCACCACTTCCTGCTCC	93
APC NM_007462	Sense, 1598: GGACCAGGACAAAAACCCAATG Antisense, 1962:TGCTATTTACATCTGCTCGCCA	386	Sense, 1642: TCTGTCCTGCTGTGTGTGTTCT Antisense, 1826: GGCAACATCTCCAAAGGTCAAG	207
Mybpc1 NM_001252372	Sense, 774: CGTAGGGAGGTGAAGCAGCA Antisense, 1102: TCTGCCAACTCCACGACAAA	247	Sense, 825: CTGCTGAAAAATGCCAACCC Antisense, 974: TGCCTCCTTTATCCACCTGA	168
Ncan NM_007789	Sense, 159: TGCTGCTGTGGCTGCTTCTC Antisense, 521: CAGCGATACAGCCCAGAGTC	381	Sense, 193: TCAGGACACACAGGACACCA Antisense, 383: CAGCAGAAGGGTAGCATTGG	309
Plat NM_008872	Sense, 157: CTGCTGCTTTGTGGACTGGC Antisense, 464: ATGTCACAGCGTTTCCCTACA	327	Sense, 175: GCTTTCCCATTGCCTGACCA Antisense, 449: CCTACAAATCCATCAGGGCACT	293
Plau NM_008873	Sense, 974: GCACAGCCATCCAGGTCC Antisense, 1237: GTTACAGATAAGCGGTCCTCCA	281	Sense, 1010: CCCCCAAGGTTTACTGATGCTC Antisense, 1180: CCGCAGCACACAGCATTTTA	191
Ptprr NM_	Sense, 543: AAGAAGAGCCTGGACATCGC Antisense, 903: TGCGTTTCTCCTGGTTTCCG	380	Sense, 582: AACTACCACTCCCCTTCCGAAG Antisense, 774: AGATCCGAAGCAGGGTTATGTT	213
Ptprz1 NM_001081306	Sense, 421: TGTTGAAGAGATTGGCTGGTCC Antisense, 806: CCTCAAAACTGGAAAATCTGTC	406	Sense, 447: CAGGAGCACTAAATCAAAAAAA Antisense, 794: AAAATCTGTCCGCATCAAAGCA	368
Sdc4 NM_011521	Sense, 222: TCTGGATGACACGGAGGAGC Antisense, 546: GTCGTAACTGCCTTCGTCCTTC	344	Sense, 284: ATAACCACATCCCTGAGAATGC Antisense, 496: AGGAAAACGGCAAAGAGGAT	233
Sema3a NM_009152	Sense, 653: GGCTGGTTCACTGGGATTGC Antisense, 1035: CCCAGTTCCACAGGCATACA	401	Sense, 671: GCCTGTCTTTTCTGGGGTGT Antisense, 957: ATCTTTTCCAGCCCATTTGC	306

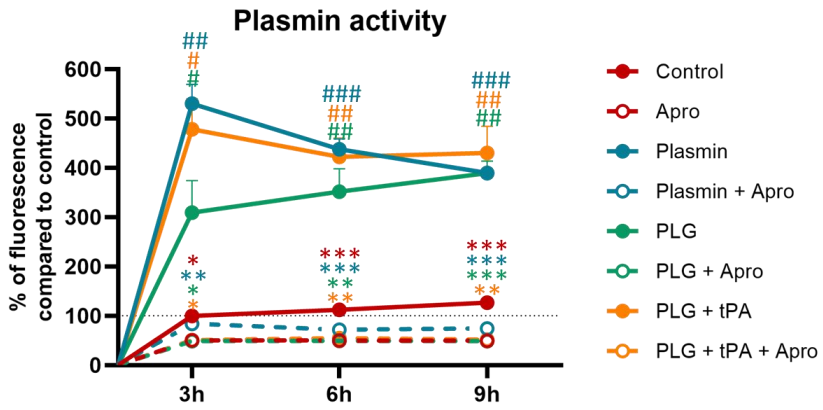
Supplementary Table 1: PCR primers



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

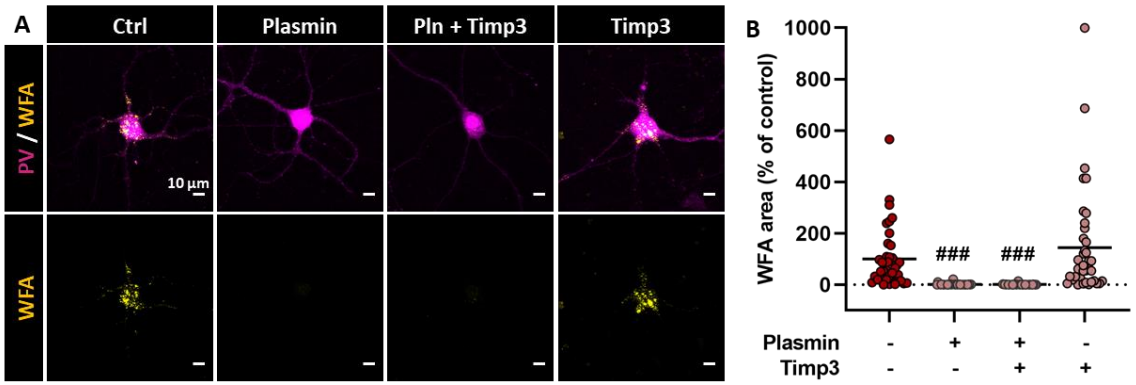
(A) Perineuronal nets-like expression in MGE-derived interneurons in vitro. Immunofluorescent staining of neurons at DIV14 with antibodies against WFA (yellow), aggrecan (cyan), HABP (white) and PV (magenta). (B) Chondroitinase ABC (ChABC) treatment during 24h enable a complete removal of PNN-like revealed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





Supplementary Figure 4: Endogenous tPA drives plasminogen conversion into plasmin

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



Supplementary Figure 5: tPA/plasmin mediated PNN degradation is MMP-independent
MGE-derived WT interneuron cultures were treated at DIV14 with plasmin (200 nM) and TIMP3 (60 nM) and processed 24h later for immunocytochemistry. (A) Representative images of immunocytochemical stainings for PV (magenta) and WFA (yellow) 24h after treatment. (B) Quantitative analysis of WFA positive area show that plasmin reduces WFA staining whereas TIMP3 treatment has no effect on plasmin-dependent PNN degradation. Graph show mean ± sem (n=30-40 cells from 4 independent experiments). Kruskall-Wallis test followed by Dunn's post-hoc test for multiple comparisons; ###: p<0,001 (compared to Control). Scale bar: 10 µm.

REFERENCES

Adhami, F., Yu, D., Yin, W., Schloemer, A., Burns, K. A., Liao, G., et al. (2008). Deleterious effects of plasminogen activators in neonatal cerebral hypoxia-ischemia. Am. J. Pathol. 172, 1704–1716. doi:10.2353/ajpath.2008.070979.

Alaiyed, S., McCann, M., Mahajan, G., Rajkowska, G., Stockmeier, C. A., Kellar, K. J., et al. (2020). Venlafaxine stimulates an MMP-9-dependent increase in excitatory/inhibitory balance in a stress model of depression. J. Neurosci. 40, 4418–4431. doi:10.1523/JNEUROSCI.2387-19.2020.

Balmer, T. S. (2016). Perineuronal nets enhance the excitability of fast-spiking neurons. eNeuro 3, 745–751. doi:10.1523/ENEURO.0112-16.2016.

Baranes, D., Lederfein, D., Huang, V. Y., Chen, M., Bailey, C. H., and Kandel, E. R. (1998). Tissue plasminogen activator contributes to the late phase of LTP and to synaptic growth in the hippocampal mossy fiber pathway. Neuron 21, 813–825. doi:10.1016/S0896-6273(00)80597-8.

Bartoletti, A., Medini, P., Berardi, N., and Maffei, L. (2004). Environmental enrichment prevents effects of dark-rearing in the rat visual cortex. Nat. Neurosci. 7, 215–216. doi:10.1038/nn1201.

Benchenane, K., Castel, H., Boulouard, M., Bluthé, R., Fernandez-Monreal, M., Roussel, B. D., et al. (2007). Anti-NR1 N-terminal-domain vaccination unmasks the crucial action of tPA on NMDA-receptor-mediated toxicity and spatial memory. J. Cell Sci. 120, 578–585. doi:10.1242/jcs.03354.

Bruno Cauli, Etienne Audinat, Bertrand Lambolez, Maria Cecilia Angulo, Nicole Ropert, Keisuke Tsuzuki, et al. (1997). Molecular and Physiological Diversity of Cortical Nonpyramidal Cells. J. Neurosci. 17, 3894 –3906.

Bukhari, N., Torres, L., Robinson, J. K., and Tsirka, S. E. (2011). Axonal regrowth after spinal cord injury via chondroitinase and the tissue plasminogen activator (tPA)/plasmin system. J. Neurosci. 31, 14931–14943. doi:10.1523/JNEUROSCI.3339-11.2011.

Cabungcal, J. H., Steullet, P., Morishita, H., Kraftsik, R., Cuenod, M., Hensch, T. K., et al. (2013). Perineuronal nets protect fast-spiking interneurons against oxidative stress. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 110, 9130–9135. doi:10.1073/pnas.1300454110.

Carstens, K. E., Phillips, M. L., Lucas Pozzo-Miller, X., Weinberg, R. J., and Dudek, S. M. (2016). Perineuronal Nets Suppress Plasticity of Excitatory Synapses on CA2 Pyramidal Neurons. J. Neurosci. doi:10.1523/JNEUROSCI.0245-16.2016.

Cauli, B., Audinat, E., Lambolez, B., Angulo, M. C., Ropert, N., Tsuzuki, K., et al. (1997). Molecular and physiological diversity of cortical nonpyramidal cells. J. Neurosci. 17, 3894–3906. doi:10.1523/jneurosci.17-10-03894.1997.

Cauli, B., Porter, J. T., Tsuzuki, K., Lambolez, B., Rossier, J., Quenet, B., et al. (2000). Classification of fusiform neocortical interneurons based on unsupervised clustering. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 97, 6144–6149. doi:10.1073/pnas.97.11.6144.

Chattopadhyaya, B., Di Cristo, G., Higashiyama, H., Knott, G. W., Kuhlman, S. J., Welker, E., et al. (2004). Experience and activity-dependent maturation of perisomatic GABAergic innervation in primary visual cortex during a postnatal critical period. J. Neurosci. 24, 9598–9611. doi:10.1523/JNEUROSCI.1851-04.2004.

Chen, C. C., Chu, P., and Brumberg, J. C. (2015). Experience-dependent regulation of tissue-type plasminogen activator in the mouse barrel cortex. Neurosci. Lett. 599, 152–157. doi:10.1016/j.neulet.2015.05.050.

Chu, P., Chen, E., Bajnath, A., and Brumberg, J. C. (2015). Cell type specificity of tissue plasminogen activator in the mouse barrel cortex. Data Br. 4, 332–335. doi:10.1016/j.dib.2015.06.008.

Devienne, G., Gac, B. Le, Piquet, J., and Cauli, B. (2018). Single Cell Multiplex Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction After. J Vis Exp. 1–12. doi:10.3791/57627.

Devienne, G., Picaud, S., Cohen, I., Piquet, J., Tricoire, L., Testa, D., et al. (2019). Regulation of perineuronal nets in the adult cortex by the electrical activity of parvalbumin interneurons. bioRxiv 671719. doi:10.1101/671719.

Dityatev, A., Brückner, G., Dityateva, G., Grosche, J., Kleene, R., and Schachner, M. (2007). Activity-dependent formation and functions of chondroitin sulfate-rich extracellular matrix of perineuronal nets. Dev. Neurobiol. 67, 570–588. doi:10.1002/dneu.20361.

Fawcett, J. W., Oohashi, T., and Pizzorusso, T. (2019). The roles of perineuronal nets and the perinodal extracellular matrix in neuronal function. Nat. Rev. Neurosci. 20, 451–465. doi:10.1038/s41583-019-0196-3.

Franchi, S. A., Macco, R., Astro, V., Tonoli, D., Savino, E., Valtorta, F., et al. (2018). A method to culture GABAergic interneurons derived from the medial ganglionic eminence. Front. Cell. Neurosci. 11, 423. doi:10.3389/fncel.2017.00423.

Frischknecht, R., Heine, M., Perrais, D., Seidenbecher, C. I., Choquet, D., and Gundelfinger, E. D. (2009). Brain extracellular matrix affects AMPA receptor lateral mobility and short-term synaptic plasticity. Nat. Neurosci. 12, 897–904. doi:10.1038/nn.2338.

Gogolla, N., Caroni, P., Lüthi, A., and Herry, C. (2009). Perineuronal Nets Protect Fear Memories from Erasure. Science 325, 1258–1261. Available at: www.sciencemag.org.

Happel, M. F. K., Niekisch, H., Castiblanco Rivera, L. L., Ohl, F. W., Deliano, M., and Frischknecht, R. (2014). Enhanced cognitive flexibility in reversal learning induced by removal of the extracellular matrix in auditory cortex. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 111, 2800–2805. doi:10.1073/pnas.1310272111.

Hébert, M., Anfray, A., 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. doi:10.1093/cercor/bhw275.

Howell, M. D., and Gottschall, P. E. (2012). Lectican proteoglycans, their cleaving metalloproteinases, and plasticity in the central nervous system extracellular microenvironment. Neuroscience 217, 6–18. doi:10.1016/j.neuroscience.2012.05.034.

Joeh, and WARD, J. (1963). Hierarchical grouping to optimize an objective function. Div. Aerosp. Med. Force, Lackl. Air.

Kawaguchi, Y. (1993). Physiological, morphological, and histochemical characterization of three classes of interneurons in rat neostriatum. J. Neurosci. 13, 4908–4923. doi:10.1523/jneurosci.13-11-04908.1993.

Kelly, E. A., Russo, A. S., Jackson, C. D., Lamantia, C. E. L., and Majewska, A. K. (2015). Proteolytic regulation of synaptic plasticity in the mouse primary visual cortex: Analysis of matrix metalloproteinase 9 deficient mice. Front. Cell. Neurosci. 9. doi:10.3389/fncel.2015.00369.

Korotkova, T., Fuchs, E. C., Ponomarenko, A., von Engelhardt, J., and Monyer, H. (2010). NMDA Receptor Ablation on Parvalbumin-Positive Interneurons Impairs Hippocampal Synchrony, Spatial Representations, and Working Memory. Neuron 68, 557–569. doi:10.1016/j.neuron.2010.09.017.

Lambolez, B., Audinat, E., Bochet, P., Crépel, F., and Rossier, J. (1992). AMPA receptor subunits expressed by single purkinje cells. Neuron 9, 247–258. doi:10.1016/0896-6273(92)90164-9.

Lemarchant, S., Pomeshchik, Y., Kidin, I., Kärkkäinen, V., Valonen, P., Lehtonen, S., et al. (2016). ADAMTS-4 promotes neurodegeneration in a mouse model of amyotrophic lateral sclerosis. Mol. Neurodegener. 11, 1–24. doi:10.1186/s13024-016-0078-3.

Lenoir, S., Varangot, A., Lebouvier, L., Galli, T., Hommet, Y., and Vivien, D. (2019). Post-synaptic release of the neuronal tissue-type plasminogen activator (tPA). Front. Cell. Neurosci. 13. doi:10.3389/fncel.2019.00164.

Lensjø, K. K., Lepperød, M. E., Dick, G., Hafting, T., and Fyhn, M. (2017). Removal of perineuronal nets unlocks juvenile plasticity through network mechanisms of decreased inhibition and increased gamma activity. J. Neurosci. 37, 1269–1283. doi:10.1523/JNEUROSCI.2504-16.2016.

Leonetti, C., Macrez, R., Pruvost, M., Hommet, Y., Bronsard, J., Fournier, A., et al. (2017). Tissue-type plasminogen activator exerts EGF-like chemokinetic effects on oligodendrocytes in white matter (re)myelination. Mol. Neurodegener. 12. doi:10.1186/s13024-017-0160-5.

Lim, L., Mi, D., Llorca, A., and Marín, O. (2018). Neuron Review Development and Functional Diversification of Cortical Interneurons. Neuron doi:10.1016/j.neuron.2018.10.009.

Liot, G., Roussel, B. D., Lebeurrier, N., Benchenane, K., López-Atalaya, J. P., Vivien, D., et al. (2006). Tissue-type plasminogen activator rescues neurones from serum deprivation-induced apoptosis through a mechanism independent of its proteolytic activity. J. Neurochem. 98, 1458–1464. doi:10.1111/j.1471-4159.2006.03982.

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

Louessard, M., Bardou, I., Lemarchand, E., Thiebaut, A. M., Parcq, J., Leprince, J., et al. (2017). Activation of cell surface GRP78 decreases endoplasmic reticulum stress and neuronal death. Cell Death Differ. 24, 1518–1529. doi:10.1038/cdd.2017.35.

Louessard, M., Lacroix, A., Martineau, M., Mondielli, G., Montagne, A., Lesept, F., et al. (2016). Tissue Plasminogen Activator Expression Is Restricted to Subsets of Excitatory Pyramidal Glutamatergic Neurons. Mol. Neurobiol. 53, 5000–5012. doi:10.1007/s12035-015-9432-7.

Macrez, R., Ortega, M. C., Bardou, I., Mehra, A., Fournier, A., Van Der Pol, S. M. A., et al. (2016). Neuroendothelial NMDA receptors as therapeutic targets in experimental autoimmune encephalomyelitis. Brain. doi:10.1093/brain/aww172.

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

Madinier, A., Quattromani, M. J., Sjölund, C., Ruscher, K., and Wieloch, T. (2014). Enriched housing enhances recovery of limb placement ability and reduces aggrecan-containing perineuronal nets in the rat somatosensory cortex after experimental stroke. PLoS One 9. doi:10.1371/journal.pone.0093121.

Maes, M. E., Colombo, G., Schulz, R., and Siegert, S. (2019). Targeting microglia with lentivirus and AAV: Recent advances and remaining challenges. Neurosci. Lett. 707. doi:10.1016/j.neulet.2019.134310.

Mataga, N., Mizuguchi, Y., and Hensch, T. K. (2004). Experience-dependent pruning of dendritic spines in visual cortex by tissue plasminogen activator. Neuron 44, 1031–1041. doi:10.1016/j.neuron.2004.11.028.

Mataga, N., Nagai, N., and Hensch, T. K. (2002). Permissive proteolytic activity for visual cortical plasticity. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 99, 7717–7721. doi:10.1073/pnas.102088899.

Matys, T., Pawlak, R., Matys, E., Pavlides, C., McEwen, B. S., and Strickland, S. (2004). Tissue plasminogen activator promotes the effects of corticotropin- releasing factor on the amygdala and anxiety-like behavior. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 101, 16345–16350. doi:10.1073/pnas.0407355101.

Mehra, A., Guérit, S., Macrez, R., Gosselet, F., Sevin, E., Lebas, H., et al. (2020). Nonionotropic action of endothelial NMDA receptors on blood–brain barrier permeability via Rho/ROCK-mediated phosphorylation of myosin. J. Neurosci. 40, 1778–1787. doi:10.1523/JNEUROSCI.0969-19.2019.

Merienne, N., Le Douce, J., Faivre, E., Déglon, N., and Bonvento, G. (2013). Efficient gene delivery and selective transduction of astrocytes in the mammalian brain using viral vectors. Front. Cell. Neurosci. 7, 106. doi:10.3389/fncel.2013.00106.

Miyata, S., Nishimura, Y., and Nakashima, T. (2007). Perineuronal nets protect against amyloid β-protein neurotoxicity in cultured cortical neurons. Brain Res. 1150, 200–206. doi:10.1016/j.brainres.2007.02.066.

Müller, C. M., and Griesinger, C. B. (1998). Tissue plasminogen activator mediates reverse occlusion plasticity in visual cortex. Nat. Neurosci. 1, 47–53. doi:10.1038/248.

Murthy, S., Kane, G. A., Katchur, N. J., Lara Mejia, P. S., Obiofuma, G., Buschman, T. J., et al. (2019). Perineuronal Nets, Inhibitory Interneurons, and Anxiety-Related Ventral Hippocampal Neuronal Oscillations Are Altered by Early Life Adversity. Biol. Psychiatry 85, 1011–1020. doi:10.1016/j.biopsych.2019.02.021.

Nicole, O., Docagne, F., Ali, C., 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. doi:10.1038/83358.

Orlando, C., Ster, J., Gerber, U., Fawcett, J. W., and Raineteau, O. (2012). Perisynaptic chondroitin sulfate proteoglycans restrict structural plasticity in an integrin-dependent manner. J. Neurosci. 32, 18009–18017. doi:10.1523/JNEUROSCI.2406-12.2012.

Pasquet, N., Douceau, S., Naveau, M., Lesept, F., Louessard, M., Lebouvier, L., et al. (2019). Tissue-Type Plasminogen Activator Controlled Corticogenesis Through a Mechanism Dependent of NMDA Receptors Expressed on Radial Glial Cells. Cereb. Cortex 29. doi:10.1093/cercor/bhy119.

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

Pizzorusso, T., Medini, P., Berardi, N., Chierzi, S., Fawcett, J., and Maffei, L. (2002). Reactivation of Ocular Dominance Plasticity in the Adult Visual Cortex. Science. 298, 1248–1251.

Pu, H., Shi, Y., Zhang, L., Lu, Z., Ye, Q., Leak, R. K., et al. (2019). Protease-independent action of tissue plasminogen activator in brain plasticity and neurological recovery after ischemic stroke. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 116, 9115–9124. doi:10.1073/pnas.1821979116.

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

Romberg, C., Yang, S., Melani, R., Andrews, M. R., Horner, A. E., Spillantini, M. G., et al. (2013). Depletion of perineuronal nets enhances recognition memory and long-term depression in the perirhinal cortex. J. Neurosci. 33, 7057–7065. doi:10.1523/JNEUROSCI.6267-11.2013.

Sallés, F. J., and Strickland, S. (2002). Localization and regulation of the tissue plasminogen activator-plasmin system in the hippocampus. J. Neurosci. 22, 2125–2134. doi:10.1523/jneurosci.22-06-02125.2002.

Sappino, A. P., Madani, R., Huarte, J., Belin, D., Kiss, J. Z., Wohlwend, A., et al. (1993). Extracellular proteolysis in the adult murine brain. J. Clin. Invest. 92, 679–685. doi:10.1172/JCI116637.

Shi, W., Wei, X., Wang, X., Du, S., Liu, W., Song, J., et al. (2019). Perineuronal nets protect long-term memory by limiting activity-dependent inhibition from parvalbumin interneurons. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 116, 27063–27073. doi:10.1073/pnas.1902680116.

Siao, C. J., and Tsirka, S. E. (2002). Tissue Plasminogen Activator Mediates Microglial Activation via Its Finger Domain through Annexin II. J. Neurosci. 22, 3352–3358. doi:10.1523/jneurosci.22-09-03352.2002.

Slaker, M., Churchill, L., Todd, R. P., Blacktop, J. M., Zuloaga, D. G., Raber, J., et al. (2015). Removal of perineuronal nets in the medial prefrontal cortex impairs the acquisition and reconsolidation of a cocaine-induced conditioned place preference memory. J. Neurosci. 35, 4190–4202. doi:10.1523/JNEUROSCI.3592-14.2015.

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

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

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

Sumi, Y., Dent, M., Seeley, J., and Morris, R. J. (1992). The expression of tissue and urokinase plasminogen activators in neural development suggests different modes of proteolytic involvement in neuronal growth. Development 116, 625-37. PMID: 1289056.

Testa, D., Prochiantz, A., and Di Nardo, A. A. (2019). Perineuronal nets in brain physiology and disease. Semin. Cell Dev. Biol. 89, 125–135. doi:10.1016/j.semcdb.2018.09.011.

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

Thorndike, R. L. (1953). Who belongs in the family? Psychometrika, 267–276.

Tsirka, S. E., Rogove, A. D., Bugge, T. H., Degen, J. L., and Strickland, S. (1997). An extracellular proteolytic cascade promotes neuronal degeneration in the mouse hippocampus. J. Neurosci. 17, 543–552. doi:10.1523/jneurosci.17-02-00543.1997.

Wang, D., and Fawcett, J. (2012). The perineuronal net and the control of cns plasticity. Cell Tissue Res. 349, 147–160. doi:10.1007/s00441-012-1375-y.

Wang, W. Y., Xu, G. Z., Tian, J., and Sprecher, A. J. (2009). Inhibitory effect on LPS-induced retinal microglial activation of downregulation of t-pa expression by siRNA interference. Curr. Eye Res. 34, 476–484. doi:10.1080/02713680902916108.

Wen, T. H., Afroz, S., Reinhard, S. M., Palacios, A. R., Tapia, K., Binder, D. K., et al. (2018). Genetic Reduction of Matrix Metalloproteinase-9 Promotes Formation of Perineuronal Nets Around Parvalbumin-Expressing Interneurons and Normalizes Auditory Cortex Responses in Developing Fmr1 Knock-Out Mice. Cereb. Cortex 28, 3951–3964. doi:10.1093/cercor/bhx258.

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

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

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

Fundings

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

Discussion

1. Implication d'ADAMTS-4 dans l'évolution de l'infarctus cérébral : un lien dans la dégradation enzymatique des PNNs ? (étude 1)

1.1 Effet de l'entraînement physique

Dans cette première étude, nous avions émis l'hypothèse qu'un entraînement physique intense faciliterait la récupération post-ischémique en dégradant les PNNs en périphérie de la lésion. En effet, les PNNs sont des structures dynamiques sensibles aux stimuli sensoriels. D'ailleurs, l'exposition des animaux à un environnement enrichi après une ischémie, accroît la dégradation des PNNs en périphérie de la lésion ischémique (Quattromani *et al.,* 2018) **(Figure 31)**.

Dans notre étude, l'entraînement consistait à faire courir les animaux sur un tapis roulant, 6 jours par semaine (20cm/sec en vitesse maximale), pendant 3 semaines. Ce protocole, réalisé avant l'ischémie, s'est avéré protecteur en réduisant la taille de l'infarctus et les déficits neurologiques mesurés par neuroscore (Endres *et al.,* 2003). Nous montrons que, si ce protocole est réalisé après l'ischémie, celui-ci n'améliore ni la récupération fonctionnelle mesurée par le Grip-test, ni la résorption de l'œdème **(Figure 37)**. De plus, nos souris entraînées ne présentent pas modification de la densité ou de la composition des PNNs dans le cortex somatosensoriel (région lésée) et moteur (région la plus stimulée par l'entraînement) **(Figure 39/39/40)**.

Une étude révèle que l'entraînement physique forcé accroît le stress des animaux, par rapport à une activité physique volontaire (Svensson *et al.,* 2016). Or, nous savons que le stress est délétère dans l'ischémie cérébrale, en favorisant la production de radicaux libres (Balkaya *et al.,* 2011) et/ou en augmentant l'hypertension (Iida *et al.,* 2005 ; Ruohonen *et al.,* 2009). Ainsi, il est possible que les potentiels effets bénéfiques induits par l'entraînement physique forcé soient contrebalancés par une hausse du stress, à la différence de l'activité volontaire retrouvée au sein de l'environnement enrichi. Afin de vérifier cette hypothèse, il aurait été judicieux de mesurer le taux de corticostérone fécale entre nos souris entraînées et non entraînées. Outre le stress, nous pouvons également imaginer que l'intensité de notre entraînement physique n'était pas optimale pour induire un effet dans ce modèle ischémique transitoire.

1.2 Effet protecteur d'ADAMTS-4 dans l'infarctus

L'objectif principal de cette étude était de déterminer l'implication d'ADAMTS-4 endogène dans l'ischémie cérébrale. Nous montrons que l'absence d'ADAMTS-4 accroît la taille de l'infarctus à 24h (+50%), aussi bien dans un modèle d'ischémie focale permanente **(Figure 34)**, que dans un modèle d'ischémie transitoire thromboembolique **(Figure 35)**. Cet effet protecteur s'accompagne d'un retard de la récupération fonctionnelle chez les souris déficientes en ADAMTS-4, par rapport à leurs homologues sauvages **(Figure 37)**. Néanmoins, ce retard n'est pas associé avec modification de la densité ou de la composition des PNNs **(Figure 39/39/40)**, une structure décrite pour inhiber la récupération fonctionnelle (Pizzorusso *et al.,* 2002, 2006 ; Madinier *et al.,* 2014). Nous montrons ainsi qu'ADAMTS-4 endogène est protecteur dans l'ischémie cérébrale, en limitant la progression de l'infarctus.

L'infarctus cérébral est causé par un œdème cytotoxique (mort excitotoxique) (Ayata and Ropper, 2002), et un œdème vasogénique provoqué par des processus inflammatoires, tels que l'infiltration des macrophages (Gidday *et al.,* 2005; Yang and Rosenberg, 2016 ; Drieu *et al.,* 2019). Cependant, l'injection intraveineuse d'ADAMTS-4 permet de réduire l'astrogliose et l'infiltration des macrophages en périphérie de l'infarctus, dans un modèle ischémique permanent (Lemarchant *et al.,* 2016a). De manière intéressante, Cross et collaborateurs montrent que l'ischémie cérébrale accroît le transcrit d'ADAMTS-4 à 6 et 24h (Cross *et al.,* 2006a). J'émets donc l'hypothèse qu'ADAMTS-4 produit en réponse à l'ischémie, réduit l'infarctus cérébral en limitant la réponse inflammatoire vasculaire et parenchymateuse.

Afin de vérifier cette hypothèse, il serait intéressant de réaliser une étude comparative du nombre de leucocytes infiltrés à 24h, au sein et en périphérie de la lésion ischémique, entre des souris sauvages et déficientes en ADAMTS-4. Cette analyse pourrait être couplée à un suivi longitudinal de l'inflammation par imagerie moléculaire. Cette méthode non invasive, repose sur la détection en IRM de billes de fer couplées à un anticorps dirigé contre une molécule d'adhésion, telle qu'ICAM-1 (*InterCellular Adhesion Molecule*) ou VCAM-1 (*Vascular Cell Adhesion Molecule*) (Gauberti *et al.,* 2018). Afin de cibler plus spécifiquement le rôle d'ADAMTS-4 sur l'infiltration des macrophages, nous pourrions également injecter des billes de fer phagocytées par des macrophages à différents temps post-ischémique, comme décrit par Drieu et collaborateurs (Drieu *et al.,* 2019). Enfin, il est également

possible d'étudier la perméabilité de la BHE en injectant du bleu Evans, ou un agent fluorescent détecté par la suite en imagerie non invasive *via* le NIRF (*Near Infrared Fluorescence*).

Outre ces différentes idées d'expériences, nous avons débuté des analyses visant à mieux caractériser les différents types cellulaires exprimant ADAMTS-4 dans un contexte ischémique, ainsi que les mécanismes responsables de cette expression.

*1.2.1 Expression vasculaire d'*ADAMTS-4

Au laboratoire, nous disposons de souris Adts4$^{-/-}$ exprimant de la β-Galactosidase (β-Gal) sous le contrôle du promoteur d'ADAMTS-4. En raison de sa localisation nucléaire, la détection de cette protéine rapportrice permet d'identifier indirectement les différents types cellulaires exprimant ADAMTS-4. Ainsi, nous avons montré qu'en condition basale, seuls les oligodendrocytes expriment ADAMTS-4 (Pruvost *et al.,* 2017). Néanmoins, l'expression d'ADAMTS-4 est également observée par les astrocytes après une ischémie cérébrale (Zamanian *et al.,* 2012) et les neurones dans un contexte excitotoxique (Yuan *et al.,* 2002). Nos observations préliminaires révèlent la présence de β-Gal au sein des vaisseaux de l'infarctus principalement entre 1 et 10 jours après une ischémie focale permanente **(Figure 44)**. La présence de β-Gal a également été observée dans quelques vaisseaux 12h après ischémie (données non montrées). L'ischémie focale permanente pourrait donc induire une expression vasculaire d'ADAMTS-4, entre 12 et 24h après l'ischémie. Il serait pertinent de compléter ces analyses pour quantifier la cinétique d'expression de la β-Gal dans la lésion, et ceci dans nos deux modèles d'ischémie.

De manière intéressante, la β-Gal semble être localisée dans les trois tuniques des vaisseaux, suggérant une expression vasculaire d'ADAMTS-4 par différents types cellulaires **(Figure 44)**. Ceci serait cohérent avec l'expression du transcrit ou de la protéine ADAMTS-4 par des lignées de cellules endothéliales et par les cellules musculaires lisses dans des tissus de patients atteints par de l'athérosclérose (Hsu *et al.,* 2012 ; Pelisek *et al.,* 2015). Il serait donc intéressant de vérifier par immunohistochimie, la présence de la β-Gal dans ces deux types cellulaires après une ischémie, sans oublier l'étude d'autres types cellulaires dont les astrocytes, les neurones et la microglie.

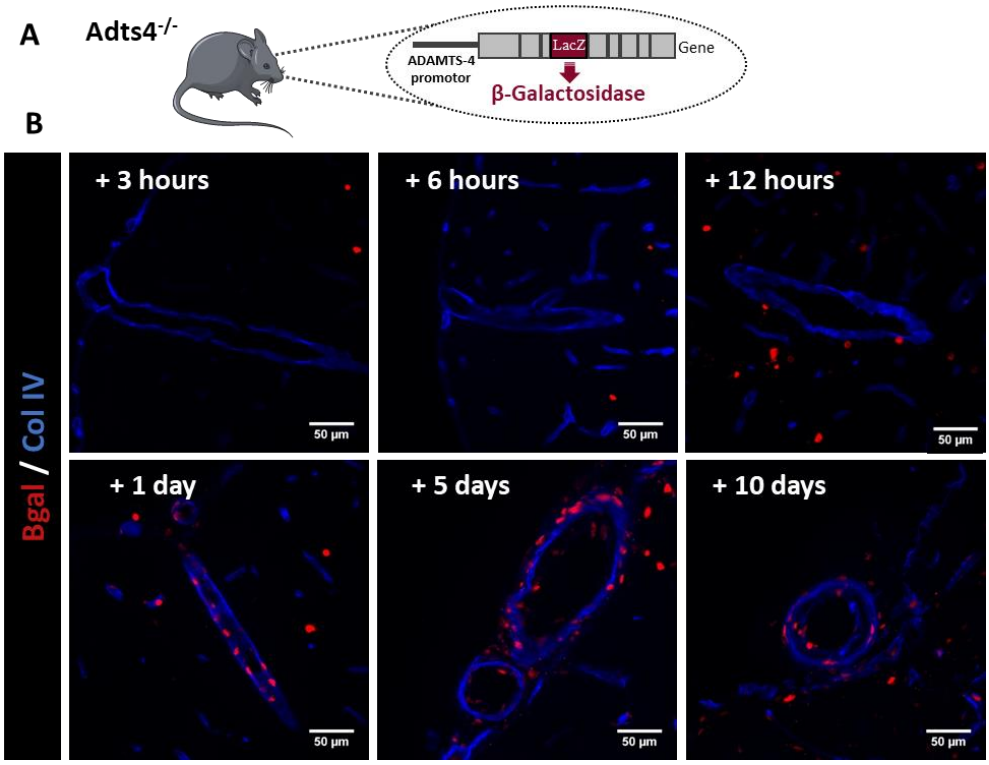


Figure 44 : Expression vasculaire d'ADAMTS-4 au sein de la lésion ischémique.
A) Représentation schématique d'une souris Adts4$^{-/-}$ exprimant de la β-Galactosidase sous le contrôle du promoteur d'ADAMTS-4. B) Immunohistochimies de la lésion ischémique quelques heures (3, 6, 12, et 24h) et plusieurs jours (5 et 10 jours) après électrocoagulation de l'ACM chez la souris Adts4$^{-/-}$; révélant la β-Galactosidase (en rouge) et la lame basale des vaisseaux (Col IV, en bleu). Échelle de 50 µm.

*1.2.2 Régulation de l'expression vasculaire d'*ADAMTS-4

Nos données préliminaires suggèrent qu'ADAMTS-4 est exprimée par les vaisseaux de l'infarctus cérébral. Cette expression pourrait être régulée par deux grands mécanismes cellulaires de l'ischémie, à savoir l'excitotoxicité et l'inflammation (Dirnagl *et al.,* 1999 ; Khoshnam *et al.,* 2017). En effet, Yuan et collaborateurs démontrent que l'excitotoxicité, induite par une injection intraparenchymateuse de kaïnate, accroît l'expression transcriptionnelle d'ADAMTS-4 dans plusieurs régions cérébrales, dont le cortex (Yuan *et al.,* 2002). De plus, nos travaux préliminaires suggèrent qu'une injection de LPS (1mg/ml) dans le péritoine accroît non seulement l'expression d'ADAMTS-4 dans le cortex, mais conduit également à une expression vasculaire **(Figure 45)**.

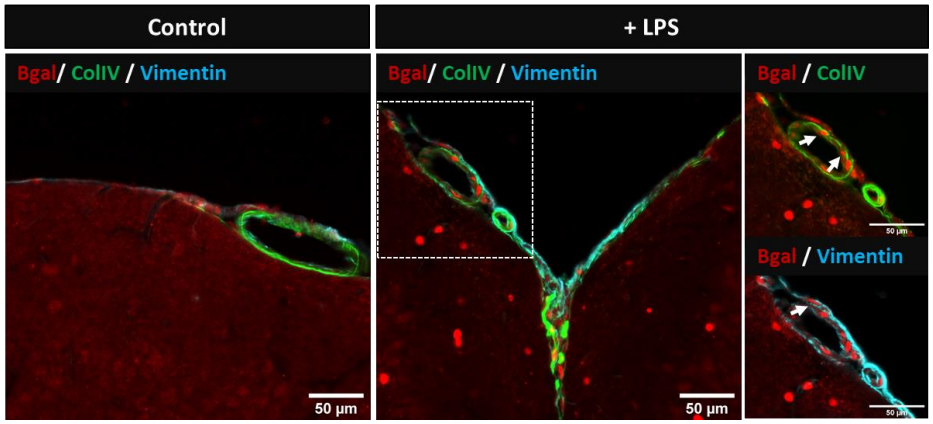


Figure 45 : L'inflammation induit l'expression vasculaire d'ADAMTS-4.
Immunohistochimies du cortex moteur, dirigées contre la β-Galactosidase (en rouge), la lame basale (Col IV, en vert) et les fibroblastes des méninges (Vimentine, en cyan), 24 heures après injection intrapéritonéale de sérum physiologique (contrôle) ou de LPS (1mg/ml), chez des souris Adts4$^{-/-}$. Les flèches blanches désignent les différentes localisations de la β-Galactosidase au sein de la paroi vasculaire. Échelle de 50 µm.

1.2.3 ADAMTS-4 et inflammation : une boucle de rétrocontrôle potentielle ?

Précédemment, j'ai émis l'hypothèse selon laquelle ADAMTS-4 endogène limite la progression de l'infarctus en réduisant l'infiltration des macrophages dans le parenchyme. De manière intéressante, nos données préliminaires confortent cette hypothèse. En effet, nous venons de voir que l'inflammation participe à l'expression vasculaire d'ADAMTS-4. Outre le LPS, plusieurs cytokines pro-inflammatoires (TNF, IFN-γ et IL-1) sont décrites pour augmenter l'expression d'ADAMTS-4, par les macrophages et les astrocytes (Cross *et al.,* 2006b, 2006a ; Wagsäter *et al.,* 2008 ; Ashlin *et al.,* 2013 ; Ren *et al.,* 2013). L'inflammation apparaît donc comme un mécanisme crucial pour accroître l'expression d'ADAMTS-4. Si mon hypothèse est exacte, il pourrait exister une boucle de rétrocontrôle, dans laquelle l'inflammation régule l'expression d'ADAMTS-4, notamment vasculaire, afin que cette dernière limite l'infiltration des macrophages au sein de la lésion ischémique.

1.2.4 Le versican vasculaire : une cible enzymatique d'ADAMTS-4 dans l'ischémie ?

À ce jour, le versican est le seul CSPG à avoir été observé au sein des vaisseaux (Stanton *et al.,* 2011). Dans un modèle de sclérose en plaques, l'expression du versican (V0 et V1) est accrue et facilite l'infiltration des leucocytes au sein de la moelle épinière (Stephenson *et al.,* 2018). Nous pouvons

donc envisager qu'ADAMTS-4 limite l'infiltration des macrophages dans l'ischémie (Lemarchant *et al.,* 2016a), en dégradant le versican (V0 et V1) des vaisseaux. Afin de vérifier cette hypothèse, nous pourrions mesurer l'intensité de marquage de versican (V0 et V1) au sein des vaisseaux de l'infarctus entre nos deux souches de souris.

1.2.5 Un effet indépendant de la dégradation des PNNs ?

Nous avons voulu déterminer si ADAMTS-4 endogène, seule ou couplée à une rééducation intensive, module la dégradation des PNNs dans la phase tardive des AVC ischémiques. En effet, les effets de l'environnement enrichi sur la dégradation des PNNs après une ischémie, s'accompagnent d'une augmentation de l'activité de protéases matricielles (Quattromani *et al.,* 2018). Nos données montrent que l'absence d'ADAMTS-4 ne modifie pas la densité et la composition des PNNs dans la phase tardive des AVC ischémiques. Néanmoins, il est possible que notre analyse soit trop tardive pour observer une dégradation des PNNs. En effet, Karetko et collaborateurs montrent que l'ischémie cérébrale réduit le nombre de PNNs péri-lésionnels entre le 1er et le 7ème jour post-ischémique. Au-delà du 7ème jour, le nombre de PNNs augmente progressivement, suggérant alors la formation de nouveaux PNNs (Karetko-Sysa *et al.,* 2011). Il serait donc intéressant de comparer la densité des PNNs péri-lésionnels sur les 7 premiers jours post-ischémiques, entre nos deux souches. Cette idée est confortée par l'augmentation de l'expression protéique d'ADAMTS-4 à 3, 5 et 8 jours après une ischémie cérébrale (Cross *et al.,* 2006a ; Lemarchant *et al.,* 2016a), ainsi que par nos données préliminaires sur l'expression vasculaire d'ADAMTS-4 à des temps plus précoces.

2. Implication d'ADAMTS-4 dans l'AVC hémorragique : les anévrismes intracrâniens

Une étude du laboratoire montre que le tPA endogène participe à la formation des anévrismes intracrâniens (AI), *via* son activité protéolytique. Des observations immunohistochimiques ont également permis de révéler une forte présence de tPA au sein de la paroi anévrismale (Labeyrie *et al.,* 2017). Comme nous l'avons vu précédemment, à forte concentration, le tPA peut cliver la forme zymogène d'ADAMTS-4 (Lemarchant *et al.,* 2014). Au vu de nos données préliminaires sur l'expression vasculaire d'ADAMTS-4 en condition inflammatoire, nous avons voulu déterminer si ADAMTS-4 participe à la formation et/ou la rupture des AI.

