



**HAL**  
open science

# Activateur tissulaire du plasminogène (tPA) neuronal : implications dans la modulation des réseaux perineuronaux (PNNs) et la physiopathologie des accidents vasculaires cérébraux (AVC) ischémiques

Paul Prunotto

## ► To cite this version:

Paul Prunotto. Activateur tissulaire du plasminogène (tPA) neuronal : implications dans la modulation des réseaux perineuronaux (PNNs) et la physiopathologie des accidents vasculaires cérébraux (AVC) ischémiques. Médecine humaine et pathologie. Normandie Université, 2023. Français. NNT : 2023NORMC417 . tel-04326242

**HAL Id: tel-04326242**

**<https://theses.hal.science/tel-04326242>**

Submitted on 6 Dec 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



UNIVERSITÉ  
CAEN  
NORMANDIE

## THÈSE

Pour obtenir le diplôme de doctorat

Spécialité ASPECTS MOLECULAIRES ET CELLULAIRES DE LA BIOLOGIE

Préparée au sein de l'Université de Caen Normandie

**Activateur tissulaire du plasminogène (tPA) neuronal :  
implications dans la modulation des réseaux perineuronaux  
(PNNs) et la physiopathologie des accidents vasculaires cérébraux  
(AVC) ischémiques**

Présentée et soutenue par  
**PAUL PRUNOTTO**

**Thèse soutenue le 21/11/2023  
devant le jury composé de**

MME MARIE-CHRISTINE BOUTON	Directrice de recherche, Sorbonne Université	Rapporteur du jury
MME EMMANUELLE CANET-SOULAS	Professeur des universités, INSERM - CarMeN - IRIS - Groupement hospitalier BRON	Rapporteur du jury
M. GILLES BONVENTO	Directeur de recherche, INSERM MIRCEN CEA-Fontenay- aux-Roses	Membre du jury
M. BRUNO CAULI	Directeur de recherche au CNRS, CNRS - Sorbonne Université	Membre du jury
M. DENIS VIVIEN	Professeur des universités PraticienHosp, Université de Caen Normandie	Président du jury
MME CARINE ALI	Professeur des universités, Université de Caen Normandie	Directeur de thèse

**Thèse dirigée par CARINE ALI (Physiopathologie et imagerie des troubles  
neurologiques)**



Normande de Biologie Intégrative,  
Santé, Environnement

PhIND



PHYSIOPATHOLOGY  
& IMAGING OF  
NEUROLOGICAL DISORDERS



## Remerciements

Avant tout, je tiens à exprimer ma profonde gratitude envers l'ensemble du jury de cette thèse pour avoir partagé avec moi, leur expertise respective. Je souhaite tout particulièrement remercier chaleureusement les deux rapportrices, Madame **Marie-Christine Bouton** et Madame **Emmanuelle Canet-Soulas**, pour le temps précieux qu'elles ont consacré à la lecture du manuscrit et à la rédaction de leurs rapports. Merci d'avance pour les échanges le jour de la soutenance. Je tiens également à exprimer ma sincère reconnaissance envers les deux examinateurs externes, à savoir Monsieur **Bruno Cauli** et Monsieur **Gilles Bonvent** pour leur contribution à la discussion lors de la soutenance de ma thèse. Bruno, je tiens également à te remercier pour ton implication et au cours de ces trois années lors de mes CSI.

Je souhaiterais bien sûr remercier **Denis Vivien** pour son accueil dans le laboratoire depuis mon stage de Master 1 et jusqu'à présent. Merci pour avoir été toujours présent, que ce soit lors de nos réunions, par le biais des échanges par mail, ou simplement dans les couloirs, toujours désireux de suivre l'évolution du projet et surtout d'anticiper la suite (parfois même plusieurs fois par jour). Merci pour m'avoir fait confiance sur le design de certaines manips et les analyses des données. Je tiens également à te remercier pour ton aide dans ma recherche d'emploi.

J'aimerais bien évidemment remercier ma directrice de Thèse, la *grande* **Pr Carine Ali** (plus jeune Pr de France et de Navarre). Evidemment. Toi aussi depuis le M1, et plus particulièrement dès les premières semaines de cours où tu as réussi à trouver les bons mots pour me motiver à continuer dans cette voie. La passerelle psychologie – biologie n'a pas été simple et même si au départ je pensais que les protéines c'était pour gonfler à la muscu, et bien aujourd'hui je suis fière de tout le chemin que l'on a fait ensemble, à étudier notre protéine fétiche. Tu m'as fait évoluer sur le plan scientifique bien sûr mais également personnel, où j'ai gagné en maturité. Je vais profiter de cette page de remerciements pour

m'excuser aussi pour mon caractère, rude, qui a pu compliquer les choses, parfois. Merci d'avoir surmonté mes défauts afin que tout se passe bien et que l'on réussisse ensemble à écrire une belle histoire sur le tPA. Les résultats « positifs » ont bien pris leur temps pour arriver mais je ne crois pas t'avoir vu inquiète à ce propos, ce qui sûrement me rassurait un peu. Merci aussi Carine pour les bons moments passés à l'extérieur, à Munich par exemple ou encore les barbecues/raclettes chez toi ! J'espère qu'on gardera contact, puisqu'à compter du 21 novembre 2023 tu ne seras plus ma directrice de thèse mais une amie, sur qui je pourrais compter (la réciproque est vraie).

Je souhaiterai aussi remercier mes collègues avec qui j'ai pu partager ces 5 années de travail et de bons moments. Je voudrais dire merci à **Quentin, Jonathane, Florent, Erwan** et mon bon vieux **Lucien** qui m'a bien manqué durant cette thèse. Merci à mes camarades du bureau C047, avant qu'il ne devienne ce qui est aujourd'hui (paix à son âme), **Mervé, Fanny, Eloise L.** Merci aussi à **Yannick, Laurent** pour leurs participations dans le projet et plus particulièrement à Yannick pour les discussions, les marches solennelles vers le A2 et les visites de routine dans ce bunker. Merci aussi à **Marion** et **Jean-Michel** pour leur bonne humeur. Merci aussi à mes nouveaux camarades du bureaux C048 : **Swannie, Audrey P, Marion M, Célia** (et **Amaury** comme t'es souvent là aussi), **Myriam** et **Elsa** pour l'ambiance quotidienne au bureau et pour l'asile que vous m'avez offert. Merci à **Camille** et **Mathys** (vive le Newport), **Louis, Mélanie, Anne-Cécile, Zita** pour les bons moments passés à rigoler et à parler de tout, de rien et de manip. Merci **Pauline** également pour ton aide dans les manip. Merci aussi aux anciens/anciennes (coups durs) **Audrey T, Héloïse L, Nénette, Damien** pour leur soutien palpable. Je pourrais aussi vous mettre dans cette catégorie **Sara** et **Matthieu** mais je voudrais aussi vous remercier pour votre encadrement de mon M2 et pour les transmissions technico-scientifiques. Merci aussi à **Arthur** et à **Christophe** de l'équipe EA pour les petits mots dans les couloirs. Merci aux personnels du CURB pour leur aide tout au long du projet et leur bonne humeur : **Bruno, Stéphane, Charlène, Claudine, Charlotte, Céline, Séverine**. Merci également aux titulaires avec qui j'ai pu passer des bons moments, scientifiques ou non. Merci aussi à l'équipe de tennis corpo du Ganil (**Pascal,**

**Gaétan, Joy, Nicolas et Fanny** et les autres partenaires de double) pour les bons moments de sport qui m'ont bien changé les idées.

Petit paragraphe pour mes amis d'enfance **Rémi, Matéo et Raphael** et les autres, perdus de vue... J'ai entendu, lors des remerciements d'une précédente thèse, une phrase qui a résonné en moi : « *Vous êtes de bien meilleurs amis avec moi que je le suis avec vous* ». Finalement je crois que ça a été le cas pour moi aussi, mais je vous assure que je vais me rattraper, car je tiens à vous. Merci pour votre soutien durant cette période, alors que vous vous demandiez ce que je faisais de mes journées....

J'aimerai aussi remercier **David, Mime, Pascale et Ange** pour leur soutien au cours de ces deux dernières années, la plupart du temps pendant les repas de famille du dimanche. Merci aussi à **Lucie et Hugues** pour ces mêmes bons moments partagés (et les apéros).

Merci aussi à mes grands-parents, que je n'appelle pas suffisamment mais qui je sais m'ont soutenu également pendant cette période. Merci **Mamie Henriette, Papi Ernest, Huguette, grand-père Jacques et grand-mère Annie**. Je vous embrasse. Merci aussi à mon cousin **Marion** et ma cousine **Juliette** (bisous aussi à **Nico** et les enfants), à mes oncles et à mes tantes.

A présent j'aimerais remercier les membres de ma famille. Mes frères **Louis et Nathan** pour tous les moments pendant lesquels on s'est fendu la poire, à chaque retour à Tours. A nos conversations toujours intelligentes sur notre groupe *Aimé Jamel et Sabri*. D'ailleurs, à ce propos, je suis Sabri car je suis le plus grand ou ???????????? Merci pour notre playlist écoutée des millions de fois pendant les manips. J'espère que vous êtes fiers de votre grand frère.

C'est aussi avec une petite émotion que je voudrais remercier **mes parents**. Merci à vous de m'avoir accompagné (et financé) mes études depuis toutes ces années. Je suis sûr que si on vous avait dit quand j'étais au collège par exemple, que je ferais une thèse en Neurosciences vous auriez ri. Les profs aussi d'ailleurs. J'espère (mais je le sais) que vous êtes fiers de moi vous aussi. Je vous aime. Merci aussi à **Marina, Louanne et Alicia** pour tous les moments familiaux que l'on a pu passer, et à ceux que l'on passera à l'avenir dans votre nouvelle

maison. Merci aussi à toi **Fabrice**, pour les bons souvenirs mais surtout pour ta simplicité qui m'a permis à maintes reprises de me ressourcer.

Pour terminer, j'aimerais remercier **Fanny**. Pour tout. Pour les manip ensemble, les réflexions scientifiques, mais aussi tout le reste, qui est plus personnel et qui te sera écrit dans une version plus spéciale, pour la maison. Merci ma nini ♥.



## Avant-propos

Mon travail de thèse a été réalisé au sein de l'unité INSERM 1237, dirigée par le Pr. Denis Vivien, et supervisé par la Pr. Carine Ali, du 01 octobre 2020 au 21 novembre 2023. Deux grandes thématiques de recherches sont explorées au sein du laboratoire :

- Activateur tissulaire du plasminogène (tPA) et troubles neurovasculaires
- Mécanismes pathologiques et impact du mode de vie dans les troubles cérébraux

Au sein de la première thématique, trois axes sont développés

- Signalisation et nouvelles fonctions du tPA
- Recherches translationnelles neurovasculaires
- Imagerie cérébrale *in vivo*

Mes travaux de thèse s'inscrivent dans le premier axe de la première thématique et portent sur les rôles du tPA exprimé par les interneurons à parvalbumine dans la régulation des réseaux périneuronaux post-ischémie, ainsi que sur les rôles du tPA exprimé par des neurones corticaux lors de la phase aiguë des phénomènes excitotoxiques/ischémiques.

L'introduction de ma thèse comporte deux axes principaux : le premier concerne les accidents vasculaires cérébraux (AVC), en particulier les AVC ischémiques ; le deuxième explore l'histoire, l'expression et les fonctions du tPA au sein du système vasculaire et du parenchyme cérébral.

Les résultats de mes recherches seront présentés dans deux articles distincts. Le premier article, dans lequel j'ai contribué en tant que troisième auteur, a fait naître mon premier objectif de thèse, qui sera présenté dans la discussion 1. Le deuxième article, dont je suis l'auteur principal, sera présenté, puis discuté dans la discussion 2. Enfin, chaque discussion sera suivie d'une conclusion générale.

Pour finir, un article sera inséré dans la partie « autres travaux », et concerne une collaboration au sein du laboratoire.



# Table des matières

1.	Les accidents vasculaires cérébraux (AVC) ischémiques .....	1
1.1	Définition et épidémiologie.....	1
1.2	Étiologie de l'AVC ischémique .....	2
1.3	Les symptômes de l'AVC ischémique.....	4
1.4	Physiopathologie de l'AVC ischémique .....	6
1.4.1	Le déséquilibre ionique .....	7
1.4.2	L'excitotoxicité .....	7
1.4.3	Les processus inflammatoires et la neuroinflammation .....	9
1.4.4	L'ouverture de la BHE.....	11
1.4.5	L'apoptose.....	11
1.4.6	L'autophagie .....	12
1.5	Les facteurs de risque de l'AVC ischémique.....	13
1.6	Prise en charge et traitements de l'AVC ischémique .....	16
1.6.1	La thrombolyse par injection intraveineuse de tPA recombinant (r-tPA, Altéplase®).....	17
1.6.2	La thrombectomie .....	19
1.6.3	La rééducation et la réadaptation : accompagnement à long terme des patients	
	20	
2.	L'activateur tissulaire du plasminogène (tPA).....	23
2.1	Historique.....	23
2.2	Structures du tPA.....	26
2.2.1	Les deux formes du tPA.....	29

2.3	Les Inhibiteurs du tPA.....	30
2.3.1	La neuroserpine (NS).....	30
2.3.2	PAI-1.....	31
2.3.3	La protéase nexine 1 (PN-1).....	32
2.4	Expression périphérique du tPA.....	33
2.5	Expression du tPA au sein du système vasculaire.....	33
2.5.1	Rôles du tPA vasculaire dans la fibrinolyse.....	34
2.5.2	Rôle du tPA vasculaire dans le couplage neurovasculaire.....	36
2.5.3	Rôle du tPA vasculaire dans le maintien de la BHE.....	38
2.6	Expression du tPA au sein du système nerveux central (SNC).....	40
2.6.1	Expression du tPA par les astrocytes.....	41
2.6.2	Expression du tPA par les cellules microgliales.....	42
2.6.3	Expression du tPA par les oligodendrocytes.....	43
2.6.4	Expression du tPA par les neurones.....	43
2.7	Les fonctions du tPA au sein du SNC.....	48
2.7.1	Implication du tPA dans le développement cérébral et la migration cellulaire.....	48
2.7.2	tPA et substance blanche.....	50
2.7.3	tPA, traumatismes médullaires et lésions nerveuses.....	52
2.7.4	tPA et cognition.....	53
2.7.5	tPA et plasticité synaptique.....	54
2.7.6	tPA, inflammation et neuroinflammation.....	56
2.7.7	tPA et apoptose.....	59
2.7.8	tPA, récepteurs NMDA, transmission glutamatergique et excitotoxicité.....	61
2.7.9	tPA endogène : neurotoxique ou neuroprotecteur ?.....	65

