



**HAL**  
open science

**Étude des altérations neuroendocrines dans un nouveau modèle murin d'encéphalite autoimmune à anticorps anti-récepteurs NMDA et étude de l'activateur tissulaire du plasminogène dans le système hypothalamo-hypophysaire**

Caroline Regnaud

► **To cite this version:**

Caroline Regnaud. Étude des altérations neuroendocrines dans un nouveau modèle murin d'encéphalite autoimmune à anticorps anti-récepteurs NMDA et étude de l'activateur tissulaire du plasminogène dans le système hypothalamo-hypophysaire. Médecine humaine et pathologie. Normandie Université, 2022. Français. NNT : 2022NORMC426 . tel-04011236

**HAL Id: tel-04011236**

**<https://theses.hal.science/tel-04011236v1>**

Submitted on 2 Mar 2023

**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 SCIENCES DE LA VIE ET DE LA SANTE**

**Préparée au sein de l'Université de Caen Normandie**

**Etude des altérations neuroendocrines dans un nouveau modèle murin d'encéphalite autoimmune à anticorps anti-récepteurs NMDA et étude de l'activateur tissulaire du plasminogène dans le système hypothalamo-hypophysaire.**

**Présentée et soutenue par  
CAROLINE REGNAULD**

**Thèse soutenue le 14/12/2022  
devant le jury composé de**

MME CAROLE ROVERE	Chargé de recherche HDR, Université côte d'Azur	Rapporteur du jury
MME ODILE VILTART	Maître de conférences, Université de Lille	Rapporteur du jury
M. STEPHANE ALLOUCHE	Professeur des universités PraticienHosp, Université de Caen Normandie	Membre du jury
MME CATHERINE LLORENS-CORTES	Directeur de recherche Emérite, CEA Paris-Saclay	Membre du jury
M. VINCENT PREVOT	Directeur de recherche à l'INSERM, Université de Lille	Membre du jury
M. DENIS VIVIEN	Professeur des universités PraticienHosp, Université de Caen Normandie	Membre du jury
M. ERIC MAUBERT	Maître de conférences, Université de Caen Normandie	Directeur de thèse

**Thèse dirigée par ERIC MAUBERT (Physiopathologie et imagerie des troubles neurologiques)**



UNIVERSITÉ  
CAEN  
NORMANDIE



Normandie de Biologie Intégrative,  
Santé, Environnement

**PhIND**



PHYSIOPATHOLOGY  
& IMAGING OF  
NEUROLOGICAL DISORDERS



## Résumé :

L'hypothalamus est une région cérébrale agissant comme le centre de contrôle et de coordination qui régit l'homéostasie corporelle. Dans cette étude nous nous sommes intéressés à deux aspects fonctionnels de l'hypothalamus, l'homéostasie énergétique et le contrôle de l'équilibre hydrominéral. Dans un premier temps nous avons étudié les perturbations neuroendocrines dans un modèle murin d'encéphalite autoimmune à anticorps anti-RNMDA développé dans notre laboratoire. Dans un second temps nous avons étudié les effets d'une déficience en activateur tissulaire du plasminogène (tPA) sur le contrôle de l'équilibre hydrominéral dans une nouvelle souche déficiente en tPA développée par notre laboratoire (tPA<sup>Null</sup>).

Nous montrons dans le modèle murin d'encéphalite autoimmune anti-RNMDA les premiers éléments révélant la présence du récepteur NMDA tancytaire ; à la fois grâce à une étude par qPCR réalisée sur des populations de tancytes obtenues par tri cellulaire, et sur les tancytes de l'éminence médiane par immunohistofluorescence. L'utilisation des cages métaboliques a permis de mettre en évidence pour la première fois des troubles de la prise alimentaire et de la régulation du métabolisme énergétique chez les animaux EAI-RNMDA.

Nous montrons chez les animaux tPA WT l'expression et la présence de la protéine du tPA dans les populations neuronales vasopressinergiques (AVP) des noyaux paraventriculaire et supraoptique de l'hypothalamus. La protéase est aussi observée dans les terminaisons nerveuses des neurones à AVP projetant dans la neurohypophyse. Une étude métabolique a révélé que les souris tPA<sup>Null</sup> présentent un comportement de polydipsie, une osmolarité plasmatique et urinaire comparables à celles des animaux WT, ainsi qu'une miction normale. Après une privation hydrique entraînant une déshydratation, les animaux tPA<sup>Null</sup> montrent une diminution de l'osmolarité urinaire, une diminution du volume mictionnel et une augmentation de la pression artérielle en comparaison avec les animaux tPA WT.

Mes travaux de thèse apportent de nouveaux éléments quant aux effets physiopathologiques de l'EAI-RNMDA dans le fonctionnement du métabolisme énergétique. Ils ont également confirmé les observations réalisées chez les animaux tPA KO quant à la déficience en tPA et son rôle dans le contrôle de l'équilibre hydrominéral.

Mots clés : encéphalite, métabolisme, hypothalamus, activateur tissulaire du plasminogène, équilibre hydrominéral

## Abstract:

Hypothalamus is a brain region acting as the control and coordination center that regulates body homeostasis. In this study we focused on two functional aspects of the hypothalamus, energy homeostasis and hydromineral balance. First, we studied neuroendocrine disturbances in a mouse model of anti-RNMDA autoimmune encephalitis for which I participated in its development in our laboratory. In a second step, we studied the effects of a deficiency in tissue plasminogen activator on the hydromineral balance in a strain newly developed by our laboratory (tPA<sup>Null</sup>) not expressing this protease.

We show in the mouse model of AIE-NMDAR first evidence of the presence of tancytic NMDA receptor; both through a qPCR study performed on tancyte populations obtained by cell sorting, and on median eminence tancytes by immunohistofluorescence. The use of metabolic cages revealed for the first-time disturbances of food intake and regulation of energy metabolism in AIE-NMDAR animals.

We show in tPA WT animals the expression and presence of the tPA protein in vasopressin neuronal populations (AVP) of the paraventricular and supraoptic nuclei of the hypothalamus. The protease is also observed in the nerve terminals of AVP neurons projecting into the neurohypophysis. A metabolic study reveals polydipsia, physiological plasma and urine osmolarity, and normal urinary behavior in tPA<sup>Null</sup> mice. After water deprivation leading to dehydration, tPA<sup>Null</sup> animals show a decrease in urinary osmolarity, as well as in urine volume and an increase in blood pressure compared to tPA WT animals.

My thesis work provides new insights into the pathophysiological effects of anti-NMDAR autoimmune encephalitis on energy metabolism functions. It also confirmed the observations made in tPA KO animals regarding tPA deficiency and its role in body water balance.

Key words: encephalitis, metabolism, hypothalamus, tissue plasminogen activator, hydromineral balance



## Remerciements

Je souhaite remercier, avec beaucoup de gratitude, les Dr Carole Rovère et Dr Odile Viltart d'avoir accepté d'être les rapporteurs de mon travail de thèse. Votre implication dans la lecture et la correction de mon manuscrit m'ont grandement aidé dans l'amélioration de celui-ci. Merci donc, pour le temps consacré et à l'ensemble de vos remarques, conseils et interrogations. Je remercie chaleureusement le Pr Catherine Llorens-Cortes d'avoir proposé d'être examinatrice de mon travail, et ainsi de faire partie de mon jury.

Merci au Dr Vincent Prevot d'avoir accepté d'être examinateur, mais surtout pour cette collaboration. Je vous remercie de m'avoir accueilli et si bien reçu dans votre laboratoire et dans votre équipe. Vous n'avez donné aucune limite à mon travail et aux projets que je voulais réaliser. J'ai énormément appris au cours de mes deux déplacements à Lille et je suis extrêmement reconnaissante d'avoir eu cette opportunité en tant que doctorante.

Merci au Pr Stéphane Allouche d'avoir accepté de travailler avec moi sur mon second projet et de m'avoir aidé à la compréhension du système vasopressinergique qui n'est pas si simple ... Merci pour toutes les analyses et vos conseils sur les protocoles expérimentaux. Je vous remercie également d'avoir accepté de faire partie de mon jury en tant qu'examinateur.

Je remercie bien entendu le Pr Denis Vivien, de m'avoir accepté et accueilli dans notre laboratoire depuis les stages de licence jusqu'à la fin de mon doctorat. Merci pour ta passion de la science qui fait de ce laboratoire un lieu d'exception pour nous tous.

Je tiens aussi à remercier le Dr Fabian Docagne, de m'avoir accepté pour mes stages de master et de m'avoir confié au Dr Isabelle Wagnon qui a été un très bon mentor. Merci d'avoir cru en moi en me confiant ce projet de thèse.

Merci à mon directeur de thèse, Dr Eric Maubert, de m'avoir encadré durant toute la durée de ma thèse et même plus. Merci d'avoir accepté de prendre totalement en charge mon projet durant cette dernière année. Merci pour ta curiosité et pour tes mille idées qui m'ont poussé à chercher plus loin dans mon travail et à étendre ma vision des choses. Durant cette thèse j'ai beaucoup appris, merci de m'avoir transmis ton expertise et tes connaissances de l'histologie. Merci de m'avoir aidé

et épaulé quand j'étais à Lille, de manière générale merci de m'avoir soutenu quand il y avait besoin.

A huge thanks to Dr Daniela Fernandois, you are such a kind and caring person. You're extremely patient and you really have a gift to teach and mentor people, and you do it right with a lot of rigor. I am very lucky to have work with you while I was in Lille, I, obviously, learned so much! I sincerely wish you the best for your life and career, I believe that you totally deserve it. Thank you so much for all of your time and work you put into my project, it's priceless!

Merci beaucoup à toi aussi, Dr Emilie Caron, à l'image de l'équipe du Dr Vincent Prévot tu es pleine de gentillesse et tu m'as tout de suite mise à l'aise quand je suis arrivée à Lille. Merci de m'avoir appris comment utiliser le système de cages métaboliques mais aussi comment analyser les data. Merci d'avoir été là quand j'avais besoin d'aide, lorsque j'avais des questions et d'avoir partagé tes connaissances avec moi, de m'avoir donné ton avis et tes interprétations.

Je remercie l'ensemble de l'équipe du Dr Vincent Prévot d'avoir été si gentil avec moi, merci pour le temps que chacun d'entre vous a passé avec moi au laboratoire dès que j'avais besoin d'aide pour tout et n'importe quoi, merci de m'avoir chacun transmis vos connaissances et pour tous vos conseils. Et bien sûr merci pour vos invitations j'ai passé de super moments avec vous !

Maintenant je reviens à Caen. Merci à l'ancienne team B pour votre aide et conseils lors de nos réunions. Merci au Dr Isabelle Bardou qui quand « j'étais petite » m'a invité avec grand plaisir à venir à Cyceron et à y rencontrer les doctorants, merci de m'avoir aidé à revenir, tout cela m'a permis d'être là aujourd'hui.

Je tiens aussi à remercier le personnel du laboratoire, merci à Yannick d'avoir été à l'écoute, à Laurent, Jean-Michel qui rend notre vie au laboratoire beaucoup plus simple ! Merci aussi à Sandrine et à Manue.

Merci aussi à toute l'équipe, aux doctorants et post-doctorants, restez soudés etentraidez-vous c'est vraiment super ne changez rien !

Merci à ma promo, Jonathane merci pour ton aide aux manips et en ta grande aide en général, merci de venir dans notre bureau prendre des nouvelles et nous faire tous rire ! Merci à Célia de m'avoir écouté et soutenu. Merci à Fatima, l'alien mais qu'on aime bien donc on l'accepte dans notre

groupe, merci de m'avoir changé les idées avec tes questions sur la mode, le maquillage ... Et de m'avoir remonté le moral quand j'en avais besoin, merci pour les pauses café et les weekend seules au labo ! Merci aux filles du bureau de m'avoir tout autant soutenu et d'avoir été là pour moi. Léonie merci pour tes discussions cheval, tes histoires et tes anecdotes qui me font bien rire, merci pour les soirées chez toi qui viennent à point pour décompresser ! Charlène merci de m'avoir supporté comme voisine de bureau et de m'avoir laissé te charrier de temps en temps, merci pour ton aide avec l'imagerie ! Un énorme merci à Amandine, qui a dû se coltiner la correction d'une thèse (sans reconnaissance !) même si tu n'en as pas l'impression ça m'a beaucoup aidé, même pour mes futurs écrits. Merci à toi aussi de m'avoir soutenu et encouragé. Merci à Hélène qui est la personne la plus étrange au monde puisqu'elle apprécie que je sois méchante avec elle ... Zita, merci à toi aussi tu es une personne très à l'écoute et c'est agréable, tu essayes toujours de m'aider dès que j'avais un souci, merci beaucoup et bon courage pour la fin de ta thèse ! Donc merci à vous les filles vous m'avez toutes vraiment aidé à passer ce cap de la thèse, et à me donner confiance en moi !

Merci maintenant à ma famille, merci à mes frères Philippe et Jean-François, de m'avoir aidé quand j'en avais besoin, et d'avoir égayé les réunions de famille ! Merci à mes sœurs Gwendolyn, ma grande sœur qui m'a toujours poussé même quand tu me rendais folle, merci de m'avoir transmis l'amour des chevaux et d'avoir passé tous ces moments de pur bonheur ensemble ! Merci d'être ma grande sœur et de m'avoir changé les idées et accueilli chez toi, dans ta maison si tranquille et apaisante ... Merci à toi Clémentine, ma petite sœur, même si tu ne comprends pas tout, tu essayes toujours de me remonter le moral, je trouve ça trop mignon que tu me vois comme un génie (mais c'est pas du tout le cas !). Merci pour tous tes petits cadeaux (même si ça m'énerve !), merci de me faire rire et de partager l'amour du jeu vidéo avec moi et de tout le reste ...

I also want to thank you Karen, you might read this in a while but thank you for always helping Justin and I, being so supportive of my work and believing in me. Thank you for trusting me with your son that I took away from you, I promise I'll bring him back! Anyway, don't change and keep caring about people, it'll always make a change.

Now to you, Justin, there isn't enough of these pages to say everything I have to say about you. So, I'll try to keep it short. You know already what I think about you and what you represent to me. This would have never happened without you, you gave me your love and your sacrifice, for me to



continue what I'm about to finish, this huge milestone that will take us to the next part of our life. I couldn't thank you enough for what you did, for what you're doing, every single day to make it easier for me, to make it possible. You've always believed in me, you had this unbreakable confidence that I will make it whatever happen, and every time you'll tell me the same things just so I can feel better about myself. I know one hundred percent you will always be by my side defending me and pushing me to my best, always putting me first, and I know very soon I'll be able to do the same for you, to carry you where you want to be. I love you.

Je finis avec mes parents, ma mère, mon père, vous avez tous les deux nourris ma curiosité et mon ambition depuis que je suis toute petite. Pas de places aux doutes avec vous, je pouvais tout faire et être tout ce que je voulais. Vous avez voulu me donner tout ce que n'importe qui rêverai d'avoir, bien au-delà du matériel. Vous m'avez aidé à braver toutes ces personnes qui m'ont rabaissé et tiré vers le bas. Maman, merci d'être qui tu es et de continuer à faire ce que tu fais, à m'aimer autant et à croire en moi et en tout ce que je fais. Papa, merci pour tous tes conseils, tout ton soutien, merci d'avoir autant de confiance en moi, de ne jamais douter. Merci à vous deux de m'avoir inspiré et fait rêver, aujourd'hui je vie une grande aventure, et j'espère bien d'autres à venir. Merci à vous d'avoir toujours décroché le téléphone et d'avoir pris le temps de m'écouter, et parfois de m'entendre me plaindre ... Merci mille fois, ce travail est aussi pour vous, and for you too Justin.

# Table des matières

<b>CHAPITRE 1</b> .....	
<b>Introduction</b> .....	
<b>I Généralités sur la pathologie de l'encéphalite autoimmune à anticorps anti-récepteur N-Méthyl-D-Aspartate</b> .....	<b>1</b>
<b>1 Les pathologies autoimmunes</b> .....	<b>1</b>
1.1 Le système immunitaire, généralités .....	1
1.2 La tolérance immunitaire.....	5
1.3 Les failles de la tolérance immunitaires : dérive vers l'autoimmunité .....	6
<b>2 L'encéphalite autoimmune à anticorps anti-récepteur N-Méthyl-D-Aspartate</b> .....	<b>7</b>
2.1 Épidémiologie de l'Encéphalite anti-récepteur NMDA .....	7
2.1.1 Distribution de la pathologie au sein des populations.....	7
2.1.2 Étiologie de la pathologie .....	8
2.2 Symptomatologie et évolution clinique de l'EAI-RNMDA .....	10
2.2.1 Tableau clinique de la pathologie .....	10
2.2.2 Cas de troubles du comportement alimentaire dans l'EAI-RNMDA.....	14
2.3 Stratégies de diagnostic de l'EAI-RNMDA .....	15
2.3.1 Diagnostic clinique .....	15
2.3.2 Examens complémentaires déterminant au diagnostic .....	16
2.3.3 Recherche d'autoanticorps anti-RNMDA.....	19
2.4 Prise en charge thérapeutique de l'EAI-RNMDA .....	21
2.4.1 Les immunothérapies.....	22
2.4.2 Traitement des symptômes psychiatriques .....	23
<b>3 Physiopathologie de l'encéphalite autoimmune à anticorps anti-récepteurs NMDA</b> .....	<b>24</b>
3.1 Les récepteurs glutamatergiques .....	24
3.1.1 Récepteurs glutamatergiques métabotropiques.....	25
3.1.2 Récepteurs glutamatergiques ionotropiques .....	25
3.2 Le récepteur NMDA.....	26
3.2.1 Structure et activation du récepteur NMDA .....	26
3.2.2 Distribution et physiologie du récepteur NMDA.....	30
3.2.2.1 Distribution du récepteur NMDA au sein du système nerveux et de la périphérie .....	30
3.2.2.2 Physiologie du récepteur NMDA selon sa composition en sous-unités fonctionnelles .....	31
3.3 Autoanticorps anti-récepteur NMDA .....	32
3.3.1 Épitopes cibles des autoanticorps sur le récepteur NMDA.....	32

3.3.2	Conséquences médiées par l'interaction autoanticorps/RNMDA.....	33
3.3.2.1	Une activité perturbée allant jusqu'à la diminution des récepteurs NMDA synaptiques ...	33
3.3.2.2	L'importance du récepteur EphB2 synaptique .....	34
<b>II</b>	<b>Les modèles murins d'encéphalite autoimmune à anticorps anti-récepteur NMDA.....</b>	<b>36</b>
<b>1</b>	<b>Modèles murins par immunisation active .....</b>	<b>36</b>
1.1	Modèle de Pan et collaborateurs .....	36
1.2	Modèle de Jones et collaborateurs.....	40
1.3	Modèle de Ding et collaborateurs .....	43
<b>2</b>	<b>Modèles murins par injection d'anticorps .....</b>	<b>47</b>
2.1	Modèle de Planagumà et collaborateurs.....	47
2.2	Modèle de Wright et collaborateurs .....	52
2.3	Modèle de Malviya et collaborateurs .....	55
<b>III</b>	<b>La prise alimentaire.....</b>	<b>58</b>
<b>1</b>	<b>Régulation de la prise alimentaire par le système nerveux central.....</b>	<b>58</b>
1.1	L'homéostasie énergétique : généralités .....	58
1.2	Les neurones orexigènes et anorexigènes du noyau arqué hypothalamique.....	62
<b>2</b>	<b>L'éminence médiane, un organe circumventriculaire.....</b>	<b>68</b>
2.1	Localisation et anatomie de l'éminence médiane .....	68
2.2	Lit capillaire fenêtré de l'EM .....	70
<b>3</b>	<b>Échanges sang – neurones hypothalamiques, orchestrés par les tanocytes.....</b>	<b>72</b>
3.1	Les tanocytes, des cellules épendymaires hautement spécialisées .....	72
3.2	Les barrières sang/CSF et BHE de l'hypothalamus médiobasal .....	77
<b>4</b>	<b>Les transmissions d'informations par les tanocytes .....</b>	<b>85</b>
4.1	Transports d'hormones.....	85
4.2	Récepteurs métaboliques .....	87
4.3	Contrôle neuroendocrine .....	87
<b>5</b>	<b>Les déséquilibres de la prise alimentaire et leurs conséquences sur l'hypothalamus médiobasal</b>	<b>89</b>
5.1	Le jeûne.....	90
5.2	Régime riche en graisse et hyperphagie .....	93
	<b>Objectifs .....</b>	<b>97</b>
	<b>Matériels et Méthodes .....</b>	<b>103</b>
	<b>Résultats .....</b>	<b>117</b>
	<b>Discussion .....</b>	<b>165</b>
	<b>CHAPITRE 2.....</b>	<b>.....</b>

<b>Introduction .....</b>	<b>.....</b>
<b>I L'activateur tissulaire du plasminogène .....</b>	<b>186</b>
<b>1 Historique.....</b>	<b>186</b>
<b>2 Principales données biologiques.....</b>	<b>187</b>
<b>3 Expression du tPA.....</b>	<b>190</b>
3.1 Dans le système nerveux central .....	190
3.2 Dans la circulation sanguine.....	193
3.3 Dans les organes périphériques .....	194
<b>4 Les inhibiteurs du tPA .....</b>	<b>194</b>
4.1 PAI-1 .....	195
4.2 La neuroserpine .....	195
4.3 La protéase nexine-1 .....	195
<b>5 Implications physiologiques du tPA dans l'organisme.....</b>	<b>196</b>
5.1 Dans le compartiment vasculaire .....	196
5.1.1 Action protéolytique du tPA : la fibrinolyse.....	196
5.1.2 tPA et barrière hémato-encéphalique.....	197
5.2 Dans le système nerveux central .....	199
5.2.1 tPA et transmission glutamatergique .....	199
5.2.2 tPA et plasticité synaptique.....	201
5.2.3 tPA et cognition .....	203
5.2.4 tPA et neurodéveloppement.....	205
5.2.5 tPA et apoptose .....	208
5.2.6 tPA et sécrétions neuroendocrines .....	209
<b>6 Les modèles déficients en tPA utilisés dans le cadre de mes travaux de recherche. ....</b>	<b>218</b>
6.1 Les souris tPA KO du Pr. P. Carmeliet .....	218
6.2 tPA Null .....	222
<b>II AVP et équilibre hydrominéral .....</b>	<b>223</b>
<b>1 La vasopressine.....</b>	<b>223</b>
1.1 Structure et synthèse.....	223
1.2 La libération de la vasopressine dans la neurohypophyse .....	227
1.2.1 Hyperosmolarité .....	227
1.2.2 Hypovolémie .....	229
1.3 Cibles de la vasopressine.....	229
1.3.1 Cellules musculaires lisses.....	230
1.3.2 Rein.....	230
1.4 Activité anti-diurétique de la vasopressine.....	231
1.4.1 Régulation de la réabsorption de l'eau.....	231

1.4.2	Contrôle des flux de sodium et d'urée .....	232
<b>2</b>	<b>Le Système Rénine-Angiotensine .....</b>	<b>234</b>
2.1	Fonction.....	234
2.2	Mécanismes.....	234
	<b>Objectifs .....</b>	<b>239</b>
	<b>Matériels et Méthodes .....</b>	<b>245</b>
	<b>Résultats .....</b>	<b>255</b>
	<b>Discussion .....</b>	<b>285</b>
	<b>Conclusion.....</b>	<b>299</b>
	<b>Autres travaux .....</b>	<b>303</b>
	<b>Bibliographie.....</b>	<b>345</b>

## Index des figures

<i>Figure 1 : La réponse immunitaire en trois actes : l'immunité innée, le système d'élimination et l'immunité adaptative.</i>	3
<i>Figure 2 : Schéma présentatif du développement des pathologies autoimmunes.</i>	6
<i>Figure 3 : Apparition de l'EAI-RNMDA en fonction de l'âge et du sexe (633 patients inclus).</i>	8
<i>Figure 4 : Schéma proposé par Dalmau et ses coll. en 2017 présentant des « déclencheurs » de l'EAI-RNMDA et une modélisation de l'activation des lymphocytes B.</i>	10
<i>Figure 5: Évolution clinique des symptômes et du statut mental des patients dans l'encéphalite autoimmune à anticorps anti-RNMDA au cours du temps.</i>	11
<i>Figure 6 : Représentation du pourcentage de patients EAI-RNMDA atteints de différents types de symptômes en fonction de l'âge.</i>	13
<i>Figure 7 : Distribution des patientes atteintes d'EAI-RNMDA par âge et par présence ou non de tumeur.</i>	18
<i>Figure 8 : Fréquence des examens diagnostiques pratiqués communément et leurs résultats chez des patients atteints d'EAI-RNMDA.</i>	19
<i>Figure 9 : Protocole d'immunofluorescence réalisé sur des cellules HEK-293 transfectées afin de tester la présence d'anticorps anti-RNMDA dans le CSF et le sérum d'un patient atteint d'EAI à anticorps anti-RNMDA.</i>	21
<i>Figure 10 : Algorithme proposé par Dalmau et coll. (2011), pour le traitement de l'encéphalite anti-RNMDA.</i>	23
<i>Figure 11 : Structure et activation du récepteur NMDA post-synaptique</i>	28
<i>Figure 12 : Schéma représentant le profil développemental de l'expression des sous-unités GluN2 et GluN3 dans le cerveau de souris à la naissance P0, à 2 semaines postnatales P14 et à l'âge adulte.</i>	31
<i>Figure 13 : Effets des anticorps de patients atteints d'EAI-RNMDA sur l'hippocampe de souris.</i>	34
<i>Figure 14 : Mise en évidence de la perméabilité de la BHE chez des souris ApoE.</i>	37
<i>Figure 15 : Plan expérimental.</i>	38
<i>Figure 16 : Identification des peptides et recherche des anticorps dans le sérum des animaux.</i>	38
<i>Figure 17 : Effets de MK-801 chez les animaux ApoE<sup>-/-</sup> et ApoE<sup>+/+</sup> après immunisation par les peptides GluN1 ou ovalbumines.</i>	39

<i>Figure 18 : Phénotype clinique des animaux traités avec les protéoliposomes.</i>	41
<i>Figure 19 : Evaluation comportementale des animaux 35 jours après traitement par protéoliposome ou liposome.</i>	42
<i>Figure 20 : Détection des anticorps sériques spécifique au récepteur NMDA.</i>	43
<i>Figure 21 : Caractérisation des autoanticorps du CSF de souris immunisées avec des peptides de la sous unité GluN1.</i>	44
<i>Figure 22 : Changements comportementaux des souris 12 semaines après l'immunisation avec le peptide GluN1<sub>356-385</sub>.</i>	45
<i>Figure 23 : Analyse de l'épitope des autoanticorps GluN1<sub>356-385</sub>.</i>	46
<i>Figure 24 : Chronologie expérimentale, programme des tests cognitifs et mise à mort des animaux.</i>	48
<i>Figure 25 : L'infusion de CSF de patients contenant des auto-anticorps anti-RNMDA entraîne des déficits de mémoire, une anhédonie et un comportement de type dépressif.</i>	50
<i>Figure 26 : L'infusion de CSF de patients contenant des anticorps RNMDA ne modifie pas les tests d'anxiété, d'agressivité et d'activité locomotrice.</i>	51
<i>Figure 27 : Les IgG humaines extraites du cerveau de souris injectées avec le CSF de patients EAI-RNMDA sont spécifiques des RNMDA.</i>	52
<i>Figure 28 : Effets épileptogènes d'une injection unique d'anticorps anti-RNMDA.</i>	54
<i>Figure 29 : Détection des IgG humaines fixées.</i>	55
<i>Figure 30 : Le RhuMab SSM5 induit de graves déficits de mémoire chez la souris.</i>	56
<i>Figure 31 : RhuMab SSM5 diminue la densité des RNMDA synaptiques dans l'hippocampe de souris après perfusion intraventriculaire.</i>	57
<i>Figure 32 : Schéma représentatif de la régulation à court terme de la prise alimentaire.</i>	60
<i>Figure 33 : Représentation schématique des noyaux hypothalamiques et de la distribution des tanocytes sur la paroi du troisième ventricule (III-V).</i>	62
<i>Figure 34 : Régulation de la prise alimentaire centralisée par le noyau arqué (hypothalamus ventromédian postérieur)</i>	65
<i>Figure 35 : Structure de l'éminence médiane et présentation des différents types cellulaires qui la compose.</i>	69

<b>Figure 36 : Micrographie électronique à transmission d'un large vaisseau porte dans l'éminence médiane de rat.</b>	71
<b>Figure 37 : Organisation protéique du diaphragme d'une fenestration de la membrane cellulaire abluminal endothéliale.</b>	72
<b>Figure 38 : Classification des tanycytes le long du troisième ventricule en fonction des sous populations, de leur morphologie et leur expression génique.</b>	74
<b>Figure 39 : Classification des sous-populations tanycytaires.</b>	76
<b>Figure 40 : Schéma représentant la distribution des protéines constitutives des jonctions serrées dans la région tubérale de l'hypothalamus.</b>	78
<b>Figure 41 : Représentation schématique des types cellulaires composant l'unité neurovasculaire.</b>	79
<b>Figure 42 : Structure et composition moléculaire des jonctions serrées.</b>	80
<b>Figure 43 : Organisation de l'interface sang-noyau arqué de l'hypothalamus médiobasal de l'hypothalamus médiobasal.</b>	83
<b>Figure 44 : Immunomarquage du récepteur NMDA au pôle apical des tanycytes EM.</b>	84
<b>Figure 45 : Transport de la leptine depuis la périphérie vers le CSF via l'éminence médiane pour atteindre les cibles des aires hypothalamiques et non hypothalamiques en bordure du 3<sup>e</sup> ventricule.</b>	86
<b>Figure 46 : Représentation schématique des interactions coordonnées cellules gliales-endothéliales-neurales régulant l'accès direct des terminaisons neurosécrétrices de la GnRH à l'espace péri-capillaire dans la zone externe de l'EM.</b>	88
<b>Figure 47 : Le jeûne induit la fenestration des capillaires du noyau arqué ventromédian en réponse au VEGF-A exprimé par les tanycytes vmARH.</b>	91
<b>Figure 48 : Effets du régime riche en gras sur les neurones de premier ordre qui contrôlent le comportement alimentaire</b>	95
<b>Figure 49 : Distribution de la sous-unité GluN1 du RNMDA et des tanycytes du 3<sup>e</sup> ventricule dans la région hypothalamique médiobasale.</b>	141
<b>Figure 50 : Les sous-unités GluN1 sont localisées à proximité des complexes de jonctions serrées organisés en barrière exprimés par les tanycytes chez des animaux de type sauvages.</b>	142



<i>Figure 51 : Les tanocytes expriment les sous-unités GluN1, GluN2A, GluN2B et GluN3A du récepteur NMDA chez des souris de type sauvages.</i>	144
<i>Figure 52 : Les populations tanocytaires de souris C57BL/6J expriment majoritairement les sous unités GluN1 et GluN3A du récepteur NMDA en condition basale.</i>	145
<i>Figure 53 : L'hybridation in situ des ARN messager de GluN1, Grin1, ne révèle pas son expression dans les corps cellulaires des tanocytes.</i>	146
<i>Figure 54 : Les animaux EA présentent une perte de masse corporelle à la suite de l'immunisation et possèdent une proportion de masse grasse significativement plus faible comparé aux animaux Sham.</i>	148
<i>Figure 55 : Les animaux EA présentent une prise alimentaire plus faible que leur contrôle sham 2 semaines post-immunisation.</i>	150
<i>Figure 56 : La température corporelle des animaux EA et Sham diminue à deux semaines post-immunisation.</i>	151
<i>Figure 57 : Les animaux EA présentent, lors du jeûne, une utilisation des ressources énergétiques différente des animaux contrôles</i>	154
<i>Figure 58 : Les animaux EA perdent en masse pondéral après la phase de jeûne lors de la réalimentation contrairement aux animaux contrôles Sham.</i>	156
<i>Figure 59 : L'expression des sous-unités du RNMDA, des marqueurs du jeûne et des neuropeptides restent inchangée entre les animaux Sham et EA selon l'état métabolique des animaux.</i>	158
<i>Figure 60 : L'encéphalite murine n'induit pas de réorganisation de la barrière tanocytaire EM et vmARH.</i>	161
<i>Figure 61 : L'encéphalite murine EAI-RNMDA n'affecte pas la régulation de l'expression des gènes Grin1 et NPY des neurones NPY/AgRP.</i>	163
<i>Figure 62 : Excitabilité des tanocytes en culture chargés en Fura-2 à la suite d'une stimulation par différentes concentrations de NMDA (0, 25, 50 et 100 <math>\mu</math>m) observée par microscopie calcique.</i>	176
<i>Figure 63 : Altérations dans l'utilisation relative des glucides, des lipides et des protéines chez les souris sepsis induit par le LPS. D'après Irahara et al., 2018.</i>	178
<i>Figure 64 : Structure et fonctions du tPA.</i>	190
<i>Figure 65 : Expression du tPA au sein de différents types cellulaires du SNC de la souris adulte.</i>	191
<i>Figure 66 : Présence du tPA dans des vésicules à cœur denses (DCV) au sein des épines dendritiques.</i>	192

<i>Figure 67 : Mécanisme d'action de la fibrinolyse.</i>	197
<i>Figure 68 : L'interaction du tPA avec le récepteur NMDA potentialise l'entrée du calcium et la mort excitotoxique.</i>	200
<i>Figure 69 : Expression du tPA dans la potentialisation à long terme.</i>	202
<i>Figure 70 : La délétion conditionnelle du tPA dans l'hippocampe (cKO-DG) entraîne une hyperactivité locomotrice et des déficits cognitifs spatiaux modérés.</i>	205
<i>Figure 71 : Implication du tPA sur la migration neuronale lors de la corticogenèse.</i>	207
<i>Figure 72 : Distributions des immunomarquages anti-tPA, -AVP et -GFAP dans le système hypothalamo-neurohypophysaire du rat.</i>	212
<i>Figure 73 : Changements des niveaux de protéines de l'AVP-neurophysine (A), de l'activité du tPA et de l'uPA (B) et des taux d'ARNm codants le tPA dans le SON et la NH après une semaine de charge en sels (salt loading).</i>	214
<i>Figure 74 : Principaux résultats d'Imamura et collaborateurs en faveur d'un rôle majeur du tPA neurohypophysaire dans la sécrétion d'AVP.</i>	216
<i>Figure 75 : Stratégie d'invalidation du gène PLAT de la protéase tPA dans le modèle de tPA KO.</i>	219
<i>Figure 76 : Représentation des gènes différemment exprimés autour de PLAT et indépendamment de la délétion du gène dans le cerveau de souris congéniques (« Melbourne » et « Michigan », souches issues des tPA KO du Pr P. Carmeliet) ou isogénique (« Bethesda », souche générée par l'équipe de Sazbo).</i>	221
<i>Figure 77 : Génération des souris tPA<sup>Null</sup> et des souris tPA flox correspondantes.</i>	222
<i>Figure 78 : Le gène de l'arginine vasopressine et la maturation de la prepro AVP.</i>	224
<i>Figure 79 : Maturation de la PréproAVP dans les neurones magnocellulaires et parvocellulaires de l'hypothalamus.</i>	226
<i>Figure 80 : Anticipation de la soif et contrôle central de la volémie.</i>	228
<i>Figure 81 : Actions de la vasopressine sur le tube collecteur responsable de la réabsorption de l'eau par le rein.</i>	233
<i>Figure 82 : Le système rénine-angiotensine (SRA) est fortement impliqué dans le maintien de l'équilibre sodique et hydrique.</i>	236

<i>Figure 83 : L'arginine-vasopressine et le tPA sont co-déTECTés dans l'axe vasopressinergique hypothalamo-hypophysaire des souris tPA WT.</i>	260
<i>Figure 84 : Le tPA<sup>555</sup> injecté dans la circulation sanguine se retrouve dans l'adénohypophyse et la neurohypophyse grâce aux capillaires fenêtrés.</i>	262
<i>Figure 85 : Le tPA et la vasopressine sont localisés le long des axones des neurones à AVP dans la couche interne de l'éminence médiane et dans les terminaisons neuronales de la neurohypophyse chez des animaux tPA WT.</i>	265
<i>Figure 86 : Les ARNm codants pour le tPA sont exprimés par les neurones à vasopressine dans les noyaux paraventriculaires et supraoptiques de l'hypothalamus (PVN et SON) de souris sauvages.</i>	267
<i>Figure 87 : La déficience en tPA entraîne une polydipsie chez les souris tPA<sup>Null</sup>.</i>	270
<i>Figure 88 : L'osmolarité plasmatique et urinaire est similaire en condition contrôle entre les souris WT et tPA<sup>Null</sup>.</i>	272
<i>Figure 89 : Les animaux tPA<sup>Null</sup> présentent un volume par miction plus important que les animaux tPA WT</i>	273
<i>Figure 90 : Les souris tPA<sup>Null</sup> (rouge) présentent une osmolarité urinaire plus faible que les souris WT (blanc) après 24h de privation hydrique.</i>	276
<i>Figure 91 : Les souris tPA<sup>Null</sup> (rouge) ont un volume urinaire plus faible par rapport aux souris WT (blanc) après 24h de privation hydrique.</i>	278
<i>Figure 92 : Les animaux tPANull perdent significativement moins de poids que les animaux WT après 24h de privation hydrique.</i>	279
<i>Figure 93 : La privation hydrique provoque une augmentation de la pression artérielle chez les souris tPA<sup>Null</sup> (rouge) par rapport aux souris WT (blanc).</i>	281
<i>Figure 94 : Détection des ARNm codants le tPA dans les parois du 3<sup>e</sup> ventricule</i>	283
<i>Figure 95 : Coupes adjacentes traitées en hybridation in situ illustrant la distribution des ARNm codants le tPA dans les trois lobes de l'hypophyse à faible (A) ou fort grossissement (B).</i>	284
<i>Figure 96 : Système rénine-angiotensine responsable du maintien de l'équilibre hydrique et sodique.</i>	295

## Index des tableaux

<i>Tableau 1 : Liste des anticorps d'immunohistologie.</i>	107
--	-----





## Liste des abréviations

<b>ADH</b> : <i>Hormone Anti Diurétique</i>	<b>ECT</b> <i>Electroconvulsivothérapie</i>
<b>AgRP</b> : <i>Peptide Lié à l'Agouti</i>	<b>EEG</b> : <i>Electroencéphalogramme</i>
<b>AHNNH</b> : <i>Axe Hypothalamo-Neurohypophysaire</i>	<b>EGF</b> : <i>Fcateur de Croissance Epidermique</i>
<b>AMPc</b> : <i>Adénosine Monophosphate cyclique</i>	<b>ELISA</b> : <i>Technique d'ImmunoAbsorption par Enzyme Liée</i>
<b>AP</b> : <i>Area Postrema</i>	<b>EM</b> : <i>Eminence Médiane</i>
<b>APC</b> : <i>Cellule Présentatrice de l'Antigène</i>	<b>EphB2R</b> : <i>Récepteur à l'Ephrine B2</i>
<b>ApoE</b> : <i>Apolipoprotéine E</i>	<b>FLAIR</b> : <i>Suppression des Fluides par Inversion Récupération</i>
<b>ARH</b> : <i>Noyau Arqué Hypothalamique</i>	<b>FSH</b> : <i>Hormone Folliculo Stimulante</i>
<b>AT1-2</b> : <i>Récepteur de l'Angiotensine de type 1 et 2</i>	<b>GABA</b> : <i>Acide Gamma-Aminobutyrique</i>
<b>ATD</b> : <i>Domaine Amino-Terminal</i>	<b>GK</b> : <i>Glucokinase</i>
<b>AVC</b> : <i>Accident Vasculaire Cérébral</i>	<b>GLUT2</b> : <i>Transporteur du Glucose 2</i>
<b>BAT</b> : <i>Tissu Adipeux Brun</i>	<b>GnRH</b> : <i>Hormone Gonadolibérine</i>
<b>BCR</b> <i>Récepteur des Lymphocytes B</i>	<b>HEK</b> : <i>Cellules Humaines Rénales Embryonnaires</i>
<b>BHE</b> : <i>Barrière Hémato-Encéphalique</i>	<b>HFD</b> : <i>Régime riche en graisse</i>
<b>BNST</b> : <i>Noyau du Lit de la Stria Terminalis</i>	<b>HSV-1</b> : <i>Virus de l'Herpès Simplex 1</i>
<b>CFA</b> <i>Adjuvant Complet de Freund</i>	<b>Ig</b> : <i>Immunoglobuline</i>
<b>CMH</b> : <i>Complexe Majeur d'Histocompatibilité</i>	<b>IgG</b> <i>Immunoglobuline G</i>
<b>CSF</b> : <i>Liquide Cérébrospinal</i>	<b>IgM</b> : <i>Immunoglobuline M</i>
<b>CTD</b> : <i>Domaine Carboxy-terminal</i>	<b>IP-3</b> : <i>Inositol Triphosphate</i>
<b>CVO</b> : <i>Organe Circumventriculaire</i>	<b>IRM</b> : <i>Imagerie par Résonance Magnétique</i>
<b>DAG</b> : <i>Diacylglycérol</i>	<b>JAM</b> : <i>Molécules d'Adhésions Fonctionnelles</i>
<b>DCs</b> : <i>Cellules Dendritiques</i>	<b>JG</b> : <i>Cellule Juxtaglomérulaire</i>
<b>DCV</b> : <i>Vésicule à Coeur Dense</i>	<b>LBD</b> : <i>Domaine de Liaison au Ligand</i>
<b>dmARH</b> : <i>Noyau Arqué Dorsomédian</i>	<b>LBS</b> : <i>Domaine de Liaison à la Lysine</i>
<b>DMH</b> : <i>Noyau Dorsomédian Hypothalamique</i>	<b>LH</b> : <i>Hormone Lutéinisante, Noyau Latéral Hypothalamique</i>
<b>EAI-RNMDA</b> : <i>Encephalite Autoimmune à anticorps anti-récepteur N-méthyl-D-aspartate</i>	<b>LTD</b> : <i>Dépression à Long Terme</i>
<b>ECF</b> : <i>Espace Extra Cellulaire</i>	<b>LTP</b> : <i>Potentialisation à Long Terme</i>

**MC3/4R** Récepteurs Mélanocortine 3 et 4

**MEC** : Matrice Extra Cellulaire

**MMP** : Métalloprotéines Matricielles

**NK-T** : Lymphocytes T Natural Killer

**NPY** : Neuropeptide Y

**OVL** : Organe Vasculaire de la Lame Terminale, : Organe Vasculaire de la Lame Basale

**PA** : Prise Alimentaire

**PAI** : Inhibiteur de l'Activateur du Plasminogène

**PDGF-CC** : Facteur de Croissance Plaquettaire

**PKC** : Protéine Kinase C

**PLVAP** : Protéine Associée aux Vésicules du Plasmalemme

**POMC** : Proopiomélanocortine, Proopiomélanocortine

**PTZ** : Pentylentétrazol

**PVN** : Noyau Paraventriculaire Hypothalamique

**PYY** : Peptide YY

**RNMDA** : Récepteur de type N-Méthyl-D-Aspartate

**RNMDA1** : Sous-unité GluN1 du récepteur NMDA

**sc-tPA** : tPA Simple Chaîne

**SFO** : Organe Subfornical, : Organe Subfornical

**SNC** : Système Nerveux Central, : Système Nerveux Central

**SNP** Système nerveux Périphérique

**SRA** : Système Rénine Angiotensine

**SVP** : Système Vasopressinergique

**TC** : Tube Collecteur Rénal

**TCA** : Trouble du Comportement Alimentaire

**TCR** : Récepteur des Lymphocytes T

**tc-tPA** : tPA Double Chaîne

**TMD** : Domaine Transmembranaire

**TNF** : Facteur de Nécrose Tumoral

**tPA** : Activateur tissulaire du Plasminogène

**TRPV** : Canal Cationique à Potentiel de Réception Transitoire de type V

**UT** : Transporteur de l'Urée

**V1a V1b et V2-R** : Récepteur à l'AVP 1a, 1b et 2

**VEGF** : Facteur de Croissance Endothélial Vasculaire

**VEGFR** : Récepteur au VEGF

**vmARH** : Noyau Arqué Ventromédian

**VMH** : Noyau Ventromédian Hypothalamique

**WAT** : Tissue Adipeux Blanc

**Y1/5** : Récepteur au NPY 1 et 5

**ZO** : Zonula Occludens

**α-MSH** : Hormone Mélanostimulante

## Avant-propos

Mes travaux de thèse ont été réalisés sous la direction du Docteur Éric Maubert au sein de l'unité INSERM U1237 « *Physiopathology and Imaging of Neurological Disorders* » (PhIND) (Caen, France) dirigée par le Pr Denis Vivien. J'ai par ailleurs eu la chance de pouvoir effectuer une grande partie de mes travaux en collaboration avec l'équipe du Dr Vincent Prevot « Développement et plasticité du cerveau neuroendocrine » de l'unité INSERM U1172 « Lille Neurosciences & Cognition » (Lille, France) dirigée par le Dr Luc Buée.

Notre unité de recherche cible ses travaux autour des sérines protéases, plus spécifiquement sur l'activateur tissulaire du plasminogène ou tPA. Cette protéase est reconnue pour sa fonction fibrinolytique et constitue le seul traitement pharmacologique disponible pour la prise en charge des accidents vasculaires cérébraux ischémiques. Le tPA est exprimé par les cellules endothéliales du système vasculaire. Cependant, il est aussi synthétisé dans le système nerveux central où il est impliqué dans de nombreuses fonctions physiologiques et physiopathologiques. Certaines de ces fonctions sont régulées par l'intermédiaire de la signalisation du récepteur N-Méthyl-D-Aspartate exprimé par différentes populations cellulaires cérébrales. L'équipe du Dr Prevot étudie, quant à elle, les rôles joués par certaines populations neuronales hypothalamiques dans le contrôle du métabolisme et de la reproduction.

Mes travaux de thèse se divisent en deux parties dont la première a consisté à mettre en évidence l'expression du récepteur NMDA à la surface des tanocytes responsables de la barrière sang/CSF. Puis, après le développement d'un modèle murin d'encéphalite autoimmune anti-récepteurs NMDA, nous avons recherché l'existence de troubles métaboliques, notamment au niveau de la balance énergétique et de la prise alimentaire, impliquant les tanocytes. La seconde



partie de mes travaux de recherche a consisté en l'étude du tPA et de ses implications dans l'axe hypothalamo-neurohypophysaire. Nous nous sommes focalisés sur l'expression du tPA dans les neurones magnocellulaires vasopressinergiques et avons étudié les conséquences d'une délétion du gène codant le tPA sur l'équilibre hydrominéral à partir d'un nouveau modèle de souris transgéniques déficientes en tPA, les tPA<sup>Null</sup>.

Ma première introduction se décline en plusieurs chapitres présentant la pathologie d'encéphalite autoimmune à anticorps anti-récepteurs NMDA, la régulation de l'équilibre énergétique et enfin la prise alimentaire.

Dans une seconde introduction, le premier chapitre traitera du tPA et de ses différentes fonctions au sein du SNC avec un intérêt particulier concernant l'implication du tPA dans le contrôle des fonctions neuroendocrines. Le chapitre 2 présentera l'équilibre hydrominérale et sa régulation par la vasopressine et le système rénine-angiotensine.

## Aparté

Mon projet de thèse a débuté en octobre 2019 au sein de l'équipe « Sérines Protéases, neuroInflammation et cellules Gliales » SPrInG anciennement affiliée à l'unité U1237 dirigée par le Docteur Fabian Docagne. Ce projet était sous la direction du Dr Docagne et la codirection du Dr Maubert en collaboration avec le Dr Prévot. Après le départ du Dr Docagne en 2021 de l'unité et la fusion de notre ancienne équipe avec celle du Pr Vivien, le Dr Maubert a repris l'entière direction de ma thèse. Pour des raisons techniques et pratiques, les travaux en relation avec mon premier projet se sont arrêtés en novembre 2021. Les travaux présentés dans la seconde partie ont débuté de façon effective à compter de janvier 2022.



## **Chapitre 1**

# **Etudes des altérations neuroendocrines dans un nouveau modèle murin d'encéphalite autoimmune à anticorps anti-récepteurs NMDA**



# Introduction



# I Généralités sur la pathologie de l'encéphalite autoimmune à anticorps anti-récepteur N-Méthyl-D-Aspartate

## 1 Les pathologies autoimmunes

Historiquement, les pathologies autoimmunes sont considérées comme rares. Cependant, au cours du temps à travers différentes études épidémiologiques, il a été montré que celles-ci concernent 3 à 5 % de la population. Il existe plus d'une centaine de pathologies autoimmunes identifiées, dont les plus communes sont la Thyroïdite d'Hashimoto (ou thyroïde autoimmune) et le diabète de type 1. Ces pathologies peuvent être spécifiques d'un organe, tel que la cirrhose biliaire primitive, tandis que d'autres font intervenir une multitude de dysfonctionnements auto-immuns impliquant plusieurs organes, tel que le lupus érythémateux systémique (Yu *et al.*, 2014).

### 1.1 *Le système immunitaire, généralités*

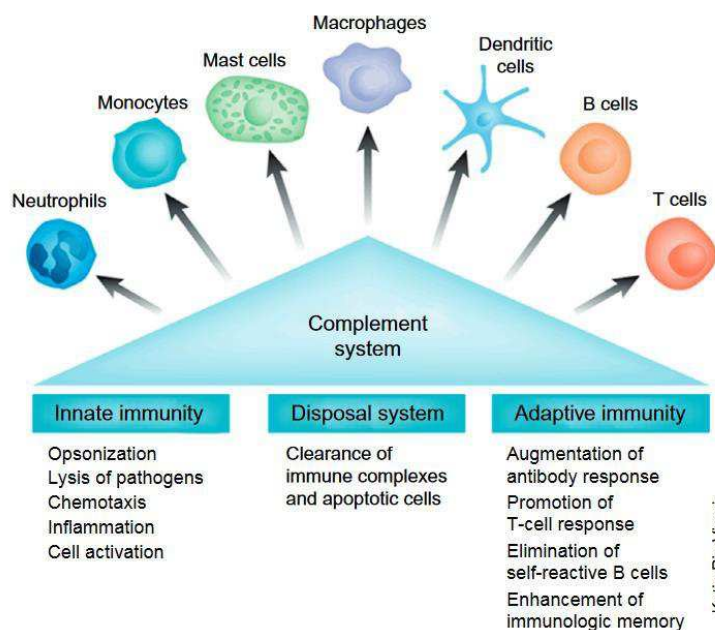
L'environnement qui nous entoure est peuplé d'organismes pathogènes et non-pathogènes. Ils contiennent une vaste population d'allergènes, de bactéries et de virus qui menace notre équilibre homéostatique. Le rôle du système immunitaire est d'éliminer ces organismes pathogènes tout en évitant d'engendrer des dommages excessifs aux tissus du soi. Le système immunitaire utilise alors un éventail de mécanismes complexes afin de contrôler et d'éliminer ces organismes pathogènes. Pour cela, le système immunitaire doit discriminer les organismes du soi et du non-soi grâce à la détection de caractéristiques structurales spécifiques (Chaplin, 2010).

La réponse immunitaire s'organise selon deux mécanismes distincts et en même temps complémentaires :



- La réponse immunitaire innée : elle constitue la première réponse du système immunitaire. Les molécules de reconnaissance utilisées par le système inné sont largement exprimées par de nombreuses populations cellulaires, ce qui en fait une réponse rapide à la suite d'une invasion par un organisme étranger.
- La réponse immunitaire adaptative : ce système adaptatif est composé d'un plus petit nombre de cellules impliquées. Cependant, elles possèdent une spécificité pour n'importe quel pathogène, toxine ou allergène. Cette réponse s'exerce bien souvent après la réponse immunitaire innée de par la nécessité pour ces cellules de proliférer après avoir rencontré l'antigène afin d'atteindre un nombre suffisant permettant une réponse efficace. L'intérêt de cette réponse repose dans la production d'une lignée de cellules à vie longue générant une mémoire immunitaire.

La réponse immunitaire innée fait intervenir, comme énoncé précédemment, différentes populations cellulaires impliquées dans des mécanismes spécifiques exécutant différentes fonctions. On retrouve le système phagocytaire faisant intervenir les macrophages et les neutrophiles équipés de mécanismes anti-pathogènes. La réponse en phase aigüe et le complément vont recruter les phagocytes sur le site de l'infection ou de la lésion. Les cellules NK jouent un rôle essentiel dans l'élimination des cellules hôtes infectées. Les cellules dendritiques (DCs) sont particulièrement adaptées dans le rôle de cellule présentatrice de l'antigène (APC) et sont impliquées dans l'initiation de la réponse innée (fig. 1) (Medina, 2016).



**Figure 1 : La réponse immunitaire en trois actes : l'immunité innée, le système d'élimination et l'immunité adaptative.**

Les fonctions de la réponse immunitaire innée sont la première ligne de défense face aux infections. Elle est constituée de divers composants cellulaires incluant les granulocytes (basophiles éosinophiles et neutrophiles), les mastocytes, les macrophages, les cellules dendritiques et les cellules *natural killer*. La réponse du système immunitaire adaptatif est plus lente à se développer, mais manifeste une augmentation de la spécificité et de la mémoire antigénique. Elle est constituée d'anticorps, des lymphocytes B et des lymphocytes T CD4<sup>+</sup> et CD8<sup>+</sup>. Le système du complément est capable d'activer des cellules à la fois du système immunitaire innée et adaptatif. Le complément déclenche et module une variété d'activité immunitaire et agit comme un lien entre les deux branches de la réponse immunitaire. De plus, le système du complément maintient l'homéostasie cellulaire en éliminant les débris cellulaires et les complexes immunitaire. D'après Medina, 2016.

La réponse adaptative s'effectue par la coopération de deux populations lymphocytaires qui expriment des récepteurs spécifiques aux antigènes, le récepteur des lymphocytes T (TCR) par les lymphocytes T, et les immunoglobulines (Ig) par les lymphocytes B.

○ *Les lymphocytes T*

Cette classe de lymphocytes se définit par son expression de  $\alpha\beta$  TCR, capable de reconnaître des antigènes peptidiques présentés par le complexe majeur d'histocompatibilité

(CMH). Le CMH est présent à la surface de cellules telles que les lymphocytes B. Ces lymphocytes vont, à la suite de la reconnaissance d'un antigène, présenter à leur surface des fragments peptidiques de protéines antigéniques qui ont été digérées. La formation des lymphocytes T progéniteurs se situe dans la moelle osseuse qu'ils vont quitter pour coloniser dans le thymus où ils vont procéder à leur maturation. Ils se divisent en plusieurs sous-catégories, dont les lymphocytes T CD8<sup>+</sup> qui agissent principalement dans la destruction des cellules infectées, et les lymphocytes T CD4<sup>+</sup> qui agissent principalement dans la régulation de la réponse immune cellulaire et humorale. Une petite sous-population qui est à la fois double négative CD4<sup>-</sup> CD8<sup>-</sup> expriment le NK1.1, l'antigène cellulaire *natural killer* (lymphocyte NK-T). Ces lymphocytes ont un rôle immunorégulateur par leur capacité à libérer de grandes quantités de cytokines, d'interleukines, de facteurs de nécrose tumorale etc. (Chaplin, 2010).

- Les lymphocytes B :

Cette population cellulaire reconnaît les antigènes étrangers grâce à leur récepteur lymphocytaire B (BCR) qui est de la famille des immunoglobulines. Il existe une grande diversité de lymphocyte B exprimant un BCR unique, résultant de processus hautement régulés lors de leur développement dans la moelle osseuse. Les lymphocytes B immatures quittent la moelle osseuse vers la rate où ils commencent leur processus de maturation périphérique. La différenciation des lymphocytes B s'effectue de deux manières différentes, soit par une activation polyclonale grâce à la reconnaissance d'épitopes par leur BCR indépendamment de l'aide des lymphocytes T, soit par une interaction avec les lymphocytes T *helper* (CD4<sup>+</sup>) antigènes spécifiques, grâce à leur CMH. Ces interactions entre les deux types de lymphocytes entraînent une production élevée d'anticorps et établissent la mémoire immunitaire (Medina, 2016).

Ainsi, le rôle du système immunitaire est de protéger l'hôte contre les agents pathogènes. Cependant, ce système immunitaire peut mener à un état pathologique dû à l'autoimmunité. Cette incapacité à distinguer le soi du non soi est souvent qualifiée de rupture de la tolérance immunitaire et constitue la base des maladies auto-immunes.

### 1.2 *La tolérance immunitaire*

La tolérance immunitaire représente la capacité du système immunitaire à tolérer nos propres tissus par une absence ou par un contrôle des réponses immunitaires vis-à-vis de celui-ci. Le système immunitaire est donc capable de discriminer le soi du non-soi.

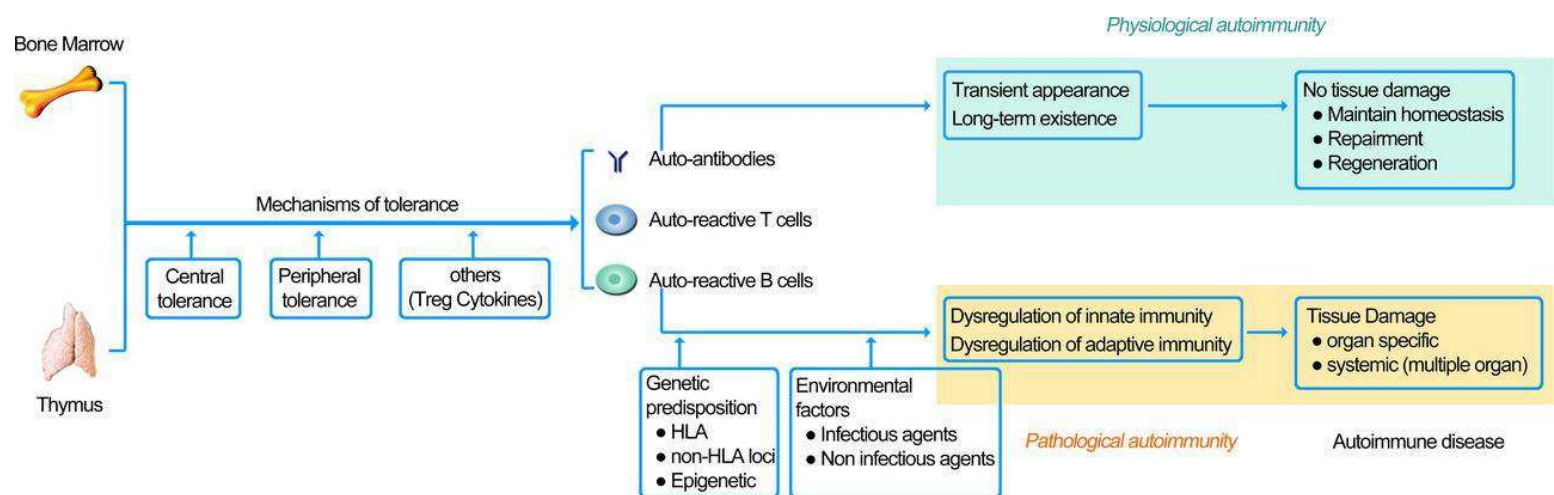
Concernant les lymphocytes T, la tolérance immunitaire centrale dans le thymus, organe lymphoïde primaire, joue un rôle clé dans l'arrangement de l'homéostasie du système immunitaire. Dans le cortex du thymus, les lymphocytes T en développement sont soumis à une sélection positive et négative avant leur maturation et leur entrée dans la circulation sanguine. Dans le cas d'un hôte sain, tous lymphocytes présentant un comportement potentiel de réactivité avec des peptides du soi seront négativement sélectionnés, c'est à dire détruit dans la médulla thymique. Cette tolérance centrale permet ainsi aux lymphocytes non autoréactifs de maturer et migrer vers la circulation sanguine. Une seconde sélection aura ensuite lieu, nommée tolérance périphérique, où, à nouveau, la majorité des lymphocytes T autoréactifs sont détruits ou rendus anergiques. Cette destruction des lymphocytes T autoréactifs par les processus de tolérance permet d'éviter l'autoimmunité.

Les lymphocytes B (principaux acteurs impliqués dans l'encéphalite auto-immune anti-récepteurs N-Méthyl-D-Aspartate) immatures présentant à leur surface des Immunoglobulines M (IgM) spécifiques des antigènes du soi ubiquitaires, vont être éliminés par un processus de délétion

clonale (mort par apoptose) lors de la tolérance centrale au sein de la moelle osseuse, autre organe lymphoïde primaire. Il est aussi possible que ces lymphocytes autoréactifs échappent à ce point de contrôle et entre dans un processus appelé correction du récepteur. Ce processus permet de « sauver » ces lymphocytes de la mort cellulaire en modifiant la spécificité du récepteur BCR. Les lymphocytes B matures sont ensuite soumis à un contrôle de tolérance périphérique, dans les organes lymphoïdes secondaires tels que la rate ou les ganglions lymphatiques (Wang *et al.*, 2015).

### 1.3 Les failles de la tolérance immunitaires : dérive vers l'autoimmunité

L'existence des lymphocytes autoréactifs ou bien ayant la capacité de produire des autoanticorps, concernant les lymphocytes B uniquement, n'est pas nécessairement synonyme de pathologie (Salinas *et al.*, 2013). Lorsque la tolérance immunitaire est rompue et que les autoanticorps et les lymphocytes autoréactifs deviennent impliqués dans l'inflammation, l'autoimmunité pathologique se développe (fig. 2) et amène à des dommages cellulaires, tissulaires pour entraîner un phénotype et une symptomatologie (Wang *et al.*, 2015).



**Figure 2 :** Schéma présentatif du développement des pathologies autoimmunes.

Malgré de strictes sélections cellulaires impliquant les tolérances centrale et périphérique, incluant ainsi plusieurs points de contrôles, une faible quantité de lymphocytes T et B peuvent échapper à la vigilance du système immunitaire.

Ceux-ci sont inoffensifs, sauf si une prédisposition génétique et/ou si des facteurs environnementaux favorisent leur agressivité envers le soi (Wang *et al.*, 2015).

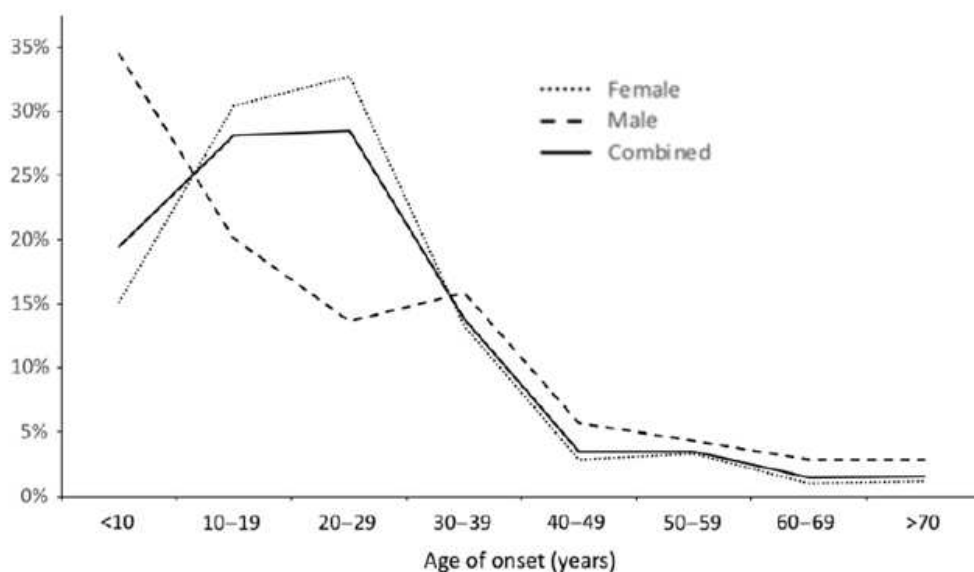
## **2 L'encéphalite autoimmune à anticorps anti-récepteur N-Méthyl-D-Aspartate**

### *2.1 Épidémiologie de l'Encéphalite anti-récepteur NMDA*

#### *2.1.1 Distribution de la pathologie au sein des populations*

L'encéphalite autoimmune à anticorps anti-récepteurs N-Méthyl-D-Aspartate (EAI-RNMDA) est classée comme une maladie rare dont l'incidence mondiale est estimée à 1,5 cas par million et par an (Dalmau *et al.*, 2019). Elle a tout d'abord été identifiée comme une pathologie touchant principalement les jeunes femmes atteintes de tératome ovarien (Dalmau *et al.*, 2007). Depuis, cette pathologie a aussi été identifiée dans d'autres populations et sans être obligatoirement associée à des tumeurs (Dalmau *et al.*, 2008a; Gable *et al.*, 2009; Irani *et al.*, 2010). L'EAI-RNMDA reste néanmoins prédominante chez la femme (fig. 3), représentant approximativement 80 % des cas d'EAI-RNMDA chez l'adulte (Dalmau *et al.*, 2008a, 2011; Gable *et al.*, 2009).

Malgré une prédominance chez les jeunes adultes, il a été observé des cas chez de très jeunes enfants, des nourrissons et des sujets beaucoup plus âgés (plus de 90 ans) (Armangue *et al.*, 2013 ; Titulaer *et al.*, 2013b).



**Figure 3 :** Apparition de l'EAI-RNMDA en fonction de l'âge et du sexe (633 patients inclus).  
D'après Warren *et al.*, 2018.

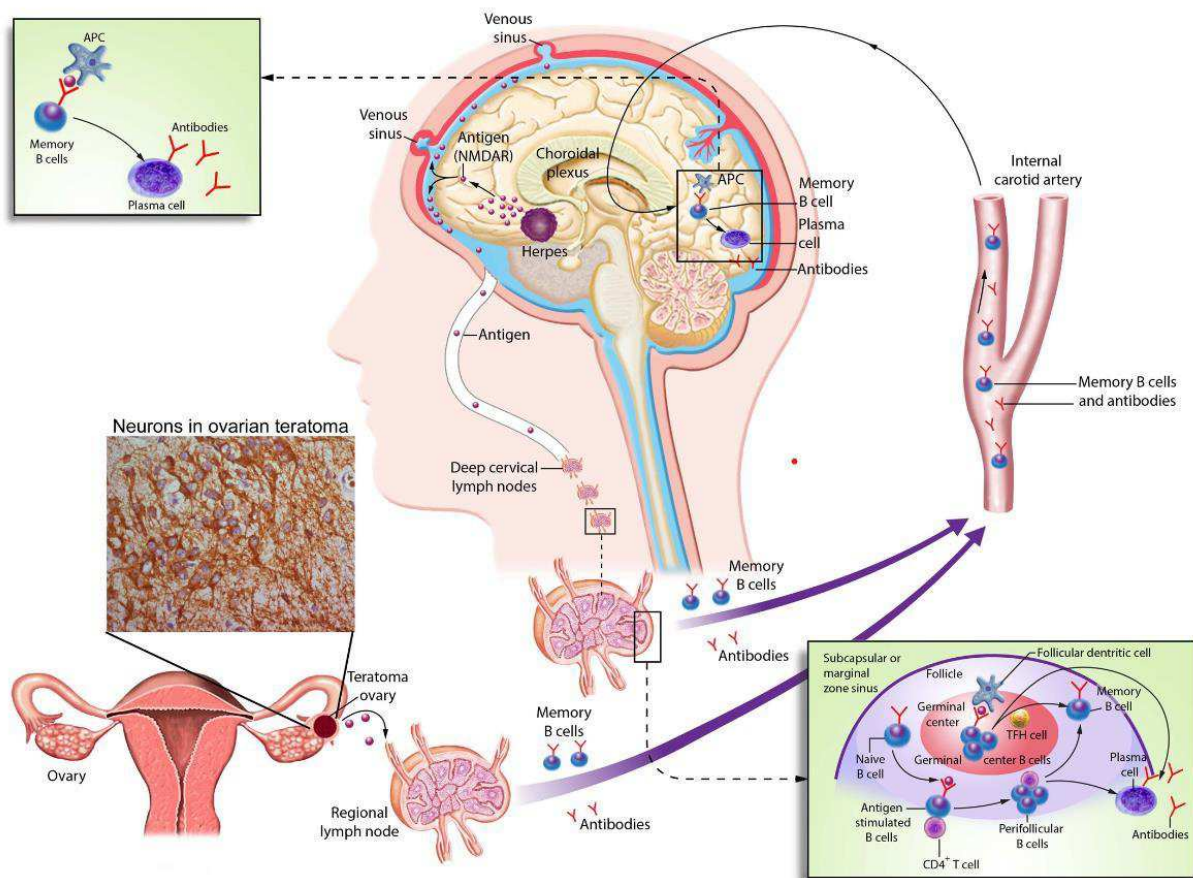
### 2.1.2 Étiologie de la pathologie

L'identification d'un néoplasme chez les patients reste aujourd'hui la cause majoritaire connue de l'apparition de l'EAI-RNMDA, il affecte globalement 40 % des patients, sexe et âges confondus (Titulaer *et al.*, 2013a). Chez la femme, cette forme paranéoplasique se retrouve davantage chez les adolescentes et les adultes entre 12 et 45 ans. De plus, 94 % de ces tumeurs sont des tératomes ovariens (Titulaer *et al.*, 2013a). Le tératome est une forme particulière de tumeur, puisqu'il se constitue des trois feuilletts embryonnaires, permettant le développement de tout type de tissus, dont le tissu nerveux. Cependant, le développement d'un tératome ne veut pas dire qu'il y aura la présence de tissus nerveux dans 100 % des cas même s'il est présent dans la quasi-totalité. En effet, une étude histologique réalisée par Chefdeville et coll. (2019), montre que parmi 27 patientes atteintes de l'EAI-RNMDA associée à un tératome ovarien, 1 patiente ne présentait pas de tissus nerveux au sein du tératome (Chefdeville *et al.*, 2019). Par ailleurs, seulement un tiers des

tératomes ovariens issus de patientes non affectées par l'EAI-RNMDA possède du tissu nerveux. De plus amples observations indiquent que les tératomes de patientes EAI-RNMDA expriment la sous-unités GluN1 du récepteur NMDA principalement par des cellules gliales, comparés aux tératomes contrôles. Aussi, il a été confirmé par cette équipe, la présence d'un environnement immunitaire particulier, révélant une infiltration inflammatoire massive. Ces données suggèrent que la présence de tissu nerveux peut être essentielle au déclenchement de la rupture de la tolérance immunitaire (Chefdeville *et al.*, 2019).

Dans certains cas d'EAI-RNMDA, le déclenchement de la pathologie a eu lieu suite à une infection au Virus de l'Herpès Simplex 1 (HSV-1) (Dalmau *et al.*, 2017), représentant la cause la plus fréquente d'infection sporadique (Hjalmarsson *et al.*, 2007). La lyse des neurones infectés par le virus va entraîner la libération d'antigènes, déclenchant ainsi un trouble inflammatoire. Cette inflammation amène à l'auto-immunité synaptique dirigé contre les récepteurs présents à la surface cellulaire (fig. 4). Un mécanisme de mimétisme semble être peu probable, sachant que la plupart des patients développent des autoanticorps dirigés chacun contre de multiples protéines neurales (Armangue *et al.*, 2014).





**Figure 4 :** Schéma proposé par Dalmau et ses coll. en 2017 présentant des « déclencheurs » de l'EAI-RNMDA et une modélisation de l'activation des lymphocytes B.

La nécrose des neurones au sein du tératome permet aux RNMDA d'atteindre les ganglions lymphatiques pelviens. Dans le cas du virus herpétique, l'infection virale induit une inflammation et la dégénérescence de neurones puis les RNMDA atteignent le système lymphatique (les ganglions lymphatiques cervicaux). Dans les ganglions lymphatiques (pelviens ou cervicaux), le RNMDA serait présenté aux cellules B naïves via des cellules présentatrices d'antigène et, en coopération avec les lymphocytes T CD4+, ces LB naïfs se différencieraient en plasmocytes (produisant des anticorps anti-RNMDA) et en cellules B mémoires. D'après Dalmau *et al.*, 2017

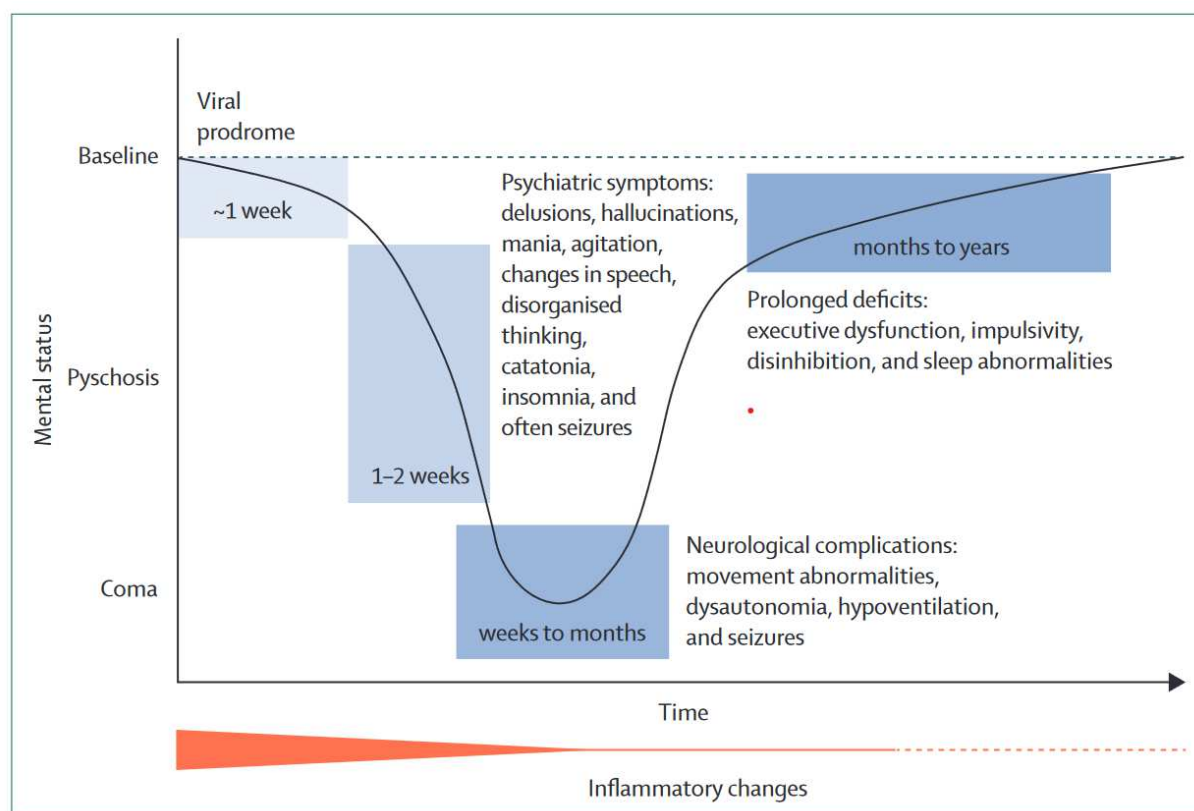
## 2.2 Symptomatologie et évolution clinique de l'EAI-RNMDA

### 2.2.1 Tableau clinique de la pathologie

L'encéphalite autoimmune anti-récepteurs NMDA se caractérise principalement par son aspect psychotique (fig. 5). C'est entre autres pour cette raison que le diagnostic de cette pathologie

a longtemps été difficile, étant avant tout identifiée comme psychiatrique et diagnostiquée comme telle (Dalmau *et al.*, 2008b ; Lamarque *et al.*, 2011).

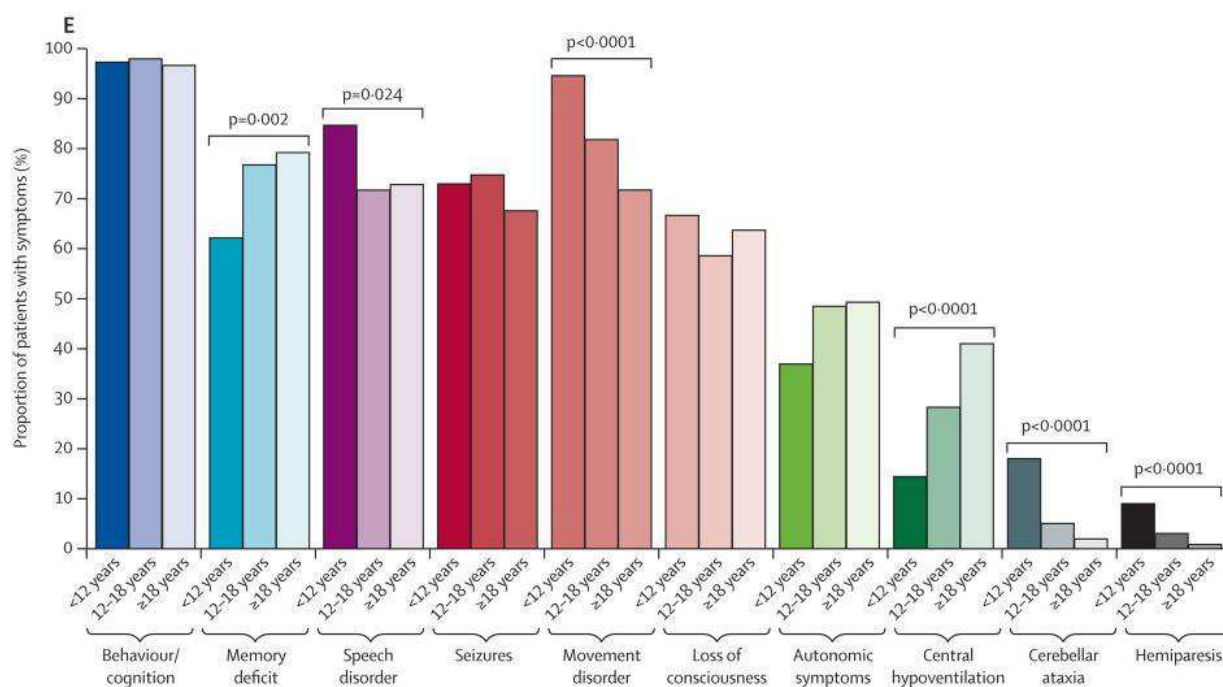
Cependant, l'aspect psychotique de la pathologie n'apparaît pas comme première manifestation. En effet, 70 % des patients présentent des symptômes prodromiques, sans distinction particulière, tels qu'une fièvre, des nausées ou encore des problèmes de respiration (fig. 5). Dans un laps de temps court, en général en moins de deux semaines, les patients développent des symptômes d'ordre psychiatrique (fig. 5) : anxiété, insomnie, peur, délires des grandeurs, hyperreligiosité, manie et paranoïa. Ces symptômes sont les manifestations les plus fréquentes (Dalmau *et al.*, 2008a).



**Figure 5:** Évolution clinique des symptômes et du statut mental des patients dans l'encéphalite auto-immune à anticorps anti-RNMDA au cours du temps.

Trois phases cliniques se dégagent dans cette pathologie. Une phase dite prodromale, une phase psychiatrique et une dernière dite phase neurologique. Chaque phase va évoluer de manière bien spécifique avec des symptômes propres dont la gravité augmente avec le temps. Plus la pathologie évolue et plus les symptômes vont être invalidants pouvant conduire au coma. Néanmoins, cette pathologie reste traitable avec des séquelles peu importantes si elle est diagnostiquée rapidement et efficacement. D'après Kayser and Dalmau, 2016.

Ces changements de comportements peuvent être plus difficiles à observer chez l'enfant, spontanément hyperactif, coléreux ou irritable. Ces agissements vont de fait compliquer le diagnostic des enfants, il y a plus de risque de ne suspecter une EAI-RNMDA qu'une fois les troubles neurologiques installés, tel que les crises d'épilepsies (Florance *et al.*, 2009). De plus, les enfants ne présentent pas un profil pathologique similaire aux adultes. En effet, les premiers symptômes observés lors de l'hospitalisation sont les troubles épileptiques et les troubles du mouvement chez 50 % des enfants, tandis que les adultes présentent majoritairement des troubles du comportement (65 %) (fig. 6). Il est aussi mis en évidence, que certains symptômes atypiques, comme l'ataxie cérébrale ou les hémiparésies, sont prédominants chez les enfants (Titulaer *et al.*, 2013a). Des observations semblables ont été faites par YoungKyu Shim et coll. (2020) quant à la symptomatologie pédiatrique (Shim *et al.*, 2020). De plus, ils observent un ratio fille/garçon (75% de fille) comparable à celui observé chez les adultes. Cependant, la présence de tératomes ovariens ne concerne que 30 % des patientes, ceux-ci étant plus rares avant la puberté (Shim *et al.*, 2020).



**Figure 6 :** Représentation du pourcentage de patients EAI-RNMDA atteints de différents types de symptômes en fonction de l'âge.

Inférieur à 12 ans, entre 12 et 18 ans, et supérieur à 18 ans. D'après Titulaer *et al.*, 2013a.

La phase neurologiques à la suite des épisodes psychotiques (fig. 5) est caractérisée par différents symptômes, tels que l'épilepsie, touchant approximativement 63% des patients (Warren *et al.*, 2018a), ou des périodes d'agitation entrecoupées de catatonie. A ce stade les mouvements anormaux et l'instabilité des fonctions autonomes sont les manifestations les plus habituelles (Dalmau *et al.*, 2008a; Ferioli *et al.*, 2010; Warren *et al.*, 2018a). Cette phase peut durer de quelques semaines à plusieurs mois et nécessite bien souvent une hospitalisation en soin intensif pour 70 % des patients (Irani *et al.*, 2010).

Toutefois, dès la prise en charge thérapeutique enclenchée, les patients progressent vers la phase de guérison. Il a en effet été mis en évidence par Warren et coll. (2018), que l'identification de la pathologie est à présent plus précoce, grâce à une sensibilisation accrue des professionnels au

diagnostic (Warren *et al.*, 2018a). Plus la pathologie est identifiée tôt et la thérapie commence rapidement, plus le rétablissement des patients est jugé meilleur. En effet, les patients présenteront une phase de convalescence plus courte et, de manière plus importante, présentent moins de séquelles. Cette phase de convalescence peut durer de plusieurs mois à plusieurs années, il n'y a aucune certitude quant à la guérison complète des patients et une disparition totale des séquelles (Titulaer *et al.*, 2013a).

### 2.2.2 Cas de troubles du comportement alimentaire dans l'EAI-RNMDA

Il existe parmi les patients atteints d'encéphalite anti-RNMDA, des cas de trouble du comportement alimentaire (TCA). Environ 6 à 7 % des patients atteints d'EAI-RNMDA présentent des TCA selon les données issues de deux méta-analyses récentes (Al-Diwani *et al.*, 2019a; Warren *et al.*, 2018a). Les TCA rencontrés chez les patients sont soit d'ordre anorexique (Mechelhoff *et al.*, 2015; Virupakshaiah *et al.*, 2019), soit à la fois anorexique et hyperphagique (Perogamvros *et al.*, 2012). Les patients développent ces troubles relativement tôt dans le développement de la pathologie, et ce sont ces troubles en particulier qui amèneront les patients à la consultation (Mechelhoff *et al.*, 2015; Virupakshaiah *et al.*, 2019). Néanmoins, ces troubles ont aussi été observés plus tard, durant la phase de guérison d'une patiente (Perogamvros *et al.*, 2012). Tout comme l'ensemble des troubles psychiatriques observés chez les patients, ceux présentant des TCA n'ont jamais présenté d'antécédents pathologiques de ce type et sont donc associés à l'EAI-RNMDA (Mechelhoff *et al.*, 2015; Perogamvros *et al.*, 2012; Virupakshaiah *et al.*, 2019).

La raison pour laquelle ces troubles sont très peu représentés chez les patients atteints d'EA est inconnue. Pourtant, il a déjà été montré un rôle du récepteur NMDA dans les mécanismes responsables du comportement alimentaire chez la souris (Lee and Stanley, 2005; Liu *et al.*, 2012). Qui plus est, des liens ont été mis en évidence chez l'Homme entre encéphalite (encéphalite

herpétique, encéphalite infectieuse), pathologie autoinflammatoire et trouble de la prise alimentaire (George, 1981; Ho and Birmingham, 2001; Zerwas *et al.*, 2017).

Sachant que les RNMDA sont impliqués dans la régulation du comportement alimentaire chez la souris (Lee and Stanley, 2005; Liu *et al.*, 2012) et probablement aussi chez l'humain, je présenterai dans ce manuscrit l'étude du comportement alimentaire, et des altérations métaboliques associées au modèle d'EAI-RNMDA que nous avons développé au laboratoire (Wagnon *et al.*, 2020).

### 2.3 *Stratégies de diagnostic de l'EAI-RNMDA*

Face à la difficulté de diagnostiquer correctement l'encéphalite anti-RNMDA dû aux similitudes symptomatologiques avec des pathologies psychiatriques, en 2019, le Professeur Josep Dalmau et coll. (2019) ont mis au point une feuille de route permettant d'éviter d'éventuelles erreurs de diagnostic et une prise en charge rapide des patients (Dalmau *et al.*, 2019).

#### 2.3.1 *Diagnostic clinique*

Le diagnostic clinique est crucial pour les patients puisqu'il s'agit du premier examen effectué par le médecin lors de la consultation. Il consiste à identifier certaines clés permettant, dès l'admission du patient, de soupçonner une EAI-RNMDA. En effet, malgré plusieurs études de cas cliniques, un phénotype psychiatrique spécifique de la pathologie n'a pu être identifié (Al-Diwani *et al.*, 2019b; Gibson *et al.*, 2019; Sarkis *et al.*, 2019; Warren *et al.*, 2018b).

Ainsi, il a été défini que l'apparition rapide (moins de 3 mois) d'au moins 4 sur 6 des symptômes suivants doit être associée à des examens complémentaires afin d'établir avec certitude le diagnostic d'une EAI-RNMDA (Dalmau *et al.*, 2019 ; Graus *et al.*, 2016) :

- Un comportement psychiatrique ou cognitif anormal
- Des troubles de l'expression
- Des crises d'épilepsie
- Des troubles du mouvement (dyskinésie, rigidité, posture anormale)
- Un niveau de conscience dégressif
- Des dysfonctions du système nerveux autonome (végétatif)

Il est aussi important d'étudier le passé médical des patients, qui aidera à l'identification de la pathologie. En effet, une infection récente par le virus de l'Herpès Simplex ou à l'encéphalite Japonaise B, peut entraîner une rechute impliquant des symptômes neurologiques opérés par l'immunité. Un patient n'ayant aucun antécédent psychiatrique avec une évolution rapide est suspecté de pathologie autoimmune. Le sexe et l'âge du patient affecté sont autant d'informations à confronter avec les cas classiques de pathologies autoimmunes observés (Dalmau *et al.*, 2019).

### 2.3.2 Examens complémentaires déterminant au diagnostic

Dans le cas d'un examen clinique où l'on suspecte une EAI-RNMDA certains examens sont fondamentaux pour exclure ou, au contraire, établir le diagnostic d'une EAI-RNMDA.

#### EEG anormaux

L'examen clinique d'Électroencéphalographie (EEG) se révèle anormal chez 90 % des patients. Cependant celui-ci présente des motifs non spécifiques de la pathologie, tels qu'un ralentissement de l'activité cérébrale (Dalmau *et al.*, 2008a; Titulaer *et al.*, 2013a). Parmi ces patients, 35 % présentent des anomalies d'ordre delta, telles qu'une activité delta ralentie, des Delta Brush Extrêmes et une Activité Delta Rythmique Généralisée (Gillinder *et al.*, 2019).

Les crises d'épilepsie ont aussi été observées chez les patients. En effet, il est le premier symptôme présenté chez près de 20% des patients, et au cours de la pathologie dans près de 70 % des cas (Gillinder *et al.*, 2019).

Malgré la non-spécificité de ces symptômes, l'EEG contrairement à l'Imagerie par Résonance Magnétique (IRM) reste anormal chez la quasi-totalité des patients atteint d'EA. La présence notamment d'anomalie delta est corrélée à un mauvais pronostic et une hospitalisation prolongée (Schmitt *et al.*, 2012). De plus, selon le Professeur Josep Dalmau, un examen EEG anormal associé à un diagnostic clinique suspect (cf. 4.1), renforce la probabilité d'une encéphalite anti-RNMDA et nécessite de procéder à la recherche d'autoanticorps (Dalmau *et al.*, 2019).

#### Anomalie du CSF

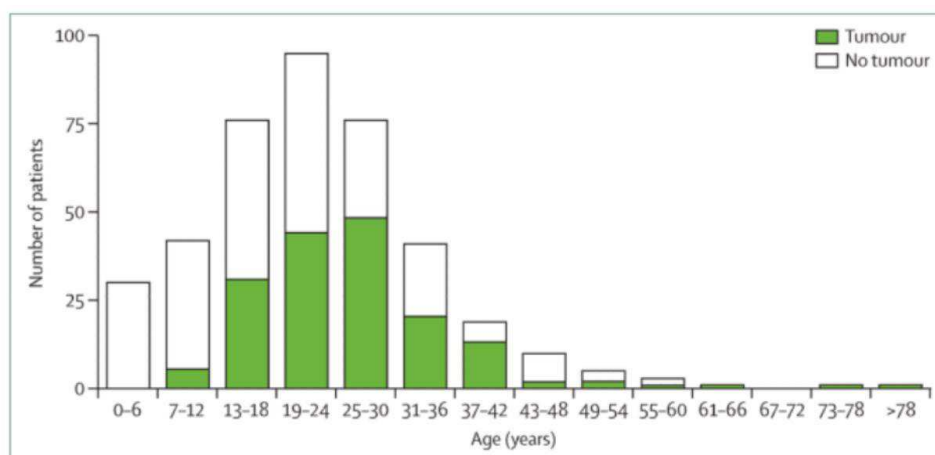
De même que pour l'examen EEG, les anomalies du liquide cérébro-spinal (CSF) sont des résultats critiques dans le diagnostic de l'encéphalite anti-RNMDA (Barry *et al.*, 2011). Ainsi, même si le CSF est initialement anormal chez 80 % des patients, il deviendra anormal plus tard dans la pathologie chez la totalité des patients (Dalmau *et al.*, 2008a). Les anomalies retrouvées sont, la pléïocytose lymphocytaire (89-90 % patients), un niveau de protéines élevé (33 %) et la présence de bandes oligoclonales marqueurs d'Ig spécifiques dans le CSF (60 %) (Gable *et al.*, 2009; Titulaer *et al.*, 2013a).

#### Présence d'un tératome

La présence du tératome est, comme expliqué auparavant, très commune chez les femmes atteintes d'EAI-RNMDA (fig.7) et concerne près d'une patiente sur deux (Dalmau *et al.*, 2008a). Les hommes, quant à eux, sont moins touchés par les tumeurs sous-jacentes à l'EAI-RNMDA, seulement 5 % des plus de 18 ans sont concernés (Dalmau *et al.*, 2011).



Les techniques de recherche de tumeur les plus efficaces sont l'imagerie, soit IRM, scanner ou échographie pelvienne et trans-vaginale. Il est aussi possible de rechercher des marqueurs tumoraux sanguins (CA125,  $\beta$ -HCG,  $\alpha$ -foetoprotéine ou testostérone par exemple), mais le résultat apparait négatif chez de nombreux patients malgré la présence d'une tumeur (Dalmau *et al.*, 2011).



**Figure 7 : Distribution des patientes atteintes d'EAI-RNMDA par âge et par présence ou non de tumeur.**

Dans l'ensemble, nous pouvons observer que les patientes sont en majorités des adolescentes ou de jeunes adultes de 19 à 30 ans. Il est aussi intéressant d'observer que la proportion de patiente atteinte EAI-RNMDA sera plus souvent associé à un tératome à l'âge adulte (25 à 42 ans) que chez des patientes plus jeunes (de 7 à 18 ans), de plus il n'y a pas été observé de tératomes chez les enfants (0 à 6ans). D'après Dalmau *et al.*, 2011.

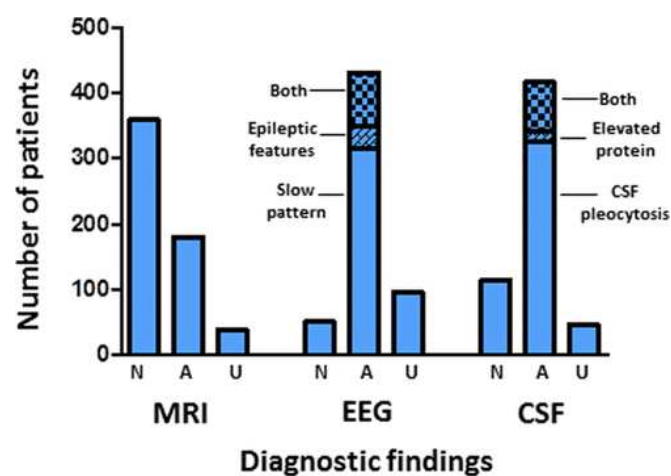
### IRM anormal

L'examen d'IRM est moins utilisé dans le diagnostic de la pathologie car il se révèle normal dans 50-70 % des cas (Barry *et al.*, 2015; Irani *et al.*, 2010; Maneta and Garcia, 2014).

L'utilisation de séquences T2 FLAIR a néanmoins permis de révéler des hypersignaux dans le système nerveux central (SNC) de patients représentant des lésions de la matière blanche (Phillips *et al.*, 2018). Ces perturbations du signal ont pu être observées principalement au niveau de l'hippocampe, du cervelet, du cortex fronto-basal, des régions insulaires, des ganglions de la

base, du tronc cérébral ou encore dans la moelle épinière (Dalmau *et al.*, 2007). Toutefois ces changements sont transitoires, non spécifiques et ils n'ont pas pu être corrélés à la gravité des symptômes (Dalmau *et al.*, 2008a). De plus, les changements observés sont inconsistants et extrêmement variables entre les patients (Gable *et al.*, 2009).

De ce fait, les techniques d'imagerie de routine ne représentent pas un examen clé pour le diagnostic de l'EAI-RNMDA (fig. 8).



**Figure 8** : Fréquence des examens diagnostiques pratiqués communément et leurs résultats chez des patients atteints d'EAI-RNMDA.

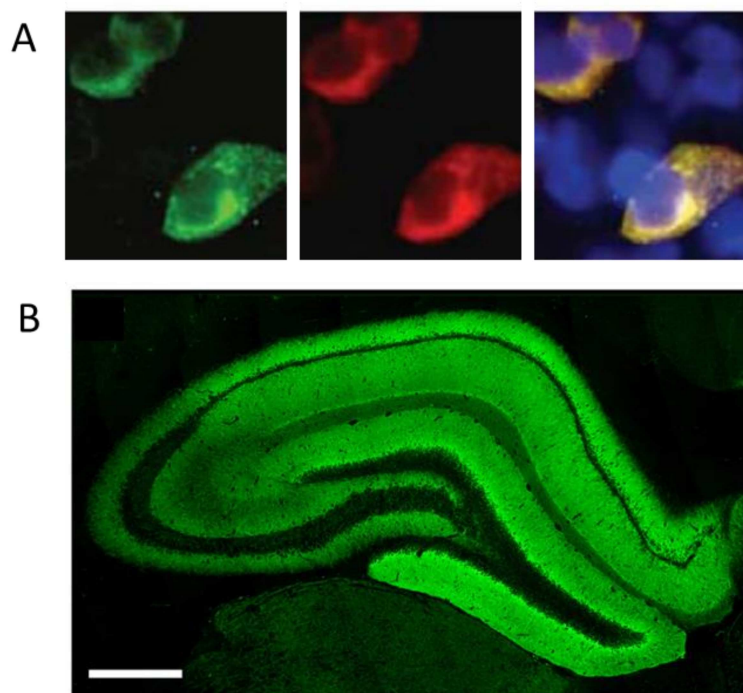
N : normal, A : anormal, U : inconnu. D'après Venkatesan and Adatia, 2017

### 2.3.3 Recherche d'autoanticorps anti-RNMDA

Le seul test diagnostique spécifique de l'encéphalite anti-RNMDA consiste à démontrer la présence d'immunoglobuline de type G (IgG) dirigées contre la sous unité GluN1 du récepteur NMDA dans le CSF des patients (Gresa-Arribas *et al.*, 2014; Maneta and Garcia, 2014). Près de 100 % des patients auront, au cours de la pathologie, la présence d'autoanticorps de ce type dans leur CSF (Dalmau *et al.*, 2008a; Irani *et al.*, 2010).

Il est aussi possible de rechercher la présence de ce type d'anticorps dans le sérum. Néanmoins ces tests s'avèrent être moins spécifiques et ils peuvent produire de faux positifs. Par exemple, des patients schizophrènes peuvent avoir des anticorps anti-RNMDA circulants plasmatiques, mais contrairement aux patients EAI-RNMDA ils ne présentent pas d'autoanticorps dans le CSF. Ces tests produisent aussi des faux négatifs (Deakin *et al.*, 2014; Mackay *et al.*, 2012; Zandi *et al.*, 2011). De plus, la sensibilité de ces tests est approximativement 85 % plus faible, comparée à une détection dans le CSF (Prüss *et al.*, 2010; Suh-Lailam *et al.*, 2013). La recherche et le suivi des anticorps anti-RNMDA dans le CSF montre une augmentation de leur titrage dans le temps avec la progression de la pathologie, et semble corrélérer avec la progression des symptômes (Hughes *et al.*, 2010). Ainsi, il est conseillé de procéder *a minima* au dosage d'anticorps anti-RNMDA dans le CSF, et de compléter avec un dosage sérique afin de réduire à la fois le risque de faux positifs et de faux négatifs (Gresa-Arribas *et al.*, 2014; Knudtzen *et al.*, 2020; Suh-Lailam *et al.*, 2013).

La mise en évidence de la présence d'IgG autoréactives spécifiques est généralement réalisée par un test cellulaire. Il permet de tester l'immunoréactivité du CSF ou du sérum de patients, en utilisant des cellules humaines rénales embryonnaires, *Human Embryonic Kidney* (lignée HEK 293) exprimant le récepteur NMDA (GluN1/GluN2) à leur surface (fig. 9A). Afin d'augmenter la spécificité de détection des IgG lorsque le sérum des patients a été testé, il est nécessaire de compléter avec un immunomarquage de l'échantillon sur coupe de tissu hippocampique de rat (Gresa-Arribas *et al.*, 2014; Zandi *et al.*, 2015). En effet, la densité importante de récepteurs NMDA au sein de l'hippocampe permet de révéler la présence d'anticorps anti-récepteurs NMDA à partir des échantillons testés (fig. 9B).



**Figure 9** : Protocole d'immunofluorescence réalisé sur des cellules HEK-293 transfectées afin de tester la présence d'anticorps anti-RNMDA dans le CSF et le sérum d'un patient atteint d'EAI à anticorps anti-RNMDA.

(A) Le CSF de patient a été testé à la dilution 1 :40 (vert). L'immunomarquage a été comparé avec un anticorps commercial ciblant la sous unité GluN1 extracellulaire du RNMDA (rouge) puis, les deux images ont été superposées nous montrant un marquage parfaitement similaire (jaune). (Dalmau *et al.*, 2008a). (B) Section coronale de l'hippocampe d'un rat immunomarkée avec les autoanticorps anti-récepteur NMDA provenant d'un patient atteint d'encéphalite anti-RNMDA. D'après Dalmau *et al.*, 2017.

#### 2.4 Prise en charge thérapeutique de l'EAI-RNMDA

Bien que l'encéphalite anti-RNMDA soit une pathologie grave lourde de symptômes, il est heureusement possible de traiter cette maladie et d'en guérir. Ainsi, le professeur Dalmau décrit un protocole thérapeutique augmentant les chances de guérisons avec un minimum de séquelles et de rechutes potentielles (Dalmau *et al.*, 2011).

Dans l'ensemble, environ 80 % des patients guérissent totalement de la pathologie, ou avec des séquelles modérées (Dalmau *et al.*, 2008a). En tenant compte de l'examen diagnostique du

patient, différentes stratégies thérapeutiques sont mises en place, la priorité étant de se focaliser sur l'immunothérapie et l'exérèse d'une tumeur identifiée.

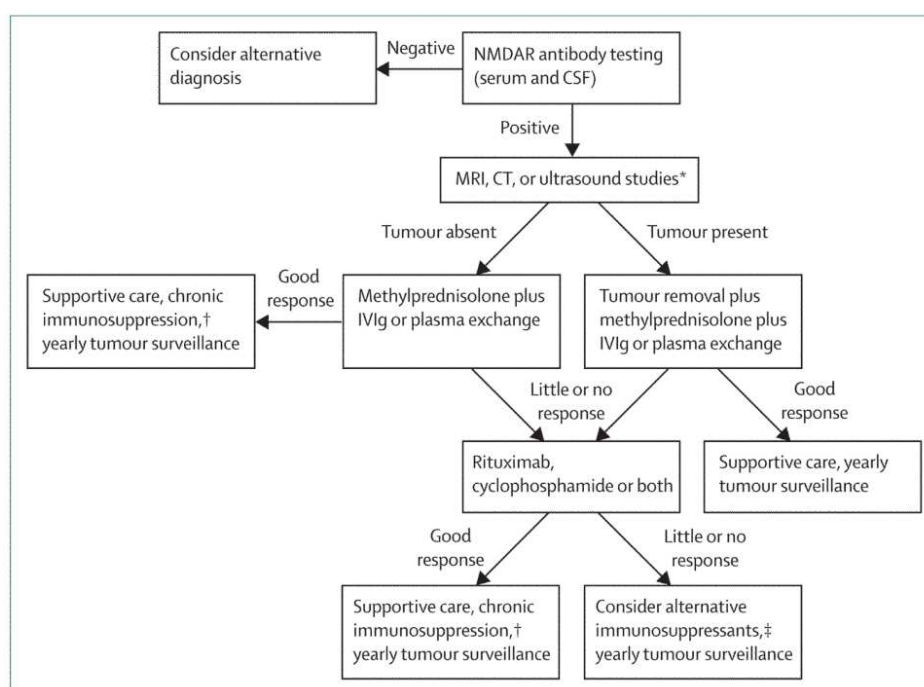
La thérapie consistera donc à la fois à traiter les causes et les conséquences cliniques de l'EAI-RNMDA (symptômes psychiatriques et neurologiques).

#### 2.4.1 *Les immunothérapies*

Selon l'algorithme proposé par le Professeur Dalmau présenté en figure 10, dans l'éventualité de la présence d'une tumeur, son retrait améliore l'état général des patients dans 75 % des cas (Graus *et al.*, 2016; Leshner *et al.*, 2010; Platt *et al.*, 2017), et avoisine les 80 % avec l'ajout complémentaire d'une immunothérapie (Titulaer *et al.*, 2013a).

La thérapie de première intention consiste en l'utilisation de stéroïdes, injection intraveineuse d'immunoglobulines, ou échange de plasma (Dowben *et al.*, 2015; Graus *et al.*, 2016; Kuppuswamy *et al.*, 2014; Titulaer *et al.*, 2013a). Il est souvent nécessaire pour les patients qui n'ont pas de tumeur, ou pour lesquels le diagnostic a été anormalement long, que des traitements supplémentaires sous forme de thérapie de seconde intention, avec le rituximab, le cyclophosphamide ou les deux, soit nécessaires (Dalmau *et al.*, 2011; Dowben *et al.*, 2015; Graus *et al.*, 2016; Ishiura *et al.*, 2008; Kuppuswamy *et al.*, 2014; Maneta and Garcia, 2014). Dans une étude basée sur 475 patients, parmi les 221 (47 %) pour lesquels il n'y a pas eu d'amélioration après la thérapie de première intention, 125 (57 %) des individus qui ont reçu la thérapie de deuxième intention ont vu leur état nettement s'améliorer comparé aux 96 patients (43 %) qui n'ont pas reçu cette thérapie (Titulaer *et al.*, 2013a).

Enfin, pour les patients réfractaires à ces approches (environ 10 %) (Titulaer *et al.*, 2013a), une thérapie de troisième intention, telle que le bortezomib ou tocilizumab a été suggérée (Lee *et al.*, 2016; Scheibe *et al.*, 2017).



**Figure 10** : Algorithme proposé par Dalmau et coll. (2011), pour le traitement de l'encéphalite anti-RNMDA.

Après avoir confirmé le diagnostic de l'EAI-RNMDA par la recherche d'anticorps dans le CSF, il est nécessaire, (\*si l'examen n'a pas déjà été pratiqué) de rechercher et de procéder à l'exérèse de la tumeur si nécessaire. S'en suivent les thérapies de première, deuxième et troisième intention, au dépend de la réponse des patients aux traitements. D'après Dalmau *et al.*, 2011.

#### 2.4.2 Traitement des symptômes psychiatriques

L'utilisation d'antipsychotiques typiques et atypiques est courante dans la gestion immédiate des symptômes psychotiques et comportementaux. Il faut toutefois rester vigilant, puisque l'utilisation de telles thérapies avant d'avoir effectué le diagnostic, peut rendre l'utilisation des immunothérapies moins efficace dans le traitement de l'EAI-RNMDA (Barry *et al.*, 2011;

Kuppuswamy *et al.*, 2014). Les troubles du sommeil sont traités avec succès par l'utilisation de la clonidine, du trazadone ou des benzodiazépines (Chapman and Vause, 2011).

Les symptômes catatoniques sont typiquement traités avec les benzodiazépines. Chez certains patients, le lorazepam ne montre un effet suffisant qu'à partir de 20-30 mg par jour (Braakman *et al.*, 2010; Dhossche and Wachtel, 2010; Fink and Taylor, 2009; Lee *et al.*, 2006). Dans ce type de cas, l'électroconvulsivothérapie (ECT) peut s'avérer utile. Cependant, la littérature reste inconsistante quant à son efficacité, malgré certains cas d'études rapportant une guérison complète après ECT chez les patients réfractaires aux thérapies de première et seconde intention (Braakman *et al.*, 2010; Dhossche and Wachtel, 2010; Fink and Taylor, 2009; Lee *et al.*, 2006). Ces mécanismes d'actions par lesquels l'ECT serait capable d'agir de manière bénéfique sur les symptômes de l'EAI-RNMDA sont incompris, mais il a été proposé que cette thérapie serait capable d'augmenter le nombre de sous unité GluN2A et GluN2B (Watkins *et al.*, 1998).

### **3 Physiopathologie de l'encéphalite autoimmune à anticorps anti-récepteurs NMDA**

La pathologie d'EAI-RNMDA est caractérisée par de nombreux symptômes faisant intervenir des dérégulations de la signalisation du récepteur NMDA neuronal, notamment au niveau hippocampique. Nous présenterons dans ce chapitre le récepteur glutamatergique NMDA et les conséquences fonctionnelles au niveau cellulaire de l'interaction des auto-anticorps avec ce récepteur dans la pathologie d'EAI-RNMDA.

#### *3.1 Les récepteurs glutamatergiques*

Dans l'ensemble des cellules du corps humain, le glutamate est en tant qu'acide aminé ubiquitaire. C'est aussi le principal neurotransmetteur exciteur du système nerveux que ce soit

dans le SNC ou le système nerveux périphérique (SNP). Il existe deux grands types de récepteurs au glutamate, les récepteurs métabotropiques et les récepteurs ionotropiques. L'ensemble de ces récepteurs est responsable, entre autres, de l'excitation neuronale dans le SNC. Ils peuvent, selon les sous types de récepteurs, être localisés sur les éléments présynaptiques (terminaisons axonales) et/ou sur les éléments post-synaptiques. Ils sont aussi exprimés par de nombreux autres types cellulaires à la fois dans le système nerveux et en périphérie.

### 3.1.1 *Récepteurs glutamatergiques métabotropiques*

Les récepteurs métabotropiques sont classés dans la catégorie des récepteurs à action lente (i.e. métabotropiques), dû à leur mode de fonctionnement *via* l'activation d'une protéine G initiant diverses cascades de signalisation intracellulaires (Benarroch, 2008). Il existe un total de 8 sous-types de récepteurs (mGlu1-8). Ces sous-types sont classifiés en 3 groupes fonctionnels, basés sur leur homologie de séquence, leur connexions signalétiques post-récepteur et leur pharmacologie (Pin and Duvoisin, 1995) :

- Groupe I constitué des récepteurs mGlu1 et mGlu5
- Groupe II constitué des récepteurs mGlu2 et mGlu3
- Groupe III : constitué des récepteurs mGlu4/6 et 8

### 3.1.2 *Récepteurs glutamatergiques ionotropiques*

Les récepteurs ionotropiques du glutamate présentent une activation glutamatergique rapide. D'un point de vue conformationnel, ce sont des récepteurs canaux (i.e. ionotropiques) permettant un passage sélectif et rapide d'ions selon les gradients électrochimiques des ions perméants (Attwell and Gibb, 2005).



Ces récepteurs ont été historiquement classés en trois grandes familles mais une nouvelle famille atypique (les récepteurs de type delta), est maintenant associée à ces récepteurs compte-tenu des homologies de séquence avec les 3 autres familles identifiées jusqu'à présent (Carrillo *et al.*, 2021). Il est actuellement décrit 4 familles de récepteurs ionotropiques pour le glutamate :

- Les récepteurs de type N-Méthyl-D-aspartate
- Les récepteurs de type alpha-amino-3-hydroxy-5-methyl-\_isoxazolopropionate (AMPA)
- Les récepteurs de type kaïnate
- Les récepteurs de type delta

En lien avec ma thématique de recherche portant sur l'EAI-RNMDA, nous consacrerons les prochains paragraphes au récepteur NMDA. Nous nous focaliserons en particulier sur la structure de ce récepteur NMDA, ses rôles, ainsi que sa localisation dans le système nerveux. Puis, nous présenterons les autoanticorps anti-RNMDA, l'épitope cible identifié sur le récepteur NMDA dans le contexte de l'EAI-RNMDA, et l'impact de sa reconnaissance par le paratope des anticorps-anti-RNMDA sur le devenir et/ou les propriétés physiologiques du RNMDA.

## 3.2 *Le récepteur NMDA*

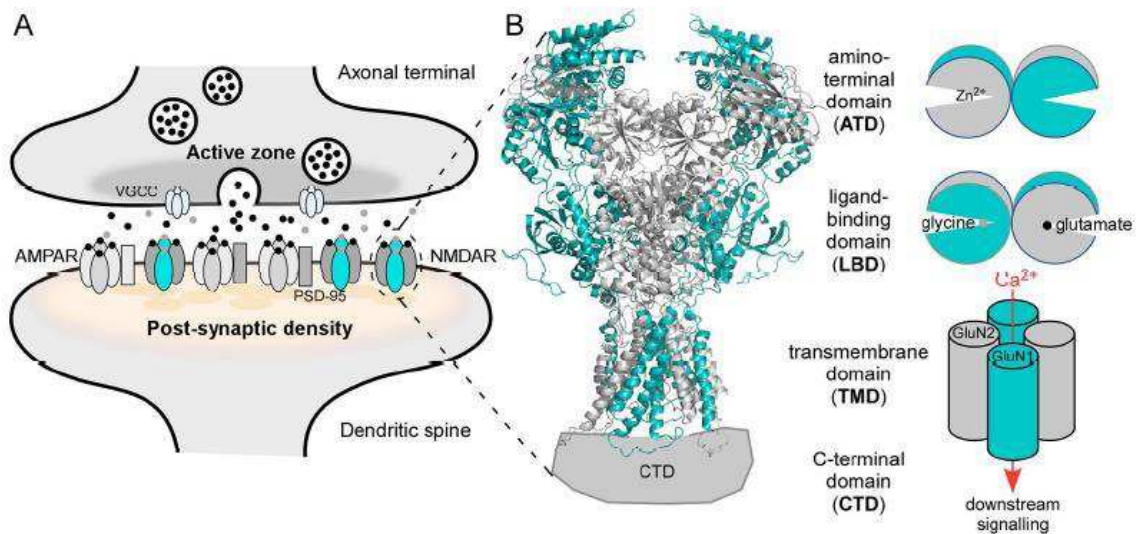
### 3.2.1 *Structure et activation du récepteur NMDA*

Les RNMDA sont des récepteurs ionotropiques composés de quatre sous unités qui forment un hétéro-tétramère constituant un canal ionique. Il existe dans l'ensemble une famille de 8 sous-unités, on trouve donc la sous unité GluN1 codée par un gène unique *Grin1*, la sous unité GluN2 pouvant être codée par 4 gènes (*Grin2A* à *Grin2D*) et la sous unité GluN3 qui, quant à elle, peut être codée par 2 gènes *Grin3A* et *Grin3B* (Monyer *et al.*, 1992; Traynelis *et al.*, 2010).

Il existe différentes combinaisons associant ces différentes sous unités. Toutefois, les hétéromères contiennent obligatoirement 2 sous unités GluN1. Ces dernières sont indispensables au fonctionnement du récepteur. Selon le récepteur constitué, les sous unités GluN1 peuvent être associées à deux autres sous unités de type GluN2 et/ou GluN3, formant des di-hétéromères ou des tri-hétéromères (Stroebele *et al.*, 2018; Ulbrich and Isacoff, 2008).

Toutes les sous unités du RNMDA présentent un degré d'homologie considérable. Elles sont organisées en quatre domaines bien identifiés hautement conservés dans la structure de leurs domaines protéiques. Quatre domaines ont été identifiés (fig. 11) :

- Le **domaine amino-terminal** extracellulaire (ATD) : ce premier domaine extracellulaire est impliqué dans différents rôles, dont l'assemblage et la modulation des fonctions du RNMDA (Atlason *et al.*, 2007; Farina *et al.*, 2011). De plus, l'ATD possède des sites de fixation aux modulateurs allostériques (Romero-Hernandez *et al.*, 2016). Enfin, ce domaine contient une région particulièrement ciblée par les anticorps dans la pathologie d'EAI-RNMDA contenant les acides aminés Asparagine (N) 368 et Glycine (G) 369 (Dalmau *et al.*, 2017).
- Le **domaine de liaison au ligand** extracellulaire (LBD) : c'est sur ce domaine protéique que vient se fixer le glutamate et ses co-agonistes tels que la glycine.
- Le **domaine transmembranaire** (TMD) : ce domaine est constitué de 4 segments transmembranaires, il intervient dans la perméabilité du canal aux ions (Traynelis *et al.*, 2010).
- Le **domaine carboxy-terminal** intracellulaire (CTD) : cet élément intracellulaire joue un rôle primordial dans l'ancrage et le trafic du récepteur (Lau and Zukin, 2007).



**Figure 11 : Structure et activation du récepteur NMDA post-synaptique**

**A :** L'arrivée d'un potentiel d'action à l'extrémité de l'axone engendre la libération vésiculaire de glutamate (points noirs) dans la fente synaptique qui va venir se fixer sur les récepteurs AMPA. L'activation des AMPA permet de dépolariiser la membrane du neurone post-synaptique et permet d'éliminer le  $Mg^{2+}$  qui bloque le canal des RNMDA. En parallèle, le glutamate, ainsi que la glycine ou la D-sérine (points gris), activent les RNMDA sur la membrane postsynaptique. Les RNMDA sont encrés au niveau post-synaptique grâce à une interaction directe avec PSD-95. **B :** A gauche, Modélisation cristallographique des R-NMDA constitués des sous unités GluN1 et GluN2. La sous unité GluN1 est en bleu et GluN2 en gris. Le complexe tétramérique est composé de quatre domaines : les domaines extracellulaires amino-terminal (ATD) et de liaison au ligand (LBD) ; le domaine transmembranaire (TMD) qui traverse la membrane et forme le canal ionique ; et le domaine intracellulaire C-terminal (CTD). A droite, une vision plus schématique des différents domaines et données physiologiques. Le LBD et l'ATD (semblables à une coquille) régulent l'activité du canal ionique. La liaison de la glycine (à GluN1) et du glutamate (à GluN2) au LBD induit la fermeture de la coquille et entraîne directement l'ouverture du canal ionique permettant l'entrée d'un flux calcique ; la fermeture de la coquille de l'ATD par des agents comme le  $Zn^{2+}$  agit comme un modulateur allostérique négatif. D'après Wollmuth *et al.*, 2021.

Il est important de noter que l'activation du récepteur NMDA, composé des sous-unités GluN1/GluN2, requiert la fixation de 2 molécules de glycine (ou D-sérine) sur les sous-unités GluN1 et la fixation de 2 molécules de glutamate qui se fixent sur les sous-unités GluN2 (Clements and Westbrook, 1991; Patneau and Mayer, 1990; Watkins and Evans, 1981). Tandis que les récepteurs NMDA composés des sous-unités GluN1/GluN3 ne nécessitent que la glycine pour leur activation (Pachernegg *et al.*, 2012).

La glycine est naturellement présente dans l'environnement extracellulaire du système nerveux. En tant que co-agoniste de la sous-unité GluN1, la glycine possède une concentration efficace médiane de  $1\mu\text{M}$ . De ce fait, la plupart des sites de fixation du co-agoniste sont naturellement occupés (Vyklícky *et al.*, 2014). Il a été déterminé que le principal co-agoniste des récepteurs NMDA synaptiques était la D-sérine, tandis que la glycine est le co-agoniste des récepteurs NMDA extrasynaptiques (Papouin *et al.*, 2012).

En ce qui concerne le glutamate, comme mentionné précédemment, il se trouve être le neurotransmetteur excitateur majoritaire du SNC. Il est libéré par les terminaisons présynaptiques des synapses glutamatergiques et active le récepteur NMDA en occupant les deux sites de liaisons localisés sur le domaine LBD des sous-unités GluN2 (Erreger *et al.*, 2007).

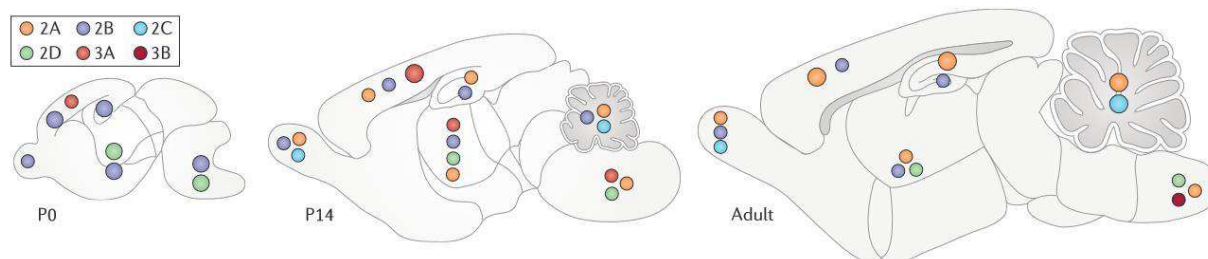
Au repos, le canal est bloqué par un ion  $\text{Mg}^{2+}$  qui est éliminé de manière voltage-dépendant après une dépolarisation membranaire. Ainsi, il est nécessaire que la membrane neuronale soit dépolarisée, ce qui est possible grâce à l'activation rapide des récepteurs AMPA par la fixation du glutamate (fig. 11) lors de l'activation synaptique (Nevian and Sakmann, 2004). Simultanément à cette dépolarisation le glutamate libéré par les neurones pré-synaptiques interagît également avec le récepteur NMDA et se fixe sur le domaine LBD des sous-unités GluN1. Cette interaction cause la fermeture à clapet du domaine LBD et engendre une modification conformationnelle du canal, permettant son ouverture. Une fois ouvert, le canal va permettre le flux de différents cations perméants, tels que le  $\text{Na}^+$ , le  $\text{K}^+$  et le  $\text{Ca}^{2+}$ . Les flux d'ions se font en accord avec leur gradient électrochimique. On observe alors un flux majoritaire d'ions  $\text{Ca}^{2+}$  rentrant dans le neurone, intensifié par sa perméabilité relative, étant 10 fois plus élevée que celle du sodium. (Vyklícky *et al.*, 2014).

### 3.2.2 *Distribution et physiologie du récepteur NMDA*

Les récepteurs NMDA sont retrouvés dans l'ensemble du SNC. Ils sont impliqués dans une multitude d'effets biologiques, tels que l'apprentissage, la mémoire et la plasticité synaptique. Compte tenu de leurs propriétés physiologiques variées, la constitution en sous-unités du récepteur aura un rôle majeur dans son fonctionnement (Hansen *et al.*, 2018). En conséquence, la distribution des récepteurs et leur composition en sous-unités évolue avec le développement du système nerveux (Paoletti *et al.*, 2013).

#### 3.2.2.1 *Distribution du récepteur NMDA au sein du système nerveux et de la périphérie*

La sous unité GluN1 étant exprimée systématiquement au sein des récepteurs NMDA, elle sera très répandue dans le cerveau du stade embryonnaire jusqu'à l'âge adulte (Akazawa *et al.*, 1994; Watanabe *et al.*, 1992). Les quatre sous-unités GluN2 qui sont des déterminants majeurs dans l'hétérogénéité fonctionnelle du récepteur, montrent un profil de distribution spatio-temporel bien différent au cours du développement (Vieira *et al.*, 2020). Chez l'adulte, les di-hétéromères GluN1/GluN2B et GluN1/GluN2A représentent une fraction importante des récepteurs NMDA cérébraux (fig. 12). Dans l'hippocampe et le cortex, de 15 à plus de 50 % des populations totales de récepteurs sont des tri-hétéromères GluN1/GluN2A/GluN2B (Al-Hallaq *et al.*, 2007). Des études menées chez le rongeur montrent que les récepteurs NMDA contenant la sous-unité GluN3A sont faiblement exprimés chez l'adulte. À l'inverse, les récepteurs NMDA contenant la sous-unité GluN3B sont fortement exprimés dans certaines régions cérébrales, telles que l'hippocampe, le cortex cérébral, le caudoputamen, le noyau accumbens et le cervelet (Pachernegg *et al.*, 2012; Wee *et al.*, 2008).



**Figure 12** : Schéma représentant le profil développemental de l'expression des sous-unités GluN2 et GluN3 dans le cerveau de souris à la naissance P0, à 2 semaines postnatales P14 et à l'âge adulte.

D'après Paoletti *et al.*, 2013

A l'échelle subcellulaire, la distribution à la surface des neurones est aussi dépendante de la composition en sous unités des récepteurs NMDA. Les synapses glutamatergiques à récepteurs NMDA sont majoritairement composées de di-hétéromères GluN1/GluN2A, et de tri-hétéromères GluN1/GluN2A/GluN2B. En revanche, les sites péri et extrasynaptique sont enrichis en récepteurs contenant la sous-unité GluN2B (Hardingham and Bading, 2010).

Les récepteurs NMDA sont aussi exprimés par d'autres cellules du SNC, telles que les astrocytes et oligodendrocytes du cervelet, du corps calleux ou du nerf optique (Skowrońska *et al.*, 2019; Wong, 2006). On les retrouve également dans les cellules endothéliales des vaisseaux cérébraux (Lu *et al.*, 2019; Macrez *et al.*, 2016). En ce qui concerne leur expression périphérique, ces récepteurs ont été entre autres identifiés dans le cœur, le pancréas, les poumons, le systèmes digestif et certaines cellules du système immunitaire (Hogan-Cann and Anderson, 2016).

### 3.2.2.2 *Physiologie du récepteur NMDA selon sa composition en sous-unités fonctionnelles*

Les différentes fonctions du récepteurs NMDA repose sur sa composition en sous unités GluN2 et GluN3. Il est admis que les sous unités GluN2A et B confèrent au canal des propriétés

de perméabilité au calcium plus importante, mais elles ont aussi plus d'affinité au blocage par l'ion  $Mg^{2+}$ . Au contraire, les sous unités GluN2C et D entraînent une perméabilité plus faible au calcium et moins d'affinité avec l'ion  $Mg^{2+}$  (Retchless *et al.*, 2012). La présence de la sous unité GluN3 diminue d'autant plus la perméabilité à l'ion  $Ca^{2+}$ . Cette particularité lui vaut un rôle de régulateur dans la libération du glutamate présynaptique (Larsen *et al.*, 2011). Par ailleurs, sa sensibilité au  $Mg^{2+}$  est de loin la plus faible parmi l'ensemble des sous-unités (Henson *et al.*, 2010; Pachernegg *et al.*, 2012).

### 3.3 Autoanticorps anti-récepteur NMDA

#### 3.3.1 Épitopes cibles des autoanticorps sur le récepteur NMDA

Nous savons, grâce aux travaux du Professeur Dalmau et de son équipe, qu'il existe dans l'EAI-RNMDA la présence d'anticorps dont la cible est sur la sous unité GluN1 du récepteur NMDA (Dalmau *et al.*, 2008b, 2008a). Il n'avait cependant pas encore été identifié de site de fixation de ces anticorps.

Ainsi, l'équipe du Professeur Lynch (Gleichman *et al.*, 2012) a procédé à une étude dans l'intention d'identifier quel était le ou les épitope(s) reconnu(s) par les anticorps anti-RNMDA dans la pathologie EAI-RNMDA, mis en évidence par immunofluorescence sur culture d'HEK ou sur coupes de tissus. Dans cette étude, le CSF de patients a été utilisé pour reconnaître préférentiellement les sites de fixation des anticorps. Ils ont d'abord mis en évidence que seul le domaine ATD de la sous-unité GluN1 était suffisant pour leur fixation et l'absence de sous-unité GluN2 ne modifiait pas la reconnaissance de la cible. En utilisant des techniques de mutagenèse sur culture de cellules HEK293 transfectées, ils ont montré que les acides aminés N368 et G369 jouaient un rôle crucial dans la reconnaissance de l'ATD par les autoanticorps anti-RNMDA. De fait, ces deux acides aminés (Asparagine et Glycine) sont localisés près de la charnière du clapet

formé par le domaine ATD. Lorsque l'anticorps se fixe sur cette zone charnière, il en résulte un encombrement stérique qui va altérer l'ouverture du canal du récepteur NMDA. Dans cette conformation, le canal ne peut plus correctement se fermer une fois ouvert, et son temps d'ouverture est rallongé. Ce phénomène s'annule quand la glycine en position 369 est mutée en isoleucine (G369I). La reconnaissance par l'anticorps de l'épitope est impossible et le récepteur retrouve son fonctionnement habituel (Gleichman *et al.*, 2012).

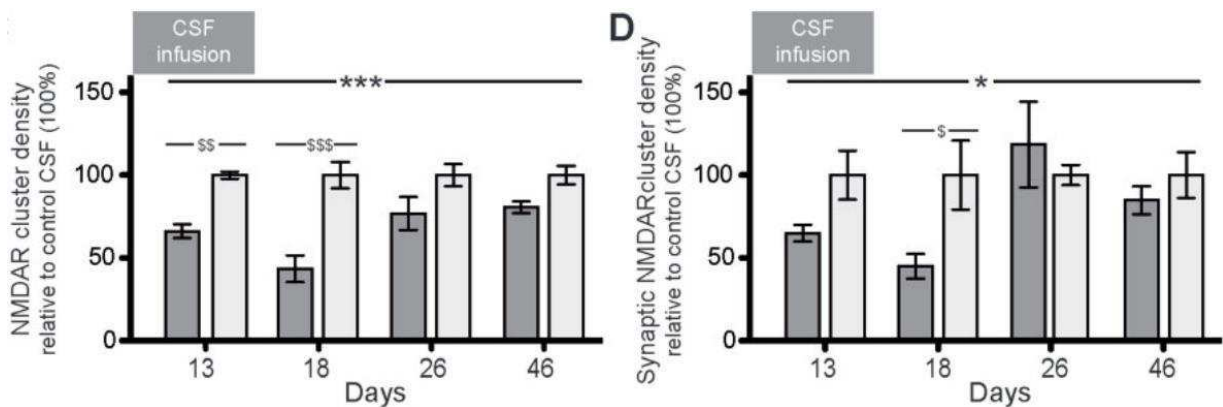
### 3.3.2 *Conséquences médiées par l'interaction autoanticorps/RNMDA*

#### 3.3.2.1 *Une activité perturbée allant jusqu'à la diminution des récepteurs NMDA synaptiques*

L'étude de Gleichman et coll. (2012) détaillée en 3.1, a mis en évidence un effet direct de la fixation des anticorps sur l'épitope composé des acides-aminés N368 et G369 en stabilisant le canal en condition ouverte. Cette modification non physiologique va perturber les propriétés électrophysiologiques du récepteur NMDA, faisant notamment intervenir les flux calciques en réponse à une stimulation glutamatergique (Gleichman *et al.*, 2012).

Les effets pathophysiologiques de la fixation des anticorps sur le RNMDA chez les patients atteints d'EAI-RNMDA ont été décrit précédemment. Des altérations comparables (troubles psychiatriques et neurologiques) ont pu être observées et mises en évidence, grâce à l'utilisation de tests comportementaux chez des souris ayant reçu une infusion intraventriculaire d'anticorps de patient EAI-RNMDA (Planagumà *et al.*, 2015). En étudiant davantage les effets au niveau tissulaire, ces auteurs ont aussi montré la diminution de la densité en récepteurs NMDA hippocampiques, dans un modèle de souris ayant reçu une infusion analogue (Planagumà *et al.*, 2015). Cette même étude montre la réversibilité des effets observés, il existe en effet un retour à la normale de la densité en RNMDA chez les souris à 26 jours après l'arrêt de l'infusion (fig.13).





**Figure 13** : Effets des anticorps de patients atteints d'EAI-RNMDA sur l'hippocampe de souris.

Représentation des taux de récepteurs NMDA totaux et synaptiques à différents temps après l'injection intraventriculaire d'IgG de patients (gris foncé) comparé aux contrôles (gris clair). D'après Planagumà *et al.*, 2015.