2.1 Présentation des AI

Les AI correspondent à des dilatations de la paroi artérielle, provoquées par une perte de la lame élastique interne et par l'apoptose des cellules musculaires lisses qui forment la *media*. Touchant 2 à 5% de la population générale, la complication la plus redoutée des AI est leur rupture, souvent associée à une hémorragie sous-arachnoïdienne. Bien que la plupart des AI restent silencieux, la rupture anévrismale conduit à une mortalité dans 50% des cas et une morbidité de 30 à 50% chez les survivants (Texakalidis et al., 2019). À ce jour, les seules approches thérapeutiques sont extravasculaires par la pose chirurgicale d'un clip ou endovasculaires en remplissant la poche anévrismale de coils. Bien qu'efficaces, ces deux approches comportent également un risque non négligeable de morbidité (Chalouhi *et al.,* 2013 ; Taheri *et al.,* 2015).

Les mécanismes à l'origine de la formation, la croissance et la rupture des AI restent encore mal connus. Néanmoins, plusieurs études démontrent que l'inflammation serait le principal facteur responsable de la pathogenèse des AI (Frösen *et al.,* 2004 ; Kanematsu *et al.,* 2011). L'hypothèse générale suggère que l'inflammation est induite par les forces hémodynamiques qui agressent la paroi vasculaire. L'inflammation permettrait alors la dégradation de la lame basale *via* les MMPs, tout en favorisant l'apoptose des cellules musculaires lisses (Aoki *et al.,* 2007 ; Chalouhi *et al.,* 2013 ; Texakalidis *et al.,* 2019).

2.2 ADAMTS-4 : un effet bénéfique dans la formation et/ou rupture des AI ?

Afin d'étudier le rôle d'ADAMTS-4 endogène dans la pathogenèse des AI, nous avons réalisé un modèle d'AI sporadique chez des souris sauvages et déficientes en ADAMTS-4. Ce modèle consiste à

dégrader la lame basale en injectant de l'élastase dans la citerne basale, et à augmenter l'hypertension *via* l'implantation sous cutanée d'une pompe osmotique remplie d'Angiotensine II (Nuki *et al.*, 2009). Nos données montrent que l'absence d'ADAMTS-4 réduit significativement le taux de mortalité provoquée par la rupture d'AI (-30%). De plus, le nombre de souris formant des AI est nettement inférieur chez les souris déficientes en ADAMTS-4 par rapport aux souris contrôles (-51%). Parmi les souris formant des AI, 80% d'entre elles présentent un AI rompu contre 20% de non rompu, et ce, pour les deux souches. De plus, le nombre moyen d'AI formés entre nos deux souches est identique **(Figure 46)**. Ainsi, dans la pathologie anévrismale, ADAMTS-4 serait délétère en favorisant la formation des AI.

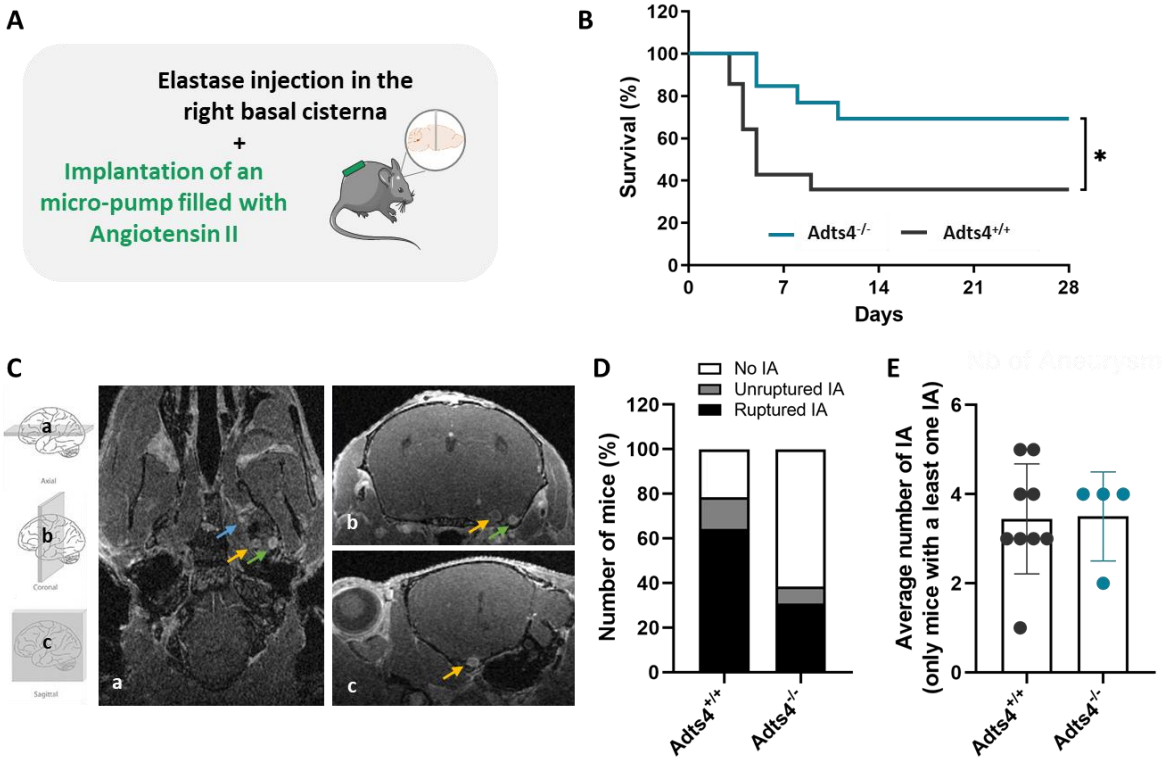


Figure 46 : L'absence d'ADAMTS-4 réduit la formation des AI.

A) Représentation schématique du modèle d'AI chez la souris, qui consiste en une injection d'élastase dans la citerne basale droite couplée à une implantation sous cutanée d'une pompe osmotique remplie d'Angiotensine II. B) Pourcentage de mortalité provoquée par la rupture d'AI chez les souris Adts4$^{+/+}$ et Adts4$^{-/-}$. (Test de Mantel-Cox, * : p<0,05 ; n=14 pour les souris Adts4$^{+/+}$ et n=13 pour les souris Adts4$^{-/-}$). C) Acquisition IRM obtenue par une séquence pondérée améliorée pour le contraste T1 3D. Les flèches de chaque couleur désignent l'emplacement d'un AI sacciforme dans 3 axes différents. D) Pourcentage du nombre de souris Adts4$^{+/+}$ et Adts4$^{-/-}$ présentant une rupture d'AI, un ou plusieurs AI non rompus et aucun AI sur 28 jours. E) Nombre moyen d'AI chez les souris avec au minimum un AI. (Moyenne ± SD ; Mann-Whitney, p>0,05 ; n=9 pour les souris Adts4$^{+/+}$ et n=4 pour les souris Adts4$^{-/-}$).

Afin de compléter nos résultats, nous pourrions évaluer la contribution d'ADAMTS-4 circulant en augmentant son taux, en utilisant une méthode de transfection hydrodynamique avant d'induire le modèle d'AI. La transfection hydrodynamique permet de transfecter *in vivo* les hépatocytes par un plasmide codant pour une protéine d'intérêt, afin d'augmenter de manière constante et stable la synthèse de cette protéine (Anfray *et al.,* 2019). Nous pourrions alors vérifier si l'incidence des AI est plus élevée chez les souris surexprimant ADAMTS-4 par rapport à des souris contrôles. Dans le même principe, nous pourrions charger nos pompes osmotiques avec de l'Angiotensine II et de l'ADAMTS-4 recombinant. Cette méthode de diffusion d'ADAMTS-4 a déjà été utilisée et s'est avérée efficace dans un modèle de traumatisme médullaire (Tauchi *et al.,* 2012).

De manière intéressante, l'effet délétère d'ADAMTS-4 endogène dans la formation des AI est similaire à celui de MMP-9. En effet, l'incidence des AI chez les souris déficientes en MMP-9 est réduite de 57% par rapport à des souris sauvages. L'utilisation d'un inhibiteur à la large spectre de MMPs (la doxycycline) réduit, quant à elle, l'incidence de 85% (Nuki *et al.,* 2009). Nos données sont également cohérentes avec celles de Ren et collaborateurs, qui montrent qu'ADAMTS-4 endogène favorise le développement des anévrismes aortiques en dégradant le versican des vaisseaux, en facilitant l'infiltration des leucocytes et en participant à l'apoptose (Ren *et al.,* 2017).

*2.2.1 Un mécanisme d'action commun d'*ADAMTS-4 *pour tous les anévrismes ?*

Au vu des résultats de Ren et collaborateurs, il serait judicieux de vérifier si les mécanismes d'action d'ADAMTS-4 dans la pathogenèse anévrismale aortique, s'applique aussi aux AI (Ren *et al.,* 2017). Afin de répondre à cette question, nous avons entrepris une analyse préliminaire visant à observer l'expression d'un fragment vasculaire de versican (V0 et V1) produit par le clivage des ADAMTS-1, -4 et -5. Il est possible de cibler ce fragment en immunohistochimie, en utilisant un anticorps dirigé contre la séquence d'acide aminée (DPEAAE) retrouvée en amont du site de clivage des ADAMTS sur versican. Dans nos deux génotypes, cet anticorps révèle une accumulation massive du fragment de versican (V0 et V1) dans la paroi anévrismale, reconnaissable par l'absence des cellules musculaires lisses et l'altération de la lame basale **(Figure 47)**.

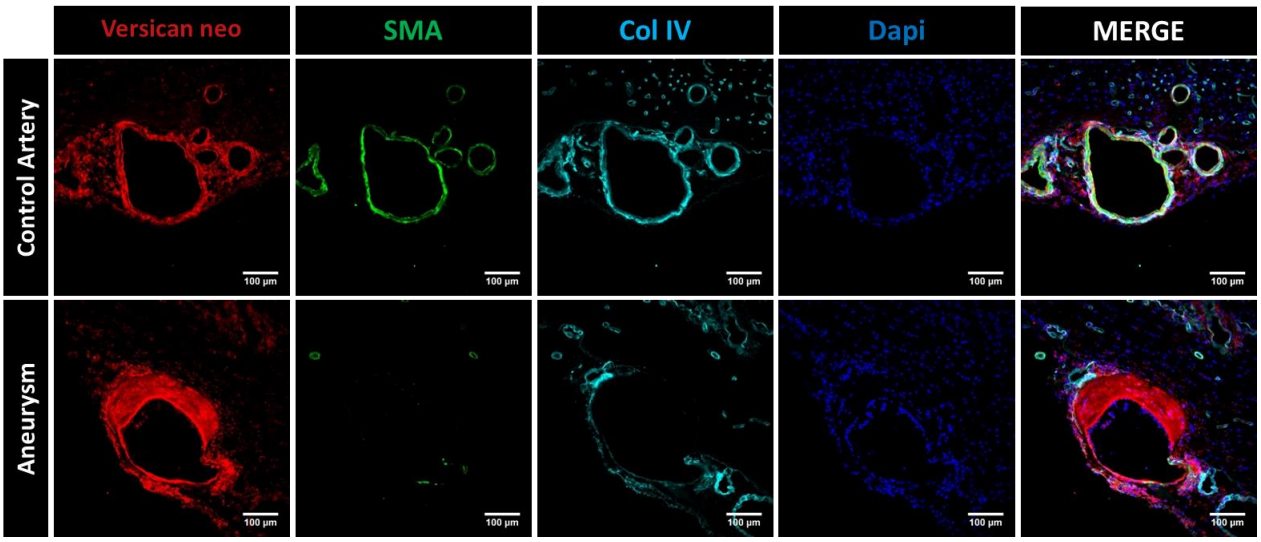


Figure 47 : Accumulation d'un fragment de versican dans la paroi vasculaire.
Analyses immunohistochimiques dirigées contre un fragment de versican (Versican neo, en rouge), les cellules musculaires lisses (SMA, en vert), la lame basale (Col IV, en cyan) sur une artère cérébrale saine et sur un AI chez la souris. Les noyaux sont révélés par le Dapi (en bleu). Échelle de 100 µm.

Il serait nécessaire de constituer une banque protéique d'artères saines et d'AI, issus de souris sauvages et déficientes en ADAMTS-4. Cette banque permettrait de confirmer les observations immunohistochimiques et de comparer la quantité du fragment de versican (V0 et V1) par rapport à sa forme complète. Ainsi, nous pourrions déterminer si cette accumulation du fragment est due à une surexpression de la forme complète de versican. En parallèle, nous pourrions également quantifier la caspase-3 par immunoempreinte et réaliser un test TUNEL entre nos deux génotypes. Cette mesure de l'apoptose nous permettrait d'avoir une idée de l'implication d'ADAMTS-4 dans la dégénérescence des cellules musculaires lisses. Finalement, nous pourrions quantifier par immunohistochimie le nombre de leucocytes au sein et en périphérie des AI entre des souris Adts4$^{+/+}$ et Adts4$^{-/-}$.

*2.2.2 Expression d'*ADAMTS-4 *dans les AI*

Nous nous sommes également penchés sur l'expression d'ADAMTS-4 dans la pathologie anévrismale. En ciblant la β-Gal dans des AI formés chez des souris Adts4$^{-/-}$, nos données révèlent pour la première fois, la présence d'ADAMTS-4 au cœur et en périphérie des AI **(Figure 48)**. Au sein des AI, la β-Gal est retrouvée dans des cellules plates et allongées, caractéristiques des cellules endothéliales. Malheureusement, l'utilisation de différents anticorps marquant les cellules endothéliales en

conditions basales (VWF et CD31), s'est avérée inefficace pour confirmer cette expression endothéliale. Nous observons également une expression périphérique de la β-Gal par les fibroblastes reconnus ici par un anticorps anti-vimentine. Cette accumulation de fibroblastes témoigne de la mise en place d'une fibrose (Marbacher *et al.,* 2014). De manière intéressante, ce profil d'expression est très similaire à celui observé chez les souris injectées au LPS **(Figure 45)**.

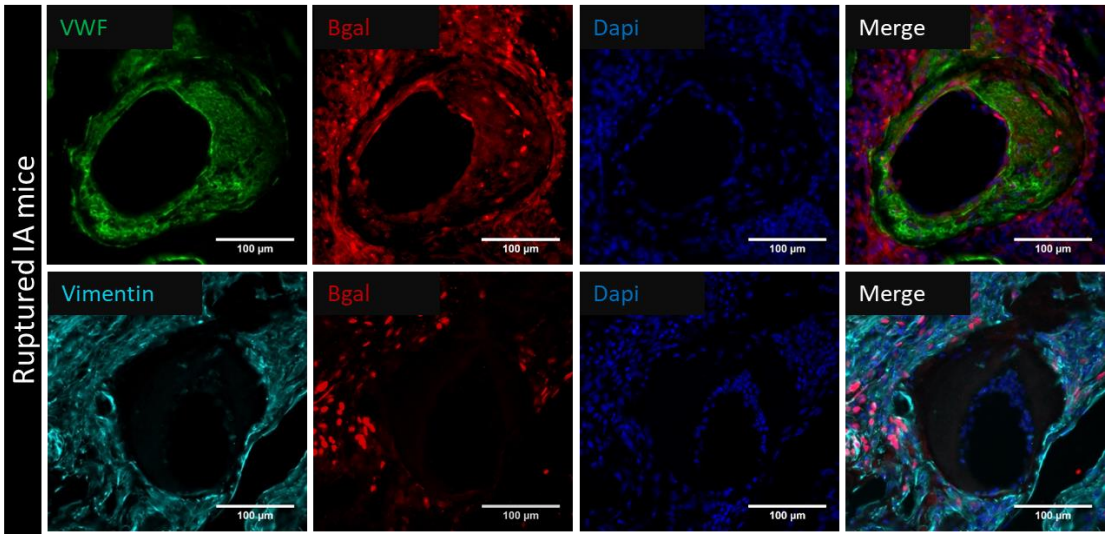


Figure 48 : ADAMTS-4 est exprimée au cœur et en périphérie des AI.
Immunohistochimies dirigées contre le facteur de Von-Willebrand (VWF, en vert), les fibroblastes (Vimentine, en cyan) et la β-Galactosidase (en rouge) sur des AI issus de souris présentant une rupture d'AI. Les noyaux sont révélés par le Dapi (en bleu). Échelle de 100 µm.

Afin de mieux comprendre les mécanismes d'action d'ADAMTS-4 dans la pathogenèse anévrismale, il serait intéressant d'identifier si l'expression vasculaire d'ADAMTS-4 précède celle des AI, ou si à l'inverse, la formation des AI précède celle d'ADAMTS-4. En raison du caractère sporadique et du faible nombre de souris Adts4$^{-/-}$ formant des AI, nous n'avons pas réussi à trouver d'AI en formation caractérisée par une prolifération des cellules musculaires lisses (Kosierkiewicz *et al.,* 1994), et ce, malgré des analyses immunohistochimiques sur les cerveaux de souris prélevés 2 et 5 jours après l'induction du modèle d'AI.

2.3 ADAMTS-4 : un marqueur prédictif des AI en clinique ?

Plusieurs études démontrent que la concentration sanguine d'ADAMTS-4 augmente chez des patients victimes d'athérosclérose ou d'anévrismes aortiques thoraciques (Zha *et al.,* 2010 ; Chen *et al.,* 2011 ; Ren *et al.,* 2013 ; Li *et al.,* 2017). Sachant qu'ADAMTS-4 est exprimée par les AI, nous nous sommes demandés si le taux plasmatique d'ADAMTS-4 pouvait servir de biomarqueur dans la détection des AI. Afin de répondre à cette question, une étude clinique a débuté au CHU de Caen, grâce au soutien financier de la Fondation Planiol. Cette étude vise à mesurer par ELISA le taux plasmatique d'ADAMTS-4, de patients hospitalisés pour une prise en charge d'un AI. À ce jour, environ 25 échantillons plasmatiques ont été prélevés chez des patients présentant une rupture d'AI et 15 échantillons chez des patients présentant un ou plusieurs AI non rompus.

2.4 ADAMTS-4 : une protéase d'intérêt pour les AVC

Mes travaux de thèse montrent qu'ADAMTS-4 joue un rôle à la fois protecteur et délétère pour les AVC. En effet, nous venons de voir qu'un plus grand nombre de souris forme des AI en présence d'ADAMTS-4. À l'inverse, sa présence durant la phase aigüe des AVC ischémiques réduit l'infarctus cérébral. De manière intéressante, l'inflammation semble jouer un rôle crucial dans l'expression et les fonctions d'ADAMTS-4. En effet, tandis que Ren et collaborateurs montrent qu'ADAMTS-4 favorise l'infiltration des leucocytes à la fois *in vitro* et dans un modèle d'anévrismes aortiques (Ren *et al.,* 2013, 2017), Lemarchant et collaborateurs montrent que l'injection intraveineuse d'ADAMTS-4 réduit l'infiltration des macrophages et le nombre d'astrocytes en périphérie de la lésion ischémique (Lemarchant *et al.,* 2016a). L'ambivalence de ces effets place ADAMTS-4 comme une actrice clef des AVC et l'étude de ses différents mécanismes d'action pourrait permettre le développement de nouvelles stratégies thérapeutiques.

3. Le tPA originaire des interneurones à parvalbumine contrôle le remodelage des réseaux périneuronaux (étude 2)

3.1 Expression du tPA au sein du SNC

3.1.1 AAV-Plat-GFP : une nouvelle approche moléculaire pour étudier le tPA

Au sein du SNC, l'expression du tPA est originaire de divers types cellulaires, dont les neurones (Siao *et al.,* 2003 ; Louessard *et al.,* 2016). En raison de son transport vésiculaire le long des dendrites et des axones, la caractérisation des différentes populations neuronales impliquées dans la synthèse du tPA est compliquée et imprécise. À ce jour, les approches ayant permis de contourner cette limite, ont consisté à bloquer le transport axonal du tPA *via* l'utilisation de colchicine, ou à utiliser des souris transgéniques exprimant de la β-Galactosidase sous contrôle du promoteur Plat (Louessard *et al.,* 2016 ; Stevenson and Lawrence, 2018).

Dans notre seconde étude, nous avons choisi d'utiliser une approche virale afin de caractériser les populations neuronales exprimant le tPA. Ainsi, l'injection d'AAV-9 codant pour une protéine GFP sous contrôle du promoteur Plat (AAV-Plat-GFP) dans le gyrus denté de l'hippocampe, révèle une expression du rapporteur GFP par les cellules granulaires et les fibres moussues. Par ailleurs, nous observons une co-localisation entre l'expression du rapporteur GFP et le marquage anti-tPA dans les fibres moussues. Ces observations sont en accord avec les données de la littérature (Louessard *et al.,* 2016 ; Stevenson and Lawrence, 2018), validant la spécificité de notre AAV-Plat-GFP **(Figure 1 de l'article)**.

3.1.2 Expression du tPA par les interneurones PV enveloppés de PNNs

Nous avons cherché à caractériser les types cellulaires exprimant le tPA dans le cortex somatosensoriel, une région dans laquelle la détection immunohistochimique du tPA n'est possible qu'avec un traitement à la colchicine. Ainsi, l'injection des AAV-Plat-GFP dans cette région révèle que seuls les neurones expriment le rapporteur GFP. En effet, ni les astrocytes et ni la microglie n'expriment le rapporteur GFP en condition physiologique ou suite à l'injection de LPS dans le cortex somatosensoriel **(Figures 2/S1 de l'article)**. Alves et collaborateurs montrent *via* un vecteur exprimant de la GFP sous contrôle d'un promoteur ubiquitaire, que seuls les neurones et les astrocytes peuvent

être infectés par les AAV-9 (Su *et al.,* 2016). Ainsi, par cette approche, nous montrons que les astrocytes n'expriment pas le tPA, à la différence des neurones.

Par la suite, nous avons cherché à identifier les sous-types neuronaux exprimant le tPA. Nos analyses immunohistochimiques révèlent que 37% des neurones infectés exprimant le rapporteur GFP sont GABA positifs, dont 27% d'interneurones PV **(Figures 2 de l'article)**. L'expression du tPA par les interneurones PV a ensuite été confirmée par de l'électrophysiologie couplée à de la *single-cell* RT-PCR, sur des neurones issus des couches IV et V du cortex visuel **(Figure 3 de l'article)**.

En dehors des interneurones PV, la littérature rapportent que deux familles d'interneurones expriment du tPA, à savoir les interneurones à somatostatine ou à VIP (Fredriksson *et al.,* 2015 ; Stevenson and Lawrence, 2018). En raison du manque de spécificité de nos anticorps, nous n'avons pas pu vérifier si les 10% restants de neurones GABA positifs exprimant le rapporteur GFP appartiennent à l'une ou l'autre de ces deux familles. En dehors des interneurones, nous observons également une expression du tPA par des neurones excitateurs marqués par Tbr1 **(Figure S2 de l'article)**, en accord avec l'étude de Louessard et collaborateurs (Louessard *et al.,* 2016).

Comme nous l'avons décrit auparavant, les PNNs enveloppent majoritairement les interneurones PV (Kosaka and Heizmann, 1989 ; Lüth *et al.,* 1992 ; Rossier *et al.,* 2015). Nous avons donc cherché à déterminer si les interneurones exprimant le rapporteur GFP sont enveloppés de PNNs, et nous montrons que c'est le cas pour 76% des neurones **(Figures 2 de l'article)**. Ainsi, nos données montrent pour la première fois que les interneurones enveloppés de PNNs expriment du tPA.

3.2 Le tPA régule la dégradation des PNNs, *via* la conversion du plasminogène en plasmine

3.2.1 In vivo

Afin d'étudier le rôle du tPA endogène sur la modulation des PNNs *in vivo*, nous avons généré une nouvelle souche de souris transgéniques sélectivement déficientes en tPA dans les interneurones PV (cKO : tPA Flox$^{+/+}$; PV Cre$^{+/-}$), en croisant des souris tPA Flox$^{+/+}$ avec des souris exprimant de la Cre sous contrôle d'un promoteur spécifique à la parvalbumine. En comparant cette nouvelle souche à des souris contrôles (tPA Flox$^{-/-}$; PV Cre$^{+/-}$), nous observons dans le cortex somatosensoriel un nombre identique d'interneurones PV entourés de PNNs. Nos analyses révèlent cependant une intensité plus importante du marquage WFA, associée à la présence d'une population de PNNs à la structure plus

dense chez les cKO, par rapport aux souris contrôles **(Figure 4 de l'article)**. Ainsi, l'absence de tPA spécifiquement dans les interneurones PV affecte la structure des PNNs.

Pour observer les PNNs du cortex somatosensoriel, nous nous sommes servis de la lectine WFA. Cette lectine reconnaît spécifiquement les chaînes CS-GAG des CSPGs, retrouvées au sein des PNNs (Berretta *et al.,* 2015). Néanmoins, il existe une variabilité importante du nombre de chaînes CS-GAG en fonction du CSPG, pouvant aller de trois chaînes pour le brevican à cent chaînes pour l'aggrecan (Stanton *et al.,* 2011) **(Figure 4)**. Il serait donc intéressant de vérifier si la composition en CSPGs varie en fonction des différentes populations de PNNs observées chez nos souris.

3.2.2 In vitro

Dans un modèle de culture enrichie en interneurones, nous montrons que la plasmine et non le tPA seul permet la dégradation des PNNs *in vitro*. Nous retrouvons des résultats similaires en présence de plasminogène. De manière intéressante, le plasminogène ne permet pas la dégradation des PNNs dans des cultures issues de souris déficientes en tPA. Ainsi, ces données suggèrent que le tPA produit par les interneurones, régule la dégradation des PNNs en présence de plasminogène **(Figure 5 de l'article)**.

3.2.2.1 La plasmine dégrade les PNNs par le clivage d'aggrecan

Par la suite, nous avons cherché à élucider ce mécanisme de dégradation. Nous avons pu mettre en évidence au sein des PNNs *in vitro*, la présence de deux composants indispensables à leur structure, à savoir l'AH et l'aggrecan **(Figure S3 de l'article)**. De manière intéressante, l'administration de plasmine réduit le marquage d'aggrecan au sein des PNNs *in vitro*. Ces données sont confortées par des tests caractérisant le clivage d'aggrecan recombinant. En effet, la plasmine clive le corps protéique d'aggrecan entre les domaines G1 et G2 *via* deux sites de clivages différents **(Figure 6 de l'article)**. L'un des sites (générant les fragments de 65 et 55 kDa) semble correspondre au site prédictif proposé par Kiani et collaborateurs (Kiani *et al.,* 2002). Cette expérience a été réalisée grâce à une protéine recombinante d'aggrecan correspondant uniquement à ses domaines G1-G2. Ainsi, il est donc probable que la plasmine possède plus de deux sites de clivage pour aggrecan.

Nous n'excluons pas la possibilité que cette dégradation passe également par le clivage des autres CSPGs. En effet, il a été démontré que la plasmine clive aussi le neurocan, le versican (V0 etV1) et le phosphacan (Wu *et al.,* 2000 ; Kenagy *et al.,* 2002). De plus, tous ces CSPGs sont exprimés par les neurones **(Tableau 2)**. Il serait donc intéressant de vérifier la présence de ces CSPGs au sein de nos PNNs *in vitro* en présence ou non de plasmine, par immunocytochimie.

3.2.2.2 Une dégradation directe et indirecte des PNNs par la plasmine ?

Afin de consolider nos données sur la dégradation des PNNs par la plasmine, nous avons cherché à vérifier si ce mécanisme est (in)dépendant des MMPs. En plus d'être exprimées par les neurones (Gottschall and Deb, 1996), les MMPs sont également activées par la plasmine (Hahn-Dantona *et al.,* 1999 ; Davis *et al.,* 2001 ; Monea *et al.,* 2002). Dans nos cultures, la plasmine dégrade aussi bien les PNNs en présence ou non de TIMP-3 (un inhibiteur à large spectre des MMPs et des ADAMTS) **(Figure S5 de l'article)**, suggérant un mécanisme de dégradation indépendant des MMPs et des ADAMTS. Néanmoins, il est possible que la concentration de la plasmine soit trop élevée et masque un effet des MMPs. Il serait donc intéressant de renouveler l'expérience de dégradation en présence ou non de TIMP-3, en utilisant une concentration plus basse de plasmine.

Outre une expression neuronale, les MMPs peuvent aussi être exprimées par les astrocytes (Gottschall and Deb, 1996). Les astrocytes sont notamment décrits pour servir de surface d'activation du plasminogène en plasmine, et peuvent réguler la concentration de tPA par un mécanisme d'endocytose et de libération (Briens *et al.,* 2017). Afin de déterminer si la plasmine peut à la fois dégrader les PNNs directement et indirectement *via* l'activation des MMPs, il serait intéressant de réitérer nos expériences de dégradation en présence de TIMP-3, en utilisant cette fois-ci des cultures mixtes de neurones et d'astrocytes.

En dehors des MMPs, les ADAMTS sont connues pour cliver les CSPGs (Howell and Gottschall, 2012). De manière intéressante, le tPA, à forte concentration, clive la forme zymogène d'ADAMTS-4 (Lemarchant *et al.,* 2014). Ainsi, dans un contexte pathologique, le tPA pourrait réguler la dégradation des PNNs par la plasmine (voie directe), qui elle-même pourrait activer les MMPs (voie indirecte) et/ou par l'activation d'ADAMTS-4 (voie indirecte) **(Figure 49)**.

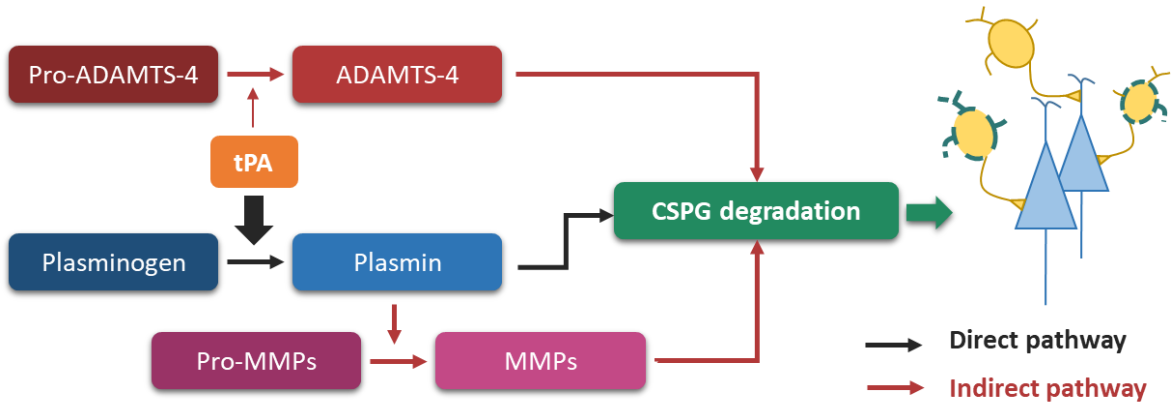


Figure 49 : Système potentiel de régulation du tPA sur la dégradation des PNNs.

3.2.3 Expression du plasminogène

Comme nous venons de le voir, le tPA produit dans nos cultures d'interneurones régule la dégradation des PNNs, en convertissant le plasminogène en plasmine. *In vivo*, l'absence de tPA spécifiquement dans les interneurones PV favorise la formation de PNNs à la structure plus dense. De manière intéressante, l'expression du plasminogène est réalisée par les neurones pyramidaux et potentiellement les interneurones PV (Lochner *et al.*, 1998, 2006 ; Lenoir *et al.*, 2019). Je pense donc qu'en absence de tPA synthétisé par les interneurones PV, la conversion du plasminogène en plasmine est localement réduite, ce qui favorise la formation de PNNs aux structures denses. À l'heure actuelle, nos données *in vitro* ne sont pas en faveur de cette hypothèse. En effet, l'administration seule d'aprotinine (un inhibiteur de la plasmine à large spectre) n'accroît pas le marquage des PNNs révélés par la lectine WFA, après 24h d'incubation. Cet effet pourrait être lié à la faible activité de la plasmine retrouvée dans nos cultures d'interneurones **(Figure 5 de l'article)**. Afin de vérifier si la source d'expression principale du plasminogène est les neurones pyramidaux, il serait judicieux de comparer l'activité enzymatique du plasminogène dans nos cultures avec celle mesurée sur des cultures de neurones corticaux enrichies en neurones excitateurs.

3.3 Implication du tPA dans les fonctions physiologiques des PNNs

3.3.1 Plasticité cérébrale

Comme nous l'avons vu précédemment, plusieurs éléments montrent un rôle dans tPA dans la période critique du cortex visuel. En effet, l'absence de tPA dans le cortex visuel induit une réduction de la dominance oculaire (OD), en réponse à une privation monoculaire (MD) (Mataga *et al.,* 2002). Des résultats identiques sont observés chez les souris déficientes en plasminogène (Mataga *et al.,* 2004). De manière intéressante, une MD induit non seulement un remodelage (intensité et taille) des PNNs (Kelly *et al.,* 2015), mais accroît également l'activité du tPA (Mataga *et al.,* 2002). Au vu de ces informations, j'émets l'hypothèse selon laquelle le tPA et la plasmine participe au remodelage des PNNs immatures afin d'induire un décalage de l'OD en réponse à une MD. Il serait donc relevant d'étudier la morphologie des PNNs dans le cortex visuel en réponse à une MD, chez des souris sauvages, déficientes en tPA (KO) et cKO. La comparaison des souris KO et cKO permettrait alors d'identifier l'implication du tPA synthétisé par les interneurones PV.

Chez l'adulte, les PNNs retreignent la plasticité cérébrale (Pizzorusso *et al.,* 2002), en limitant notamment la synaptogenèse et la mobilité des épines dendritiques (Pyka *et al.,* 2011 ; Orlando *et al.,* 2012 ; De Vivo *et al.,* 2013). Nous montrons que les souris déficientes spécifiquement en tPA dans les interneurones PV présentent une population de PNNs plus denses dans le cortex somatosensoriel que leurs homologues sauvages. Il serait donc intéressant d'étudier par microscopie confocale la mobilité des épines sur les interneurones PV chez des souris adultes issues de nos deux lignées.

3.3.2 Régulation de l'activité neuronale

De manière intéressante, les PNNs régulent l'excitabilité neuronale en augmentant la fréquence des décharges des interneurones PV (Slaker *et al.,* 2015 ; Balmer, 2016). Cette régulation pourrait être liée aux propriétés polyanioniques des PNNs (Brückner *et al.,* 1993). En effet, en raison de leur structure riche en sucres chargés négativement, les PNNs pourraient agir comme des réservoirs à cations favorisant la dépolarisation des interneurones FS-PV (Härtig *et al.,* 1999). Il serait donc intéressant de réaliser des enregistrements électrophysiologiques entre nos deux lignées de souris, afin de vérifier si la fréquence de décharges des interneurones PV est accrue chez nos souris cKO présentant une population de PNNs plus dense.

3.3.3 Neuroprotection

3.3.3.1 Face au stress oxydatif

Outre des effets inhibiteurs, les PNNs pourraient être neuroprotecteurs face au stress oxydatif (Reinert *et al.,* 2003 ; Morawski *et al.,* 2004 ; Cabungcal *et al.,* 2013). Suttkus et collaborateurs montrent que la délétion de certains composants des PNNs accroît les lésions induites par l'injection de chlorure de fer ($FeCl_3$) (Suttkus *et al.,* 2014). Ainsi, en injectant du chlorure de fer dans le cortex somatosensoriel, nous pourrions déterminer si les souris cKO présentent des lésions réduites par rapport à leurs homologues sauvages, suggérant alors que l'effet protecteur des PNNs dépend de la densité de leur structure.

3.3.3.2 Face à l'excitotoxicité

Le laboratoire a montré que le sc-tPA (tPA simple chaîne) est capable de cliver la sous-unité GluN1 des récepteurs NMDA, ce qui potentialise l'influx calcique au sein des neurones. Ainsi, dans des modèles d'excitotoxicité par administration de NMDA, le sc-tPA accroît la mort neuronale induite par l'administration de NMDA (Nicole *et al.,* 2001 ; Parcq *et al.,* 2012) **(Figure 24)**. De récentes études suggèrent la présence de récepteurs NMDA sur les interneurones PV, avec un rôle, par exemple, dans la régulation des rythmes gamma (Carlén *et al.,* 2012 ; Picard *et al.,* 2019 ; Hudson *et al.,* 2020). Dans notre modèle de cultures enrichie en interneurones, nous montrons la présence des récepteurs NMDA au niveau des interneurones PV, en ciblant la sous-unité GluN2B **(Figure 50)**.

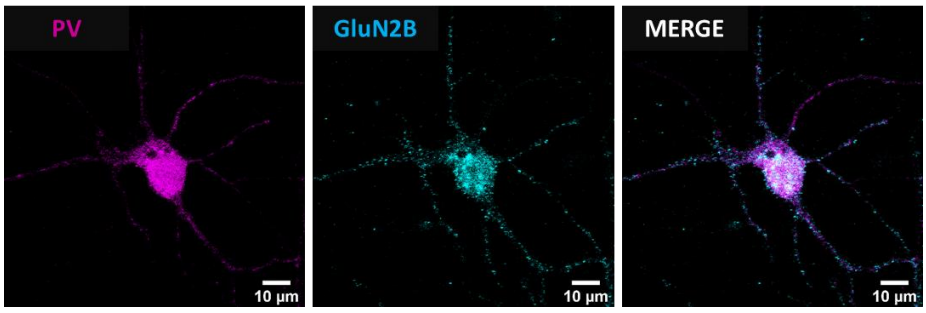


Figure 50 : Expression de la sous-unité GluN2B des récepteurs NMDA dans les interneurones PV.
Immunocytochimie dirigée contre les interneurones PV (en magenta) et la sous-unité GluN2B (en cyan) sur des cultures d'interneurones à DIV14. Échelle de 10 µm.

Par la suite, nous avons cherché à déterminer si l'administration de tPA potentialise la mort excitotoxique induite par du NMDA, dans nos cultures d'interneurones. L'influence des PNNs a également été étudiée par l'ajout ou non de chABC. Nous montrons que l'administration de tPA potentialise la mort excitotoxique induite par le NMDA (+33,33% en présence de PNNs et 65% sans PNNs), sur des cultures d'interneurones. Néanmoins, nous n'observons pas de différence significative entre la condition NMDA et celle prétraitée à la chABC **(Figure 51)**.

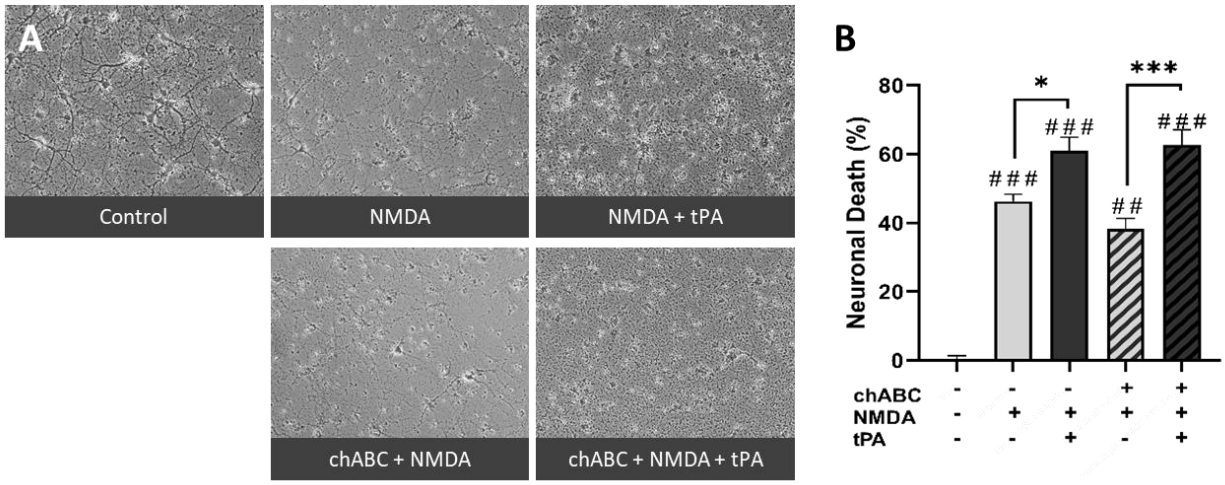


Figure 51 : Le tPA potentialise la mort excitotoxique dans des cultures d'interneurones.
Les cultures d'interneurones ont été pré-traitées à la ChABC pendant 24h. Les cellules ont ensuite été rincées et traitées au NMDA (25 µM) et au tPA (300 nM) pendant 18h. A) Acquisitions des cultures d'interneurones après administration des différents traitements. B) Quantification de la LDH (Lactate déshydrogénase) à partir du milieu de culture (Moyenne ± SD ; Test de Dunn, ## : $p<0,01$, ### : $p<0,001$ (par rapport au contrôle) et * : $p<0,05$; *** : $p<0,001$ (par rapport au traitement NMDA) ; n=20 à partir de 5 expérimentations différentes).

En réalité, il est difficile de déterminer si les PNNs protègent ou non contre l'excitotoxicité *in vitro*. En effet, nos cultures possèdent différents sous-types d'interneurones comprenant au minimum des interneurones à somatostatine (Franchi *et al.*, 2018) et des interneurones PV (données de l'étude 2). Ainsi, les interneurones PV enveloppés de PNNs ne représentent qu'une partie du nombre de cellules mesurées par la LDH (Lactate déshydrogénase). Afin de compléter notre expérience, il serait intéressant de mesurer l'influx calcique en fonction de nos différents traitements. Afin de cibler précisément les interneurones PV en imagerie calcique, nous pourrions transfecter des cellules issues de souris Pv-Cre$^{+/+}$ par un plasmide codant pour une sonde calcique (GCamp) inductible par le recombinase Cre.

3.4 Implication du tPA dans les fonctions pathologiques des PNNs

Comme nous l'avons vu, la dégradation des PNNs représente un intérêt thérapeutique majeur pour améliorer la récupération fonctionnelle dans diverses pathologies, dont les AVC ischémiques. En effet, une déplétion des PNNs en périphérie de l'infarctus est observée dans plusieurs modèles expérimentaux (Hobohm *et al.,* 2005 ; Härtig *et al.,* 2017 ; Dzyubenko *et al.,* 2018). Quattromani et collaborateurs démontrent que l'environnement enrichi favorise la dégradation des PNNs en périphérie de la lésion et améliore la récupération fonctionnelle après un AVC ischémique. Ces effets s'accompagnent notamment par une augmentation de l'expression de plusieurs protéases, dont le tPA (Quattromani *et al.,* 2018). Nous pourrions donc envisager d'étudier la contribution du tPA et de la plasmine dans la dégradation des PNNs après une ischémie cérébrale, entre des souris déficientes en tPA (KO) et sauvages. Néanmoins, en raison de l'expression de ces deux protéases dans le compartiment vasculaire (Collen and Lijnen, 1991), une des limites que nous pourrions rencontrer est l'influence du tPA et du plasminogène vasculaire dans le cas d'une ouverture de la BHE. En réalité, cette limite s'applique dans toutes les pathologies inflammatoires où l'on observe une ouverture de la BHE. Afin de nous affranchir de cette limite, il pourrait s'avérer intéressant d'utiliser des souris déficientes en plasminogène spécifiquement dans le compartiment vasculaire.