Objectifs .....	68
<b>Résultats</b> .....	71
Contexte bibliographique de l'étude 1 .....	73
Principaux résultats obtenus .....	79
<b>Article 1</b> .....	80
Contexte bibliographique de l'étude 2 .....	113
Principaux outils utilisés .....	117
Principaux résultats obtenus .....	117
<b>Article 2</b> .....	118
<b>Discussion</b> .....	158
<b>Discussion résultats 1</b> .....	159
1.1 Quel(s) rôle(s) pour le tPA originaire des interneurons à PV dans la récupération fonctionnelle post-ischémie ? .....	160
1.1.1 Le tPA des interneurons à PV influence-t-il le débit sanguin cérébral post-AVC ischémique ?.....	161
1.1.2 Le tPA des interneurons à PV impacte-t-il le volume de lésion ischémique ? ...	162
1.1.3 Le tPA des interneurons à PV joue-t-il un rôle dans la récupération fonctionnelle post-AVC ?.....	163
1.1.3 Le tPA des interneurons à PV participe-t-il à la modification de la structure des PNNs ?.....	165
1.1.4 L'axe tPA-NMDA des interneurons à PV serait-il impliqué ? .....	171
1.1.5 Le flux calcique induit par stimulation au NMDA augmente de manière dépendant de la dose sur des cultures d'interneurones. ....	172
1.1.6 Le tPA potentialise l'influx calcique et la mort des interneurons induits par le NMDA .....	172

Conclusion générale sur les résultats 1.....	177
Discussion résultats 2.....	179
2.2 Quel(s) rôle(s) pour le tPA endogène aux neurones, à la phase aigüe des phénomènes excitotoxiques/ischémiques ?.....	179
2.2.1 Démasquer le tPA neuronal <i>in vivo</i> , un défi technique.....	179
2.2.2 L'expression du tPA par les neurones leur confère une résistance face à l'excitotoxicité.....	182
2.2.3 La délétion conditionnelle du tPA dans les neurones est délétère pour leur survie dans un contexte excitotoxique.....	185
2.2.4 Et dans un contexte ischémique ?.....	188
2.2.5 L'effet protecteur du tPA est-il sensible au phénotype neurochimique des neurones qui l'expriment ?.....	191
Conclusion générale sur les résultats 2 .....	193
Conclusion générale des travaux de thèse.....	194
Autres travaux .....	196
Bibliographie.....	211



## Index des figures et tableaux

Figure 1 : <u>Illustration des deux grands types d'AVC</u> .....	1
Figure 2 : <u>Incidence de l'AVC ischémique dans le monde</u> .....	2
Figure 3 : <u>Classification TOAST de l'étiologie des AVC ischémiques</u> .....	3
Figure 4 : <u>Illustration des symptômes de l'AVC ischémique, en fonction de la zone cérébrale touchée</u> .....	5
Figure 5 : <u>Campagne de sensibilisation aux signes cliniques des AVC</u> .....	6
Figure 6 : <u>Illustration chronologique simplifiée d'une partie de la physiopathologie de l'AVC ischémique</u> .....	10
Figure 7 : <u>Illustration des pratiques liées à un mode de vie sain pour une meilleure santé cardiovasculaire</u> .....	14
Figure 8 : <u>Les thrombi riches en plaquettes sont résistants à la thrombolyse intraveineuse par injection de r-tPA</u> .....	18
Figure 9 : <u>Résultats de l'étude clinique SWIFT DIRECT</u> .....	20
Figure 10 : <u>Processus de récupération post-AVC</u> .....	20
Figure 11 : <u>Histoire du tPA à travers les siècles</u> .....	25
Figure 12 : <u>Hybridation des sondes d'ADN complémentaire du tPA humain</u> .....	26
Figure 13 : <u>Structure du tPA et fonctions associées</u> .....	27
Figure 14 : <u>Oscillations circadiennes de la protéine PAI-1</u> .....	32
Figure 15 : <u>Le tPA peut être clairé par les hépatocytes</u> .....	34
Figure 16 : <u>Processus de la fibrinolyse endogène</u> .....	35
Figure 17 : <u>Le tPA est un acteur clé du couplage neurovasculaire</u> .....	37
Figure 18 : <u>Schéma illustrant les différents composants de la barrière hémato-encéphalique (BHE)</u> .....	39
Figure 19 : <u>Localisation de l'activité protéolytique du tPA dans le SNC chez la souris</u> .....	41
Figure 20 : <u>Recapture in vivo du tPA par les astrocytes</u> .....	42

Figure 21 : <u>Le tPA est exprimé par les neurones, stocké dans des vésicules à cœur dense dans les épines dendritiques.</u> .....	44
Figure 22 : <u>Immunodétection du tPA dans l'hippocampe et le cortex chez la souris adulte.</u> .....	45
Figure 23 : <u>Détection du tPA au sein des neurones corticaux chez la souris, avec ou sans traitement à la colchicine.</u> .....	46
Figure 24 : <u>L'injection de virus adéno-associés (AAV9) dans le cortex somatosensoriel primaire (S1BF) de souris adultes dévoile l'expression de tPA par des neurones inhibiteurs GABAergiques.</u> .....	47
Figure 25 : <u>Migration des cellules granulaires du cervelet chez des souris sauvages (A) et des souris n'exprimant plus le gène codant pour le tPA (B)</u> .....	49
Figure 26 : <u>Rôle du tPA et des récepteurs NMDA dans la migration des neuroblastes pendant la corticogénèse.</u> .....	50
Figure 27 : <u>Implication du tPA dans la physiopathologie de la sclérose en plaques chez la souris.</u> .....	51
Figure 28 : <u>Le tPA originaire de l'amygdale centrale est impliqué dans l'hyperactivité et l'anxiété.</u> .....	54
Figure 29 : <u>Illustration de l'augmentation rapide de l'expression d'ARN messager du tPA.</u>	55
Figure 30 : <u>Implication du tPA dans l'inflammation par ses effets sur la BHE.</u> .....	58
Figure 31 : <u>Le tPA protège les neurones de l'apoptose</u> .....	60
Figure 32 : <u>Les souris déficientes en tPA (tPA KO) sont résistantes à la mort neuronale excitotoxique.</u> .....	61
Figure 33 : <u>Le tPA potentialise l'influx calcique induit par le NMDA.</u> .....	63
Figure 34 : <u>Schéma représentant les trois principales classes d'interneurones au sein du néocortex chez la souris</u> .....	74
Figure 35 : <u>Structure des PNNs.</u> .....	76
Figure 36 : <u>Rôles des PNNs dans l'inhibition de la plasticité via trois mécanismes</u> .....	78
Tableau 1 : <u>Arguments en faveur d'un effet neurotoxique du tPA endogène dans l'excitotoxicité/l'ischémie cérébrale.</u> .....	110

Tableau 2 : <u>Arguments en faveur d'un effet neuroprotecteur du tPA endogène dans l'excitotoxicité/l'ischémie cérébrale</u> .....	112
Figure 37 : <u>Vue générale du protocole expérimental</u> .....	161
Figure 38 : <u>La délétion du tPA au sein des interneurons PV n'affecte pas la perfusion cérébrale 24 heures après l'induction d'un AVC thromboembolique</u> .....	162
Figure 39 : <u>La délétion du tPA originaire des interneurons PV n'influence pas le volume et l'étendue de la lésion ischémique</u> .....	163
Figure 40 : <u>Evaluation de la récupération fonctionnelle post-ischémie par le test d'agrippement (Grip Test)</u> .....	164
Figure 41 : <u>Illustration et quantifications des interneurons PV et des PNNs chez des souris WT et cKO, 24 heures après l'induction de l'AVC</u> .....	167
Figure 42 : <u>Illustrations et quantifications de la proportion de PNNs selon leur densité, 24 heures post-AVC</u> .....	168
Figure 43 : <u>Représentation graphique de l'augmentation de calcium intracellulaire induite par ajout de NMDA à dose croissante dans les cultures d'interneurons à DIV12</u> .....	172
Figure 44 : <u>Illustration du protocole d'imagerie par vidéo-microscopie calcique</u> .....	173
Figure 45 : <u>Le tPA potentialise l'influx calcique des neurones corticaux ainsi que des interneurons</u> .....	173
Figure 46 : <u>le tPA potentialise la mort des interneurons induite par NMDA in vitro</u> .....	174
Figure 47 : <u>Immunohistochimie et analyse en microscopie confocale et en microscopie par feuillet de lumière chez une souris Plat-IRES-Cre-eGFP</u> .....	181
Figure 48 : <u>Caractérisation de la lésion excitotoxique induite par l'injection intracorticale de NMDA à une concentration de 2.5 nanomoles</u> .....	183
Figure 49 : <u>Signal de fluorescence révélant deux phases temporelles distinctes de concentration de calcium intracellulaire suite à une occlusion permanente de l'artère cérébrale moyenne distale (dMCAO)</u> .....	184
Figure 50 : <u>Image IRM T2 et T1, représentative du volume de lésion induit par l'AVC ischémique (A) et quantifications associées (B)</u> .....	189



## Liste des abréviations

AAV	<i>Adeno-Associated Virus</i>
ACA	<i>Anterior Cerebral Artery</i>
ACM	Artère Cérébrale Moyenne
ADAMTS	<i>A Disintegrin And Metalloproteinase with Thrombospondin Motifs</i>
AMPA	<i><math>\alpha</math>-Amino-3-hydroxy-5-Methyl-4-isoxazolePropionic Acid</i>
AQP4	Aquaporine-4
ATD	<i>Amino Terminal Domain</i>
ATP	Adénosine Triphosphate
AVC	Accident Vasculaire Cérébral
BDNF	<i>Brain-Derived Neurotrophic Factor</i>
BHE	Barrière hémato-encéphalique
CAG	<i>Chicken <math>\beta</math>-actin/cytomegalovirus</i>
ChABC	Chondroïtinase ABC
CSPG	<i>Chondroitin Sulfate ProteoGlycans</i>
DAMPS	<i>Damage-Associated Molecular Patterns</i>
DS	Drip-and-Ship
DSC	Débit Sanguin Cérébral
EAE	<i>Experimental Autoimmune Encephalomyelitis</i>
EGF	Epidermal Growth Factor
EGM	Eminence ganglionnaire médiane
ERK	<i>Extracellular signal-Regulated Kinase</i>
GABA	<i>Gamma-AminoButyric Acid</i>

GFP	<i>Green Fluorescent Protein</i>
HA	<i>Hyaluronic acid</i>
IMC	Indice de Masse Corporelle
IRM	Imagerie par Résonance Magnétique
K1	<i>Kringle 1</i>
K2	<i>Kringle 2</i>
KO	<i>Knock-out</i>
LBD	<i>Lysine Binding Site</i>
LDH	Lactate Déshydrogénase
LPS	LipoPolySaccharide
LRP	<i>Low Density Lipoprotein Receptor-related Protein</i>
LTD	<i>Long-Term Depression</i>
LTP	<i>Long-Term Potentiation</i>
MCAO	<i>Middle Cerebral Artery Occlusion</i>
MMPs	<i>matrix metalloproteinases</i>
MS	Mother-Ship
NMDA	<i>N-Methyl-D-Aspartate</i>
NS	<i>Neuroserpin</i>
NTD	<i>N-terminal Domain</i>
PAI-1	<i>Plasminogen activator inhibitor type 1</i>
PCA	<i>Posterior cerebral artery</i>
PDGF-C	<i>Platelet-derived growth factor C</i>
PLAT	<i>Plasminogen activator tissue type</i>
PN1	<i>Protease Nexin 1</i>
PNNs	<i>Perineuronal Nets</i>

PV	Parvalbumine
r-tPA	<i>Recombinant-tissue type plasminogen activator</i>
sc-tPA	<i>Single-chain Tissue-type Plasminogen Activator</i>
SNC	Système Nerveux Central
SP	Sérine Protéase
SST	Somatostatine
tc-tPA	<i>Two-Chain Tissue-type Plasminogen Activator</i>
TMD	<i>Trans-Membrane Domain</i>
TNK	Tenecteplase
tPA	<i>Tissue-type Plasminogen Activator</i>
uPA	<i>Urokinase Plasminogen Activator</i>
VAMP-2	<i>Vesicle-associated membrane protein 2</i>
V-CAM1	<i>Vascular-Cell Adhesion Molecule 1</i>
VGlut	Vesicular Glutamate Transporter
VIP	<i>Vasoactive intestinal peptide</i>
WT	<i>Wild-type</i>



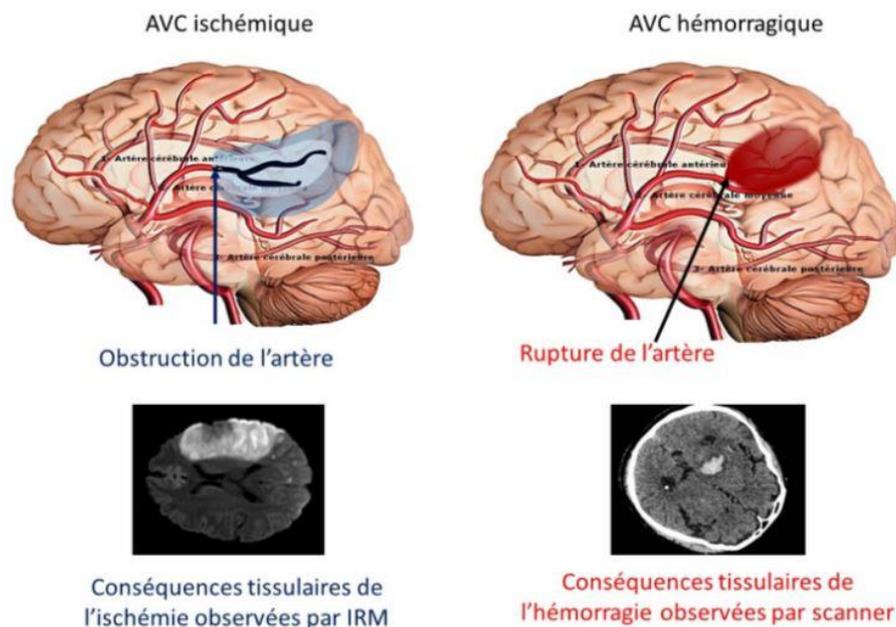
# Introduction

# 1. Les accidents vasculaires cérébraux (AVC) ischémiques

## 1.1 Définition et épidémiologie

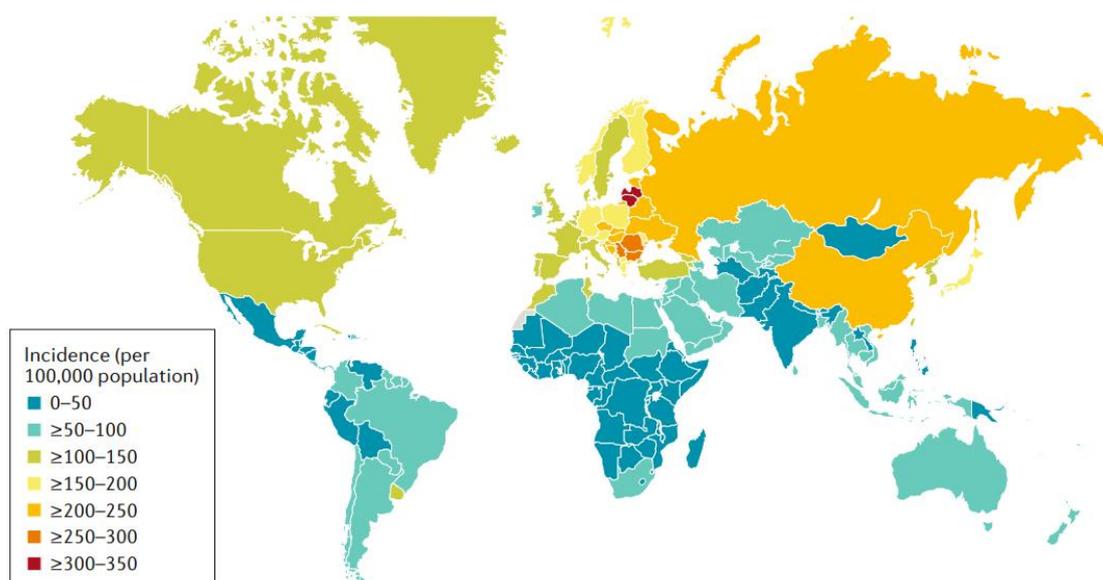
Les accidents vasculaires cérébraux (AVC ou en anglais : *stroke*) sont un ensemble d'atteintes neurologiques d'apparition soudaine, dont l'origine est une interruption de la circulation sanguine, causée par une obstruction (AVC ischémique, 80-85% des cas) ou une rupture (AVC hémorragique, 15-20% des cas) vasculaire (**Figure 1**). Bien que moins fréquents, les AVC hémorragiques induisent une mortalité et des déficits plus sévères que les AVC ischémiques.