Hughes et coll. (2010) mettent en évidence une diminution des courants synaptiques des neurones hippocampiques médiée par les RNMDA, après avoir été en contact avec le CSF de patients. De manière analogue aux études de Planagumà, ils rapportent également une diminution drastique de la densité en RNMDA dans l'hippocampe de rats (Hughes *et al.*, 2010).

### 3.3.2.2 L'importance du récepteur EphB2 synaptique

Selon Mikasova et coll. (2012), une explication à la diminution de la densité en récepteurs NMDA au niveau de l'hippocampe trouverait sa réponse dans l'ancrage à la synapse des RNMDA par leur interaction avec les récepteurs à l'EphrinB2 (Mikasova *et al.*, 2012).

Les éphrines sont des protéines qui interagissent avec leur récepteur Eph, ayant une activité tyrosine kinase. Ces interactions moléculaires sont, entre autres, impliquées dans la formation de synapses et dans la plasticité neuronale (Lai and Ip, 2009). Le récepteur EphB2 a été identifié à la synapse de neurones hippocampiques de rat, il pourrait y jouer un rôle dans la stabilisation du RNMDA (Torres *et al.*, 1998).

Par la suite, il a été montré la colocalisation des récepteurs EphB2 et NMDA au niveau neuronal (Dalva *et al.*, 2000). L'interaction entre ces deux récepteurs, permet d'orienter l'emplacement du récepteur NMDA sur la synapse et son maintien dans la zone postsynaptique (Washburn *et al.*, 2020).

L'équipe de Laurent Groc s'est penchée sur les effets de la fixation d'anticorps au récepteur NMDA dans l'interaction RNMDA/EphB2R (Mikasova *et al.*, 2012). Ces auteurs procèdent à une incubation du CSF de patients atteint d'EAI-RNMDA sur des cultures de neurones hippocampiques. Ils mettent en évidence une diminution des récepteurs GluN1/GluN2A et GluN1/GluN2B à la surface des synapses glutamatergiques en fonction du temps, et un blocage de la potentialisation à long terme par les autoanticorps de patients. En effet, la fixation des anticorps entraîne une perturbation de l'interaction RNMDA/EphB2 et provoque un glissement du récepteur NMDA vers les zones extrasynaptiques bloquant complètement la plasticité synaptique (Mikasova *et al.*, 2012).

En 2014, Moscato *et coll.* (2014) se sont intéressés aux effets de la fixation des anticorps sur les RNMDA et leur devenir (Moscato *et al.*, 2014). Après avoir confirmé la diminution des clusters des RNMDA des neurones hippocampiques, les auteurs montrent que les anticorps de patients entraînent rapidement une augmentation du taux d'internalisation des RNMDA synaptiques, indépendamment de l'activité de ces récepteurs. Ces internalisations sont supposées être à l'origine de la diminution du courant synaptique médié par les RNMDA (Hughes *et al.*, 2010). Une fois internalisés, les RNMDA liés aux anticorps vont être dirigés vers les endosomes et lysosomes de recyclage, de façon similaire à une endocytose des RNMDA induite pharmacologiquement. Pour finir, ils montrent que ces événements, induits par les anticorps anti-RNMDA, n'entraînent pas

d'augmentation de l'expression des gènes *Grin* en vue de compenser la perte des récepteurs (Moscato *et al.*, 2014).

## **II Les modèles murins d'encéphalite autoimmune à anticorps anti-récepteur NMDA**

L'EAI-RNMDA ayant été identifiée il y a une quinzaine d'année, l'étiologie reste peu connue et les symptômes très diversifiés. Ainsi, il a été nécessaire d'étudier cette pathologie en préclinique afin de mettre en évidence les mécanismes moléculaires sous-jacents et d'élaborer, entre autres, des thérapies adaptées. Finalement, différents modèles de la pathologie ont été développés uniquement chez la souris. Parmi eux, on distingue des modèles obtenus suite à une immunisation active de l'animal, les modèles passifs induits par l'injection d'anticorps anti-RNMDA.

### **1 Modèles murins par immunisation active**

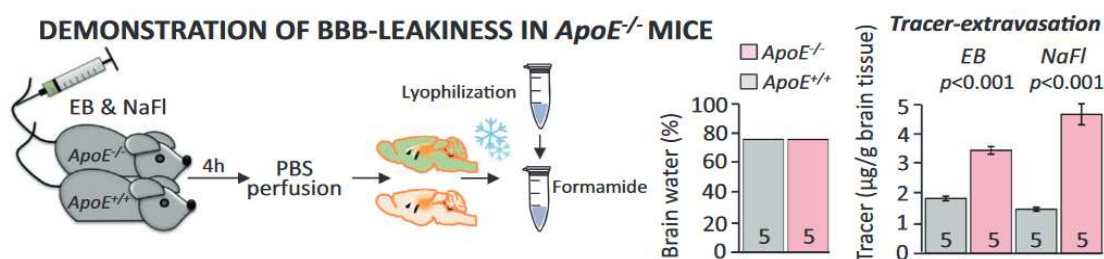
L'immunisation active repose sur l'injection d'une/de protéine(s) ou d'un/de peptides cible(s) dans une émulsion contenant des adjuvants, afin de déclencher une réponse immunitaire et la production d'anticorps dirigés contre la/les cible(s).

#### *1.1 Modèle de Pan et collaborateurs*

Le premier modèle murin basé sur une immunisation active a été développé par l'équipe du Professeur Ehrenreich (Pan *et al.*, 2018). Ce Dernier est basé sur l'utilisation d'une souche murine, déficiente en Apolipoprotéine E (ApoE), cette déficience entraîne une diminution de l'étanchéité de la barrière hémato-encéphalite (BHE), et donc une diminution de l'efficacité de cette barrière de défense su SNC (Methia *et al.*, 2001). L'étude s'est portée à la fois sur des animaux mâles et

femelles, en accord avec les observations réalisés en clinique, touchant à la fois les hommes et les femmes.

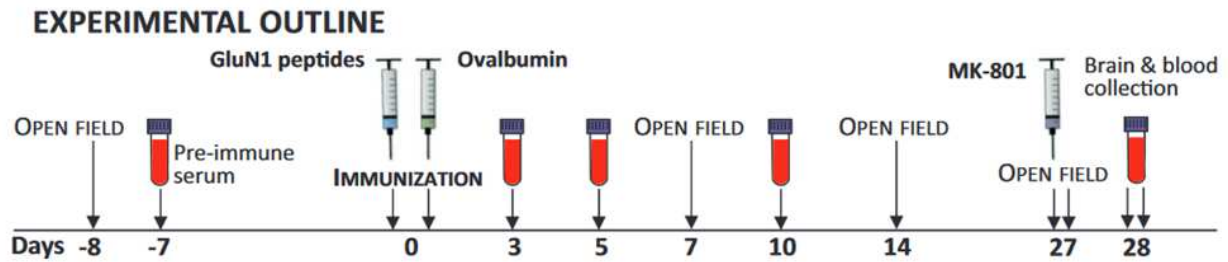
Avant de procéder à l'immunisation des animaux ApoE, il a d'abord été montré les effets de la déficience en ApoE sur la BHE. L'altération de la BHE chez ces animaux se traduit par une extravasation accrue des traceurs fluorescents dans le parenchyme cérébral depuis la circulation sanguine (fig. 14). Toutefois ceci n'est pas associé à un déficit comportemental (Pan *et al.*, 2018).



**Figure 14 :** Mise en évidence de la perméabilité de la BHE chez des souris ApoE.

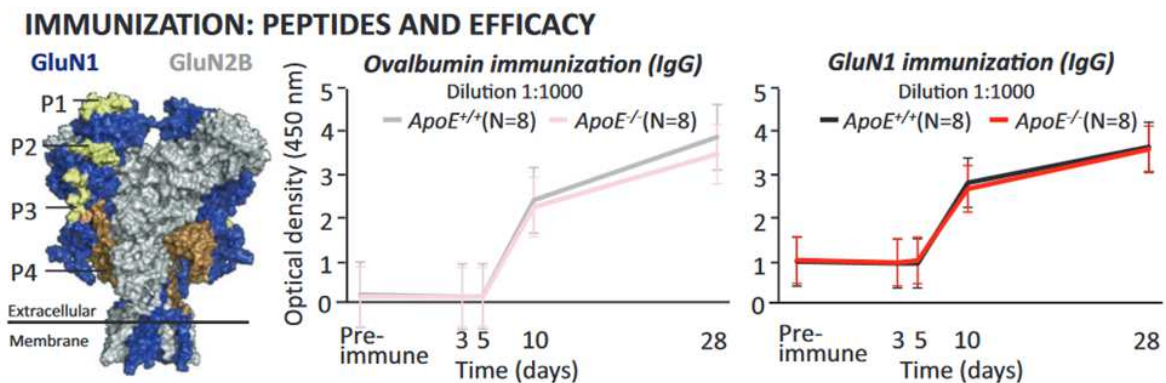
Deux traceurs fluorescents ont été utilisés : le bleu Evans (EB) et la fluorescéine (NaFl) par injection dans la veine caudale. Une fois les cerveaux récoltés, les fluorophores sont extraits avec le formamide et quantifiés. D'après Pan *et al.*, 2018.

L'induction du modèle consiste à une injection unique en sous-cutanée d'un mélange de quatre peptides issus du domaine extracellulaire de la sous-unité GluN1 du RNMDA (RNMDA1) émulsionné dans un volume équivalent d'adjuvant complet de Freund (CFA). L'utilisation d'adjuvants permet d'optimiser la réponse immunitaire en stimulant l'immunité innée contre le peptide cible (Constantinescu and Hilliard, 2005). En parallèle, une immunisation dite contrôle est réalisée *via* l'injection d'un peptide contrôle : l'ovalbumine, combiné au CFA (fig. 15).



**Figure 15 :** Plan expérimental.  
D'après Pan *et al.*, 2018.

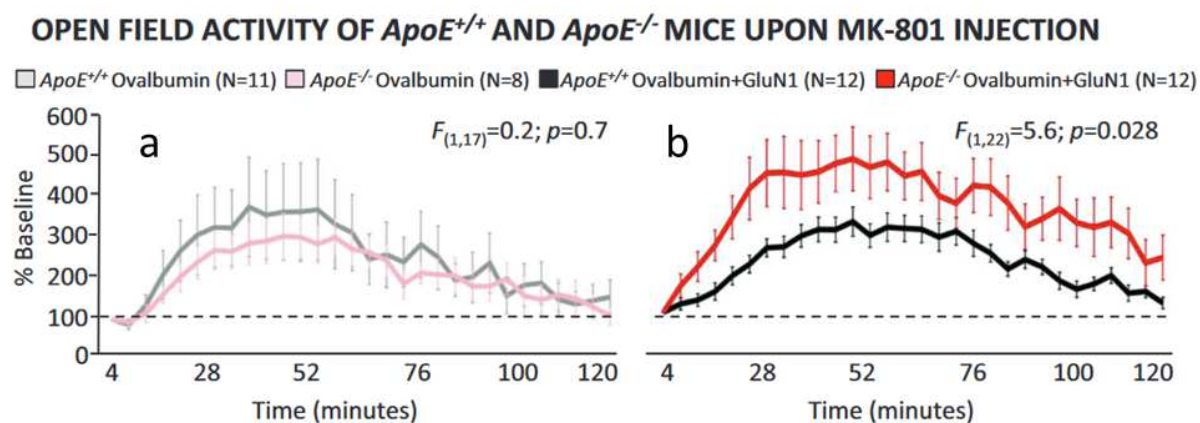
L'efficacité de l'immunisation est attestée par le dosage grâce au test ELISA des anticorps anti-GluN1 et anti-Ovalbumine, chez les animaux ApoE<sup>-/-</sup> et ApoE<sup>+/+</sup> avant immunisation, et à 3, 5, 10 et 18 jours post-immunisation dans le plasma (fig. 16). L'immunisation entraîne un niveau élevé d'IgG spécifique circulant. La réponse dans le temps se révèle similaire entre les peptides RNMDA1 et l'albumine, quel que soit le génotype des animaux ApoE (fig. 16).



**Figure 16 :** Identification des peptides et recherche des anticorps dans le sérum des animaux.

À gauche : Sous unités GluN1 annotées avec les 4 peptides utilisés pour l'immunisation, situés sur le domaine extracellulaire de la sous unité. Au milieu et à droite : développement dans le temps des IgG anti-ovalbumine et anti-GluN1-AB après immunisation des souris ApoE<sup>-/-</sup> et ApoE<sup>+/+</sup>. Les dosages sont obtenus à partir du plasma des animaux grâce à l'utilisation de tests ELISA (technique d'immunoabsorption par enzyme liée), qui a été prélevé à 3, 5 et 10 jours post-immunisation. D'après Pan *et al.*, 2018.

Comme expliqué dans la partie *Chapitre 2.2.2.(a)*, l'EAI-RNMDA se traduit notamment par un niveau élevé d'anxiété chez les patients. Afin de déterminer l'efficacité de l'immunisation et du développement de la pathologie, Pan et coll. (2018) ont donc réalisé un test comportemental d'*open field*, permettant d'évaluer le degré d'anxiété et d'activité moyenne des animaux. Ce test est répété deux fois, à 10 jours post-immunisation et à 14 jours post-immunisation (fig. 17). Ce test n'a révélé aucune différence entre les génotypes avant immunisation ou encore 7 et 10 jours après immunisation, quel que soit le type d'immunisation, peptides RNMDA1 ou albumine. À 4 semaines post-injection, les animaux  $ApoE^{-/-}$  ayant reçu une injection de MK-801 (antagoniste non compétitif du récepteur NMDA) montrent une hyperactivité, en opposition aux animaux contrôles  $ApoE^{+/+}$  qui montrent un comportement normal après injection de MK-801 (fig. 17).



**Figure 17 :** Effets de MK-801 chez les animaux  $ApoE^{-/-}$  et  $ApoE^{+/+}$  après immunisation par les peptides GluN1 ou ovalbumines.

(a) Les animaux  $ApoE^{-/-}$  et  $ApoE^{+/+}$  immunisés avec l'ovalbumine et ayant reçu le MK-801 ne montrent pas de différence de comportement, évalué par l'*open field*. (b) Au contraire, les animaux  $ApoE^{-/-}$  immunisés avec l'ovalbumine, les peptides GluN1 et ayant reçu une injection de MK-801 montrent un comportement hyperactif comparés aux animaux  $ApoE^{+/+}$ . D'après Pan *et al.*, 2018.

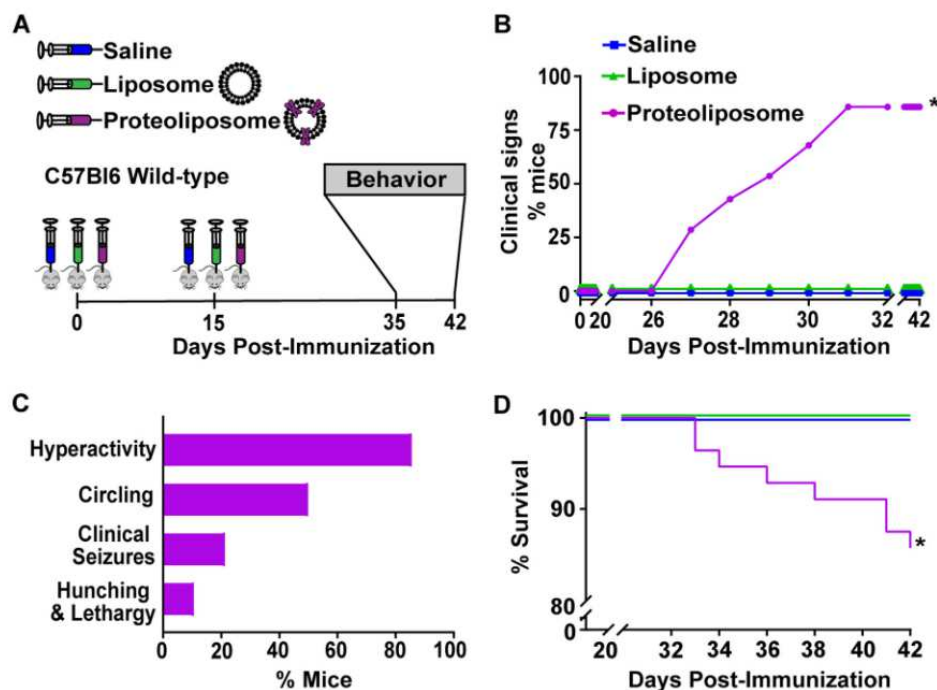
Pan et coll. (2018) en déduisent que des perturbations liés au MK-801 nécessitent au préalable une ouverture de la BHE et un titre d'auto-anticorps suffisant (permettant d'atteindre une

perte des RNMDA synaptiques suffisante) (Pan *et al.*, 2018). Ce modèle mis en place par Pan et coll. (2018) présente donc une production d'IgG spécifiques contre le peptide cible en réponse à l'immunisation et des troubles comportementaux associés à une altération de la BHE suggérant la nécessité du passage des auto-anticorps à travers cette barrière pour induire un effet comportemental.

### 1.2 *Modèle de Jones et collaborateurs*

Jones et coll. (2019) pour le développement de leur modèle murin, ont procédé à une immunisation active *via* l'utilisation de liposomes porteurs de RNMDA tétramériques composés des sous-unités GluN1/GluN2 (holorécepteurs hétérodimériques) (Jones *et al.*, 2019). Le complexe formé par l'association de ces récepteurs tétramériques et de liposomes est alors appelé protéoliposome. Ces derniers ont alors été injectés à des animaux sauvages adultes (souris C57BL/6) selon un protocole d'immunisation classique, à savoir 4 injections sous-cutanées réparties sur le dos de l'animal. Cette immunisation est suivie d'un rappel immunologique dit « *boost* » 2 semaines plus tard. Conjointement, deux groupes d'animaux contrôles recevront soit une injection de solution saline, soit des liposomes « nus » non porteurs de RNMDA (fig. 18A).

Dès 4 semaines post-immunisation, seuls les animaux ayant reçu des protéoliposomes montrent des signes neurologiques. 86 % de l'ensemble des animaux du groupe protéoliposomes présenteront des comportements anormaux 6 semaines après immunisation (fig. 18B-C).



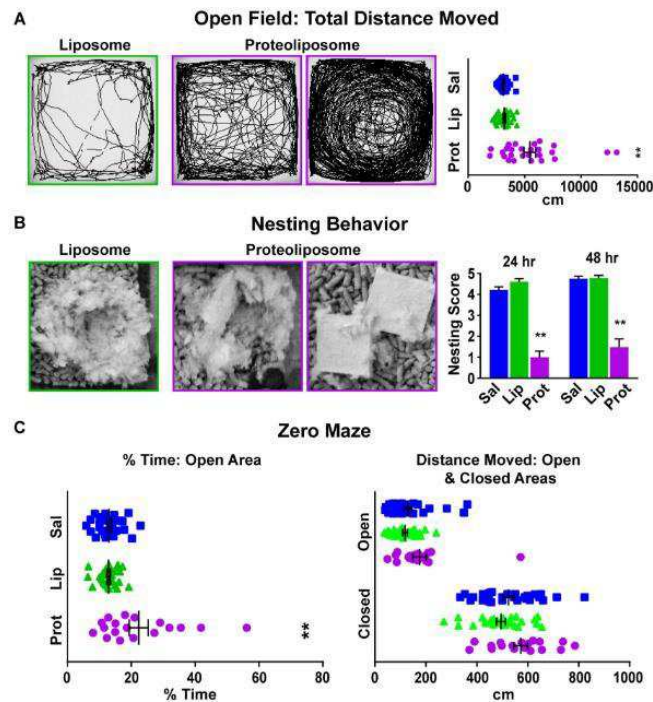
**Figure 18 : Phénotype clinique des animaux traités avec les protéoliposomes.**

(A) Chronologie des traitements et des tests comportementaux. Les souris sauvages adultes reçoivent en injection sous-cutanée au jour 0 et au jour 15 les protéoliposomes (violet) ou les liposomes contrôles (vert) ou la solution saline (bleu). (B) Les signes cliniques ont été relevés à partir de la première injection. (C) Détail des signes cliniques observés chez les animaux traités avec les protéoliposomes. (D) Courbe de survit Kaplan-Meier des animaux traités avec les protéoliposomes et les animaux contrôles. D'après Jones *et al.*, 2019.

Ces mêmes animaux sont soumis à une combinaison de test comportementaux 35 jours après l'immunisation afin d'évaluer l'acquisition potentielle d'un phénotype par l'immunisation. Un comportement hyperactif est mis en évidence chez les animaux ayant reçu les protéoliposomes par le test de l'open field (fig. 19A). On remarque étrangement que les animaux traités passent significativement plus de temps dans les bras ouverts considérés comme aversif et anxiogène lors de comportements normaux (fig. 19C). La construction d'un nid par les animaux dans leur cage traduisant leur motivation à réaliser une tâche est aussi affectée dans le groupe protéoliposomes. En effet, si 6 semaines post-immunisation les animaux contrôles construisent des nids corrects, les



animaux ayant reçu des protéoliposomes ont peu touché au matériel de nidification (fig. 19B). Enfin, le test du labyrinthe en O ou O maze est habituellement utilisé pour identifier un comportement anxieux.

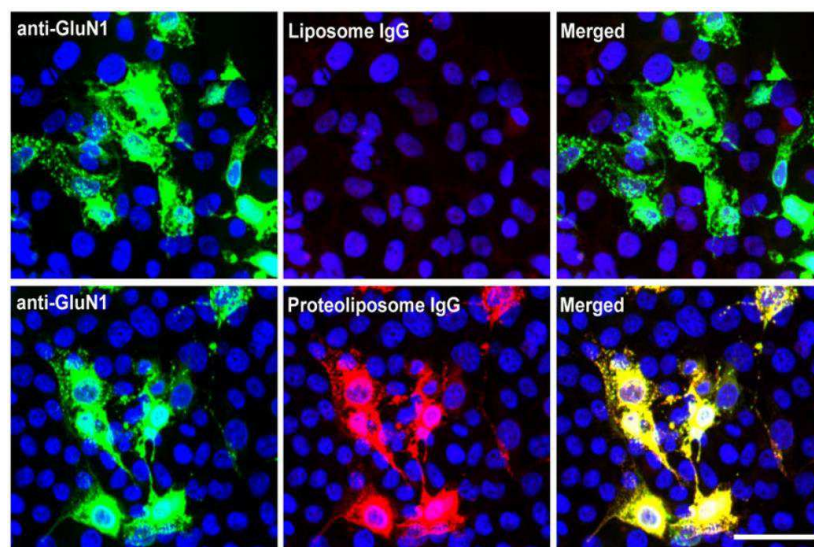


**Figure 19 : Evaluation comportementale des animaux 35 jours après traitement par protéoliposome ou liposome.**

(A) Représentation de l'activité ambulatoire dans l'open field des animaux contrôle (entouré en vert), et de deux animaux traités avec les protéoliposomes (entourés en violet) afin de d'identifier un comportement hyperactif. La distance totale parcourue est représentée sous forme de graphique avec les protéoliposomes (violet), les liposome (vert) et les solution saline (bleu). (B) Représentation photographique des nids réalisés par un animal contrôle comparé aux nids de deux animaux protéoliposomes. Les nids ont été évalués à 24 et 48h, comme représenté sur le graphique. (C) Evaluation de l'anxiété des animaux par le labyrinthe en O. Ont été mesurés, le temps passé dans les bras ouverts, et la distance totale parcourue dans les bras ouverts et les bras fermés. D'après Jones *et al.*, 2019.

La présence d'auto-anticorps anti-RNMDA1 dans le sérum des animaux traités a été mis en évidence 6 semaines post-immunisation grâce à l'utilisation de culture de cellules humaines HEK-293, exprimant à la fois des combinaisons GluN1/GluN2A et GluN1/GluN2B. En parallèle,

les cellules HEK ont été immunomarqué par un anticorps commercial anti-GluN1. Il a ainsi été mis en évidence un co-marquage entre l'anticorps commercial anti-GluN1 et les IgG d'animaux protéoliposomes, au contraire des animaux liposome qui ne présentent pas d'IgG anti-RNMDA dans leur sérum (fig. 20).



**Figure 20 : Détection des anticorps sériques spécifique au récepteur NMDA.**

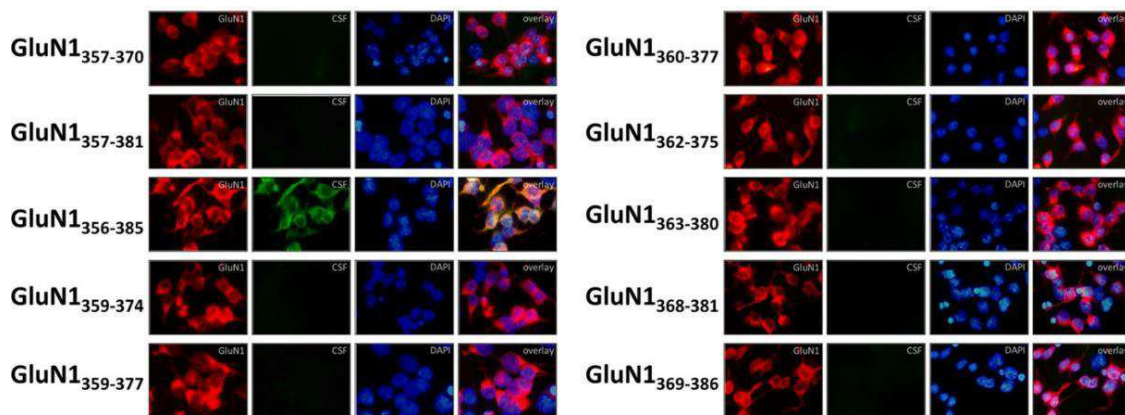
Cellules HEK-293FT transfectées avec les sous unités GluN1/GluN2A sont marqués avec un anticorps anti-GluN1 commercial (à gauche en haut et en bas en vert) ou avec les IgG provenant de souris traitées avec le protéoliposome (en bas en rouge). La superposition des images montre une colocalisation (en bas à droite en jaune). Les IgG provenant des animaux traités avec les liposomes (en haut au milieu) ne montrent aucun marquage. D'après Jones *et al.*, 2019.

Ce modèle présente des similitudes avec la symptomatologie des patients EAI-RNMDA que ce soit de par la production d'auto-anticorps anti-GluN1 circulants mais aussi de par la présence d'un phénotype comportemental.

### 1.3 Modèle de Ding et collaborateurs

Ding et coll. (2021) ont développé un modèle murin très similaire au niveau de la technique d'immunisation à celui de Wagnon et coll. (2020) développé dans notre laboratoire, à l'exception

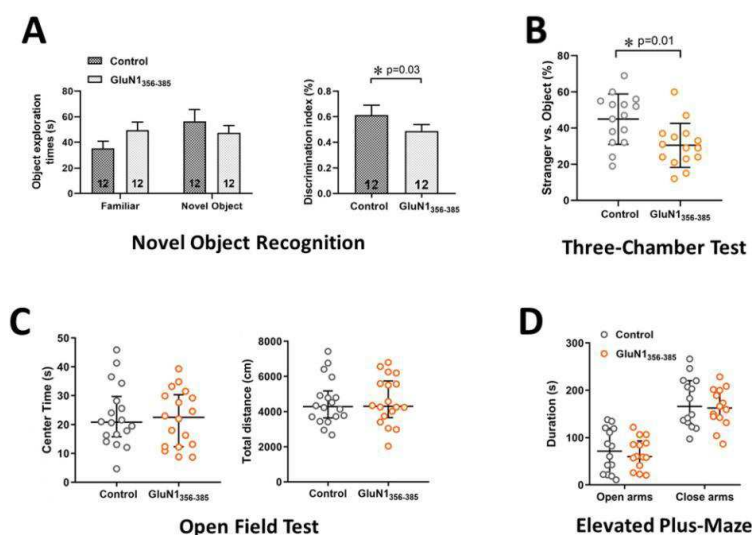
que des femelles C57BL/6 ont été utilisées pour induire ce modèle et non des mâles. En effet, le peptide immunogène issu de la sous-unité GluN1 du RNMDA est injecté par voie sous-cutanée dans une émulsion de CFA et de *Mycobacterium tuberculosis*. En complément, de la toxine pertussique est injectée en intra-péritonéale lors de l'induction ainsi que 48 heures plus tard. Finalement, les animaux immunisés reçoivent deux doses « booster », à 4 et 8 semaines post-immunisation (Ding *et al.*, 2021). De plus, le peptide utilisé par l'équipe de Ding et certes issu du domaine extracellulaire de la sous-unité GluN1 tout comme celui utilisé dans notre modèle mais il ne possède toutefois pas la même séquence. En effet, Ding et coll. (2021) ont déterminés leur peptide parmi 10 peptides potentiels, avec lesquels les animaux ont été immunisés. Ils ont ensuite cherché la présence d'auto-anticorps dans le CSF de l'ensemble de ces animaux, et ont déterminé que seul le peptide GluN1<sub>356-385</sub> était capable d'induire la production d'auto-anticorps spécifiques de GluN1 (fig. 21).



**Figure 21** : Caractérisation des autoanticorps du CSF de souris immunisées avec des peptides de la sous unité GluN1.

Détection par immunofluorescence des autoanticorps induits par les peptides du domaine ATD de la sous unité GluN1, dirigés contre la protéine GluN1 des cellules HEK293. D'après Ding *et al.*, 2021.

Les tests comportementaux ont été réalisés 12 semaines après la primo-injection du protocole d'immunisation. Dans le test de reconnaissance d'un nouvel objet, les animaux GluN1 montrent un temps d'exploration plus faible sans toutefois être significatif, 45s contre 55s pour les animaux contrôles, du nouvel objet et une diminution de l'index de discrimination des objets nouveaux (fig. 22A). Ces observations mettent en évidence des troubles mnésiques chez les animaux GluN1 comparés aux animaux contrôles. Le test des 3 chambres, consiste à tester le comportement social des animaux, à la fois en termes de sociabilité et de nouveauté social. Lors de ce test, les animaux GluN1 ont significativement passés moins de temps avec la souris étrangère comparés aux animaux contrôles (fig. 22B). Ces observations renforcent le signe d'un trouble mnésique chez les animaux GluN1, qui pourrait aussi être due à une anxiété en présence d'un nouvel animal. Cependant, les tests d'anxiété (open field) et de comportement de type dépressif (labyrinthe en croix surélevé) n'ont montré aucune différence entre les animaux GluN1 et leur contrôle (fig. 22C-D).

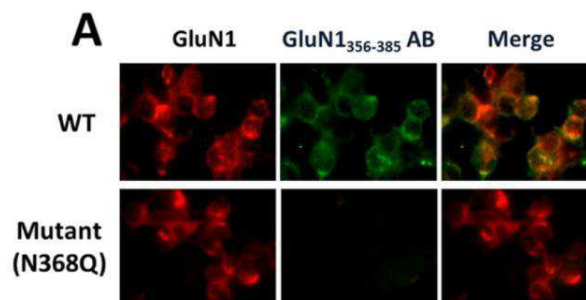


**Figure 22 :** Changements comportementaux des souris 12 semaines après l'immunisation avec le peptide GluN1<sup>356-385</sup>.

(A) Temps d'exploration et indice de discrimination du test de reconnaissance de nouveaux objets des souris 12 semaines après l'immunisation. (B) Test des 3 chambres chez les souris 12 semaines après l'immunisation. (C) Les

souris ont été évaluées dans l'open field à la fois pour le temps passé dans la zone centrale (à gauche) et pour la distance totale pendant un essai de 30 minutes. (D) Les souris ont été évaluées dans le labyrinthe en croix surélevé pour le temps passé dans les bras ouverts (à gauche) et les bras fermés (à droite) pendant un essai de 5 minutes. D'après Ding *et al.*, 2021.

La mise en évidence de la présence d'auto-anticorps chez les animaux GluN1 a été montrée dans la figure 23. Cependant, afin de confirmer la spécificité des auto-anticorps produits par les animaux immunisés, Ding et coll. (2021) ont muté l'acide aminé N368 du domaine extracellulaire de GluN1, nécessaire à la reconnaissance et à la fixation des anticorps, dans les cellules HEK transfectées. Ils observent après incubation des auto-anticorps sur les cultures d'HEK, qu'il n'y a plus de reconnaissance par les auto-anticorps de l'épitope situé sur GluN1 (fig.23).



**Figure 23 :** Analyse de l'épitope des autoanticorps GluN1<sub>356-385</sub>.

Les autoanticorps ont été incubés sur des cellules HEK293 transfectées avec la sous unité GluN1 ou une construction mutée sur l'acide aminé 368 de la sous unité GluN1 (N368Q). D'après Ding *et al.*, 2021.

Ce modèle développé par Ding et coll. (2021), montre de manière surprenante que le peptide GluN1<sub>359-377</sub> qui ne diffère que par l'absence du dernière acide aminé, comparé au modèle de Wagnon et coll. (2020), n'entraîne pas la production d'anticorps anti-RNMDA capable de reconnaître les sous unités GluN1/2 des cellules HEK transfectées. De plus, la séquence sélectionnée de 29 acides aminés, s'avère comporter l'ensemble de la séquence sélectionnée par

Wagnon et coll. (2020). Cette étude montre l'importance de l'immunogénicité des séquences peptidiques.

L'ensemble de ces modèles d'immunisation actives montre la multiplicité des épitopes potentiels du domaine extracellulaire de la sous-unité GluN1 du récepteur NMDA. Bien que les mécanismes intrathécaux de productions des auto-anticorps soient nécessaires à la compréhension de la pathologie, les modèles murins d'injections d'anticorps de patients, ou générés par les modèles, permet de sélectionner spécifiquement les anticorps d'intérêt et d'identifier leurs effets respectifs en procédant à une injection directe dans des régions choisies du SNC.

## 2 Modèles murins par injection d'anticorps

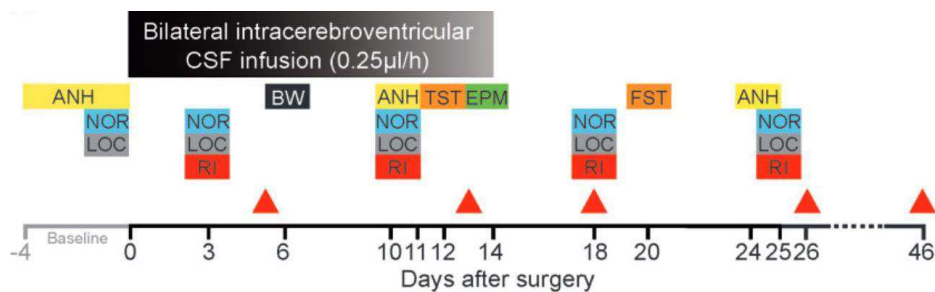
Ces modèles sont différents de ceux décrits auparavant. Dans les modèles induits par injection d'anticorps, le système immunitaire des animaux n'est pas recruté et il n'y a donc pas de production endogène d'auto-anticorps en réponse à une immunisation. Dans ce cas, les anticorps pathogènes dirigés contre la sous-unité GluN1 du RNMDA sont directement injectés le plus souvent par voie intra-ventriculaire. Ces modèles qualifiés d'immunisation passive présentent une utilité dans l'étude directe de la fixation des anticorps aux récepteurs NMDA et des effets qui en résultent, au niveau cellulaire et phénotypique, tout en s'affranchissant des événements en amont liés à l'immunisation.

### 2.1 *Modèle de Planagumà et collaborateurs*

Ce modèle est un des premiers modèles murins développés, afin de transposer la physiopathologie de l'homme, mais aussi de procéder à des études plus précises sur les interactions entre les RNMDA exprimés par les neurones et les anticorps ciblant spécifiquement ce dernier (Planagumà *et al.*, 2015).

Pour induire un modèle murin de l'EAI-RNMDA, Planagumà et coll. (2015) ont utilisé des anticorps anti-RNMDA provenant du CSF de 25 patients possédant un titrage élevé d'auto-anticorps RNMDA. L'ensemble des échantillons ont été regroupés pour l'injection. Parallèlement 25 échantillons de patients ne possédant pas d'auto-anticorps RNMDA et mis en commun ont été utilisés pour l'injection du groupe contrôle. L'injection des anticorps est réalisée grâce à l'utilisation d'une pompe osmotique permettant une infusion pendant 14 jours chez des souris C57BL6/J mâles âgées de 8 semaines.

Une évaluation de l'induction de la pathologie *via* des tests comportementaux a lieu à différents temps après le début de l'injection de CSF (fig. 24). Quatre tests ont été effectués, le test de reconnaissance de nouvel objet, le test de préférence au sucrose, le test de suspension par la queue et le test de nage forcée. Ces tests évaluent respectivement, les capacités mnésiques, l'anhédonie, et les comportements de type dépressif chez les animaux.

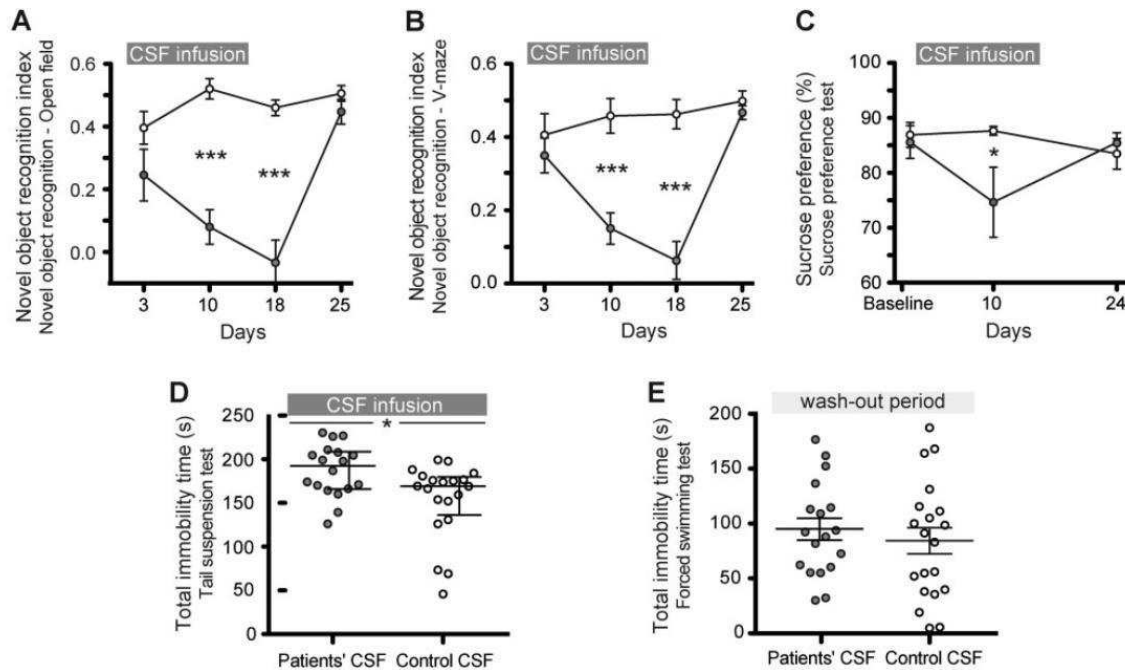


**Figure 24 : Chronologie expérimentale, programme des tests cognitifs et mise à mort des animaux.**

Au jour 0, la pompe osmotique et les cathéters sont placés et l'infusion bilatérale du CSF de patients ou de contrôles débute. L'injection dure 14 jours. La mémoire (test de reconnaissance de nouvel objet NOR), l'anhédonie (test de préférence au sucrose ANH), le comportement de type dépressif (test de suspension par la queue TST et test de nage forcée FST), l'anxiété (test clair et obscur BW et le test du labyrinthe en croix surélevé EPM), l'agressivité (test d'intrusion d'un résident RI) et l'activité locomotrice (LOC) ont été évalués aux jours indiqués. Le test NOR s'est déroulé dans un open field et dans un labyrinthe en V, chez deux groupes de souris distincts. D'après Planagumà *et al.*, 2015

L'effet mesuré qui a le plus d'impact durant les 14 jours d'injection est le test de reconnaissance de nouvel objet, à la fois dans l'open field et dans le labyrinthe en V (fig. 25A-B). En effet, les animaux ayant reçu une injection de CSF de patients montrent une diminution progressive de l'index de reconnaissance de l'objet, indiquant la présence d'un déficit mnésique. On remarque 11 jours après la fin de l'injection, un retour des capacités mnésiques à un état physiologique chez les animaux. Au jour 10 post-injection, les animaux ayant reçu l'injection de CSF de patients montre une diminution de leur préférence à l'eau sucrée comparé aux animaux ayant reçus l'injection contrôle, indiquant un comportement d'anhédonie (fig. 25C). Lors des deux tests de mesure du comportement de type dépressif, 12 jours après le début de l'injection, les animaux ayant reçu le CSF de patients montre un temps total d'immobilité plus élevé que les animaux contrôles avec le test de suspension par la queue (fig. 25D). Cependant, à 6 jours après l'arrêt de l'injection, aucune différence n'a été relevé lors du test de nage forcée, l'injection des anticorps chez les animaux traités n'a donc pas provoqué de comportement de type dépressif (fig. 25E).

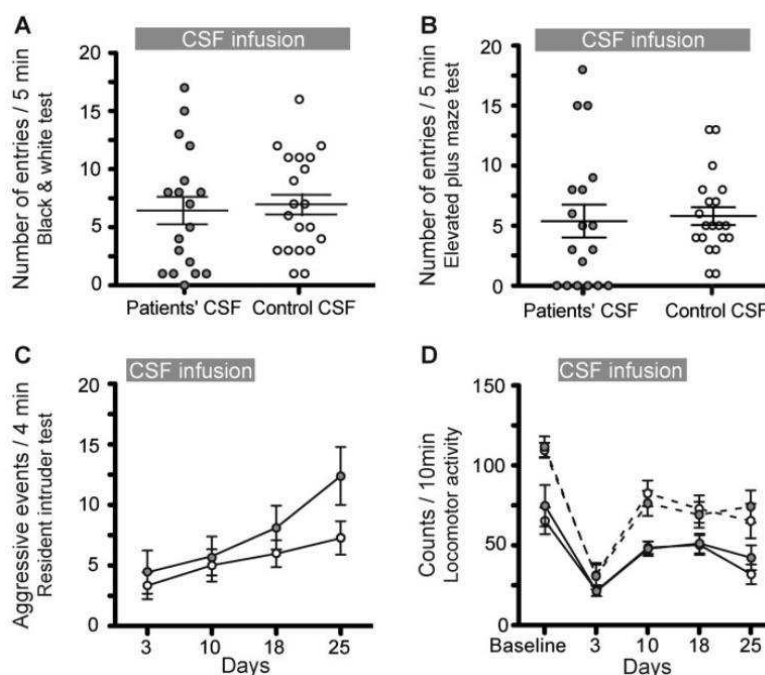




**Figure 25** : L'infusion de CSF de patients contenant des auto-anticorps anti-RNMDA entraîne des déficits de mémoire, une anhédonie et un comportement de type dépressif.

(A et B) L'indice de reconnaissance d'objets nouveaux dans des systèmes en open field (A) ou en labyrinthe en V (B) chez des animaux traités avec du CSF de patients (cercles gris) ou du CSF témoin (cercles blancs). Un indice élevé indique une meilleure mémoire de reconnaissance des objets. (C) Préférence pour l'eau contenant du sucrose chez les animaux ayant reçu le CSF des patients (gris) ou le CSF témoin (blanc). Des pourcentages plus faibles indiquent une anhédonie. (D et E) Temps total d'immobilité dans le test de suspension par la queue pendant la période d'injection (D, jour 12) et dans le test de nage forcée après la période d'injection (E, jour 20). D'après Planagumà *et al.*, 2015

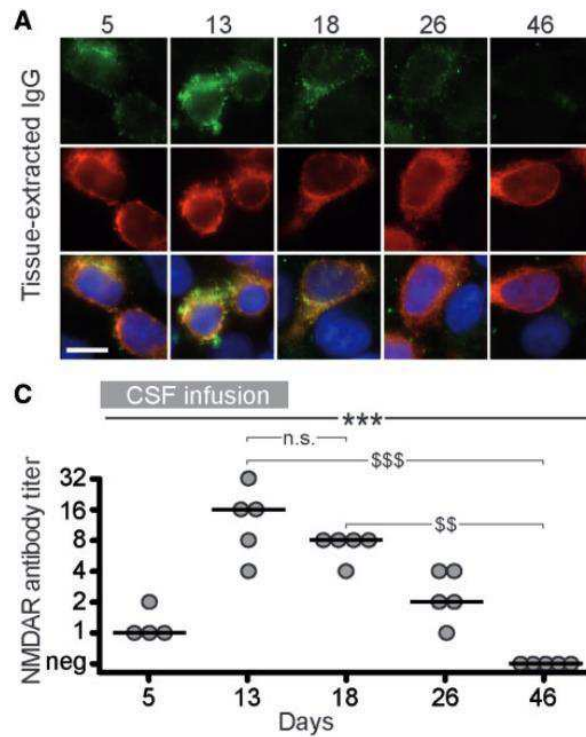
En complément de ces tests comportementaux, Planagumà et coll. (2015) n'ont observé aucuns troubles moteurs ni de comportements anxieux ou agressifs parmi ces deux groupes d'animaux (fig. 26).



**Figure 26 :** L'infusion de CSF de patients contenant des anticorps RNMDA ne modifie pas les tests d'anxiété, d'agressivité et d'activité locomotrice.

(A et B) Nombre d'entrées dans les compartiments clairs ou ouverts pendant une période de 5 minutes dans un test standard clair et obscur (A, 6e jour) ou de labyrinthe en croix surélevé (B, 14e jour) chez les animaux traités avec le CSF des patients (cercles remplis) ou le CSF témoin (cercles ouverts). (C) Nombre d'événements agressifs sur une période de 4 minutes dans un test d'intrusion d'un résident chez les deux groupes d'animaux. (D) Comptage des mouvements horizontaux (lignes pleines) et verticaux (lignes pointillées) sur une période de 10 minutes dans les deux groupes d'animaux. D'après Planagumà *et al.*, 2015.

Afin de confirmer que l'origine des troubles observés était induite par les auto-anticorps du CSF injecté, les IgG ont été extraites de différentes régions cérébrales des animaux à plusieurs temps pendant et après la fin de l'injection. Ils observent alors d'une part une immunoréactivité des IgG extraites à l'aide de cellules HEK exprimant la sous-unité GluN1 du RNMDA à leur surface (fig. 27A), et d'autre part une corrélation entre la concentration en auto-anticorps RNMDA présents dans le parenchyme cérébral et la durée d'injection du CSF (fig. 27C).



**Figure 27 :** Les IgG humaines extraites du cerveau de souris injectées avec le CSF de patients EAI-RNMDA sont spécifiques des RNMDA.

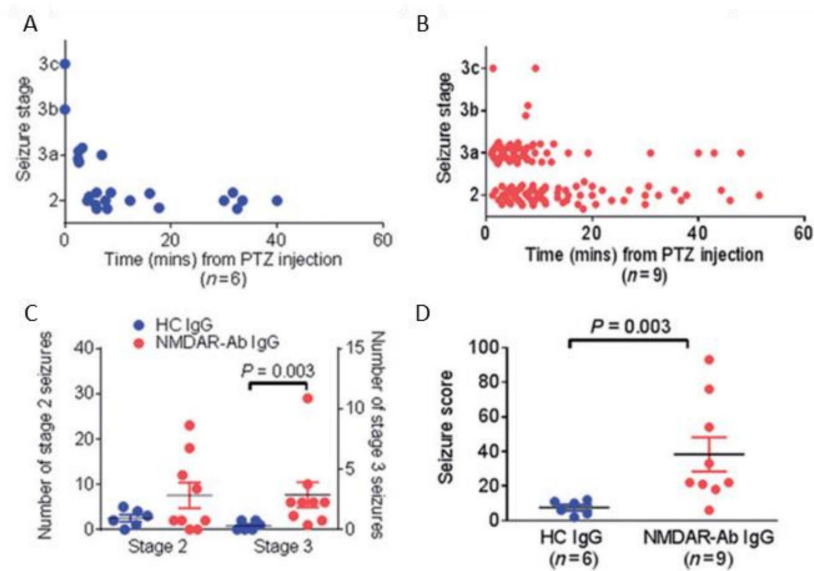
(A) Cellules HEK293 exprimant la sous-unité GluN1 du RNMDA immunomarquées avec des fractions d'IgG extraites à l'acide (rangée supérieure en A) provenant de l'hippocampe de souris injectées avec le CSF de patients et mis à morts aux jours indiqués. La réactivité maximale avec les cellules exprimant GluN1 a été notée dans les fractions d'IgG extraites par acide aux jours 13 et 18 (A) ; ce qui indique que la réactivité des fractions extraites par acide correspond aux anticorps IgG qui se sont liés aux récepteurs RNMDA du cerveau. La deuxième ligne montre la réactivité avec un anticorps monoclonal GluN1, et la troisième ligne la colocalisation de l'immunomarquage. Barres d'échelle = 10 mm. (C) Quantification du titre des anticorps anti-RNMDA dans les fractions extraites d'IgG de l'hippocampe d'animaux traités avec du CSF de patients. D'après Planagumà *et al.*, 2015.

## 2.2 Modèle de Wright et collaborateurs

Ce modèle utilisé par Wright et collaborateur est inspiré de celui de Planagumà (Planagumà *et al.*, 2015), que nous venons de décrire. Cependant, le modèle animal est basé sur des femelles C57BL/6J et non des mâles (Wright *et al.*, 2015).

Ce modèle a été développé dans le but d'analyser l'épileptogénicité des auto-anticorps anti-RNMDA. Afin de tester la sensibilité des animaux aux crises d'épilepsie couplées à l'injection des auto-anticorps RNMDA, Wright et coll. (2015) ont utilisé une molécule pro-convulsivante, le pentylenetetrazol (PTZ) à raison de 40mg/kg par injection intra-péritonéale, 48h après les injections d'IgG. Les souris ont été observées et filmées durant 60 min en parallèle de l'enregistrement EEG.

L'injection des IgG seuls sans utilisation de PTZ n'a aucun effet sur l'activité épileptique, et l'enregistrement EEG ne montre pas d'augmentation de la puissance moyenne dans aucune des fréquences, qui pourraient révéler une activité épileptique spontanée tout au long des 21 jours d'enregistrement. L'observation des animaux à la suite de l'injection de PTZ met en évidence un nombre de crises épileptiques supérieur chez les animaux ayant reçus les IgG anti-RNMDA de patients comparés aux animaux ayant reçus les IgG contrôles de sujets sains (fig. 28A-B). Il existe une tendance à ce que les crises d'épilepsie débutent plus tôt après l'injection chez les animaux IgG RNMDA, bien que le nombre de crises de stade 2 ne soit pas différent inter-groupes (fig. 28C). Pourtant, les crises de stade 3 ont été observé chez tous les animaux IgG RNMDA comparé aux animaux IgG contrôles sains, et le nombre de crises de stade 3 par souris est plus élevé chez les animaux IgG RNMDA comparé aux animaux contrôles (fig. 28D).

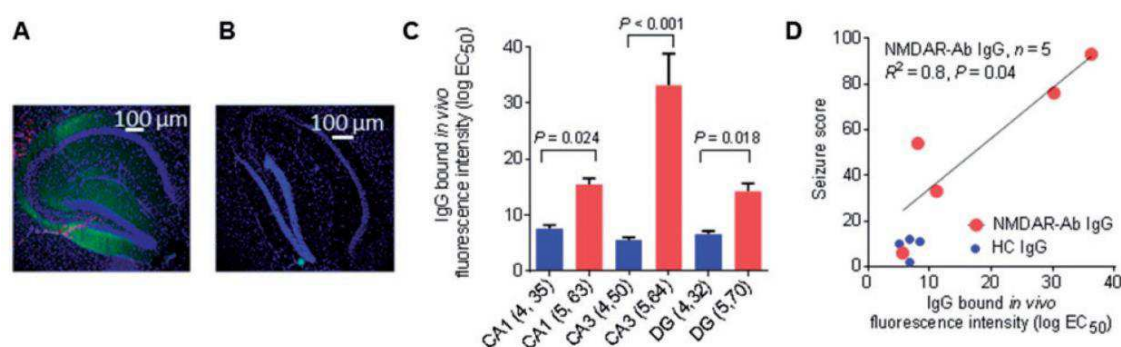


**Figure 28 : Effets épiléptogènes d'une injection unique d'anticorps anti-RNMDA.**

(A-D) Ethogrammes des groupes contrôles sains (C) et IgG RNMDA (D) des souris injectées la suite de l'injection de PTZ, montrant le délai d'apparition des différents événements épileptiques durant les 60 min d'observation avant la mise à mort. (E) Les crises de stade 3 mais pas de stade 2 sont plus fréquentes chez les souris injectées avec les IgG anti-RNMDA à la suite de l'injection de PTZ. (F) Le score moyen calculé durant les 60 min d'observation à la suite du PTZ est plus élevé pour les souris IgG RNMDA que les souris IgG contrôles sains. D'après Wright *et al.*, 2015

Wright et coll. (2015) ont ensuite examiné si les comportements épileptiques étudiés étaient liés aux IgG humaines provenant des injections de CSF. Pour ce faire, les cerveaux des animaux ont été prélevés à la fin des observations après injection du PTZ. Par la suite, les coupes d'hippocampes murines ont été immunomarquées grâce à des IgG anti-humain permettant de révéler la présence des IgG anti-RNMDA sur le tissu murin. Ainsi, ils détectent les IgG humaines sur les hippocampes de souris injectées avec les IgG anti-RNMDA (fig. 29A), avec peu de marquage dans le tissu de souris injectées avec les IgG contrôles sains (fig. 29B). Il existe une variabilité au sein des marquages à travers les différentes régions hippocampiques, mais dans l'ensemble les souris IgG RNMDA possèdent une fixation des IgG plus importante dans chaque zone de l'hippocampe, en particulier le CA3 (fig. 29C). De plus, le score associé aux crises d'épilepsies

est corrélé avec la quantité d'IgG fixée (fig. 29D). Malgré la résistance naturelle de la souche C57BL/6J à l'épilepsie, l'utilisation du PTZ permet d'y pallier et de mettre en évidence les effets épiléptogènes des anticorps anti-RNMDA dans ce modèle.



**Figure 29 : Détection des IgG humaines fixées.**

(A) Détection post-mortem des IgG humaines chez des souris injectées avec les anticorps anti-RNMDA avec l'utilisation d'IgG anti-humain (B) Seuls de faibles niveaux d'IgG ont été trouvés dans les hippocampes des souris ayant reçu une injection d'IgG contrôles. (C) La quantité d'IgG humaines fixées dans les hippocampes sont déterminées par l'analyse de l'intensité de fluorescence moyenne des coupes cérébrales, étaient plus élevées chez les souris ayant reçu une injection d'IgG anti-RNMDA que chez les souris ayant reçu une injection d'IgG contrôles dans CA1, CA3 et le gyrus denté (DG). (D) Pour les animaux ayant reçu des anticorps anti-RNMDA, il existe une corrélation linéaire entre la fixation des IgG et le stade des crises d'épilepsies. D'après Wright *et al.*, 2015.

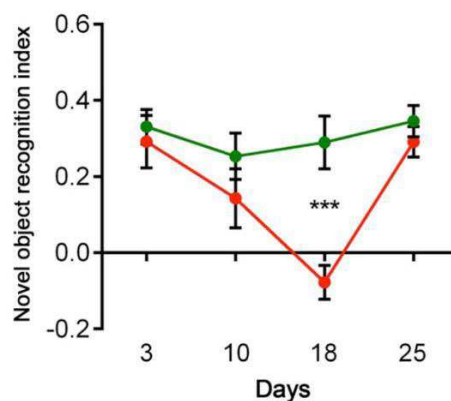
### 2.3 Modèle de Malviya et collaborateurs

Malviya et coll. (2017), ont, pour la réalisation de leur modèle, identifiés un anticorps intrathécale sélectionné par une étude approfondie des cellules immunes CD138<sup>+</sup> (plasmocytes sécréteurs d'anticorps) obtenues par une analyse de cytométrie en flux des CSF de patients EAI-RNMDA. Ces plasmocytes vont être étudiés selon les séquences des différentes chaînes composant les anticorps qu'ils expriment (chaînes lourdes, chaînes  $\kappa$  et chaînes  $\lambda$ ) obtenue par la technique de cellule isolée RT-PCR (Réaction de Polymérisation en Chaîne en Temps Réel). Ils identifient des séquences hypermutées ainsi que des mutations de remplacement, tous deux indiquant une réponse immune intrathécale induite par des antigènes à l'origine de ces mutations. Ces séquences vont

faire l'objet de reconstruction, ils créent donc des anticorps recombinant au nombre de sept appelés rhuMab. Ils sélectionnent le clone SSM5 comme étant le plus réactifs envers les RNMDA (Malviya *et al.*, 2017).

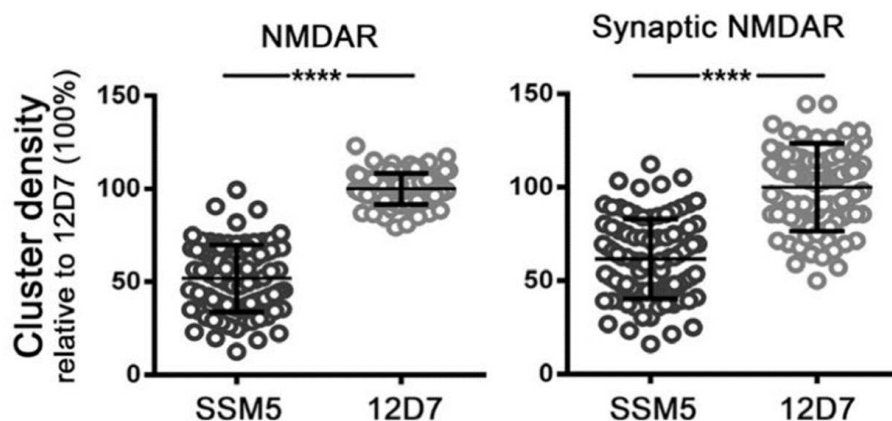
Afin de déterminer les effets pathophysiologiques de ces anticorps recombinant rhuMab, Malviya *et coll.* (2017) suivent un protocole identique à celui de Planagumà (Planagumà *et al.*, 2015). Ainsi ils procèdent à une infusion durant 14 jours des anticorps rhuMab SSM5 et de l'isotype 12D7 chez des souris mâles C57BL/6J grâce à l'utilisation d'une mini-pompe osmotique.

L'évaluation comportementale des animaux est réalisée par l'utilisation du test NOR. Ils mettent ainsi en évidence que les animaux ayant reçu le le rhuMab SSM5 montrent une diminution progressive de l'index de reconnaissance de l'objet comparé aux animaux ayant reçu les isotypes rhuMab 12D7, mettant en évidence un trouble mnésique (fig. 30). D'autre part, de manière comparable aux études réalisées auparavant sur des cultures de neurones (Planagumà *et al.*, 2015), l'injection de rhuMab SSM5 issu de patients entraîne au contraire de l'injection de rhuMab 12D7, une diminution significative du nombre de RNMDA hippocampique à la membrane, des clusters de RNMDA synaptiques *in vivo*, sans affecter la mort neuronale (fig. 31).



**Figure 30** : Le RhuMab SSM5 induit de graves déficits de mémoire chez la souris.

Indice de reconnaissance des objets nouveaux chez les souris traitées avec le rhuMab dérivé de patients (SSM5, cercles rouges) et le rhuMab témoin (12D7, cercles verts) (chacun à 90 lg/ml dans une solution saline). Un indice élevé indique une meilleure mémoire de reconnaissance des objets. Notez que les souris perfusées avec le rhuMab dérivé de patients ont montré une diminution progressive de la mémoire qui est maximale au jour 18. Le temps total d'exploration des deux objets est similaire dans les deux groupes. D'après Malviya *et al.*, 2017



**Figure 31 : RhuMab SSM5 diminue la densité des RNMDA synaptiques dans l'hippocampe de souris après perfusion intraventriculaire.**

Quantification de la densité des groupes RNMDA totaux et RNMDA synaptiques au jour 18 dans une analyse groupée des zones de l'hippocampe (CA1, CA2, CA3 et gyrus denté) chez des animaux traités avec un anticorps monoclonal anti-RNMDA (SSM5 ; gris foncé) et un anticorps témoin (12D7 ; gris pâle). D'après Malviya *et al.*, 2017

L'ensemble de ces modèles murins ont permis à mettre en évidence des similarités avec la pathologie humaine en termes de comportements, mais surtout de mieux comprendre les mécanismes physiologiques responsables de ceux-ci. De plus, nous avons une meilleure compréhension des autoanticorps, à la fois dans leur reconnaissance de l'épitope mais aussi des conséquences de leur interaction avec le récepteur NMDA. Cependant, il n'a pas été étudié chez les modèles animaux la part de responsabilité de ces autoanticorps dans les troubles liés aux dysfonctionnements de l'hypothalamus, notamment les troubles du comportement alimentaire. Nous présenterons dans le chapitre suivant la physiologie de la prise alimentaire, les zones impliquées dans sa régulation et leur capacité d'adaptation aux modifications de l'équilibre énergétique, qui parfois mène à la pathologie.



### III La prise alimentaire

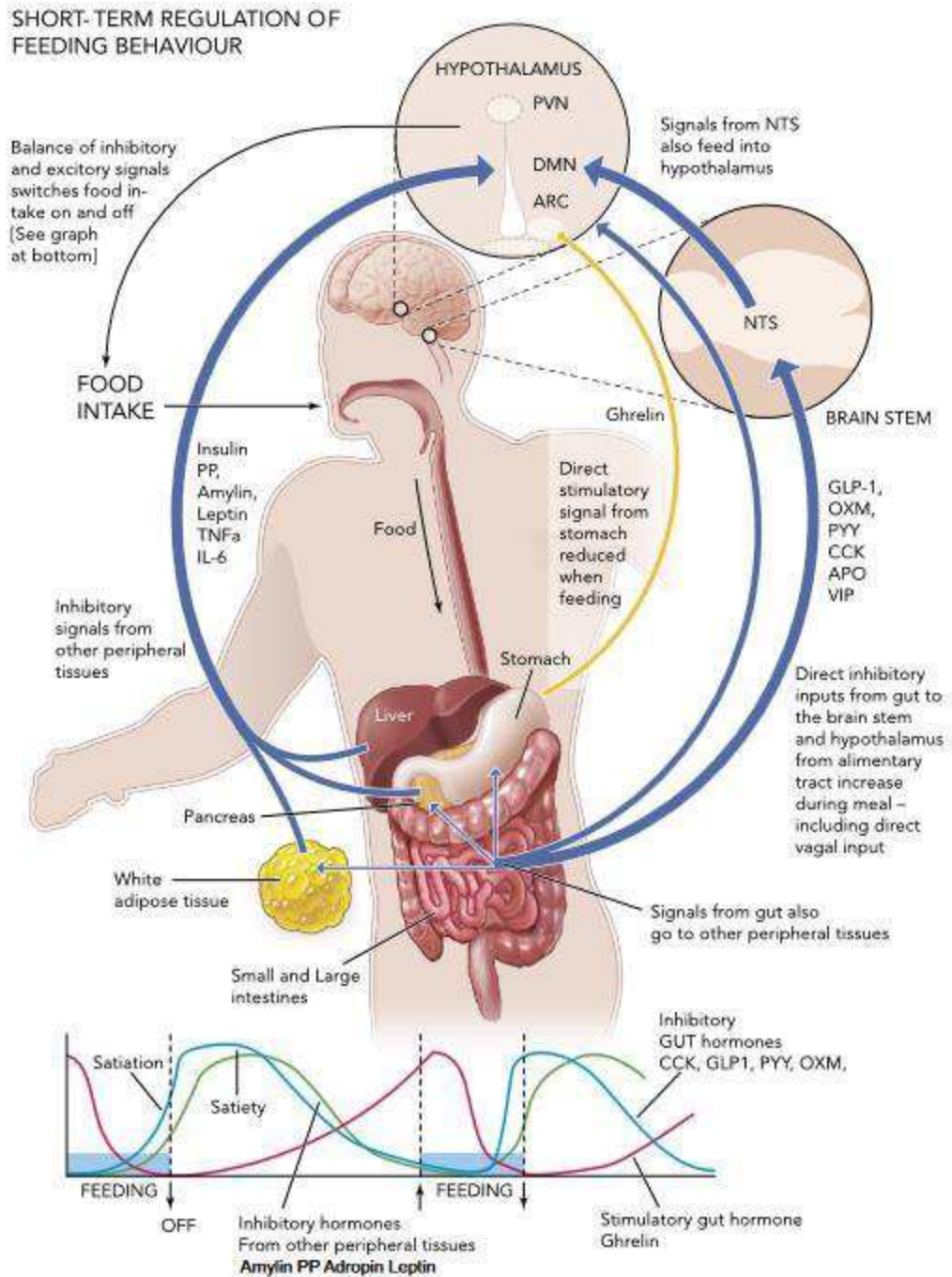
#### 1 Régulation de la prise alimentaire par le système nerveux central

##### 1.1 *L'homéostasie énergétique : généralités*

La prise alimentaire est nécessaire et absolue à la survie d'un individu. Cependant, celle-ci se doit d'être régulée afin de maintenir un équilibre énergétique physiologique adapté aux besoins de l'organisme. L'alimentation ne peut être en continu, il y a donc un décalage temporel entre le processus d'approvisionnement en énergie et le processus d'utilisation de l'énergie. Les animaux doivent en conséquence avoir un (ou plusieurs) mécanisme(s) de stockage de l'énergie afin que l'approvisionnement épisodique puisse correspondre aux besoins continus de l'organisme (Speakman, 2014). Lors de l'alimentation, l'apport et la dépense énergétique doivent être à l'équilibre selon le niveau de dépense qui influe directement sur le niveau d'apports nécessaire. Tous apports en surplus ou au contraire en défaut entraîneront soit le stockage, soit la mobilisation du glucose, du glycogène ou des triglycérides. Le glucose qui est stocké sous forme de glycogène constitue le « stock » de la régulation à court terme de la prise alimentaire et de la balance énergétique (Speakman, 2014). Dans le cas où les apports ne répondent pas aux besoins énergétiques durant une période prolongée, les animaux ont besoin de disposer d'un mécanisme de stockage à long terme qui est généralement fourni par les lipides et les protéines. Ce dernier pourra être utilisé lorsque les apports ne répondent pas aux besoins énergétiques au long terme. Ainsi, le foie transforme les acides gras alimentaires en triglycérides qui sont stockés sous forme de tissu adipeux blanc (WAT) (Alves-Bezerra and Cohen, 2017). Il existe un autre type de tissu adipeux, le tissu adipeux brun (BAT). Ces deux types de tissu adipeux ont des fonctions antagonistes (Saely *et al.*, 2012). En effet, le WAT va stocker l'énergie en excès, tandis que le BAT est spécialisé dans

la dissipation de l'énergie en produisant de la chaleur nécessaire au maintien d'une température corporelle physiologique. En réponse à une adaptation et afin de préserver l'équilibre énergétique, la thermogenèse s'effectuant par le BAT peut-être soit stimulée, soit inhibée en fonction des besoins énergétiques (Saely *et al.*, 2012).

Comme illustré par la figure 32, la réponse périphérique presque immédiate à la prise alimentaire implique, le système digestif, le tissu adipeux, mais aussi le foie et le pancréas. De nombreuses hormones anorexigènes sont libérées progressivement le long du tube digestif au passage du bol alimentaire. Ces hormones anorexigènes incluent entre autres les incrétines (*glucagon-like peptide 1* GLP-1 et GIP) et le peptide YY (PYY). Les populations cérébrales ciblées par ces hormones sont diverses ; elles sont principalement localisées dans le noyau du tractus solitaire et le noyau arqué (ARH). Le foie, le tissu adipeux blanc, le pancréas et l'estomac libèrent, eux aussi, des hormones qui affecteront l'appétit. L'amyline, le polypeptide pancréatique et l'insuline par le pancréas, l'adropine par le foie, la ghréline par l'estomac et le PAI-1 (Inhibiteur de l'Activateur du Plasminogène 1) ainsi que diverses adipokines par le tissu adipeux incluant la leptine, le facteur nécrotique-alpha et l'interleukine-6 (Speakman, 2014).



**Figure 32 : Schéma représentatif de la régulation à court terme de la prise alimentaire.**

Lorsque les aliments pénètrent dans le tube digestif, ils stimulent progressivement la production de plusieurs inhibiteurs (flèches bleues à droite du schéma), dont la cholécystokinine (CCK), les incrétinines (GLP-1), le Polypeptide Intestinal Vasoactif (VIP), le peptide YY (PYY), l'oxyntomoduline (OXM) et l'apolipoprotéine A-IV (APO) transportés vers le tronc cérébral [noyau du tractus solitaire (NTS)] et l'hypothalamus [noyau arqué (ARC)] et inhibent la production d'une hormone stimulante produite par l'estomac (Ghréline) (flèche orange à droite). Ces hormones ciblent également d'autres tissus périphériques tels que le foie, le pancréas et le tissu adipeux blanc. Ils libèrent d'autres signaux

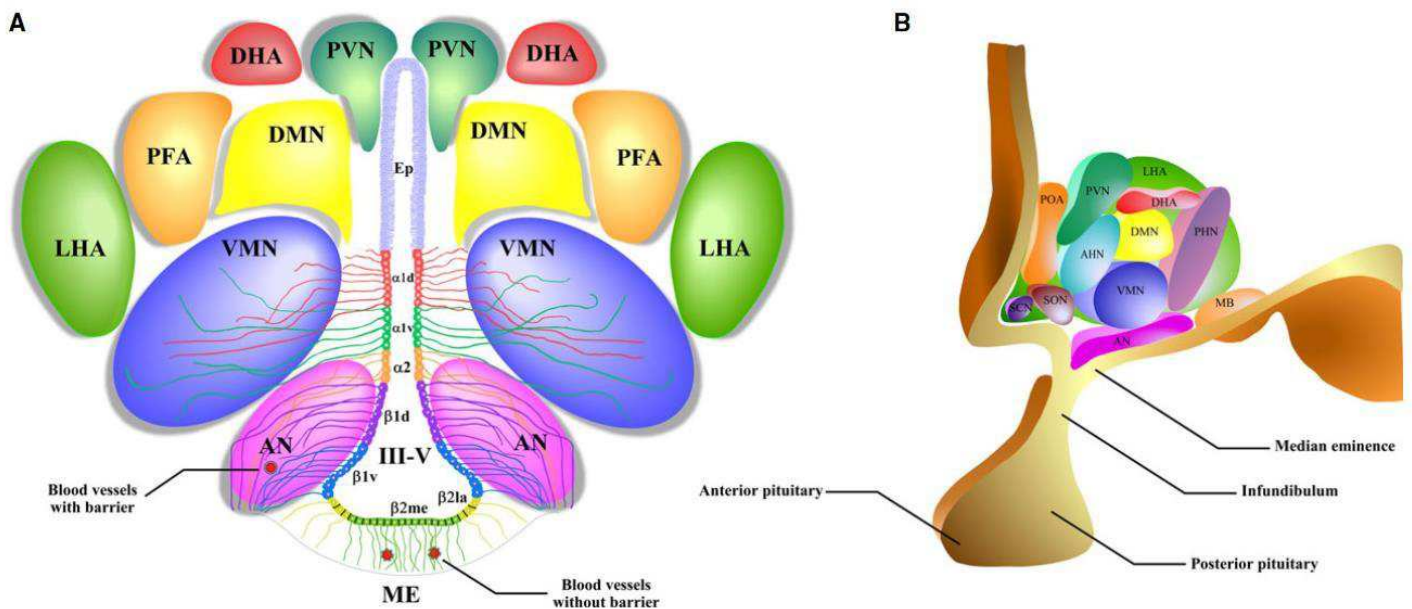
inhibiteurs ciblant aussi l'hypothalamus (flèche bleue à gauche), tel que l'insuline, le polypeptide pancréatique (PP), l'amyline, la leptine, le Facteur de Nécrose Tumorale-alpha (TNF- $\alpha$ ) et l'Interleukine-6 (IL-6). En outre, la distension du tube digestif agit comme un signal inhibiteur via le nerf vague. La conséquence de cette augmentation des signaux d'inhibition combinée à la réduction du signal de stimulation entraîne une diminution de la sensation de faim (satiété) et l'alimentation finit par s'arrêter. Une fois que l'alimentation s'arrête, les signaux d'inhibition vont à terme diminuer et les signaux de stimulation réaugmenter (satiété réduite), ainsi la prise alimentaire finit par reprendre. D'après Speakman, 2014.

Selon Hopkins et coll., (2016), le contrôle de l'appétit est basé sur un réseau d'interactions formant le système psychobiologique. Ce système est conceptualisé sur 3 niveaux, à savoir, le niveau des événements psychologiques et des opérations comportementales, le niveau de la physiologie périphérique et des événements métaboliques et le niveau de la neurotransmission et des interactions métaboliques cérébrales (Hopkins *et al.*, 2016).

Dans ce 4<sup>e</sup> chapitre de mon introduction, nous allons nous intéresser plus particulièrement au troisième niveau, autrement dit celui du système nerveux central. Par conséquent, nous présenterons les populations neuronales du noyau arqué responsable de la régulation de la prise alimentaire. J'insisterai aussi sur l'environnement particulier de ce réseau hypothalamique impliquant l'éminence médiane et les tanocytes. Je terminerai par la description des capacités d'adaptation structurale de la région de l'hypothalamus médiobasal face aux déséquilibres de l'homéostasie énergétique afin d'amener mes objectifs de thèse.

### 1.2 Les neurones orexigènes et anorexigènes du noyau arqué hypothalamique

L'hypothalamus est une structure cérébrale située à la base du cerveau. Il est relié à l'hypophyse par la tige pituitaire. Il est subdivisé dans le plan antéro-postérieur par trois régions principales : la région antérieure, la région médiane et la région postérieure. Ces mêmes régions sont composées de différents noyaux, chacun se caractérisant par une population neuronale spécifique ayant des rôles définis (fig. 33).



**Figure 33 : Représentation schématique des noyaux hypothalamiques et de la distribution des tanocytes sur la paroi du troisième ventricule (III-V).**

(A) Schéma coronal des noyaux hypothalamiques, des épendymocytes et des tanocytes. Le noyau arqué (AN) fait partie de l'hypothalamus postérieur, il régule le contrôle neuroendocrine et les rythmes circadiens. Le noyau ventromédian hypothalamique (VMN) fait partie de la région hypothalamique postérieure et régule la satiété. Le noyau dorsomédian hypothalamique (DMN) fait partie de la région hypothalamique postérieure, il possède un rôle dans la prise alimentaire, la consommation hydrique, le poids corporel et l'activité circadienne. Le noyau paraventriculaire hypothalamique (PVN) fait partie de l'hypothalamus antérieur, il régule l'équilibre hydrique, la production de vasopressine et d'ocytocine. L'aire latérale hypothalamique (LHA ou LH) se situe dans la région hypothalamique postérieure et sa stimulation induit la prise alimentaire. L'aire périfornicale hypothalamique (PFA) se situe dans la région hypothalamique postérieure et est impliquée dans la régulation du cycle veille/sommeil. (B) Vue sagittale de la distribution

des noyaux hypothalamiques. Ep : épendymocytes ; AN : noyau arqué ; VMN : noyau ventromédian ; DMN : noyau dorsomédian ; PVN : noyau périventriculaire ; DHA : aire hypothalamique dorsale ; PFA : aire perifornicale ; LHA : aire hypothalamique latérale ; SCN : noyau suprachiasmatique ; SON : noyau supraoptique ; POA : zone préoptique ; MB : corps mammillaires ; ME : éminence médiane ; III-V : troisième ventricule. D'après Elizondo *et al.*, 2015.

L'hypothalamus est impliqué dans différentes fonctions majeures :

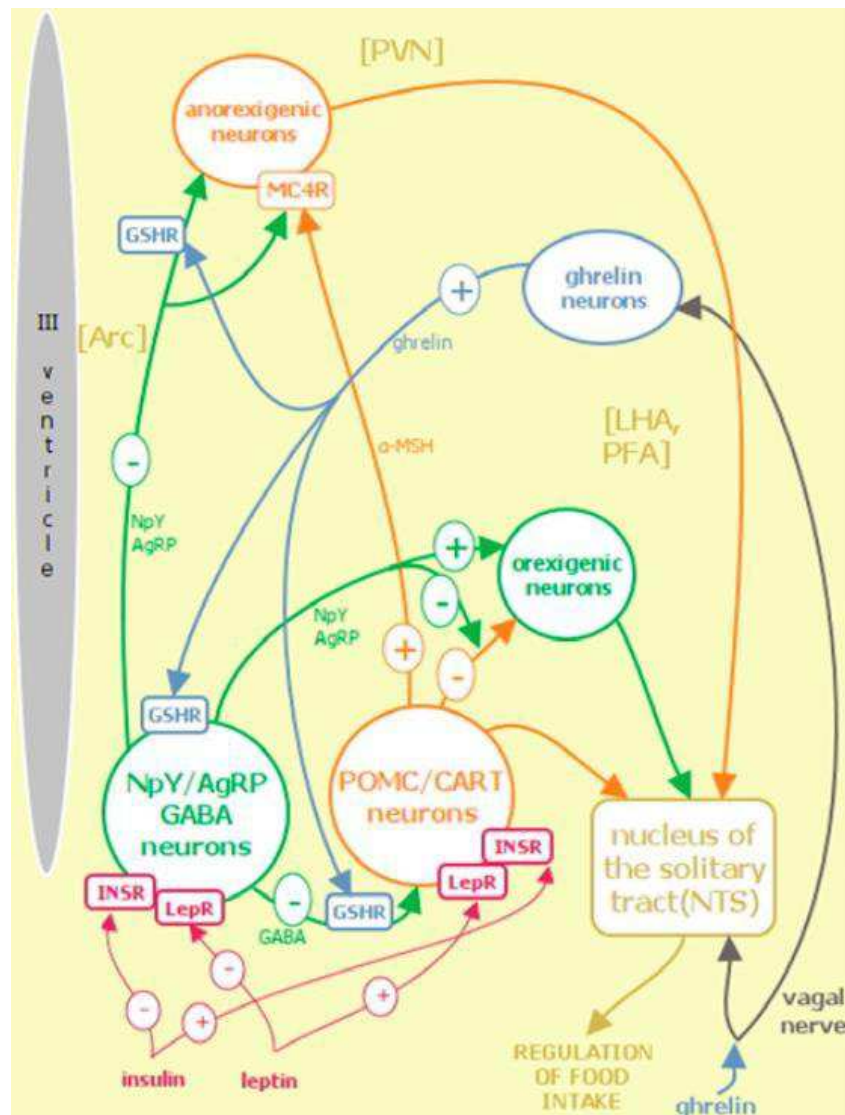
- La sécrétion de facteurs hypophysiotropes au niveau de la zone externe de l'éminence médiane (EM) (thyroïdienne, gonadolibérine, somatolibérine, corticolibérine, somatostatine, dopamine ...)
- Le maintien des cycles physiologiques
- Le contrôle de la prise alimentaire (PA) en adéquation avec l'équilibre énergétique
- La régulation du comportement sexuel
- La régulation de la température corporelle

Nous porterons notre intérêt sur les noyaux impliqués dans la régulation de la PA, où le noyau arqué est le centre régulateur de ces fonctions.

Le noyau arqué se situe dans la région tubérale de l'hypothalamus et est localisé près de l'éminence médiane (EM) ; il est composé de deux lobes placés de part et d'autre du troisième ventricule cérébral. L'ARH est délimité latéralement par la paroi de l'épendyme et dorsalement par le noyau ventromédian hypothalamique (VMH). Ce noyau est impliqué dans la régulation de la prise alimentaire (PA) et dans celle du métabolisme (Myers and Olson, 2012). Pour ce faire, l'ARH va intégrer les signaux neuronaux centraux et les signaux métaboliques hormonaux et nutritionnels depuis la circulation périphérique. Ce dernier point sera développé dans une prochaine section.

Le noyau arqué est entre autres composé de deux populations neuronales de premier ordre, antagonistes fonctionnelles, capables d'assimiler l'information portée par les signaux périphériques (fig. 34).

- Les neurones orexigènes (stimulent l'appétit) : leur rôle est de stimuler la prise alimentaire, ils expriment deux neuropeptides le neuropeptide Y (NPY) et le Peptide Apparenté à l'Agouti (AgRP) et le neurotransmetteur Acide Gamma-Aminobutyrique (GABA).
- Les neurones anorexigènes (diminuent l'appétit) : leur rôle est d'inhiber la prise alimentaire, ils expriment la proopiomélanocortine (POMC) et le neuropeptide CART (Transcrit Régulé par la Cocaïne et l'Amphétamine) (Gropp *et al.*, 2005).



**Figure 34 : Régulation de la prise alimentaire centralisée par le noyau arqué (hypothalamus ventromédian postérieur)**

Le message orexigène de la ghréline atteint l'hypothalamus grâce à une activation sympathique du nerf vague et provoque une libération locale de ghréline par les neurones du PVN. La ghréline sécrétée par ces neurones se fixe à ses récepteurs GSHR sur les neurones à NPY/AgRP/GABA, entraînant une augmentation de la production des neuropeptides NPY et AgRP, et du neurotransmetteur GABA. S'ensuivent deux conséquences, d'une part l'inhibition des neurones à POMC/CART par le GABA, et d'autre part la stimulation des neurones orexigènes dans la région LHA/PFA par le NPY et l'AgRP, il en résulte un signal orexigène prédominant. L'insuline et la leptine quant à elles diffusent dans le noyau arqué et se fixent sur leurs récepteurs des neurones à NPY et à POMC. Cependant, leurs effets sont opposés, puisqu'elles vont inhiber les neurones orexigènes, et stimuler les neurones anorexigènes et ainsi favoriser l'expression de l' $\alpha$ -MSH par les neurones à POMC tout en supprimant l'expression de NPY et AgRP. Il s'ensuit un signal anorexigène prédominant. NPY : neuropeptide Y, AgRP : peptide lié à l'agouti, GABA : acide gamma amino butyrique,  $\alpha$ -MSH : hormone mélanostimulante alpha ou mélanocortine, GSHR : récepteur de la ghréline, LepR : récepteur de la leptine, INSR : récepteur de l'insuline, Y1R : récepteur au NPY, MC4R : récepteur à l' $\alpha$ -MSH. D'après Warchol *et al.*, 2014.



Au cours d'un repas, en réponse à l'insuline et la leptine, les neurones anorexigènes à POMC/CART vont être stimulés par l'activation de leurs récepteurs à l'insuline et la leptine. Ces neurones projettent principalement vers d'autres noyaux hypothalamiques dont le noyau paraventriculaire (PVN), le noyau dorsomédian (DMH), l'aire hypothalamique latérale (LH) et le noyau ventromédian hypothalamique (VMH). Ils jouent un rôle dans la transmission de l'information vers d'autres régions cérébrales par le biais des populations d'interneurones (fig. 34) (Waterson and Horvath, 2015). Lors de la phase prandiale, le peptide POMC est clivé le long des projections axonales en hormone alpha mélanostimulante ( $\alpha$ -MSH) par les pro-hormones convertases 1 et 2 (PC1/2) (Mountjoy, 2015). L' $\alpha$ -MSH va être libérée par les axones des neurones POMC afin d'activer les récepteurs mélanocortine de type 3 et 4 (MC3/4R) des neurones anorexigènes de second ordre du PVN (Könner *et al.*, 2009). Le PVN est le noyau présentant la plus haute expression de MC4R. Il est considéré comme hébergeant la population majoritaire de MC4R régulant l'apport énergétique (Tao, 2010). L'information relayée par ces neurones de second ordre va entraîner une diminution de la PA. De plus, on observe une augmentation de la dépense énergétique imputable à l'activation du tissu adipeux brun BAT cela se traduit par une thermogénèse (Enriori *et al.*, 2011).

Par ailleurs, avant la prise d'un repas, la ghréline active les neurones AgRP/NPY. Ces derniers projettent également vers le PVN et le LH (Betley *et al.*, 2013). Les neurones AgRP/NPY colibèrent les neuropeptides NPY et AgRP. Le NPY stimule l'appétit par l'activation des récepteurs NPY Y1 et Y5 exprimés notamment par des neurones du PVN. Parallèlement, il diminue aussi la dépense énergétique par l'inhibition de la thermogénèse en ciblant des neurones du tronc cérébral *via* leurs récepteurs Y1 (Shi *et al.*, 2013). L'AgRP quant à lui, agit comme un agoniste inverse des récepteurs MC3/4R, limitant ainsi les effets anorexigènes de l' $\alpha$ -MSH sur les neurones de second

ordre (Timper and Brüning, 2017). Les neurones AgRP/NPY sont également capables d'inhiber directement les neurones POMC dans le noyau arqué par l'action inhibitrice du GABA, bloquant ainsi leur action anorexigène. (Liu *et al.*, 2012).

Les neurones POMC et AgRP/NPY reçoivent ensuite un rétrocontrôle de la part des populations neuronales d'autres noyaux hypothalamiques, tels que le VMH et le PVN. Ces rétrocontrôles peuvent-être soit positif, soit négatif en fonction du statut énergétique. Ainsi, lorsque qu'une population neuronale est activée (NPY/AgRP ou POMC/CART), la population antagoniste est, quant à elle, inhibée par l'intermédiaire des mécanismes décrits ci-dessus (Waterson and Horvath, 2015).

Des populations neuronales des noyaux hypothalamiques impliqués dans la régulation de l'équilibre énergétique et la prise alimentaire projettent également au-delà de l'hypothalamus et sollicitent d'autres neurones effecteurs de la prise alimentaire et de la dépense énergétique. Certaines régions du tronc cérébral sont très impliquées dans la régulation de l'homéostasie énergétique ; dans la régulation de la prise alimentaire par l'expression des MC4R par les neurones du noyau du tractus solitaire, mais aussi dans la régulation de la thermogenèse par les neurones pré moteurs du noyau du raphé (Waterson and Horvath, 2015). Par ailleurs, la prise alimentaire n'est pas uniquement motivée par les besoins de l'organisme, il existe un système de récompense mésolimbique, appelé aussi système « hédonique » stimulant une alimentation au-delà des besoins énergétiques (Coccurello and Maccarrone, 2018).

## 2 L'éminence médiane, un organe circumventriculaire

### 2.1 Localisation et anatomie de l'éminence médiane

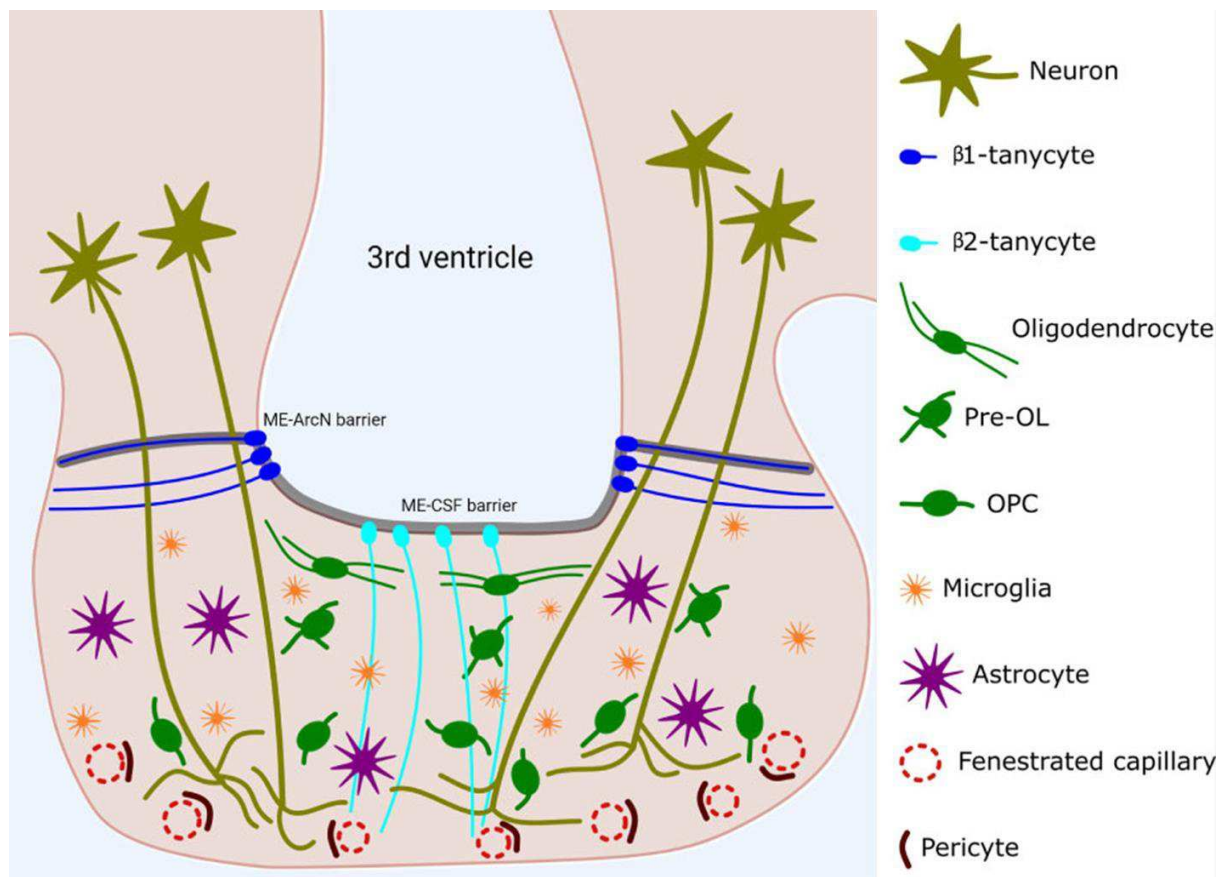
L'éminence médiane (EM) se situe en périphérie du troisième ventricule, plus exactement sous le plancher de celui-ci et borde l'espace arachnoïdien sur son côté ventral. Elle fait partie de l'unique système porte cérébral, le système porte hypothalamo-hypophysaire (Yin and Gore, 2010). Un système porte désigne un système circulatoire sanguin qui relie deux réseaux capillaires de même type. Le système porte hypothalamo-hypophysaire connecte le lit capillaire de l'hypothalamus au niveau de la zone externe de l'éminence médiane et celui de l'adénohypophyse. La région de l'EM est tout à fait particulière de par (fig. 35) :

- Sa localisation formant un complexe avec le noyau arqué de l'hypothalamus
- Son réseau vasculaire porte qui communique avec l'hypophyse antérieure
- Les projections terminales de la voie tuberofundibulaire et de la voie hypothalamo-hypophysaire
- Les prolongements tanycytaires, une cellule épendymaire spécialisée qui sera détaillé dans la partie 3.1 (Korf and Møller, 2021)

L'éminence médiane est qualifiée d'organe circumventriculaire (CVO). Les CVO sont des structures hautement vascularisées, localisées aux abords du 3<sup>e</sup> et du 4<sup>e</sup> ventricule et caractérisées par l'absence de BHE. Ils représentent un point de communication entre le sang, le parenchyme cérébral et le CSF. Leur environnement est abondamment composé de neurones et de cellules gliales adaptés et spécialisés aux fonctions du CVO, qu'il soit sensitif, sécréteur ou les deux (Benarroch, 2011).

L'éminence médiane est organisée en deux parties distinctes (fig. 35) :

- La zone interne est composée de fibres des populations neuronales des noyaux supraoptiques et paraventriculaires qui projettent dans la neurohypophyse. On retrouve aussi de nombreuses cellules gliales (oligodendrocytes, astrocytes, péricytes, microglie) dont les tanocytes, ainsi qu'une vascularisation locale présentant une BHE.
- La zone externe est composée d'une riche vascularisation caractérisée par des vaisseaux fenêtrés dépourvus de BHE, composant le lit capillaire du système porte. Ainsi différents neurones hypothalamiques en plus des tanocytes vont projeter dans cette structure pour entrer en contact avec le système vasculaire porte de l'adénohypophyse.



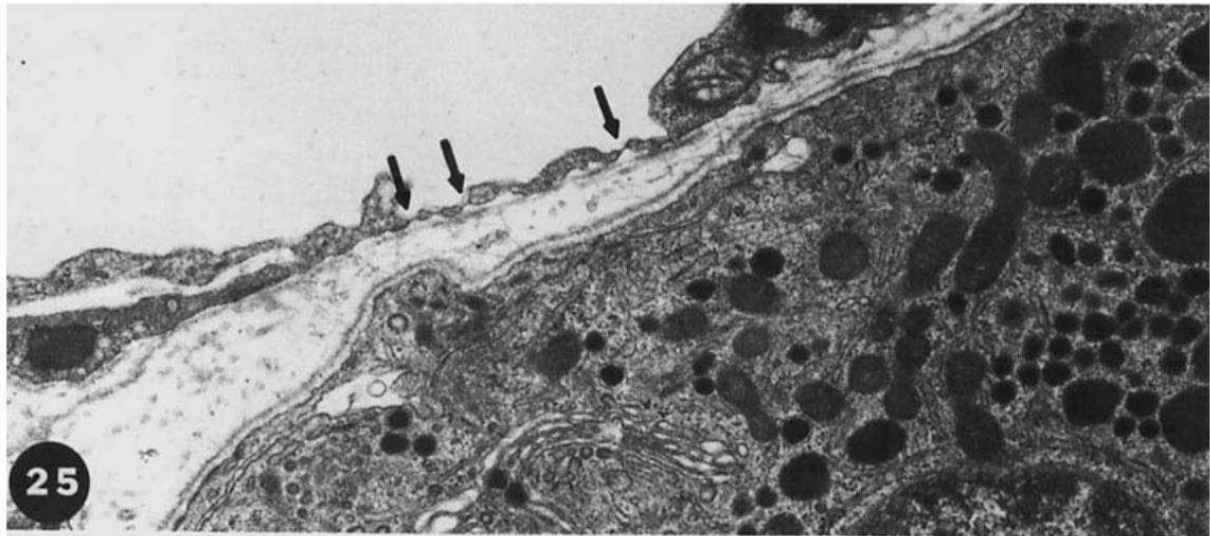
**Figure 35 : Structure de l'éminence médiane et présentation des différents types cellulaires qui la compose.**

L'éminence médiane est divisée en deux zones distinctes ; la zone externe et la zone interne. La zone externe est un enchevêtrement de différents types cellulaires. Elle est traversée par de nombreux prolongements neuronaux hypothalamiques qui projettent sur la vascularisation de la neurohypophyse. On y trouve aussi de nombreuses cellules

gliales, dont les oligodendrocytes, les pré-oligodendrocytes (Pre-OL), les cellules précurseurs d'oligodendrocytes (OPC), la microglie, les astrocytes et les tanocytes. La zone externe est riche en capillaires fenêtrés du système porte hypothalamo-hypophysaire. Dans cette région, les prolongements des neurones senseurs et sécréteurs des noyaux hypothalamiques ainsi que les tanocytes sont en contact direct avec les capillaires. Les neurohormones sécrétées (GnRH, CRH, GHRH, TRH) sont transportées directement dans l'adénohypophyse et diffusées en périphérie. Ce système vasculaire porte permet aussi aux neurones et tanocytes de détecter des modifications métaboliques à partir de fluctuations d'hormones (leptine, insuline) issues du sang par l'intermédiaire de senseurs (transporteurs, récepteurs) aux hormones et aux métabolites. D'après Clayton *et al.*, 2022.

## 2.2 *Lit capillaire fenêtré de l'EM*

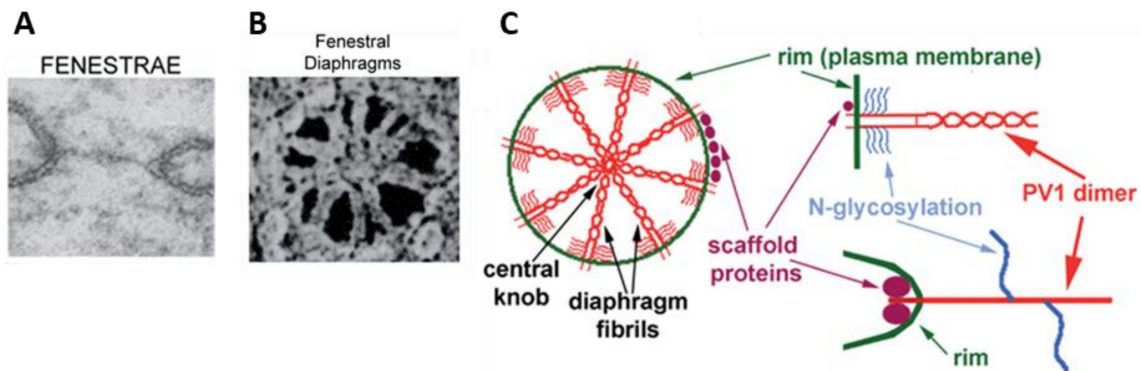
De par leurs rôles sensitifs et/ou sécréteurs, il est nécessaire aux CVO d'avoir un accès privilégié au système circulatoire périphérique. Ainsi, les vaisseaux sanguins des CVO dépourvus de BHE sont appelés vaisseaux fenêtrés comme nous avons pu le voir dans la partie 2.1, ils composent le lit capillaire de la zone externe de l'EM. Les cellules endothéliales de ces vaisseaux expriment une protéine particulière, la protéine associée aux vésicules du plasmalemme (PLVAP) observée chez la souris représentent des marqueurs de la fenestration (Ciofi, 2011; Hussain *et al.*, 2022; Mullier *et al.*, 2010). Contrairement aux vaisseaux possédant une BHE, les cellules endothéliales des vaisseaux fenêtrés possèdent une membrane basale particulièrement fine, et sont dépourvues de complexes de jonctions serrées, facilitant les échanges entre le sang et le parenchyme. La vascularisation d'autres CVO a été décrit plus en détails, spécifiquement les CVO senseurs, tels que l'organe vasculaire de la lame basale (OVLT) l'organe subfornical (SFO) et l'*area postrema* (AP) (Miyata, 2015). Il n'y a pas eu d'études approfondies récentes des vaisseaux fenêtrés de l'EM, mais la structure du lit capillaire de l'éminence médiane a été décrite par l'utilisation de microscopie électronique à transmission (fig. 36) (Page *et al.*, 1978).



**Figure 36** : Micrographie électronique à transmission d'un large vaisseau porte dans l'éminence médiane de rat.

On observe un endothélium capillaire fenêtrés (flèches noires) tapissant un large vaisseau du système porte hypothalamo-hypophysaire au niveau de l'éminence médiane. x16 200. D'après Page *et al.*, 1978.

Les fenestrations se présentent sous forme d'une ouverture allant de 30 à 80 nm de diamètre dans la membrane abluminale des cellules endothéliales (Miyata, 2015; Willis *et al.*, 2007). Ces pores sont constitués d'une membrane perméable comparable à un diaphragme. Ils sont composés de protéines associées aux PLVAP aussi connu sous le nom de PV-1 ou encore CD68 (fig. 37) (Bearer and Orci, 1985). Ces fenestrations permettent aux molécules de haut poids moléculaire de facilement se déplacer vers l'intérieur ou l'extérieur du capillaire (Morita *et al.*, 2016; Morita and Miyata, 2012).



**Figure 37 : Organisation protéique du diaphragme d'une fenestration de la membrane cellulaire abluminal endothéliale.**

Image de microscopie électronique à transmission, (A) coupe tissulaire perpendiculaire d'une fenêtre (ou fenestrae) de capillaire, (B) vue de face d'un diaphragme fenêtré, on observe les fibrilles qui le composent. (C) Représentation schématique de PV1 (PLVAP) et son intégration dans le diaphragme. Les dimères de PV1 participent à la formation des fibrilles ancrées dans sur la bordure (membrane plasmique) via l'extrémité N-terminal de PV1, et s'entrecroisent dans la maille centrale via l'extrémité C-terminal de PV1. Les antennes glycanes sont situées près de la membrane, ce qui maintiendrait la protéine « à flot » en empêchant son effondrement sur la membrane plasmique. (A) x 90 000 (B) x 110 000. D'après Stan, 2007 adapté de Bearer and Orci, 1985.

Les caractéristiques structurales de ces vaisseaux permettent une communication facilitée entre sang et parenchyme. En effet, l'accès des molécules du sang vers le parenchyme cérébral est 200 à 700 fois plus rapides que dans les structures cérébrales possédant une BHE (Gross *et al.*, 1987). Cependant, cette perméabilité est, au niveau de la zone externe de l'éminence médiane, sous le contrôle d'une barrière formée par un type cellulaire spécifique : les tanocytes.

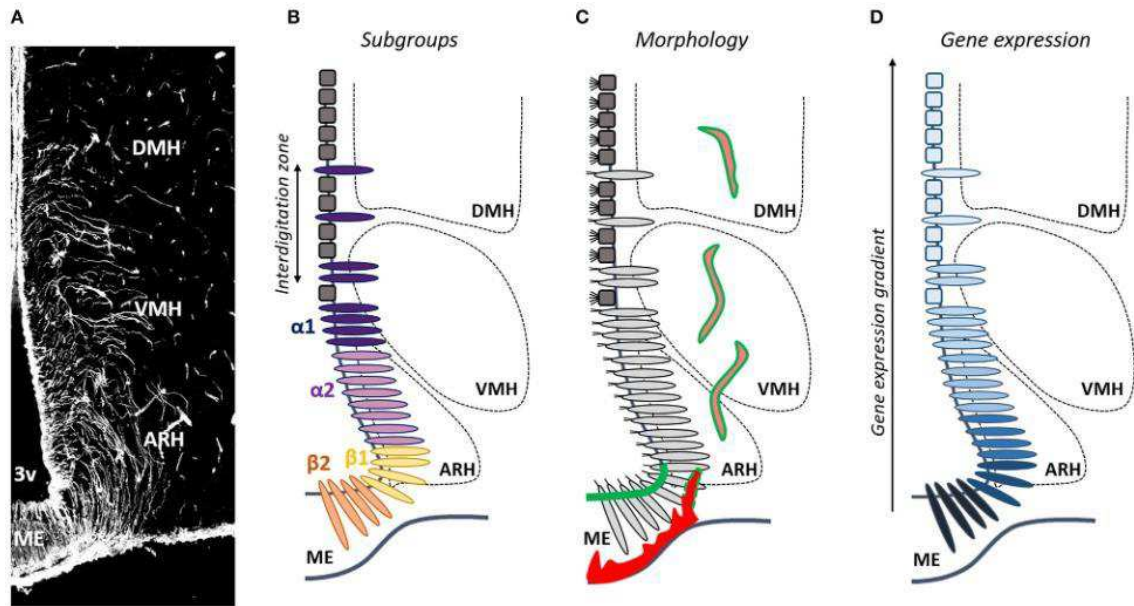
### 3 Échanges sang – neurones hypothalamiques, orchestrés par les tanocytes

#### 3.1 Les tanocytes, des cellules épendymaires hautement spécialisées

Les parois des ventricules sont bordées de cellules gliales appelées épendymocytes que l'on retrouve aussi dans le canal de l'épendyme. Ces cellules ont pour fonction d'assurer l'interface entre le SNC et le CSF. Les épendymocytes sont des cellules ciliées permettant ainsi la création

d'un flux faisant circuler le CSF dans le système ventriculaire (Eichele *et al.*, 2020). Il existe d'autres cellules épendymaires extrêmement spécialisées qui bordent spécifiquement les parois et le plancher du 3<sup>e</sup> ventricule, les tanocytes. Il a aussi été décrit des cellules semblables aux tanocytes bordant les ventricules des différents CVO du SNC (Langlet *et al.*, 2013b). Les tanocytes ont été pour la première fois décrits par Horstmann chez les chondrichthyens ou poissons cartilagineux (Horstmann, 1954). À présent, ces cellules gliales hautement spécialisées sont reconnues pour leurs rôles dans la reproduction, la prise alimentaire et l'homéostasie énergétique (Langlet, 2019, 2014; Prevot *et al.*, 2018). Ces cellules tapissent le plancher et les murs ventro-latéraux du 3<sup>e</sup> ventricule, leur surface apicale est dénuée de cils contrairement aux épendymocytes. Elles possèdent un long prolongement unicilié ou bicilié selon leur fonction et localisation (fig. 38). Ces prolongements s'étendent jusqu'au lit capillaire de l'EM pour entrer en contact avec les vaisseaux sanguins du système porte hypothalamo-hypophysaire. Ces prolongements s'étendent aussi dans le noyau arqué et entrent en contact avec les capillaires possédant une BHE (Langlet *et al.*, 2013b; Mullier *et al.*, 2010; Rodríguez *et al.*, 2019). Leurs implications physiologiques sont multiples. Ainsi, les tanocytes sont impliqués dans la circulation des informations entre le sang et le cerveau (Balland *et al.*, 2014; Langlet *et al.*, 2013a; Prevot *et al.*, 2007), la sensibilité métabolique (Elizondo-Vega *et al.*, 2019), la modulation de l'activation neuronale (Elizondo-Vega *et al.*, 2016) ou encore la neurogenèse (Chaker *et al.*, 2016).





**Figure 38** : Classification des tanycytes le long du troisième ventricule en fonction des sous populations, de leur morphologie et leur expression génique.

(A) Les tanycytes sont des cellules épendymaires polarisées qui tapissent la partie basale du troisième ventricule (3V). Ils sont mis en évidence par un immunomarquage de la vimentine (blanc). (B) Les tanycytes ont été classés en quatre sous-types ( $\beta 1$ ,  $\beta 2$ ,  $\alpha 1$  et  $\alpha 2$ ). (C) Les tanycytes (en gris clair) se distinguent morphologiquement des cellules épendymaires cuboïdes multiciliées classiques (en gris foncé). Ils envoient un seul long prolongement radial dans l'hypothalamus médiobasal comprenant l'éminence médiane (EM), le noyau arqué (ARH), le noyau ventromédian (VMH), et le noyau dorsomédian (DMH). Les tanycytes qui tapissent l'EM et l'ARH ventromédian (vmARH) sont des cellules uniciliées, qui entrent en contact avec des vaisseaux fenêtrés (rouge C) et présentent une barrière sang/CSF à leur pôle apical (vert C). Tandis que les tanycytes qui tapissent l'ARH dorsomédian (dmARH), le VMH et le DMH sont des cellules biciliées, qui entrent en contact avec les neurones et les vaisseaux possédant une BHE (orange/vert C). Dans le vmARH, les vaisseaux sont perméables ou non selon le statut énergétique de l'individu (tirets verts C). (D) De nombreux gènes exprimés par les populations tanycytaires (Dio2, DARPP-32, Rax ...) présentent un gradient d'expression. Il est encore difficile d'établir une correspondance stricte entre la classification alpha 1/2 et bêta 1/2 et leur profil d'expression génique. D'après Langlet, 2019.

Les tanycytes ont été classés en quatre sous-familles appelées  $\alpha 1$ ,  $\alpha 2$ ,  $\beta 1$ , et  $\beta 2$  (fig. 38B). Les tanycytes  $\beta 2$  tapissent le plancher du 3<sup>e</sup> ventricule dans l'EM de l'hypothalamus et sont en contact avec le système porte hypothalamo-hypophysaire, et les terminaisons axonales sécrétrices neuroendocrines. Les tanycytes  $\beta 1$  se trouvent dans la partie ventromédiane de l'ARH (vmARH), ils projettent dans le parenchyme jusqu'à l'espace latéral des vaisseaux fenêtrés de l'EM en passant

par le vmARH. Les tanocytes  $\alpha 2$  sont alignés le long du noyau arqué dorsomédian (dmARH), alors que les tanocytes  $\alpha 1$  sont alignés le long du VMH et de la partie dorsomédiane du DMH. Les prolongements des tanocytes  $\alpha 1/2$  projettent dans le parenchyme dans lequel ils entrent en contact avec des vaisseaux possédant une BHE ou bien avec des neurones (Rodriguez *et al.*, 2005). Cependant, bien que cette classification soit utile, elle peut être contestée de par sa généralisation simpliste. Étant donné les avancées récentes en termes d'études de morphologie, d'anatomie, de transcriptomique et de diversité physiologique des populations tanocytaires, il devient difficile d'attribuer l'expression d'un gène à une fonction, à un sous-type de tanocytes (fig. 38) (Langlet, 2019). Par exemple, les tanocytes pourraient être séparés en deux familles en fonction du contact effectuée par leur pied tanocyttaire avec, soit des vaisseaux fenêtrés perméables, soit avec des capillaires possédant une BHE (Mullier *et al.*, 2010). Bien que cette première catégorie se situe principalement au niveau de l'EM et donc correspond aux tanocytes précédemment appelés  $\beta$ , la seconde catégorie est principalement située le long des murs latéraux du 3<sup>e</sup> ventricule et correspond aux tanocytes  $\alpha$  ; pourtant, les tanocytes du vmARH en contact avec les circuits capillaires de l'EM oscille entre deux phénotypes en fonction de la perméabilité de l'endothélium de ces capillaires, eux-mêmes dépendant du statut énergétique de l'individu (Langlet *et al.*, 2013a) ; ces tanocytes nécessiteraient donc leur propre catégorie. Même si ces 3 types de tanocytes expriment des marqueurs communs (DARP-32, GRP<sub>50</sub>, vimentine, nestine) (Prevot *et al.*, 2018), les tanocytes en contact direct avec les vaisseaux fenêtrés expriment spécifiquement la claudine-1 et leur corps cellulaire forment une barrière sang-CSF étanche, prévenant la diffusion libre des molécules du sang depuis les capillaires vers le CSF (Langlet *et al.*, 2013a). Il serait aussi possible de distinguer différentes populations au sein d'un même sous-ensemble de tanocytes, exprimant des marqueurs tels que GLAST, GLT-1 and GLUT<sub>1</sub>, mais également en fonctions des réseaux neuroendocrines et non-neuroendocrines avec lesquels les tanocytes interagissent (Prevot *et al.*, 2018) (fig. 39).

Par conséquent, dans ce manuscrit, les tanycytes seront désormais définis selon la nouvelle classification, à savoir : tanycytes EM ( $\beta 1$ ), tanycytes vmARH ( $\beta 2$ ), tanycytes dmARH ( $\alpha 2$ ) et tanycytes VMH/DMH ( $\alpha 1$ ) (fig.39).

Classification		Characteristics				
New	Old	Shh Expression During Development	Number of Cilia	Nature of the Contacted Blood Vessels	Markers	Nature of the Associated Neuroendocrine Axons
ME tanycytes	$\beta 2$	No	Unciliated	Fenestrated vessel, endfeet brushlike	DARPP-32, vimentin, GPR50, Claudin-1, GLAST GLUT1( <sup>+/+</sup> )	TRH, CRH, SOM, GHRH, TIDA
vmARH tanycytes	$\beta 1$	Yes	Unciliated	Fenestrated vessel, endfeet brushlike, medially located  BBB vessels (proximal part of their processes) and fenestrated vessels (distal part of their processes), endfeet clublike, laterally located	SPRR1A, DARPP-32, vimentin, GPR50, Claudin-1, GLAST, GLUT1(+)  SPRR1A (?) DARPP-32, vimentin, GPR50, GLUT1(+)	GnRH, TIDA
dmARH tanycytes	$\alpha 2$	Yes	Biciliated	BBB vessels	DARPP-32, Vimentin, GPR50, Connexin-43, GFAP ( <sup>+/+</sup> ), GLT-1, GLUT1(+)	NA
VMH and DMH tanycytes	$\alpha 1$	Yes	Biciliated	BBB vessels	DARPP-32, GPR50, Vimentin, Connexin 43, GFAP ( <sup>+/+</sup> ), GLT-1, GLUT1(+)	NA

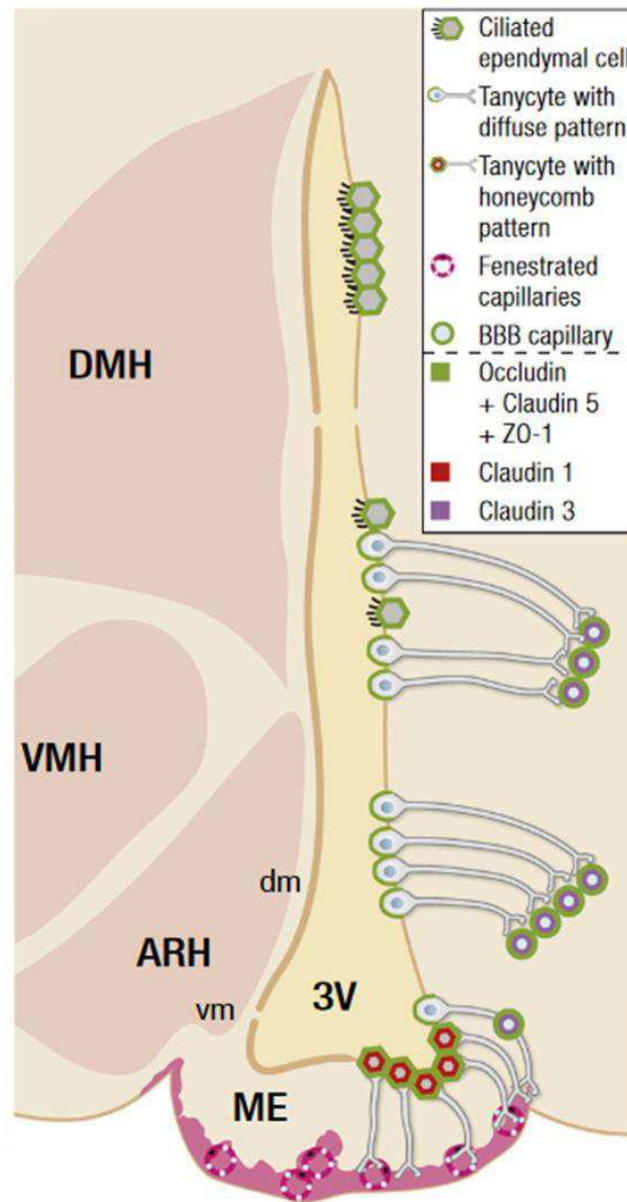
**Figure 39 : Classification des sous-populations tanycytaires.**

La classification des tanycytes, ancienne ou nouvelle, s'établit principalement selon la structure dans laquelle ils projettent, soit, dans l'EM, le vmARH, le dmARH et le VMH/DMH. Cependant, d'autres caractéristiques de ces tanycytes dont, l'expression de la protéine Shh (Sonic HedgeHog), le nombre de cils, la nature des vaisseaux sanguins ou des neurones avec lesquels ils sont en contact et les marqueurs génétiques, montrent que certaines particularités sont retrouvées dans plusieurs sous-populations de tanycytes. Il paraît donc nécessaire de développer une nouvelle classification des tanycytes plus en accord avec leurs caractéristiques nouvellement mis en évidence. D'après Prevot *et al.*, 2018.

En lien avec nos recherches portant sur l'implication des récepteurs NMDA tanycytaires dans la barrière sang/CSF et les conséquences des auto-anticorps anti-RNMDA circulant, nous focaliserons cette partie sur les tanycytes de l'éminence médiane et du noyau arqué, ainsi que leur rôle fonctionnel dans la barrière sang/CSF et dans les échanges d'informations entre la périphérie et le SNC.

### 3.2 *Les barrières sang/CSF et BHE de l'hypothalamus médiobasal*

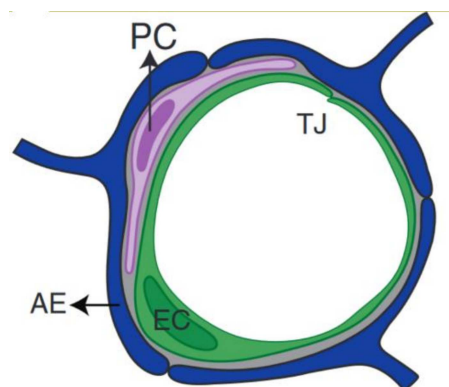
Dans la région médiobasale de l'hypothalamus, il existe trois types de barrières cérébrales impliqués dans la transmission d'informations relatives à la PA : la BHE du noyau arqué, la barrière sang/CSF sous le contrôle des tanycytes EM et celle sous le contrôle des tanycytes vmARH (fig. 40).



**Figure 40** : Schéma représentant la distribution des protéines constitutives des jonctions serrées dans la région tubérale de l'hypothalamus.

Dans le noyau arqué, les capillaires présentent une BHE constitutive dont la structuration oscille selon l'état énergétique de l'individu. En revanche, la zone externe de l'éminence médiane est constituée de capillaires dépourvus de BHE et possède une fenestration de leurs cellules endothéliales. On remarque à la fois dans le noyau arqué et dans l'éminence médiane, les pieds tanycytaires qui entrent en contact avec les capillaires. Le corps cellulaire des tanocytes EM expriment une barrière hautement organisée en nid d'abeille, l'état de la barrière des tanocytes vmARH est dépendante de la condition énergétique. Cependant les tanocytes dmARH sont fondamentalement dépourvus de toutes barrière paracellulaire. Abréviations ; ARH, noyau arqué ; dm, dorsomédian ; vm, ventromédian ; EM, éminence médiane ; 3V, 3<sup>e</sup> ventricule. D'après Prevot *et al.*, 2018.

Certaines barrières cérébrales ont pour rôle de protéger le SNC de la toxicité du sang et des molécules de la périphérie grâce à une structure particulière adaptée à leur fonction. Parmi ce type de barrière, on identifie la barrière hémato-encéphalique qui est classiquement composée de différents types cellulaires. Tout d'abord, le système vasculaire est composé de cellules endothéliales qui forment la paroi des vaisseaux sanguins. Les cellules murales incluent les cellules musculaires lisses et les péricytes. Les cellules musculaires lisses sont retrouvées uniquement dans les larges vaisseaux cérébraux ils sont absents des capillaires, les péricytes quant à eux ne recouvrent que partiellement la couche de cellules endothéliales. Les astrocytes enveloppent complètement les vaisseaux du côté adluminal par leur pied astrocytaires (Daneman and Prat, 2015) (fig. 41).

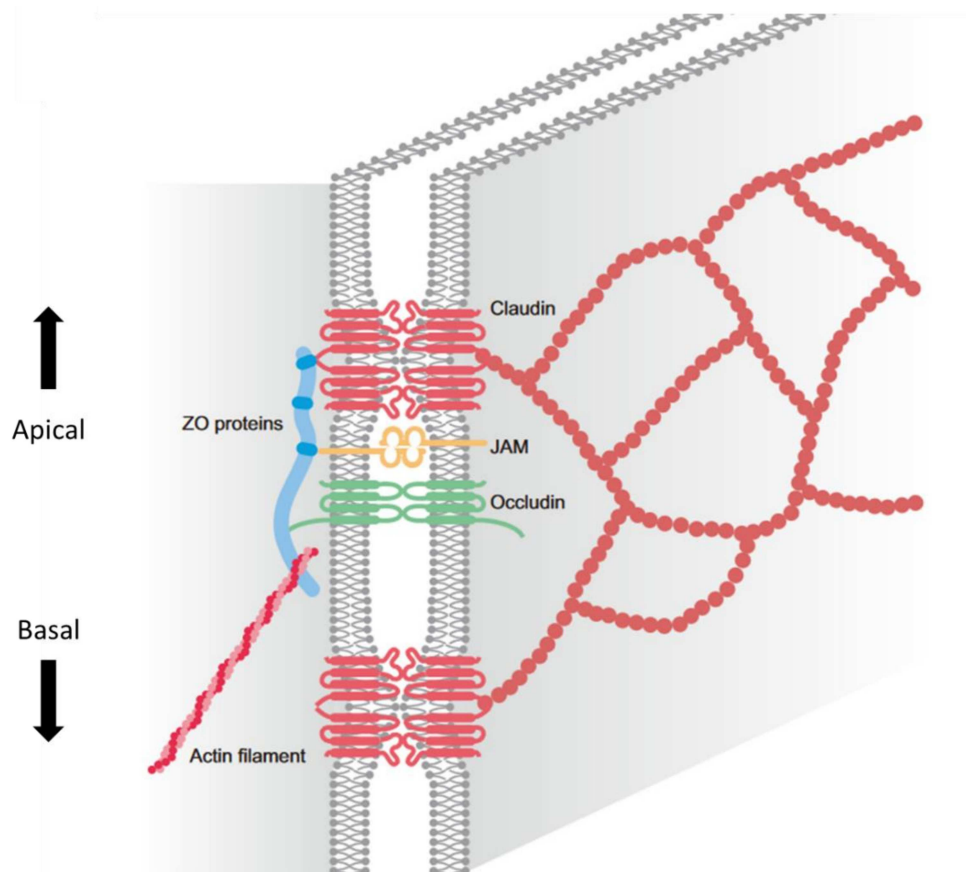


**Figure 41 : Représentation schématique des types cellulaires composant l'unité neurovasculaire.**

Le système vasculaire comportant une BHE se compose de trois types cellulaires principaux, les cellules endothéliales (EC), les péricytes (PC) et les astrocytes qui enveloppent les vaisseaux sanguins de leur pied astrocytaires (AE). Les cellules endothéliales assurent une étanchéité entre le milieu sanguin et parenchymateux grâce à la présence de jonctions serrées entre cellules endothéliales adjacentes (TJ). D'après Daneman and Prat, 2015.

Les cellules endothéliales du système vasculaire sont maintenues ensemble par les jonctions serrées. Ces jonctions serrées sont constituées de protéines divisées en différentes catégories dépendantes de leur fonction. Leur rôle est de préserver un contact cellulaire proche de

l'accolement (Daneman and Prat, 2015). Elles permettent la formation d'une barrière imperméable qui restreint la diffusion libre des molécules à travers l'espace intercellulaire. De plus elles bloquent d'éventuels échanges entre les domaines membranaires apicaux et basaux. (Otani and Furuse, 2020) (fig. 42).



**Figure 42 : Structure et composition moléculaire des jonctions serrées.**

L'occludine et les molécules d'adhésion fonctionnelle (JAM) sont les principales protéines transmembranaires des jonctions serrées. Les claudines forment des ponts, correspondant aux points de contact des membranes. Les protéines membranaires associées aux jonctions serrées sont localisées aux jonctions apicales cellule-cellule en interagissant avec la famille de protéines d'échafaudage, *zonula occludens*, servant de connexion entre les jonctions serrées et le cytosquelette d'actine. Abréviations : JAM, molécule d'adhésion jonctionnelle ; ZO, zonula occludens. D'après Otani and Furuse, 2020

Ces jonctions serrées (fig. 42) sont constituées de différentes protéines, dont les claudines, les occludines, les molécules d'adhésions fonctionnelles (JAM) et les protéines de la famille des *zonula occludens* (ZO), ayant chacune un rôle dans le positionnement et/ou le maintien de la jonction. Les claudines transmembranaire sont impliquées dans la régulation de la perméabilité paracellulaire de par la création d'un point de contact entre les membranes cellulaires (Zihni *et al.*, 2016). Les protéines claudines, occludines et JAMs interagissent par leur région cytoplasmique avec la famille des protéines d'échafaudage ZO intracytoplasmique, qui sont elles-mêmes fixées au squelette d'actine (Itoh *et al.*, 1999) (fig. 42). L'actine permet le maintien de l'assemblage des jonctions serrées en étant connecté au cytosquelette.

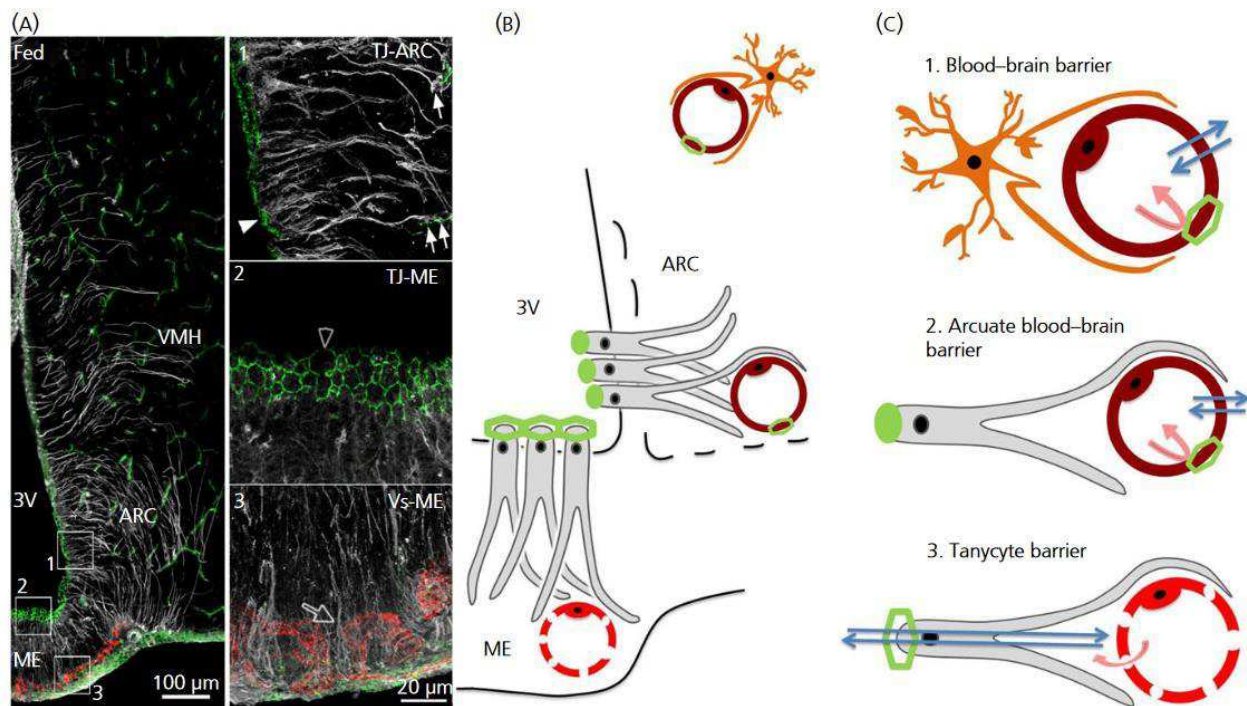
La BHE est donc en partie dépendante des jonctions serrées des cellules endothéliales formant une barrière paracellulaire à résistance élevée aux molécules et aux ions. Elles permettent de polariser les compartiments luminal et basal des vaisseaux sanguins (Daneman and Prat, 2015). En conditions physiologiques, les jonctions serrées des cellules endothéliales du système vasculaire du noyau arqué sont composés des protéines ZO1 (*Zonula Occludens* 1), de l'occludine, de la claudine 5 et de la claudine 3 (Daneman and Prat, 2015; Mullier *et al.*, 2010; Norsted *et al.*, 2008) (fig. 40). Toutefois, la barrière établie par les cellules endothéliales des capillaires du vmARH n'est pas « figée » et présente une plasticité selon la condition métabolique de l'individu, cette particularité sera détaillée dans la partie 5.1. De plus, il a été montré que certains capillaires régionalisés de la vmARH n'exprimaient pas d'antigènes de la barrière endothéliale (EBA), montrant ainsi l'absence potentielle d'une BHE intacte (Norsted *et al.*, 2008).

La barrière sang/CSF est établie au plancher du troisième ventricule par le corps cellulaire des tanocytes EM qui tapissent le plancher du 3<sup>e</sup> ventricule. Les tanocytes communiquent directement avec le compartiment sanguin des vaisseaux fenêtrés de la zone externe de l'éminence



médiane. Cette promiscuité engendre des échanges facilités entre les molécules du sang et les tanocytes. Afin de préserver le milieu du CSF et l'ensemble du parenchyme, les tanocytes EM forment une barrière étanche à l'interface parenchyme/CSF au niveau de leur corps cellulaire (fig. 40-43A-B). Cette barrière est constituée de protéines de jonctions serrées similaires à celles retrouvées dans la barrière formée par les cellules endothéliales des vaisseaux de l'ARH à l'exception de la claudine 3 (fig. 40). On retrouve l'expression des protéines Occludin, Claudin 5, ZO1 et exclusivement par cette sous-population de tanocytes, la claudine-1 (Mullier *et al.*, 2010). Les tanocytes vmARH sont en contact avec les capillaires dont la BHE est fluctuante selon le statut énergétique (fig. 40-43B-C). Cependant, tout comme l'architecture de ces vaisseaux peut varier selon le statut énergétique, il en est de même pour la barrière des corps cellulaires des tanocytes vmARH (voir 5.1). Les tanocytes dmARH sont en contact des capillaires possédant une BHE mais dont la structure reste stable (fig. 40). De par la présence d'une BHE constante sur ces vaisseaux, les tanocytes dmARH ne présentent pas d'organisations spécifiques des protéines de jonctions serrées pouvant leur conférer une barrière au niveau de leur corps cellulaire (fig. 40). Cette absence de barrière au niveau des tanocytes ARH permet une diffusion paracellulaire entre le CSF et l'ARH (Mullier *et al.*, 2010).