Outre les AVC ischémiques, nous pourrions également nous intéresser au rôle du tPA sur la dégradation des PNNs, en réponse aux crises épileptiques. Dans une modèle expérimental, l'induction d'une crise épileptique provoque la déplétion des PNNs enveloppant les interneurones PV corticaux et hippocampiques (McRae and Porter, 2012 ; Pollock *et al.,* 2014). De manière intéressante, les crises épileptiques augmentent l'expression transcriptionnelle du tPA dans l'hippocampe (Qian *et al.,* 1993). De plus, l'absence de tPA accroît la résistance des souris à la survenue des crises épileptiques, induite par l'injection de kaïnate ou de pentylènetétrazole (Tsirka *et al.,* 1995).

3.5 Rôle du tPA exprimé par les interneurones PV

Afin d'identifier le rôle du tPA exprimé par les interneurones PV, nous avons débuté une analyse phénotypique entre des souris cKO (tPA Flox$^{+/+}$; PV Cre$^{+/-}$) et leur contrôles (tPA Flox$^{-/-}$; PV Cre$^{+/-}$), *via* l'*open-field* (anxiété et motricité) et le labyrinthe de Barnes (mémoire spatiale). Ces tests ont été choisis en fonction des différents phénotypes observés chez les souris déficientes en tPA (KO)

(Calabresi *et al.*, 2000 ; Benchenane *et al.*, 2007 ; Obiang *et al.*, 2012) **(cf 3.4.2.4 Les processus cognitifs)**.

Nous montrons que les souris cKO parcourent, pour une même durée, plus de distance que les souris contrôles en périphérie de l'*open-field*. Nous n'observons néanmoins pas de différence sur le labyrinthe de Barnes. Ainsi, nos données préliminaires suggèrent que les souris cKO présentent uniquement un phénotype anxieux **(Figure 52)**. Cependant, ce phénotype devra être confirmé par un autre test mesurant l'anxiété, tel que la boîte claire/sombre.

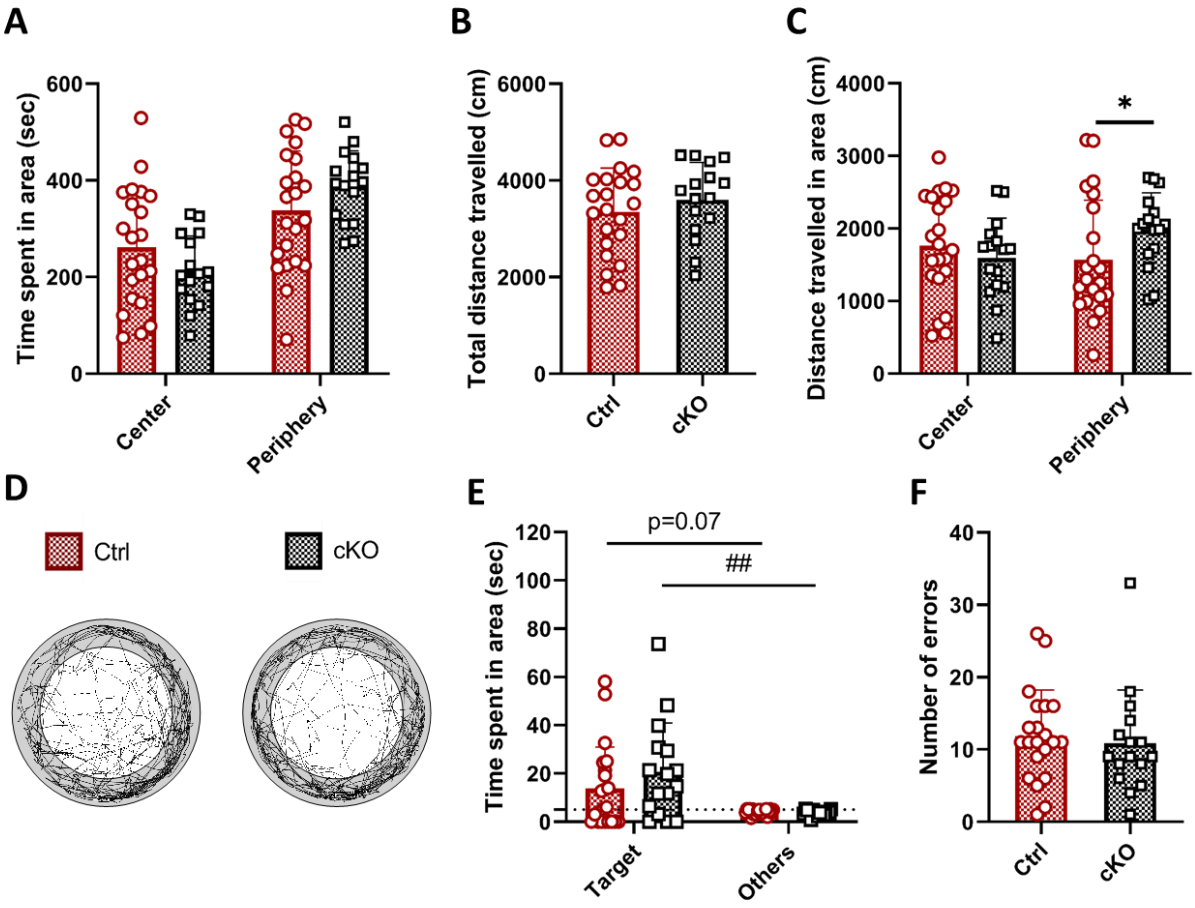


Figure 52 : Caractérisation comportementale des souris cKO.

(A-D) Résultats obtenus pour le test de *l'open-field* chez les souris cKO (tPAflox$^{+/+}$; PV-Cre$^{+/-}$) et leur contrôles (tPA Flox$^{-/-}$; PV Cre$^{+/-}$), montrant : (A) le temps passé, (B) la distance totale et (C) la distance au centre et en périphérie. D) Des tracés représentatifs sont présentés pour les deux génotypes. E) Mesure du temps passé dans les zones du labyrinthe et (I) du nombre d'erreurs (Moyenne ± SD ; Test de Mann-Whitney, * : p<0,05 (par rapport aux souris contrôles) ; Test de Wilcoxon, ## : p<0,01 (par rapport à la condition *Target*) ; n=22 pour les souris contrôles et n=16 pour les cKO).

Ces données pourraient suggérer que le tPA exprimé par les interneurones PV, favorise la transmission glutamatergique. En effet, l'immunisation systémique à l'aide d'un anticorps bloquant l'interaction du tPA avec les récepteurs NMDA, provoque un déficit de mémoire spatiale chez des souris sauvages (Benchenane *et al.,* 2007 ; Obiang *et al.,* 2012). Il serait également intéressant de vérifier si un lien existe entre ce phénotype et les PNNs, en quantifiant le nombre et la densité des PNNs dans des régions impliquées dans l'anxiété, à savoir l'amygdale, l'hippocampe, le cortex préfrontal et l'hypothalamus (Tovote *et al.,* 2015).

Il serait également intéressant de compléter cette caractérisation par un test de mémoire émotionnelle comme le *fear-conditioning.* En effet, le nombre de PNNs augmente à la suite d'un protocole de peur conditionnée et leur déplétion réduit les réponses de peur conditionnée lors d'une phase rappel du test (Banerjee *et al.,* 2017 ; Shi *et al.,* 2019).

Conclusion générale

La première partie de ma thèse a permis d'éclaircir le rôle d'ADAMTS-4 endogène dans la phase aigüe et tardive des AVC ischémiques. Nous montrons qu'ADAMTS-4 endogène est protecteur dans la phase aigüe de l'AVC ischémique, en limitant la progression de l'infarctus cérébral. Cet effet se traduit par une amélioration de la récupération fonctionnelle tardive. Dans la phase tardive des AVC ischémiques, ADAMTS-4, combinée ou non avec un entraînement physique intense, n'influence pas la dégradation des PNNs dans la région lésée (cortex somatosensoriel), ainsi que dans la région la plus stimulée par l'entraînement physique (cortex moteur). Nous montrons dans cette étude, qu'ADAMTS-4 endogène ne module pas la structure des PNNs dans la phase tardive des AVC ischémiques, mais s'avère bénéfique dans la phase aigüe.

La deuxième partie de mon travail de thèse a permis de démontrer l'existence d'un nouveau mécanisme de régulation enzymatique des PNNs en condition physiologique. Nous montrons que le tPA peut être synthétisé par les interneurones PV enveloppés de PNNs. En absence de tPA spécifiquement dans ce type cellulaire, les souris présentent une population de PNNs à la structure plus dense. Nous montrons que l'administration de plasminogène exogène permet la dégradation des PNN*s in vitro*. Néanmoins, cet effet n'est pas retrouvé sur des cultures issues de souris déficientes en tPA, suggérant que le tPA exprimé pas les interneurones *in vitro* régule la dégradation des PNNs par la conversion du plasminogène en plasmine. De plus, nous montrons que la plasmine dégrade les PNNs directement, en clivant le corps protéique d'aggrecan, un CSPG crucial à la structure et aux fonctions des PNNs. Ces travaux démontrent que le tPA régule la dégradation des PNNs, *via* la conversion du plasminogène en plasmine.

Dans l'ensemble, ces travaux de thèse permettent de mieux caractériser les fonctions de deux protéases endogènes du SNC, en démontrant notamment l'existence d'un nouveau mécanisme de régulation des PNNs au fort potentiel thérapeutique.

Autres travaux

Received: 21 February 2017 | Revised: 6 July 2017 | Accepted: 2 August 2017
DOI: 10.1002/glia.23207

GLIA
WILEY

RESEARCH ARTICLE

ADAMTS-4 in oligodendrocytes contributes to myelination with an impact on motor function

Mathilde Pruvost[1] | Matthieu Lépine[1] | Camille Leonetti[1] | Olivier Etard[2,3] | Mikaël Naveau[1,4] | Véronique Agin[1] | Fabian Docagne[1] | Eric Maubert[1] | Carine Ali[1] | Evelyne Emery[1,5] | Denis Vivien[1,6]

[1]Normandie University, UNICAEN, INSERM, UMR-S 1237 Physiopathology and imaging of Neurological disorders, Cyceron, Caen 14000, France
[2]CHU de Caen, Laboratoire des Explorations Fonctionnelles du Système Nerveux, Avenue de la côte de Nacre, Caen F-14000, France
[3]Normandie Univ, UNICAEN, ISTS, 14000 Caen, France
[4]UMS 3408 Support Cyceron, CNR, Universite de Caen Normandie, CHU de Caen, GIP CYCERON, Caen, France
[5]Department of neurosurgery, CHU de Caen, Avenue de la côte de Nacre, Caen F-14000, France
[6]Department of clinical research, CHU de Caen, Avenue de la côte de Nacre, Caen F-14000, France

Correspondence
Denis Vivien, PhD, INSERM UMR-S 1237, Physiopathology and imaging of Neurological disorders, GIP CYCERON, University of Caen Normandie, Bd Becquerel, BP 5229, 14074 Caen Cedex, France.
Email: vivien@cyceron.fr

Funding information
INSERM (French National Institute for Health and Medical Research); Université Caen-Normandie; the Foundation for Medical Research, Grant/Award Number: FRM/FDT20150532690; MESR (the French Ministry of High Education and Research); Agence Nationale de la Recherche, Grant/Award Number: ANR-15-CE16-0010; Fonds Européens de Développement Economique et Régional (EU fundings—FEDER) Normandie

Abstract

Myelination is a late developmental process regulated by a set of inhibitory and stimulatory factors, including extracellular matrix components. Accordingly, chondroitin sulfate proteoglycans (CSPGs) act as negative regulators of myelination processes. A disintegrin and metalloproteinase with thrombospondin motifs type 4 (ADAMTS-4) is an extracellular protease capable of degrading CSPGs. Although exogenous ADAMTS-4 has been proven to be beneficial in several models of central nervous system (CNS) injuries, the physiological functions of endogenous ADAMTS-4 remain poorly understood. We first used *Adamts4/LacZ* reporter mice to reveal that ADAMTS-4 is strongly expressed in the CNS, especially in the white matter, with a cellular profile restricted to mature oligodendrocytes. Interestingly, we evidenced an abnormal myelination in *Adamts4*$^{-/-}$ mice, characterized by a higher diameter of myelinated axons with a shifting g-ratio. Accordingly, lack of ADAMTS-4 is accompanied by motor deficits and disturbed nervous electrical activity. In conclusion, we demonstrate that ADAMTS-4 is a new marker of mature oligodendrocytes contributing to the myelination processes and thus to the control of motor capacities.

KEYWORDS
behaviour, metalloproteinase, myelination, oligodendrocyte, white matter

Abbreviations: ADAMTS, a disintegrin and metalloproteinase with thrombospondin motifs; APC, adenomatous polyposis coli; β-gal, β-galactosidase; BOS, base of support; CNS, central nervous system; ColIV, type-IV Collagen; CSPGs, chondroitin sulfate proteoglycan; ECM, extracellular matrix; GFAP, glial fibrillary acidic protein; Iba-1, ionized calcium-binding adapter molecule-1; KO, knockout; MBP, myelin basic protein; OPC, oligodendrocyte precursor cell; PDGFR-α, platelet-derived growth factor receptor alpha; PLP, proteolipid protein; PTPδ, receptor protein tyrosine phosphatase σ; SEM, standard error of the mean; SEP, somatosensory evoked potentials; WT, wild type.

1 | INTRODUCTION

The myelin sheath, produced by oligodendrocytes in the central nervous system (CNS) enables energy-efficient saltatory conduction and is necessary to maintain axonal integrity and survival (Lappe-siefke et al., 2003). The alteration of myelin is well-known in white matter diseases, such as multiple sclerosis, and is also associated to psychiatric disorders (Fields, 2008) and neurodegenerative diseases such as Alzheimer's

 © 2017 Wiley Periodicals, Inc.

disease (Noble, 2004). Hence, many studies have focused on the understanding of the mechanisms underlying the oligodendrocyte maintenance and ability to remyelinate after damages (Aguirre, Dupree, Mangin, & Gallo, 2007; Arnett et al., 2004; Levine & Reynolds, 1999; Nait-Oumesmar et al., 1999; Nakatani et al., 2013; Zawadzka et al., 2010). However, the developmental regulation of myelination is not yet fully understood. Myelination is a late developmental process that remains dynamic throughout life, contributing to a precise distribution of myelinated axons including the axonal diameter and the thickness of the myelin sheath, also named g-ratio (Chang, Redmond, Chan, Francisco, & Francisco, 2016). During development, oligodendrocyte precursor cells (OPCs) migrate and differentiate to become mature oligodendrocytes, which continue to myelinate later on, even late after birth (Takebayashi & Ikenaka, 2015). Several signalling pathways modulate the complex balance between OPC proliferation and differentiation. For instance, myelination is controlled by a set of inhibitory or stimulatory signals derived from neurons such as growth factors, neurotrophic factors and electrical activity (Bercury & Macklin, 2015). In the meantime, signals from oligodendrocytes to neurons also act to coordinate myelin formation, especially through growth factors production and axonal subdomains organization (Simons & Trajkovic, 2006). Extracellular matrix (ECM) proteins also play important roles in the control of myelination. For instance, chondroitin sulfate proteoglycans (CSPGs) inhibit morphological maturation and process outgrowth of oligodendrocytes, as well as their myelination and remyelination capacities (Lau et al., 2012; Siebert & Osterhout, 2011a). CSPGs constitute a family of large macromolecules composed of a core protein on which one or more glycosaminoglycan chains (GAG) are covalently attached. Many studies have shown their importance in the organization of the ECM in the CNS with critical roles during development and in the adult. From early stages of development through adulthood, an important remodeling of CSPGs contents throughout the CNS occurs, by expression changes as well as regulated proteolysis. These changes contribute to the modulation of major events of development such as neurogenesis, gliogenesis, cell migration, neurite outgrowth, axonal pathfinding, synaptic modulation, and structural plasticity (Bandtlow & Zimmermann, 2000; Bartus, James, Bosch, & Bradbury, 2012; Oohira, Matsui, Tokita, Yamauchi, & Aono, 2000). CSPGs also play important roles under pathological conditions after injuries, such as spinal cord injury or traumatic brain injury, and in several CNS pathologies such as multiple sclerosis (Kucharova, Chang, Boor, Yong, & Stallcup, 2011; Larsen, Wells, Stallcup, Opdenakker, & Yong, 2003), stroke (Bidmon et al., 1997; Hobohm et al., 2005), Alzheimer's disease (Dewitt, Silver, Canning, & Perry, 1993), and epilepsy (Heck, Garwood, Loeffler, Larmet, & Faissner, 2004; Okamoto et al., 2003). Under most of these pathological conditions, reactive astrocytes express high levels of CSPGs of the lectican family (Barnett & Linington, 2013; Camand, Morel, Faissner, Sotelo, & Dusart, 2004; Chen et al., 2010; Dobbertin et al., 2003; Galtrey & Fawcett, 2007; García-Alías, Barkhuysen, Buckle, & Fawcett, 2009). The inhibitory impact of such ECM components on axonal regeneration and neural plasticity is well established (Galtrey & Fawcett, 2007; Gervasi, Kwok, & Fawcett, 2008). It has been shown that the receptor protein tyrosine phosphatase σ (PTPσ), the leukocyte common antigen-related phosphatase as well as the Nogo inhibitor receptors 1 and 3 represent neuronal receptors of CSPGs (Dickendesher et al., 2012; Fisher et al., 2011; Shen et al., 2009) that contribute to the inhibition of neurite outgrowth and axonal regeneration, especially following CNS damages. Moreover, the binding of CSPGs to PTPσ, which is also present on oligodendrocytes, limits myelination by preventing oligodendrocyte process outgrowth, through the Rho kinase pathway (Pendleton et al., 2013). The inhibitory effects of CSPGs can be reversed by degradation of CSPGs through digestion of their GAG chains with the bacterial enzyme Chondroitinase ABC (Bradbury et al., 2002; Moon, Asher, Rhodes, & Fawcett, 2001). Thus, although the contribution of CSPGs during myelination processes is well established, we know little about the endogenous extracellular proteases that are responsible for the processing and turnover of CSPGs. Among the possible candidates, a subset of a large family of extracellular proteases, called a disintegrin and metalloproteinase with thrombospondin motifs (ADAMTS), has been reported to contribute to the cleavage of lecticans. 19 ADAMTS have been identified in Humans and have been shown to act on tissue morphogenesis and their pathophysiological modifications (Kelwick, Desanlis, Wheeler, & Edwards, 2015; Porter, Clark, Kevorkian, & Edwards, 2005). ADAMTSs are expressed throughout the CNS, including the spinal cord, hippocampus, striatum, and cortex (Jungers, Le Goff, Somerville, & Apte, 2005; Matthews et al., 2000; Mayer, Hamel, & Gottschall, 2005; Yuan, Matthews, Sandy, & Gottschall, 2002). The ADAMTS proteases, especially ADAMTS-1, −4, −5, and −9 play roles in the CNS such as neuroplasticity, neuroregeneration, inflammation, and angiogenesis (Gottschall & Howell, 2015; Lemarchant et al., 2013). Among them, ADAMTS-4 (Tortorella et al., 1999) is of particular interest, as recombinant ADAMTS-4 has been reported to degrade CSPGs and to promote functional recovery after spinal cord injuries (Lemarchant et al., 2014; Tauchi et al., 2012). In the mouse CNS, ADAMTS-4 has been described to be at least eight times more expressed than other major ADAMTS proteoglycanases (Lemarchant, Pomeshchik, et al., 2016). Interestingly, ADAMTS-4 was recently reported to be enriched in the proteome of the oligodendrocyte lineage (Sharma et al., 2015).

Here, we postulated that ADAMTS-4 may play a role during physiological myelination and motor control. We therefore explored the possible in vivo influence of ADAMTS-4 in the normal CNS by using heterozygous reporter mice (*Adamts4*$^{-/+}$/*LacZ*$^{+/-}$), homozygous ADAMTS-4 knockout mice (*Adamts4*$^{-/-}$/*LacZ*$^{+/+}$) and wild type mice (WT). We identified ADAMTS-4, a protease well known to degrade CSPGs, as a specific marker of mature oligodendrocytes. Moreover, we demonstrated that the absence of ADAMTS-4 impairs axonal conduction and induces motor deficits in adults, possibly as a consequence of an abnormal myelination process.

2 | MATERIALS AND METHODS

2.1 | Animals

Adamts4$^{+/-}$ (B6.129P2-*Adamts4*^{tm1Dgen}/J) mice were obtained from the Jackson Laboratory (https://www.jax.org/strain/005770) and were

maintained on a C57BL/6J background. *Adamts4* was inactivated by Deltagen Inc. by homologous recombination in embryonic stem cells. The bacterial *LacZ* gene was inserted into the gene (exon 4) such that the endogenous gene promoter drives expression of β-galactosidase (β-gal) with the following construct: Lac0-SA-IRES-*lacZ*-Neo555G/Kan. The cassette thus comprises a splice acceptor (SA) site with an internal ribosome entry site (IRES) adjacent to the nuclear-targeted reporter gene (*LacZ*) and allows to map the cellular site of gene expression. Mice were bred to yield WT, *Adamts4*$^{+/-}$ and *Adamts4*$^{-/-}$ (KO) genotyped by PCR using tail DNA. For the targeted allele, the forward primer in neo 5′-GGGTGGGATTAGATAAATGCCTGCTCT-3′ and the gene-specific reverse primer 5′-GGACACGGGATGGACCCTCTAGA TG-3′ were used. For the endogenous allele, the gene-specific forward primer 5′-ACATGGAGGACTCAGTGTGGCCCAC-3′ and the gene-specific reverse primer 5′-GGACACGGGATGGACCCTCTAGATG-3′ were used. Additional details of the targeting strategy are available at http://www.informatics.jax.org/external/ko/deltagen/1231.html. Only male mice were used in this study; age of mice is detailed in the figure legends. All experiments were carried out in accordance with French laws (act no. 87–848; Ministère de l'Agriculture et de la Forêt) and European Communities Council Directives of November 24, 1986 (86/609/EEC) guidelines, and have been approved by the national ethical committee (02658.02). All animals were housed in a 12 h light/12 h dark cycle with food and water ad libitum. Mice used for behavioral tests were maintained under a reverse light–dark cycle.

2.2 | Antibodies

The following antibodies were used in this study: Actin (1:1,000; A2066, Sigma); APC [CC-1] (adenomatous polyposis coli, 1:800; ab16794, Abcam); β-gal (1:2,000; ab9361, Abcam or 1:10,000; 8559761, MP Biomedical); GFAP (glial fibrillary acidic protein 1:800; ab4674, Abcam); Iba-1 (ionized calcium-binding adapter molecule-1, 1:800; ab5076, Abcam); MBP (myelin basic protein, Immunohistochemistry 1:800; Western blot 1:1,250; ab40390, Abcam); NeuN (1:1,500; MAB377, Millipore); Olig2 (1:800; AB9610, Millipore); PDGFRα (platelet-derived growth factor receptor alpha, 1:800; 558774, BD Pharmingen); PLP (proteolipid protein, 1:1,000; ab105784, Abcam); S100-β (1:500; ab52642, Abcam); ColIV (Type IV-Collagen, 1:1,500; 1340–01, Southern Biotech).

2.3 | Immunofluorescence and immunoblotting

For immunohistochemistry, mice were anaesthetized and transcardially perfused with 0.9% NaCl heparinized followed by a mixture of 2% paraformaldehyde and 0.2% picric acid in 0.1 M sodium phosphate buffer, pH 7.4. Brains and spinal cord were removed, washed in veronal buffer containing 20% sucrose, and frozen in Tissue-Tek (Miles Scientific). Coronal sections (8–10 μm) were cut on a cryostat, collected on poly-D-lysine slides, and stored at −80°C. Permeabilized sections were incubated with primary antibodies overnight at room temperature. Corresponding fluorescent secondary antibodies were used at 1:600 (Jackson ImmunoResearch). Sections were observed under a fluorescent microscope (Leica DM6000), recorded with MetaMorph 7.0 software (Molecular Devices) and further analysed using ImageJ. For 3D reconstruction, images were taken using a Leica SP5 confocal microscope with a 100× oil-immersive objective (Leica Microsystems) at a 1,024 × 1,024 pixels resolution with a z-step of 0.45 μm. The 3D structure was reconstructed from confocal images using Imaris software (version 5.5, Bitplane, Zurich, Switzerland). Volume and surface functions were used.

For immunoblotting, tissues or cell cultures were homogenized in ice-cold TNT buffer (Tris–HCl, NaCl, Triton X-100 supplemented with protease inhibitor cocktail). After centrifugation (12,000*g*, 4°C, 15 min) protein content was assessed by the BCA method (Pierce). Samples were resolved on 3–8% Tris–Acetate or 12% SDS-PAGE gel and transferred onto a polyvinlidene difluoride membrane. Membranes were blocked with TBS (10 mM Tris; 200 mM NaCl; pH 7.4) containing 0.05% Tween-20, 5% BSA, and incubated overnight at 4°C with primary antibodies. After incubation with appropriate peroxidase-conjugated secondary antibody, proteins were visualized with an enhanced Chemiluminescence ECL-Plus detection system (PerkinElmer-NEN) and visualized using an ImageQuant^{TM}LAS 4000 camera.

2.4 | Electron microscopy

Animals were deeply anesthetized and perfused transcardially with 100 mL of physiological saline, followed by 150 mL of fixative [3% paraformaldehyde, 0.2% picric acid and 2% of glutaraldehyde in 0.1 M phosphate buffer (pH 7.4) at 4°C]. After perfusion, the brains were removed from the skull and placed in 0.1 M phosphate buffer solution. Brains were cut with a matrix and 3 mm sagittal sections were collected. Punch (1 mm diameter) were performed on sagittal sections at the level of the corpus callosum (Bregma-1, antero-posterior). Punches were post-fixed in 2% osmium tetroxide diluted in phosphate buffer for one hour at RT. Specimens were dehydrated in graded aqueous solution of alcohol replaced finally by acetone (5, 40, 60, 80, 100%), infiltrated with a solution mixture of 100% acetone and Epon overnight in capped vials at room temperature and polymerized at 60°C for 48 h. The embedded slices on the block surface were trimmed on a Leica ultracut R ultramicrotome to obtain ultrathin sections of 80 nm thickness from the area of interest and collected on formvar-coated copper slot grids. The sections were counterstained with URANYLESS© (Delta Microscopie, Mauressac, France) and lead citrate before digital image acquisition at a magnification of 15,000× via an ORIUS 200 digital camera on a JEM 1011 transmission electron microscope. Samples treatment and image acquisition were performed at CMAbio3: Centre de Microscopie Appliquée à la Biologie, Biological Microscopy Facility Center UFR des sciences, SF 4206 ICORE Université de Caen Normandie. Ten non-overlapping electron microscopy images of the corpus callosum of 4 WT and 4 *Adamts4*$^{-/-}$ mice were analysed for axon number, axon diameter, and g-ratio. The g-ratios (axon diameter/fiber diameter) were calculated with a g-ratio calculator plugin for ImageJ.

2.5 | Evoked potentials

Mice were anaesthetized with 5% isoflurane in a 65%/35% mixture of Medical Air/O_2. A subdermal needle electrode was placed on the

vertex of the animal above the primary cortical area for recording, as well as one on the nose and on the back for reference and ground, respectively. Isoflurane was then reduced to 1% for stabilization of the anesthesia over 25 min. Stimulation was performed through ring electrodes (Intensity: 2 mA; duration: 0.04 ms; frequency: 2.7 Hz; Band pass: 10–1,000 Hz; Sweep: 100) on the left forepaw. The somatosensory evoked potentials were recorded using a dedicated Keypoint system (Alpine biomed). Short latency response was analyzed. We measured the latency of the positive response peaking at about 5.5 ms and its amplitude relative to the previous negative peak. Body temperature was monitored along the experiment and maintained at 37°C.

2.6 | Assessment of gait and motor performance

Actimetry; Spontaneous locomotor activity was measured over 30 min using a rack of eight transparent individual actimetry cages equipped with infrared beams located across the long axis of the cage (Imetronic®). The number of horizontal movements (horizontal crossings) and vertical movements (rearing behaviors) were determined by breaks in movement-sensitive photo-beams that were then converted into locomotor activity counts. *Open field*; Open field experiment was performed to measure the distance travelled by mice in a square box of 31.5 × 31.5 cm. Each mouse was placed in the box for 10 min. Distance was videotracked (DMK 21AF04, The Imaging Source®) and analysed with EthoVision XT 11.5 (Noldus). Additionally, a central region of 15 × 15 cm was defined in order to measure anxiety-like behavior. Rodents typically spend more time exploring the periphery of the arena by walking along the walls (thigmotaxis) than the center area (Prut & Belzung, 2003). Therefore, the percentage of time spent in the center area was measured. *Rotarod*; The Rotarod apparatus (LE8200, Bioseb) consisted of a rotating rod of 30 mm diameter, accelerating from 8 to 40 rpm over 5 min. Each mouse was given three trials with 15 min inter-trial interval. The time until the mouse fell from the rod was measured automatically. Mean latency to fall over the three trials was calculated. *Catwalk*; Gait analysis was performed using the CatWalk XT automated gait analysis system (Noldus). The apparatus consists of an enclosed walkway (130 × 68 × 152 cm) on a glass plate in which the light of a fluorescent tube on its long side is completely internally reflected. The mouse traverses the corridor from one side to the other as a green light enters on the long side of the plate. When a mouse's paws make contact with the glass plate the light is scattered and its footprints are captured. The training and testing procedures were conducted as previously described (Hamers, Koopmans, & Joosten, 2006). After training (5 min of exploration of the walkway the day before testing), the mice were subjected to three consecutive compliant runs (<60% of speed variation). The recorded data were analyzed using the CatWalk XT 9.0 software. The data analyzed contain a comparably high number of explanatory variables that may be able to result in a high number of false positives. Conversely, the high correlation among the explanatory variables renders the test statistics obtained highly dependent. Therefore, we proceeded to parameters selection prior to the analyses. More precisely, four general parameters and five paw parameters were selected prior to the experiment. Parameters are defined in the Supporting Information Table S1.

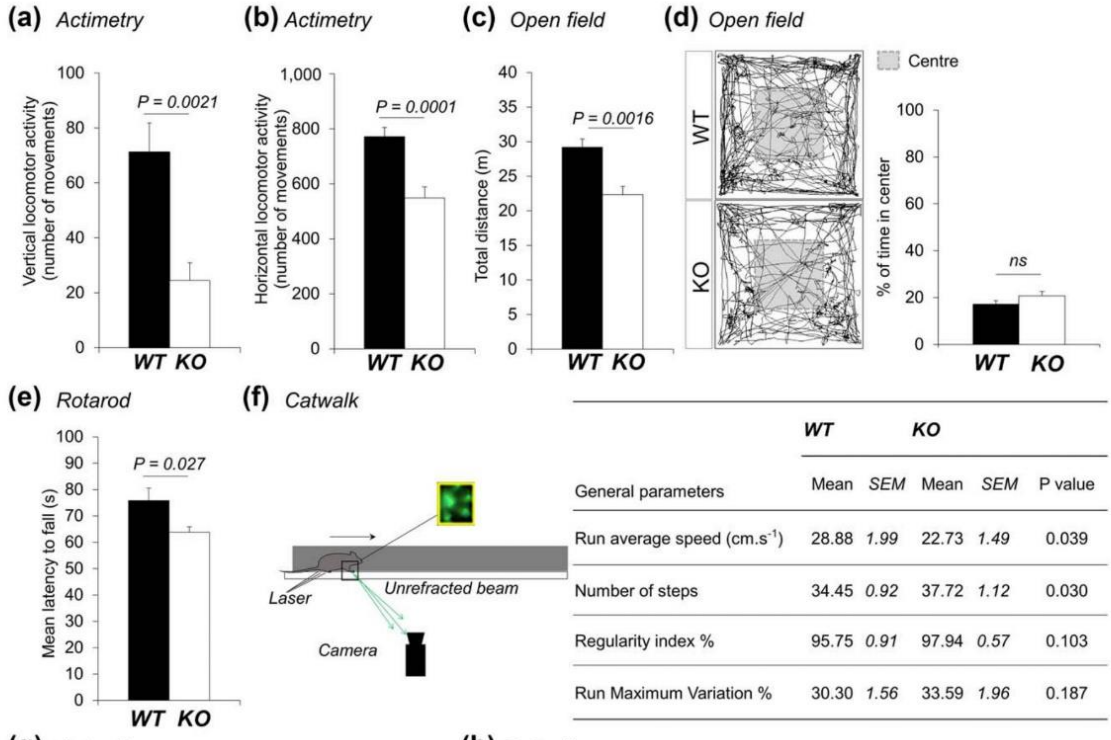
2.7 | Statistical analyses

Numbers of experiments are indicated in figure legends. All graph data are presented as the mean ± standard error mean (SEM). Statistics analyses were performed using Statview and distribution boxplots were produced using the BoxPlotR web-tool (http://shiny.chemgrid.org/boxplotr/). Comparisons between two independent samples were performed using two-tailed Mann-Whitney *U*-tests or Student's *t*-test as reported in figure legends. A p-value $<.05$ is considered significant. Cumulative frequency was analyzed with Kolmogorov–Smirnov tests.

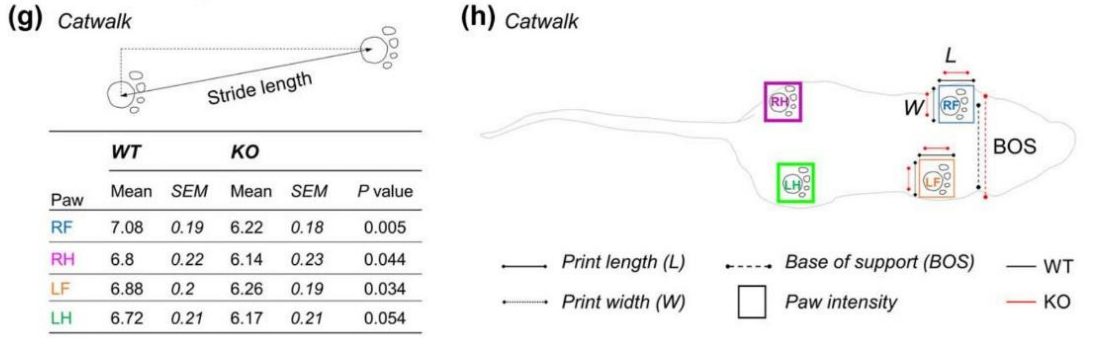
3 | RESULTS

3.1 | ADAMTS-4 deficiency leads to motor deficits and to abnormal electric nerve activity in adult mice

We investigated the functional impact of a lack of ADAMTS-4 (*Adamts4*$^{-/-}$ vs. WT mice at eight weeks old) on motor performances in four behavior assays: actimetry, open field, rotarod, and CatWalk. Actimetry was first used to assess the global spontaneous locomotor activity of the mice by counting their number of rearing and of horizontal movements during 30 min. Actimetry analyses revealed a reduced spontaneous vertical locomotor activity in *Adamts4*$^{-/-}$ mice ($n = 18$; threefold less than the WT animals, $n = 24$; $p = .0021$; Figure 1a). Additionally, horizontal activity was 1.5-fold smaller in *Adamts4*$^{-/-}$ mice ($n = 18$ *Adamts4*$^{-/-}$ mice and $n = 24$ WT mice; $p = .0001$; Figure 1b). This reduced locomotor activity of *Adamts4* deficient mice was confirmed in an open field setup. The open field measures the general activity and exploratory behavior of the mice by tracking their movements into a square closed area during 10 min. In this assay, *Adamts4*$^{-/-}$ mice ($n = 18$) walked on 22.32 ± 5.6 m over 10 min compared to 29.19 ± 5.8 m for WT mice ($n = 23$; $p = .0016$; Figure 1c). It is also interesting to note that the percentage of time spent in the central area did not significantly differ between *Adamts4*$^{-/-}$and WT mice (Figure 1d), suggesting no difference in the anxiety/exploratory behavior between both genotypes. Motor coordination was assessed by the rotarod test, in which mice are placed on a horizontal rod that rotates with increasing speed over time. We observed that *Adamts4*$^{-/-}$ mice ($n = 18$) fell from the rotarod about 10 s earlier than WT mice (three trials per animal, $n = 19$; $p = .027$; Figure 1e). Parallel gait analyses performed using the CatWalk system confirmed the motor deficits observed in *Adamts4*$^{-/-}$ mice. The CatWalk method is an automated and objective measurement of gait parameters. Several parameters generated by the CatWalk system (detailed in Supporting Information Table S1) were preselected for data processing: four general parameters of the gait: run average speed, number of steps, regularity index, run maximum variation; and five parameters more closely related to the paws: stride length, base of support (BOS), print length, print width, paw intensity. Over a trial, *Adamts4*$^{-/-}$ mice displayed a decreased average speed (22.73 ± 1.49 cm s^{-1} for *Adamts4*$^{-/-}$ mice, n = 18 vs. 28.88 ± 1.99 cm s^{-1} WT, $n = 22$, $p = .039$; Figure 1f) and made a higher number of steps (37.72 ± 1.12 steps by *Adamts4*$^{-/-}$ mice, $n = 18$ vs. 34.45 ± 0.92 steps by WT mice; $n = 22$, $p = .030$;



	WT		KO		
General parameters	Mean	*SEM*	Mean	*SEM*	P value
Run average speed (cm.s^{-1})	28.88	*1.99*	22.73	*1.49*	0.039
Number of steps	34.45	*0.92*	37.72	*1.12*	0.030
Regularity index %	95.75	*0.91*	97.94	*0.57*	0.103
Run Maximum Variation %	30.30	*1.56*	33.59	*1.96*	0.187



	WT		KO		
Paw	Mean	*SEM*	Mean	*SEM*	*P* value
RF	7.08	*0.19*	6.22	*0.18*	0.005
RH	6.8	*0.22*	6.14	*0.23*	0.044
LF	6.88	*0.2*	6.26	*0.19*	0.034
LH	6.72	*0.21*	6.17	*0.21*	0.054

FIGURE 1 Absence of ADAMTS-4 leads to motor deficits. (a, b) Actimetry. Spontaneous locomotor activity in *Adamts4*$^{-/-}$ mice (KO, $n = 18$) compared to WT mice ($n = 24$) as measured in vertical movements (a, $p = .0021$; Mann–Whitney *U*-tests) and horizontal movements (b, $p = .0001$; Mann–Whitney *U*-tests). (c, d) Open field experiment. Total distance travelled during 10 min of open field exploration for *Adamts4*$^{-/-}$ mice (KO, $n = 18$) compared to WT mice (c, $n = 23$; $p = .0016$; Mann–Whitney *U*-tests). Representative sample traces showing 10 min of open field exploration. The percentage of time spent in the central area (grey) was measured and did not significantly differ between *Adamts4*$^{-/-}$ mice (KO, $n = 18$) and WT mice (d, $n = 23$; Mann–Whitney *U*-tests). (e) Rotarod. Mean latency to fall in *Adamts4*$^{-/-}$ mice (KO, $n = 18$) compared to WT ($n = 19$ mice; $p = .027$; Student's *t*-test). (f–h) CatWalk gait analysis of *Adamts4*$^{-/-}$ (KO, $n = 18$) and WT ($n = 22$) mice. (f) Schematic representation of the CatWalk system and comparison table of the measurements of the general parameters between the two genotypes; data were evaluated using Mann–Whitney *U*-tests. The run average speed ($p = .039$); the number of steps ($p = .030$); the regularity index ($p = .103$) and the run maximum variations were measured ($p = .187$). (g) Comparison table of the stride length measured for all four paws between the two genotypes ($p = .005$; .044; .034; .054 for the right front (RF), right hind (RH), left front (LF) and left hind (LH) paws, respectively; Mann–Whitney *U*-tests). (h) Schematic representation of the paw parameters of *Adamts4*$^{-/-}$ mice (KO, red lines) and WT mice (black lines). The base of support of the front paws (BOS) is increased in *Adamts4*$^{-/-}$ mice ($p = .004$; Mann–Whitney *U*-tests). The print length (L) and width (W) of the front paws are decreased in *Adamts4*$^{-/-}$ mice (Length: RF, $p < .0001$; LF, $p = .0005$; Width: RF, $p < .0001$; LF, $p = .002$; Mann–Whitney *U*-tests); the paw intensity of the hind paws is increased in *Adamts4*$^{-/-}$ mice (RH, $p = 0.003$; LH, $p = 0.004$; Mann–Whitney *U*-tests). Parameters detailed in Supporting Information Table S1. Mean data of all paws detailed in the Supporting Information Table S2

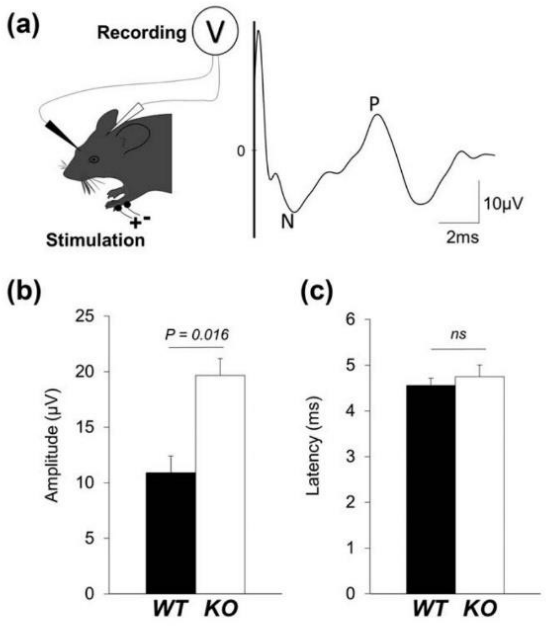


FIGURE 2 Absence of ADAMTS-4 leads to an altered nervous electrical activity. (a) Somatosensory evoked potentials. After stabilization of anaesthesia, one forepaw was stimulated and the corresponding electrical response of the somatosensory pathway recorded. The short latency positive response peaking at about 5.5 ms was measured, relative to the previous negative response. (b) Mean amplitude of evoked potentials in *Adamts4*$^{-/-}$ (KO) and WT mice ($n = 5$ in each group; $p = .016$; Mann-Whitney *U*-tests). (c) Mean latency of evoked potentials in *Adamts4*$^{-/-}$ (KO) and WT mice ($n = 5$ in each group, $p = .835$, Mann-Whitney *U*-tests)

Figure 1f). In the meantime, no difference in the run maximum variation or in the regularity index were observed between the two genotypes (Figure 1f). Regarding paw parameters, the stride length was decreased in *Adamts4*$^{-/-}$ mice ($n = 18$) compared to that of WT mice ($n = 22$; $p = .005$, .044, .034, .054 for the right front, right hind, left front, and left hind paws, respectively, Figure 1g). Moreover, the distance between the two mass mid-points of the front paws (BOS) was increased in *Adamts4*$^{-/-}$ mice ($n = 28$; 1.55 ± 0.03 cm) compared to WT ($n = 22$; 1.44 ± 0.02 cm; $p = .004$) while the BOS of the hind paws was unaffected (Figure 1h; data in Supporting Information Table S2). Also, the two front paws of *Adamts4*$^{-/-}$ mice ($n = 18$) showed a significant decrease in the width and length of the prints and the two hind paws of *Adamts4*$^{-/-}$ mice showed a higher paw intensity, compared to WT ($n = 22$; Length: RF, $p < .0001$; LF, $p = .0005$; Width: RF, $p < .0001$; LF, $p = .002$; Paw intensity: RH, $p = .003$; LH, $p = .004$; Figure 1h; mean individual paw data in Supporting Information Table S2). No weight difference was observed between WT and *Adamts4*$^{-/-}$ animals (Supporting Information Figure S1). Taken together, these data reveal that the absence of ADAMTS-4 leads to significant motor deficits, suggesting a role of ADAMTS-4 in the nervous system in relation with motor functions. Since ADAMTS-4 could also act on cartilage (Tortorella et al., 1999), we aimed to support our hypothesis on a possible influence of ADAMTS-4 on motor functions by measuring electrical activity of the somatosensory pathway. Therefore, we recorded somatosensory evoked potentials (SEP) in *Adamts4*$^{-/-}$ and WT mice (Figure 2a). This assay allows measuring the electrical response of the somatosensory pathway from stimulation of a forepaw. The electrical response is characterized by its amplitude (μV) and its latency (ms). We observed a twofold higher mean amplitude of the response in *Adamts4* deficient mice when compared to WT mice (*Adamts4*$^{-/-}$, $n = 5$, 19.66 ± 3.41 μV; WT, $n = 5$, 10.91 ± 3.4 μV; $p = .016$; Figure 2b) with no difference in the latency (*Adamts4*$^{-/-}$, $n = 5$, 4.75 ± 0.56 ms; WT, $n = 5$, 4.56 ± 0.35 ms; $p = .835$; Figure 2c). The difference in amplitude of the SEP objectifies a modified sensorimotor integration in the *Adamts4*$^{-/-}$ mice. Given the amplitude ratio between the two populations, these results support a role for ADAMTS-4 on the CNS.