Le terme AVC regroupe 5 pathologies : les infarctus cérébraux, les hémorragies cérébrales, les accidents ischémiques transitoires, les hémorragies sous arachnoïdiennes et les thromboses cérébrales.



**Figure 1 :** Illustration des deux grands types d'AVC. A gauche, les AVC de type ischémique, représentant 80-85% des cas et caractérisés par la présence d'un caillot sanguin obstruant la circulation sanguine vers le cerveau. A droite, les AVC de type hémorragique, caractérisés par la rupture d'un vaisseau sanguin entraînant l'épanchement de sang dans le cerveau (Source : Institut du cerveau et de la moelle épinière).

Les AVC représentent en France, la première cause de mortalité chez la femme ainsi que la première cause de handicap acquis chez l'adulte. C'est également la deuxième cause de démence. Au niveau national, on dénombre 150 000 cas d'AVC par an, dont près d'un quart sont mortels (données issues de l'ARS France) et, dans le monde, on déplore plus de 15 millions de cas par an, soit à peu près un AVC toutes les 3 secondes (Feigin *et al.*, 2022). Cette pathologie représente un coût global estimé à 721 milliards de dollars américains soit 659 milliards d'euros (Owolabi *et al.*, 2022). Au niveau géographique, il a été montré que les pays au nord de l'équateur sont les plus touchés et notamment en Europe (Figure 2, Campbell *et al.*, 2019).

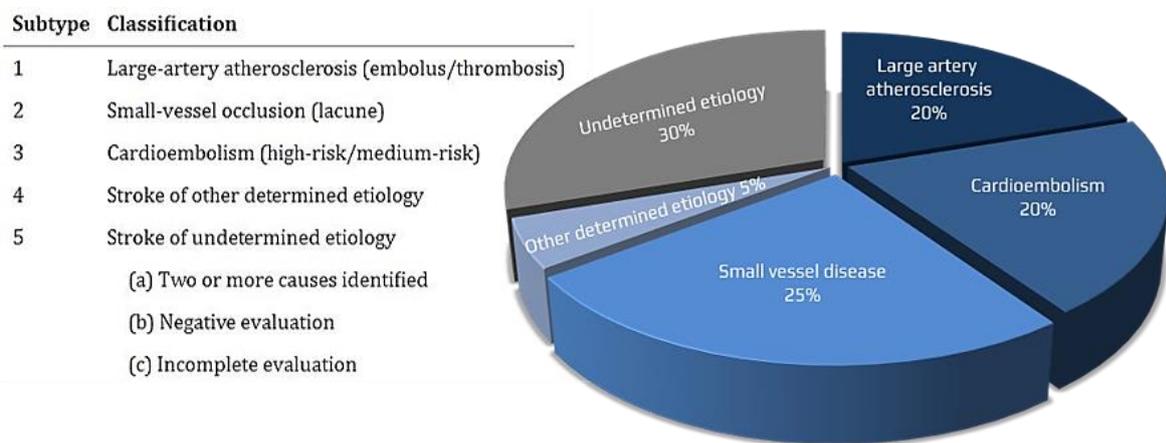


*Figure 2 : Incidence de l'AVC ischémique dans le monde. Les pays au sud de l'équateur sont moins touchés que les pays du Nord (Campbell *et al.*, 2019).*

## 1.2 Étiologie de l'AVC ischémique

Les origines de la survenue d'un AVC ischémique peuvent être multiples et il a été décrit plus de 150 causes. Les AVC ischémiques sont répertoriés selon la classification TOAST (en anglais : *Trial of ORG 10172 in acute stroke treatment subtypes classification* (Figure 3, Adams *et al.*, 1993) qui se divise en 5 sous-types :

- Les AVC dûs à l'athérosclérose de gros vaisseaux (macroangiopathie). Dans cette catégorie, les patients présentent des sténoses (>50%) voire des occlusions totales de certaines artères intra- ou extra- crâniennes, liées à l'athérosclérose.
- Les AVC d'origine cardioembolique représentent l'ensemble des ischémies résultant d'au moins un évènement embolique d'origine cardiaque.
- Les AVC des petits vaisseaux (ou AVC lacunaires) concernent des patients présentant des syndromes lacunaires cliniques traditionnels, avec une lésion du tronc cérébral ou de l'hémisphère sous-cortical d'un diamètre inférieur à 1,5 cm.
- Les AVC avec d'autres étiologies déterminées. Cette catégorie inclut les rares cas d'AVC tels que des troubles hématologiques ou des vasculopathiques.
- Les AVC avec d'autres étiologies indéterminées. Ils peuvent correspondre à des examens incomplets ou alors qui n'ont pas permis de diagnostiquer un AVC.



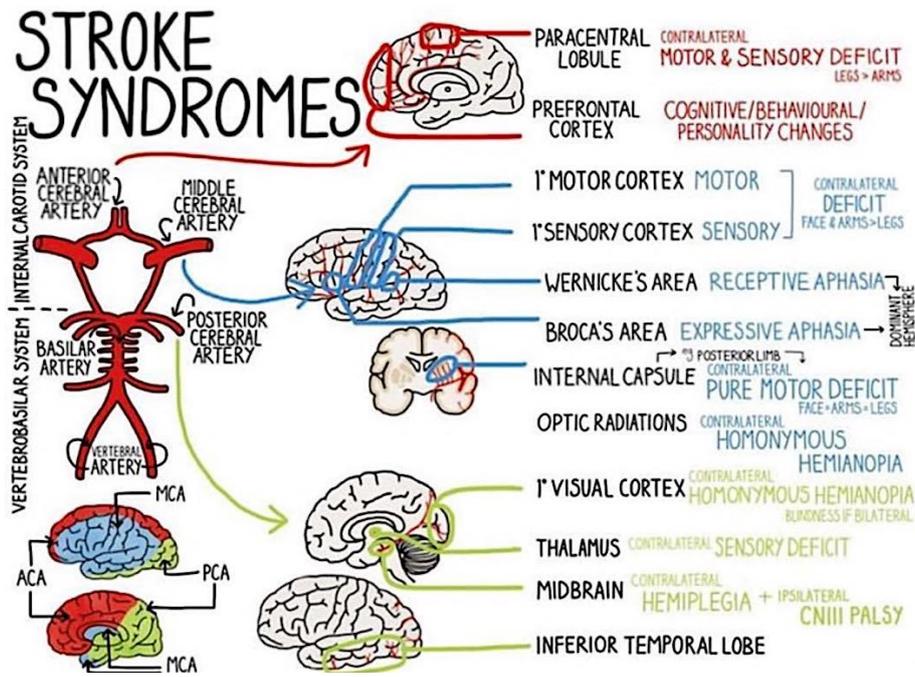
*Figure 3 : Classification TOAST de l'étiologie des AVC ischémiques. 5 sous-catégories ont été distinguées : Les AVC dûs à l'athérosclérose des grandes artères (20%), les AVC ischémiques des petits vaisseaux (25%), les AVC d'origine cardioembolique (20%), les AVC avec d'autres étiologies déterminées (5%), les AVC avec d'autres étiologies indéterminées (30%) (Adams et al., 1993).*

### 1.3 Les symptômes de l'AVC ischémique

Les symptômes des AVC ischémiques sont très hétérogènes car ils dépendent de la localisation de l'obstruction. Dans 50% des cas, le territoire vasculaire touché est celui de l'artère cérébrale moyenne (ACM), ce qui engendre des atteintes motrices et cognitives (Ng *et al.*, 2007).

A la suite de l'occlusion vasculaire, les neurones sont rapidement en danger : on estime que sans traitement, 2 millions de neurones, 14 milliards de synapses et 12 km d'axones myélinisés meurent par minute (Saver, 2006). La perte irréversible des cellules nerveuses peut alors se traduire par les symptômes suivants (**Figure 4**) :

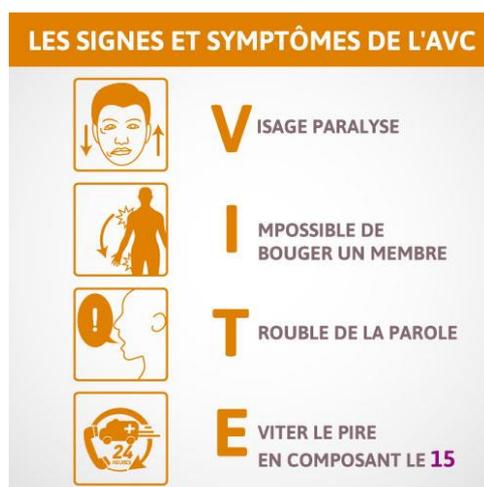
- Hémiplégie ou faiblesse musculaire du visage ou d'un membre,
- Complication brutale dans la parole et/ou gêne dans la prononciation claire (aphasie),
- Vision floue unilatérale ou bilatérale,
- Équilibre douteux, vertige,
- Céphalées intenses, migraines.



*Figure 4 : Illustration des symptômes de l'AVC ischémique, en fonction de la zone cérébrale touchée. Une atteinte vasculaire de l'artère cérébrale moyenne (MCA) peut induire des lésions des cortex moteurs et sensoriels et des aires de Broca et Wernicke, conduisant à des déficits moteurs et sensoriels controlatéraux ainsi qu'à des aphasies expressives et réceptives. Les atteintes peuvent également toucher la capsule interne, ce qui engendre des symptômes purement moteurs de la face, des bras et des jambes. Une atteinte de l'artère cérébrale antérieure (ACA) entraîne des lésions du cortex préfrontal et du lobule paracentral conduisant respectivement à des changements de personnalité et de comportement ainsi qu'à des déficits moteurs des bras et des jambes controlatéraux. Une atteinte de l'artère cérébrale postérieure (PCA) induit des dommages des lobes temporaux inférieurs ainsi que du mésencéphale, du thalamus et du cortex visuel. Des symptômes tels que l'hémianopsie (perte de vision du côté controlatéral à la lésion) ou des paralysies du nerf oculomoteur peuvent apparaître (Illustration issue de Soton Brain Hub, Université de Glasgow).*

Dans cette pathologie où le temps est compté, il est d'utilité publique de savoir identifier clairement ces symptômes. C'est pourquoi, l'acronyme « FAST : *face, arm, speech et time* » a été initialement mis en place dans les pays anglophones, afin de garder en mémoire les signes cliniques évocateurs de l'AVC.

En français, l'acronyme à retenir est « VITE » (Figure 5).



*Figure 5 : Campagne de sensibilisation aux signes cliniques des AVC. Les signes évocateurs sont : visage paralysé, impossibilité de bouger un membre, troubles de la parole. Dans le cas où ces signes sont remarqués, il faut, en France, immédiatement appeler le 15 (illustration issue de France AVC).*

#### 1.4 Physiopathologie de l'AVC ischémique

Comme nous l'avons écrit précédemment, l'AVC ischémique est caractérisé par un arrêt ou une forte perturbation du flux sanguin cérébral. Ce phénomène prive les cellules du parenchyme (neurones, astrocytes, oligodendrocytes...) d'oxygène et de glucose. Trois zones vont alors se distinguer (**Figure 6**) :

Le cœur ischémique, est la région où l'atteinte est la plus sévère. Le débit sanguin cérébral (DSC) y est inférieur à 10 mL par minute pour 100 grammes de tissu. Les cellules nerveuses subissent des dommages irréversibles, et meurent rapidement par nécrose (Heiss & Rosner, 1983).

La pénombre ischémique est la zone critique dans le contexte des AVC ischémiques. Elle est caractérisée par une diminution du DSC variant entre 10 et 20 mL par minute, pour 100 grammes de tissu (Furlan *et al.*, 1996). C'est la zone cible des traitements des AVC ischémiques, qui conditionne le devenir des cellules en souffrance (Chalet *et al.*, 2022). Sa taille peut être estimée par imagerie cérébrale.

L'oligémie ou zone périphérique est le territoire caractérisé par un DSC compris entre 20 et 50 ml/min/100 g de tissu (Bandera *et al.*, 2006). L'hypoxie cérébrale y est compensée par une augmentation du taux d'extraction d'oxygène, permettant d'assurer la viabilité du tissu (Adhami *et al.*, 2006).

#### 1.4.1 Le déséquilibre ionique

L'occlusion cérébrale entraîne la rapide diminution de l'apport en oxygène et en glucose. Ce déficit énergétique entraîne des dysfonctions mitochondriales conduisant à la production d'espèces réactives de l'oxygène induisant des dommages cellulaires (Andrabi *et al.*, 2020). Le manque d'oxygène et de glucose entraîne également la défaillance de synthèse d'ATP induisant la dysfonction de la pompe  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ -ATPase. Cette défaillance contribue au déséquilibre ionique affectant les niveaux de sodium ( $\text{Na}^+$ ), de potassium ( $\text{K}^+$ ) et de calcium ( $\text{Ca}^{2+}$ ), entraînant une dépolarisation cellulaire irréversible et la libération excessive de glutamate (Figure 6). Cette surabondance de glutamate dans la fente synaptique va suractiver ses récepteurs ionotropiques (en particulier de type N-méthyl-D-aspartate, NMDA), induisant alors une toxicité neuronale, par un phénomène appelé **excitotoxicité** (Doyle *et al.*, 2008).