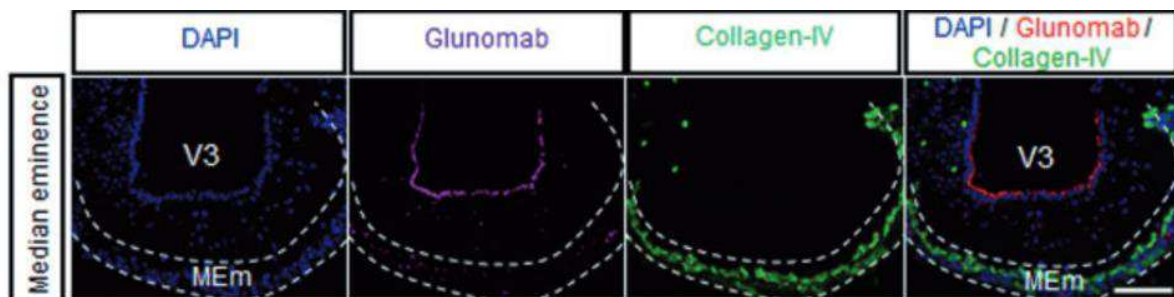
Ainsi, les tanocytes EM expriment l'occludine, ZO1, la claudine 5 et la claudine 1 permettant la création d'une barrière étanche entre les compartiments sanguins, le CSF et le parenchyme cérébral (fig. 40). Cette barrière hautement organisée se révèle sous forme d'un motif en nid d'abeille caractéristique (Mullier *et al.*, 2010). De plus, les prolongements tanocytaires en contact avec les vaisseaux fenêtrés de l'EM vont former des jonctions serrées intercellulaires (fig. 43B-C), assurant ainsi une barrière physique prévenant l'extravasation des molécules circulantes du sang vers le parenchyme cérébral (Langlet *et al.*, 2013b; Mullier *et al.*, 2010).



**Figure 43 : Organisation de l'interface sang-noyau arqué de l'hypothalamus médiobasal de l'hypothalamus médiobasal.**

(A) Immunomarquage anti-vimentine (blanc) révélant les tanycytes, Détection immunohistologique de la protéine zonula occludens-1 (ZO-1 ; vert) et anti-MECA-32 (rouge) qui révèle les vaisseaux fenêtrés sur une coupe coronale de la région tubérale chez des animaux nourris. Les tanycytes présentent un immunomarquage anti-ZO1 diffus et désorganisé (pointes de flèche ; encart 1) lorsqu'ils interagissent avec les vaisseaux qui possèdent une barrière qualifiée d'hémato-encéphalique par similitude avec la BHE impliquant les astrocytes Dans les corps cellulaires des tanycytes en contact avec les vaisseaux fenêtrés de la zone externe de l'EM (révélés par le MECA-32), l'immunomarquage anti-ZO-1 est organisé en un motif caractéristique en nid d'abeille (pointes de flèche vides ; encart 2). Ces tanycytes interagissent avec les vaisseaux fenêtrés révélés par MECA-32 (flèches vides ; encart 3). (B) Représentation schématique de la région tubérale hypothalamique. Les tanycytes de l'éminence médiane qui interagissent avec les vaisseaux fenêtrés du lit capillaire de la zone externe présentant une barrière organisée de complexes de jonctions serrées. Les tanycytes de la région ventromédiane du noyau arqué interagissent avec des vaisseaux sanguins possédant une barrière hémato-encéphalique, ces tanycytes expriment des protéines de jonctions serrées tel que ZO-1, mais ne sont pas organisées en nid d'abeille. (C) Représentation schématique des différentes interfaces sang-cerveau présentes dans la région tubérale hypothalamique. Capillaire sanguin classique avec une barrière hémato-encéphalique (1), Capillaire non fenêtré en relation avec un tanycyte constituant la barrière sang-ARC (2) et capillaire fenêtré en relation les tanycytes qui constituent la barrière tanycytaire sang-CSF (3). Selon l'auteur, les propriétés de la barrière sont principalement assurées par les cellules endothéliales (1, 2) ou par les tanycytes (3) afin de maintenir l'homéostasie cérébrale. Contrairement aux vaisseaux fenêtrés (flèches rose en 3), la diffusion paracellulaire ne peut pas avoir lieu au travers des barrières 1 et 2 (flèches roses). Ces dernières présentes, cependant des mécanismes de transport transcellulaire spécifiques permettant d'assurer les échanges (flèches bleues). D'après Langlet, 2014.

Nous nous sommes intéressés à la barrière tanycytaire lors de la mise en évidence par Macrez et coll. (2016), d'un immunomarquage des tanocytes EM avec notre anticorps Glunomab<sup>®</sup>. Cet anticorps cible spécifiquement le site de fixation de l'activateur tissulaire du plasminogène (tPA) sur la sous-unité GluN1 du RNMDA (fig. 44) (Macrez *et al.*, 2016). L'immunomarquage anti-GluN1 révèle la présence du récepteur NMDA à la surface apicale des tanocytes. Des immunomarquages similaires montrent la présence du RNMDA dans les cellules endothéliales des vaisseaux cérébraux possédant une BHE et dans certaines populations de neurones (Lesept *et al.*, 2016; Macrez *et al.*, 2016; Mehra *et al.*, 2020). Par ailleurs, le fait est que la fixation du tPA sur les récepteurs NMDA endothéliaux entraîne une perte de l'intégrité de la BHE (Lesept *et al.*, 2016; Macrez *et al.*, 2016). Nous nous sommes demandés si les récepteurs NMDA tanycytaire possédaient aussi un rôle dans le maintien de la barrière tanycytaire, et si la perte de ces récepteurs dû aux autoanticorps du CSF dans la pathologie d'EAI-RNMDA pouvait influencer son intégrité.



**Figure 44 : Immunomarquage du récepteur NMDA au pôle apical des tanocytes EM.**

Région médiobasale de l'hypothalamus observé par microscopie à épifluorescence montre l'immunomarquage du Glunomab (rouge), et du collagène-IV (en vert) chez des souris sauvages. L'immunomarquage révélé par l'anticorps glunomab montre la présence de la sous-unité GluN1 au pôle apical des tanocytes. Contrairement aux capillaires cérébraux pourvus d'une BHE, cet immunomarquage se révèle inexistant dans les vaisseaux fenêtrés de la zone externe de l'EM (MEm). V3 : 3<sup>e</sup> ventricule, MEm : éminence médiane. Échelle : 50µm. D'après Macrez *et al.*, 2016.

En conclusion, les barrières de l'hypothalamus médiobasal sont étroitement liées aux tanocytes. Leur proximité avec le compartiment sanguin n'est pas uniquement due à un rôle de barrière et de protection de l'environnement cérébral, les tanocytes sont aussi capables de détecter et de communiquer des informations entre le SNC et la périphérie (Balland *et al.*, 2014; Elizondo *et al.*, 2015; Uriarte *et al.*, 2021).

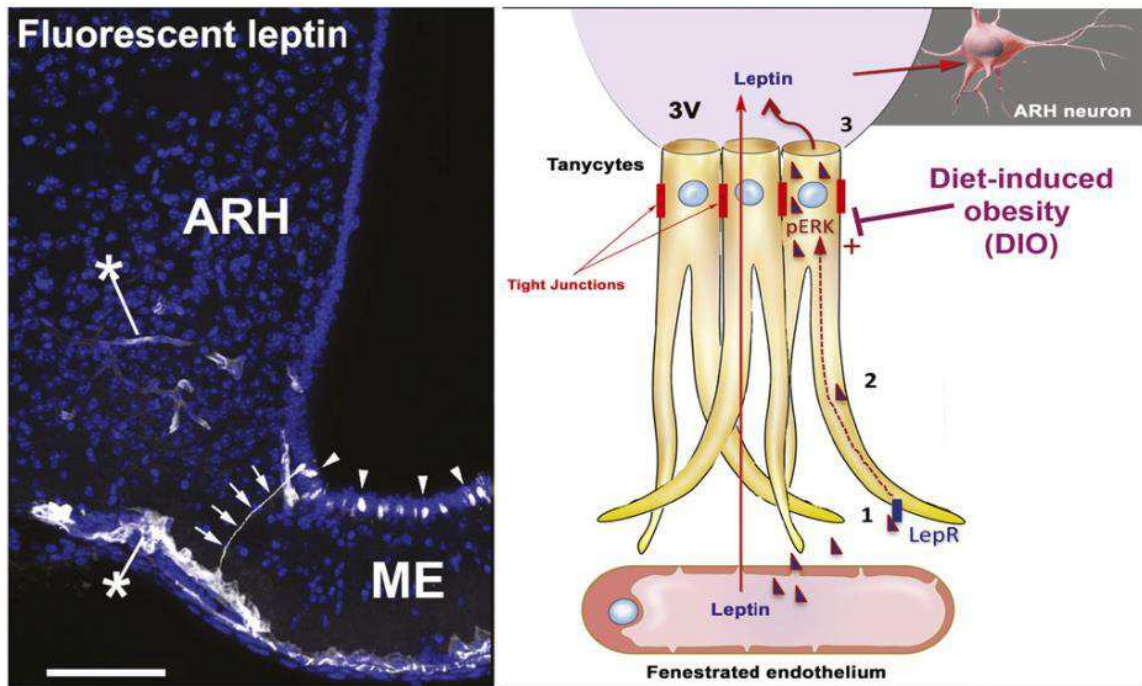
## 4 Les transmissions d'informations par les tanocytes

Les tanocytes EM sont en contact direct avec les vaisseaux fenêtrés de l'éminence médiane, réseaux vasculaires faisant partie du système porte hypothalamo-hypophysaire. Cette localisation octroie aux tanocytes une place stratégique dans la détection et le transport des molécules du sang provenant de la périphérie vers le CSF et les régions hypothalamiques adjacentes.

### 4.1 Transports d'hormones

Les tanocytes sont sensibles aux hormones circulantes dont certaines impliquées dans la régulation de la PA (Bolborea and Langlet, 2021). Il a été montré que les tanocytes EM avaient une capacité à percevoir et à répondre à la leptine circulante (Balland *et al.*, 2014). D'autres études ont mis en évidence les propriétés du transport de la ghréline par les tanocytes selon un mécanisme GHSR-indépendant (Récepteur Sécrétagogue de L'hormone de Croissance) (Collden *et al.*, 2014; Uriarte *et al.*, 2021). La leptine est une hormone anorexigène sécrétée dans le flux sanguin par les adipocytes. Elle module la PA en activant ses propres récepteurs appelés récepteurs à la leptine (LepR) des neurones NPY et POMC du noyau arqué (voir 1.2) (de Luca *et al.*, 2005). L'équipe de Vincent Prévot a montré que la leptine administrée en périphérie était capturée par les tanocytes de l'éminence médiane depuis la circulation sanguine. Cela se fait par l'activation des récepteurs LepR à la surface des pieds tanocytaire (Balland *et al.*, 2014). La leptine va ensuite migrer vers le côté

apical grâce au système de transport réalisé par l'intermédiaire des clathrines. Elle sera ensuite libérée dans le CSF du 3<sup>e</sup> ventricule (fig. 45). La leptine pourra alors rejoindre la région du dmARH et d'autres régions cérébrales adjacentes afin d'activer les populations neuronales sensibles à la leptine (Caron *et al.*, 2010).



**Figure 45 :** Transport de la leptine depuis la périphérie vers le CSF *via* l'éminence médiane pour atteindre les cibles des aires hypothalamiques et non hypothalamiques en bordure du 3<sup>e</sup> ventricule.

À gauche : Détection de la leptine fluorescente (blanc) dans un prolongement tanycytaire (flèches) et leur corps cellulaire (pointes de flèche). La leptine bioactive fluorescente a été injectée par voie intraveineuse chez des souris de type sauvage et est captée par les tanycytes grâce à ses récepteurs LepR. Les astérisques montrent la détection de la leptine fluorescente dans les vaisseaux de la BHE de l'ARH. Barre d'échelle 200  $\mu$ m. À droite : Schéma illustrant le passage de la leptine des vaisseaux sanguins du système porte hypophysaire fenêtrés vers le CSF du troisième ventricule (3V) et les neurones hypothalamiques exprimant le LepR. Il a aussi été montré par Balland et coll. que l'obésité induite par le régime alimentaire chez les animaux perturbait le transport de la leptine par les tanycytes D'après Prevot *et al.*, 2018, à partir de Balland *et al.*, 2014.

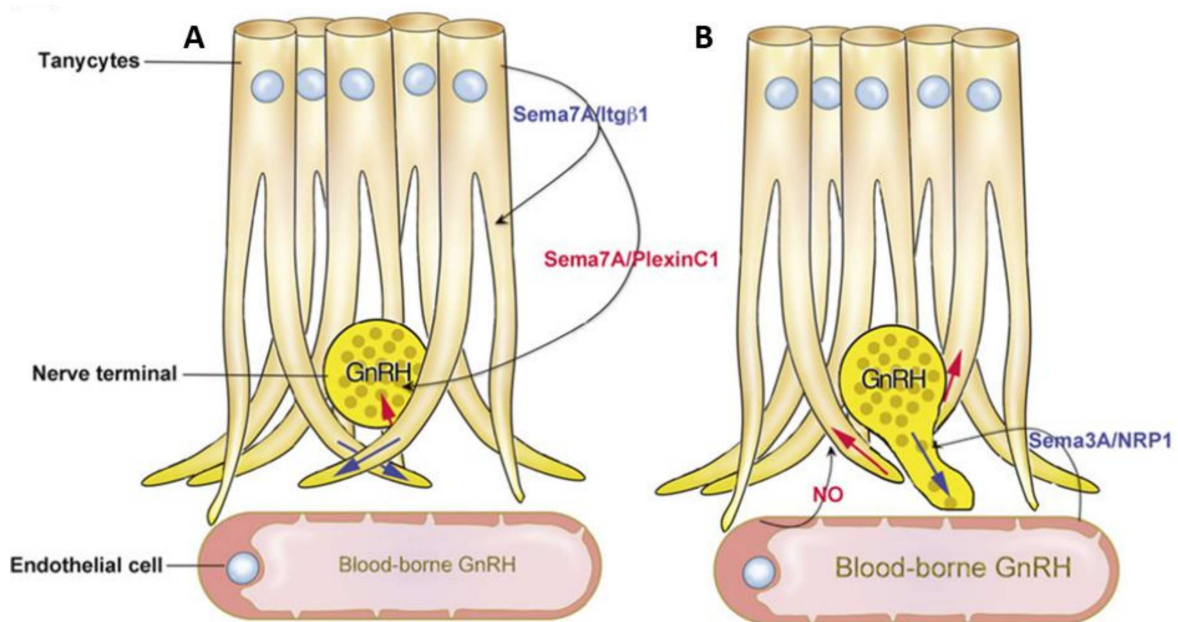
#### 4.2 Récepteurs métaboliques

Les tanocytes EM possèdent des propriétés analogues aux cellules  $\beta$  pancréatiques leur conférant une sensibilité au glucose. Nous savons que les cellules  $\beta$  pancréatiques sont des glucosenseurs. Pour remplir ces fonctions sensibles, elles expriment le transporteur du glucose 2 (GLUT2), la glucokinase (GK) pour la phosphorylation du glucose, et le canal potassium ATP-sensitif ( $K_{ATP}$ ) dont la fermeture permet une dépolarisation et une entrée massive de calcium entraînant la libération d'insuline. De manière intéressante, les tanocytes expriment aussi le GLUT2, la GK et le  $K_{ATP}$ , faisant des tanocytes des glucosenseurs (Prevot *et al.*, 2018; Thorens, 2015). Des études ont aussi montré que les tanocytes vmARH/dmARH et VMH étaient capables de détecter des modifications du niveau de glucose dans le CSF et de libérer des facteurs paracrines en réponse aux taux de glucose circulant, tels que l'adénosine triphosphate (ATP) (Frayling *et al.*, 2011). L'ATP serait capable d'influencer l'activité des neurones de l'ARH et du VMH, permettant une réponse adaptée aux variations de l'homéostasie énergétique (Frayling *et al.*, 2011; García-Cáceres *et al.*, 2019; Kittner *et al.*, 2006).

#### 4.3 Contrôle neuroendocrine

Un autre aspect des fonctions tanocytaires comporte le contrôle neuroendocrine de la reproduction. Nous savons que l'hormone gonadolibérine (GnRH) influence la libération des hormones lutéinisante (LH) folliculo stimulante (FSH) chez les mammifères femelles et mâles. Selon la phase du cycle œstral des souris femelles, la sécrétion de la GnRH est restreinte par une barrière physique opérée par les prolongements tanocytaires (Prevot *et al.*, 1998). Les terminaisons nerveuses des neurones sécrétant la GnRH se retrouvent immergés par les tanocytes empêchant la libération de la GnRH dans le système porte de l'EM (fig. 46). Lors de la pré-ovulation, un remaniement structurel des tanocytes EM se produit permettant le dégagement des axones et la

mise en place d'un contact entre la membrane axonal des neurones sécréteurs du GnRH et de la lame basale entourant l'espace vasculaire porte pituitaire (Prevot *et al.*, 1998). Ainsi, la facilitation de l'accès de la GnRH à la paroi vasculaire dans l'EM est associée à une augmentation persistante des niveaux de LH circulante et à l'arrêt du cycle œstral dans la phase œstrale (Giacobini *et al.*, 2014; Parkash *et al.*, 2015).



**Figure 46** : Représentation schématique des interactions coordonnées cellules gliales-endothéliales-neuronales régulant l'accès direct des terminaisons neurosécrétrices de la GnRH à l'espace péri-capillaire dans la zone externe de l'EM.

(A) Au cours du diestrus (dernière phase du cycle œstral avant la phase folliculaire du cycle menstruel), des niveaux élevés de progestérone dans un contexte de faible circulation d'œstrogènes favorisent la sécrétion de Sema7A par les tanocytes de l'EM. Sema7A active l'intégrine  $\beta 1$  (Itg $\beta 1$ ) exprimée par les tanocytes eux-mêmes *via* une action paracrine/autocrine pour promouvoir la croissance de leurs pieds terminaux (flèche bleue), qui submerge les terminaisons neuroendocrines de la GnRH et forment ainsi une barrière de diffusion empêchant la libération de la GnRH dans l'espace péri-capillaire des capillaires fenêtrés. En parallèle, le Sema7A tancytaire agit sur le récepteur Plexin C1 exprimé par les terminaisons neuroendocrines de la GnRH pour induire leur rétraction de l'espace péri-capillaire (flèche rouge). (B) Au cours du prœstrus (première phase du cycle œstral après la phase lutéale du cycle menstruel), des taux circulants élevés d'œstrogènes favorisent la libération de monoxyde d'azote (NO) et de Sema3A par les cellules endothéliales fenêtrées de l'EM, ce qui favorise respectivement la rétraction des terminaisons tancytiques de la lame basale parenchymateuse (flèche rouge) et la croissance, sous l'effet de la neuropiline 1 (NRP1), des axones neuroendocriniens de la GnRH guidés par un échafaudage de processus tancytiques vers l'espace péri-capillaire (flèche bleue).

L'importance du maintien de l'équilibre de l'ensemble de ces fonctions métaboliques et reproductives repose sur la capacité des organes périphériques à communiquer rapidement de façon effective et reproductible avec les réseaux neuronaux qui contrôlent l'homéostasie énergétique et la PA. Les tanocytes apparaissent comme être le pivot de ces processus physiologiques et ont un rôle clé dans leur régulation en conditions physiologiques et pathologiques (García-Cáceres *et al.*, 2019). Les troubles hypothalamiques observés chez les patients EAI-RNMDA incluent des dysfonctionnements dont les rôles sont régis par les tanocytes, tels que la prise alimentaire. Il est donc important d'étudier les liens entre les manifestations de la pathologie en tant que troubles métaboliques et le fonctionnement des tanocytes et de la région médiobasale hypothalamique dans son ensemble au sein de l'EAI-RNMDA.

## **5 Les déséquilibres de la prise alimentaire et leurs conséquences sur l'hypothalamus médiobasal**

Les tanocytes sont considérés comme des intégrateurs des signaux métaboliques grâce à leurs interfaces entre la circulation sanguine périphérique, le CSF et le parenchyme. De par leur localisation et leur interaction avec les compartiments sanguins et ventriculaires, les tanocytes reçoivent des informations métaboliques et modulent la réponse neuronale afin d'assurer des changements physiologiques dans la balance énergétique. Cette balance peut être perturbée soit par un apport énergétique trop faible, soit par un apport énergétique trop important face aux besoins énergétiques. Par conséquent, les tanocytes sont *de facto* impliqués dans l'adaptation métabolique en réponse aux déséquilibres énergétiques. L'adaptation métabolique passe par une réponse neuronale ciblant entre autres les neurones de premiers ordres NPY et POMC orexigènes et anorexigènes respectivement, impliqué dans le contrôle de la PA.

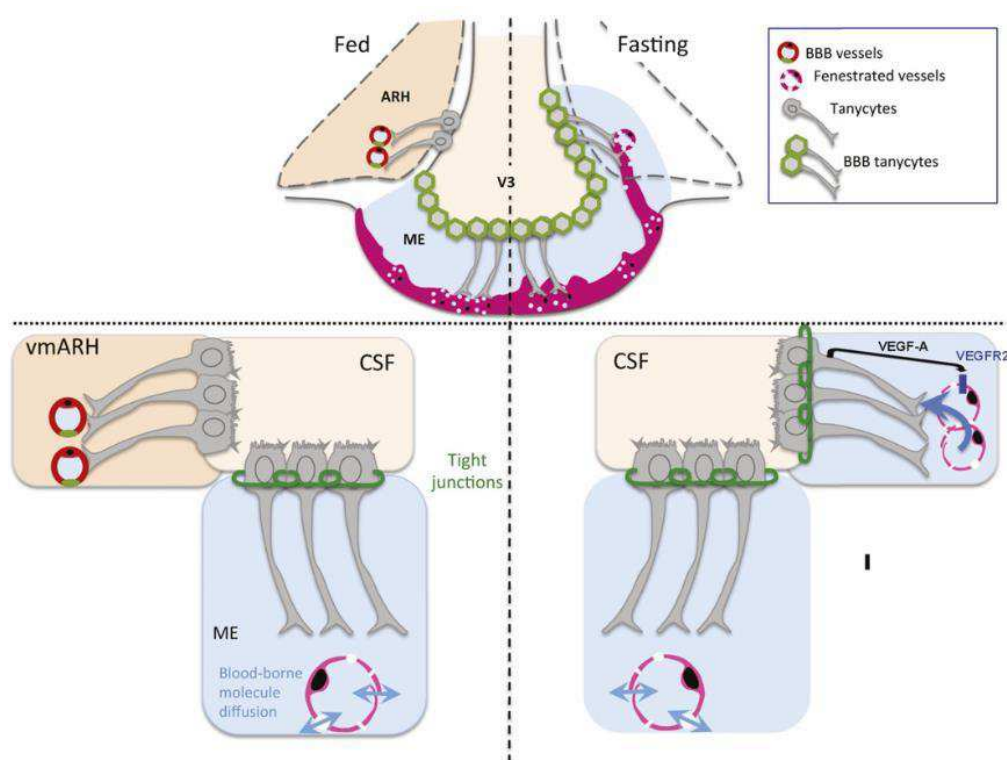


### 5.1 *Le jeûne*

L'état postprandial résulte de l'ingestion d'un repas, cette phase dure entre 4 et 5 heures selon le type de nutriments consommés. L'état postprandial se différencie de l'état post-absorptif qui s'étend sur les 6 heures suivant le repas, et de l'état de jeûne à la suite de la période post-absorptive soit 10 à 12 h après le dernier repas (Vors *et al.*, 2014). C'est à partir d'environ 12-16 h sans s'alimenter que le métabolisme intervertit sa source principale d'énergie (Anton *et al.*, 2018). Afin de pouvoir s'adapter à cet état énergétique et dans le but maintenir un équilibre métabolique stable, des modifications structurales et fonctionnelles se mettent en place au niveau de structures cérébrales impliquées dans la régulation de l'homéostasie énergétique et donc de la PA, impliquant les tanocytes.

Langlet et coll. (2013) ont étudié les changements adaptatifs des barrières sang-hypothalamus en réponse à un jeûne (Langlet *et al.*, 2013a). Pour ce faire, les études ont été réalisées chez deux groupes d'animaux, l'un ayant un accès *ad libitum* à la nourriture, l'autre étant à jeun pendant 24 h. Les 24 h de jeûne entraînent une chute du glucose sanguin déclenchant l'expression du facteur de croissance endothéliale vasculaire A (VEGF-A) par les tanocytes EM et une accumulation du VEGF dans l'éminence médiane hypothalamique. Le VEGF contenu dans ces tanocytes va interagir avec ses récepteurs VEGFR endothéliaux des capillaires de l'EM et du vmARH *via* les prolongements tanocytaires en contact avec ces capillaires, afin de promouvoir la fenestration des cellules endothéliales. Les tanocytes en contact avec les capillaires nouvellement perméables réorganisent leurs complexes de jonctions serrées en bordure du 3<sup>e</sup> ventricule. Ils créent ainsi une barrière étanche entre le parenchyme et le CSF (fig. 47). En conséquence, les cibles

neuronales du vmARH ne sont plus isolées par les barrières sang-cerveau et sang-CSF mais deviennent directement exposées aux signaux métaboliques périphériques (Langlet *et al.*, 2013a).



**Figure 47 :** Le jeûne induit la fenestration des capillaires du noyau arqué ventromédian en réponse au VEGF-A exprimé par les tanycytes vmARH.

Schéma représentatif des conséquences fonctionnelles des modifications structurales de la barrière tanycytaire sur l'accès direct des molécules véhiculées par le sang vers le vmARH en créant une route privilégiée. La chute du glucose détectée par les tanycytes entraîne la production de VEGF-A qui va interagir avec le VEGFR de type 2 des cellules endothéliales pour favoriser la fenestration de leur endothélium, simultanément, les tanycytes de l'ARH réorganisent leurs jonctions intercellulaires en constituant des complexes de jonctions serrées similaires à ceux des tanycytes EM. D'après Prevot *et al.*, 2018 adapté de Langlet *et al.*, 2013a.

Liu et coll. (2012) ont mis en évidence le rôle du récepteur NMDA dans l'activation des neurones orexigènes AgRP/NPY et l'expression des neuropeptides *AgRP* et *NPY* après une phase de jeûne (Liu *et al.*, 2012). Chez des animaux mutants, la délétion spécifique du RNMDA des

neurones AgRP entraîne une diminution du poids corporelle, de la masse grasse, du quotient respiratoire et de la PA en condition *ad libitum* et après une période de jeûne (24 h) (Liu *et al.*, 2012). Cependant, la délétion du RNMDA des neurones POMC n'entraîne aucun changement dans le comportement alimentaire ou le poids corporelle des animaux mutants. Après un jeûne de 24 h, ce comportement s'observe histologiquement par une diminution de l'activité des neurones AgRP par l'expression de *cFos* chez des souris mutante déficiente en RNMDA des neurones AgRP/NPY, de plus, l'expression des ARNm *AgRP* et *NPY* sont significativement moins exprimés chez ces mêmes souris après 24 h de jeûne (Liu *et al.*, 2012).

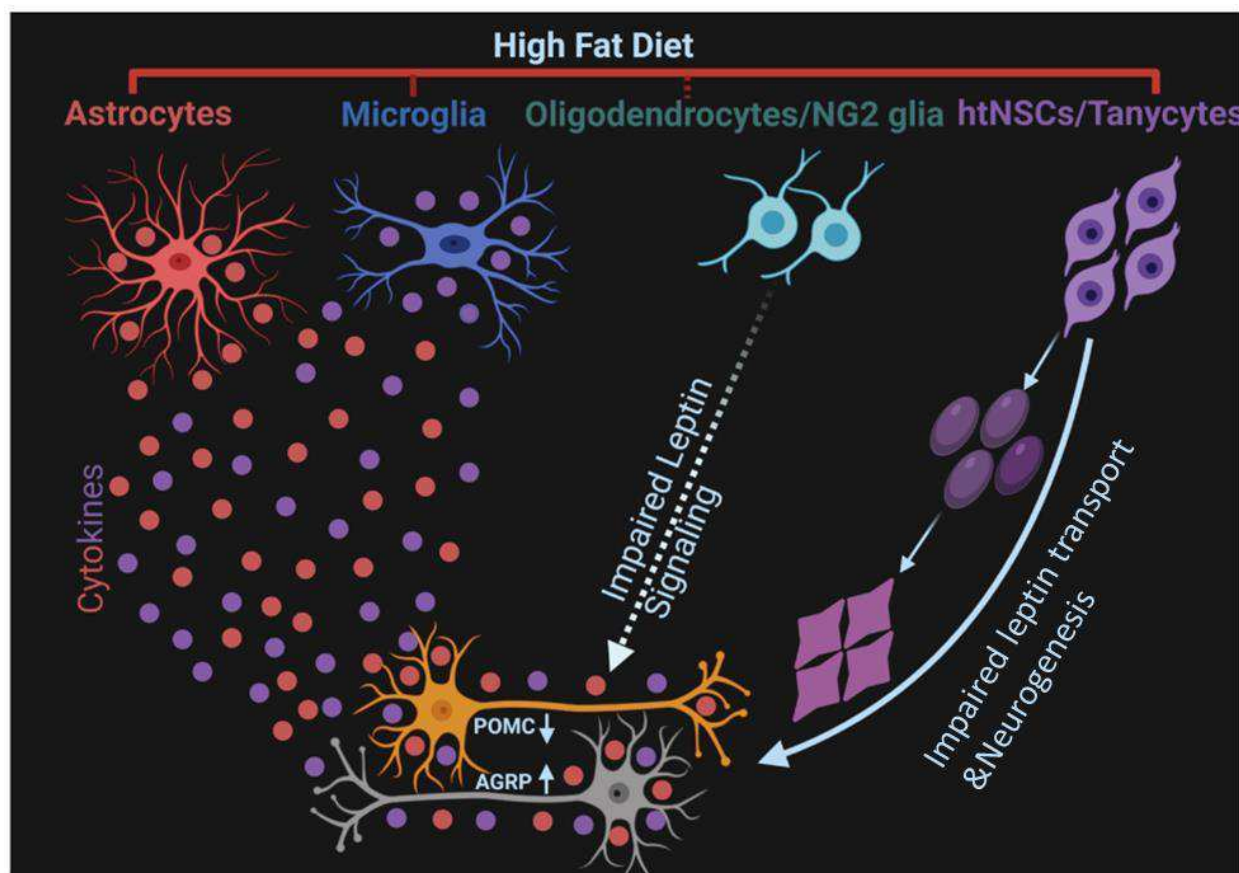
Cette particularité d'adaptation du système vasculaire de l'EM et du vmARH ainsi que de la barrière des tanocytes EM et vmARH dans le cas du jeûne permet de favoriser les échanges entre le sang et les neurones de l'ARH. Cette restructuration pourrait être perturbée dans le cas de l'EAI-RNMDA par l'interaction des anticorps circulants avec les récepteurs NMDA tanocytaire, entraînant une diminution de la densité en RNMDA. Étant donné les rôles du récepteur NMDA dans la plasticité de la BHE, la barrière des tanocytes EM ainsi que des capillaires du vmARH pourraient, eux aussi, subir des modifications structurelles dû à la perte des RNMDA. Ces perturbations empêcheront un fonctionnement physiologique en condition prandial, post-prandial et en période de jeûne permettant un maintien de l'équilibre énergétique normal. Les neurones AgRP/NPY sont physiologiquement très exposés au contenu du CSF de par l'absence de barrière paracellulaire des tanocytes vmARH. Ainsi, dans la pathologie de l'EAI-RNMDA, la diffusion des autoanticorps du CSF vers le noyau arqué entrainerait leur fixation aux RNMDA des neurones NPY/AgRP provoquant la perte de ces récepteurs neuronaux. D'après Liu et coll. (2012), cette perte des RNMDA provoque des modifications pathophysiologiques du comportement alimentaire et énergétiques des animaux.

## 5.2 Régime riche en graisse et hyperphagie

Il existe peu de littérature ayant étudié l'adaptabilité de l'EM et des tanocytes de cette même région en cas d'hyperphagie et de régime riche en graisse (HFD pour High Fat Diet). Il existe cependant une étude ayant montré qu'après six semaines d'exposition au HFD, les animaux présentaient de très lourds dérèglements des tanocytes EM : des dérangements spatiaux, des organelles anormaux et un contenu en lipides élevé comparé aux conditions contrôles (Severi *et al.*, 2021).

Cependant, les effets d'un HFD sur l'altération du fonctionnement de l'ARH ont fait l'objet d'études plus approfondies et mettent en évidence un lien important entre l'inflammation et le développement d'altérations irréversibles des structures responsables du contrôle de l'équilibre énergétique (Lizarbe *et al.*, 2019; Thaler *et al.*, 2012). Ce régime est connu pour induire une inflammation dans l'hypothalamus, l'ingestion de sucres tels que le fructose et le glucose est aussi responsable du développement de l'inflammation. Les cellules gliales résidentes de l'hypothalamus incluent la microglie, les astrocytes, les cellules souches pluripotentes de deux types que sont les cellules souches neurales hypothalamiques, et les précurseurs d'oligodendrocytes pouvant être différenciées en cellules gliales en condition inflammatoire (Ullah *et al.*, 2021). Toutes ces cellules vont répondre à l'inflammation causée par l'alimentation HFD en termes de production de cytokines et d'altération de la signalisation de la leptine et de la neurogenèse (Ullah *et al.*, 2021). Nous avons vu que l'ARH contenait les populations neuronales POMC et AgRP/NPY impliqué dans la régulation de la PA. Il a été mis en évidence que l'inflammation hypothalamique a lieu en premier dans l'ARH (Posey *et al.*, 2009) affectant prioritairement le fonctionnement des neurones POMC et AgRP/NPY. Les cytokines pro-inflammatoires produites par la microglie et les astrocytes dans l'ARH vont induire une résistance à la leptine et à l'insuline (Deng *et al.*, 2020) (fig. 48). De

plus, le TNF- $\alpha$ , une cytokine pro-inflammatoire, réduit l'expression de POMC ce qui stimule la prise alimentaire et à long terme l'obésité par l'augmentation de NPY/AgRP (Ullah *et al.*, 2021). D'autres cytokines sont exprimées en condition inflammatoire par les cellules gliales et les neurones de l'ARH. De fait, les neurones POMC et AgRP sont affectés par le biais de ces cytokines inflammatoires qui induisent un stress du réticulum endoplasmique et des dysfonctions mitochondriales par un défaut de l'autophagie. Ce milieu inflammatoire va causer à terme une toxicité pour les neurones qui ne mourront plus par apoptose et dont la population sera grandement diminuée (Thaler *et al.*, 2012). Ces lésions hypothalamiques mènent couramment au développement de l'obésité hypothalamique et au diabète de type 2.



**Figure 48 :** Effets du régime riche en gras sur les neurones de premier ordre qui contrôlent le comportement alimentaire

Le régime HFD active la microglie et les astrocytes, lesquels en réponse vont libérer des cytokines pro-inflammatoires. De même, le régime HFD entraîne une altération du transport de la leptine par les tanocytes mais aussi de la neurogenèse par les cellules souches neuronales (htNSCs). Les cytokines compromettent également la signalisation de la leptine qui régule à la hausse l'expression du neuropeptide orexigène AgRP. L'interaction entre le HFD, les progéniteurs d'oligodendrocytes et les neurones de l'ARH (POMC et AgRP) est jusqu'à maintenant hypothétique (flèche pointillée). Abréviations : NG2, précurseurs d'oligodendrocytes ; htNSCs, cellules souches neuronales hypothalamiques. D'après Ullah *et al.*, 2021.

L'EM, l'ARH et les tanocytes gouvernent ensemble la régulation énergétique. Ils permettent notamment de modifier la vascularisation de l'éminence médiane et du noyau arqué afin d'optimiser le transport des signaux périphériques vers les populations neuronales de l'hypothalamus. Ces signaux rejoignent le centre de régulation de la PA, le noyau arqué, dont les

populations neuronales de premier ordre vont activer d'autres interneurons situés dans des régions intra et extrahypothalamiques déclenchant une réponse adaptée aux changements énergétiques et ainsi permettant de maintenir un équilibre physiologique stable. La localisation du récepteur NMDA à la fois dans les capillaires de la BHE du noyau arqué et à la surface des tanocytes EM influe les fonctions régulatrices de l'équilibre énergétique. Nous savons que les autoanticorps circulant dans le plasma et le CSF peuvent cibler ces récepteurs et entraîner des dysfonctions des barrières de l'hypothalamus médiobasale, et de l'activité des neurones AgRP/NPY. Des dérégulations peuvent avoir lieu, induit ou non par les RNMDA, qui à terme crée des lésions parfois irréversibles menant à un état pathologique associé à des troubles métaboliques impliquant la PA.

## **Objectifs**





La description récente de l'EAI-RNMDA par le Pr Dalmau et son équipe a permis d'améliorer la compréhension de cette pathologie et la prise en charge des patients. Considérée pendant de nombreuses années comme une pathologie psychiatrique du fait de sa symptomatologie comparable avec la schizophrénie, elle est à ce jour mieux connue dans l'environnement hospitalier et est plus facilement identifiable. Ceci a pour conséquences une augmentation de la survie des patients, un raccourcissement de la durée de convalescence et une diminution du nombre de rechutes et de séquelles.

Afin d'étudier cette pathologie, de déterminer les mécanismes moléculaires sous-jacents à son développement et d'établir des pistes thérapeutiques, il a été nécessaire de développer des modèles animaux pertinents. Dans ce but, des modèles murins d'immunisation passive ont été développés, dont le tout premier il y a seulement 7 ans (Planagumà *et al.*, 2015). Les études réalisées ont permis de mieux comprendre la physiopathologie liée à la présence d'autoanticorps anti-récepteurs NMDA. Ainsi, une forte interaction entre autoanticorps anti-récepteurs NMDA et neurones hippocampiques a été identifiée comme étant à l'origine de symptômes neuropsychiatriques chez les patients, tel que des hallucinations visuelles et auditives, une paranoïa ou encore des changements d'humeurs inexplicables (Warren *et al.*, 2018a). Cependant, ces modèles reposaient principalement sur l'injection d'autoanticorps provenant de patients EAI-RNMDA, s'affranchissant ainsi de la réponse immunitaire du modèle animal. Cette réponse autoimmune est pourtant un des mécanismes à l'origine du développement de la pathologie. Il est donc nécessaire, afin de se rapprocher de la physiopathologie humaine, de développer un modèle murin impliquant la réponse système immunitaire. Un nombre non négligeable de patients EAI-RNMDA sont atteints de symptômes neurologiques liés à des dysfonctions potentielles de l'hypothalamus incluant des troubles du comportement alimentaires (Ho and Birmingham, 2001; Perogamvros *et al.*, 2012;

Virupakshaiah *et al.*, 2019). À l'heure actuelle, les études basées sur des modèles murins se sont focalisées sur le parallèle avec les troubles cognitifs et psychiatriques des patients car ce sont les principales manifestations. Les perturbations neuroendocrines associées à l'hypothalamus n'ont, à notre connaissance, pas fait l'objet de recherches approfondies. Or, plusieurs éléments soulèvent des interrogations quant à l'implication des autoanticorps dans les fonctions neuroendocrines. Tout d'abord, il a été montré la présence des autoanticorps circulants dans le sang et le CSF des patients (Dalmau *et al.*, 2008b). Or, les observations de Macrez et coll. en 2016 ont révélé la présence de récepteurs NMDA à la surface de tanocytes de l'éminence médiane en contact avec le CSF. Ces derniers sont, par ailleurs, impliqués dans la régulation de plusieurs fonctions hypothalamiques (Prevot *et al.*, 2018). De plus, Lesept et coll. en 2016 ont mis en évidence l'implication du récepteur NMDA endothéliale dans le maintien de l'intégrité de la BHE. Nous avons envisagé que ces autoanticorps anti-RNMDA pourraient être impliqués dans l'émergence de troubles neuroendocrines *via* l'interaction entre les autoanticorps et les RNMDA tanocytaires. Cette interaction pourrait entraîner une diminution du nombre ou de l'activité des récepteurs et perturber l'intégrité de la barrière sang/CSF formée par les tanocytes de l'éminence médiane.

Nous savons que l'organisation des complexes de jonctions serrées par les tanocytes le long du 3<sup>e</sup> ventricule n'est pas homogène (Mullier *et al.*, 2010). En effet, les tanocytes du vmARH sont exempts de barrière en condition basale (cf. figure 43). Cette particularité permet la diffusion libre du CSF vers l'ARH et les noyaux hypothalamiques adjacents (Mullier *et al.*, 2010). Par conséquent, les autoanticorps pourraient librement diffuser hors du 3<sup>e</sup> ventricule et interagir avec les récepteurs NMDA exprimés par les populations neuronales du système mélanocortine dans le noyau arqué. Or, il a été montré par Liu et coll. en 2012 que la perte spécifique des RNMDA des neurones AgRP entraîne des perturbations de l'homéostasie énergétique dont la prise alimentaire.

Ainsi, nous avons émis l'hypothèse qu'en initiant une réponse contre le peptide contenant les acides-aminés immunoréactifs (N368/G369) impliquées dans la pathologie d'EAI-RNMDA, les animaux reproduiraient la symptomatologie humaine de la pathologie et les processus auto-immuns à l'origine de ces symptômes.

De plus, nous supposons que les autoanticorps anti-RNMDA entraînent une ouverture de la barrière formée par les tanocytes de l'EM et/ou une perte des RNMDA des neurones du système mélanocortine à l'origine des troubles liés aux troubles du comportement alimentaire observés chez les patients EAI-RNMDA.

Dans un premier temps, mes travaux de thèse ont consisté à participer au développement d'un modèle murin d'EAI-RNMDA reposant sur une immunisation active. A partir de ce modèle, le but principal de cette première partie de thèse est de rechercher s'il existe des troubles de l'homéostasie énergétique et du métabolisme. Ainsi, mes travaux se sont déroulés suivant deux axes :

### **Mise en place d'un nouveau modèle murin d'encéphalite autoimmune anti-récepteurs NMDA reposant sur une immunisation active**

La mise en place de ce modèle est nécessaire afin de se rapprocher des mécanismes physiopathologiques des patients EAI-RNMDA. Son développement s'est effectué à travers trois objectifs principaux :

- La conception d'un peptide immunogène fondée sur la recherche d'un épitope situé sur la sous-unité GluN1

- Etude de l'infiltration des cellules immunitaires dans le SNC à la suite de l'immunisation par l'injection du peptide
- Caractérisation des conséquences d'une déplétion en lymphocyte B dans ce modèle

Cette étude a donné lieu à une publication « Autoimmune encephalitis mediated by B-cell response against N-methyl-D-aspartate receptor » publiée dans *Brain* en 2020.

### **Etude des troubles métaboliques dans notre modèle murin d'EAI-RNMDA**

Dans cette seconde partie, nous avons recherché s'il existait des troubles du comportement alimentaire comparables à ceux rapportés chez l'humain et /ou métaboliques dans notre modèle selon trois axes :

- Caractérisation des récepteurs NMDA des tanocytes de l'éminence médiane
- Etude du métabolisme, de la composition et de la température corporelle dans le modèle d'EAI-RNMDA en condition contrôle et durant une restriction alimentaire
- Etude de l'intégrité de la barrière tanocytaire, de la densité des neurones à NPY et de leur expression du gène *Grin1* chez les animaux EAI-RNMDA et sham

# **Matériels et Méthodes**



## **Animaux**

Les expériences ont été réalisées sur des souris (*Mus musculus*) mâles âgées de 8 semaines de souche C57BL/6J achetées auprès des laboratoires Janvier (Janvier Labs, France), et des animaux transgéniques *tdTomato<sup>loxP-STOP-loxP</sup>* (Strain# JAX:007914, RRID:IMSR\_JAX:007914) achetés auprès de Jackson Laboratories (Bar Harbor, ME, USA). L'utilisation d'animaux mâles s'appuie sur la décision qui a été prise au début du développement du modèle d'EAI-RNMDA justifiant ce choix par l'exemption des cycles hormonaux des femelles. Les animaux âgés de 8 semaines correspondent à de jeunes adultes ce qui s'apparente à l'âge des patients atteints d'EAI-RNMDA et permet donc une meilleure translation clinique/pré-clinique. Les animaux ont accès à la nourriture et à l'eau *ad libitum* à l'exception du protocole de mise à jeun (voir ci-dessous). Ils ont été hébergés selon un cycle nyctéméral composé de 12 heures de lumière et 12 heures d'obscurité dans des cages standard en polypropylène (22 × 37 × 19 cm, Charles River, L'Arbresle, France ; 5 à 6 souris par cage) et dans une pièce maintenue à une température de 22 °C ± 1 °C. Toutes les études sur les animaux réalisées dans notre laboratoire U1237 ont été menées conformément à la loi française suivant les Réglementations éthiques du Ministère de l'Enseignement Supérieur, de la Recherche et de l'Innovation français (décret 2013-118 ; agrément # 11904) et aux directives du Conseil de la Communauté Européenne (2010/63/UE). Les études sur les animaux réalisées dans le laboratoire U1172 à Lille ont été réalisées avec l'approbation des comités d'éthique institutionnels pour les soins et l'utilisation des animaux expérimentaux de l'Université de Lille et du ministère français de l'Éducation nationale, de l'enseignement supérieur et de la Recherche (APAFIS#2617-2015110517317420 v5), et selon les directives définies par la directive du Conseil de L'Union Européenne du 22 septembre 2010 (2010/63/EU).

## **Génération des animaux transgéniques**



Les animaux *tdTomato*<sup>loxP-STOP-loxP</sup> au fond génétique C57BL/6J ont été développés afin de posséder une réponse Cre constitutive. Il a été choisi le locus *Rosa26* qui est exprimé de façon ubiquitaire. Ce locus est donc modifié par insertion d'une construction contenant le gène du marqueur fluorescent *tdtomato* sous le contrôle d'une séquence stop associée à deux séquences LoxP. Ce système de recombinaison *Cre-Lox* nous permet de déterminer la localisation et l'instant précis où le gène *tdTomato* est activé.

### **Préparation des tissus cérébraux**

*Tissus pour l'immunomarquage* : les souris C57BL/6J ont été décapitées vigiles à l'aide de ciseaux. Les cerveaux ont été disséqués, rincés dans une solution saline froide, puis directement inclus dans de l'agent d'enrobage Cryomatrix™ (Eprexia™, Thermo Fisher Scientific, MA, USA) et congelés dans de l'isopentane refroidi à -70 °C à l'aide de glace carbonique. Les tissus ont ensuite été découpés au cryostat en sections de 14 µm (CM3050, Leica Microsystems) et conservés à -80 °C jusqu'à leur utilisation.

*Tissu pour l'hybridation in situ* : toutes les surfaces et les outils ont été nettoyés avec le RNaseZap® (Sigma-Aldrich, MO, USA) pour s'assurer que nos tissus ne soient pas contaminés par les RNases. Les souris C57BL/6J naïves, les souris EAI-RNMDA et Sham (deux semaines après immunisation) ont été profondément anesthésiées et perfusées en intracardiaque avec une solution saline froide supplémentée en héparine à 0,2 %. Après exsanguination, le cerveau est disséqué puis directement inclus dans l'agent d'enrobage Tissue-Tek OCT (Sakura) et congelés dans de l'isopentane refroidi à -70 °C à l'aide de glace carbonique. Les tissus ont ensuite été découpés au cryostat en sections de 14 µm (CM3050, Leica Microsystems) et conservés à -80 °C jusqu'à leur utilisation.

### **Immunomarquage et hybridation in situ**

Immunomarquage : Les coupes de cerveaux doivent tout d'abord être fixées, en plongeant les lames de microscopie directement dans un mélange 1/1 de méthanol/acétone refroidit à -20°C durant 5 minutes. Après la fixation, les tissus sont lavés dans 3 bains de PBS1X frais. Nous procédons ensuite à l'incubation avec les anticorps primaires appropriés pendant une nuit à 4 °C. Les anticorps primaires utilisés sont listés dans le tableau 1. Après 3 rinçages dans du PBS1X, les anticorps secondaires adaptés couplés à l'Alexa Fluor 488, à la Cyanine3 ou à l'Alexa Fluor 647 (1/800 ; Jackson ImmunoResearch, West Grove, CA, USA) ont été incubés à température ambiante pendant 90 minutes. Une fois lavées, les lames sont montées avec le milieu de montage Fluoromount-G contenant du DAPI pour la coloration des noyaux (Thermofisher, MA, USA ; 15596276).

**Tableau 1** : Liste des anticorps d'immunohistologie.

Anticorps & Cible	Espèce	Dilution	Référence
Glunomab - GluN1	Souris monoclonal	500e	
Vimentin	Poulet polyclonal	2000e	Millipore, AB5733
MECA-32 - PLVAP	Rat monoclonal	500e	Biologend, 120502
Claudine 1	Lapin polyclonal	100e	Invitrogen, 519000
ZO-1	Lapin polyclonal	5000e	Invitrogen, 617300

Pour l'hybridation, nous avons utilisé le kit RNAscope™ Multiplex Fluorescent V2 (Biotechne, MN, USA) selon les instructions du fabricant. Toutes les solutions de laboratoire ont été préparées à l'avance avec de l'eau stérile à 0,1 % DEPC (Sigma-Aldrich, MO, USA ; D5758) pour éviter toutes contaminations par les RNases et les DNases. Nos cibles ont été révélées avec la sonde *Grin1* (Biotechne, MN, USA ; 431611), couplée au fluorophore Opal 520 (Akoya, MA, USA ; SKU FP1487001KT ; 1/5000), et la sonde *NPY* (Biotechne, MN, USA ; 313321-C2) couplée au fluorophore Opal 650 (Akoya, MA, USA ; SKU FP1496001KT ; 1/5000). À la fin du protocole, nous avons effectué les étapes d'immunomarquage avec les anticorps primaires incubés pendant la

nuit à 4 °C. Le protocole a ensuite été poursuivi comme expliqué précédemment, excepté le marquage des noyaux cellulaires qui est obtenue grâce à une incubation des lames dans une solution de DAPI (1/5000) qui sont ensuite rincées et séchées avant d'être montées avec le milieu de montage ProLong™ Gold (ThermoFisher, MA, USA ; P36930).

### **Analyses microscopiques et quantifications**

Les images ont été capturées numériquement sur un microscope à épifluorescence Leica DM6B couplé à une caméra Hamamatsu Orca Flash 4.0, visualisées avec le logiciel Metamorph (Version 2.2.0 ; Molecular Devices), et traitées ensuite à l'aide du logiciel FIJI (Schindelin *et al.*, 2012). Pour la quantification des neurones NPY du noyau arqué des animaux Sham et EA, 3 animaux par groupes ont été utilisés. Le comptage s'est effectué grâce au logiciel FIJI sur 2 coupes distinctives par animal, où les valeurs ont été moyenné par animal puis entre les animaux de chaque groupe.

Pour la quantification de la densité du signal ZO-1, 5 animaux EA et 5 animaux sham ont été utilisés. Au total, 8 coupes de 3 sections différentes de l'éminence médiane (antérieure, médiane et postérieure) par animal ont été acquises avec un microscope confocal inversé TCS SP8 (Leica Microsystems, Mannheim, Allemagne). Les images obtenues représentent des projections d'intensité maximale collectées en utilisant le module z-stack du système LAS X (Leica Microsystems, Mannheim, Allemagne) et un objectif à immersion (huile) x40. Brièvement, l'analyse des images a été effectuée grâce au logiciel Fiji. Les régions d'intérêt se situent au niveau du corps cellulaire des tanocytes soit de l'éminence médiane, soit du noyau arqué où sont exprimés les protéines ZO-1. Celle-ci sont sélectionnées selon les dimensions 50/1000 px. Le signal ZO-1 est binarisé puis squelettisé permettant de mesurer ensuite la quantité moyenne de signal. Les valeurs obtenues sont additionnées pour chaque animal puis moyennées entre les 5 animaux d'un

même groupe. Le protocole a été effectuée comme détaillé précédemment (Langlet *et al.*, 2013a; Mullier *et al.*, 2010).

### **Injection de pAAV-Dio2-iCre-2A-GFP**

*L'ensemble des injections cérébrale de la tat-Cre et des AAV ont été effectués par le Dr Daniela Fernandois post-doctorante dans l'équipe du Dr Vincent Prévot à Lille.*

L'injection intraventriculaire a lieu 1 semaine avant l'immunisation des animaux. Afin de cibler les tanycytes en vue d'un tri cellulaire, nous avons utilisé chez les animaux *tdTomato<sup>loxP-STOP-loxP</sup>* soit une tat-Cre, soit Virus Adéno-Associé (AAV) pAAV-Dio2-iCre-2A-GFP comme détaillé précédemment (Collden *et al.*, 2014; Duquenne *et al.*, 2021; Müller-Fielitz *et al.*, 2017). Les injections sont réalisées à l'aide d'un cadre stéréotaxique (Kops Instruments, California) sous anesthésie générale induit par isoflurane 3 % dans un flux d'air médical d'1 L/min dans une chambre à induction. L'anesthésie est maintenue sous isoflurane (1 % dans un flux d'air médical à 0.7 L/min) durant laquelle les animaux reçoivent une injection de corpopfen (5 mg/kg) une fois l'action de l'anesthésie validée. Par la suite, une seringue Neurohamilton équipée d'une pompe à infusion (Hamilton Company, Ref: 65459-01) a été lentement insérée dans le cerveau pour administrer la tat-Cre ou l'AAV.

- *La tat-Cre n'est pas spécifique d'une population cellulaire, cependant son injection près du plancher du 3<sup>e</sup> ventricule limite sa diffusion dans le CSF attribuable aux tanycytes non ciliés. Son injection a lieu dans le troisième ventricule des animaux à raison de 1,5µl soit 2.1 mg/ml, selon les coordonnées stéréotaxiques : antéropostérieur, -1.7 mm, médiolatéral, 0 mm, dorsoventral, -5.6 mm, au cours d'une période de 5 minutes.*

- L'AAV cible spécifiquement le promoteur du gène *Dio2* principalement exprimé par les tanocytes. L'injection, à raison d'un volume de 2  $\mu\text{l}$  soit  $1.25 \times 10^8$  vp/ $\mu\text{l}$ , est effectuée dans le ventricule latéral selon les coordonnées : antéropostérieur, -0.3 mm, médiolatéral, -1 mm, dorsoventral, -2.5 mm, au cours d'une période de 10 minutes.

De cette façon, après injection de la tat-Cre ou de l'AAV, les animaux *tdTomato<sup>loxP-STOP-loxP</sup>* rapporteurs vont exprimer dans leur tanocytes le *tdTomato* qui permettra leur détection et leur sélection par cytométrie en flux.

### **Immunsation des animaux**

*L'immunsation des animaux a eu lieu à la fois à Caen et à Lille en fonction des protocoles.*

La réponse autoimmune a été induite chez des souris C57BL/6J mâles âgées de 8 semaines par injection sous-cutanée de 200 mg du peptide sélectionné (peptide GluN1<sub>359-378</sub>) dans un mélange émulsionné (rapport volumique 1:1) d'adjuvant complet de Freund (laboratoires Sigma Aldrich) contenant 600 mg de *Mycobacterium tuberculosis* (H37Ra tué par la chaleur (Difco)). Pour les animaux sham, l'émulsion est dépourvue du peptide immunogène. L'émulsion a été administrée en quatre points d'injections de 50  $\mu\text{L}$  : deux aux épaules et deux aux hanches. Tous les animaux ont reçu une injection intrapéritonéale de 200 ng de toxine pertussique (Sigma Aldrich) dans 200  $\mu\text{L}$  de solution saline au moment de l'immunsation, et 48 h après l'immunsation.

### **Tri cellulaire induit par fluorescence (FACS) et PCR en temps réel quantitative (RT-qPCR)**

*Isolation par FACS des tanocytes hypothalamiques*

*L'ensemble des étapes menant au tri des tanocytes ont été effectués à Lille sous les instructions et avec l'aide du Dr Daniela Fernandois. Le trie en lui-même a eu lieu à la Plateforme d'Imagerie Cellulaire et Tissulaire BICeL de Lille (BioImaging Center Lille).*

L'éminence médiane des souris *tdTomato<sup>loxP-STOP-loxP</sup>* injectée avec la tat-cre ou l'AAV-Dio2 ont été microdisséquées et dissociées par voie enzymatique (Papain Dissociation System, Worthington, Lakewood, NJ) pour obtenir des suspensions unicellulaires. Le trie des tanocytes a été réalisé à l'aide d'un cytomètre trieur de cellules FACS ARIA SORP et du logiciel FACSDiva v8.0.3 (BD Bioscience, Inc). La décision de tri était basée sur la fluorescence du tdTomato (excitation 561 nm ; détection : bande passante 675+/-20 nm). Pour chaque animal, 4.000 cellules tdTomato-positives et négatives ont été triées directement dans 10 µl de tampon d'extraction : 0,1 % TritonX-100 (Sigma-Aldrich) et 0,4 U/µl RNaseOUT (ThermoFisher). La population cellulaire positive correspond aux tanocytes tandis que la population cellulaire négative correspond aux autres populations cellulaires cérébrales. Cette population cellulaire négative (tout sauf des tanocytes) représente notre contrôle positif de l'expression des sous-unités du RNMDA dans l'étude par injection de *tat-Cre*.

#### *RT-qPCR*

*L'ensemble des RT-qPCR ont été effectués par moi-même à Lille après formation par le Dr Daniela Fernandois.*

Pour les analyses d'expression génique, les ARNm provenant des explants hypothalamiques ont été d'abord extraits grâce au kit PicoPure™ RNA Isolation Kit ref. KIT0204 (Applied Biosystems™, ME, USA), puis dosés grâce au spectrophotomètre NanoDrop™ ND-1000 (Thermo Fisher Scientific, ME, USA). Les ARNm provenant des populations tanocytaires triées par FACS

n'ont pas fait l'objet d'une extraction afin de limiter la manipulation des échantillons et la perte d'informations. Cependant l'ADN génomique a été dégradé grâce à l'utilisation du kit Invitrogen™ Enzyme ezDNase™ (Thermo Fisher Scientific, ME, USA).

Ces ARNm ont été transcrit de manière inverse à l'aide de la reverse transcriptase SuperScript III (Life Technologies) et une étape de préamplification linéaire a été appliquée aux cellules triées uniquement en utilisant le protocole TaqMan PreAmp Master Mix (P/N 4366128, Applied Biosystems). La RT-qPCR a été réalisée sur le système PCR rapide en temps réel Applied Biosystems 7900HT en utilisant le TaqMan Fast Universal PCR MasterMix (Applied Biosystems) (Tableau 2). Les données d'expression génique ont été analysées à l'aide des logiciels SDS 2.4.1 (Applied Biosystems), puis sont calculées en utilisant la méthode  $2^{-\Delta\Delta C_t}$  après normalisation selon l'expression des gènes de ménages *Actin* ou *RN18s*.

**Tableau 2 : Liste des sondes RT-qPCR**

Gène	Protéine	Référence
Actb	Actin	Mm00607939_s1
Rn18s	18S ribosomal RNA	Mm03928990_g1
Dio2	Type II iodothyronine deiodinase	Mm00515664_m1
Ppp1r1b	Darpp 32	Mm00454892_m1
Vim	Vimentin	Mm01333430_m1
Pecam 1	Platelet endothelial cell adhesion molecule	Mm01242576_m1
Elavl 4	ELAV-like protein 4 (Hu-antigen D, HuD)	Mm01263580_mH
Grin1	Glutamate receptor ionotropic, NMDA 1, GluN1	Mm00433790_m1
Grin2A	glutamate receptor, ionotropic, NMDA2A (epsilon 1), GluN2A, NMDAR2A, NR2A	Mm00433802_m1
Grin2B	Glutamate receptor ionotropic, NMDA 2B, GluN2B	Mm00433820_m1
Grin2C	glutamate receptor, ionotropic, NMDA2C (epsilon 3), GluN2C, NMDAR2C, NR2C	Mm00439180_m1
Grin2D	glutamate receptor, ionotropic, NMDA2D (epsilon 4), GluN2D, NMDAR2D, NR2D	Mm00433822_m1
Grin3A	Glutamate receptor ionotropic, NMDA 3A, GluN3A	Mm01341723_m1
Grin3B	glutamate receptor, ionotropic, NMDA3B, GluN3B, NR3B	Mm00504568_m1
VEGFA	vascular endothelial growth factor A	Mm00437308_m1
HIF1a	Hypoxia-inducible factor 1-alpha	Mm00468869_m1
NPY	Neuropeptide Y	Mm01410146_m1
AgRP	agouti related protein	Mm00475829_g1
POMC	Pro-opiomelanocortin	Mm00435874_m1
CARTPT	Cocaine- and amphetamine-regulated transcript protein	Mm04210469_m1

### Mesures paramètres physiologiques

*L'ensemble des expériences d'analyse de la composition corporelle et du métabolisme des animaux ont été réalisées à Lille par moi-même après formation et avec l'aide du Dr Emilie Caron responsable de la plateforme métabolique et phénotypique. L'analyse des données métaboliques ont été effectuée en partie par le Dr Emilie Caron puis par moi-même après formation.*

#### *Composition corporelle*

La composition corporelle a été mesurée chaque semaine à l'aide d'un Minispec LF Series (Bruker Corporation, Massachusetts). Les données relatives à la masse grasse, à la masse maigre et aux fluides corporels libres (fluides interstitielles, fluides intracellulaires et plasma) ont été exprimées en % du poids corporel.

#### *Température corporelle*

La mesure de la température corporelle s'est effectuée quotidiennement à 10h chez des animaux hébergés en cycle diurne 7h-19h. L'appareil de mesure est un ... la mesure est effectuée au niveau de la zone périanale qui est en moyenne 3°C plus basse que la température rectale. Les animaux sont placés sur la grille d'une cage puis maintenu par la queue qui est ensuite légèrement relevé afin d'exposer la zone de mesure.

#### *Analyse du métabolisme basal*

Analyse métabolique en conditions contrôles : les animaux, EA et Sham ont été directement immunisés à Lille, dans l'unité 1172 (Lille Neurosciences et Cognition) après la période d'habituation aux cages métaboliques (72 h). Les animaux sont placés individuellement dans un système de calorimétrie indirecte (PhenoMaster, TSE Systems ; Bad Homburg, Allemagne), composé de 8 cages maintenues à une température constante de 23 °C ± 1. Le système enregistre



plusieurs paramètres simultanément et les mesures sont effectuées toutes les 20 minutes pendant un total de 4 semaines, soit 28 jours selon un cycle jour/nuit de 12 h chacun. La consommation de nourriture et d'eau a été évaluée à l'aide d'un système de pesée relié à la mangeoire et au biberon d'eau. L'activité ambulatoire et les redressements ont été enregistrés avec un système multidimensionnel à faisceaux lumineux infrarouges. Un calorimètre à circuit ouvert permet de mesurer la consommation d'O<sub>2</sub> et la production de CO<sub>2</sub>, établissant la dépense énergétique :

$$(EE = VO_2 \times (3,815 + (1,232 \times (VCO_2/VO_2))) \times 4,1868)$$

Ainsi que le quotient respiratoire :

$$(RER = VCO_2/VO_2)$$

Analyses métaboliques durant une phase de jeûne/réalimentation : le système d'analyse est similaire à celui décrit précédemment. Les animaux sont placés dans le système de calorimétrie indirecte au 10<sup>e</sup> jour post-immunisation. Les enregistrements ont lieu durant un total de dix jours. Au 14<sup>e</sup> jour post-immunisation, un jeûne de 24 heures est réalisé. Pour cela, la nourriture est retirée à 10 h pour la moitié des animaux EA et sham. La nourriture est réapprovisionnée à 10 h le lendemain au 15<sup>e</sup> jour post-immunisation. Ce jeûne est effectué sans restriction hydrique.

### **Analyses statistiques**

Les tests statistiques ont été réalisés avec le logiciel GraphPad Prism (version 8.0.0.). La normalité des échantillons a tout d'abord été testée à l'aide de tests de Shapiro-Wilk. Selon la distribution, des tests *t* de Student ou *U* de Mann-Whitney ont été réalisés pour comparer deux groupes indépendants. Pour les comparaisons multiples, des tests ANOVA à un ou deux facteurs (groupe

et temps) ou de Kruskal-Wallis ont été utilisés, suivis de tests post-hoc en cas de différence significative (LSD de Fisher). Toutes les valeurs de  $p$  sont bilatérales. La valeur alpha est de 0,05.



## Résultats



## **Mise en place d'un nouveau modèle murin d'encéphalite autoimmune anti-récepteur NMDA reposant sur une immunisation active**

Title: Autoimmune encephalitis mediated by B-cell response against NMDA receptor in the mouse.

Titre : Encéphalite autoimmune dirigée contre le récepteur NMDA médiée par les lymphocytes B.

*Article publié dans le journal « Brain » pour lequel je suis quatrième auteur.*

Dans cet article j'ai participé à : l'induction des animaux GluN1<sub>359-378</sub> et Sham et aux tests comportementaux (Fig. 2), l'étude sur l'épilepsie induite pharmacologiquement chez les animaux GluN1<sub>359-378</sub> et Sham (Fig. 4), l'étude de la mort neuronale par marquage histologique au Fluoro-Jade chez les animaux GluN1<sub>359-378</sub> et Sham (Fig. 5G). En *supplementari*, j'ai participé aux études de cytométrie en flux (Fig. 2 et 4), à la génération des images histologique (Fig. 4) et à la construction des Fig. 2 et 4.

### **Contexte bibliographique de l'étude :**

L'encéphalite autoimmune à anticorps anti récepteur N-Méthyl-D-Aspartate (RNMDA) est une pathologie neuropsychiatrique où l'on estime son incidence à 1.5/million/an de cas. La symptomatologie de la maladie varie en fonction des patients et inclut des troubles psychiatriques (hallucinations, confusion, psychose), des déficits cognitifs (dans les fonctions exécutives et la mémoire), des crises d'épilepsie et des perturbations métaboliques, telles que des troubles du sommeil, de la prise alimentaire et de la régulation de la température corporelle.

La maladie est due à la présence d'autoanticorps dirigés contre le domaine amino-terminal (ATD) de la sous unité GluN1 du RNMDA. Le système immunitaire est largement impliqué dans cette maladie, principalement les lymphocytes B et les plasmocytes qui sont détectés chez l'homme


à la fois dans le parenchyme et le CSF. Ces plasmocytes sont notamment responsables de la synthèse intrathécale d'anticorps anti-RNMDA induisant une hypoactivité glutamatergique. Les autoanticorps reconnaissent une zone de l'ATD du RNMDA comprise au niveau l'asparagine et la glycine en position 368/369 sur la séquence de GluN1.

Différents modèles murins existent, basés sur une infusion intracérébroventriculaire d'anticorps anti-RNMDA humains ou bien basés sur des immunisations actives contre une séquence peptidique issue de GluN1. Certains d'entre eux mettent en évidence des déficits comportementaux proches de ceux observés chez l'homme, mais il n'y a pas eu d'études approfondies de la réponse autoimmune dans ces modèles.

**Objectif de l'étude :** Dans cette étude, nous induisons une immunisation active contre un peptide contenant les deux acides aminés reconnus par les autoanticorps dans la pathologie (N368-G369). Par la suite, nous analysons l'impact de l'immunisation sur les aspects comportementaux, cellulaires et moléculaires en les comparants à la physiopathologie humaine.

**Principaux résultats :** L'immunisation contre le peptide GluN1<sub>359-378</sub> mène à la production d'anticorps anti-RNMDA à la fois dans la circulation sanguine et dans le CSF. Les animaux, post-immunisation, vont développer des déficits anxieux, dépressifs et de mémorisation à long terme. Des lymphocytes B sont identifiés dans le CSF ainsi que des plasmocytes. Ces plasmocytes vont sécréter les autoanticorps anti-RNMDA dans le CSF. La déplétion des lymphocytes B permet une nette réduction des symptômes observés chez les animaux du groupe isotype, soulignant bien le caractère central des lymphocytes B dans le développement de la pathologie.

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

Isabelle Wagon,<sup>1</sup> Pauline He'lie,<sup>1</sup> Isabelle Bardou,<sup>1</sup> Caroline Regnaud,<sup>1</sup> Le'onie Lesec,<sup>1</sup> Jero'me Leprince,<sup>2</sup> Mikae'l Naveau,<sup>3</sup> Barbara Delaunay,<sup>1</sup> Olivier Toutirais,<sup>1,4</sup> Brigitte Lemauff,<sup>1,4</sup> Olivier Etard,<sup>5,6</sup> Denis Vivien,<sup>1,7</sup> Ve'ronique Agin,<sup>1</sup> Richard Macrez,<sup>1,8</sup> Eric Maubert<sup>1</sup> and  Fabian Docagne<sup>1</sup>

Anti-*N*-methyl-D-aspartate receptor (NMDAR) encephalitis is a neuropsychiatric disease characterized by an antibody-mediated autoimmune response against NMDAR. Recent studies have shown that anti-NMDAR antibodies are involved in the pathophysiology of the disease. However, the upstream immune and inflammatory processes responsible for this pathogenic response are still poorly understood. Here, we immunized mice against the region of NMDA receptor containing the N368/G369 amino acids, previously implicated in a pathogenic response. This paradigm induced encephalopathy characterized by blood–brain barrier opening, periventricular T<sub>2</sub>-MRI hyperintensities and IgG deposits into the brain parenchyma. Two weeks after immunization, mice developed clinical symptoms reminiscent of encephalitis: anxiety- and depressive-like behaviours, spatial memory impairment (without motor disorders) and increased sensitivity to seizures. This response occurred independently of overt T-cell recruitment. However, it was associated with B220<sup>+</sup> (B cell) infiltration towards the ventricles, where they differentiated into CD138<sup>+</sup> cells (plasmocytes). Interestingly, these B cells originated from peripheral lymphoid organs (spleen and cervical lymphoid nodes). Finally, blocking the B-cell response using a depleting cocktail of antibodies reduced the severity of symptoms in encephalitis mice. This study demonstrates that the B-cell response can lead to an autoimmune reaction against NMDAR that drives encephalitis-like behavioural impairments. It also provides a relevant platform for dissecting encephalitogenic mechanisms in an animal model, and enables the testing of therapeutic strategies targeting the immune system in anti-NMDAR encephalitis.

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

Correspondence to: Fabian Docagne, PhD  
 Inserm U1237, PhIND, Institut BB@C, Centre Cyceron, BP5229, 14074 Caen Cedex, France  
 Email: [docagne@cyceron.fr](mailto:docagne@cyceron.fr)

**Keywords:** autoimmune encephalitis; glutamate; neuropsychiatry; paraneoplastic; limbic

**Abbreviation:** NMDAR = *N*-methyl-D-aspartate receptor



## Introduction

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

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

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

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

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

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

## Materials and methods

### Animals

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

### Experimental group allocation

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

### Statistical analyses

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

version 13.3 and StatView<sup>®</sup>. *P*-values are given in the text (results) for each individual experiment.

## Peptide design

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

## Active immunization

Autoimmune response was induced on 8-week-old male C57BL/6J mice (Janvier lab) via subcutaneous injection of 200 µg of selected peptide (GluN1<sub>359-378</sub> peptide or GluN1<sub>168-187</sub> control peptide) in an emulsion mixture (volume ratio 1:1) of complete Freund's adjuvant (Sigma Aldrich Laboratories) containing 600 µg of heat-killed *Mycobacterium tuberculosis* H37Ra (Difco). For sham animals, the immunogenic peptide was replaced with 200 µl of saline. The emulsion was administered in four injections of 50 µl: two at shoulders and two at limbs. All animals were intraperitoneally injected with 200 ng of *Bordetella pertussis* toxin (Sigma Aldrich) in 200 µl of saline at the time of immunization, and at 48 h after immunization.

## Experimental design

After immunization with the GluN1<sub>359-378</sub> or the GluN1<sub>168-187</sub> control peptide, mice were subjected to one different behavioural test every day in the following order: actimetry, Y-maze, O-Maze, swimming test, starting 1 or 2 weeks after immunization, depending on the experiment. Tissue and fluids were collected on the last day of the series of behavioural tests.

## Detection of anti-NMDAR antibodies

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

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

## Behavioural tasks

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

### O-maze

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

### Y-maze

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

### Forced swim test

The forced swim test was used to assess depressive-like behaviour (Slattery and Cryan, 2012). Mice were individually placed into a glass cylinder containing warm water (25°C), deep enough to force the mouse to swim. The total trial time was 6 min and immobilization time measurement began from the second minute. Immobilization time was defined as the time that

animal stop swimming and start floating with its head above the water. This test is considered to reflect behavioural despair.

### Actimetry

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

### Pharmacologically-induced seizures

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

### MRI

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

### In vivo vascular permeability

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

### CSF protein dosage

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

### Tissue processing

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

### Immunostaining

Sections were co-incubated overnight at room temperature with the following antibodies: Rabbit anti-laminin or chicken anti-laminin (1:1500; Abcam), rat anti-CD4 (1:25; eBiosciences), rat anti-CD8 (1:25; eBiosciences), sheep anti-fibrinogen serum, rat anti CD45R/B220 (RA3-6B2) (1:800; Invitrogen), rabbit anti-syndecan-1 (1:800; Abcam) or sheep anti-TTR (ab9015) (Abcam; 1:1000). Primary antibodies were revealed by using AffiniPure F(ab)<sup>2</sup> fragment IgGs conjugated to Alexa<sup>488</sup>, Cy3 or Alexa<sup>647</sup> at 1:800 (Jackson ImmunoResearch). Next, sections were coverslipped with antifade medium containing DAPI. Assessment of neurodegeneration was performed by Fluoro-Jade<sup>®</sup> C staining (Schmued *et al.*, 2005).

### Microscopy

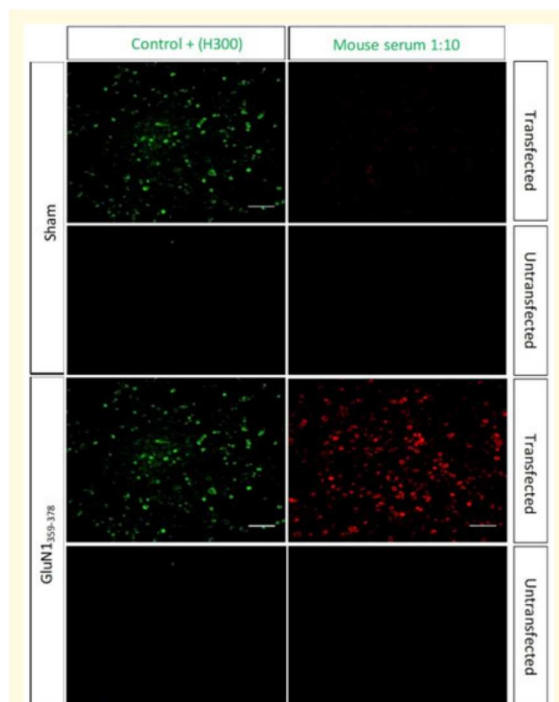
Images were digitally captured on a Leica DM6000 microscope coupled to Coolsnap camera, visualized with Metavue software (Version 5.0; Molecular Devices), and further processed by using ImageJ software (Version 1.49e; NIH). All analyses were performed blinded to the experimental groups.

### Dot blot

A recombinant peptide corresponding to the N-Terminal part of GluN1 was blotted on a nitrocellulose membrane for 1 h at room temperature until the blots were dry. The membrane was then blocked with 2% bovine serum albumin in TTBS (50 mM Tris, 0.5 M NaCl, 0.05% Tween-20, pH 7.4) for 1 h at room temperature. The membrane was then incubated for 1 h at room temperature in TTBS with CSF from sham or GluN1<sup>359-378</sup> mice, or with GluNoma<sup>®</sup> (Lesept *et al.*, 2016) an anti-GluN1 antibody as a positive control. The membrane was washed three times (10 min each) in TTBS on rocker before incubation with anti-mouse IgG secondary antibody for 1 h at room temperature in TTBS. Membrane was washed again three times (10 min each) in TTBS on rocker. Blots were enhanced for analysis and detection by chemiluminescence agent Thermo Scientific Pierce ECL Plus substrate and data were obtained by ImageQuant LAS 4000 (GE Healthcare Life Sciences).

### Calcium video microscopy

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



**Figure 1** Validation of immunization. Immunostaining of HEK293 cells ( $n = 3$ ) transfected with GluN1a and GluN2B subunits after incubation with serum of sham mice or GluN1<sub>359-378</sub> mice (revealed by anti-mouse IgG coupled to Cy3, red), or with a commercial anti-GluN1 antibody (H300, revealed by anti-rabbit IgG coupled to FITC, green). Scale bars = 100  $\mu$ m.

familiar arms (arms 1 and 2) ( $P = 0.028$  and  $P = 0.006$ , respectively,  $n = 12$ ; Fig. 2F). This indicates good spatial memory in sham mice. In sharp contrast, GluN1<sub>359-378</sub> mice failed to discriminate between new and familiar arms, as they visited the new arm significantly less often than the familiar arms ( $P = 0.018$  for both,  $n = 10$ ; Fig. 2F). These results reveal a deficit of spatial memory in GluN1<sub>359-378</sub>. Active immunization with a control peptide (Fig. 3A and Supplementary Table 2) did not induce any behavioural changes in the O-maze ( $P = 0.84$ ,  $P = 0.12$  and  $P = 0.67$ , respectively; Fig. 3B–D) or in the Y-maze (new arm versus arm 1:  $P = 0.007$ , new arm versus arm 2:  $P = 0.023$ ; Fig. 3E). Global motor activity (horizontal or vertical) was not influenced by active immunization with GluN1<sub>359-378</sub> (horizontal:  $P = 0.63$ , vertical:  $P = 0.91$ ,  $n = 10$  in each group; Fig. 2G and H) or with the control peptide (horizontal:  $P = 0.73$ , vertical  $P = 0.91$ ,  $n = 10$  in each group; Fig. 3F and G) as compared to sham mice.

Our next step was to test whether active immunization with GluN1<sub>359-378</sub> could induce epileptogenic effects, a symptom of human NMDAR encephalitis (Geis *et al.*, 2019) reproduced after passive transfer of NMDAR antibodies in

mouse models (Wright *et al.*, 2015). The injection of PTZ resulted in epileptic like behavioural signs ranging from motionless staring (stage 1) to convulsions (stages 5) (Fig. 4A–F). The number of stage 4 ( $P = 0.035$ ;  $n = 10$  in each group, Fig. 4C) and the average cumulative score after 60 min ( $P = 0.035$ ; Fig. 4E) were increased in GluN1<sub>359-378</sub> mice.

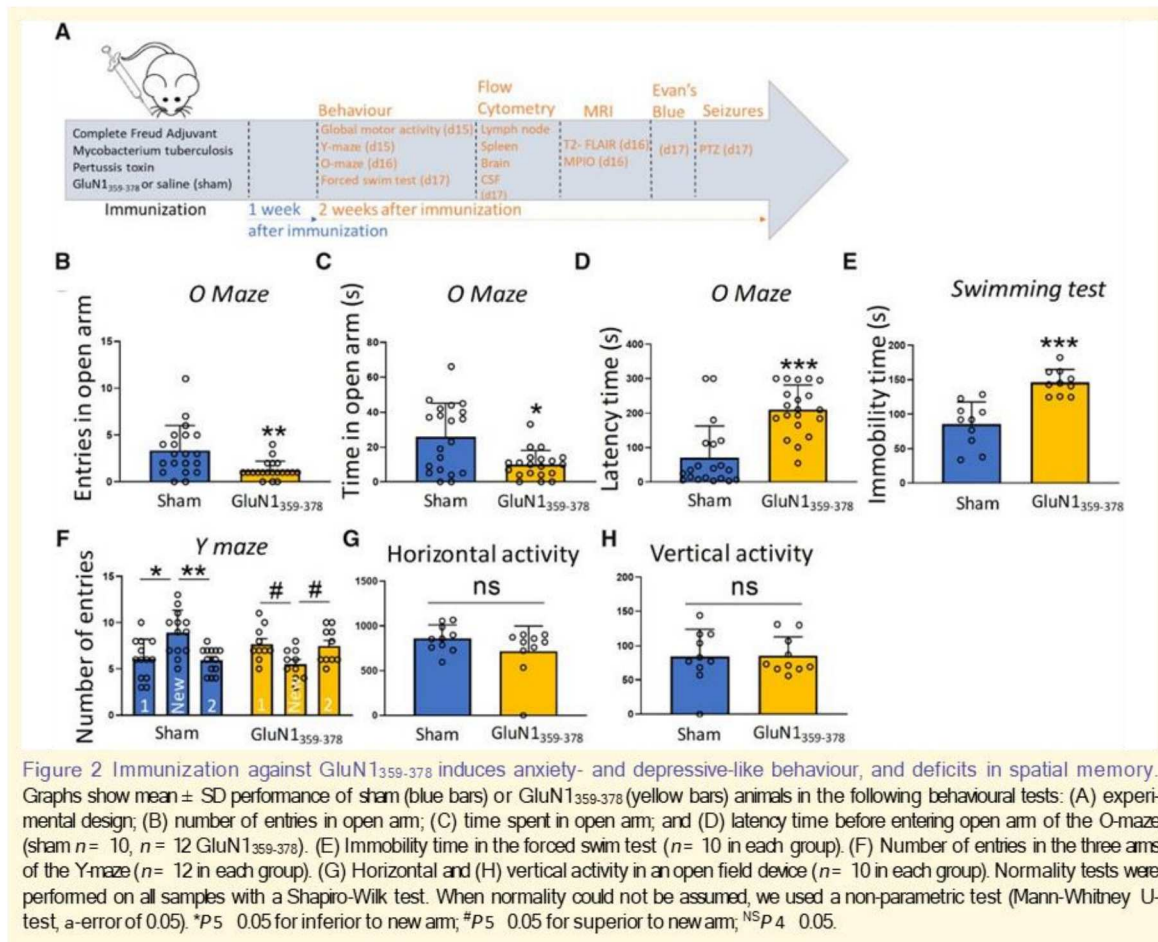
We then assessed the general pathological markers induced by active immunization in GluN1<sub>359-378</sub> mice. GluN1<sub>359-378</sub> mice showed diffuse MRI T2-FLAIR hyperintensities in the brain, particularly at perivascular locations (Fig. 5A). GluN1<sub>359-378</sub> mice also showed an increase in blood–brain barrier permeability, revealed by Evan’s blue extravasation, within the whole brain (Fig. 5B and corresponding quantification:  $P = 0.028$ ,  $n = 4$  in each group; Fig. 5C). Protein concentration was increased in the CSF of GluN1<sub>359-378</sub> mice ( $P = 0.029$ ,  $n = 10$  in each group; Fig. 5D), where anti-NMDAR IgG were detected (Fig. 5E). Finally, IgG deposits were observed within the brain parenchyma, around the ventricles and in the hippocampal region (Fig. 5F). These different pathological signs occurred in the absence of positive immunostaining for the neuronal degeneration marker, Fluoro-Jade<sup>c</sup> (Fig. 5G).

These data show that the immunization against GluN1<sub>359-378</sub> induces an autoimmune response that drives structural and behavioural impairments reminiscent of several key aspects of anti-NMDAR encephalitis.

Our next step was to explore whether the antibodies produced by the mice after immunization against GluN1<sub>359-378</sub> may influence NMDAR function. To this end, we studied the dynamics of calcium influx into cultured neurons induced by NMDA stimulation by using calcium video-microscopy (Fig. 5H–J). After two reference NMDA-induced spikes (50 mM, 30 s), neurons were incubated with the sera from sham or GluN1<sub>359-378</sub> mice for 45 min. At the end of the incubation period, neurons were stimulated again (two stimulations with 50 mM NMDA for 30 s). Incubation with serum from GluN1<sub>359-378</sub> mice strongly reduced the amplitude of NMDA-induced spike, while incubation with serum from sham mice had limited effects (Fig. 5H). The responsiveness compared to the first two peaks (Fig. 5I) and the global calcium response (AUC; Fig. 5J) were strongly reduced after incubation with serum from GluN1<sub>359-378</sub> mice ( $P = 0.00001$ ) as compared to incubation with serum from sham mice.

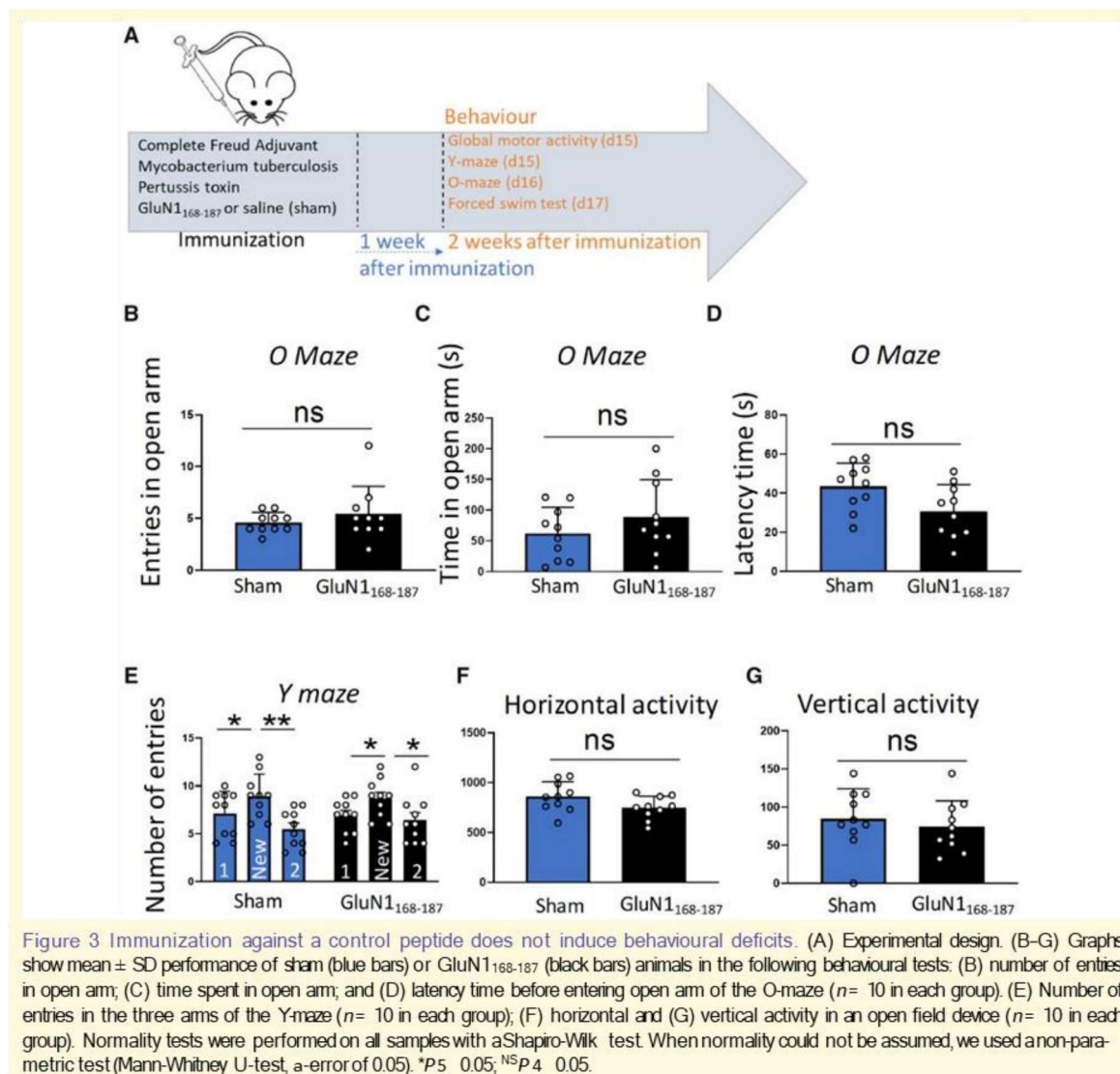
### Experimental NMDAR autoimmune encephalitis is mediated by a B-cell response

At the histological level, fibrinogen extravasation illustrated the increase in blood–brain barrier permeability in the hippocampal region of GluN1<sub>359-378</sub> animals (Fig. 6A). To address whether this increase in blood–brain barrier permeability was important for the development of the behavioural impairments, we immunized a series of animals without injecting pertussis toxin (Supplementary Fig. 1A). In this case, in



which no overt Evan's blue extravasation could be observed (Supplementary Fig. 1B), anxiety-like behaviour was absent (entries:  $P = 0.35$ , time in open arms:  $P = 0.97$ , latency time:  $P = 0.53$ ;  $n = 10$  in each group; Supplementary Fig. 1C and E) and spatial memory impairments were less marked (new arm versus arm 1:  $P = 0.007$ , new arm versus arm 2:  $P = 0.012$ ,  $n = 15$  in each group; Supplementary Fig. 1F). The increase in blood-brain barrier was not associated with endothelial expression of adhesion molecules, assessed here by molecular MRI for P-selectin (Fig. 6B), in contrast to what is observed in other models of CNS-directed autoimmune diseases (Fournier et al., 2017). In line with this, few if any T-cell infiltration was observed at sites of overt blood-brain barrier permeabilization (Fig. 6C), in contrast to what is observed in other models of CNS-directed autoimmune diseases such as experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE) (Fig. 6D). This absence of T-cell infiltration was confirmed by flow cytometry from the whole dissociated brain (Fig. 6E and corresponding quantification: CD4:  $P = 0.46$ , CD8:  $P = 0.082$ ,  $n = 5$  (sham) and 6 (GluN1<sub>359-378</sub>); Fig. 6F).

In contrast, a significant increase in B cell population, identified as B220<sup>+</sup> cells, was observed in the whole dissociated brain of GluN1<sub>359-378</sub> (Fig. 7A and corresponding quantification:  $P = 0.008$ ,  $n = 5$  and 6, respectively; Fig. 7B), reaching ~30% of CD45<sup>+</sup> leucocytes. Interestingly, B cells were not found within the parenchyma (Fig. 7C), but rather in the meninges (Fig. 7D), ventricles (Fig. 7E), choroid plexus (Fig. 7F) and in the form of cell aggregates (Fig. 7G; corresponding quantification: meninges:  $P = 0.009$ , choroid plexus:  $P = 0.012$ , ventricles:  $P = 0.011$ , hippocampus:  $P = 1$ ,  $n = 5$  in each group; Fig. 7H). In addition, although B cells were rarely found in the CSF of sham animals, their number was increased in the CSF of GluN1<sub>359-378</sub> animals (Fig. 7I). Further, a substantial number of these cells matured into CD138<sup>+</sup> cells (plasma cells) (Fig. 7J). In sham animals, the vast majority (87%) of CD45<sup>+</sup> cells (leucocytes) were CD3<sup>+</sup> positive cells (T lymphocytes), while within the remaining population of CD3<sup>-</sup> cells, only 11.4% of cells were B220<sup>+</sup> (B cells) and 10.4% were CD138<sup>+</sup> (plasma cells) (Fig. 7K). In contrast, in GluN1<sub>359-378</sub> mice, only half of CD45<sup>+</sup> cells

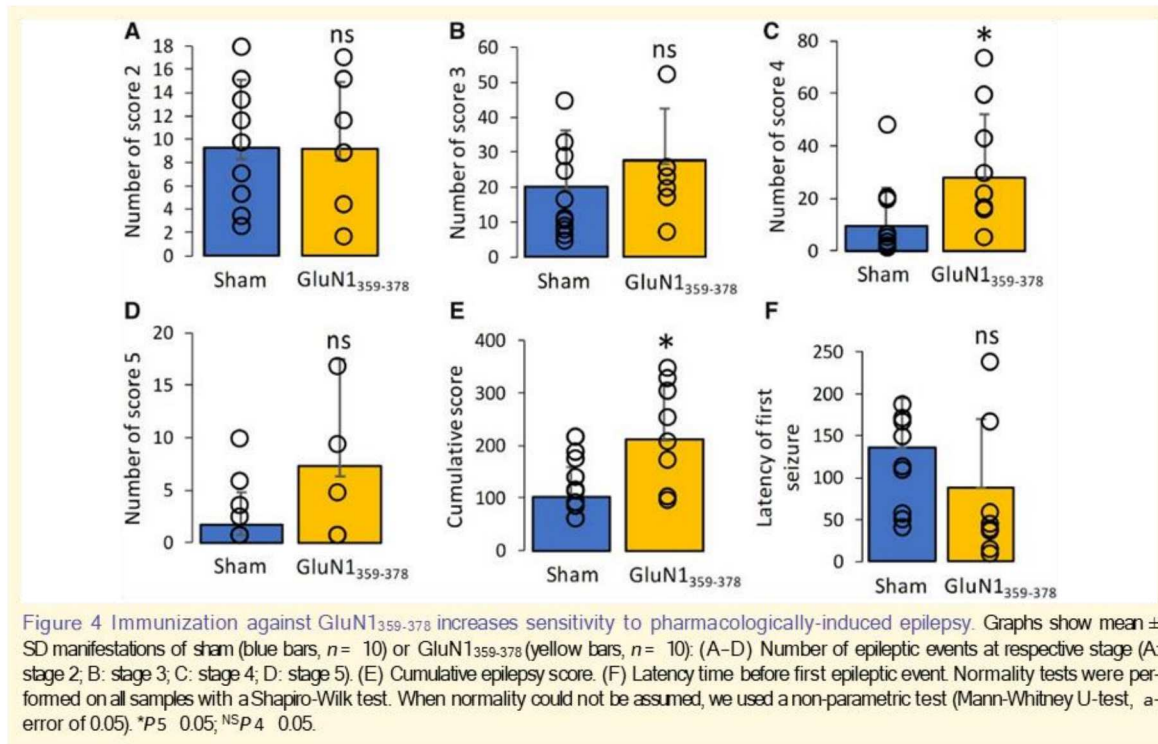


(leucocytes) were CD3<sup>+</sup> cells (T lymphocytes), and within the remaining population of CD3<sup>+</sup> cells, 33% of cells were B220<sup>+</sup> (B cells) and 27.2% were CD138<sup>+</sup> (plasmocytes) (Fig. 7K).

Some changes were observed in the myeloid populations (Supplementary Fig. 2; sham: *n* = 5, GluN1<sub>359-378</sub>: *n* = 6). The LY6G<sup>+</sup> population (neutrophil phenotype) was increased in the brain (*P* = 0.008), cervical lymph nodes (*P* = 0.0035) and unchanged in the spleen (*P* = 0.78) at Week 2 post-immunization (Supplementary Fig. 2A–C). Most myeloid cells were CD11b<sup>+</sup>/CD11c<sup>−</sup> cells (microglia/macrophages phenotype), while CD11b<sup>−</sup>/CD11c<sup>+</sup> cells and CD11b<sup>+</sup>/CD11c<sup>+</sup> cells (dendritic cell phenotypes) were found in low numbers (51% of leucocytes; Supplementary

Fig. 2D). CD11b<sup>+</sup>/CD11c<sup>−</sup> cells were increased in the brain (*P* = 0.013) and cervical lymph nodes (*P* = 0.008) of GluN1<sub>359-378</sub> mice (Supplementary Fig. 2D and E), but not in the spleen (Supplementary Fig. 2) at that stage.

An increase in B cells and plasma cells in the CSF was only observed at 2 weeks after immunization, which corresponds to the symptomatic phase of the model. At 1 week after immunization, circulating antibodies were detected with less intensity (Supplementary Fig. 3A) than at 2 weeks post-immunization in GluN1<sub>359-378</sub> mice, and symptoms were still absent (Supplementary Fig. 3B–E). There was no increase in B cell population in the CSF of GluN1<sub>359-378</sub> mice as compared to sham animals neither in the whole dissociated brain (Supplementary Fig. 3F and corresponding



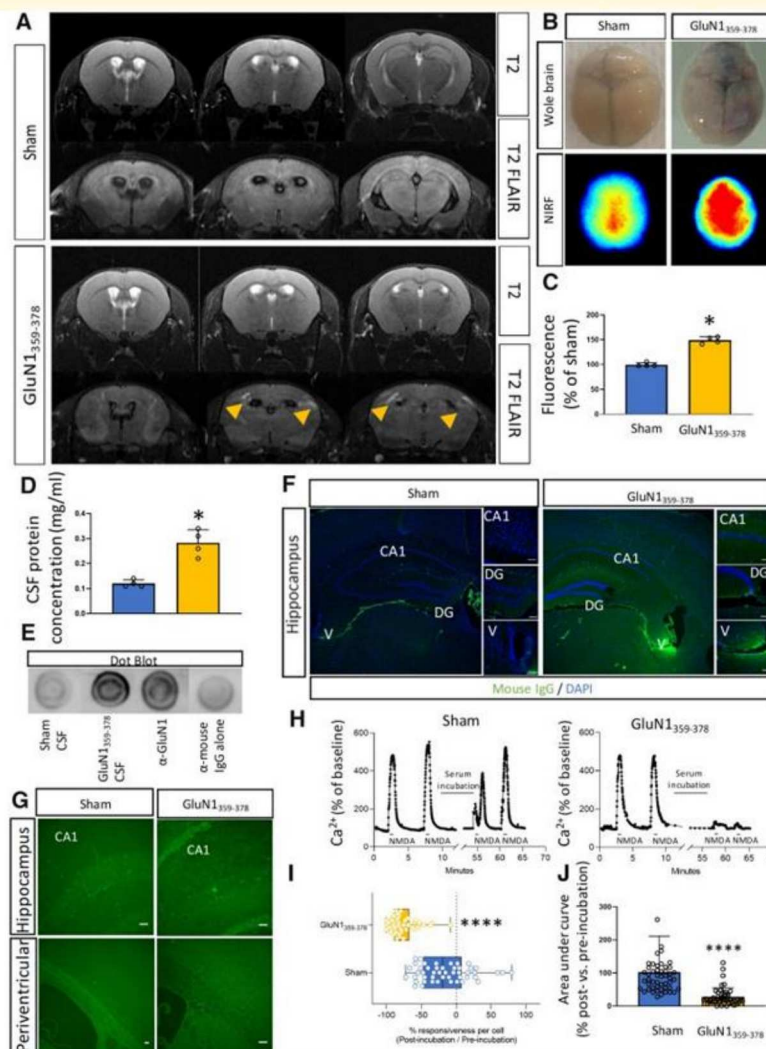
quantification [Supplementary Fig. 3G](#)) nor in the CSF ([Supplementary Fig. 3H](#) and corresponding quantification, [Supplementary Fig. 3J](#)), where no CD138<sup>+</sup> plasma cells were detected ([Supplementary Fig. 3I](#) and corresponding quantification, [Supplementary Fig. 3J](#)).

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

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

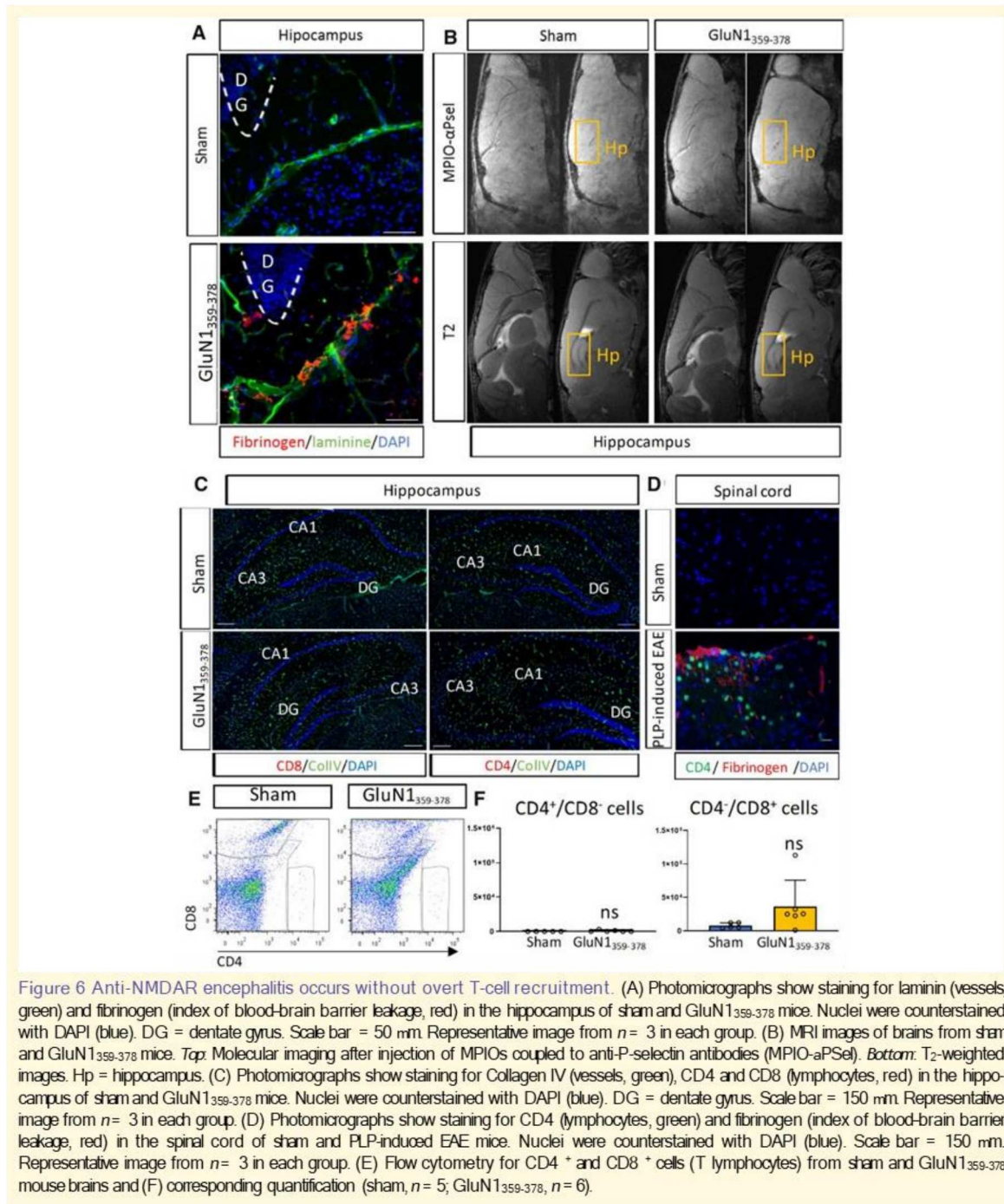
[Fig. 8E](#)), without affecting T cells ([Fig. 8D](#) and corresponding quantification, [Fig. 8E](#)).

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



**Figure 5** Pathological markers of encephalitis after immunization against GluN1<sup>359-378</sup>. (A) Representative images ( $n = 5$ ; nine slices per brain) of T<sub>2</sub>-FLAIR MRI of sham and GluN1<sup>359-378</sup> mice. Arrows show periventricular lesions. (B) Representative images; and (C) corresponding quantification of fluorescence (mean  $\pm$  SD) in brains of sham (blue bars) and GluN1<sup>359-378</sup> (yellow bars) mice ( $n = 4$  in each group) after Evans blue injection to assess blood-brain barrier integrity. (D) Total protein concentration (mean  $\pm$  SD) in the CSF of sham (blue bars) and GluN1<sup>359-378</sup> (yellow bars) mice ( $n = 10$  in each group). (E) Immunoblotting using CSF from sham GluN1<sup>359-378</sup> mice to detect the amino-terminal domain of GluN1. GluN1 antibody (LeSept *et al.*, 2016), an antibody directed against GluN1, was used as a positive control. The dot blot was revealed by anti-mouse IgG. Negative control was performed by omitting the primary serum (anti-mouse IgG alone). (F) Representative images mice ( $n = 3$  in each group, three anatomical sections: caudal, medial, rostral) of immunostaining for mouse IgG in the brain of sham and GluN1<sup>359-378</sup>. (G) Representative image of Fluoro-Jade<sup>C</sup> staining in the brain (hippocampus and perivascular zones) of sham and GluN1<sup>359-378</sup> mice ( $n = 3$  in each group). (H) Neurons were stimulated twice with NMDA (50 mM, 30 s) at times indicated in the figure before and after incubation with serum from sham or GluN1<sup>359-378</sup> mice. Variations of mean calcium concentration in individual neurons (sham,  $n = 48$ ; GluN1<sup>359-378</sup>  $n = 46$ ; from three independent experiments) were measured by Fura-2 videomicroscopy and are expressed as percentage of basal level. (I) Graphs show percentage of responsiveness of each neuron after serum incubation (comparison of the AUC of calcium peaks after and before serum incubation, see 'Materials and methods' section). (J) Graphs show mean  $\pm$  SEM AUC of NMDA induced calcium peaks in neurons after incubation with serum from sham or GluN1<sup>359-378</sup> mice (sham,  $n = 48$ ; GluN1<sup>359-378</sup>,  $n = 46$ ; from three independent experiments).  $P < 0.00001$ , Mann-Whitney U-test. Scale bar = 50  $\mu$ m in G.

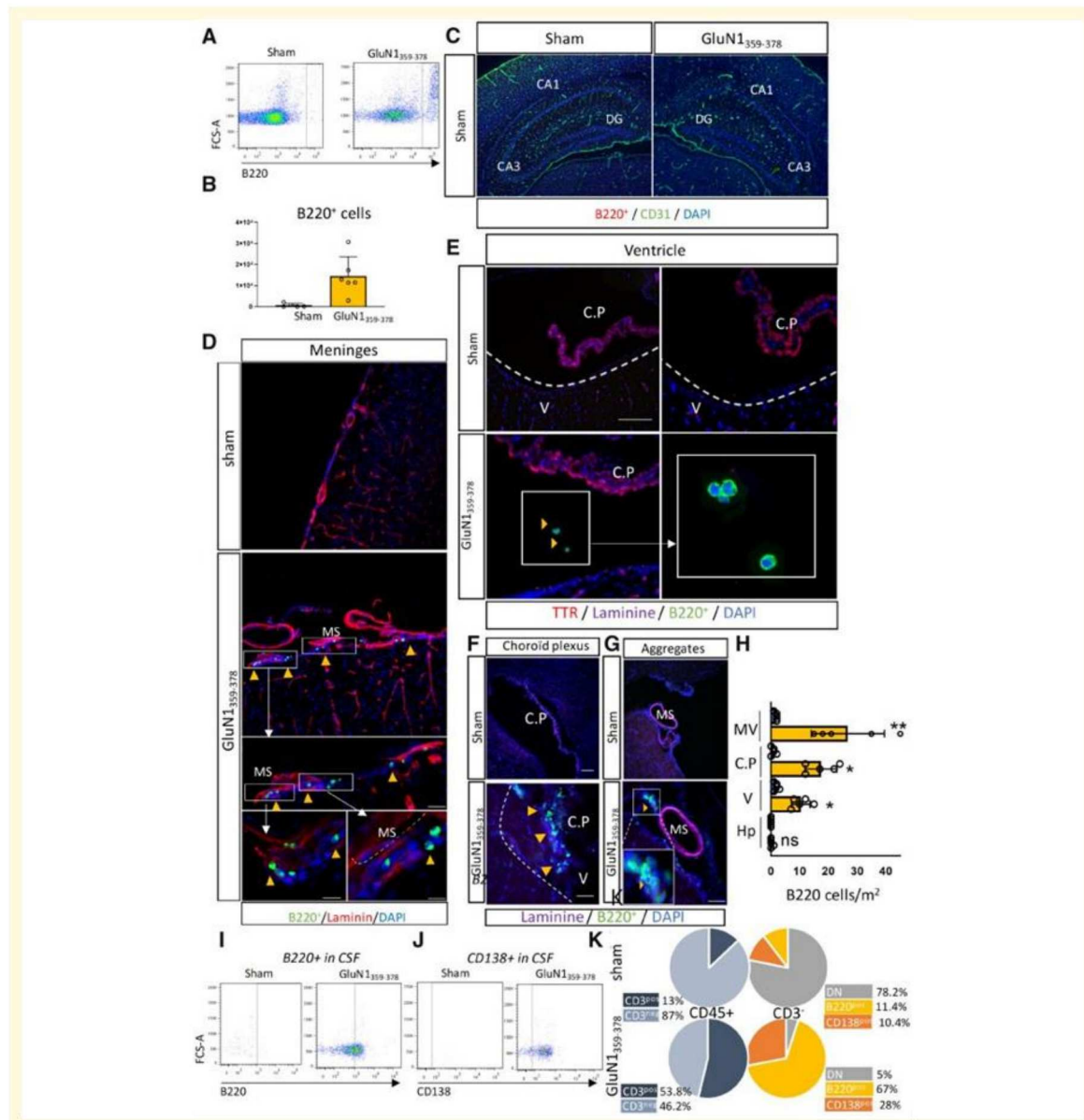




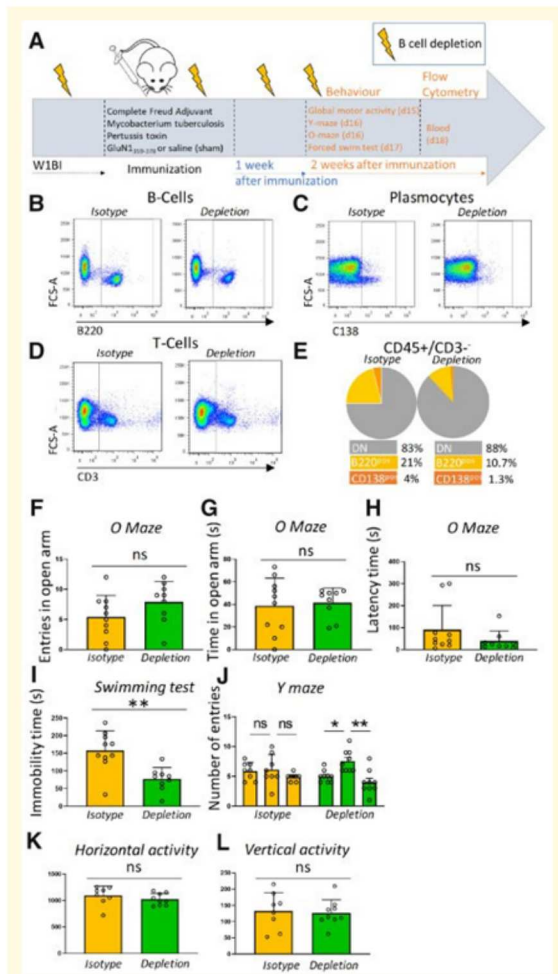
## Discussion

This study describes that active immunization of mice against GluN1<sup>359-378</sup> induces a B-cell-mediated autoimmune

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



**Figure 7** Anti-NMDAR encephalitis occurs with B cell infiltration via leptomeningeal and circumventricular pathways. (A) Flow cytometry for B220<sup>+</sup> cells (B lymphocytes) from sham and GluN1<sup>359-378</sup> mouse brains and (B) corresponding quantification (*n* = 5 and 6, respectively). (C) Photomicrographs show staining for CD31 (vessels, green) and B220 (B lymphocytes, red) in the hippocampus of sham and GluN1<sup>359-378</sup> mice. Nuclei were counterstained with DAPI (blue). Note the absence of B220<sup>+</sup> staining. Scale bar = 150 μm. Representative image from *n* = 3 in each group. (D) Photomicrographs show staining for laminin (vessels, red) and B220 (B lymphocytes, green) in the meninges of sham and GluN1<sup>359-378</sup> mice. Nuclei were counterstained with DAPI (blue). Scale bar = 150 μm (top) and 20 μm (bottom). Representative image from *n* = 3 in each group. (E–G) Photomicrographs show staining for Laminin (vessels, magenta), TTR (choroid plexus, red) and B220 (B lymphocytes, green) in the ventricles (E), choroid plexus (F) and B cell aggregates (G) of sham and GluN1<sup>359-378</sup> mice. Nuclei were counterstained with DAPI (blue). Scale bar = 150 μm (top) and 20 μm (bottom). Representative image from *n* = 5 in each group. (H) Corresponding quantification. CP = choroid plexus; Hp = hippocampus; MV = meningeal vessel; V = ventricle. (I–K) Flow cytometry for B220<sup>+</sup> (B lymphocytes) and CD138<sup>+</sup> (plasmocytes) and corresponding quantifications (*n* = 3 pools of five CSF in each group).



**Figure 8** B-cell depletion prevents the progression of anti-NMDAR encephalitis. (A) Experimental design. (B–D) Flow cytometry for (A) B220<sup>+</sup> (B lymphocytes), (B) CD138<sup>+</sup> (plasmacytes) and (C) CD3<sup>+</sup> (T lymphocytes). (E) Corresponding quantifications ( $n = 4$  in each group). (F) Number of entries in open arm, (G) time spent in open arm and (H) latency time before entering open arm of the O-maze (isotype,  $n = 10$ ; depleted,  $n = 9$ ). (I) Immobility time in the forced swim test ( $n = 9$  in each group). (J) Number of entries in the three arms of the Y-maze (isotype,  $n = 10$ ; depleted,  $n = 9$ ). (K) Horizontal and (L) vertical activity in an open field device (isotype,  $n = 10$ ; depleted,  $n = 9$ ). Graphs show mean  $\pm$  SD performance of GluN1<sub>359-378</sub> mice with B-cell depletion (green bars) or isotype injection (yellow bars). Normality tests were performed on all samples with a Shapiro-Wilk test. When normality could not be assumed, we used a non-parametric test (Mann-Whitney U-test,  $\alpha$ -error of 0.05). \* $P < 0.05$  inferior to new arm; # $P < 0.05$  superior to new arm; <sup>NS</sup> $P > 0.05$ .

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

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

Mice subjected to this paradigm show symptoms that are reminiscent of human anti-NMDAR encephalitis: memory impairments, anxiety- and depressive-like behaviours, and increased sensitivity to seizures. These symptoms are similar to those observed in previous works (Planaguma *et al.*, 2015; Wright *et al.*, 2015), despite distinct experimental paradigms. Interestingly, serum from GluN1<sub>359-378</sub> mice strongly reduced NMDA-induced calcium influx *in vitro*, which supports the relevance of the autoantibodies produced in this model and gives a possible link with the symptoms observed *in vivo*. Overall, it confirms that an immune reaction against NMDAR can lead to adverse effects *in vivo*, whatever the way this reaction is induced: direct injection or infusion of antibodies into the ventricles (Planaguma *et al.*, 2015; Malviya *et al.*, 2017; Taraschenko *et al.*, 2019), stereotactic injection of patient CSF into the parenchyma (Blome *et al.*, 2018), or active immunization, as is the case in the present work.

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

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

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

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

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

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

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

towards the meninges, passage to the ventricles and differentiation into plasma cells. The precise mechanisms responsible for B cell migration towards the brain in this model remain to be investigated. Assessing cytokine and chemokine levels may give important clues in this instance. This B-cell response is particularly relevant to the human pathology, as these cells are found in the CSF of patients (Dale *et al.*, 2013). In line with this, the nature of the inflammatory infiltrates is reminiscent of the clinical situation, in which rare T-cell infiltrates are detected (Tu'zu'n *et al.*, 2009) and CD138<sup>+</sup> cells are the main component of inflammatory infiltrates (Martinez-Hernandez *et al.*, 2011). These observations have provided the basis for the use of anti-B cell therapy using Rituximab<sup>®</sup>, a monoclonal anti-CD20 antibody (Hohlfeld, 2018). Here, the depletion of B cells prevented the depression-like symptoms and the impairments in spatial memory observed in GluN1<sup>359-378</sup> mice. This confirms the central role of the B-cell response in the establishment of encephalitis-like symptoms in these mice.

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

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

## Acknowledgements

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

## Funding

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

## Competing interests

The authors report no competing interests.

## Supplementary material

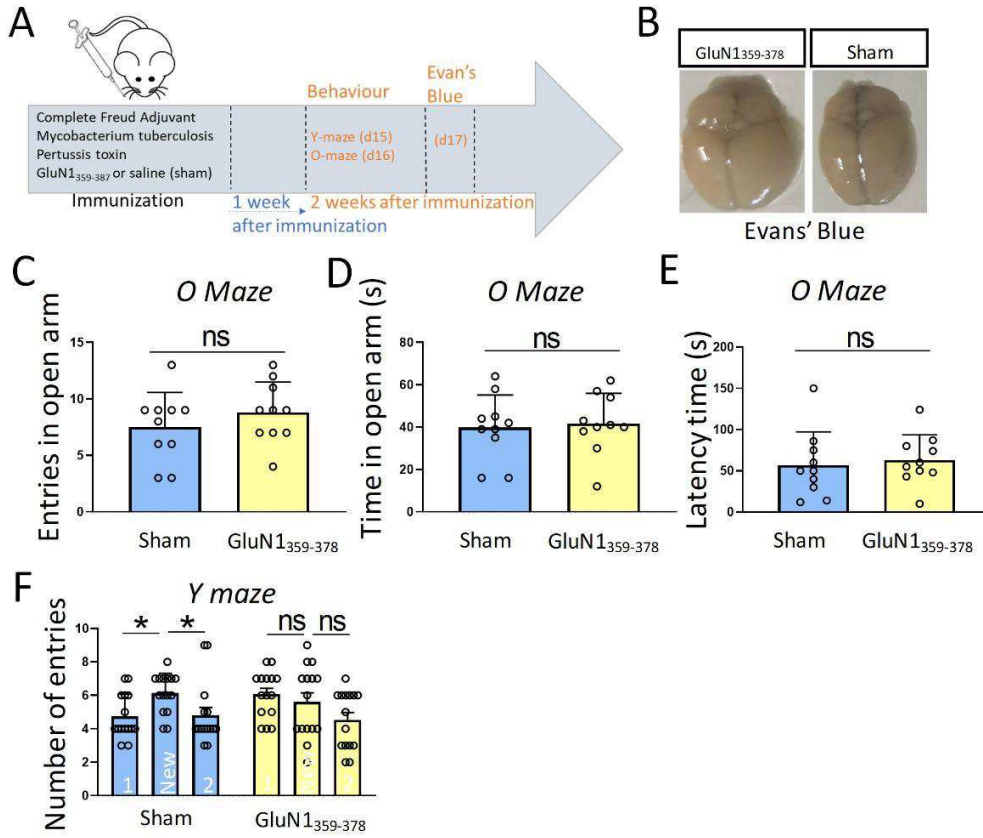
[Supplementary material](#) is available at *Brain* online.

## References

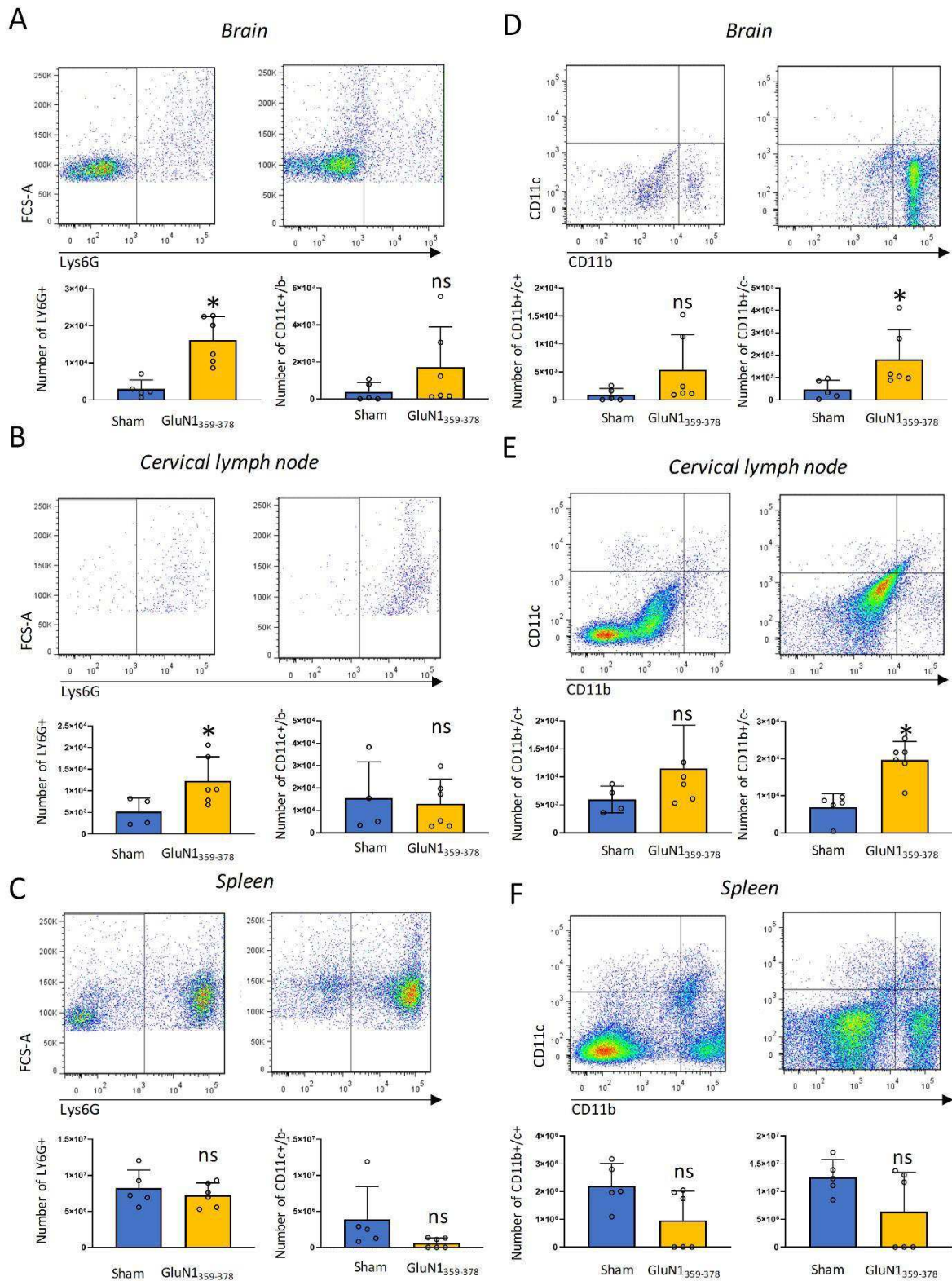
- Blome R, Bach W, Guli X, Porath K, Sellmann T, Bien CG, et al. Differentially altered NMDAR dependent and independent long-term potentiation in the CA3 subfield in a model of anti-NMDAR encephalitis. *Front Synaptic Neurosci* 2018; 10: 26.
- Carmi Y, Spitzer MH, Linde IL, Burt BM, Prestwood TR, Perlman N, et al. Allogeneic IgG combined with dendritic cell stimuli induce antitumour T-cell immunity. *Nature* 2015; 521: 99–104.
- Castillo-Gómez E, Oliveira B, Tapken D, Bertrand S, Klein-Schmidt C, Pan H, et al. All naturally occurring autoantibodies against the NMDA receptor subunit NR1 have pathogenic potential irrespective of epitope and immunoglobulin class. *Mol Psychiatry* 2017; 22: 1776–84.
- Cryan JF, Holmes A. The ascent of mouse: advances in modelling human depression and anxiety. *Nat Rev Drug Discov* 2005; 4: 775–90.
- Dale RC, Pillai S, Brilot F. Cerebrospinal fluid CD19(+) B-cell expansion in N-methyl-D-aspartate receptor encephalitis. *Dev Med Child Neurol* 2013; 55: 191–3.
- Dalmau J, Gleichman AJ, Hughes EG, Rossi JE, Peng X, Lai M, et al. Anti-NMDA-receptor encephalitis: case series and analysis of the effects of antibodies. *Lancet Neurol* 2008; 7: 1091–8.
- DeSena AD, Greenberg BM, Graves D. 'Light switch' mental status changes and irritable insomnia are two particularly salient features of anti-NMDA receptor antibody encephalitis. *Pediatr Neurol* 2014; 51: 151–3.
- Finke C, Kopp UA, Püschel H, Dalmau J, Wandinger K-P, Ploner CJ. Cognitive deficits following anti-NMDA receptor encephalitis. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 2012; 83: 195–8.
- Fournier AP, Quenault A, Martinez de Lizarrondo S, Gauberti M, Defer G, Vivien D, et al. Prediction of disease activity in models of multiple sclerosis by molecular magnetic resonance imaging of P-selectin. *Proc Natl Acad Sci USA* 2017; 114: 6116–21.
- Gabriel T, Macrez R, Gauberti M, Montagne A, Hebert M, Petersen K-U, et al. Immunotherapy blocking the tissue plasminogen activator-dependent activation of N-methyl-D-aspartate glutamate receptors improves hemorrhagic stroke outcome. *Neuropharmacology* 2013; 67: 267–71.
- Geis C, Planaguma J, Carrenño M, Graus F, Dalmau J. Autoimmune seizures and epilepsy. *J Clin Invest* 2019; 129: 926–40.
- Gleichman AJ, Spruce LA, Dalmau J, Seeholzer SH, Lynch DR. Anti-NMDA receptor encephalitis antibody binding is dependent on amino acid identity of a small region within the GluN1 amino terminal domain. *J Neurosci* 2012; 32: 11082–94.
- Gresa-Arribas N, Titulaer MJ, Torrents A, Aguilar E, McCracken L, Leypoldt F, et al. Antibody titres at diagnosis and during follow-up of anti-NMDA receptor encephalitis: a retrospective study. *Lancet Neurol* 2014; 13: 167–77.
- Hammer C, Stepniak B, Schneider A, Papiol S, Tantra M, Begemann M, et al. Neuropsychiatric disease relevance of circulating anti-NMDA receptor autoantibodies depends on blood-brain barrier integrity. *Mol Psychiatry* 2014; 19: 1143–9.
- Hara M, Martinez-Hernandez E, Arin'o H, Armangue T, Spatola M, Petit-Pedrol M, et al. Clinical and pathogenic significance of IgG, IgA, and IgM antibodies against the NMDA receptor. *Neurology* 2018; 90: e1386–94.
- Hogan-Cann AD, Anderson CM. Physiological roles of non-neuronal NMDA receptors. *Trends Pharmacol Sci* 2016; 37: 750–67.
- Hohlfeld R. B-cells as therapeutic targets in neuro-inflammatory diseases. *Clin Immunol* 2018; 186: 51–3.
- Irani SR, Bera K, Waters P, Zuliani L, Maxwell S, Zandi MS, et al. N-methyl-D-aspartate antibody encephalitis: temporal progression of clinical and paraclinical observations in a predominantly non-paraneoplastic disorder of both sexes. *Brain* 2010; 133: 1655–67.
- Jézéquel J, Johansson EM, Dupuis JP, Rogemond V, Gréa H, Kellermayer B, et al. Dynamic disorganization of synaptic NMDA receptors triggered by autoantibodies from psychotic patients. *Nat Commun* 2017; 8: 1791.
- Jones BE, Tovar KR, Goehring A, Jalali-Yazdi F, Okada NJ, Gouaux E, et al. Autoimmune receptor encephalitis in mice induced by active immunization with conformationally-stabilized holoreceptors. *Sci Transl Med* 2019; 11: eaaw0044.
- Kraeuter A-K, Guest PC, Sarnyai Z. The Y-maze for assessment of spatial working and reference memory in mice. *Methods Mol Biol* 2019; 1916: 105–11.
- Lesept F, Chevilly A, Jezequel J, Ladepeche L, Macrez R, Aimable M, et al. Tissue-type plasminogen activator controls neuronal death by raising surface dynamics of extrasynaptic NMDA receptors. *Cell Death Dis* 2016; 7: e2466.
- Lütjohann A, Fabene PF, van Luijtelaar G. A revised Racine's scale for PTZ-induced seizures in rats. *Physiol Behav* 2009; 98: 579–86.
- Macrez R, Obiang P, Gauberti M, Roussel B, Baron A, Parcq J, et al. Antibodies preventing the interaction of tissue-type plasminogen activator with N-methyl-D-aspartate receptors reduce stroke damages and extend the therapeutic window of thrombolysis. *Stroke* 2011; 42: 2315–22.
- Macrez R, Ortega MC, Bardou I, Mehra A, Fournier A, Van der Pol SMA, et al. Neuroendothelial NMDA receptors as therapeutic targets in experimental autoimmune encephalomyelitis. *Brain* 2016; 139: 2406–19.
- Malviya M, Barman S, Golombek KS, Planaguma J, Mannara F, Strutz-Seeborn N, et al. NMDAR encephalitis: passive transfer from man to mouse by a recombinant antibody. *Ann Clin Transl Neurol* 2017; 4: 768–83.
- Martinez-Hernandez E, Horvath J, Shiloh-Malawsky Y, Sangha N, Martinez-Lage M, Dalmau J. Analysis of complement and plasma cells in the brain of patients with anti-NMDAR encephalitis. *Neurology* 2011; 77: 589–93.
- Michel L, Grasmuck C, Charabati M, Le'cuyer M-A, Zandee S, Dhazez T, et al. Activated leukocyte cell adhesion molecule regulates B lymphocyte migration across central nervous system barriers. *Sci Transl Med* 2019; 11: eaaw0475.
- Mikasova L, De Rossi P, Bouchet D, Georges F, Rogemond V, Didelot A, et al. Disrupted surface cross-talk between NMDA and Ephrin-B2 receptors in anti-NMDA encephalitis. *Brain* 2012; 135: 1606–21.
- Musette P, Bouaziz JB. Cell modulation strategies in autoimmune diseases: new concepts. *Front Immunol* 2018; 9: 622.
- Nicole O, Docagne F, Ali C, Margail I, Carmeliet P, Mackenzie ET, et al. The proteolytic activity of tissue-plasminogen activator enhances NMDA receptor-mediated signaling. *Nat Med* 2001; 7: 59–64.
- Nosadini M, Mohammad SS, Corazza F, Ruga EM, Kothur K, Perilongo G, et al. Herpes simplex virus-induced anti-N-methyl-D-aspartate receptor encephalitis: a systematic literature review with analysis of 43 cases. *Dev Med Child Neurol* 2017; 59: 796–805.