3.2 | In the CNS, ADAMTS-4 is mainly present in the white matter

To characterize in detail the expression of ADAMTS-4 in the CNS, we used the B6.129P2-*Adamts4*^{tm1Dgen}/J mouse line in which a bacterial *LacZ* reporter gene, coding for β-gal, is inserted in the locus of ADAMTS-4 (Figure 3a). Heterozygous mice (*Adamts4*$^{-/+}$/*LacZ*$^{+/-}$) were used to report the expression of ADAMTS-4 without possible interference due to a lack of endogenous ADAMTS-4 (Figure 3b). β-gal immunohistochemistry showed that ADAMTS-4 is widely expressed in the CNS, as detected in the hippocampus, corpus callosum, cerebellum and spinal cord, with a positive staining extensively observed in the white matter (Figure 3c).

3.3 | ADAMTS-4 is selectively expressed by mature oligodendrocytes

As we observed a strong expression of ADAMTS-4 in the CNS, especially in the white matter we sought to determine if its expression was associated with myelination during development. At prenatal stages (E15 and E17), Olig2 positive cells were detected in the spinal cord of *Adamts4*$^{-/+}$/*LacZ*$^{+/-}$ heterozygous mice, while the ADAMTS-4 reporter gene β-gal staining was absent. After birth (P3 and P7), we detected β-gal staining in Olig2 positive cells (Figure 4a). Notably, the ADAMTS-4 reporter gene β-gal was colocalized with the presence of MBP in the spinal cord of heterozygous mice at early post-natal developmental stages (P3 and P7; Figure 4b–c). To examine further the cellular expression of ADAMTS-4, parallel co-immunohistochemistry analyses were performed in adult brain tissues for neuronal, astrocyte, endothelial, microglial, oligodendrocyte, and markers (Figure 5). No β-gal staining revealing the presence of ADAMTS-4 was found in neurons, astrocytes, endothelial cells or microglial, but was detected in Olig2 positive cells (Figure 5a). As cells of the oligodendrocyte lineage evolve through different stages of maturation, we sought to determine at which stage(s) of their maturation ADAMTS-4 was expressed by using additional co-immunostainings for PDGFRα (a marker of oligodendrocyte progenitors), Olig2 (a general marker of oligodendrocytes,

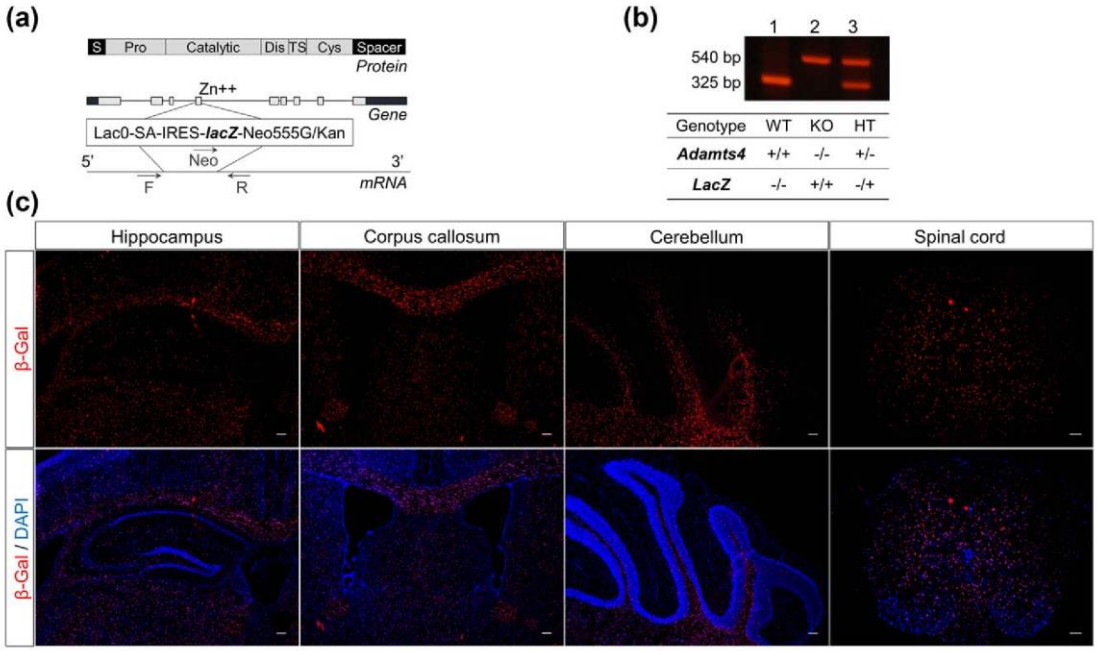


FIGURE 3 ADAMTS-4 is widely expressed in the CNS, especially in the white matter. (a) Scheme of the B6.129P2-*Adamts4*^{tm1Dgen}/J mice construction strategy. The domain structure of ADAMTS-4 protein is shown at the top with the following domain abbreviations: SP, signal peptide; Pro, propeptide; Dis, disintegrin-like domain; TS, thrombospondin motifs; Cys, cysteine-rich region. The gene scheme shows the exon-intron structure of *Adamts4* with the site of insertion of the IRES-*LacZ*-Neo cassette in the catalytic domain. The primers used for genotyping by PCR are shown in relation to *Adamts4* DNA; F: forward primer for the endogenous gene, R: reverse primer for the endogenous gene and targeted gene; Neo: forward primer for the targeted gene. (b) Agarose electrophoresis pattern for mice genotypes. Line 1: One band of 325 bp represent wild-type mice (WT); Line 2: one band of 540 bp represents homozygous *Adamts4*$^{-/-}$ mice (KO); Line 3: one band of 325 bp and one band of 540 bp represents heterozygous (HT) genotype expressing both *Adamts4* and *LacZ* (*Adamts4*$^{-/+}$/*LacZ*$^{+/-}$) as summarized in the table below. (c) Immunohistochemistry raised against β-galactosidase (red, upper panel) performed from coronal sections of *Adamts4*$^{-/+}$/*LacZ*$^{+/-}$ adult mice brain and spinal cord, merged with DAPI stainings (blue, used to reveal nuclei; lower panel). Scale bar: 100 μm

from progenitors and mature cells), and APC (a marker of mature oligodendrocytes). At adult stage, a number of Olig2 positive cells were positive for ADAMTS-4, and none of the PDGFRα cells exhibited ADAMTS-4 expression. Interestingly, ADAMTS-4 expression showed strong colocalization with APC positive cells in the adult brain (Figure 5b). Similarly, in the mouse spinal cord at the early post-natal stage P7, no β-gal was detected in neurons, astrocytes, endothelial cells or microglia (Supporting Information Figure S2). The colocalization of β-gal with Olig2 and APC positive cells support our findings of an expression of ADAMTS-4 restricted to mature oligodendrocytes in the CNS (Supporting Information Figure S2). In the adult corpus callosum, the number of APC positive cells did not differ between WT and *Adamts4*$^{-/-}$ mice ($n = 3$, $p = .275$; Figure 5d). Interestingly, we did not observe an expression of ADAMTS-4 (β-gal positive immunostaining) in S100-β positive Schwann cells of the peripheral nervous system (Supporting Information Figure S3). Altogether, these finding demonstrate that ADAMTS-4 is selectively expressed by mature oligodendrocytes of the CNS, with a possible role during the processes of myelination.

3.4 | Absence of ADAMTS-4 leads to an abnormal CNS myelination

To evaluate the role of ADAMTS-4 in myelination, we first performed immunoblotting against MBP and PLP from *Adamts4*$^{-/-}$ and WT littermates brain tissues (corpus callosum). No difference in MBP levels (Figure 6a,b) and PLP levels (Figure 6c,d) was observed between the two genotypes at P21 and in adult mice of eight weeks old. However, when examining myelinated axons of the corpus callosum by using electron microscopy, we found that *Adamts4*$^{-/-}$ adult mice exhibit a decreased number of myelinated axons (*Adamts4*$^{-/-}$, $n = 4$, 1.27 ± 0.23 axons/μm^2; WT, $n = 4$, 1.67 ± 0.07 axons/μm^2; $p = .021$, Figure 7a,d), with no difference in the number of unmyelinated axons in *Adamts4*$^{-/-}$ mice (*Adamts4*$^{-/-}$, $n = 4$, 1.93 ± 0.78 axons/μm^2; WT, $n = 4$, 2.17 ± 0.39 axons/μm^2; $p = .773$; Figure 7b,d). Overall, no significant difference was observed in the total axon number between the two genotypes (*Adamts4*$^{-/-}$, $n = 4$, 3.85 ± 0.17 axons/μm^2; WT, $n = 4$, 3.20 ± 0.42 axons/μm^2; $p = .312$; Figure 7c,d).

Impaired axonal features were then revealed between WT and KO animals. The overall diameter of myelinated axons is increased in

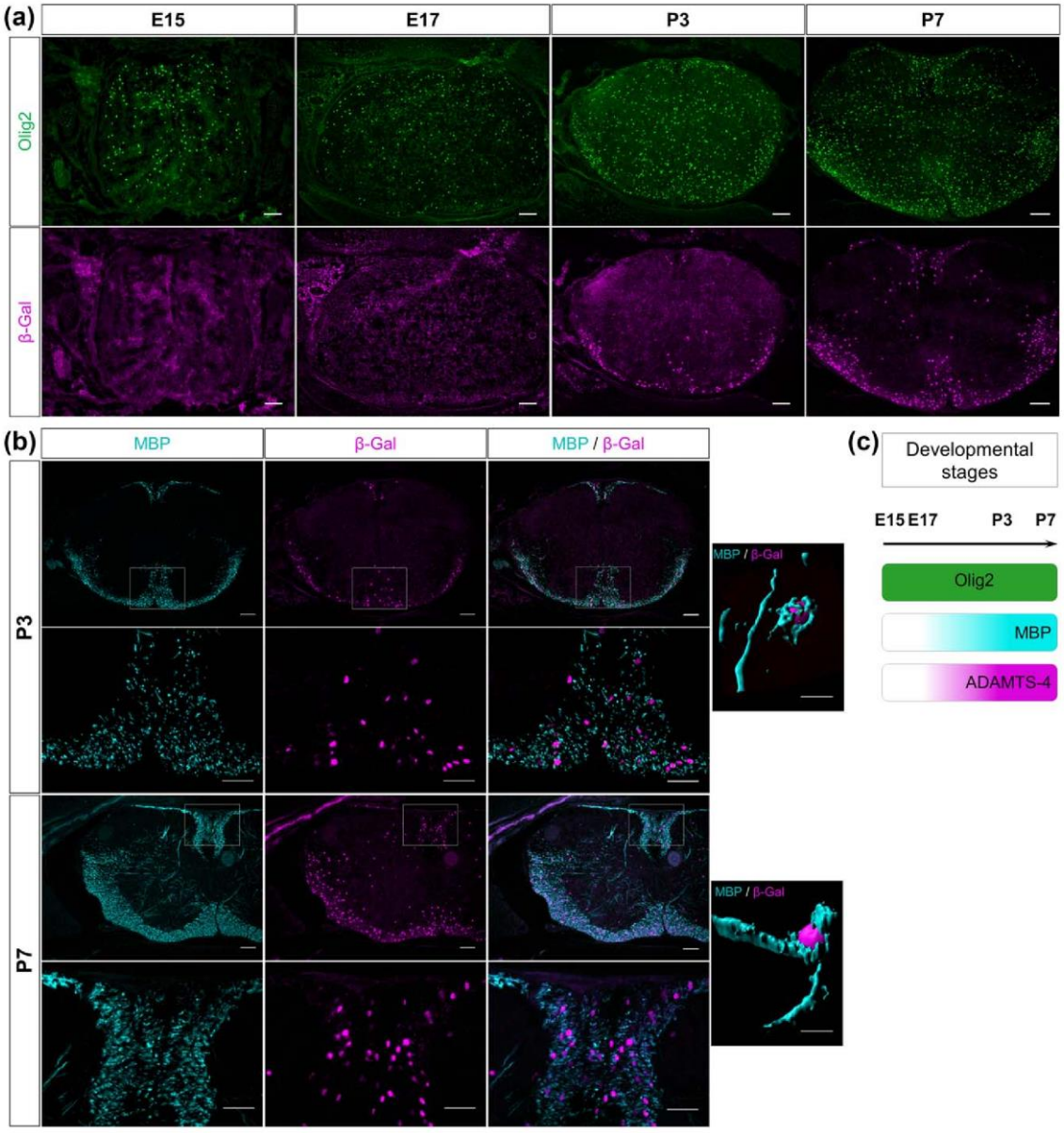


FIGURE 4 ADAMTS-4 is expressed at early post-natal stages, along with myelination. (a) Co-immunohistochemistry in *Adamts4*$^{-/+}$/*LacZ*$^{+/-}$ mice spinal cord with β-gal staining to detect ADAMTS-4 expression (magenta), and Olig2 antibody (general marker of oligodendrocytes, green) at two late pre-natal stages (E15, E17) and two early post-natal stages (P3, P7). Scale bar: 100 μm. (b) Co-immunohistochemistry raised against β-galactosidase to reveal ADAMTS-4 positive cells (magenta) and MBP (cyan) performed from *Adamts4*$^{-/+}$/*LacZ*$^{+/-}$ mice spinal cord at stages P3 and P7. Right panel single images are 3D reconstruction from confocal images at a higher magnification. Scale bar from left to right panel: 100, 50, 10 μm. (c) Schematic representation of ADAMTS-4 expression at the developmental stages E15, E17, P3, and P7 along with myelin development at post-natal stages

Adamts4$^{-/-}$ mice, as observed by a shift in the axon size distribution (Figure 7e) and by an increase of the mean axon diameter value (WT 0.58 ± 0.15 μm vs. *Adamts4*$^{-/-}$ 0.69 ± 0.19 μm; P = 10e-5; Figure 7f). Moreover, we observed a slight increase of the global g-ratio, mainly affecting axons with the smallest diameter (Figure 7g). Indeed, we observed a mean g-ratio significantly higher in *Adamts4*$^{-/-}$ mice (0.80 ± 0.05) compared to WT mice (WT 0.78 ± 0.05; p = .047; Figure 7h). These results demonstrate that the absence of ADAMTS-4 in

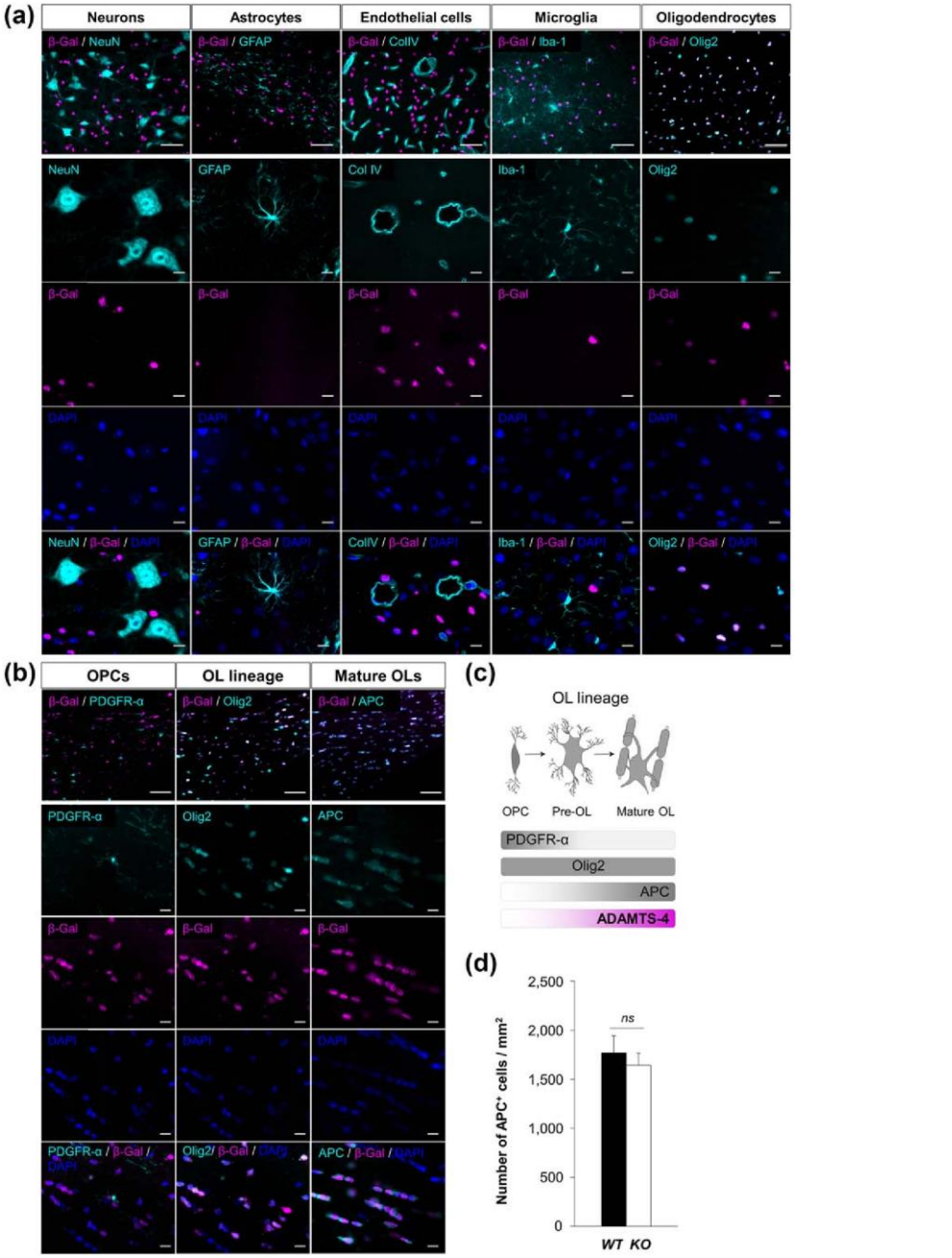


FIGURE 5 ADAMTS-4 is only expressed by mature oligodendrocytes. (a) Co-immunohistochemistry in *Adamts4*$^{-/+}$/*LacZ*$^{+/-}$ adult mice (eight weeks) brain with β-gal staining (magenta) and cell-specific markers (cyan): NeuN, neurons; GFAP, astrocytes; ColIV, vessels; Iba-1, microglia; Olig2, oligodendrocytes; scale bar: 50 μm. Higher magnification images are shown in the lower panel as separate layouts for cell markers (cyan), β-gal (magenta), and DAPI (blue) and as merged; scale bar: 10 μm. Representative images of the brain covering regions of the forebrain, mibrain and hindbrain are shown. (b) Co-immunohistochemistry of *Adamts4*$^{-/+}$/*LacZ*$^{+/-}$ adult mice (eight weeks) corpus callosum with β-gal staining (magenta) and oligodendrocyte-specific markers (cyan): PDGFRα for oligodendrocyte precursor cells (OPC), Olig2 for oligodendrocyte (OL) lineage cells, and APC for mature oligodendrocytes (mature OL). Higher magnification images are shown in the lower panel as separate layouts for cell markers (cyan), β-gal (magenta), and DAPI (blue) and as merged; scale bar: 10 μm. (c) Scheme representing the expression pattern of ADAMTS-4 in mature oligodendrocytes. (d) Quantification of the number of APC positive cells per mm^2 in the corpus callosum of *Adamts4*$^{-/-}$ (KO) and WT adult mice ($n = 3$ per genotype; $p = .2752$, Mann-Whitney *U*-tests)

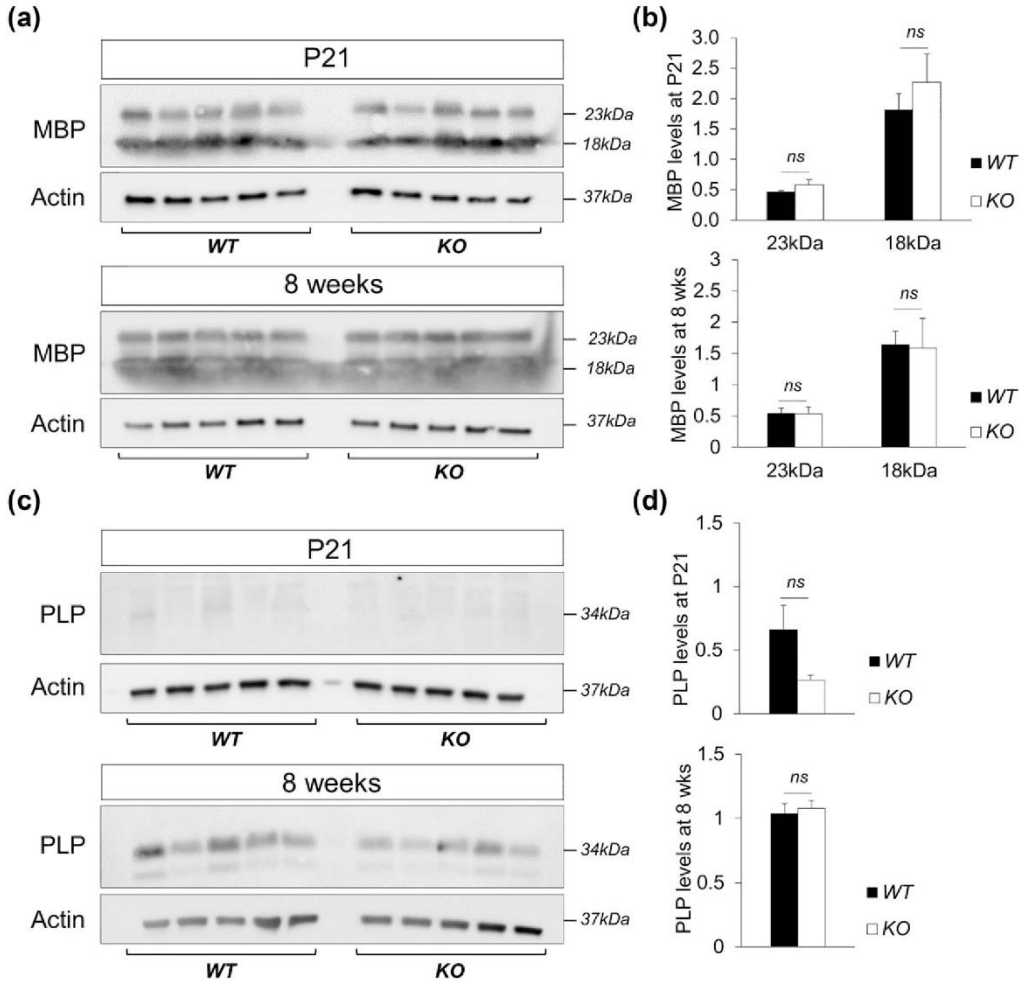


FIGURE 6 Absence of ADAMTS-4 does not modify myelin protein levels at late development (P21) or in the adult stage. (a, b) Immunoblotting (a) and quantification (b) of the protein levels of the 18 and 23 kDa isoforms of MBP, normalized to actin, in the corpus callosum of WT and *Adamts4*$^{-/-}$ (KO) at P21 (upper panel) and adult (eight weeks, lower panel) stages ($n = 5$ in each group, non-significant, Mann-Whitney *U*-tests). (c, d) Immunoblotting (c) and quantification (d) of the protein levels of PLP, normalized to actin, in the corpus callosum of WT and *Adamts4*$^{-/-}$ (KO) at P21 (upper panel) and adult (eight weeks, lower panel) stages ($n = 5$ in each group, non-significant, Mann-Whitney *U*-tests)

mature oligodendrocytes results in an affected myelination profile characterized by a modified distribution of the myelinated fibers in number and size, as well as an altered g-ratio.

In conclusion, we provide here unexpected data demonstrating that the extracellular protease ADAMTS-4, exclusively expressed by mature oligodendrocytes in healthy CNS, plays a critical role in the myelination processes, controlling the pattern of myelinated fibers and subsequent motor functions between healthy individuals.

4 | DISCUSSION

A functioning vertebrate nervous system needs fast electrical impulses along axonal tracts. In the CNS, both axon caliber and myelin sheath are critical for the speed of signal conduction. Indeed, it is generally admitted that larger axons have a faster conduction rate and the insulating myelin layer surrounding axons help improving conduction velocity. The cell type responsible for myelin production and axon ensheathment in the CNS is oligodendrocyte. While many studies have focused on the impact of myelin destruction as in multiple sclerosis and how to promote remyelination (Crawford, Chambers, & Franklin, 2013), little is currently known about axon selection by oligodendrocytes and which mechanisms control the final diameter of myelinated axons. The major finding of our present study is that the extracellular ADAMTS-4, initially characterized in the cartilage (Tortorella et al., 1999) is exclusively expressed by myelinating oligodendrocytes in the normal CNS, influences myelination processes, axonal conduction and finally motor performances.

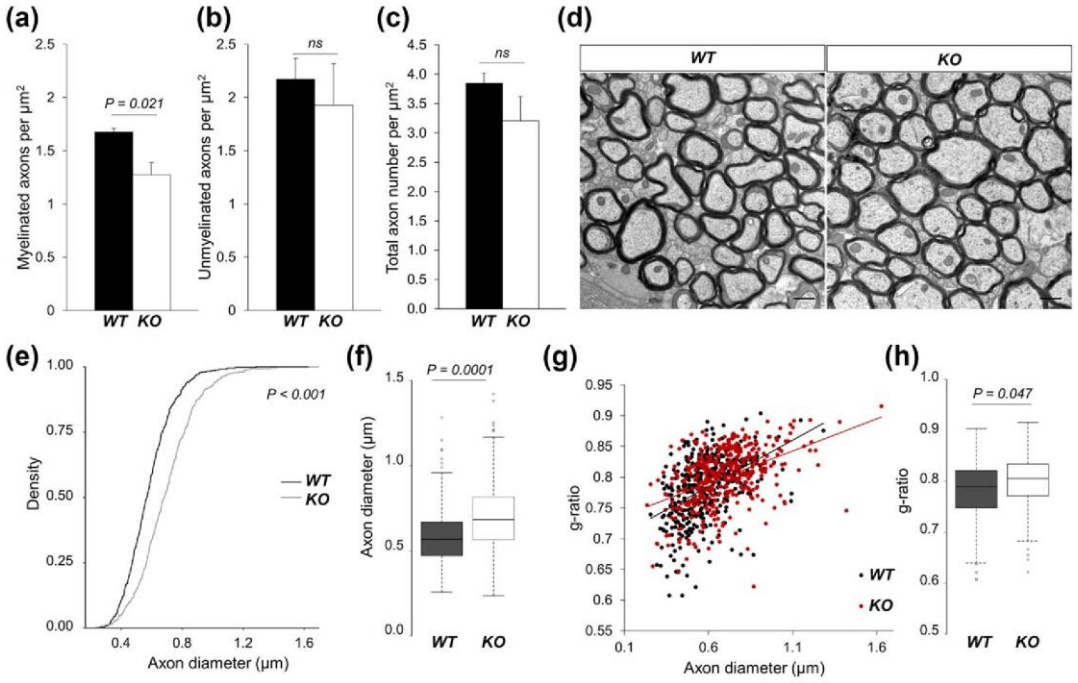


FIGURE 7 Impaired myelination and increased axon radial size in *Adamts4*$^{-/-}$ mice. (a) Number of myelinated axons per µm^2 of corpus callosum in *Adamts4*$^{-/-}$ (KO) and WT adult mice ($p = .021$, 10 images per animal, $n = 4$ animals per genotype, Mann-Whitney U-tests). (b) Number of unmyelinated axons per µm^2 of corpus callosum in *Adamts4*$^{-/-}$ (KO) and WT adult mice ($p = .773$, 10 images per animal, $n = 4$ animals per genotype, Mann-Whitney U-tests). (c) Total axon number per µm^2 of corpus callosum in *Adamts4*$^{-/-}$ (KO) and WT adult mice ($p = .312$, 10 images per animal, $n = 4$ animals per genotype, Mann-Whitney U-tests). (d) Electron microscopy images of the corpus callosum of WT and *Adamts4*$^{-/-}$ (KO) adult mice; Scale bar: 0.5 µm. (e, f) Diameter of myelinated axons in the corpus callosum of *Adamts4*$^{-/-}$ mice (KO) compared to WT mice presented as the cumulative frequency distribution of axon diameter (e, 400 axons from four mice of each genotype, $p < .001$; Kolmogorov–Smirnov tests) or as a box plot of the axon diameter in each genotype (f), boxes show the median (black middle line) limited by the 25th and 75th percentiles as determined by R software; whiskers extend 1.5 times the interquartile range from the 25th and 75th percentiles, white dots represent outliers (f; 400 axons from four mice of each genotype, $p = .0001$; Student's *t*-test).(g, h) g-ratio of myelinated axons in the corpus callosum of *Adamts4*$^{-/-}$ and WT adult mice presented as a function of axon diameter (g) and as a box plot of the g-ratio in each genotype (h), boxes show the median (black middle line) limited by the 25th and 75th percentiles as determined by R software; whiskers extend 1.5 times the interquartile range from the 25th and 75th percentiles, white dots represent outliers (h; 400 axons, axons from four mice of each genotype, $p = .047$ Student's *t*-test)

Our data revealed ADAMTS-4 as present in the white matter of the CNS, only in mature APC positive oligodendrocytes. These data are in agreement with recent studies that have reported the expression of ADAMTS-4 in mature oligodendrocytes by in situ hybridization in the developing telencephalon (Levy, Brooks, Chen, Su, & Fox, 2015) and by immunohistochemistry of adult mouse spinal cord (Lemarchant, Pomeshchik, et al., 2016). Notably, ADAMTS-4 protein was recently described as highly enriched in oligodendrocytes by a proteomic analysis (Sharma et al., 2015), among the well-known oligodendrocytes proteins such as MBP, PLP, 2′,3′-cyclic nucleotide 3′-phosphodiesterase and the transcription factor Sox10.

ADAMTS proteases constitute a family of 19 members, secreted into the ECM. They can be classified into several groups, according to their preference to cleave specific ECM macromolecules as follows (Kelwick et al., 2015): proteoglycanases (ADAMTS-1, −4, −5, −8, −9, −15, and −20), procollagen *N*-propeptidases (ADAMTS-2, −3, and −14), cartilage oligomeric matrix protein-cleaving enzymes (ADAMTS-7 and −12), von Willebrand Factor proteinase (ADAMTS-13) and a group of orphan enzymes (ADAMTS-6, −10, −16, −17, −18, and 19). ADAMTS proteoglycanases were initially described in the cartilage where they play deleterious effect in arthritic diseases (Jones & Riley, 2005). It is only recently that their role in the CNS has been highlighted (Lemarchant et al., 2013). Among the proteoglycanases present in the CNS, ADAMTS-4 (Matthews et al., 2000) promotes the degradation of the aggregating CSPGs that are well known inhibitors of axonal regeneration (Galtrey & Fawcett, 2007), oligodendrocyte process outgrowth and myelination (Harlow & Macklin, 2014). Up to now, the role of ADAMTS-4 in the CNS was mainly studied in conditions of injuries. For instance, ADAMTS-4 under its mature form was reported to promote axonal growth and functional recovery following spinal cord injury (Lemarchant et al., 2014; Tauchi et al., 2012). Similarly, ADAMTS-4 was proposed to play a role following ischemic stroke

(Lemarchant, Dunghana, et al., 2016) and in an experimental model of amyotrophic lateral sclerosis (Lemarchant, Pomeshchik, et al., 2016) possibly by influencing, respectively, inflammatory and neurodegenerative processes, two phenomena independent of its capacity to degrade CSPGs. However, little is known about the function(s) of ADAMTS-4 in the normal CNS. Because our data revealed ADAMTS-4 as a restricted marker of mature oligodendrocytes without affecting the number of APC positive cells itself, we focused our study on a possible effect of ADAMTS-4 on the myelination processes. Also important to note, the expression of ADAMTS-4 is limited to the myelinating cells of the CNS, with no expression of the ADAMTS-4 reporter gene detected in the peripheral nervous system (S100-β positive Schwann cells). We thus revealed an unexpected role of ADAMTS-4 in myelination processes, with its absence leading to an impaired pattern of myelinated axons (i.e., a reduced number of myelinated axons, an increased g-ratio for myelinated axons, especially for smaller diameter axons and an increased diameter of myelinated axons) and possibly a subsequent alteration of the sensorimotor integration at the adult stage. Accordingly, we also highlighted an increased amplitude of the evoked potentials in *Adamts4*$^{-/-}$ mice. This phenomenon was reported in patients with a deficiency in the inhibitory cortical processes (Ferlazzo et al., 2014; Kobayashi et al., 2014; Shibasaki, Yamashita, Neshige, Tobimatsu, & Fukui, 1985). Since our results demonstrate alterations of the corpus callosum fibers on one hand, and that there are inhibitory projections within the corpus callosum, conversely (Bloom & Hynd, 2005), we could imagine that the sensorimotor integration observed in the *Adamts4*$^{-/-}$ mice results from a deficit of the callosal inhibition objectified by an increased amplitude of the evoked potentials in these mice.

Myelination is a complex sequence of events (Simons & Nave, 2015) in which ADAMTS-4 may contribute. A first hypothesis could be an action through CSPGs which are the main targets of the proteolytic activity of ADAMTS-4 (Matthews et al., 2000; Sandy et al., 2001; Tortorella et al., 2000; Westling et al., 2004). Indeed, CSPGs have been shown to impair myelination through PTPσ binding (Pendleton et al., 2013). Moreover, CSPGs are present at the nodes of Ranvier in the developing and adult CNS (Oohashi et al., 2002). Interestingly, a specific distribution of certain types of CSPGs in the perinodal ECM has been related to axon diameter, such as brevican which is particularly present in the nodes of Ranvier of larger axons (Bekku, Rauch, Ninomiya, & Oohashi, 2009). During development, the largest axons are the first to be myelinated within a specific region, as it was demonstrated that the thickest fiber tracts in the spinal cord acquire myelin from P1, while the smallest axons are myelinated after P20 (Hildebrand, Remahl, Bjartmar, & Hospital, 1993). This finding supports our data regarding the differential impairment of the g-ratio regarding axon size. Indeed, despite an overall increase of the g-ratio of the myelinated fibers in the corpus callosum of *Adamts4*$^{-/-}$ mice, we observed that larger axons are less affected. This reinforces the hypothesis of a delayed myelination in the absence of ADAMTS-4. Other substrates of ADAMTS-4 have also been reported, such as Reelin (Krstic, Rodriguez, & Knuesel, 2012) which is also expressed by oligodendrocytes (Siebert & Osterhout, 2011b). In the peripheral nervous system, Reelin has been shown to influence the caliber of myelinated axons (Panteri et al., 2006). Furthermore, non-proteolytic roles for ADAMTS-4 have been suggested, offering new targets to be identified (Hamel et al., 2008). Among its five domains, ADAMTS-4 possesses a disintegrin-like domain. Up to now, no role for this domain has been clearly identified in the family of ADAMTS proteases while similar sequences in ADAM proteases are known to interact with several kinds of integrin receptors, a set of receptors also reported to control axons diameter (Câmara et al., 2009). Therefore, given data from the literature and our results showing affected axonal features in *Adamts4*$^{-/-}$ mice, we can hypothesize for a role for ADAMTS-4 in axo-glial communication processes.

To the best of our knowledge, only few studies have reported a motor phenotype due to a single gene deletion in the absence of injury. Here, we demonstrate that the lack of a single protease within the ECM is enough to influence the myelination pattern at the adult stage, with a possible functional motor repercussion even in the absence of injury. We can thus postulate that the endogenous levels of ADAMTS-4 in oligodendrocytes may contribute to motor capacities. However, because ADAMTS-4 expression has also been detected in other tissues, such as the cartilage (Tortorella et al., 1999) and the heart (Vistnes et al., 2014) we cannot exclude a contribution of ADAMTS-4 outside of the CNS in the observed motor deficits. Nevertheless, the deletion of ADAMTS-4 showed no abnormality in skeletal growth or remodeling (Glasson et al., 2004). Interestingly, in Humans, polymorphisms of the *Adamts4* gene were reported, with possible association with lumbar disc degeneration (Liu et al., 2016), and cardiovascular diseases (Kozian et al., 2007).

In summary, we identify ADAMTS-4 as a new actor in myelination processes. Our present investigations demonstrate, in vivo, that ADAMTS-4 is exclusively expressed by mature oligodendrocytes in the healthy CNS and is involved in processes that control myelination. Accordingly, absence of ADAMTS-4 led to abnormal myelination processes and subsequent motor deficits. As such, our findings provide the bases to open a new avenue of research in the field of myelination/remyelination, focusing on ADAMTS-4.

CONFLICT OF INTEREST

The authors declare no conflict of interest.

ORCID

Mathilde Pruvost http://orcid.org/0000-0003-0844-7731

REFERENCES

Aguirre, A., Dupree, J. L., Mangin, J. M., & Gallo, V. (2007). A functional role for EGFR signaling in myelination and remyelination. *Nature Neuroscience*, *10*(8), 990–1002.

Arnett, H. A., Fancy, S. P. J., Alberta, J. A., Zhao, C., Plant, S. R., Kaing, S., Raine, C. S., et al. (2004). bHLH transcription factor Olig1 is required to repair demyelinated lesions in the CNS. *Science*, *306* (5704), 2111–2115.

Bandtlow, C. E., & Zimmermann, D. R. (2000). Proteoglycans in the developing brain: new conceptual insights for old proteins. *Physiological Reviews*, *80*(4), 1267–1290.

Barnett, S. C., & Linington, C. (2013). Myelination: Do astrocytes play a role? *The Neuroscientist*, *19*(5), 442–450.

Bartus, K., James, N. D., Bosch, K. D., & Bradbury, E. J. (2012). Chondroitin sulphate proteoglycans: Key modulators of spinal cord and brain plasticity. *Experimental Neurology*, *235*(1), 5–17.

Bekku, Y., Rauch, U., Ninomiya, Y., & Oohashi, T. (2009). Brevican distinctively assembles extracellular components at the large diameter nodes of Ranvier in the CNS. *Journal of Neurochemistry*, *108*(5), 1266–1276.

Bercury, K. K., & Macklin, W. B. (2015). Dynamics and mechanisms of CNS myelination. *Developmental Cell*, *32*(4), 447–458.

Bidmon, H. J., Jancsik, V., Schleicher, A., Hagemann, G., Witte, O. W., Woodhams, P., & Zilles, K. (1997). Structural alterations and changes in cytoskeletal proteins and proteoglycans after focal cortical ischemia. *Neuroscience*, *82*(2), 397–420.

Bloom, J. S., & Hynd, G. W. (2005). The role of the corpus callosum in interhemispheric transfer of information: Excitation or inhibition? *Neuropsychology Review*, *15*(2), 59–71.

Bradbury, E. J., Moon, L. D. F., Popat, R. J., King, V. R., Bennett, G. S., Patel, P. N., Fawcett, J. W., et al. (2002). Chondroitinase ABC promotes functional recovery after spinal cord injury. *Nature*, *416*(6881), 636–640.

Camand, E., Morel, M. P., Faissner, A., Sotelo, C., & Dusart, I. (2004). Long-term changes in the molecular composition of the glial scar and progressive increase of serotoninergic fibre sprouting after hemisection of the mouse spinal cord. *European Journal of Neuroscience*, *20*(5), 1161–1176.

Câmara, J., Wang, Z., Nunes-fonseca, C., Friedman, H. C., Grove, M., Sherman, D. L., Komiyama, N. H., et al. (2009). Integrin mediated axoglial interactions initiate myelination in the CNS. *The Journal Of Cell Biology*, *185*(4), 699–712.

Chang, K., Redmond, S. A., Chan, J. R., Francisco, S., & Francisco, S. (2016). Remodeling myelination : Implications for mechanisms and neural plasticity. *Nature Neuroscience*, *19*(2), 190–197.

Chen, J., Joon Lee, H., Jakovcevski, I., Shah, R., Bhagat, N., Loers, G., Liu, H.-Y., et al. (2010). The extracellular matrix glycoprotein Tenascin-C is beneficial for spinal cord regeneration. *Molecular Therapy*, *18*(10), 1769–1777.

Crawford, A. H., Chambers, C., & Franklin, R. J. M. (2013). Remyelination : the true regeneration of the central nervous system. *Journal of Comparative Pathology*, *149*(2–3), 242–254.

Dewitt, D. A., Silver, J., Canning, D. R., & Perry, G. (1993). Chondroitin sulfate proteoglycans are associated with the lesions of Alzheimers-disease. *Experimental Neurology*, *121*(2), 149–152.

Dickendesher, T. L., Baldwin, K. T., Mironova, Y. A., Koriyama, Y., Raiker, S. J., Askew, K. L., Wood, A., et al. (2012). NgR1 and NgR3 are receptors for chondroitin sulfate proteoglycans. *Nature Neuroscience*, *15*(5), 703–712.