#### 1.4.2 L'excitotoxicité

Il y a près de six décennies, des études ont mis en évidence les effets toxiques du sodium de L-glutamate par le biais d'injections systémiques, démontrant ainsi que ce dernier pouvait dégrader les couches internes de la rétine (Lucas & Newhouse, 1957). Ce concept d'excitotoxicité (toxicité des acides aminés excitateurs), formulé par John Olney, se produit également dans l'encéphale (Olney, 1969). Effectivement, l'injection sous-cutanée de monosodium de glutamate induit chez des souris de la nécrose neuronale dans

plusieurs régions du cerveau. Plus tard, il a été dévoilé que l'excitotoxicité peut aussi résulter de la libération excessive et incontrôlée de glutamate endogène, entraînant une mort cellulaire de type nécrotique, classiquement observée dans les situations aiguës telles que les traumatismes cérébraux et les AVC (Bicknell & Cohen, 1995 ; Dong *et al.*, 1997 ; Dirnagl *et al.*, 1999).

De fait, l'excitotoxicité est le mécanisme par lequel une stimulation excessive des récepteurs ionotropiques du glutamate, NMDA essentiellement mais aussi AMPA (en anglais : *α-amino-3-hydroxy-5methyl-isoxazolepropionic acid*) ou Kainate, entraîne une accumulation d'eau et de calcium intracellulaire et la libération de radicaux libres, conduisant irrémédiablement à la **mort nécrotique excitotoxique** (Shen *et al.*, 2022). Ce type de nécrose cellulaire se caractérise par une augmentation du volume cellulaire, un gonflement des organites, ainsi qu'une rupture des membranes nucléaires et cytoplasmiques, la dégradation aléatoire de l'ADN par des endonucléases, et une protéolyse massive (Dong *et al.*, 1997).

A la suite d'un AVC ischémique, ce phénomène excitotoxique serait le premier induisant des dommages neuronaux, par formation d'un œdème cytotoxique (Martínez-Coria *et al.*, 2021 ; Verma *et al.*, 2022).

Il apparaît que la composition et/ou la localisation des récepteurs NMDA pourrait être responsable d'effets différentiels. Par exemple, les récepteurs NMDA contenant la sous unité GluN2B seraient déclencheurs d'excitotoxicité et d'apoptose neuronale alors que les récepteurs NMDA contenant la sous-unité GluN2A seraient protecteurs (Zhu *et al.*, 2018). Ces effets bénéfiques passeraient notamment par l'activation de la voie PI3K/Akt (Downward, 1999), l'activation de ERK (en anglais : *extracellular signal-regulated kinase*) conduisant à la phosphorylation de CREB (Wu *et al.*, 2001) et à l'activation du gène codant pour le facteur neurotrophique dérivé du cerveau, BDNF (en anglais : *brain-derived neurotrophic factor*) (Ghosh *et al.*, 1994).

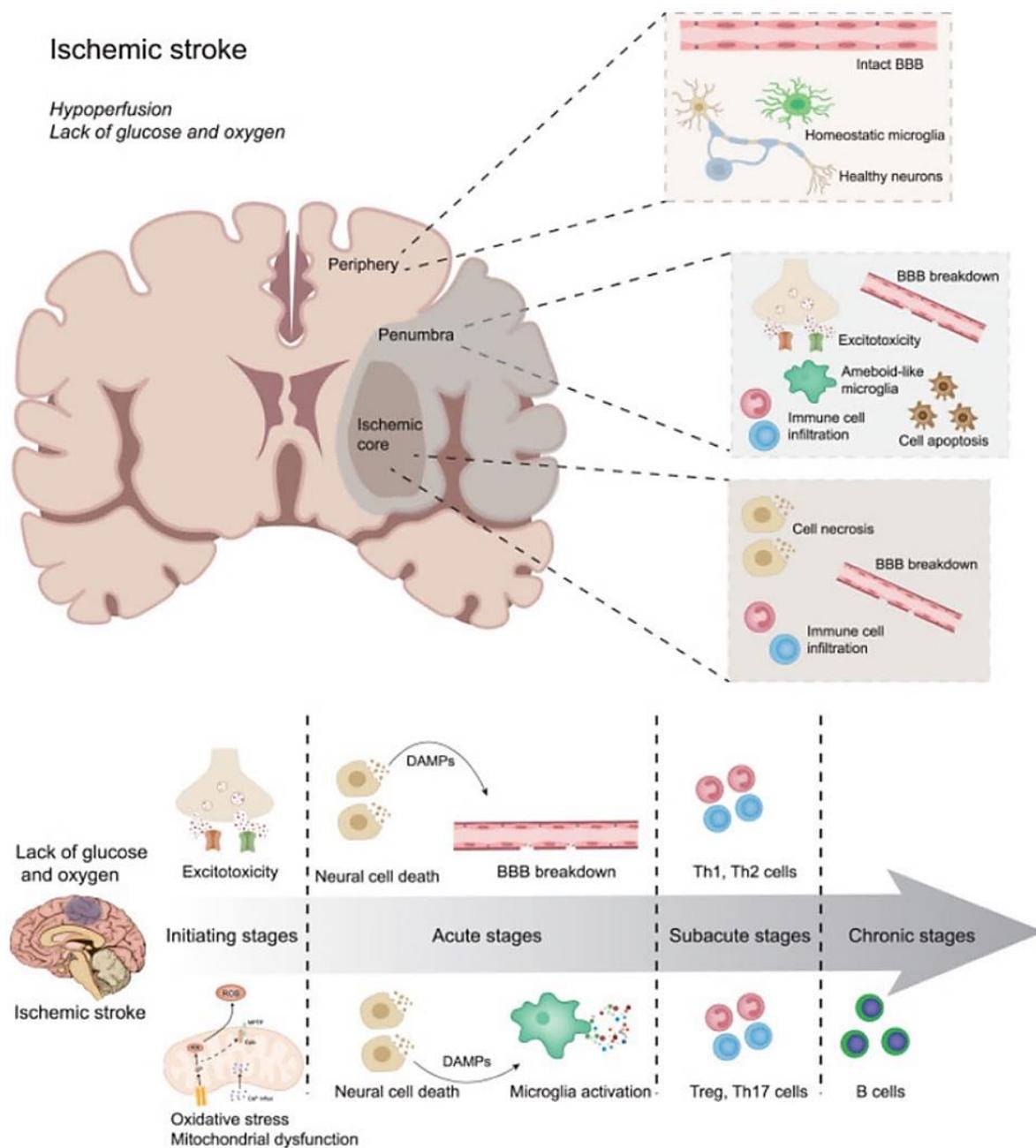
La distribution des récepteurs NMDA au niveau synaptique ou extrasynaptique a également une importance dans le devenir excitotoxique (Seillier *et al.*, 2022).

En 2002, il avait été mis en évidence que l'activation des récepteurs NMDA synaptiques avait des effets anti-apoptotiques, contrairement à l'activation des récepteurs extrasynaptiques, conduisant à une perte des potentiels membranaires mitochondriaux et une mort cellulaire (Hardingham *et al.*, 2002). Plus récemment, il a été mis en évidence que l'activation seule, des récepteurs NMDA synaptiques ou extrasynaptiques, était non toxique et que le degré d'excitotoxicité était lié à l'ampleur et la durée de la co-activation de ces récepteurs (Zhou *et al.*, 2013).

### 1.4.3 Les processus inflammatoires et la neuroinflammation

La mort neuronale excitotoxique instaure de **l'inflammation** conduisant à la libération de DAMPs (en anglais : *damage-associated molecular patterns*), tels que HMGB1 (en anglais : *high mobility group-box-1*) ou S100A8 (*MRP8, calgranulin A*), et de cytokines pro-inflammatoires, comme le TNF (en anglais : *tumor necrosis factor*) ou bien les interleukines telles que l'IL-1 $\beta$  ou IL-6, qui sont des protéines servant de messenger entre le système immunitaire et les leucocytes (lymphocytes T-helper 1 ou 2 puis lymphocytes B, par exemple) (Figure 6). Également, l'expression des molécules d'adhésion vasculaires telles que les VCAM-1 (en anglais : *vascular cell adhesion molecule*) ainsi que des sélectines E et P augmente. Ces molécules d'adhésion permettent de faciliter le passage des leucocytes du sang vers le parenchyme, aggravant ainsi l'inflammation et **perméabilisant la barrière hémato-encéphalique (BHE)**.

Dans le parenchyme, certains DAMPS et cytokines vont activer les récepteurs à la surface des cellules immunitaires du parenchyme telles que les astrocytes ou la microglie, on parle alors de la **neuroinflammation**. De plus, quelques macrophages résidents peuvent aussi s'activer (Gelderblom *et al.*, 2009 ; Iadecola & Anrather, 2011). Aussi, de par la détérioration de la BHE, ces mêmes cytokines et DAMPS peuvent induire une réponse immunitaire systémique à plus long terme.



*Figure 6 : Illustration chronologique simplifiée d'une partie de la physiopathologie de l'AVC ischémique. L'obstruction d'un vaisseau cérébral conduit à un manque d'oxygène et de glucose pour les cellules du parenchyme en particulier pour les neurones. Ces derniers ne peuvent plus produire d'ATP et ne peuvent plus gérer l'homéostasie ionique intracellulaire conduisant à une libération exacerbée du glutamate suractivant les récepteurs ionotropiques NMDA. Ce phénomène est appelé excitotoxicité et conduit à la libération de signaux tels que des cytokines ou des DAMPs, déclenchant les phénomènes inflammatoires. Ces derniers sont médiés, d'une part, par l'activation des astrocytes et de la microglie présents dans le cerveau ainsi que par l'ouverture de la BHE facilitant l'infiltration des leucocytes du sang vers le parenchyme (Qin et al., 2022).*

#### 1.4.4 L'ouverture de la BHE

L'« ouverture » de la BHE est également facilitée par une augmentation de l'expression et de l'activité des métalloprotéases matricielles (MMPs) et en particulier des MMP9 allant directement dégrader la lame basale des vaisseaux (Rosenberg & Yang, 2007). Le décrochement des pieds astrocytaires des vaisseaux va également participer à l'ouverture de la BHE contribuant à l'inflammation cérébrale (Figure 6). Les différentes hypothèses dans l'ouverture de la BHE seront expliquées plus en détails dans la **partie 2** intitulée : l'activateur tissulaire du plasminogène (tPA), rôles dans l'intégrité de la BHE.

L'ouverture de la BHE est aussi permise par l'activation des cellules endothéliales ainsi que des péricytes (Liebner *et al.*, 2018) provoquant un **œdème vasogénique** ainsi qu'une forte expression d'AQP4 (aquaporine 4) au niveau astrocytaire (Badaut *et al.*, 2007). L'œdème vasogénique a lieu dans un second temps, dans les 48 heures post-occlusion. L'accumulation anormale de liquide entraîne une augmentation de la pression intracrânienne qui peut engendrer des déficits neurologiques tels que des céphalées notamment (Hornig *et al.*, 1993).

#### 1.4.5 L'apoptose

L'apoptose fait référence à une mort cellulaire programmée, ayant lieu à la phase subaiguë de l'AVC ischémique. Elle requiert en général de l'énergie afin d'être activée, c'est pourquoi elle se produit majoritairement dans la zone de pénombre (Martin *et al.*, 1998). L'apoptose peut être activée durant l'ischémie selon deux voies : la voie intrinsèque et la voie extrinsèque.

La voie intrinsèque est déclenchée par une élévation du calcium intracellulaire, entraînant la libération du facteur inducteur de l'apoptose (en anglais : *apoptosis-inducing factor*, AIF) et du cytochrome C dans le cytoplasme. Le cytochrome C se lie ensuite au facteur d'activation

de la procaspase-9 pour la convertir en caspase-9, qui à son tour active la caspase-3 (Love, 2003). Une fois activée, la caspase-3 favorise la fragmentation de l'ADN et la formation de corps apoptotiques, aboutissant à la mort de la cellule (Elena-Real *et al.*, 2018).

La voie extrinsèque, pour sa part, implique des facteurs libérés en dehors de la cellule, tels que le Fas-L (Ligand Associé aux Fibroblastes). Lorsque ce ligand se lie au récepteur Fas, cela conduit à la formation d'un complexe contenant la protéine FADD (protéine associée à la mort avec domaine de mort) qui interagit ensuite avec la procaspase-8. Ce complexe nouvellement formé, connu sous le nom de DISC (complexe de signalisation inducteur de la mort), permet l'activation de la caspase-8, qui est ensuite libérée dans le cytoplasme pour amorcer le processus de clivage de la caspase-3. Par la suite, des mécanismes similaires à ceux de la voie intrinsèque sont mis en marche (Radak *et al.*, 2017).

#### 1.4.6 L'autophagie

L'autophagie, quant à elle, est un processus par lequel la cellule peut renouveler son matériel cytoplasmique, dans le but de se maintenir en vie. Elle se caractérise par la synthèse d'une structure membranaire à double couche appelée autophagosome, qui contient des cargaisons ciblées pour la dégradation. Les autophagosomes fusionnent ensuite avec les lysosomes pour former des autolysosomes, entraînant la dégradation de leur contenu. La principale voie de régulation de l'autophagie implique la kinase mTOR (en anglais : *mammalian target of rapamycin*) (Thiebaut *et al.*, 2019).

Le rôle de l'autophagie dans l'AVC est débattu (Kasprowska *et al.*, 2017 ; Ni *et al.*, 2018). Il a par exemple été démontré que l'autophagie était un mécanisme protecteur en dégradant les produits de la mort cellulaire (Carloni *et al.*, 2017).

D'un autre côté, l'équipe a mis en évidence que l'activation de l'autophagie augmenterait la mort neuronale (Thiebaut *et al.*, 2022). Lors de l'ischémie, l'autophagie affecte aussi bien les neurones (Tian *et al.*, 2010) que les astrocytes (Qin *et al.*, 2010).

## 1.5 Les facteurs de risque de l'AVC ischémique

Les facteurs de risque associés à l'AVC ischémique sont nombreux et de plus en plus impactant avec l'âge. Cependant, nous pouvons en différencier deux catégories : d'une part, les facteurs de risque modifiables et, d'autre part, les facteurs de risque non-modifiables (Boehme *et al.*, 2017). Parmi les données qui vont suivre, la plupart sont issues de l'étude INTERSTROKE regroupant près de 22 pays (O'Donnell *et al.*, 2010).

### Les facteurs de risque modifiables :

- **L'hypertension** est le facteur de risque le plus important et il existe un lien très fort entre une pression artérielle élevée et le risque de faire un AVC (Chobanian *et al.*, 2003). Le risque d'être atteint d'un AVC ischémique double à chaque augmentation de la pression artérielle systolique de +20 mmHg et +10 mmHg en diastolique.