- Pan H, Oliveira B, Saher G, Dere E, Tapken D, Mitjans M, et al. Uncoupling the widespread occurrence of anti-NMDAR1 autoantibodies from neuropsychiatric disease in a novel autoimmune model. *Mol Psychiatry* 2019; 24: 1489–501.
- Planaguma J, Leypoldt F, Mannara F, Gutiérrez-Cuesta J, Martín-García E, Aguilar E, et al. Human N-methyl D-aspartate receptor antibodies alter memory and behaviour in mice. *Brain* 2015; 138: 94–109.
- Schmued LC, Stowers CC, Scallet AC, Xu L. Fluoro-Jade C results in ultra high resolution and contrast labeling of degenerating neurons. *Brain Res* 2005; 1035: 24–31.
- Slattery DA, Cryan JF. Using the rat forced swim test to assess anti-depressant-like activity in rodents. *Nat Protoc* 2012; 7: 1009–14.
- Taraschenko O, Fox HS, Pittock SJ, Zekeridou A, Gafurova M, Eldridge E, et al. A mouse model of seizures in anti-N-methyl-d-aspartate receptor encephalitis. *Epilepsia* 2019; 60: 452–63.
- Turner VM, Mabbott NA. Ageing adversely affects the migration and function of marginal zone B cells. *Immunology* 2017; 151: 349–62.
- Tu' zhi'n E, Zhou L, Baehring JM, Bannykh S, Rosenfeld MR, Dalmau J. Evidence for antibody-mediated pathogenesis in anti-NMDAR encephalitis associated with ovarian teratoma. *Acta Neuropathol* 2009; 118: 737–43.
- Vincent A, Bien CG. Anti-NMDA-receptor encephalitis: a cause of psychiatric, seizure, and movement disorders in young adults. *Lancet Neurol* 2008; 7: 1074–5.
- Whittaker Hawkins RF, Patenaude A, Dumas A, Jain R, Tesfagiorgis Y, Kerfoot S, et al. ICAM1 + neutrophils promote chronic inflammation via ASPRV1 in B cell-dependent autoimmune encephalomyelitis. *JCI Insight* 2017; 2: e96882.
- Wright S, Hashemi K, Stasiak L, Bartram J, Lang B, Vincent A, et al. Epileptogenic effects of NMDAR antibodies in a passive transfer mouse model. *Brain* 2015; 138: 3159–67.

**Supplémentari**

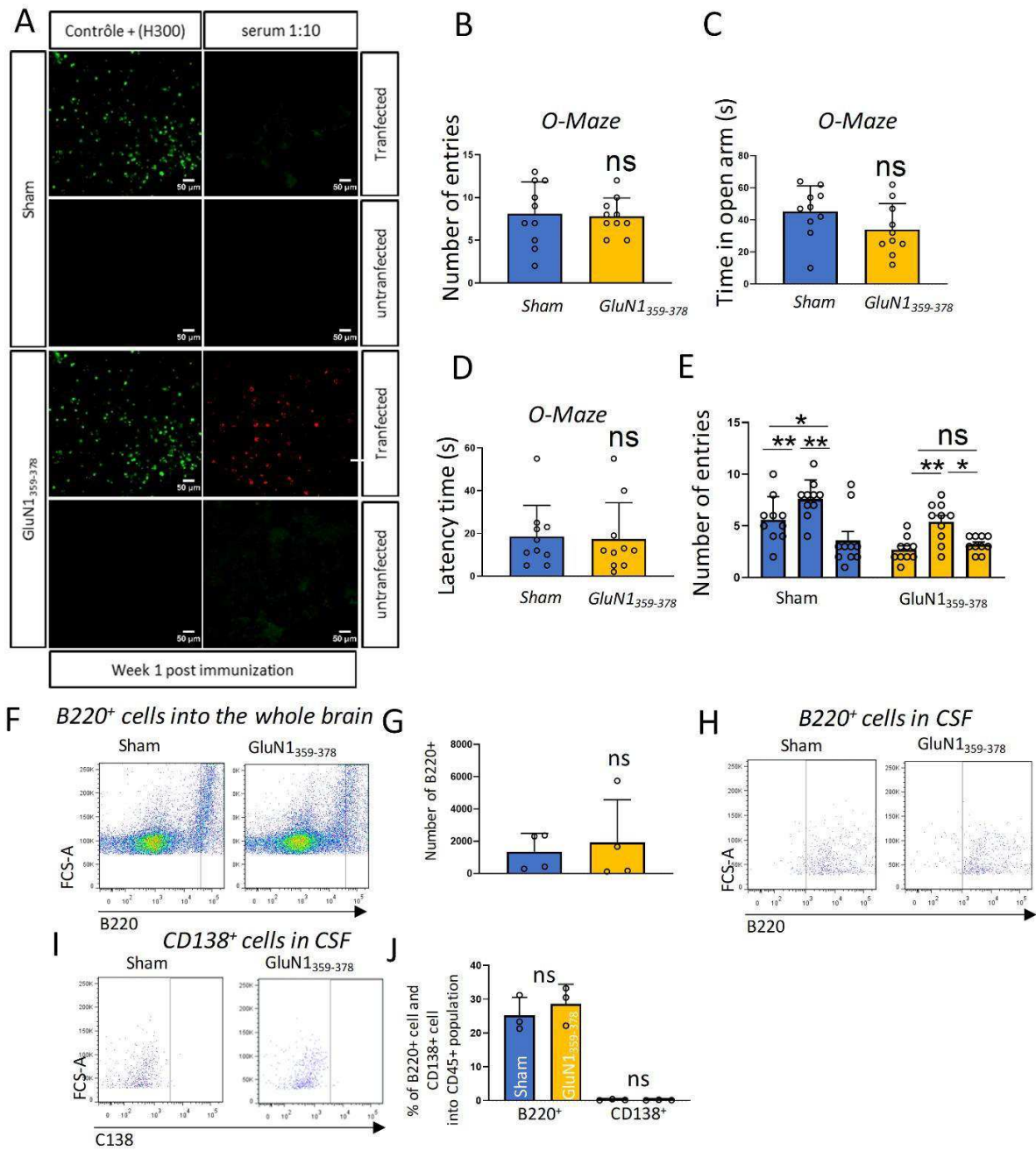


**Suppl Fig 1**

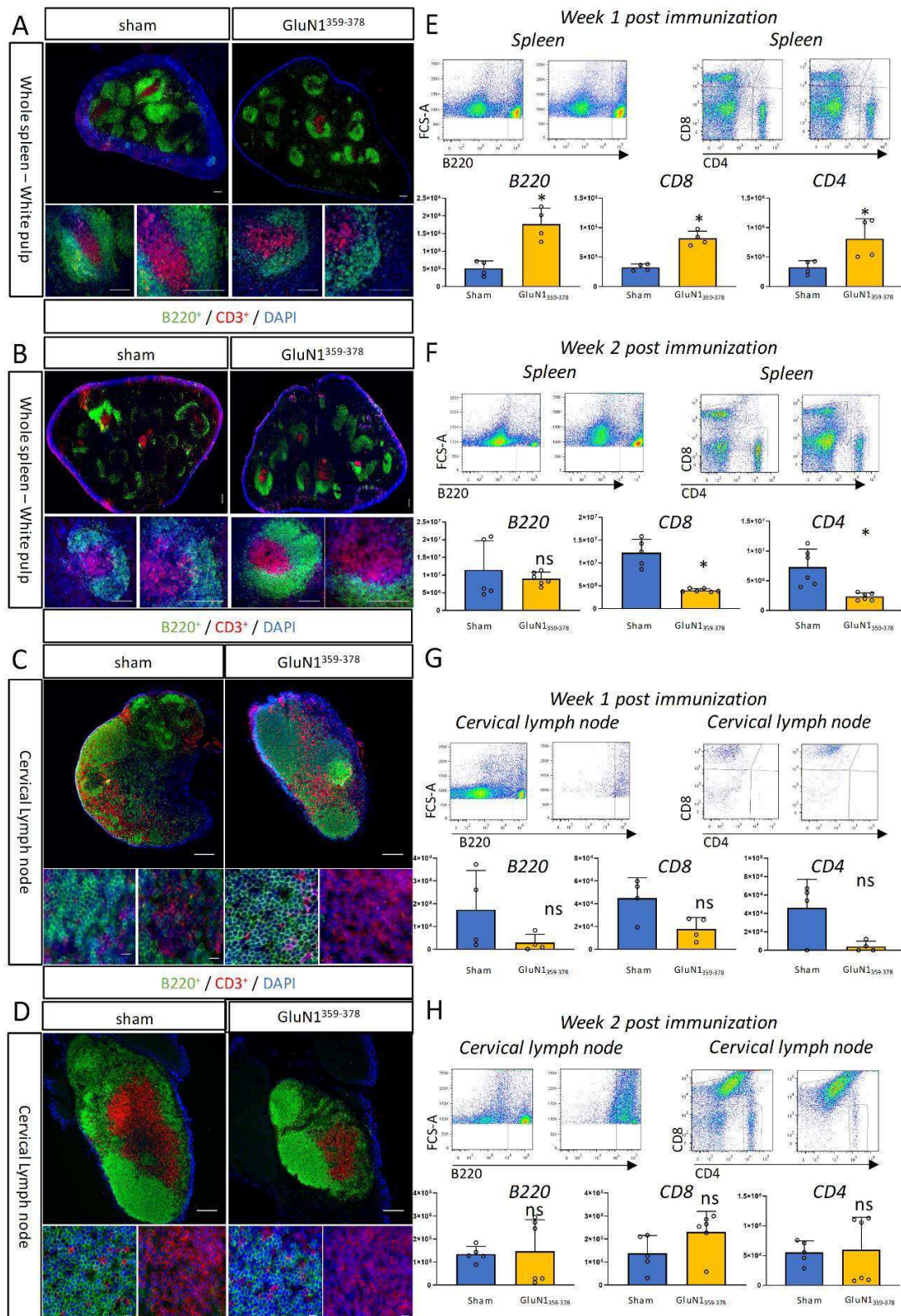


Suppl Fig 2





Suppl Fig 3

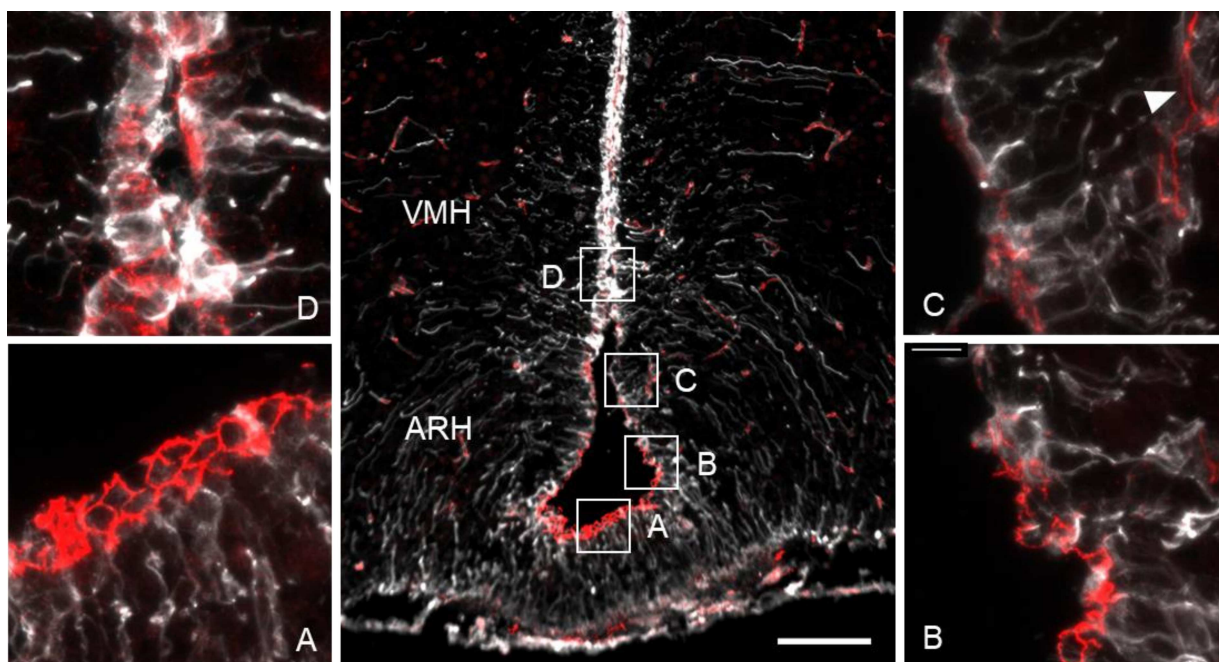


Suppl Fig 4

## **Etude des troubles métaboliques dans le modèle murin d'EAI-RNMDA**

### *Validation de l'existence des récepteurs NMDA tanycytaires, localisations et expression des sous-unités régulatrices*

Notre première étape a été de caractériser l'expression du récepteur NMDA par les tanocytes de l'hypothalamus médiobasal. En premier lieu par la validation de la présence de la sous-unité constitutive des RNMDA à la surface de ces tanocytes (fig. 49A). L'immunomarquage anti-GluN1 est plus intense au niveau des tanocytes EM qui bordent le plancher du troisième ventricule (fig. 49A-B). En opposition les immunomarquages des tanocytes ARH et tanocytes VMH apparaissent sous forme de ponctuations de faible intensité (fig. 49C-D). On retrouve un fort immunomarquage au niveau des vaisseaux sanguins du parenchyme cérébral possédant une BHE caractérisée par la présence de protéines de jonctions organisées en complexes (fig. 49C, flèche blanche), mais pas dans les capillaires fenêtrés de la zone externe de l'éminence médiane dû à l'absence de BHE (fig. 49).

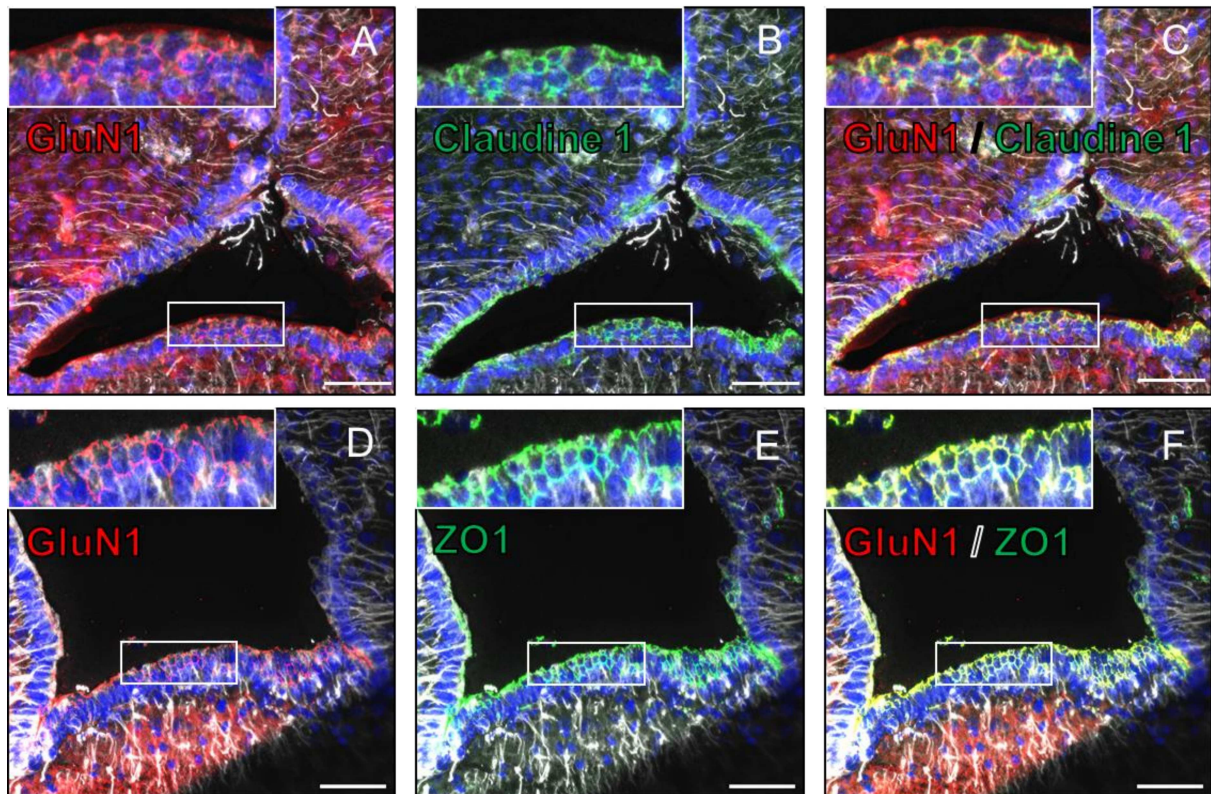


**Figure 49** : Distribution de la sous-unité GluN1 du RNMDA et des tancytes du 3<sup>e</sup> ventricule dans la région hypothalamique médiobasale.

L'immunomarquage anti-GluN1 (en rouge) par l'anticorps Glunomab révèle sa distribution dans la région médiobasale de l'hypothalamus. Il présente un immunomarquage le long des murs du 3<sup>e</sup> ventricule différent selon le type cellulaire et la localisation. L'immunomarquage anti-GluN1 est absent des vaisseaux fenêtrés de la zone externe de l'éminence médiane. Le marquage vimentine permet d'identifier les tancytes, il se révèle intense dans le corps cellulaire des épendymocytes (région dorsale du 3<sup>e</sup> ventricule), au contraire des tancytes (région ventrale du 3<sup>e</sup> ventricule) qui est plus faible et marque les prolongements tancytaires qui s'étendent dans le parenchyme hypothalamique. **1, 2** : L'expression de GluN1 arbore un motif en nid d'abeille dans la population de tancytes de l'éminence médiane. **3** : Le motif observé précédemment disparaît graduellement pour laisser place à un marquage moins intense pour les tancytes de l'ARH. On observe un marquage des capillaires possédant une BHE (pointe de flèche) mettant en évidence les récepteurs NMDA endothéliaux. **4** : Dans la zone ventrale du VMH où les tancytes apparaissent, la perte du signal de GluN1 devient plus évidente : Barre d'échelle : 100  $\mu$ m, 20  $\mu$ m dans les inserts, n=3 animaux.

Les récepteurs NMDA sont préférentiellement exprimés au niveau des tancytes EM. Or ces cellules expriment des protéines de jonctions serrées (fig. 50). Compte tenu des disparités de la distribution du récepteur parmi les différents sous-types de tancytes, nous nous sommes intéressés à la localisation et l'expression des complexes de jonctions serrées dans les tancytes. Comme l'illustre la figure 50, l'immunomarquage anti-GluN1 a pu être colocalisé soit avec celui de la claudine 1 (fig. 50C), soit avec celui de ZO-1 (fig. 50F) dans les tancytes EM. La protéine claudine-1 est exclusivement exprimée en motif de nid d'abeille par les tancytes EM à l'état basal

(fig. 50B). Ces résultats indiquent que le récepteur NMDA est localisé à proximité des complexes de jonctions serrées qui constituent la barrière caractéristique des tanycytes EM.



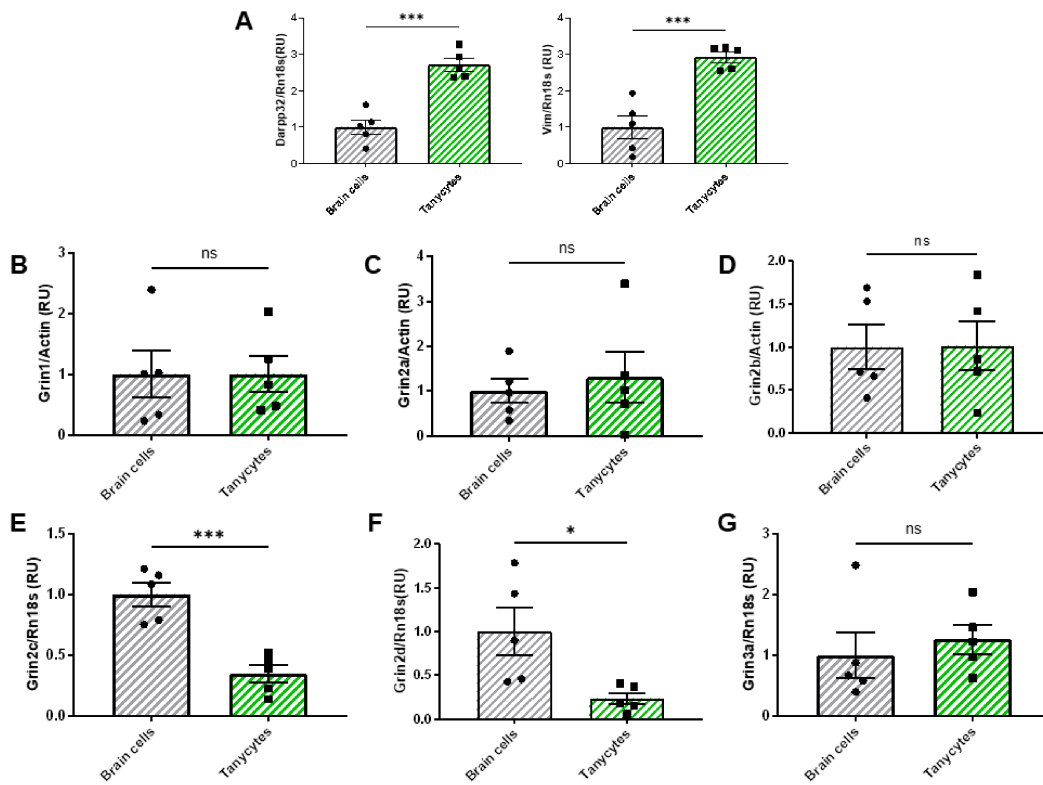
**Figure 50** : Les sous-unités GluN1 sont localisées à proximité des complexes de jonctions serrées organisés en barrière exprimés par les tanycytes chez des animaux de type sauvages.

Immunomarquages de la sous-unité GluN1 (rouge), et des protéines de jonctions serrées Claudine-1 ou ZO-1 (vert) exprimées par les tanycytes de l'éminence médiane. La colocalisation des cibles protéiques apparaît en jaune. **A, B** Immunomarquage de GluN1 et de Claudine-1 respectivement et leur superposition en **C**. **D, E** Immunomarquage de GluN1 et de ZO-1 respectivement et leur superposition en **F**. Barre d'échelle : 50  $\mu\text{m}$  (A), n=3 animaux.

Le récepteur NMDA est une protéine tétramérique composé obligatoirement de deux sous-unités GluN1, et de deux autres sous-unité GluN2 et/ou GluN3. Il forme ainsi un hétérodimère ou trimère selon sa composition. L'identification de l'expression des sous-unités régulatrices du récepteur NMDA tanycytaire nous permettra de déterminer ses fonctions de par sa composition

structurale. Dans ce but, nous avons procédé à une analyse transcriptomique de l'expression des sous-unités à partir de populations tanycytaires obtenues par tri cellulaire. Dans un premier temps et afin de cibler les tanycytes de façon efficace, nous avons injecté une *tat-Cre* dans le 3<sup>e</sup> ventricule de souris tdTomato<sup>loxp-stop-loxp</sup> au niveau du plancher du troisième ventricule.

Ainsi, l'expression du fluorophore tdTomato par les tanycytes permet de les identifier et de les trier par cytométrie en flux. Pour valider l'enrichissement en tanycytes de notre population cellulaire, il est nécessaire d'analyser les taux d'expression des ARNm codant la Darpp32 (PPP1R1B) et la Vimentine qui sont deux marqueurs de l'enrichissement d'une population cellulaire en tanycytes (fig. 51A). Les taux d'expression par les tanycytes (population positive) sont comparés par rapport aux taux d'expression des populations cellulaires cérébrales (population négative). Ces populations représentent un contrôle positif de l'expression des sous-unités du RNMDA. Nos analyses montrent que les niveaux d'expression des ARNm de *Grin1*, *Grin2A*, *Grin2B* et *Grin3A* par les tanycytes comparés à ceux de la population contrôle sont similaires (fig. 51B-C-D-G). Cependant, ceux des ARNm de *Grin2C* et *Grin2D* sont, quant à eux, significativement plus faibles (Fig. 51E-F). Cette première analyse suggérerait que les RNMDA tanycytaires sont préférentiellement constitués d'arrangements structuraux composés d'un homodimère de GluN1 et d'un homo ou hétérodimère de GluN2A, GluN2B et/ou GluN3A.

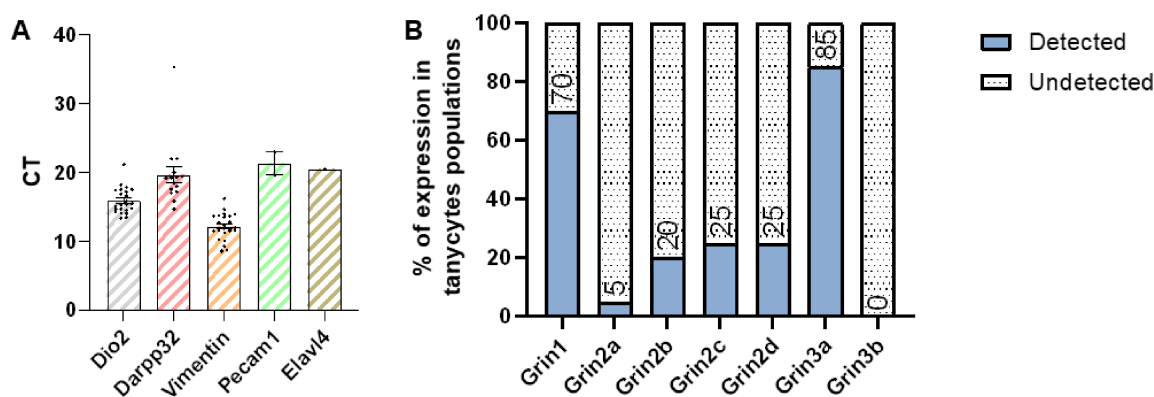


**Figure 51** : Les tanycytes expriment les sous-unités GluN1, GluN2A, GluN2B et GluN3A du récepteur NMDA chez des souris de type sauvages.

Analyse par PCR quantitative des ARNm des sous-unités du récepteur NMDA dans une population tanycytaire de souris tdTomato<sup>FloxP/STOP/FloxP</sup> ayant reçu la *tat-Cre*. Les taux d'expression de la population tanycytaire sont comparés à ceux des populations cellulaires cérébrales de référence isolées auprès des mêmes animaux. Les résultats sont normalisés par rapport à l'expression des gènes de ménage *Actin* ou *Rn18s*. Les taux d'expressions sont représentés en  $2^{-\Delta\Delta CT}$ . **A** Expression des ARNm marqueurs d'une population enrichie en tanycytes *PPP1R1B* et *Vimentine* par rapport aux cellules cérébrales. **B** Expression de l'ARNm *Grin1*. **C** Expression de l'ARNm *Grin2A*. **D** Expression de l'ARNm *Grin2B*. **E** Expression de l'ARNm *Grin2C*. **F** Expression de l'ARNm *Grin2D*. **G** Expression de l'ARNm *Grin3A*. N=5 animaux par groupe. Moyenne  $\pm$  SEM \*p < 0.05; \*\*p < 0.01; \*\*\*p < 0.001, selon le test statistique *t* de Student ou Mann-Whitney en fonction de la normalité des data.

Ces résultats encourageants nous ont amenés à réaliser une étude plus stricte dans laquelle nous avons utilisé l'AAV-Dio2 chez les animaux tdTomato<sup>loxP-stop-loxP</sup>. En effet, cette approche permet de cibler plus spécifiquement les populations tanycytaires au contraire de la *tat-Cre* qui est une protéine recombinante aspécifique. Ainsi, cette étude nous permet d'affiner les résultats obtenus préalablement avec la *tat-Cre*, sans pour autant discriminer les différentes sous-

populations de tanocytes. Dans un groupe de 24 animaux, nous avons pu exclure les populations tanocytaires contaminées soit par des neurones, soit par des cellules endothéliales qui expriment respectivement *Elavl4* et *Pecam1* (des marqueurs spécifiques de ces populations cellulaires) (fig. 52A). De ce fait, la pureté et la quantité de tanocytes obtenues sont bien plus élevées comparées à notre première étude. L'étude de PCR quantitative révèle que la majorité des populations tanocytaires issues d'animaux de type sauvage expriment les ARNm de *Grin1* et *Grin3A*. L'expression des sous-unités GluN2A/B/C/D ne sont détectées respectivement que chez 5 %, 20 %, 25 % et 25 % des populations tanocytaires. Au contraire, l'expression des sous unités GluN1 et GluN3A sont détectés chez 70 % et 85 % des populations tanocytaires (fig. 52B).



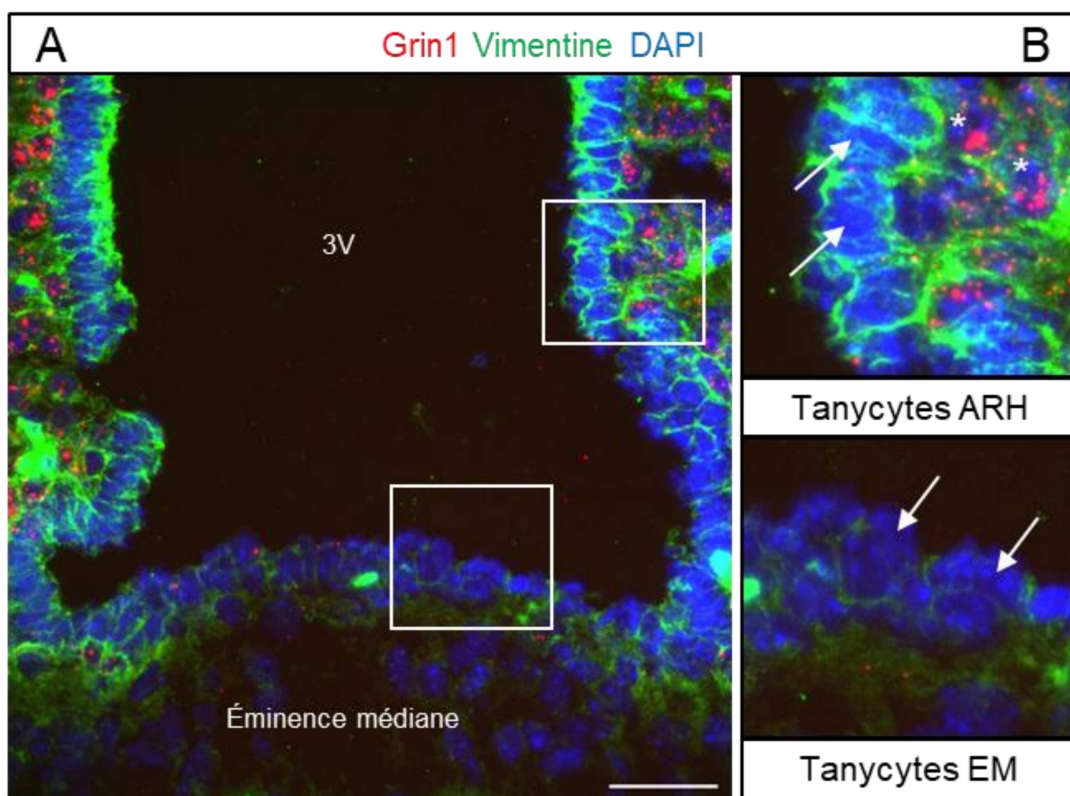
**Figure 52 : Les populations tanocytaires de souris C57BL/6J expriment majoritairement les sous unités GluN1 et GluN3A du récepteur NMDA en condition basale.**

Analyse par PCR quantitative des ARNm des sous-unités du récepteur NMDA dans des populations tanocytaires de souris tdTomato<sup>FloxP/STOP/FloxP</sup> ayant reçu le pAAV-Dio2-Cre-EGFP. **A** Étude de la pureté des populations tanocytaires suite au tri cellulaire par FACS ; les ARNm *Dio2*, *Darpp32* et *vimentine* sont des marqueurs d'expression des tanocytes. *Pecam1* et *Elavl4* sont des marqueurs d'expression des cellules endothéliales et des neurones respectivement. La détection de ces marqueurs cellulaires a entraîné l'exclusion des échantillons contaminés. **B** Détection des ARNm des sous-unités du récepteur NMDA dans les populations tanocytaires sélectionnées. Animaux n=24. Les histogrammes représentent la moyenne ± SEM A.



Au vu de l'ensemble des résultats obtenus par qPCR avec l'utilisation de la tat-Cre et de l'AAV-Dio2, nous en déduisons que les récepteurs NMDA tanycytaires seraient principalement composés des sous-unités régulatrices GluN1 et GluN3.

Afin de valider les données de qPCR et la présence des RNMDA tanycytaires, nous avons procédé à une hybridation *in situ*, grâce à la technique RNAscope® ciblant l'ARNm de *Grin1*. L'HIS ne révèle pas de transcrite dans les tanycytes de l'EM ou de l'ARH (fig. 53A), contrairement à d'autres populations cellulaires du noyau arqué dans lesquelles on remarque un fort signal (fig. 53B).



**Figure 53** : L'hybridation *in situ* des ARN messager de GluN1, *Grin1*, ne révèle pas son expression dans les corps cellulaires des tanycytes.

Les images ont été capturées par microscopie à épifluorescence. **A** : Images microscopiques de la zone basale du 3<sup>e</sup> ventricule, on peut y observer les populations tanycytaires de l'éminence médiane et du noyau arqué. **B** : Nous n'observons pas de signal révélant la présence de *Grin1* (rouge) dans les tanycytes de l'EM ou de l'ARH (flèches

blanches), contrairement aux populations cellulaires de l'ARH où l'on retrouve un signal intense (étoiles blanches). Barre d'échelle = 50  $\mu$ m, n=3.

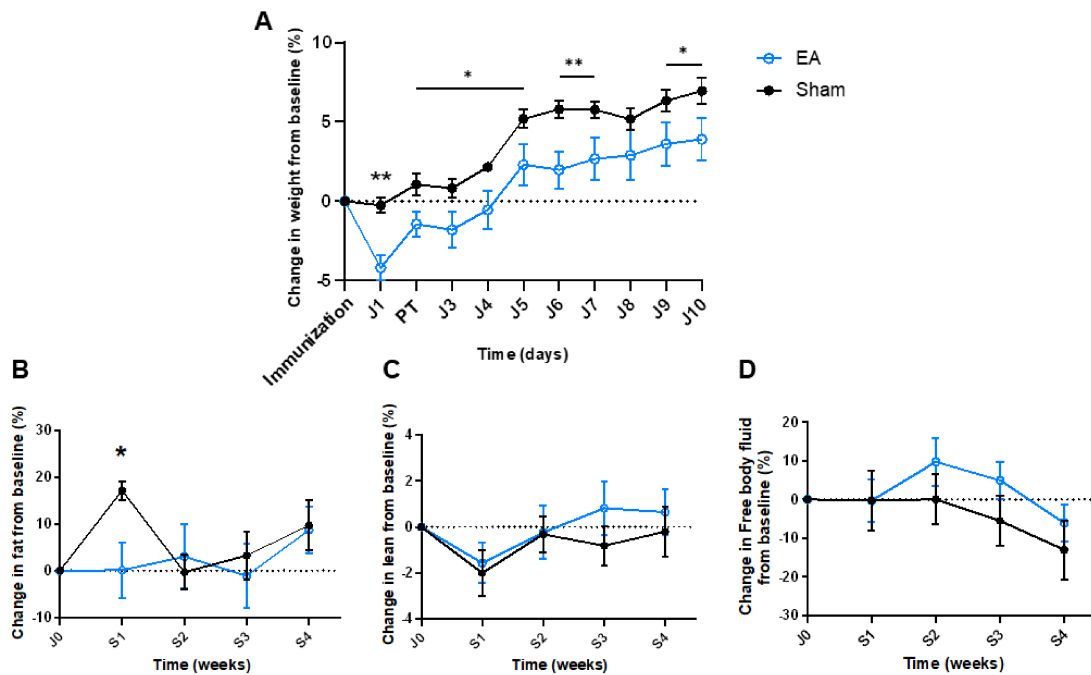
L'ensemble de ces travaux concernant l'objectif 1 montre que nous avons détecté certaines sous-unités du récepteur NMDA par qPCR dans les populations tanycytaires, dont GluN1, qui est aussi identifié par immunomarquage spécifiquement dans les tanycytes de l'EM. Toutefois, nous n'avons pas observé le transcrit *Grin1* lors de l'hybridation *in situ* (HIS) dans les tanycytes EM et ARH. A la suite de cette étude, nous avons étudié le métabolisme des animaux du modèle d'EAI-RNMDA à la recherche de troubles fonctionnels.

#### ***Etude du métabolisme, de la composition et de la température corporelle dans le modèle d'EAI-RNMDA en condition contrôle et durant une restriction alimentaire***

Pour répondre à l'objectif fixé, à la suite de l'immunisation des animaux EA nous avons recherché l'expression d'un phénotype caractéristique de troubles métaboliques. Nous nous sommes intéressés aux variations de poids, à la composition corporelle et à la température des animaux EA comparés aux animaux Sham. 24 h après l'immunisation, les animaux EA présentent une perte de masse corporelle de près de 5 % pour un poids moyen initial de 24.001 g  $\pm$  1.242 (fig. 54A). Les animaux EA retrouvent rapidement leur poids de départ entre le 4<sup>e</sup> et 5<sup>e</sup> jour post-immunisation (fig. 54A). Après ce stade, le poids des animaux EA continu d'augmenter parallèlement à celui des animaux sham sans jamais récupérer de la diminution pondérale initiale (fig. 54A).

Afin d'identifier le type tissulaire affecté par cette perte de poids, nous mesurons chez les animaux leur composition corporelle grâce à l'utilisation d'un minispec une fois par semaine durant 4 semaines après immunisation. Nous n'observons pas de perte de masse grasse, de masse maigre

ou des liquides corporels chez les animaux EA (fig. 54 B-C-D) par rapport aux animaux témoins. Cependant, 1 semaine après l'immunisation, les animaux Sham possèdent une composition corporelle plus riche en masse grasse que les animaux EA. Cette augmentation surprenante de la masse grasse diminue ensuite et s'équilibre avec les animaux EA à partir de la deuxième semaine post-immunisation.



**Figure 54 :** Les animaux EA présentent une perte de masse corporelle à la suite de l'immunisation et possèdent une proportion de masse grasse significativement plus faible comparé aux animaux Sham.

Mesures pondérales effectuées chez des animaux EA-RNMDA et leurs contrôles Sham. **A** Variations (en %) du poids des animaux par rapport au poids relevé le jour de l'immunisation sur une période de 10 jours. **B, C, D** : Variation de la composition corporelle en tissus adipeux (**B**), en tissus maigre (**C**) et en liquide corporel libre (**D**) au cours des 4 semaines post-immunisation. Abréviations, PT ; injection de toxine pertussique. **A** n=10 sham, n=7 EA, **B, C, D** n=9 EA et n=7 Sham. Moyenne  $\pm$  SEM \*p < 0.05; \*\*p < 0.01; \*\*\*p < 0.001, selon le test statistique ANOVA à deux facteurs et test posthoc de Fisher.

En vue de décrypter les mécanismes responsables de cette perte de poids, nous avons évalué le métabolisme énergétique et l'activité locomotrice des animaux EA et Sham par une mesure

indirecte de la calorimétrie grâce à la quantification des volumes d'O<sub>2</sub> consommés et de CO<sub>2</sub> produit, des relevés constants de la prise alimentaire par un système de mesure du poids de la mangeoire, et par des mesures manuelles de la température corporelle des animaux.

- Évolution de la prise alimentaire chez les animaux EA-RNMDA et Sham

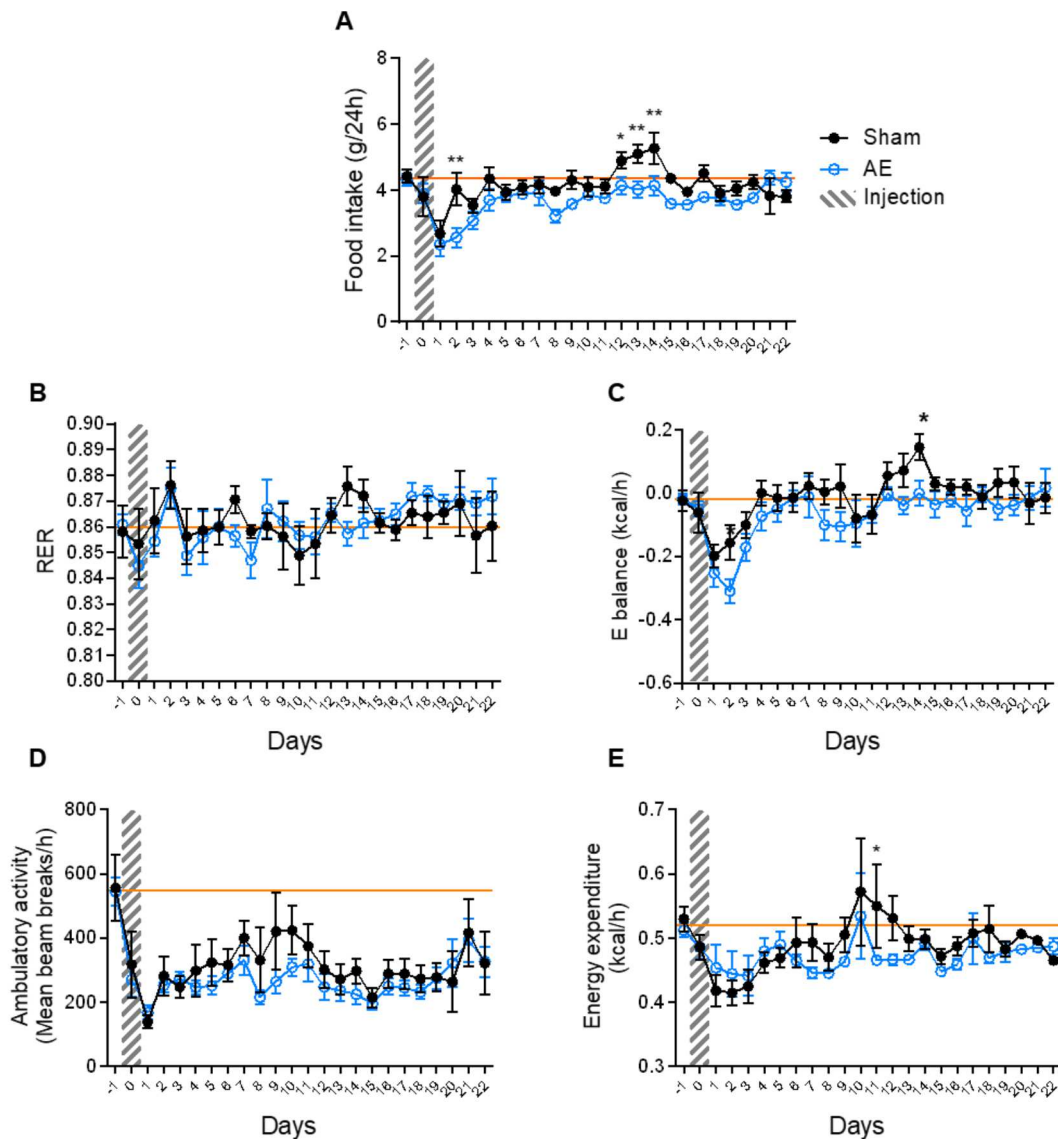
Les animaux EA et Sham présentent une baisse deux fois plus faible de la prise alimentaire d'en moyenne 2 g/24 h après l'immunisation en comparaison de leur consommation en condition basale d'en moyenne 4 g/24 h. La PA restera inférieure par rapport à la valeur moyenne basale avant immunisation (4 g/24 h) pour les deux groupes expérimentaux au cours des 11 premiers jours (fig. 55A). Cependant, aux jours 12, 13 et 14 post-immunisation, les animaux EA présentent une PA significativement plus faible que les Sham, d'en moyenne 1 g/24 h (fig. 55A).

- Évolution métabolique

Il n'y a pas de différences observées entre les animaux EA et Sham quant à la métabolisation de l'énergie (RER) au cours du temps (fig. 55B). Concernant la dépense énergétique, elle apparaît neutre et est analogue entre EA et Sham (fig. 55E). Finalement, la balance énergétique est relativement négative la première semaine après l'immunisation pour les animaux EA et Sham due à leur baisse de PA. Elle devient ensuite significativement plus faible pour les EA comparés aux Sham au jour 14 post-immunisation, ce qui correspond aux variations de la PA des animaux à la même période (fig. 55C).

- Évolution de l'activité ambulatoire

L'activité ambulatoire diminue grandement après l'immunisation où les animaux EA et Sham sont 2 à 3 fois moins actifs qu'en condition basale (fig.55D), néanmoins il n'y a pas de différences de l'activité ambulatoire entre les animaux sham et EA.

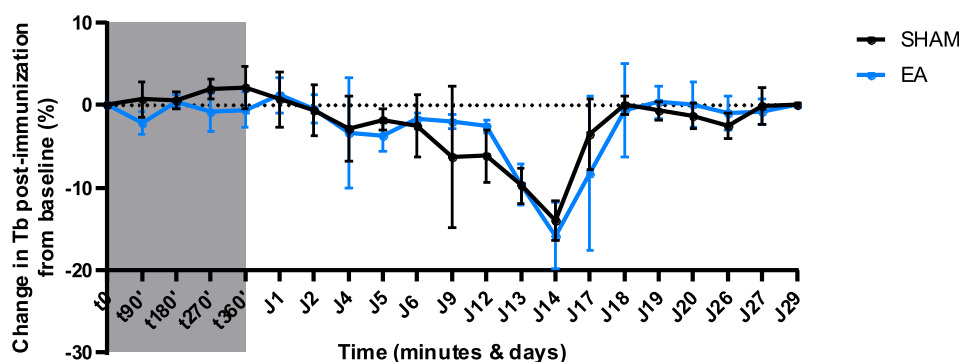


**Figure 55** : Les animaux EA présentent une prise alimentaire plus faible que leur contrôle sham 2 semaines post-immunisation.

Les mesures sont réalisées en continu, chaque point représente une moyenne des mesures enregistrées sur 24 h. Les paramètres sont mesurés chez les animaux EA (bleu) et les animaux Sham (noir). Pour chaque paramètre mesuré, la droite (orange) visible sur les graphes, représente la valeur moyenne en condition basale (avant immunisation). **A** Prise alimentaire en g/24 h (consommation journalière). **B** Quotient respiratoire (RER). **C** Balance énergétique en kcal/h. **D**

Activité ambulatoire horizontale en rupture moyenne des faisceaux infrarouges par heure. **E** Dépense énergétique en kcal/h. Sham n=7, EA n=8. Moyenne  $\pm$  SEM \*p < 0.05; \*\*p < 0.01; \*\*\*p < 0.001, selon le test statistique ANOVA à deux facteurs et test posthoc de Fisher.

Nous nous sommes ensuite intéressés à la température corporelle des animaux EA et Sham dans les heures suivant leur immunisation puis une fois toute les 24h (fig. 56). De manière surprenante, nous n'avons pas observé de variation anormale de la température chez les animaux dans les premières heures après immunisation ou les jours suivant. Toutefois, les animaux EA et sham présentent une baisse de leur température corporelle et atteint un pic minimum 14 jours après l'immunisation, puis retrouve des valeurs basales à J18 (fig. 56).



**Figure 56 : La température corporelle des animaux EA et Sham diminue à deux semaines post-immunisation.** La température périanal est mesurée chez les animaux EA (bleu) et sham (noir) durant 29 jours. Les températures ont été relevé à 90min., 180min., 270min., 360min. (gris), puis une fois toutes les 24h jusqu'à 29 jours post-immunisation. N=4 animaux par groupe.

Ces premières observations concernant le métabolisme des animaux EA tendent à indiquer l'existence d'une anomalie de la PA. La température corporelle des animaux EA et sham diminue deux semaines après immunisation mais reste comparable entre les deux groupes. Afin

d'approfondir l'étude du métabolisme des animaux, nous avons procédé à une expérience de jeûne/réalimentation, consistant en une période de jeûne de 24 h suivie d'une période de réalimentation de 48 h. Durant cette période de jeûne, les animaux EA et Sham n'ont plus accès à la nourriture.

- Évolution de la prise alimentaire

Au début des enregistrements (10 jours post-immunisation) avant la phase de jeûne, la PA des animaux EA est significativement plus faible d'en moyenne 0.5 g/24 h que les animaux Sham. Étonnamment, la PA est identique entre les groupes EA et Sham durant la période de réalimentation. Elle augmente à des valeurs d'en moyenne 4.5 g/24 h pour les deux groupes (fig. 57A-B).

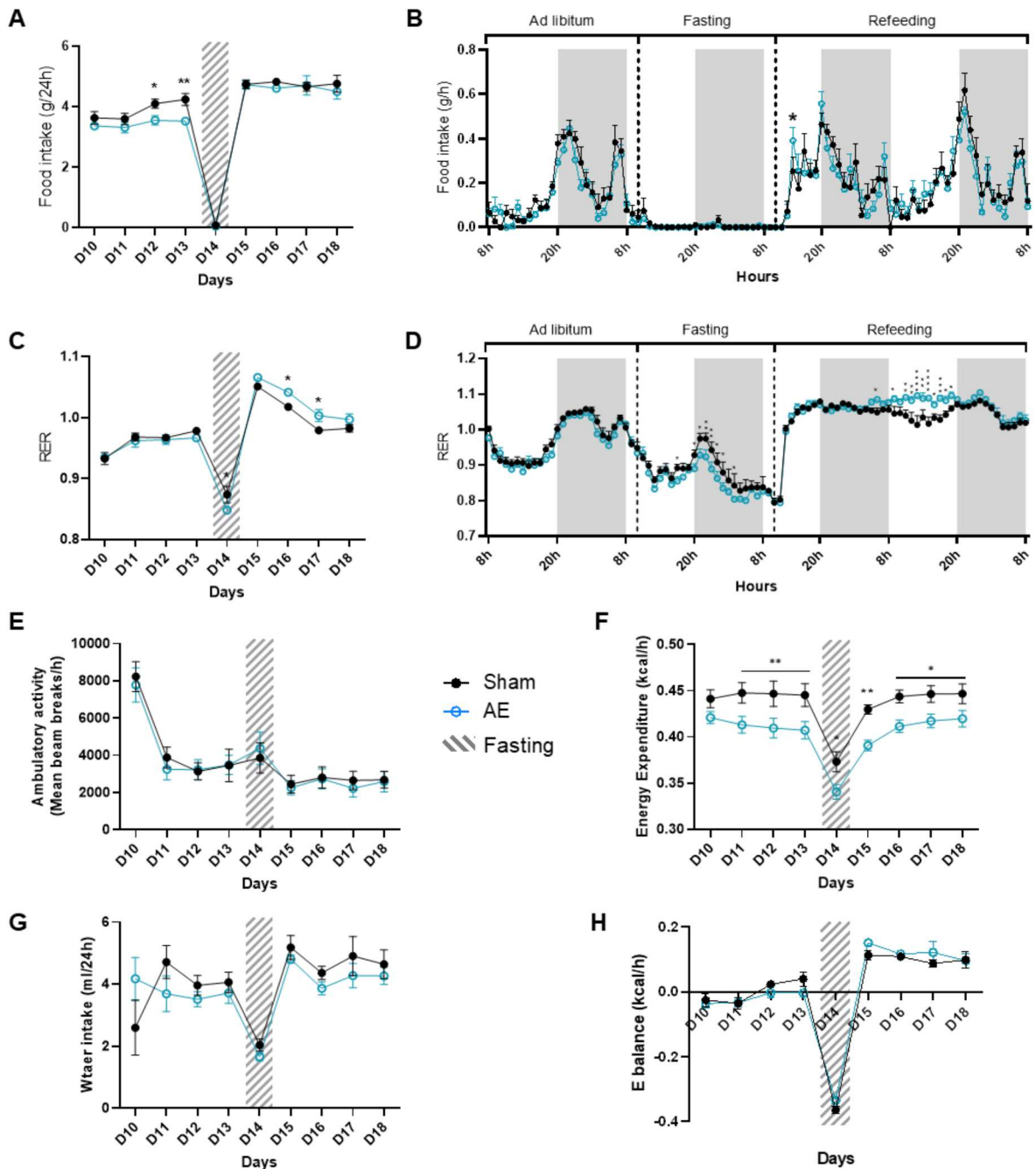
- Évolution du métabolisme

Le quotient respiratoire (RER) se révèle différent lors du jeûne et de la réalimentation entre EA et Sham (fig. 57A). Comme attendu, les valeurs de RER diminuent lors de la phase de jeûne pour les deux groupes d'animaux qui ne peuvent plus consommer les carbohydrates apportés par la nourriture. Les valeurs de RER sont significativement plus faibles d'en moyenne 0.02 pour les animaux EA par rapport aux animaux Sham soulignant ainsi une consommation plus importante de triglycérides du tissu adipeux des animaux EA lors du jeûne (fig. 57C-D). Lors de la phase de réalimentation, le RER réaugmente et plafonne à des valeurs supérieures à 1. Ceci est dû à la transformation et à un stockage important des glucides ou carbohydrates apporté par la nourriture en triglycéride dans le tissu adipeux. Lors de la phase claire du deuxième jour post-jeûne, bien que les valeurs de RER restent élevées pour les animaux sham par rapport aux valeurs contrôles, le RER des animaux EA est significativement plus élevé marquant une consommation plus

importante du glucose comme substrat (fig. 57C-D). Ces données indiquent une adaptation métabolique de l'utilisation des réserves énergétiques par les animaux.

L'évolution de l'activité ambulatoire reste comparable entre les deux groupes avant, pendant et après le jeûne (fig. 57E). Les animaux EA vont cependant avoir, tout le long de l'enregistrement, une dépense énergétique significativement plus faible que celle des animaux Sham (fig. 57F) sans que les animaux EA soient moins actifs que les animaux sham (fig. 57E). La balance énergétique (fig. 57H) et la prise hydrique (fig. 57G) des animaux EA et Sham sont identiques tout au long de l'acquisition. En résumé, le jeûne et la réalimentation n'ont pas d'effets spécifiques sur la dépense énergétique entre les animaux EA et Sham.



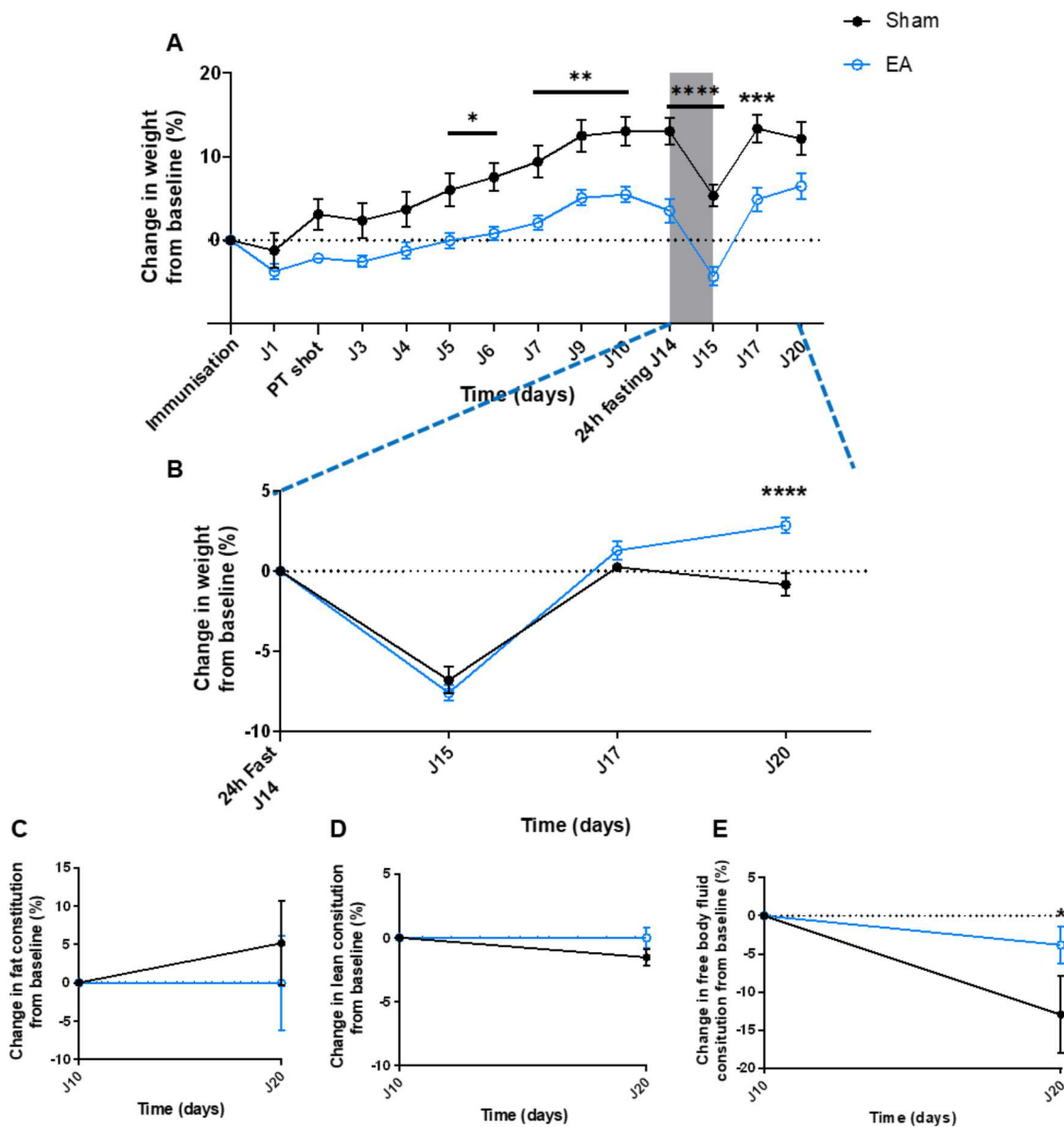


**Figure 57 :** Les animaux EA présentent, lors du jeûne, une utilisation des ressources énergétiques différente des animaux contrôles

Les paramètres sont enregistrés en continu chez les animaux EA et Sham. Les valeurs des paramètres mesurés sont moyennées sur 24 h pour les tracés (A, C, E, H). Concernant les tracés B et D les mesures des paramètres mesurés moyennés sur 1 h. A Prise alimentaire en g/24 h à partir du 10<sup>e</sup> jour post-immunisation. B Prise alimentaire moyenne, 24 h avant le jeûne (Fasting), lors du jeûne puis au cours des 48 h de réalimentation. C Quotient respiratoire (RER) à partir du 10<sup>e</sup> jour post-immunisation. D Quotient respiratoire lors des 24 premières heures précédant le jeûne, lors du

jeûne et au cours des 48 h de réalimentation. **E** Dépense énergétique en kcal/h. **F** Activité ambulatoire horizontale. **G** Prise hydrique en ml/24 h. **H** Balance énergétique en kcal/h. Sham n=7, EA n=8. Moyenne  $\pm$  SEM \*p < 0.05; \*\*p < 0.01; \*\*\*p < 0.001, selon le test statistique ANOVA à deux facteurs.

Parallèlement à cette étude métabolique, nous nous sommes intéressées à l'évolution de la charge pondérale des animaux. Nous observons des variations identiques après immunisation, soit une perte de poids de près de 5 % pour les animaux EA qui perdure dans le temps (fig. 58A). Lors de la phase de jeûne, la perte de poids est similaire entre les deux groupes (fig. 58B). Néanmoins, on remarque que 5 jours après le jeûne, les animaux EA gagnent en moyenne 3 % de leur masse corporelle comparée à celle des animaux Sham (fig. 58B). La variation de la composition corporelle des animaux relevé à J10 et J20 post immunisation reste similaire entre EAI-RNMDA et sham (fig. 58C-D), excepté pour la composition en eau des animaux sham qui diminue significativement à J20 par rapport aux animaux EAI-RNMDA (fig. 58E).

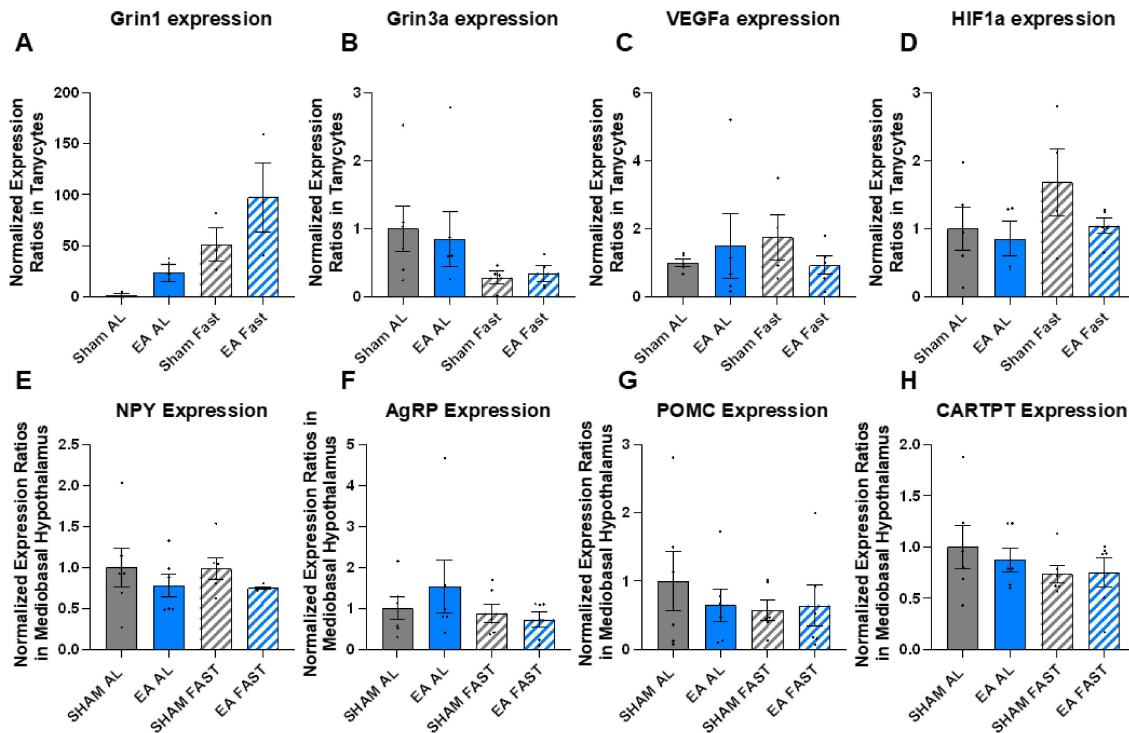


**Figure 58** : Les animaux EA perdent en masse pondérale après la phase de jeûne lors de la réalimentation contrairement aux animaux contrôles Sham.

**A** Relevé des poids des animaux EA (bleu) et Sham (noir) après immunisation et lors des phases de jeûne/réalimentation, rapporté au poids le jour de l'immunisation. **B** Poids des animaux EA et Sham pendant le jeûne et 5 jours lors de la réalimentation, rapportée au poids au jour où commence le jeûne. **C**, **D** et **E** Mesure de la composition corporelle en masse grasse (**C**), masse maigre (**D**) et liquide corporelle (**E**) des animaux EA et Sham au jour d'entrée (10 jours post-immunisation) et de sortie (20 jours post-immunisation) des cages métaboliques, ainsi, nous pouvons observer la composition corporelle des animaux avant et après l'expérience de jeûne/réalimentation. Animaux Sham n=7 et EA n=8. Moyenne  $\pm$  SEM \* $p$  < 0.05; \*\* $p$  < 0.01; \*\*\* $p$  < 0.001, selon le test statistique ANOVA à deux facteurs et test posthoc de Fisher.

Le jeûne puis la réalimentation entraîne des modifications de l'utilisation et du stockage des ressources énergétiques par les animaux EA. Étrangement leur prise alimentaire reste similaire à celle des animaux sham.

En vue d'expliquer ces changements, nous nous sommes interrogés s'il existait des différences dans l'expression des gènes régulateurs de la balance énergétique, soit, les marqueurs du jeûne exprimés par les tanocytes et les neuropeptides exprimés dans l'ARH (fig. 59). L'étude transcriptomique intègre aussi une étude comparative de l'expression des sous-unités GluN1 et GluN3A par les tanocytes. Nous avons comparé quatre groupes d'animaux (n = 6) incluant les EA et les Sham à des états métaboliques différents, (à jeun ou nourri). Concernant les marqueurs du jeûne exprimés par les tanocytes, l'expression des ARNm de *VEGFa* et *HIF1A* est équivalente quel que soit l'immunisation ou le statut métabolique des animaux (fig. 59C-D). Il n'existe pas non plus de modifications de l'expression des ARNm de neuropeptides par les neurones de l'ARH, *NPY*, *AgRP*, *POMC* et *CARTPT* (fig. 59E-F-G-H). L'expression des ARNm de sous-unités *Grin1* et *Grin3A* reste comparable entre les différents groupes d'animaux (fig. 59A-B). De façon surprenante, les animaux Sham qui représentent notre groupe contrôle ne présentent pas un statut d'expression physiologique en réponse au jeûne, où l'expression de *VEGFa*, *HIF1A*, *NPY* et *AgRP* est augmentée, tandis que celles de *POMC* et *CARTPT* est diminuée.



**Figure 59 :** L'expression des sous-unités du RNMDA, des marqueurs du jeûne et des neuropeptides restent inchangée entre les animaux Sham et EA selon l'état métabolique des animaux.

Les PCR quantitatives sont soit réalisés sur des populations de tanyocytes triées par FACS (A, B, C, D), soit réalisé sur des prélèvements de l'hypothalamus médiobasale (E, F, G, H). Elles sont réalisées chez des animaux EA (bleu) et Sham (gris), avec un accès à la nourriture à volonté (AL) ou après 24 h de jeûne (Fast). Expression des ARNm des sous-unités du RNMDA *Grin1* A et *Grin3A* B par les tanyocytes. Expression des ARNm des marqueurs du jeûne *VEGFa* C et *HIF1a* D par les tanyocytes. Expression des ARNm des neuropeptides responsable du contrôle de la PA dans la région de l'hypothalamus médiobasal, dont le *NPY* E, l'*AgRP* F, le *POMC* G et le *CARTPT* H. Abréviations, AL, *Ad Libitum*. Animaux : tanyocytes Sham AL n=5, EA AL n=5, Sham Fast n=4, EA Fast n=6. Hypothalamus médiobasal n=6. Moyenne  $\pm$  SEM \* $p < 0.05$ ; \*\* $p < 0.01$ ; \*\*\* $p < 0.001$ , selon le test statistique ANOVA à deux facteurs, associé au test posthoc de Fisher.

Pour résumer, en condition contrôle nous observons : que les animaux EA sont, 24 h après l'immunisation et contrairement aux animaux sham, sujets à une perte de poids correspondant à 5 % de leur masse corporelle. De plus, ils montrent un comportement alimentaire différent de celui des animaux Sham 2 semaines post-immunisation avec une PA plus faible d'en moyenne 1 g/24 h. La température corporelle des animaux EA et sham évolue similairement avec une diminution importante de la température au jour 14 post-immunisation.

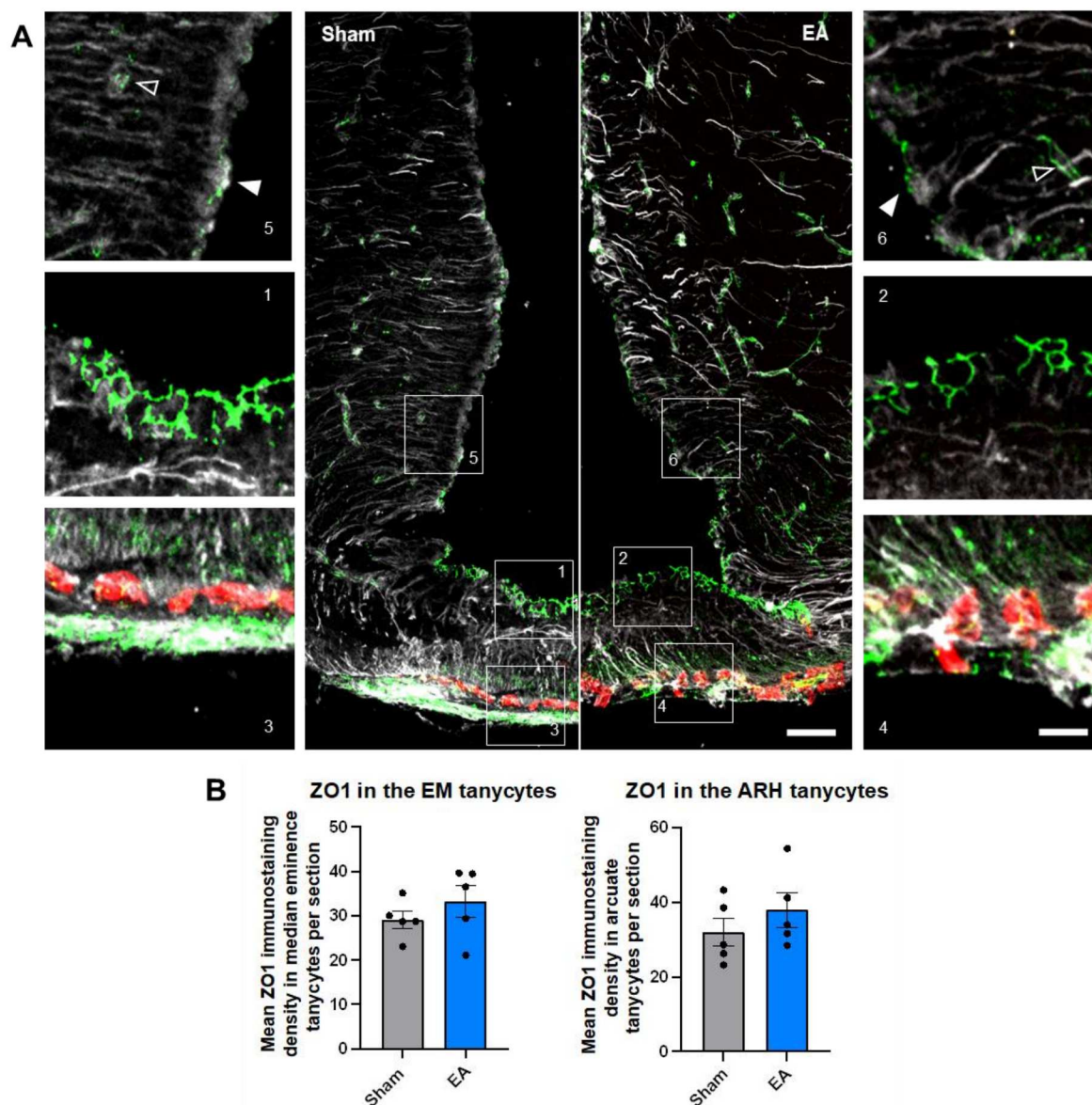
Les animaux EA en condition de stress énergétique conditionné par le jeûne présentent une utilisation et un stockage de leurs réserves énergétiques qui diffèrent par rapport aux animaux Sham. De fait, les animaux EA ont une lipolyse ainsi qu'une lipogenèse plus marquée durant la phase de jeûne et de réalimentation respectivement. Par ailleurs, cette adaptation métabolique n'impacte pas le poids des animaux ou leur composition corporelle en masse maigre et masse grasse. La composition corporelle en fluide des animaux EA diminue significativement moins que les animaux sham. L'étude transcriptomique des modifications de l'expression des marqueurs tanycytaires et des neuropeptides hypothalamiques lors d'un jeûne s'avère identique entre EA et sham nourris ou à jeun. Effectivement, dans notre groupe contrôle Sham l'expression de ces marqueurs et des neuropeptides n'est pas celle attendue lors d'une réponse physiologique au jeûne. Au regard de ces résultats, nous pouvons penser que les animaux Sham sont aussi affectés par l'immunisation contrôle qui perturbe l'expression des neuropeptides responsable du maintien de l'équilibre énergétique, de même que les animaux EA.

Afin de déterminer l'origine des troubles observés en condition contrôle, nous nous sommes intéressés aux conséquences potentiels dû à la présence des autoanticorps dans le CSF des animaux EA deux semaines après immunisation.

***Etude de l'intégrité de la barrière tanycytaire, de la densité des neurones à NPY et de leur expression du gène Grin1 chez les animaux EAI-RNMDA et sham***

Afin de rechercher d'éventuels effets des autoanticorps au pic symptomatologique du modèle (2 semaines post immunisation, Wagnon *et al.*, 2020), nous avons étudié l'état physique de la barrière tanycytaire hypothalamique par immunohistologie quantitative en réalisant des immunomarquages anti-ZO1 (un marqueur de l'intégrité de cette barrière, Mullier *et al.*, 2010). La

densité du signal de la protéine ZO-1 a donc été étudiée en microscopie chez des animaux EA et Sham. L'organisation des complexes de jonctions serrées ne présente pas de modifications chez les EA ou chez les Sham, à la fois pour les tanocytes EM et les tanocytes vmARH (fig. 60A-B). Quel que soit le groupe expérimental, nous n'avons pas observé de différences nettes dans la distribution des immunomarquages anti-ZO1 (fig. 60A). En effet, au sein des deux groupes, nous pouvons observer une organisation des complexes de jonctions serrées en motif de nid d'abeille au niveau des tanocytes EM (fig. 60A ins. 1-2), tandis que les tanocytes vmARH ne présentent jamais ce type d'organisation (fig. 60A ins. 5-6). La quantification de la densité d'immunomarquage de ZO-1 ne révèle pas de différences entre les animaux sham et EA, à la fois pour les tanocytes EM et les tanocytes vmARH (fig. 60B).

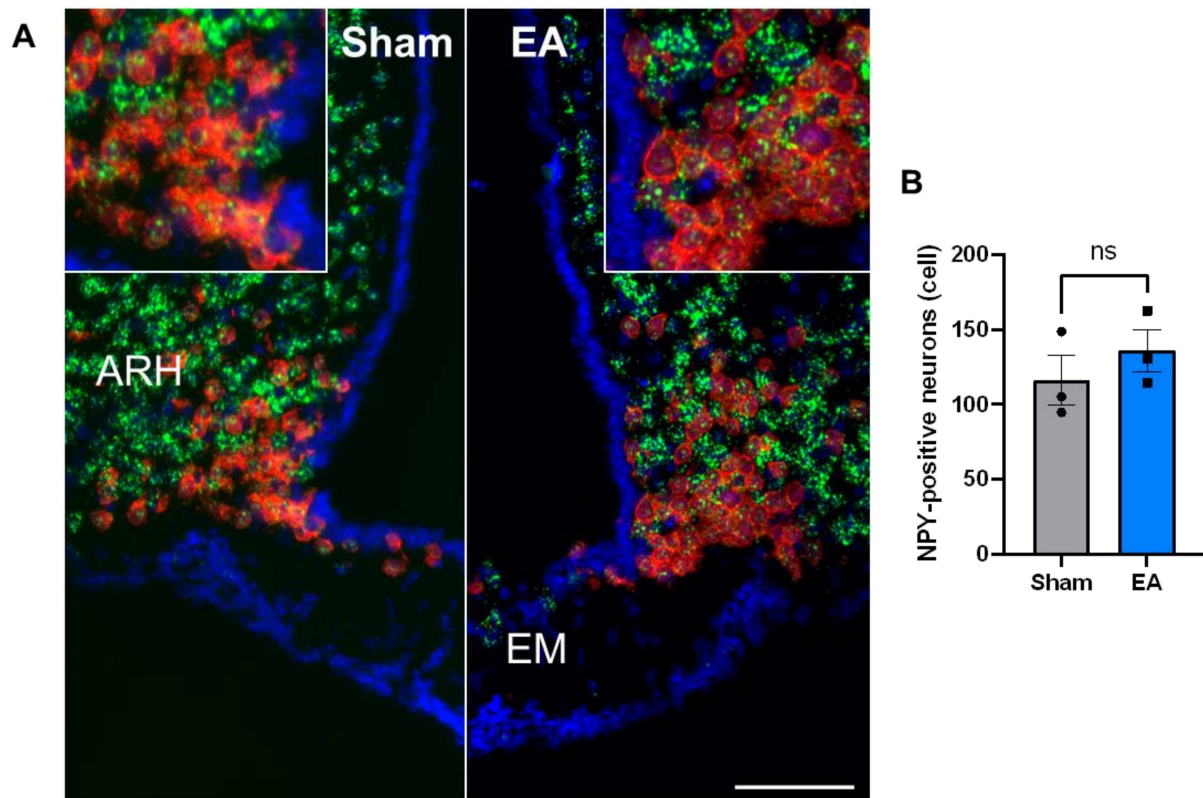


**Figure 60 : L'encéphalite murine n'induit pas de réorganisation de la barrière tanycytaire EM et vmARH.**

**A** Immunomarquage des tanyocytes par l'anticorps anti-vimentine (blanc), des jonctions serrées par l'anticorps anti-ZO-1 (ZO1, vert) et des vaisseaux fenêtrés par l'anticorps anti-MECA-32 (rouge) sur des sections coronales de la région hypothalamique médiobasale des animaux Sham et EA. Les images ont été obtenues par l'utilisation d'un microscope confocal. La barrière des tanyocytes EM forment un motif en nid d'abeille (inserts 1 et 2) lorsqu'ils interagissent avec des vaisseaux MECA-32 positifs (inserts 3 et 4) et un motif diffus (flèches pleines, inserts 5 et 6) lorsqu'ils interagissent avec des vaisseaux ZO1 positifs (marqueur de la BHE) (flèches vides, inserts 5 et 6) **B** Quantification des jonctions serrées positives au ZO1 des tanyocytes EM et ARH en fonction de l'immunisation des animaux EA et Sham. N = 5 animaux par groupe, moyenne  $\pm$  SEM \* $p < 0.05$ ; \*\* $p < 0.01$ ; \*\*\* $p < 0.001$ , selon le test statistique  $t$  de Student ou Mann-Whitney selon la normalité des valeurs.



Dans un second, nous avons comparé la densité de neurones exprimant l'ARNm *NPY* (responsable du comportement orexigène) chez les animaux EA et sham grâce à une étude quantitative d'HIS (fig. 61). Nous n'avons pas observé de différences significatives dans la densité neuronales *NPY* positive entre les animaux EA et Sham (fig. 61B). L'expression de *Grin1* est observée dans les neurones coexprimants le *NPY* dans la région du noyau arqué, à la fois chez les animaux EA et sham (fig. 61A). Dû à la probabilité d'une diffusion des autoanticorps anti-RNMDA du CSF vers le noyau arqué et d'une diminution potentiel du RNMDA des neurones *NPY*, nous nous sommes intéressés à l'expression du gène *Grin1* dans ces neurones. Qualitativement, nous n'avons pas observé de différences dans l'expression des ARNm de *Grin* au sein des neurones orexigènes *NPY* quel que soit le statut d'immunisation des animaux (fig. 61A). Cette étude histologique indique qu'il n'y a pas de modification du nombre de neurones exprimant l'ARNm *NPY* chez les animaux EAI-RNMDA comparément aux animaux sham. De même, l'expression de la sous-unité GluN1 n'est pas non plus affecté par l'EAI-RNMDA induite chez les animaux.



**Figure 61** : L'encéphalite murine EAI-RNMDA n'affecte pas la régulation de l'expression des gènes *Grin1* et *NPY* des neurones NPY/AgRP.

Hybridation *in situ* des ARNm de *Grin1* (vert) et *NPY* (rouge) chez des animaux sham et EA dans la région ventromédiane du noyau arqué. **A** L'hybridation *in situ* des ARNm de *Grin1* et *NPY* révèle une expression de la sous-unité GluN1 par la présence de leurs ARNm dans les neurones à NPY de l'ARH à la fois chez les animaux sham et EA. **B** Quantification du nombre de neurones positifs au ARNm *NPY* chez les animaux Sham et EA. Barre d'échelle = 50µm. N=3 animaux par groupe. Abréviations, ARH : noyau arqué, EM : éminence médiane. n=3 sham, n=3 EA.

Pour résumer les travaux réalisés dans le cadre de notre troisième objectif, l'induction de l'EAI-RNMDA dans notre modèle n'affectent pas l'intégrité de la barrière tanycytaire à l'état basal. Il n'a pas non plus été mis en évidence une variation de la densité en neurones exprimant les ARNm *NPY*, ni de l'expression de la sous-unité GluN1 dans les neurones orexigènes NPY. Les différences métaboliques observées précédemment en condition contrôle ne semblent pas être explicables aux vues de ces résultats.



## **Discussion**



## **Mise en place d'un nouveau modèle murin d'encéphalite autoimmune anti-récepteurs NMDA par une immunisation active**

La pathologie d'EAI-RNMDA a été associée à différents troubles psychiatriques faisant intervenir les fonctions neuronales de l'hypothalamus. Même si les cas cliniques se révèlent peu nombreux, il a déjà été mis en évidence que les pathologies autoimmunes étaient sous-jacentes de troubles de la PA (Mechelhoff *et al.*, 2015; Perogamvros *et al.*, 2012; Virupakshaiah *et al.*, 2019). Il paraît logique que la présence d'autoanticorps ciblant un récepteur exprimé dans différents types cellulaires cérébraux et périphériques va potentiellement créer de multiples dysfonctionnements. Ainsi, il est probable que des troubles de la PA soient présents chez de nombreux patients. Toutefois, l'identification de tels troubles peut être compliquée de par la présence simultanée d'autres symptômes (Warren *et al.*, 2018a).

Le développement de notre modèle a permis de palier à certaines insuffisances physiopathologiques des modèles par injection d'anticorps humain (Malviya *et al.*, 2017; Planagumà *et al.*, 2015; Wright *et al.*, 2015). Parmi l'ensemble de ceux existant à ce jour, notre modèle est le seul à décrire une réponse autoimmune par l'intermédiaire des lymphocytes B ciblant le système nerveux central. Nos travaux ont mis en évidence l'infiltration des lymphocytes B dans les méninges, les espaces périventriculaires et les ventricules cérébraux, où ils se différencient en plasmocytes. Ces réactions ont été associées à une encéphalopathie caractérisée par une ouverture de la BHE, des hypersignaux périventriculaires observés en FLAIR et des dépôts d'IgG dans le parenchyme autour des ventricules et dans la région hippocampique. Deux semaines post-immunisations, les animaux développent des troubles cognitifs et comportementaux (Wagnon *et al.*, 2020).

Dans le cadre de mes recherches, la validation du modèle s'est faite par l'utilisation du Y maze à 14 jours post-immunisation. Ce test permet d'évaluer la mémoire de travail et spatiale à court terme chez les animaux. De l'ensemble des tests comportementaux réalisés avec notre modèle, le Y maze requiert des petites cohortes (n=10) afin d'être discriminant, il est aussi peu anxiogène et non invasif.

À la suite du développement de notre modèle d'EAI-RNMDA par immunisation active, l'équipe du Pr. Hannelore Ehrenreich a entrepris de le reproduire indépendamment, afin de répondre aux questions de leur projet de recherche sur la pathologie d'EAI-RNMDA (Wilke *et al.*, 2021). Le fait est que cette étude s'est soldée par un échec quant à la reproduction du phénotype pathophysiologique de notre modèle, malgré la présence des autoanticorps anti-GluN1<sub>359-378</sub>. Nous tenterons d'expliquer dans cette partie de la discussion, comment et pourquoi la reproduction de notre modèle par Wilke et coll. n'a pas abouti aux résultats escomptés. Le protocole suivi par Wilke et coll. est très similaire au notre, (parfois à un jour près) concernant l'immunisation et les tests comportementaux, histologiques ou cellulaires. Cependant, quelques éléments diffèrent par rapport à notre protocole :

- Immunisation : pas d'utilisation de *mycobacterium tuberculosis* (MT) supplémentaire dans l'émulsion CFA/peptide GluN1.
- Groupes contrôles : il n'existe pas de groupes immunisés sans peptides.
- Comportement : utilisation d'un dispositif de comportement différent pour évaluer l'état d'anxiété des animaux à savoir le labyrinthe en croix surélevé plutôt que le O maze. Phase de rappel de 3 minutes au lieu de 1 minute pour le test du Y maze permettant d'évaluer les capacités de mémorisation des animaux.

- Hébergement : les animaux sont hébergés dans un cycle non-inversé donc manipulés durant la phase diurne.

Bien que l'absence du *mycobacterium tuberculosis* (MT) puisse limiter le développement de la réponse immunitaire, cela n'a pas empêché la production d'autoanticorps détectés par ELISA dans le sérum des animaux (Wilke *et al.*, 2021). De plus, quand bien même le CFA possède déjà dans sa composition le MT, un ajout supplémentaire de MT va fortement activer le système immunitaire inné (Kato and Yamamoto, 1988). La réponse immunitaire se traduit par une infiltration du SNC par des cellules immunitaires et des autoanticorps associés à une altération ou perte de l'imperméabilité de la BHE. Il est possible que la réponse inflammatoire permettant d'engendrer une rupture de la BHE soit être trop faible, ouverture qui sera ensuite entretenue par l'encéphalopathie déclenchée par l'infiltration des autoanticorps et des cellules immunitaires. L'absence d'altération de la BHE dans les différents groupes d'animaux de l'étude de Wilke et coll. pourrait apporter un début de réponse quant à l'échec de la reproductibilité de notre modèle. En effet, l'absence d'altération de la BHE implique l'impossibilité des autoanticorps et cellules immunitaires à s'infiltrer dans le SNC et donc à cibler les cellules exprimant la sous-unité GluN1 du RNMDA (fig. 5-7 Wagnon *et al.*, 2020). Le développement de la neuro inflammation n'a donc pas lieu et empêche l'induction des déficits cognitifs mimant l'EAI-RNMDA. Toutefois, il nous est difficile d'affirmer que la seule absence du MT supplémentaire dans l'émulsion utilisée pour l'immunisation des animaux soit responsable du maintien de l'intégrité de la BHE.

Le test comportemental du labyrinthe en croix surélevé bien que similaire dans la mise en évidence des troubles anxieux, a tendance contrairement au test du O maze à inciter les animaux à rester au centre de la croix. Au croisement des deux bras, les animaux peuvent à la fois observer les côtés « ouvert » et aller vers le second bras fermé sans avoir à traverser un bras ouvert. Tandis



que pour le O maze, les animaux qui vont explorer le labyrinthe sont obligés de traverser ses bras ouverts pour aller dans le second bras fermé (Tucker and McCabe, 2017). Il est possible dans le cas de notre modèle que le labyrinthe en O ou O maze soit plus adapté pour la mise en évidence d'un comportement anxieux (fig.2 Wagnon *et al.*, 2020).

Il est intéressant de noter que les animaux ayant reçu le peptide GluN1<sub>359-378</sub> et les animaux ayant reçu le peptide OVA (émulsion identique entre ces deux groupes) n'ont pas su discriminer le bras nouveau lors du test du Y maze en comparaison des animaux du second groupe contrôle ayant reçu le peptide GluN1<sub>168-187</sub>. Le fait que les animaux OVA ne discrimine pas en tant que groupe contrôle alors qu'elle devrait discriminer le bras nouveau, pourrait venir du temps d'acquisition de la phase de rappel. En effet celui-ci est d'une durée de 3 minutes lors de la phase de rappel et donc potentiellement trop long pour pouvoir correctement discriminer le comportement des animaux. En effet les animaux ont tendance à visiter en premier le lieu qui leur est inconnu, donc le bras nouveau, de par leur comportement curieux (Whalley, 2021).

Un élément très important de leur protocole diffère du notre. En effet, les animaux sont hébergés selon un cycle « normal » ou non-inversé. Cela signifie que l'immunisation et l'ensemble des tests comportementaux ont été réalisés lors de la phase diurne des animaux, ce qui correspond à leur phase de repos (Haspel *et al.*, 2020; Orozco-Solis and Aguilar-Arnal, 2020). Or, il a récemment été montré que l'horloge circadienne et le système immunitaire sont liés entre eux. On trouve donc des variables dépendantes du moment de la journée dans la physiologie des cellules immunitaires, les interactions hôte/parasite, les processus inflammatoires ou les réponses immunitaires adaptatives. Ainsi, il est probable que l'immunisation des animaux durant leur phase de repos ne soit pas adaptée dans le but d'obtenir une réponse efficace de leur système immunitaire innée puis adaptatif. De plus, réaliser des tests comportementaux durant la phase diurne peut

modifier le comportement des animaux. En effet, il a été montré dans une souche DBA (souris sujettes à l'anxiété) que pratiquer les test comportementaux durant la phase diurne inhibait leur comportement tels que l'exploration et la prise alimentaire (Roedel *et al.*, 2006). Cependant, il n'a pas été observé de différence dans l'anxiété et la mémoire spatiale d'animaux sauvage C57BL/6 entre la phase diurne et nocturne (Tsao *et al.*, 2022). Les résultats obtenus par les tests comportementaux du Y maze et O maze effectués par Wilke et coll. (2021) ne sont donc probablement pas liés au cycle circadien des animaux. Il est important de noter que la manipulation répétée des animaux durant leur phase de repos pourra à terme engendrer des troubles comportementaux (sommeil) et neurochimiques (composition et signalisation des RNMDA hippocampiques) (Longordo *et al.*, 2011).

Le point soulevé par l'étude de Wilke et coll. (2021) concernant la remise en question des études publiées reste très intéressant. En effet, même après avoir réitéré le protocole avec un deuxième groupe d'animaux indépendant, les résultats sont restés identiques au premier groupe excluant des erreurs potentielles d'expérimentations montrant donc que leur protocole est reproductible. Au-delà du protocole et des différentes techniques d'activation du système immunitaire utilisées, l'étude de Wilke et coll. (2021) montre bien l'hétérogénéité de la réponse du système immunitaire entre individus, même au sein d'une même souche d'animaux.

### **Etude des troubles métaboliques dans le modèle murin d'EAI-RNMDA**

Les résultats de notre seconde étude montrent les premières preuves de la présence du RNMDA exprimé par les tanocytes EM responsables de la formation d'une barrière entre le sang et le CSF. Ce récepteur NMDA a été mis en évidence par immunomarquage et qPCR de la sous unité GluN1. Il est probable que les sous-unités GluN2A, GluN2B et GluN3A rentrent aussi dans sa composition

puisque que leur expression a été détecté en qPCR. Notre modèle murin d'EAI-RNMDA présente à la fois une perte de poids et une prise alimentaire plus faible après l'immunisation. Ces changements physiologiques ne sont pas associés à une modification de la composition corporelle mais la température corporelle de l'ensemble des animaux diminue 14 jours après immunisation. De plus, la barrière sang/CSF tanocytaire ne présente pas d'altérations dans le modèle d'EAI-RNMDA, nous n'avons pas non plus identifié visuellement de variation de la densité en neurones NPY ou de l'expression du gène *Grin1* par les neurones NPY/AgRP. Or cette population neuronale est très impliquée dans la régulation énergétique mais ne permettent pas d'expliquer ces changements du comportement alimentaire. Finalement, le stress énergétique imposé par le jeûne déclenche chez les animaux EAI-RNMDA une gestion des réserves énergétiques qui diffère des animaux contrôles, sans pour autant impacter leur PA, la variation de leur masse corporelle ou leur composition corporelle.

### ***Les récepteurs NMDA exprimés par les tanocytes***

Les récepteurs NMDA ont été mis en évidence dans différents types de tissus tels que les reins, le cœur, les poumons, le pancréas, l'estomac, la peau, les ovaires, le système immunitaire et le SNC (Hogan-Cann and Anderson, 2016). Les RNMDA exprimés dans le SNC par des populations cellulaires cérébrales non neuronales n'ont pas été autant étudiés que les récepteurs NMDA neuronaux (Hogan-Cann and Anderson, 2016). Ainsi, l'expression du RNMDA sur les tanocytes n'a pas, à notre connaissance, encore été mis en évidence. Nous avons donc concentré notre travail du récepteur NMDA potentiellement exprimé par les tanocytes.

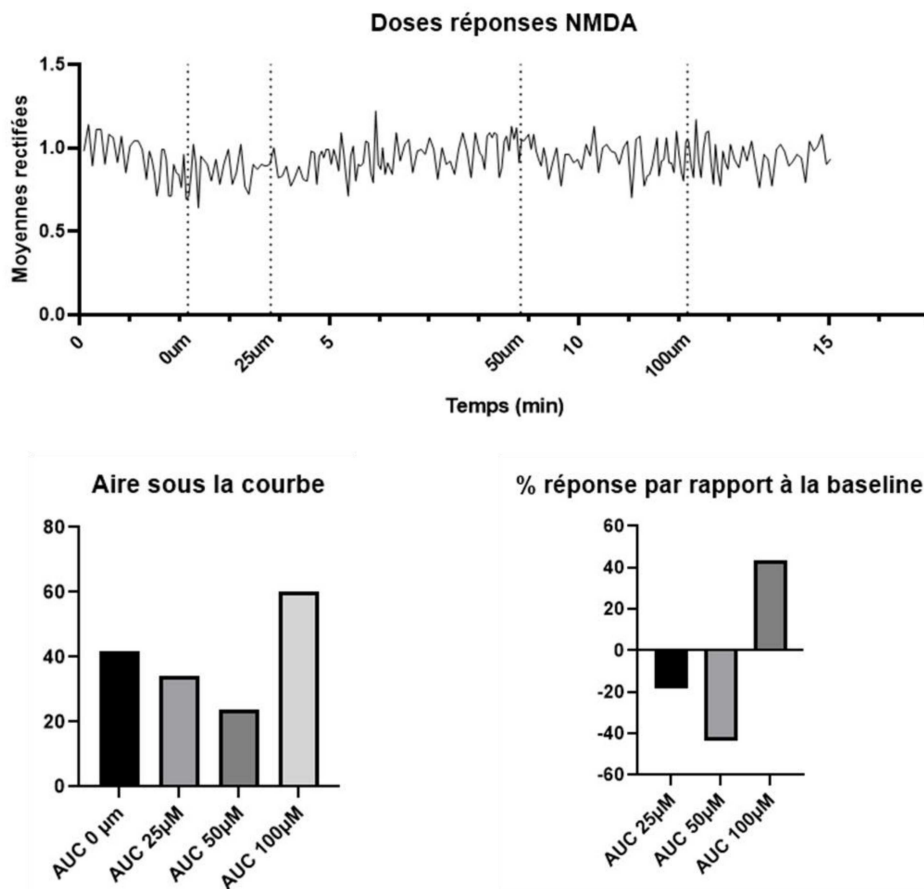
Mes études par immunohistofluorescence ont révélé la difficulté à mettre en évidence la présence des différentes sous-unités pouvant constituer le RNMDA (Résultats fig. 49). Il est

important de noter que seul l'anticorps monoclonal Glunomab parmi l'ensemble des anticorps utilisés (monoclonaux et polyclonaux commerciaux) a permis de marquer la sous-unité GluN1. Comme je l'ai déjà évoqué, cet anticorps cible spécifiquement le site de fixation du tPA sur la sous-unité GluN1 du RNMDA. Dans notre cas, le récepteur NMDA tanycytaire apparaît à proximité des protéines de jonctions serrées ZO-1 et claudine 1 de la barrière sang/CSF (Résultats fig. 50). Mes résultats sont en accord avec les observations de Mehra et coll. (2020) concernant l'expression du RNMDA par les cellules endothéliales à la proximité des protéines de jonctions serrées de la BHE (Mehra *et al.*, 2020). Ces observations suggèrent une implication du RNMDA dans la barrière sang/CSF. De plus, il a déjà été montré qu'une forte activation du RNMDA peut déclencher la dépolymérisation du cytosquelette d'actine qui est associé aux protéines de jonctions serrées transmembranaires par l'intermédiaire de la protéine ZO-1 (Lei *et al.*, 2001). Cette proximité entre le RNMDA et les protéines formant les jonctions serrées pourrait changer la conformation des épitopes cibles de la sous-unité GluN1 et simultanément exposer le site de fixation au tPA. Il a en effet été montré que le tPA influait sur la régulation de la barrière formée par les cellules endothéliales dans des conditions inflammatoires et entraînerait une rupture de la barrière augmentant sa perméabilité (Macrez *et al.*, 2016; Mehra *et al.*, 2020). Nous avons mis en évidence par des études annexes que la fixation des tissus influençait énormément la reconnaissance de GluN1 sur les tanocytes par les anticorps, pareillement à la mise en évidence des protéines de jonctions serrées. Ces observations sont en faveur d'une organisation dimensionnelle particulière entre RNMDA et protéines de jonctions serrées de par leurs similitudes histologiques. Par ailleurs, nos expériences qPCR ont aussi révélé l'expression de la sous-unité GluN2A et GluN2B (Résultats fig.51-52) en concordance avec les résultats de Mehra et coll. Le glutamate se lie spécifiquement à la sous-unité GluN2B, or, il s'avère que l'activation des récepteurs NMDA par la fixation du NMDA (agoniste du glutamate) entraîne la diminution de l'expression de ZO-1 et de sa densité

(Mao *et al.*, 2022). Notre seconde étude transcriptomique fait intervenir une technique d'isolation des tanocytes plus fines (utilisation de l'AVV-Dio2) nous permettant d'obtenir une population tanocytaire plus pure. Cette étude montre que GluN3A est la sous-unité la plus exprimée parmi les populations tanocytaires des animaux, mais elle n'a pas été détectée par immunohistofluorescence. Or, il a aussi été montré l'existence de cette sous-unité par Mehra et Coll. (2020) chez les récepteurs NMDA endothéliaux. D'autres études de transcriptomiques ont aussi mis en évidence l'expression de la sous unité GluN3A par les tanocytes EM ( $\beta$ 2), mais pas des autres sous-unités (Farkas *et al.*, 2020). Ainsi, les récepteurs NMDA tanocytaires pourraient être de 3 configurations différentes, soit dihérotétramériques GluN1-GluN2A/B, GluN1-GluN3A ou trihérotétramériques GluN1-GluN2A/B-GluN3A. Ces conformations du récepteurs NMDA sont très similaires aux récepteurs endothéliaux du SNC caractérisés par Mehra et Coll. Cela renforce notre hypothèse quant à leur implication dans la régulation de la barrière tanocytaire sang/CSF. Il a été montré que ces récepteurs endothéliaux étaient impliqués dans les changements de diamètre des artérioles, en augmentant le flux sanguin par la vasodilatation des vaisseaux (Hogan-Cann *et al.*, 2019). Ils permettent aussi par leur activation une augmentation de la perméabilité transcellulaire (Kim *et al.*, 2022). Ces particularités entre BHE et RNMDA pourraient être applicables aux RNMDA de la barrière sang/CSF établi par les tanocytes EM et vmARH, ainsi que dans les vaisseaux de la BHE du noyau arqué avec lesquels les tanocytes vmARH sont en contact.

Afin de confirmer la présence du récepteur NMDA tanocytaire, il sera nécessaire de procéder à des IHF complémentaires, avec un isotype du GluNomab, ciblant une séquence différente localisée sur la zone externe de la sous-unité GluN1. Ainsi, nous pourrions valider la spécificité de l'anticorps GluNomab pour la sous-unité GluN1 du RNMDA. Par ailleurs, l'hybridation *in situ* (HIS) n'a pas mis en évidence la présence de transcrits des ARNm de *Grin1*

dans les tanocytes (Résultats fig. 53). Cette non-détection peut s'expliquer par un nombre de transcrits très insuffisant. En effet, il est possible que les RNMDA à la surface des tanocytes soient relativement stables et reposent sur un renouvellement minime nécessitant une faible expression de *Grin1* le gène codant pour la sous-unité GluN1. Il pourrait être intéressant d'observer l'HIS sur de nombreuses coupes de tissus afin d'augmenter les chances de détections de ces ARNm, de même tester l'ensemble des sous-unités du RNMDA nous permettrait de comparer avec les résultats obtenus avec les autres techniques d'IF et de qPCR. Il existe une souche de souris pour laquelle la séquence du gène *Grin1* est « floxée » de façon ubiquitaire. Ainsi, il serait possible d'invalider le gène *Grin1* des tanocytes grâce au système Cre-LoxP par l'utilisation de l'AAV-Dio2 (exprimant la *Cre recombinase*) spécifique de ces cellules. La suppression de ce gène empêchera la formation d'un RNMDA à la membrane des tanocytes qui ne sera alors plus détectable par l'anticorps Glunomab. Cette étude permettra de confirmer la spécificité de l'anticorps Glunomab. Après avoir étudié la localisation et la composition du récepteur NMDA, nous voulions savoir s'ils étaient activables par une stimulation au NMDA. Une étude de microscopie calcique préliminaire a été réalisée afin de mettre en évidence un flux de  $Ca^{2+}$  très faible, ou inexistant de par la présence de la sous-unité GluN3A à la surface des tanocytes. Nous n'avons pas observé de réactivité de la part des tanocytes en culture suite à une double activation des cellules par le NMDA et la glycine (fig. 62). Cependant, ces résultats préliminaires ont besoin d'être réitérés afin de confirmer ou infirmer ces premières observations. Ces cultures cellulaires pourraient aussi être utilisées, à la fois en ICF et en HIS dans la mise en évidence du RNMDA tanocytaire et de sa composition en sous-unités.



**Figure 62 : Excitabilité des tanycytes en culture chargés en Fura-2 à la suite d'une stimulation par différentes concentrations de NMDA (0, 25, 50 et 100 µM) observée par microscopie calcique.**

Les études cliniques de la pathologie EAI-RNMDA mettent en évidence la présence de troubles du métabolisme et de la PA chez les patients EAI-RNMDA. D'après ces observations nous avons recherché dans notre modèle s'il existait des perturbations similaires qui n'ont pas été étudiées jusqu'à maintenant dans les modèles murins d'EAI-RNMDA.

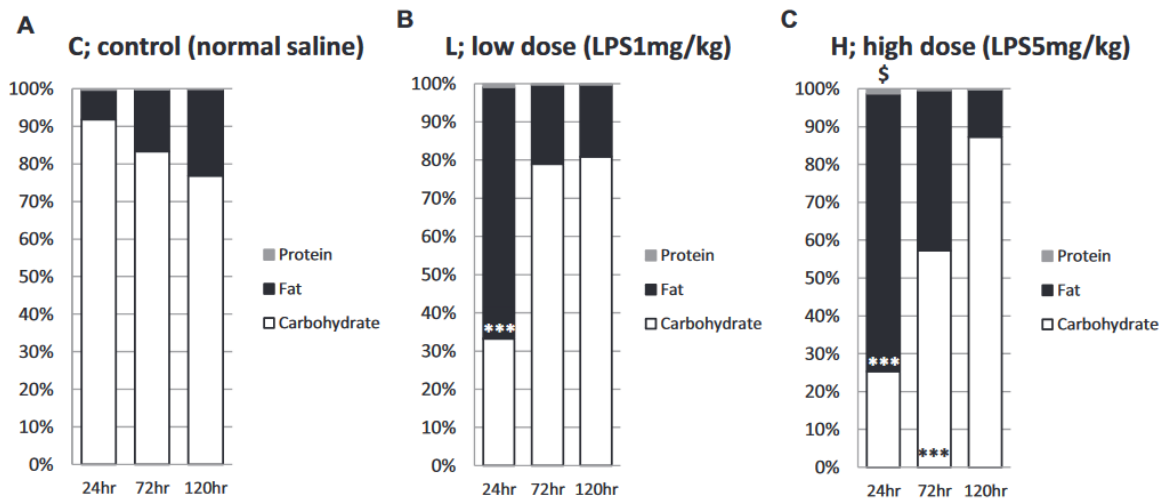
***Etude du métabolisme, de la composition et de la température corporelle dans le modèle d'EAI-RNMDA en condition contrôle et durant une restriction alimentaire***

Nos premières observations sont liées au poids des animaux EA qui va diminuer de façon significative 24 h après l'immunisation comparé aux Sham (Résultats fig. 54). Les deux groupes reçoivent exactement la même émulsion composée de CFA, à l'exception du peptide qui est remplacé par une solution saline pour les animaux Sham. Au vu de la rapidité de ces changements, il est probable que la réponse innée soit de plus forte intensité chez les EA, de par la présence du peptide, entraînant cette perte de poids. En effet, les symptômes observés durant les premières 24 h après immunisation sont semblables à ceux observés dans des modèles de sepsis obtenus par injection intrapéritonéale de LPS, mettant en évidence la réponse immunitaire innée (Irahara *et al.*, 2018). De plus, les animaux en sepsis suite à une injection de LPS présentent une diminution de la PA, de leur poids corporel et de l'activité motrice ainsi qu'une baisse de la température corporelle (Irahara *et al.*, 2018). Une dérégulation de cette dernière est également observée chez les patients EAI-RNMDA. En effet, il est rapporté à la fois une augmentation anormale et prolongée de la température corporelle, mais aussi des épisodes d'hypothermie (Dalmau *et al.*, 2007; Heng *et al.*, 2021; Liang and Chen, 2022). Cependant, il n'a pas été observé de variation de la température corporelle chez les animaux EA comparativement aux animaux Sham (Résultats fig. 56).

La perte de poids des animaux EA observé dans les 24h après l'immunisation n'entraîne à priori pas de variations de la composition corporelle des EA comparativement aux conditions contrôles à J0 (Résultats fig. 54). Cependant, les Sham sont sujets à une augmentation transitoire de leur masse grasse une semaine post-immunisation, pourtant, nous n'observons pas d'augmentation de leur PA aux mêmes temps. Dans les modèles de sepsis, les auteurs montrent une utilisation plus importante du tissu adipeux en réponse à l'inflammation par les animaux ayant reçu le LPS (fig. 63) (Irahara *et al.*, 2018). Nous pouvons supposer que l'immunisation chez les EA augmente de façon équivalente l'utilisation du tissu adipeux contrairement aux animaux Sham



malgré une PA similaire. De plus, les deux groupes sont sujets à une baisse de la PA équivalente le jour de l'immunisation durant les 24 h qui suivent, ce qui n'explique pas la perte de poids des EA (Résultats fig. 55).



**Figure 63 : Altérations dans l'utilisation relative des glucides, des lipides et des protéines chez les souris sepsis induit par le LPS. D'après Irahara *et al.*, 2018.**

Après l'immunisation, le poids corporel des deux groupes continue à augmenter. En effet, malgré que les animaux aient atteint l'âge adulte, il est important de rappeler qu'ils sont toujours en croissance jusqu'à l'âge de 6 mois. Il est alors envisageable que l'immunisation chez les animaux EA retarde la prise de poids au profit de la réponse immunitaire. Toutefois, il n'a pas été montré de modifications de la croissance chez les enfants ou les adolescents atteints d'EAI-RNMDA (de Bruijn *et al.*, 2018).

Nous savons que la PA des animaux diminue suite à l'immunisation, et réaugmente dès 48 h après. Deux semaines après immunisation, seule la PA des animaux Sham augmente (Résultats fig. 55). Cette observation se révèle très étrange puisque c'est à cette période que les

symptômes du modèle EA sont observés (trouble de la mémoire, anxiété, comportement dépressif) (Wagnon *et al.*, 2020). Les injections d'adjuvant chez les animaux tels que le CFA ont montré qu'il était possible de promouvoir une ouverture de la BHE entraînant une extravasation des molécules du sérum (IgG, albumine, IgM) à la fois dans la moelle épinière et le tronc cérébral 2 semaines après les injections (Rabchevsky *et al.*, 1999). Cette extravasation n'entraîne pas de réactions inflammatoires dans le SNC ou d'infiltrations de cellules immunitaires (Rabchevsky *et al.*, 1999). Nous savons que l'hypothalamus est le siège de la régulation centrale de la PA, une altération de son fonctionnement (BHE, activité neuronale) peut entraîner des dysfonctionnements de ces régulations. Chez les animaux Sham, nous pouvons supposer que même sans déclencher une réaction inflammatoire, une perturbation de la BHE de l'ARH pourrait entraîner cette augmentation soudaine de la PA. Parallèlement, cet effet n'est pas observé chez les animaux EA. Ceci pourrait s'expliquer par la présence d'autoanticorps dans le SNC qui pourraient prévenir cette augmentation de la PA. Afin de déterminer les effets du CFA dans le métabolisme de notre modèle, il semble indiqué de procéder à un protocole d'immunisation en remplaçant le CFA par l'IFA (Adjuvant Incomplet de Freud) et par la même occasion de retirer le *mycobacterium tuberculosis* de l'émulsion.

L'infiltration des cellules immunitaires présentes dans le SNC des animaux EA (neutrophiles et macrophages) pourrait aussi être responsable de leur comportement alimentaire. Il a effectivement été montré des effets de l'inflammation dans le SNC *via* la production d'IL-1 $\beta$  par les cellules immunitaires innées, tel que les macrophages activées (Böttcher *et al.*, 2020). IL-1 $\beta$  va augmenter l'activité du facteur de transcription inflammatoire NF $\kappa$ B dans les tanocytes induisant l'expression de cyclooxygénase-2 ou Cox2 activant la voie métabolique de l'acide arachidonique (Nørregaard *et al.*, 2015). Cox-2 à son tour stimule la sécrétion de la prostaglandine anorexigène

E<sub>2</sub> ou PGE<sub>2</sub> par les tanocytes qui induit un comportement anorexique (Böttcher *et al.*, 2020). Dans notre cas, il serait intéressant de quantifier l'expression de Cox-2 dans les populations tanocytaires des animaux EA, mais aussi de doser l'IL-1 $\beta$  dans l'hypothalamus médiobasal. Une augmentation de l'expression d'IL-1 $\beta$  par rapport aux animaux sham pourrait expliquer l'absence d'augmentation de la PA à deux semaines post-immunisation dû à l'environnement inflammatoire qui perturbe l'activité des neurones AgRP/NPY et POMC (Lizarbe *et al.*, 2019).

Après une période prolongée sans s'alimenter (environ 16h) le corps rentre dans une phase de jeûne et le métabolisme de l'individu modifie l'utilisation de ses ressources énergétiques. Durant l'expérience de jeûne/réalimentation, les animaux EA présentent une adaptation plus marquée par rapport aux animaux contrôles sham face aux restrictions alimentaires. Toutefois, l'ensemble des animaux montre des capacités adaptatives fonctionnelles en réponse au stress énergétique apporté par le jeûne. En effet, lors des périodes interprandiales et de jeûne, les animaux doivent s'adapter afin de répondre à leurs besoins énergétiques. En premier lieu grâce à la glycolyse dans le foie entraînant la libération de pyruvate dans le sang, puis à la lipolyse dans le tissu adipeux mettant à disposition les acides gras et le glycérol qui vont permettre de maintenir les besoins énergétiques (Geisler *et al.*, 2016). Pour optimiser au maximum leurs réserves énergétiques corporelles, il est plausible que les animaux entrent dans un état de torpeur. La torpeur est un état similaire à l'hibernation auquel certains mammifères font appel durant des périodes de froids prolongées. Seulement, la torpeur n'est pas uniquement déclenchée lors d'une baisse de la température ambiante, elle est aussi adoptée lors de restriction énergétique, globalement son but est de ralentir le métabolisme, notamment en abaissant la température corporelle (Sunagawa and Takahashi, 2016). Par conséquent, lors de l'état de torpeur la noradrénaline et l'adrénaline, sécrétées par les glandes surrénales entraîne l'activation des adipocytes blanc *via* les récepteurs adrénergiques  $\beta$ 3.

Cela conduit à la suppression de la sécrétion de leptine et à une élévation de la lipolyse. Ceci déclenche alors la libération d'acides gras libres dans le sang (Swoap and Weinschenker, 2008). De plus, l'état de torpeur est régulé par une interaction complexe entre les hormones périphériques impliquées dans la régulation du métabolisme énergétique (la ghréline, la leptine, l'insuline) et les neurones hypothalamiques (Hitrec *et al.*, 2019; Jensen *et al.*, 2013). Pour les animaux EA, leur RER (*Respiratory Exchange Ratio* ou quotient respiratoire) est plus faible que les Sham témoignant d'une métabolisation du tissu adipeux plus importante liée à l'état de jeûne (Résultats fig. 57). Nous pouvons supposer que ce métabolisme est lié à une ou des altérations du mécanisme de torpeur exacerbant le mécanisme de lipolyse. Aussi, la torpeur est caractérisée par un arrêt de la thermogénèse (Heldmaier *et al.*, 2004), les variations de température corporelle lors du jeûne chez les animaux EA et Sham nous sont inconnues. Il serait donc nécessaire de procéder à ces mesures afin d'identifier s'il existe entre les animaux EA et sham une différence de la variation de leur température corporelle lors de la phase de jeûne, et de confirmer si ces animaux entrent ou non dans un état de torpeur.

Tout comme le glycogène est la source primaire d'énergie lors du jeûne, c'est aussi la source énergétique qui sera reconstituée la première par la glycogénèse (Geisler *et al.*, 2016). La lipogénèse observée chez les animaux EA et Sham durant la phase de réalimentation est un phénomène adaptatif physiologique ("Changes in lipogenesis during refeeding of fasted mice," 1969). Cette étude observe un retour à la normale du quotient respiratoire 7 jours après le jeûne. Il serait donc intéressant de prolonger l'enregistrement et d'observer le comportement des animaux EA quant à la durée de leur lipogénèse. Au cours des mesures que nous avons réalisées, la lipogénèse des animaux EA s'avère plus importante en particulier durant la phase claire 24 h après la fin du jeûne où le RER ne diminue pas contrairement aux animaux Sham. En temps normal, la

valeur du RER diminue lors de la phase de repos des animaux. Ici, il reste relativement élevé au sein des deux groupes qui doivent reconstituer leurs réserves énergétiques, à la fois dans le foie sous forme de glycogène et de triglycérides et dans le tissu adipeux sous forme de triglycérides (Geisler *et al.*, 2016). Ainsi, il est probable que les animaux EA maintiennent une lipogenèse plus importante durant la phase de réalimentation afin de compenser une lipolyse plus importante durant la phase de jeûne.

Les variations de la dépense énergétique sont légèrement plus faibles chez les animaux EA, ce qui peut être expliqué par la PA plus faible chez ces animaux avant l'expérience de jeûne. En effet, dans des conditions homéostatiques la PA correspond typiquement à la dépense énergétique (Ono-Moore *et al.*, 2020). Nous pouvons-nous attendre à ce que la dépense énergétique des animaux EA soit supérieure à celle des Sham durant la phase de jeûne dû à une lipolyse plus importante. Cependant, cette dépense reste inférieure et dans des ordres de grandeurs similaires tout au long de l'expérience. Il est possible que la dépense énergétique soit plus faible chez les animaux EA grâce à l'état de torpeur permettant de diminuer significativement la température corporelle grâce à l'arrêt de la thermogenèse (Tran *et al.*, 2022).

De manière surprenante, les deux groupes d'animaux perdent autant de poids lors de la phase du jeûne, malgré le fait que les animaux EA présentent une lipolyse plus importante (Résultats fig. 58). Cependant, on remarque que lors de la phase de réalimentation 5 jours après la fin du jeûne, la prise de poids des animaux EA est plus importante que celle des Sham. Ceci pourrait s'expliquer par une lipogenèse plus élevée des animaux EA observée 24 h après la phase de réalimentation qui accroît la quantité de tissus adipeux. D'après les relevés de composition corporelle effectués, nous ne pouvons confirmer ou infirmer cette hypothèse puisque ces relevés ont été effectués au début et à la fin de l'étude, 10 jours plus tard.

Bien que ces résultats mettent en évidence un comportement adaptatif distinctif chez les animaux EA, il est nécessaire de rappeler que l'environnement de l'ensemble des animaux est maintenu à une température de 21 °C. Or, ces températures sont relativement faibles pour les souris. Elles utiliseront environ un tiers de leur nourriture consommée afin de maintenir une température corporelle physiologique (Neff, 2020). Il est possible de s'affranchir de ces contraintes en augmentant la température ambiante à environ 28 °C qui correspond à une température de thermoneutralité pour les souris (Keijer *et al.*, 2019). Dans ces conditions, il n'y a plus de thermogénèse permettant de maintenir une température corporelle physiologique chez les animaux et en font de meilleurs modèles pour étudier les troubles liés au métabolisme chez l'homme. Ainsi, en plus d'un suivi de la température corporelle des animaux, nous pourrions réitérer l'étude jeûne/réalimentation dans des conditions de thermoneutralité nous permettant ainsi d'observer le phénotype des animaux uniquement induit par l'immunisation. De même, pour l'étude du métabolisme en condition contrôle, une étude de l'adaptabilité du tissu adipeux brun et blanc face au jeûne serait nécessaire afin de déterminer s'il existe des altérations du mécanisme chez les animaux EA et/ou sham (Tang *et al.*, 2017).

Afin d'identifier l'origine des perturbations observées, nous avons procédé à une étude transcriptomique des marqueurs du jeûne et des neuropeptides impliqués dans le métabolisme alimentaire. La quantification des neuropeptides de l'hypothalamus médiobasale n'a révélé aucunes variations ou différences entre Sham et EA, en condition contrôle ou de jeûne. Comme évoqué auparavant, il est tout à fait possible que l'utilisation du CFA et de la toxine pertussique chez les animaux sham perturbent suffisamment les fonctions de barrières des tanocytes et des capillaires pour altérer les fonctions des tanocytes et par extension des régions hypothalamiques impliquées dans la régulation du métabolisme énergétique. En parallèle du dosage des ARNm de

neuropeptides, nous nous sommes intéressés à l'expression des marqueurs du jeûne par les tanocytes, tel que VEGFa et HIF1A (Résultats fig. 59). Cependant, les résultats obtenus sont très variables au sein des différents groupes et ne permettent pas de distinguer des profils d'expression entre les groupes. Il est nécessaire de réitérer cette étude en augmentant le nombre d'individus. De plus, il serait judicieux de procéder au prélèvement des échantillons pendant la phase sombre puisque les animaux sont actifs et se nourrissent principalement durant cette période (Van Drunen and Eckel-Mahan, 2021). Une étude histologique nous permettrait de déterminer l'activité du système neuronale NPY et POMC des animaux EA et Sham en condition basale et après un jeûne. De fait, l'activation de neurones NPY et POMC peut être identifiée avec une HIS de *cFos* couplé à l'identification de ces neurones toujours avec une HIS. Ainsi nous pourrions déterminer lequel ou lesquels de ces populations neuronales sont plus ou moins activé ou inhibé en fonction de l'immunisation et du statut énergétique.

***Etude de l'intégrité de la barrière tanocytaire, de la densité des neurones à NPY et de leur expression du gène *Grin1* chez les animaux EAI-RNMDA et sham***

Nous avons comme objectif de déterminer les conséquences de la présence des autoanticorps dans le SNC des animaux EA sur l'intégrité de la barrière tanocytaire et sur les neurones NPY.

Nous n'avons pas observé de différences dans la structure et l'organisation des complexes de jonctions serrées de la barrière tanocytaire entre EA et sham en condition basale (Résultats fig. 60). Indiquant, soit qu'il n'y a pas d'interactions entre les autoanticorps et les RNMDA tanocytaires, soit que cette interaction n'entraîne pas la perte des récepteurs, soit que les récepteurs ne sont pas impliqués dans le maintien de la barrière ou encore qu'un mécanisme de compensation

se met en place en condition contrôle lorsque les animaux ont accès à la nourriture. Nous savons que la région médiobasale de l'hypothalamus, notamment le noyau arqué et l'éminence médiane, font preuve de plasticité pour répondre aux besoins métaboliques impliqués lors du jeûne (Langlet *et al.*, 2013a). Ainsi, il serait nécessaire de réitérer cette analyse et de comparer les conditions de jeûne à une condition contrôle chez les EA et les Sham. De plus, une étude quantitative de la distribution des vaisseaux fenêtrés de l'EM et de l'ARH serait nécessaire pour compléter l'étude d'adaptabilité des animaux EAI-RNMDA face au jeûne. L'observation en HIS des ARNm de *NPY* permettant d'identifier la population neuronale *NPY/AgRP*, n'a pas montré de différences dans la densité de neurones positif au *NPY* que ce soit chez les EA ou les sham (Résultats fig. 61). Il serait nécessaire d'augmenter le nombre de coupes pour cette étude afin de valider ces observations. De plus, nous pourrions quantifier le signal obtenu par cellule positive au *NPY* afin d'identifier pour pouvoir valider ces observations. Nous pourrions aussi compléter la quantification de l'expression de *Grin1* avec la quantification de *GluN1* par IHC. En effet, il n'est pas certain qu'une perte des récepteurs NMDA entrainera forcément une régulation à la hausse des ARNm de *Grin1*. Cette expérience devrait être employée dans des conditions de jeûne chez les animaux EA et sham afin d'étudier les effets de ce stress énergétique sur la régulation de l'expression de *GluN1* et du *NPY* dans les neurones orexigènes *AgRP/NPY*.

A la fin du protocole, différents tissus ont été récupérés dans le but de les peser et d'entreprendre des analyses plus approfondies. Néanmoins, nous n'avons pas observé de différences de poids entre tissus adipeux brun, tissus adipeux blanc et masse maigre. Les animaux étant à 4 semaines post-immunisation, il serait intéressant de procéder à des mises à mort au cours de différents temps, par exemple chaque semaine, afin d'étudier finement par des dosages la graisse



brune, la graisse blanche et le plasma, en termes d'activation et d'expression hormonale (Henry and Clarke, 2008).

Pour conclure, notre modèle se rapproche davantage de la pathologie chez l'homme et le rend plus crédible dans la réalisation de futures études impliquant son utilisation. Compte tenu de nos données sur le RNMDA des tanocytes de l'EM et des troubles métaboliques du modèle mutin d'EAI-RNMDA, il est à présent nécessaire de compléter ces résultats afin d'identifier plus finement un phénotype métabolique chez les animaux EA et d'identifier quels sont les mécanismes sous-jacents responsables de celui-ci. Par ailleurs, la compréhension des liens entre RNMDA, tanocytes EM et pathologie EAI-RNMDA sera bénéfique dans nos connaissances sur le fonctionnement de cette sous-population tanocytaire et de leur barrière, mais aussi sur leur implication dans le contrôle de la PA et du métabolisme énergétique. De futures études permettront de mieux identifier les mécanismes auto-immun responsables des TCA chez les patients EAI-RNMDA amenant à une meilleure prise en charge thérapeutique de ces symptômes chez les patients. Par ailleurs, la présence de troubles métaboliques dans les modèles murins d'EAI-RNMDA par immunisation active n'a encore jamais été mise en évidence. Il en est de même pour les récepteurs NMDA des tanocytes de l'EM mis en évidence par l'anticorps Glunomab, la particularité étant que cet anticorps se lie au site de fixation du tPA. Il serait intéressant d'étudier les conséquences fonctionnelles de l'interaction du tPA au RNMDA tanocytaire.

## **Chapitre 2**

# **Etude de l'activateur tissulaire du plasminogène dans le système hypothalamo-hypophysaire**



# Introduction



Les travaux réalisés dans le chapitre 1, m'ont permis de me familiariser avec la neuroendocrinologie, les principaux constituants hypothalamiques (les neurones et les différentes cellules gliales) et le contrôle du comportement alimentaire.

A l'instar des anticorps anti-RNMDA, l'activateur tissulaire du plasminogène est susceptible d'affecter ce récepteur et donc la signalisation glutamatergique tanycytaire et/ou neuronale. Par ailleurs, comme nous le découvrirons dans la suite de ce manuscrit, des données de la littérature rapportaient que le tPA pouvait être exprimé par les épendymocytes mais sa présence dans les tanocytes n'avait, à notre connaissance, jamais été recherché. Enfin, des observations préliminaires obtenues au laboratoire, suggéraient que le tPA était susceptible d'avoir un rôle majeur dans le contrôle du comportement alimentaire compte tenu de son expression importante au sein de du noyau arqué. L'ensemble des données présentées ci-dessous et notre intégration dans l'équipe de recherche du Pr. Vivien m'ont amené à étudier la molécule phare de notre laboratoire (le tPA) dans les systèmes hypothalamo-hypophysaires.

Dans cette introduction, je présenterai les principales données bibliographiques concernant cette serine protéase. Comme nous le verrons, les données de la littérature et mes premières observations histologiques concernant le tPA et les systèmes hypothalamo-hypophysaires m'ont amené à me focaliser spécifiquement sur le tPA et ses implications concernant le contrôle de l'équilibre hydrominéral.

## **I L'activateur tissulaire du plasminogène**

L'activateur tissulaire du plasminogène est une protéase circulante produite par les cellules endothéliales des vaisseaux sanguins. Son action protéolytique lui confère des propriétés de fibrinolytiques en convertissant le plasminogène inactif en plasmine active. Cette dernière est capable de dégrader les caillots de fibrine. Ces propriétés fondamentales en font le seul traitement pharmacologique dans la phase aiguë de l'accident vasculaire cérébral (AVC) ischémique. Le tPA est également exprimé dans le système nerveux central (SNC) où il régule de nombreuses fonctions physiologiques. Les travaux réalisés dans le chapitre 1, m'ont permis de me familiariser avec la neuroendocrinologie et les constituants hypothalamiques que sont les neurones et les différentes cellules gliales.

### **1 Historique**

Les défauts de coagulation du sang ont été observés très tôt dans l'histoire de l'homme, dès la Grèce antique (V<sup>ème</sup> siècle avant J.C.) par Hippocrate. Bien des siècles plus tard, en 1761 (Morgagni, 1761) Giovanni Battista Morgagni met en évidence à nouveau que le sang de certains patients morts subitement ne coagulait pas. Sans le savoir, il était en présence de patients morts d'apoplexie (ancien terme désignant l'AVC). Ces observations seront exploitées environ 200 ans plus tard dans les travaux de Gabriel Andral où il avance les premières preuves du système fibrinolytique en montrant que le sang coagulé pouvait à nouveau se liquéfier (Andral, 1843). En 1889, Denis et De Marbaix mettent en évidence l'existence d'une enzyme fibrinolytique (Denis, De Marbaix, 1889). Cette activité protéolytique sera alors qualifiée de fibrinolyse par Albert Dastre en 1903. Par la suite, le plasminogène est mis en évidence dans une fraction de sérum par Hédin en 1903 (Hedin, 1903) qui montre la présence d'une activité protéolytique responsable de la

dégradation de la fibrine présente dans les caillots sanguins. Ce n'est qu'en 1947 que le tPA, alors appelé fibrinokinase, fut clairement identifié à l'instar de son interaction avec le plasminogène (Astrup and Permin, 1947). Toutefois il ne sera purifié et caractérisé qu'en 1978 dans la circulation sanguine (Binder *et al.*, 1978).

Pour la toute première fois, le tPA va être utilisé chez l'homme en 1981 par Weimar afin de traiter des patients atteints de thrombose de la veine rénale suite à une transplantation (Weimar *et al.*, 1981). Dans le but d'exploiter les capacités fibrinolytiques du tPA et de développer son utilisation en tant que traitement thrombolytique, l'équipe de Désiré Cohen va cloner le gène du tPA dans le but de le faire exprimer par les bactéries *E. Coli* sous forme de protéines recombinantes (Pennica *et al.*, 1983). Son utilisation thérapeutique a permis de réaliser les premières études cliniques sur des patients souffrant d'infarctus du myocarde en permettant une recanalisation complète des artères coronaires (Van de Werf *et al.*, 1986). À la suite de cette utilisation, le tPA a été proposé comme agent thrombolytique de l'AVC ischémique (National Institute of Neurological Disorders and Stroke rt-PA Stroke Study Group, 1995). A ce jour, il reste le seul traitement pharmacologique autorisé lors de la phase aigüe d'un AVC ischémique.

## 2 Principales données biologiques

Le tPA est une glycoprotéine de 70 kDa appartenant à la famille des sérines protéases. Il est codé par le gène *PLAT* (PLasminogen Activator Tissue-type) situé sur le chromosome 8 de l'homme (Pennica *et al.*, 1983). Ce gène se compose de 14 exons à l'origine des différents motifs structuraux de la protéine (Browne *et al.*, 1985) et est traduit en une protéine précurseur de 526 acides aminés (Pennica *et al.*, 1983).