Dobbertin, A., Rhodes, K. E., Garwood, J., Properzi, F., Heck, N., Rogers, J. H., Fawcett, J. W., et al. (2003). Regulation of RPTPβ/phosphacan expression and glycosaminoglycan epitopes in injured brain and cytokine-treated glia. *Molecular and Cellular Neuroscience*, *24*(4), 951–971.

Ferlazzo, E., Canafoglia, L., Michelucci, R., Gambardella, A., Gennaro, E., Pasini, E., Riguzzi, P., et al. (2014). Mild Lafora disease: Clinical, neurophysiologic, and genetic findings. *Epilepsia*, *55*(12), e129–e133.

Fields, R. D. (2008). White matter in learning, cognition and psychiatric disorders. *Trends in Neurosciences*, *31*(7), 361–370.

Fisher, D., Xing, B., Dill, J., Li, H., Hoang, H. H., Zhao, Z., Yang, X.-L., et al. (2011). Leukocyte common antigen-related phosphatase is a functional receptor for chondroitin sulfate proteoglycan axon growth inhibitors. *Journal of Neuroscience*, *31*(40), 14051–14066.

Galtrey, C. M., & Fawcett, J. W. (2007). The role of chondroitin sulfate proteoglycans in regeneration and plasticity in the central nervous system. *Brain Research Reviews*, *54*(1), 1–18.

García-Alías, G., Barkhuysen, S., Buckle, M., & Fawcett, J. W. (2009). Chondroitinase ABC treatment opens a window of opportunity for task-specific rehabilitation. *Nature Neuroscience*, *12*(9), 1145–1151.

Gervasi, N. M., Kwok, J. C., & Fawcett, J. W. (2008). Role of extracellular factors in axon regeneration in the CNS: Implications for therapy. *Regenerative Medicine*, *3*(6), 907–923.

Glasson, S. S., Askew, R., Sheppard, B., Carito, B. A, Blanchet, T., Ma, H.-L., Flannery, C. R., et al. (2004). Characterization of and osteoarthritis susceptibility in ADAMTS-4-knockout mice. *Arthritis and Rheumatism*, *50*(8), 2547–2558.

Gottschall, P. E., & Howell, M. D. (2015). ADAMTS expression and function in central nervous system injury and disorders. *Matrix Biology*. *44–46*, 70–76.

Hamel, M. G., Ajmo, J. M., Leonardo, C. C., Zuo, F., Sandy, J. D., & Gottschall, P. E. (2008). Multimodal signaling by the ADAMTSs (a disintegrin and metalloproteinase with thrombospondin motifs) promotes neurite extension. *Experimental Neurology*, *210*(2), 428–440.

Hamers, F. P. T., Koopmans, G. C., & Joosten, E. A. J. (2006). CatWalk-assisted gait analysis in the assessment of spinal cord injury. *Journal of Neurotrauma*, *23*(3–4), 537–548.

Harlow, D. E., & Macklin, W. B. (2014). Inhibitors of myelination: ECM changes, CSPGs and PTPs. *Experimental Neurology*, *251*, 39–46.

Heck, N., Garwood, J., Loeffler, J. P., Larmet, Y., & Faissner, A. (2004). Differential upregulation of extracellular matrix molecules associated with the appearance of granule cell dispersion and mossy fiber sprouting during epileptogenesis in a murine model of temporal lobe epilepsy. *Neuroscience*, *129*(2), 309–324.

Hildebrand, C., Remahl, S., Bjartmar, C., & Hospital, K. (1993). Myelinated nerve fibres in the CNS. *Progress in Neurobiology*, *40*(3), 319–384.

Hobohm, C., Günther, A., Grosche, J., Roßner, S., Schneider, D., & Brückner, G. (2005). Decomposition and long-lasting downregulation of extracellular matrix in perineuronal nets induced by focal cerebral ischemia in rats. *Journal of Neuroscience Research*, *80*(4), 539–548.

Jones, G. C., & Riley, G. P. (2005). ADAMTS proteinases : A multi-domain, multi-functional family with roles in extracellular matrix turnover and arthritis. *Arthritis Research & Therapy*, *7*(4), 160–169.

Jungers, K. A., Le Goff, C., Somerville, R. P. T., & Apte, S. S. (2005). Adamts9 is widely expressed during mouse embryo development. *Gene Expression Patterns*, *5*(5), 609–617.

Kelwick, R., Desanlis, I., Wheeler, G. N., & Edwards, D. R. (2015). The ADAMTS (a disintegrin and metalloproteinase with thrombospondin motifs) family. *Genome Biology*, *16*, 113.

Kobayashi, K., Hitomi, T., Matsumoto, R., Kondo, T., Kawamata, J., Matsuhashi, M., Hashimoto, S., et al. (2014). Long-term follow-up of cortical hyperexcitability in Japanese Unverricht-Lundborg disease. *Seizure*, *23*(9), 746–750.

Kozian, D., Hermann, M., Siegler, K., Deleuze, J., Ricard, S., & Mace, S. (2007). *U.S. Patent No. WO2007134718 A2*. Washington, DC: U.S Patent and Trademark Office.

Krstic, D., Rodriguez, M., & Knuesel, I. (2012). Regulated proteolytic processing of reelin through interplay of tissue plasminogen activator (tPA), ADAMTS-4, ADAMTS-5, and their modulators. *PLoS ONE*, *7*(10), e47793.

Kucharova, K., Chang, Y., Boor, A., Yong, V., & Stallcup, W. B. (2011). Reduced inflammation accompanies diminished myelin damage and

repair in the NG2 null mouse spinal cord. *Journal of Neuroinflammation*, *8*(1), 158.

Lappe-Siefke, C., Goebbels, S., Gravel, M., Nicksch, E., Lee, J., Braun, P. E., Griffiths, I. R., et al. (2003). Disruption of Cnp1 uncouples oligodendroglial functions in axonal support and myelination. *Nature Genetics*, *33*(3), 366–374.

Larsen, P. H., Wells, J. E., Stallcup, W. B., Opdenakker, G., & Yong, V. W. (2003). Matrix metalloproteinase-9 facilitates remyelination in part by processing the inhibitory NG2 proteoglycan. *Journal of Neuroscience*, *23*(35), 11127–11135.

Lau, L. W., Keough, M. B., Haylock-Jacobs, S., Cua, R., Döring, A., Sloka, S., Stirling, D. P., et al. (2012). Chondroitin sulfate proteoglycans in demyelinated lesions impair remyelination. *Annals of Neurology*, *72*(3), 419–432.

Lemarchant, S., Dunghana, H., Pomeshchik, Y., Leinonen, H., Kolosowska, N., Korhonen, P., Kanninen, K., et al. (2016). Anti-inflammatory effects of ADAMTS-4 in a mouse model of ischemic stroke. *Glia*, *64*(9), 1492–1507.

Lemarchant, S., Pomeshchik, Y., Kidin, I., Kärkkäinen, V., Valonen, P., Lehtonen, S., Goldsteins, G., et al. (2016). ADAMTS-4 promotes neurodegeneration in a mouse model of amyotrophic lateral sclerosis. *Molecular Neurodegeneration*, *11*, 10.

Lemarchant, S., Pruvost, M., Hébert, M., Gauberti, M., Hommet, Y., Briens, A., Maubert, E., et al. (2014). tPA promotes ADAMTS-4-induced CSPG degradation, thereby enhancing neuroplasticity following spinal cord injury. *Neurobiology of Disease*, *66*, 28–42.

Lemarchant, S., Pruvost, M., Montaner, J., Emery, E., Vivien, D., Kanninen, K., & Koistinaho, J. (2013). ADAMTS proteoglycanases in the physiological and pathological central nervous system. *Journal of Neuroinflammation*, *10*(1), 133.

Levine, J. M., & Reynolds, R. (1999). Activation and proliferation of endogenous oligodendrocyte precursor cells during ethidium bromide-induced demyelination. *Experimental Neurology*, *160*(2), 333–347.

Levy, C., Brooks, J. M., Chen, J., Su, J., & Fox, M. A. (2015). Cell-specific and developmental expression of lectican-cleaving proteases in mouse hippocampus and neocortex. *Journal of Comparative Neurology*, *523*(4), 629–648.

Liu, S., Wu, N., Liu, J., Liu, H., Su, X., Liu, Z., Zuo, Y., et al. (2016). Association between ADAMTS-4 gene polymorphism and lumbar disc degeneration in Chinese Han population. *Journal of Orthopedic Research*, *34*(5), 860–864.

Matthews, R. T., Gary, S. C., Zerillo, C., Pratta, M., Solomon, K., Arner, E. C., & Hockfield, S. (2000). Brain-enriched hyaluronan binding (BEHAB)/brevican cleavage in a glioma cell line is mediated by a disintegrin and metalloproteinase with thrombospondin motifs (ADAMTS) family member. *The Journal of Biological Chemistry*, *275*(30), 22695–22703.

Mayer, J., Hamel, M. G., & Gottschall, P. E. (2005). Evidence for proteolytic cleavage of brevican by the ADAMTSs in the dentate gyrus after excitotoxic lesion of the mouse entorhinal cortex. *BMC Neuroscience*, *6*, 52.

Moon, L. D., Asher, R. A., Rhodes, K. E., & Fawcett, J. W. (2001). Regeneration of CNS axons back to their target following treatment of adult rat brain with chondroitinase ABC. *Nature Neuroscience*, *4*(5), 465–466.

Nait-Oumesmar, B., Decker, L., Lachapelle, F., Avellana-Adalid, V., Bachelin, C., & Baron-Van Evercooren, A. (1999). Progenitor cells of the adult mouse subventricular zone proliferate, migrate and differentiate into oligodendrocytes after demyelination. *European Journal of Neuroscience*, *11*(12), 4357–4366.

Nakatani, H., Martin, E., Hassani, H., Clavairoly, A., Maire, C. L., Viadieu, A., Kerninon, C., et al. (2013). Ascl1/Mash1 promotes brain oligodendrogenesis during myelination and remyelination. *Journal of Neuroscience*, *33*(23), 9752–9768.

Noble, M. (2004). The possible role of myelin destruction as a precipitating event in Alzheimer's disease. *Neurobiology of Aging*, *25*, 25–31.

Okamoto, M., Sakiyama, J., Mori, S., Kurazono, S., Usui, S., Hasegawa, M., & Oohira, A. (2003). Kainic acid-induced convulsions cause prolonged changes in the chondroitin sulfate proteoglycans neurocan and phosphacan in the limbic structures. *Experimental Neurology*, *184*(1), 179–195.

Oohashi, T., Hirawaka, S., Bekku, Y., Rauch, U., Zimmermann, D. R., Su, W., Ohtsuka, A., et al. (2002). Bral1, a brain-specific link protein, colocalizingwith the Versican V2 isoform at the nodes mouse central nervous systems. *Molecular and Cellular Neuroscience*, *57*, 43–57.

Oohira, A., Matsui, F., Tokita, Y., Yamauchi, S., & Aono, S. (2000). Molecular interactions of neural chondroitin sulfate proteoglycans in the brain development. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, *374*(1), 24–34.

Panteri, R., Mey, J., Zhelyaznik, N., D'Altocolle, A., Del Fà, A., Gangitano, C., Marino, R., et al. (2006). Reelin is transiently expressed in the peripheral nerve during development and is upregulated following nerve crush. *Molecular and Cellular Neuroscience*, *32*(1), 133–142.

Pendleton, J. C., Shamblott, M. J., Gary, D. S., Belegu, V., Hurtado, A., Malone, M. L., & McDonald, J. W. (2013). Chondroitin sulfate proteoglycans inhibit oligodendrocyte myelination through PTPσ. *Experimental Neurology*, *247*, 113–121.

Porter, S., Clark, I. M., Kevorkian, L., & Edwards, D. R. (2005). The ADAMTS metalloproteinases. *The Biochemical Journal*, *386*(1), 15–27.

Prut, L., & Belzung, C. (2003). The open field as a paradigm to measure the effects of drugs on anxiety-like behaviors: A review. *European Journal of Pharmacology*, *463*(1–3), 3–33.

Sandy, J. D., Westling, J., Kenagy, R. D., Iruela-Arispe, M. L., Verscharen, C., Rodriguez-Mazaneque, J. C., Zimmermann, D. R., et al. (2001). Versican V1 proteolysis in human aorta in vivo occurs at the Glu 441-Ala442 bond, a site that is cleaved by recombinant ADAMTS-1 and ADAMTS-4. *Journal of Biological Chemistry*, *276*(16), 13372–13378.

Sharma, K., Schmitt, S., Bergner, C. G., Tyanova, S., Kannaiyan, N., Manrique-Hoyos, N., Kongi, K., et al. (2015). Cell type- and brain region-resolved mouse brain proteome. *Nature Neuroscience*, *18*(12), 1819–1831.

Shen, Y., Tenney, A. P., Busch, S. A., Horn, K. P., Cuascut, F. X., Liu, K., He, Z., et al. (2009). PTP s is a receptor for CSPG, an inhibitor of neural regeneration. *Science*, *326*(5952), 592–596.

Shibasaki, H., Yamashita, Y., Neshige, R., Tobimatsu, S., & Fukui, R. (1985). Pathogenesis of giant somatosensory evoked potentials in progressive myoclonic epilepsy. *Brain*, 225–240.

Siebert, J. R., & Osterhout, D. J. (2011a). The inhibitory effects of chondroitin sulfate proteoglycans on oligodendrocytes. *Journal of Neurochemistry*, *119*(1), 176–188.

Siebert, J. R., & Osterhout, D. J. (2011b). Oligodendroglial cells express and secrete reelin. *Anatomical Record*, *294*(5), 759–763.

Simons, M., & Nave, K. (2015). Oligodendrocytes: Myelination and axonal support. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, *8*(1):a020469.

Simons, M., & Trajkovic, K. (2006). Neuron-glia communication in the control of oligodendrocyte function and myelin biogenesis. *Journal of Cell Science*, *119*(21), 4381–4389.

Takebayashi, H., & Ikenaka, K. (2015). Oligodendrocyte generation during mouse development. *Glia*, *63*(8), 1350–1356.

Tauchi, R., Imagama, S., Natori, T., Ohgomori, T., Muramoto, A., Shinjo, R., Matsuyama, Y., et al. (2012). The endogenous proteoglycan-degrading enzyme ADAMTS-4 promotes functional recovery after spinal cord injury. *Journal of Neuroinflammation*, *9*(1), 53.

Tortorella, M., Burn, T. C., Pratta, M. a, Hollis, J. M., Liu, R., Rosenfeld, S. A., Copeland, R. A., et al. (1999). Purification and cloning of aggrecanase-1: A member of the ADAMTS family of proteins. *Science*, *284* (5420), 1664–1666.

Tortorella, M., Pratta, M., Liu, R., Austin, J., Ross, O., Abbaszade, I., Burn, T., et al. (2000). Sites of aggrecan cleavage by recombinant human aggrecanase-1 (ADAMTS-4)*. The *Journal of Biological Chemistry*, *275* (24), 18566–18573.

Vistnes, M., Aronsen, J. M., Lunde, I. G., Sjaastad, I., Carlson, C. R., & Christensen, G. (2014). Pentosan polysulfate decreases myocardial expression of the extracellular matrix enzyme ADAMTS4 and improves cardiac function in vivo in rats subjected to pressure overload by aortic banding (N. Frangogiannis, Ed.). *PLoS ONE*, *9*(3), e89621.

Westling, J., Gottschall, P. E., Thompson, V. P., Cockburn, A., Perides, G., Zimmermann, D. R., & Sandy, J. D. (2004). ADAMTS4 (aggrecanase-1) cleaves human brain versican V2 at Glu405-Gln406 to generate glial hyaluronate binding protein. *The Biochemical Journal*, *377*(Pt 3), 787–795.

Yuan, W., Matthews, R. T., Sandy, J. D., & Gottschall, P. E. (2002). Association between protease-specific proteolytic cleavage of brevican and synaptic loss in the dentate gyrus of kainate-treated rats. *Science*, *114*(4), 1091–1101.

Zawadzka, M., Rivers, L. E., Fancy, S. P. J., Zhao, C., Tripathi, R., Jamen, F., Young, K., et al. (2010). CNS-resident glial progenitor/stem cells produce Schwann cells as well as oligodendrocytes during repair of CNS demyelination. *Cell Stem Cell*, *6*(6), 578–590.

SUPPORTING INFORMATION

Additional Supporting Information may be found online in the supporting information tab for this article.

How to cite this article: Pruvost M, Lépine M, Leonetti C, et al. ADAMTS-4 in oligodendrocytes contributes to myelination with an impact on motor function. *Glia*. 2017;65:1961–1975. https://doi.org/10.1002/glia.23207

Impact of 12/15-Lipoxygenase on Brain Injury After Subarachnoid Hemorrhage

Thomas Gaberel, MD, PhD; Clément Gakuba, MD, PhD; Yi Zheng, PhD; Matthieu Lépine, MSc; Eng H. Lo, PhD; Klaus van Leyen, PhD

Background and Purpose—Subarachnoid hemorrhage (SAH) is a devastating form of stroke. Oxidative stress contributes to brain injury, but the mechanisms have been poorly studied. Here, we evaluated the role of 12/15-lipoxygenase (12/15-LOX), an enzyme known to cause cell death in ischemic stroke, on brain injury in a mouse model of SAH.

Methods—C57Bl6 wild-type mice and *Alox15* knockout mice were subjected to SAH using a direct blood injection technique. In SAH wild-type mice, half received the 12/15-LOX inhibitor ML351 and half received vehicle. Immunohistochemistry, brain edema, blood-brain barrier leakage and functional outcomes were assessed 1 and 3 days after SAH induction.

Results—SAH led to increased 12/15-LOX in macrophages of the brain parenchyma, adjacent to the subarachnoid blood. Neuronal cell death after SAH was reduced by ML351 and in *Alox15* knockout mice. Similarly, SAH induced brain edema, which was 12/15-LOX dependent. Finally, *Alox15* gene knockout and inhibitor treatment in wild-type mice with SAH led to an improved behavioral outcome.

Conclusions—12/15-LOX is overexpressed in macrophages after SAH in mice, and inhibition of the 12/15-LOX pathway decreases brain injury and improves neurological outcome. This study suggests 12/15-LOX as a novel therapeutic target to limit brain injury after SAH.

Visual Overview—An online visual overview is available for this article. **(*Stroke*. 2019;50:520-523. DOI: 10.1161/STROKEAHA.118.022325.)**

Key Words: blood-brain barrier ■ brain injury ■ lipoxygenase ■ oxidative stress ■ subarachnoid hemorrhage

Downloaded from http://ahajournals.org by on October 14, 2020

Aneurysmal subarachnoid hemorrhage (SAH) is a severe form of stroke, which often leads to death and disability.[1] Two phenomena lead to brain injury: early brain injury (EBI) and delayed cerebral ischemia, frequently associated with cerebral vasospasm.[2] EBI refers to the effect of transient global ischemia and toxicity of subarachnoid blood, causing apoptotic neuronal cell death through several mechanisms.[3] Mechanisms involved in EBI persist for several days, and neuroprotection against EBI has to be developed.[4] 12/15-Lipoxygenase (12/15-LOX), an enzyme involved in the oxidative pathway, has been identified as a key target to prevent secondary brain injury after ischemic stroke.[5–7] Here, we evaluated the role of 12/15-LOX in EBI after SAH and the impact of a highly specific 12/15-LOX inhibitor, ML351.[8]

Methods

Data supporting the findings of this study are available from the corresponding authors on reasonable request. Detailed Materials and Methods are deposited in the online-only Data Supplement.

Animal experiments were performed following protocols approved by the MGH Institutional Animal Care and Use Committee in accordance with National Institutes of Health Guidelines. Briefly, SAH was induced in 11 *Alox15* knockout mice and 80 genetically matched wild-type mice using an established direct blood injection technique. Intraperitoneal injection of the 12/15-LOX inhibitor ML351 (50 mg/kg)[8] or vehicle occurred 5 minutes after induction of SAH. Immunohistochemistry was assessed 1 and 3 days later; and brain edema, blood-brain barrier leakage, and functional outcomes were assessed 3 days later. The flowchart of the study is described in the Figure I in the online-only Data Supplement.

Results

12/15-LOX Is Overexpressed in Macrophages After SAH

Blood was directly injected into the chiasmatic cistern to establish SAH (Figure 1A). After sacrifice 1 day later, immunohistochemistry revealed that 12/15-LOX is overexpressed in SAH mice compared with sham-operated mice (Figure 1B). This overexpression was restricted to

Received June 12, 2018; final revision received November 21, 2018; accepted November 30, 2018.

From the Neuroprotection Research Laboratory, Massachusetts General Hospital, Harvard Medical School, Charlestown, MA (T.G., C.G., Y.Z., E.H.L., K.v.L.); Department of Neurosurgery (T.G.) and Department of Anesthesiology and Critical Care Medicine (C.G.), Caen University Hospital, Avenue de la côte de Nacre, France; Normandie Université, UNICAEN, INSERM, UMR-S U1237, Physiopathology and Imaging of Neurological Disorders (PhIND), GIP Cyceron, Caen, France (M.L.).

The online-only Data Supplement is available with this article at https://www.ahajournals.org/doi/suppl/10.1161/STROKEAHA.118.022325.

Correspondence to Klaus van Leyen, PhD, Neuroprotection Research Laboratory, Massachusetts General Hospital, 149 13th St, Room 2401, Charlestown, MA 02129, Email klaus_vanleyen@hms.harvard.edu or Thomas Gaberel, MD, PhD, Neuroprotection Research Laboratory, Massachusetts General Hospital, 149 13th St, Room 2401, Charlestown, MA 02129, Email thomas.gaberel@hotmail.fr

© 2019 American Heart Association, Inc.

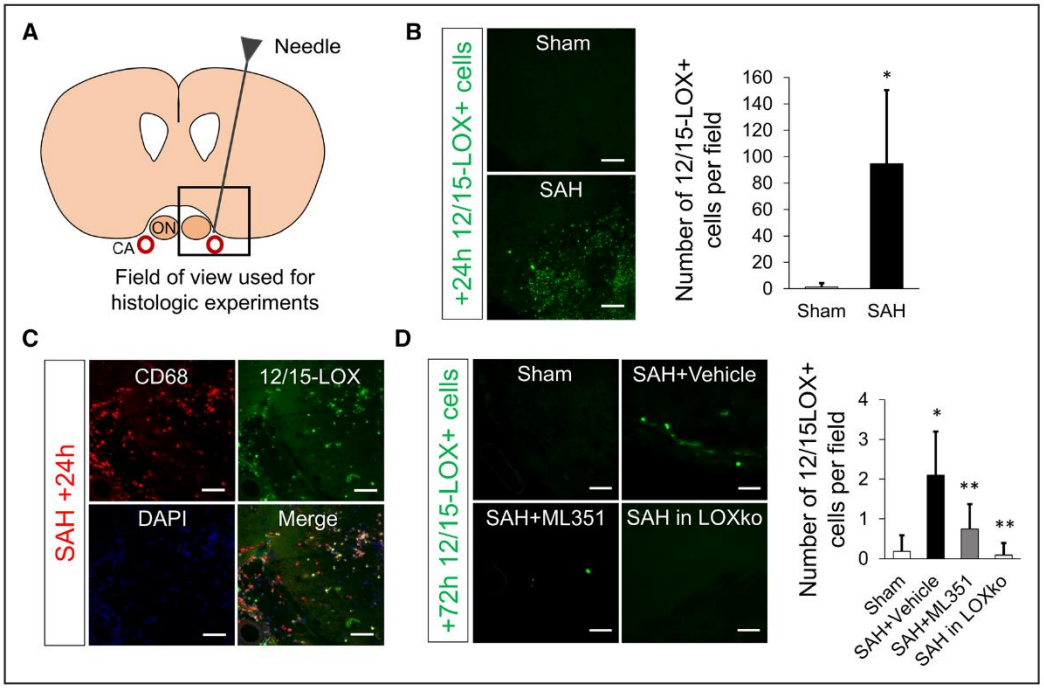


Figure 1. 12/15-lipoxygenase (12/15-LOX) is overexpressed after subarachnoid hemorrhage (SAH). **A**, Schematic view representing the needle trajectory for SAH induction, and the field of view used for the histological experiments. **B**, Representative immunohistochemistry images obtained 24 h after SAH induction, and corresponding quantification (n=4 per groups). SAH induces a major increase of 12/15-LOX compared with sham mice. Scale bar, 50 µm; **P*<0.05 vs sham. **C**, Representative immunohistochemistry images obtained 24 h after SAH induction, showing that the cells expressing 12/15-LOX are CD68+, so are activated macrophages. Scale bar, 50 µm. **D**, Representative immunohistochemistry images obtained 72 h after SAH induction, and corresponding quantification (n=4 per groups). SAH still induce an increase of 12/15-LOX compared with sham mice. This phenomenon is partly reversed by the 12/15-LOX inhibitor ML351, and absent in *Alox15* knockout (ko) mice. Scale bar, 50 µm; **P*<0,05 vs sham and ***P*<0.05 vs SAH+vehicle. CA indicates carotid artery; and ON, optic nerve.

Downloaded from http://ahajournals.org by on November 7, 2020

the brain parenchyma adjacent to the SAH. Cells expressing 12/15-LOX are CD68+, suggesting a central role for activated macrophages in 12/15-LOX overexpression (Figure 1C; Figure II in the online-only Data Supplement). Neither neurons nor astrocytes expressed 12/15-LOX 24 hours after SAH (Figures III and IV in the online-only Data Supplement).

12/15-LOX Overexpression Increases Brain Injury After SAH

To investigate the impact of 12/15-LOX on brain injury, we induced SAH in *Alox15* knockout mice, or injected the 12/15-LOX inhibitor ML351 to wild-type mice with SAH. 12/15-LOX expression remained slightly elevated in wild-type mice 3 days after SAH, which was reduced by ML351 treatment, whereas *Alox15* knockout mice exhibited only background staining for 12/15-LOX (Figure 1D). Next, we detected widespread neuronal cell death surrounding the SAH area, as assessed by Fluorojade B staining in SAH mice, compared with *Alox15* knockout mice and mice receiving ML351 (Figure 2A and 2B). Moreover, SAH mice developed cerebral edema, which was reduced in *Alox15* knockout mice but not by ML351 (Figure 2C). We did not detect blood-brain barrier leakage in this model (Figure 2D), suggesting that edema in this model is mainly cytotoxic not vasogenic.

12/15-LOX Inhibition Improves the Short-Term Functional Outcome After SAH

This model of SAH induces short-term neurological impairments. SAH-associated weight loss was reduced in *Alox15* knockout mice (Figure 3A). Using a 4-point neuroscore, we found that the neurological deficit caused by SAH is decreased in mice receiving ML351 (Figure 3B). Little injury was detected using a modified Garcia scale (Figure 3C). Finally, spontaneous motor activity was decreased in SAH mice, which was reversed by ML351 and in *Alox15* knockout mice (Figure 3D).

Discussion

In our study, 12/15-LOX was overexpressed in activated macrophages after SAH, and blocking 12/15-LOX activity decreased the level of brain injury and subsequently improved the short-term neurological outcome in mice.

This result is in line with previous studies evaluating the role of 12/15-LOX in ischemic stroke: 12/15-LOX is upregulated in the peri-infarct area in mice and humans, contributing to brain damage by causing both neuronal cell death and neurovascular injury.[5,6] Surprisingly, 12/15-LOX is here increased predominantly in macrophages at 24 hours, rather than in neurons and endothelial cells; the injury mechanism may thus differ. Fewer 12/15-LOX positive cells are present at 72 hours. Considering the number of CD68+ cells after SAH is stable within the first 7 days after SAH,[9] this suggests its expression

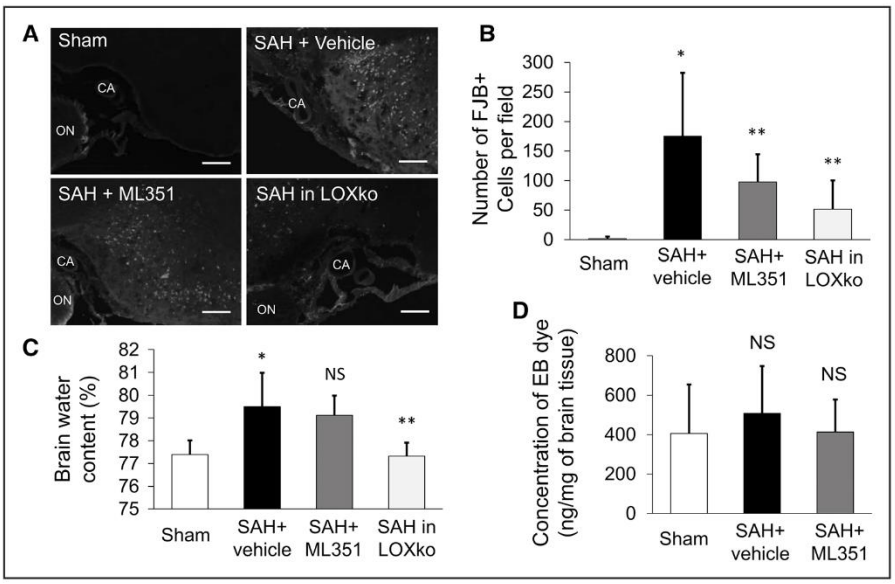


Figure 2. 12/15-Lipoxygenase (12/15-LOX) plays a key role in neuronal cell death and brain edema after subarachnoid hemorrhage (SAH). **A**, Representative pictures of FJB staining performed 72 h after SAH induction. SAH induces widespread FJB staining indicative of neuronal damage, a phenomenon limited in 12/15-LOX knockout (ko) mice or in mice receiving the 12/15-LOX inhibitor ML351. Scale bar, 200 µm. **B**, Corresponding quantification (n=4 per group). *P<0.05 vs sham and **P<0.05 vs SAH+vehicle. **C**, Brain edema measured using the dry/wet weight method in both hemispheres 3 days after SAH induction. SAH induces brain edema, which is reduced in *Alox15* ko mice (n=10 in wild-type [WT] mice groups, and 7 in the *Alox15* ko mice group). *P<0.05 vs sham; **P<0.05 vs SAH+vehicle; and NS: nonsignificant vs SAH+vehicle. **D**, No opening of the blood-brain barrier is detected in the 2 brain hemispheres with Evans Blue (EB; n=7 in sham and SAH+vehicle group, n=9 in SAH+ML351 group). NS: nonsignificant vs sham. CA indicates carotid artery; and ON, optic nerve.

is transient. The enzyme inhibitor ML351 further reduced the amount of 12/15-LOX, possibly because of the vicious cycle of amplification of oxidative stress caused by 12/15-LOX.[8]

The role of oxidative stress in SAH has long been known.[10] Interestingly, baicalein administration in rats with SAH decreased EBI, notably because baicalein is a

Downloaded from http://ahajournals.org by on November 7, 2020

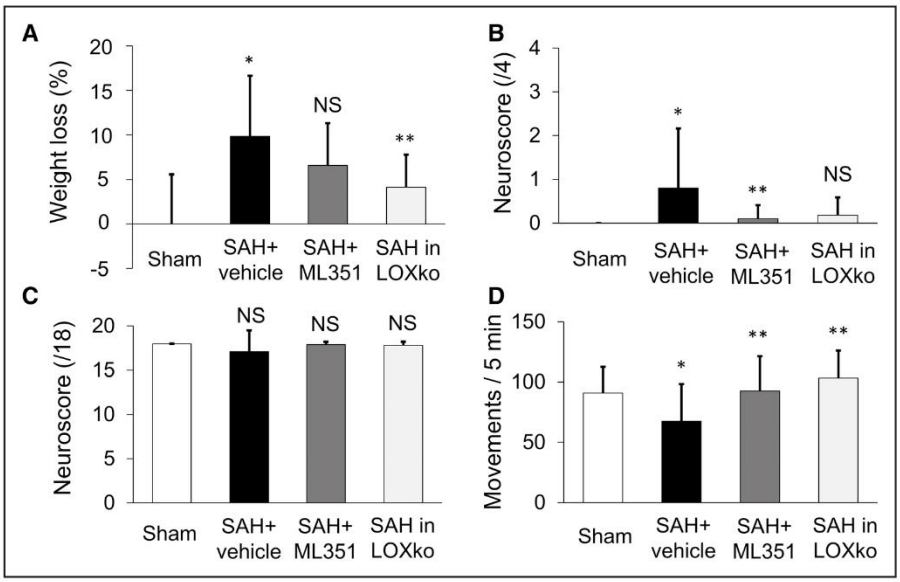


Figure 3. Inhibition of 12/15-lipoxygenase (12/15-LOX) improves functional outcomes 3 days after subarachnoid hemorrhage (SAH). **A**, SAH leads to significant weight loss. This phenomenon is reversed in *Alox15* ko mice and decreased in animals treated with ML351 (n=20 in sham and SAH+ML351 mice, n=18 in SAH+Vehicle mice, and n=11 in *Alox15* ko mice). *P<0.05 vs sham; **P<0.05 vs SAH+vehicle; and NS: nonsignificant vs SAH+vehicle. **B**, The 12/15-LOX inhibitor ML351 improves neurological deficit after SAH, evaluated by a 4-point neuroscore scale (n=20 in the wild-type [WT] mice groups, n=11 in the *Alox15* ko mice group). *P<0.05 vs sham; **P<0.05 vs SAH+vehicle; and NS: nonsignificant vs SAH+vehicle. **C**, No significant deficit in a modified Garcia scale (n=20 in the WT mice groups, n=11 in the 12/15-LOX ko mice group). NS: nonsignificant vs sham. **D**, Spontaneous activity is better preserved in mice treated with ML351 compared with vehicle following SAH, and in *Alox15* ko mice (n=20 in the WT mice groups, n=11 in the *Alox15* ko mice group). *P<0.05 vs sham and **P<0.05 vs SAH+vehicle.

12/15-LOX inhibitor.[11] Baicalein as a strong antioxidant is not specific; however, and data focusing strictly on 12/15-LOX were needed, particularly because the 12/15-LOX product 12-hydroxyeicosatetraenoic acid is elevated in the cerebrospinal fluid of SAH patients.[12]

Our study has several limitations. First, our study only looked at short-term outcomes relevant to EBI and found fewer neurological deficits than previously; a possible impact of 12/15-LOX on cerebral vasospasm and delayed cerebral ischemia remains to be explored. Additionally, we have used male mice, and effects of 12/15-LOX in females remain to be determined. Moreover, future studies are needed to examine the mechanisms of 12/15-LOX injury in more detail, focusing on its activity in macrophages.

Sources of Funding

This work was supported by National Institutes of Health (NIH) grants R01NS049430, R21NS087165, and American Heart Association grant 17GRNT33460100 (to Dr van Leyen); research grants from the Société Française de Neurochirurgie and Zeiss (to Dr Gaberel); fellowships from Société Française d'Anesthésie et Réanimation and Fondation pour la Recherche Médicale (SPE20150331891; to Dr Gakuba).

Disclosures

Patent protection for ML351 as treatment for stroke has been applied for (PCT/US2014/052269). All authors report no conflicts.

References

1. Connolly ES Jr, Rabinstein AA, Carhuapoma JR, Derdeyn CP, Dion J, Higashida RT, et al; American Heart Association Stroke Council; Council on Cardiovascular Radiology and Intervention; Council on Cardiovascular Nursing; Council on Cardiovascular Surgery and Anesthesia; Council on Clinical Cardiology. Guidelines for the management of aneurysmal subarachnoid hemorrhage: a guideline for healthcare professionals from the American Heart Association/American Stroke Association. *Stroke*. 2012;43:1711–1737. doi: 10.1161/STR.0b013e3182587839
2. Macdonald RL. Delayed neurological deterioration after subarachnoid haemorrhage. *Nat Rev Neurol*. 2014;10:44–58. doi: 10.1038/nrneurol.2013.246
3. Cahill J, Cahill WJ, Calvert JW, Calvert JH, Zhang JH. Mechanisms of early brain injury after subarachnoid hemorrhage. *J Cereb Blood Flow Metab*. 2006;26:1341–1353. doi: 10.1038/sj.jcbfm.9600283
4. Sehba FA, Pluta RM, Zhang JH. Metamorphosis of subarachnoid hemorrhage research: from delayed vasospasm to early brain injury. *Mol Neurobiol*. 2011;43:27–40. doi: 10.1007/s12035-010-8155-z
5. van Leyen K, Kim HY, Lee SR, Jin G, Arai K, Lo EH. Baicalein and 12/15-lipoxygenase in the ischemic brain. *Stroke*. 2006;37:3014–3018. doi: 10.1161/01.STR.0000249004.25444.a5
6. Yigitkanli K, Pekcec A, Karatas H, Pallast S, Mandeville E, Joshi N, et al. Inhibition of 12/15-lipoxygenase as therapeutic strategy to treat stroke. *Ann Neurol*. 2013;73:129–135. doi: 10.1002/ana.23734
7. Pallast S, Arai K, Pekcec A, Yigitkanli K, Yu Z, Wang X, et al. Increased nuclear apoptosis-inducing factor after transient focal ischemia: a 12/15-lipoxygenase-dependent organelle damage pathway. *J Cereb Blood Flow Metab*. 2010;30:1157–1167. doi: 10.1038/jcbfm.2009.281
8. Rai G, Joshi N, Jung JE, Liu Y, Schultz L, Yasgar A, et al. Potent and selective inhibitors of human reticulocyte 12/15-lipoxygenase as anti-stroke therapies. *J Med Chem*. 2014;57:4035–4048. doi: 10.1021/jm401915r
9. Plog BA, Moll KM, Kang H, Iliff JJ, Dashnaw ML, Nedergaard M, et al. A novel technique for morphometric quantification of subarachnoid hemorrhage-induced microglia activation. *J Neurosci Methods*. 2014;229:44–52. doi: 10.1016/j.jneumeth.2014.04.001
10. Gaetani P, Marzatico F, Rodriguez y Baena R, Pacchiarini L, Viganò T, Grignani G, et al. Arachidonic acid metabolism and pathophysiologic aspects of subarachnoid hemorrhage in rats. *Stroke*. 1990;21:328–332.
11. Wang CX, Xie GB, Zhou CH, Zhang XS, Li T, Xu JG, et al. Baincalein alleviates early brain injury after experimental subarachnoid hemorrhage in rats: possible involvement of TLR4/NF-κB-mediated inflammatory pathway. *Brain Res*. 2015;1594:245–255. doi: 10.1016/j.brainres.2014.10.014
12. Poloyac SM, Reynolds RB, Yonas H, Kerr ME. Identification and quantification of the hydroxyeicosatetraenoic acids, 20-HETE and 12-HETE, in the cerebrospinal fluid after subarachnoid hemorrhage. *J Neurosci Methods*. 2005;144:257–263. doi: 10.1016/j.jneumeth.2004.11.015

Downloaded from http://ahajournals.org by on October 14, 2020

Bibliographie

A

Acharya, C., Yik, J. H. N., Kishore, A., Van Dinh, V., Di Cesare, P. E., and Haudenschild, D. R. (2014). Cartilage oligomeric matrix protein and its binding partners in the cartilage extracellular matrix: Interaction, regulation and role in chondrogenesis. *Matrix Biol.* 37, 102–111. doi:10.1016/j.matbio.2014.06.001.

Adams, H. ., Bendixen, B. ., Kappelle, L. ., Biller, J., Love, B. ., Gordon, D. ., et al. (1993). Classification of Subtype of Acute Ischemic Stroke. *Stroke* 23, 35–41. doi:10.1161/01.STR.24.1.35.

Ajmo, J. M., Bailey, L. A., Howell, M. D., Cortez, L. K., Pennypacker, K. R., Mehta, H. N., et al. (2010). Abnormal Post-Translational and Extracellular Processing of Brevican in Plaque-Bearing Mice Overexpressing APPsw. *J Neurochem.* 113, 784–795. doi:10.1161/CIRCULATIONAHA.110.956839.

Akassoglou, K., Kombrinck, K. W., Degen, J. L., and Strickland, S. (2000). Tissue plasminogen activator-mediated fibrinolysis protects against axonal degeneration and demyelination after sciatic nerve injury. *J. Cell Biol.* 149, 1157–1166. doi:10.1083/jcb.149.5.1157.

Alaiyed, S., Bozzelli, P. L., Caccavano, A., Wu, J. Y., and Conant, K. (2019). Venlafaxine stimulates PNN proteolysis and MMP-9-dependent enhancement of gamma power; relevance to antidepressant efficacy. *J. Neurochem.* 148, 810–821. doi:10.1111/jnc.14671.

Alberts, M. J., Shang, T., and Magadan, A. (2015). Endovascular therapy for acute ischemic stroke: Dawn of anew era. *JAMA Neurol.* 72, 1101–1103. doi:10.1001/jamaneurol.2015.1743.

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.

Anfray, A., Drieu, A., Hingot, V., Hommet, Y., Yetim, M., Rubio, M., et al. (2019). Circulating tPA contributes to neurovascular coupling by a mechanism involving the endothelial NMDA receptors. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* doi:10.1177/0271678X19883599.

Anlar, B., and Gunel-Ozcan, A. (2012). Tenascin-R: Role in the central nervous system. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 44, 1385–1389. doi:10.1016/j.biocel.2012.05.009.

Aoki, T., Kataoka, H., Morimoto, M., Nozaki, K., and Hashimoto, N. (2007). Macrophage-derived matrix metalloproteinase-2 and -9 promote the progression of cerebral aneurysms in rats. *Stroke* 38, 162–169. doi:10.1161/01.STR.0000252129.18605.c8.

Armstead, W. M., Cines, D. B., and Higazi, A. A. R. (2004). Altered NO function contributes to impairment of uPA and tPA cerebrovasodilation after brain injury. *J. Neurotrauma* 21, 1204–1211. doi:10.1089/neu.2004.21.1204.

Arundine, M., and Tymianski, M. (2003). Molecular mechanisms of calcium-dependent neurodegeneration in excitotoxicity. *Cell Calcium 34* 34, 325–337. doi:10.1016/S0143-4160(03)00141-6.

Asher, R. A., Morgenstern, D. A., Fidler, P. S., Adcock, K. H., Oohira, A., Braistead, J. E., et al. (2000). Neurocan Is Upregulated in Injured Brain and in Cytokine-Treated Astrocytes. *J. Neurosci.* 20, 2427–2438.

Asher, R. A., Morgenstern, D. A., Shearer, M. C., Adcock, K. H., Pesheva, P., and Fawcett, J. W. (2002). Versican Is Upregulated in CNS Injury and Is a Product of Oligodendrocyte Lineage Cells. *J. Neurosci.* 22, 2225–2236.

Ashlin, T. G., Kwan, A. P. L., and Ramji, D. P. (2013). Regulation of ADAMTS-1, -4 and -5 expression in human macrophages: Differential regulation by key cytokines implicated in atherosclerosis and novel synergism between TL1A and IL-17. *Cytokine* 64, 234–242. doi:10.1016/j.cyto.2013.06.315.

Åstedt, B., Lindoff, C., and Lecander, I. (1998). Significance of the plasminogen activator inhibitor of placental type (PAI-2) in pregnancy. *Semin. Thromb. Hemost.* 24, 431–435. doi:10.1055/s-2007-996035.