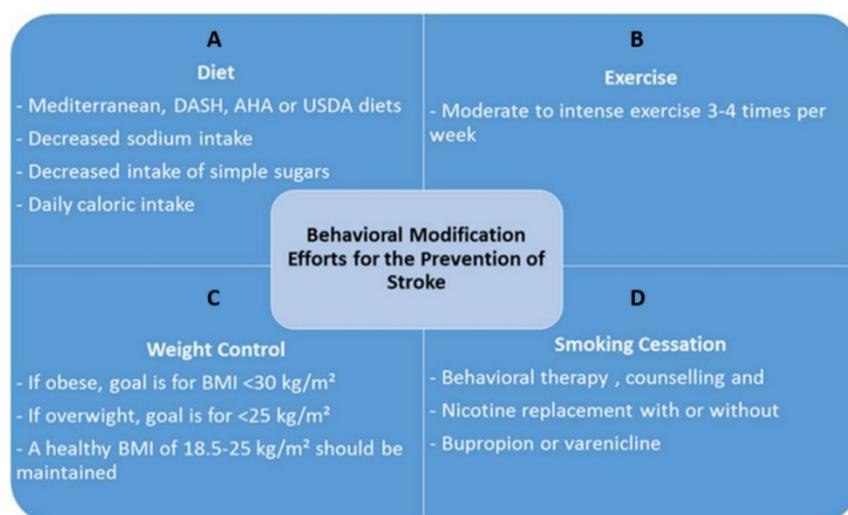
- **La consommation courante de tabac, d'alcool et d'autres substances.** Le risque d'AVC chez les fumeurs quotidiens est très présent (deux fois plus de risque) et il est directement corrélé au nombre de paquets consommés par année. Il est estimé que près de 15% de tous les décès liés aux AVC sont dus au tabagisme (données issues d'une cohorte Coréenne de plus de 470 000 hommes suivis pendant 20 ans, Song & Cho, 2008). La consommation d'alcool est davantage liée à l'apparition d'AVC hémorragiques. Pour l'AVC ischémique, il a été démontré puis remis en question que la consommation légère à modérée (moins de 2 verres d'alcool par jour pour les hommes et moins de 1 pour les femmes) était plutôt protectrice. En revanche, la consommation sévère était associée à un risque augmenté (Wannamethee & Shaper, 1996). Enfin, la consommation de substances telles que l'héroïne, la cocaïne ou la méthamphétamine est également associée à un risque accru d'AVC ischémique (Ho *et al.*, 2009).

- **Le diabète.** Les patients diabétiques ont un risque doublé de faire un AVC ischémique. Aussi, leur taux de mortalité est de 20% (Banerjee *et al.*, 2012).

- Les **causes cardiaques** sont également des facteurs de risque importants pour l'AVC, notamment avec le vieillissement de la population. Par exemple, la fibrillation auriculaire (FA) est souvent à l'origine de la formation de caillots qui migrent de l'oreillette gauche vers le cerveau. Ces dernières années, le nombre d'AVC chez les patients FA a presque triplé (Yiin *et al.*, 2014).

- Un **indice de masse corporelle (IMC) élevé**, une **inactivité physique** et la **sédentarité**, une **mauvaise alimentation** ainsi que de **l'inflammation** ou des **infections** sont également des facteurs de risque modifiables, responsables de la survenue d'AVC.

Il est important d'identifier ces facteurs de risque, car une bonne prise en charge (pharmacologique et/ou en changeant d'hygiène de vie) a un impact positif sur le risque de survenue d'un AVC ischémique (Figure 7) (Suk *et al.*, 2003).



*Figure 7 : Illustration des pratiques liées à un mode de vie sain pour une meilleure santé cardiovasculaire. Des modifications dans les comportements et les habitudes de vie peuvent prévenir la survenue des AVC. A : L'alimentation est un facteur pouvant être modifié et diminue de 20% la prévalence des AVC. Les comportements à adopter seraient : un régime méditerranéen (principalement basé sur les aliments d'origine végétale et donc faible en matières grasses), diminuer la prise de sel et de sucre et contrôler le nombre de calories ingérées. B : La pratique d'exercice physique 3 à 4 fois par semaine serait également à prendre en compte. C : Le contrôle du poids basé sur l'IMC est également à prendre en considération en appliquant des limites. D : L'arrêt de la consommation de tabac est également très important car après 5 ans d'arrêt, le risque de survenue d'un AVC est égal à celui d'un non-fumeur. Plusieurs thérapies peuvent être mises en place (Illustration adaptée de Boehme *et al.*, 2017).*

### Les facteurs de risques non modifiables :

Les facteurs de risque non modifiables sont moins nombreux. Parmi eux, on retrouve :

- **L'âge**. En effet, plus l'on vieillit, plus on est susceptible de faire un AVC ischémique. Il a été démontré que l'incidence augmentait avec l'âge mais aussi qu'elle doublait tous les 10 ans après 55 ans (Roger *et al.*, 2012). En 2005, l'âge moyen de survenue d'un AVC ischémique était de 69,2 ans. Aujourd'hui, avec l'augmentation de la malnutrition et de la sédentarité due notamment aux évolutions technologiques ainsi que l'amélioration de la détection des symptômes mineurs, l'âge moyen se rapproche de 50 ans.

- **Le sexe** est également un facteur de risque à prendre en compte, bien qu'influencé par l'âge. Effectivement, chez les patients jeunes, l'incidence est en défaveur des femmes (Kapral *et al.*, 2005). De manière générale, les femmes sont les plus touchées par les AVC ischémiques car leur espérance de vie est plus élevée que celle des hommes.

- **L'ethnicité** a également fait l'objet de recherche et, par exemple, les afro-américains ainsi que les hispano-américains ont deux fois plus de risque de déclarer un AVC ischémique (Cruz-Flores *et al.*, 2011).

- **Des facteurs génétiques** sont également présents dans la survenue des AVC ischémiques. Cependant, il est compliqué d'associer des mutations précises à la survenue d'AVC tant l'hétérogénéité de la pathologie est vaste. Certains gènes ont été tout de même ciblés comme le gène NOTCH3, dont la mutation entraîne une artériopathie cérébrale autosomique dominante pouvant engendrer des AVC lacunaires (Tournier-Lasserre *et al.*, 1991). Des études ont également mis en évidence que des antécédents familiaux d'AVC augmentaient le risque de déclarer une ischémie de 30% (Flossmann *et al.*, 2004). Enfin, cette même étude a mis en lumière que les jumeaux monozygotes ont 1,65 fois plus de risque de faire un AVC ischémique que des jumeaux dizygotes. De plus, l'avancée des techniques de séquençages génomiques (Bycroft *et al.*, 2018) et les récentes données issues des études pangénomiques (en anglais : *Genome wide association study*, GWAS) ont apporté de nouveaux éléments dans la génétique de l'AVC.

Ces études ont notamment permis de mettre en avant 35 loci indépendants, impliqués dans la survenue d'AVC (Dichgans *et al.*, 2019).

## 1.6 Prise en charge et traitements de l'AVC ischémique

Avant toute prise en charge, il est majeur d'établir un diagnostic fiable de l'AVC ischémique, qui repose sur l'imagerie, dans l'idéal, par IRM (Imagerie par résonance magnétique), ou, à défaut, par scanner.

Pour faciliter et améliorer la prise en charge des AVC à la phase aiguë, il a été créé, dans les plus gros centres hospitaliers français, des unités neurovasculaires (UNV) spécialisées. Ces unités permettent de réduire de près de 17% le risque de décès (données issues de la Haute Autorité de Santé, HAS).

A l'heure actuelle, seulement deux approches thérapeutiques d'urgence sont approuvées en clinique :

- le traitement pharmacologique (la **thrombolyse** par injection intraveineuse de la forme recombinante de l'activateur tissulaire du plasminogène, **r-tPA** ou **altéplase®**, (NINDS, 1995).
- l'approche mécanique (la **thrombectomie**, Fransen *et al.*, 2014).

Actuellement, deux modèles de prise en charge sont comparés : le modèle Drip-and-Ship (DS : transport vers le centre de référence après un premier accueil en périphérie) et le modèle Mothership (MS : transport direct vers le centre spécialisé). Le modèle MS se caractérise par l'accès à la neuroimagerie de pointe et la présence de neurocliniciens spécialisés pouvant notamment réaliser la thrombectomie mécanique. Le modèle DS, quant à lui, inclut la redirection des patients vers des centres spécialisés si nécessaire. Certaines études montrent que le modèle MS serait associé à un meilleur devenir neurologique à moyen terme (Mohamed *et al.*, 2021), alors que pour d'autres, il n'y aurait pas de différence

en termes d'indépendance fonctionnelle à 90 jours entre les deux modèles. Le modèle DS serait cependant associé à un risque accru d'hémorragie intracrânienne symptomatique (D'Anna *et al.*, 2023).

En dehors de cette prise en charge aiguë, la **rééducation physique et/ou cognitive** vise à limiter les déficits post-AVC. Bien sûr, la **prévention** (primaire ou secondaire) est aussi majeure pour réduire les risques d'AVC et de déficits associés.

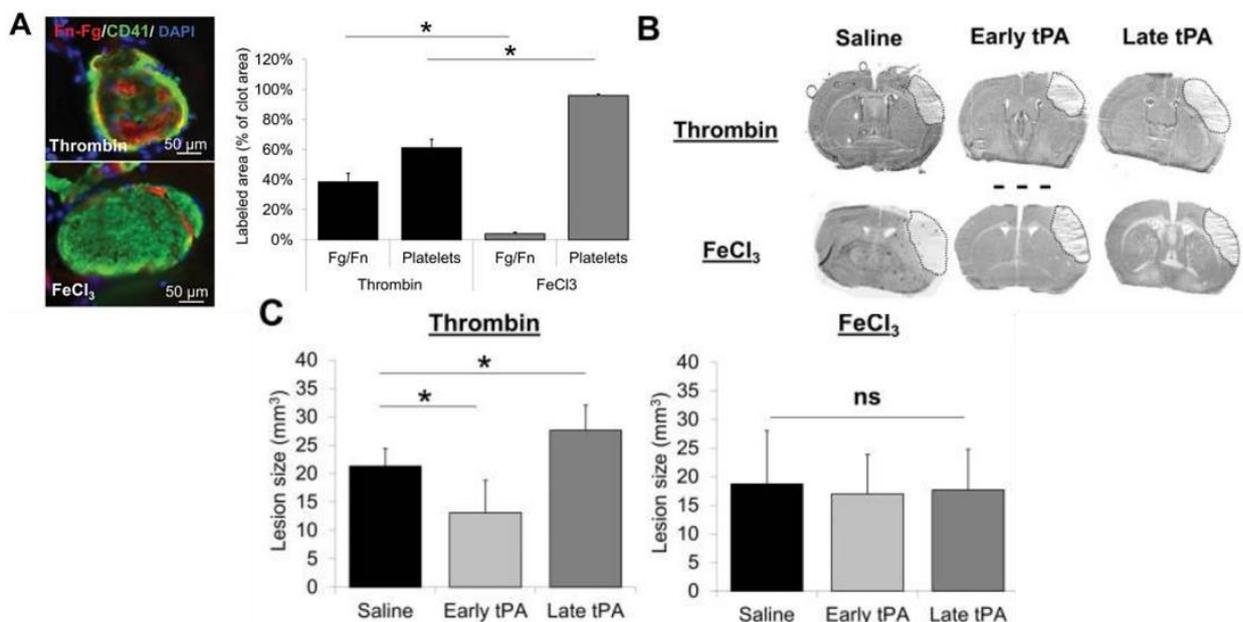
### 1.6.1 La thrombolyse par injection intraveineuse de tPA recombinant (r-tPA, Altéplase®)

L'objectif à atteindre dans la lutte contre les AVC ischémiques est la désobstruction du ou des vaisseaux occlus dans le but de rétablir un flux sanguin cérébral au plus vite. Pour ce faire, la thrombolyse par injection intraveineuse de r-tPA est recommandée dans la phase aiguë des AVC ischémiques (NINDS, 1995). Elle est prescrite dans une fenêtre temporelle relativement courte (<4h30) et va détruire les caillots, *via* la conversion du plasminogène en plasmine active par le r-tPA. Ce phénomène est appelé « fibrinolyse » et sera détaillé dans la **partie 2** : rôles du tPA dans la fibrinolyse.

Malheureusement dans certains cas, notamment lorsque la fenêtre thérapeutique est dépassée, ce traitement peut s'avérer inefficace et peut même engendrer des effets secondaires néfastes tels que de la neurotoxicité ou encore des transformations hémorragiques (Polavarapu *et al.*, 2007 ; Yaghi *et al.*, 2017). De plus, il a été démontré que la localisation du caillot impactait l'efficacité du traitement et les chances de reperfusion. La thrombolyse est plus efficace lorsque le caillot bloque un vaisseau relativement accessible et de petite taille. Cependant, si le caillot est situé dans un vaisseau plus important ou profondément dans le cerveau, il peut être difficile pour le r-tPA d'atteindre le site de l'occlusion et de dissoudre complètement le caillot (Sillanpää *et al.*, 2013).

Cela souligne l'importance d'un diagnostic rapide et précis pour déterminer si la thrombolyse est une option appropriée pour un patient donné.

Ce traitement possède également d'autres limites importantes, notamment dues à la composition du caillot sanguin (Jang *et al.*, 1989). Effectivement, les caillots dits riches en fibrine (protéine importante dans la coagulation sanguine) sont sensibles à la thrombolyse par le r-tPA, contrairement aux caillots riches en plaquettes (Figure 8, Martinez de Lizarrondo *et al.*, 2017). Plusieurs hypothèses peuvent expliquer cette différence et notamment la faible capacité du tPA à se lier à la fibrine ce qui diminue sa capacité à convertir le plasminogène en plasmine (Rijken *et al.*, 1982). De plus, les plaquettes ont la capacité de sécréter en forte quantité des inhibiteurs du tPA tels que PAI-1 (en anglais : *Plasminogen activator inhibitor type 1*) ou encore PN-1 (en anglais : *protase nexin-1*), ce qui logiquement, réduit son activité (Boulaftali *et al.*, 2011).