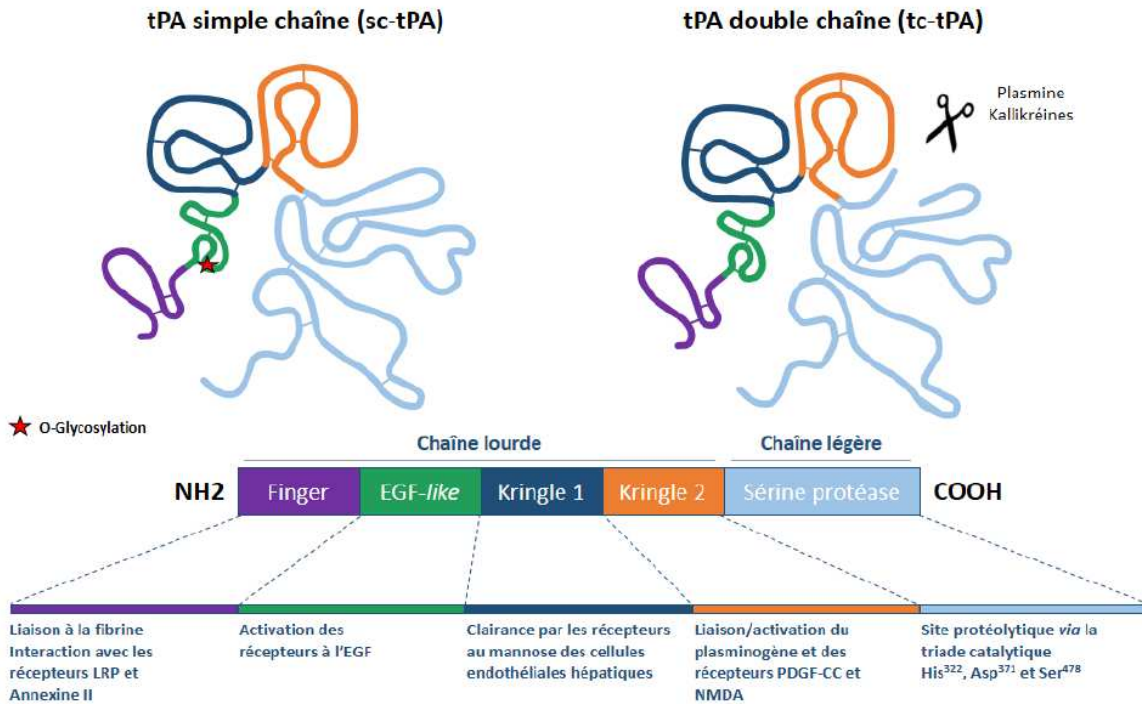


Le tPA est constitué de 5 domaines répartis sur une chaîne lourde et une chaîne légère maintenues ensemble par 17 ponts disulfures formant la structure tridimensionnelle de la protéase (Pennica *et al.*, 1983). La chaîne lourde se compose, des domaines Finger, EGF-like, Kringle 1 et Kringle 2, tandis que la chaîne légère est composée du domaine sérine protéase. La diversité de ses domaines permet au tPA des interactions avec d'autres protéines. Ces interactions sont à l'origine des différentes et principales fonctions présentées ci-dessous et résumées sur la figure 64.

- **Le domaine Finger** permet au tPA de se lier à la fibrine. Cette liaison est nécessaire à la formation d'un complexe ternaire avec le plasminogène (Kagitani *et al.*, 1985). Il permet également la liaison au récepteur aux lipoprotéines de faible densité (*Low Density Lipoprotein Receptor-related Protein* ou LRP) responsable de l'endocytose du tPA par les cellules hépatiques (Vivien *et al.*, 2011) et à l'annexine II (Bu *et al.*, 1992; Hajjar *et al.*, 1994). De plus, l'inhibition du tPA par le PAI-1 (Plasminogen Inhibitor 1) s'effectue, en partie, par la fixation de PAI-1 au domaine finger (Kaneko *et al.*, 1992).
- **Le domaine EGF** possède une forte homologie avec le facteur de croissance EGF (*Epidermal Growth Factor*) habilitant ainsi le tPA à activer les récepteurs au facteur de croissance épidermique (*EGF Receptor*). La O-glycosylation de ce domaine EGF permet la recapture et la clairance du tPA au niveau hépatique (Hajjar and Reynolds, 1994; Hurtado *et al.*, 2007).
- **Le domaine Kringle 1** a été peu étudié. Néanmoins des travaux suggèrent l'importance de sa glycosylation dans la recapture hépatique du tPA par l'intermédiaire des récepteurs au mannose des cellules endothéliales hépatiques (Kuiper *et al.*, 1988). Il serait aussi impliqué dans l'inhibition de la prolifération des cellules endothéliales indépendamment du facteur de croissance (Kim *et al.*, 2003).

- **Le domaine Kringle 2** dispose d'un domaine de liaison à la lysine (*Lysine Binding Domain*, LBS) fonctionnel permettant de stabiliser l'interaction entre le domaine finger et la fibrine (van Zonneveld *et al.*, 1986). Il se lie avec le facteur de croissance dérivé des plaquettes (PDGF-CC ou Platelet-Derived Growth Factor CC), le récepteur NMDA ou encore le plasminogène (Fredriksson *et al.*, 2004; Lopez-Atalaya *et al.*, 2008).
- **Le domaine sérine protéase** est responsable des fonctions fibrinolytiques du tPA. Ces dernières lui permettent de convertir le plasminogène en plasmine grâce à la triade catalytique : histidine 322, acide aspartique 371 et sérine 478 (Pennica *et al.*, 1983).

Physiologiquement, le tPA est retrouvé sous deux formes : la forme simple chaîne (sc-tPA) et la forme double chaîne (tc-tPA). Le clivage du tPA est effectué par d'autres protéases comme la plasmine ou les kallikréines. Le clivage du tPA n'impute pas à sa fonction protéolytique principale qu'il soit sous forme simple ou double chaînes cependant il présente certaines propriétés qui sont au centre d'investigations menées au laboratoire (Anfray *et al.*, 2021).



**Figure 64 : Structure et fonctions du tPA.**

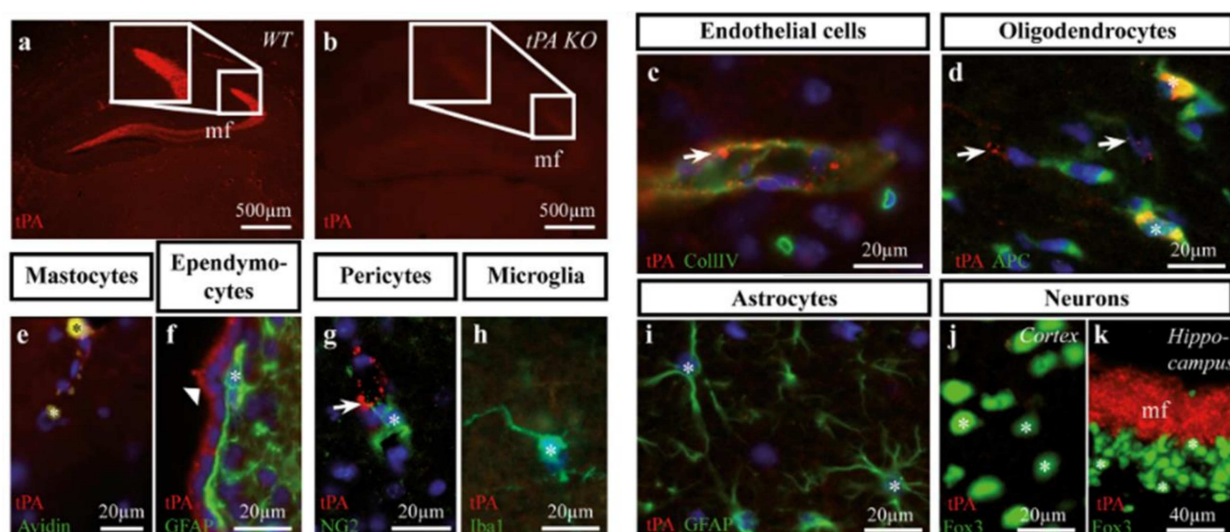
Représentation schématique de la structure primaire du tPA simple chaîne (sc-tPA) et du tPA double chaîne (tc-tPA) où chaque domaine fonctionnel est représenté (Finger, EGF-like, Kringle 1, Kringle 2, Sérine protéase). Le site d'O-Glycosylation est indiqué par une étoile rouge, on peut aussi observer le site de clivage du sc-tPA en tc-tPA (ciseaux noirs). De plus, les 17 ponts disulfures responsables de l'organisation tertiaire de la protéase sont mis en évidence. (Douceau, 2020).

### 3 Expression du tPA

#### 3.1 Dans le système nerveux central

L'identification du tPA a permis simultanément de mettre en évidence dès 1981 la présence de la protéase dans le cerveau des souris par Soreq et Miskin. Leurs premières observations montrent que le tPA est à la fois détecté dans le système vasculaire, mais aussi dans des régions cérébrales denses en neurones (Soreq and Miskin, 1981). L'expression du tPA ne se limite pas aux neurones du SNC (Salles and Strickland, 2002). En effet, elle a été rapportée dans différents types

cellulaires dont les oligodendrocytes (Correa *et al.*, 2011), les astrocytes (Buisson *et al.*, 1998; Docagne *et al.*, 1999), les cellules microgliales (Siao *et al.*, 2003), les épendymocytes (Louessard *et al.*, 2016a) et les péricytes (Ishiura *et al.*, 2008) (fig. 65). Les régions cérébrales qui témoignent d'une haute expression en tPA sont caractérisées par de nombreux remodelages synaptiques en lien avec les mécanismes d'apprentissage et de mémorisation.

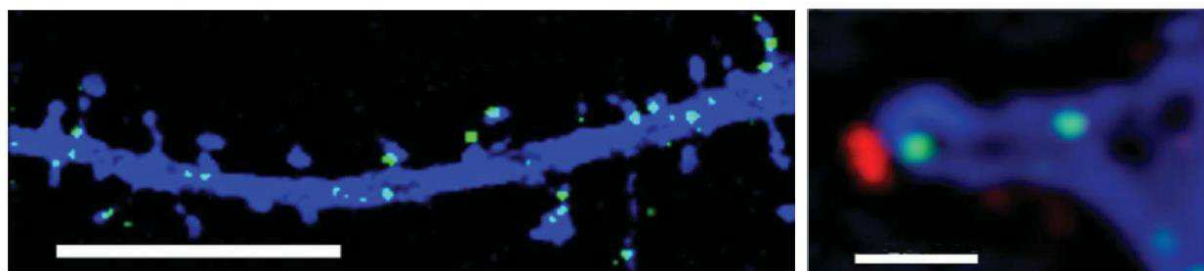


**Figure 65 : Expression du tPA au sein de différents types cellulaires du SNC de la souris adulte.**

Immunomarquage anti-tPA (rouge) et de différents types cellulaires révélés en vert. A l'aide de marqueurs spécifiques. (a, b) On observe un immunomarquage positif chez les animaux WT (a) dans les fibres moussues de l'hippocampe contrairement aux tPA KO (b) qui n'expriment pas le tPA. Identification du tPA dans les cellules endothéliales (c), les oligodendrocytes (d), les mastocytes (e), les épendymocytes (f) et les neurones hippocampiques (k). Il n'a cependant pas été identifié dans les péricytes (g), la microglie (h), les astrocytes (i) et les neurones du cortex (j). D'après Louessard *et al.*, 2016.

**Les neurones :** le tPA est synthétisé et stocké dans les vésicules présynaptiques en condition physiologique (Parmer *et al.*, 1997; Shin *et al.*, 2004). Il a aussi été montré que le tPA était encapsulé dans des vésicules à cœur dense (*Dense Core Vesicle*, DCV) dont le rôle est de transporter les hormones peptidiques et les neuropeptides vers la membrane cellulaire pour être libéré (Kim *et al.*, 2006a). *In vitro*, ces DCV chargées en tPA sont localisées au sein des épines

dendritiques de neurones hippocampiques en culture (fig. 66) (Lochner *et al.*, 2006). La libération du tPA est sous le contrôle de la dépolarisation neuronale entraînant l'exocytose des vésicules (Lochner *et al.*, 2006). Son accumulation a été révélée spécifiquement dans le corps cellulaire des neurones glutamatergiques du cortex et des neurones granulaires du gyrus denté hippocampique après traitement à la colchicine qui bloque la libération du tPA par les vésicules (Louessard *et al.*, 2016a). De plus, quelques études rapportent l'expression du tPA dans des neurones gabaergiques, dont des interneurones exprimant la somatostatine (Stevenson and Lawrence, 2018a), la parvalbumine (Chu *et al.*, 2015), et le peptide vasoactif intestinal (Fredriksson *et al.*, 2015).



**Figure 66 : Présence du tPA dans des vésicules à cœur denses (DCV) au sein des épines dendritiques.**

À gauche : distribution des DCV contenant du tPA fluorescent dans les épines dendritiques associées dans un neurone hippocampique à 14 jours de développement *in vitro* et après 24 h d'expression d'ECFP (bleu) et de tPA-EYFP (jaune), barre d'échelle = 20 $\mu$ m. À droite : Image d'une synapse dérivée d'un neurone hippocampique à 17 jours de développement *in vitro* exprimant le tPA-EYFP (jaune) et l'ECFP (bleu), immunocytochimie de la synapsine I (rouge), barre d'échelle = 1 $\mu$ m. D'après Lochner *et al.*, 2006.

**Les astrocytes** : au-delà des fonctions de sécrétion du tPA et de son inhibiteur PAI-1 (Kimura *et al.*, 2000), les astrocytes ont un rôle majeur dans la recapture du tPA libéré dans la fente synaptique (Cassé *et al.*, 2012). L'internalisation du tPA s'effectue par l'interaction de son domaine finger avec les récepteurs LRP présents à la surface des astrocytes. Le tPA est ensuite internalisé et dégradé par les lysosomes dans les astrocytes (Cassé *et al.*, 2012).

**Les oligodendrocytes** : son expression est retrouvée dans des oligodendrocytes du corps calleux chez l'adulte (Correa *et al.*, 2011; Louessard *et al.*, 2016a). L'expression oligodendrocytaire du tPA diminue lors du vieillissement (Correa *et al.*, 2011.. Le tPA est également impliqué dans la migration des précurseurs d'oligodendrocytes de la moelle épinière au cours de développement et après lésion de la substance blanche dans le cerveau adulte (Leonetti *et al.*, 2017). Enfin, des travaux récents menés au laboratoire, montrent une spectaculaire expression transitoire du tPA lors de la phase active de myélinisation. Cette dernière s'opère à P15 dans la moelle épinière de souris (communication personnelle du Dr. Barbara Delaunay, ses travaux sont en cours de publication).

**La microglie** : au contraire des oligodendrocytes, le tPA ne serait exprimé que par la microglie activée participant ainsi à des mécanismes inflammatoires et neurodégénératifs (Tsirka *et al.*, 1995). De plus, le tPA contribue lui-même à l'activation microgliale en condition inflammatoire par l'interaction de son domaine finger avec l'annexine II (Siao and Tsirka, 2002).

**Les épendymocytes** : une expression de tPA dans les épendymocytes a été rapportée par Louessard et ses collaborateurs en 2016. Dans cette étude (Louessard *et al.*, 2016a) les auteurs n'ont pas étudié les autres types de cellules bordant les ventricules et nous pouvons nous interroger sur la présence ou non de tPA dans les tanocytes.

### 3.2 *Dans la circulation sanguine*

Le tPA est majoritairement retrouvé dans le compartiment vasculaire. Il y est synthétisé par les cellules endothéliales des vaisseaux et stocké dans les corps de Weibel-Palade (Binder *et al.*, 1979; Levin *et al.*, 1997). Le tPA est libéré soit de façon constitutive, soit en réponse à des stimuli spécifiques tels que la présence de thrombine, l'hyperoxie ou un stress mécanique (Diamond *et al.*, 1989; Ito *et al.*, 2000; Levin *et al.*, 1997). La clairance du tPA va s'effectuer principalement dans

le foie grâce à la recapture de la protéase par les hépatocytes et les cellules endothéliales hépatiques (Kuiper *et al.*, 1988). On attribue également aux hépatocytes une fonction de production du tPA plasmatique en condition physiologique (Zheng *et al.*, 2019). Cependant, de par la présence d'une vascularisation hépatique, il est difficile de différencier finement la production hépatique de la production endothéliale (Yetim, 2021).

### 3.3 Dans les organes périphériques

L'expression du tPA n'est pas uniquement réservée au SNC et au système vasculaire. Il existe de multiples organes périphériques qui libèrent, eux aussi, la protéase tels que les poumons, les testicules, la prostate, les reins, le cœur ainsi que les muscles (Rouf *et al.*, 1996). Sa libération est associée de manière générale à un remodelage du tissu soit en condition physiologique, soit en condition pathologique. Ainsi, le tPA exprimé dans l'utérus est impliqué dans le déclenchement des menstruations (Lockwood and Schatz, 1996), mais il peut également être associé à des dégénérescences tel que dans le cancer du pancréas (Aguilar *et al.*, 2004).

## 4 Les inhibiteurs du tPA

La libération constitutive du tPA dans l'espace vasculaire et son activité fibrinolytique nécessitent un contrôle par différents inhibiteurs. Ces inhibiteurs appartiennent à la famille des serpins (*serine protease inhibitors*) (Sappino *et al.*, 1993). Ces serpins peuvent agir par différents mécanismes, c'est à dire, le blocage direct de l'activité protéolytique du tPA et/ou en perturbant ses interactions avec d'autres protéines comme par exemple en affectant sa capacité à se lier aux résidus lysine *via* son LBS (Yaron *et al.*, 2021). Il existe actuellement trois principales serpins capables d'inhiber le tPA dans le SNC : le PAI-1, la neuroserpine et la protéase nexine-1.

#### 4.1 *PAI-1*

Le PAI-1 aussi appelé SERPINE 1 est exprimé en périphérie par les cellules endothéliales, les plaquettes les cellules musculaires lisses (Sprengers and Kluft, 1987) et les cellules adipeuses. Dans le SNC, il est exprimé en faible quantité dans les neurones et les astrocytes (Buisson *et al.*, 1998; Hino *et al.*, 2001). Toutefois son expression augmente dans les astrocytes dans un contexte inflammatoire (Docagne *et al.*, 1999; Sallés and Strickland, 2002). Son mécanisme d'inhibition repose sur sa capacité à agir comme substrat auprès des sérines protéases (Kaneko *et al.*, 1992). L'interaction de PAI-1 avec le tPA s'effectue sur les domaines *Finger* et *Kringle-2* de ce dernier, bloquant ainsi sa fixation à la fibrine (Kaneko *et al.*, 1992). Il existe d'autres PAI, tels que les PAI 2 et 3 dont le premier agit selon un mécanisme similaire à PAI-1 et le second, en revanche ne montre aucun rôle physiologique associé au tPA à ce jour (Gebbinck, 2011).

#### 4.2 *La neuroserpine*

La neuroserpine fait aussi partie de la famille des PAI. Elle est cependant principalement exprimée dans le SNC par les neurones et les astrocytes en condition physiologique (Docagne *et al.*, 1999; Osterwalder *et al.*, 1998). Sa production quasi-exclusive dans le tissu nerveux ne lui confère aucune influence sur le tPA vasculaire. Sa liaison directe avec le domaine catalytique du tPA s'avère très peu stable ce qui lui confère des propriétés d'inhibiteur transitoire par rapport au PAI-1. Le tPA peut hydrolyser la neuroserpine ce qui entraîne sa dissociation permettant ainsi au tPA de reprendre une activité normale (Carlson *et al.*, 2016).

#### 4.3 *La protéase nexine-1*

La protéase-nexine-1 est exprimée dans le parenchyme cérébral par les neurones et les cellules gliales (Giau *et al.*, 2005; Simpson *et al.*, 1994). Elle est très peu présente dans le sang en condition



basale (Bouton *et al.*, 2012). Néanmoins, elle est sécrétée par les plaquettes et son niveau d'expression dépend directement de la quantité de plaquettes présentes dans le sang. Ainsi, la nexine-1 est impliquée dans la régulation du tPA lors de la fibrinolyse où elles sont rapidement libérées par les plaquettes (Boulaftali *et al.*, 2010). Malgré une affinité plus faible de la nexine-1 pour le tPA par rapport à PAI-1, des études *in-vivo* ont démontré que la nexine-1 est capable d'inhiber, à la fois le tPA lié à la fibrine mais aussi l'« auto-activation » du plasminogène par la plasmine liée à la fibrine (Boulaftali *et al.*, 2010).

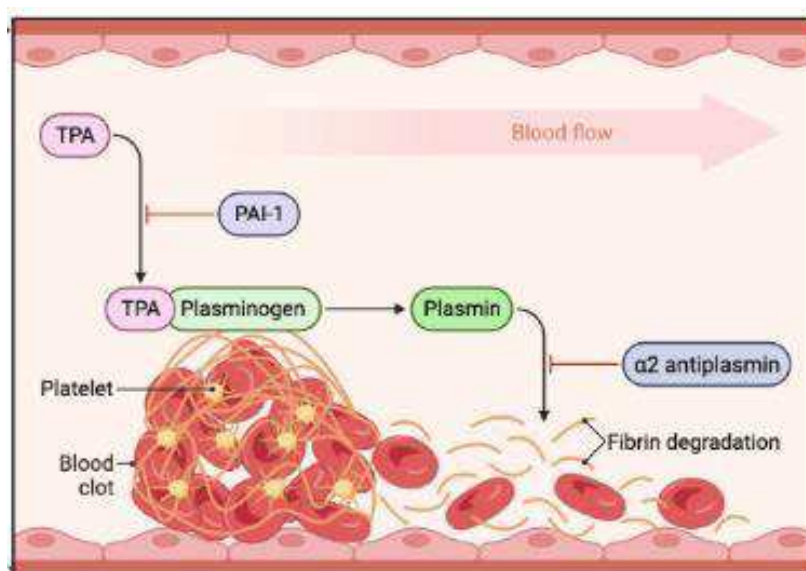
## 5 Implications physiologiques du tPA dans l'organisme

### 5.1 Dans le compartiment vasculaire

#### 5.1.1 Action protéolytique du tPA : la fibrinolyse

La fibrinolyse est un mécanisme enzymatique consistant à la dégradation des caillots de fibrine qui se forment dans l'espace vasculaire. Cette dégradation des chaînes de fibrine est possible grâce à l'action enzymatique de la plasmine. Comme je l'ai mentionné, la plasmine est issue du clivage du plasminogène (une pro-enzyme) par les activateurs du plasminogène. Les principaux activateurs du plasminogène sont : le tPA et l'activateur du plasminogène de type urokinase (uPA) (Collen and Lijnen, 1991). Une fois activée, la plasmine agit sur deux niveaux : la dégradation des dépôts de fibrine enchâssés dans la paroi des vaisseaux et la dégradation de la matrice extracellulaire (MEC) nécessaire au remodelage tissulaire dans la réparation des vaisseaux (Lin *et al.*, 2020). L'activation du plasminogène en plasmine par le tPA est relativement peu efficace. Cependant, la présence de fibrine augmente l'activité protéolytique du tPA par un facteur 100 (Hoylaerts *et al.*, 1982). Ce niveau de spécificité permet ainsi au tPA d'activer le plasminogène uniquement en présence d'une grande quantité de fibrine (fig. 67). Afin de réguler le système fibrinolytique et d'éviter un phénomène d'hyperfibrinolyse responsable de la dégradation de la

BHE (Marcos-Contreras *et al.*, 2016), le plasminogène est inhibé par l' $\alpha$ -2-antiplasmine et l' $\alpha$ -2-macroglobuline (Thiebaut *et al.*, 2018). La régulation de la fibrinolyse s'effectue aussi directement auprès du tPA par des inhibiteurs présentés en (I.4).



**Figure 67 : Mécanisme d'action de la fibrinolyse.**

Le tPA libéré dans la circulation va convertir le plasminogène en plasmine lorsqu'ils sont à proximité des caillots de fibrine. La plasmine sous sa forme active peut alors dégrader la fibrine et entraîner la lyse du caillot. La fibrinolyse est sous le contrôle de plusieurs inhibiteurs, dont PAI-1 (inhibiteur du tPA), l' $\alpha$ -2-antiplasmine et l' $\alpha$ -2-macroglobuline (inhibiteurs de la plasmine).

### 5.1.2 tPA et barrière hémato-encéphalique

La barrière hémato-encéphalique possède un rôle protecteur du parenchyme cérébral en créant un environnement privilégié isolé de la périphérie. Cette barrière se situe au niveau des capillaires cérébraux, où les cellules endothéliales forment un obstacle scellé entre elles par des jonctions serrées et adhérentes limitant le flux paracellulaire (Rubin and Staddon, 1999). La BHE est également établie par la présence d'autres structures cellulaires et non cellulaires, dont les péricytes, la lame basale et les astrocytes (Abbott *et al.*, 2006).

Lors d'un AVC ischémique, l'unique possibilité de traitement pharmacologique lors de la phase aiguë nécessite l'utilisation du tPA. Cependant, son utilisation n'est pas sans effets secondaires néfastes. Il a été montré que son injection par voie intraveineuse pouvait augmenter les lésions cérébrales, y compris chez les animaux déficients en tPA (Wang *et al.*, 1998). Il est très probable que le tPA apporté par injection traverse la BHE vers le parenchyme cérébral. Des travaux de recherche effectués dans notre laboratoire mettent en évidence le passage du tPA depuis la circulation vers le parenchyme en condition physiologique grâce à un mécanisme de transcytose LRP dépendant (Benchenane *et al.*, 2005).

Au-delà des effets de transcytose, le tPA est aussi capable d'affecter la perméabilité de la barrière (Wardlaw *et al.*, 2013). En effet, l'interaction du tPA avec les récepteurs LRP affectent l'attachement des pieds astrocytaires le long des vaisseaux qui indubitablement entraînent une perméabilisation de la BHE en condition ischémique (Polavarapu *et al.*, 2007). Ces effets perméabilisant de la BHE par le tPA augmentent le risque de transformations hémorragiques suite à un AVC ischémique (Yepes *et al.*, 2003). Le tPA administré par voie intraveineuse a aussi la capacité d'augmenter l'expression des métalloprotéines matricielles (MMP) par les cellules endothéliales (Suzuki *et al.*, 2007). Les MMP ont des propriétés de dégradation des composants de la MEC, tels que la laminine et le collagène (Lakhan *et al.*, 2013). D'autres effets du tPA sur l'intégrité de la barrière ont été mis en évidence, dont l'activation du facteur de croissance plaquettaire (PDGF-CC) (Fredriksson *et al.*, 2004). Ce dernier va activer ses récepteurs PDGFR- $\alpha$  localisés sur les astrocytes et les péricytes et induire une ouverture de la BHE (Su *et al.*, 2008).

Par ailleurs, il a été montré dans notre laboratoire les effets du blocage de l'interaction entre le tPA et le récepteur NMDA endothélial. Ce blocage affecte l'activité du récepteur et il permet de réduire la perméabilité de la BHE en condition inflammatoire à la suite d'un traitement au TNF

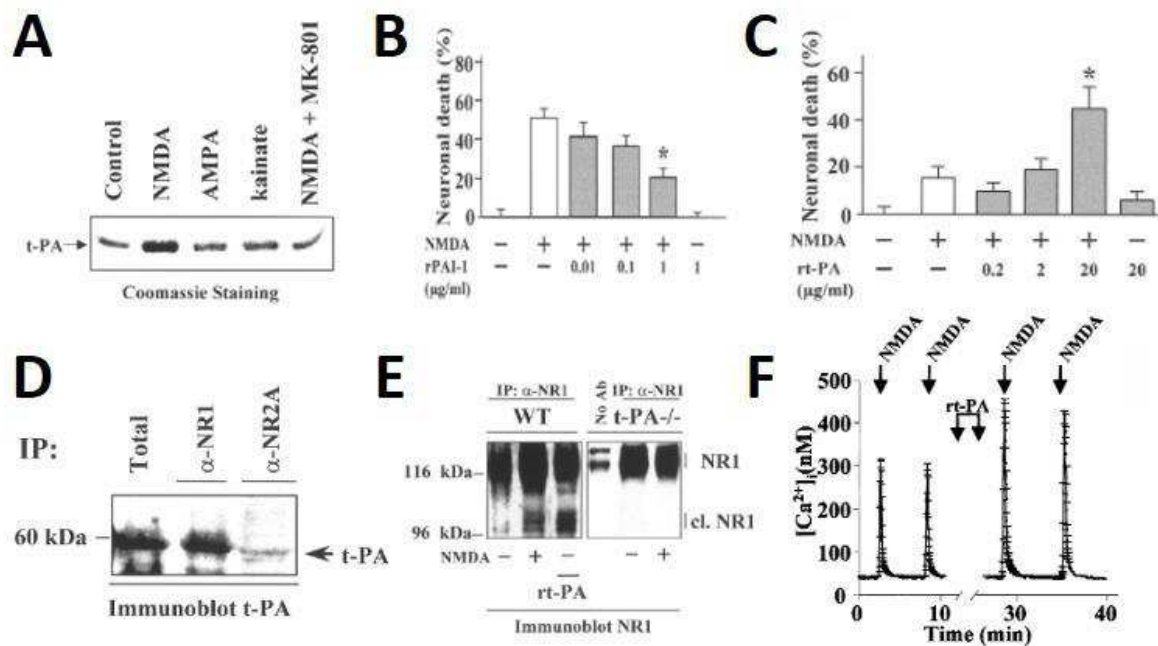
(Facteur de Nécrose Tumoral) ou dans un modèle murin de sclérose en plaque (Macrez *et al.*, 2016; Mehra *et al.*, 2020).

## 5.2 Dans le système nerveux central

### 5.2.1 tPA et transmission glutamatergique

Le glutamate est le neurotransmetteur excitateur le plus répandu dans le SNC. Il agit avec trois types de récepteurs glutamatergiques ionotropiques, les récepteurs AMPA, les récepteurs NMDA et les récepteurs kaïnate, ou avec des récepteurs de type métabotropiques. La transmission glutamatergique est essentielle dans les fonctions d'apprentissage et de mémoire (Willard and Koochekpour, 2013).

Des travaux menés dans notre laboratoire ont mis en évidence la capacité du tPA à cliver la sous-unité GluN1 du RNMDA et à potentialiser ainsi l'influx de calcium neuronal (fig. 68) (Nicole *et al.*, 2001). À terme, ce mécanisme entraîne la mort neuronale dans des modèles d'excitotoxicité induite par le NMDA (Benchenane *et al.*, 2007; Nicole *et al.*, 2001). La composition du récepteur NMDA a aussi un rôle sur les effets du tPA. En effet, l'utilisation d'un antagoniste de la sous-unité GluN2 empêche ces effets pro-excitotoxiques (Baron *et al.*, 2010). De même, le blocage du site de fixation du tPA sur la sous-unité GluN1 induit une diminution de la taille de lésions dans des modèles d'AVC ischémique et d'excitotoxicité induite par le tPA (Benchenane *et al.*, 2007; Macrez *et al.*, 2010).



**Figure 68 : L'interaction du tPA avec le récepteur NMDA potentialise l'entrée du calcium et la mort excitotoxique.**

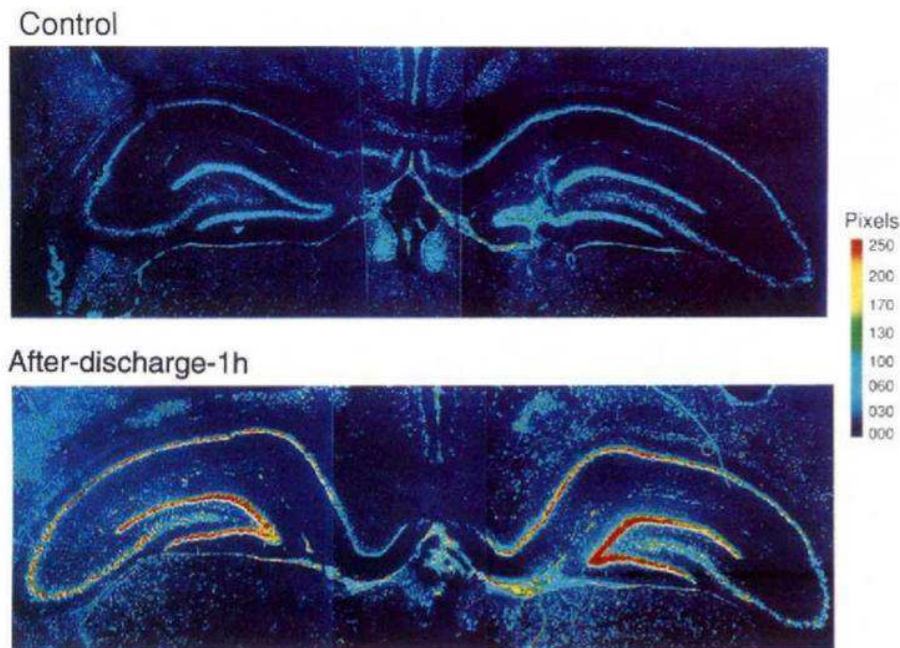
(A) La dépolarisation neuronale induite par un traitement au NMDA augmente la sécrétion de tPA par les neurones corticaux tandis que les traitements AMPA et kainate ne modifient pas la sécrétion de tPA. (B) La mort neuronale induite par le NMDA est réduite après un traitement au PAI-1 tandis que l'ajout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

Les actions du tPA sur la signalisation du récepteur NMDA vont influencer les mécanismes physiologiques dépendant de la transmission glutamatergique dans les phénomènes de plasticité synaptique et/ou les processus cognitifs.

### 5.2.2 *tPA et plasticité synaptique*

La plasticité synaptique représente la modification de l'intensité ou de l'efficacité de la transmission synaptique de synapses pré-existantes. Globalement, elle est impliquée dans la rétention et la transformation d'informations transitoires en connaissances pérennes. Cette plasticité se développe en deux mécanismes aux fonctions et rôles différents : la plasticité à court terme et la plasticité à long terme. Nous nous intéresserons principalement à la plasticité à long terme qui comprend la potentialisation à long terme (LTP) et la dépression à long terme (LTD). La LTP et la LTD sont deux actions opposées, l'une permettant de garder l'efficacité de la transmission synaptique, et la seconde, au contraire, de réduire l'efficacité de cette transmission. Les mécanismes de la LTP sont dépendants de l'activité des récepteurs glutamatergiques AMPA et NMDA (Citri and Malenka, 2008).

En 1993 une équipe a montré le rôle du tPA dans la LTP. En effet, ils remarquent qu'après l'activation des neurones hippocampiques impliqués dans la formation de la LTP que la quantité d'ARNm du tPA augmente de manière rapide (fig. 69) (Qian *et al.*, 1993). Une augmentation comparable a été mise en évidence dans les cellules de Purkinje du cervelet de rat en phase d'apprentissage de tâches motrices (Seeds *et al.*, 1995). Ces observations attestent d'une fonction du tPA dans les phénomènes d'apprentissage.



**Figure 69 : Expression du tPA dans la potentialisation à long terme.**

Hybridation *in situ* des ARNm de *PLAT* au niveau du gyrus denté de l'hippocampe (en fausses couleurs) de rat en conditions contrôle et 1h après une induction de la LTP par stimulation haut fréquence de la voie perforante. D'après Qian *et al.*, 1993.

Selon Qian et collaborateurs, l'augmentation de la transcription du gène *PLAT* dans le gyrus denté hippocampique serait dépendante de l'activation des récepteurs NMDA. L'activation des RNMDA conduit à une activation de la voie AMPc/PKA (Adénosine monophosphate cyclique/protéine kinase A) elle-même responsable de la synthèse et de la libération du tPA post-synaptique où il va activer les récepteurs LRP des neurones hippocampiques (Baranes *et al.*, 1998; Zhuo *et al.*, 2000).

Baranes et collaborateurs mettent en évidence une réduction de la phase tardive de la LTP au niveau des collatérales de Schaffers qui projettent sur la région CA1 (SC-CA1) et des fibres moussues projetant sur la région CA3 (MF-CA3) de l'hippocampe grâce à l'utilisation d'un

inhibiteur de tPA (Baranes *et al.*, 1998). Les mêmes observations ont été réalisées par Huang et collaborateurs sur des voies identiques dans une souche d'animaux déficiente en tPA, les tPA KO (Huang *et al.*, 1996). Par ailleurs, des travaux réalisés dans notre laboratoire décrivent le rôle du tPA sous sa forme simple chaîne uniquement dans la LTP tardive (Parcq *et al.*, 2012).

### 5.2.3 tPA et cognition

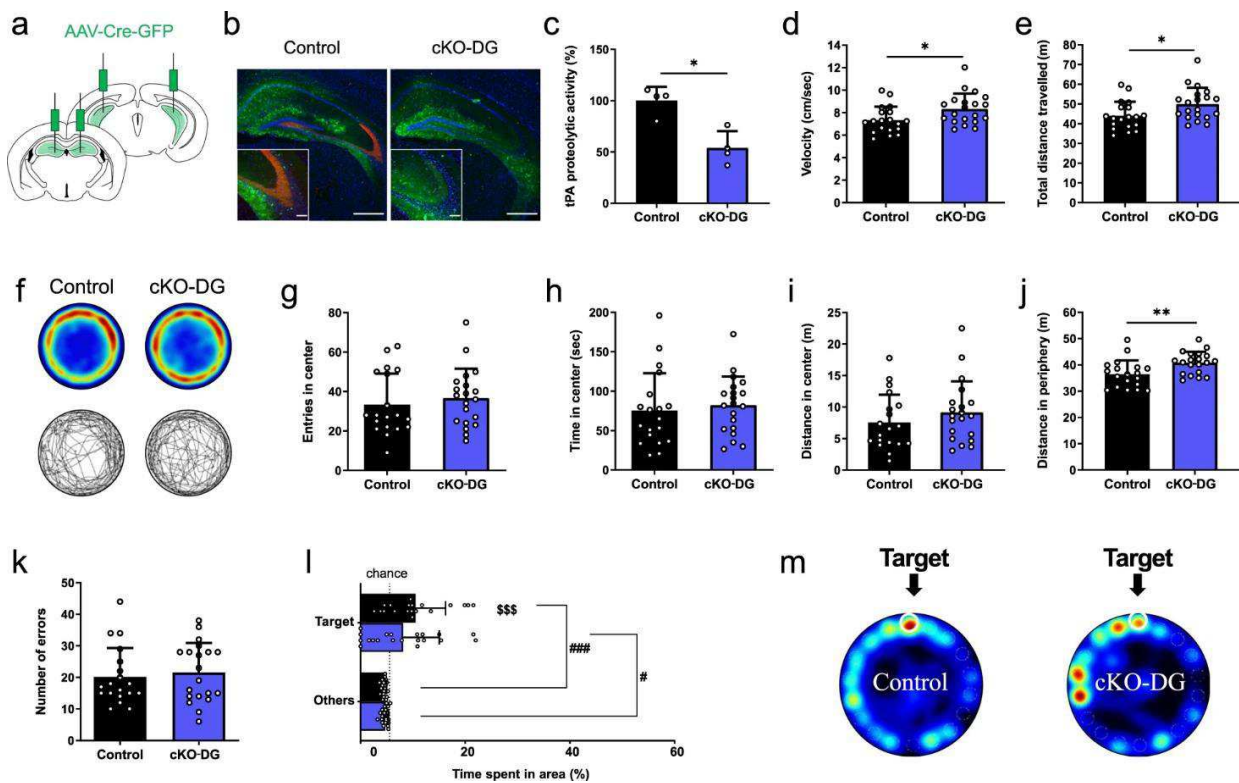
Les processus cognitifs représentent les capacités de mémoire et d'apprentissage d'un individu. D'un côté, la mémoire sert à se souvenir d'événements spécifiques, tandis que l'apprentissage permet à l'individu, *in fine*, de modifier son comportement face à une situation déjà rencontrée. Ces processus reposent sur la plasticité synaptique dont la LTP que nous avons décrite dans la section précédente. Inévitablement, le tPA étant hautement exprimé dans les régions soumises à la plasticité synaptique, il sera aussi impliqué dans les processus cognitifs.

L'implication du tPA dans la mémoire spatiale a fait l'objet de plusieurs études parfois contradictoires selon les tests comportementaux utilisés. Huang et collaborateurs montrent que l'apprentissage spatial des animaux tPA KO et WT est similaire d'après le test du labyrinthe de Barnes (Huang *et al.*, 1996). De plus, ils ont montré que la distance parcourue par les animaux KO était plus grande, sans pour autant démontrer un déficit de l'apprentissage (Huang *et al.*, 1996). En accord avec ces résultats, Pawlak et collaborateurs n'observent, à l'aide de la piscine de Morris, aucun déficits de l'apprentissage et de la mémoire spatiale entre les animaux déficient en tPA et leur contrôle WT (Pawlak *et al.*, 2005).

Contrairement à ces études, il a été montré qu'une déficience en tPA entraînait des déficits d'acquisition et de mémorisation chez les souris tPA KO grâce au test de la piscine de Morris (Oh *et al.*, 2014). De plus, une surexpression du tPA neuronal stimule les performances spatiales



attestées par la piscine de Morris ou du *Homing Hole Board Test* (Madani *et al.*, 1999). D'autres tests comportementaux tels que la reconnaissance d'objets met en évidence un déficit dans la reconnaissance des objets et dans la localisation des objets après les avoir déplacés (Calabresi *et al.*, 2000; Benchenane *et al.*, 2007). De manière intéressante, les travaux de Benchenane et collaborateurs sont fondés sur l'immunisation contre la sous-unité GluN1 et plus particulièrement son domaine extracellulaire amino terminal (Benchenane *et al.*, 2007). Ainsi l'interaction entre le tPA et le récepteur NMDA semble être à l'origine de ces perturbations de la mémoire spatiale. Des études menées dans notre laboratoire mettent en évidence que les RNMDA avec lesquels le tPA interagit spécifiquement contiennent la sous-unité GluN2D (Obiang *et al.*, 2012). Enfin, une étude récente réalisée dans notre laboratoire par Douceau et collaborateurs met en évidence que la suppression spécifique de l'expression du tPA dans le gyrus denté de l'hippocampe induit une hyperactivité et des déficits partiels de la mémoire spatiale (fig. 70) (Douceau *et al.*, 2022).



**Figure 70 : La délétion conditionnelle du tPA dans l'hippocampe (cKO-DG) entraîne une hyperactivité locomotrice et des déficits cognitifs spatiaux modérés.**

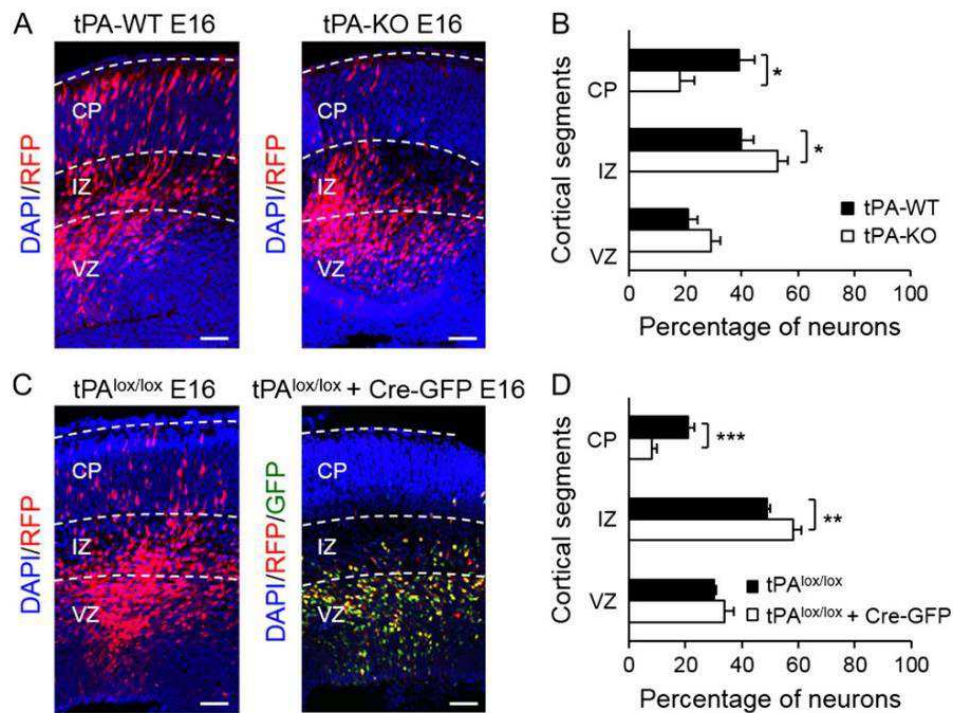
Après injection de l'AAV-Cre-GFP dans le gyrus denté de souris WT et tPA Floxés, les animaux *floxés* n'expriment plus le tPA dans la zone ciblée (b). Les animaux cKO-DG présentent une activité protéolytique du tPA significativement plus faible dans l'hippocampe (c). Ces mêmes animaux montrent une hyperactivité locomotrice dans le test de l'open field (d-e-f). La délétion du tPA dans le gyrus denté n'affecte pas l'anxiété des animaux (g-h-i-j). Les souris cKO-DG présentent des déficits spatiaux modérés dans le test du labyrinthe de Barnes (k-l-m).

#### 5.2.4 tPA et neurodéveloppement

Le développement cérébral est une étape qui a lieu à la fois lors de la vie fœtale, mais aussi après la naissance. Il s'organise à travers différentes étapes faisant intervenir la prolifération des progéniteurs neuronaux, leur différenciation, leur migration ainsi que le développement des connexions permettant la création de réseaux neuronaux. Le tPA intervient dans un processus essentiel du développement cérébral à savoir la migration neuronale.

Il a été démontré que le tPA jouait un rôle lors de l'étape de migration des cellules granulaires du cervelet. Au cours de cette étape qui a lieu lors des premières semaines après la naissance, les cellules migrent à partir de la couche granulaire externe afin de rejoindre la couche granulaire interne en passant par la couche moléculaire du cervelet (Consalez and Hawkes, 2013; Komuro and Yacubova, 2003). La première preuve de la présence du tPA dans cette région a été mise en évidence par Krystosek et Seeds qui montrent que les cellules granulaires du cervelet peuvent sécréter du tPA le long de leurs prolongements (Krystosek and Seeds, 1981). Cette expression du tPA coïncide avec les événements majeurs de la prolifération et de migration (Friedman and Seeds, 1995). Ces auteurs ont également révélé que la quantité d'ARNm exprimé dans les cellules granulaires diminuait significativement à la fin de leur migration (Friedman and Seeds, 1995). De plus, les animaux déficients en tPA présentent une migration de ces neurones granulaires retardée (Seeds *et al.*, 1999).

Une autre population cellulaire progénitrice (les neuroblastes) illustre l'importance du tPA dans la migration neuronale lors de la corticogénèse. En effet, des travaux réalisés par Pasquet et collaborateurs au sein du laboratoire révèlent un retard de la migration chez des souris déficientes en tPA ou encore chez des souris dont le tPA est spécifiquement délété dans les neuroblastes lors de la corticogénèse (fig. 71) (Pasquet et al., 2019a). Cette étude souligne également, l'importance du récepteur NMDA dans les effets du tPA via l'interaction de son domaine *Kringle 2* avec les RNMDA de la glie radiaire (un support nécessaire à la migration des neuroblastes).



**Figure 71 : Implication du tPA sur la migration neuronale lors de la corticogenèse.**

(A) Distribution des progéniteurs neuronaux dans les différentes couches corticales à E16. La migration neuronale est retardée chez les animaux KO par rapport aux souris WT. (B) Pourcentage de neurones selon le segment cortical. (C) On observe aussi un retard de la migration chez les animaux tPA<sup>lox/lox</sup> dont le tPA est supprimé spécifiquement dans les progéniteurs neuronaux grâce à l'utilisation d'un plasmide recombinant porteur d'une Cre (pCAG-Cre-GFP). (D) Pourcentage de neurones selon le segment cortical. D'après Pasquet *et al.*, 2019.

Nous pouvons souligner que le tPA est également impliqué dans la migration des oligodendrocytes. Ainsi, notre laboratoire a pu démontrer que le tPA influence la migration des progéniteurs d'oligodendrocytes *via* son interaction et l'activation des récepteurs à l'EGF (Leonetti *et al.*, 2017). L'ensemble des données présentées ci-dessus souligne l'importance du tPA dans les processus de migration cellulaire (migration neuronale et oligodendrocytaire).

### 5.2.5 tPA et apoptose

Tout comme la prolifération des cellules est importante lors du développement cérébral, l'apoptose l'est tout autant dans le cadre de l'établissement de circuits neuronaux fonctionnels. L'apoptose est une mort cellulaire programmée, non inflammatoire et elle permet, entre autres, l'élimination des cellules qui n'ont pas été intégrées dans un circuit fonctionnel. Une étude *in vitro*, a très tôt, révélé que l'activation de la microglie déclenchait la libération de tPA qui, *in fine*, induisait une mort neuronale via l'activation d'une voie de signalisation apoptotique (Flavin *et al.*, 2000). Une autre étude a conféré au tPA un rôle pro-apoptotique à partir de cultures de neurones corticaux de souris exposés au NMDA (Liu *et al.*, 2004).

Cependant, des études plus récentes sont plutôt en faveur d'un effet anti-apoptotiques pour le tPA. Ainsi, notre équipe a démontré des effets anti-apoptotiques à la fois sur des neurones corticaux et les oligodendrocytes. En effet, dans des conditions de privation sérique *in vitro*, le tPA va réduire l'activation de la caspase 3 impliquée dans la cascade apoptotique neuronale. Cet effet anti-apoptotique passe par des mécanismes indépendants de l'activité protéolytique du tPA (Liot *et al.*, 2006). De tels effets ont également été démontrés *in vivo*. Ainsi, il a été observé qu'après un traumatisme crânien, l'inhibition du tPA endogène par la neuroserpine activait la mort neuronale apoptotique (Zhao *et al.*, 2020).

Des effets anti-apoptotiques ont également été démontré pour les oligodendrocytes à la fois *in vivo* et *in vitro*. *In vitro*, le tPA est impliqué dans l'activation de la voie de signalisation phosphatidylinositol-3-kinase (PI3K) des oligodendrocytes les protégeant ainsi de l'apoptose (Correa *et al.*, 2011). Ces mécanismes protecteurs sont dépendants de l'interaction du tPA aux récepteurs à l'EGF ou à l'annexine II (Bertrand *et al.*, 2015; Lee *et al.*, 2007). Des effets protecteurs et anti-apoptotique du tPA sur les oligodendrocytes ont aussi été mis en évidence dans une étude

*in vivo*. Ainsi, l'injection de tPA dans le corps calleux permet de réduire les lésions de la substance blanche dans un modèle d'ischémie cérébrale chez la souris âgée (Correa *et al.*, 2011).

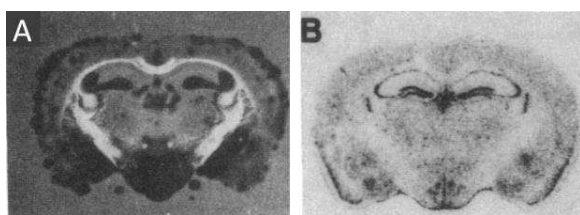
#### 5.2.6 tPA et sécrétions neuroendocrines

De nombreuses sécrétions hormonales sont sous de neurones de noyaux hypothalamiques qui dictent la libération des hormones par le biais de l'hypophyse (Shahid *et al.*, 2022). Je présenterai ci-dessous les détections et les rôles attribués au tPA dans le cadre des sécrétions endocrines et/ou neuroendocrines.

Les premières études portant sur la présence de tPA dans les tissus endocrines concernent la thyroïde ( J.-D. Vassalli "unpublished observations" dans Granelli-Piperno and Reich, 1983), les parathyroïdes (Cohn and MacGregor, 1981) et les îlots pancréatiques (Virji *et al.*, 1980). Cette dernière étude a montré que la régulation de la synthèse et de la sécrétion des activateurs du plasminogène (PA) étaient régulées de concert avec celle de l'insuline (Virji *et al.*, 1980). Ces derniers auteurs ont, pour la première fois, également suggéraient que les activateurs du plasminogène pouvaient intervenir dans la maturation de la proinsuline. Granelli-Piperno et Reich (1993) ont, quant à eux étudié, *in vitro*, les activateurs du plasminogène (PA) que sont le tPA et l'uPA à partir d'hypophyses de rat (Granelli-Piperno and Reich, 1983). Ils ont démontré que les lobes antérieur (adénohypophyse) et intermédiaire synthétisaient et sécrétaient à la fois le tPA et l'uPA. Dans le lobe antérieur, ils associent ces deux protéases dans les populations de cellules lactotropes, corticotropes et gonadotropes (Granelli-Piperno and Reich, 1983). Ils révèlent également, à partir de cultures cellulaires d'adénohypophyse cultivées ou non en présence de plasminogène, que le tPA jouerait un rôle dans le clivage du précurseur de l'ACTH. Une étude immunohistologique ultérieure, réalisée sur des hypophyses de rats, a infirmé certaines des observations de Granelli-Piperno et Reich (Kristensen *et al.*, 1985). En effet, dans cette étude, les

auteurs ont démontré que seul le tPA (et non l'uPA) était exprimé dans l'hypophyse (Kristensen *et al.*, 1985). Ils décrivent que l'immunomarquage anti-tPA est présent dans la majorité des cellules somatotropes mais absent des cellules corticotropes. De plus, ils illustrent l'absence d'immunomarquage dans le lobe intermédiaire et un très faible signal dans de rares structures granulaires de la neurohypophyse (Kristensen *et al.*, 1985). Comme nous le voyons, les données de la littérature ne sont pas univoques. Elles montrent que l'étude de la distribution du tPA dans les cellules antéhypophysaires mériterait un examen approfondi afin de confirmer et ou infirmer les études antérieures.

Le tPA a également été décrit au sein de l'hypothalamus dans lequel on rencontre les neurones parvocellulaires hypophysiotropes et les neurones magnocellulaires projetant sur l'hypophyse postérieure. En 1978, Dowdle et coll. ont rapporté pour la première fois la présence du tPA dans l'hypothalamus et l'amygdale de souris (Dowdle *et al.*, 1978). Cette première description de la présence de tPA hypothalamique a été confirmée par Sappino et collaborateurs en 1993. L'image ci-après est tirée de l'article de Sappino et coll. (1993). Elle illustre les distributions hypothalamiques de l'activité protéolytique du tPA à l'aide de la technique de zymographie *in situ* et des transcrits du gène PLAT (révélés en hybridation *in situ*).



Distributions hypothalamiques de l'activité protéolytique du tPA à l'aide de la technique de zymographie *in situ* (A) et des transcrits du gène PLAT révélés en hybridation *in situ* (B). D'après Sappino *et al.*, 1993

Ce n'est que 30 ans plus tard qu'une équipe s'est intéressée aux fonctions du tPA dans l'axe vasopressinergique hypothalamo-neurohypophysaire (AHNH) du rat (Miyata *et al.*, 2005). Ces auteurs ont étudié la distribution du tPA et celle de la métalloprotéase matricielle de type 3 (MMP-

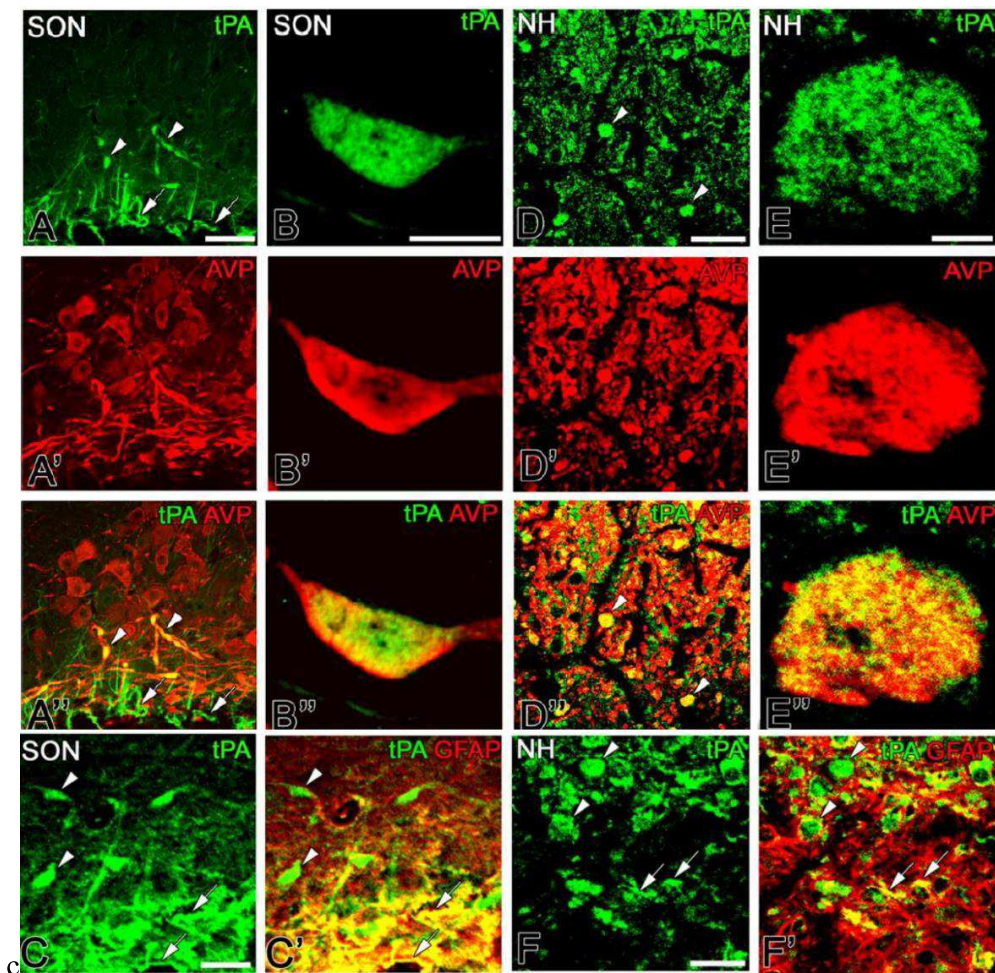
3) au sein de l'AHNH en se focalisant sur les neurones magnocellulaires vasopressinergiques du noyau supra optique (SON). En effet, ces derniers, à l'instar des neurones à ocytocine lors de la lactation, sont connus pour faire preuve d'une grande plasticité structurale lors d'une stimulation importante comme, par exemple, lors d'une charge hyperosmotique (*salt loading*) (Hawrylak *et al.*, 1998; Miyata and Hatton, 2002). Les auteurs ont recherché si le tPA et la MMP3 pouvaient jouer un rôle majeur dans la plasticité structurale tout en étudiant les effets du tPA sur la sécrétion d'AVP.

Ils ont tout d'abord étudié en utilisant la technique d'immunohistofluorescence en multiple immunomarquage, la distribution du tPA et de l'AVP au sein de l'AHNH. Ils rapportent, pour la première fois, une expression spécifique du tPA principalement dans les dendrites et les terminaisons axonales neurohypophysaire des neurones magnocellulaires vasopressinergiques du SON (Fig. 72). Ils montrent également que l'immunoréactivité du tPA est associée à des prolongements astrocytaires (GFAP-positifs) de la *glia limitans* du SON ainsi qu'à des astrocytes de la neurohypophyse. Concernant les neurones à AVP, la distribution de l'immunomarquage anti-MMP3 est comparable à celle qu'ils rapportent pour le tPA (principalement dendritique dans le SON et associée aux terminaisons axonales de la NH). Les astrocytes sont, quant à eux, toujours dépourvus d'immunomarquage anti-MMP3 (dans le SON et la NH).

Afin de comprendre le(s) rôle(s) du tPA au sein de l'axe vasopressinergique hypothalamo-neurohypophysaire, les auteurs ont réalisé diverses expériences qui leur ont permis démontrer que le tPA était libéré, à partir de neurosécrétomes neurohypophysaires *in vitro*. Ils montrent, de plus, que cette sécrétion de tPA se fait de manière calcium dépendante car elle est bloquée par un inhibiteur des canaux calciques lors d'une stimulation induite par le KCl. De plus, ils rapportent que dans le cas d'une stimulation chronique hyperosmotique (*salt loading*), induite par une



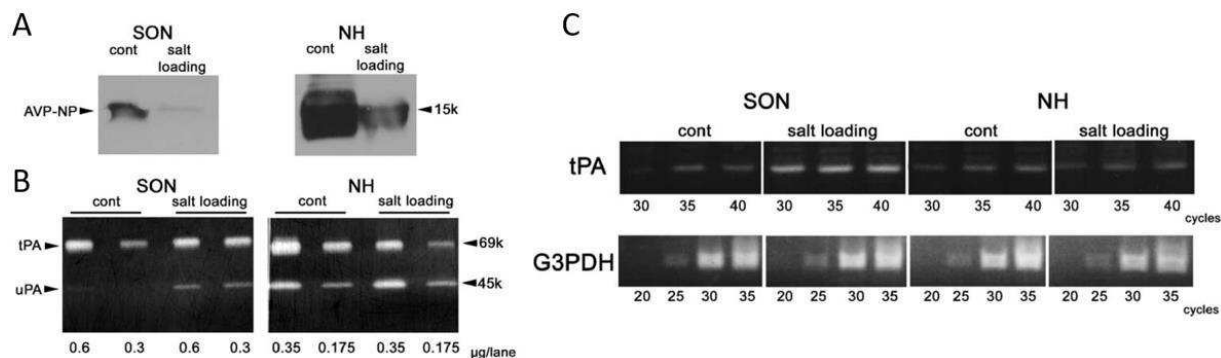
alimentation en eau chargée à 2% de NaCl durant 1 semaine, que la protéine AVP-neurophysine (fig. 72A) et l'activité enzymatique du tPA neurohypophysaire (fig. 72B) diminuaient significativement. Ils n'ont pas observé, par ailleurs, de variations des taux de la protéine MMP3 dans le SON ou la NH. Une analyse après RT-PCR montre que les taux d'ARNm codants le tPA ne sont pas affectés dans la NH mais ils augmentent considérablement dans le noyau supraoptique après la stimulation hyperosmotique (fig. 72C).



**Figure 72** : Distributions des immunomarquages anti-tPA, -AVP et -GFAP dans le système hypothalamo-neurohypophysaire du rat.

**A, A' et A''** : Images confocales montrant un double immunomarquage anti-tPA et anti-AVP dans le noyau supraoptique (SON). L'immunomarquage anti-tPA est observé au niveau des dendrites AVP-positives (pointes de flèches) et des prolongements astrocytaires de la glia limitans. **B, B', B'' et C, C'** : Forts grossissements au sein du SON montrant l'immunoréactivité du tPA dans les dendrites positives à l'AVP (B,B',B'' et pointes de flèches en C et C') et des astrocytes positifs à la GFAP (flèche en C et C'). **D, D' et D''** : Dans la neurohypophyse (NH), l'immunomarquage anti-tPA est observé principalement au niveau des terminaux des axones AVP-positifs provenant des neurones magnocellulaires (pointes de flèches en D et D'' ou encore F et F'). **E, E', E''** : A fort grossissement, l'immunoréactivité du tPA est visible dans une terminaison AVP-positive. **F et F'** : Double immunomarquage anti-tPA et -GFAP, illustrant la présence du tPA dans des astrocytes GFAP-positifs (flèches). Barres d'échelle = 50  $\mu\text{m}$  (A et D), 20  $\mu\text{m}$  (C et F) et 5  $\mu\text{m}$  (B et E). D'après Myata *et al.*, 2005.

Afin de comprendre le(s) rôle(s) du tPA au sein de l'axe vasopressinergique hypothalamo-post hypophysaire, les auteurs ont réalisé diverses expériences qui leur ont permis démontrer que le tPA était libéré, à partir de neurosécrétomes neurohypophysaires *in vitro*. Ils montrent, de plus, que cette sécrétion de tPA se fait de manière calcium dépendante car elle est bloquée par un inhibiteur des canaux calciques lors d'une stimulation induite par le KCl. De plus, ils rapportent que dans le cas d'une stimulation chronique hyper-osmotique (Salt loading), induite par une alimentation en eau chargée à 2% de NaCl durant 1 semaine, que la protéine AVP-neurophysine (fig. 73A) et l'activité enzymatique du tPA neurohypophysaire (fig. 73B) diminuaient significativement. Ils n'ont pas observé, par ailleurs, de variations des taux de la protéine MMP3 dans le SON ou la NH. Une analyse après RT-PCR montre que les taux d'ARNm codants le tPA ne sont pas affectés dans la NH mais ils augmentent considérablement dans le noyau supraoptique après la stimulation hyperosmotique (fig. 73C).



**Figure 73 :** Changements des niveaux de protéines de l'AVP-neurophysine (A), de l'activité du tPA et de l'uPA (B) et des taux d'ARNm codants le tPA dans le SON et la NH après une semaine de charge en sels (salt loading).

**A :** L'analyse en Western révèle que la charge saline chronique diminue significativement les niveaux d'AVP-neurophysine dans le SON et le NH. **B :** L'analyse zymographique montre que la charge en sels a peu affecté les niveaux de tPA bioactif dans le SON par rapport à la nette diminution observable dans la NH. La stimulation chronique a augmenté les niveaux d'uPA bioactif dans le SON, mais pas dans la NH. **C :** L'analyse RT-PCR a révélé que la charge en sels (salt loading) affecte de manière significative les niveaux d'expression des l'ARNm codants le tPA dans le SON sans affecter ceux de la NH. La taille des produits de PCR est de 397 pour le tPA et de 445 pour la Glycéraldéhyde-3-phosphate déshydrogénase (G3PDH) qui a été utilisée pour standardiser les taux d'ARNm initiaux.

Les auteurs déduisent de l'ensemble de leurs expériences que le tPA et la MMP-3 pourraient être responsables de la plasticité structurale des neurones magnocellulaires vasopressinergiques lors d'une stimulation chronique hyper-osmotique (Miyata *et al.*, 2005).

Dans le but d'établir avec plus de certitudes le(s) rôle(s) du tPA dans le contrôle de l'équilibre hydrominéral et/ou la plasticité structurale des neurones vasopressinergiques du NSO, la même équipe a poursuivi ses recherches sur des souris transgéniques (Imamura *et al.*, 2010). Ils ont utilisé des souris déficientes en tPA (souris tPA KO) et des souris déficientes en plasminogène (Plg KO). A l'instar de leur première étude, ils ont réalisé une étude immunohistologique de la distribution du tPA, du Plg, de la GFAP, de la lamine et du collagène de type IV dans la neurohypophyse en conditions basales ou après divers types de chocs osmotiques (chroniques ou aigües). Les « chocs osmotiques » utilisés dans cette nouvelle étude sont la privation d'eau (Water deprivation, WD) ou l'injection intraperitonéale de NaCl à 3 ou 9% pour les chocs osmotiques en

aiguë. Ils justifient la non utilisation du même type de choc osmotique que celui réalisé chez le rat (Miyata *et al.*, 2005) par le fait que les souris déficientes en tPA ou en Plg ne présentaient pas le même comportement dipsique que les souris WT pas face à une alimentation en eau salée (Imamura *et al.*, 2010). Bien que les auteurs n'aient étonnamment pas étudié le SON à l'aide de leurs anticorps, ils rapportent que les immunomarquages anti-tPA (ils ont utilisé deux anticorps différents) sont, comme chez le rat, associés aux terminaisons axonales vasopressinergiques de la NH. Ils illustrent, comme cela est visible sur l'iconographie ci-après que le tPA est présent dans les vésicules de sécrétion de ces terminaisons.

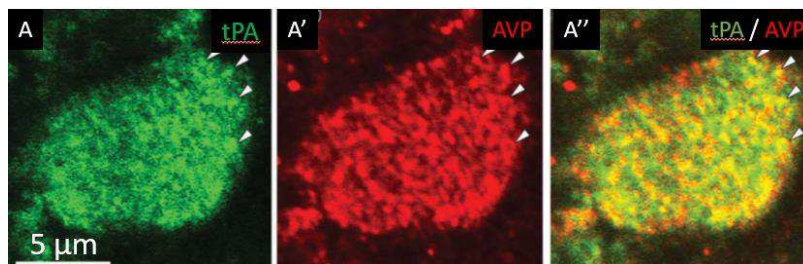


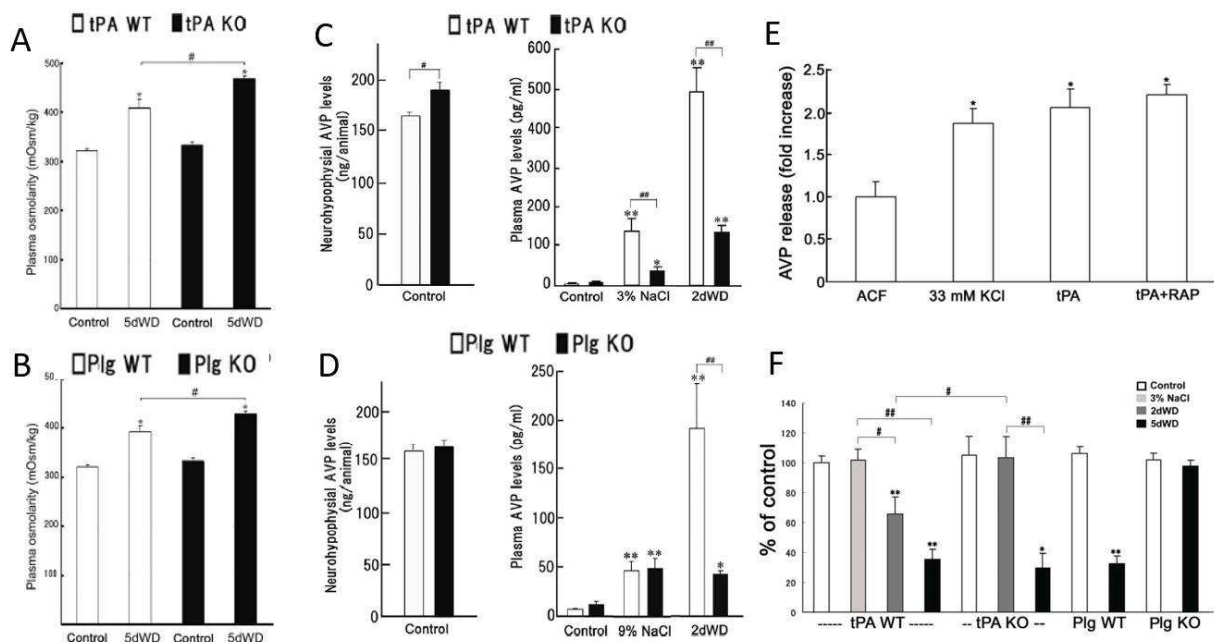
Illustration de l'immunomarquage anti-tPA dans une terminaison d'axone vasopressinergique de la NH. Les pointes de flèche indiquent la colocalisation des immunomarquages anti-tPA et anti-AVP dans les vésicules de sécrétion. Imamura *et al.*, 2010.

Bien que ce point ne soit pas discuté par les auteurs, les astrocytes neurohypophysaires des souris WT des deux souches utilisées sont dépourvus d'immunomarquage anti-tPA (contrairement à ce qui avait été décrit chez le rat (cf. Miyata *et al.*, 2005) cependant dans cette étude les astrocytes sont immunoréactifs pour le plasminogène.

D'un point de vue fonctionnel, les souris tPA knockout (tPA KO) et Plg KO ont une osmolarité plasmatique plus élevée lors d'une stimulation osmotique chronique réalisée par une privation d'eau de 5 jours (fig. 74A-B). Ces résultats révèlent une régulation anormale de l'osmolarité plasmatique chez les souris KO. Les auteurs montrent également que lors d'une stimulation osmotique aiguë, les souris tPA KO, mais pas les Plg KO, présentent une altération de

la capacité à sécréter de l'AVP dans la circulation sanguine (fig. 74 C-D). Dans le cas d'une stimulation osmotique chronique, les animaux KO pour le tPA et le plasminogène ont montré une plus faible capacité à sécréter de l'AVP dans la circulation sanguine (fig. 74 C-D).

Les auteurs rapportent également que le tPA recombinant favorise la libération d'AVP à partir de NH isolées indépendamment d'une activation potentielle des récepteurs LRP (fig. 74E). Enfin, ils montrent qu'une stimulation osmotique chronique diminue le niveau d'expression de la laminine des microvaisseaux neurohypophysaires chez les souris WT mais pas chez les souris déficientes en plasminogène (Plg KO) lors d'un stress osmotique chronique (Fig.74F). Cette dernière observation est en faveur du fait que le tPA pourrait agir sur la sécrétion d'AVP neurohypophysaire via un effet plasmine dépendant.



**Figure 74 : Principaux résultats d'Imamura et collaborateurs en faveur d'un rôle majeur du tPA neurohypophysaire dans la sécrétion d'AVP.**

**A et B :** L'osmolarité plasmatique des souris tPA KO (A) et Plg KO (B) est plus élevée que celle des souris tPA WT après 5 jours de privation d'eau. Les valeurs sont les moyennes  $\pm$  6 s.e.m. \*P < 0,01 par rapport au contrôle ; # P < 0,05 entre les souris WT et KO.

**C et D :** Concentrations neurohypophysaires (gauche) et plasmatiques de l'AVP chez les souris tPA KO et WT (C) en condition contrôle ou après des stimulations osmotiques. Le niveau d'AVP neurohypophysaire est légèrement plus élevés chez les tPA KO (C). Après l'administration intrapéritonéale de 3 % de NaCl ou après 2 jours de privation en eau (2dWD), l'AVP plasmatique augmente plus faiblement chez les souris tPA KO par rapport aux souris WT (graphe de droite en C). Le taux d'AVP plasmatique des souris Plg KO et WT augmente de manière comparable 1 heure après l'administration intrapéritonéale de NaCl à 9 %. Dans la condition 2dWD, le taux plasmatique d'AVP des souris Plg KO est significativement inférieur à celui des souris WT (graphe de droite en D). Plg, plasminogène. Les valeurs sont les moyennes +/- s.e.m. \*P < 0,05, \*\*P < 0,01 par rapport au contrôle ; # P < 0,05, ## P < 0,01 entre les souris WT et KO.

**E :** Sécrétion d'AVP induite par le tPA à partir de NH isolées (*in vitro*). Le dosage radio-immunologique de la libération d'AVP a été réalisé à partir du milieu des boîtes de culture en condition contrôle (ACF) ou après 10 minutes de stimulation par une solution dépolarisante de KCl (33 mM KCl), par du tPA recombinant ou par du tPA recombinant en présence d'un inhibiteur des récepteurs LRP (RAP). La libération d'AVP dans le milieu d'incubation est augmentée par la stimulation au KCl, et par l'application de tPA recombinant et ce même en présence de l'inhibiteur des récepteurs LRP (RAP). Les effets sécrétagogues du tPA ne passent donc pas par l'activation des récepteurs LRP. Les valeurs sont les moyennes +/-s.e.m. \* P < 0,05 par rapport à l'ACF témoin (référence).

**F :** Analyses morphométriques quantitatives obtenues à partir des immunomarquages anti-laminine dans la neurohypophyse en condition basale ou après des stimulations osmotiques aiguës ou chroniques. Les niveaux de gris des immunomarquages anti-laminine ont été quantifiés chez les différentes souches de souris. Chez les animaux tPA KO, le signal anti-lamine est diminué après une stimulation osmotique chronique mais pas après une stimulation aiguë (suggérant des effets à long terme). Concernant les souris Plg KO et WT, une stimulation osmotique chronique (5dWD) affecte considérablement l'immunomarquage anti-laminine au sein de la NH chez les souris WT mais pas chez les souris KO. Cela suggère que le tPA pourrait agir par l'intermédiaire d'un mécanisme Plasminogène dépendant lors d'une stimulation chronique de longue durée.

L'ensemble des observations d'Imamura et coll. (2010) suggère que, chez la souris, la sécrétion d'AVP est induite et/ou régulée par le tPA. Le rôle du tPA dans la libération de l'AVP reposerait en grande partie sur sa capacité à dégrader indirectement la laminine (composant de la MEC) par l'intermédiaire de la plasmine, la dégradation serait un mécanisme tardif favorisant la libération de l'AVP. Ils concluent leur article en disant que, chez la souris, le système tPA-plasminogène s'avère crucial dans le contrôle de la sécrétion de la vasopressine dans la circulation sanguine.

En confrontant les résultats obtenus par cette équipe chez le rat (Miyata *et al.*, 2005) et la souris (Imamura *et al.*, 2010), des différences inter espèces apparaissent concernant la présence ou non de tPA dans les astrocytes de la neurohypophyse. Cela pourrait être un point crucial pour la compréhension des effets du tPA dans la régulation de l'équilibre hydrominéral chez la souris. Il

me semble également regrettable que la distribution du tPA n'ait pas été décrite dans le SON de la souris ni même au niveau du noyau para ventriculaire chez les deux espèces. Afin de pallier ces critiques, j'ai focalisé une grande partie de mes travaux de thèse sur l'étude du tPA dans le contrôle de l'équilibre hydrominéral chez une nouvelle souche de souris déficiente en tPA. Cette souche a été générée au sein de notre laboratoire et, comme je l'expose ci-dessous, elle présente de nombreux intérêts par rapport à la souche de souris utilisée dans le cadre des recherches précédemment présentées (Imamura *et al.*, 2010).

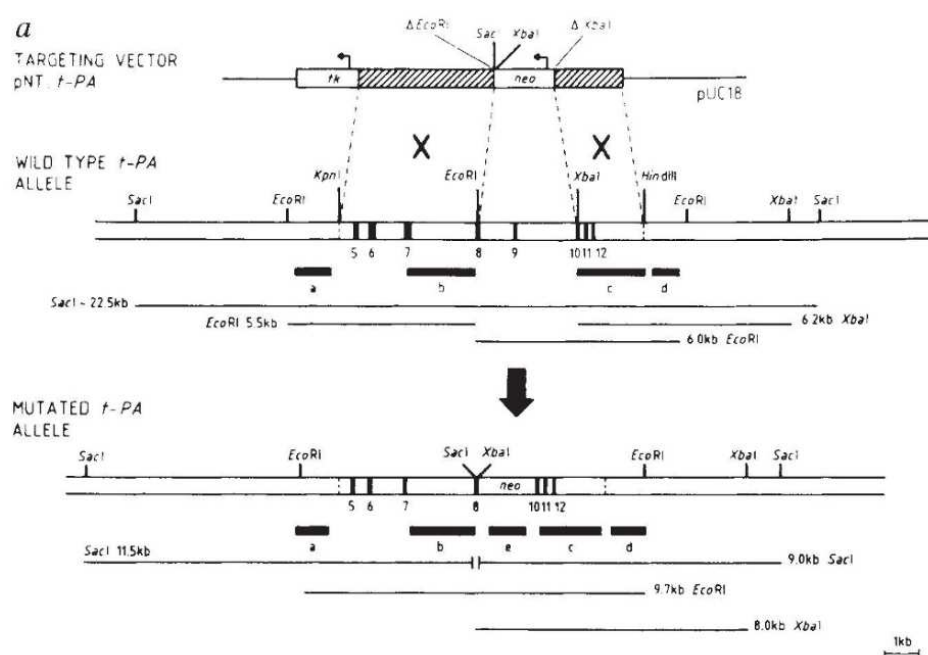
## **6 Les modèles déficients en tPA utilisés dans le cadre de mes travaux de recherche.**

Afin de mieux comprendre les rôles du tPA dans la physiologie des mammifères, des modèles animaux ont été générés dans le but de déterminer si l'inactivation (ou la surexpression) du gène *PLAT* induisait des modifications moléculaires, cellulaires et /ou physiologiques majeures. La création de modèles murins déficients en tPA est, pour les modèles les plus anciens, fondée sur une modification génétique du gène *PLAT* codant pour le tPA. Nous présenterons dans cette section le premier modèle développé, la souris tPA KO qui fut utilisée dans l'étude d'Imamura et coll., avec ses avantages et ces inconvénients ayant menés d'autres équipes à développer leur propre modèle, dont la nôtre, la souris tPA<sup>Null</sup>.

### *6.1 Les souris tPA KO du Pr. P. Carmeliet*

La première inactivation du gène *PLAT* a été développée à partir de la souche murine 129 par Carmeliet et collaborateurs en 1994 (Carmeliet *et al.*, 1994). Afin d'invalider le gène du tPA, ils ont construit un vecteur cible pNT.tPA dans lequel une cassette exprimant *neo* (*neomycin-resistance-gene*) remplace la séquence génomique codant pour la majorité du domaine *kringle-2*,

et une partie du domaine sérine protéase (fig. 75). Cette recombinaison homologue résulte en une inactivation totale du gène *PLAT*. Les animaux transgéniques ainsi créés se développent à priori normalement. Ils sont fertiles et ont une durée de vie normale. Toutefois, la déficience en tPA réduit le potentiel thrombolytique des animaux et augmente l'incidence des thromboses induites par l'endotoxine. Ils révèlent des dépôts de fibrine dans les organes périphériques qui augmentent avec l'âge des animaux (Carmeliet *et al.*, 1994).



**Figure 75 : Stratégie d'inactivation du gène *PLAT* de la protéase tPA dans le modèle de tPA KO.**

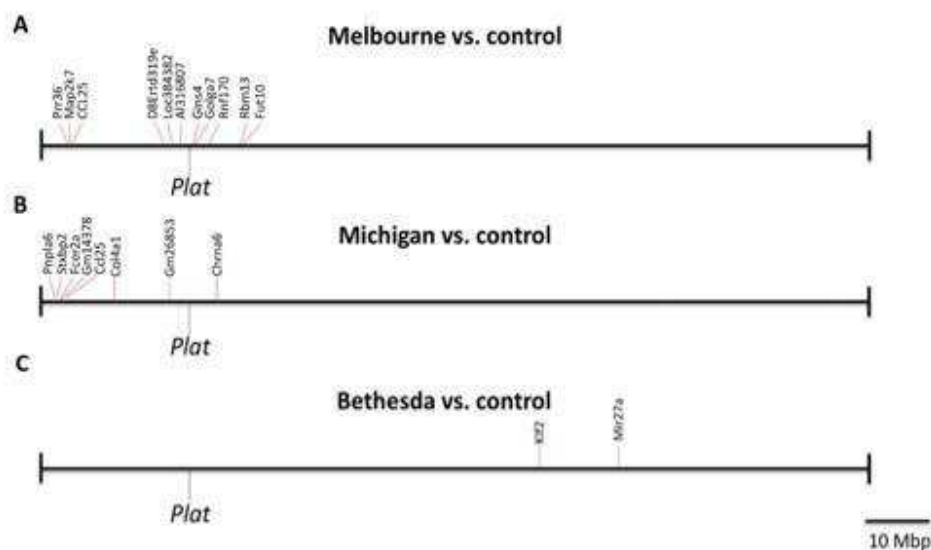
Construction du vecteur de ciblage contenant la cassette *NEO* qui remplacera une partie de la séquence du gène *PLAT* et invalidera l'intégralité du gène. D'après Carmeliet *et al.*, 1994.

Ce modèle murin a fait l'objet de très nombreuses études visant à démontrer les implications et les rôles du tPA. A titre d'exemples (non exhaustifs) cette souche a été utilisée par notre laboratoire dans le cadre d'études sur la mémoire (Obiang *et al.*, 2012), la distribution cérébrale du tPA (Louessard *et al.*, 2015), la myélinisation (Leonetti *et al.*, 2017), le couplage neurovasculaire



(Anfray et al., 2020) et les pathologies autoimmunes (Hélie *et al.*, 2021). Il est important de rappeler que les travaux d'Imamura et coll. (2010) ont été réalisés grâce à l'utilisation de cette souche tPA KO.

La souche murine 129 sur laquelle est basé ce modèle (une souche ayant servi à la construction de nombreuses souris transgéniques), est à l'origine des lignées de cellules souches embryonnaires qui sont maintenant porteuses de multiples mutations « passagères » (*passenger mutations*) capables d'influencer le phénotype des animaux. Ces animaux chimériques ont été rétro-croisés de multiples fois avec la souche C57BL/6J pour les études phénotypiques créant des animaux congéniques, ce qui ne permet pas d'éliminer les fonds génétiques dérivés des cellules souches embryonnaires. Ainsi, la variation génétique entre les souches du donneur (129) et du receveur (C57BL/6J) implique que le génome passager contient généralement des mutations dans les régions flanquant le gène ciblé (mutations passagères) (Berghe *et al.*, 2015). Une étude de 2016 de Szabo et collaborateurs s'est intéressée aux mutations passagères et à l'expression génique aberrante chez les souris congéniques déficientes en tPA (Szabo *et al.*, 2016). Ils mettent en évidence la présence de gènes différentiellement exprimés dans le cerveau de ces souris, à proximité du gène *PLAT*. Grâce à une analyse bio-informatique, ils montrent un nombre important de mutations dans des gènes co-ségrégant avec le gène *PLAT* (transmis aux cellules filles), dont plusieurs mutations potentiellement invalidantes (fig. 76) (Szabo *et al.*, 2016).



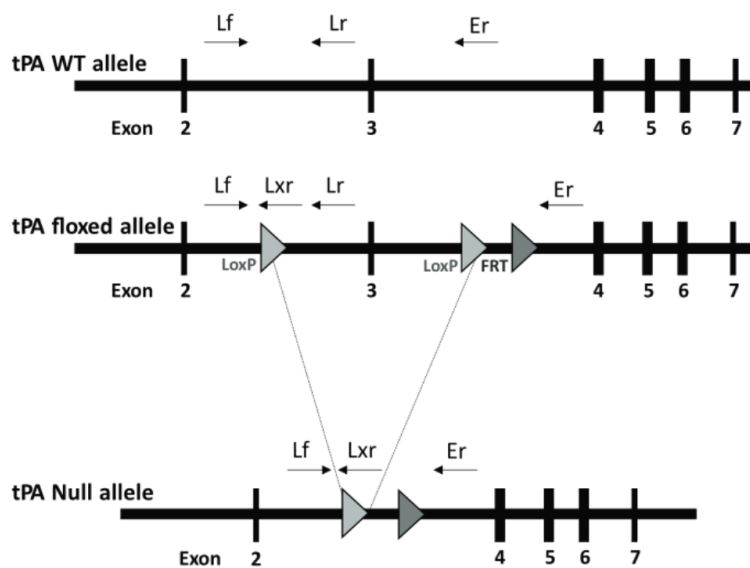
**Figure 76** : Représentation des gènes différentiellement exprimés autour de *PLAT* et indépendamment de la délétion du gène dans le cerveau de souris congéniques (« Melbourne » et « Michigan », souches issues des tPA KO du Pr P. Carmeliet) ou isogénique (« Bethesda », souche générée par l'équipe de Szabo).

Localisation de *PLAT* et de différents gènes différentiellement exprimés (par rapport aux contrôles, WT) montrée dans différentes souches de souris déficientes en tPA. (A) La souche « Melbourne » est issue des souris KO du Pr P. Carmeliet et a été élevée à Melbourne depuis de nombreuses générations (souche congénique). 11 gènes sont différentiellement exprimés (en dehors de *PLAT*) dans les cerveaux déficients en tPA (85%) sont localisés dans un intervalle de 27 Mbp, de part et d'autre de *PLAT*. (B) La souche « Michigan » est également issue des souris KO du Pr P. Carmeliet mais les souris ont été élevées dans le Michigan depuis de nombreuses générations (souche congénique). Chez les Michigan, 8 des 32 gènes différentiellement exprimés (en dehors de *PLAT*) dans les cerveaux déficients en tPA (25%) sont localisés dans un intervalle de 30 Mbp de part et d'autre de *PLAT*. (C) Aucun gène n'est différentiellement exprimé chez les animaux isogéniques « Bethesda » générés par l'équipe de Szabo. D'après Szabo *et al.*, 2016.

Une manière de remédier à ces problèmes de congénisité qui peut conduire à l'expression différentielle de certains gènes à proximité du gène ciblé est de créer *de novo* des souches isogéniques « pure ». Ces souches sont dépourvues de ces mutations passagères et ne présentent pas d'expression différentielle de certains gènes comme le montre la souche Bethesda générée par l'équipe de Szabo (Fig.76),

6.2 *tPA Null*

C'est donc en prenant en considérations ces études et la nécessité de travailler avec des souris tPA floxées que notre laboratoire a développé en collaboration avec l'Institut Clinique de la Souris (ICS, Illkirch-Graffenstaden, France) une nouvelle souche de souris déficiente en tPA, la souche tPA<sup>Null</sup>. Le gène *PLAT* de la souris est constitué de 14 exons s'étendant sur une région d'environ 25kb sur le chromosome 8. Afin de construire le vecteur pour la génération de souris tPA conditionnelles, une séquence LoxP a été insérée dans l'intron 2 tandis qu'un second site loxP ainsi que le gène marqueur PGK-Neo flanqué de 2 sites FRT ont été introduits dans l'intron 3 (fig. 77). Les souris tPA<sup>Null</sup> dans lesquelles l'exon-3 du gène *Plat* est excisé de manière constitutive par le système Cre-lox ont été générées en croisant les souris tPA flox avec la lignée de souris à expression Cre ubiquitaire, Rosa26Cre.



**Figure 77 : Génération des souris tPA<sup>Null</sup> et des souris tPA flox correspondantes.**

Les sites LoxP (triangles gris clair) sont insérés dans des régions encadrant l'exon 3, la cassette NEO encadrée par deux sites FRT (triangle gris foncé) est aussi insérée dans l'exon 3. Les exons sont indiqués par les boîtes noires. D'après Douceau *et al.*, 2022.

La création des souris floxées et des tPA<sup>Null</sup> a déjà fait l'objet de recherches neurodéveloppementales (Pasquet *et al.*, 2019) ou encore impliquant l'anxiété (Douceau *et al.*, 2022).

Afin de lever d'éventuelles ambiguïtés de nomenclature, je distinguerai et j'identifierai, dans la suite de ce document, les souris générées par le Pr. P. Carmeliet sous le nom de souris tPA KO et celle de notre laboratoire seront dénommées tPA<sup>Null</sup>.

Conformément aux preuves avancées concernant les mutations non contrôlées des modèles animaux déficients en tPA d'origine 129, il apparaît légitime de s'interroger sur les fonctions spécifiques imputées au tPA dans les différentes études ayant fait appel aux congéniques tPA KO du Pr. Carmeliet. Au regard de résultats préliminaires et de l'étude préalable d'Imamura et collaborateurs en 2010, nous avons décidé de nous intéresser à l'équilibre hydrique des animaux tPA<sup>Null</sup> afin de confirmer l'implication du tPA dans l'homéostasie osmotique. Nous consacrerons ce deuxième chapitre de l'introduction à la régulation de l'équilibre hydrique, dont la vasopressine est une hormone clé.

## II AVP et équilibre hydrominéral

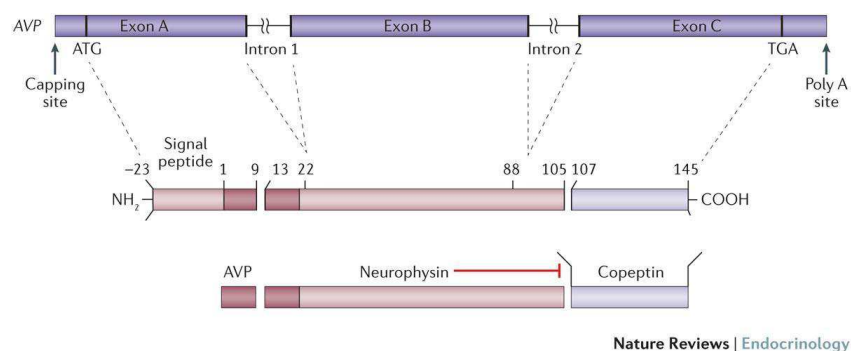
### 1 La vasopressine

#### 1.1 Structure et synthèse

Dans l'hypothalamus, la vasopressine ou hormone anti-diurétique (ADH) ou arginine vasopressine (AVP) est un nonapeptide (9 amino-acides) synthétisé par les neurones magnocellulaires et parvocellulaires localisés dans les noyaux paraventriculaire (NPV) et

supraoptiques (NSO) de l'hypothalamus. On retrouve d'autres neurones vassopressinergiques dans d'autres noyaux hypothalamiques (noyaux suprachiasmatiques) voire d'autres régions cérébrales comme le noyau du lit de la *stria terminalis* (BNST) ou encore au sein de l'amygdale médiane) (De Vries, 2008). Je me focaliserai sur les neurones des noyaux supraoptiques et paraventriculaires.

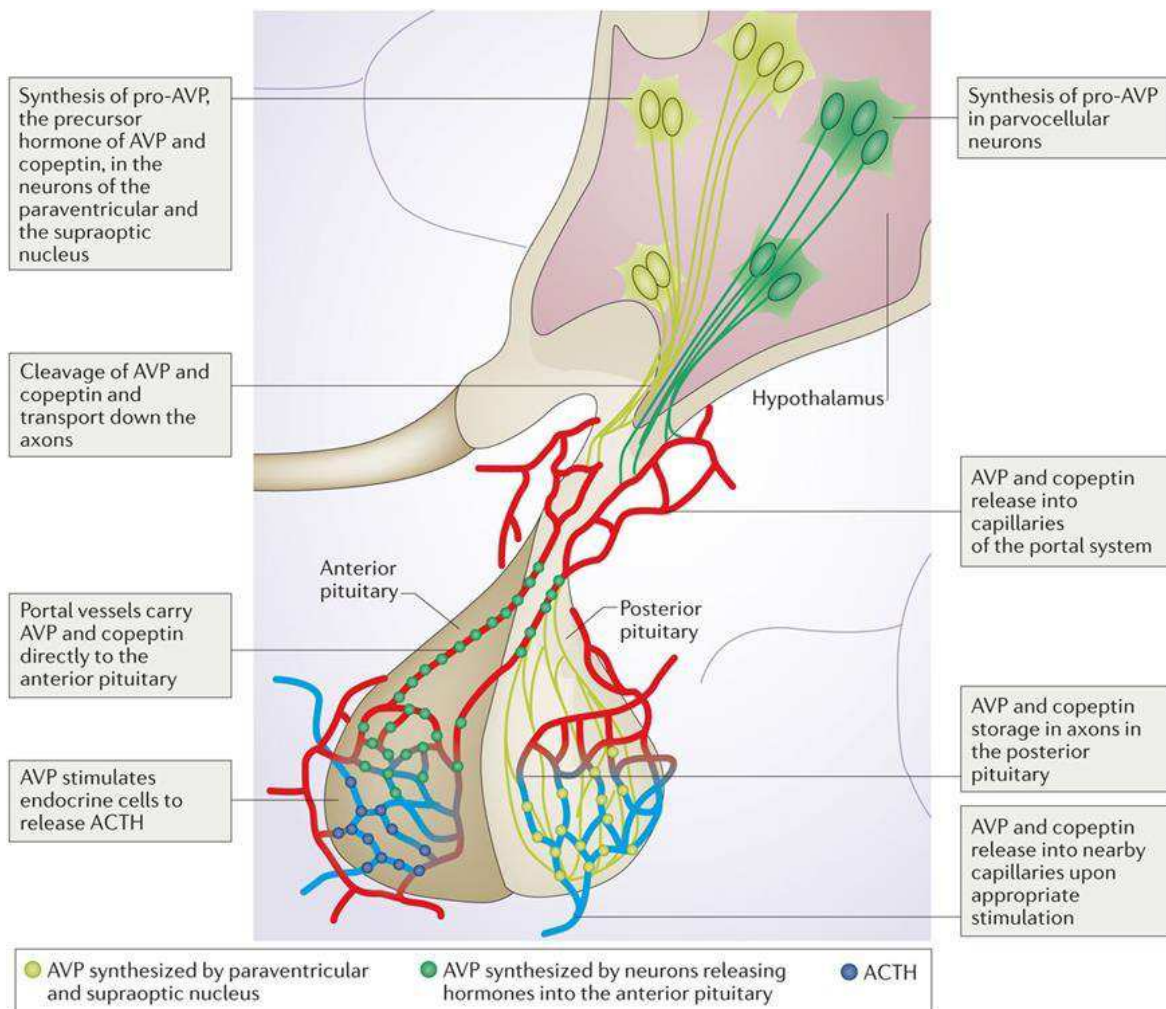
La vasopressine est issue de la transcription du gène AVP localisé sur le chromosome 2 chez la souris et le chromosome 20 chez l'humain. Après la maturation de l'ARN messager (l'épissage) ce dernier est traduit au niveau du réticulum endoplasmique granulaire. La traduction conduit à la formation d'une protéine précurseur de 164 acides aminés : la pré-pro-Vasopressine. Ce précurseur est composé, d'un peptide signal, de l'AVP, d'une protéine appelée neurophysine-2 et d'un peptide glycolysé de 39 acides aminés avec un segment riche en leucine appelé copeptine (fig. 78) (Land *et al.*, 1982). Le gène qui code pour ce précurseur chez l'homme est composé de trois exons et de deux introns localisés sur le bras court du chromosome 20 (Land *et al.*, 1983). Ce gène est bien conservé chez de nombreuses espèces et il est constitué de 3 exons séparés par deux introns (fig. 78).



**Figure 78 : Le gène de l'arginine vasopressine et la maturation de la prepro AVP.**

Le gène de l'AVP est constitué de trois exons codant pour une prohormone de 164 acides aminés avec un peptide signal N-terminal. La prohormone est encapsulée dans les granules neurosécrétoires des neurones magnocellulaires et parvocellulaires. Durant le transport axonal des granules vers les terminaisons axonales, le clivage enzymatique des prohormones génère la vasopressine, la neurophysine 2 et la glycoprotéine C-terminale (copeptine). D'après Christ-Crain and Fenske, 2016.

Je me focaliserai ci-dessous sur les deux principaux types de neurones hypothalamiques du SON assurant systèmes assurant la sécrétion d'AVP (fig. 79). Le premier concerne les neurones magnocellulaires du PVN et du SON. On peut souligner que c'est à partir de ces neurones que l'AVP a été isolée, séquencée et identifiée en tant que neurohormone. Dans les neurones magnocellulaires du PVN et du SON, la pré-pro-AVP perd son peptide signal dans le réticulum endoplasmique et commence à subir des modifications post-traductionnelles dans le RE, l'appareil de golgi et après son sont empaquetage vésiculaire. Durant le transport des vésicules de sécrétion vers les terminaisons axonales de la neurohypophyse, le précurseur de l'AVP est clivé par différentes enzymes (endopeptidase, carboxy-exopeptidase E) assurant le clivage protéolytique. Ces clivages conduisent à l'obtention de l'AVP la neurophysine-2 et de la copeptine (Sparapani *et al.*, 2021). L'AVP est finalement stockée dans les granules neurosécrétoires de la neurohypophyse jusqu'à sa libération dans la circulation (Acher *et al.*, 2002). La seconde voie neurosécrétoire transporte des concentrations élevées de l'hormone depuis les neurones parvocellulaires jusqu'au système porte hypothalamo-hypophysaire. L'AVP libérée à ce niveau peut, en autres, agir en synergie avec la corticolibérine afin de stimuler la libération d'hormone corticotrope (ACTH) par les cellules corticotropes (Rivier and Vale, 1983).



Nature Reviews | Endocrinology

**Figure 79 : Maturation de la PréproAVP dans les neurones magnocellulaires et parvocellulaires de l'hypothalamus.**

L'AVP, la copeptine et la neurophysine dérivent d'un précurseur synthétisé dans les neurones magnocellulaires et parvocellulaires de l'hypothalamus. À la suite du clivage de ce précurseur lors du transport axonal, les peptides actifs sont stockés jusqu'à leur libération dans les terminaisons axonales de la neurohypophyse (pour les neurones magnocellulaires) ou de l'éminence médiane (pour les neurones parvocellulaires). Lors d'une stimulation dépolarisante, les neurones contenant l'AVP libèrent leur contenu dans les capillaires de la neurohypophyse ou dans ceux du système porte hypophysaire. D'après Christ-Crain and Fenske, 2016.

Les principales fonctions physiologiques de la vasopressine sont l'homéostasie de l'équilibre hydrominéral, le tonus vasculaire et la régulation de la réponse neuroendocrine au stress.

Je me focaliserai dans la prochaine section, sur l'équilibre hydrominéral et les différents stimuli responsables de la libération d'AVP au niveau de la neurohypophyse (Cuzzo *et al.*, 2022).

## 1.2 *La libération de la vasopressine dans la neurohypophyse*

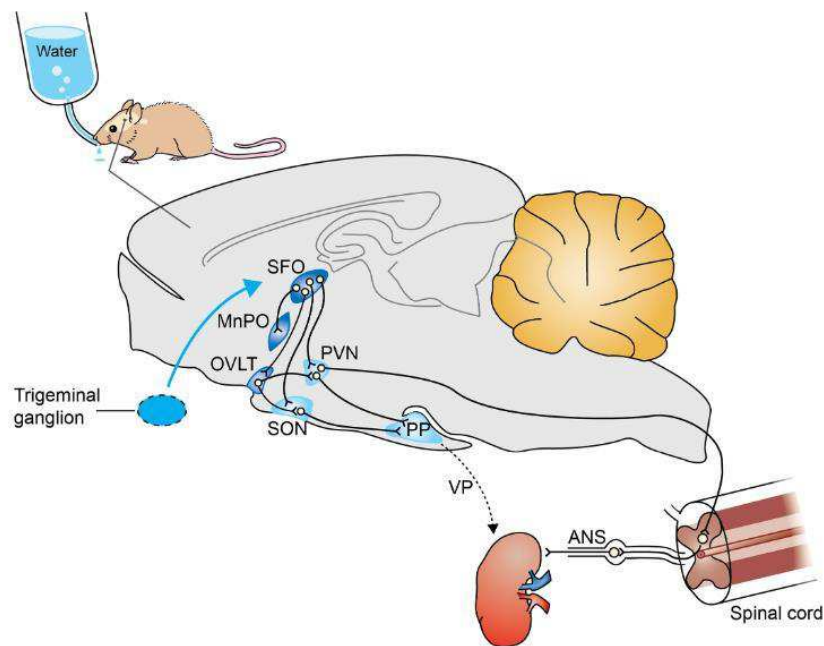
Il existe deux stimuli principaux déclenchant la libération de la vasopressine après la naissance d'un potentiel d'action dans les neurones magnocellulaires. Ainsi, ces neurones sont fortement stimulés par des variations importantes de la pression osmotique (hyperosmolarité) et dans le cadre d'une hypovolémie.

### 1.2.1 *Hyperosmolarité*

L'un des principaux stimuli de la libération de la vasopressine est la déshydratation entraînant une augmentation de l'osmolarité plasmatique. L'AVP est libérée en fonction d'un seuil où l'osmolarité plasmatique atteint 285mOsm/L. Cette relation entre la vasopressine et l'osmolarité plasmatique est linéaire. Ainsi, les fonctions de la vasopressine sont centrales dans la réponse antidiurétique (Morgenthaler *et al.*, 2006). Pour autant, la sensibilité du système de régulation de l'osmolarité n'est pas identique pour chaque soluté. Ainsi, le sodium, contrairement à l'urée ou le glucose possède la plus grande influence sur la libération de la vasopressine (Bankir *et al.*, 2017). Des neurones spécialisés de l'organe vasculaire de la lame terminale (OVLT) sont capables de détecter l'osmolarité du sang et du CSF à l'aide de aquaporines 4 (AQP-4) (Danziger and Zeidel, 2015). Dans un état d'hyperosmolarité, un flux d'eau sortant à travers les AQP-4 étire les membranes et dépolarise les neurones de l'OVLT qui stimulent les neurones magnocellulaires et induisent une libération d'AVP. Simultanément à la sortie d'eau, les canaux cationiques TRPV (canal cationique à potentiel de réception transitoire, sous-famille V) détectent l'étirement mécanique des membranes et permettent la stimulation de la soif et à nouveau de la libération



d'AVP (Danziger and Zeidel, 2015). L'équilibre hydrique est aussi régulé par la soif qui déclenche de la consommation hydrique sous le contrôle de l'osmolarité plasmatique. Des expériences récentes utilisant la technique d'optogénétique chez des animaux vigiles ont montré que le rétrocontrôle négatif sur la soif et la sécrétion de la vasopressine ne sont pas effectués directement par les changements de l'osmolarité plasmatique (fig. 80). Au contraire, il semblerait que ce contrôle s'effectue de manière anticipée, c'est-à-dire avant même que l'osmolarité plasmatique physiologique ne se rétablisse (Watts, 2017). Ces signaux d'anticipation de la soif et de la libération d'AVP convergent vers la même famille de neurones : les neurones homéostatiques de l'organe sous-fornical (SFO) (Mandelblat-Cerf *et al.*, 2017).



**Figure 80 : Anticipation de la soif et contrôle central de la volémie.**

Les neurones de l'organe subfornical (SFO) sont des médiateurs de la soif anticipée (voie indiquée par la flèche bleue). Les neurones du SFO sont activés lorsque les souris sont déshydratées. Leur activité est presque immédiatement inhibée par une consommation hydrique, en raison de signaux, non encore parfaitement identifiés, provenant de la cavité buccale. Ces signaux pourraient impliquer, entre autres, les ganglions trigéminaux. Les neurones du SFO activés projettent vers d'autres structures comme l'aire préoptique médiane (MnPO), l'organe vasculaire de la lame terminale (OVLT) et vers les neurones magnocellulaires à AVP du SON et du PVN. La libération dendritique de vasopressine dans le PVN est perçue par les récepteurs de l'AVP de type V1a par les neurones pré-sympathiques autonomes qui

entraînent une stimulation sympathique des afférences rénales (un contrôle central de la volémie et de l'osmolarité). PP, neurohypophyse, ANS, autonomic nerve stimulation (Bankir *et al.*, 2017).

### 1.2.2 *Hypovolémie*

Une diminution significative du volume sanguin circulant et de la pression artérielle déclenchent la libération de vasopressine (Johnson *et al.*, 1970). Dans un état d'hypovolémie ou lors d'une diminution de la pression artérielle, les barorécepteurs du ventricule gauche, de l'artère carotide et de l'arc aortique détectent la diminution du volume sanguin et de la pression artérielle (Cuzzo *et al.*, 2022). Le signal détecté par ces récepteurs est transmis par le nerf vague qui in fine va stimuler la libération d'AVP par les sites de production (Boone and Deen, 2008). La libération d'AVP en réponse à une hypovolémie n'est pas aussi sensible qu'en condition d'hyperosmolarité. En effet, bien que la relation entre la libération de l'AVP et l'osmolarité soit linéaire, il n'en est pas de même pour le volume plasmatique où la libération d'AVP est exponentielle (Dunn *et al.*, 1973). Des variations de l'osmolarité plasmatique aussi faibles qu'1% déclenche la libération d'AVP, tandis qu'une diminution d'au minimum 8% du volume total sanguin est nécessaire afin d'obtenir une libération significative de la vasopressine (Bankir, 2001; Dunn *et al.*, 1973).

### 1.3 *Cibles de la vasopressine*

Après avoir été libérée dans la circulation générale, la vasopressine va cibler différents tissus par l'intermédiaire de ses récepteurs. Les récepteurs de la vasopressine sont au nombre de 3 : V1a-R, V1b-R et V2-R. Les récepteurs V2 sont couplés à l'activation de l'AMP cyclique, tandis que les récepteurs V1a et V1b (aussi appelé V3) sont des récepteurs couplés à une protéine G (Bankir *et al.*, 2017). Les cibles de l'AVP sont majoritairement associées à la régulation de l'homéostasie hydrique via le rein et les cellules musculaires lisses principalement. Cependant, l'AVP est susceptible d'agir sur de nombreuses autres cibles périphériques ou centrales et elle est

impliquée dans de nombreuses fonctions physiologiques comme par exemple le stress et le métabolisme (Bankir *et al.*, 2017). Je présenterai ci-dessous que les principaux effets de l'AVP sur les cellules musculaires lisses et le rein.

### 1.3.1 Cellules musculaires lisses

Bien que la régulation du tonus vasculaire ne soit pas l'action principale de la vasopressine, elle est nécessaire dans le maintien d'une perfusion tissulaire normale en cas d'hypovolémie par exemple. L'AVP libérée va se fixer à ses récepteurs métabotropiques V1a-R des cellules musculaires lisses. Le couplage avec la protéine G active la phospholipase C (PLC) amenant à la production d'inositol triphosphate (IP-3) et de diacylglycérol (DAG) depuis la membrane cellulaire. L'IP-3 entraîne une libération du calcium intracellulaire depuis le réticulum endoplasmique. Le DAG et le calcium activent ensemble la protéine kinase C (PKC) déclenchant une voie de signalisation phosphorylante. L'activation de cette cascade résulte en la contraction des muscles vasculaires lisses qui va augmenter la résistance périphérique et *in fine* la pression artérielle (Boone and Deen, 2008).

### 1.3.2 Rein

Les récepteurs V2 sont localisés sur les cellules principales du tube collecteur (TC) et, dans une moindre mesure, dans la branche ascendante de Henlé. Tout le long du TC, la vasopressine augmente la perméabilité à l'eau grâce à sa liaison au récepteur V2 et permet d'exercer son rôle de régulateur de l'équilibre hydrique. Les récepteurs situés sur la branche ascendante de Henlé permettent de stimuler la réabsorption du sodium (Gonzalez *et al.*, 2020). Les récepteurs V1a sont également exprimés au niveau rénal mais je me focaliserai sur les récepteur V2. En effet, les rôles

majeurs de l'AVP dans la régulation de l'homéostasie hydrique et sodique par son action antidiurétique sur le rein sont principalement attribués au récepteurs V2 (Bankir *et al.*, 2017).

Ces actions ciblées de la vasopressine permettent essentiellement de maintenir une fonction physiologique de l'espace vasculaire. Elle agit à la fois sur l'hyperosmolarité plasmatique par la réabsorption de l'eau dans les reins, et sur les troubles d'hypovolémie et/ou d'hypotension par la contraction des muscles vasculaires lisses.

#### 1.4 *Activité anti-diurétique de la vasopressine*

L'action de la vasopressine sur le rein va permettre de réguler à la fois les flux d'eau, mais aussi de solutés tels que le sodium et l'urée. Ces processus permettent la concentration des urines dont les mécanismes moléculaires et cellulaires liés à ces phénomènes vont être détaillés ci-dessous.

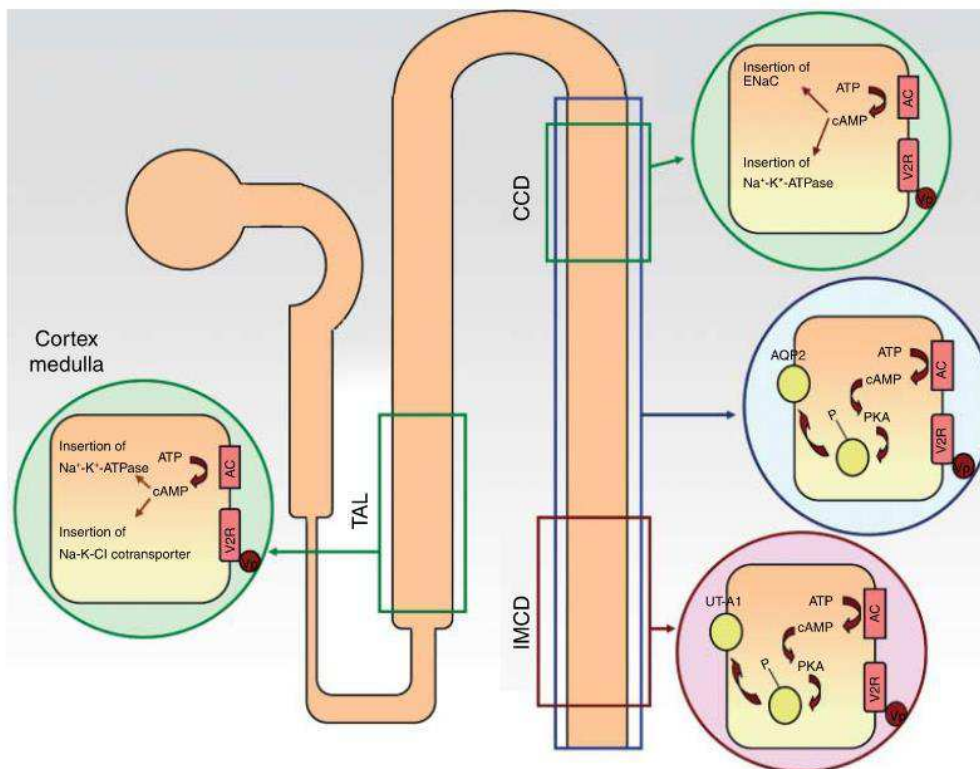
##### 1.4.1 *Régulation de la réabsorption de l'eau*

Le long du tube collecteur (TC), la vasopressine exerce principalement ses effets sur ses récepteurs V2 ce qui entraîne l'activation de l'adénylate cyclase et la production d'AMPc. L'AMPc va activer la protéine kinase A (PKA), une enzyme phosphorylante qui initie une cascade de phosphorylations intracellulaires. Cette cascade va atteindre les vésicules chargées en aquaporine 2 (AQP2) et favoriser leur insertion à la membrane luminale des cellules du TC (Agre and Nielsen, 1996). L'AQP2 va permettre à l'eau de se déplacer passivement dans la cellule, guidée par le gradient osmotique établie par le NaCl et l'urée (fig. 81). Cette densité accrue des canaux va favoriser la réabsorption de l'eau dans le rein et concentrer les urines (Boone and Deen, 2008).

#### 1.4.2 Contrôle des flux de sodium et d'urée

Parallèlement à la réabsorption de l'eau par les AQP2, la vasopressine exerce deux autres effets sur le TC à travers les V2R. Tout d'abord dans le TC cortical et la strie externe de la zone externe de la médullaire rénale, la vasopressine stimule la réabsorption du sodium par ses actions sur le canal sodium épithélial ENaC (fig. 81) (Férraille *et al.*, 2003). Cet effet entraîne l'eau de façon isosmotique et ainsi aide à concentrer tous les autres solutés dans la lumière du tube. Ainsi, l'action de la vasopressine sur le transport de Na<sup>+</sup> entraîne une réabsorption supplémentaire d'eau (Bankir *et al.*, 2010). Un effet supplémentaire de la vasopressine peut être observé, mais seulement lorsque les concentrations circulantes de l'hormone sont élevées. Dans l'anse ascendante de Henlé, la vasopressine va stimuler le cotransporteur Na-K-2Cl et ainsi favoriser la réabsorption du sodium (fig. 81) (Bankir, 2001).

Dans la partie terminale du TC intra-médullaire, la vasopressine augmente la perméabilité à l'urée en activant les transporteurs de l'urée UT-A1 et UT-A3 (Sands, 2003). L'urée est transportée librement grâce à ses transporteurs. Sa concentration va donc augmenter tout au long du tube proximal et de l'anse de Henlé (dû aux effets des mouvements d'eau et d'urée), jusqu'à son arrivée dans la partie terminale du TC. A ce niveau, l'activation des récepteurs par la vasopressine augmente significativement son transport (fig. 81). Cela va entraîner l'urée dans l'interstitium médullaire et ainsi y maintenir une concentration en urée élevée ce qui favorise une réabsorption de l'eau (fig. 81) (Fenton, 2009).



**Figure 81** : Actions de la vasopressine sur le tube collecteur responsable de la réabsorption de l'eau par le rein.

Dans le canal collecteur, l'AVP se lie au récepteur V2 pour initier la synthèse de l'AMPc intracellulaire *via* la Gs/adényl cyclase (AC). L'augmentation de l'AMPc active la PKA qui phosphoryle l'AQP2. Cette voie de signalisation médiée par V2R conduit finalement à l'insertion des vésicules chargées d'AQP2 sur la membrane plasmique apicale. Dans le tube collecteur intra-médullaire terminal (IMCD), l'AVP agit par l'intermédiaire de la PKA pour augmenter la phosphorylation du transporteur d'urée UT-A1. L'AVP exerce un effet sodique via la même voie de signalisation pour induire la translocation du co-transporteur Na-K-Cl dans l'anse de Henlé ascendante (TAL), du canal sodique épithélial (ENaC) dans les tubes collecteurs corticaux (CCD) et de la Na-K-ATPase dans les tubes collecteurs corticaux et l'anse de Henlé ascendante. D'après Cheng *et al.*, 2009.

Ces différents effets combinés de la vasopressine sur le canal collecteur contribuent au rétablissement d'une osmolarité plasmatique physiologique en augmentant l'osmolarité urinaire. En parallèle de l'action de la vasopressine, il existe un système dont le rôle principal est d'assurer le maintien d'une pression artérielle physiologique (le système rénine angiotensine). Son action n'est pas indépendante de celle de la vasopressine et leurs fonctions sont parfois en synergie dans les modulations de l'équilibre hydrominéral.

## 2 Le Système Rénine-Angiotensine

### 2.1 Fonction

Le système rénine-angiotensine (SRA) est un régulateur critique du volume sanguin et de la résistance vasculaire systémique. Bien que le baroréflexe (déclenché par les barorécepteurs) réponde rapidement afin de diminuer la pression artérielle, le SRA possède une réponse adaptée aux altérations chroniques. Il est composé de trois composants majeurs : la rénine, l'angiotensine II et l'aldostérone. Ensemble, ils opèrent à augmenter la pression artérielle en réponse à une diminution de la pression artérielle rénale et/ou à une diminution de l'apport en sel au tubule contourné distal des reins. Le système rénine-angiotensine-aldostérone agit en modifiant le volume sanguin, la réabsorption du sodium, la sécrétion de potassium, la réabsorption de l'eau et le tonus vasculaire. À travers ces mécanismes, le corps peut augmenter sa pression artérielle d'une manière prolongée (Fountain and Lappin, 2022).

### 2.2 Mécanismes

Dans les artérioles afférentes du rein, des cellules spécialisées appelées cellules juxtaglomérulaires (JG) contiennent de la prorénine. Alors que la prorénine est sécrétée de manière constitutive sous sa forme inactive, l'activation des cellules JG entraîne le clivage de la prorénine en rénine. L'activation de ces cellules se produit en réponse à une diminution de la pression artérielle ou à une activation par les cellules de la macula densa en réponse à une diminution de la charge en sodium dans le tubule contourné distal (Nehme *et al.*, 2019; Ren *et al.*, 2019).

Une fois la rénine libérée dans le sang, elle peut agir sur sa cible, l'angiotensinogène. La rénine va cliver l'angiotensinogène en angiotensine I. L'angiotensine I est physiologiquement inactive mais agit comme un précurseur de l'angiotensine II (Laghlam *et al.*, 2021).

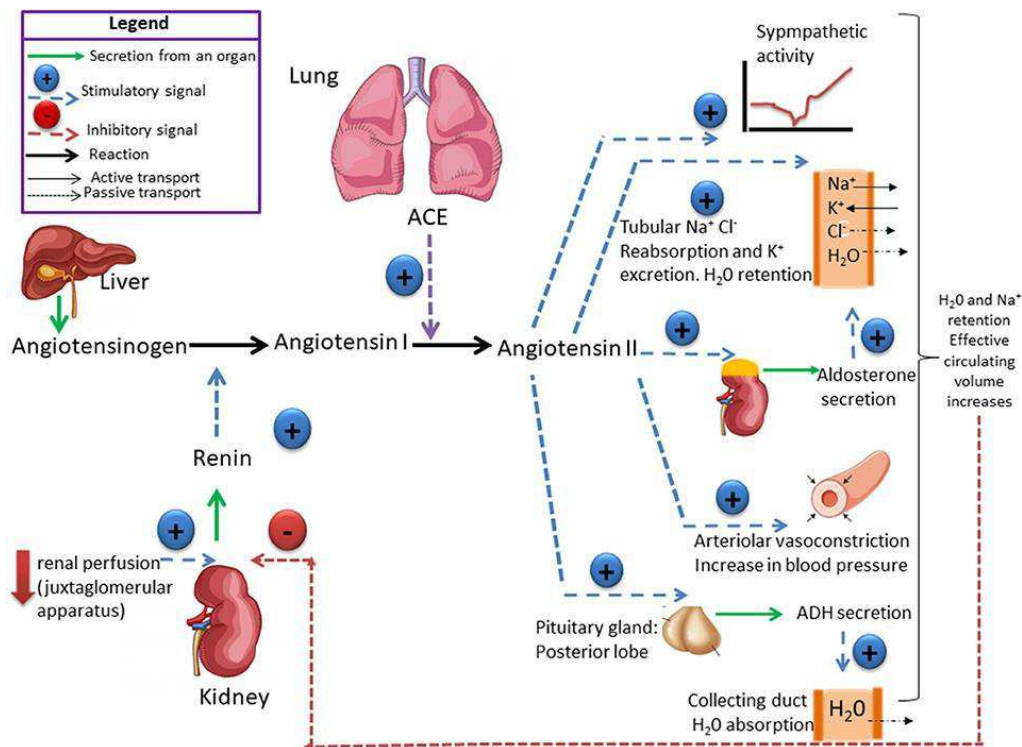
La conversion de l'angiotensine I en angiotensine II est catalysée par une enzyme appelée enzyme de conversion de l'angiotensine (ECA). Après avoir été convertie en angiotensine II, elle va agir à la fois sur le cortex surrénalien, les artérioles et dans les organes circumventriculaires en se liant aux récepteurs de l'angiotensine II de type I (AT1) et de type II (AT2) (fig. 82) (Bernstein *et al.*, 2018).

- Dans le tubule convoluté proximal du rein, l'angiotensine II agit en augmentant l'échange Na-H, ce qui accroît la réabsorption du sodium (Na). L'augmentation des taux de Na dans l'organisme a pour effet d'augmenter l'osmolarité du sang, entraînant un déplacement d'eau dans le volume sanguin et l'espace extracellulaire (ECF).
- L'angiotensine II agit également sur le cortex surrénalien, en particulier sur la zone glomérulée. Elle y stimule la libération d'aldostérone. L'aldostérone affecte la réabsorption du sodium et l'excrétion du potassium au niveau du tubule distal et du canal collecteur du néphron.
- L'effet de l'angiotensine II sur la vasoconstriction a lieu dans les artérioles systémiques. À cet endroit, l'angiotensine II se lie aux récepteurs couplés aux protéines G, entraînant une cascade de messagers secondaires qui provoque une puissante vasoconstriction artériolaire. Cela a pour effet d'augmenter la résistance périphérique totale, entraînant une augmentation de la pression artérielle.
- Enfin, l'angiotensine II agit sur le cerveau. Là, elle a trois effets. Premièrement, elle se lie à ces récepteurs neuronaux du SFO et de l'OVLT ce qui stimule la soif et augmente la consommation d'eau (Noda and Matsuda, 2022). Deuxièmement, les neurones du SFO activés par l'angiotensine II projettent, comme je l'ai rapporté préalablement, dans le PVN



et le SON où ils stimulent la libération d'AVP par la neurohypophyse (Noda and Matsuda, 2022). L'AVP agit pour augmenter la réabsorption d'eau dans le rein en insérant des canaux aquaporines au niveau du canal collecteur. Troisièmement, l'angiotensine II diminue la sensibilité du réflexe barorécepteur. Cela diminue la réponse des barorécepteurs à une augmentation de la pression artérielle, ce qui serait contre-productif par rapport à l'objectif du SRA.

L'effet net de ces interactions permet une augmentation du sodium corporel total, de l'eau corporelle totale et du tonus vasculaire.



**Figure 82 :** Le système rénine-angiotensine (SRA) est fortement impliqué dans le maintien de l'équilibre sodique et hydrique.

La rénine catalyse la conversion de l'angiotensinogène en angiotensine I qui est convertie par l'enzyme de conversion de l'angiotensine (ECA) en angiotensine II (ANGII). L'ANG II contrôle la sécrétion d'aldostérone, qui stimule la rétention de Na<sup>+</sup> et celle de l'hormones antidiurétiques (ADH) qui stimule la réabsorption de H<sub>2</sub>O par le rein. Le volume plasmatique et l'osmolalité du plasma contrôlent l'appétit salin et la consommation hydrique. Une consommation élevée de Na<sup>+</sup> entraîne une modification du volume plasmatique et de l'osmolalité, qui exerce une

rétroaction négative sur la sécrétion de rénine. En fin de compte, une consommation élevée de  $\text{Na}^+$  induit une diminution de la concentration d'aldostérone, ce qui réduit la réabsorption de  $\text{Na}^+$  et augmente l'excrétion de sodium. Une consommation élevée de  $\text{Na}^+$  n'induit pas de changement dans la concentration plasmatique d'ADH, si l'apport d' $\text{H}_2\text{O}$  est suffisant pour maintenir un équilibre  $\text{Na}^+ / \text{H}_2\text{O}$ . D'après de Almeida and Coimbra, 2019.

Ainsi, le système vasopressinergique (SVP) et le système rénine-angiotensine sont activés par les mêmes stimuli et parfois engagés dans les mêmes voies de régulations. Il apparaît donc rationnel que leurs actions soient liées. Les dernières découvertes montrent que le RSA et le SVP interagissent à différents niveaux (Szczepanska-Sadowska *et al.*, 2018). Tout d'abord, l'angiotensine II agit sur les récepteurs AT1 qui jouent un rôle significatif dans la libération d'AVP par les neurones vasopressinergiques (Fyhrquist *et al.*, 1979; Takahashi *et al.*, 2010), tandis que l'AVP par l'activation de ses récepteurs V1a régule la libération de rénine dans les reins (Aoyagi *et al.*, 2008). Ensuite, l'angiotensine II et l'AVP, activant AT1R et V1aR respectivement, exercent une vasoconstriction, augmentent la contractilité cardiaque, stimulent le système sympatho-surrénalien et augmentent la pression artérielle (Szczepanska-Sadowska *et al.*, 2018). Ensemble, ils agissent de façon antagoniste dans la régulation de la pression artérielle par le baroréflexe (Oikawa *et al.*, 2007; Tan *et al.*, 2007). Enfin, l'action coopérative de l'angiotensine II sur AT1R et de l'AVP activant à la fois V1aR et V2R dans le rein est nécessaire pour la régulation appropriée du flux sanguin rénal et de la réabsorption efficace du sodium et de l'eau (Amin *et al.*, 2005; Oliverio *et al.*, 2000). Par ailleurs, chacun d'entre eux optimisent la libération de l'aldostérone et potentialisent son action dans les tubules rénaux (Birumachi *et al.*, 2007; Foster *et al.*, 1997).

Au-delà des actions de la vasopressine dans la régulation de l'équilibre hydrique, le système rénine-angiotensine est tout aussi important dans sa régulation des fonctions cardiaques normales qui dépend d'un équilibre hydrique physiologique régulé par la vasopressine. Le contrôle de ces

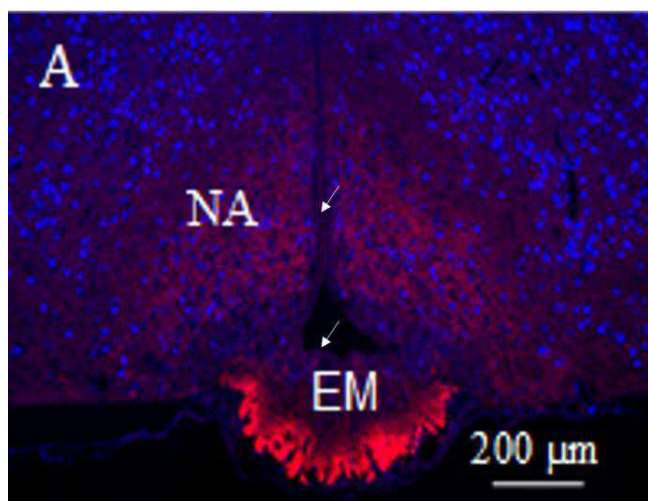
fonctions serait donc grandement perturbé si l'un de ces effecteurs (vasopressine, rénine, angiotensine II) venait à être dérégulé.

À l'aide de ces connaissances, des travaux de Miyata et collaborateurs et de Imamura et collaborateurs, notre objectif a été d'étudier les effets d'une déficience en tPA dans l'équilibre hydrique grâce à l'utilisation d'une nouvelle souche de souris tPA<sup>Null</sup>, théoriquement dépourvue d'anomalies génétiques rapportées pour les souches congéniques.

## **Objectifs**



Les travaux réalisés dans le chapitre 1, m'ont permis d'acquérir des bases solides concernant les principaux constituants hypothalamiques (les neurones et les différentes cellules gliales) et le contrôle du comportement alimentaire. Mon intégration dans l'équipe de recherche du professeur Denis Vivien, lors de ma dernière année de thèse, m'a conduit à me réorienter sur la molécule phare de notre laboratoire i.e. le tPA. J'ai donc souhaité étudier le tPA dans la sphère neuroendocrine et plus particulièrement sur le comportement alimentaire. En effet, des résultats préliminaires du laboratoire suggeraient que le tPA pourrait avoir un rôle majeur dans le contrôle du comportement alimentaire. En effet, les immunomarquages anti-tPA révélèrent la présence d'une forte immunoréactivité au sein de ce noyau suggérant, entre autres, que le tPA pourrait agir sur la neurophysiologie des neurones à POMC et/ou NPY de ce noyau et donc affecter le comportement alimentaire. Les immunomarquages présentés ci-dessous illustrent les fondements de notre première hypothèse.



**Distribution de l'immunomarquage anti-tPA dans l'hypothalamus de souris.**

L'immunomarquage anti-tPA est fortement exprimé dans l'éminence médiane (EM) et il « dessine » le noyau arqué de l'hypothalamus (NA) suggérant une forte expression au sein de ce noyau. Notez que les tanycytes (flèches) ne semblent pas présenter d'immunomarquage anti-tPA à ce grossissement. Travaux réalisés par le Dr. Morgane Louessard.

Comme nous le verrons par la suite, notre première hypothèse s'est rapidement révélée fautive lors d'une étude sur des souris tPA<sup>Null</sup> et WT testées en cages métaboliques. Cette piste associant le tPA et le comportement alimentaire a donc été abandonnée.

Parallèlement, je souhaitais également poursuivre mes travaux sur les tanycytes en étudiant le tPA dans cette population cellulaire caractérisée par une certaine plasticité structurale associée à des conditions physiologiques particulières (le jeûne par exemple) et/ou à la neurogenèse. Malheureusement et étonnamment, j'ai pu rapidement confirmer que les tanycytes étaient, contrairement aux épendymocytes qui bordent les ventricules (Louessard et al. 2016a), dépourvus de tPA et des transcrits codants pour cette protéine (j'illustrerai ces observations dans la partie résultats).