Astrup, T., and Permin, P. M. (1947). Fibrinolysis in the Animal Organism. *Nature* 159, 681–682.

Avram, S., Shaposhnikov, S., Buiu, C., and Mernea, M. (2014). Chondroitin Sulfate Proteoglycans : Structure-Function Relationship with Implication in Neural Development and Brain Disorders. *Biomed Res. Int.* 2014, 14–16. doi:10.1155/2014/642798.

Ayata, C., and Ropper, A. H. (2002). Ischaemic brain oedema. *J. Clin. Neurosci.* 9, 113–124. doi:10.1054/jocn.2001.1031.

B

Baig, S., Wilcock, G. K., and Love, S. (2005). Loss of perineuronal net N-acetylgalactosamine in Alzheimer's disease. *Acta Neuropathol.* 110, 393–401. doi:10.1007/s00401-005-1060-2.

Balkaya, M., Prinz, V., Custodis, F., Gertz, K., Kronenberg, G., Kroeber, J., et al. (2011). Stress worsens endothelial function and ischemic stroke via glucocorticoids. *Stroke* 42, 3258–3264.

doi:10.1161/STROKEAHA.110.607705.

Balmer, T. S. (2016). Perineuronal nets enhance the excitability of fast-spiking neurons. *eNeuro* 3, 745–751. doi:10.1523/ENEURO.0112-16.2016.

Baltaci, S. B., Mogulkoc, R., and Baltaci, A. K. (2019). Molecular Mechanisms of Early and Late LTP. *Neurochem. Res.* 44, 281–296. doi:10.1007/s11064-018-2695-4.

Banerjee, S. B., Gutzeit, V. A., Baman, J., Aoued, H. S., Doshi, N. K., Liu, R. C., et al. (2017). Perineuronal Nets in the Adult Sensory Cortex Are Necessary for Fear Learning. *Neuron* 95, 169-179.e3. doi:10.1016/j.neuron.2017.06.007.

Baranes, D., Lederfein, D., Huang, V. Y., Chen, M., Bailey, C. H., and Kandel, E. R. (1998). Tissue plasminogen activator contributes to the late phase of LTP and to synaptic growth in the hippocampal mossy fiber pathway. *Neuron* 21, 813–825. doi:10.1016/S0896-6273(00)80597-8.

Barker-carlson, K., Lawrence, D. A., and Schwartz, B. S. (2002). Acyl-Enzyme Complexes between Tissue-type Plasminogen Activator and Neuroserpin are Short-lived *in vitro* *. 277, 46852–46857. doi:10.1074/jbc.M207740200.

Bartoletti, A., Medini, P., Berardi, N., and Maffei, L. (2004). Environmental enrichment prevents effects of dark-rearing in the rat visual cortex. *Nat. Neurosci.* 7, 215–216. doi:10.1038/nn1201.

Basham, M. E., and Seeds, N. W. (2001). Plasminogen expression in the neonatal and adult mouse brain. *J. Neurochem.* 77, 318–325. doi:10.1046/j.1471-4159.2001.t01-1-00239.x.

Bekku, Y., Saito, M., Moser, M., Fuchigami, M., Maehara, A., Nakayama, M., et al. (2012). Bral2 is indispensable for the proper localization of brevican and the structural integrity of the perineuronal net in the brainstem and cerebellum. *J. Comp. Neurol.* 520, 1721–1736. doi:10.1002/cne.23009.

Bekku, Y., Su, W. D., Hirakawa, S., Fässler, R., Ohtsuka, A., Kang, J. S., et al. (2003). Molecular cloning of Bral2, a novel brain-specific link protein, and immunohistochemical colocalization with brevican in perineuronal nets. *Mol. Cell. Neurosci.* 24, 148–159. doi:10.1016/S1044-7431(03)00133-7.

Benchenane, K., Berezowski, V., Fernández-Monreal, M., Brillault, J., Valable, S., Dehouck, M. P., et al. (2005). Oxygen glucose deprivation switches the transport of tPA across the blood-brain barrier from an LRP-dependent to an increased LRP-independent process. *Stroke* 36, 1059–1064. doi:10.1161/01.STR.0000163050.39122.4f.

Benchenane, K., Castel, H., Boulouard, M., Bluthé, R., Fernandez-Monreal, M., Roussel, B. D., et al.

(2007). Anti-NR1 N-terminal-domain vaccination unmasks the crucial action of tPA on NMDA-receptor-mediated toxicity and spatial memory. *J. Cell Sci.* 120, 578–585. doi:10.1242/jcs.03354.

Berretta, S., Pantazopoulos, H., Markota, M., Brown, C., and Batzianouli, E. T. (2015). Losing the sugar coating: Potential impact of perineuronal net abnormalities on interneurons in schizophrenia. *Schizophr. Res.* 167, 18–27. doi:10.1016/j.schres.2014.12.040.

Bertrand, T., Lesept, F., Chevilley, A., Lenoir, S., Aimable, M., Briens, A., et al. (2015). Conformations of tissue plasminogen activator (tPA) orchestrate neuronal survival by a crosstalk between EGFR and NMDAR. *Cell Death Dis.* 6, 1–9. doi:10.1038/cddis.2015.296.

Beurdeley, M., Spatazza, J., Lee, H. H. C., Sugiyama, S., Bernard, C., Di Nardo, A. A., et al. (2012). Otx2 binding to perineuronal nets persistently regulates plasticity in the mature visual cortex. *J. Neurosci.* 32, 9429–9437. doi:10.1523/JNEUROSCI.0394-12.2012.

Bignami, A., Perides, G., and Rahemtulla, F. (1993). Versican , a Hyaluronate-Binding Proteoglycan of Embryonal Precartilaginous Mesenchyma , Is Mainly Expressed Postnatally in Rat Brain. *J. Neurosci. Res.* 106, 97–106.

Blacktop, J. M., Todd, R. P., and Sorg, B. A. (2017). Role of perineuronal nets in the anterior dorsal lateral hypothalamic area in the acquisition of cocaine-induced conditioned place preference and self-administration. *Neuropharmacology* 118, 124–136. doi:10.1016/j.neuropharm.2017.03.018.

Boehme, A. K., Esenwa, C., and Elkind, M. S. V. (2017). Stroke Risk Factors, Genetics, and Prevention. *Circ. Res.* 120, 472–495. doi:10.1161/CIRCRESAHA.116.308398.

Boulaftali, Y., Ho-tin-noe, B., Pena, A., Venisse, L., Richard, B., Arocas, V., et al. (2011). Platelet Protease Nexin-1, a Serpin That Strongly Influences Fibrinolysis and Thrombolysis. *Circulation* 123, 1326–1334. doi:10.1161/CIRCULATIONAHA.110.000885.

Bouton, M. C., Boulaftali, Y., Richard, B., Arocas, V., Michel, J. B., and Jandrot-Perrus, M. (2012). Emerging role of serpinE2/protease nexin-1 in hemostasis and vascular biology. *Blood* 119, 2452–2457. doi:10.1182/blood-2011-10-387464.

Brakebusch, C., Seidenbecher, C. I., Asztely, F., Rauch, U., Matthies, H., Meyer, H., et al. (2002). Brevican-Deficient Mice Display Impaired Hippocampal CA1 Long-Term Potentiation but Show No Obvious Deficits in Learning and Memory. *Mol. Cell. Biol.* 22, 7417–7427. doi:10.1128/MCB.22.21.7417.

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, 1–18. doi:10.1038/celldisc.2017.1.

Broughton, B. R. S., Reutens, D. C., and Sobey, C. G. (2009). Apoptotic mechanisms after cerebral ischemia. *Stroke* 40. doi:10.1161/STROKEAHA.108.531632.

Brückner, G., Brauer, K., Härtig, W., Wolff, J. R., Rickmann, M. J., Derouiche, A., et al. (1993). Perineuronal nets provide a polyanionic, glia-associated form of microenvironment around certain neurons in many parts of the rat brain. *Glia* 8, 183–200. doi:10.1002/glia.440080306.

Brückner, G., Grosche, J., Schmidt, S., Härtig, W., Margolis, R. U., Delpech, B., et al. (2000). Postnatal development of perineuronal nets in wild-type mice and in a mutant deficient in tenascin-R. *J. Comp. Neurol.* 428, 616–629. doi:10.1002/1096-9861(20001225)428:4<616::AID-CNE3>3.0.CO;2-K.

Brückner, G., Hausen, D., Härtig, W., Drlicek, T., Arendt, T., and Brauer, K. (1999). CORTICAL AREAS ABUNDANT IN EXTRACELLULAR MATRIX CHONDROITIN SULPHATE PROTEOGLYCANS ARE LESS AFFECTED BY CYTOSKELETAL CHANGES IN ALZHEIMER'S DISEASE. *Neuroscience* 92, 791–805.

Bu, G., Williams, S., Strickland, D. K., and Schwartz, A. L. (1992). Low density lipoprotein receptor-related protein/a2-macroglobulin receptor is an hepatic receptor for tissue-type plasminogen activator (hepatocyte/dearance/endocytosis/39-kDa. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 89, 7427–7431.

Bukalo, O., Schachner, M., and Dityatev, A. (2001). Modification of extracellular matrix by enzymatic removal of chondroitin sulfate and by lack of tenascin-R differentially affects several forms of synaptic plasticity in the hippocampus. *Neuroscience* 104, 359–369. doi:10.1016/S0306-4522(01)00082-3.

Bukhari, N., Torres, L., Robinson, J. K., and Tsirka, S. E. (2011). Axonal regrowth after spinal cord injury via chondroitinase and the tissue plasminogen activator (tPA)/plasmin system. *J. Neurosci.* 31, 14931–14943. doi:10.1523/JNEUROSCI.3339-11.2011.

Büttner, F. H., Hughes, C. E., Margerie, D., Lichte, A., Tschesche, H., Caterson, B., et al. (1998). Membrane type 1 matrix metalloproteinase (MT1-MMP) cleaves the recombinant aggrecan substrate rAgg1mut at the "aggrecanase" and the MMP sites: Characterization of MT1-MMP catabolic activities on the interglobular domain of aggrecan. *Biochem. J.* 333, 159–165. doi:10.1042/bj3330159.

C

Cabungcal, J. H., Steullet, P., Morishita, H., Kraftsik, R., Cuenod, M., Hensch, T. K., et al. (2013). Perineuronal nets protect fast-spiking interneurons against oxidative stress. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 110, 9130–9135. doi:10.1073/pnas.1300454110.

Caceres, J. A., and Goldstein, J. N. (2012). Intracranial Hemorrhage. *Emerg. Med. Clin. North Am.* 30, 771–794. doi:10.1016/j.emc.2012.06.003.

Calabresi, P., Napolitano, M., Centonze, D., Marfia, G. A., Gubellini, P., Teule, M. A., et al. (2000). Tissue plasminogen activator controls multiple forms of synaptic plasticity and memory. *Eur. J. Neurosci.* 12, 1002–1012. doi:10.1046/j.1460-9568.2000.00991.x.

Campbell, B. C. V., Mitchell, P. J., Churilov, L., Yassi, N., Kleinig, T. J., Dowling, R. J., et al. (2018). Tenecteplase versus alteplase before thrombectomy for ischemic stroke. *N. Engl. J. Med.* 378, 1573–1582. doi:10.1056/NEJMoa1716405.

Carlén, M., Meletis, K., Siegle, J. H., Cardin, J. A., Futai, K., Vierling-Claassen, D., et al. (2012). A critical role for NMDA receptors in parvalbumin interneurons for gamma rhythm induction and behavior. *Mol. Psychiatry* 17, 537–548. doi:10.1038/mp.2011.31.

Carstens, K. E., Phillips, M. L., Pozzo-Miller, L., Weinberg, R. J., and Dudek, S. M. (2016). Perineuronal nets suppress plasticity of excitatory synapses on CA2 pyramidal neurons. *J. Neurosci.* 36, 6312–6320. doi:10.1523/JNEUROSCI.0245-16.2016.

Carulli, D., Pizzorusso, T., Kwok, J. C. F., Putignano, E., Poli, A., Forostyak, S., et al. (2010). Animals lacking link protein have attenuated perineuronal nets and persistent plasticity. *Brain* 133, 2331–2347. doi:10.1093/brain/awq145.

Carulli, D., Rhodes, K. E., Brown, D. J., Bonnert, T. P., Pollack, S. J., Oliver, K., et al. (2006). Composition of perineuronal nets in the adult rat cerebellum and the cellular origin of their components. *J. Comp. Neurol.* 494, 559–577. doi:10.1002/cne.20822.

Carulli, D., Rhodes, K. E., and Fawcett, J. W. (2007). Upregulation of Aggrecan , Link Protein 1 , and Hyaluronan Synthases during Formation of Perineuronal Nets in the Rat Cerebellum. *J. Comp. Neurol.* 94, 83–94. doi:10.1002/cne.

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.

Celio, M. R., Spreafico, R., De Biasi, S., and Vitellaro-Zuccarello, L. (1998). Perineuronal nets: Past and present. *Trends Neurosci.* 21, 510–515. doi:10.1016/S0166-2236(98)01298-3.

Chalouhi, N., Hoh, B. L., and Hasan, D. (2013). Review of cerebral aneurysm formation, growth, and rupture. *Stroke* 44, 3613–3622. doi:10.1161/STROKEAHA.113.002390.

Chang, E. F., and Merzenich, M. M. (2003). Environmental Noise Retards Auditory Cortical Development. *Science (80-.).* 300, 498–502.

Chang, M. C., Park, J. M., Pelkey, K. A., Grabenstatter, H. L., Xu, D., Linden, D. J., et al. (2010). Narp regulates homeostatic scaling of excitatory synapses on parvalbumin-expressing interneurons. *Nat. Neurosci.* 13, 1090–1097. doi:10.1038/nn.2621.

Chen, C., Bivard, A., Lin, L., Levi, C. R., Spratt, N. J., and Parsons, M. W. (2019). Thresholds for infarction vary between gray matter and white matter in acute ischemic stroke: A CT perfusion study. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* 39, 536–546. doi:10.1177/0271678X17744453.

Chen, C. C., Chu, P., and Brumberg, J. C. (2015). Experience-dependent regulation of tissue-type plasminogen activator in the mouse barrel cortex. *Neurosci. Lett.* 599, 152–157. doi:10.1016/j.neulet.2015.05.050.

Chen, L., Yang, L., Zha, Y., and Cui, L. (2011). Association of serum a disintegrin and metalloproteinase with thrombospodin motif 4 levels with the presence and severity of coronary artery disease. *Diagnostic methods* 22, 570–576. doi:10.1097/MCA.0b013e32834c7565.

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. doi:10.3389/fncel.2015.00415.

Chow, J. P. H., Fujikawa, A., Shimizu, H., Suzuki, R., and Noda, M. (2008). Metalloproteinase- and γ-secretase-mediated cleavage of protein-tyrosine phosphatase receptor type Z. *J. Biol. Chem.* 283, 30879–30889. doi:10.1074/jbc.M802976200.

Chu, P., Chen, E., Bajnath, A., and Brumberg, J. C. (2015). Cell type specificity of tissue plasminogen activator in the mouse barrel cortex. *Data Br.* 4, 332–335. doi:10.1016/j.dib.2015.06.008.

Cipolla, M. J., Lessov, N., and Clark, W. M. (2000). Postischemic attenuation of cerebral artery reactivity is increased in the presence of tissue plasminogen activator. *Stroke* 31, 940–945. doi:10.1161/01.STR.31.4.940.

Citri, A., and Malenka, R. C. (2008). Synaptic plasticity: Multiple forms, functions, and mechanisms. *Neuropsychopharmacology* 33, 18–41. doi:10.1038/sj.npp.1301559.

Collen, D., and Lijnen, H. R. (1991). Basic and clinical aspects of fibrinolysis and thrombolysis. *Blood* 78, 3114–3124. doi:10.1182/blood.v78.12.3114.bloodjournal78123114.

Collen, D., and Lijnen, H. R. (2009). The tissue-type plasminogen activator story. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 29, 1151–1155. doi:10.1161/ATVBAHA.108.179655.

Correa, F., Gauberti, M., Parcq, J., Macrez, R., Hommet, Y., Obiang, P., et al. (2011). Tissue plasminogen activator prevents white matter damage following stroke. *J. Exp. Med.* 208, 1229–1242. doi:10.1084/jem.20101880.

Corvetti, L., and Rossi, F. (2005). Degradation of chondroitin sulfate proteoglycans induces sprouting of intact Purkinje axons in the cerebellum of the adult rat. *J. Neurosci.* 25, 7150–7158. doi:10.1523/JNEUROSCI.0683-05.2005.

Cross, A. K., Haddock, G., Stock, C. J., Allan, S., Surr, J., Bunning, R. a D., et al. (2006a). ADAMTS-1 and -4 are up-regulated following transient middle cerebral artery occlusion in the rat and their expression is modulated by TNF in cultured astrocytes. *Brain Res.* 1088, 19–30. doi:10.1016/j.brainres.2006.02.136.

Cross, A. K., Haddock, G., Surr, J., Plumb, J., and Bunning, R. A. D. (2006b). Differential expression of ADAMTS-1 , -4 , -5 and TIMP-3 in rat spinal cord at different stages of acute experimental autoimmune encephalomyelitis. *J. Autoimmun.* 26, 16e23. doi:10.1016/j.jaut.2005.09.026.

Cua, R. C., Lau, L. W., Keough, M. B., Midha, R., Apte, S. S., and Yong, V. W. (2013). Overcoming neurite-inhibitory chondroitin sulfate proteoglycans in the astrocyte matrix. *Glia* 61, 972–984. doi:10.1002/glia.22489.

Culmsee, C., Zhu, C., Landshamer, S., Becattini, B., Wagner, E., Pellechia, M., et al. (2005). Apoptosis-inducing factor triggered by poly(ADP-ribose) polymerase and Bid mediates neuronal cell death after oxygen-glucose deprivation and focal cerebral ischemia. *J. Neurosci.* 25, 10262–10272. doi:10.1523/JNEUROSCI.2818-05.2005.

D

D'Arcy, M. S. (2019). Cell death: a review of the major forms of apoptosis, necrosis and autophagy. *Cell Biol. Int.* 43, 582–592. doi:10.1002/cbin.11137.

Dancevic, C. M., Fraser, F. W., Smith, A. D., Stupka, N., Ward, A. C., and McCulloch, D. R. (2013). Biosynthesis and expression of a disintegrin-like and metalloproteinase domain with

thrombospondin-1 repeats-15: A novel versican-cleaving proteoglycanase. *J. Biol. Chem.* 288, 37267–37276. doi:10.1074/jbc.M112.418624.

Davis, G. E., Pintar Allen, K. A., Salazar, R., and Maxwell, S. A. (2001). Matrix metalloproteinase-1 and -9 activation by plasmin regulates a novel endothelial cell-mediated mechanism of collagen gel contraction and capillary tube regression in three-dimensional collagen matrices. *J. Cell Sci.* 114, 917–930.

De Vivo, L., Landi, S., Panniello, M., Baroncelli, L., Chierzi, S., Mariotti, L., et al. (2013). Extracellular matrix inhibits structural and functional plasticity of dendritic spines in the adult visual cortex. *Nat. Commun.* 4, 1–10. doi:10.1038/ncomms2491.

de Wit, N. M., Vanmol, J., Kamermans, A., Hendriks, J. J. A., and de Vries, H. E. (2017). Inflammation at the blood-brain barrier: The role of liver X receptors. *Neurobiol. Dis.* 107, 57–65. doi:10.1016/j.nbd.2016.09.015.

Deepa, S. S., Carulli, D., Galtrey, C., Rhodes, K., Fukuda, J., Mikami, T., et al. (2006). Composition of Perineuronal Net Extracellular Matrix in Rat Brain A DIFFERENT DISACCHARIDE COMPOSITION FOR THE NET-ASSOCIATED. *J. Biol. Chem.* 281, 17789–17800. doi:10.1074/jbc.M600544200.

Diamond, S. L., Eskin, S. G., and McIntire, L. V. (1989). Fluid flow stimulates tissue plasminogen activator secretion by cultured human endothelial cells. *Science (80-.).* 243, 1483–1485. doi:10.1126/science.2467379.

Dick, G., Liktan, C., Alves, J. N., Ehlert, E. M. E., Miller, G. M., Hsieh-Wilson, L. C., et al. (2013). Semaphorin 3A binds to the perineuronal nets via chondroitin sulfate type E motifs in rodent brains. *J. Biol. Chem.* 288, 27384–27395. doi:10.1074/jbc.M111.310029.

Dirnagl, U., Iadecola, C., and Moskowitz, M. A. (1999). Pathobiology of ischaemic stroke: An integrated view. *Trends Neurosci.* 22, 391–397. doi:10.1016/S0166-2236(99)01401-0.

Dityatev, A., Brückner, G., Dityateva, G., Grosche, J., Kleene, R., and Schachner, M. (2007). Activity-Dependent Formation and Functions of Chondroitin Sulfate-Rich Extracellular Matrix of Perineuronal Nets Alexander. *Dev Neurobiol.* 67, 570–588. doi:10.1002/dneu.

Dobbertin, A., Rhodes, K. E., Garwood, J., Properzi, F., Heck, N., Rogers, J. H., et al. (2003). Regulation of RPTPβ/phosphacan expression and glycosaminoglycan epitopes in injured brain and cytokine-treated glia. *Mol. Cell. Neurosci.* 24, 951–971. doi:10.1016/S1044-7431(03)00257-4.

Docagne, F., Nicole, O., Marti, H. H., Mackenzie, E. T., Buisson, A., and Vivien, D. (1999). Transforming growth factor-βl as a regulator of the serpins/t-PA axis in cerebral ischemia. *FASEB J.* 13, 1315–

1324. doi:10.1096/fasebj.13.11.1315.

Dong, H., Du, T., Premaratne, S., Zhao, C. X., and Tian, Q. (2017). Relationship between ADAMTS4 and carotid atherosclerotic plaque vulnerability in humans. *J. Vasc. Surg.* 67, 1120–1126. doi:10.1016/j.jvs.2017.08.075.

Doyle, K., Simon, R., and Stenzel-poore, M. (2008). Mechanisms of Ischemic Brain Damage – Review Article. *Neuropharmacology* 55, 310–318. doi:10.1016/j.neuropharm.2008.01.005.Neuropharmacology.

Drieu, A., Buendia, I., Levard, D., Hélie, P., Brodin, C., Vivien, D., et al. (2019). Immune Responses and Anti-inflammatory Strategies in a Clinically Relevant Model of Thromboembolic Ischemic Stroke with Reperfusion. *Transl. Stroke Res.* 11, 481–495. doi:10.1007/s12975-019-00733-8.

Drieu, A., Levard, D., Vivien, D., and Rubio, M. (2018). Anti-inflammatory treatments for stroke: from bench to bedside. *Ther. Adv. Neurol. Disord. Immunol.* 11, 1–15. doi:10.1177/https.

Dubeya, D., McRae, P. A., Rankin-Gee, E. K., Baranov, E., Wandrey, L., Rogers, S., et al. (2017). Increased metalloproteinase activity in the hippocampus following status epilepticus. *Epilepsy Res.* 132, 50–58. doi:10.1016/j.physbeh.2017.03.040.

Duca, A., and Jagoda, A. (2016). Transient Ischemic Attacks: Advances in Diagnosis and Management in the Emergency Department. *Emerg. Med. Clin. North Am.* 34, 811–835. doi:10.1016/j.emc.2016.06.007.

Dyck, S. M., and Karimi-Abdolrezaee, S. (2015). Chondroitin sulfate proteoglycans: Key modulators in the developing and pathologic central nervous system. *Exp. Neurol.* 269, 169–187. doi:10.1016/j.expneurol.2015.04.006.

Dzyubenko, E., Manrique-Castano, D., Kleinschnitz, C., Faissner, A., and Hermann, D. M. (2018). Topological remodeling of cortical perineuronal nets in focal cerebral ischemia and mild hypoperfusion. *Matrix Biol.* 74, 121–132. doi:10.1016/j.matbio.2018.08.001.

E

Easton, J. D., Saver, J. L., Albers, G. W., Alberts, M. J., Chaturvedi, S., Feldmann, E., et al. (2009). Definition and evaluation of transient ischemic attack: A scientific statement for healthcare professionals from the American heart association/American stroke association stroke council; council on cardiovascular surgery and anesthesia; council on cardio. *Stroke* 40, 2276–2293.

doi:10.1161/STROKEAHA.108.192218.

Ehlen, H. W. A., Sengle, G., Klatt, A. R., Talke, A., Müller, S., Paulsson, M., et al. (2009). Proteolytic processing causes extensive heterogeneity of tissue matrilin forms. *J. Biol. Chem.* 284, 21545–21556. doi:10.1074/jbc.M109.016568.

Eill, G. J., Sinha, A., Morawski, M., Viapiano, M. S., and Matthews, R. T. (2020). The protein tyrosine phosphatase RPTPξ/phosphacan is critical for perineuronal net structure. *J. Biol. Chem.* 295, 955–968. doi:10.1074/jbc.RA119.010830.

El Tawil, S., and Muir, K. W. (2017). Thrombolysis and thrombectomy for acute ischaemic stroke. *Clin. Med. J. R. Coll. Physicians London* 17, 161–165. doi:10.7861/clinmedicine.17-2-161.

Emeis, J. J., Van Den Eijnden-Schrauwen, Y., Van Den Hoogen, C. M., De Priester, W., Westmuckett, A., and Lupu, F. (1997). An endothelial storage granule for tissue-type plasminogen activator. *J. Cell Biol.* 139, 245–256. doi:10.1083/jcb.139.1.245.

Endo, H., Kamada, H., Nito, C., Nishi, T., and Chan, P. H. (2006). Mitochondrial translocation of p53 mediates release of cytochrome c and hippocampal CA1 neuronal death after transient global cerebral ischemia in rats. *J. Neurosci.* 26, 7974–7983. doi:10.1523/JNEUROSCI.0897-06.2006.

Endres, M., Gertz, K., Lindauer, U., Katchanov, J., Schultze, J., Schröck, H., et al. (2003). Mechanisms of Stroke Protection by Physical Activity. *Ann. Neurol.* 54, 582–590. doi:10.1002/ana.10722.

Engel, M., Maurel, P., Margolis, R. U., and Margolis, R. K. (1996). Chondroitin Sulfate Proteoglycans in the Developing Central Nervous System . I . Cellular Sites of Synthesis of Neurocan and Phosphacan. *J. Comp. Neurol.* 366, 34–43.

Evans, D. L., Mcgroganll, M., Scottll, R. W., and Camell$, R. W. (1991). THE JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY Protease Specificity and Heparin Binding and Activation of Recombinant Protease Nexin I*. 266, 22307–22312.

F

Faini, G., Aguirre, A., Landi, S., Lamers, D., Pizzorusso, T., Ratto, G. M., et al. (2018). Perineuronal nets control visual input via thalamic recruitment of cortical PV interneurons. *Elife* 7, 1–21. doi:10.7554/eLife.41520.

Favuzzi, E., Fernandes, C., Ewers, H., Rico, B., Mantoan, L., Maeso, P., et al. (2017). Activity-Dependent Gating of Parvalbumin Interneuron Function by the Perineuronal Net Protein Brevican Article

Activity-Dependent Gating of Parvalbumin Interneuron Function by the Perineuronal Net Protein Brevican. *Neuron* 95, 639–655. doi:10.1016/j.neuron.2017.06.028.

Fawcett, J. W., Oohashi, T., and Pizzorusso, T. (2019). The roles of perineuronal nets and. *Nat. Rev. Neurosci.* 20, 451–465. doi:10.1038/s41583-019-0196-3.

Feigin, V. L., Norrving, B., and Mensah, G. A. (2017). Global Burden of Stroke. *Circ. Res.* 120, 439–448. doi:10.1161/CIRCRESAHA.116.308413.

Feigin, V. L., Roth, G. A., Naghavi, M., Parmar, P., Krishnamurthi, R., Chugh, S., et al. (2016). Global burden of stroke and risk factors in 188 countries, during 1990–2013: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2013. *Lancet Neurol.* 15, 913–924. doi:10.1016/S1474-4422(16)30073-4.

Fernández-Monreal, M., López-Atalaya, J. P., Benchenane, K., Cacquaevel, M., Dulin, F., Le Caer, J. P., et al. (2004). Arginine 260 of the amino-terminal domain of NR1 subunit is critical for tissue-type plasminogen activator-mediated enhancement of N-methyl-D-aspartate receptor signaling. *J. Biol. Chem.* 279, 50850–50856. doi:10.1074/jbc.M407069200.

Flannery, C. R., Zeng, W., Corcoran, C., Collins-Racie, L. A., Chockalingam, P. S., Hebert, T., et al. (2002). Autocatalytic cleavage of ADAMTS-4 (aggrecanase-1) reveals multiple glycosaminoglycan-binding sites. *J. Biol. Chem.* 277, 42775–42780. doi:10.1074/jbc.M205309200.

Flavin, M. P., Zhao, G., and Ho, L. T. (2000). Activator (tPA) Triggers Neuronal. *Glia* 29, 347–354.

Forostyak, S., Homola, A., Turnovcova, K., Svitil, P., Jendelova, P., and Sykova, E. (2014). Intrathecal delivery of mesenchymal stromal cells protects the structure of altered perineuronal nets in SOD1 rats and amends the course of ALS. *Stem Cells* 32, 3163–3172. doi:10.1002/stem.1812.

Fosang, A. J., Neame, P. J., Last, K., Hardingham, T. E., Murphy, G., and Hamilton, J. A. (1992). The interglobular domain of cartilage aggrecan is cleaved by PUMP, gelatinases, and cathepsin B. *J. Biol. Chem.* 267, 19470–19474.

Foscarin, S., Raha-chowdhury, R., Fawcett, J. W., and Kwok, J. C. F. (2017). Brain ageing changes proteoglycan sulfation , rendering perineuronal nets more inhibitory. *Aging (Albany. NY).* 9, 1607–1622.

Fowke, T. M., Karunasinghe, R. N., Bai, J. Z., Jordan, S., Gunn, A. J., and Dean, J. M. (2017). Hyaluronan synthesis by developing cortical neurons *in vitro*. *Sci. Rep.* 7, 1–13. doi:10.1038/srep44135.

Franchi, S. A., Macco, R., Astro, V., Tonoli, D., Savino, E., Valtorta, F., et al. (2018). A method to culture GABAergic interneurons derived from the medial ganglionic eminence. *Front. Cell. Neurosci.* 11,

1–21. doi:10.3389/fncel.2017.00423.

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

Fredriksson, L., Stevenson, T. K., Su, E. J., Ragsdale, M., Moore, S., Craciun, S., et al. (2015). Identification of a neurovascular signaling pathway regulating seizures in mice. *Ann. Clin. Transl. Neurol.* 2, 722–738. doi:10.1002/acn3.209.

Friedman, G. C., and Seeds, N. W. (1994). Tissue plasminogen activator expression in the embryonic nervous system. *Dev. Brain Res.* 81, 41–49. doi:10.1016/0165-3806(94)90066-3.

Frischknecht, R., Heine, M., Perrais, D., Seidenbecher, C. I., Choquet, D., and Gundelfinger, E. D. (2009). Brain extracellular matrix affects AMPA receptor lateral mobility and short-term synaptic plasticity. *Nat. Neurosci.* 12, 897–904. doi:10.1038/nn.2338.

Frösen, J., Piippo, A., Paetau, A., Kangasniemi, M., Niemelä, M., Hernesniemi, J., et al. (2004). Remodeling of saccular cerebral artery aneurysm wall is associated with rupture: Histological analysis of 24 unruptured and 42 ruptured cases. *Stroke* 35, 2287–2293. doi:10.1161/01.STR.0000140636.30204.da.

Fujioka, H., Dairyo, Y., Yasunaga, K. I., and Emoto, K. (2012). Neural functions of matrix metalloproteinases: Plasticity, neurogenesis, and disease. *Biochem. Res. Int.* 2012. doi:10.1155/2012/789083.

G

Gaberel, T., Macrez, R., Gauberti, M., Montagne, A., Hebert, M., Petersen, K. U., et al. (2013). Immunotherapy blocking the tissue plasminogen activator-dependent activation of N-methyl-D-aspartate glutamate receptors improves hemorrhagic stroke outcome. *Neuropharmacology* 67, 267–271. doi:10.1016/j.neuropharm.2012.11.023.

Gaberel, T., Montagne, A., Lesept, F., Gauberti, M., Lemarchand, E., Orset, C., et al. (2014). Urokinase versus Alteplase for intraventricular hemorrhage fibrinolysis. *Neuropharmacology* 85, 158–165. doi:10.1016/j.neuropharm.2014.05.001.

Galtrey, C. M., and Fawcett, J. W. (2007). The role of chondroitin sulfate proteoglycans in regeneration and plasticity in the central nervous system. *Brain Res. Rev.* 54, 1–18. doi:10.1016/j.brainresrev.2006.09.006.

Gao, G., Westling, J., Thompson, V. P., Howell, T. D., Gottschall, P. E., and Sandy, J. D. (2002). Activation of the proteolytic activity of ADAMTS4 (aggrecanase-1) by C-terminal truncation. *J. Biol. Chem.* 277, 11034–11041. doi:10.1074/jbc.M107443200.

Garwood, J., Heck, N., Reichardt, F., and Faissner, A. (2003). Phosphacan short isoform, A novel non-proteoglycan variant of phosphacan/receptor protein tyrosine phosphatase-β, Interacts with neuronal receptors and promotes neurite outgrowth. *J. Biol. Chem.* 278, 24164–24173. doi:10.1074/jbc.M211721200.

Gauberti, M., Fournier, A. P., Docagne, F., Vivien, D., and de Lizarrondo, S. M. (2018). Molecular magnetic resonance imaging of endothelial activation in the central nervous system. *Theranostics* 8, 1195–1212. doi:10.7150/thno.22662.

Gendron, C., Kashiwagi, M., Ngee, H. L., Enghild, J. J., Thøgersen, I. B., Hughes, C., et al. (2007). Proteolytic activities of human ADAMTS-5: Comparative studies with ADAMTS-4. *J. Biol. Chem.* 282, 18294–18306. doi:10.1074/jbc.M701523200.

Gherardini, L., Gennaro, M., and Pizzorusso, T. (2015). Perilesional treatment with chondroitinase ABC and motor training promote functional recovery after stroke in rats. *Cereb. Cortex* 25, 202–212. doi:10.1093/cercor/bht217.

Giamanco, K. a., and Matthews, R. T. (2012). Deconstructing the perineuronal net: Cellular contributions and molecular composition of the neuronal extracellular matrix. *Neuroscience* 218, 367–384. doi:10.1016/j.neuroscience.2012.05.055.

Giamanco, K. a., Morawski, M., and Matthews, R. T. (2010). Perineuronal net formation and structure in aggrecan knockout mice. *Neuroscience* 170, 1314–1327. doi:10.1016/j.neuroscience.2010.08.032.

Giau, R., Carrette, J., Bockaert, J., and Homburger, V. (2005). Constitutive secretion of protease nexin-1 by glial cells and its regulation by G-protein-coupled receptors. *J. Neurosci.* 25, 8995–9004. doi:10.1523/JNEUROSCI.2430-05.2005.

Gidday, J. M., Gasche, Y. G., Copin, J. C., Shah, A. R., Perez, R. S., Shapiro, S. D., et al. (2005). Leukocyte-derived matrix metalloproteinase-9 mediates blood-brain barrier breakdown and is proinflammatory after transient focal cerebral ischemia. *Am. J. Physiol. - Hear. Circ. Physiol.* 289, 558–568. doi:10.1152/ajpheart.01275.2004.

Glasson, S. S., Askew, R., Sheppard, B., Carito, B. A., Blanchet, T., Ma, H. L., et al. (2004). Characterization of and osteoarthritis susceptibility in ADAMTS-4-knockout mice. *Arthritis*

Rheum. 50, 2547–2558. doi:10.1002/art.20558.

Gordon, J. A., and Stryker, M. P. (1996). Experience-dependent plasticity of binocular responses in the primary visual cortex of the mouse. *J. Neurosci.* 16, 3274–3286. doi:10.1523/jneurosci.16-10-03274.1996.

Gottschall, P. E., and Deb, S. (1996). Regulation of matrix metalloproteinase expression in astrocytes, microglia and neurons. *Neuroimmunomodulation* 3, 69–75. doi:10.1159/000097229.

Goulay, R., Naveau, M., Gaberel, T., Vivien, D., and Parcq, J. (2018). Optimized tPA: A non-neurotoxic fibrinolytic agent for the drainage of intracerebral hemorrhages. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* 38, 1180–1189. doi:10.1177/0271678X17719180.

Griemert, E. V., Recarte Pelz, K., Engelhard, K., Schäfer, M. K., and Thal, S. C. (2019). PAI-1 but Not PAI-2 Gene Deficiency Attenuates Ischemic Brain Injury After Experimental Stroke. *Transl. Stroke Res.* 10, 372–380. doi:10.1007/s12975-018-0644-9.

Griffin, J. M., Fackelmeier, B., Clemett, C. A., Fong, D. M., Mouravlev, A., Young, D., et al. (2020). Astrocyte-selective AAV-ADAMTS4 gene therapy combined with hindlimb rehabilitation promotes functional recovery after spinal cord injury. *Exp. Neurol.* 327. doi:10.1016/j.expneurol.2020.113232.

Grimpe, B., and Silver, J. (2002). The extracellular matrix in axon regeneration. *Prog. Brain Res.* 137, 333–349. doi:10.1016/S0079-6123(02)37025-0.

Gu, W., Fu, S., Wang, Y., Li, Y., Wang, X., Xu, X., et al. (2007). Expression and regulation of versican in neural precursor cells and their. *Acta Pharmacol Sin* 28, 1519–1530. doi:10.1111/j.1745-7254.2007.00659.x.

Gverić, D., Herrera, B., Petzold, A., Lawrence, D. A., and Cuzner, M. L. (2003). Impaired fibrinolysis in multiple sclerosis: A role for tissue plasminogen activator inhibitors. *Brain* 126, 1590–1598. doi:10.1093/brain/awg167.

H

Hacke, W., Kaste, M., Bluhmki, E., Brozman, M., Dávalos, A., Guidetti, D., et al. (2008). Thrombolysis with Alteplase 3 to 4.5 Hours after Acute Ischemic Stroke. *Trial* 359, 1317–1329.

Haddock, G., Cross, A. K., Plumb, J., Surr, J., Buttle, D. J., Bunning, R. A. D., et al. (2006). Expression of ADAMTS-1, -4, -5 and TIMP-3 in normal and multiple sclerosis CNS white matter. *Mult. Scler.* 12,

386–396. doi:10.1191/135248506ms1300oa.

Hahn-Dantona, E., Ramos-DeSimone, N., Sipley, J., Nagase, H., French, D. L., and Quigley, J. P. (1999). Activation of ProMMP-9 by a plasmin/MMP3 cascade in a tumor cell model. Regulation by tissue inhibitors of metalloproteinases. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 878, 372–387. doi:10.1111/j.1749-6632.1999.tb07696.x.

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.

Hamel, M. G., Mayer, J., and Gottschall, P. E. (2005). Altered production and proteolytic processing of brevican by transforming growth factor b in cultured astrocytes. *J. ofNeurochemistry* 93, 1533–1541. doi:10.1111/j.1471-4159.2005.03144.x.

Hamel, M. G., Mayer, J., Leonardo, C. C., Zuo, F., John, D., and Gottschall, P. E. (2008). Multimodal Signaling by the ADAMTSs (a disintegrin and metalloproteinase with thrombospondin motifs) Promote Neurite Extension. *Exp Neurol.* 210, 428–440. doi:10.1016/j.expneurol.2007.11.014.Multimodal.

Hanley, D. F., Thompson, R. E., Rosenblum, M., Yenokyan, G., Lane, K., McBee, N., et al. (2019). Efficacy and safety of minimally invasive surgery with thrombolysis in intracerebral haemorrhage evacuation (MISTIE III): a randomised, controlled, open-label, blinded endpoint phase 3 trial. *Lancet* 393, 1021–1032. doi:10.1016/S0140-6736(19)30195-3.

Harris, N. G., Nogueira, M. S. M., Verley, D. R., and Sutton, R. L. (2013). Chondroitinase enhances cortical map plasticity and increases functionally active sprouting axons after brain injury. *J. Neurotrauma* 30, 1257–1269. doi:10.1089/neu.2012.2737.

Härtig, W., Derouiche, A., Welt, K., Brauer, K., Grosche, J., Mäder, M., et al. (1999). Cortical neurons immunoreactive for the potassium channel Kv3.1b subunit are predominantly surrounded by perineuronal nets presumed as a buffering system for cations. *Brain Res.* 842, 15–29. doi:10.1016/S0006-8993(99)01784-9.

Härtig, W., Mages, B., Aleithe, S., Nitzsche, B., Altmann, S., Barthel, H., et al. (2017). Damaged neocortical perineuronal nets due to experimental focal cerebral ischemia in mice, rats and sheep. *Front. Integr. Neurosci.* 11, 1–16. doi:10.3389/fnint.2017.00015.

Hashimoto, G., Aoki, T., Nakamura, H., Tanzawa, K., and Okada, Y. (2001). Inhibition of ADAMTS4 (aggrecanase-1) by tissue inhibitors of. *FEBS Lett.* 494, 192–195.

Hashimoto, G., Shimoda, M., and Okada, Y. (2004). ADAMTS4 (aggrecanase-1) interaction with the C-

terminal domain of fibronectin inhibits proteolysis of aggrecan. *J. Biol. Chem.* 279, 32483–32491. doi:10.1074/jbc.M314216200.

Haunsø, A., Celio, M. R., Margolis, R. K., and Menoud, P. A. (1999). Phosphacan immunoreactivity is associated with perineuronal nets around parvalbumin-expressing neurones. *Brain Res.* 834, 219–222. doi:10.1016/S0006-8993(99)01596-6.

Hayashi, N., Miyata, S., Yamada, M., Kamei, K., and Oohira, A. (2005). Neuronal expression of the chondroitin sulfate proteoglycans receptor-type protein-tyrosine phosphatase β and phosphacan. *Neuroscience* 131, 331–348. doi:10.1016/j.neuroscience.2004.11.017.

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* 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. (Paris).* 172, 186–197. doi:10.1016/j.neurol.2015.10.002.

Hensch, T. K., and Bilimoria, P. M. (2012). Re-opening Windows: Manipulating Critical Periods for Brain Development. *Cerebrum* 2012, 11. Available at: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23447797%0Ahttp://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=PMC3574806.

Hills, R., Mazzarella, R., Fok, K., Liu, M., Nemirovskiy, O., Leone, J., et al. (2007). Identification of an ADAMTS-4 cleavage motif using phage display leads to the development of fluorogenic peptide substrates and reveals matrilin-3 as a novel substrate. *J. Biol. Chem.* 282, 11101–11109. doi:10.1074/jbc.M611588200.