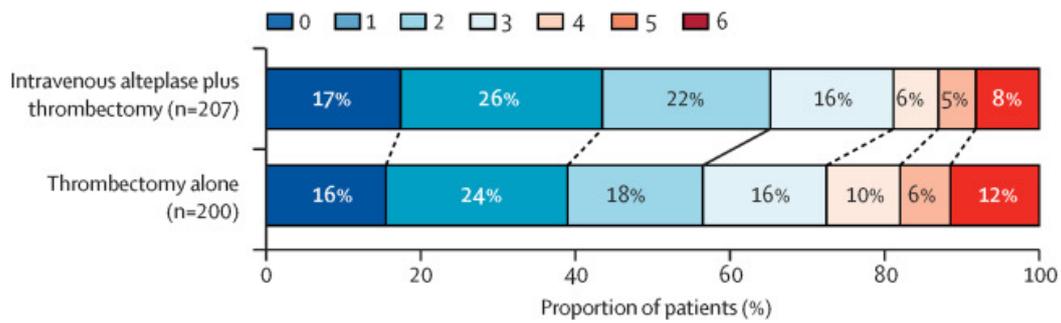
**Figure 8 :** Les thrombi riches en plaquettes sont résistants à la thrombolyse intraveineuse par injection de r-tPA. **A :** Immunohistochimie représentative de thrombi après 20 minutes d'occlusion de l'artère cérébrale moyenne (ACM) réalisée par injection de thrombine ou de chlorure de fer (FeCl<sub>3</sub>). Les thrombi induits par la thrombine sont riches en fibrine (marqueur Fn-Fg, rouge) alors que les thrombi induits par le FeCl<sub>3</sub> sont riches en plaquettes (marqueur CD41, vert). **B et C :** Le traitement dans la phase précoce (early) de l'ischémie par le r-tPA réduit le volume de lésion uniquement dans le modèle thrombine, présentant des caillots riches en fibrine. Cependant, il est inefficace dans la phase plus tardive, quelle que soit la composition du thrombus Figure adaptée de Martinez de Lizarrondo *et al.*, 2017).

A l'heure actuelle, de nouvelles recherches évaluent l'efficacité d'autres formes de tPA, muté, qui permettraient de limiter au maximum les effets secondaires indésirés (Thiebaut *et al.*, 2018). C'est le cas, par exemple, du Tenecteplase (TNK ou métalyse®), un tPA muté ayant une affinité 15 fois plus importante pour la fibrine, une demi-vie 6 fois plus longue (autour de 25 minutes) ainsi qu'une affinité pour son inhibiteur circulant principal PAI-1, 80 fois moins importante (Tanswell *et al.*, 2002). Les récents essais cliniques ont également démontré l'efficacité du TNK (Alamowitch *et al.*, 2023).

### 1.6.2 La thrombectomie

En 2015, l'essai clinique MR CLEAN recrute près de 500 participants sur 16 centres hospitaliers hollandais et met en évidence l'efficacité et la sûreté de la thrombectomie dans les 6 heures après occlusion dans la circulation cérébrale antérieure (Berkhemer *et al.*, 2015). Aujourd'hui, les données suggèrent que la thrombectomie s'avère efficace jusqu'à 24h après la survenue de l'AVC (Nogueira *et al.*, 2018 ; Pirson *et al.*, 2021).

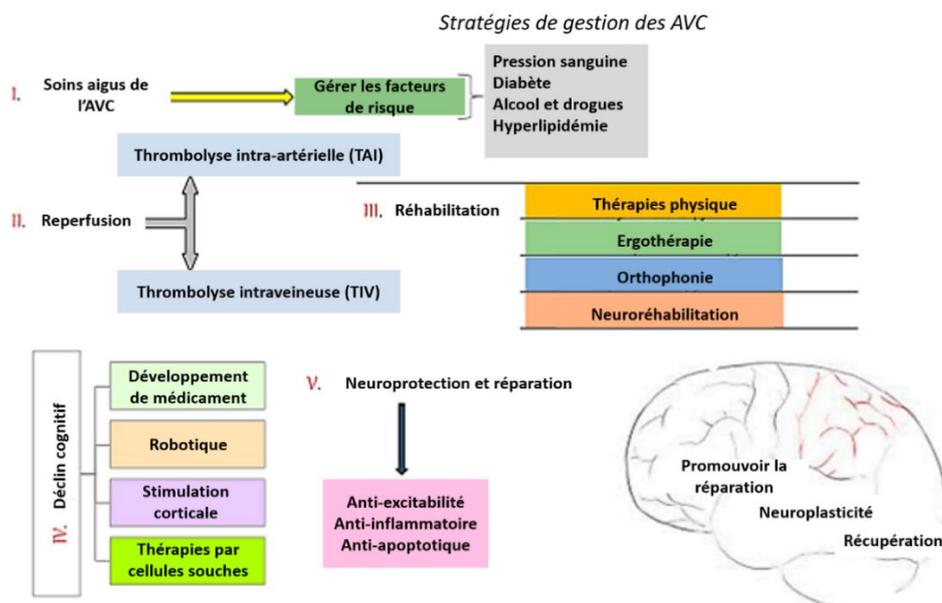
La thrombectomie mécanique consiste au retrait du caillot sanguin par l'insertion d'un cathéter fémoral remonté jusqu'à l'artère obstruée, sous contrôle radioscopique. Le cathéter dispose en son extrémité d'un maillage en nickel et titane, permettant l'accroche et le retrait du caillot afin de rétablir un DSC normal. Aussi, une récente étude clinique (SWIFT DIRECT) incluant 407 patients dans 42 centres hospitaliers a été mise en place dans le but de tester l'effet combiné de l'injection intraveineuse de tPA associée à une thrombectomie (Figure 9, Fischer *et al.*, 2022). L'évaluation fonctionnelle *via* l'échelle modifiée de Rankin à 3 mois post-AVC indique une non infériorité de la thrombectomie seule par rapport à l'association avec l'injection de r-tPA, en termes de dépendance fonctionnelle à 3 mois. Cependant, il a également été montré que les taux de reperfusion post-interventionnelle étaient plus élevés chez les patients bénéficiant de la double intervention.



**Figure 9 :** Résultats de l'étude clinique SWIFT DIRECT testant l'efficacité de l'association du traitement par injection IV de r-TPA à la thrombectomie. Les scores modifiés sur l'échelle de Rankin à 90 jours vont de 0 (absence de symptôme) à 6 (décès). La ligne en noir foncé montre le seuil de l'indépendance des patients, ce seuil a été atteint chez 57 % des patients assignés à la thrombectomie seule contre 65 % pour les patients assignés à la double thérapie (Fischer et al., 2022).

### 1.6.3 La rééducation et la réadaptation : accompagnement à long terme des patients

Comme nous l'avons vu précédemment, l'AVC ischémique est la première cause de handicap acquis chez l'adulte. Les séquelles, qui peuvent persister pendant des mois, voire des années, doivent être prises en charge de manière spécifique (Figure 10).



**Figure 10 :** Processus de récupération post-AVC (Kuriakose & Xiao, 2020).

Même si elle est probablement variable selon les individus, la plasticité cérébrale doit être stimulée par une rééducation adaptée, par des professionnels du domaine tels que des kinésithérapeutes ou des ostéopathes (données issues de la HAS). La HAS préconisait par exemple une rééducation intensive d'au moins 45 minutes par jour pendant 5 à 7 jours par semaine, mais ceci a été remis en cause par la suite. Il a été développé des outils afin d'aider les patients à une rééducation autonome. C'est le cas par exemple du *biofeedback* par électromyogramme (Langhorne *et al.*, 2009), grâce auquel de petites électrodes placées sur les muscles vont générer un signal sonore ou visuel, indiquant l'activité musculaire. L'utilisation du *biofeedback* combinée à des soins de physiothérapie standards améliorerait significativement la récupération des patients (Woodford & Price, 2007). D'un point de vue sensoriel, la rééducation concerne les aspects liés à la perception du corps dans l'espace ou bien la sensibilité de la peau. Les ergothérapeutes ont également un rôle important à jouer dans la réadaptation des patients aux tâches de la vie quotidienne. Les orthophonistes interviennent quant à eux, pour les troubles du langage. Les troubles cognitifs et la dépression post-AVC étant fréquents, l'intervention de psychologues ou de psychiatres peut être nécessaire. L'ensemble de ce suivi à plus long terme est très important pour le devenir physique, psychologique ainsi que pour prévenir au maximum les risques de dépendance.

L'héminégligence est une séquelle qui peut être observée chez certains patients après un AVC ischémique. Elle correspond à une perte de la perception d'une moitié de l'environnement et/ou de son corps. Des études ont démontré que la rTMS (en anglais : *Repetitive Transcranial Magnetic Stimulation*), qui consiste à stimuler de manière spécifique et répétitive une région corticale avec une haute ou basse fréquence, permettait de réduire ces symptômes (Fisicaro *et al.*, 2019). De plus, une récente étude clinique vient de démontrer qu'une rééducation motrice intensive de 3 à 12 mois post-AVC, améliorerait la déficience clinique, les fonctions motrices ainsi que la qualité de vie. Cependant, un protocole de rTMS à 1 Hz, n'était pas un traitement efficace au sein de l'échantillon étudié (Edwards *et al.*, 2023).

## Résumé

Les accidents vasculaires cérébraux (AVC) peuvent être de type **ischémique** (80% des cas) ou de type **hémorragique** (20% des cas). Ils se caractérisent respectivement par l'obstruction ou la rupture d'un vaisseau sanguin. L'AVC ischémique représente la **seconde cause de mortalité et la première cause de handicap acquis chez l'adulte**. C'est une pathologie d'urgence, avec une fenêtre thérapeutique très courte (<4h30) pour l'administration de son traitement pharmacologique, la thrombolyse par **injection intraveineuse de r-tPA**.

Les AVC ischémiques conduisent à des phénomènes en cascades provoqués par l'obstruction d'un vaisseau et ainsi la **diminution de l'apport en oxygène et en glucose** pour les cellules nerveuses du parenchyme. Ce déficit énergétique induit des **déséquilibres ioniques** provoquant des dépolarisations neuronales irréversibles et continues conduisant à **l'exocytose démesurée de glutamate** (acide aminé et neurotransmetteur excitateur). Ce dernier présent en trop grande quantité dans l'espace synaptique **sur-active les récepteurs ionotropiques NMDA**, conduisant à la mort **neuronale par nécrose excitotoxique**. La mort des neurones est accompagnée de signaux induisant **l'inflammation, l'ouverture de la BHE** et la création **d'un œdème vasogénique**. Des phénomènes autophagiques et apoptotiques accompagnent cette cascade ischémique.

Comme nous allons le voir dans la seconde partie de cette introduction, le tPA, endogène ou exogène, serait capable d'influencer l'évolution des lésions ischémiques, en agissant à de nombreux niveaux de ces processus ischémiques.

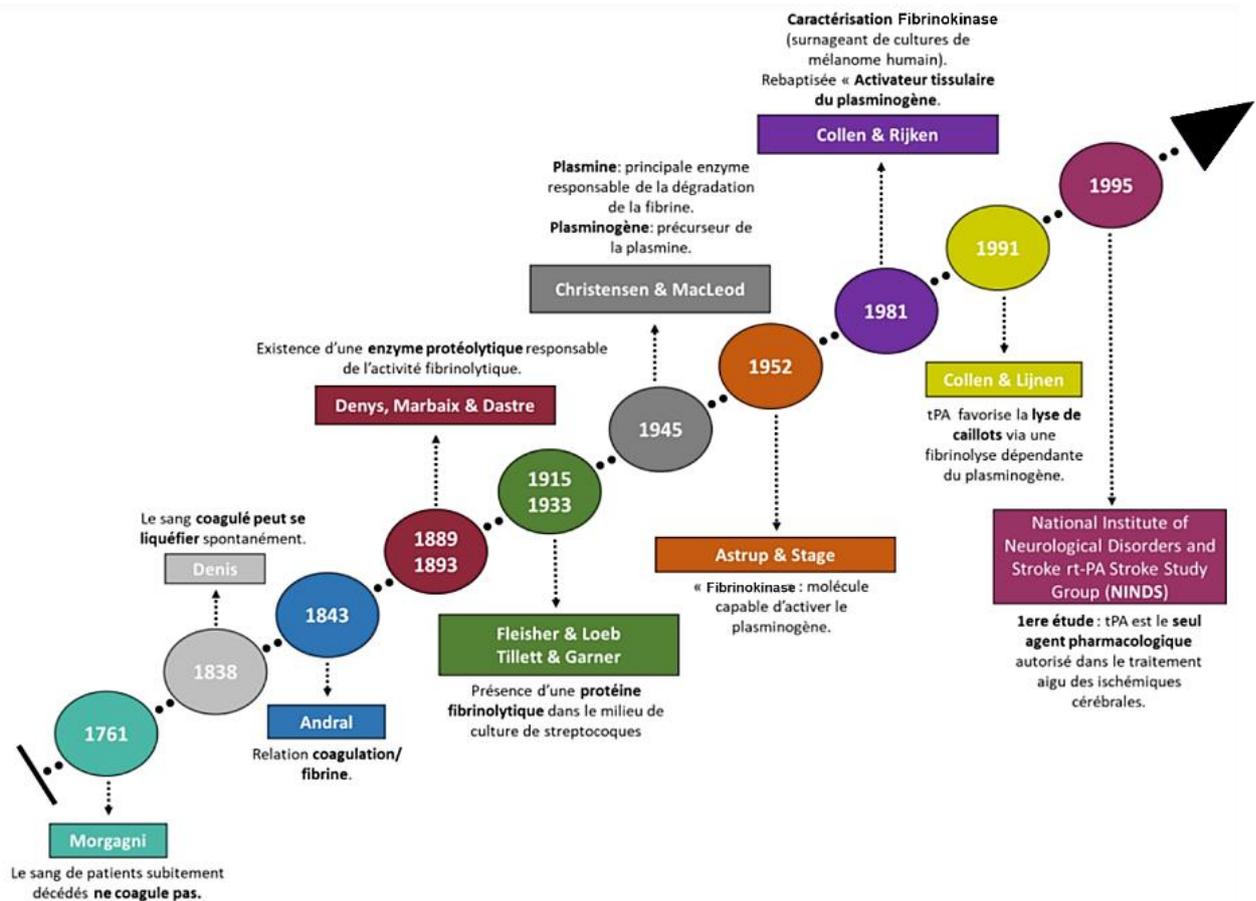
## 2. L'activateur tissulaire du plasminogène (tPA)

Le tPA est une sérine protéase, principalement connue pour ses propriétés fibrinolytiques, *via* la conversion du plasminogène en plasmine active. Mais ses fonctions ne s'arrêtent pas au système vasculaire et cette protéine joue des rôles importants au sein du système nerveux central (SNC).

### 2.1 Historique

En 1761, Giovanni Battista Morgagni, un anatomiste italien, recueillit plus de 600 cas de maladies, toutes retranscrites dans un célèbre ouvrage nommé « *De sebidus et Causis Morborum per Anatomen Indagatis* » (des siècles et des causes des maladies explorées par l'anatomie). Parmi ses observations, il décrit qu'en cas de décès soudain, le sang des patients ne coagulait pas (**Figure 11, Morgagni, 1761**). Plus tard, en 1838, Prosper Sylvain Denis fit l'observation inverse de la dissolution spontanée du sang (**Denis, 1838**). En 1845, Gabriel Andral (considéré aujourd'hui comme l'un des pères de l'hématologie) remarqua que le sang coagulé pouvait se liquéfier et évoqua sans le savoir le concept connu aujourd'hui sous le nom de « fibrinolyse » (**Andral, 1845**). C'est à la fin du 19<sup>ème</sup> siècle que Denys et de Marbaix mentionnèrent pour la première fois la présence d'une enzyme impliquée dans la fibrinolyse (**Denys & De Marbraix, 1889**). Le terme de fibrinolyse vit officiellement le jour en 1893 grâce au physiologiste français Albert Dastre (**Dastre, 1893**). Au début du 20<sup>ème</sup> siècle, Hedin observa une activité protéolytique dans les globulines de sérum (**Hedin, 1903**) et en 1945, Christensen et Macleod identifièrent dans ces mêmes globulines, le plasminogène, protéine soluble du sang et précurseur inactif de la plasmine, enzyme responsable de la dégradation des caillots de sang (**Christensen & Macleod, 1945**).