Enfin, l'analyse bibliographique que j'ai réalisée et mes observations lors de l'étude réalisée en cages métabolique sur les souris tPAnull et WT m'ont rapidement poussé à réorienter mes recherches sur l'implication du tPA dans le contrôle de l'équilibre hydrominéral.

En effet, comme je l'ai présenté dans l'introduction, les travaux de l'équipe de Miyata (Miyata *et al.* 2005 ; Imamura *et al.* 2010) ont révélés que le tPA pouvait jouer un rôle majeur au sein du système vasopressinergique hypothalamo- neurohypophysaire et ce à la fois chez le rat et la souris. Dans leur première étude réalisée chez le Rat (Miyata *et al.* 2005 ), les auteurs rapportent que le tPA est libéré (de manière calcium dépendante) par les terminaisons des axones de la neurohypophyse et ils suggèrent que le tPA et la MMP-3 pourraient être responsables de la plasticité structurale des neurones magnocellulaires vasopressinergiques lors d'une stimulation chronique hyper-osmotique (Miyata *et al.*, 2005). Ce fut la première étude associant clairement le tPA au contrôle de l'équilibre hydrominéral.

Dans leur seconde étude réalisée sur des souris déficientes en tPA ou en Plg (Imamura *et al.*, 2010), les auteurs ont rapporté une régulation anormale de l'osmolarité plasmatique chez les souris tPA et Plg KO. Ils montrent également que lors d'une stimulation osmotique aiguë, les souris

tPA KO, mais pas les Plg KO, présentent une altération de la capacité à sécréter de l'AVP dans la circulation sanguine. Dans le cas d'une stimulation osmotique chronique, les animaux KO pour le tPA et le plasminogène ont montré une plus faible capacité à sécréter de l'AVP dans la circulation sanguine. Les auteurs rapportent de plus que le tPA recombinant favorise la libération d'AVP à partir de NH isolées indépendamment d'une activation potentielle via les récepteurs LRP. Enfin, ils montrent qu'une stimulation osmotique chronique diminue le niveau d'expression de la laminine des microvaisseaux neurohypophysaires chez les souris tPA KO, tPA WT et Plg WT mais pas chez les souris déficientes en plasminogène (Plg KO). L'ensemble de ces observations suggère que, chez la souris, la sécrétion d'AVP est induite et/ou régulée par le tPA. Le rôle du tPA dans la libération de l'AVP reposerait en grande partie sur sa capacité à dégrader indirectement la laminine (composant de la MEC) par l'intermédiaire de la plasmine. La dégradation de la MEC serait un mécanisme tardif favorisant la libération de l'AVP dans le sang. Ils concluent leur article en disant que, chez la souris, le système tPA-plasminogène s'avère crucial dans le contrôle de la sécrétion de la vasopressine dans la circulation sanguine.

En confrontant les résultats obtenus par cette équipe chez le rat (Miyata *et al.*, 2005) et la souris (Imamura *et al.*, 2010), des différences inter espèces apparaissent concernant la présence ou non de tPA dans les astrocytes de la neurohypophyse. Il est également regrettable que la distribution du tPA n'ait pas été décrite dans le SON de la souris ni même au niveau du noyau para ventriculaire chez les deux espèces. De plus, les protocoles utilisés pour induire une activation hypothalamo-neurohypophysaire ne sont pas comparables dans les deux études. Enfin et comme je l'ai souligné précédemment l'utilisation d'une souche de souris congénique déficiente en tPA pourrait ne pas être idéale.



Afin de pallier certaines critiques et/ou de confirmer et étendre les travaux antérieurs, j'ai réalisé mes travaux de recherche organisés selon un grand axe de recherche centré sur l'implication du tPA dans le contrôle de l'équilibre hydrominéral à partir de notre nouvelle souche de souris déficiente en tPA : les souris tPA<sup>Null</sup>.

### **Etude de(s) implication(s) du tPA dans le contrôle de l'équilibre hydrominéral sur une nouvelle souche de souris déficiente en tPA : les souris tPA<sup>Null</sup>.**

Ces travaux ont été réalisés suivant trois objectifs principaux :

**Objectif 1** : Etudes histologiques dans le but de confirmer et étendre les études antérieures (Imamura *et al.*, 2010) : Distribution du tPA et de la vasopressine dans l'axe hypothalamo-neurohypophysaire des animaux tPA WT et tPA<sup>Null</sup>. Ces études ont été réalisées dans le but d'établir la distribution du tPA à l'aide de l'immunohistologie et celle des transcrits (ARNm) codants le tPA en utilisant l'hybridation in situ.

**Objectif 2** : Etude de l'activité métabolique chez les animaux tPA<sup>Null</sup> et WT

**Objectif 3** : Etudes de paramètres physiologiques dans différentes conditions expérimentales chez des souris sauvages et tPA<sup>Null</sup> :

- Étude de l'osmolarité plasmatique et urinaire
- Étude du fonctionnement de l'appareil urinaire (miction)
- Étude de la pression artérielle et du rythme cardiaque

## **Matériels et Méthodes**



## **Animaux**

Les expériences ont été réalisées sur des souris (*Mus musculus*) mâles âgées de 8 semaines déficientes en tPA, les tPA<sup>Null</sup> et leur contrôle sauvages tPA WT (ou WT) (Animalerie : Centre Universitaire de Ressources Biologiques, Université de Normandie, Caen, France ; agrément #33644) ainsi que des animaux sauvages C57BL/6J (Janvier Labs, Le genest-Saint-Isle France). Ils ont été hébergés selon un cycle nyctéméral composé de 12 heures de lumière et 12 heures d'obscurité dans des cages standard en polypropylène (22 × 37 × 19 cm, Charles River, L'Arbresle, France ; 5 souris par cage) et dans une pièce maintenue à une température de 21°C ± 1°C. Toutes les expériences ont été menées conformément à la loi française sur l'éthique (décret 2013-118 ; agrément # 33644) et aux directives du Conseil de la Communauté Européenne (2010/63/UE).

## **Génération de souris transgéniques**

Les souris tPA<sup>Null</sup> (souche C57BL/6NTac) ont été générés comme précédemment décrits (Pasquet et al., 2019a). L'exon 3 du gène *Plat* est constitutivement délété *via* le système Cre-lox ont été générés par l'Institut Clinique de la Souris (ICS, Illkirch, France) en croisant les souris tPA<sup>flox</sup> avec une lignée de souris exprimant de manière ubiquitaire la Cre, Rosa26Cre (Birling *et al.*, 2012).

## **Préparation des tissus cérébraux**

*Tissus pour les études immunohistologiques* : les souris tPA<sup>Null</sup> et WT ont été profondément anesthésiées et perfusées avec une solution saline héparinée 0.2% à 4°C (5000 UI/ml Panpharma ; Luitré, France) suivi par 150 mL de solution de 4% de paraformaldéhyde froid afin d'obtenir une fixation tissulaire en profondeur. Les cerveaux et hypophyses ont été disséqués puis incubés à 4°C pendant 48 heures dans une solution de tampon phosphate à 20% de sucrose et renouvelés une fois à 24 h. Suite à cela, les tissus sont cryopréservés dans de l'agent d'enrobage Cryomatrix™ (Thermo

Scientific) et stockés à  $-80^{\circ}\text{C}$ . Les tissus ont ensuite été découpés au cryostat en sections de  $10\ \mu\text{m}$  (CM3050, Leica Microsystems) et conservés à  $-80^{\circ}\text{C}$  jusqu'à leur utilisation.

*Tissu pour l'hybridation in situ* : toutes les surfaces et outils ont été nettoyés avec le RNaseZap® (Sigma) pour s'assurer que nos tissus ne soient pas contaminés par les RNases. Les souris WT ont été profondément anesthésiées et perfusées en intracardiaque avec une solution saline froide supplémentée en héparine à 0,2%. Après exsanguination, le cerveau et l'hypophyse sont disséqués puis directement inclus dans l'agent d'enrobage Tissue-Tek OCT (Sakura) et congelés dans de l'isopentane refroidi à  $-70^{\circ}\text{C}$  à l'aide de glace carbonique. Les tissus ont ensuite été découpés au cryostat en sections de  $14\ \mu\text{m}$  (CM3050, Leica Microsystems) et conservés à  $-80^{\circ}\text{C}$  jusqu'à leur utilisation.

### **Immunomarquage et hybridation in situ**

Les anticorps suivants ont été utilisés : anticorps anti-AVP (Peninsula Laboratories, BMA Switzerland; T-35047; 1/1500), anticorps anti-tPA (abcam, Cambridge UK ; ab62763 ; 1/1500), anticorps anti-NP2 (Sigma-Aldrich, MO, USA ; MABN856 ; 1/2000), anticorps anti-MECA-32 (BioLegend, CA, USA ; 120501 ; 1/1500), anticorps anti-collagen type IV (ThermoFisher, MA, USA ; 600-101-MN4 ; 1/800) et anticorps anti-GFAP (ab4674 abcam).

Les coupes de cerveau sont rincées 3 fois dans une solution de PBS, puis incubées avec les anticorps primaires appropriés sur la nuit à température ambiante. Après 3 rinçages dans du PBS1X, les anticorps secondaires adaptés couplés à l'Alexa Fluor 488 ou à la Cyanine3 (1/800 ; Jackson ImmunoResearch, West Grove, CA, USA) ont été incubés à température ambiante pendant 90 minutes. Une fois lavée, les lames sont montées avec lamelle et le milieu de montage Fluoromount-G contenant du DAPI pour la coloration des noyaux (Thermofisher, MA, USA ;

15596276). Pour les expériences de STED, nous avons utilisé deux anticorps secondaires adaptés à la configuration du laser de déplétion : un anticorps anti guinea-pig pour la détection de l'AVP couplé à l'Alexa-Fluor 532 (Invitrogen, MA, USA ; A11009) et un anticorps anti rabbit pour la détection du tPA couplé à l'Alexa-Fluor 568 (Invitrogen, MA, USA ; A11075).

Pour l'hybridation, nous avons utilisé le kit RNAscope™ Multiplex Fluorescent V2 (Biotechne, MN, USA) selon les instructions du fabricant. Toutes les solutions de laboratoire ont été préparées à l'avance avec de l'eau autoclavée à 0,1% DEPC (Sigma-Aldrich, MO, USA ; D5758) pour éviter toutes contaminations par les RNases et les DNases. Notre cible a été révélée avec la sonde *PLAT* (Biotechne, MN, USA ; 586951), couplée au fluorophore Opal 520 (Akoya, MA, USA ; SKU FP1487001KT ; 1/5000). À la fin du protocole, nous avons effectué les étapes d'immunomarquages avec les anticorps primaires incubés pendant la nuit à 4°C. Le protocole a ensuite été poursuivi comme expliqué précédemment, mais contre-coloré avec une solution de DAPI (1/5000) et avec l'utilisation du milieu de montage ProLong™ Gold (ThermoFisher, MA, USA ; P36930).

### **Injections intraveineuses tPA<sup>555</sup>**

*Injections réalisées par le Dr Jonathane Furon*

Dans le but d'étudier le passage éventuel du tPA sanguin vers les zones cérébrales dépourvues de barrières hématoencéphaliques, nous avons marqué du tPA avec de l'alexa 555 afin de générer du tPA fluorescent (tPA<sup>555</sup>). La technique de marquage a été décrite précédemment (Furon, *et al.*, en préparation). Les souris sont placées sous anesthésie dans un cadre stéréotaxique et 200µL de solution saline (0.9% NaCl) contenant 50 µg de tPA<sup>555</sup> a été injectée dans la veine de la queue durant approximativement 5 secondes.

Suivant l'injection intraveineuse, les souris sont gardées sous anesthésie placées dans un cadre stéréotaxique et surveillées durant un laps de temps précis : 15, 30 ou 45 minutes. Après le temps requis, les souris ont été immédiatement soumis à une perfusion intracardiaque de solution saline héparinée à 0.2% suivi par une solution de paraformaldéhyde à 4%. Suite à la perfusion, le cerveau et l'hypophyse des animaux sont extraits et placés dans une solution de tampon phosphate à 20% de sucrose pendant 48 heures, et renouvelés une fois. Suite à cela, les tissus sont cryopréservés dans de l'agent d'enrobage Cryomatrix™ (Thermo Scientific) et stockés à -80°C. Les tissus ont ensuite été découpés au cryostat en sections de 10 µm (CM3050, Leica Microsystems) et conservés à -80°C jusqu'à leur utilisation.

### **Microscopie et STED**

*Les images obtenues grâce au STED ont été acquise par Erwan Baudron.*

Les images ont été capturées numériquement sur un microscope à épifluorescence Leica DM6B couplé à une caméra Hamamatsu Orca Flash 4.0, visualisées avec le logiciel Metamorph (Version 2.2.0 ; Molecular Devices), et traitées ensuite à l'aide du logiciel FIJI (Schindelin *et al.*, 2012).

Les images obtenues avec la technologie Stimulated Emission Depletion (STED) ont été capturés avec un microscope confocal inversé TCS SP8 (Leica Microsystems, Mannheim Germany) et visualisés grâce au logiciel LAS X (Leica Microsystems, Mannheim Germany). Les fluorophores ont été excités avec une lumière blanche pulsée de 80MHz et le signal STED a été obtenu par un laser de déplétion de 650nm.

### **Cages métaboliques**

Les souris ont été habituées au système pendant 72 heures avant la collection des données.

Les animaux, tPA<sup>Null</sup> et WT ont été transférés à la Plateforme d'Analyses Comportementales, établie à l'Institut de la Recherche et de l'Innovation Biomédicale (IRIB) de l'Université de Rouen. Les animaux sont placés individuellement dans un système de calorimétrie indirecte (PhenoMaster, TSE Systems; Bad Homburg, Germany), composé de 16 cages. Le système enregistre de multiples paramètres simultanément chaque minute. Durant un total de trois phases claires et trois phases sombres (72 h). Les prises alimentaires et hydriques ont été évaluées avec un système de pesée connecté à la mangeoire et à au biberon d'eau. L'activité ambulatoire et de redressement ont été enregistré avec un système de faisceau lumineux infrarouge multidimensionnel. Un calorimètre à circuit ouvert permet de mesurer la consommation d'O<sub>2</sub> et la production de CO<sub>2</sub> en établissant la dépense énergétique ( $EE = VO_2 \times (3.815 + (1.232 \times (VCO_2/VO_2))) \times 4.1868$ ), ainsi que le Rapport d'Echange Respiratoire ( $RER = VCO_2/VO_2$ ). Les souris sont maintenues dans un environnement à température constante de 23 °C ± 1.

### **Prélèvements plasmatiques, urinaires et analyses**

L'urine a été recueillie chez les animaux par miction spontanée. Les souris ont été placées individuellement pendant 1 heure dans des cages d'hébergement habituel contenant une fine couche de sable hydrophobe LabSand (Coastline Global ; PA, USA). Les souris ont ensuite été retirées des cages. L'urine va perler sur le sable et sera récoltée à l'aide d'une seringue et d'une aiguille puis placée dans un tube adéquat pour être centrifugé 15 min à 4000 g avant d'être stockée à -80°C jusqu'à leur utilisation. Le sable sera changé et les cages nettoyées après chaque collecte. L'expérience est répétée après 24 heures de privation hydrique, la collecte des urines a eu lieu au cours des 2 dernières heures, donc entre 22 heures et 24 heures de privation. Chaque collecte d'urine a eu lieu à 13h pour respecter la fluctuation du rythme circadien.



Le plasma a été prélevé chez les animaux au cours de l'euthanasie dans des conditions de contrôle ou après 24h de privation hydrique. Une seringue de 1 ml avec une aiguille montée de 25 g a été utilisée pour le prélèvement (BD Biosciences ; Hyaryana, Inda). Auparavant, chaque seringue a été cotée d'héparine sodique (Panpharma ; Luitré, France) à 5000 UI/ml dilué 10 fois, puis 100 ul sont prélevés dans chaque seringue pour un volume total de plasma collecté de 1 ml. Nous avons une concentration finale de 50 UI/ml pour l'héparine sodique par échantillon. Les échantillons sont gardés dans la glace puis rapidement centrifugés 15 min à 4000 g afin de récupérer le plasma. De même que pour les urines la mise à mort des animaux permettant de récupérer le plasma a lieu en début d'après-midi.

*Les analyses ont été pratiquées par le Pr Stéphane Allouche dans le service de Biochimie du C.H.U. de Caen*

L'analyse des échantillons a été réalisée avec l'automate Beckman Coulter (CA, USA). Le module ISE a été utilisé pour les mesures de  $\text{Na}^+$  et  $\text{Cl}^-$ , il utilise des électrodes à membrane d'éther couronne pour le sodium et une membrane en PVC à orientation moléculaire pour le chlorure qui sont spécifiques à chaque ion d'intérêt dans l'échantillon (Burtis *et al.*, 2001). Pour la créatinine, un test de réaction enzymatique en chaîne a été utilisé. L'absorbance est ensuite mesurée à 600/700 nm, où la concentration de créatinine est proportionnelle au niveau d'absorbance. Le glucose est mesuré avec la méthode à l'hexokinase. L'absorbance est ensuite mesurée à 340 nm, l'augmentation de l'absorbance est proportionnelle à la concentration en glucose de l'échantillon (Barthelmai et Czok, 1962). Le test cinétique UV est utilisé pour la mesure de l'urée. L'absorbance du NADH par unité de temps est inversement proportionnelle à la concentration d'urée (Talke et Schubert, 1965). Pour les mesures d'osmolarité, nous avons utilisé l'osmomètre Microsample Fiske® 210 (Advanced

Instrument ; Horsham, Royaume-Uni), il détermine l'osmolalité des solutions en utilisant la loi de la cryométrie (FPD).

### **Mesures de la pression sanguine**

La pression artérielle a été mesurée avec le système d'analyse de la pression artérielle non invasif Visitech System. Ce système consiste en des mesures au niveau de la queue des souris qui sont éveillées. Dans ce but, les souris ont été contentionnées sur une plaque chauffée, leur queue étant ensuite placée dans un manchon où une membrane en expansion exercera une pression sur la queue pour obtenir des valeurs de pression artérielle. Chaque souris a été habituée au système une fois avant l'expérience. Pendant la mesure, ils ont été placés 2 par 2 dans le système, subissant 4 mesures de test, nous permettant d'ajuster la position du matériel et de la queue en cas de non-détection. Il permet également à la souris de s'adapter et de se calmer pour réduire la quantité de mouvement lors des mesures de données réelles. L'enregistrement des données a été effectué sur 8 mesures successives, puis la diastole et la systole ont été déterminées avec le graphique obtenu pour chaque mesure réussie, la valeur finale correspondant à la moyenne de toutes les valeurs mesurées. La fréquence cardiaque a été mesurée simultanément à la pression artérielle par le système. La même expérience a été répétée après 24h de privation d'eau, les mesures ont été réalisées dans les deux conditions expérimentales à 13h.

### **Analyses statistiques**

Les analyses statistiques ont été réalisées avec GraphPad (version 8.0). Les ensembles de données multiples composés de 2 groupes indépendants ont été analysés avec un test *t* de Student ou le test non-paramétrique de Mann-Whitney lorsque les données ne suivaient pas une loi normale (tests de Shapiro-Wilk). Lorsque plus de 2 groupes indépendants sont comparés, nous avons utilisé une

ANOVA à un facteur ou le test non-paramétrique Kruskal-Wallis. Enfin, si deux facteurs définissent les ensembles de données, nous avons alors utilisé une ANOVA à deux facteurs. La significativité statistique est établie si  $p < 0,05$ .

## Résultats



**Dysregulation of water balance in a new tPA deficient mouse model the tPA<sup>Null</sup> mice.**

**Regnauld C.**<sup>1</sup>, Furon J.<sup>1</sup>, Baudron E.<sup>1</sup>, Allouche S.<sup>1,2</sup>, Vivien D.<sup>1,3</sup>, Maubert E.<sup>1</sup>

Affiliations:

**1** Normandie Univ, UNICAEN, INSERM, GIP Cyceron, Institut Blood and Brain @Caen-Normandie (BB@C), UMR-S U1237, Physiopathology and Imaging of Neurological Disorders (PhIND), Caen, FRANCE.

**2** Department of Biochemistry, University Hospital of Caen, Caen, France.

**3** Department of clinical research, Caen University Hospital, CHU Caen, France.

**Article en préparation**Résumé :

Les travaux visant à étudier les modifications fonctionnelles liées à une perte constitutive du tPA ont souvent été réalisées chez le modèle tPA KO (souche 129) de Carmeliet et coll. (1994). Au vu des mutations passagères et des anomalies génétiques liées à cette souche (Szabo *et al.*, 2016), il semble important de comparer les phénotypes observés chez les tPA KO dans le modèle isogénique que nous avons développé au laboratoire (tPA<sup>Null</sup>). Dans cette étude, nous avons procédé à l'étude du tPA dans les fonctions associées à l'équilibre hydrominéral dont l'osmolarité urinaire, plasmatique et la pression artérielle. Nous avons révélé la présence du tPA dans les corps cellulaires des neurones magnocellulaires vasopressinergiques hypothalamiques et dans leurs terminaisons axonales de la neurohypophyse d'animaux tPA WT. En condition physiologique, les animaux tPA<sup>Null</sup> montrent une consommation hydrique plus importante que leur contrôle WT. Nous n'avons pas observé de différences dans l'osmolarité urinaire et plasmatique entre les animaux tPA<sup>Null</sup> et tPA WT, ni dans la miction en condition physiologique. Par ailleurs, après une privation hydrique de 24h, les animaux déficients en tPA présentent une osmolarité urinaire plus faible que

leur contrôle WT, et leur volume mictionnel s'avère être en quantité moins importante. De plus, les animaux tPA<sup>Null</sup> montrent une hypertension artérielle après la privation hydrique qui n'est pas observée chez les animaux tPA WT.

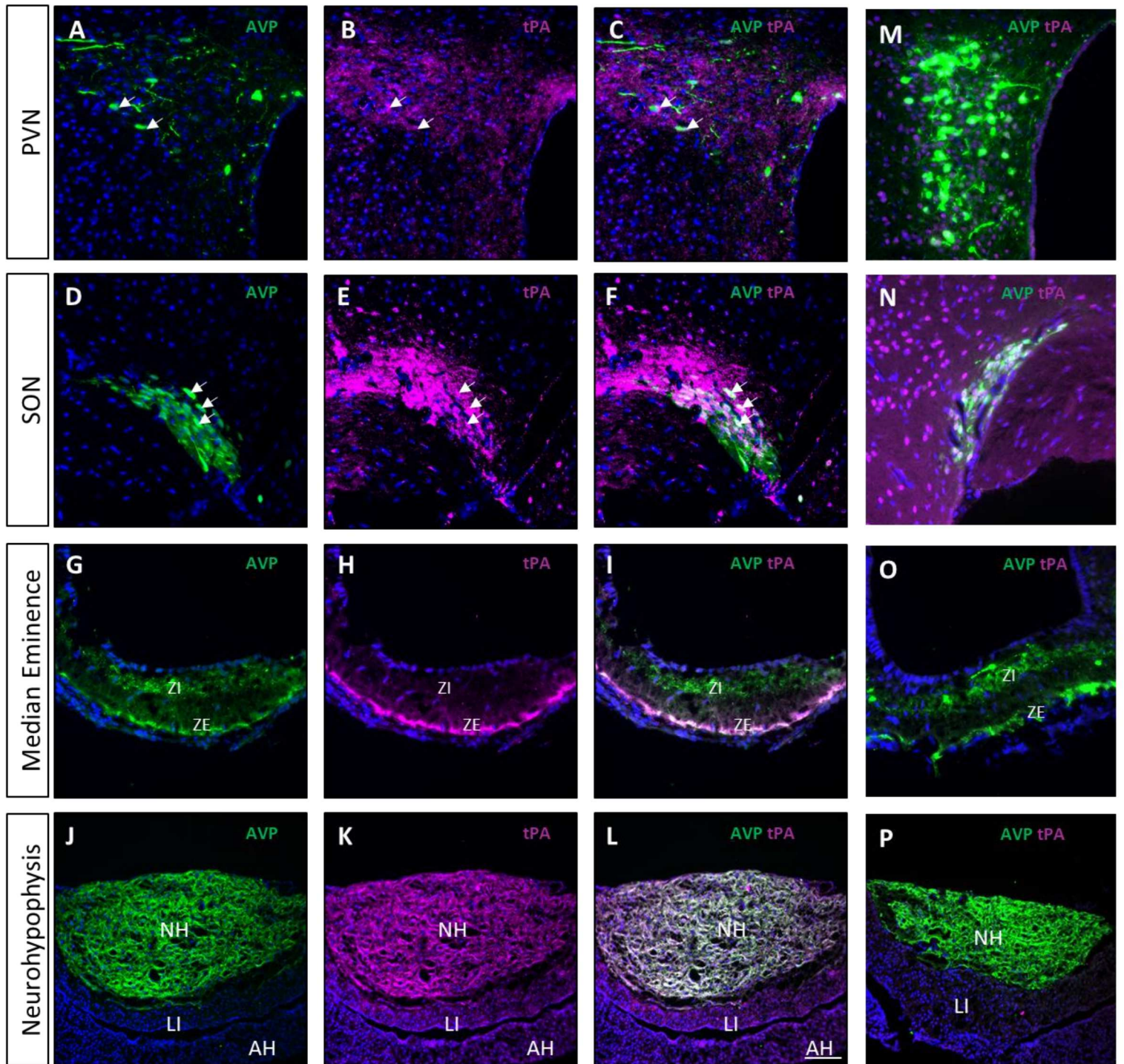
Principaux résultats :

- Le tPA est détecté chez les animaux tPA WT dans les neurones à AVP des noyaux SON et PVN de l'hypothalamus, et dans les terminaisons nerveuses des neurones de la neurohypophyse.
- En condition physiologique les animaux tPA<sup>Null</sup> présentent un comportement de polydipsie, un métabolisme énergétique comparable aux WT, une osmolarité urinaire et plasmatique physiologique mais un rythme cardiaque anormalement élevé.
- La privation hydrique entraîne chez les animaux tPA<sup>Null</sup>, une diminution de l'osmolarité urinaire, une diminution du volume mictionnel et une augmentation de la pression artérielle en comparaison des animaux tPA WT.

***Distribution du tPA et de la vasopressine dans les neurones magnocellulaires vasopressinergiques des animaux tPA WT***

Notre premier objectif consiste à mettre en évidence la codétection de l'AVP et du tPA dans les neurones vasopressinergiques de l'hypothalamus. Les immunomarquages des protéines AVP et tPA mettent en évidence la présence du tPA dans le PVN et le SON hypothalamique (fig. 83A-D). On observe une colocalisation du tPA et de l'AVP dans certains neurones magnocellulaires du PVN (flèches blanches fig. 83C) et du SON (flèches blanches, fig. 83F). A faible grossissement, l'immunomarquage anti-tPA est colocalisé avec l'AVP dans la zone externe de l'EM (fig. 83I), cependant, on ne détecte que l'AVP dans la zone interne de l'EM (fig. 83I). Un immunomarquage intense anti-AVP est observé dans la neurohypophyse colocalisée avec celui du tPA (fig. 83L). Aucun immunomarquage anti-AVP n'est détecté dans le lobe intermédiaire et l'adénohypophyse (fig. 83J), au contraire de l'immunomarquage anti-tPA qui y est observé ponctuellement (fig. 83K). La spécificité de nos immunomarquages anti-tPA a été attestée, chez les animaux tPA<sup>Null</sup>, par l'absence d'immunomarquages anti-tPA quelle que soit la structure étudiée : dans le PVN (fig. 83M), dans le SON (fig. 83N), dans l'EM (fig. 83O) et dans la neurohypophyse (fig. 83P). De plus, les contrôles classiques, réalisés en n'utilisant que les anticorps secondaires seuls (sans anticorps primaires), étaient systématiquement dépourvus d'immunomarquage et ce quel que soit l'immunomarquage présenté dans ce manuscrit. Dans cette étude immunohistochimique, nous avons également pu confirmer que les astrocytes de la neurohypophyse des souris WT étaient dépourvus d'immunomarquage anti-tPA (non illustré).





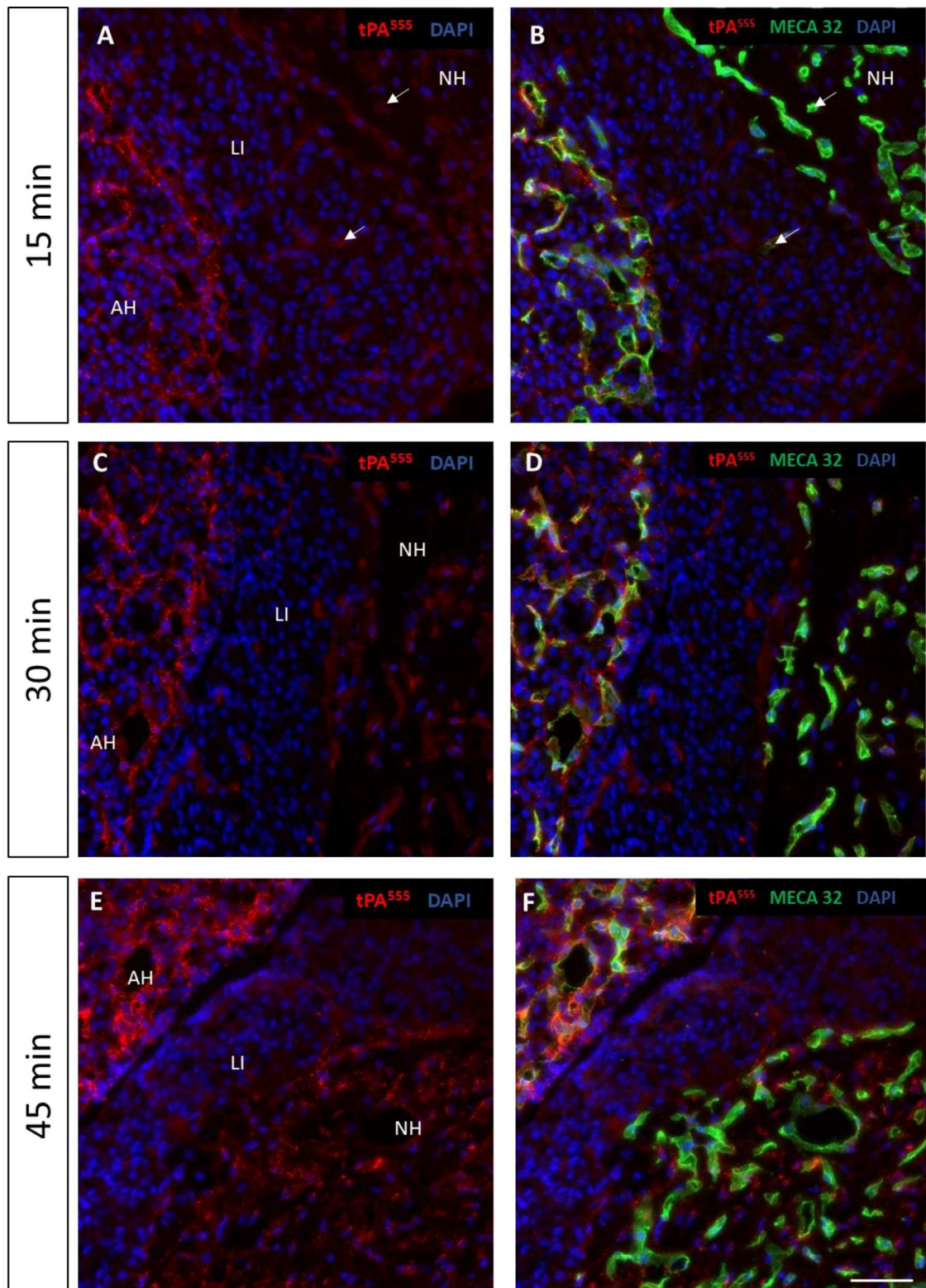
**Figure 83** : L'arginine-vasopressine et le tPA sont co-détectés dans l'axe vasopressinergique hypothalamo-hypophysaire des souris tPA WT.

Le double immunomarquage anti-AVP (vert) et anti-tPA (magenta) apparaissent en blanc lorsqu'ils sont colocalisés. Dans le noyau paraventriculaire (PVN), nous avons observé des corps cellulaires neuronaux (magnocellulaires) et des

fibres positives à l'AVP (A). Le signal anti-tPA est quant à lui observé dans le corps cellulaire des neurones du PVN dont certains sont positifs à l'AVP (C). La colocalisation du signal AVP et tPA dans les neurones magnocellulaires du PVN est indiquée par les flèches blanches (A-C). Dans le noyau supraoptique (SON), nous avons observé une forte immunoréactivité pour le tPA dans les neurones magnocellulaires positifs à l'AVP indiquées par des flèches blanches (D-E-F) ainsi que dans les fibres neuronales. Dans l'éminence médiane (EM), on détecte l'AVP au sein des zones externe et interne (G), tandis que le tPA est fortement présent dans la couche externe où sa colocalisation avec l'AVP est observée en blanc (H-I). La neurohypophyse est très immunoréactive pour l'AVP stockée dans les terminaisons axonales (J). À ce grossissement, l'immunomarquage anti-tPA (K) apparaît colocalisé avec celui de l'AVP (L). Nous n'observons pas de tPA quel que soit la structure d'intérêt chez les animaux tPA<sup>Null</sup>, dans le PVN (M), dans le SON (N), dans l'EM (O) et dans la neurohypophyse (P). N = 5 animaux par groupe. PVN : noyau paraventriculaire ; SON : noyau supraoptique. Barre d'échelle de A à L = 50  $\mu$ m.

Nous savons que le tPA est une protéase qui est sécrétée dans le système vasculaire par les cellules endothéliales. Nous avons voulu déterminer si le tPA circulant pouvait atteindre les organes circumventriculaires que sont la neurohypophyse et l'EM et être responsable de l'immunoréactivité anti-tPA que nous observons dans ces structures. Pour ce faire, nous avons donc réalisé des injections de tPA fluorescent dans la veine caudale. Les hypophyses ont ensuite été prélevées à différents temps post-injection (fig. 84).

Après injection, la densité en tPA fluorescent augmente dans un premier temps dans la circulation sanguine puis dans différentes régions hypophysaires. On remarque que quel que soit le temps post-injection, le tPA<sup>555</sup> est plus nettement observé dans l'adénohypophyse que dans la neurohypophyse (fig. 84A, C, E). Dès 15 minutes post-injection, le tPA fluorescent diffuse hors des vaisseaux fenestrés (positifs au MECA-32) de l'adénohypophyse (fig. 84B). Cette extravasation s'intensifie au cours du temps (fig. 84D, F). L'extravasation du tPA fluorescent dans le parenchyme de la neurohypophyse devient, quant à elle, particulièrement évidente à 45 minutes post-injection (fig. 84F). Ces observations montrent que le tPA périphérique peut atteindre la neurohypophyse grâce à la fenestration de sa vascularisation et qu'une partie des immunomarquages anti-tPA décrits dans cette structure pourrait provenir du tPA sanguin.

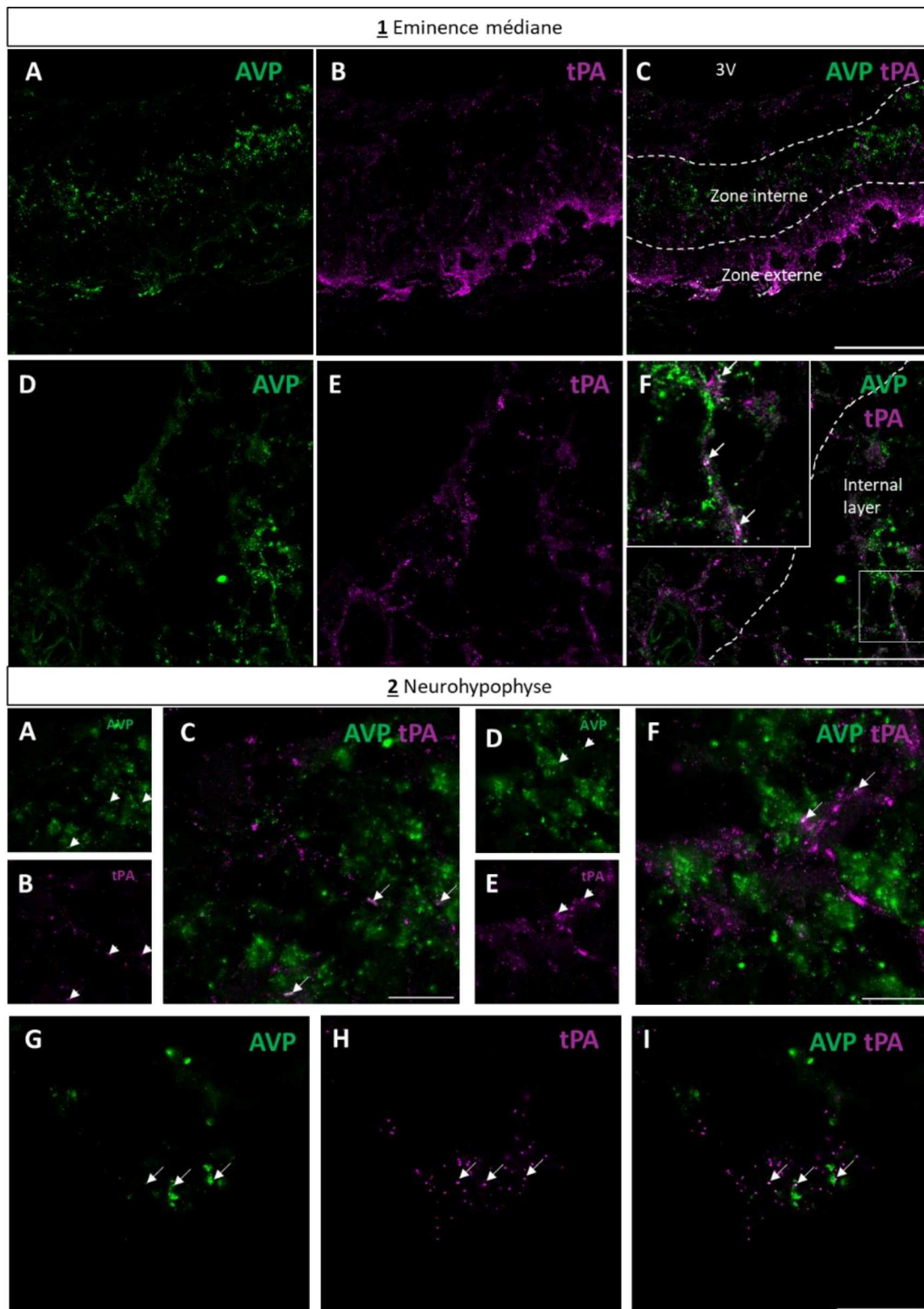


**Figure 84 :** Le tPA<sup>555</sup> injecté dans la circulation sanguine se retrouve dans l'adénohypophyse et la neurohypophyse grâce aux capillaires fenêtrés.

Distribution hypophysaire du tPA marqué à l'Alexafluor555 (tPA<sup>555</sup>) et injecté par voie intraveineuse (**A-F**) et immunomarquages anti-MECA 32 (**B, D, F**) selon le temps post-injection i.v. (**A, B** = 15 min. ; **C, D** = 30 min. ; **E, F** = 45 min.). A fort grossissement, nous observons que le tPA<sup>555</sup> colonise, dès 15 min, (**A et B**) l'adénohypophyse (AH) et qu'il est visible en dehors de l'appareil vasculaire (**B**). Bien que plus discret, le lobe nerveux (NH) présente également de rares ponctuations associées aux capillaires (flèches en **A et B**), à 45 minutes post-injection l'extravasation du tPA<sup>555</sup> dans la neurohypophyse devient évidente (**F**). Le lobe intermédiaire est, quant à lui, dépourvu de tPA<sup>555</sup> quel que soit le temps post injection en accord avec la faible expression de Meca 32 (**B, D et F**) et la perméabilité différentielle des vaisseaux de cette subdivision hypophysaire. AH : adénohypophyse, LI : lobe intermédiaire, NH : neurohypophyse. Barre d'échelle de A à F = 200µm, n = 5 par temps d'injection.

Afin de statuer quant à la présence ou non de tPA dans les neurones magnocellulaires et dans leurs terminaisons de la neurohypophyse, nous avons procédé à une étude histologique préliminaire de l'éminence médiane et de la neurohypophyse de souris tPA WT avec l'utilisation d'un microscope confocal STED chez un animal tPA WT mâle, permettant d'augmenter grandement la résolution spatiale de nos signaux immunologiques (fig. 85). Nos résultats préliminaires (n=1) de la région de l'éminence médiane montre une forte immunoréactivité du tPA dans la ZE de l'EM où il apparaît colocalisé avec l'AVP (fig. 85.1C). Il apparaît dans la ZI de l'EM un signal anti-tPA même si cet immunomarquage se révèle moins dense que dans la ZE (fig. 85.1B). Un agrandissement de cette zone montre une colocalisation du tPA et de l'AVP dans un axone (fig. 85.1F). Dans un second temps, nous nous sommes intéressés aux terminaisons axonales de la neurohypophyse afin de déterminer si l'on pouvait observer le tPA et l'AVP dans les mêmes granules avec la technologie STED. À plus fort grossissement, on observe à nouveau une colocalisation des immunomarquages tPA et AVP dans la neurohypophyse (flèches blanches, fig. 85.2C-F). À l'échelle d'une terminaison nerveuse (~14µm) les immunomarquages montrent la présence des protéines tPA et AVP dans une même terminaison axonale des neurones magnocellulaires (fig. 85.2I). Les ponctuations observées ont un diamètre d'environ 400 nm, ce qui pourrait correspondre à la taille d'un granule de sécrétion. Ces ponctuations sont très individualisées pour le signal du tPA (fig. 85.2H). Cependant, la majorité du signal de l'AVP est

bien plus important en termes de taille (1.37  $\mu\text{m}$ ), il pourrait s'agir d'agrégats de vésicules (fig. 85.2G). On observe quelques colocalisations du signal AVP et tPA indiquées par les flèches blanches (Fig. 85.2I).

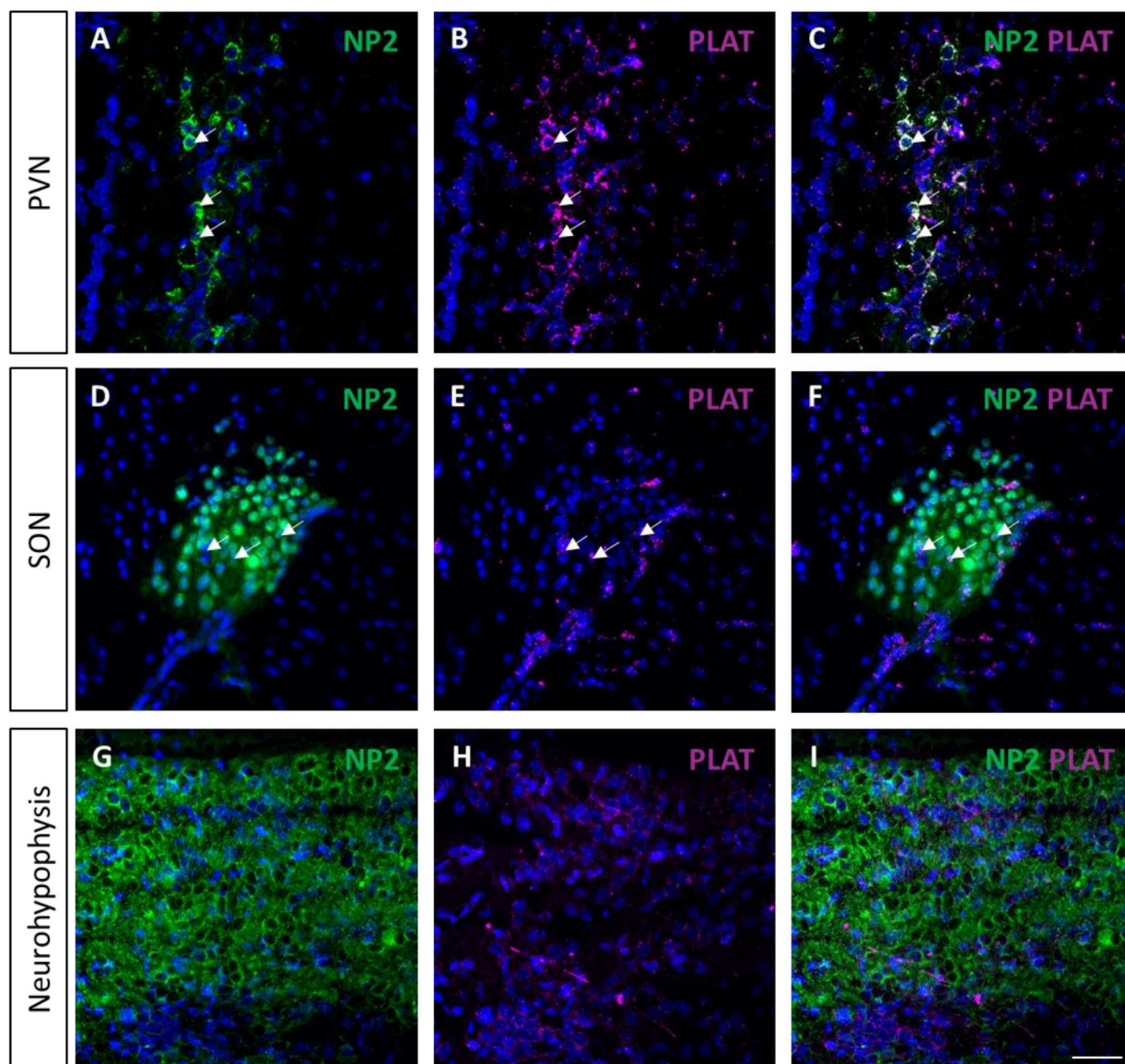


**Figure 85** : Le tPA et la vasopressine sont localisés le long des axones des neurones à AVP dans la couche interne de l'éminence médiane et dans les terminaisons neuronales de la neurohypophyse chez des animaux tPA WT.

Distribution de l'Arginine-Vasopressine (vert) et du tPA (magenta), visualisé au microscope confocal avec la technologie STED, dans l'éminence médiane et la neurohypophyse de souris WT. **1A, 1B, 1C** Immunomarquages de l'AVP, du tPA et leur superposition, montrent la présence de l'AVP dans les couches interne et externe de l'éminence médiane. Le tPA se trouve principalement dans la couche externe et également dans la couche interne, en moindre quantité. **1D, 1E, 1F** Immunomarquage de l'AVP, du tPA et de la superposition des cibles. Dans l'agrandissement de la photo (**1F**), on peut observer le double immunomarquage entre le tPA et l'AVP (flèches blanches). (**2A, 2D, 2G**) Immunomarquage de la vasopressine. (**2B, 2E, 2H**) immunomarquage du tPA. La superposition des cibles (**2C, 2F**) montre que les terminaisons magnocellulaires présentent une double immunoréactivité pour l'AVP et le tPA. La focalisation sur une seule extrémité magnocellulaire (2I) montre que certaines vésicules contiennent à la fois de la vasopressine et du tPA. Barre d'échelle de 1A à 1F = 50µm, de 2A à 2I = 10µm. N = 1.

Nous avons ensuite voulu étudier la distribution des ARNm codant le tPA au sein de l'axe hypothalamo-hypophysaire vasopressinergique (fig. 86).

L'hybridation *in situ* des ARNm issus de la transcription du gène *PLAT* révèle la présence des transcrits dans les cellules positives à l'immunomarquage de la neurophysine 2 (NP2) dans le PVN (flèches blanches fig. 86A-B-C) et dans le SON (flèches blanches fig. 86D-E-F). Dans la neurohypophyse certaines cellules, certainement endothéliales, montrent une expression du gène *PLAT*, qui n'apparaît toutefois pas colocalisée avec l'immunomarquage de la neurophysine (fig. 86G-H-I). Il ne m'a malheureusement pas été possible d'établir avec certitude s'il existe ou non des ARNm du gène *PLAT* dans les terminaisons axonales des neurones magnocellulaires.



**Figure 86** : Les ARNm codants pour le tPA sont exprimés par les neurones à vasopressine dans les noyaux paraventriculaires et supraoptiques de l'hypothalamus (PVN et SON) de souris sauvages.

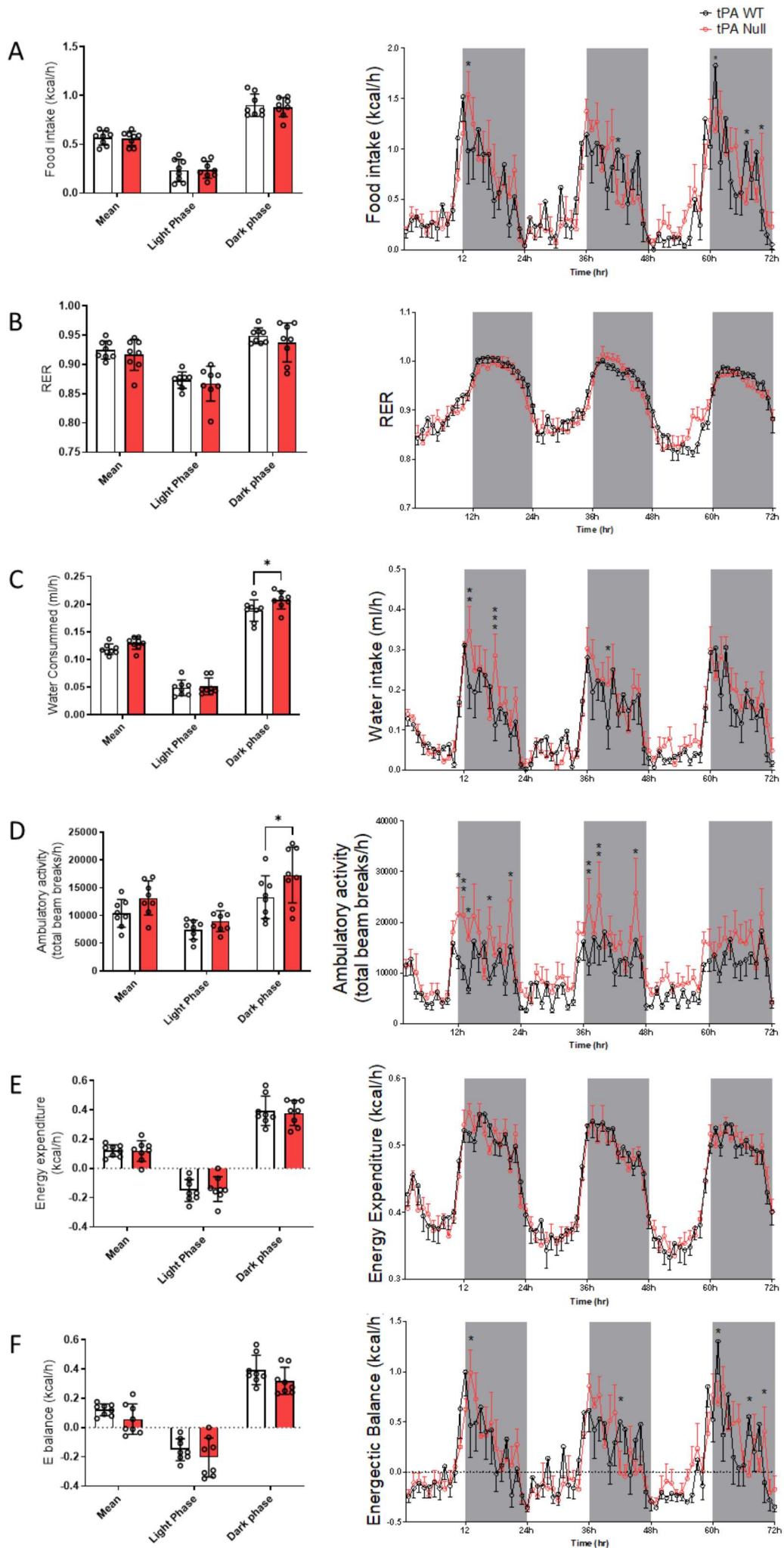
Codétection par hybridation *in situ* fluorescente (fISH) des ARNm du gène *PLAT* et immunomarquage de la neurophysine-2 dans différentes structures cérébrales de souris WT et *tPA*<sup>Null</sup>. La technologie RNAscope a été utilisée selon les instructions du fabricant pour l'hybridation de la sonde *PLAT* (magenta), suivie par l'immunomarquage de la neurophysine-2 (vert). (A, B) La visualisation de la NP2 et des ARNm du gène *PLAT* dans le PVN montre la colocalisation des cibles dans les neurones vasopressinergiques (C, flèches blanches). (D, E) Immunomarquage de la NP2 et hybridation de la sonde *PLAT* dans le SON. On observe dans le SON la présence de transcrits du gène *PLAT* dans les neurones magnocellulaires (F, flèches blanches). (G, H, I) Dans la neurohypophyse, les ARNm de *PLAT* ne sont pas colocalisés dans les zones fortement marquées avec l'anti-NP2. N=3 animaux. PVN : noyau paraventriculaire ; SON : noyau supraoptique ; NP2 : neurophysine-2 ; *PLAT* : *Plasminogen Activator, Tissue Type*. Barre d'échelle de A à I = 50µm.



***Etude de l'activité métabolique chez les animaux tPA<sup>Null</sup> et WT***

Afin d'étudier les répercussions métaboliques d'une déficience en tPA, nous avons comparé le métabolisme des animaux tPA<sup>Null</sup> et des animaux tPA WT (fig. 87). Ces animaux sont hébergés durant 3 jours consécutifs dans des cages métaboliques équipées d'un circuit ouvert mesurant la calorimétrie indirecte. Cette étude révèle que les animaux tPA<sup>Null</sup> ont une consommation hydrique et une activité ambulatoire significativement plus élevée lors de la phase nocturne (fig. 87C-D). En effet, les animaux tPA<sup>Null</sup> consomment en moyenne 0,72 mL/24 h supplémentaire par rapport aux animaux tPA WT, correspondant à 17 % d'eau consommée en plus (fig. 87C). Les animaux tPA<sup>Null</sup> et tPA WT ont une prise alimentaire ainsi qu'un RER (reflète le métabolisme énergétique) équivalent tout au long de l'enregistrement à la fois durant les phases diurnes et les phases nocturnes (fig. 87A-B). Il en est de même pour la dépense énergétique et la balance énergétique (fig. 87E-F).

Cette surconsommation hydrique chez les animaux tPA<sup>Null</sup> pourrait être liée à une déshydratation chronique obligeant les animaux à réapprovisionner leur réserve d'eau.



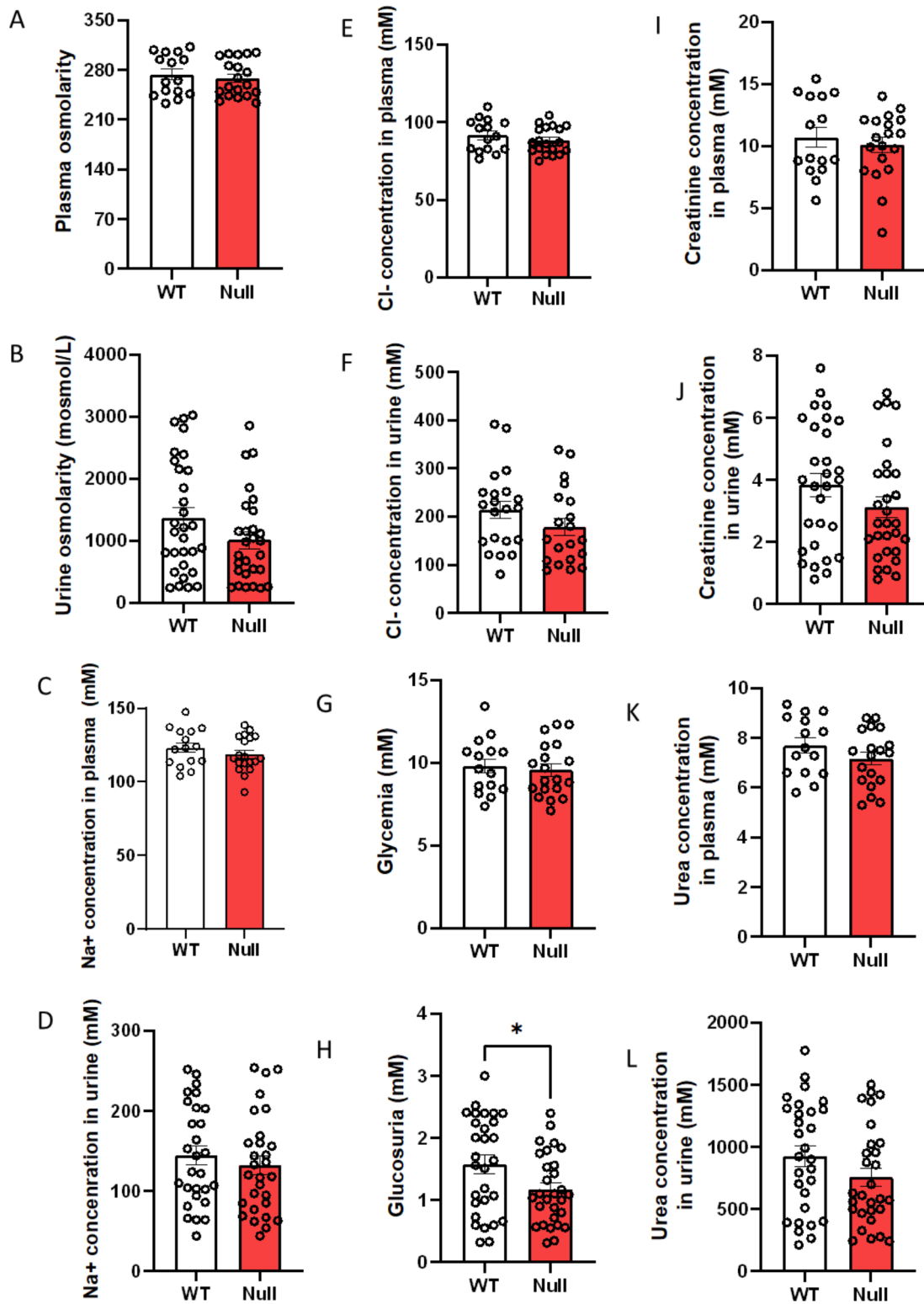
**Figure 87 : La déficience en tPA entraîne une polydipsie chez les souris tPA<sup>Null</sup>.**

Les souris sont hébergées dans des cages PhenoMaster métaboliques durant 3 jours consécutifs après 48h d'habituation au système. Les données de la colonne de gauche montrent la moyenne des valeurs des cycles diurnes, nocturnes, et des deux cycles. Les données de la colonne de droite représentent les valeurs enregistrées heure par heure pendant 3 jours, les zones ombrées correspondent au cycle nocturne. Les enregistrements de la prise alimentaire (A), du rapport d'échange respiratoire (RER) (B), de la dépense énergétique (E) et du bilan énergétique (F) ne montrent aucune différence entre les souris WT et tPA<sup>Null</sup>. Cependant, l'activité ambulatoire (D) et la consommation d'eau (C) augmentent chez les souris tPA<sup>Null</sup> par rapport à leur contrôle WT. Ces comportements est particulièrement net pendant la phase sombre de leur rythme circadien. N = 8 animaux par groupe. Les barres d'erreur représentent les SEM \*p < 0,05 ; \*\*p < 0,01 ; \*\*\*p < 0,005 la valeur de p est déterminée par un test ANOVA à 2 facteurs et un test post hoc de Fisher (histogrammes et courbes).

***Etudes de paramètres physiologiques dans différentes conditions expérimentales chez des souris sauvages et tPA<sup>Null</sup>***

D'après les résultats de l'étude métabolique des animaux tPA<sup>Null</sup>, nos travaux se sont orientés vers l'étude de l'osmolarité plasmatique et urinaire ainsi que sur le comportement urinaire de ces animaux (fig. 88). Dans ce but, l'urine a été recueillie par miction spontanée (animaux se déplaçant librement dans des cages individuelles) et le plasma a été prélevé, lors de la mise à mort, par ponction intracardiaque chez les animaux tPA WT et tPA<sup>Null</sup>. Les dosages de l'osmolarité plasmatique et urinaire des animaux tPA<sup>Null</sup> et WT donnent des valeurs équivalentes (fig. 88A-B). Les dosages du sodium (fig. 88C-B), du chlore (fig. 88E-F), de la glycémie (fig. 88G), de la créatine (fig. 88I-J) et de l'urée (fig. 88K-L), ne présentent aucune différence entre les animaux tPA<sup>Null</sup> et WT. Toutefois, Il existe une différence significative dans la quantité de glucose urinaire qui est plus faible chez les animaux tPA<sup>Null</sup> (fig. 88H).

L'osmolarité urinaire et plasmatique des animaux tPA<sup>Null</sup> n'est donc pas affectée par leur déficience en tPA, dans des conditions contrôles.

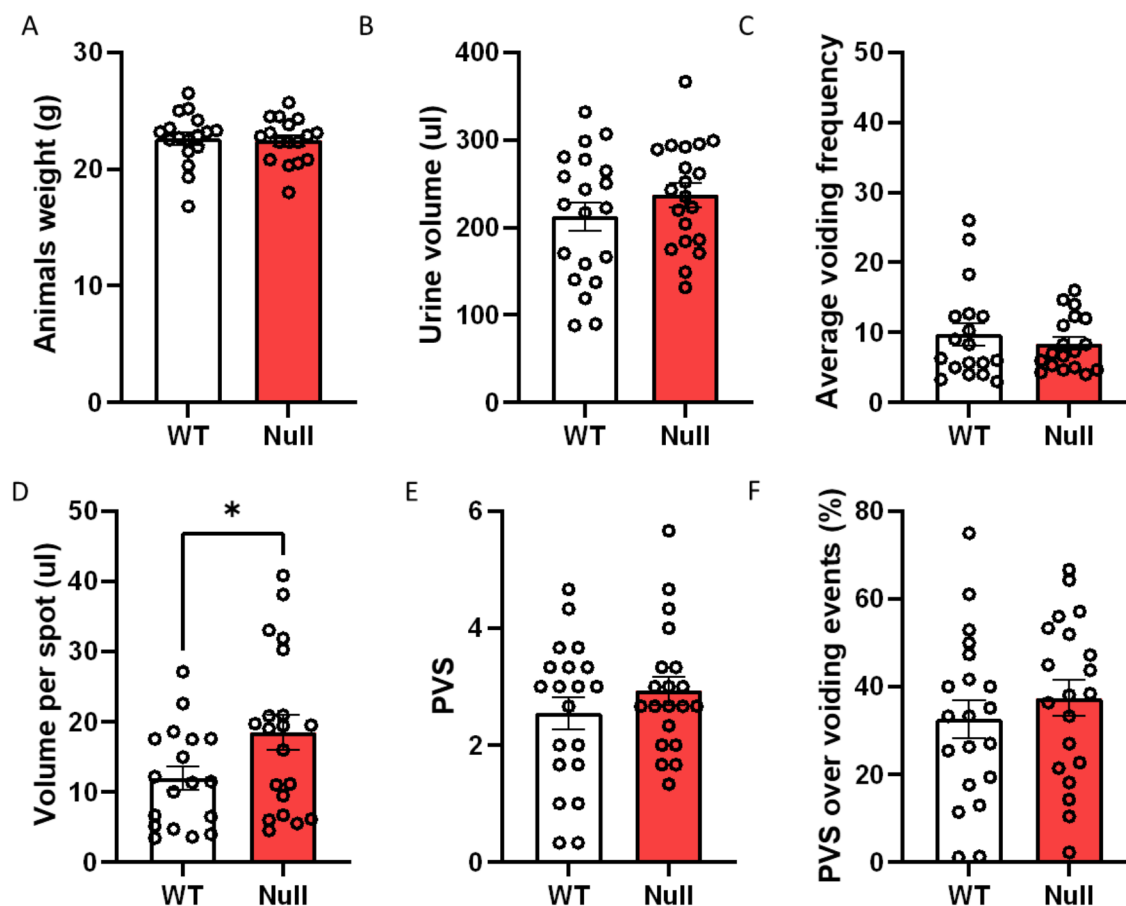


**Figure 88 : L'osmolarité plasmatique et urinaire est similaire en condition contrôle entre les souris WT et tPA<sup>Null</sup>.**

Les mesures des paramètres urinaires ont été effectuées avec une collecte d'urine par miction spontanée, tandis que le plasma a été collecté lors de la mise à mort des souris par ponction intracardiaque. L'ensemble des graphiques représentent les valeurs moyennes des paramètres pour les deux génotypes WT et tPA<sup>Null</sup>. (A, B) L'osmolarité plasmatique et urinaire des animaux WT et tPA<sup>Null</sup> montre des valeurs similaires, de même que pour la concentration de Na<sup>+</sup> (C, D), la concentration de Cl<sup>-</sup> (E, F), la créatinine (I, J) et l'urée (K, L). On observe pour la glucosurie une concentration de glucose plus faible chez les souris tPA<sup>Null</sup> par rapport aux WT, cependant la glycémie est similaire entre les deux groupes (G, H). N = 20 animaux par groupe ou moins si les valeurs aberrantes ont été identifiées avec la méthode ROUT Q = 1%. Les barres d'erreur représentent les SEM \*p < 0,05 ; \*\*p < 0,01 ; \*\*\*p < 0,00, la valeur de p est déterminée par un test t de Student ou Mann-Whitney selon la normalité des données.

L'étude des fonctions urinaires des animaux s'est fondée sur l'utilisation d'une méthode de mesure indirecte, le test des tâches de mictions (VSA : Void Spot Assay) (fig. 89). Cette méthode nous permet d'évaluer les quantités d'urine produites, le nombre de mictions totales ainsi que le nombre de mictions primaires (PVS : Primary Voiding Spot) correspondant à des volumes supérieurs à 25ul. Le poids des animaux est relevé avant le début de la mesure et montre un poids équivalent entre les animaux tPA<sup>Null</sup> et WT (fig. 89A). Il apparaît que le volume par miction (tâche) est significativement plus élevé chez les animaux tPA<sup>Null</sup> en comparaison des animaux tPA WT (fig. 89D), mais il n'y a pas de différences entre les deux groupes d'animaux en termes de volume urinaire total (fig. 89B), de nombres de mictions (fig. 89C), de nombres de mictions primaires (PVS) (fig. 89E) et dans le ratio de PVS (nombre de PVS/ nombre de miction total) (fig. 89F).

Bien que le volume d'urine ne soit pas plus élevé chez les animaux tPA<sup>Null</sup>, leur volume par miction est plus important et s'accorde avec une consommation en eau plus élevée que leur contrôle WT.



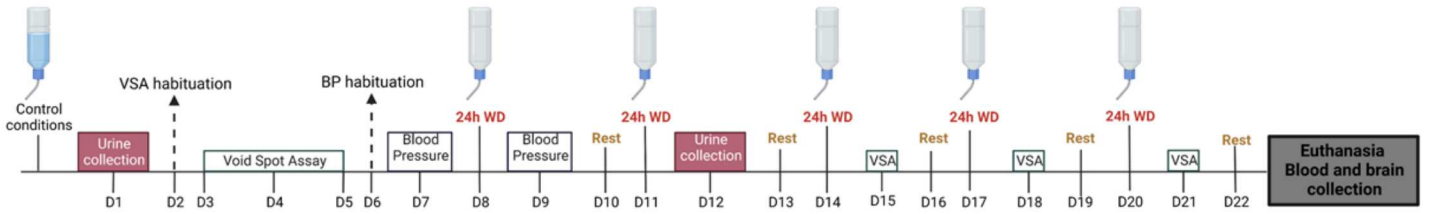
**Figure 89 :** Les animaux tPA<sup>Null</sup> présentent un volume par miction plus important que les animaux tPA WT

Les mesures des volumes d'urine ont été réalisées en utilisant le test VSA 3 jours consécutifs pendant 4 heures. Le programme Void Whizzard a été utilisé pour l'analyse des données. L'ensemble des graphiques représente les valeurs moyennes pour chaque paramètre mesuré chez les animaux WT et tPA<sup>Null</sup>. (A) Le poids des animaux est similaire entre WT et tPA<sup>Null</sup>, ce qui en fait des groupes analogues. Il n'y a pas de différences dans le volume total d'urine mesuré entre tPA<sup>Null</sup> et WT (B), ni dans la fréquence de miction entre les deux groupes (C). Nous avons constaté que le volume par miction était plus élevé chez les souris tPA<sup>Null</sup> par rapport aux souris WT (D). La fréquence de miction primaire (PVS) (E) et le ratio de PVS (F) sont tous deux comparables entre les groupes. N = 20 animaux par groupe ou moins si des valeurs aberrantes ont été identifiées avec la méthode ROUT, Q = 1%. Les barres d'erreurs représentent les SEM \*p < 0,05 ; \*\*p < 0,01 ; \*\*\*p < 0,00, la valeur de p est déterminée par un test t de Student ou Mann-Whitney selon la normalité des données.

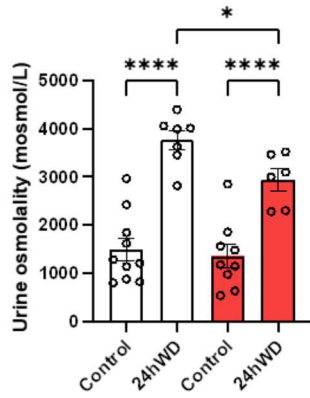
L'étude de l'osmolarité plasmatique et urinaire des animaux tPA<sup>Null</sup> et WT n'a pas mis en évidence un effet du tPA dans les paramètres mesurés. Nous avons alors décidé de réitérer ces mesures dans une condition particulière nécessitant une privation hydrique de 24h chez les animaux tPA<sup>Null</sup> et WT (fig. 90). L'urine et le plasma ont été prélevés comme précédemment décrit. La

moitié des animaux tPA<sup>Null</sup> et WT sont privés d'eau pendant 24h au moment des prélèvements. Nos premières observations de cette étude montrent que l'ensemble des groupes présente une augmentation significative des paramètres urinaires mesurés entre la condition contrôle et la condition de privation hydrique. C'est-à-dire, l'osmolarité (fig. 90B), le sodium (fig. 90C), le chlore (fig. 90D), le glucose (fig. 90E), la créatine (fig. 90F) et l'urée (fig. 90G). Il s'avère que les animaux tPA<sup>Null</sup> ont une osmolarité urinaire significativement plus faible que les animaux tPA WT après 24h de privation hydrique (fig. 90B). En effet, l'osmolarité urinaire des animaux tPA<sup>Null</sup> est d'en moyenne  $2943 \pm 22.5$  mosmol/L, contre  $3765 \pm 195.0$  mosmol/L pour les animaux tPA WT soit 1,3 fois plus faible. Les concentrations de glucose, créatine et d'urée sont aussi toutes significativement plus faible pour les animaux tPA<sup>Null</sup> comparés aux animaux tPA WT. Cependant, l'ensemble des paramètres plasmatiques mesurés sont identiques entre eux quelle que soit la condition d'accès à l'eau ou le génotype (fig. 90H-I-J-K-L-M). Seule exception pour la créatinine qui est plus concentrée chez les animaux tPA<sup>Null</sup> après 24h de privation hydrique.

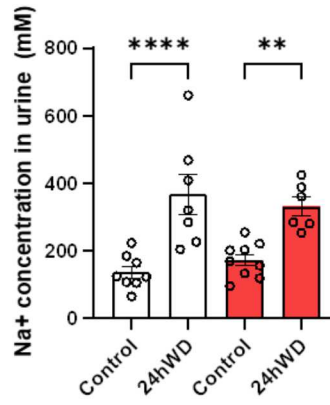
Ces données nous indiquent que les urines des animaux tPA<sup>Null</sup> sont plus diluées que celle des animaux tPA WT. Nous avons émis l'hypothèse que les animaux tPA<sup>Null</sup> excrétaient des volumes d'urine plus importants après 24h de privation hydrique par rapport aux animaux contrôles.



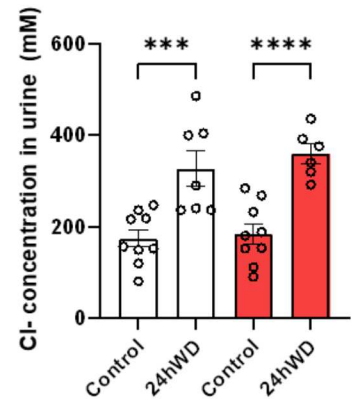
**A**



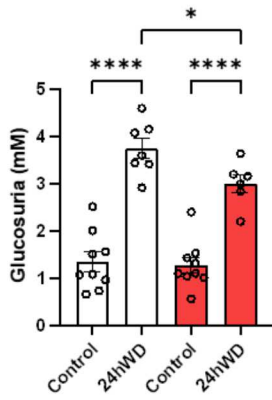
**B**



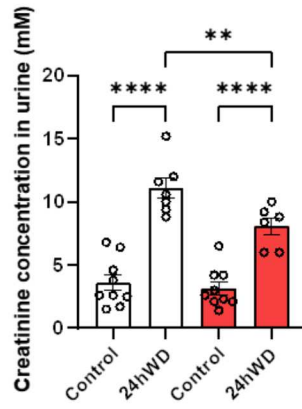
**C**



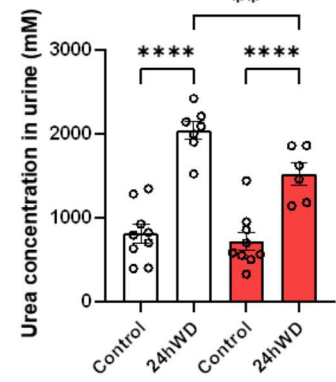
**D**



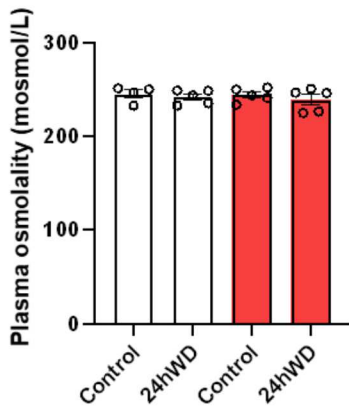
**E**



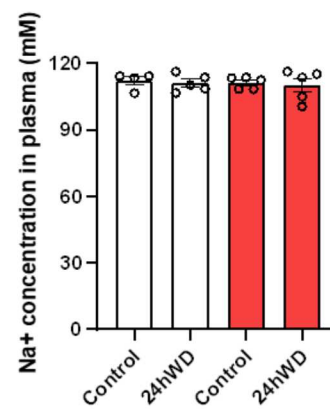
**F**



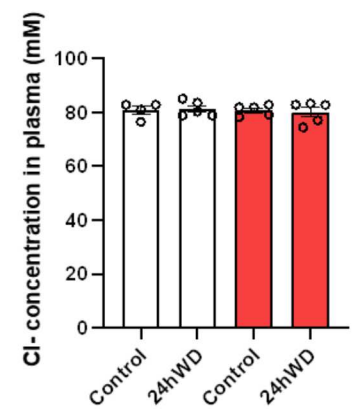
**G**



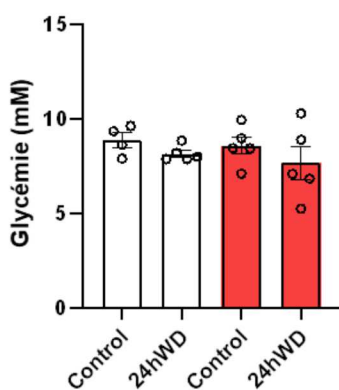
**H**



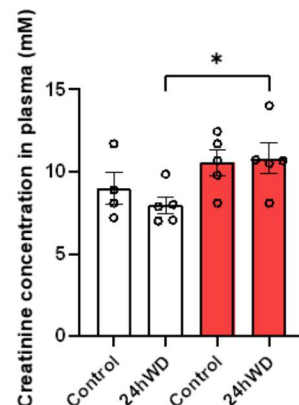
**I**



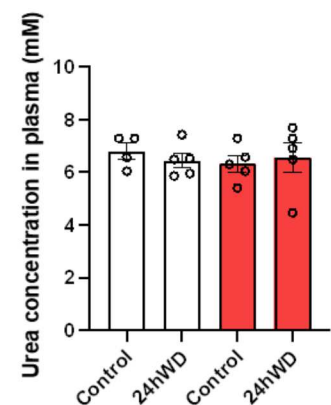
**J**



**K**



**L**





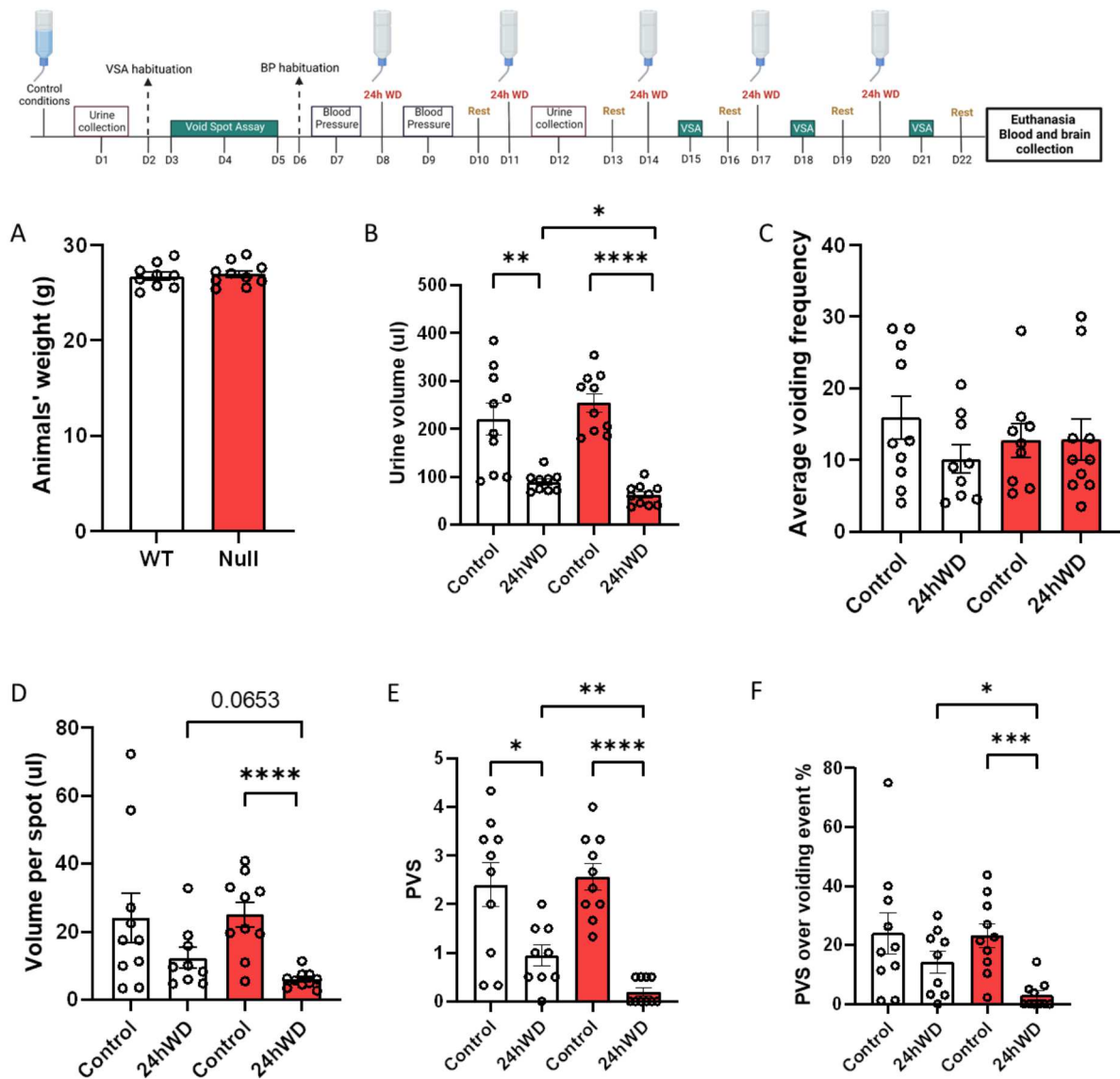
**Figure 90 : Les souris tPA<sup>Null</sup> (rouge) présentent une osmolarité urinaire plus faible que les souris WT (blanc) après 24h de privation hydrique.**

Les mesures des paramètres urinaires ont été effectuées à la suite d'une collecte d'urine par miction spontanée, tandis que le plasma a été prélevé lors de l'euthanasie des souris par ponction intracardiaque. L'ensemble des graphiques représentent les valeurs moyennes pour chaque paramètre mesuré chez les animaux WT et tPA<sup>Null</sup>. La mesure des paramètres urinaires montre qu'après 24h de privation hydrique, l'ensemble des valeurs diminuent pour les souris tPA<sup>Null</sup> et WT. Frise temporelle des expériences effectuées : collecte des urines (rouge) et mise à mort des animaux (gris). L'osmolarité urinaire des souris tPA<sup>Null</sup> après la privation hydrique est significativement plus faible que celle des souris WT (A), il en est de même pour la glucosurie (D), la créatinine (E) et l'urée (E). Nous avons remarqué que les concentrations de Na<sup>+</sup> et Cl<sup>-</sup> sont inchangées chez les tPA<sup>Null</sup> après la privation d'eau par rapport aux WT (H et I). En ce qui concerne le plasma, l'ensemble des paramètres mesurés ne révèle aucune différence quelle que soit la condition d'accès à l'eau, ou le génotype des animaux WT et tPA<sup>Null</sup>, dont (G) l'osmolarité, (H) la concentration de Na<sup>+</sup>, (I) la concentration de Cl<sup>-</sup>, (J) la glycémie, et (L) l'urée. De façon surprenante, nous avons observé une concentration plus élevée de créatinine à 24h de restriction hydrique chez les souris tPA<sup>Null</sup> par rapport aux souris WT (K). Urine N = 10 animaux par groupe, plasma N = 4 ou 5 animaux. Les barres d'erreur représentent les SEM \*p < 0,05 ; \*\*p < 0,01 ; \*\*\*p < 0,00, la valeur de p est déterminée par un test ANOVA à un facteur ou Kruskal-Wallis selon la normalité des données.

Afin de déterminer s'il existait des différences dans les fonctions urinaires des animaux tPA<sup>Null</sup> après une privation hydrique de 24h, nous avons réitéré l'étude du VSA (fig. 91). À nouveau, nous avons procédé au relevé des poids des animaux qui s'est avéré être équivalant entre les groupes tPA<sup>Null</sup> et WT. Certains paramètres, tels que la fréquence de miction (fig. 91C), le volume par miction (fig. 91D) et le ratio de PVS (fig. 91F) ne sont pas significativement affectés par la privation hydrique chez les animaux tPA WT. On observe une diminution significative du volume total d'urine (d'environ 100 à 200µL) entre la condition contrôle et après 24h de privation hydrique chez les animaux tPA<sup>Null</sup> et WT. De plus, le volume urinaire des animaux tPA<sup>Null</sup> est significativement plus faible après 24h de privation hydrique que celui des animaux tPA WT (fig. 91B). De même, le nombre de PVS est significativement plus faible chez les animaux tPA<sup>Null</sup> et WT entre la condition contrôle et après 24h de privation hydrique (fig. 91E). On observe significativement moins de PVS chez les animaux tPA<sup>Null</sup> que les animaux tPA WT (fig. 91E). Le volume par miction est significativement plus faible uniquement chez les animaux tPA<sup>Null</sup> entre la condition contrôle et après 24h de privation hydrique (fig. 91D). Toutefois, il n'y a pas de

différence significative entre tPA<sup>Null</sup> et WT après 24h de privation hydrique ( $p = 0.0653$ ). Le ratio de PVS est significativement plus faible chez les animaux tPA<sup>Null</sup> en comparaison avec la condition tPA<sup>Null</sup> contrôle et avec les animaux tPA WT après 24h de privation hydrique (fig. 91D). Cependant, les fonctions urinaires observées auparavant en condition contrôle diffèrent lors de cette étude. En effet, le volume par miction des animaux tPA<sup>Null</sup> n'est pas plus élevé en comparaison des animaux tPA WT (fig. 91D) comparativement à l'étude initiale (fig. 87D).

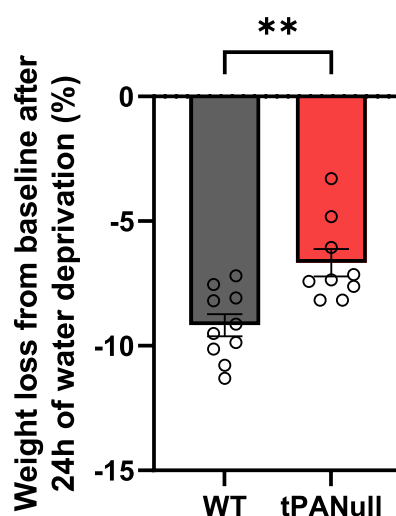
En conclusion, cette étude nous apprend que les animaux tPA<sup>Null</sup> ont un volume urinaire significativement plus faible que les animaux tPA WT, de part un volume par miction plus faible et non pas par une quantité plus faible de miction après 24h de privation hydrique.



**Figure 91 :** Les souris  $tPA^{Null}$  (rouge) ont un volume urinaire plus faible par rapport aux souris WT (blanc) après 24h de privation hydrique.

L'ensemble des graphiques représente les valeurs moyennes pour chaque paramètre mesuré chez les animaux WT et  $tPA^{Null}$ . Frise temporelle des expériences effectuées : void spot assay (vert). (A) Le poids des animaux est similaire entre les animaux WT et  $tPA^{Null}$ , ce qui en fait des groupes analogues. La privation d'eau diminue à la fois le volume total d'urine (B) et le nombre de PVS (E) des souris  $tPA^{Null}$  et WT. La fréquence moyenne de miction n'a pas été modifiée après la privation chez les deux génotypes (C). Il s'avère que le volume total d'urine (B), le volume par miction (D), le nombre de PVS (E) et le ratio de PVS (F) sont significativement plus faibles chez les animaux  $tPA^{Null}$  après la privation hydrique comparativement aux animaux WT. N = 10 animaux par groupe et N = 9 pour les  $tPA^{Null}$  24hWD. Des animaux sont exclus si nous identifions des valeurs aberrantes avec la méthode ROUT, Q = 1%. Les barres d'erreur représentent les SEM \* $p < 0,05$  ; \*\* $p < 0,01$  ; \*\*\* $p < 0,001$ , la valeur de p est déterminée par un test t de Student ou Mann-Whitney selon la normalité des données.

Parallèlement à l'étude du fonctionnement urinaire, les animaux ont été pesés avant et après les 24h de privation hydrique afin d'évaluer la perte de poids attendue (fig. 92). Il se trouve que les animaux tPA<sup>Null</sup> auront une perte de poids significativement plus faible (moy. -6.673%) que les animaux WT (moy. -9.174%). Malgré la déshydratation des animaux, ces données semblent cohérentes si l'on compare avec la diminution de la miction des animaux tPA<sup>Null</sup> (fig. 91B).



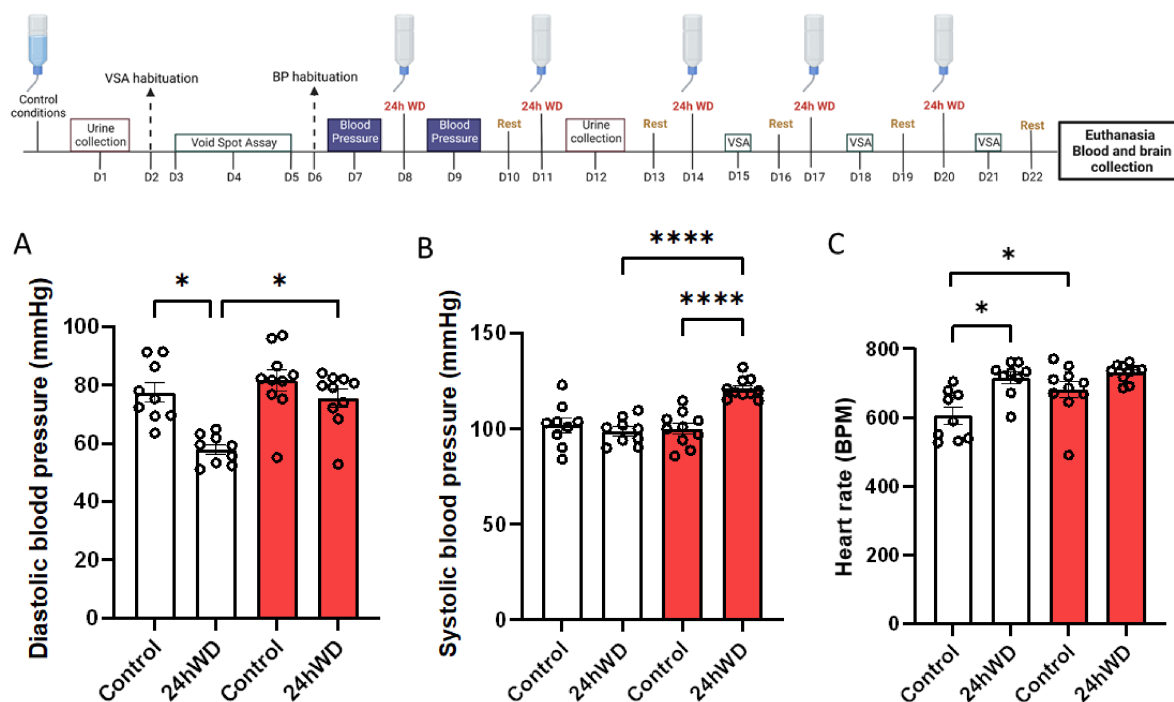
**Figure 92** : Les animaux tPANull perdent significativement moins de poids que les animaux WT après 24h de privation hydrique.

Les animaux WT (gris) et les animaux tPA<sup>Null</sup> (rouge) ont été pesés avant et après les 24h de privation hydrique. Les deux groupes d'animaux ont une masse pondérale qui diminuera après la privation hydrique, elle est cependant significativement plus faible chez les animaux tPA<sup>Null</sup> en comparaison des animaux WT. Les barres d'erreur représentent les SEM \*p < 0,05 ; \*\*p < 0,01 ; \*\*\*p < 0,001, la valeur de p est déterminée par un test t de Student selon la normalité des données. N=10 WT et 9 tPA<sup>Null</sup>.

Les résultats obtenus chez les animaux tPA<sup>Null</sup> suggèrent qu'en condition contrôlée, l'absence de tPA est compensée par un (ou des) mécanisme(s) adaptatif(s) permettant ainsi de maintenir une osmolarité plasmatique et urinaire comparable à celles des WT.

Nous savons que les variations de volume urinaire sont en partie dépendantes de la volémie et de l'osmolarité plasmatique, qui vont eux-mêmes influencer les fonctions cardiaques, tel que la pression artérielle et le rythme cardiaque.

Compte tenu des résultats obtenus lors de l'étude de la miction et de l'osmolarité plasmatique et urinaire, nous nous sommes intéressés aux variations de la pression artérielle et du rythme cardiaque chez les animaux tPA<sup>Null</sup> et WT, en condition contrôle ou après 24h de privation hydrique (fig. 93). En condition contrôle, la pression artérielle diastolique, systolique et le rythme cardiaque sont équivalents entre tPA<sup>Null</sup> et tPA WT (fig. 93A-B-C). Lors de la privation hydrique de 24h la pression artérielle diastolique (PAd) des animaux tPA<sup>Null</sup> ne varie pas contrairement à celle des animaux tPA WT. Cette dernière diminue significativement entre la condition contrôle et la privation hydrique (de 77 mmHg à 58 mmHg) (fig. 93A). La PAd des animaux tPA<sup>Null</sup> est donc significativement supérieure (76 mmHg) comparativement des animaux tPA WT (58 mmHg) (fig. 93A). La pression artérielle systolique (PAs) ne varie pas chez les animaux tPA WT mais elle augmente significativement chez les animaux tPA<sup>Null</sup> (de 100 mmHg à 121 mmHg) entre la condition contrôle et la privation hydrique (fig. 93B). La PAs est ainsi significativement plus élevée chez les animaux tPA<sup>Null</sup> (120 mmHg) en comparaison des animaux tPA WT (99 mmHg) après 24h de privation hydrique (fig. 93B). Le rythme cardiaque augmente significativement chez les animaux tPA WT (de 605 BPM à 716 BPM) mais pas chez les animaux tPA<sup>Null</sup> entre la condition contrôle et la privation hydrique de 24h (fig. 93C). Il n'y a pas de différences entre les deux groupes selon la condition contrôle ou de privation hydrique (fig. 93C). Nous pouvons toutefois observer que le rythme cardiaque des animaux tPA<sup>Null</sup> est significativement plus élevé en condition contrôle (682 BPM) comparativement aux animaux WT (605 BPM).



**Figure 93 :** La privation hydrique provoque une augmentation de la pression artérielle chez les souris tPA<sup>Null</sup> (rouge) par rapport aux souris WT (blanc).

L'ensemble des graphiques représente les valeurs moyennes pour chaque paramètre mesuré chez les animaux WT et tPA<sup>Null</sup>. Frise temporelle des expériences effectuées : mesure de la pression artérielle (bleu). Dans les conditions contrôles, il n'y a pas de différences de pression artérielle entre les animaux tPA<sup>Null</sup> et WT (**A**, **B**). Nous n'avons observé aucune différence de la pression artérielle diastolique chez les souris tPA<sup>Null</sup>, alors qu'elle diminue significativement chez les animaux WT après la privation hydrique (**A**). La pression sanguine systolique augmente significativement chez les animaux tPA<sup>Null</sup> tandis qu'elle ne varie pas chez les souris WT (**B**). La fréquence cardiaque reste similaire chez les souris tPA<sup>Null</sup> alors qu'elle augmente significativement chez les souris WT après la privation hydrique (**C**), de plus le rythme cardiaque des animaux tPA<sup>Null</sup> est significativement plus élevé en condition contrôle comparativement aux animaux WT. N = 10 animaux par groupe et 9 pour les tPA<sup>Null</sup> 24hWD. Des animaux sont exclus si nous identifions des valeurs aberrantes avec la méthode ROUT, Q = 1%. Les barres d'erreur représentent la SEM \*p < 0,05 ; \*\*p < 0,01 ; \*\*\*p < 0,00, la valeur de p est déterminée par un test t de Student ou Mann-Whitney selon la normalité des données.

Cette étude montre qu'en condition de privation hydrique, les animaux tPA WT vont diminuer leur PAD et augmenter leur rythme. Cette étude montre qu'en condition de privation hydrique, les animaux tPA WT vont diminuer leur PAD et augmenter leur rythme cardiaque, tandis que les animaux tPA<sup>Null</sup> vont augmenter leur PAS uniquement (fig. 90). Ces variations de pression artérielle et de rythme cardiaque sont en lien avec le volume et/ou l'osmolarité plasmatique. Or,

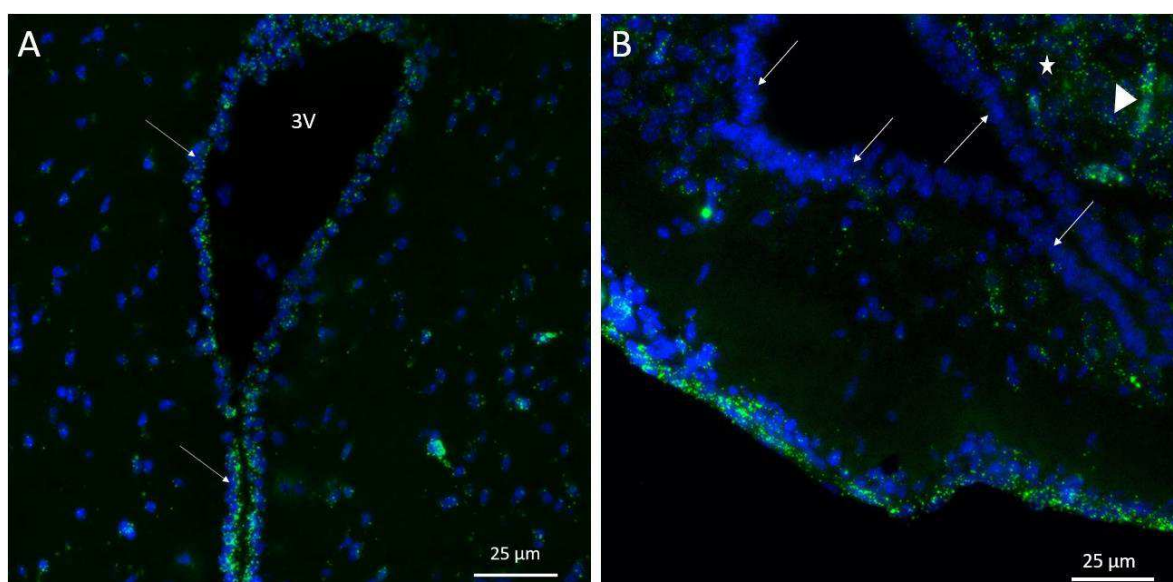
comme énoncé auparavant les fonctions urinaire et plasmatique (volume, osmolarité) sont liées entre elles. Donc nous pouvons supposer que les variations de la fonction urinaire et de la pression artérielle observées sont toutes deux en relation avec une perturbation de l'activité de la vasopressine.

L'ensemble de ces résultats apportent la preuve que le tPA est exprimé par les neurones de l'axe vasopressinergique hypothalamo-neurohypophysaire. De plus, après 24h de privation hydrique, les animaux déficients en tPA (tPA<sup>Null</sup>) présentent des troubles de l'osmolarité urinaire et des fonctions cardiaques.

## RESULTATS ANNEXE :

Bien que ne faisant pas partie de nos objectifs principaux, je tiens à illustrer différentes observations originales réalisées dans le cadre de mes travaux sur la distribution du tPA au sein du système vasopressinergique hypothalamo-neurohypophysaire.

- **Expression différentielle du tPA dans les différents types cellulaires de l'épithélium ventriculaire (épendymocytes versus tanocytes)**



**Figure 94 :** Détection des ARNm codants le tPA dans les parois du 3<sup>e</sup> ventricule

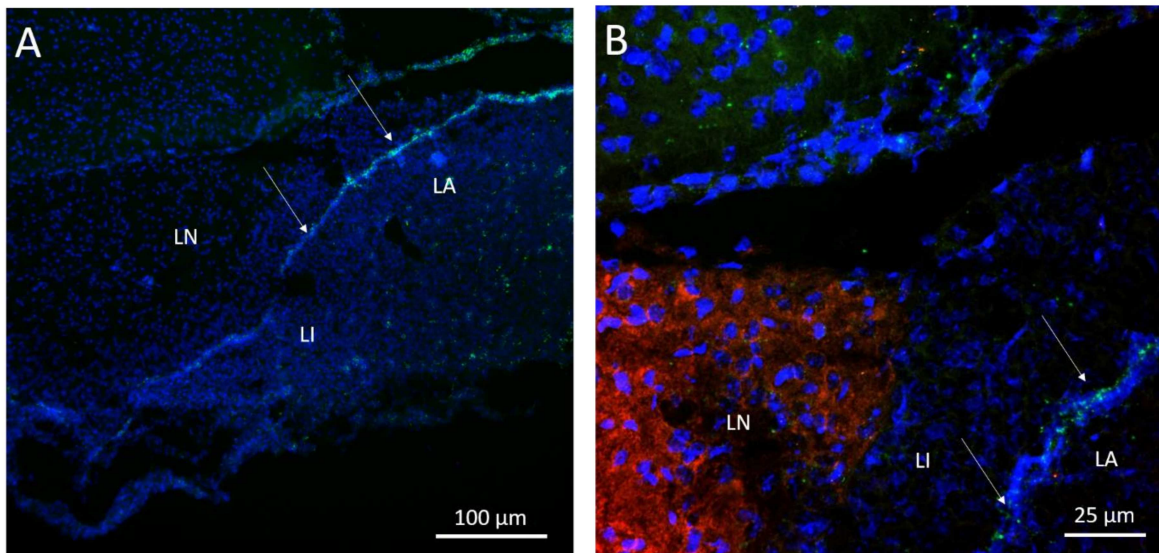
Ependymocytes du 3<sup>e</sup> ventricule dorsal (A) et tanocytes qui tapissent le plancher du 3<sup>ème</sup> ventricule de l'hypothalamus antérieur (B). De nombreux transcrits du tPA sont visibles dans les épendymocytes (flèches en A) mais pas dans les tanocytes (flèches en B). On détecte également des transcrits du gène PLAT dans des cellules du noyau arqué antérieur (étoile en B). La pointe de flèche en B montre des cellules endothéliales de vaisseaux parenchymateux qui présentent toujours de nombreux transcrits du gène PLAT. N = 3 animaux WT.

Pour information, il est important de souligner que le(s) rôle(s) du tPA exprimé par les épendymocytes n'a pas fait l'objet d'étude. Un article rapporte néanmoins l'existence d'altérations cérébroventriculaires chez les souris tPA KO congéniques (Stefanitsch et al., 2015). En utilisant



des méthodes d'IRM anatomique comparables, nous n'avons pas pu confirmer ces données chez nos souris  $tPA^{Null}$ .

- **tPA et cellules antéhypophysaires ?**



**Figure 95** : Coupes adjacentes traitées en hybridation in situ illustrant la distribution des ARNm codants le tPA dans les trois lobes de l'hypophyse à faible (A) ou fort grossissement (B).

**A** : Ce faible grossissement montre que les ARNm codant le PLAT sont principalement associés à la région qui sépare le lobe intermédiaire du lobe antérieur. Les signaux intenses observés dans le LA correspondent principalement à des marquages vasculaires et/ou à de très rares cellules endocrines exprimant le gène PLAT leur nature n'a pas pu être identifiée). Malgré ce faible grossissement, un signal intense est détecté au niveau de la zone qui sépare le LI du LA (flèches en A). C'est dans cette région particulière (la zone marginale) que l'on rencontre des cellules précurseur des cellules antéhypophysaires (Communication personnelle du docteur E. Maubert).

**B** : Sur une coupe adjacente visualisée à plus fort grossissement, l'immunomarquage anti-neurophysine II (rouge) permet d'identifier le lobe nerveux (LN). On observe à nouveau un intense marquage des transcrits du gène PLAT au niveau de la zone marginale (flèches en B). Les cellules antéhypophysaires sont, quant à elles, dépourvues de marquage. N = 3 animaux WT.

## **Discussion**



Les résultats de notre étude nous ont permis de confirmer la présence de la protéine tPA et de son transcrite *PLAT* dans les cellules à AVP des noyaux PVN et SON hypothalamiques. La protéine tPA est aussi observée dans les terminaisons axonales provenant des neurones parvocellulaires dans la zone externe de l'EM contenant de l'AVP. Nous avons aussi mis en évidence la présence de tPA dans la neurohypophyse qui est colocalisé avec l'AVP. Il s'avère que les animaux déficients en tPA, les tPA Null, montrent une consommation hydrique plus importante en condition contrôle. Nous avons mis en évidence un défaut de la réabsorption d'eau par les reins régulant l'osmolarité urinaire et plasmatique ainsi que les troubles de la fonction urinaire chez les animaux tPA Null après une privation hydrique de 24h. De plus, les animaux tPA Null montrent des changements de leur pression artérielle différent des animaux contrôles après une privation hydrique de 24h.

#### ***Distribution du tPA et de la vasopressine dans les neurones magnocellulaires vasopressinergiques des animaux tPA WT***

Les immunomarquages du tPA dans la région hypothalamo-hypophysaire montrent la présence du tPA dans les régions des noyaux hypothalamique SON et PVN, ainsi que dans la zone externe de l'EM et dans la neurohypophyse (Résultats fig. 83). Ces observations ont confirmées les résultats de Miyata et coll. (2005), qui montraient aussi la présence de tPA dans les neurones magnocellulaires du SON et dans la neurohypophyse bien que les tissus proviennent rat Wistar (Miyata *et al.*, 2005). Il n'a pas été mis en évidence la présence du tPA dans les neurones magnocellulaires du SON et du PVN sur tissus murins par Imamura et coll. (2010), ils ont cependant mis en évidence la présence du tPA dans la neurohypophyse (Imamura *et al.*, 2010).

D'après nos résultats concernant l'injection périphérique du tPA fluorescent, il est tout à fait possible que le tPA observé à la fois dans la zone externe l'EM et la neurohypophyse provienne

de la circulation périphérique et diffuse à travers les vaisseaux fenêtrés (Résultats fig. 84). L'étude d'Imamura et coll. met en évidence une libération d'AVP par les terminaisons nerveuses isolées de la neurohypophyse après une application extracellulaire de tPA recombinant. Cette observation validerait notre supposition, en effet le tPA pourrait être libéré soit par les terminaison neuronale et participer localement à la libération de l'AVP, soit par les cellules endothéliales avant d'atteindre les terminaisons nerveuses des neurones magnocellulaire du côté abluminal. Par ailleurs, le tPA est observé à la fois dans les neurones magnocellulaires et dans la neurohypophyse mais pas dans le tractus neuronal magnocellulaire de la zone interne de l'EM, contrairement à la vasopressine. D'après les travaux d'Imamura et coll. (2010) décrivant l'AVP et le tPA dans les mêmes granules, il est surprenant de pouvoir détecter l'AVP sans tPA dans le tractus. Pour ces raisons nous avons jugé nécessaire de procéder à l'étude STED permettant d'augmenter grandement la résolution spatiale de nos signaux immunologiques, et donc de définir précisément la localisation du tPA dans ces structures.

Cette étude préliminaire a mis en évidence la présence de tPA à la fois dans des fibres neuronales positives à l'AVP dans la zone externe de l'EM (Résultats fig. 85), ainsi que dans les terminaisons nerveuses de la neurohypophyse (Résultats fig. 85). Ces observations pourraient valider le transport du tPA depuis les corps cellulaires des neurones jusque dans les terminaisons axonales des neurones magnocellulaires. Cependant, le signal de du tPA et de l'AVP ne sont que ponctuellement colocalisé, signifiant que ces deux protéines ne soient pas transportées et stockés dans les mêmes granules, contrairement aux résultats de Imamura et coll. (2010) et Miyata et coll. (2005). Il a été montré par Knipe et coll. (2010) que le pH des granules de sécrétions des cellules endothéliales contenant le tPA s'élevait en moyenne à 6,1 (Knipe *et al.*, 2010), contrairement aux vésicules de sécrétions chargées en AVP dont le pH diminue avec la maturation des granules qui

est d'environ 5.0~5.5 dans un granule mature (Kim *et al.*, 2006b). Cette différence de pH serait donc incompatible pour ces deux protéines, plus encore de par l'importance du pH dans l'activité enzymatique du tPA (Hamon *et al.*, 1990). Il reste tout de même absolument nécessaire de réitérer cette étude avec un nombre d'animaux plus élevé et de comparer les observations immunohistologique entre tPA<sup>Null</sup> et WT.

Grâce à l'hybridation in situ, nous avons pu observer l'expression du tPA par les neurones vasopressinergiques (Résultats fig. 86). Nous pouvons affirmer que les neurones magnocellulaires du SON, expriment les ARNm du gène *PLAT*. Concernant le PVN, il serait nécessaire d'associer l'hybridation in situ du transcrit *PLAT* à un immunomarquage d'un marqueur spécifique de chaque population neuronale, parvocellulaire et magnocellulaire afin d'identifier une expression fine de cette protéine. L'hybridation dans la neurohypophyse reste incertaine quant à la localisation précise des transcrit. L'ajout de marqueurs immunologique des vaisseaux sanguins nous permettra de les différencier des terminaisons axonales. Il a été mis en évidence par Doyle et Kiebler (2011) qu'il était possible pour un transcrit d'être transporté du soma vers la synapse où il sera traduit en protéine (Doyle and Kiebler, 2011).

#### ***Etude de l'activité métabolique chez les animaux tPA<sup>Null</sup> et WT***

Le tPA et la vasopressine sont exprimés dans les neurones magnocellulaires et sont tous deux présents au niveau des terminaisons nerveuses de la neurohypophyse. A ce niveau, l'AVP sera libérée avec ou non le tPA dans la circulation sanguine. Nous avons donc recherché si une déficience en tPA était capable de perturber les fonctions de l'AVP et de générer des troubles métaboliques. Les enregistrements des animaux tPA<sup>Null</sup> et WT dans les cages métaboliques, révèlent une activité ambulatoire et une consommation hydrique significativement plus élevée chez

les animaux tPA<sup>Null</sup> (Résultats fig. 87). Les résultats de Douceau et coll. (2022) ont préalablement révélés que les animaux tPA<sup>Null</sup> constitutifs était hyperactifs (Douceau *et al.*, 2022). Mes résultats montrent que l'augmentation de la consommation d'eau est un phénotype comportemental nouveau que nous pouvons attribuer à nos tPA<sup>Null</sup>. La polydipsie ne s'explique pas par une activité ambulatoire plus élevée puisque celle-ci n'entraîne pas d'augmentation de la dépense énergétique des animaux et leur balance énergétique reste comparable à celle des animaux WT (Manzanares *et al.*, 2019). Une polydipsie peut s'apparenter à des troubles des fonctions de la vasopressine. Ainsi, une déficience en AVP (diabète insipide central) ou une incapacité des reins à concentrer l'urine (diabète insipide néphrogénique) pourrait être à l'origine du phénotype de polydipsie observé, (Hui *et al.*, 2022). Il existe des modèles murins de diabète insipide central, tels que le rat de souche Brattleboro qui n'exprime pas la vasopressine à la suite d'une mutation du gène *AVP* (Valtin and Schroeder, 1964), ces animaux sont atteints de polydipsie et de polyurie. Nous avons donc voulu déterminer si les fonctions urinaires de nos animaux tPA<sup>Null</sup> présentaient aussi une polyurie comparable à celle observée chez ce modèle.

#### ***Etudes de paramètres physiologiques dans différentes conditions expérimentales chez des souris sauvages et tPA<sup>Null</sup>***

Dans la première partie de cette étude, les mesures réalisées en conditions contrôles n'ont pas mis en évidence de phénotype distinct entre les animaux tPA Null et WT (Résultats fig. 88). La glycosurie qui est plus élevée chez les animaux tPA Null par rapport aux animaux WT semble trouver son origine dans la très grande variabilité des données inter-individus. Ceci pourrait être lié à la consommation alimentaire des animaux qui n'est pas contrôlée avant les prélèvements d'urine ou de plasma. Ainsi il pourrait être intéressant de procéder à ces prélèvements chez des animaux à jeun. Par ailleurs, on observe également que les paramètres mesurés dans les urines sont très

variables en comparaison des mesures effectuées dans le plasma. Concernant les mesures de VSA réalisées en condition contrôle, il semble que les volumes soient plus élevés par miction chez les animaux tPA<sup>Null</sup> ce qui validerait en partie notre hypothèse concernant le rôle du tPA dans les fonctions de l'AVP (Résultats fig. 89). Cependant, nous n'avons pas observé d'augmentation significative du volume d'urine totale des animaux tPA<sup>Null</sup> par rapport aux animaux WT. Au vu du nombre d'animaux important utilisés pour ces mesures, l'absence de différences pourrait s'apparenter à un effet trop faible de la déficience en tPA sur l'équilibre hydrique chez les animaux tPA<sup>Null</sup>. Il n'est toutefois pas surprenant que nous n'ayons pas observé de différences évidentes entre nos deux groupes en conditions contrôles. Il existe certaines études dans lesquels les effets sur l'osmolarité sont mis en évidence après une privation hydrique, et non lors de conditions contrôles où les animaux peuvent avoir développé des mécanismes compensatoires (Imamura *et al.*, 2010; Janas *et al.*, 2016).

Nous avons donc réalisé une privation hydrique chez nos animaux tPA<sup>Null</sup> et WT afin de souligner un phénotype différent entre les animaux tPA<sup>Null</sup> et WT (Résultats fig. 90). Après une privation hydrique de 24h, l'osmolarité urinaire est plus faible chez les animaux tPA<sup>Null</sup>. Les valeurs indiquent une dilution plus importante des urines des animaux tPA<sup>Null</sup>, qui s'accompagne donc d'une concentration en solutés plus faible (glucose, créatinine et urée). De manière intéressante, les ions sodium et chlore ont une concentration similaire entre les animaux tPA<sup>Null</sup> et WT après 24h de privation hydrique. J'ai considéré que si les urines sont plus diluées chez les tPA<sup>Null</sup>, que cela pouvait provenir de deux choses : soit la réabsorption en eau par les reins est plus faible, soit les urines sont plus pauvres en soluté. On peut supposer dans notre cas qu'il s'agit d'un défaut de la réabsorption en eau par les reins ce qui expliquerait la consommation hydrique des animaux tPA<sup>Null</sup> plus élevée que les animaux tPA WT (Armstrong and Johnson, 2018).



Or la réabsorption en eau dans les reins est due notamment à l'action de la vasopressine, qui est sécrétée en cas d'hypovolémie, sur ses récepteurs. (Donato *et al.*, 2014). Ainsi, une hypovolémie et la déshydratation entraînent, par ailleurs, l'activation du système rénine-angiotensine, qui va déclencher la réabsorption du sodium et d'eau (Donato *et al.*, 2014). Cependant, comme nous l'avons décrit les concentrations de sodium et de chlore sont identiques entre les animaux WT et Null après la privation hydrique. Nous pouvons envisager que les flux d'eau au niveau des tubes collecteurs des reins soient négligeables par rapport au maintien d'une volémie physiologique. Une autre hypothèse serait que les animaux possèdent des mécanismes compensatoires permettant de garder une concentration ionique urinaire et plasmatique physiologique.

Il est important de noter que les animaux ont accès à la nourriture durant la phase de privation hydrique dont leur ingestion influe sur la déshydratation des animaux. Il a été montré que la consommation en nourriture des animaux diminuait due à l'absence d'eau dans leur environnement (Bekkevold *et al.*, 2013; Schoorlemmer and Evered, 2002). Or, nous ne connaissons pas la prise alimentaire de nos animaux lors d'une privation hydrique. Il serait nécessaire de réitérer l'expérience en cages métaboliques avant, pendant et après 24h de privation hydrique, afin d'observer simultanément la prise alimentaire et la consommation hydrique des animaux après cette période de privation. Parallèlement à l'osmolarité urinaire, l'osmolarité plasmatique est équivalente quel que soit le génotype des animaux et la condition d'accès à l'eau.

Dans l'étude de Imamura et coll., Les auteurs mettent en évidence une augmentation significative de l'osmolarité plasmatique chez les animaux tPA KO et WT, qui est significativement plus élevée chez les tPA KO par rapport aux animaux tPA WT après 5 jours de privation hydrique (Imamura *et al.*, 2010). Il est très probable qu'après 5 jours sans eau, les

mécanismes de compensation régulés par les tubes collecteurs des reins ne soient plus suffisants à établir une osmolarité plasmatique physiologique à la fois chez les animaux tPA KO et tPA WT (Capasso *et al.*, 2001; Vasilev *et al.*, 2021). Toutefois, ces résultats sont concordants avec une osmolarité urinaire plus faible chez nos animaux tPA<sup>Null</sup>. En effet si les urines sont plus diluées alors l'osmolarité du plasma augmente lorsque l'absorption de l'eau par les reins est inefficace. Mes perspectives pour répondre à cette question serait de tester si l'augmentation progressive du temps de privation hydrique des animaux tPA<sup>Null</sup> et WT jusqu'à 5 jours consécutifs entraîne chez les animaux tPA<sup>Null</sup> une osmolarité plasmatique plus élevée en comparaison aux animaux tPA WT.

Afin de mieux comprendre pourquoi les animaux tPA<sup>Null</sup> présentent une polydipsie qui n'a pas d'effet sur le fonctionnement urinaire en condition contrôle chez les animaux tPA Null, nous avons mesuré les volumes urinaires excrétés chez les animaux tPA<sup>Null</sup> et WT après 24h de privation hydrique en comparaison avec les conditions contrôles (Résultats fig. 91).

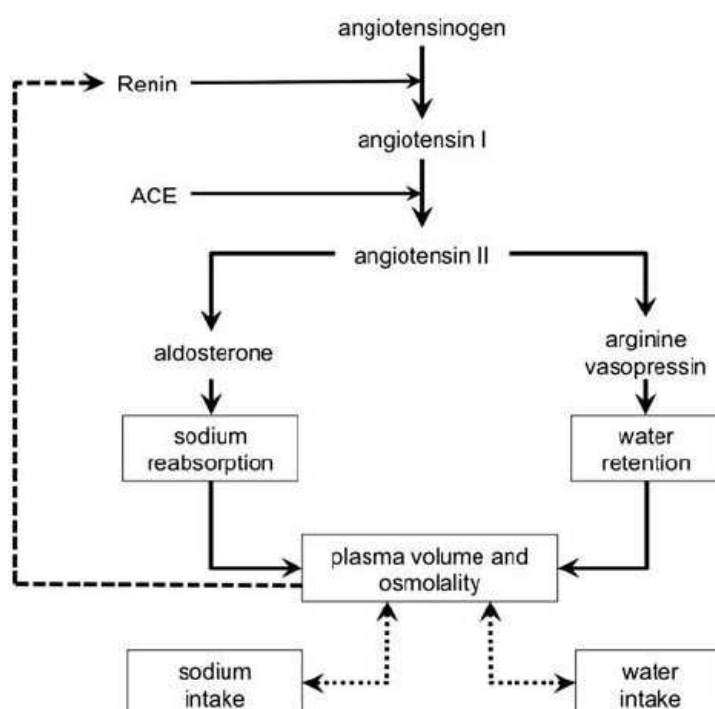
Nous n'avons observé aucunes différences en condition contrôle entre les animaux tPA Null et WT. Après 24h de privation hydrique, de manière très étrange les animaux tPA Null possèdent un volume urinaire significativement plus faible que les animaux tPA WT, ce qui discordé avec les mesures d'osmolarité qui sont plus faibles dans les urines des animaux tPA<sup>Null</sup> comparativement aux tPA WT. Ainsi, selon moi, il serait toutefois possible que les animaux n'aient pas une osmolarité urinaire plus faible dû à une diminution de la réabsorption de l'eau, mais dû à une augmentation de l'absorption des solutés. Néanmoins sachant que la composition du plasma ne montre pas de variation de la concentration de ces solutés entre les différentes conditions ; si les animaux tPA Null ont une consommation hydrique plus élevée et une osmolarité urinaire plus faible que les animaux tPA WT, alors ils devraient aussi avoir des volumes urinaires excrétés plus élevés par rapport aux animaux tPA WT après 24h de privation hydrique (Shi *et al.*, 2017). Mes

observations sont en faveur du fait d'une possibilité que les animaux Null présentent un dysfonctionnement mictionnel impliquant une rétention urinaire causée par une contractilité incomplète des muscles de la vessie par exemple (Yoshimura and Chancellor, 2004), ou bien directement dû à la déshydratation par la rétention d'eau.

De plus, il est envisageable que le test du VSA ne soit pas adapté dans notre étude et ne soit pas assez fin pour pouvoir mettre en évidence un phénotype subtil. Pour étudier de manière plus directe les fonctions urinaires des animaux, nous pourrions utiliser des cages métaboliques collectrices adaptées aux souris. Il existe aussi un système d'enregistrement de la pression au niveau de la vessie et du sphincter : la cystométrie. Bien qu'invasive, cette méthode est relativement fiable et la plus directe dans l'étude des fonctions mictionnel des souris (Mann-Gow *et al.*, 2017; Sidler *et al.*, 2018). Toutefois, nos observations quant au volume urinaire excrété par nos animaux ne sont pas totalement aberrantes puisque les animaux tPA<sup>Null</sup> perdent moins de poids que les animaux WT après 24h de privation hydrique (fig. 92), ce qui corrèlerai avec une rétention d'eau observé chez l'homme en cas de déshydratation (Hahn, 2021). Ainsi, la mesure de la composition corporelle des animaux serait déterminant dans la compréhension de la gestion des fluides par les souris tPA<sup>Null</sup>.

Les variations d'osmolarité plasmatique et de volémie entraînent des modifications des constantes de pression artérielle et de rythme cardiaque. Il apparaissait donc nécessaire de mesurer ces paramètres physiologiques chez les animaux tPA<sup>Null</sup> et WT après une privation hydrique. La mesure de la pression artérielle de nos animaux nous a permis de montrer une réponse totalement différente entre les animaux déficients en tPA et les animaux WT à la privation hydrique, et donc à la déshydratation (Résultats fig. 93). Les animaux tPA WT présentent une hypotension diastolique, ce phénomène peut s'expliquer par un volume sanguin plus faible à cause de la

déshydratation (Holbein *et al.*, 2014; Kreimeier, 2000; Taylor and Jones, 2022). Pour compenser cette chute de la pression artérielle, le rythme cardiaque des animaux tPA WT s'accélère (Young *et al.*, 2019). Nos animaux tPA Null augmentent leur pression artérielle systolique face à un rythme cardiaque élevé même en condition basale comme illustré. Il est possible qu'une déficience en hormone AVP en phase de déshydratation pourrait conduire à une volémie trop basse de part une réabsorption de l'eau inefficace (Rajani *et al.*, 2009; Reid, 1997). Le rétrocontrôle négatif ne s'effectuerait pas sur la rénine et l'angiotensine II continueraient à être sécrétées afin de maintenir son action hypertensive (fig. 96) (Digby *et al.*, 2011). L'étude de Hahn (2021) a montré chez l'homme, qu'une élévation des biomarqueurs urinaires (créatinine) était corrélée à une activité cardiaque plus élevée.



**Figure 96 : Système rénine-angiotensine responsable du maintien de l'équilibre hydrique et sodique.**

La rénine catalyse la conversion de l'angiotensinogène en angiotensine I qui est convertie par l'enzyme de conversion de l'angiotensine (ECA) en angiotensine II. L'angiotensine II contrôle la sécrétion d'aldostérone, qui stimule la rétention de sodium, et d'arginine vasopressine (AVP) qui stimule la réabsorption d'eau par le rein. Le volume plasmatique et l'osmolarité du plasma contrôlent l'appétit sodique et la consommation hydrique. Une consommation élevée de sel

entraîne une modification du volume plasmatique et de l'osmolarité, qui exercent une rétroaction négative sur la sécrétion de rénine. En fin de compte, la consommation élevée de sel induit une diminution de la concentration d'aldostérone, ce qui réduit la réabsorption du sodium et augmente l'excrétion du sodium. Une consommation élevée de sel n'induit pas de changement dans la concentration plasmatique d'AVP, si l'apport d'eau fraîche est suffisant pour maintenir un équilibre entre le sel et l'eau. Digby *et al.*, 2011 d'après Cowley *et al.*, 1986.

Grâce à notre étude, Nous avons montré que la souche de souris déficiente en tPA, tPA<sup>Null</sup>, présente tout comme les tPA KO un trouble de l'équilibre hydrique, impliquant :

- Une consommation hydrique élevée
- Des troubles de l'osmolarité urinaire et de la miction après 24h de privation hydrique
- Une hypertension après 24h de privation hydrique

De plus, nous avons pu observer des troubles de l'osmolarité urinaire ce qui n'ont pas été mis en évidence auparavant, et cela, dès 24h de privation hydrique. Dans le but de définir l'origine des troubles observés, il est nécessaire de doser le taux de vasopressine circulant. Ce dosage a été effectué chez les animaux tPA KO. Il montre une nette diminution de la vasopressine dans le plasma de ces animaux après 48h de privation hydrique (Imamura *et al.*, 2010).

En relation avec une pression artérielle élevée chez les animaux déficients en tPA, le dosage de l'aldostérone nous permettrait de mieux comprendre si sa surexpression pourrait causer les troubles de la fonction cardio-vasculaire des animaux Null après la déprivation hydrique. L'implication du tPA dans l'activation des neurones à AVP parvocellulaires et magnocellulaires du PVN et du SON pourrait être mis en évidence par une quantification du marquage cFOS (marqueur précoce de l'activation cellulaire) dans ces régions, comme il a été effectué par Imamura et coll. (2010). Afin d'identifier finement la spécificité des fonctions du tPA vasculaire dans l'équilibre hydrique, les mêmes études histologiques et physiologique devraient être répétées chez des animaux *VEcad Cre tPA Flox*, et leur contrôle, qui n'expriment pas le tPA endothélial. De cette manière en nous

affranchissant du tPA endothéliales, les effets observés pourront plus facilement être attribué au tPA des neurones vasopressinergiques.

Pour conclure, nous avons démontré les effets d'une déficience en tPA dans le maintien d'un équilibre hydrique physiologique dans une nouvelle souche de souris déficiente en tPA. Il est d'autant plus intéressant que certains de ces paramètres ont déjà été mis en évidence auparavant dans une autre souche déficiente en tPA, les tPA KO. Les études d'Imamura et coll. (2010) et de Miyata et coll. (2005) ainsi que nos résultats nous portent à croire qu'une diminution de vasopressine circulante est à l'origine de ces troubles. Il nous est toutefois impossible de conclure quant à l'action du tPA sur la libération de la vasopressine sans étoffer plus amplement nos recherches. Notre souche tPA<sup>Null</sup> a été développée afin de s'affranchir des mutations passagères à la proximité du gène *PLAT*. Ainsi, la souche tPA<sup>Null</sup> se présente potentiellement comme un meilleur modèle d'étude des implications du tPA dans l'équilibre hydrique et le maintien des fonctions cardio-vasculaires physiologique en réponse à une déshydratation.



## **Conclusion**





Dans ces travaux de thèse, nous avons montré l'importance des modèles animaux dans la recherche préclinique. Ces modèles sont cruciaux puisqu'ils représentent la première étape dans la compréhension de physiopathologies (modèle d'EAI-RNMDA) mais aussi dans la compréhension fonctionnelle de protéines (souris déficiente en tPA tPA<sup>Null</sup>). Cependant, les modèles murins, bien que proches de l'homme dans ses fonctions biologiques, restent des modèles et possèdent des limites à l'interprétation des études qui y sont associées. Ainsi, il est tout aussi important de continuer à développer des modèles toujours plus rigoureux qui permettront une compréhension plus fine et plus fiable des mécanismes physiologiques amenant, à terme, à une meilleure prise en charge des patients, au développement de thérapies et à la prévention des pathologies.

Dans le premier chapitre de cette thèse, nous avons développé un nouveau modèle murin d'EAI-RNMDA par immunisation active visant à pallier aux insuffisances physiopathologiques des modèles par injection d'anticorps. Grâce à ce modèle, nous avons mis en évidence l'implication des lymphocytes B dans le développement physiopathologique de l'EAI-RNMDA. Ce modèle présente également des troubles cognitifs et comportementaux. Dans la deuxième partie de nos objectifs, nous avons apporté les premières données en faveur de la présence du récepteur NMDA exprimé par les tanocytes EM. La recherche de troubles neuroendocrines dans notre modèle d'EAI-RNMDA a mis en lumière la présence de troubles du métabolisme associés aux fonctions de régulations de l'énergie, par la prise alimentaire et la gestion des réserves énergétiques. Nous n'avons toutefois pas réussi à établir de liens entre ces deux éléments.

Dans le second chapitre de cette thèse, nous nous sommes intéressés aux rôles du tPA dans l'équilibre hydrominéral, par l'utilisation de la souche isogénique tPA<sup>Null</sup> déficiente en tPA développée par notre équipe et l'ICS (Institut Clinique de la Souris). Ce modèle permet de s'affranchir des modifications de l'expression de gènes à la proximité du gène *PLAT* (gène du tPA)

observées dans la souche congénique tPA KO de Carmeliet et coll. (1994), qui peuvent perturber la physiologie des animaux au-delà de la perte de l'expression du tPA. Notre travail visait à reproduire les recherches expérimentales menées par Imamura et coll. (2010) sur la souche tPA KO. Cette étude a permis de mettre en évidence différentes anomalies physiologiques dans la régulation de l'équilibre hydrominéral des animaux tPA<sup>Null</sup>, faisant intervenir la soif, l'osmolarité plasmatique, urinaire et l'activité cardio-vasculaire.

Ces travaux permettront d'ouvrir de nouvelles pistes de recherches sur les TCA et l'auto-immunité, mais aussi sur les conséquences des autoanticorps anti-RNMDA présents dans le LCR grâce à l'utilisation de notre modèle d'EAI-RNMDA. Les travaux sur la tPA<sup>Null</sup> améliorent notre compréhension du fonctionnement de l'équilibre hydrique, et avec l'étude d'Imamura et coll. (2010) révèlent une nouvelle cible thérapeutique dans les pathologies liées à l'équilibre hydrique faisant intervenir l'AVP. De plus, ces travaux montrent l'importance de caractériser ces modèles, en condition physiologique, afin de prendre en compte les éventuelles perturbations pouvant avoir un impact dans certaines études, telles que le stroke.

## **Autres travaux**



Les différentes collaborations réalisées lors de mon doctorat ont participé à la publication d'un article de recherche et à un second en préparation cités ci-dessous :

1. *Tolerogenic effect of antigen-encapsulating nanoparticles toward specific T cell response against N-methyl-D-aspartate receptor in an autoimmune encephalitis model.*

Dans cet article, ma participation s'est faite dans la partie comportementale et dans le suivi des animaux. J'ai procédé à la réalisation et à l'analyse des tests de O maze, ainsi qu'à l'assistance dans la réalisation des mesures sur le sommeil grâce à l'utilisation d'une armoire ventilée aménagée de cages équipées d'un capteur *Piezoelectric*.