Hino, H., Akiyama, H., Iseki, E., Kato, M., Kondo, H., Ikeda, K., et al. (2001). Immunohistochemical localization of plasminogen activator inhibitor-1 in rat and human brain tissues. *Neurosci. Lett.* 297, 105–108. doi:10.1016/S0304-3940(00)01679-7.

Ho-Tin-Noé, B., Enslen, H., Doeuvre, L., Corsi, J. M., Lijnen, H. R., and Anglés-Cano, E. (2009). Role of plasminogen activation in neuronal organization and survival. *Mol. Cell. Neurosci.* 42, 288–295. doi:10.1016/j.mcn.2009.08.001.

Hobohm, C., Günther, A., Grosche, J., Roßner, S., Schneider, D., and Brückner, G. (2005). Decomposition and long-lasting downregulation of extracellular matrix in perineuronal nets induced by focal cerebral ischemia in rats. *J. Neurosci. Res.* 80, 539–548. doi:10.1002/jnr.20459.

Holmes, W. E., Nelles, L., Lijnen, H. R., and Collen, D. (1987). Primary structure of human α2-antiplasmin, a serine protease inhibitor (serpin). *J. Biol. Chem.* 262, 1659–1664.

Horii-hayashi, N., Okuda, H., Tatsumi, K., Ishizaka, S., Yoshikawa, M., and Wanaka, A. (2008). Localization of chondroitin sulfate proteoglycan versican in adult brain with special reference to large projection neurons. *Cell Tissue Res* 334, 163–177. doi:10.1007/s00441-008-0698-1.

Horii-Hayashi, N., Sasagawa, T., Matsunaga, W., and Nishi, M. (2015). Development and Structural Variety of the Chondroitin Sulfate Proteoglycans-Contained Extracellular Matrix in the Mouse Brain. *Neural Plast.* 2015. doi:10.1155/2015/256389.

Horii-hayashi, N., Sasagawa, T., and Nishi, M. (2016). Insights from extracellular matrix studies in the hypothalamus : structural variations of perineuronal nets and discovering a new perifornical area of the anterior hypothalamus. *Anat. Sci. Int.* 92, 18–24. doi:10.1007/s12565-016-0375-5.

Horton, J. C., and Hocking, D. R. (1997). Timing of the critical period for plasticity of ocular dominance columns in macaque striate cortex. *J. Neurosci.* 17, 3684–3709. doi:10.1523/jneurosci.17-10-03684.1997.

Hou, X., Yoshioka, N., Tsukano, H., Sakai, A., Miyata, S., Watanabe, Y., et al. (2017). Chondroitin Sulfate Is Required for Onset and Offset of Critical Period Plasticity in Visual Cortex. *Sci. Rep.* 7, 1–17. doi:10.1038/s41598-017-04007-x.

Howell, M. D., and Gottschall, P. E. (2012). Lectican proteoglycans, their cleaving metalloproteinases, and plasticity in the central nervous system extracellular microenvironment. *Neuroscience* 217, 6–18. doi:10.1038/jid.2014.371.

Howell, M. D., Torres-Collado, A. X., Iruela-Arispe, M. L., and Gottschall, P. E. (2012). Selective Decline of Synaptic Protein Levels in the Frontal Cortex of Female Mice Deficient in the Extracellular Metalloproteinase ADAMTS1. *PLoS One* 7. doi:10.1371/journal.pone.0047226.

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.

Hsieh, T. H., Cheong Lee, H. H., Hameed, M. Q., Pascual-Leone, A., Hensch, T. K., and Rotenberg, A. (2017). Trajectory of parvalbumin cell impairment and loss of cortical inhibition in traumatic brain injury. *Cereb. Cortex* 27, 5509–5524. doi:10.1093/cercor/bhw318.

Hsu, Y., Staton, C. A., Cross, N., and Buttle, D. J. (2012). Anti-angiogenic properties of ADAMTS-4 *in vitro*. *Int. J. Exp. Path.* 93, 70–77. doi:10.1111/j.1365-2613.2011.00802.

Huang, Y. Y., Bach, M. E., Lipp, H. P., Zhuo, M., Wolfer, D. P., Hawkins, R. D., et al. (1996). Mice lacking the gene encoding tissue-type plasminogen activator show a selective interference with late-phase long-term potentiation in both Schaffer collateral and mossy fiber pathways. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 93, 8699–8704. doi:10.1073/pnas.93.16.8699.

Hubel, D. H., and Wiesel, T. N. (1970). THE PERIOD OF SUSCEPTIBILITY TO THE PHYSIOLOGICAL EFFECTS OF UNILATERAL EYE CLOSURE IN KITTENS. *J. Physiol. (1970),* 206, 419–436.

Huber, D., Cramer, E. M., Kaufmann, J. E., Meda, P., Massé, J. M., Kruithof, E. K. O., et al. (2002). Tissue-type plasminogen activator (t-PA) is stored in Weibel-Palade bodies in human endothelial cells both *in vitro* and *in vivo*. *Blood* 99, 3637–3645. doi:10.1182/blood.V99.10.3637.

Hudson, M. R., Sokolenko, E., O'Brien, T. J., and Jones, N. C. (2020). NMDA receptors on parvalbumin-positive interneurons and pyramidal neurons both contribute to MK-801 induced gamma oscillatory disturbances: Complex relationships with behaviour. *Neurobiol. Dis.* 134, 104625. doi:10.1016/j.nbd.2019.104625.

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.

I

Ichinose, A., Kisiel, W., and Fujikawa, K. (1984). Proteolytic activation of tissue plasminogen activator by plasma and tissue enzymes. *FEBS Lett.* 175, 412–418. doi:10.1016/0014-5793(84)80779-6.

Iida, S., Baumbach, G. L., Lavoie, J. L., Faraci, F. M., Sigmund, C. D., and Heistad, D. D. (2005). Spontaneous stroke in a genetic model of hypertension in mice. *Stroke* 36, 1253–1258. doi:10.1161/01.str.0000167694.58419.a2.

Itano, N., Sawai, T., Yoshida, M., Lenas, P., Yamada, Y., Imagawa, M., et al. (1999). Three isoforms of mammalian hyaluronan synthases have distinct enzymatic properties. *J. Biol. Chem.* 274, 25085–25092. doi:10.1074/jbc.274.35.25085.

J

Jackson, C., and Sudlow, C. (2005). Are Lacunar Strokes Really Different?:Are Lacunar Strokes Really Different?: A Systematic Review of Differences in Risk Factor Profiles Between Lacunar and Nonlacunar Infarcts. *Stroke* 36, 891–901. doi:10.1161/01.STR.0000157949.34986.30.Are.

Janelsins, M. C., Mastrangelo, M. A., Park, K. M., Sudol, K. L., Narrow, W. C., Oddo, S., et al. (2008). Chronic neuron-specific tumor necrosis factor-alpha expression enhances the local inflammatory environment ultimately leading to neuronal death in 3xTg-AD mice. *Am. J. Pathol.* 173, 1768–1782. doi:10.2353/ajpath.2008.080528.

John, N., Krügel, H., Frischknecht, R., Smalla, K. H., Schultz, C., Kreutz, M. R., et al. (2006). Brevican-containing perineuronal nets of extracellular matrix in dissociated hippocampal primary cultures. *Mol. Cell. Neurosci.* 31, 774–784. doi:10.1016/j.mcn.2006.01.011.

Johnson, C. O., Nguyen, M., Roth, G. A., Nichols, E., Alam, T., Abate, D., et al. (2019). Global, regional, and national burden of stroke, 1990–2016: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2016. *Lancet Neurol.* 18, 439–458. doi:10.1016/S1474-4422(19)30034-1.

Jones, F. S., and Jones, P. L. (2000). The tenascin family of ECM glycoproteins: Structure, function, and regulation during embryonic development and tissue remodeling. *Dev. Dyn.* 218, 235–259. doi:10.1002/(SICI)1097-0177(200006)218:2<235::AID-DVDY2>3.0.CO;2-G.

Jones, G. C., and Riley, G. P. (2005). ADAMTS proteinases: A multi-domain, multi-functional family with roles in extracellular matrix turnover and arthritis. *Arthritis Res. Ther.* 7, 160–169. doi:10.1186/ar1783.

K

Kagitani, H., Tagawa, M., Hatanaka, K., Ikari, T., Saito, A., Bando, H., et al. (1985). Expression in E. coli of finger-domain lacking tissue-type plasminogen activator with high fibrin affinity. *FEBS Lett.* 189, 145–149. doi:10.1016/0014-5793(85)80860-7.

Kaneko, M., Sakata, Y., Matsuda, M., and Mimuro, J. (1992). Interactions between the Finger and Kringle-2 Domains of Tissue-Type Plasminogen Activator and Plasminogen Activator Inhibitor-1. *J. Biochem. 111,* 111, 244–248.

Kanematsu, Y., Kanematsu, M., Kurihara, C., Tada, Y., Tsou, T., Van Rooijen, N., et al. (2011). Critical

roles of macrophages in the formation of intracranial aneurysm. *Stroke* 42, 173–178. doi:10.1161/STROKEAHA.110.590976.

Karetko-Sysa, M., Skangiel-Kramska, J., and Nowicka, D. (2011). Disturbance of perineuronal nets in the perilesional area after photothrombosis is not associated with neuronal death. *Exp. Neurol.* 231, 113–126. doi:10.1016/j.expneurol.2011.05.022.

Kashiwagi, M., Enghild, J. J., Gendron, C., Hughes, C., Caterson, B., Itoh, Y., et al. (2004). Altered Proteolytic Activities of ADAMTS-4 Expressed by C-terminal Processing *. 279, 10109–10119. doi:10.1074/jbc.M312123200.

Kaufmann, A. M., Firlik, A. D., Fukui, M. B., Wechsler, L. R., Jungries, C. ., and Yonas, H. (1999). Ischemic Core and Penumbra in Human Stroke. *Stroke* 30, 93–99. doi:10.1161/str.30.5.1150/a.

Kelly, E. A., Russo, A. S., Jackson, C. D., Lamantia, C. E. L., and Majewska, A. K. (2015). Proteolytic regulation of synaptic plasticity in the mouse primary visual cortex: Analysis of matrix metalloproteinase 9 deficient mice. *Front. Cell. Neurosci.* 9, 1–17. doi:10.3389/fncel.2015.00369.

Kelwick, R., Desanlis, I., Wheeler, G. N., and Edwards, D. R. (2015). The ADAMTS (A Disintegrin and Metalloproteinase with Thrombospondin motifs) family. *Genome Biol.* 16, 1–16. doi:10.1186/s13059-015-0676-3.

Kenagy, R. D., Fischer, J. W., Davies, M. G., Berceli, S. A., Hawkins, S. M., Wight, T. N., et al. (2002). Increased plasmin and serine proteinase activity during flow-induced intimal atrophy in baboon PTFE grafts. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 22, 400–404. doi:10.1161/hq0302.105376.

Khoshnam, S. E., Winlow, W., Farzaneh, M., Farbood, Y., and Moghaddam, H. F. (2017). Pathogenic mechanisms following ischemic stroke. *Neurol. Sci.* 38, 1167–1186. doi:10.1007/s10072-017-2938-1.

Kiani, C., Chen, L., Wu, Y. J., Yee, A. J., and Yang, B. B. (2002). Structure and function of aggrecan. *Cell Res.* 12, 19–32. doi:10.1038/sj.cr.7290106.

Kim, H. K., Lee, S. Y., Oh, H. K., Kang, B. H., Ku, H. J., Lee, Y., et al. (2003). Inhibition of endothelial cell proliferation by the recombinant kringle domain of tissue-type plasminogen activator. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 304, 740–746. doi:10.1016/S0006-291X(03)00656-9.

Kosaka, T., and Heizmann, C. W. (1989). Selective staining of a population of parvalbumin-containing GABAergic neurons in the rat cerebral cortex by lectins with specific affinity for terminal N-acetylgalactosamine. *Brain Res.* 483, 158–163. doi:10.1016/0006-8993(89)90048-6.

Kosierkiewicz, T. A., Factor, S. M., and Dickson, D. W. (1994). Immunocytochemical Studies of

Atherosclerotic Lesions of Cerebral Berry Aneurysms. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* 53, 399–406.

Krstic, D., Rodriguez, M., and Knuesel, I. (2012). Regulated Proteolytic Processing of Reelin through Interplay of Tissue Plasminogen Activator (tPA), ADAMTS-4, ADAMTS-5, and Their Modulators. *PLoS One* 7, 1–11. doi:10.1371/journal.pone.0047793.

Krystosek, A., and Seeds, N. W. (1981). Plasminogen activator secretion by granule neurons in cultures of developing cerebellum. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 78, 7810–7814. doi:10.1073/pnas.78.12.7810.

Kuiper, J., Van't Hof, A., Otter, M., Biessen, E. A. L., Rijken, D. C., and Van Berkel, T. J. C. (1996). Interaction of mutants of tissue-type plasminogen activator with liver cells: Effect of domain deletions. *Biochem. J.* 313, 775–780. doi:10.1042/bj3130775.

Kwok, J. C. F., Carulli, D., and Fawcett, J. W. (2010). *In vitro* modeling of perineuronal nets: Hyaluronan synthase and link protein are necessary for their formation and integrity. *J. Neurochem.* 114, 1447–1459. doi:10.1111/j.1471-4159.2010.06878.x.

Kwok, J. C. F., Dick, G., Wang, D., and Fawcett, J. W. (2011a). Extracellular matrix and perineuronal nets in CNS repair. *Dev. Neurobiol.* 71, 1073–1089. doi:10.1002/dneu.20974.

L

Labeyrie, P.-E., Goulay, R., Martinez de Lizarrondo, S., Hébert, M., Gauberti, M., Maubert, E., et al. (2017). Vascular Tissue-Type Plasminogen Activator Promotes Intracranial Aneurysm Formation. *Stroke*, STROKEAHA.117.017305. doi:10.1161/STROKEAHA.117.017305.

Lakhan, S. E., Kirchgessner, A., Tepper, D., and Leonard, A. (2013). Matrix metalloproteinases and blood-brain barrier disruption in acute ischemic stroke. *Front. Neurol.* 4 APR, 1–15. doi:10.3389/fneur.2013.00032.

Lamba, D., Bauer, M., Huber, R., Fischer, S., Rudolph, R., Kohnert, U., et al. (1996). The 2.3 Å Crystal Structure of the Catalytic Domain of Recombinant Two-chain Human Tissue-type Plasminogen Activator. *J. Mol. Biol.* 258, 117–135. doi:10.1006/jmbi.1996.0238.

Lander, C., Kind, P., Maleski, M., and Hockfield, S. (1997). A family of activity-dependent neuronal cell-surface chondroitin sulfate proteoglycans in cat visual cortex. *J. Neurosci.* 17, 1928–1939. doi:10.1523/JNEUROSCI.17-06-01928.1997.

Langhorne, P., Coupar, F., and Pollock, A. (2009). Motor recovery after stroke: a systematic review.

Lancet Neurol. 8, 741–754. doi:10.1016/S1474-4422(09)70150-4.

Lansberg, M. G., Albers, G. W., and Wijman, C. A. C. (2007). Symptomatic intracerebral hemorrhage following thrombolytic therapy for acute ischemic stroke: A review of the risk factors. *Cerebrovasc. Dis.* 24, 1–10. doi:10.1159/000103110.

Law, R. H. P., Abu-Ssaydeh, D., and Whisstock, J. C. (2013). New insights into the structure and function of the plasminogen/plasmin system. *Curr. Opin. Struct. Biol.* 23, 836–841. doi:10.1016/j.sbi.2013.10.006.

Lee, H. H. C., Bernard, C., Ye, Z., Acampora, D., Simeone, A., Prochiantz, A., et al. (2017). Genetic Otx2 mis-localization delays critical period plasticity across brain regions. *Mol. Psychiatry* 22, 680–688. doi:10.1038/mp.2017.1.

Lee, H., McKeon, R. J., and Bellamkonda, R. V. (2010). Sustained delivery of thermostabilized chABC enhances axonal sprouting and functional recovery after spinal cord injury. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 107, 3340–3345. doi:10.1073/pnas.0905437106.

Lee, H. Y., Hwang, I. Y., Im, H., Koh, J. Y., and Kim, Y. H. (2007). Non-proteolytic neurotrophic effects of tissue plasminogen activator on cultured mouse cerebrocortical neurons. *J. Neurochem.* 101, 1236–1247. doi:10.1111/j.1471-4159.2007.04417.x.

Lee, S. H., Ko, H. M., Kwon, K. J., Lee, J., Han, S. H., Han, D. W., et al. (2014). TPA regulates neurite outgrowth by phosphorylation of LRP5/6 in neural progenitor cells. *Mol. Neurobiol.* 49, 199–215. doi:10.1007/s12035-013-8511-x.

Lees, K. R., Emberson, J., Blackwell, L., Bluhmki, E., Davis, S. M., Donnan, G. A., et al. (2016). Effects of Alteplase for Acute Stroke on the Distribution of Functional Outcomes: A Pooled Analysis of 9 Trials. *Stroke* 47, 2373–2379. doi:10.1161/STROKEAHA.116.013644.

Lemarchand, E., Maubert, E., Haelewyn, B., Ali, C., Rubio, M., and Vivien, D. (2016). Stressed neurons protect themselves by a tissue-type plasminogen activator-mediated EGFR-dependent mechanism. *Cell Death Differ.* 23, 123–131. doi:10.1038/cdd.2015.76.

Lemarchant, S., Dunghana, H., Pomeshchik, Y., Leinonen, H., Kolosowska, N., Korhonen, P., et al. (2016a). Anti-inflammatory effects of ADAMTS-4 in a mouse model of ischemic stroke. *Glia* 64, 1492–1507. doi:10.1002/glia.23017.

Lemarchant, S., Pomeshchik, Y., Kidin, I., Kärkkäinen, V., Valonen, P., Lehtonen, S., et al. (2016b). ADAMTS-4 promotes neurodegeneration in a mouse model of amyotrophic lateral sclerosis. *Mol. Neurodegener.* 11, 1–24. doi:10.1186/s13024-016-0078-3.

Lemarchant, S., Pruvost, M., Hébert, M., Gauberti, M., Hommet, Y., Briens, A., et al. (2014). TPA promotes ADAMTS-4-induced CSPG degradation, thereby enhancing neuroplasticity following spinal cord injury. *Neurobiol. Dis.* 66, 28–42. doi:10.1016/j.nbd.2014.02.005.

Lemons, M. L., Sandy, J. D., Anderson, D. K., and Howland, D. R. (2001). Intact aggrecan and fragments generated by both aggrecanse and metalloproteinase-like activities are present in the developing and adult rat spinal cord and their relative abundance is altered by injury. *J. Neurosci.* 21, 4772–4781. doi:10.1523/jneurosci.21-13-04772.2001.

Lemons, M. L., Sandy, J. D., Anderson, D. K., and Howland, D. R. (2003). Intact aggrecan and chondroitin sulfate-depleted aggrecan core glycoprotein inhibit axon growth in the adult rat spinal cord. *Exp. Neurol.* 184, 981–990. doi:10.1016/S0014-4886(03)00383-2.

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, 1–15. doi:10.3389/fncel.2019.00164.

Lensjø, K. K., Christensen, C., Tennøe, S., and Fyhn, M. (2017a). Differential Expression and Cell-Type Specificity of Perineuronal Nets in Hippocampus , Medial Entorhinal Cortex , and Visual Cortex Examined in the Rat and Mouse. *Neuronal Excit.* 4, 1–18.

Lensjø, K. K., Lepperød, M. E., Dick, G., Hafting, T., and Fyhn, M. (2017b). Removal of perineuronal nets unlocks juvenile plasticity through network mechanisms of decreased inhibition and increased gamma activity. *J. Neurosci.* 37, 1269–1283. doi:10.1523/JNEUROSCI.2504-16.2016.

Leonetti, C., Macrez, R., Pruvost, M., Hommet, Y., Bronsard, J., Fournier, A., et al. (2017). Tissue-type plasminogen activator exerts EGF-like chemokinetic effects on oligodendrocytes in white matter (re)myelination. *Mol. Neurodegener.* 12, 1–16. doi:10.1186/s13024-017-0160-5.

Lesept, F., Chevilley, A., Jezequel, J., Ladépêche, L., Macrez, R., Aimable, M., et al. (2016). Tissue-type plasminogen activator controls neuronal death by raising surface dynamics of extrasynaptic NMDA receptors. *Cell Death Dis.* 7, 1–15. doi:10.1038/cddis.2016.279.

Letourneau, P. C., Condic, M. L., and Snow, D. M. (1994). Interactions of developing neurons with the extracellular matrix. *J. Neurosci.* 14, 915–928. doi:10.1523/jneurosci.14-03-00915.1994.

Levin, E. G., and Del Zoppo, G. J. (1994). Localization of tissue plasminogen activator in the endothelium of a limited number of vessels. *Am. J. Pathol.* 144, 855–861.

Levin, E. G., Santell, L., and Osborn, K. G. (1997). The expression of endothelial tissue plasminogen activator *in vivo*: A function defined by vessel size and anatomic location. *J. Cell Sci.* 110, 139–

148.

Levy, C., Brooks, J. M., Chen, J., Su, J., and Fox, M. A. (2015). Cell-specific and developmental expression of lectican-cleaving proteases in mouse hippocampus and neocortex. *J. Comp. Neurol.* 523, 629–648. doi:10.1002/cne.23701.

Leys, Di., Hommet, Y., Jacquet, C., Moulin, S., Sibon, I., Mas, J. L., et al. (2016). Proportion of single-chain recombinant tissue plasminogen activator and outcome after stroke. *Neurology* 87, 2416–2426. doi:10.1212/WNL.0000000000003399.

Li, K., Wang, Z.-W., Hu, Z., Ren, Z., Hu, X., Li, L., et al. (2017). Assessing Serum Levels of ADAMTS1 and ADAMTS4 as New Biomarkers for Patients with Type A Acute Aortic Dissection. *Med Sci Monit* 23, 3913–3922. doi:10.12659/MSM.905092.

Lijnen, H. R. (2001). Plasmin and matrix metalloproteinases in vascular remodeling. *Thromb. Haemost.* 86, 324–333. doi:10.1055/s-0037-1616230.

Lim, N. H., Kashiwagi, M., Visse, R., Jones, J., Enghild, J. J., Brew, K., et al. (2010). Reactive-site mutants of N-TIMP-3 that selectively inhibit ADAMTS-4 and ADAMTS-5: Biological and structural implications. *Biochem. J.* 431, 113–122. doi:10.1042/BJ20100725.

Lin, R., Rosahl, T. W., Whiting, P. J., Fawcett, J. W., and Kwok, J. C. F. (2011). 6-Sulphated chondroitins have a positive influence on axonal regeneration. *PLoS One* 6. doi:10.1371/journal.pone.0021499.

Liot, G., Benchenane, K., Léveillé, F., López-Atalaya, J. P., Fernández-Monreal, M., Ruocco, A., et al. (2004). 2,7-bis-(4-amidinobenzylidene)-cycloheptan-1-one dihydrochloride, tPA stop, prevents tPA-enhanced excitotoxicity both *in vitro* and *in vivo*. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* 24, 1153–1159. doi:10.1097/01.WCB.0000134476.93809.75.

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

Liotta, L. A., Brundage, R., Siegal, G. P., Goldfarb, R. H., Terranova, V., and Garbisa, S. (1981). Effect of Plasminogen Activator (Urokinase), Piasmin, and Thrombin on Glycoprotein and Collagenous Components of Basement Membrane. *Cancer Res.* 41, 4629–4636. doi:10.1097/00006534-198206000-00105.

Lipachev, N., Arnst, N., Melnikova, A., Jäälinoja, H., Kochneva, A., Zhigalov, A., et al. (2019).

Quantitative changes in perineuronal nets in development and posttraumatic condition. *J. Mol. Histol.* 50, 203–216. doi:10.1007/s10735-019-09818-y.

Liu, D., Cheng, T., Guo, H., Fernández, J. A., Griffin, J. H., Song, X., et al. (2004). Tissue plasminogen activator neurovascular toxicity is controlled by activated protein C. *Nat. Med.* 10, 1379–1383. doi:10.1038/nm1122.

Liu, H., Gao, P. F., Xu, H. W., Liu, M. M., Yu, T., Yao, J. P., et al. (2013). Perineuronal nets increase inhibitory GABAergic currents during the critical period in rats. *Int. J. Ophthalmol.* 6, 120–125. doi:10.3980/j.issn.2222-3959.2013.02.02.

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

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. doi:10.1091/mbc.9.9.2463.

Longstaff, C., and Kolev, K. (2015). Basic mechanisms and regulation of fibrinolysis. *J. Thromb. Haemost.* 13, S98–S105. doi:10.1111/jth.12935.

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

Louessard, M., Bardou, I., Lemarchand, E., Thiebaut, A. M., Parcq, J., Leprince, J., et al. (2017). Activation of cell surface GRP78 decreases endoplasmic reticulum stress and neuronal death. *Cell Death Differ.* 24, 1518–1529. doi:10.1038/cdd.2017.35.

Louessard, M., Lacroix, A., Martineau, M., Mondielli, G., Montagne, A., Lesept, F., et al. (2016). Tissue Plasminogen Activator Expression Is Restricted to Subsets of Excitatory Pyramidal Glutamatergic Neurons. *Mol. Neurobiol.* 53, 5000–5012. doi:10.1007/s12035-015-9432-7.

Love, S. (2003). Apoptosis and brain ischaemia. *Prog. Neuro-Psychopharmacology Biol. Psychiatry* 27, 267–282. doi:10.1016/S0278-5846(03)00022-8.

Lüth, H. J., Fischer, J., and Celio, M. R. (1992). Soybean lectin binding neurons in the visual cortex of the rat contain parvalbumin and are covered by glial nets. *J. Neurocytol.* 21, 211–221. doi:10.1007/BF01194979.

M

Mabuchi, M., Murakami, S., Taguchi, T., Ohtsuka, A., and Murakami, T. (2001). Purkinje cells in the adult cat cerebellar cortex possess a perineuronal net of proteoglycans. *Arch. Histol. Cytol.* 64, 203–209.

Macrez, R., Bezin, L., Le Mauff, B., Ali, C., and Vivien, D. (2010). Functional occurrence of the interaction of tissue plasminogen activator with the NR1 subunit of N-methyl-d-aspartate receptors during stroke. *Stroke* 41, 2950–2955. doi:10.1161/STROKEAHA.110.592360.

Macrez, R., Obiang, P., Gauberti, M., Roussel, B., Baron, A., Parcq, J., et al. (2011). Antibodies preventing the interaction of tissue-type plasminogen activator with N-methyl-D-aspartate receptors reduce stroke damages and extend the therapeutic window of thrombolysis. *Stroke* 42, 2315–2322. doi:10.1161/STROKEAHA.110.606293.

Macrez, R., Ortega, M. C., Bardou, I., Mehra, A., Fournier, A., Van Der Pol, S. M. A., et al. (2016). Neuroendothelial NMDA receptors as therapeutic targets in experimental autoimmune encephalomyelitis. *Brain* 139, 2406–2419. doi:10.1093/brain/aww172.

Madani, R., Kozlov, S., Akhmedov, A., Cinelli, P., Kinter, J., Lipp, H. P., et al. (2003). Impaired explorative behavior and neophobia in genetically modified mice lacking or overexpressing the extracellular serine protease inhibitor neuroserpin. *Mol. Cell. Neurosci.* 23, 473–494. doi:10.1016/S1044-7431(03)00077-0.

Madinier, A., Quattromani, M. J., Sjölund, C., Ruscher, K., and Wieloch, T. (2014). Enriched Housing Enhances Recovery of Limb Placement Ability and Reduces Aggrecan-Containing Perineuronal Nets in the Rat Somatosensory Cortex after Experimental Stroke. *PLoS One* 9, e93121. doi:10.1371/journal.pone.0093121.

Maleski, M., and Hockfield, S. (1997). Glial cells assemble hyaluronan-based pericellular matrices *in vitro*. *Glia* 20, 193–202. doi:10.1002/(SICI)1098-1136(199707)20:3<193::AID-GLIA3>3.0.CO;2-9.

Mang, C. S., Campbell, K. L., Ross, C. J. D., and Boyd, L. A. (2013). Promoting Neuroplasticity for Motor Rehabilitation After Stroke : *Phys. Ther.* 93, 1707–1716. doi:10.1002/14651858.CD003316.pub6.www.cochranelibrary.com.

Mannaioni, G., Orr, A. G., Hamill, C. E., Yuan, H., Pedone, K. H., McCoy, K. L., et al. (2008). Plasmin potentiates synaptic N-methyl-D-aspartate receptor function in hippocampal neurons through activation of protease-activated receptor-1. *J. Biol. Chem.* 283, 20600–20611.

doi:10.1074/jbc.M803015200.

Marbacher, S., Marjamaa, J., Bradacova, K., Von Gunten, M., Honkanen, P., Abo-Ramadan, U., et al. (2014). Loss of mural cells leads to wall degeneration, aneurysm growth, and eventual rupture in a rat aneurysm model. *Stroke* 45, 248–254. doi:10.1161/STROKEAHA.113.002745.

Marcos-Contreras, O. A., De Lizarrondo, S. M., Bardou, I., Orset, C., Pruvost, M., Anfray, A., et al. (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.

Massey, J. M., Hubscher, C. H., Wagoner, M. R., Decker, J. A., Amps, J., Silver, J., et al. (2006). Chondroitinase ABC digestion of the perineuronal net promotes functional collateral sprouting in the cuneate nucleus after cervical spinal cord injury. *J. Neurosci.* 26, 4406–4414. doi:10.1523/JNEUROSCI.5467-05.2006.

Mataga, N., Mizuguchi, Y., and Hensch, T. K. (2004). Experience-dependent pruning of dendritic spines in visual cortex by tissue plasminogen activator. *Neuron* 44, 1031–1041. doi:10.1016/j.neuron.2004.11.028.

Mataga, N., Nagai, N., and Hensch, T. K. (2002). Permissive proteolytic activity for visual cortical plasticity. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 99, 7717–7721. doi:10.1073/pnas.102088899.

Matsui, F., Kawashima, Ã. S., Shuo, T., Yamauchi, S., Tokita, Y., Aono, S., et al. (2002). TRANSIENT EXPRESSION OF JUVENILE-TYPE NEUROCAN BY REACTIVE ASTROCYTES IN ADULT RAT BRAINS INJURED BY KAINATE-INDUCED SEIZURES AS WELL AS SURGICAL INCISION were suggested to prevent the axon regeneration (for a. *Neuroscience* 112, 773–781.

Matthews, R. T., Gary, S. C., Zerillo, C., Pratta, M., Solomon, K., Arner, E. C., et al. (2000). Brain-enriched hyaluronan binding (BEHAB)/brevican cleavage in a glioma cell line is mediated by a disintegrin and metalloproteinase with thrombospondin motifs (ADAMTS) family member. *J. Biol. Chem.* 275, 22695–22703. doi:10.1074/jbc.M909764199.

Matthews, R. T., Kelly, G. M., Zerillo, C. A., Gray, G., Tiemeyer, M., and Hockfield, S. (2002). Aggrecan Glycoforms Contribute to the Molecular Heterogeneity of Perineuronal Nets. *J. Neurosci.* 22, 7536–7547.

Matys, T., Pawlak, R., Matys, E., Pavlides, C., McEwen, B. S., and Strickland, S. (2004). Tissue plasminogen activator promotes the effects of corticotropin- releasing factor on the amygdala and anxiety-like behavior. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 101, 16345–16350. doi:10.1073/pnas.0407355101.

Matys, T., Pawlak, R., and Strickland, S. (2005). Tissue plasminogen activator in the bed nucleus of stria terminalis regulates acoustic startle. *Neuroscience* 135, 715–722. doi:10.1016/j.neuroscience.2005.06.076.

Mauney, S. A., Athanas, K. M., Pantazopoulos, H., Shaskan, N., Passeri, E., Berretta, S., et al. (2013). Developmental pattern of perineuronal nets in the human prefrontal cortex and their deficit in schizophrenia. *Biol. Psychiatry* 74, 427–435. doi:10.1016/j.biopsych.2013.05.007.

McRae, P. A., and Porter, B. E. (2012). The Perineuronal Net Component of the Extracellular Matrix in Plasticity and Epilepsy. *Neurochem Int.* 29, 997–1003. doi:10.1016/j.biotechadv.2011.08.021.Secreted.

Medina, M. G., Ledesma, M. D., Domínguez, J. E., Medina, M., Zafra, D., Alameda, F., et al. (2005). Tissue plasminogen activator mediates amyloid-induced neurotoxicity via Erk1/2 activation. *EMBO J.* 24, 1706–1716. doi:10.1038/sj.emboj.7600650.

Mehra, A., Guérit, S., Macrez, R., Gosselet, F., Sevin, E., Lebas, H., et al. (2020). Nonionotropic action of endothelial NMDA receptors on blood–brain barrier permeability via Rho/ROCK-mediated phosphorylation of myosin. *J. Neurosci.* 40, 1778–1787. doi:10.1523/JNEUROSCI.0969-19.2019.

Miranda, E., and Lomas, D. A. (2006). Neuroserpin: A serpin to think about. *Cell. Mol. Life Sci.* 63, 709–722. doi:10.1007/s00018-005-5077-4.

Miyata, S., and Kitagawa, H. (2016). Chondroitin 6-Sulfation Regulates Perineuronal Net Formation by Controlling the Stability of Aggrecan. *Neural Plast.* 2016, 13. doi:10.1155/2016/1305801.

Miyata, S., Komatsu, Y., Yoshimura, Y., Taya, C., and Kitagawa, H. (2012). Persistent cortical plasticity by upregulation of chondroitin 6-sulfation. *Nat. Publ. Gr.* 15, 414-S2. doi:10.1038/nn.3023.

Miyata, S., Nishimura, Y., Hayashi, N., and Oohira, a. (2005). Construction of perineuronal net-like structure by cortical neurons in culture. *Neuroscience* 136, 95–104. doi:10.1016/j.neuroscience.2005.07.031.

Miyata, S., Nishimura, Y., and Nakashima, T. (2007). Perineuronal nets protect against amyloid ??-protein neurotoxicity in cultured cortical neurons. *Brain Res.* 1150, 200–206. doi:10.1016/j.brainres.2007.02.066.

Monea, S., Lehti, K., Keski-Oja, J., and Mignatti, P. (2002). Plasmin activates pro-matrix metalloproteinase-2 with a membrane-type 1 matrix metalloproteinase-dependent mechanism. *J. Cell. Physiol.* 192, 160–170. doi:10.1002/jcp.10126.

Moonen, G., Grau-Wagemans, M. P., and Selak, I. (1982). Plasminogen activator-plasmin system and

neuronal migration. *Nature* 298, 753–755. doi:10.1038/298753a0.

Morawski, M., Brückner, G., Arendt, T., and Matthews, R. T. (2012a). The International Journal of Biochemistry Aggrecan : Beyond cartilage and into the brain. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 44, 690–693. doi:10.1016/j.biocel.2012.01.010.

Morawski, M., Brückner, G., Jäger, C., Seeger, G., Matthews, R. T., and Arendt, T. (2012b). Involvement of perineuronal and perisynaptic extracellular matrix in Alzheimer's disease neuropathology. *Brain Pathol.* 22, 547–561. doi:10.1111/j.1750-3639.2011.00557.x.

Morawski, M., Brückner, M. K., Riederer, P., Brückner, G., and Arendt, T. (2004). Perineuronal nets potentially protect against oxidative stress. *Exp. Neurol.* 188, 309–315. doi:10.1016/j.expneurol.2004.04.017.

Morikawa, S., Ikegaya, Y., Narita, M., and Tamura, H. (2017). Activation of perineuronal net-expressing excitatory neurons during associative memory encoding and retrieval. *Sci. Rep.* 7, 1–9. doi:10.1038/srep46024.

Morotti, A., and Goldstein, J. N. (2016). Diagnosis and Management of Acute Intracerebral Hemorrhage Andrea. *Emerg Med Clin North Am.* 34, 883–899. doi:10.1016/j.physbeh.2017.03.040.

Mower, G. D. (1991). The effect of dark rearing on the time course of the critical period in cat visual cortex. *Dev. Brain Res.* 58, 151–158. doi:10.1016/0165-3806(91)90001-Y.

Mueller, A. L., Davis, A., Sovich, S., Carlson, S. S., and Robinson, F. R. (2016). Distribution of N-Acetylgalactosamine-Positive Perineuronal Nets in the Macaque Brain : Anatomy and Implications. *Neural Plast.* 2016, 1–19.

Mullane, M. J. O., and Baker, M. S. (1998). Loss of Cell Viability Dramatically Elevates Cell Surface Plasminogen Binding and Activation. *Exp. Cell Res.* 242, 153–164.

Murphy, G. (2011). Tissue inhibitors of metalloproteinases. *Genome Biol.* 12, 1–7. doi:10.1038/315768a0.

N

Nagaoka, M. R., Strital, E., Kouyoumdjian, M., and Borges, D. R. (2002). Participation of a galectin-dependent mechanism in the hepatic clearance of tissue-type plasminogen activator and plasma kallikrein. *Thromb. Res.* 108, 257–262. doi:10.1016/S0049-3848(02)00393-6.

Nakagami, Y., Abe, K., Nishiyama, N., and Matsuki, N. (2000). Laminin degradation by plasmin regulates long-term potentiation. *J. Neurosci.* 20, 2003–2010. doi:10.1523/jneurosci.20-05-02003.2000.

Nakamura, H., Fujii, Y., Inoki, I., Sugimoto, K., Tanzawa, K., Matsuki, H., et al. (2000). Brevican is degraded by matrix metalloproteinases and aggrecanase-1 (ADAMTS4) at different sites. *J. Biol. Chem.* 275, 38885–38890. doi:10.1074/jbc.M003875200.

Namura, S., Zhu, J., Fink, K., Endres, M., Srinivasan, A., Tomaselli, K. J., et al. (1998). Activation and cleavage of caspase-3 in apoptosis induced by experimental cerebral ischemia. *J. Neurosci.* 18, 3659–3668. doi:10.1523/jneurosci.18-10-03659.1998.

Nandadasa, S., Foulcer, S., and Apte, S. S. (2014). The multiple, complex roles of versican and its proteolytic turnover by ADAMTS proteases during embryogenesis. *Matrix Biol.* 35, 34–41. doi:10.1016/j.matbio.2014.01.005.

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.

Novak, U., and Kaye, A. H. (2000). Extracellular matrix and the brain : components and function. *J. Clin. Neurosci.* 7, 280–290.

Noveletto, F., Soares, A. V., Eichinger, F. L. F., Domenech, S. C., Hounsell, M. D. S., and Filho, P. B. (2020). Biomedical Serious Game System for Lower Limb Motor Rehabilitation of Hemiparetic Stroke Patients. *IEEE Trans. Neural Syst. Rehabil. Eng.* 28, 1481–1487. doi:10.1109/TNSRE.2020.2988362.

Nuki, Y., Tsou, T. L., Kurihara, C., Kanematsu, M., Kanematsu, Y., and Hashimoto, T. (2009). Elastase-induced intracranial aneurysms in hypertensive mice. *Hypertension* 6, 247–253. doi:10.1111/j.1743-6109.2008.01122.x.Endothelial.

O

O'Brien, R. J., Desheng, X., Petralia, R. S., Steward, O., Huganir, R. L., and Worley, P. (1999). Synaptic clustering of AMPA receptors by the extracellular immediate- early gene product Narp. *Neuron* 23, 309–323. doi:10.1016/S0896-6273(00)80782-5.

O'Donnell, M. J., Chin, S. L., Rangarajan, S., Xavier, D., Liu, L., Zhang, H., et al. (2016). Global and

regional eff ects of potentially modifi able risk factors associated with acute stroke in 32 countries (INTERSTROKE): a case-control studyGlobal and regional effects of potentially modifiable risk factors associated with acute stroke in 32 coun. *Lancet* 388, 761–775. doi:10.1016/S0140-6736(16)30506-2.

O'Shea, K. S., Liu, L. H. J., and Dixita, V. M. (1991). Thrombospondin and a 140 kd fragment promote adhesion and neurite outgrowth from embryonic central and peripheral neurons and from PC12 cells. *Neuron* 7, 231–237. doi:10.1016/0896-6273(91)90261-W.

Obiang, P., Macrez, R., Jullienne, A., Bertrand, T., Lesept, F., Ali, C., et al. (2012). GluN2D subunit-containing NMDA receptors control tissue plasminogen activator-mediated spatial memory. *J. Neurosci.* 32, 12726–12734. doi:10.1523/JNEUROSCI.6202-11.2012.

Obiang, P., Maubert, E., Bardou, I., Nicole, O., Launay, S., Bezin, L., et al. (2011). Enriched housing reverses age-associated impairment of cognitive functions and tPA-dependent maturation of BDNF. *Neurobiol. Learn. Mem.* 96, 121–129. doi:10.1016/j.nlm.2011.03.004.

Oohashi, T., Hirakawa, S., Bekku, Y., Rauch, U., Zimmermann, D. R., Su, W. D., et al. (2002). Bral1, a brain-specific link protein, colocalizing with the versican V2 isoform at the nodes of Ranvier in developing and adult mouse central nervous systems. *Mol. Cell. Neurosci.* 19, 43–57. doi:10.1006/mcne.2001.1061.

Orlando, C., Ster, J., Gerber, U., Fawcett, J. W., and Raineteau, O. (2012). Perisynaptic chondroitin sulfate proteoglycans restrict structural plasticity in an integrin-dependent manner. *J. Neurosci.* 32, 18009–18017. doi:10.1523/JNEUROSCI.2406-12.2012.

Orset, C., Macrez, R., Young, A. R., Panthou, D., Angles-Cano, E., Maubert, E., et al. (2007). Mouse model of *in situ* thromboembolic stroke and reperfusion. *Stroke* 38, 2771–2778. doi:10.1161/STROKEAHA.107.487520.

Österlund, B., Andersson, B., and Häggmark, S. (2002). Myocardial ischemia induces coronary t-PA release in the pig. *Acta Anaesthesiol. Scand.* 46, 271–278. doi:10.1034/j.1399-6576.2002.t01-1-460308.x.

Osterwalder, T., Cinelli, P., Baici, A., Pennella, A., Krueger, S. R., Schrimpf, S. P., et al. (1998). The Axonally Secreted Serine Proteinase Inhibitor, Neuroserpin, Inhibits Plasminogen Activators and Plasmin but Not Thrombin*. *J. Biol. Chem.* 273, 2312–2321.

Osterwalder, T., Contartese, J., Stoeckli, E. T., Kuhn, T. B., and Sonderegger, P. (1996). Neuroserpin, an axonally secreted serine protease inhibitor. *EMBO J.* 15, 2944–2953. doi:10.1002/j.1460-2075.1996.tb00657.

P

Pang, P. T., Teng, H. K., Zaitsev, E., Woo, N. T., Sakata, K., Zhen, S., et al. (2004). Cleavage of proBDNF by tPA/plasmin is essential for long-term hippocampal plasticity. *Science (80-.).* 306, 487–491. doi:10.1126/science.1100135.