Par la suite, les chercheurs tentèrent d'isoler cette protéine fibrinolytique et c'est en 1952, qu'Astrup et Stage y parvinrent en utilisant des agents chaotropes (capables de dégrader des protéines ou des acides nucléiques). La protéine fut alors nommée « fibrinokinase » (Astrup & Stage, 1952). En 1979, une purification et une caractérisation de la « fibrinokinase » furent réalisées à partir de tissus du système sanguin de cadavre (Binder *et al.*, 1978) et d'utérus (Rijken *et al.*, 1979). Deux années plus tard, la « fibrinokinase » fut renommée « activateur tissulaire du plasminogène ou tPA » par Rijen et Collen à la suite de leurs travaux visant à purifier le tPA dans le surnageant de mélanome humain (Figure 11, Rijken & Collen, 1981). La première utilisation du tPA chez l'humain eu lieu la même année par Weimar, chez des patients souffrant de thrombose veineuse rénale (Weimar *et al.*, 1981). En 1983, Pennica et ses collaborateurs réussirent à cloner le gène codant pour le tPA et ainsi commencèrent la production de tPA par des bactéries *E. coli* (Pennica *et al.*, 1983). Grâce aux avancées des techniques de production, le tPA recombinant a pu être produit sous forme d'un médicament, l'Altéplase®, qui reste à ce jour le seul agent pharmacologique approuvé pour le traitement de la phase aiguë de l'ischémie cérébrale (National Institute of Neurological Disorders and Stroke r-tPA Stroke Study Group (NINDS, 1995).

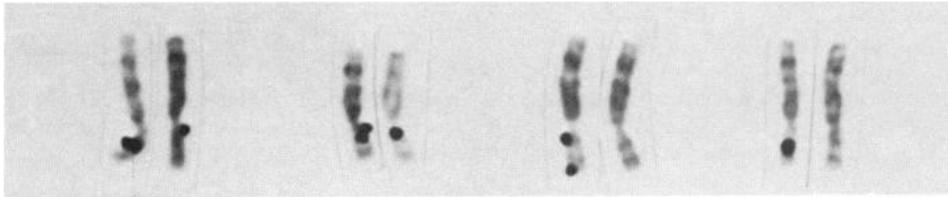


*Figure 11 : Histoire du tPA à travers les siècles. Des premières observations post-mortem, aux premières hypothèses sur la fibrinolyse, l'anciennement baptisé « fibrinokinase » voit aujourd'hui sa forme recombinante (r-tPA ou Altéplase®) être le seul traitement pharmacologique pour le traitement de la phase aiguë des AVC ischémiques (d'après la Thèse de Jonathane Furon).*

Il est important de mentionner l'existence de l'uPA (en anglais : *urokinase plasminogen activator*) qui, comme le tPA, est une sérine protéase (Crippa, 2007) capable de convertir le plasminogène en plasmine active, sans nécessairement la présence de fibrine. Elle est principalement libérée dans la circulation sanguine par les cellules endothéliales. L'uPA a aussi été testé en clinique pour les AVC ischémiques mineurs (étude clinique TRUST, Zhao et al., 2022).

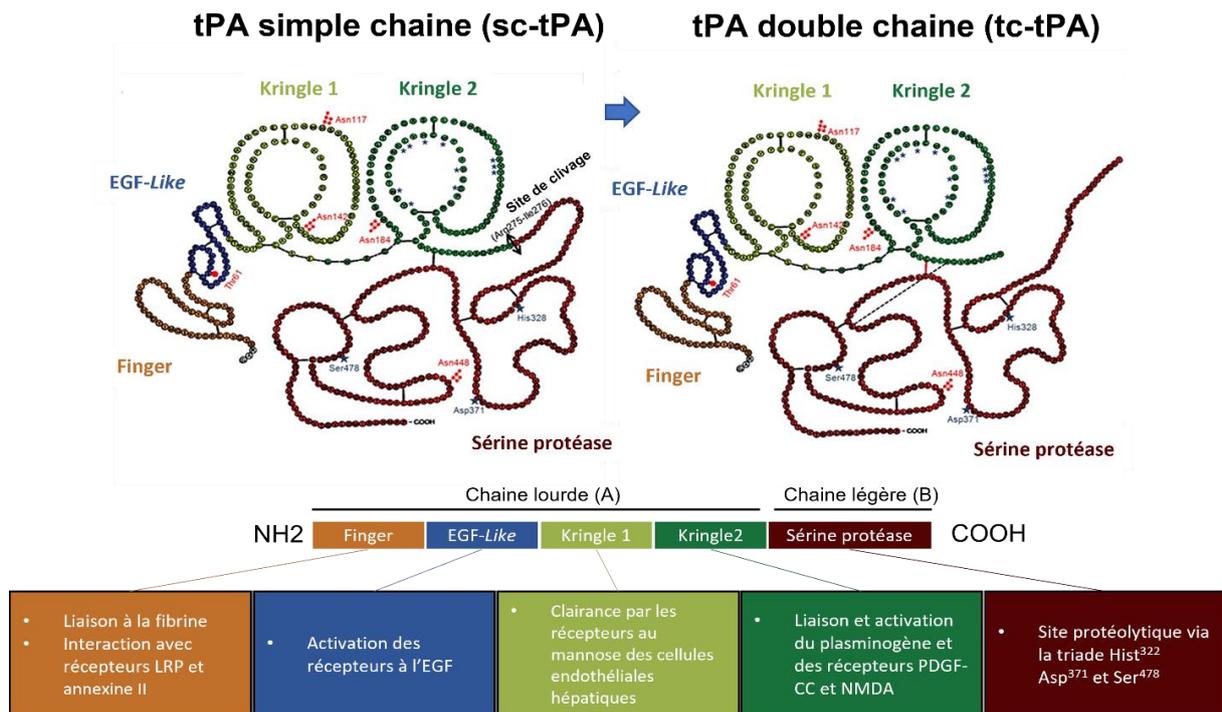
## 2.2 Structures du tPA

Le tPA est codé par le gène PLAT (*Plasminogen Activator Tissue type*), retrouvé sur le chromosome 8 chez l'homme (**Figure 12**) ainsi que chez la souris (*Mus musculus*) (Yang-Feng *et al.*, 1986).



**Figure 12** : Hybridation des sondes d'ADN complémentaire du tPA humain. Grâce à la technique d'autoradiographie en grain d'argent, nous voyons les sondes d'ADNc du tPA, localisées en position 8p12 et 8q11.2, du chromosome 8. (Yang-Feng *et al.*, 1986).

Le tPA humain est produit sous la forme d'un monomère bicaténaire constitué de 527 acides aminés et ayant une masse moléculaire de 69 kilos daltons (kDa) (Pennica *et al.*, 1983). Sous sa forme mature, il est constitué de 5 domaines structurels/fonctionnels, 17 ponts disulfures et 4 sites de glycosylation. La chaîne A ou chaîne lourde contient les domaines « *Finger* » (résidus 1 à 43), « *EGF-like* » (*En anglais : Epidermal Growth Factor*), (résidus 44 à 91), « *Kringle 1* » (résidus 92 à 173) et « *Kringle 2* » (résidus 174 à 275). La chaîne B ou légère contient le domaine « *sérine protéase* » (résidus 276 à 527), responsable de l'activité catalytique du tPA (Figure 13, adaptée de Chevilly *et al.*, 2015 ; Hébert *et al.*, 2016).



**Figure 13 :** *Structure du tPA et fonctions associées.* Illustration montrant le tPA dans ses deux configurations : simple chaîne ou sc-tPA (à gauche) et double chaîne ou tc-tPA (à droite), mettant en avant les 5 régions ou domaines distincts, associés à des fonctions propres (Finger, EGF-Like, Kringle1, Kringle2 et sérine protéase). Présence des 17 ponts disulfures, ainsi que du site de clivage du sc-tPA en tc-tPA (double flèche) par la plasmine ou les kallikréines ou le facteur Xa (Figure adaptée de *Chevilly et al., 2015 ; Hébert et al., 2016*).

- Le domaine **Finger** tire son nom de sa forte similarité avec le premier domaine *finger* de la fibronectine de type 1 (*Bányai et al., 1983*). Il est un acteur de l'action fibrinolytique du tPA et car il possède une forte affinité à la fibrine et y permet donc sa liaison. Le tPA, via son domaine *Finger*, en se fixant à la fibrine peut former un complexe tertiaire avec le plasminogène. Ce domaine permet aussi la fixation avec d'autres récepteurs tels que les récepteurs aux lipoprotéines de faible densité (en anglais : *Low Density Lipoprotein Receptor-related Protein, LRP*) et les récepteurs à l'annexine-II (*Hajjar et al., 1994*). De plus, le domaine *Finger* est également responsable de la liaison avec l'un de ses inhibiteurs : PAI-1 (en anglais : *plasminogen activator inhibitor type 1*) (*Kaneko et al., 1992*).

- Le domaine **EGF-like** tire également son nom de sa forte similarité avec le facteur de croissance épidermique. Il permet la fixation du tPA aux récepteurs EGF (Hurtado *et al.*, 2007). Sa O-glycosylation permet au tPA d'être recapturé et clairé par le foie (Hajjar & Reynolds, 1994).
- Le domaine **Kringle 1** (K1) possède un site de forte affinité pour la lysine (*Lysine Binding Site*, LBS). Il est composé de deux acides aminés aromatiques (Tryptophane 242 et Tryptophane 253) et reste fonctionnellement peu connu. Il est tout de même décrit dans la littérature l'importance de sa glycosylation dans sa recapture par le foie, par le biais des récepteurs au mannose, présents sur les cellules endothéliales (Kuiper *et al.*, 1988).
- Le domaine **Kringle 2** (K2) tout comme le domaine K1 possède un même domaine LBS mais cette fois-ci fonctionnel. La fonctionnalité de ce domaine LBS permet au tPA, *via* son domaine K2, d'interagir avec plusieurs substrats connus tels que le plasminogène, le facteur de croissance dérivé des plaquettes (en anglais : *platelet-derived growth factor-CC*, PDGF-CC) (Fredriksson *et al.*, 2004). Aussi, *via* son domaine K2, le tPA peut se lier à la sous-unité GluN1 des récepteurs N-méthyl-D-aspartate (NMDA) (Lopez-Atalaya *et al.*, 2008 ; Samson *et al.*, 2008) ce qui, comme nous allons le voir, participe à de nombreux processus neurobiologiques.
- Le domaine **Sérine protéase** (SP) est donc le seul domaine composant la chaîne B (ou légère) du tPA. Il s'agit du domaine catalytique, contenant la triade catalytique histidine en position 322, acide aspartique en position 371 et sérine en position 478 (Pennica *et al.*, 1983).

### 2.2.1 Les deux formes du tPA

Le tPA existe sous deux formes (**Figure 13**). Tout d'abord, la forme simple chaîne (en anglais : *single-chain*, sc-tPA) est la forme sécrétée, native. Contrairement aux autres sérines protéases dont la forme simple chaîne dite « zymogène » est inactive, le sc-tPA possède la particularité d'être actif en se liant avec la fibrine (Rijken *et al.*, 1982). Le sc-tPA peut être converti en forme double chaîne (en anglais *two-chain*, tc-tPA) par hydrolyse de la liaison peptidique reliant l'arginine en position 275 et l'isoleucine en position 276 (Ichinose *et al.*, 1984). Cette hydrolyse peut être faite par d'autres sérines protéases telles que les kallikréines, le facteur Xa ou encore la plasmine. Les deux parties nouvellement formées sont toujours liées entre elles par un pont disulfure entre la cystéine en position 299 (chaîne A) et la cystéine en position 430 (chaîne B) ainsi que par un pont salin nouvellement créé entre l'arginine en position 302 et l'acide glutamique en position 445 (Lamba *et al.*, 1996).

Tout comme la forme sc-tPA, la forme tc-tPA possède la fonction de liaison à la fibrine et, en présence de cette dernière, les deux formes présentent le même niveau d'activité catalytique. Cependant, en l'absence de fibrine, le tc-tPA aurait une activité catalytique supérieure à celle du sc-tPA (Petersen *et al.*, 1988).

De nombreux chercheurs ont tenté de comprendre les effets différentiels des deux formes du tPA. Par exemple, l'équipe d'accueil a montré au sein du parenchyme cérébral, que la forme sc-tPA était capable de promouvoir l'activité du récepteur NMDA (augmentation du flux calcique et induction de neurotoxicité) contrairement à la forme tc-tPA (Parcq *et al.*, 2012). Il a récemment été montré que le tc-tPA (mais pas le sc-tPA) modulait la mort neuronale *via* l'interaction avec le récepteur C-MET, conduisant au recrutement et à la dégradation par le protéasome, des récepteurs NMDA possédant la sous-unité GluN2B (Hedou *et al.*, 2021).

Également, une étude clinique réalisée en 2016 dans 13 centres français, a montré qu'il n'y avait pas d'association statistique entre le ratio sc-tPA/tc-tPA, administré lors du traitement des AVC ischémiques, et la survenue de handicap, de dépendance ou le décès à 3 mois. Cependant, une corrélation a été observée entre un ratio élevé de sc/(sc + tc) r-tPA et la présence de crises épileptiques précoces (Leys *et al.*, 2016).

## 2.3 Les Inhibiteurs du tPA

Comme évoqué plus haut, afin de réguler l'activité du tPA, il existe des inhibiteurs et en particulier les serpins : la neuroserpine (NS), PAI-1, et la protéase nexine 1 (PN1).

### 2.3.1 La neuroserpine (NS)

La neuroserpine est une protéine de 429 acides aminés ayant une masse moléculaire de presque 55 kDa. On la retrouve préférentiellement dans certains organes tels que le cœur et ou les reins (Schrimpf *et al.*, 1997) mais également au sein du SNC où sa libération est effectuée par les neurones ou les astrocytes (Osterwalder *et al.*, 1996 ; Yepes & Lawrence, 2004). La NS inhibe le tPA en se liant à son domaine catalytique et forment des complexes peu stables, ayant une durée de vie inférieure à 10 minutes ce qui réduit l'efficacité d'inhibition (Miranda & Lomas, 2006). Malgré cela, des études ont démontré un effet supérieur de la neuroserpine sur l'inhibition de la forme tc-tPA, formant un complexe plus stable (Hastings *et al.*, 1997).