Cet article porte sur les mécanismes immunitaires menant à la réponse auto-immune des lymphocytes B et plus particulièrement sur le rôle des lymphocytes T *helper* qui est mal compris à ce jour dans l'encéphalite auto-immune anti-RNMDA.

Grâce à l'utilisation du modèle murin d'EAI-RNMDA mis au point dans notre laboratoire (Wagnon *et al.*, 2020), Lesec et coll. ont montrés la présence dans la rate et les méninges de lymphocytes T CD4<sup>+</sup> mais aussi CD8<sup>+</sup> anti-GluN1 spécifiques. Le profil polyfonctionnel des lymphocytes T *helper* suggère une interaction entre les lymphocytes T et B amenant à la génération d'anticorps autoimmuns anti-GluN1. Dans un second temps, l'utilisation de nanoparticules PLGA (poly(acide lactique-co-glycolique)) chargées d'antigènes servant à l'induction du modèle, diminue la réponse des cellules T contre le peptide GluN1 sans affecter les symptômes de la maladie.

Pour conclure, cette étude a identifié pour la première fois une contribution de la part des lymphocytes T *helper* dans la pathologie d'EAI-RNMDA et ouvre la voie au développement de futures approches tolérogènes à base de nanoparticules pour traiter les rechutes.

*2. Parvalbumin interneuron derived tissue-type plasminogen activator shapes perineuronal net structure.*

Dans cet article, ma participation s'est effectuée dans l'étude de l'expression du gène *PLAT* par les interneurones parvalbumines, enveloppés de filets périneuronaux, grâce à l'utilisation de l'Hybridation *In Situ* fluorescente (fISH) couplée à l'immunohistofluorescence.

Cet article porte sur le profil d'expression du tPA par les interneurones parvalbumines à décharge rapide (FS-PV) et son rôle éventuel dans la plasticité de la matrice par le biais du remodelage des filets périneuronaux (PNN) qui entourent ces interneurones.

Lépine et coll. montrent que les interneurones corticaux FS-PV sont une source de tPA *in vivo*, la suppression de l'expression du tPA dans ces neurones entraîne une densification des PNN dans le cortex somatosensoriel. *In vitro*, dans des cultures primaires d'interneurones murins, des analyses ont montré que le tPA convertissait le plasminogène en plasmine active qui va à son tour dégrader directement l'agrécan, constituant structurel majeur des PNN.

Pour conclure, cette étude a démontré que le tPA libéré par les interneurones FS-PV dans le SNC réduisait la densité des PNN par la dégradation de l'agrécan. Cette découverte du remodelage des PNN tPA dépendante ouvre des perspectives intéressantes sur le contrôle de la plasticité cérébrale.

1. Tolerogenic effect of antigen-encapsulating nanoparticles toward specific T cell response against N-methyl-D-aspartate receptor in an autoimmune encephalitis model





## **Tolerogenic effect of antigen-encapsulating nanoparticles toward specific T cell response against N-methyl-D-aspartate receptor in an autoimmune encephalitis model**

### **Authors:**

LESEC Léonie<sup>a</sup>, REGNAULD Caroline<sup>a</sup>, FURON Jonathane<sup>a</sup>, MAZERT-DREON Aurélie<sup>b</sup>, GROO Anne-Claire<sup>b</sup>, MILLER Stephen<sup>c</sup>, NEEF Tobias<sup>c</sup>, LEPRINCE Jérôme<sup>d</sup>, LEFRANC Benjamin<sup>d</sup>, VIVIEN Denis<sup>a,e</sup>, DOCAGNE Fabian<sup>a</sup>, LE MAUFF Brigitte<sup>a,f</sup>, TOUTIRAIS Olivier<sup>a,f</sup>

<sup>a</sup> Normandie Univ, UNICAEN, INSERM, GIP Cyceron, Institut Blood and Brain @Caen-Normandie (BB@C), UMR-S U1237, Physiopathology and Imaging of Neurological Disorders (PhIND), Caen, France.

<sup>b</sup> Normandie Univ, UNICAEN, CERMN, F-14000 Caen, France.

<sup>c</sup> Department of Microbiology-Immunology, Feinberg School of Medicine, Northwestern University, Chicago, IL and Interdepartmental Immunobiology Center, Feinberg School of Medicine, Northwestern University, Chicago, IL, USA

<sup>d</sup> Normandie Univ, UNIROUEN, INSERM, U1239, Neuronal and Neuroendocrine Differentiation and Communication, Rouen, France

<sup>e</sup> Department of clinical research, Caen University Hospital, CHU Caen, France.

<sup>f</sup> Department of Immunology and Histocompatibility (HLA), Caen University Hospital, CHU Caen, France.

**Article en préparation**

**Abstract:**

Anti-N-Methyl-D-Aspartate receptor (NMDA) autoimmune encephalitis (RNMDA AE) is an autoimmune disease characterized by severe psychiatric and neurological symptoms. While the pathogenic role of antibodies (Ab) directed against the GluN1 subunit of RNMDA is well described in this disease, the immune mechanisms involved in the generation of the autoimmune B cell response, especially the role of T helper cells, are poorly understood. Previously, we have developed a B-cell-mediated mouse model of RNMDA-AE by immunization with a GluN1359-378 peptide that drives a series of symptoms that recapitulate AE such as anxiety behavior and spatial memory impairment. Here, in this mouse model, we highlighted anti-GluN1 specific CD4<sup>+</sup> but also CD8<sup>+</sup> T cells in both spleen and meninges. T helper cells have a polyfunctional profile suggesting a T and B cell crosstalk to generate anti-GluN1 pathogenic Abs. Interestingly, the use of a tolerogenic strategy with PLGA (poly(lactic-co-glycolic acid)) nanoparticles (NPs) loaded with antigen, decreased T cell response against GluN1 peptide without affecting symptoms of the disease. In conclusion, this study identified, for the first time, a potential contribution of T helper cells in the pathology of RNMDA AE and pave the way for the development of future NP-based tolerogenic approaches to treat relapses.

## 2. Parvalbumin interneuron-derived tissue-type plasminogen activator shapes perineuronal net structure




## RESEARCH ARTICLE

## Open Access



# Parvalbumin interneuron-derived tissue-type plasminogen activator shapes perineuronal net structure

Matthieu Lépine<sup>1†</sup>, Sara Douceau<sup>1†</sup>, Gabrielle Devienne<sup>2</sup>, Paul Prunotto<sup>1</sup>, Sophie Lenoir<sup>1</sup>, Caroline Regnaud<sup>1</sup>, Elsa Pouet<sup>1</sup>, Juliette Piquet<sup>2</sup>, Laurent Lebouvier<sup>1</sup>, Yannick Hommet<sup>1</sup>, Eric Maubert<sup>1</sup>, Véronique Agin<sup>1</sup>, Bertrand Lambolez<sup>2</sup>, Bruno Cauti<sup>2</sup>, Carine Ali<sup>1††</sup>  and Denis Vivien<sup>3†</sup>

## Abstract

**Background:** Perineuronal nets (PNNs) are specialized extracellular matrix structures mainly found around fast-spiking parvalbumin (FS-PV) interneurons. In the adult, their degradation alters FS-PV-driven functions, such as brain plasticity and memory, and altered PNN structures have been found in neurodevelopmental and central nervous system disorders such as Alzheimer's disease, leading to interest in identifying targets able to modify or participate in PNN metabolism. The serine protease tissue-type plasminogen activator (tPA) plays multifaceted roles in brain pathophysiology. However, its cellular expression profile in the brain remains unclear and a possible role in matrix plasticity through PNN remodeling has never been investigated.

**Result:** By combining a GFP reporter approach, immunohistochemistry, electrophysiology, and single-cell RT-PCR, we discovered that cortical FS-PV interneurons are a source of tPA *in vivo*. We found that mice specifically lacking tPA in FS-PV interneurons display denser PNNs in the somatosensory cortex, suggesting a role for tPA from FS-PV interneurons in PNN remodeling. *In vitro* analyses in primary cultures of mouse interneurons also showed that tPA converts plasminogen into active plasmin, which in turn, directly degrades aggrecan, a major structural chondroitin sulfate proteoglycan (CSPG) in PNNs.

**Conclusions:** We demonstrate that tPA released from FS-PV interneurons in the central nervous system reduces PNN density through CSPG degradation. The discovery of this tPA-dependent PNN remodeling opens interesting insights into the control of brain plasticity.

**Keywords:** Tissue-type plasminogen activator, Plasminogen, Parvalbumin interneurons, Perineuronal nets, Aggrecan

## Background

Perineuronal nets (PNNs) are a specific form of extracellular matrix (ECM), in which chondroitin sulfate proteoglycans (CSPGs), hyaluronan, link proteins, and tenascin-R are organized into dense lattice-like structures [26, 86]. In the cerebral cortex, PNNs mainly envelop fast-spiking parvalbumin (FS-PV) interneurons. They are formed during post-natal development and are thought to stabilize neuronal circuits at adult stages [12, 26, 89, 96]. Indeed, PNN digestion with the bacterial enzyme

<sup>†</sup>Matthieu Lépine, Sara Douceau, Carine Ali and Denis Vivien contributed equally to this work.

\*Correspondence: [ali@cyceron.fr](mailto:ali@cyceron.fr)

<sup>1</sup> Normandie Univ, UNICAEN, INSERM, INSERMUMR-S U1237, Physiopathology and Imaging of Neurological Disorders, Institut Blood and Brain @ Caen Normandie, Cyceron, Bd Becquerel, BP 5229-14074, 14000 Caen, France  
Full list of author information is available at the end of the article



© The Author(s) 2022. **Open Access** This article is licensed under a Creative Commons Attribution 4.0 International License, which permits use, sharing, adaptation, distribution and reproduction in any medium or format, as long as you give appropriate credit to the original author(s) and the source, provide a link to the Creative Commons licence, and indicate if changes were made. The images or other third party material in this article are included in the article's Creative Commons licence, unless indicated otherwise in a credit line to the material. If material is not included in the article's Creative Commons licence and your intended use is not permitted by statutory regulation or exceeds the permitted use, you will need to obtain permission directly from the copyright holder. To view a copy of this licence, visit <http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>. The Creative Commons Public Domain Dedication waiver (<http://creativecommons.org/publicdomain/zero/1.0/>) applies to the data made available in this article, unless otherwise stated in a credit line to the data.

chondroitinase ABC (ChABC) strongly affects neuronal excitability and influences brain plasticity [2, 11, 30, 42, 62, 70, 76]. In the brain, endogenous proteases such as A Disintegrin And Metalloproteinase with Thrombospondin Motifs (ADAMTS) or matrix metalloproteinases (MMPs) may regulate PNN functions through the cleavage of their CSPGs, including aggrecan, neurocan, versican, and brevican [34, 86]. Paradigms of sensory deprivation have demonstrated the critical implication of PNN remodeling during periods of heightened plasticity, as well as the involvement of endogenous MMP9 in PNN plasticity [37, 59, 60, 66]. Interestingly, it has been shown that the expression and activity of the serine protease, tissue-type plasminogen activator (tPA) increase after sensory deprivation. Furthermore, tPA is thought to participate in plasticity-related mechanisms [16, 52, 53, 58]. However, a direct link between tPA-driven plasticity and PNNs remains unestablished.

In the (neuro-)vascular clinical community, tPA is well known as being the major enzymatic activator of plasminogen, thus promoting vascular fibrinolysis. Besides, tPA also has prominent effects in the central nervous system (CNS). As reviewed recently [87], many actions of tPA in the CNS rely on its proteolytic activity. Some functions occur independently of plasmin(ogen), via different receptors and binding partners which include laminin, low-density lipoprotein receptor-related proteins (LRPs), N-methyl-D-aspartate receptor (NMDAR), or some growth factor precursors. Via these multiple targets, tPA is a key player in CNS physiological and pathological processes (for recent reviews see [87, 98]). For instance, during development, tPA controls neuronal migration [64] and promotes axonal growth/synaptic plasticity [4, 67, 68, 82]. Later in life, tPA modulates learning and memory processes [5, 32, 48] and anxiety-related behaviors [54, 65]. Under pathological conditions, tPA controls neuronal death [44, 45, 61, 94], neuro-inflammation, and blood-brain barrier permeability [47, 55, 77, 81].

Consensual descriptions of the cellular distribution of tPA in the CNS are lacking. So far, most literature agrees that tPA can be released in the extracellular space by endothelial cells, oligodendrocytes, and hippocampal neurons [43, 46, 80]. Microglia and astrocytes are uncertain sources of tPA under physiological conditions but

might be under pathological conditions [1, 91]. In the CNS, tPA is easily detected (mRNA and protein) in hippocampal mossy fibers [46, 74, 85], but its immunohistological detection in cortical neurons is only available through its somatic accumulation after the blockade of axo-dendritic transport with colchicine. Interestingly, immunohistological (after colchicine injection), electrophysiological, and transcriptional analyses revealed the expression of tPA in a subset of excitatory neurons [46, 84]. tPA expression has also been suggested in some GABAergic interneurons in different brain areas [17, 28, 80].

In the present study, using a viral reporter construct, electrophysiology, and single-cell RT-PCR in mice, we found that cortical GABAergic neurons, mainly FS-PV interneurons, express tPA. Using conditional mice presenting a depletion of tPA restricted to PV cells, as well as primary culture of interneurons, we show that tPA originating from PV cells controls PNN turnover through plasmin. This regulation occurs through the cleavage of a component crucial for PNN structural integrity, the CSPG aggrecan.

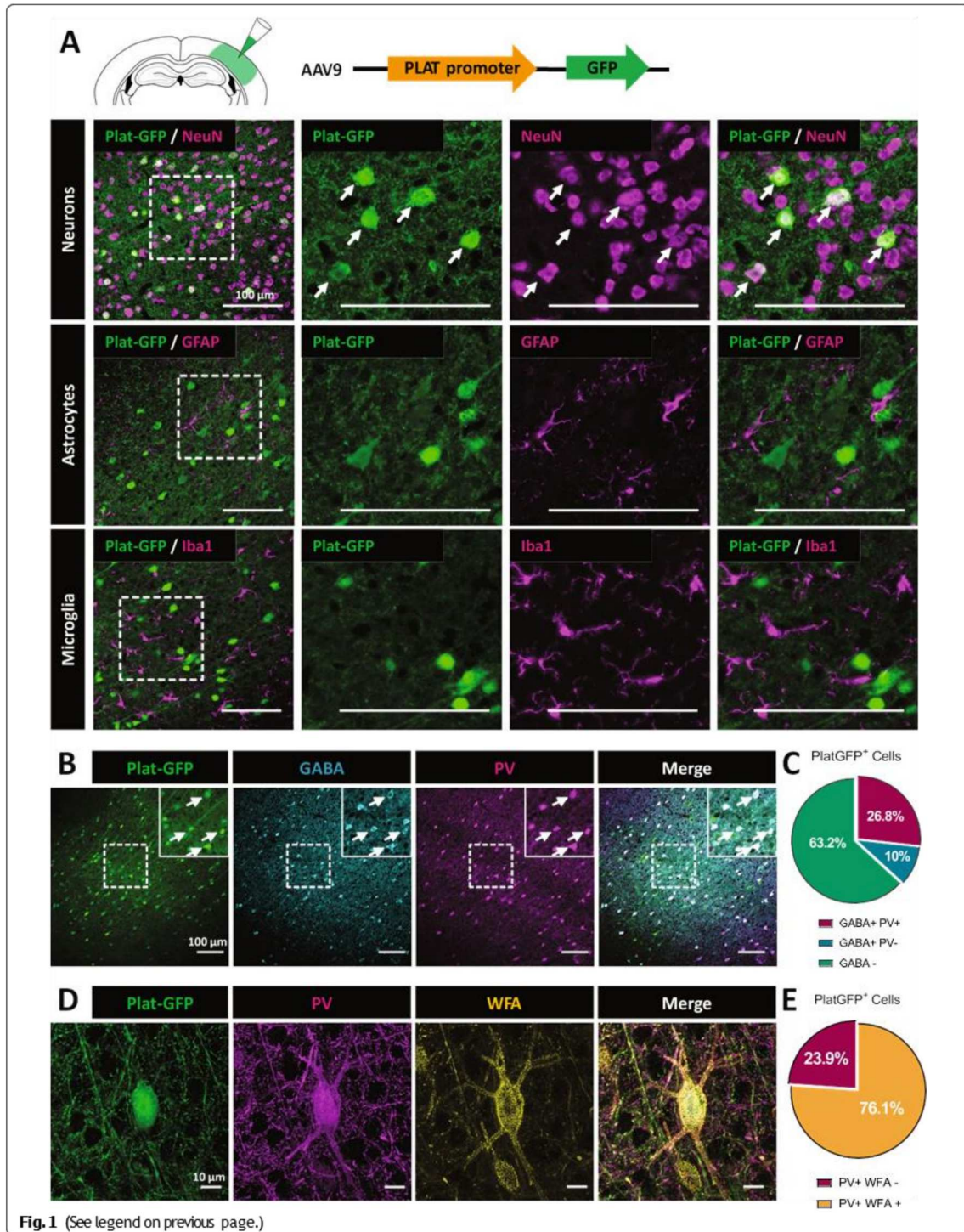
## Results

### tPA is expressed by cortical fast-spiking parvalbumin interneurons in vivo

We sought to identify the cell subtypes expressing tPA in the somatosensory cortex of adult mice. We used a viral reporter construct encoding for green fluorescent protein (GFP) under the control of the human tPA (Plat) promoter (AAV-Plat-GFP, Fig. 1A). This construct was first validated in the dentate gyrus (DG; Additional file 1: Fig. S1A-B), a brain structure in which tPA expression is well described [46, 80]. After injection of the AAV-Plat-GFP in the somatosensory cortex, immunohistochemical analyses revealed that the GFP reporter was only detected in NeuN-positive neuronal cells but neither in GFAP-positive astrocytes nor in Iba-1-positive microglia (Fig. 1A; these three cell types are potential targets of AAV9-driven infection [50, 56]). Even under inflammatory conditions (lipopolysaccharide treatment), neither reactive astrocytes nor reactive microglia expressed GFP, excluding the expression of tPA in these cell types (Additional file 1: Fig. S2).

(See figure on next page.)

**Fig. 1** tPA is expressed by parvalbumin interneurons wrapped 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  $\mu$ m). **B**, **C** Co-localization of the Plat-GFP reporter (green) with GABA (cyan) and parvalbumin (magenta) markers following injection of AAV-Plat-GFP in the somatosensory cortex of WT mice (Scale bar: 100  $\mu$ m). Quantitative analysis of Plat-mediated expression of GFP in relation to GABAergic positive neurons and parvalbumin interneurons. **C** Around 37% of Plat-GFP positive neurons are GABAergic interneurons and 73% of them co-localized with PV marker ( $n=4$  coronal sections from  $N=3$  WT brains). **D** 3D reconstruction of a Plat-GFP positive neuron (green), co-labeled with PV (magenta) and the PNN marker *Wisteria floribunda* agglutinin (WFA, yellow) (Scale bar: 10  $\mu$ m). **E** Quantification of Plat-GFP neurons double stained with PV and WFA





Confirming our previous findings [46], a subset of tPA-GFP+ neurons were excitatory glutamatergic neurons, as they expressed Tbr1 (Additional file 1: Fig. S3). In addition, we found that 36.9 % of Plat-GFP+ neurons were positive for GABA (Fig. 1B,C). Among these Plat-GFP GABAergic interneurons, the majority (72.7 %) were parvalbumin+ (Fig. 1B,C) and 76.1 % of these parvalbumin+ neurons were wrapped with PNNs (stained with WFA; Fig. 1D,E). In situ hybridization confirmed the presence of tPA mRNA in PV interneurons, and more precisely those wrapped with PNNs (Additional file 1: Fig. S4).

We also performed electrophysiological and molecular characterizations of 28 neurons from deeper layers (IV-V) of the mouse primary visual cortex by combining patch-clamp recordings and single-cell RT-PCR [13]. The PCR protocol was designed to probe the expression of different cell type-specific markers (VGLUT1, GAD65 and GAD67, PV, S100 $\beta$ , Sst, APC, and Akr1c18), plasminogen activators (Plat: tPA gene and Plau: urokinase), and extracellular matrix-related genes (Ncan, Ptprz1, Ptprr, Sema3a, Sdc4, and Mybp1; Additional file 1: Table S1). 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 adaptation. FS-PV interneurons of G42 mice (PV-expressing reporter mouse) [15] were characterized by low input resistance and high rheobase currents [36]. FS-PV interneurons fired short-duration action potentials with sharp post-hyperpolarizing potentials and were able to sustain a high firing rate with little or no spike frequency adaptation (Fig. 2A). The molecular analysis of the FS-PV interneuron shown in Fig. 2B confirmed the expression of PV and GAD65/67, as well as SST, APC, Akr1c18, Plat, Ncan, Ptprr, and Sema3a.

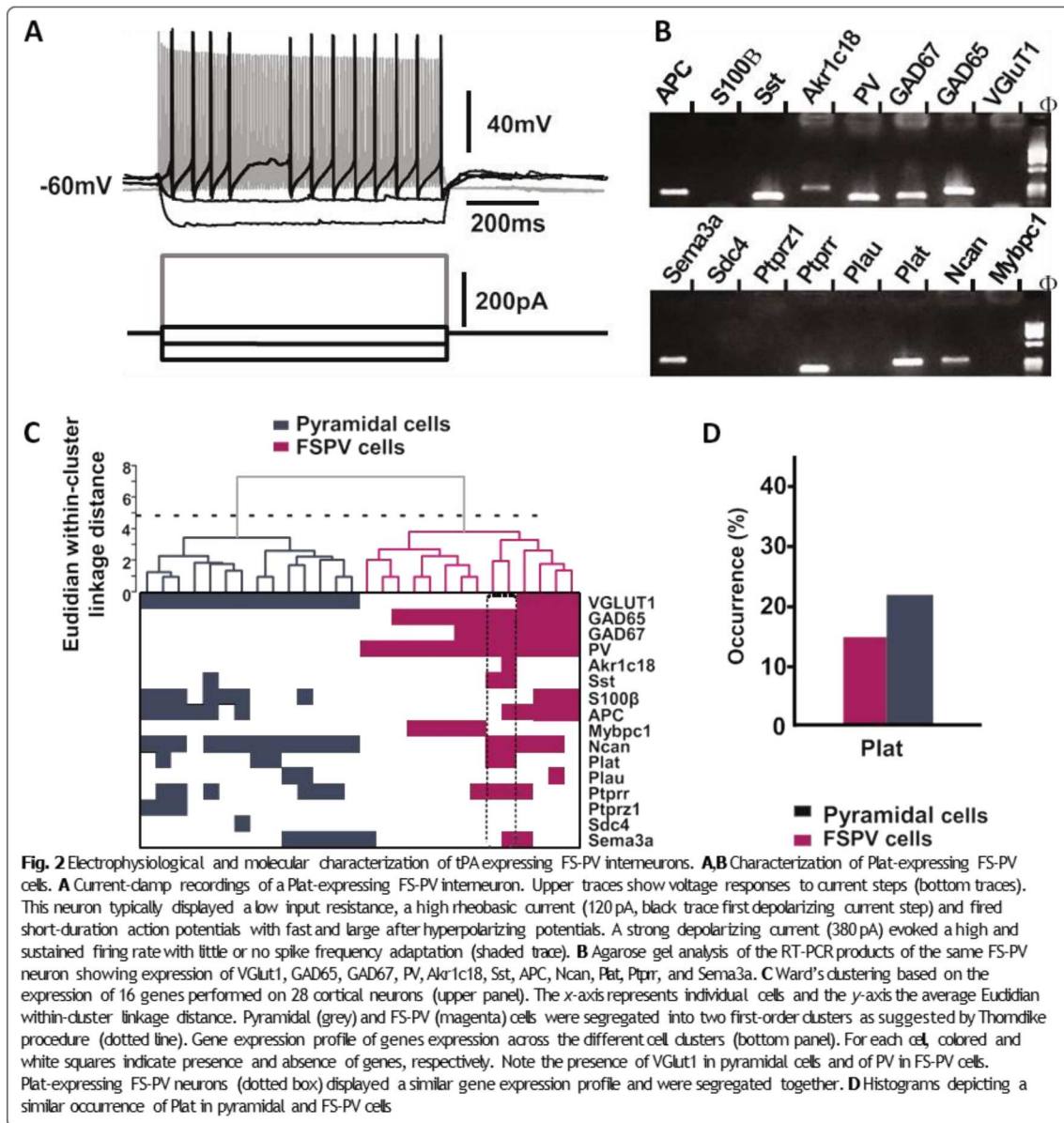
Analyzed neurons were grouped together according to their overall molecular similarity using Ward's clustering [14], yielding two main groups (Fig. 2C). All neurons in the left cluster were pyramidal cells expressing VGLUT1 but none in either cluster expressed GADs or PV. By contrast, all neurons in the right cluster expressed PV and were identified as FS-PV interneurons. A sub-cluster of two FS-PV interneurons (dotted box, Fig. 2C) displayed a similar molecular profile with expression of Sst, Plat, Ncan, Plat, and Ptprr. Plat mRNA was detected in 14.3 % of FS-PV cells ( $n=2$  of 14 cells, Fig. 2D), a proportion similar to that observed in pyramidal cells (21.4 %,  $n=3$  of 14 cells,  $p=0.663$ ) and confirming our previous observations [46].

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

To assess the effect of tPA expressed by PV cells on the remodeling of PNNs, we generated a conditional knock-out mouse strain lacking tPA in PV cells by crossing

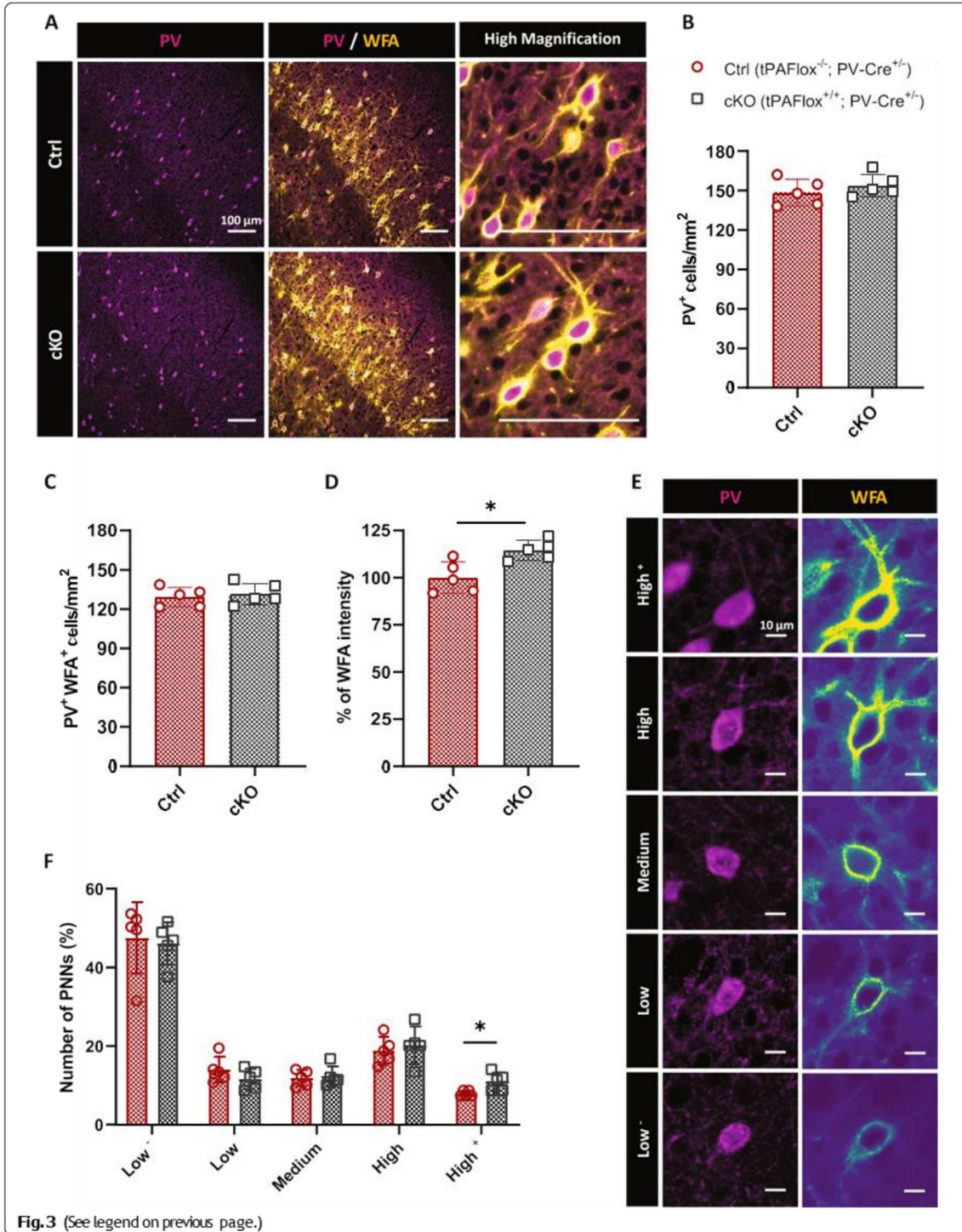
tPAFlox<sup>+/+</sup> mice with PV-Cre<sup>+/-</sup> mice (tPAFlox<sup>-/-</sup>; PV-Cre<sup>+/-</sup> mice were used as controls, Additional file 1: Fig. S5). In both genotypes, the total number of PV interneurons, as well as the number of PV interneurons wrapped with PNNs, was similar (Fig. 3A-C). However, the overall intensity of WFA was higher in cKO mice than in WT mice (+14.4 %, Fig. 3D). A semi-quantitative analysis based on a qualitative grading PNN staining intensity around PV soma, from very low to very high WFA staining (Fig. 3E), revealed a slightly higher percentage of neurons wrapped with the highest degree of PNN coverage in cKO mice (Fig. 3F). Overall, these observations support the idea that tPA released from PV interneurons can contribute to PNN turnover in vivo.

To dissect the potential underlying mechanism of this effect, we used a model of primary murine interneuron cultures ([27]; Fig. 4). Immunocytochemistry confirmed the presence of PNN-like structures (displaying WFA labelling and expressing aggrecan and hyaluronic acid, two major components of PNN; Additional file 1: Fig. S6A) that were sensitive to ChABC (Additional file 1: Fig. S6B). We assessed PNN integrity in response to treatment with tPA alone or in combination with its conventional substrate plasminogen, plasminogen alone, or active plasmin (Fig. 4A,B). After 24 h exposure, we observed a significant PNN degradation with plasmin treatment (-87.3%) or with the combination of plasminogen+tPA (-87.6%), while tPA alone did not alter PNN turnover (Fig. 4A,B). This suggests that tPA might not directly promote PNN degradation. Accordingly, aprotinin, a blocker of plasmin proteolytic activity, prevented plasminogen + tPA-induced PNN degradation (Additional file 1: Fig. S7A-B) demonstrating that tPA promotes PNN degradation via a plasmin-dependent mechanism. We found that plasminogen alone could also induce PNN degradation (-88.4 %, Fig. 4A,B), suggesting that endogenous tPA released by interneurons converts extracellular plasminogen into plasmin. To confirm this, a fluorescent assay of plasmin activity revealed the actual conversion of plasminogen in active plasmin in the absence of exogenous tPA treatment (Additional file 1: Fig. S7C-D). We also exposed cultured interneurons from tPA Null mice to plasminogen, plasmin, or plasminogen + tPA during 24 h (Fig. 4C,D). Although plasmin and plasminogen + tPA significantly reduced WFA staining (-88.2 % for plasmin; -91.5 % for plasminogen + tPA), plasminogen alone did not (Fig. 4C,D), confirming that PNN degradation depends on endogenous tPA produced by interneurons. We also found that plasmin-dependent degradation of PNNs in vitro was not sensitive to TIMP3 [90], suggesting that MMPs or ADAMTS are not downstream effectors in this pathway (Additional file 1: Fig. S8). To understand how plasmin promotes PNN



(See figure on next page.)

**Fig. 3** Specific deletion of tPA in PV interneurons affects PNNs morphology. **A** Representative images of PV cells (magenta) and PNNs (yellow) in the somatosensory cortex of adult tPA<sup>Flox<sup>+/+</sup></sup>; PV-Cre<sup>+/-</sup> mice (cKO) and their control littermates (Ctrl), tPA<sup>Flox<sup>-/-</sup></sup>; PV-Cre<sup>+/-</sup> 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



degradation, we incubated a fragment of the aggrecan core protein (corresponding to G1-IGD-G2) with plasminogen, plasmin, tPA alone or in combination, and with or without aprotinin (Fig. 4E–G). ADAMTS-4 was used as a positive proteolytic control. Aggrecan core protein was efficiently cleaved by plasmin (51% loss in the signal of the core protein) and plasminogen + tPA (28.7% loss in the signal of the core protein), leading to two fragments (55 and 65 kDa) which were similarly obtained with the control treatment with ADAMTS4 (–66%). Plasmin treatment also leads to two products of 90 and 30 kDa due to a second cleavage site. Moreover, as observed with WFA staining, a significant decrease of aggrecan staining around PV cells in vitro revealed that tPA-dependent activation of plasminogen degrades this perineuronal CSPG in situ (Fig. 4H,I).

## Discussion

The present study provides the first demonstration that tPA expressed by FS-PV interneurons regulates PNN remodeling, through the conversion of plasminogen into plasmin. This remodeling results from the cleavage of a major component of PNNs, the CSPG aggrecan.

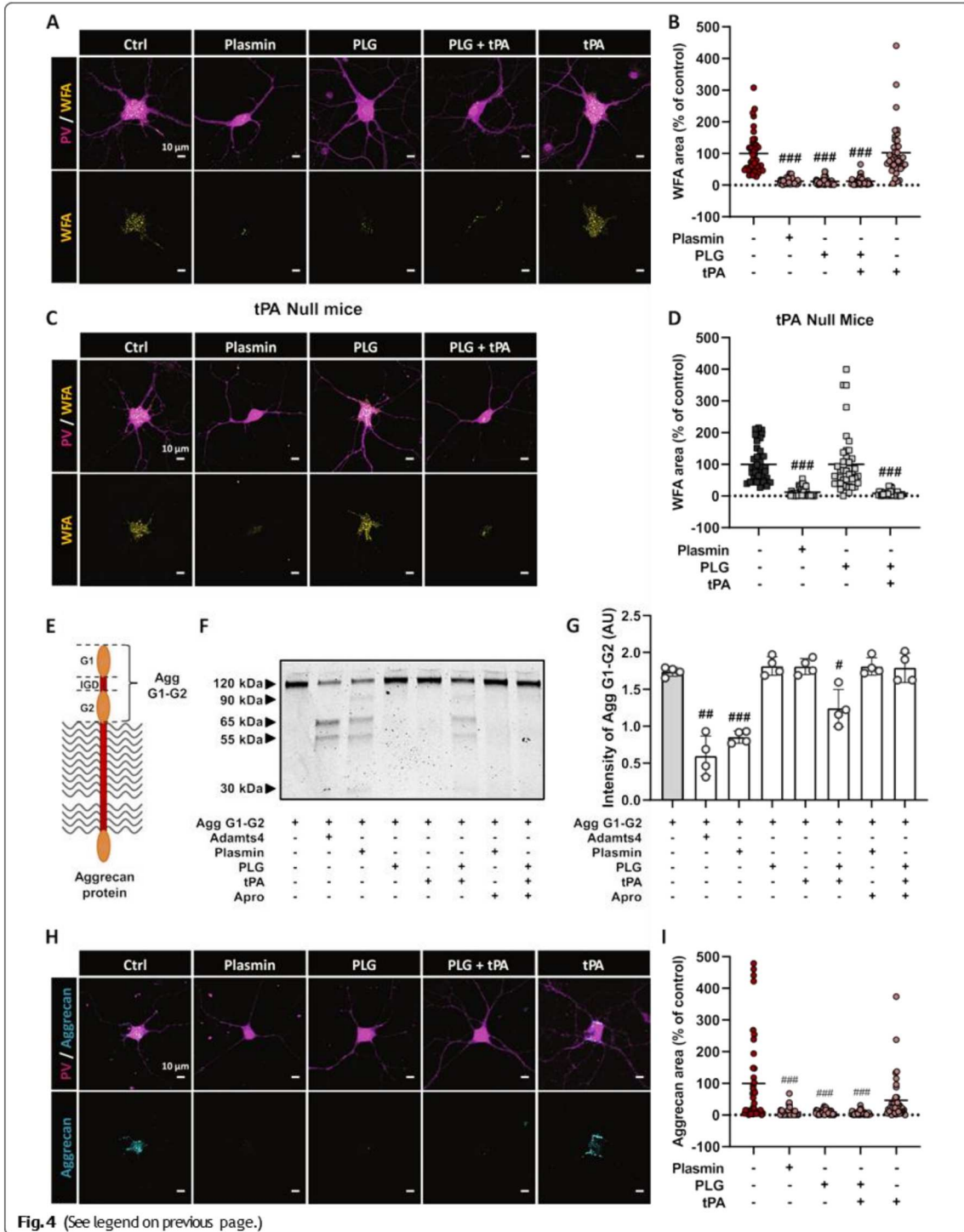
tPA expression was previously reported in excitatory pyramidal neurons using in situ hybridization techniques, immunohistochemistry, and single-cell PCR coupled with patch-clamp recordings [46, 75]. Sparse and inconsistent studies have also reported tPA expression in some subtypes of GABAergic interneurons. Immunohistological studies [28] have reported tPA expression in VIP-positive, but not in SST-positive perivascular interneurons. 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 [80]. Furthermore, the presence of tPA in PV-positive neurons but not in SST-positive neurons has been proposed

in the somatosensory cortex, although the specificity of the staining is not entirely clear [17]. One of our main findings is the demonstration by molecular, electrophysiological, and single-cell RT-PCR approaches that tPA is expressed by GABAergic interneurons, including FS-PV interneurons. These FS-PV interneurons are fundamental for several behavioral responses and their dysfunction participates in several diseases, including schizophrenia and autism [35, 73]. Interestingly, their activity is at least in part under the control of a specialized ECM that surrounds them, the PNNs. PNNs are dynamic structures, not only during experience-driven plastic developmental periods [51, 83, 96], but also in adults. For instance, modification of PNN density with the diurnal-nocturnal cycle, or their enzymatic degradation may have a potential impact on memory processing [30, 63, 78]. In line with this, memory-related diseases (Alzheimer's disease, drug addiction), but also many other pathological conditions (schizophrenia, epilepsy, depression, multiple sclerosis, stroke, Huntington's disease) may to some extent involve or impact PNN integrity and function [12, 23, 86, 93].

CSPGs, the major components of PNNs, are sensitive to endogenous processing by proteases of the MMP and ADAMTS families [34, 86]. FS-PV interneurons and pyramidal cells express an array of proteases that could thus process PNNs from both sides [21, 71]. Previous studies have shown that the tPA/plasmin system can degrade several CSPGs found in PNNs, such as neurocan, versican, and phosphacan [38, 95] and can activate pro-MMPs and pro-ADAMTS4 into their mature form [19, 41]. Interestingly, the tPA/plasmin system can also increase ChABC-mediated axonal regrowth after spinal cord injury through CSPG degradation [9]. However, the direct evidence of PNN degradation by the tPA/plasmin system has never been provided. Here, we show that the conditional deletion of tPA in FS-PV interneurons in vivo leads to a moderate increase in PNN density in the

(See figure on next page.)

**Fig. 4** Endogenous tPA controls the remodeling of PNNs through plasmin-dependent aggrecan cleavage. **A,B** MGE-derived WT interneuron cultures were treated at DIV14 with plasmin (200 nM), plasminogen (100 nM), tPA (10 and 200 nM), and processed 24h later for immunocytochemistry. **A** Representative images for PV (magenta) and WFA (yellow) stainings. **B** Quantification shows that plasmin, plasminogen, and plasminogen + tPA reduce WFA staining, whereas tPA has no effect. **C** 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). **D** WFA-positive area quantification reveals that plasmin induces the degradation of PNN in PV cells from tPA Null cultures whereas plasminogen fails to (mean  $\pm$  sem;  $n=40$  cells from 4 independent experiments). Kruskal-Wallis test followed by Dunn's post hoc test for multiple comparisons; ####:  $p<0.001$  (compared to control), \*\*\*:  $p<0.001$  (compared to plasminogen + tPA). Scale bar: 10  $\mu$ m. **E–G** Human aggrecan G1-G2 (156 nM) was incubated with ADAMTS4 (positive control), plasmin, plasminogen, tPA (7.8 nM for each protease), and aprotinin (78 nM) overnight. **F,G** Degradation products were visualized by Imperial blue staining. Like ADAMTS4, plasmin, and plasminogen + tPA can cleave aggrecan G1-G2 in vitro. Aprotinin reverses plasmin-dependent aggrecan degradation.  $N=4$  independent experiments. One-way ANOVA, Fisher's LSD post hoc test; #:  $p<0.05$ ; #:  $p<0.01$ ; #:  $p<0.001$  (compared to Agg G1-G2). **H** Representative images of MGE-derived WT interneuron cultures treated with plasmin (100 nM), plasminogen (100 nM), and tPA (10 and 200 nM) and co-stained with aggrecan (cyan) and PV (magenta). **I** 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 (mean  $\pm$  sem;  $n=40$  cells from 4 independent experiments). Kruskal-Wallis test followed by Dunn's post hoc test for multiple comparisons; ####:  $p<0.001$  (compared to Control). Scale bar: 10  $\mu$ m



somatosensory cortex, which is indicative of a cell-autonomous regulation of PNN plasticity under physiological conditions. Thus, the histological modifications observed *in vivo* under basal conditions could reflect modifications of the dynamic balance between CSPG synthesis and their degradation. However, using *in vitro* experiments, by combining cell imaging and pharmacology, we demonstrate that tPA indeed promotes PNN degradation around PV interneurons through plasminogen conversion into plasmin. The latter can be blocked by aprotinin and is independent of MMP or ADAMTS activation, since a broad-range inhibitor (TIMP3) did not reverse the effects of plasmin. Overall, our study shows that tPA/plasmin can exert a cell-autonomous effect on PNN degradation when expressed by PV interneurons. Moreover, since tPA was described to be induced as an immediate early gene following seizure or long-term potentiation [68], we can hypothesize that its expression may be also triggered in PV cells under certain conditions to promote PNN remodeling. In addition, considering that tPA is also expressed in the brain by various cell types including pyramidal cells [46] or oligodendrocytes [43], it could also probably drive PNN degradation through a non-cell autonomous manner when released in the extracellular space.

The consequence of PNN degradation on FS-PV cell function has been the subject of several studies, sometimes with contradictory results [2, 22, 24, 25, 31]. For instance, PNN digestion induced by chondroitinase ABC was shown to reduce [2] or increase the excitability of interneurons [22]. However, these discrepancies could be explained by the experimental approaches used. Indeed, genetic removal of specific PNN components might affect the development of neuronal networks, which is not the case when PNN are acutely digested in the adult brain. Additionally, *in vitro* models cannot reflect the complexity of neuronal networks. It would be relevant to perform fine electrophysiological studies to determine the impact of tPA-driven degradation of PNN on PV cell functions. Furthermore, it has been described that the activity of PV cells and the density of PNNs influence fear memory and social behaviors [3, 6, 8, 18, 69, 79]. Therefore, it would also be interesting to investigate the consequence of PNN degradation by the tPA/plasmin, using PV-Cre x tPA flox mice, on these behavioral responses.

Finally, we also demonstrate that tPA-mediated PNN degradation can occur through the cleavage of the core protein of aggrecan. However, we cannot exclude that the plasminogen activator system may also promote PNN degradation through the cumulative cleavage of different CSPG as previously mentioned [38, 95]. Nevertheless, given that aggrecan is one of the main component of PNNs, we can hypothesize that plasmin is more likely

to influence PNN remodeling by acting on this particular CSPG. Indeed, aggrecan was shown to play a crucial role in PNN structure since its conditional knockout in the brain results in complete PNN loss in the cortex and the reactivation of juvenile plasticity [72]. Interestingly, both tPA and plasmin are also involved in plasticity-related mechanisms such as ocular dominance shift and dendritic spine remodeling during the critical period [52, 53]. In view of these results, we hypothesize that PNN degradation by the tPA/plasmin system could promote the restoration of juvenile plasticity under pathological conditions.

## Conclusions

In summary, our findings show that in the presence of plasminogen, tPA released from FS-PV cells reduces PNN density through CSPG degradation. This could affect several PNN properties, including balancing GABAergic and glutamatergic neurotransmissions [2, 22, 42, 70, 76, 78], being a physical protective barrier [10, 29, 57], a contributor to pathogenic pathways [40, 49, 62, 97], and a driver of synaptic plasticity and behavioral outcome [11, 29, 70, 76]. Overall, we provide unanticipated mechanistic insights in the regulation of PNNs with relevance to neuronal function, which could translate into new targets to promote plasticity/recovery under pathological conditions.

## 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 #25267 and Ce5/2012/062). All applicable international, national, and/or institutional guidelines for the care and use of animals were followed. Electrophysiological experiments were performed on G42 transgenic mice (Jackson laboratories #007677, GAD67-GFP, 50). Histological analyses were performed on 8-week-old male Swiss mice, tPAFlox<sup>+/+</sup> mice, tPAFlox<sup>+/+</sup>; PV-Cre<sup>+/-</sup> mice and their control (tPAFlox<sup>-/-</sup>; PV-Cre<sup>+/-</sup>) littermates (20-25g). Pregnant tPA Null mice and their WT littermates at gestational day 14 were used for *in vitro* neuronal cultures.

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

tPA Null mice were generated by the Mouse Clinical Institute (ICS, Illkirch, France). Briefly tPAFlox<sup>+/+</sup> mice (on a C57BL6NTac genetic background) in which exon 3 is flanked by loxP sites (see 3) were crossed with Rosa<sup>26</sup>-Cre mice [7] 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<sup>+/-</sup> female mice (Jackson laboratory # 008069, Pvalbtm1(cre)Arbr, [33]) were crossed with tPAFlox<sup>+/+</sup> male mice or tPAFlox<sup>-/-</sup> male mice to generate tPAFlox<sup>+/+</sup>; PV-Cre<sup>+/-</sup> (cKO) and their control littermates tPAFlox<sup>-/-</sup>; PV-Cre<sup>+/-</sup>. Mice were genotyped by PCR for the presence of 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<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 2 CaCl<sub>2</sub>, 1 MgCl<sub>2</sub>, 26 NaHCO<sub>3</sub>, 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 30 min in aCSF saturated with O<sub>2</sub>/CO<sub>2</sub> (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<sub>2</sub>, 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 content of the pipette was expelled into a test tube and RT was performed in a final volume of 10 μL, as described previously [39]. 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-step amplification was performed essentially as described [13, 20]. Briefly, cDNAs present in the 10 μL reverse transcription reaction were first amplified simultaneously using all external primer pairs (Additional file 1: Table S1). 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 (Additional file 1: Table S1) by performing 35 PCR cycles as described above. Ten microliters of each individual PCR product was 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, Ptprr1, Sdc4, Sema3a). The presence of a given gene was digitized by 1 and its absence was digitized by 0. Ward-linkage hierarchical clustering [92] 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 [88] as described previously [14].

#### 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). The pPlat-GFP was 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 iodixanol density gradient followed by dialysis against the formulation buffer of the vector stocks, 0.5 mmol/l MgCl<sub>2</sub> and 1.25 mmol/l KCl in phosphate-buffered saline (PBSMK; five buffer changes, 3 h 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<sub>2</sub>/O<sub>2</sub> in a stereotaxic frame (Harvard Apparatus). AAV9-Plat-GFP (1.25.10<sup>13</sup> vp/mL) were injected

through a glass micropipette in the right hemisphere in a volume of 0.5  $\mu$ L at a rate of 0.2  $\mu$ L/min. Coordinates (relative to bregma) according to the Paxinos Mouse Brain Atlas were as follows: 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 min 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, lectins, and biotinylated protein were used: 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); or Biotinylated Wisteria floribunda Agglutinin (WFA) (1:1000, L1516, Sigma Aldrich).

#### Immunohistochemistry

Mice were deeply anesthetized with isoflurane 5 % in 70 %/30 % mixture of  $\text{NO}_2/\text{O}_2$ . 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  $\mu$ m were collected on Poly-Lysine slides and stored at  $-80^\circ\text{C}$ . 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  $\times$  microscope with an oil-immersion  $\times 40$ , 1.44-N.A. objective at a resolution of 512 $\times$ 512 pixels with 572 Hz speed and a step size of 0.22 $\mu$ m.

#### Histological analysis

To estimate the percentage of each Plat-GFP cell, all transfected cells were quantified ( $1090.3 \pm 58.9$  Plat-GFP cells/brain, from four sections per brain, 3 WT mice). For PNN/PV cells quantification, 2 images per section

were acquired to cover all layers of the somatosensory cortex with a good resolution (four sections per brain, five mice per condition). PNN intensity was calculated as the intensity of WFA staining through the entire section of the somatosensory cortex. The overall intensity of WFA staining considers the high WFA staining around the soma and proximal dendrites and low WFA staining found around dendrites. PNN morphology was evaluated using a qualitative classification, 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 [27]. Medial ganglionic eminences were dissected in HBSS (Hanks' Balanced Salt Solution, Gibco) /HEPES 10mM, incubated 15 min at  $37^\circ\text{C}$  in HBSS/HEPES with trypsin (0.05 %, Gibco) and DNase I (100  $\mu$ g/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  $\beta$ -D-arabino-furanoside hydrochloride (5  $\mu$ M, Sigma Aldrich) was added at DIV3, and fresh medium was added at DIV7.

#### In vitro treatments

Cells were treated at DIV14 with either 100 nM Human Glu-plasminogen (Enzyme Research Laboratories, HPg 2001), 200 nM Human Plasmin (Enzyme Research Laboratories, HPlasmin), or 10 nM or 200 nM Human tPA (Actilyse<sup>®</sup>, Boehringer Ingelheim) for 24 h.

#### 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  $4^\circ\text{C}$  in blocking buffer containing primary antibodies. Confocal images were acquired with a Leica TCS SP8 Confocal/STED 3  $\times$  microscope with an oil-immersion  $\times 40$ , 1.44-N.A. objective. Confocal images were taken at a resolution of 1024 $\times$ 1024 pixels with 400 Hz speed and a step size of 0.45 $\mu$ m. Laser intensity, gain, and offset were maintained constant in each analysis.



### PNN quantification in vitro

Confocal images were analyzed with the ImageJ software. Random PV-positive cells were imaged with  $160 \times 160 \times 15 \mu\text{m}$  z-stack with  $0.45 \mu\text{m}$  step size. A threshold was applied to the WFA channel or aggrecan channel (range 0–255), and the area was quantified in 40 neurons from 4 independent experiments.

### Enzymatic degradation assays

Recombinant human aggrecan core protein G1-IGD-G2 (156 nM) (Biotechne) was incubated at  $37^\circ\text{C}$  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  $\text{CaCl}_2$ , 150 mM NaCl, and 0.05 %Brij35. Then, 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).

### Statistics

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

Otherwise, experiments were analyzed by investigators blinded to group allocation. Unblinding was made after completion of statistical analysis. All statistical analyses were performed using the GraphPad Prism 8 software. Comparisons between more than two independent samples were performed using two-tailed Kruskal-Wallis test and appropriate post hoc test (Dunn's test). Mann–Whitney  $U$  test was used for the comparisons of two independent samples. Plasmin activity was analyzed using 2-way Anova (two-stage linear step-up procedure of Benjamini, Krieger and Yekutieli). Recombinant aggrecan degradation was analyzed using one-way ANOVA followed by Fisher's LSD test. The intensity of the 120-kDa band was compared between Agg G1-G2 and protease-treated conditions. 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.

### Abbreviations

AAV: Adeno-associated viruses; ADAMTS: A Disintegrin And Metalloproteinase with Thrombospondin Motifs; CSPGs: Chondroitin sulfate proteoglycans; ECM: Extracellular matrix; FS-PV: Fast-spiking parvalbumin; GABA: Gamma-aminobutyric acid; LRP: Low-density lipoprotein receptor-related proteins; MMPs: Matrix metalloproteinases; NMDAR: N-methyl-D-aspartate receptor; PNN: Perineuronal nets; PV: Parvalbumin; TIMP3: Tissue inhibitor of metalloproteinases-3; tPA: Tissue-type plasminogen activator; VP: Vasointestinal peptide; WFA: Wisteria floribunda agglutinin.

### Supplementary Information

The online version contains supplementary material available at <https://doi.org/10.1186/s12915-022-01419-8>.

**Additional file 1: Figure S1.** Characterization of a tPA-reporter viral construct in the dentate gyrus. **Figure S2.** Flat-GFP reporter expression in the cortex after LPS treatment. **Figure S3.** Flat-GFP reporter expression in excitatory neurons in the cortex. **Figure S4.** tPAmRNA is expressed in PV interneurons enwrapped with PNNs. **Figure S5.** Conditional depletion of tPA in PV interneurons. **Figure S6.** PNN-like structures *in vitro*. **Figure S7.** Interneuron-derived tPA promotes PNN degradation through plasmin. **Figure S8.** tPA/plasmin mediated PNNs degradation is MMP-independent. **Table S1.** Sequences of PCR primers. **Supplementary materials and methods.**

### Acknowledgements

We are grateful to Dr Mario Mertini for his helpful comments and corrections. We are grateful to Pr Gilles Bonvento and Dr Alexis-Pierre Bemelmans for viral particle production.

### Authors' contributions

DV and CA designed and supervised the study. ML, SD, GD, and PP performed the data analysis. ML, SD, GD, PP, SL, CR, EP, JYH, LL, and EM performed the experiments. ML, SD, GD, PP, CA, BL, BC, VA, and DV wrote the manuscript. All authors have read and approved the final manuscript.

### Funding

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.

### Availability of data and materials

All data generated or analyzed during this study are included in this published article and its supplementary information files. All data supporting our results are available from the corresponding author upon reasonable request.

### Declarations

#### Ethics approval and consent to participate

All experiments were conducted in accordance with the French ethical law (Decree 2013-118) and the European Communities Council guidelines (2010/63/EU).

#### Consent for publication

Not applicable.

#### Competing interests

The authors declare that they have no competing interests.

#### Author details

<sup>1</sup>Normandie Univ, UNICAEN, INSERM, INSERM UMR-S U1237, Physiopathologie and Imaging of Neurological Disorders, Institut Blood and Brain @ Caen Normandie, Cyceron, Bd Becquerel, BP 5229-14074, 14000 Caen, France. <sup>2</sup>Neuroscience Paris Seine - Institut de Biologie Paris Seine (NPS - IBPS), Sorbonne Université UMR119, CNRS UMR8246, INSERM U1130, 75005 Paris, France. <sup>3</sup>Department of clinical research, CHU de Caen Normandie, Caen, France.

Received: 2 November 2021 Accepted: 27 September 2022  
Published online: 05 October 2022

## References

- Adhami F, Yu D, Yin W, Schloemer A, Burns KA, Liao G, et al. Deleterious effects of plasminogen activators in neonatal cerebral hypoxia-ischemia. *Am J Pathol*. 2008;172:1704-16. <https://doi.org/10.2353/ajpath.2008.070979>.
- Balmer TS. Perineuronal nets enhance the excitability of fast-spiking neurons. *eNeuro*. 2016;3:1-13. <https://doi.org/10.1523/ENEURO.0112-16.2016>.
- Banerjee SB, Gutzeit VA, Baman J, Aoued HS, Doshi NK, Liu RC, et al. Perineuronal nets in the adult sensory cortex are necessary for fear learning. *Neuron*. 2017;95:169-179.e3. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2017.06.007>.
- Baranes D, Lederlein D, Huang VY, Chen M, Bailey CH, Kandel ER. Tissue plasminogen activator contributes to the late phase of LTP and to synaptic growth in the hippocampal mossy fiber pathway. *Neuron*. 1998;21:813-25. [https://doi.org/10.1016/S0896-6273\(00\)80597-8](https://doi.org/10.1016/S0896-6273(00)80597-8).
- Benchenane K, Castel H, Boulouard M, Bluthé R, Fernandez-Monreal M, Roussel BD, et al. Anti-NR1 N-terminal-domain vaccination unmasks the crucial action of tPA on NMDA-receptor-mediated toxicity and spatial memory. *J Cell Sci*. 2007;120:578-85. <https://doi.org/10.1242/jcs.03354>.
- Bicks LK, Yamamoto K, Ranigan ME, Kim JM, Kato D, Lucas EK, et al. Prefrontal parvalbumin interneurons require juvenile social experience to establish adult social behavior. *Nat Commun*. 2020;11. <https://doi.org/10.1038/s41467-020-14740-z>.
- Birling MC, Dierich A, Jacquot S, Héroult Y, Pavlovic G. Highly-efficient, fluorescent, locus directed cre and floxed deleter mice on a pure C57BL/6N genetic background. *Genesis*. 2012;50:482-9. <https://doi.org/10.1002/dvg.20826>.
- Brown JA, Ramikie TS, Schmidt MJ, Baldi R, Garbett K, Everheart MG, et al. Inhibition of parvalbumin-expressing interneurons results in complex behavioral changes. *Mol Psychiatry*. 2015;20:1499-507. <https://doi.org/10.1038/mp.2014.192>.
- Bukhari N, Torres L, Robinson JK, Tsirka SE. Axonal regrowth after spinal cord injury via chondroitinase and the tissue plasminogen activator (tPA)/plasmin system. *J Neurosci*. 2011;31:14931-43. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.3339-11.2011>.
- Cabungcal JH, Steullet P, Morishita H, Kraftsik R, Cuenod M, Hensch TK, et al. Perineuronal nets protect fast-spiking interneurons against oxidative stress. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2013;110:9130-5. <https://doi.org/10.1073/pnas.1300454110>.
- Carstens KE, Phillips ML, Pozzo-Miller L, Weinberg RJ, Dupek SM. Perineuronal nets suppress plasticity of excitatory synapses on CA2 pyramidal neurons. *J Neurosci*. 2016;36:6312-20. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.0245-16.2016>.
- Carulli D, Verhaagen J. An extracellular perspective on CNS maturation: Perineuronal nets and the control of plasticity. *Int J Mol Sci*. 2021;22:1-26. <https://doi.org/10.3390/ijms22052434>.
- Cauli B, Audinat E, Lambollez B, Angulo MC, Ropert N, Tsuzuki K, et al. Molecular and physiological diversity of cortical nonpyramidal cells. *J Neurosci*. 1997;17:3894-906. <https://doi.org/10.1523/jneurosci.17-10.03894.1997>.
- Cauli B, Porter JT, Tsuzuki K, Lambollez B, Rossier J, Quenet B, et al. Classification of fusiform neocortical interneurons based on unsupervised clustering. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2000;97:6144-9. <https://doi.org/10.1073/pnas.97.11.6144>.
- Chattopadhyaya B, Di Cristo G, Higashiyama H, Knott GW, Kuhlman SJ, Welker E, et al. Experience and activity-dependent maturation of perisomatic GABAergic innervation in primary visual cortex during a postnatal critical period. *J Neurosci*. 2004;24:9598-611. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.1851-04.2004>.
- Chen CC, Chu P, Brumberg JC. Experience-dependent regulation of tissue-type plasminogen activator in the mouse barrel cortex. *Neurosci Lett*. 2015;599:152-7. <https://doi.org/10.1016/j.neulet.2015.05.050>.
- Chu P, Chen E, Bajinath A, Brumberg JC. Cell type specificity of tissue plasminogen activator in the mouse barrel cortex. *Data Br*. 2015;4:332-5. <https://doi.org/10.1016/j.dib.2015.06.008>.
- Cope EC, Zych AD, Katchur NJ, Waters RC, Laham BJ, Diethorn EJ, et al. Atypical perineuronal nets in the CA2 region interfere with social memory in a mouse model of social dysfunction. *Mol Psychiatry*. 2021. <https://doi.org/10.1038/s41380-021-01174-2>.
- Davis GE, Pintar Allen KA, Salazar R, Maxwell SA. 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*. 2001;114:917-30.
- Devienne G, Le Gac B, Piquet J, Cauli B. Single cell multiplex reverse transcription polymerase chain reaction after patch-clamp. *J Vis Exp*. 2018;1-12. <https://doi.org/10.3791/57627>.
- Devienne G, Picaud S, Cohen I, Piquet J, Tricoire L, Testa D, et al. Regulation of perineuronal nets in the adult cortex by the electrical activity of parvalbumin interneurons. Cold Spring Harbor Laboratory; 2019.
- Dityatev A, Brückner G, Dityateva G, Grosche J, Kleene R, Schachner M. Activity-dependent formation and functions of chondroitin sulfate-rich extracellular matrix of perineuronal nets. *Dev Neurobiol*. 2007;67:570-88. <https://doi.org/10.1002/dneu.20361>.
- Dzyubenko E, Manrique-Castano D, Kleinschmitz C, Faissner A, Hermann DM. Topological remodeling of cortical perineuronal nets in focal cerebral ischemia and mild hypoperfusion. *Matrix Biol*. 2018;74:121-32. <https://doi.org/10.1016/j.matbio.2018.08.001>.
- Faini G, Aguirre A, Landi S, Lamers D, Pizzorusso T, Ratto GM, et al. Perineuronal nets control visual input via thalamic recruitment of cortical PV interneurons. *Elife*. 2018;7. <https://doi.org/10.7554/eLife41520>.
- Favuzzi E, Marques-Smith A, Fernandes C, Ewers H, Correspondence BR. Activity-dependent gating of parvalbumin interneuron function by the perineuronal net protein brevicin. *Neuron*. 2017;95:639-55. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2017.06.028>.
- Fawcett JW, Ohashi T, Pizzorusso T. The roles of perineuronal nets and the perinodal extracellular matrix in neuronal function. *Nat Rev Neurosci*. 2019;20:451-65. <https://doi.org/10.1038/s41583-019-0196-3>.
- Franchi SA, Macco R, Astro V, Tondi D, Savino E, Valtorta F, et al. A method to culture GABAergic interneurons derived from the medial ganglionic eminence. *Front Cell Neurosci*. 2018;11:1-21. <https://doi.org/10.3389/fncel.2017.00423>.
- Fredriksson L, Stevenson TK, Su EJ, Ragsdale M, Moore S, Cradun S, et al. Identification of a neurovascular signaling pathway regulating seizures in mice. *Ann Clin Transl Neurol*. 2015;2:722-38. <https://doi.org/10.1002/acn3.209>.
- Frischnecht R, Heine M, Perrais D, Seidenbecher CI, Choquet D, Gundelfinger ED. Brain extracellular matrix affects AMPA receptor lateral mobility and short-term synaptic plasticity. *Nat Neurosci*. 2009;12:897-904. <https://doi.org/10.1038/nn.2338>.
- Gogolla N, Caroni PLüthi A, Herry C. Perineuronal nets protect fear memories from erasure. *Science*. 2009;325:1258-61. <https://doi.org/10.1126/science.1174146>.
- Hayani H, Song I, Dityatev A. Increased excitability and reduced excitatory synaptic input into fast-spiking CA2 interneurons after enzymatic attenuation of extracellular matrix. *Front Cell Neurosci*. 2018;12. <https://doi.org/10.3389/fncel.2018.00149>.
- Hébert M, Anfray A, Chevilly A, Martinez de Lizarrondo S, Quenault A, Louessard M, et al. Distant space processing is controlled by tPA-dependent NMDA receptor signaling in the entorhinal cortex. *Cereb Cortex*. 2017;27:4783-96. <https://doi.org/10.1093/cercor/bhw275>.
- Hippenmeyer S, Vrieseling E, Sigrist M, Portmann T, Laengle C, Ladle DR, et al. A developmental switch in the response of DRG neurons to ETS transcription factor signaling. *PLoS Biol*. 2005;3:0878-90. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.0030159>.
- Howell MD, Gottschall PE. Lectican proteoglycans, their degrading metalloproteinases, and plasticity in the central nervous system extracellular microenvironment. *Neuroscience*. 2012;217:6-18. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2012.05.034>.
- Hu H, Gan J, Jonas P. Fast-spiking, parvalbumin+ GABAergic interneurons: from cellular design to microcircuit function. *Science*. 2014;345:1255263. <https://doi.org/10.1126/science.1255263>.
- Kavaguchi Y. Physiological, morphological, and histochemical characterization of three classes of interneurons in rat neostriatum. *J Neurosci*. 1993;13:4908-23. <https://doi.org/10.1523/jneurosci.13-11-04908.1993>.

37. Kelly EA, Russo AS, Jackson CD, Lamantia CEL, Majewska AK. Proteolytic regulation of synaptic plasticity in the mouse primary visual cortex: analysis of matrix metalloproteinase 9 deficient mice. *Front Cell Neurosci.* 2015;9:1-17. <https://doi.org/10.3389/fncel.2015.00369>.
38. Kenagy RD, Fischer JW, Davies MG, Berceli SA, Hawkins SM, Wight TN, et al. Increased plasmin and serine proteinase activity during flow-induced intimal atrophy in baboon PTFE grafts. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2002;22:400-4. <https://doi.org/10.1161/hq0302.105376>.
39. Lambdez B, Audinat E, Bockel F, Crépel F, Rossier J. AMPA receptor subunits expressed by single purkinje cells. *Neuron.* 1992;9:247-58. [https://doi.org/10.1016/0896-6273\(92\)90164-9](https://doi.org/10.1016/0896-6273(92)90164-9).
40. Lemarchant S, Pomeschik Y, Káidin I, Kärkkäinen V, Valonen P, Lehtonen S, et al. ADAMTS-4 promotes neurodegeneration in a mouse model of amyotrophic lateral sclerosis. *Mol Neurodegener.* 2016;11:1-24. <https://doi.org/10.1186/s13024-016-0078-3>.
41. Lemarchant S, Pruvost M, Hébert M, Gauberti M, Hommet Y, Briens A, et al. TPA promotes ADAMTS-4-induced CSPG degradation, thereby enhancing neuroplasticity following spinal cord injury. *Neurobiol Dis.* 2014;66:28-42. <https://doi.org/10.1016/j.nbd.2014.02.005>.
42. Lensjø KK, Lepperød ME, Dick G, Hafting T, Fyhn M. Removal of perineuronal nets unlocks juvenile plasticity through network mechanisms of decreased inhibition and increased gamma activity. *J Neurosci.* 2017;37:1269-83. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.2504-16.2016>.
43. Leonetti C, Macrez R, Pruvost M, Hommet Y, Bronsard J, Fournier A, et al. Tissue-type plasminogen activator exerts EGF-like chemokinetic effects on oligodendrocytes in white matter (re)myelination. *Mol Neurodegener.* 2017;12:1-16. <https://doi.org/10.1186/s13024-017-0160-5>.
44. Liot G, Roussel BD, Lebeuier N, Benchenane K, López-Atalaya JP, Vivien D, et al. Tissue-type plasminogen activator rescues neurons from serum deprivation-induced apoptosis through a mechanism independent of its proteolytic activity. *J Neurochem.* 2006;98:1458-64. <https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.2006.03982.x>.
45. Louessard M, Bardou I, Lemarchand E, Thiebaut AM, Parcq J, Leprince J, et al. Activation of cell surface GRP78 decreases endoplasmic reticulum stress and neuronal death. *Cell Death Differ.* 2017;24:1518-29. <https://doi.org/10.1038/cdd.2017.35>.
46. Louessard M, Lacroix A, Martineau M, Mondielli G, Montagne A, Lesept F, et al. Tissue plasminogen activator expression is restricted to subsets of excitatory pyramidal glutamatergic neurons. *Mol Neurobiol.* 2016;53:5000-12. <https://doi.org/10.1007/s12035-015-9432-7>.
47. Macrez R, Ortega MC, Bardou I, Mehra A, Fournier A, Van der Pol SMA, et al. Neuroendothelial NMDA receptors as therapeutic targets in experimental autoimmune encephalomyelitis. *Brain.* 2016;139:2406-19. <https://doi.org/10.1093/brain/aww172>.
48. Madani R, Hulo S, Toni N, Madani H, Steimer T, Müller D, et al. Enhanced hippocampal long-term potentiation and learning by increased neuronal expression of tissue-type plasminogen activator in transgenic mice. *EMBO J.* 1999;18:3007-12. <https://doi.org/10.1093/emboj/18.11.3007>.
49. Madinier A, Quattromani MJ, Sjölund C, Ruscher K, Wieloch T. Enriched housing enhances recovery of limb placement ability and reduces aggrecan-containing perineuronal nets in the rat somatosensory cortex after experimental stroke. *PLoS One.* 2014;9:1-14. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0093121>.
50. Maes ME, Colombo G, Schulz R, Siegert S. Targeting microglia with lentivirus and AAV: recent advances and remaining challenges. *Neurosci Lett.* 2019;707:1-10. <https://doi.org/10.1016/j.neulet.2019.134310>.
51. Mascio G, Buccì D, Notartomaso S, Liberatore F, Antenucci N, Scarselli P, et al. Perineuronal nets are under the control of type-5 metabotropic glutamate receptors in the developing somatosensory cortex. *Trans Psychiatry.* 2021;11. <https://doi.org/10.1038/s41398-021-01210-3>.
52. Mataga N, Mizuguchi Y, Hensch TK. Experience-dependent pruning of dendritic spines in visual cortex by tissue plasminogen activator. *Neuron.* 2004;44:1031-41. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2004.11.028>.
53. Mataga N, Nagai N, Hensch TK. Permissive proteolytic activity for visual cortical plasticity. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2002;99:7717-21. <https://doi.org/10.1073/pnas.102088899>.
54. Matys TP, Pawlak R, Matys E, Pavlides C, McEwen BS, Strickland S. Tissue plasminogen activator promotes the effects of corticotropin-releasing factor on the amygdala and anxiety-like behavior. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2004;101:16345-50. <https://doi.org/10.1073/pnas.0407355101>.
55. Mehra A, Guérit S, Macrez R, Gosselet F, Sevin E, Lebas H, et al. Nonionotropic action of endothelial NMDA receptors on blood-brain barrier permeability via Rho/ROCK-mediated phosphorylation of myosin. *J Neurosci.* 2020;40:1778-87. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.0969-19.2019>.
56. Merienne N, Le Douce J, Faivre E, Déglon N, Bonvento G. Efficient gene delivery and selective transduction of astrocytes in the mammalian brain using viral vectors. *Front Cell Neurosci.* 2013;7:1-13. <https://doi.org/10.3389/fncel.2013.00106>.
57. Miyata S, Nishimura Y, Nakashima T. Perineuronal nets protect against amyloid  $\beta$ -protein neurotoxicity in cultured cortical neurons. *Brain Res.* 2007;1150:200-6. <https://doi.org/10.1016/j.brainres.2007.02.066>.
58. Müller CM, Griesinger CB. Tissue plasminogen activator mediates reverse occlusion plasticity in visual cortex. *Nat Neurosci.* 1998;1:47-53. <https://doi.org/10.1038/248>.
59. Murase S, Lantz CL, Quinlan EM. Light reintroduction after dark exposure reactivates plasticity in adults via perisynaptic activation of MMP-9. *Elife.* 2017;6:1-23. <https://doi.org/10.7554/eLife.27345>.
60. Nakamura M, Nakano K, Morita S, Nakashima T, Oohira A, Miyata S. Expression of chondroitin sulfate proteoglycans in barrel field of mouse and rat somatosensory cortex. *Brain Res.* 2009;1252:117-29. <https://doi.org/10.1016/j.brainres.2008.11.022>.
61. Nicole O, Docagne F, Ali C, Margail I, Cameliet P, MacKenzie ET, et al. The proteolytic activity of tissue-plasminogen activator enhances NMDA receptor-mediated signaling. *Nat Med.* 2001;7:59-64. <https://doi.org/10.1038/83358>.
62. Orlando C, Ster J, Gerber U, Fawcett JW, Raineteau O. Perisynaptic chondroitin sulfate proteoglycans restrict structural plasticity in an integrin-dependent manner. *J Neurosci.* 2012;32:18009-17. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.2406-12.2012>.
63. Pantazopoulos H, Gisabella B, Rexrode L, Benefield D, Yildiz E, Seltzer P, et al. Circadian rhythms of perineuronal net composition. *eNeuro.* 2020;7:1-21. <https://doi.org/10.1523/ENEURO.0034-19.2020>.
64. Pasquet N, Douceau S, Naveau M, Lesept F, Louessard M, Lebovieur L, et al. Tissue-type plasminogen activator controlled corticogenesis through a mechanism dependent of NMDA receptors expressed on radial glial cells. *Cereb Cortex.* 2019;29:2482-98. <https://doi.org/10.1093/cercor/bhy119>.
65. Pawlak R, Magarinos AM, Melchor J, McEwen B, Strickland S. Tissue plasminogen activator in the amygdala is critical for stress-induced anxiety-like behavior. *Nat Neurosci.* 2003;6:168-74. <https://doi.org/10.1038/mn998>.
66. Pizzorusso T, Medini P, Berardi N, Chierzi S, Fawcett JW, Maffei L. Reactivation of ocular dominance plasticity in the adult visual cortex. *Science.* 2002;298:1248-51. <https://doi.org/10.1126/science.1072699>.
67. Pu H, Shi Y, Zhang L, Lu Z, Ye Q, Leak RK, et al. Protease-independent action of tissue plasminogen activator in brain plasticity and neurological recovery after ischemic stroke. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2019;116:9115-24. <https://doi.org/10.1073/pnas.1821979116>.
68. Qian Z, Gilbert ME, Colicos MA, Kandel ER, Kuhl D. Tissue-plasminogen activator is induced as an immediate-early gene during seizure, kindling and long-term potentiation. *Nature.* 1993;361:453-7. <https://doi.org/10.1038/361453a0>.
69. Reinhard SM, Rais M, Afroz S, Hanania Y, Pendi K, Espinoza K, et al. Reduced perineuronal net expression in Fmr1 KO mice auditory cortex and amygdala is linked to impaired fear-associated memory. *Neurobiol Learn Mem.* 2019;164. <https://doi.org/10.1016/j.nlm.2019.107042>.
70. Romberg C, Yang S, Melani R, Andrews MR, Homer AE, Spillanti MG, et al. Depletion of perineuronal nets enhances recognition memory and long-term depression in the perirhinal cortex. *J Neurosci.* 2013;33:7057-65. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.6267-11.2013>.
71. Rossier J, Bernard A, Cabungcal JH, Perrenoud Q, Savoye A, Gallopin T, et al. Cortical fast-spiking parvalbumin interneurons enwrapped in the perineuronal net express the metalloproteinases Adamts8, Adamts15 and Nephrilysin. *Mol Psychiatry.* 2015;20:154-61. <https://doi.org/10.1038/mp.2014.162>.
72. Rowlands D, Lensjø KK, Dinh T, Yang S, Andrews MR, Hafting T, et al. Aggrecan directs extracellular matrix-mediated neuronal plasticity. *J Neurosci.* 2018;38:10102-13. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.1122-18.2018>.

73. Ruden JB, Dugan LL, Konradi C. Parvalbumin interneuron vulnerability and brain disorders. *Neuropsychopharmacology*. 2021;46:279-87. <https://doi.org/10.1038/s41386-020-0778-9>.
74. Sallés FJ, Strickland S, Sallés FJ, Strickland S. Localization and regulation of the tissue plasminogen activator-plasmin system in the hippocampus. *J Neurosci*. 2002;22:2125-34. <https://doi.org/10.1523/jneurosci.22-06-02125.2002>.
75. Sappino AP, Madani R, Huarte J, Belin D, Kiss JZ, Wohlwend A, et al. Extracellular proteolysis in the adult murine brain. *J Clin Invest*. 1993;92:679-85. <https://doi.org/10.1172/JCI116637>.
76. Shi W, Wei X, Wang X, Du S, Liu W, Song J, et al. Perineuronal nets protect long-term memory by limiting activity-dependent inhibition from parvalbumin interneurons. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2019;116:27063-73. <https://doi.org/10.1073/pnas.1902680116>.
77. Siao CJ, Tsirka SE. Tissue plasminogen activator mediates microglial activation via its finger domain through annexin II. *J Neurosci*. 2002;22:3352-8. <https://doi.org/10.1523/jneurosci.22-09-03352.2002>.
78. Staker M, Churchill L, Todd RP, Backtop JM, Zuloaga DG, Raber J, et al. Removal of perineuronal nets in the medial prefrontal cortex impairs the acquisition and reconsolidation of a cocaine-induced conditioned place preference memory. *J Neurosci*. 2015;35:4190-202. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.3592-14.2015>.
79. Sparta DR, Hovelsø N, Mason AO, Kantak PA, Ung RL, Decot HK, et al. Activation of prefrontal cortical parvalbumin interneurons facilitates extinction of reward-seeking behavior. *J Neurosci*. 2014;34:3699-705. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.0235-13.2014>.
80. Stevenson TK, Lawrence DA. Characterization of tissue plasminogen activator expression and trafficking in the adult murine brain. *eNeuro*. 2018;5:1-18. <https://doi.org/10.1523/ENEURO.0119-18.2018>.
81. Su EJ, Fredriksson L, Geyer M, Folestad E, Cale J, Andrae J, et al. Activation of PDGF-CC by tissue plasminogen activator impairs blood-brain barrier integrity during ischemic stroke. *Nat Med*. 2008;14:731-7. <https://doi.org/10.1038/nm1787>.
82. Sumi Y, Dent MA, Owen DE, Seeley PJ, Morris RJ. The expression of tissue and urokinase-type plasminogen activators in neural development suggests different modes of proteolytic involvement in neuronal growth. *Development*. 1992;116:625-37.
83. Sur M, Frost DO, Hockfield S. Expression of a surface-associated antigen on Y-cells in the cat lateral geniculate nucleus is regulated by visual experience. *J Neurosci*. 1988;8:874-82. <https://doi.org/10.1523/jneurosci.08-03-00874.1988>.
84. Teesalu T, Kulla A, Asser T, Koskineemi M, Vaheeri A. Tissue plasminogen activator as a key effector in neurobiology and neuropathology. *Biochem Soc Trans*. 2002;30:183-9. <https://doi.org/10.1042/bst0300183>.
85. Teesalu T, Kulla A, Simisker A, Sirén V, Lawrence DA, Asser T, et al. Tissue plasminogen activator and neuroserpin are widely expressed in the human central nervous system. *Thromb Haemost*. 2004. <https://doi.org/10.1160/th02-12-0310>.
86. Testa D, Prochiantz A, Di Nardo AA. Perineuronal nets in brain physiology and disease. *Semin Cell Dev Biol*. 2019;89:125-35. <https://doi.org/10.1016/j.semcdb.2018.09.011>.
87. Thiebaut AM, Gauberti M, Ali C, Martinez De Lizarrondo S, Vivien D, Yepes M, et al. The role of plasminogen activators in stroke treatment: fibrinolysis and beyond. *Lancet Neurol*. 2018;17:1121-32. [https://doi.org/10.1016/S1474-4422\(18\)30323-5](https://doi.org/10.1016/S1474-4422(18)30323-5).
88. Thorndike RL. Who belongs in the family? *Psychometrika*. 1953;18:267-76. <https://doi.org/10.1007/BF02289263>.
89. Ueno H, Suemitsu S, Okamoto M, Matsumoto Y, Ishihara T. Sensory experience-dependent formation of perineuronal nets and expression of Cat-315 immunoreactive components in the mouse somatosensory cortex. *Neuroscience*. 2017;355:161-74. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2017.04.041>.
90. Visse R, Nagase H. Matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases: structure, function, and biochemistry. *Circ Res*. 2003;92:827-39. <https://doi.org/10.1161/01.RES.0000070112.80711.3D>.
91. Wang WY, Xu G-Z, Tian J, Sprecher AJ. Inhibitory effect on LPS-induced retinal microglial activation of downregulation of t-PA expression by siRNA interference. *Curr Eye Res*. 2009;34:476-84. <https://doi.org/10.1080/02713680902916108>.
92. Ward JH. Hierarchical grouping to optimize an objective function. *J Am Stat Assoc*. 1963;58:236-44. <https://doi.org/10.1080/01621459.1963.10500845>.
93. Wen TH, Binder DK, Ethell IM, Razak KA. The perineuronal 'safety' net? Perineuronal net abnormalities in neurological disorders. *Front Mol Neurosci*. 2018;11:270.
94. Wu F, Wu J, Nicholson AD, Echeverry R, Halle WB, Catano M, et al. Tissue-type plasminogen activator regulates the neuronal uptake of glucose in the ischemic brain. *J Neurosci*. 2012;32:9848-58. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.1241-12.2012>.
95. Wu YP, Siao CJ, Lu W, Sung TC, Frohman MA, Milev P, et al. The tissue plasminogen activator (tPA)/plasmin extracellular proteolytic system regulates seizure-induced hippocampal mossy fiber outgrowth through a proteoglycan substrate. *J Cell Biol*. 2000;148:1295-304. <https://doi.org/10.1083/jcb.148.6.1295>.
96. Ye Q, Miao Q, Long (2013) Experience-dependent development of perineuronal nets and chondroitin sulfate proteoglycan receptors in mouse visual cortex. *Matrix Biol*. 2013;32:352-363. <https://doi.org/10.1016/j.matbio.2013.04.001>.
97. Yutsudo N, Kitagawa H. Involvement of chondroitin 6-sulfation in temporal lobe epilepsy. *Exp Neurol*. 2015;274:126-33. <https://doi.org/10.1016/j.expneurol.2015.07.009>.
98. Zhu J, Wan Y, Xu H, Wu Y, Hu B, Jin H. The role of endogenous tissue-type plasminogen activator in neuronal survival after ischemic stroke: friend or foe? *Cell Mol Life Sci*. 2019;76:1489-506. <https://doi.org/10.1007/s00181-019-03005-8>.

#### Publisher's Note

Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.

Ready to submit your research? Choose BMC and benefit from:

- fast, convenient online submission
- thorough peer review by experienced researchers in your field
- rapid publication on acceptance
- support for research data, including large and complex data types
- gold Open Access which fosters wider collaboration and increased citations
- maximum visibility for your research: over 100M website views per year

At BMC, research is always in progress.

Learn more [biomedcentral.com/submissions](https://biomedcentral.com/submissions)



## Additional File 1

### **Parvalbumin interneuron-derived Tissue-type plasminogen activator shapes perineuronal net structure**

Matthieu Lépine<sup>a1</sup>, Sara Douceau<sup>a1</sup>, Gabrielle Devienne<sup>b</sup>, Paul Prunotto<sup>a</sup>, Sophie Lenoir<sup>a</sup> Caroline Regnaud<sup>a</sup>, Elsa Pouet<sup>a</sup>, Juliette Piquet<sup>b</sup>, Laurent Lebouvier<sup>a</sup>, Yannick Hommet<sup>a</sup>, Eric Maubert<sup>a</sup>, Véronique Agin<sup>a</sup>, Bertrand Lambolez<sup>b</sup>, Bruno Cauli<sup>b</sup>, Carine Ali<sup>\*a1</sup>, Denis Vivien<sup>a,c1</sup>

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

<sup>b</sup> Neuroscience Paris Seine - Institut de Biologie Paris Seine (NPS - IBPS), Sorbonne Université UM119, CNRS UMR8246, INSERM U1130, 75005 Paris, France

<sup>c</sup> Department of clinical research, CHU de Caen Normandie, Caen, France

<sup>1</sup> Authors with equal contribution

**\*Corresponding author. Email: [ali@cyceron.fr](mailto:ali@cyceron.fr)**

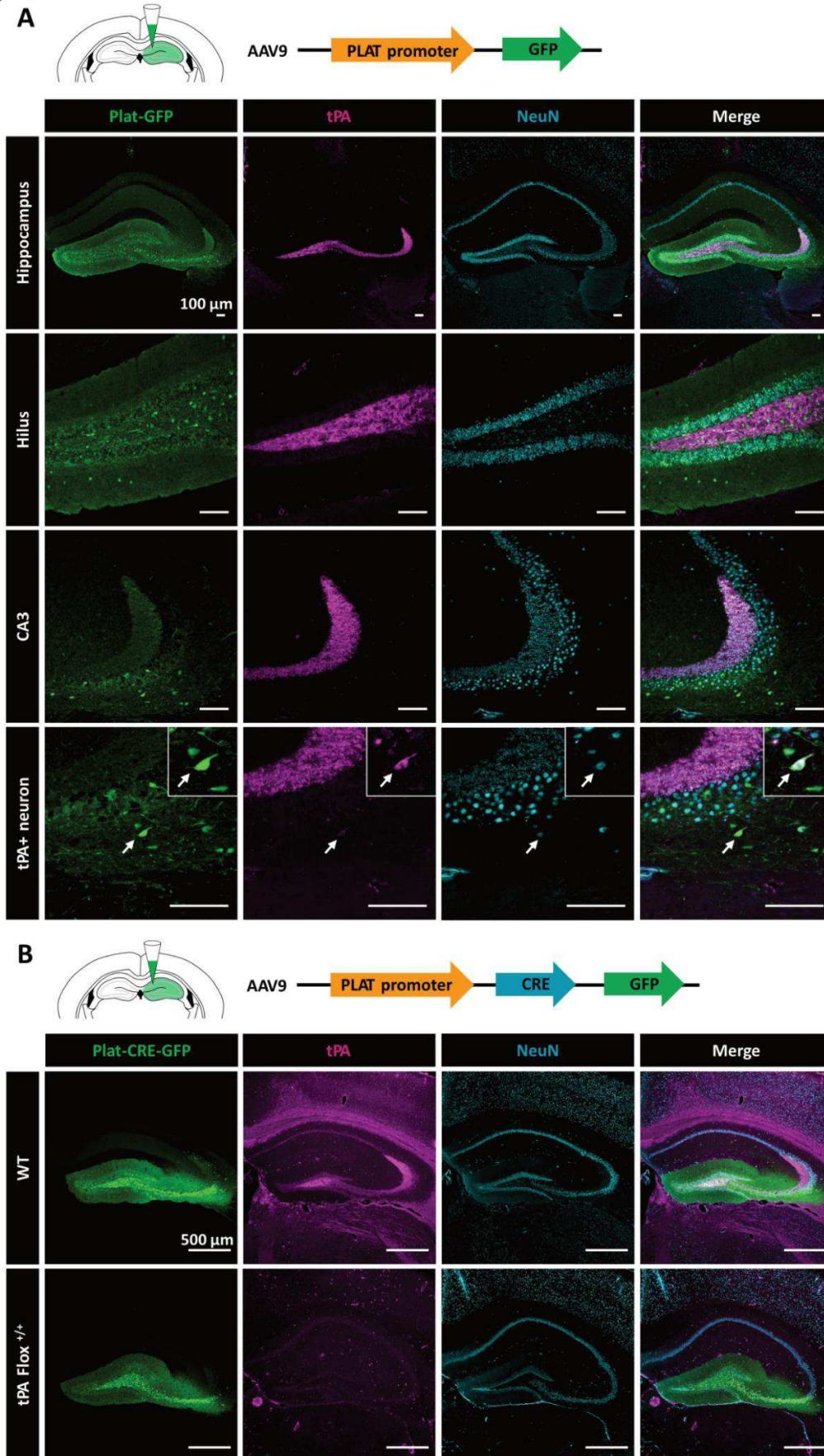
#### **This file include:**

Figure S1 to S8

Table S1

Supplementary materials and methods

Fig. S1

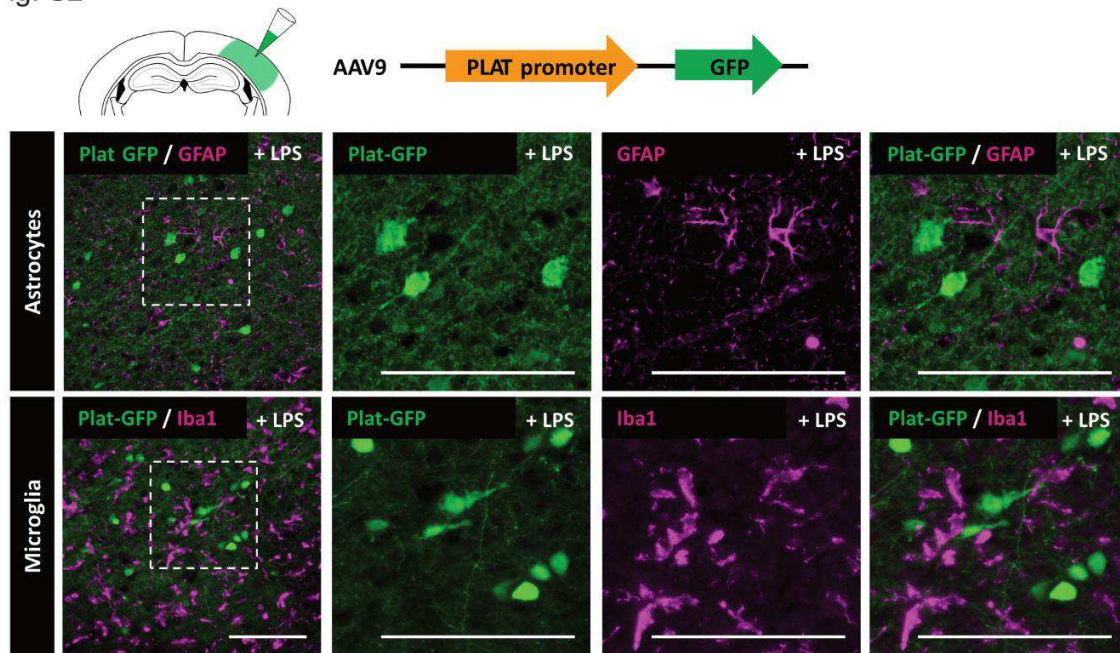


**Figure S1: Characterization of a tPA-reporter construct, for *in vivo* investigations – AAV9-Plat-GFP**

(A) We engineered a viral reporter construct encoding for green fluorescent protein (GFP) under the control of the human tPA (Plat) promoter (-1035 to +207 from the transcription start site; AAV-Plat-GFP; see Methods section). The construct was first injected in the dentate gyrus (DG), a brain structure in which tPA immunostaining is well described (Louessard et al., 2016b; Stevenson and Lawrence, 2018b). Co-Immunohistochemistry of the GFP reporter (green) with the neuronal marker NeuN (cyan) and tPA (magenta) were performed in the hippocampus of adult wild type mice, 3 weeks after injection. The GFP staining was observed in the granular cells of the DG, in mossy cells of the hilus and in mossy fibers in the CA3 sub-region of the hippocampus. Hippocampal GFP signals in mossy fibers co-localized with signals from immunostaining for a tPA-specific antibody (Louessard et al., 2016b).

(B) To validate the specificity of the Plat-GFP construct, tPA $Flox^{+/+}$  mice (Pasquet et al., 2019b) were injected in the DG with an AAV-Plat-Cre-GFP construct (See Methods section). Co-immunohistochemistry of the GFP reporter (green) with the neuronal marker NeuN (cyan) and tPA (magenta) in the hippocampus 3 weeks after injection. As expected, Cre-GFP was detected in both granular cells of the DG and in the corresponding mossy fibers, while co-immunostaining for tPA was negative, confirming the efficient and specific conditional knock-out in tPA $Flox^{+/+}$  mice but not in their wild type littermates. Thus, the Plat-GFP construct is a valid reporter of tPA expression *in vivo*. Scale bar: 100  $\mu$ m.

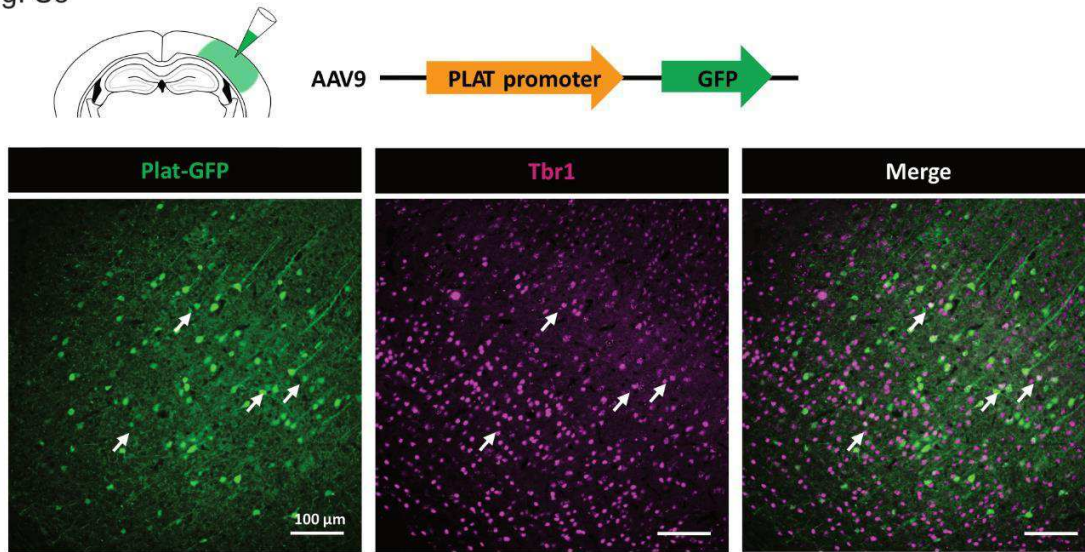
Fig. S2

**Figure S2: 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  $\mu$ m.



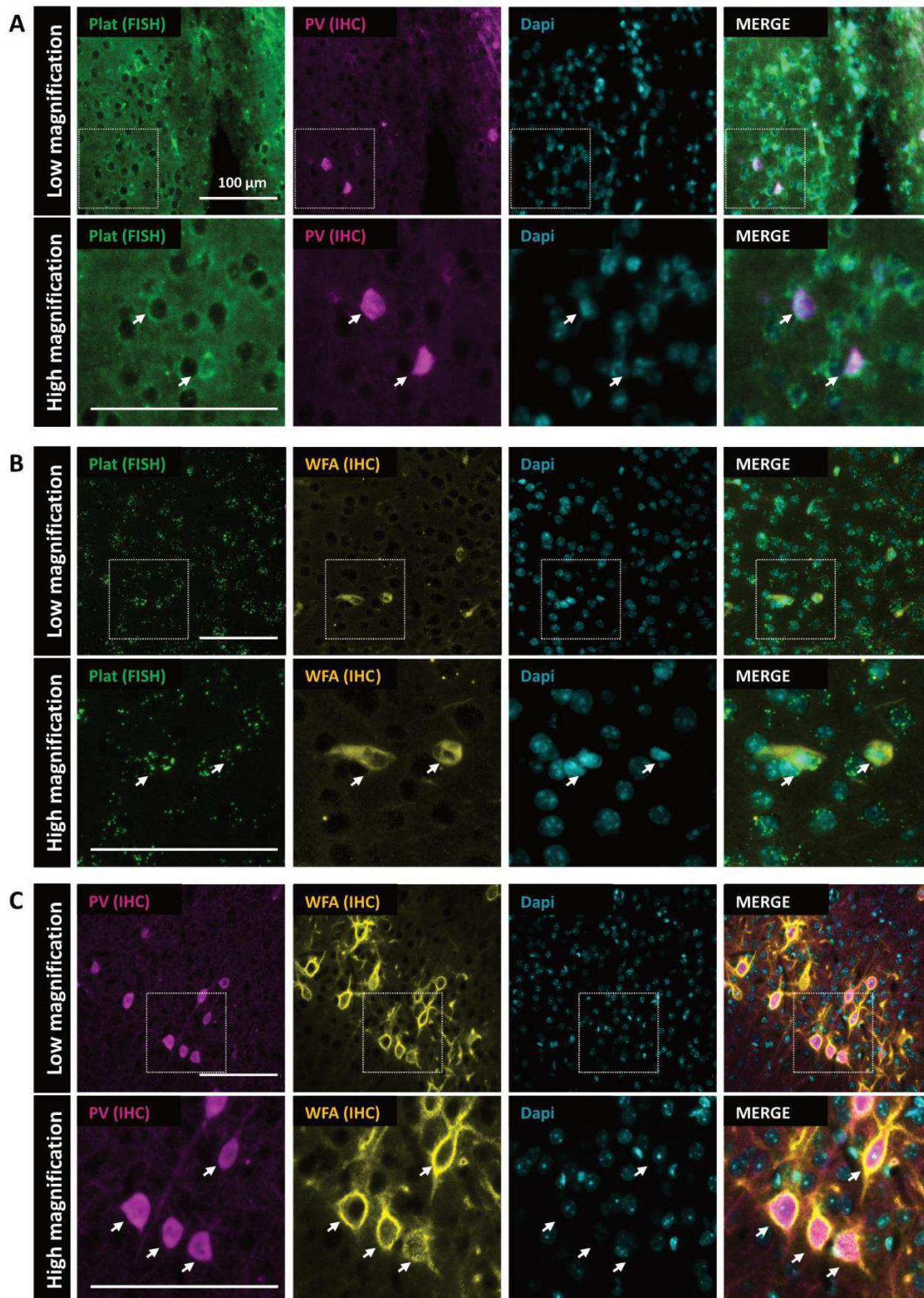
Fig. S3



**Figure S3: 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 localization of Plat-GFP in excitatory neurons. Scale bar: 100  $\mu\text{m}$ .

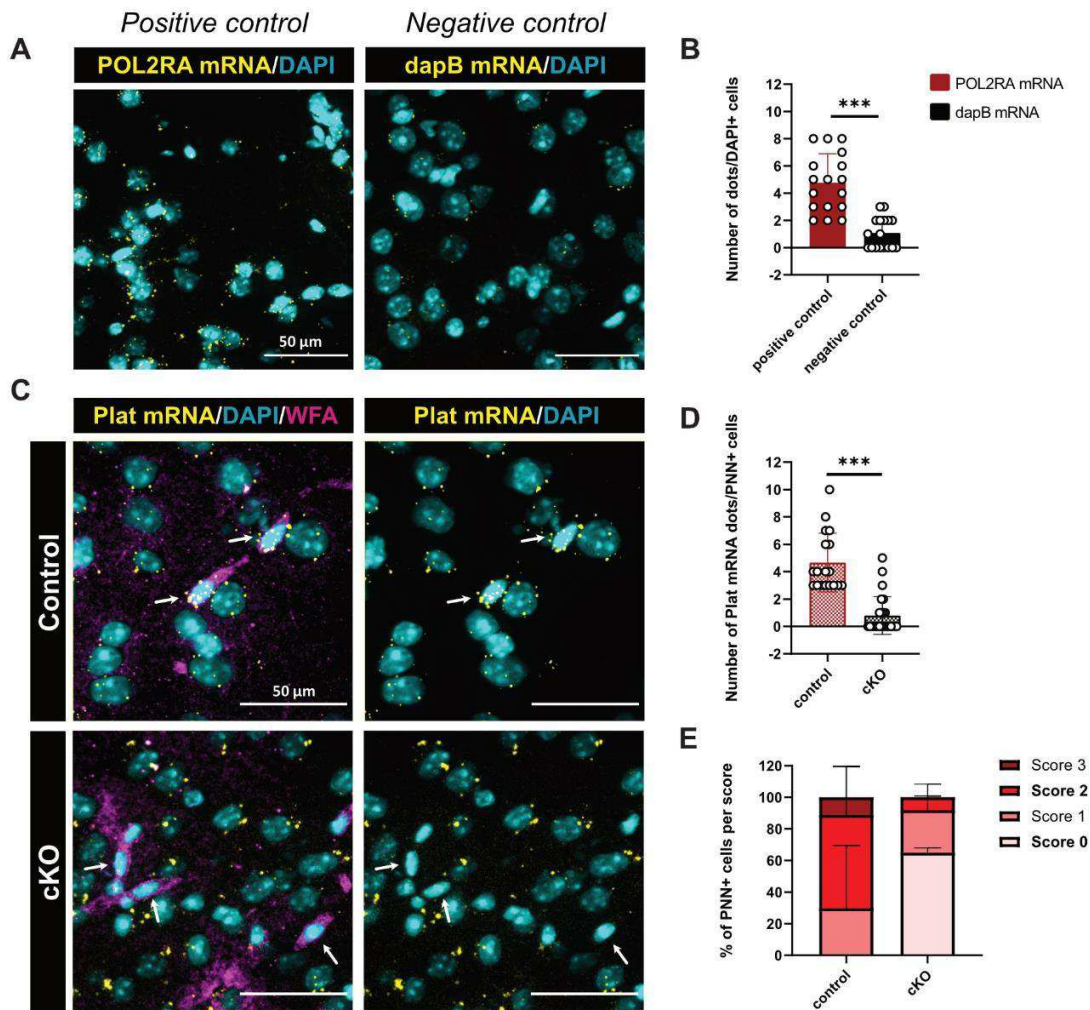
Fig. S4



**Figure S4: tPA mRNA is expressed in parvalbumin interneurons enwrapped with PNNs**

(A-B) *In situ* hybridization against tPA mRNA (Plat; green dots) in the somatosensory cortex of WT mice, revealing tPA mRNA detection in parvalbumin interneurons (magenta) and in neurons enwrapped by PNNs (WFA, yellow). (C) Immunohistochemistry in the somatosensory cortex, revealing PNN marker (WFA) mostly around parvalbumin positive cells. Scale bar: 100  $\mu$ m.

Fig. S5

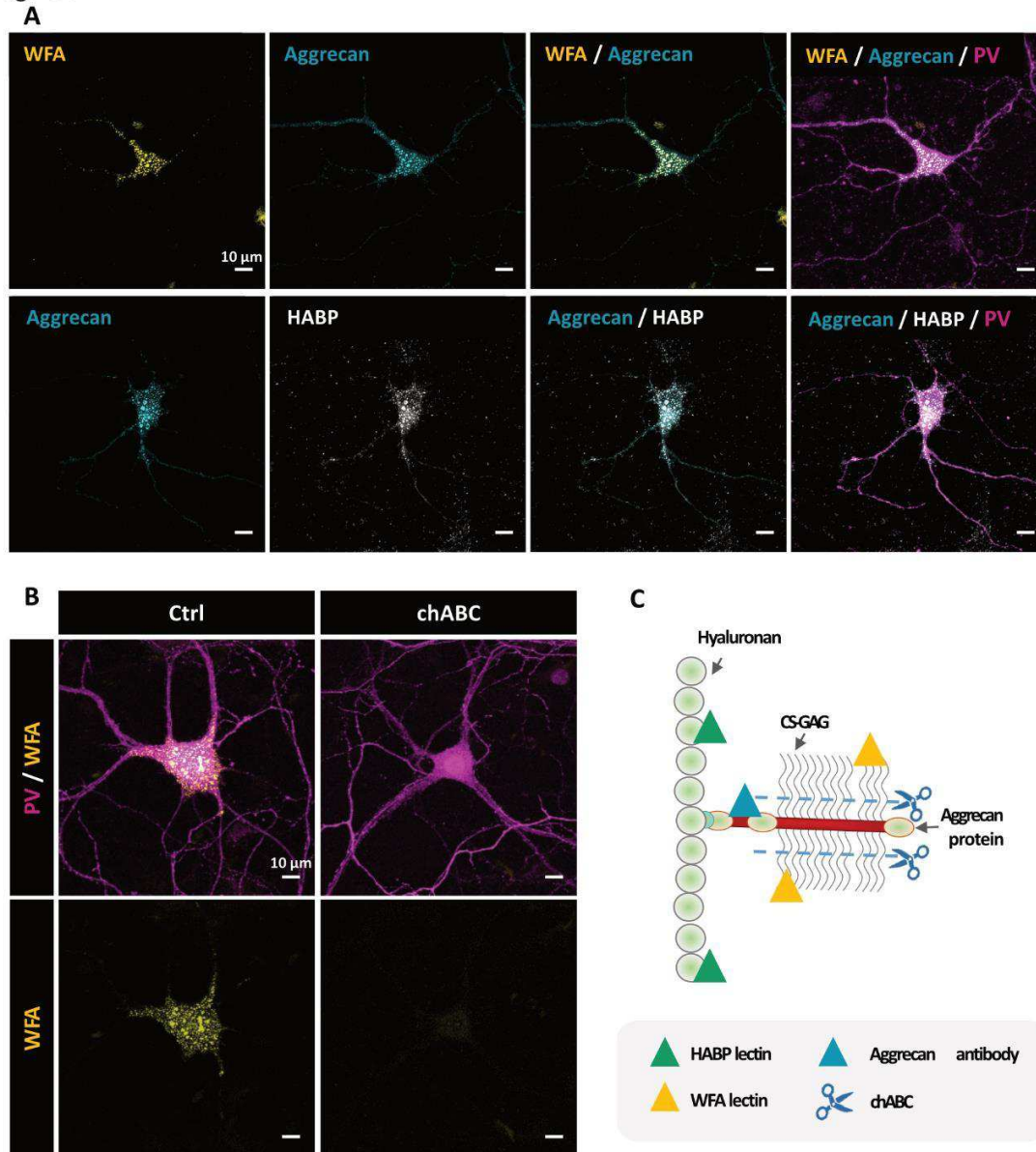


**Figure S5: Endogenous tPA mRNA is expressed by PNN positive cells in WT mice but not in mice with a selective deletion of tPA in PV.**

(A) Representative images of RNAscope positive control POL2RA mRNA (yellow) and negative control dapB mRNA (yellow). (B) Quantification of the number of mRNA dots found in each condition. N=17 DAPI+ cells per condition. Mann Whitney test;  $p < 0.001$ . (C) Representative images showing Plat mRNA dots (yellow) in PNN+ cells (magenta) in control mice and cKO mice. Note that Plat mRNA dots are still present in PNN- cells in cKO condition. (D) Quantification of the number of Plat mRNA dots found in Control and cKO mice. Control: N=18 PNN+ cells from 3 control mice; cKO: N= 25 PNN+ cells from 3 cKO mice. Mann Whitney test;  $p < 0.001$ . (E)

Quantification of the percentage of cells per score in control mice and cKO mice. N=3 mice per genotype. Two-way ANOVA (score\*genotype:  $p < 0.01$ ); Sidak post-hoc test: score 2:  $p < 0.05$ ; score 0:  $p < 0.01$ . Scale bar = 50  $\mu\text{m}$ . Graph show mean  $\pm$  sem.

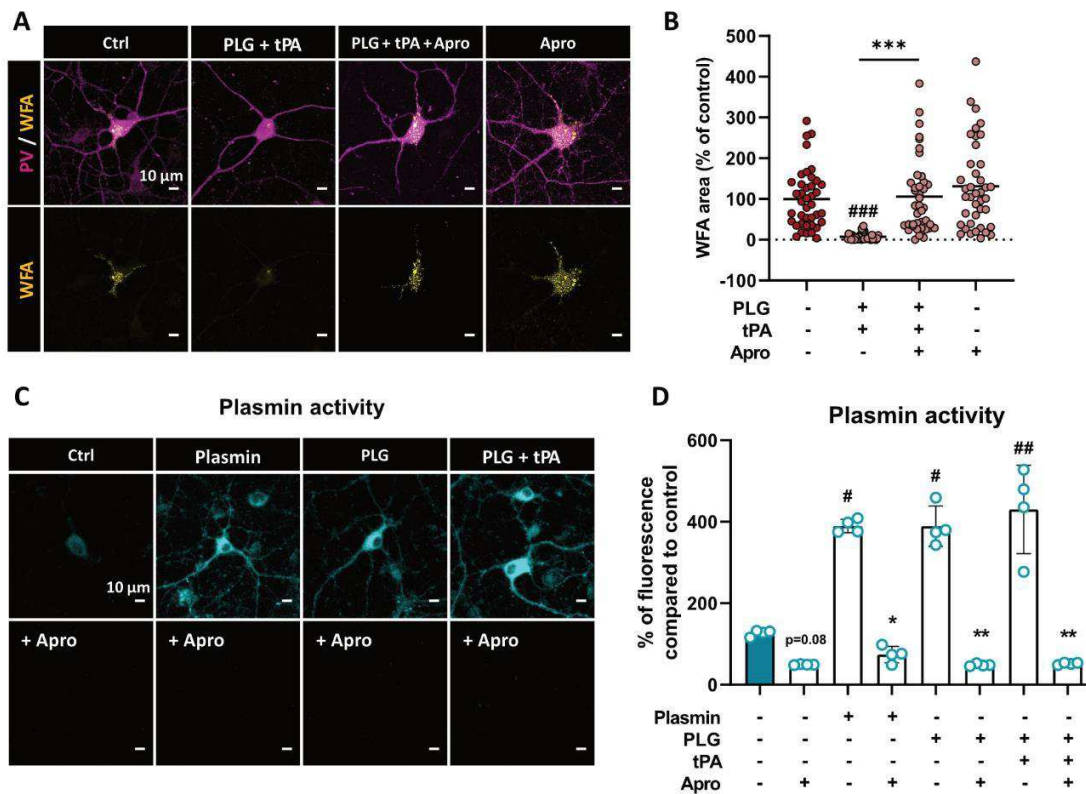
Fig. S6



**Figure S6: PNN-like structures express aggrecan and hyaluronic acid and are sensitive to ChABC treatment**

(A) Neurons at DIV14 stained for WFA (yellow) aggrecan (cyan), HABP (Hyaluronic acid binding protein; white) and PV (magenta). (B) Chondroitinase ABC (ChABC) treatment during 24h enables 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  $\mu\text{m}$ .

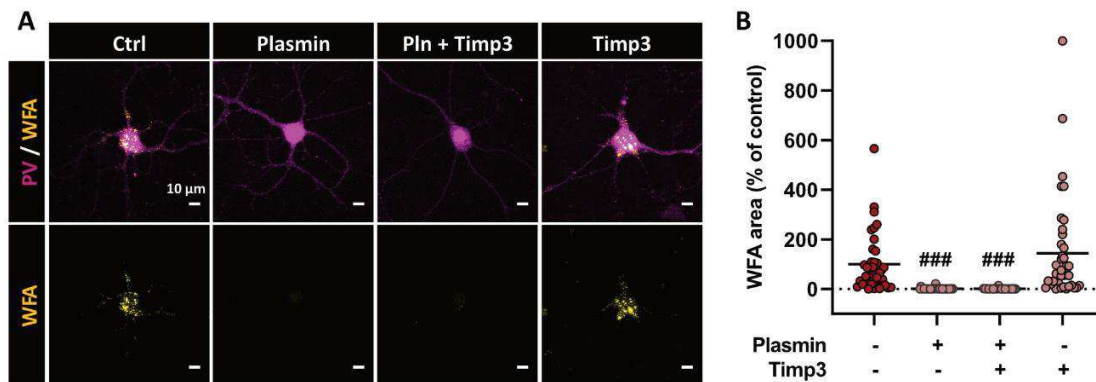
Fig. S7



**Figure S7: Endogenous tPA controls the remodeling of PNNs in a plasmin- dependent manner**

(A-B) MGE-derived WT interneuron cultures were treated at DIV14 with plasminogen (100 nM), tPA (10 nM) and aprotinin (1.5  $\mu$ M) and processed 24h later for immunocytochemistry. (A) Representative images of immunocytochemical stainings for PV (magenta) and WFA (yellow) 24h after treatment. (B) Aprotinin reverses plasminogen + tPA-induced PNN-like degradation. Graph show mean  $\pm$  sem (n=40 cells from 4 independent experiments). Kruskal-Wallis test followed by Dunn's post-hoc test for multiple comparisons; ###: p<0.001 (compared to Control), \*\*\*: p<0.001 (compared to PLG + tPA).(C-D) 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  $\pm$  sem (n=4 independent experiments; Kruskal Wallis followed by two-stages 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.

Fig. S8



### Figure S8: tPA/plasmin mediated PNNs 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 PNNs degradation. Graph show mean  $\pm$  sem (n=30-40 cells from 4 independent experiments). Kruskal-Wallis test followed by Dunn's post-hoc test for multiple comparisons; ###:  $p < 0,001$  (compared to Control). Scale bar: 10  $\mu$ m.



Table. S1

Genes accession no.	First PCR primers	Size bp	Second PCR nested primers	Size, bp
VGlut1* NM_182993.2	Sense, 597: CCCTTAGAACGGAGTCGGCT Antisense, 1169: TATCCGACCACCAGCAGCAG	592	Sense, 621: ACGACAGCCTTTTGGCGTTC Antisense, 968: CAAAGTAGGGGGCTGAGAG	366
GAD65* NM_008078.2	Sense, 99: CCAAAAAGTTCACGGGCGG Antisense, 454: TCCTCCAGATTTGCGGTTG	373	Sense, 219: CACCTGCGACCAAAAACCTT Antisense, 447 : GATTTTGGCGTTGGTCTGCC	247
GAD67* NM_008077.4	Sense, 83: ATGATACTTGGTGTGGCGTAGC Antisense, 314: GTTTGCTCCTCCCGTTCTTAG	253	Sense, 159: CAATAGCCTGGAAGAGAAGAGTCCG Antisense, 314: GTTTGCTCCTCCCGTTCTTAG	178
PV* NM_013645.3	Sense, 104: GCCTGAAGAAAAAGAACCCG Antisense, 275: AATCTTGCCGTCCCCATCCT	191	Sense, 122: CGGATGAGGTGAAGAAGGTGT Antisense, 265: TCCCCATCCTTGCTCCAGC	163
Akr1c18 NM_134066	Sense, 290: GGTCAACTTCCCATCGTCCA Antisense, 667 : GCACCATAGGCAACCAGAAC	397	Sense, 374 : ATCTCATTCATTTCCCAGTGTCTC Antisense, 610 : GCTCTGGTTGAGATAAAGATGGC	259
Sst NM_009215.1	Sense, 1: ATGCTGTCTGCCGTCTCCA Antisense, 231: GCCTCATCTCGTCTGCTCA	250	Sense, 41: GCATCGTCTGGCTTTGGG Antisense, 191:GGGCTCCAGGGCATCATCT	168
S100beta NM_009115.3	Sense, 57: CGGGCGAGAGGGTGACAA Antisense, 172: TCTTCGTCCAGCGTCTCCAT	133	Sense, 57: CGGGCGAGAGGGTGACAA Antisense, 133: TGTCCACCACTTCTGCTCC	93
APC NM_007462	Sense, 1598: GGACCAGGACAAAAACCCAATG Antisense, 1962: TGCTATTTACATCTGCTCGCCA	386	Sense, 1642: TCTGTCCTGCTGTGTGTGTTCT Antisense, 1826: GGCAACATCTCCAAAGGTCAG	207
Mybp1 NM_001252372	Sense, 774: CGTAGGGAGGTGAAGCAGCA Antisense, 1102: TCTGCCAACTCCACGACAAA	247	Sense, 825: CTGCTGAAAAATGCCAACCC Antisense, 974: TGCCTCCTTTATCCACCTGA	168
Ncan NM_007789	Sense, 159: TGCTGTGTGGCTGCTTCTC Antisense, 521: CAGCGATACAGCCAGAGTC	381	Sense, 193: TCAGGACACACAGGACACCA Antisense, 383: CAGCAGAAGGGTAGCATTGG	309
Plat NM_008872	Sense, 157: CTGCTGCTTTGTGGACTGGC Antisense, 464: ATGTCACAGCGTTTCCCTACA	327	Sense, 175: GCTTTCCATTGCCTGACCA Antisense, 449: CCTACAAATCCATCAGGGCACT	293
Plau NM_008873	Sense, 974: GCACAGCCATCCAGGTCC Antisense, 1237: GTTACAGATAAGCGGTCCTCCA	281	Sense, 1010: CCCCCAAGGTTTACTGATGCTC Antisense, 1180: CCGCAGCACACAGCATTTTA	191
Piprr NM_	Sense, 543: AAGAAGAGCCTGGACATCGC Antisense, 903: TGCGTTTCTCTGTTTCCG	380	Sense, 582: AACTACCACTCCCCTTCCGAAG Antisense, 774: AGATCCGAAGCAGGGTTATGTT	213
Ptprz1 NM_001081306	Sense, 421: TGTGAAAGAGATTGGCTGGTCC Antisense, 806: CCTCAAACCTGGAATCTGTC	406	Sense, 447: CAGGAGCACTAAATCAAAAAA Antisense, 794: AAAATCTGTCCGCATCAAAGCA	368
Sdc4 NM_011521	Sense, 222: TCTGGATGACACGGAGGAGC Antisense, 546: GTCGTAACCTGCTTCCCTTC	344	Sense, 284: ATAACCACATCCCTGAGAATGC Antisense, 496: AGGAAAACGGCAAAGAGGAT	233
Sema3a NM_009152	Sense, 653: GGCTGGTTCCTGCGGATGTC Antisense, 1035: CCCAGTTCACAGGCATACA	401	Sense, 671: GCCTGTCTTTTCTGGGGTGT Antisense, 957: ATCTTTTCCAGCCCAATTGC	306

Table S1: Sequences of first and second PCR primers

## Supplementary materials and methods

### Viral production:

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-Cre-GFP was then subcloned in the pDONR221 for AAV production. All 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.

### Stereotaxic injection of AAV virus:

Animals were deeply anesthetized with isoflurane 5 %, and maintained with 2 % isoflurane in a 70 %/30 % mixture of NO<sub>2</sub>/O<sub>2</sub> in a stereotaxic frame (Harvard Apparatus). AAV9-Plat-GFP or AAV9-Plat-Cre-GFP (1.25.10<sup>13</sup> 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: -2mm; ML: ±1mm; DV: -1.8mm for the dentate gyrus (0.5 µL/site) 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 5 minutes and then removed slowly. After recovery from surgery, mice were left undisturbed for 3 weeks for effective and stable transgene expression.

### Antibodies:

The following antibodies were used: rabbit anti-tPA (1:3000; generous gift from R. Lijnen, Leuven); chicken anti- T-box brain 1 (Tbr1) (1:250, AB2261, Merck). Lectin WFA (1:1000,

L1516, Sigma Aldrich). and Biotinylated Hyaluronic Acid Binding Protein (HABP) (1:200, 385911, Merck) were used to stain PNN.

*In vitro* treatments:

Cells were treated at DIV14 with either 0.1 U/mL Chondroitinase ABC (Merck, C2905), 1.5  $\mu$ M Aprotinin (Sigma Aldrich) or 60 nM recombinant Human TIMP3 (Origene, TP762069) for 24 hours.

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.

*In situ* hybridization:

For fresh tissues: mice were deeply anesthetized with isoflurane 5 % in 70 %/30 % mixture of NO<sub>2</sub>/O<sub>2</sub>. A transcardial perfusion was performed with ice cold 0.9 % NaCl with 3 % heparin and the brain was frozen in isopentane. Cryostat coronal sections of 10  $\mu$ m were collected on Poly-Lysine slides and dried at least 1 hour at – 20°C. Slides were fixed 30 min with a solution containing 4 % paraformaldehyde (PBS 0.1M, in DEPC water, pH 7.4), then digested 15 min by protease-3. Plat probes were hybridized and amplified (RNAscope®). Following the *in situ* hybridization steps, PV immunostaining was performed.

For fixed tissues: mice were deeply anesthetized with isoflurane 5 % in 70 %/30 % mixture of NO<sub>2</sub>/O<sub>2</sub>. 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 DEPC treated with

PBS 0.1M, pH 7.4). Brains were post-fixed for 4h then cryoprotected in 20 % sucrose solution (in PBS 0.1M, in DEPC water, pH 7.4) for 24h and frozen in Tissue-Tek (Miles Scientific). Cryostat coronal sections of 10  $\mu$ m were collected on Poly-Lysine slides and dried at least 1 hour at  $-20^{\circ}\text{C}$ . Slides were treated by target retrieval reagents for 5min at  $100^{\circ}\text{C}$  and protease-plus digestion for 30min. At this step, Plat probes were hybridized and amplified (RNAscope®). Following the in situ hybridization steps, WFA staining was performed. Image analysis and expression assessment was performed by manual counting using ImageJ software. Only dots up to 1.5 microns were considered as positive. Quantifications were performed by counting the number of Plat+ mRNA dots per PNN+ cells. The semi-quantitative ACD 4-scale score was performed as follows: 0 = No staining or  $<1$  dot/cells; 1 = 1–3 dots/cell; 2 = 4–9 dots/cell; 3 = 10–15 dots/cell. Control probes for the bacterial gene DapB (bacterial dihydrodipicolinate reductase; negative control) and the housekeeping gene PolR2a (RNA polymerase II; positive control) were also performed in WT brains.



## **Bibliographie**



- Abbott, N.J., Rönnbäck, L., Hansson, E., 2006. Astrocyte-endothelial interactions at the blood-brain barrier. *Nat Rev Neurosci* 7, 41–53. <https://doi.org/10.1038/nrn1824>
- Acher, R., Chauvet, J., Rouille, Y., 2002. Dynamic processing of neuropeptides. *J Mol Neurosci* 18, 223–228. <https://doi.org/10.1385/JMN:18:3:223>
- Agre, P., Nielsen, S., 1996. The aquaporin family of water channels in kidney. *Nephrologie* 17, 409–415.
- Aguilar, S., Corominas, J.M., Malats, N., Pereira, J.A., Dufresne, M., Real, F.X., Navarro, P., 2004. Tissue plasminogen activator in murine exocrine pancreas cancer: selective expression in ductal tumors and contribution to cancer progression. *Am J Pathol* 165, 1129–1139. [https://doi.org/10.1016/S0002-9440\(10\)63374-3](https://doi.org/10.1016/S0002-9440(10)63374-3)
- Akazawa, C., Shigemoto, R., Bessho, Y., Nakanishi, S., Mizuno, N., 1994. Differential expression of five N-methyl-D-aspartate receptor subunit mRNAs in the cerebellum of developing and adult rats. *Journal of Comparative Neurology* 347, 150–160. <https://doi.org/10.1002/cne.903470112>
- Al-Diwani, A., Handel, A., Townsend, L., Pollak, T., Leite, M.I., Harrison, P.J., Lennox, B.R., Okai, D., Manohar, S.G., Irani, S.R., 2019a. The psychopathology of NMDAR-antibody encephalitis in adults: a systematic review and phenotypic analysis of individual patient data. *The Lancet Psychiatry* 6, 235–246. [https://doi.org/10.1016/S2215-0366\(19\)30001-X](https://doi.org/10.1016/S2215-0366(19)30001-X)
- Al-Diwani, A., Handel, A., Townsend, L., Pollak, T., Leite, M.I., Harrison, P.J., Lennox, B.R., Okai, D., Manohar, S.G., Irani, S.R., 2019b. The psychopathology of NMDAR-antibody encephalitis in adults: a systematic review and phenotypic analysis of individual patient data. *Lancet Psychiatry* 6, 235–246. [https://doi.org/10.1016/S2215-0366\(19\)30001-X](https://doi.org/10.1016/S2215-0366(19)30001-X)
- Al-Hallaq, R.A., Conrads, T.P., Veenstra, T.D., Wenthold, R.J., 2007. NMDA Di-Heteromeric Receptor Populations and Associated Proteins in Rat Hippocampus. *J Neurosci* 27, 8334–8343. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.2155-07.2007>
- Alves-Bezerra, M., Cohen, D.E., 2017. Triglyceride metabolism in the liver. *Compr Physiol* 8, 1–8. <https://doi.org/10.1002/cphy.c170012>
- Amin, M.S., Wang, H.-W., Reza, E., Whitman, S.C., Tuana, B.S., Leenen, F.H.H., 2005. Distribution of epithelial sodium channels and mineralocorticoid receptors in cardiovascular regulatory centers in rat brain. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 289, R1787–1797. <https://doi.org/10.1152/ajpregu.00063.2005>
- Andral, G., 1843. *Essai d'hématologie pathologique*. Fortin, Masson et Cie.
- Anfray, A., Brodin, C., Drieu, A., Potzaha, F., Dalarun, B., Agin, V., Vivien, D., Orset, C., 2021. Single- and two- chain tissue type plasminogen activator treatments differentially influence cerebral recovery after stroke. *Exp Neurol* 338, 113606. <https://doi.org/10.1016/j.expneurol.2021.113606>
- Anfray, A., Drieu, A., Hingot, V., Hommet, Y., Yetim, M., Rubio, M., Deffieux, T., Tanter, M., Orset, C., Vivien, D., 2020. Circulating tPA contributes to neurovascular coupling by a mechanism involving the endothelial NMDA receptors. *J Cereb Blood Flow Metab* 40, 2038–2054. <https://doi.org/10.1177/0271678X19883599>



- Anton, S.D., Moehl, K., Donahoo, W.T., Marosi, K., Lee, S., Arch G. Mainous, I.I.I., Leeuwenburgh, C., Mattson, M.P., 2018. Flipping the Metabolic Switch: Understanding and Applying Health Benefits of Fasting. *Obesity* (Silver Spring, Md.) 26, 254. <https://doi.org/10.1002/oby.22065>
- Aoyagi, T., Izumi, Y., Hiroyama, M., Matsuzaki, T., Yasuoka, Y., Sanbe, A., Miyazaki, H., Fujiwara, Y., Nakayama, Y., Kohda, Y., Yamauchi, J., Inoue, T., Kawahara, K., Saito, H., Tomita, K., Nonoguchi, H., Tanoue, A., 2008. Vasopressin regulates the renin-angiotensin-aldosterone system via V1a receptors in macula densa cells. *American Journal of Physiology-Renal Physiology* 295, F100–F107. <https://doi.org/10.1152/ajprenal.00088.2008>
- Armangue, T., Leypoldt, F., Málaga, I., Raspall-Chaure, M., Marti, I., Nichter, C., Pugh, J., Vicente-Rasoamalala, M., Lafuente-Hidalgo, M., Macaya, A., Ke, M., Titulaer, M.J., Höftberger, R., Sheriff, H., Glaser, C., Dalmau, J., 2014. Herpes Simplex Virus Encephalitis is a Trigger of Brain Autoimmunity. *Ann Neurol* 75, 317–323. <https://doi.org/10.1002/ana.24083>
- Armangue, T., Titulaer, M.J., Málaga, I., Bataller, L., Gabilondo, I., Graus, F., Dalmau, J., 2013. Pediatric Anti-NMDAR encephalitis-Clinical analysis and novel findings in a series of 20 patients. *J Pediatr* 162, 850–856.e2. <https://doi.org/10.1016/j.jpeds.2012.10.011>
- Armstrong, L., Johnson, E., 2018. Water Intake, Water Balance, and the Elusive Daily Water Requirement. *Nutrients* 10, 1928. <https://doi.org/10.3390/nu10121928>
- Atlason, P.T., Garside, M.L., Meddows, E., Whiting, P., McIlhinney, R.A.J., 2007. N-Methyl-d-aspartate (NMDA) Receptor Subunit NR1 Forms the Substrate for Oligomeric Assembly of the NMDA Receptor\*. *Journal of Biological Chemistry* 282, 25299–25307. <https://doi.org/10.1074/jbc.M702778200>
- Attwell, D., Gibb, A., 2005. Neuroenergetics and the kinetic design of excitatory synapses. *Nat Rev Neurosci* 6, 841–849. <https://doi.org/10.1038/nrn1784>
- Balland, E., Dam, J., Langlet, F., Caron, E., Steculorum, S., Messina, A., Rasika, S., Falluel-Morel, A., Anouar, Y., Dehouck, B., Trinquet, E., Jockers, R., Bouret, S.G., Prévot, V., 2014. Hypothalamic tanycytes are an ERK-gated conduit for leptin into the brain. *Cell Metab* 19, 293–301. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2013.12.015>
- Bankir, L., 2001. Antidiuretic action of vasopressin: quantitative aspects and interaction between V1a and V2 receptor-mediated effects. *Cardiovasc Res* 51, 372–390. [https://doi.org/10.1016/s0008-6363\(01\)00328-5](https://doi.org/10.1016/s0008-6363(01)00328-5)
- Bankir, L., Bichet, D.G., Bouby, N., 2010. Vasopressin V2 receptors, ENaC, and sodium reabsorption: a risk factor for hypertension? *Am J Physiol Renal Physiol* 299, F917–928. <https://doi.org/10.1152/ajprenal.00413.2010>
- Bankir, L., Bichet, D.G., Morgenthaler, N.G., 2017. Vasopressin: physiology, assessment and osmosensation. *J Intern Med* 282, 284–297. <https://doi.org/10.1111/joim.12645>
- Baranes, D., Lederfein, D., Huang, Y.Y., Chen, M., Bailey, C.H., 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. [https://doi.org/10.1016/s0896-6273\(00\)80597-8](https://doi.org/10.1016/s0896-6273(00)80597-8)

- Baron, A., Montagne, A., Cassé, F., Launay, S., Maubert, E., Ali, C., Vivien, D., 2010. NR2D-containing NMDA receptors mediate tissue plasminogen activator-promoted neuronal excitotoxicity. *Cell Death Differ* 17, 860–871. <https://doi.org/10.1038/cdd.2009.172>
- Barry, H., Byrne, S., Barrett, E., Murphy, K.C., Cotter, D.R., 2015. Anti-N-methyl-d-aspartate receptor encephalitis: review of clinical presentation, diagnosis and treatment. *BJPsych Bull* 39, 19–23. <https://doi.org/10.1192/pb.bp.113.045518>
- Barry, H., Hardiman, O., Healy, D.G., Keogan, M., Moroney, J., Molnar, P.P., Cotter, D.R., Murphy, K.C., 2011. Anti-NMDA receptor encephalitis: an important differential diagnosis in psychosis. *The British Journal of Psychiatry* 199, 508–509. <https://doi.org/10.1192/bjp.bp.111.092197>
- Bearer, E., Orci, L., 1985. Endothelial fenestral diaphragms: a quick-freeze, deep-etch study. *J Cell Biol* 100, 418–428.
- Bekkevold, C.M., Robertson, K.L., Reinhard, M.K., Battles, A.H., Rowland, N.E., 2013. Dehydration Parameters and Standards for Laboratory Mice. *J Am Assoc Lab Anim Sci* 52, 233–239.
- Benarroch, E.E., 2011. Circumventricular organs: Receptive and homeostatic functions and clinical implications. *Neurology* 77, 1198–1204. <https://doi.org/10.1212/WNL.0b013e31822f04a0>
- Benarroch, E.E., 2008. Metabotropic glutamate receptors: Synaptic modulators and therapeutic targets for neurologic disease. *Neurology* 70, 964–968. <https://doi.org/10.1212/01.wnl.0000306315.03021.2a>
- Benchenane, K., Berezowski, V., Ali, C., Fernández-Monreal, M., López-Atalaya, J.P., Brillault, J., Chuquet, J., Nouvelot, A., MacKenzie, E.T., Bu, G., Cecchelli, R., Touzani, O., Vivien, D., 2005. Tissue-type plasminogen activator crosses the intact blood-brain barrier by low-density lipoprotein receptor-related protein-mediated transcytosis. *Circulation* 111, 2241–2249. <https://doi.org/10.1161/01.CIR.0000163542.48611.A2>
- Benchenane, K., Castel, H., Boulouard, M., Bluthé, R., Fernandez-Monreal, M., Roussel, B.D., Lopez-Atalaya, J.P., Butt-Gueulle, S., Agin, V., Maubert, E., Dantzer, R., Touzani, O., Dauphin, F., Vivien, D., Ali, C., 2007. Anti-NR1 N-terminal-domain vaccination unmasks the crucial action of tPA on NMDA-receptor-mediated toxicity and spatial memory. *J Cell Sci* 120, 578–585. <https://doi.org/10.1242/jcs.03354>
- Berghe, T.V., Hulpiau, P., Martens, L., Vandenbroucke, R.E., Van Wonterghem, E., Perry, S.W., Bruggeman, I., Divert, T., Choi, S.M., Vuylsteke, M., Shestopalov, V.I., Libert, C., Vandenabeele, P., 2015. Passenger Mutations Confound Interpretation of All Genetically Modified Congenic Mice. *Immunity* 43, 200–209. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2015.06.011>
- Bernstein, K.E., Khan, Z., Giani, J.F., Cao, D.-Y., Bernstein, E.A., Shen, X.Z., 2018. Angiotensin-converting enzyme in innate and adaptive immunity. *Nat Rev Nephrol* 14, 325–336. <https://doi.org/10.1038/nrneph.2018.15>
- Bertrand, T., Lesept, F., Chevilly, A., Lenoir, S., Aimable, M., Briens, A., Hommet, Y., Bardou, I., Parcq, J., Vivien, D., 2015. Conformations of tissue plasminogen activator (tPA) orchestrate neuronal survival by a crosstalk between EGFR and NMDAR. *Cell Death Dis* 6, e1924. <https://doi.org/10.1038/cddis.2015.296>

- Betley, J.N., Cao, Z.F.H., Ritola, K.D., Sternson, S.M., 2013. Parallel, Redundant Circuit Organization for Homeostatic Control of Feeding Behavior. *Cell* 155, 1337–1350. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2013.11.002>
- Binder, P.S., Akers, P., Zavala, E.Y., 1979. Endothelial cell density determined by specular microscopy and scanning electron microscopy. *Ophthalmology* 86, 1831–1847. [https://doi.org/10.1016/s0161-6420\(79\)35343-x](https://doi.org/10.1016/s0161-6420(79)35343-x)
- Birling, M.-C., Dierich, A., Jacquot, S., Héroult, Y., Pavlovic, G., 2012. Highly-efficient, fluorescent, locus directed cre and FlpO deleter mice on a pure C57BL/6N genetic background. *genesis* 50, 482–489. <https://doi.org/10.1002/dvg.20826>
- Birumachi, J., Hiroyama, M., Fujiwara, Y., Aoyagi, T., Sanbe, A., Tanoue, A., 2007. Impaired arginine-vasopressin-induced aldosterone release from adrenal gland cells in mice lacking the vasopressin V1A receptor. *Eur J Pharmacol* 566, 226–230. <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2007.03.022>
- Bolborea, M., Langlet, F., 2021. What is the physiological role of hypothalamic tanycytes in metabolism? *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 320, R994–R1003. <https://doi.org/10.1152/ajpregu.00296.2020>
- Boone, M., Deen, P.M.T., 2008. Physiology and pathophysiology of the vasopressin-regulated renal water reabsorption. *Pflugers Arch* 456, 1005–1024. <https://doi.org/10.1007/s00424-008-0498-1>
- Böttcher, M., Müller-Fielitz, H., Sundaram, S.M., Gallet, S., Neve, V., Shionoya, K., Zager, A., Quan, N., Liu, X., Schmidt-Ullrich, R., Haenold, R., Wenzel, J., Blomqvist, A., Engblom, D., Prevot, V., Schwaninger, M., 2020. NF- $\kappa$ B signaling in tanycytes mediates inflammation-induced anorexia. *Molecular Metabolism* 39, 101022. <https://doi.org/10.1016/j.molmet.2020.101022>
- Boulaftali, Y., Adam, F., Venisse, L., Ollivier, V., Richard, B., Taieb, S., Monard, D., Favier, R., Alessi, M.-C., Bryckaert, M., Arocas, V., Jandrot-Perrus, M., Bouton, M.-C., 2010. Anticoagulant and antithrombotic properties of platelet protease nexin-1. *Blood* 115, 97–106. <https://doi.org/10.1182/blood-2009-04-217240>
- Bouton, M.-C., Boulaftali, Y., Richard, B., Arocas, V., Michel, J.-B., Jandrot-Perrus, M., 2012. Emerging role of serpinE2/protease nexin-1 in hemostasis and vascular biology. *Blood* 119, 2452–2457. <https://doi.org/10.1182/blood-2011-10-387464>
- Braakman, H.M.H., Moers-Hornikx, V.M.P., Arts, B.M.G., Hupperts, R.M.M., Nicolai, J., 2010. Pearls & Oy-sters: Electroconvulsive therapy in anti-NMDA receptor encephalitis. *Neurology* 75, e44–e46. <https://doi.org/10.1212/WNL.0b013e3181f11dc1>
- Browne, M.J., Tyrrell, A.W., Chapman, C.G., Carey, J.E., Glover, D.M., Grosveld, F.G., Dodd, I., Robinson, J.H., 1985. Isolation of a human tissue-type plasminogen-activator genomic DNA clone and its expression in mouse L cells. *Gene* 33, 279–284. [https://doi.org/10.1016/0378-1119\(85\)90235-5](https://doi.org/10.1016/0378-1119(85)90235-5)
- Bu, G., Morton, P.A., Schwartz, A.L., 1992. Identification and partial characterization by chemical cross-linking of a binding protein for tissue-type plasminogen activator (t-PA) on rat hepatoma cells. A plasminogen activator inhibitor type 1-independent t-PA receptor. *J Biol Chem* 267, 15595–15602.