Pantazopoulos, H., Markota, M., Jaquet, F., Ghosh, D., Wallin, A., Santos, A., et al. (2015). Aggrecan and chondroitin-6-sulfate abnormalities in schizophrenia and bipolar disorder: A postmortem study on the amygdala. *Transl. Psychiatry* 5, 1–11. doi:10.1038/tp.2014.128.

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

Park, L., Gallo, E. F., Anrather, J., Wang, G., Norris, E. H., Paul, J., et al. (2008). Key role of tissue plasminogen activator in neurovascular coupling. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 105, 1073–1078. doi:10.1073/pnas.0708823105.

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

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

Pelisek, J., Deutsch, L., Ansel, A., Pongratz, J., Stadlbauer, T., Gebhard, H., et al. (2015). Expression of a metalloproteinase family of ADAMTS in human vulnerable carotid lesions. *J Cardiovasc Med 2015,* 16, 1–9. doi:10.2459/JCM.0000000000000254.

Pendleton, J. C., Shamblott, M. J., Gary, D. S., Belegu, V., Hurtado, A., Malone, M. L., et al. (2013).

Chondroitin sulfate proteoglycans inhibit oligodendrocyte myelination through PTP σ. *Exp. Neurol.* 247, 113–121. doi:10.1016/j.expneurol.2013.04.003.

Pennica, D., Holmes, W. E., Kohr, W. J., Harkins, R. N., Vehar, G. A., Ward, C. A., et al. (1983). Cloning and expression of human tissue-type plasminogen activator cDNA in E. coli. *Nature* 301, 214–221. doi:10.1038/301214a0.

Picard, N., Takesian, A. E., Fagiolini, M., and Hensch, T. K. (2019). NMDA 2A receptors in parvalbumin cells mediate sex-specific rapid ketamine response on cortical activity. *Mol. Psychiatry* 24, 828–838. doi:10.1038/s41380-018-0341-9.

Pittman, R. N., and DiBenedetto, A. J. (1995). PC12 Cells Overexpressing Tissue Plasminogen Activator Regenerate Neurites to a Greater Extent and Migrate Faster than Control Cells in Complex Extracellular Matrix. *J. Neurochem.* 64, 566–575. doi:10.1046/j.1471-4159.1995.64020566.x.

Pizzorusso, T., Medeni, P., Berardi, N., Chierzi, S., Fawcett, J., and Maffei, L. (2002). Reactivation of Ocular Dominance Plasticity in the Adult Visual Cortex. *Science (80-.).* 298, 1248–1251. doi:10.1126/science.1072699.

Pizzorusso, T., Medini, P., Landi, S., Baldini, S., Berardi, N., and Maffei, L. (2006). Structural and functional recovery from early monocular deprivation in adult rats. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 103, 8517–8522. doi:10.1073/pnas.0602657103.

Plawinski, L., Dejouvencel, T., and Anglés-Cano, E. (2011). Fibrinolyse, nouveaux concepts: Vésicules et cross-talk fibrinolytiques. *Hematologie* 17, 423–434. doi:10.1684/hma.2011.0656.

Polavarapu, R., Gongora, M. C., Yi, H., Ranganthan, S., Lawrence, D. A., Strickland, D., et al. (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.

Pollock, E., Everest, M., Brown, A., and Poulter, M. O. (2014). Metalloproteinase inhibition prevents inhibitory synapse reorganization and seizure genesis. *Neurobiol. Dis.* 70, 21–31. doi:10.1016/j.nbd.2014.06.003.

Prochiantz, A., and Di Nardo, A. A. (2015). Homeoprotein signaling in the developing and adult nervous system. *Neuron* 85, 911–925. doi:10.1016/j.neuron.2015.01.019.

Pruvost, M., Lépine, M., Leonetti, C., Etard, O., Naveau, M., Agin, V., et al. (2017). ADAMTS-4 in oligodendrocytes contributes to myelination with an impact on motor function. *Glia* 65, 1961–1975. doi:10.1002/glia.23207.

Pyka, M., Wetzel, C., Aguado, A., Geissler, M., Hatt, H., and Faissner, A. (2011). Chondroitin sulfate proteoglycans regulate astrocyte- dependent synaptogenesis and modulate synaptic activity in primary embryonic hippocampal neurons. *Eur. J. Neurosci.* 33, 2187–2202. doi:10.1111/j.1460-9568.2011.07690.x.

Q

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

Quattromani, M. J., Pruvost, M., Guerreiro, C., Backlund, F., Englund, E., Aspberg, A., et al. (2017). Extracellular Matrix Modulation Is Driven by Experience-Dependent Plasticity During Stroke Recovery. doi:10.1007/s12035-017-0461-2.

Quattromani, M. J., Pruvost, M., Guerreiro, C., Backlund, F., Englund, E., Aspberg, A., et al. (2018). Extracellular Matrix Modulation Is Driven by Experience-Dependent Plasticity During Stroke Recovery. *Mol. Neurobiol.* 55, 2196–2213. doi:10.1007/s12035-017-0461-2.

R

Raum, D., Marcus, D., Alper, C. A., Levey, R., Paul D. Taylor, A., and Starzl, T. E. (1980). Synthesis of Human Plasminogen by the Liver Donald. *Science (80-.).* 028, 1036–1037. doi:10.1038/jid.2014.371.

Rees, S. G., Dent, C. M., and Caterson, B. (2009). Metabolism of proteoglycans in tendon. *Scand. J. Med. Sci. Sport.* 19, 470–478. doi:10.1111/j.1600-0838.2009.00938.x.

Reinert, T., Morawski, M., Arendt, T., and Butz, T. (2003). Quantitative microanalysis of perineuronal nets in brain tissue. *Nucl. Instruments Methods Phys. Res. Sect. B Beam Interact. with Mater. Atoms* 210, 395–400. doi:10.1016/S0168-583X(03)01041-3.

Rempe, R. G., Hartz, A. M. S., and Bauer, B. (2016). Matrix metalloproteinases in the brain and blood-brain barrier: Versatile breakers and makers. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* 36, 1481–1507. doi:10.1177/0271678X16655551.

Ren, P., Hughes, M., Krishnamoorthy, S., Zou, S., Zhang, L., Wu, D., et al. (2017). Critical Role of

ADAMTS-4 in the Development of Sporadic Aortic Aneurysm and Dissection in Mice. *Sci. Rep.* 7, 1–14. doi:10.1038/s41598-017-12248-z.

Ren, P., Zhang, L., Xu, G., Palmero, L., Albini, P., Coselli, J., et al. (2013). ADAMTS-1 and ADAMTS-4 levels are Elevated in Thoracic Aortic Aneurysms and Dissections. *Ann Thorac Surg.* 29, 997–1003. doi:10.1016/j.biotechadv.2011.08.021.Secreted.

Rogove, A. D., Siao, C. J., Keyt, B., Strickland, S., and Tsirka, S. E. (1999). Activation of microglia reveals a non-proteolytic cytokine function for tissue plasminogen activator in the central nervous system. *J. Cell Sci.* 112, 4007–4016.

Rohde, V., Rohde, I., Thiex, R., Ince, A., Jung, A., Dückers, G., et al. (2002). Fibrinolysis therapy achieved with tissue plasminogen activator and aspiration of the liquefied clot after experimental intracerebral hemorrhage: Rapid reduction in hematoma volume but intensification of delayed edema formation. *J. Neurosurg.* 97, 954–962. doi:10.3171/jns.2002.97.4.0954.

Rolls, A., Shechter, R., and Schwartz, M. (2009). The bright side of the glial scar in CNS repair. *Nat. Rev. Neurosci.* 10, 235–241. doi:10.1038/nrn2591.

Romberg, C., Yang, S., Melani, R., Andrews, M. R., Horner, A. E., Spillantini, M. G., et al. (2013). Depletion of perineuronal nets enhances recognition memory and long-term depression in the perirhinal cortex. *J. Neurosci.* 33, 7057–7065. doi:10.1523/JNEUROSCI.6267-11.2013.

Rossier, J., Bernard, A., Cabungcal, J., Perrenoud, Q., Savoye, A., Gallopin, T., et al. (2015). Cortical fast-spiking parvalbumin interneurons enwrapped in the perineuronal net express the metallopeptidases Adamts8 , Adamts15 and Neprilysin. *Mol. Psychiatry*, 154–161. doi:10.1038/mp.2014.162.

Rossignol, P., Vranckx, R., Bouton, M., Meilhac, O., Lijnen, H. R., Guillin, M., et al. (2004). Protease Nexin-1 Inhibits Plasminogen Activation-induced Apoptosis of Adherent Cells*. *J. Biol. Chem.* 279, 10346–10356. doi:10.1074/jbc.M310964200.

Rouf, S. A., Moo-Young, M., and Chisti, Y. (1996). Tissue-type plasminogen activator: characteristics, applications and production technology. *Biotechnol. Adv.* 14, 239–266.

Roussel, B. D., Macrez, R., Jullienne, A., Agin, V., Maubert, E., Dauphinot, L., et al. (2009). Age and albumin D site-binding protein control tissue plasminogen activator levels: Neurotoxic impact. *Brain* 132, 2219–2230. doi:10.1093/brain/awp162.

Rowlands, D., Lensjø, X. K. K., Dinh, T., Yang, S., Andrews, X. M. R., Hafting, T., et al. (2018). Aggrecan Directs Extracellular Matrix-Mediated Neuronal Plasticity. *J Neurosci.* 38, 10102–10113.

Ruohonen, S. T., Savontaus, E., Rinne, P., Rosmaninho-Salgado, J., Cavadas, C., Ruskoaho, H., et al. (2009). Stress-induced hypertension and increased sympathetic activity in mice overexpressing neuropeptide y in noradrenergic neurons. *Neuroendocrinology* 89, 351–360. doi:10.1159/000188602.

S

Sabbagh, U., Monavarfeshani, A., Su, K., Zabet-Moghadamd, M., Cole, J., Carnival, E., et al. (2019). Distribution and development of molecularly distinct perineuronal nets in visual thalamus Ubadah. *J Neurochem.* 147, 626–646. doi:10.1111/jnc.14614.Distribution.

Saghatelyan, A. K., Dityatev, A., Schmidt, S., Schuster, T., Bartsch, U., and Schachner, M. (2001). Reduced perisomatic inhibition, increased excitatory transmission, and impaired long-term potentiation in mice deficient for the extracellular matrix glycoprotein tenascin-R. *Mol. Cell. Neurosci.* 17, 226–240. doi:10.1006/mcne.2000.0922.

Sallés, F. J., and Strickland, S. (2002). Localization and regulation of the tissue plasminogen activator-plasmin system in the hippocampus. *J. Neurosci.* 22, 2125–2134. doi:10.1523/jneurosci.22-06-02125.2002.

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 N-Methyl-D-Aspartate receptor function. *J Neurochem.* 107, 1091–1101. doi:10.1111/j.1471-4159.2008.05687.x.Tissue-type.

Sandy, J. D., Westling, J., Richard, D., Iruela-arispe, M. L., Carlos, J., Dieter, R., et al. (2001). Versican V1 Proteolysis in Human Aorta *in vivo* Occurs at the Glu441-Ala442 Bond, a Site That Is Cleaved by Recombinant ADAMTS-1 and ADAMTS-4*. *J. Biol. Chem.* 276, 13372–13378. doi:10.1074/jbc.M009737200.

Sasaki, M., Seo-Kiryu, S., Kato, R., Kita, S. I., and Kiyama, H. (2001). A disintegrin and metalloprotease with thrombospondin type1 motifs (ADAMTS-1) and IL-1 receptor type 1 mRNAs are simultaneously induced in nerve injured motor neurons. *Mol. Brain Res.* 89, 158–163. doi:10.1016/S0169-328X(01)00046-8.

Satoh, K., Suzuki, N., and Yokota, H. (2000). ADAMTS-4 (a disintegrin and metalloproteinase with thrombospondin motifs) is transcriptionally induced in beta-amyloid treated rat astrocytes. *Neurosci. Lett. 289* 289, 177–180.

Scaffidi, C., Fulda, S., Srinivasan, A., Friesen, C., Li, F., Tomaselli, K. J., et al. (1998). Two CD95 (APO-1/Fas) signaling pathways. *EMBO J.* 17, 1675–1687. doi:10.1093/emboj/17.6.1675.

Scott, R. W., Bergman, B. L., Bajpai, A., Hersh, R. T., Rodriguez, H., Jonesd, B. N., et al. (1985). THE JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY Protease Nexin PROPERTIES AND A MODIFIED PURIFICATION PROCEDURE*. 260, 7029–7034.

Seeds, N. W., Basham, M. E., and Haffke, S. P. (1999). Neuronal migration is retarded in mice lacking the tissue plasminogen activator gene. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 96, 14118–14123. doi:10.1073/pnas.96.24.14118.

Seidenbecher, C. I., Gundelfinger, E. D., Bo, T. M., and Trotter, J. (1998). Transcripts for secreted and GPI-anchored brevican are differentially distributed in rat brain. *Eur. J. ofNeuroscience* 10, 1621–1630.

Sessolo, M., Marcon, I., Bovetti, S., Losi, G., Cammarota, M., Ratto, G. M., et al. (2015). Parvalbumin-positive inhibitory interneurons oppose propagation but favor generation of focal epileptiform activity. *J. Neurosci.* 35, 9544–9557. doi:10.1523/JNEUROSCI.5117-14.2015.

Sharma, K., Schmitt, S., Bergner, C. G., Tyanova, S., Kannaiyan, N., Manrique-Hoyos, N., et al. (2015). Cell type- and brain region-resolved mouse brain proteome. *Nat. Neurosci.* 18, 1819–1831. doi:10.1038/nn.4160.

Shi, W., Wei, X., Wang, X., Du, S., Liu, W., Song, J., et al. (2019). Perineuronal nets protect long-term memory by limiting activity-dependent inhibition from parvalbumin interneurons. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 116, 27063–27073. doi:10.1073/pnas.1902680116.

Shin, C. Y., Kundel, M., and Wells, D. G. (2004). Rapid, activity-induced increase in tissue plasminogen activator is mediated by metabotropic glutamate receptor-dependent mRNA translation. *J. Neurosci.* 24, 9425–9433. doi:10.1523/JNEUROSCI.2457-04.2004.

Siao, C. J., Fernandez, S. R., and Tsirka, S. E. (2003). Cell type-specific roles for tissue plasminogen activator released by neurons or microglia after excitotoxic injury. *J. Neurosci.* 23, 3234–3242. doi:10.1523/jneurosci.23-08-03234.2003.

Siao, C. J., and Tsirka, S. E. (2002). Tissue Plasminogen Activator Mediates Microglial Activation via Its Finger Domain through Annexin II. *J. Neurosci.* 22, 3352–3358. doi:10.1523/jneurosci.22-09-03352.2002.

Silverman, G. A., Bird, P. I., Carrell, R. W., Church, F. C., Coughlin, P. B., Gettins, P. G. W., et al. (2001). The serpins are an expanding superfamily of structurally similar but functionally diverse proteins.

Evolution, mechanism of inhibition, novel functions, and a revised nomenclature. *J. Biol. Chem.* 276, 33293–33296. doi:10.1074/jbc.R100016200.

Simats, A., García-Berrocoso, T., and Montaner, J. (2016). Neuroinflammatory biomarkers: From stroke diagnosis and prognosis to therapy. *Biochim. Biophys. Acta - Mol. Basis Dis.* 1862, 411–424. doi:10.1016/j.bbadis.2015.10.025.

Simpson, C. S., Johnston, H. M., and Morris, B. J. (1994). Neuronal expression of protease-nexin 1 mRNA in rat brain. *Neurosci. Lett.* 170, 286–290. doi:10.1016/0304-3940(94)90339-5.

Slaker, M., Churchill, L., Todd, R. P., Blacktop, J. M., Zuloaga, D. G., Raber, J., et al. (2015). Removal of perineuronal nets in the medial prefrontal cortex impairs the acquisition and reconsolidation of a cocaine-induced conditioned place preference memory. *J. Neurosci.* 35, 4190–4202. doi:10.1523/JNEUROSCI.3592-14.2015.

Soleman, S., Yip, P. K., Duricki, D. a., and Moon, L. D. F. (2012). Delayed treatment with chondroitinase ABC promotes sensorimotor recovery and plasticity after stroke in aged rats. *Brain* 135, 1210–1223. doi:10.1093/brain/aws027.

Soreq, H., and Miskin, R. (1981). PLASMINOGEN ACTIVATOR IN THE RODENT BRAIN HERMONA. *Brain Res.* 216, 361–374.

Sprengers, E., and Kluft, C. (1987). Plasminogen activator inhibitors. *Blood* 69, 381–387. doi:10.1182/blood.v69.2.381.381.

Stanton, H., Melrose, J., Little, C. B., and Fosang, A. J. (2011). Proteoglycan degradation by the ADAMTS family of proteinases. *Biochim. Biophys. Acta - Mol. Basis Dis.* 1812, 1616–1629. doi:10.1016/j.bbadis.2011.08.009.

Stephenson, E. L., Mishra, M. K., Moussienko, D., Laflamme, N., Rivest, S., Ling, C. C., et al. (2018). Chondroitin sulfate proteoglycans as novel drivers of leucocyte infiltration in multiple sclerosis. *Brain* 141, 1094–1110. doi:10.1093/brain/awy033.

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

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

Su, W., Kang, J., Sopher, B., Gillespie, J., Aloi, M. S., Odom, G. L., et al. (2016). Recombinant adeno-

associated viral (rAAV) vectors mediate efficient gene transduction in cultured neonatal and adult microglia. *J Neurochem* 136, 49–62. doi:10.1016/j.physbeh.2017.03.040.

Sugiyama, S., Di Nardo, A. A., Aizawa, S., Matsuo, I., Volovitch, M., Prochiantz, A., et al. (2008). Experience-Dependent Transfer of Otx2 Homeoprotein into the Visual Cortex Activates Postnatal Plasticity. *Cell* 134, 508–520. doi:10.1016/j.cell.2008.05.054.

Sullivan, C. S., Gotthard, I., Wyatt, E. V, Bongu, S., Mohan, V., Weinberg, R. J., et al. (2018). Perineuronal Net Protein Neurocan Inhibits NCAM / EphA3 Repellent Signaling in GABAergic Interneurons. *Sci. Rep.*, 1–15. doi:10.1038/s41598-018-24272-8.

Suttkus, A., Rohn, S., Weigel, S., Glöckner, P., Arendt, T., and Morawski, M. (2014). Aggrecan, link protein and tenascin-R are essential components of the perineuronal net to protect neurons against iron-induced oxidative stress. *Cell Death Dis.* 5, e1119. doi:10.1038/cddis.2014.25.

Suzuki, Y., Nagai, N., Yamakawa, K., Kawakami, J., Lijnen, H. R., and Umemura, K. (2009). Tissue-type plasminogen activator (t-PA) induces stromelysin-1 (MMP-3) in endothelial cells through activation of lipoprotein receptor-related protein. *Blood* 114, 3352–3358. doi:10.1182/blood-2009-02-203919.

Svensson, M., Rosvall, P., Boza-Serrano, A., Andersson, E., Lexell, J., and Deierborg, T. (2016). Forced treadmill exercise can induce stress and increase neuronal damage in a mouse model of global cerebral ischemia. *Neurobiol. Stress* 5, 8–18. doi:10.1016/j.ynstr.2016.09.002.

T

Taheri, Z., Harirchian, M. H., Ghanaati, H., Khoshnevisan, A., Salamati, P., Miri, M., et al. (2015). Comparison of endovascular coiling and surgical clipping for the treatment of intracranial aneurysms: A prospective study. *Iran. J. Neurol.* 14, 22–8. Available at: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25874053%0Ahttp://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=PMC4395803.

Taniguchi, Y., Inoue, N., Morita, S., Nikaido, Y., Nakashima, T., Nagai, N., et al. (2011). Localization of plasminogen in mouse hippocampus, cerebral cortex, and hypothalamus. *Cell Tissue Res.* 343, 303–317. doi:10.1007/s00441-010-1110-5.

Tanne, D., Kasner, S. E., Demchuk, A. M., Koren-Morag, N., Hanson, S., Grond, M., et al. (2002). Markers of increased risk of intracerebral hemorrhage after intravenous recombinant tissue

plasminogen activator therapy for acute ischemic stroke in clinical practice: The multicenter rt-PA acute stroke survey. *Circulation* 105, 1679–1685. doi:10.1161/01.CIR.0000012747.53592.6A.

Tauchi, R., Imagama, S., Natori, T., Ohgomori, T., Muramoto, A., Shinjo, R., et al. (2012). The endogenous proteoglycan-degrading enzyme ADAMTS-4 promotes functional recovery after spinal cord injury. *J. Neuroinflammation* 9, 53–63. doi:10.1186/1742-2094-9-53.

Testa, D., Prochiantz, A., and Nardo, A. A. Di (2019). Seminars in Cell & Developmental Biology Perineuronal nets in brain physiology and disease. *Semin. Cell Dev. Biol.* 89, 125–135. doi:10.1016/j.semcdb.2018.09.011.

Tewari, B. P., Chaunsali, L., Campbell, S. L., Patel, D. C., Goode, A. E., and Sontheimer, H. (2018). Perineuronal nets decrease membrane capacitance of peritumoral fast spiking interneurons in a model of epilepsy. *Nat. Commun.* 9. doi:10.1038/s41467-018-07113-0.

Texakalidis, P., Sweid, A., Mouchtouris, N., Peterson, E. C., Sioka, C., Rangel-Castilla, L., et al. (2019). Aneurysm Formation, Growth, and Rupture: The Biology and Physics of Cerebral Aneurysms. *World Neurosurg.* 130, 277–284. doi:10.1016/j.wneu.2019.07.093.

The National Institute of Neurological Disorders and Stroke rt-PA Stroke Study Group (1995). TISSUE PLASMINOGEN ACTIVATOR FOR ACUTE ISCHEMIC STROKE. *N. Engl. J. Med.* 333, 1581–1587.

Thelwell, C., and Longstaff, C. (2007). The regulation by fibrinogen and fibrin of tissue plasminogen activator kinetics and inhibition by plasminogen activator inhibitor 1. *J. Thromb. Haemost.* 5, 804–811. doi:10.1111/j.1538-7836.2007.02422.x.

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.

Tortorella, M. D., Arner, E. C., Hills, R., Easton, A., Korte-Sarfaty, J., Fok, K., et al. (2004). α2-Macroglobulin Is a Novel Substrate for ADAMTS-4 and ADAMTS-5 and Represents an Endogenous Inhibitor of These Enzymes. *J. Biol. Chem.* 279, 17554–17561. doi:10.1074/jbc.M313041200.

Tortorella, M. D., Arner, E. C., Hills, R., Gormley, J., Fok, K., Pegg, L., et al. (2005). ADAMTS-4 (aggrecanase-1): N-Terminal activation mechanisms. *Arch. Biochem. Biophys.* 444, 34–44. doi:10.1016/j.abb.2005.09.018.

Tortorella, M. D., Burn, T. C., Pratta, M. A., Abbaszade, I., Hollis, J. M., Liu, R., et al. (1999). Purification and cloning of aggrecanase-1: A member of the ADAMTS family of proteins. *Science (80-.).* 284,

1664–1666. doi:10.1126/science.284.5420.1664.

Tortorella, M., Pratta, M., Liu, R. Q., Abbaszade, I., Ross, H., Burn, T., et al. (2000). The thrombospondin motif of Aggrecanase-1 (ADAMTS-4) is critical for aggrecan substrate recognition and cleavage. *J. Biol. Chem.* 275, 25791–25797. doi:10.1074/jbc.M001065200.

Toshniwal, P. K., Firestone, S. L., Barlow, G. H., and Tiku, M. L. (1987). Characterization of astrocyte plasminogen activator. *J. Neurol. Sci.* 80, 277–287. doi:10.1016/0022-510X(87)90162-6.

Tovote, P., Fadok, J. P., and Lüthi, A. (2015). Neuronal circuits for fear and anxiety. *Nat. Rev. Neurosci.* 16, 317–331. doi:10.1038/nrn3945.

Troeberg, L., Fushimi, K., Scilabra, S. D., Nakamura, H., Dive, V., Thøgersen, I. B., et al. (2009). The C-terminal domains of ADAMTS-4 and ADAMTS-5 promote association with N-TIMP-3. *Matrix Biol.* 28, 463–469. doi:10.1016/j.matbio.2009.07.005.

Trotter, J. H., Lussier, A. L., Psilos, K. E., Mahoney, H. L., Sponaugle, A. E., Hoe, H. S., et al. (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, S. E., Gualandris, A., Amaral, D. G., and Strickland, S. (1995). Excitotoxin-induced neuronal degeneration and seizure are mediated by tissue plasminogen activator. *Nature* 340–344, 1689–1699. doi:10.1017/CBO9781107415324.004.

Tsirka, S. E., Rogove, A. D., Bugge, T. H., Degen, J. L., and Strickland, S. (1997). Degeneration in the Mouse Hippocampus. *J. Neurosci.* 17, 543–552.

U

Ueno, H., Fujii, K., Suemitsu, S., and Murakami, S. (2018). Expression of aggrecan components in perineuronal nets in the mouse cerebral cortex. *IBRO Reports* 4, 22–37. doi:10.1016/j.ibror.2018.01.002.

Ueno, H., Suemitsu, S., Murakami, S., Kitamura, N., Wani, K., Matsumoto, Y., et al. (2019). Layer-specific expression of extracellular matrix molecules in the mouse somatosensory and piriform cortices. *IBRO Reports* 6, 1–17. doi:10.1016/j.ibror.2018.11.006.

Ueno, H., Suemitsu, S., Okamoto, M., Matsumoto, Y., and Ishihara, T. (2017). Sensory experience-dependent formation of perineuronal nets and expression of Cat-315 immunoreactive components in the mouse somatosensory cortex. *Neuroscience* 355, 161–174.

doi:10.1016/j.neuroscience.2017.04.041.

Ulrich, R., Gerhauser, I., Seeliger, F., Baumgärtner, W., and Alldinger, S. (2005). Matrix metalloproteinases and their inhibitors in the developing mouse brain and spinal cord: A reverse transcription quantitative polymerase chain reaction study. *Dev. Neurosci.* 27, 408–418. doi:10.1159/000088455.

V

Van't Spijker, H. M., Rowlands, D., Rossier, J., Haenzi, B., Fawcett, J. W., and Kwok, J. C. F. (2019). Neuronal Pentraxin 2 Binds PNNs and Enhances PNN Formation. *Neural Plast.* 2019. doi:10.1155/2019/6804575.

Végh, M. J., Heldring, C. M., Kamphuis, W., Hijazi, S., Timmerman, A. J., Li, K. W., et al. (2014). Reducing hippocampal extracellular matrix reverses early memory deficits in a mouse model of Alzheimer's disease. *Acta Neuropathol. Commun.* 2, 1–11. doi:10.1186/s40478-014-0076-z.

Viapiano, M. S., Matthews, R. T., and Hockfield, S. (2003). A Novel Membrane-associated Glycovariant of BEHAB / Brevican Is Up-regulated during Rat Brain Development and in a Rat Model of Invasive Glioma *. *J. Biol. Chem.* 278, 33239–33247. doi:10.1074/jbc.M303480200.

Vo, T., Carulli, D., Ehlert, E. M. E., Kwok, J. C. F., Dick, G., Mecollari, V., et al. (2013). The chemorepulsive axon guidance protein semaphorin3A is a constituent of perineuronal nets in the adult rodent brain. *Mol. Cell. Neurosci.* 56, 186–200. doi:10.1016/j.mcn.2013.04.009.

Von Düring, S., Bruchez, S., Suppan, L., and Niquille, M. (2015). Oxygénothérapie normobare en médecine aiguë : Entre mythes et réalité. *Rev. Med. Suisse* 11, 1476–1485.

W

Wagsäter, D., Björk, H., Zhu, C., Björkegren, J., Valen, G., Hamsten, A., et al. (2008). ADAMTS-4 and -8 are inflammatory regulated enzymes expressed in macrophage-rich areas of human atherosclerotic plaques. *Atheroscler. 196* 196, 514–522. doi:10.1016/j.atherosclerosis.2007.05.018.

Wallén, P., Bergsdorf, N., and Rånby, M. (1982). Purification and identification of two structural variants of porcine tissue plasminogen activator by affinity adsorption on fibrin. *BBA - Gen. Subj.*

719, 318–328. doi:10.1016/0304-4165(82)90105-2.

Walter, S., Jumpertz, T., Hüttenrauch, M., Ogorek, I., Gerber, H., Storck, S. E., et al. (2019). The metalloprotease ADAMTS4 generates N-truncated Aβ4–x species and marks oligodendrocytes as a source of amyloidogenic peptides in Alzheimer's disease. *Acta Neuropathol.* 137, 239–257. doi:10.1007/s00401-018-1929-5.

Wang, H., Katagiri, Y., McCann, T. E., Unsworth, E., Goldsmith, P., Yu, Z. X., et al. (2008). Chondroitin-4-sulfation negatively regulates axonal guidance and growth. *J. Cell Sci.* 121, 3083–3091. doi:10.1242/jcs.032649.

Wang, P., Tortorella, M., England, K., Malfait, A. M., Thomas, G., Arner, E. C., et al. (2004). Proprotein Convertase Furin Interacts with and Cleaves Pro-ADAMTS4 (Aggrecanase-1) in the trans-Golgi Network. *J. Biol. Chem.* 279, 15434–15440. doi:10.1074/jbc.M312797200.

Wang, X., Lee, S. R., Arai, K., Lee, S. R., Tsuji, K., Rebeck, G. W., et al. (2003). Lipoprotein receptor-mediated induction of matrix metalloproteinase by tissue plasminogen activator. *Nat. Med.* 9, 1313–1317. doi:10.1038/nm926.

Wang, Y. F., Tsirka, S. E., Strickland, S., Stieg, P. E., Soriano, S. G., and Lipton, S. A. (1998). Tissue plasminogen activator (tPA) increases neuronal damage after focal cerebral ischemia in wild-type and tPA-deficient mice. *Nat. Med.* 4, 228–231. doi:10.1038/nm0298-228.

Wang, Z., Luo, J., Iwamoto, S., and Chen, Q. (2014). Matrilin-2 is proteolytically cleaved by ADAMTS-4 and ADAMTS-5. *Molecules* 19, 8472–8487. doi:10.3390/molecules19068472.

Wayne, G. J., Deng, S. J., Amour, A., Borman, S., Matico, R., Carter, H. L., et al. (2007). TIMP-3 inhibition of ADAMTS-4 (Aggrecanase-1) is modulated by interactions between aggrecan and the C-terminal domain of ADAMTS-4. *J. Biol. Chem.* 282, 20991–20998. doi:10.1074/jbc.M610721200.

Weaver, M. S., Workman, G., Cardo-Vila, M., Arap, W., Pasqualini, R., and Sage, E. H. (2010). Processing of the matricellular protein hevin in mouse brain is dependent on ADAMTS4. *J. Biol. Chem.* 285, 5868–5877. doi:10.1074/jbc.M109.070318.

Weimar, W., Stibbe, J., Van Seyen, A. J., Billiau, A., De Somer, P., and Collen, D. (1981). Specific Lysis of an Iliofemoral Thrombus By Administration of Extrinsic (Tissue-Type) Plasminogen Activator. *Lancet* 318, 1018–1020. doi:10.1016/S0140-6736(81)91217-4.

Weiss, N., Miller, F., Cazaubon, S., and Couraud, P. O. (2009). The blood-brain barrier in brain homeostasis and neurological diseases. *Biochim. Biophys. Acta - Biomembr.* 1788, 842–857. doi:10.1016/j.bbamem.2008.10.022.

Wen, T. H., Afroz, S., Reinhard, S. M., Palacios, A. R., Tapia, K., Binder, D. K., et al. (2018). Genetic Reduction of Matrix Metalloproteinase-9 Promotes Formation of Perineuronal Nets Around Parvalbumin-Expressing Interneurons and Normalizes Auditory Cortex Responses in Developing Fmr1 Knock-Out Mice. *Cereb. Cortex* 28, 3951–3964. doi:10.1093/cercor/bhx258.

Westling, J., Gottschall, P. E., Thompson, V. P., Cockburn, A., Perides, G., Zimmermann, D. R., et al. (2004). ADAMTS4 (aggrecanase-1) cleaves human brain versican V2 at Glu 405-Gln406 to generate glial hyaluronate binding protein. *Biochem. J.* 377, 787–795. doi:10.1042/bj20030896.

Wiesel, T. N., and Hubel, D. H. (1965). Comparison of the effects of unilateral and bilateral eye closure on cortical unit responses in kittens. *J. Neurophysiol.* 28, 1029–1040. doi:10.1152/jn.1965.28.6.1029.

Wolfgang, H., Briickner, G., Brauer, K., Schmidt, C., and Bigl, V. (1995). Allocation of perineuronal nets and parvalbumin-, calbindin-D28 k- and glutamic acid decarboxylase-immunoreactivity in the amygdala of the rhesus monkey. *Brain Rcsearch* 698, 265–269.

Won, S. J., Kim, D. Y., and Gwag, B. J. (2002). Cellular and molecular pathways of ischemic neuronal death. *J. Biochem. Mol. Biol.* 35, 67–86. doi:10.5483/bmbrep.2002.35.1.067.

Wong, E., Maretzky, T., Peleg, Y., Blobel, C. P., and Sagi, I. (2015). The functional maturation of a disintegrin and metalloproteinase (ADAM) 9, 10, and 17 requires processing at a newly identified proprotein convertase (PC) cleavage site. *J. Biol. Chem.* 290, 12135–12146. doi:10.1074/jbc.M114.624072.

Wu, Y. P., Siao, C. J., Lu, W., Sung, T. C., Frohman, M. A., Milev, P., et al. (2000). The tissue plasminogen activator (tPA)/plasmin extracellular proteolytic system regulates seizure-induced hippocampal mossy fiber outgrowth through a proteoglycan substrate. *J. Cell Biol.* 148, 1295–1304. doi:10.1083/jcb.148.6.1295.

Y

Yamada, J., Ohgomori, T., and Jinno, S. (2015). Perineuronal nets affect parvalbumin expression in GABAergic neurons of the mouse hippocampus. *Eur. J. Neurosci.* 41, 368–378. doi:10.1111/ejn.12792.

Yamamoto, K., Owen, K., Parker, A. E., Scilabra, S. D., Dudhia, J., Strickland, D. K., et al. (2014). Low density lipoprotein receptor-related protein 1 (LRP1)-mediated endocytic clearance of a

disintegrin and metalloproteinase with thrombospondin motifs-4 (ADAMTS-4): Functional differences of non-catalytic domains of ADAMTS-4 and ADAMTS-5 in LRP1 binding. *J. Biol. Chem.* 289, 6462–6474. doi:10.1074/jbc.M113.545376.

Yang, S., Cacquevel, M., Saksida, L. M., Bussey, T. J., Schneider, B. L., Aebischer, P., et al. (2015). Perineuronal net digestion with chondroitinase restores memory in mice with tau pathology. *Exp. Neurol.* 265, 48–58. doi:10.1016/j.expneurol.2014.11.013.

Yang, Y., and Rosenberg, G. A. (2016). Matrix metalloproteinases as therapeutic targets for stroke Yi. *Brain Res.* 1623, 30–38. doi:10.1016/j.physbeh.2017.03.040.

Yao, Y., and Tsirka, S. E. (2011). Truncation of monocyte chemoattractant protein 1 by plasmin promotes blood-brain barrier disruption. *J. Cell Sci.* 124, 1486–1495. doi:10.1242/jcs.082834.

Ye, Q., and Miao, Q. long (2013). Experience-dependent development of perineuronal nets and chondroitin sulfate proteoglycan receptors in mouse visual cortex. *Matrix Biol.* 32, 352–363. doi:10.1016/j.matbio.2013.04.001.

Yepes, M., Sandkvist, M., Moore, E. G., Bugge, T. H., Strickland, D. K., and Lawrence, D. A. (2003). induces opening of the blood-brain barrier via the LDL receptor – related protein. *Methods* 112, 1533–1540. doi:10.1172/JCI200319212.Introduction.

Yiu, G., and He, Z. (2006). Glial inhibition of CNS axon regeneration. *Nat. Rev. Neurosci.* 7, 617–627. doi:10.1038/nrn1956.

Yu, Z., Chen, N., Hu, D., Chen, W., Yuan, Y., and Meng, S. (2020). Decreased Density of Perineuronal Net in Prelimbic Cortex Is Linked to Depressive-Like Behavior in Young-Aged Rats. *Front. Mol. Neurosci.* 13, 1–12. doi:10.3389/fnmol.2020.00004.

Yuan, W., Matthews, R. T., Sandy, J. D., and Gottschall, P. E. (2002). Association between protease-specific proteolytic cleavage of brevican and synaptic loss in the dentate gyrus of kainate-treated rats. *Neuroscience* 114, 1091–1101. doi:10.1016/S0306-4522(02)00347-0.

Z

Zamanian, J. L., Xu, L., Foo, L. C., Nouri, N., Zhou, L., Giffard, R. G., et al. (2012). Genomic Analysis of Reactive Astrogliosis. *J. Neurosci.* 32, 6391–6410. doi:10.1523/JNEUROSCI.6221-11.2012.

Zha, Y., Chen, Y., Xu, F., Li, T., Zhao, C., and Cui, L. (2010). ADAMTS4 level in patients with stable coronary artery disease and acute coronary syndromes. *Biomed. Pharmacother.* 64, 160–164.

doi:10.1016/j.biopha.2009.09.012.

Zheng, Z., Nayak, L., Wang, W., Arif Yurdagul, A. Y., Wang, X., Cai, B., et al. (2019). An ATF6-tPA pathway in hepatocytes contributes to systemic fibrinolysis and is repressed by DACH1. *Blood* 133, 743–753. doi:10.1182/blood-2018-07-864843.

Zhou, A., Carrell, R. W., and Huntington, J. A. (2001a). The Serpin Inhibitory Mechanism Is Critically Dependent on the Length of the Reactive Center Loop. *J. Biol. Chem.* 276, 27541–27547. doi:10.1074/jbc.M102594200.

Zhou, X., Brakebusch, C., Matthies, H., Oohashi, T., Hirsch, E., Moser, M., et al. (2001b). Neurocan Is Dispensable for Brain Development. *Mol. Cell. Biol.* 21, 5970–5978. doi:10.1128/MCB.21.17.5970.

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

Zimmermann, D. R., and Dours-Zimmermann, M. T. (2008). Extracellular matrix of the central nervous system: From neglect to challenge. *Histochem. Cell Biol.* 130, 635–653. doi:10.1007/s00418-008-0485-9.

Modulation enzymatique des réseaux périneuronaux par la désintégrine et métalloprotéinase à motifs thrombospondines de type 4 (ADAMTS-4) et l'activateur tissulaire du plasminogène (tPA)

Les réseaux périneuronaux (*perineuronal nets*, PNNs) sont des structures de la matrice extracellulaire, qui enveloppent préférentiellement les interneurones exprimant la parvalbumine (PV). Ils régulent l'activité neuronale, protègent contre le stress oxydatif et ferment les périodes critiques du développement. La dégradation des PNNs restaure la plasticité cérébrale et améliore la récupération fonctionnelle dans différentes pathologies cérébrales. Une meilleure compréhension des mécanismes enzymatiques modulant les PNNs peuvent conduire au développement de nouveaux outils thérapeutiques. Nos travaux se sont donc intéressés à deux protéases endogènes pléiotropiques du cerveau. Nous avons tout d'abord étudié l'implication de la désintégrine et métalloprotéinase à motifs thrombospondines de type 4 (ADAMTS-4) dans l'évolution des dommages causés par l'ischémie cérébrale, en lien avec la modulation des PNNs. Dans une seconde partie, nous avons étudié le potentiel rôle de l'activateur tissulaire du plasminogène (tPA), dans la dégradation des PNNs en condition physiologique.

Nous montrons qu'ADAMTS-4 endogène, seule ou couplée à une rééducation intensive, accélère la récupération fonctionnelle après une ischémie cérébrale, sans affecter la structure des PNNs. Nous démontrons également qu'ADAMTS-4 est protecteur dans la phase aiguë de l'ischémie cérébrale, en limitant la progression de l'infarctus. La combinaison de l'immunohistologie, de l'électrophysiologie et de la *single-cell* RT-PCR a permis d'identifier les interneurones PV, comme une source de tPA *in vivo*. Nous observons que les souris spécifiquement déficientes en tPA dans les interneurones PV, présentent des PNNs plus denses, suggérant un rôle du tPA dans le remodelage des PNNs. Des analyses *in vitro* confortent cette hypothèse, en montrant que le tPA convertit le plasminogène en plasmine, qui à son tour, dégrade un des principaux composants des PNNs, l'aggrecan. Dans l'ensemble, ces travaux permettent de mieux caractériser les fonctions de deux protéases endogènes du système nerveux central, en démontrant notamment l'existence d'un nouveau mécanisme de régulation des PNNs.

Mots clés : PNNs, ADAMTS-4, ischémie cérébrale, tPA, plasmine

Enzymatic modulation of perineuronal nets by a disintegrin and metalloproteinase with thrombospondin motifs 4 (ADAMTS-4) and the tissue plasminogen activator (tPA)

Perineuronal nets (PNNs) are extracellular matrix assemblies that preferentially enwrap interneurons expressing parvalbumin (PV). PNNs development and maintenance regulate several processes within the central nervous system, including neuronal activity, neuronal protection from oxidative stress, and closure of developmental critical period plasticity window. Converging evidence indicate that PNNs degradation restores plasticity and improves functional recovery in a variety of neurological disorders. Understanding PNNs enzymatic modulation may be essential for the development of new therapeutic tools. Our work focused on two endogenous proteases with pleiotropic functions in the brain. We first studied the involvement of a disintegrin and metalloproteinase with thrombospondin motifs type 4 (ADAMTS-4) in the evolution of ischemic brain damages and dysfunctions, in relation to PNNs. In a second part, we investigated the potential role of tissue-type plasminogen activator (tPA) in PNNs physiological degradation.

We established that endogenous ADAMTS-4, alone or coupled with intensive rehabilitation, accelerates functional recovery after stroke, without modulating PNNs structure. In addition, we demonstrated that ADAMTS-4 is protective in the acute phase of ischemic stroke, by limiting infarct progression. Combining immunohistology, electrophysiology and single cell RT-PCR PCR allowed identifying PV interneurons as being a source of tPA *in vivo*. We found that mice specifically lacking tPA in PV interneurons display denser PNNs, suggesting that endogenous tPA modulates PNNs structure. *In vitro* analyses supported this hypothesis, and allowed the demonstration that tPA converts plasminogen into active plasmin, which in turn, directly degrades aggrecan, a major chondroitin sulfate proteoglycans contained is PNNs. Overall, this work allows to better characterize two endogenous brain proteases, notably by providing a new physiological mechanism regulating PNNs remodeling.

Key words: PNNs, ADAMTS-4, ischemic stroke, tPA, plasmin