- Buisson, A., Nicole, O., Docagne, F., Sartelet, H., Mackenzie, E.T., Vivien, D., 1998. Up-regulation of a serine protease inhibitor in astrocytes mediates the neuroprotective activity of transforming growth factor beta1. *FASEB J* 12, 1683–1691.
- Calabresi, P., Napolitano, M., Centonze, D., Marfia, G.A., Gubellini, P., Teule, M.A., Berretta, N., Bernardi, G., Frati, L., Tolu, M., Gulino, A., 2000. Tissue plasminogen activator controls multiple forms of synaptic plasticity and memory. *Eur J Neurosci* 12, 1002–1012. <https://doi.org/10.1046/j.1460-9568.2000.00991.x>
- Capasso, J.M., Rivard, C.J., Berl, T., 2001. Long-term adaptation of renal cells to hypertonicity: role of MAP kinases and Na-K-ATPase. *American Journal of Physiology-Renal Physiology* 280, F768–F776. <https://doi.org/10.1152/ajprenal.2001.280.5.F768>
- Carlson, K.-S.B., Nguyen, L., Schwartz, K., Lawrence, D.A., Schwartz, B.S., 2016. Neuroserpin Differentiates Between Forms of Tissue Type Plasminogen Activator via pH Dependent Deacylation. *Front Cell Neurosci* 10, 154. <https://doi.org/10.3389/fncel.2016.00154>
- Carmeliet, P., Schoonjans, L., Kieckens, L., Ream, B., Degen, J., Bronson, R., De Vos, R., van den Oord, J.J., Collen, D., Mulligan, R.C., 1994. Physiological consequences of loss of plasminogen activator gene function in mice. *Nature* 368, 419–424. <https://doi.org/10.1038/368419a0>
- Caron, E., Sachot, C., Prevot, V., Bouret, S.G., 2010. Distribution of leptin-sensitive cells in the postnatal and adult mouse brain. *Journal of Comparative Neurology* 518, 459–476. <https://doi.org/10.1002/cne.22219>
- Cassé, F., Bardou, I., Danglot, L., Briens, A., Montagne, A., Parcq, J., Alahari, A., Galli, T., Vivien, D., Docagne, F., 2012. Glutamate controls tPA recycling by astrocytes, which in turn influences glutamatergic signals. *J Neurosci* 32, 5186–5199. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.5296-11.2012>
- Chaker, Z., George, C., Petrovska, M., Caron, J.-B., Lacube, P., Caillé, I., Holzenberger, M., 2016. Hypothalamic neurogenesis persists in the aging brain and is controlled by energy-sensing IGF-I pathway. *Neurobiology of Aging* 41, 64–72. <https://doi.org/10.1016/j.neurobiolaging.2016.02.008>
- Changes in lipogenesis during refeeding of fasted mice, 1969. . *Nutrition Reviews* 27, 56–59. <https://doi.org/10.1111/j.1753-4887.1969.tb04958.x>
- Chaplin, D.D., 2010. Overview of the Immune Response. *J Allergy Clin Immunol* 125, S3-23. <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2009.12.980>
- Chapman, M.R., Vause, H.E., 2011. Anti-NMDA receptor encephalitis: diagnosis, psychiatric presentation, and treatment. *Am J Psychiatry* 168, 245–251. <https://doi.org/10.1176/appi.ajp.2010.10020181>
- Chefdeville, A., Treilleux, I., Mayeur, M.-E., Couillault, C., Picard, G., Bost, C., Mokhtari, K., Vasiljevic, A., Meyronet, D., Rogemond, V., Psimaras, D., Dubois, B., Honnorat, J., Desestret, V., 2019. Immunopathological characterization of ovarian teratomas associated with anti-N-methyl-D-aspartate receptor encephalitis. *Acta Neuropathol Commun* 7, 38. <https://doi.org/10.1186/s40478-019-0693-7>

- Cheng, C., Chu, J., Chow, B., 2009. Vasopressin-independent mechanisms in controlling water homeostasis. *Journal of molecular endocrinology* 43, 81–92. <https://doi.org/10.1677/JME-08-0123>
- Christ-Crain, M., Fenske, W., 2016. Copeptin in the diagnosis of vasopressin-dependent disorders of fluid homeostasis. *Nat Rev Endocrinol* 12, 168–176. <https://doi.org/10.1038/nrendo.2015.224>
- Chu, P., Chen, E., Bajnath, A., Brumberg, J.C., 2015. Cell type specificity of tissue plasminogen activator in the mouse barrel cortex. *Data Brief* 4, 332–335. <https://doi.org/10.1016/j.dib.2015.06.008>
- Ciofi, P., 2011. The arcuate nucleus as a circumventricular organ in the mouse. *Neuroscience Letters* 487, 187–190. <https://doi.org/10.1016/j.neulet.2010.10.019>
- Citri, A., Malenka, R.C., 2008. Synaptic plasticity: multiple forms, functions, and mechanisms. *Neuropsychopharmacology* 33, 18–41. <https://doi.org/10.1038/sj.npp.1301559>
- Clayton, R.W., Lovell-Badge, R., Galichet, C., 2022. The Properties and Functions of Glial Cell Types of the Hypothalamic Median Eminence. *Frontiers in Endocrinology* 13.
- Clements, J.D., Westbrook, G.L., 1991. Activation kinetics reveal the number of glutamate and glycine binding sites on the N-methyl-d-aspartate receptor. *Neuron* 7, 605–613. [https://doi.org/10.1016/0896-6273\(91\)90373-8](https://doi.org/10.1016/0896-6273(91)90373-8)
- Coccorello, R., Maccarrone, M., 2018. Hedonic Eating and the “Delicious Circle”: From Lipid-Derived Mediators to Brain Dopamine and Back. *Frontiers in Neuroscience* 12.
- Cohn, D.V., MacGregor, R.R., 1981. The biosynthesis, intracellular processing, and secretion of parathormone. *Endocr Rev* 2, 1–26. <https://doi.org/10.1210/edrv-2-1-1>
- Collden, G., Balland, E., Parkash, J., Caron, E., Langlet, F., Prevot, V., Bouret, S.G., 2014. Neonatal overnutrition causes early alterations in the central response to peripheral ghrelin. *Mol Metab* 4, 15–24. <https://doi.org/10.1016/j.molmet.2014.10.003>
- Collen, D., Lijnen, H.R., 1991. Basic and clinical aspects of fibrinolysis and thrombolysis. *Blood* 78, 3114–3124.
- Consalez, G., Hawkes, R., 2013. The compartmental restriction of cerebellar interneurons. *Frontiers in neural circuits* 6. <https://doi.org/10.3389/fncir.2012.00123>
- Constantinescu, C.S., Hilliard, B.A., 2005. Adjuvants in EAE, in: Lavi, E., Constantinescu, C.S. (Eds.), *Experimental Models of Multiple Sclerosis*. Springer US, Boston, MA, pp. 73–84. [https://doi.org/10.1007/0-387-25518-4\\_5](https://doi.org/10.1007/0-387-25518-4_5)
- Correa, F., Gauberti, M., Parcq, J., Macrez, R., Hommet, Y., Obiang, P., Hernangómez, M., Montagne, A., Liot, G., Guaza, C., Maubert, E., Ali, C., Vivien, D., Docagne, F., 2011. Tissue plasminogen activator prevents white matter damage following stroke. *The Journal of Experimental Medicine* 208, 1229. <https://doi.org/10.1084/jem.20101880>
- Cowley, A.W., Barber, W.J., Lombard, J.H., Osborn, J.L., Liard, J.F., 1986. Relationship between body fluid volumes and arterial pressure. *Fed Proc* 45, 2864–2870.
- Cuzzo, B., Padala, S.A., Lappin, S.L., 2022. Physiology, Vasopressin, in: *StatPearls*. StatPearls Publishing, Treasure Island (FL).

- Dalmau, J., Armangué, T., Planagumà, J., Radosevic, M., Mannara, F., Leypoldt, F., Geis, C., Lancaster, E., Titulaer, M.J., Rosenfeld, M.R., Graus, F., 2019. An update on anti-NMDA receptor encephalitis for neurologists and psychiatrists: mechanisms and models. *The Lancet Neurology* 18, 1045–1057. [https://doi.org/10.1016/S1474-4422\(19\)30244-3](https://doi.org/10.1016/S1474-4422(19)30244-3)
- Dalmau, J., Geis, C., Graus, F., 2017. Autoantibodies to Synaptic Receptors and Neuronal Cell Surface Proteins in Autoimmune Diseases of the Central Nervous System. *Physiol Rev* 97, 839–887. <https://doi.org/10.1152/physrev.00010.2016>
- Dalmau, J., Gleichman, A.J., Hughes, E.G., Rossi, J.E., Peng, X., Lai, M., Dessain, S.K., Rosenfeld, M.R., Balice-Gordon, R., Lynch, D.R., 2008a. Anti-NMDA-receptor encephalitis: case series and analysis of the effects of antibodies. *Lancet Neurol* 7, 1091–1098. [https://doi.org/10.1016/S1474-4422\(08\)70224-2](https://doi.org/10.1016/S1474-4422(08)70224-2)
- Dalmau, J., Lancaster, E., Martinez-Hernandez, E., Rosenfeld, M.R., Balice-Gordon, R., 2011. Clinical experience and laboratory investigations in patients with anti-NMDAR encephalitis. *Lancet Neurol* 10, 63–74. [https://doi.org/10.1016/S1474-4422\(10\)70253-2](https://doi.org/10.1016/S1474-4422(10)70253-2)
- Dalmau, J., Tüzün, E., Wu, H., Masjuan, J., Rossi, J.E., Voloschin, A., Baehring, J.M., Shimazaki, H., Koide, R., King, D., Mason, W., Sansing, L.H., Dichter, M.A., Rosenfeld, M.R., Lynch, D.R., 2008b. Paraneoplastic Anti-N-methyl-D-aspartate Receptor Encephalitis Associated with Ovarian Teratoma 17.
- Dalmau, J., Tüzün, E., Wu, H., Masjuan, J., Rossi, J.E., Voloschin, A., Baehring, J.M., Shimazaki, H., Koide, R., King, D., Mason, W., Sansing, L.H., Dichter, M.A., Rosenfeld, M.R., Lynch, D.R., 2007. Paraneoplastic anti-N-methyl-D-aspartate receptor encephalitis associated with ovarian teratoma. *Ann. Neurol.* 61, 25–36. <https://doi.org/10.1002/ana.21050>
- Dalva, M.B., Takasu, M.A., Lin, M.Z., Shamah, S.M., Hu, L., Gale, N.W., Greenberg, M.E., 2000. EphB Receptors Interact with NMDA Receptors and Regulate Excitatory Synapse Formation. *Cell* 103, 945–956. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(00\)00197-5](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(00)00197-5)
- Daneman, R., Prat, A., 2015. The Blood–Brain Barrier. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 7, a020412. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a020412>
- Danziger, J., Zeidel, M.L., 2015. Osmotic Homeostasis. *Clin J Am Soc Nephrol* 10, 852–862. <https://doi.org/10.2215/CJN.10741013>
- de Almeida, L.F., Coimbra, T.M., 2019. When Less or More Isn't Enough: Renal Maldevelopment Arising From Disequilibrium in the Renin-Angiotensin System. *Frontiers in Pediatrics* 7.
- de Bruijn, M.A.A.M., Aarsen, F.K., van Oosterhout, M.P., van der Knoop, M.M., Catsman-Berrevoets, C.E., Schreurs, M.W.J., Bastiaansen, D.E.M., Sillevius Smitt, P.A.E., Neuteboom, R.F., Titulaer, M.J., 2018. Long-term neuropsychological outcome following pediatric anti-NMDAR encephalitis. *Neurology* 90, e1997–e2005. <https://doi.org/10.1212/WNL.0000000000005605>
- de Luca, C., Kowalski, T.J., Zhang, Y., Elmquist, J.K., Lee, C., Kilimann, M.W., Ludwig, T., Liu, S.-M., Chua, S.C., 2005. Complete rescue of obesity, diabetes, and infertility in db/db mice by neuron-specific LEPR-B transgenes. *J Clin Invest* 115, 3484–3493. <https://doi.org/10.1172/JCI24059>

- Deakin, J., Lennox, B.R., Zandi, M.S., 2014. Antibodies to the N-Methyl-D-Aspartate Receptor and Other Synaptic Proteins in Psychosis. *Biological Psychiatry, Neuroimmune Mechanisms Related to Psychosis* 75, 284–291. <https://doi.org/10.1016/j.biopsych.2013.07.018>
- Deng, G., Morselli, L.L., Wagner, V.A., Balapattabi, K., Sapouckey, S.A., Knudtson, K.L., Rahmouni, K., Cui, H., Sigmund, C.D., Kwitek, A.E., Grobe, J.L., 2020. Single-nucleus RNA sequencing of the hypothalamic arcuate nucleus of C57BL/6J mice after prolonged diet-induced obesity. *Hypertension* 76, 589–597. <https://doi.org/10.1161/HYPERTENSIONAHA.120.15137>
- Devries, G., 2008. Sex differences in vasopressin and oxytocin innervation of the brain, in: *Progress in Brain Research*. Elsevier, pp. 17–27. [https://doi.org/10.1016/S0079-6123\(08\)00402-0](https://doi.org/10.1016/S0079-6123(08)00402-0)
- Dhossche, D.M., Wachtel, L.E., 2010. Catatonia is Hidden in Plain Sight Among Different Pediatric Disorders: A Review Article. *Pediatric Neurology* 43, 307–315. <https://doi.org/10.1016/j.pediatrneurol.2010.07.001>
- Diamond, S.L., Eskin, S.G., McIntire, L.V., 1989. Fluid flow stimulates tissue plasminogen activator secretion by cultured human endothelial cells. *Science* 243, 1483–1485. <https://doi.org/10.1126/science.2467379>
- Digby, S., Chadwick, M., Blache, D., 2011. Salt intake and reproductive function in sheep. *Animal: an international journal of animal bioscience* 5, 1207–16. <https://doi.org/10.1017/S1751731111000152>
- Ding, Y., Zhou, Z., Chen, J., Peng, Y., Wang, Haitao, Qiu, W., Xie, W., Zhang, J., Wang, Honghao, 2021. Anti-NMDAR encephalitis induced in mice by active immunization with a peptide from the amino-terminal domain of the GluN1 subunit. *J Neuroinflammation* 18, 53. <https://doi.org/10.1186/s12974-021-02107-0>
- Docagne, F., Nicole, O., Marti, H.H., MacKenzie, E.T., Buisson, A., Vivien, D., 1999. Transforming growth factor-beta1 as a regulator of the serpins/t-PA axis in cerebral ischemia. *FASEB J* 13, 1315–1324. <https://doi.org/10.1096/fasebj.13.11.1315>
- Donato, V., Lacquaniti, A., Cernaro, V., Lorenzano, G., Trimboli, D., Buemi, A., Lupica, R., Buemi, M., 2014. From Water to Aquaretics: a Legendary Route. *CPB* 33, 1369–1388. <https://doi.org/10.1159/000358704>
- Douceau, S., 2020. Implication du tPA cérébral dans la régulation des comportements et le remodelage des perineuronal nets (phdthesis). Normandie Université.
- Douceau, S., Lemarchand, E., Hommet, Y., Lebouvier, L., Joséphine, C., Bemelmans, A.-P., Maubert, E., Agin, V., Vivien, D., 2022. PKC $\delta$ -positive GABAergic neurons in the central amygdala exhibit tissue-type plasminogen activator: role in the control of anxiety. *Mol Psychiatry* 27, 2197–2205. <https://doi.org/10.1038/s41380-022-01455-4>
- Dowben, J.S., Kowalski, P.C., Keltner, N.L., 2015. Biological Perspectives. *Perspectives in Psychiatric Care* 51, 236–240. <https://doi.org/10.1111/ppc.12132>
- Doyle, M., Kiebler, M.A., 2011. Mechanisms of dendritic mRNA transport and its role in synaptic tagging. *EMBO J* 30, 3540–3552. <https://doi.org/10.1038/emboj.2011.278>

- Dunn, F.L., Brennan, T.J., Nelson, A.E., Robertson, G.L., 1973. The Role of Blood Osmolality and Volume in Regulating Vasopressin Secretion in the Rat. *J Clin Invest* 52, 3212–3219.
- Duquenne, M., Folgueira, C., Bourouh, C., Millet, M., Silva, A., Clasadonte, J., Imbernon, M., Fernandois, D., Martinez-Corral, I., Kusumakshi, S., Caron, E., Rasika, S., Deliglia, E., Jouy, N., Oishi, A., Mazzone, M., Trinquet, E., Tavernier, J., Kim, Y.-B., Ory, S., Jockers, R., Schwaninger, M., Boehm, U., Nogueiras, R., Annicotte, J.-S., Gasman, S., Dam, J., Prévot, V., 2021. Leptin brain entry via a tanycytic LepR:EGFR shuttle controls lipid metabolism and pancreas function. *Nat Metab* 3, 1071–1090. <https://doi.org/10.1038/s42255-021-00432-5>
- Eichele, G., Bodenschatz, E., Ditte, Z., Günther, A.-K., Kapoor, S., Wang, Y., Westendorf, C., 2020. Cilia-driven flows in the brain third ventricle. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 375, 20190154. <https://doi.org/10.1098/rstb.2019.0154>
- Elizondo, R., Cortés-Campos, C., Barahona, M., Oyarce, K., Carril, C., Garcia-Robles, M., 2015. The role of tanycytes in hypothalamic glucosensing. *Journal of cellular and molecular medicine* 19. <https://doi.org/10.1111/jcmm.12590>
- Elizondo-Vega, R., Cortés-Campos, C., Barahona, M.J., Carril, C., Ordenes, P., Salgado, M., Oyarce, K., García-Robles, M. de los A., 2016. Inhibition of hypothalamic MCT1 expression increases food intake and alters orexigenic and anorexigenic neuropeptide expression. *Sci Rep* 6, 33606. <https://doi.org/10.1038/srep33606>
- Elizondo-Vega, R.J., Recabal, A., Oyarce, K., 2019. Nutrient Sensing by Hypothalamic Tanycytes. *Front Endocrinol (Lausanne)* 10, 244. <https://doi.org/10.3389/fendo.2019.00244>
- Enriori, P.J., Sinnayah, P., Simonds, S.E., Rudaz, C.G., Cowley, M.A., 2011. Leptin action in the dorsomedial hypothalamus increases sympathetic tone to brown adipose tissue in spite of systemic leptin resistance. *Journal of Neuroscience* 31, 12189–12197. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.2336-11.2011>
- Erreger, K., Geballe, M.T., Kristensen, A., Chen, P.E., Hansen, K.B., Lee, C.J., Yuan, H., Le, P., Lyuboslavsky, P.N., Micale, N., Jørgensen, L., Clausen, R.P., Wyllie, D.J.A., Snyder, J.P., Traynelis, S.F., 2007. Subunit-specific agonist activity at NR2A-, NR2B-, NR2C-, and NR2D-containing N-methyl-D-aspartate glutamate receptors. *Mol Pharmacol* 72, 907–920. <https://doi.org/10.1124/mol.107.037333>
- Farina, A.N., Blain, K.Y., Maruo, T., Kwiatkowski, W., Choe, S., Nakagawa, T., 2011. Separation of Domain Contacts Is Required for Heterotetrameric Assembly of Functional NMDA Receptors. *J Neurosci* 31, 3565–3579. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.6041-10.2011>
- Farkas, E., Varga, E., Kovács, B., Szilvásy-Szabó, A., Cote-Vélez, A., Péterfi, Z., Matziari, M., Tóth, M., Zelena, D., Mezriczky, Z., Kádár, A., Kővári, D., Watanabe, M., Kano, M., Mackie, K., Rózsa, B., Ruska, Y., Tóth, B., Máté, Z., Erdélyi, F., Szabó, G., Gereben, B., Lechan, R.M., Charli, J.-L., Joseph-Bravo, P., Fekete, C., 2020. A Glial-Neuronal Circuit in the Median Eminence Regulates Thyrotropin-Releasing Hormone-Release via the Endocannabinoid System. *iScience* 23, 100921. <https://doi.org/10.1016/j.isci.2020.100921>
- Fenton, R.A., 2009. Essential role of vasopressin-regulated urea transport processes in the mammalian kidney. *Pflugers Arch* 458, 169–177. <https://doi.org/10.1007/s00424-008-0612-4>



- Férraille, E., Mordasini, D., Gonin, S., Deschênes, G., Vinciguerra, M., Doucet, A., Vandewalle, A., Summa, V., Verrey, F., Martin, P.-Y., 2003. Mechanism of control of Na,K-ATPase in principal cells of the mammalian collecting duct. *Ann N Y Acad Sci* 986, 570–578. <https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.2003.tb07255.x>
- Feroli, S., Dalmau, J., Kobet, C.A., Zhai, Q.J., Broderick, J.P., Espay, A.J., 2010. Anti-N-methyl-D-aspartate Receptor Encephalitis. *Arch Neurol* 67, 250–251. <https://doi.org/10.1001/archneurol.2009.317>
- Fink, M., Taylor, M.A., 2009. The Catatonia Syndrome: Forgotten but Not Gone. *Archives of General Psychiatry* 66, 1173–1177. <https://doi.org/10.1001/archgenpsychiatry.2009.141>
- Flavin, M.P., Zhao, G., Ho, L.T., 2000. Microglial tissue plasminogen activator (tPA) triggers neuronal apoptosis in vitro. *Glia* 29, 347–354.
- Florence, N.R., Davis, R.L., Lam, C., Szperka, C., Zhou, L., Ahmad, S., Campen, C.J., Moss, H., Peter, N., Gleichman, A.J., Glaser, C.A., Lynch, D.R., Rosenfeld, M.R., Dalmau, J., 2009. Anti-N-Methyl-D-Aspartate Receptor (NMDAR) Encephalitis in Children and Adolescents. *Ann Neurol* 66, 11–18. <https://doi.org/10.1002/ana.21756>
- Foster, R.H., MacFarlane, C.H., Bustamante, M.O., 1997. Recent progress in understanding aldosterone secretion. *Gen Pharmacol* 28, 647–651. [https://doi.org/10.1016/s0306-3623\(96\)00290-x](https://doi.org/10.1016/s0306-3623(96)00290-x)
- Fountain, J.H., Lappin, S.L., 2022. Physiology, Renin Angiotensin System, in: StatPearls. StatPearls Publishing, Treasure Island (FL).
- Frayling, C., Britton, R., Dale, N., 2011. ATP-mediated glucosensing by hypothalamic tanycytes. *J Physiol* 589, 2275–2286. <https://doi.org/10.1113/jphysiol.2010.202051>
- Fredriksson, L., Li, H., Fieber, C., Li, X., Eriksson, U., 2004. Tissue plasminogen activator is a potent activator of PDGF-CC. *EMBO J* 23, 3793–3802. <https://doi.org/10.1038/sj.emboj.7600397>
- Fredriksson, L., Stevenson, T.K., Su, E.J., Ragsdale, M., Moore, S., Craciun, S., Schielke, G.P., Murphy, G.G., Lawrence, D.A., 2015. Identification of a neurovascular signaling pathway regulating seizures in mice. *Ann Clin Transl Neurol* 2, 722–738. <https://doi.org/10.1002/acn3.209>
- Friedman, G.C., Seeds, N.W., 1995. Tissue plasminogen activator mRNA expression in granule neurons coincides with their migration in the developing cerebellum. *J Comp Neurol* 360, 658–670. <https://doi.org/10.1002/cne.903600410>
- Fyhrquist, F., Eriksson, L., Wallenius, M., 1979. Plasma vasopressin in conscious goats after cerebroventricular infusions of angiotensins, sodium chloride, and fructose. *Endocrinology* 104, 1091–1095. <https://doi.org/10.1210/endo-104-4-1091>
- Gable, M.S., Gavali, S., Radner, A., Tilley, D.H., Lee, B., Dwyer, L., Collins, A., Dengel, A., Dalmau, J., Glaser, C.A., 2009. Anti-NMDA receptor encephalitis: report of ten cases and comparison with viral encephalitis. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 28, 1421–1429. <https://doi.org/10.1007/s10096-009-0799-0>
- García-Cáceres, C., Balland, E., Prevot, V., Luquet, S., Woods, S.C., Koch, M., Horvath, T.L., Yi, C.-X., Chowen, J.A., Verkhatsky, A., Araque, A., Bechmann, I., Tschöp, M.H., 2019. Role

- of astrocytes, microglia, and tanycytes in brain control of systemic metabolism. *Nat Neurosci* 22, 7–14. <https://doi.org/10.1038/s41593-018-0286-y>
- Gebbink, M.F.B.G., 2011. Tissue-type plasminogen activator-mediated plasminogen activation and contact activation, implications in and beyond haemostasis. *J Thromb Haemost* 9 Suppl 1, 174–181. <https://doi.org/10.1111/j.1538-7836.2011.04278.x>
- Geisler, C.E., Hepler, C., Higgins, M.R., Renquist, B.J., 2016. Hepatic adaptations to maintain metabolic homeostasis in response to fasting and refeeding in mice. *Nutr Metab (Lond)* 13, 62. <https://doi.org/10.1186/s12986-016-0122-x>
- George, G.C.W., 1981. Anorexia nervosa with herpes simplex encephalitis. *Postgrad Med J* 57, 366–367.
- Giacobini, P., Parkash, J., Campagne, C., Messina, A., Casoni, F., Vanacker, C., Langlet, F., Hobo, B., Cagnoni, G., Gallet, S., Hanchate, N.K., Mazur, D., Taniguchi, M., Mazzone, M., Verhaagen, J., Ciofi, P., Bouret, S.G., Tamagnone, L., Prevot, V., 2014. Brain Endothelial Cells Control Fertility through Ovarian-Steroid-Dependent Release of Semaphorin 3A. *PLoS Biol* 12, e1001808. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.1001808>
- Giau, R., Carrette, J., Bockaert, J., 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. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.2430-05.2005>
- Gibson, L.L., Pollak, T.A., Blackman, G., Thornton, M., Moran, N., David, A.S., 2019. The Psychiatric Phenotype of Anti-NMDA Receptor Encephalitis. *JNP* 31, 70–79. <https://doi.org/10.1176/appi.neuropsych.17120343>
- Gillinder, L., Warren, N., Hartel, G., Dionisio, S., O’Gorman, C., 2019. EEG findings in NMDA encephalitis – A systematic review. *Seizure* 65, 20–24. <https://doi.org/10.1016/j.seizure.2018.12.015>
- Gleichman, A.J., Spruce, L.A., Dalmau, J., Seeholzer, S.H., Lynch, D.R., 2012. Anti-NMDA Receptor Encephalitis Antibody Binding Is Dependent on Amino Acid Identity of a Small Region Within the GluN1 Amino Terminal Domain. *J Neurosci* 32, 11082–11094. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.0064-12.2012>
- Gonzalez, A.A., Salinas-Parra, N., Cifuentes-Araneda, F., Reyes-Martinez, C., 2020. Chapter Eight - Vasopressin actions in the kidney renin angiotensin system and its role in hypertension and renal disease, in: Litwack, G. (Ed.), *Vitamins and Hormones, Vasopressin*. Academic Press, pp. 217–238. <https://doi.org/10.1016/bs.vh.2019.09.003>
- Granelli-Piperno, A., Reich, E., 1983. Plasminogen activators of the pituitary gland: enzyme characterization and hormonal modulation. *J Cell Biol* 97, 1029–1037.
- Graus, F., Titulaer, M.J., Balu, R., Benseler, S., Bien, C.G., Cellucci, T., Cortese, I., Dale, R.C., Gelfand, J.M., Geschwind, M., Glaser, C.A., Honnorat, J., Höftberger, R., Iizuka, T., Irani, S.R., Lancaster, E., Leypoldt, F., Prüss, H., Rae-Grant, A., Reindl, M., Rosenfeld, M.R., Rostásy, K., Saiz, A., Venkatesan, A., Vincent, A., Wandinger, K.-P., Waters, P., Dalmau, J., 2016. A clinical approach to diagnosis of autoimmune encephalitis. *Lancet Neurol* 15, 391–404. [https://doi.org/10.1016/S1474-4422\(15\)00401-9](https://doi.org/10.1016/S1474-4422(15)00401-9)

- Gresa-Arribas, N., Titulaer, M.J., Torrents, A., Aguilar, E., McCracken, L., Leypoldt, F., Gleichman, A.J., Balice-Gordon, R., Rosenfeld, M.R., Lynch, D., Graus, F., Dalmau, J., 2014. Diagnosis and significance of antibody titers in anti-NMDA receptor encephalitis, a retrospective study. *Lancet Neurol* 13, 167–177. [https://doi.org/10.1016/S1474-4422\(13\)70282-5](https://doi.org/10.1016/S1474-4422(13)70282-5)
- Gropp, E., Shanabrough, M., Borok, E., Xu, A.W., Janoschek, R., Buch, T., Plum, L., Balthasar, N., Hampel, B., Waisman, A., Barsh, G.S., Horvath, T.L., Brüning, J.C., 2005. Agouti-related peptide-expressing neurons are mandatory for feeding. *Nat Neurosci* 8, 1289–1291. <https://doi.org/10.1038/nn1548>
- Gross, P.M., Weindl, A., Knigge, K.M., 1987. Peering through the Windows of the Brain. *J Cereb Blood Flow Metab* 7, 663–672. <https://doi.org/10.1038/jcbfm.1987.120>
- Hahn, R.G., 2021. Effects of diet, habitual water intake and increased hydration on body fluid volumes and urinary analysis of renal fluid retention in healthy volunteers. *Eur J Nutr* 60, 691–702. <https://doi.org/10.1007/s00394-020-02275-4>
- Hajjar, K.A., Jacovina, A.T., Chacko, J., 1994. An endothelial cell receptor for plasminogen/tissue plasminogen activator. I. Identity with annexin II. *J Biol Chem* 269, 21191–21197.
- Hajjar, K.A., Reynolds, C.M., 1994. alpha-Fucose-mediated binding and degradation of tissue-type plasminogen activator by HepG2 cells. *J Clin Invest* 93, 703–710. <https://doi.org/10.1172/JCI117023>
- Hamon, F., Masson-Lunven, C., Boutière, B., Boyer-Neumann, C., Larrieu, M.J., Anglés-Cano, E., 1990. Factors affecting the stability of tPA and PAI-1 during storage and handling of human plasma for in vitro studies: implications in the determination of tPA and PAI-1 activities. *Blood Coagul Fibrinolysis* 1, 393–399. <https://doi.org/10.1097/00001721-199010000-00007>
- Hansen, K.B., Yi, F., Perszyk, R.E., Furukawa, H., Wollmuth, L.P., Gibb, A.J., Traynelis, S.F., 2018. Structure, function, and allosteric modulation of NMDA receptors. *J Gen Physiol* 150, 1081–1105. <https://doi.org/10.1085/jgp.201812032>
- Hardingham, G.E., Bading, H., 2010. Synaptic versus extrasynaptic NMDA receptor signalling: implications for neurodegenerative disorders. *Nat Rev Neurosci* 11, 682–696. <https://doi.org/10.1038/nrn2911>
- Haspel, J.A., Anafi, R., Brown, M.K., Cermakian, N., Depner, C., Desplats, P., Gelman, A.E., Haack, M., Jelic, S., Kim, B.S., Laposky, A.D., Lee, Y.C., Mongodin, E., Prather, A.A., Prendergast, B.J., Reardon, C., Shaw, A.C., Sengupta, S., Szentirmai, É., Thakkar, M., Walker, W.E., Solt, L.A., 2020. Perfect timing: circadian rhythms, sleep, and immunity — an NIH workshop summary. *JCI Insight* 5. <https://doi.org/10.1172/jci.insight.131487>
- Heldmaier, G., Ortmann, S., Elvert, R., 2004. Natural hypometabolism during hibernation and daily torpor in mammals. *Respiratory Physiology & Neurobiology, Hypoxic Hypometabolism* 141, 317–329. <https://doi.org/10.1016/j.resp.2004.03.014>
- Hélie, P., Camacho-Toledano, C., Leseq, L., Célia, S., Miralles, A., Ortega, M., Guérit, S., Lebas, H., Bardou, I., Vila del Sol, V., Vivien, D., Le Mauff, B., Clemente, D., Docagne, F., TOUTIRAIS, O., 2021. Tissue plasminogen activator worsens experimental autoimmune

- encephalomyelitis by complementary actions on lymphoid and myeloid cell responses. *Journal of Neuroinflammation* 18. <https://doi.org/10.1186/s12974-021-02102-5>
- Heng, K.Y.C., Lee, J.H., Thomas, T., 2021. Anti-N-Methyl-D-aspartate receptor encephalitis masquerading as fever of unknown origin. *Clinical Case Reports* 9, 2323–2327. <https://doi.org/10.1002/ccr3.4025>
- Henry, B.A., Clarke, I.J., 2008. Adipose Tissue Hormones and the Regulation of Food Intake. *Journal of Neuroendocrinology* 20, 842–849. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2826.2008.1730.x>
- Henson, M.A., Roberts, A.C., Pérez-Otaño, I., Philpot, B.D., 2010. Influence of the NR3A subunit on NMDA receptor functions. *Prog Neurobiol* 91, 23–37. <https://doi.org/10.1016/j.pneurobio.2010.01.004>
- Hino, H., Akiyama, H., Iseki, E., Kato, M., Kondo, H., Ikeda, K., Kosaka, K., 2001. Immunohistochemical localization of plasminogen activator inhibitor-1 in rat and human brain tissues. *Neurosci Lett* 297, 105–108. [https://doi.org/10.1016/s0304-3940\(00\)01679-7](https://doi.org/10.1016/s0304-3940(00)01679-7)
- Hitrec, T., Luppi, M., Bastianini, S., Squarcio, F., Berteotti, C., Lo Martire, V., Martelli, D., Occhignegro, A., Tupone, D., Zoccoli, G., Amici, R., Cerri, M., 2019. Neural control of fasting-induced torpor in mice. *Sci Rep* 9, 15462. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-51841-2>
- Hjalmarsson, A., Blomqvist, P., Sköldenberg, B., 2007. Herpes Simplex Encephalitis in Sweden, 1990–2001: Incidence, Morbidity, and Mortality. *Clinical Infectious Diseases* 45, 875–880. <https://doi.org/10.1086/521262>
- Ho, A.W.-C., Birmingham, C.L., 2001. Anorexia nervosa remission during an episode of encephalitis. *International Journal of Eating Disorders* 29, 97–99. [https://doi.org/10.1002/1098-108X\(200101\)29:1<97::AID-EAT17>3.0.CO;2-2](https://doi.org/10.1002/1098-108X(200101)29:1<97::AID-EAT17>3.0.CO;2-2)
- Hogan-Cann, A.D., Anderson, C.M., 2016. Physiological Roles of Non-Neuronal NMDA Receptors. *Trends in Pharmacological Sciences* 37, 750–767. <https://doi.org/10.1016/j.tips.2016.05.012>
- Hogan-Cann, A.D., Lu, P., Anderson, C.M., 2019. Endothelial NMDA receptors mediate activity-dependent brain hemodynamic responses in mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 116, 10229–10231. <https://doi.org/10.1073/pnas.1902647116>
- Holbein, W.W., Bardgett, M.E., Toney, G.M., 2014. Blood pressure is maintained during dehydration by hypothalamic paraventricular nucleus-driven tonic sympathetic nerve activity. *J Physiol* 592, 3783–3799. <https://doi.org/10.1113/jphysiol.2014.276261>
- Hopkins, M., Blundell, J., Halford, J., King, N., Finlayson, G., 2016. The Regulation of Food Intake in Humans, Endotext [Internet]. MDText.com, Inc.
- Horstmann, E., 1954. [The fiber glia of selacean brain]. *Z Zellforsch Mikrosk Anat* 39, 588–617.
- Hoylaerts, M., Rijken, D.C., Lijnen, H.R., Collen, D., 1982. Kinetics of the activation of plasminogen by human tissue plasminogen activator. Role of fibrin. *J Biol Chem* 257, 2912–2919.
- Huang, Y.Y., Bach, M.E., Lipp, H.P., Zhuo, M., Wolfer, D.P., Hawkins, R.D., Schoonjans, L., Kandel, E.R., Godfraind, J.M., Mulligan, R., Collen, D., Carmeliet, P., 1996. Mice lacking

- the gene encoding tissue-type plasminogen activator show a selective interference with late-phase long-term potentiation in both Schaffer collateral and mossy fiber pathways. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93, 8699–8704. <https://doi.org/10.1073/pnas.93.16.8699>
- Hughes, E.G., Peng, X., Gleichman, A.J., Lai, M., Zhou, L., Tsou, R., Parsons, T.D., Lynch, D.R., Dalmau, J., Balice-Gordon, R.J., 2010. Cellular and Synaptic Mechanisms of Anti-NMDA Receptor Encephalitis. *J Neurosci* 30, 5866–5875. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.0167-10.2010>
- Hui, C., Khan, M., Radbel, J.M., 2022. Diabetes Insipidus, in: StatPearls. StatPearls Publishing, Treasure Island (FL).
- Hurtado, M., Lozano, J.J., Castellanos, E., López-Fernández, L.A., Harshman, K., Martínez-A, C., Ortiz, A.R., Thomson, T.M., Paciucci, R., 2007. Activation of the epidermal growth factor signalling pathway by tissue plasminogen activator in pancreas cancer cells. *Gut* 56, 1266–1274. <https://doi.org/10.1136/gut.2006.097188>
- Hussain, B., Fang, C., Huang, X., Feng, Z., Yao, Y., Wang, Y., Chang, J., 2022. Endothelial  $\beta$ -Catenin Deficiency Causes Blood-Brain Barrier Breakdown via Enhancing the Paracellular and Transcellular Permeability. *Front Mol Neurosci* 15, 895429. <https://doi.org/10.3389/fnmol.2022.895429>
- Imamura, Y., Morita, S., Nakatani, Y., Okada, K., Ueshima, S., Matsuo, O., Miyata, S., 2010. Tissue plasminogen activator and plasminogen are critical for osmotic homeostasis by regulating vasopressin secretion. *Journal of Neuroscience Research* 88, 1995–2006. <https://doi.org/10.1002/jnr.22370>
- Irahara, T., Sato, N., Otake, K., Matsumura, S., Inoue, K., Ishihara, K., Fushiki, T., Yokota, H., 2018. Alterations in energy substrate metabolism in mice with different degrees of sepsis. *Journal of Surgical Research* 227, 44–51. <https://doi.org/10.1016/j.jss.2018.01.021>
- Irani, S.R., Bera, K., Waters, P., Zuliani, L., Maxwell, S., Zandi, M.S., Friese, M.A., Galea, I., Kullmann, D.M., Beeson, D., Lang, B., Bien, C.G., Vincent, A., 2010. N-methyl-d-aspartate antibody encephalitis: temporal progression of clinical and paraclinical observations in a predominantly non-paraneoplastic disorder of both sexes. *Brain* 133, 1655–1667. <https://doi.org/10.1093/brain/awq113>
- Ishiura, H., Matsuda, S., Higashihara, M., Hasegawa, M., Hida, A., Hanajima, R., Yamamoto, T., Shimizu, J., Dalmau, J., Tsuji, S., 2008. Response of Anti-Nmda Receptor Encephalitis Without Tumor to Immunotherapy Including Rituximab. *Neurology* 71, 1921–1923. <https://doi.org/10.1212/01.wnl.0000336648.43562.59>
- Ito, T., Takenaka, K., Sakai, H., Yoshimura, S., Hayashi, K., Noda, S., Sakai, N., 2000. Elevation of mRNA levels of tissue-type plasminogen activator and urokinase-type plasminogen activator in hippocampus and cerebral cortex following middle cerebral artery occlusion in rats. *Neurol Res* 22, 413–419. <https://doi.org/10.1080/01616412.2000.11740693>
- Itoh, M., Furuse, M., Morita, K., Kubota, K., Saitou, M., Tsukita, S., 1999. Direct binding of three tight junction-associated MAGUKs, ZO-1, ZO-2, and ZO-3, with the COOH termini of claudins. *Journal of Cell Biology* 147, 1351–1363. <https://doi.org/10.1083/jcb.147.6.1351>
- Janas, S., Seghers, F., Schakman, O., Alsady, M., Deen, P., Vriens, J., Tissir, F., Nilius, B., Loffing, J., Gailly, P., Devuyst, O., 2016. TRPV4 is associated with central rather than nephrogenic

- osmoregulation. *Pflügers Archiv - European Journal of Physiology* 468. <https://doi.org/10.1007/s00424-016-1850-5>
- Jensen, T., Kiersgaard, M., Sørensen, D., Mikkelsen, L., 2013. Fasting of mice: a review. *Lab Anim* 47, 225–240. <https://doi.org/10.1177/0023677213501659>
- Johnson, J.A., Zehr, J.E., Moore, W.W., 1970. Effects of separate and concurrent osmotic and volume stimuli on plasma ADH in sheep. *Am J Physiol* 218, 1273–1280. <https://doi.org/10.1152/ajplegacy.1970.218.5.1273>
- Jones, B.E., Tovar, K.R., Goehring, A., Jalali-Yazdi, F., Okada, N.J., Gouaux, E., Westbrook, G.L., 2019. Autoimmune receptor encephalitis in mice induced by active immunization with conformationally-stabilized holoreceptors. *Sci Transl Med* 11, eaaw0044. <https://doi.org/10.1126/scitranslmed.aaw0044>
- Kagitani, H., Tagawa, M., Hatanaka, K., Ikari, T., Saito, A., Bando, H., Okada, K., Matsuo, O., 1985. Expression in *E. coli* of finger-domain lacking tissue-type plasminogen activator with high fibrin affinity. *FEBS Lett* 189, 145–149. [https://doi.org/10.1016/0014-5793\(85\)80860-7](https://doi.org/10.1016/0014-5793(85)80860-7)
- Kaneko, M., Sakata, Y., Matsuda, M., Mimuro, J., 1992. Interactions between the finger and kringle-2 domains of tissue-type plasminogen activator and plasminogen activator inhibitor-1. *J Biochem* 111, 244–248. <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.jbchem.a123744>
- Kato, K., Yamamoto, K.-I., 1988. Role of Adjuvant and Immunogenic Moieties of *M. tuberculosis* in Pathogenicity, in: Bendinelli, M., Friedman, H. (Eds.), *Mycobacterium Tuberculosis: Interactions with the Immune System, Infectious Agents and Pathogenesis*. Springer US, Boston, MA, pp. 39–58. [https://doi.org/10.1007/978-1-4684-5418-5\\_2](https://doi.org/10.1007/978-1-4684-5418-5_2)
- Kayser, M.S., Dalmau, J., 2016. Anti-NMDA receptor encephalitis, autoimmunity, and psychosis. *Schizophr Res* 176, 36–40. <https://doi.org/10.1016/j.schres.2014.10.007>
- Keijer, J., Li, M., Speakman, J.R., 2019. What is the best housing temperature to translate mouse experiments to humans? *Molecular Metabolism* 25, 168–176. <https://doi.org/10.1016/j.molmet.2019.04.001>
- Kim, H.-K., Lee, S.Y., Oh, H.-K., Kang, B.-H., Ku, H.-J., Lee, Y., Shin, J.-Y., Hong, Y.-K., Joe, Y.A., 2003. Inhibition of endothelial cell proliferation by the recombinant kringle domain of tissue-type plasminogen activator. *Biochem Biophys Res Commun* 304, 740–746. [https://doi.org/10.1016/s0006-291x\(03\)00656-9](https://doi.org/10.1016/s0006-291x(03)00656-9)
- Kim, K.-S., Jeon, M.T., Kim, E.S., Lee, C.H., Kim, D.-G., 2022. Activation of NMDA receptors in brain endothelial cells increases transcellular permeability. *Fluids and Barriers of the CNS* 19, 70. <https://doi.org/10.1186/s12987-022-00364-6>
- Kim, T., Gondré-Lewis, M.C., Arnaoutova, I., Loh, Y.P., 2006a. Dense-core secretory granule biogenesis. *Physiology (Bethesda)* 21, 124–133. <https://doi.org/10.1152/physiol.00043.2005>
- Kim, T., Gondré-Lewis, M.C., Arnaoutova, I., Loh, Y.P., 2006b. Dense-Core Secretory Granule Biogenesis. *Physiology* 21, 124–133. <https://doi.org/10.1152/physiol.00043.2005>

- Kimura, M., Soeda, S., Oda, M., Ochiai, T., Kihara, T., Ono, N., Shimeno, H., 2000. Release of plasminogen activator inhibitor-1 from human astrocytes is regulated by intracellular ceramide. *J Neurosci Res* 62, 781–788. [https://doi.org/10.1002/1097-4547\(20001215\)62:6<781::AID-JNR4>3.0.CO;2-W](https://doi.org/10.1002/1097-4547(20001215)62:6<781::AID-JNR4>3.0.CO;2-W)
- Kittner, H., Franke, H., Harsch, J.I., El-Ashmawy, I.M., Seidel, B., Krügel, U., Illes, P., 2006. Enhanced food intake after stimulation of hypothalamic P2Y1 receptors in rats: modulation of feeding behaviour by extracellular nucleotides. *European Journal of Neuroscience* 24, 2049–2056. <https://doi.org/10.1111/j.1460-9568.2006.05071.x>
- Knipe, L., Meli, A., Hewlett, L., Bierings, R., Dempster, J., Skehel, P., Hannah, M.J., Carter, T., 2010. A revised model for the secretion of tPA and cytokines from cultured endothelial cells. *Blood* 116, 2183–2191. <https://doi.org/10.1182/blood-2010-03-276170>
- Knudtzen, F.C., Nilsson, A.C., Skarphedinsson, S., Blaabjerg, M., 2020. False-positive anti-NMDA receptor antibodies in severe case of Lyme neuroborreliosis. *Neurol Sci* 41, 197–199. <https://doi.org/10.1007/s10072-019-04004-0>
- Komuro, H., Yacubova, E., 2003. Recent advances in cerebellar granule cell migration. *CMLS, Cell. Mol. Life Sci.* 60, 1084–1098. <https://doi.org/10.1007/s00018-003-2248-z>
- Könner, A.C., Klöckener, T., Brüning, J.C., 2009. Control of energy homeostasis by insulin and leptin: Targeting the arcuate nucleus and beyond. *Physiology & Behavior, Proceedings from the 2008 Meeting of the Society for the Study of Ingestive Behavior* 97, 632–638. <https://doi.org/10.1016/j.physbeh.2009.03.027>
- Korf, H.-W., Møller, M., 2021. Chapter 15 - Arcuate nucleus, median eminence, and hypophysial pars tuberalis, in: Swaab, D.F., Kreier, F., Lucassen, P.J., Salehi, A., Buijs, R.M. (Eds.), *Handbook of Clinical Neurology, The Human Hypothalamus*. Elsevier, pp. 227–251. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-820107-7.00015-X>
- Kreimeier, U., 2000. Pathophysiology of fluid imbalance. *Critical Care* 4, S3. <https://doi.org/10.1186/cc968>
- Kristensen, P., Nielsen, L.S., Grondhal-Hensen, J., Andresen, P.B., Larsson, L.-I., Dano, K., 1985. Immunocytochemical demonstration of tissue-type plasminogen activator in endocrine cells of the rat pituitary gland. *J Cell Biol* 101, 305–311.
- Krystosek, A., 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. <https://doi.org/10.1073/pnas.78.12.7810>
- Kuiper, J., M, O., Dc, R., Tj, van B., 1988. Characterization of the interaction in vivo of tissue-type plasminogen activator with liver cells. *The Journal of biological chemistry* 263.
- Kuppuswamy, P.S., Takala, C.R., Sola, C.L., 2014. Management of psychiatric symptoms in anti-NMDAR encephalitis: a case series, literature review and future directions. *General Hospital Psychiatry* 36, 388–391. <https://doi.org/10.1016/j.genhosppsych.2014.02.010>
- Laghlam, D., Jozwiak, M., Nguyen, L.S., 2021. Renin-Angiotensin-Aldosterone System and Immunomodulation: A State-of-the-Art Review. *Cells* 10, 1767. <https://doi.org/10.3390/cells10071767>

- Lai, K.-O., Ip, N.Y., 2009. Synapse development and plasticity: roles of ephrin/Eph receptor signaling. *Current Opinion in Neurobiology, Signalling mechanisms* 19, 275–283. <https://doi.org/10.1016/j.conb.2009.04.009>
- Lakhan, S.E., Kirchgessner, A., Tepper, D., Leonard, A., 2013. Matrix metalloproteinases and blood-brain barrier disruption in acute ischemic stroke. *Front Neurol* 4, 32. <https://doi.org/10.3389/fneur.2013.00032>
- Lamarque, M., Psimaras, D., Ducray, F., Pelieu, I., Sonnevile, R., Demeret, S., Bolgert, F., Dehais, C., Camdessanche, J., Antoine, J., Honnorat, J., Delattre, J.-Y., Weiss, N., 2011. Encéphalites auto-immunes à anticorps antirécepteurs-NMDA, une cause fréquente d'encéphalite en réanimation. *Réanimation* 20, 397–407. <https://doi.org/10.1007/s13546-011-0275-6>
- Land, H., Grez, M., Ruppert, S., Schmale, H., Rehbein, M., Richter, D., Schütz, G., 1983. Deduced amino acid sequence from the bovine oxytocin–neurophysin I precursor cDNA. *Nature* 302, 342–344. <https://doi.org/10.1038/302342a0>
- Land, H., Schütz, G., Schmale, H., Richter, D., 1982. Nucleotide sequence of cloned cDNA encoding bovine arginine vasopressin–neurophysin II precursor. *Nature* 295, 299–303. <https://doi.org/10.1038/295299a0>
- Langlet, F., 2019. Tanycyte Gene Expression Dynamics in the Regulation of Energy Homeostasis. *Front. Endocrinol.* 10, 286. <https://doi.org/10.3389/fendo.2019.00286>
- Langlet, F., 2014. Tanycytes: A Gateway to the Metabolic Hypothalamus. *Journal of Neuroendocrinology* 26. <https://doi.org/10.1111/jne.12191>
- Langlet, F., Levin, B.E., Luquet, S., Mazzone, M., Messina, A., Dunn-Meynell, A.A., Balland, E., Lacombe, A., Mazur, D., Carmeliet, P., Bouret, S.G., Prevot, V., Dehouck, B., 2013a. Tanycytic VEGF-A Boosts Blood-Hypothalamus Barrier Plasticity and Access of Metabolic Signals to the Arcuate Nucleus in Response to Fasting. *Cell Metabolism* 17, 607–617. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2013.03.004>
- Langlet, F., Mullier, A., Bouret, S.G., Prevot, V., Dehouck, B., 2013b. Tanycyte-like cells form a blood-cerebrospinal fluid barrier in the circumventricular organs of the mouse brain: Tanycyte barrier in circumventricular organs. *J. Comp. Neurol.* 521, 3389–3405. <https://doi.org/10.1002/cne.23355>
- Larsen, R.S., Corlew, R.J., Henson, M.A., Roberts, A.C., Mishina, M., Watanabe, M., Lipton, S.A., Nakanishi, N., Pérez-Otaño, I., Weinberg, R.J., Philpot, B.D., 2011. Nr3a-containing NMDA receptors promote neurotransmitter release and spike timing-dependent plasticity. *Nat Neurosci* 14, 338–344. <https://doi.org/10.1038/nn.2750>
- Lau, C.G., Zukin, R.S., 2007. NMDA receptor trafficking in synaptic plasticity and neuropsychiatric disorders. *Nat Rev Neurosci* 8, 413–426. <https://doi.org/10.1038/nrn2153>
- Lee, A., Glick, D.B., Dinwiddie, S.H., 2006. Electroconvulsive Therapy in a Pediatric Patient With Malignant Catatonia and Paraneoplastic Limbic Encephalitis. *The Journal of ECT* 22, 267–270. <https://doi.org/10.1097/01.yct.0000244236.72049.9e>



- Lee, H.-Y., Hwang, I.-Y., Im, H., Koh, J.-Y., Kim, Y.-H., 2007. Non-proteolytic neurotrophic effects of tissue plasminogen activator on cultured mouse cerebrocortical neurons. *J Neurochem* 101, 1236–1247. <https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.2007.04417.x>
- Lee, S.W., Stanley, B.G., 2005. NMDA receptors mediate feeding elicited by neuropeptide Y in the lateral and perifornical hypothalamus. *Brain Research* 1063, 1–8. <https://doi.org/10.1016/j.brainres.2005.09.045>
- Lee, W.-J., Lee, S.-T., Moon, J., Sunwoo, J.-S., Byun, J.-I., Lim, J.-A., Kim, T.-J., Shin, Y.-W., Lee, K.-J., Jun, J.-S., Lee, H.S., Kim, S., Park, K.-I., Jung, K.-H., Jung, K.-Y., Kim, M., Lee, S.K., Chu, K., 2016. Tocilizumab in Autoimmune Encephalitis Refractory to Rituximab: An Institutional Cohort Study. *Neurotherapeutics* 13, 824–832. <https://doi.org/10.1007/s13311-016-0442-6>
- Lei, S., Czerwinska, E., Czerwinski, W., Walsh, M.P., MacDonald, J.F., 2001. Regulation of NMDA Receptor Activity by F-Actin and Myosin Light Chain Kinase. *J Neurosci* 21, 8464–8472. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.21-21-08464.2001>
- Leonetti, C., Macrez, R., Pruvost, M., Hommet, Y., Bronsard, J., Fournier, A., Perrigault, M., Machin, I., Vivien, D., Clemente, D., De Castro, F., Maubert, E., Docagne, F., 2017. Tissue-type plasminogen activator exerts EGF-like chemokinetic effects on oligodendrocytes in white matter (re)myelination. *Mol Neurodegener* 12, 20. <https://doi.org/10.1186/s13024-017-0160-5>
- Lesept, F., Chevilly, A., Jezequel, J., Ladépêche, L., Macrez, R., Aimable, M., Lenoir, S., Bertrand, T., Rubrecht, L., Galea, P., Lebouvier, L., Petersen, K.-U., Hommet, Y., Maubert, E., Ali, C., Groc, L., Vivien, D., 2016. Tissue-type plasminogen activator controls neuronal death by raising surface dynamics of extrasynaptic NMDA receptors. *Cell Death Dis* 7, e2466–e2466. <https://doi.org/10.1038/cddis.2016.279>
- Leshner, A.P., Myers, T.J., Tecklenburg, F., Streck, C.J., 2010. Anti-N-methyl-d-aspartate receptor encephalitis associated with an ovarian teratoma in an adolescent female. *Journal of Pediatric Surgery* 45, 1550–1553. <https://doi.org/10.1016/j.jpedsurg.2010.04.002>
- Levin, E.G., Santell, L., 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 ( Pt 2), 139–148. <https://doi.org/10.1242/jcs.110.2.139>
- Liang, C.-W., Chen, T.-C., 2022. Anti-NMDA receptor encephalitis presenting as fever with undetermined cause. *International Journal of Infectious Diseases* 122, 365–367. <https://doi.org/10.1016/j.ijid.2022.06.019>
- Lin, H., Xu, L., Yu, S., Hong, W., Huang, M., Xu, P., 2020. Therapeutics targeting the fibrinolytic system. *Exp Mol Med* 52, 367–379. <https://doi.org/10.1038/s12276-020-0397-x>
- Liot, G., Roussel, B.D., Lebeurrier, N., Benchenane, K., López-Atalaya, J.P., Vivien, D., Ali, C., 2006. Tissue-type plasminogen activator rescues neurones from serum deprivation-induced apoptosis through a mechanism independent of its proteolytic activity. *J Neurochem* 98, 1458–1464. <https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.2006.03982.x>
- Liu, D., Cheng, T., Guo, H., Fernández, J.A., Griffin, J.H., Song, X., Zlokovic, B.V., 2004. Tissue plasminogen activator neurovascular toxicity is controlled by activated protein C. *Nat Med* 10, 1379–1383. <https://doi.org/10.1038/nm1122>

- Liu, T., Kong, D., Shah, B.P., Ye, C., Koda, S., Saunders, A., Ding, J.B., Yang, Z., Sabatini, B.L., Lowell, B.B., 2012. Fasting Activation of AgRP Neurons Requires NMDA Receptors and Involves Spinogenesis and Increased Excitatory Tone. *Neuron* 73, 511–522. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2011.11.027>
- Lizarbe, B., Cherix, A., Duarte, J.M.N., Cardinaux, J.-R., Gruetter, R., 2019. High-fat diet consumption alters energy metabolism in the mouse hypothalamus. *Int J Obes* 43, 1295–1304. <https://doi.org/10.1038/s41366-018-0224-9>
- Lochner, J.E., Honigman, L.S., Grant, W.F., Gessford, S.K., Hansen, A.B., Silverman, M.A., Scalettar, B.A., 2006. Activity-dependent release of tissue plasminogen activator from the dendritic spines of hippocampal neurons revealed by live-cell imaging. *J Neurobiol* 66, 564–577. <https://doi.org/10.1002/neu.20250>
- Lockwood, C.J., Schatz, F., 1996. A biological model for the regulation of peri-implantational hemostasis and menstruation. *J Soc Gynecol Investig* 3, 159–165.
- Longordo, F., Fan, J., Steimer, T., Kopp, C., Lüthi, A., 2011. Do Mice Habituate to “Gentle Handling?” A Comparison of Resting Behavior, Corticosterone Levels and Synaptic Function in Handled and Undisturbed C57BL/6J Mice. *Sleep* 34, 679–681. <https://doi.org/10.1093/sleep/34.5.679>
- Lopez-Atalaya, J., Bd, R., D, L., J, P., O, N., Y, H., K, B., H, C., J, L., D, T.V., R, B., S, R., H, V., Ku, P., Js, S., C, A., D, V., 2008. Toward safer thrombolytic agents in stroke: molecular requirements for NMDA receptor-mediated neurotoxicity. *Journal of cerebral blood flow and metabolism : official journal of the International Society of Cerebral Blood Flow and Metabolism* 28. <https://doi.org/10.1038/jcbfm.2008.14>
- Louessard, M., Lacroix, A., Martineau, M., Mondielli, G., Montagne, A., Lesept, F., Lambolez, B., Cauli, B., Mothet, J.-P., Vivien, D., Maubert, E., 2016a. Tissue Plasminogen Activator Expression Is Restricted to Subsets of Excitatory Pyramidal Glutamatergic Neurons. *Mol Neurobiol* 53, 5000–5012. <https://doi.org/10.1007/s12035-015-9432-7>
- Louessard, M., Lacroix, A., Martineau, M., Mondielli, G., Montagne, A., Lesept, F., Lambolez, B., Cauli, B., Mothet, J.-P., Vivien, D., Maubert, E., 2016b. Tissue Plasminogen Activator Expression Is Restricted to Subsets of Excitatory Pyramidal Glutamatergic Neurons. *Molecular Neurobiology* 53, 5000–5012. <https://doi.org/10.1007/s12035-015-9432-7>
- Lu, L., Hogan-Cann, A.D., Globa, A.K., Lu, P., Nagy, J.I., Bamji, S.X., Anderson, C.M., 2019. Astrocytes drive cortical vasodilatory signaling by activating endothelial NMDA receptors. *J Cereb Blood Flow Metab* 39, 481–496. <https://doi.org/10.1177/0271678X17734100>
- Mackay, G., Ahmad, K., Stone, J., Sudlow, C., Summers, D., Knight, R., Will, R., Irani, S.R., Vincent, A., Maddison, P., 2012. NMDA receptor autoantibodies in sporadic Creutzfeldt-Jakob disease. *J Neurol* 259, 1979–1981. <https://doi.org/10.1007/s00415-012-6489-3>
- Macrez, R., Bezin, L., Le Mauff, B., Ali, C., 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. <https://doi.org/10.1161/STROKEAHA.110.592360>
- Macrez, R., Ortega, M.C., Bardou, I., Mehra, A., Fournier, A., Van der Pol, S.M.A., Haelewyn, B., Maubert, E., Lesept, F., Chevilly, A., de Castro, F., De Vries, H.E., Vivien, D., Clemente,

- D., Docagne, F., 2016. Neuroendothelial NMDA receptors as therapeutic targets in experimental autoimmune encephalomyelitis. *Brain* 139, 2406–2419. <https://doi.org/10.1093/brain/aww172>
- Madani, R., Hulo, S., Toni, N., Madani, H., Steimer, T., Muller, D., Vassalli, J.D., 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. <https://doi.org/10.1093/emboj/18.11.3007>
- Malviya, M., Barman, S., Golombeck, K.S., Planagumà, J., Mannara, F., Strutz-Seebohm, N., Wrzos, C., Demir, F., Baksmeier, C., Steckel, J., Falk, K.K., Gross, C.C., Kovac, S., Bönnte, K., Johnen, A., Wandinger, K., Martín-García, E., Becker, A.J., Elger, C.E., Klöcker, N., Wiendl, H., Meuth, S.G., Hartung, H., Seebohm, G., Leypoldt, F., Maldonado, R., Stadelmann, C., Dalmau, J., Melzer, N., Goebels, N., 2017. NMDAR encephalitis: passive transfer from man to mouse by a recombinant antibody. *Ann Clin Transl Neurol* 4, 768–783. <https://doi.org/10.1002/acn3.444>
- Mandelblat-Cerf, Y., Kim, A., Burgess, C.R., Subramanian, S., Tannous, B.A., Lowell, B.B., Andermann, M.L., 2017. Bidirectional Anticipation of Future Osmotic Challenges by Vasopressin Neurons. *Neuron* 93, 57–65. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2016.11.021>
- Maneta, E., Garcia, G., 2014. Psychiatric Manifestations of Anti-NMDA Receptor Encephalitis: Neurobiological Underpinnings and Differential Diagnostic Implications. *Psychosomatics* 55, 37–44. <https://doi.org/10.1016/j.psych.2013.06.002>
- Mann-Gow, T.K., Larson, T.R., Wøien, C.T., Andersen, T.M., Andersson, K.-E., Zvara, P., 2017. Evaluating the Procedure for Performing Awake Cystometry in a Mouse Model. *J Vis Exp*. <https://doi.org/10.3791/55588>
- Manzanares, G., Brito-da-Silva, G., Gandra, P.G., 2019. Voluntary wheel running: patterns and physiological effects in mice. *Braz J Med Biol Res* 52, e7830. <https://doi.org/10.1590/1414-431x20187830>
- Mao, F., Huang, F., Nong, W., Lao, D., Gong, Z., Huang, W., 2022. N-methyl-D-aspartic acid increases tight junction protein destruction in brain endothelial cell via caveolin-1-associated ERK1/2 signaling. *Toxicology* 470, 153139. <https://doi.org/10.1016/j.tox.2022.153139>
- Marcos-Contreras, O.A., Martinez de Lizarrondo, S., Bardou, I., Orset, C., Pruvost, M., Anfray, A., Frigout, Y., Hommet, Y., Lebouvier, L., Montaner, J., Vivien, D., Gauberti, M., 2016. Hyperfibrinolysis increases blood-brain barrier permeability by a plasmin- and bradykinin-dependent mechanism. *Blood* 128, 2423–2434. <https://doi.org/10.1182/blood-2016-03-705384>
- Mechelhoff, D., van Noort, B.M., Weschke, B., Bachmann, C.J., Wagner, C., Pfeiffer, E., Winter, S., 2015. Anti-NMDA receptor encephalitis presenting as atypical anorexia nervosa: an adolescent case report. *Eur Child Adolesc Psychiatry* 24, 1321–1324. <https://doi.org/10.1007/s00787-015-0682-8>
- Medina, K.L., 2016. Overview of the immune system, in: *Handbook of Clinical Neurology*. Elsevier, pp. 61–76. <https://doi.org/10.1016/B978-0-444-63432-0.00004-9>

- Mehra, A., Guérit, S., Macrez, R., Gosselet, F., Sevin, E., Lebas, H., Maubert, E., De Vries, H.E., Bardou, I., Vivien, D., Docagne, F., 2020. Nonionotropic Action of Endothelial NMDA Receptors on Blood–Brain Barrier Permeability via Rho/ROCK-Mediated Phosphorylation of Myosin. *J. Neurosci.* 40, 1778–1787. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.0969-19.2019>
- Methia, N., André, P., Hafezi-Moghadam, A., Economopoulos, M., Thomas, K.L., Wagner, D.D., 2001. ApoE deficiency compromises the blood brain barrier especially after injury. *Mol Med* 7, 810–815.
- Mikasova, L., De Rossi, P., Bouchet, D., Georges, F., Rogemond, V., Didelot, A., Meissirel, C., Honnorat, J., Groc, L., 2012. Disrupted surface cross-talk between NMDA and Ephrin-B2 receptors in anti-NMDA encephalitis. *Brain* 135, 1606–1621. <https://doi.org/10.1093/brain/aws092>
- Miyata, S., 2015. New aspects in fenestrated capillary and tissue dynamics in the sensory circumventricular organs of adult brains. *Frontiers in Neuroscience* 9.
- Miyata, S., Nakatani, Y., Hayashi, N., Nakashima, T., 2005. Matrix-degrading enzymes tissue plasminogen activator and matrix metalloprotease-3 in the hypothalamo-neurohypophysial system. *Brain Research* 1058, 1–9. <https://doi.org/10.1016/j.brainres.2005.07.027>
- Monyer, H., Sprengel, R., Schoepfer, R., Herb, A., Higuchi, M., Lomeli, H., Burnashev, N., Sakmann, B., Seeburg, P.H., 1992. Heteromeric NMDA Receptors: Molecular and Functional Distinction of Subtypes. *Science* 256, 1217–1221. <https://doi.org/10.1126/science.256.5060.1217>
- Morgagni, G.B. (1682-1771) A. du texte, 1820. De sedibus et causis morborum per anatomen indagatis libri V. Tomus 2 / ... 9a editio, auctoris vita... illustrata, curantibus F. Chaussier,... et N.-P. Adelon,...
- Morgenthaler, N., J, S., C, A., A, B., 2006. Assay for the measurement of copeptin, a stable peptide derived from the precursor of vasopressin. *Clinical chemistry* 52. <https://doi.org/10.1373/clinchem.2005.060038>
- Morita, S., Furube, E., Mannari, T., Okuda, H., Tatsumi, K., Wanaka, A., Miyata, S., 2016. Heterogeneous vascular permeability and alternative diffusion barrier in sensory circumventricular organs of adult mouse brain. *Cell Tissue Res* 363, 497–511. <https://doi.org/10.1007/s00441-015-2207-7>
- Morita, S., Miyata, S., 2012. Different vascular permeability between the sensory and secretory circumventricular organs of adult mouse brain. *Cell Tissue Res* 349, 589–603. <https://doi.org/10.1007/s00441-012-1421-9>
- Moscato, E.H., Peng, X., Jain, A., Parsons, T.D., Dalmau, J., Balice-Gordon, R.J., 2014. Acute mechanisms underlying antibody effects in anti-N-methyl-D-aspartate receptor encephalitis. *Ann Neurol.* 76, 108–119. <https://doi.org/10.1002/ana.24195>
- Mountjoy, K.G., 2015. Pro-Opiomelanocortin (POMC) Neurones, POMC-Derived Peptides, Melanocortin Receptors and Obesity: How Understanding of this System has Changed Over the Last Decade. *Journal of Neuroendocrinology* 27, 406–418. <https://doi.org/10.1111/jne.12285>

- Müller-Fielitz, H., Stahr, M., Bernau, M., Richter, M., Abele, S., Krajka, V., Benzin, A., Wenzel, J., Kalies, K., Mittag, J., Heuer, H., Offermanns, S., Schwaninger, M., 2017. Tancocytes control the hormonal output of the hypothalamic-pituitary-thyroid axis. *Nat Commun* 8, 484. <https://doi.org/10.1038/s41467-017-00604-6>
- Mullier, A., Bouret, S.G., Prevot, V., Dehouck, B., 2010. Differential distribution of tight junction proteins suggests a role for tancocytes in blood-hypothalamus barrier regulation in the adult mouse brain. *J. Comp. Neurol.* 518, 943–962. <https://doi.org/10.1002/cne.22273>
- Myers, M.G., Olson, D.P., 2012. Central nervous system control of metabolism. *Nature* 491, 357–363. <https://doi.org/10.1038/nature11705>
- 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. <https://doi.org/10.1056/NEJM199512143332401>
- Neff, E.P., 2020. A point on thermoneutrality for mice. *Lab Anim* 49, 169–169. <https://doi.org/10.1038/s41684-020-0560-y>
- Nehme, A., Zouein, F.A., Zayeri, Z.D., Zibara, K., 2019. An Update on the Tissue Renin Angiotensin System and Its Role in Physiology and Pathology. *J Cardiovasc Dev Dis* 6, E14. <https://doi.org/10.3390/jcdd6020014>
- Nevian, T., Sakmann, B., 2004. Single Spine Ca<sup>2+</sup> Signals Evoked by Coincident EPSPs and Backpropagating Action Potentials in Spiny Stellate Cells of Layer 4 in the Juvenile Rat Somatosensory Barrel Cortex. *J Neurosci* 24, 1689–1699. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.3332-03.2004>
- Nicole, O., Docagne, F., Ali, C., Margaille, I., Carmeliet, P., MacKenzie, E.T., Vivien, D., Buisson, A., 2001. The proteolytic activity of tissue-plasminogen activator enhances NMDA receptor-mediated signaling. *Nat Med* 7, 59–64. <https://doi.org/10.1038/83358>
- Noda, M., Matsuda, T., 2022. Central regulation of body fluid homeostasis. *Proc. Jpn. Acad., Ser. B* 98, 283–324. <https://doi.org/10.2183/pjab.98.016>
- Nørregaard, R., Kwon, T.-H., Frøkiær, J., 2015. Physiology and pathophysiology of cyclooxygenase-2 and prostaglandin E<sub>2</sub> in the kidney. *Kidney Research and Clinical Practice* 34, 194–200. <https://doi.org/10.1016/j.krcp.2015.10.004>
- Norsted, E., Gömüç, B., Meister, B., 2008. Protein components of the blood–brain barrier (BBB) in the mediobasal hypothalamus. *Journal of Chemical Neuroanatomy* 36, 107–121. <https://doi.org/10.1016/j.jchemneu.2008.06.002>
- Obiang, P., Macrez, R., Jullienne, A., Bertrand, T., Lesept, F., Ali, C., Maubert, E., Vivien, D., Agin, V., 2012. GluN2D subunit-containing NMDA receptors control tissue plasminogen activator-mediated spatial memory. *J Neurosci* 32, 12726–12734. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.6202-11.2012>
- Oh, S.B., Byun, C.J., Yun, J.-H., Jo, D.-G., Carmeliet, P., Koh, J.-Y., Lee, J.-Y., 2014. Tissue plasminogen activator arrests Alzheimer’s disease pathogenesis. *Neurobiol Aging* 35, 511–519. <https://doi.org/10.1016/j.neurobiolaging.2013.09.020>

- Oikawa, R., Nasa, Y., Ishii, R., Kuwaki, T., Tanoue, A., Tsujimoto, G., Takeo, S., 2007. Vasopressin VIA receptor enhances baroreflex via the central component of the reflex arc. *Eur J Pharmacol* 558, 144–150. <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2006.11.063>
- Oliverio, M.I., Best, C.F., Smithies, O., Coffman, T.M., 2000. Regulation of sodium balance and blood pressure by the AT(1A) receptor for angiotensin II. *Hypertension* 35, 550–554. <https://doi.org/10.1161/01.hyp.35.2.550>
- Ono-Moore, K.D., Rutkowsky, J.M., Pearson, N.A., Williams, D.K., Grobe, J.L., Tolentino, T., Lloyd, K.C.K., Adams, S.H., 2020. Coupling of energy intake and energy expenditure across a temperature spectrum: impact of diet-induced obesity in mice. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 319, E472–E484. <https://doi.org/10.1152/ajpendo.00041.2020>
- Orozco-Solis, R., Aguilar-Arnal, L., 2020. Circadian Regulation of Immunity Through Epigenetic Mechanisms. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology* 10.
- Osterwalder, T., Cinelli, P., Baici, A., Pennella, A., Krueger, S.R., Schrimpf, S.P., Meins, M., Sonderegger, P., 1998. The axonally secreted serine proteinase inhibitor, neuroserpin, inhibits plasminogen activators and plasmin but not thrombin. *J Biol Chem* 273, 2312–2321. <https://doi.org/10.1074/jbc.273.4.2312>
- Otani, T., Furuse, M., 2020. Tight Junction Structure and Function Revisited. *Trends in Cell Biology* 30, 805–817. <https://doi.org/10.1016/j.tcb.2020.08.004>
- Pachernegg, S., Strutz-Seebohm, N., Hollmann, M., 2012. GluN3 subunit-containing NMDA receptors: not just one-trick ponies. *Trends in Neurosciences* 35, 240–249. <https://doi.org/10.1016/j.tins.2011.11.010>
- Page, R.B., Leure-Dupree, A.E., Bergland, R.M., 1978. The neurohypophyseal capillary bed II. Specializations within median eminence. *American Journal of Anatomy* 153, 33–65. <https://doi.org/10.1002/aja.1001530104>
- Pan, H., Oliveira, B., Saher, G., Dere, E., Tapken, D., Mitjans, M., Seidel, J., Wesolowski, J., Wakhloo, D., Klein-Schmidt, C., Ronnenberg, A., Schwabe, K., Trippe, R., Mätz-Rensing, K., Berghoff, S., Al-Krinawe, Y., Martens, H., Begemann, M., Stöcker, W., Kaup, F.-J., Mischke, R., Boretius, S., Nave, K.-A., Krauss, J.K., Hollmann, M., Lühder, F., Ehrenreich, H., 2018. Uncoupling the widespread occurrence of anti-NMDAR1 autoantibodies from neuropsychiatric disease in a novel autoimmune model. *Molecular Psychiatry*. <https://doi.org/10.1038/s41380-017-0011-3>
- Paoletti, P., Bellone, C., Zhou, Q., 2013. NMDA receptor subunit diversity: impact on receptor properties, synaptic plasticity and disease. *Nat Rev Neurosci* 14, 383–400. <https://doi.org/10.1038/nrn3504>
- Papouin, T., Ladépêche, L., Ruel, J., Sacchi, S., Labasque, M., Hanini, M., Groc, L., Pollegioni, L., Mothet, J.-P., Oliet, S.H.R., 2012. Synaptic and Extrasynaptic NMDA Receptors Are Gated by Different Endogenous Coagonists. *Cell* 150, 633–646. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2012.06.029>
- Parcq, J., Bertrand, T., Montagne, A., Baron, A.F., Macrez, R., Billard, J.M., Briens, A., Hommet, Y., Wu, J., Yepes, M., Lijnen, H.R., Dutar, P., Anglés-Cano, E., Vivien, D., 2012. Unveiling an exceptional zymogen: the single-chain form of tPA is a selective activator of

- NMDA receptor-dependent signaling and neurotoxicity. *Cell Death Differ* 19, 1983–1991. <https://doi.org/10.1038/cdd.2012.86>
- Parkash, J., Messina, A., Langlet, F., Cimino, I., Loyens, A., Mazur, D., Gallet, S., Balland, E., Malone, S.A., Pralong, F., Cagnoni, G., Schellino, R., De Marchis, S., Mazzone, M., Pasterkamp, R.J., Tamagnone, L., Prevot, V., Giacobini, P., 2015. Semaphorin7A regulates neuroglial plasticity in the adult hypothalamic median eminence. *Nat Commun* 6, 6385. <https://doi.org/10.1038/ncomms7385>
- Parmer, R.J., Mahata, M., Mahata, S., Sebald, M.T., O'Connor, D.T., Miles, L.A., 1997. Tissue plasminogen activator (t-PA) is targeted to the regulated secretory pathway. Catecholamine storage vesicles as a reservoir for the rapid release of t-PA. *J Biol Chem* 272, 1976–1982. <https://doi.org/10.1074/jbc.272.3.1976>
- Pasquet, N., Douceau, S., Naveau, M., Lesept, F., Louessard, M., Lebouvier, L., Hommet, Y., Vivien, D., Bardou, I., 2019a. Tissue-Type Plasminogen Activator Controlled Corticogenesis Through a Mechanism Dependent of NMDA Receptors Expressed on Radial Glial Cells. *Cerebral Cortex* 29, 2482–2498. <https://doi.org/10.1093/cercor/bhy119>
- Pasquet, N., Douceau, S., Naveau, M., Lesept, F., Louessard, M., Lebouvier, L., Hommet, Y., Vivien, D., Bardou, I., 2019b. Tissue-Type Plasminogen Activator Controlled Corticogenesis Through a Mechanism Dependent of NMDA Receptors Expressed on Radial Glial Cells. *Cerebral Cortex* 29, 2482–2498. <https://doi.org/10.1093/cercor/bhy119>
- Patneau, D., Mayer, M., 1990. Structure-activity relationships for amino acid transmitter candidates acting at N-methyl-D-aspartate and quisqualate receptors. *J Neurosci* 10, 2385–2399. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.10-07-02385.1990>
- Pawlak, R., Rao, B.S.S., Melchor, J.P., Chattarji, S., McEwen, B., Strickland, S., 2005. Tissue plasminogen activator and plasminogen mediate stress-induced decline of neuronal and cognitive functions in the mouse hippocampus. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102, 18201–18206. <https://doi.org/10.1073/pnas.0509232102>
- Pennica, D., Holmes, W.E., Kohr, W.J., Harkins, R.N., Vohar, G.A., Ward, C.A., Bennett, W.F., Yelverton, E., Seeburg, P.H., Heyneker, H.L., Goeddel, D.V., Collen, D., 1983. Cloning and expression of human tissue-type plasminogen activator cDNA in *E. coli*. *Nature* 301, 214–221. <https://doi.org/10.1038/301214a0>
- Perogamvros, L., Schnider, A., Leemann, B., 2012. The role of NMDA receptors in human eating behavior: evidence from a case of anti-NMDA receptor encephalitis. *Cogn Behav Neurol* 25, 93–97. <https://doi.org/10.1097/WNN.0b013e31825921a6>
- Phillips, O.R., Joshi, S.H., Narr, K.L., Shattuck, D.W., Singh, M., Di Paola, M., Ploner, C.J., Prüss, H., Paul, F., Finke, C., 2018. Superficial white matter damage in anti-NMDA receptor encephalitis. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 89, 518–525. <https://doi.org/10.1136/jnnp-2017-316822>
- Pin, J.-P., Duvoisin, R., 1995. The metabotropic glutamate receptors: Structure and functions. *Neuropharmacology* 34, 1–26. [https://doi.org/10.1016/0028-3908\(94\)00129-G](https://doi.org/10.1016/0028-3908(94)00129-G)
- Planagumà, J., Leypoldt, F., Mannara, F., Gutiérrez-Cuesta, J., Martín-García, E., Aguilar, E., Titulaer, M.J., Petit-Pedrol, M., Jain, A., Balice-Gordon, R., Lakadamyali, M., Graus, F.,

- Maldonado, R., Dalmau, J., 2015. Human N-methyl D-aspartate receptor antibodies alter memory and behaviour in mice. *Brain* 138, 94–109. <https://doi.org/10.1093/brain/awu310>
- Platt, M.P., Agalliu, D., Cutforth, T., 2017. Hello from the Other Side: How Autoantibodies Circumvent the Blood–Brain Barrier in Autoimmune Encephalitis. *Front Immunol* 8, 442. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2017.00442>
- Polavarapu, R., Gongora, M.C., Yi, H., Ranganathan, S., Lawrence, D.A., Strickland, D., Yepes, M., 2007. Tissue-type plasminogen activator-mediated shedding of astrocytic low-density lipoprotein receptor-related protein increases the permeability of the neurovascular unit. *Blood* 109, 3270–3278. <https://doi.org/10.1182/blood-2006-08-043125>
- Posey, K.A., Clegg, D.J., Printz, R.L., Byun, J., Morton, G.J., Vivekanandan-Giri, A., Pennathur, S., Baskin, D.G., Heinecke, J.W., Woods, S.C., Schwartz, M.W., Niswender, K.D., 2009. Hypothalamic proinflammatory lipid accumulation, inflammation, and insulin resistance in rats fed a high-fat diet. *American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism* 296, E1003–E1012. <https://doi.org/10.1152/ajpendo.90377.2008>
- Prevot, V., Dehouck, B., Poulain, P., Beauvillain, J.-C., Buée-Scherrer, V., Bouret, S., 2007. Neuronal–glial–endothelial interactions and cell plasticity in the postnatal hypothalamus: Implications for the neuroendocrine control of reproduction. *Psychoneuroendocrinology, Integrative approaches to neural plasticity (Lille Summer School, 2006)* 32, S46–S51. <https://doi.org/10.1016/j.psyneuen.2007.03.018>
- Prevot, V., Dehouck, B., Sharif, A., Ciofi, P., Giacobini, P., Clasadonte, J., 2018. The Versatile Tanycyte: A Hypothalamic Integrator of Reproduction and Energy Metabolism. *Endocrine Reviews* 39, 333–368. <https://doi.org/10.1210/er.2017-00235>
- Prevot, V., Dutoit, S., Croix, D., Tramu, G., Beauvillain, J.C., 1998. Semi-quantitative ultrastructural analysis of the localization and neuropeptide content of gonadotropin releasing hormone nerve terminals in the median eminence throughout the estrous cycle of the rat. *Neuroscience* 84, 177–191. [https://doi.org/10.1016/S0306-4522\(97\)00537-X](https://doi.org/10.1016/S0306-4522(97)00537-X)
- Prüss, H., Dalmau, J., Harms, L., Höltje, M., Ahnert-Hilger, G., Borowski, K., Stoecker, W., Wandinger, K.P., 2010. Retrospective analysis of NMDA receptor antibodies in encephalitis of unknown origin. *Neurology* 75, 1735–1739. <https://doi.org/10.1212/WNL.0b013e3181fc2a06>
- Qian, Z., Gilbert, M.E., Colicos, M.A., Kandel, E.R., Kuhl, D., 1993. Tissue-plasminogen activator is induced as an immediate-early gene during seizure, kindling and long-term potentiation. *Nature* 361, 453–457. <https://doi.org/10.1038/361453a0>
- Rabchevsky, A.G., Degos, J.D., Dreyfus, P.A., 1999. Peripheral injections of Freund’s adjuvant in mice provoke leakage of serum proteins through the blood-brain barrier without inducing reactive gliosis. *Brain Res* 832, 84–96. [https://doi.org/10.1016/s0006-8993\(99\)01479-1](https://doi.org/10.1016/s0006-8993(99)01479-1)
- Rajani, R.R., Ball, C.G., Feliciano, D.V., Vercruyse, G.A., 2009. Vasopressin in Hemorrhagic Shock: Review Article. *The American Surgeon* 75, 1207–1212. <https://doi.org/10.1177/000313480907501212>
- Reid, I.A., 1997. Role of Vasopressin Deficiency in the Vasodilation of Septic Shock. *Circulation* 95, 1108–1110. <https://doi.org/10.1161/01.CIR.95.5.1108>



- Ren, L., Lu, X., Danser, A.H.J., 2019. Revisiting the Brain Renin-Angiotensin System-Focus on Novel Therapies. *Curr Hypertens Rep* 21, 28. <https://doi.org/10.1007/s11906-019-0937-8>
- Retchless, B.S., Gao, W., Johnson, J.W., 2012. A single GluN2 subunit residue controls NMDA receptor channel properties via intersubunit interaction. *Nat Neurosci* 15, 406-S2. <https://doi.org/10.1038/nn.3025>
- Rijken, D.C., Hoylaerts, M., Collen, D., 1982. Fibrinolytic properties of one-chain and two-chain human extrinsic (tissue-type) plasminogen activator. *J Biol Chem* 257, 2920–2925.
- Rivier, C., Vale, W., 1983. Modulation of stress-induced ACTH release by corticotropin-releasing factor, catecholamines and vasopressin. *Nature* 305, 325–327. <https://doi.org/10.1038/305325a0>
- Rodriguez, E., Blazquez, J., Pastor, F., Pelaez, B., Pena, P., Peruzzo, B., Amat, P., 2005. Hypothalamic Tanycytes: A Key Component of Brain–Endocrine Interaction. *International Review of Cytology* 247, 89–164. [https://doi.org/10.1016/S0074-7696\(05\)47003-5](https://doi.org/10.1016/S0074-7696(05)47003-5)
- Rodríguez, E., Guerra, M., Peruzzo, B., Blázquez, J.L., 2019. Tanycytes: A rich morphological history to underpin future molecular and physiological investigations. *Journal of Neuroendocrinology* 31, e12690. <https://doi.org/10.1111/jne.12690>
- Roedel, A., Storch, C., Holsboer, F., Ohl, F., 2006. Effects of light or dark phase testing on behavioural and cognitive performance in DBA mice. *Lab Anim* 40, 371–381. <https://doi.org/10.1258/002367706778476343>
- Romero-Hernandez, A., Simorowski, N., Karakas, E., Furukawa, H., 2016. Molecular basis for subtype-specificity and high-affinity zinc inhibition in the GluN1-GluN2A NMDA receptor amino terminal domain. *Neuron* 92, 1324–1336. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2016.11.006>
- Rouf, S.A., Moo-Young, M., Chisti, Y., 1996. Tissue-type plasminogen activator: characteristics, applications and production technology. *Biotechnol Adv* 14, 239–266. [https://doi.org/10.1016/0734-9750\(96\)00019-5](https://doi.org/10.1016/0734-9750(96)00019-5)
- Rubin, L.L., Staddon, J.M., 1999. The cell biology of the blood-brain barrier. *Annu Rev Neurosci* 22, 11–28. <https://doi.org/10.1146/annurev.neuro.22.1.11>
- Saely, C.H., Geiger, K., Drexel, H., 2012. Brown versus White Adipose Tissue: A Mini-Review. *Gerontology* 58, 15–23. <https://doi.org/10.1159/000321319>
- Salinas, G.F., Braza, F., Brouard, S., Tak, P.-P., Baeten, D., 2013. The role of B lymphocytes in the progression from autoimmunity to autoimmune disease. *Clinical Immunology* 146, 34–45. <https://doi.org/10.1016/j.clim.2012.10.005>
- Salles, F.J., Strickland, S., 2002. Localization and regulation of the tissue plasminogen activator-plasmin system in the hippocampus. *J Neurosci* 22, 2125–2134.
- Sallés, F.J., Strickland, S., 2002. Localization and Regulation of the Tissue Plasminogen Activator–Plasmin System in the Hippocampus. *J Neurosci* 22, 2125–2134. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.22-06-02125.2002>
- Sands, J.M., 2003. Molecular mechanisms of urea transport. *J Membr Biol* 191, 149–163. <https://doi.org/10.1007/s00232-002-1053-1>

- Sappino, A.P., Madani, R., Huarte, J., Belin, D., Kiss, J.Z., Wohlwend, A., Vassalli, J.D., 1993. Extracellular proteolysis in the adult murine brain. *J Clin Invest* 92, 679–685. <https://doi.org/10.1172/JCI116637>
- Sarkis, R.A., Coffey, M.J., Cooper, J.J., Hassan, I., Lennox, B., 2019. Anti-N-Methyl-D-Aspartate Receptor Encephalitis: A Review of Psychiatric Phenotypes and Management Considerations: A Report of the American Neuropsychiatric Association Committee on Research. *JNP* 31, 137–142. <https://doi.org/10.1176/appi.neuropsych.18010005>
- Scheibe, F., Prüss, H., Mengel, A.M., Kohler, S., Nümann, A., Köhnlein, M., Ruprecht, K., Alexander, T., Hiepe, F., Meisel, A., 2017. Bortezomib for treatment of therapy-refractory anti-NMDA receptor encephalitis. *Neurology* 88, 366–370. <https://doi.org/10.1212/WNL.0000000000003536>
- Schmitt, S.E., Pargeon, K., Frechette, E.S., Hirsch, L.J., Dalmau, J., Friedman, D., 2012. Extreme delta brush. *Neurology* 79, 1094–1100. <https://doi.org/10.1212/WNL.0b013e3182698cd8>
- Schoorlemmer, G.H.M., Evered, M.D., 2002. Reduced feeding during water deprivation depends on hydration of the gut. *American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology* 283, R1061–R1069. <https://doi.org/10.1152/ajpregu.00236.2002>
- Seeds, N.W., Basham, M.E., 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. <https://doi.org/10.1073/pnas.96.24.14118>
- Seeds, N.W., Williams, B.L., Bickford, P.C., 1995. Tissue plasminogen activator induction in Purkinje neurons after cerebellar motor learning. *Science* 270, 1992–1994. <https://doi.org/10.1126/science.270.5244.1992>
- Severi, I., Fosca, M., Colleluori, G., Marini, F., Imperatori, L., Senzacqua, M., Di Vincenzo, A., Barbatelli, G., Fiori, F., Rau, J.V., Giordano, A., 2021. High-Fat Diet Impairs Mouse Median Eminence: A Study by Transmission and Scanning Electron Microscopy Coupled with Raman Spectroscopy. *Int J Mol Sci* 22, 8049. <https://doi.org/10.3390/ijms22158049>
- Shahid, Z., Asuka, E., Singh, G., 2022. Physiology, Hypothalamus, in: StatPearls. StatPearls Publishing, Treasure Island (FL).
- Shi, G., Somlo, D., Kim, G.H., Prescianotto-Baschong, C., Sun, S., Beuret, N., Long, Q., Rutishauser, J., Arvan, P., Spiess, M., Qi, L., 2017. ER-associated degradation is required for vasopressin prohormone processing and systemic water homeostasis. *Journal of Clinical Investigation* 127. <https://doi.org/10.1172/JCI94771>
- Shi, Y.-C., Lau, J., Lin, Z., Zhang, H., Zhai, L., Sperk, G., Heilbronn, R., Mietzsch, M., Weger, S., Huang, X.-F., Enriquez, R.F., Castillo, L., Baldock, P.A., Zhang, L., Sainsbury, A., Herzog, H., Lin, S., 2013. Arcuate NPY Controls Sympathetic Output and BAT Function via a Relay of Tyrosine Hydroxylase Neurons in the PVN. *Cell Metabolism* 17, 236–248. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2013.01.006>
- Shim, Y., Kim, S.Y., Kim, H., Hwang, H., Chae, J.-H., Choi, J., Kim, K.J., Yum, M.-S., Ko, T.S., Kim, Y.O., Byeon, J.H., Lee, Jiwon, Lee, Jeehun, Kim, J.S., Lim, B.C., 2020. Clinical outcomes of pediatric Anti-NMDA receptor encephalitis. *European Journal of Paediatric Neurology* 29, 87–91. <https://doi.org/10.1016/j.ejpn.2020.10.001>

- Shin, C.Y., Kundel, M., 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. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.2457-04.2004>
- Siao, C.-J., Fernandez, S.R., 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.
- Siao, C.-J., Tsirka, S.E., 2002. Tissue plasminogen activator mediates microglial activation via its finger domain through annexin II. *J Neurosci* 22, 3352–3358. <https://doi.org/20026281>
- Sidler, M., Aitken, K.J., Forward, S., Vitkin, A., Bagli, D.J., 2018. Non-invasive voiding assessment in conscious mice. *Bladder (San Franc)* 5, e33. <https://doi.org/10.14440/bladder.2018.582>
- Simpson, C.S., Johnston, H.M., Morris, B.J., 1994. Neuronal expression of protease-nexin 1 mRNA in rat brain. *Neurosci Lett* 170, 286–290. [https://doi.org/10.1016/0304-3940\(94\)90339-5](https://doi.org/10.1016/0304-3940(94)90339-5)
- Skowrońska, K., Obara-Michlewska, M., Zielińska, M., Albrecht, J., 2019. NMDA Receptors in Astrocytes: In Search for Roles in Neurotransmission and Astrocytic Homeostasis. *Int J Mol Sci* 20, 309. <https://doi.org/10.3390/ijms20020309>
- Soreq, H., Miskin, R., 1981. Secreted proteins in the medium of microinjected *Xenopus* oocytes are degraded by oocyte proteases. *FEBS Letters* 128, 305–310. [https://doi.org/10.1016/0014-5793\(81\)80104-4](https://doi.org/10.1016/0014-5793(81)80104-4)
- Sparapani, S., Millet-Boureima, C., Oliver, J., Mu, K., Hadavi, P., Kalostian, T., Ali, N., Avelar, C.M., Bardies, M., Barrow, B., Benedikt, M., Biancardi, G., Bindra, R., Bui, L., Chihab, Z., Cossitt, A., Costa, J., Daigneault, T., Dault, J., Davidson, I., Dias, J., Dufour, E., El-Khoury, S., Farhangdoost, N., Forget, A., Fox, A., Gebrael, M., Gentile, M.C., Geraci, O., Gnanapragasam, A., Gomah, E., Haber, E., Hamel, C., Iyanker, T., Kalantzis, C., Kamali, S., Kassardjian, E., Kontos, H.K., Le, T.B.U., LoScerbo, D., Low, Y.F., Mac Rae, D., Maurer, F., Mazhar, S., Nguyen, A., Nguyen-Duong, K., Osborne-Laroche, C., Park, H.W., Parolin, E., Paul-Cole, K., Peer, L.S., Philippon, M., Plaisir, C.-A., Porras Marroquin, J., Prasad, S., Ramsarun, R., Razzaq, S., Rhainds, S., Robin, D., Scartozzi, R., Singh, D., Fard, S.S., Soroko, M., Soroori Motlagh, N., Stern, K., Toro, L., Toure, M.W., Tran-Huynh, S., Trépanier-Chicoine, S., Waddingham, C., Weekes, A.J., Wisniewski, A., Gamberi, C., 2021. The Biology of Vasopressin. *Biomedicines* 9, 89. <https://doi.org/10.3390/biomedicines9010089>
- Speakman, J.R., 2014. If Body Fatness is Under Physiological Regulation, Then How Come We Have an Obesity Epidemic? *Physiology* 29, 88–98. <https://doi.org/10.1152/physiol.00053.2013>
- Sprengers, E.D., Kluft, C., 1987. Plasminogen activator inhibitors. *Blood* 69, 381–387.
- Stan, R. v., 2007. Endothelial stomatal and fenestral diaphragms in normal vessels and angiogenesis. *Journal of Cellular and Molecular Medicine* 11, 621–643. <https://doi.org/10.1111/j.1582-4934.2007.00075.x>

- Stefanitsch, C., Lawrence, A.-L.E., Olverling, A., Nilsson, I., Fredriksson, L., 2015. tPA Deficiency in Mice Leads to Rearrangement in the Cerebrovascular Tree and Cerebroventricular Malformations. *Frontiers in Cellular Neuroscience* 9.
- Stevenson, T.K., Lawrence, D.A., 2018a. Characterization of Tissue Plasminogen Activator Expression and Trafficking in the Adult Murine Brain. *eNeuro* 5, ENEURO.0119-18.2018. <https://doi.org/10.1523/ENEURO.0119-18.2018>
- Stevenson, T.K., Lawrence, D.A., 2018b. Characterization of Tissue Plasminogen Activator Expression and Trafficking in the Adult Murine Brain. *eNeuro* 5, 1–18. <https://doi.org/10.1523/ENEURO.0119-18.2018>
- Stroebel, D., Casado, M., Paoletti, P., 2018. Triheteromeric NMDA receptors: from structure to synaptic physiology. *Curr Opin Physiol* 2, 1–12. <https://doi.org/10.1016/j.cophys.2017.12.004>
- Su, E.J., Fredriksson, L., Geyer, M., Folestad, E., Cale, J., Andrae, J., Gao, Y., Pietras, K., Mann, K., Yepes, M., Strickland, D.K., Betsholtz, C., Eriksson, U., Lawrence, D.A., 2008. Activation of PDGF-CC by Tissue Plasminogen Activator Impairs Blood Brain Barrier Integrity During Ischemic Stroke. *Nat Med* 14, 731–737. <https://doi.org/10.1038/nm1787>
- Suh-Lailam, B.B., Haven, T.R., Copple, S.S., Knapp, D., Jaskowski, T.D., Tebo, A.E., 2013. Anti-NMDA-receptor antibody encephalitis: Performance evaluation and laboratory experience with the anti-NMDA-receptor IgG assay. *Clinica Chimica Acta* 421, 1–6. <https://doi.org/10.1016/j.cca.2013.02.010>
- Sunagawa, G.A., Takahashi, M., 2016. Hypometabolism during Daily Torpor in Mice is Dominated by Reduction in the Sensitivity of the Thermoregulatory System. *Sci Rep* 6, 37011. <https://doi.org/10.1038/srep37011>
- Suzuki, Y., Nagai, N., Umemura, K., Collen, D., Lijnen, H.R., 2007. Stromelysin-1 (MMP-3) is critical for intracranial bleeding after t-PA treatment of stroke in mice. *J Thromb Haemost* 5, 1732–1739. <https://doi.org/10.1111/j.1538-7836.2007.02628.x>
- Swoap, S.J., Weinshenker, D., 2008. Norepinephrine Controls Both Torpor Initiation and Emergence via Distinct Mechanisms in the Mouse. *PLoS One* 3, e4038. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0004038>
- Szabo, R., Samson, A.L., Lawrence, D.A., Medcalf, R.L., Bugge, T.H., 2016. Passenger mutations and aberrant gene expression in congenic tissue plasminogen activator-deficient mouse strains. *J Thromb Haemost* 14, 1618–1628. <https://doi.org/10.1111/jth.13338>
- Szczepanska-Sadowska, E., Czarzasta, K., Cudnoch-Jedrzejewska, A., 2018. Dysregulation of the Renin-Angiotensin System and the Vasopressinergic System Interactions in Cardiovascular Disorders. *Curr Hypertens Rep* 20, 19. <https://doi.org/10.1007/s11906-018-0823-9>
- Takahashi, K., Hiraishi, K., Hirose, T., Kato, I., Yamamoto, H., Shoji, I., Shibasaki, A., Kaneko, K., Satoh, F., Totsune, K., 2010. Expression of (pro)renin receptor in the human brain and pituitary, and co-localisation with arginine vasopressin and oxytocin in the hypothalamus. *J Neuroendocrinol* 22, 453–459. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2826.2010.01980.x>
- Tan, P.S.P., Killinger, S., Horiuchi, J., Dampney, R.A.L., 2007. Baroreceptor reflex modulation by circulating angiotensin II is mediated by AT1 receptors in the nucleus tractus solitarius. *Am*

- J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 293, R2267-2278. <https://doi.org/10.1152/ajpregu.00267.2007>
- Tang, H.-N., Tang, C.-Y., Man, X.-F., Tan, S.-W., Guo, Y., Tang, J., Zhou, C.-L., Zhou, H.-D., 2017. Plasticity of adipose tissue in response to fasting and refeeding in male mice. *Nutr Metab (Lond)* 14, 3. <https://doi.org/10.1186/s12986-016-0159-x>
- Tao, Y.-X., 2010. The Melanocortin-4 Receptor: Physiology, Pharmacology, and Pathophysiology. *Endocrine Reviews* 31, 506–543. <https://doi.org/10.1210/er.2009-0037>
- Taylor, K., Jones, E.B., 2022. Adult Dehydration, in: StatPearls. StatPearls Publishing, Treasure Island (FL).
- Thaler, J.P., Yi, C.-X., Schur, E.A., Guyenet, S.J., Hwang, B.H., Dietrich, M.O., Zhao, X., Sarruf, D.A., Izgur, V., Maravilla, K.R., Nguyen, H.T., Fischer, J.D., Matsen, M.E., Wisse, B.E., Morton, G.J., Horvath, T.L., Baskin, D.G., Tschöp, M.H., Schwartz, M.W., 2012. Obesity is associated with hypothalamic injury in rodents and humans. *J Clin Invest* 122, 153–162. <https://doi.org/10.1172/JCI59660>
- Thiebaut, A.M., Gauberti, M., Ali, C., Martinez De Lizarrondo, S., Vivien, D., Yepes, M., Roussel, B.D., 2018. The role of plasminogen activators in stroke treatment: fibrinolysis and beyond. *Lancet Neurol* 17, 1121–1132. [https://doi.org/10.1016/S1474-4422\(18\)30323-5](https://doi.org/10.1016/S1474-4422(18)30323-5)
- Thorens, B., 2015. GLUT2, glucose sensing and glucose homeostasis. *Diabetologia* 58, 221–232. <https://doi.org/10.1007/s00125-014-3451-1>
- Timper, K., Brüning, J.C., 2017. Hypothalamic circuits regulating appetite and energy homeostasis: pathways to obesity. *Dis Model Mech* 10, 679–689. <https://doi.org/10.1242/dmm.026609>
- Titulaer, M.J., McCracken, L., Gabilondo, I., Armangué, T., Glaser, C., Iizuka, T., Honig, L.S., Benseler, S.M., Kawachi, I., Martinez-Hernandez, E., Aguilar, E., Gresa-Arribas, N., Ryan-Florance, N., Torrents, A., Saiz, A., Rosenfeld, M.R., Balice-Gordon, R., Graus, F., Dalmau, J., 2013a. Treatment and prognostic factors for long-term outcome in patients with anti-N-Methyl-D-Aspartate (NMDA) receptor encephalitis: a cohort study. *Lancet Neurol* 12, 157–165. [https://doi.org/10.1016/S1474-4422\(12\)70310-1](https://doi.org/10.1016/S1474-4422(12)70310-1)
- Titulaer, M.J., McCracken, L., Gabilondo, I., Iizuka, T., Kawachi, I., Bataller, L., Torrents, A., Rosenfeld, M.R., Balice-Gordon, R., Graus, F., Dalmau, J., 2013b. Late-onset anti-NMDA receptor encephalitis. *Neurology* 81, 1058–1063. <https://doi.org/10.1212/WNL.0b013e3182a4a49c>
- Torres, R., Firestein, B.L., Dong, H., Staudinger, J., Olson, E.N., Haganir, R.L., Bredt, D.S., Gale, N.W., Yancopoulos, G.D., 1998. PDZ Proteins Bind, Cluster, and Synaptically Colocalize with Eph Receptors and Their Ephrin Ligands. *Neuron* 21, 1453–1463. [https://doi.org/10.1016/S0896-6273\(00\)80663-7](https://doi.org/10.1016/S0896-6273(00)80663-7)
- Tran, L.T., Park, S., Kim, S.K., Lee, J.S., Kim, K.W., Kwon, O., 2022. Hypothalamic control of energy expenditure and thermogenesis. *Exp Mol Med* 54, 358–369. <https://doi.org/10.1038/s12276-022-00741-z>
- Traynelis, S.F., Wollmuth, L.P., McBain, C.J., Menniti, F.S., Vance, K.M., Ogden, K.K., Hansen, K.B., Yuan, H., Myers, S.J., Dingledine, R., 2010. Glutamate Receptor Ion Channels:

- Structure, Regulation, and Function. *Pharmacol Rev* 62, 405–496. <https://doi.org/10.1124/pr.109.002451>
- Tsao, C.-H., Flint, J., Huang, G.-J., 2022. Influence of diurnal phase on behavioral tests of sensorimotor performance, anxiety, learning and memory in mice. *Sci Rep* 12, 432. <https://doi.org/10.1038/s41598-021-03155-5>
- Tsirka, S.E., Gualandris, A., Amaral, D.G., Strickland, S., 1995. Excitotoxin-induced neuronal degeneration and seizure are mediated by tissue plasminogen activator. *Nature* 377, 340–344. <https://doi.org/10.1038/377340a0>
- Tucker, L.B., McCabe, J.T., 2017. Behavior of Male and Female C57BL/6J Mice Is More Consistent with Repeated Trials in the Elevated Zero Maze than in the Elevated Plus Maze. *Frontiers in Behavioral Neuroscience* 11.
- Ulbrich, M.H., Isacoff, E.Y., 2008. Rules of engagement for NMDA receptor subunits. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105, 14163–14168. <https://doi.org/10.1073/pnas.0802075105>
- Ullah, R., Rauf, N., Nabi, G., Yi, S., Yu-Dong, Z., Fu, J., 2021. Mechanistic insight into high-fat diet-induced metabolic inflammation in the arcuate nucleus of the hypothalamus. *Biomedicine & Pharmacotherapy* 142, 112012. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2021.112012>
- Uriarte, M., De Francesco, P.N., Fernández, G., Castrogiovanni, D., D’Arcangelo, M., Imbernon, M., Cantel, S., Denoyelle, S., Fehrentz, J.-A., Praetorius, J., Prevot, V., Perello, M., 2021. Circulating ghrelin crosses the blood-cerebrospinal fluid barrier via growth hormone secretagogue receptor dependent and independent mechanisms. *Molecular and Cellular Endocrinology* 538, 111449. <https://doi.org/10.1016/j.mce.2021.111449>
- Valtin, H., Schroeder, H.A., 1964. Familial hypothalamic diabetes insipidus in rats (Brattleboro strain). *American Journal of Physiology-Legacy Content* 206, 425–430. <https://doi.org/10.1152/ajplegacy.1964.206.2.425>
- Van de Werf, F., Vanhaecke, J., de Geest, H., Verstraete, M., Collen, D., 1986. Coronary thrombolysis with recombinant single-chain urokinase-type plasminogen activator in patients with acute myocardial infarction. *Circulation* 74, 1066–1070. <https://doi.org/10.1161/01.CIR.74.5.1066>
- Van Drunen, R., Eckel-Mahan, K., 2021. Circadian Rhythms of the Hypothalamus: From Function to Physiology. *Clocks & Sleep* 3, 189–226. <https://doi.org/10.3390/clockssleep3010012>
- van Zonneveld, A.J., Veerman, H., Pannekoek, H., 1986. On the interaction of the kringle-2 domain of tissue-type plasminogen activator with fibrin. Inhibition of kringle-2 binding to fibrin by epsilon-amino caproic acid. *J Biol Chem* 261, 14214–14218.
- Vasilev, D., Havel, D., Liebscher, S., Slesiona-Kuenzel, S., Logothetis, N.K., Schenke-Layland, K., Totah, N.K., 2021. Three Water Restriction Schedules Used in Rodent Behavioral Tasks Transiently Impair Growth and Differentially Evoke a Stress Hormone Response without Causing Dehydration. *eNeuro* 8. <https://doi.org/10.1523/ENEURO.0424-21.2021>
- Venkatesan, A., Adatia, K., 2017. Anti-NMDA-Receptor Encephalitis: From Bench to Clinic. *ACS Chem. Neurosci.* 8, 2586–2595. <https://doi.org/10.1021/acscchemneuro.7b00319>

- Vieira, M., Yong, X.L.H., Roche, K.W., Anggono, V., 2020. Regulation of NMDA glutamate receptor functions by the GluN2 subunits. *Journal of Neurochemistry* 154, 121–143. <https://doi.org/10.1111/jnc.14970>
- Virji, M.A., Vassalli, J.D., Estensen, R.D., Reich, E., 1980. Plasminogen activator of islets of Langerhans: modulation by glucose and correlation with insulin production. *Proc Natl Acad Sci U S A* 77, 875–879.
- Virupakshaiah, A., Consolini, D., Bean, C., Elia, J., 2019. When Autoimmune Encephalitis masquerades as an Eating Disorder, two case reports on unique presentation of anti - NMDAR Encephalitis. (P2.2-016). *Neurology* 92.
- Vivien, D., Gauberti, M., Montagne, A., Defer, G., Touzé, E., 2011. Impact of tissue plasminogen activator on the neurovascular unit: from clinical data to experimental evidence. *J Cereb Blood Flow Metab* 31, 2119–2134. <https://doi.org/10.1038/jcbfm.2011.127>
- Vors, C., Nazare, J.-A., Michalski, M.-C., Laville, M., 2014. Intérêt de la phase postprandiale pour la santé de l'Homme. *Obésité* 9. <https://doi.org/10.1007/s11690-013-0410-9>
- Vyklicky, V., Korinek, M., Smejkalova, T., Balik, A., Krausova, B., Kaniakova, M., Lichnerova, K., Cerny, J., Krusek, J., Dittert, I., Horak, M., Vyklicky, L., 2014. Structure, Function, and Pharmacology of NMDA Receptor Channels. *Physiol Res* S191–S203. <https://doi.org/10.33549/physiolres.932678>
- Wagnon, I., Hélie, P., Bardou, I., Regnaud, C., Lesec, L., Leprince, J., Naveau, M., Delaunay, B., Toutirais, O., Lemauff, B., Etard, O., Vivien, D., Agin, V., Macrez, R., Maubert, E., Docagne, F., 2020. Autoimmune encephalitis mediated by B-cell response against N-methyl-d-aspartate receptor. *Brain* 143, 2957–2972. <https://doi.org/10.1093/brain/awaa250>
- Wang, L., Wang, F.-S., Gershwin, M.E., 2015. Human autoimmune diseases: a comprehensive update. *Journal of Internal Medicine* 278, 369–395. <https://doi.org/10.1111/joim.12395>
- Wang, Y.F., Tsirka, S.E., Strickland, S., Stieg, P.E., Soriano, S.G., 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. <https://doi.org/10.1038/nm0298-228>
- Warchoń, M., Krauss, H., Wojciechowska, M., Opala, T., Pięta, B., Żukiewicz-Sobczak, W., Kupsz, J., Grochowalska, A., 2014. The role of ghrelin, leptin and insulin in foetal development. *Ann Agric Environ Med*. 21, 349–352. <https://doi.org/10.5604/1232-1966.1108603>
- Wardlaw, J.M., Doubal, F.N., Valdes-Hernandez, M., Wang, X., Chappell, F.M., Shuler, K., Armitage, P.A., Carpenter, T.C., Dennis, M.S., 2013. Blood-brain barrier permeability and long-term clinical and imaging outcomes in cerebral small vessel disease. *Stroke* 44, 525–527. <https://doi.org/10.1161/STROKEAHA.112.669994>
- Warren, N., Siskind, D., O’Gorman, C., 2018a. Refining the psychiatric syndrome of anti-N-methyl-d-aspartate receptor encephalitis. *Acta Psychiatrica Scandinavica* 138, 401–408. <https://doi.org/10.1111/acps.12941>

- Warren, N., Siskind, D., O’Gorman, C., 2018b. Refining the psychiatric syndrome of anti-N-methyl-d-aspartate receptor encephalitis. *Acta Psychiatrica Scandinavica* 138, 401–408. <https://doi.org/10.1111/acps.12941>
- Washburn, H.R., Xia, N.L., Zhou, W., Mao, Y.-T., Dalva, M.B., 2020. Positive surface charge of GluN1 N-terminus mediates the direct interaction with EphB2 and NMDAR mobility. *Nat Commun* 11, 570. <https://doi.org/10.1038/s41467-020-14345-6>
- Watanabe, M., Inoue, Y., Sakimura, K., Mishina, M., 1992. Developmental changes in distribution of NMDA receptor channel subunit mRNAs. *Neuroreport* 3, 1138–1140. <https://doi.org/10.1097/00001756-199212000-00027>
- Waterson, M.J., Horvath, T.L., 2015. Neuronal Regulation of Energy Homeostasis: Beyond the Hypothalamus and Feeding. *Cell Metabolism* 22, 962–970. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2015.09.026>
- Watkins, C.J., Pei, Q., Newberry, N.R., 1998. Differential effects of electroconvulsive shock on the glutamate receptor mRNAs for NR2A, NR2B and mGluR5b. *Molecular Brain Research* 61, 108–113. [https://doi.org/10.1016/S0169-328X\(98\)00211-3](https://doi.org/10.1016/S0169-328X(98)00211-3)
- Watkins, J.C., Evans, R.H., 1981. Excitatory amino acid transmitters. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 21, 165–204. <https://doi.org/10.1146/annurev.pa.21.040181.001121>
- Watts, A.G., 2017. Great Expectations: Anticipatory Control of Magnocellular Vasopressin Neurons. *Neuron* 93, 1–2. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2016.12.033>
- Wee, K.S.-L., Zhang, Y., Khanna, S., Low, C.-M., 2008. Immunolocalization of NMDA receptor subunit NR3B in selected structures in the rat forebrain, cerebellum, and lumbar spinal cord. *J Comp Neurol* 509, 118–135. <https://doi.org/10.1002/cne.21747>
- Weimar, W., Stibbe, J., van Seyen, A.J., Billiau, A., De Somer, P., Collen, D., 1981. Specific lysis of an iliofemoral thrombus by administration of extrinsic (tissue-type) plasminogen activator. *Lancet* 2, 1018–1020. [https://doi.org/10.1016/s0140-6736\(81\)91217-4](https://doi.org/10.1016/s0140-6736(81)91217-4)
- Whalley, K., 2021. Investigating curiosity. *Nat Rev Neurosci* 22, 386–387. <https://doi.org/10.1038/s41583-021-00480-6>
- Wilke, J.B.H., Hindermann, M., Berghoff, S.A., Zihlsler, S., Arinrad, S., Ronnenberg, A., Barnkothe, N., Steixner-Kumar, A.A., Röglin, S., Stöcker, W., Hollmann, M., Nave, K.-A., Lühder, F., Ehrenreich, H., 2021. Autoantibodies against NMDA receptor 1 modify rather than cause encephalitis. *Mol Psychiatry* 26, 7746–7759. <https://doi.org/10.1038/s41380-021-01238-3>
- Willard, S.S., Koochekpour, S., 2013. Glutamate, glutamate receptors, and downstream signaling pathways. *Int J Biol Sci* 9, 948–959. <https://doi.org/10.7150/ijbs.6426>
- Willis, C.L., Garwood, C.J., Ray, D.E., 2007. A size selective vascular barrier in the rat area postrema formed by perivascular macrophages and the extracellular matrix. *Neuroscience* 150, 498–509. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2007.09.023>
- Wollmuth, L.P., Chan, K., Groc, L., 2021. The diverse and complex modes of action of anti-NMDA receptor autoantibodies. *Neuropharmacology* 194, 108624. <https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2021.108624>



- Wong, R., 2006. NMDA receptors expressed in oligodendrocytes. *BioEssays* 28, 460–464. <https://doi.org/10.1002/bies.20402>
- Wright, S., Hashemi, K., Stasiak, L., Bartram, J., Lang, B., Vincent, A., Upton, A.L., 2015. Epileptogenic effects of NMDAR antibodies in a passive transfer mouse model. *Brain* 138, 3159–3167. <https://doi.org/10.1093/brain/awv257>
- Yaron, J.R., Zhang, L., Guo, Q., Haydel, S.E., Lucas, A.R., 2021. Fibrinolytic Serine Proteases, Therapeutic Serpins and Inflammation: Fire Dancers and Firestorms. *Front Cardiovasc Med* 8, 648947. <https://doi.org/10.3389/fcvm.2021.648947>
- Yepes, M., Sandkvist, M., Moore, E.G., Bugge, T.H., Strickland, D.K., Lawrence, D.A., 2003. Tissue-type plasminogen activator induces opening of the blood-brain barrier via the LDL receptor-related protein. *J Clin Invest* 112, 1533–1540. <https://doi.org/10.1172/JCI19212>
- Yetim, M., 2021. Rôle neurovasculaire de l'activateur tissulaire du plasminogène (phdthesis). Normandie Université.
- Yin, W., Gore, A.C., 2010. The Hypothalamic Median Eminence and its Role in Reproductive Aging. *Ann N Y Acad Sci* 1204, 113–122. <https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.2010.05518.x>
- Yoshimura, N., Chancellor, M.B., 2004. Differential Diagnosis and Treatment of Impaired Bladder Emptying. *Rev Urol* 6, S24–S31.
- Young, H.A., Cousins, A., Johnston, S., Fletcher, J.M., Benton, D., 2019. Autonomic adaptations mediate the effect of hydration on brain functioning and mood: Evidence from two randomized controlled trials. *Sci Rep* 9, 16412. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-52775-5>
- Yu, C., Gershwin, M.E., Chang, C., 2014. Diagnostic criteria for systemic lupus erythematosus: A critical review. *Journal of Autoimmunity, Diagnostic Criteria in Autoimmune Diseases* 48–49, 10–13. <https://doi.org/10.1016/j.jaut.2014.01.004>
- Zandi, M.S., Irani, S.R., Lang, B., Waters, P., Jones, P.B., McKenna, P., Coles, A.J., Vincent, A., Lennox, B.R., 2011. Disease-relevant autoantibodies in first episode schizophrenia. *J Neurol* 258, 686–688. <https://doi.org/10.1007/s00415-010-5788-9>
- Zandi, M.S., Paterson, R.W., Ellul, M.A., Jacobson, L., Al-Diwani, A., Jones, J.L., Cox, A.L., Lennox, B., Stamelou, M., Bhatia, K.P., Schott, J.M., Coles, A.J., Kullmann, D.M., Vincent, A., 2015. Clinical relevance of serum antibodies to extracellular N-methyl-d-aspartate receptor epitopes. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 86, 708–713. <https://doi.org/10.1136/jnnp-2014-308736>
- Zerwas, S., Larsen, J.T., Petersen, L., Thornton, L.M., Quaranta, M., Koch, S.V., Pisetsky, D., Mortensen, P.B., Bulik, C.M., 2017. Eating Disorders, Autoimmune, and Autoinflammatory Disease. *Pediatrics* 140, e20162089. <https://doi.org/10.1542/peds.2016-2089>
- Zhao, J.-J., Liu, Z.-W., Wang, B., Huang, T.-Q., Guo, D., Zhao, Y.-L., Song, J.-N., 2020. Inhibiting endogenous tissue plasminogen activator enhanced neuronal apoptosis and axonal injury after traumatic brain injury. *Neural Regen Res* 15, 667–675. <https://doi.org/10.4103/1673-5374.266914>

- Zheng, Z., Nayak, L., Wang, W., Yurdagul, A., Wang, X., Cai, B., Lapping, S., Ozcan, L., Ramakrishnan, R., Pestell, R.G., Jain, M.K., Tabas, I., 2019. An ATF6-tPA pathway in hepatocytes contributes to systemic fibrinolysis and is repressed by DACH1. *Blood* 133, 743–753. <https://doi.org/10.1182/blood-2018-07-864843>
- Zhuo, M., Holtzman, D.M., Li, Y., Osaka, H., DeMaro, J., Jacquin, M., Bu, G., 2000. Role of tissue plasminogen activator receptor LRP in hippocampal long-term potentiation. *J Neurosci* 20, 542–549.
- Zihni, C., Mills, C., Matter, K., Balda, M.S., 2016. Tight junctions: from simple barriers to multifunctional molecular gates. *Nat Rev Mol Cell Biol* 17, 564–580. <https://doi.org/10.1038/nrm.2016.80>





## Résumé :

L'hypothalamus est une région cérébrale agissant comme le centre de contrôle et de coordination qui régit l'homéostasie corporelle. Dans cette étude nous nous sommes intéressés à deux aspects fonctionnels de l'hypothalamus, l'homéostasie énergétique et le contrôle de l'équilibre hydrominéral. Dans un premier temps nous avons étudié les perturbations neuroendocrines dans un nouveau modèle murin d'encéphalite autoimmune à anticorps anti-RNMDA développé dans notre laboratoire. Dans un second temps nous avons étudié les effets d'une déficience en activateur tissulaire du plasminogène (tPA) sur le contrôle de l'équilibre hydrominéral dans une nouvelle souche déficiente en tPA développée par notre laboratoire (tPA<sup>Null</sup>).

Nous montrons dans le modèle murin d'encéphalite autoimmune anti-RNMDA les premiers éléments révélant la présence du récepteur NMDA tanycytaires ; à la fois grâce à une étude par qPCR réalisée sur des populations de tanocytes obtenues par tri cellulaire, et sur les tanocytes de l'éminence médiane par immunohistofluorescence. L'utilisation des cages métaboliques a permis de mettre en évidence pour la première fois des troubles de la prise alimentaire et de la régulation du métabolisme énergétique chez les animaux EAI-RNMDA.

Nous montrons chez les animaux tPA WT l'expression et la présence de la protéine du tPA dans les populations neuronales vasopressinergiques (AVP) des noyaux paraventriculaire et supraoptique de l'hypothalamus. La protéase est aussi observée dans les terminaisons nerveuses des neurones à AVP projetant dans la neurohypophyse. Une étude métabolique a révélé que les souris tPA<sup>Null</sup> présentent un comportement de polydipsie, une osmolarité plasmatique et urinaire comparable à celles des animaux WT, ainsi qu'une miction normale. Après une privation hydrique entraînant une déshydratation, les animaux tPA<sup>Null</sup> montrent une diminution de l'osmolarité urinaire, une diminution du volume mictionnel et une augmentation de la pression artérielle en comparaison avec les animaux tPA WT.

Mes travaux de thèse apportent de nouveaux éléments quant aux effets physiopathologiques de l'EAI-RNMDA dans le fonctionnement du métabolisme énergétique. Ils ont également confirmé les observations réalisées chez les animaux tPA KO quant à la déficience en tPA et son rôle dans le contrôle de l'équilibre hydrominéral.

**Mots clés :** encéphalite, métabolisme, hypothalamus, activateur tissulaire du plasminogène, équilibre hydrominéral

## Abstract:

Hypothalamus is a brain region acting as the control and coordination center that regulates body homeostasis. In this study we focused on two functional aspects of the hypothalamus, energy homeostasis and hydromineral balance. First, we studied neuroendocrine disturbances in a new mouse model of anti-RNMDA autoimmune encephalitis developed in our laboratory. In a second step, we studied the effects of a deficiency in tissue plasminogen activator on the hydromineral balance in a strain newly developed by our laboratory (tPA<sup>Null</sup>).

We show in the mouse model of AIE-NMDAR first evidence of the presence of tanycytic NMDA receptor; both through a qPCR study performed on tanocyte populations obtained by cell sorting, and on median eminence tanocytes by immunohistofluorescence. The use of metabolic cages revealed for the first-time disturbances of food intake and regulation of energy metabolism in AIE-NMDAR animals.

We show in tPA WT animals the expression and presence of the tPA protein in vasopressin neuronal populations (AVP) of the paraventricular and supraoptic nuclei of the hypothalamus. The protease is also observed in the nerve terminals of AVP neurons projecting into the neurohypophysis. A metabolic study reveals polydipsia, physiological plasma and urine osmolarity, and normal urinary behavior in tPA<sup>Null</sup> mice. After water deprivation leading to dehydration, tPA<sup>Null</sup> animals show a decrease in urinary osmolarity, as well as in urine volume and an increase in blood pressure compared to tPA WT animals.

My thesis work provides new insights into the pathophysiological effects of anti-NMDAR autoimmune encephalitis on energy metabolism functions. It also confirmed the observations made in tPA KO animals regarding tPA deficiency and its role in body water balance.

**Key words:** encephalitis, metabolism, hypothalamus, tissue plasminogen activator, hydromineral balance