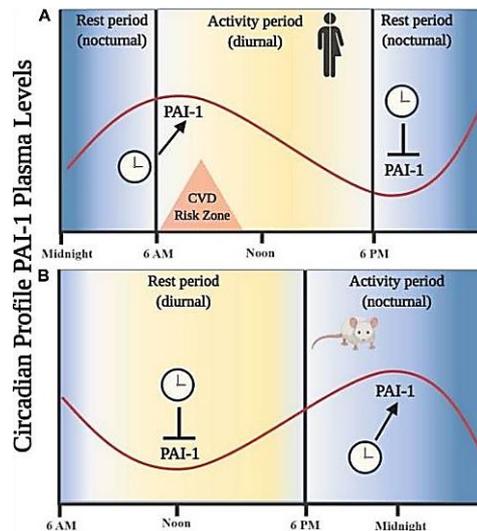
La NS n'est pas retrouvée dans la circulation sanguine, n'ayant alors aucun effet inhibiteur sur le tPA vasculaire (Docagne *et al.*, 1999).

### 2.3.2 PAI-1

Le deuxième inhibiteur très étudié du tPA est la protéine PAI-1, appelée également SERPINE 1. Elle est retrouvée dans la circulation sanguine, étant synthétisée par les cellules endothéliales, les cellules musculaires lisses ainsi que les plaquettes (Sprengers & Kluft, 1987). Comme nous l'avons précédemment évoqué, l'interaction entre le PAI-1 et les domaines *Finger* et *Kringle 2* du tPA réprime sa capacité à se lier à la fibrine et ainsi inhibe son action protéolytique (Kaneko *et al.*, 1992). Au sein du parenchyme cérébral, toutes les études ne sont pas consensuelles mais certaines ont montré en condition basale, l'expression de PAI-1 par les neurones et les astrocytes, mais en faible quantité (Buisson *et al.*, 1998 ; Hino *et al.*, 2001). En conditions pathologiques, telle que l'ischémie, Docagne et ses collaborateurs ont mis en évidence une augmentation de PAI-1 au sein des astrocytes (Docagne *et al.*, 1999). Il a été rapporté dans la littérature un lien entre le niveau de PAI-1 cérébral et des maladies psychiatriques, notamment des patients atteints de dépression majeure présentant des taux plus importants (Jiang *et al.*, 2016). Il a également été démontré au sein du laboratoire d'accueil que des souris déficientes en PAI-1 (PAI-1 KO) présentaient des phénotypes dépressifs ainsi qu'une résistance aux antidépresseurs (Party *et al.*, 2019).

Aussi, il a été démontré que PAI-1 inhibait l'activité du tPA mais aussi, bloquait l'activation de ERK1/2 dans des cultures de cellules PC12, altérant la croissance des neurites. Dans les cellules de Schwann, PAI-1 bloque également l'activation de ERK1/2 par le tPA et ainsi la migration cellulaire et dans les macrophages, PAI-1 empêche la capacité du tPA à initier la phosphorylation de I $\kappa$ B $\alpha$  et ainsi l'expression des cytokines (Gonias *et al.*, 2018). De plus, le knockout ou l'inhibition pharmacologique de PAI-1 par l'anticorps monoclonal MAI-12, empêche l'inhibition du tPA, ce qui en augmente les capacités fibrinolytiques dans des modèles expérimentaux de thromboses (Levi *et al.*, 1992).

Enfin, il a été démontré en 2020 des données très importantes concernant les variations des niveaux circulants de PAI-1 au cours de la journée (Figure 14, Carmona *et al.*, 2020).



**Figure 14 :** *Oscillations circadiennes de la protéine PAI-1. A :* Chez l'Homme, les niveaux de PAI-1 augmentent en phase de repos avec un pic au début de la journée et une diminution au cours de la journée. **B :** Chez la souris, nous pouvons observer une augmentation du niveau circulant de PAI-1 en quittant la phase repos et le niveau au plus haut durant la phase d'activité (Carmona et al., 2020).

Chez la souris, les niveaux de PAI-1 sont faibles durant les périodes de repos (le jour) et plus élevés durant les périodes d'activité (la nuit). Ces données sont à prendre à considération lors d'études sur le tPA, et soulignent l'importance du choix dans l'hébergement des animaux (cycle normal *versus* cycle inversé). Chez l'Homme, le pic de présence de PAI-1 au petit matin pourrait expliquer la survenue d'AVC du réveil.

### 2.3.3 La protéase nexine 1 (PN-1)

La protéase nexine-1 est une serpine présente dans la paroi des vaisseaux et exprimée par les plaquettes, les leucocytes ou les monocytes (Bouton et al., 2012). PN-1 est l'inhibiteur principal de la thrombine mais également du tPA et de la plasmine, notamment au sein du système nerveux. Il a d'ailleurs été rapporté que des souris déficientes en PN-1 avaient un temps d'occlusion vasculaire réduit ainsi qu'un taux de recanalisation supérieur aux souris WT (Boulaftali et al., 2011). PN-1, normalement produit en grandes quantités par les

plaquettes au sein des thrombi induits par le Chlorure de Fer ( $\text{FeCl}_3$ ), diminue l'efficacité de la thrombolyse au r-tPA dans ces modèles.

## 2.4 Expression périphérique du tPA

L'expression, ainsi que l'activité protéolytique du tPA, ont été détectées en conditions physiologiques en dehors du compartiment vasculaire, notamment dans la prostate, les testicules, les ovaires, le cœur ou encore les poumons (Rouf *et al.*, 1996). Les fonctions du tPA ne sont donc pas restreintes au maintien de la fluidité sanguine.

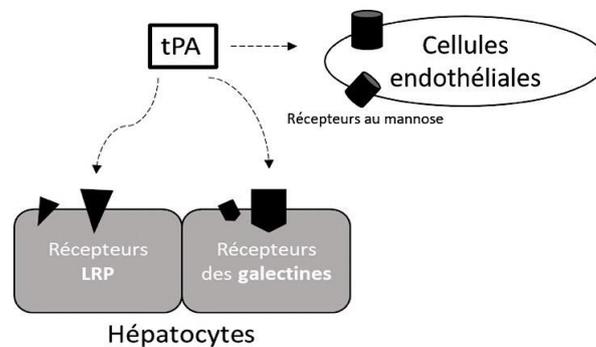
## 2.5 Expression du tPA au sein du système vasculaire

Chronologiquement, le tPA a, dans un premier temps, été identifié dans le sang (Binder *et al.*, 1978), sécrété par les cellules endothéliales. Pendant plusieurs années, il a été admis que le tPA était stocké dans des vésicules denses appelées corps de Weibel-Palade et co-localisait avec le facteur von Willebrand (Weibel & Palade, 1964). Cependant, selon Knipe et ses collaborateurs, il semblerait que le tPA soit stocké dans des petits granules, différents de ceux contenant le facteur von Willebrand (Knipe *et al.*, 2010).

Le tPA peut être libéré dans le sang de plusieurs façons : de **manière constitutive** (Angles-Cano *et al.*, 1985) ou bien **en réponse à des stimuli** divers tels que la thrombine, l'hyperoxie ou un stress mécanique (Levin *et al.*, 1997). Quel que soit son mode de libération, son rôle est de veiller à la bonne fluidité sanguine. Majoritairement libéré par les micro-vaisseaux (<100  $\mu\text{m}$  de diamètre), le tPA est libéré dans le compartiment sanguin sous forme simple chaîne, et circule à une concentration de 70 pico molaire (pM) ; sa demi-vie est estimée à 6 minutes et il est très rapidement converti en forme tc-tPA (Rijken & Lijnen, 2009). Sa concentration plasmatique diminue avec l'âge (Tomadesso *et al.*, 2022).

Pour rappel, l'activité du tPA au niveau vasculaire est également régulée par la présence constante de son inhibiteur, PAI-1 (Chandler *et al.*, 1997). Il a aussi été mis en évidence que le tPA circulant était également synthétisé par les hépatocytes (Zheng *et al.*, 2019). Ainsi, les hépatocytes et les cellules endothéliales établiraient les niveaux de tPA circulant, en conditions physiologiques (Gonias, 2019).

Le tPA est en grande partie clairé par le foie : grâce aux hépatocytes, *via* l'interaction entre le domaine *Finger* du tPA et les récepteurs LRP ou les récepteurs de la voie des galectines (Figure 15, Nagaoka *et al.*, 2003) et grâce aux récepteurs au mannose des cellules endothéliales auxquels le domaine K1 du tPA peut se lier (Kuiper *et al.*, 1988).



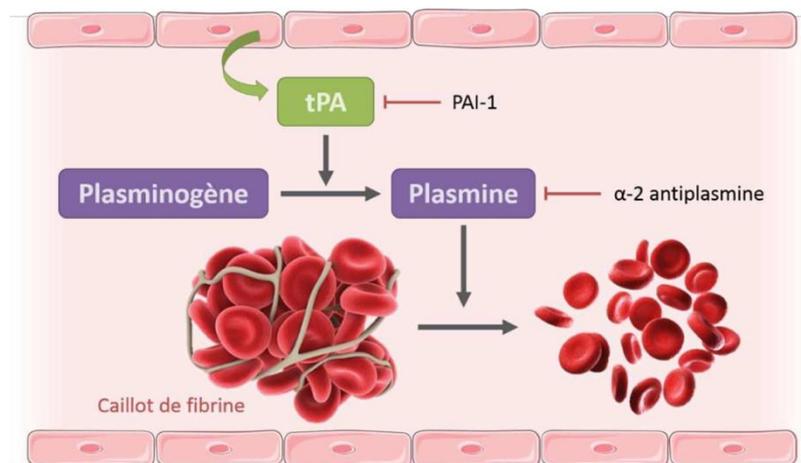
*Figure 15 : Le tPA peut être éliminé par les hépatocytes, via les interactions entre le domaine Finger du tPA et les récepteurs LRP ou aux galectines. Il peut aussi être clairé par les cellules endothéliales du foie via l'interaction entre le domaine K1 du tPA et les récepteurs au mannose (Figure adaptée de Nagaoka *et al.*, 2003).*

### 2.5.1 Rôles du tPA vasculaire dans la fibrinolyse

Comme énoncé précédemment, le tPA est principalement connu pour sa capacité à convertir le plasminogène en plasmine active, une protéase ciblant notamment la fibrine (Collen & Lijnen, 1991). Le tPA se lie au plasminogène *via* son domaine *Kringle 2* et permet sa conversion par sa région catalytique présente sur son domaine SP. Il est d'ailleurs bien connu qu'en absence de fibrine, le tPA n'est pas un bon activateur du plasminogène et

qu'en présence de fibrine, sa capacité à convertir le plasminogène en plasmine est augmentée de 100 fois (Rijken *et al.*, 1982).

Ce phénomène de fibrinolyse endogène permet une bonne fluidité sanguine (Figure 16). Cette propriété fibrinolytique a permis à la forme recombinante du tPA de révolutionner la prise en charge de pathologies thrombotiques, en particulier celles des AVC ischémiques (NINDS, 1995).



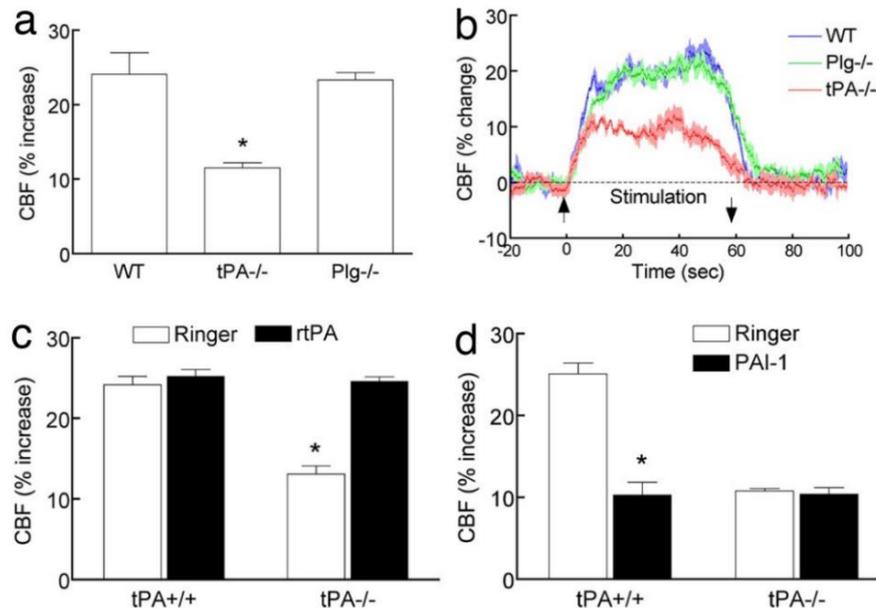
**Figure 16 :** *Processus de la fibrinolyse endogène.* Les cellules endothéliales libèrent le tPA dans le flux sanguin. Le tPA circulant peut convertir le plasminogène en plasmine active, à proximité des caillots de fibrine. Une fois active, la plasmine dissout ces caillots de fibrine et refluidifie le sang. La régulation de la fibrinolyse se fait, d'une part, par l'action de PAI-1 sur le tPA, et, d'autre part, par l' $\alpha$ -2 anti-plasmine sur la plasmine (Figure issue de la Thèse de Sophie Lenoir).

Au-delà de son rôle dans la fibrinolyse, le tPA est impliqué dans d'autres processus au sein du système vasculaire.

### 2.5.2 Rôle du tPA vasculaire dans le couplage neurovasculaire

Le couplage neurovasculaire, ou hyperémie fonctionnelle, désigne le fait que lorsque l'activité neuronale locale augmente, cela nécessite un plus grand apport en oxygène et en nutriments, se traduisant par une augmentation du DSC. Ce phénomène est assuré par un changement physique vasculaire, induit de diverses manières (Zhu *et al.*, 2022). Plusieurs études montrent que le tPA participe au contrôle de cette réponse vasculaire.

Par exemple, Armstead et ses collaborateurs ont mis en évidence que la libération de monoxyde d'azote induisait une vasodilatation et que ceci était dépendant du tPA et de l'uPA (Armstead *et al.*, 2004). *In vivo*, un modèle courant d'étude du couplage neurovasculaire est la mesure du DSC dans le cortex somatosensoriel en réponse à la stimulation des vibrisses. L'utilisation d'animaux transgéniques a permis une meilleure compréhension de l'action du tPA endogène sur le couplage neurovasculaire : en 2008, l'équipe du Pr. Iadecola a montré un déficit du couplage neurovasculaire chez des souris déficientes en tPA (tPA KO), déficit compensable par l'application de tPA au niveau du cortex somatosensoriel. Ce déficit n'existe pas chez les souris déficientes en plasminogène, suggérant un mécanisme indépendant du plasminogène ou de plasmine (Figure 17, Park *et al.*, 2008).



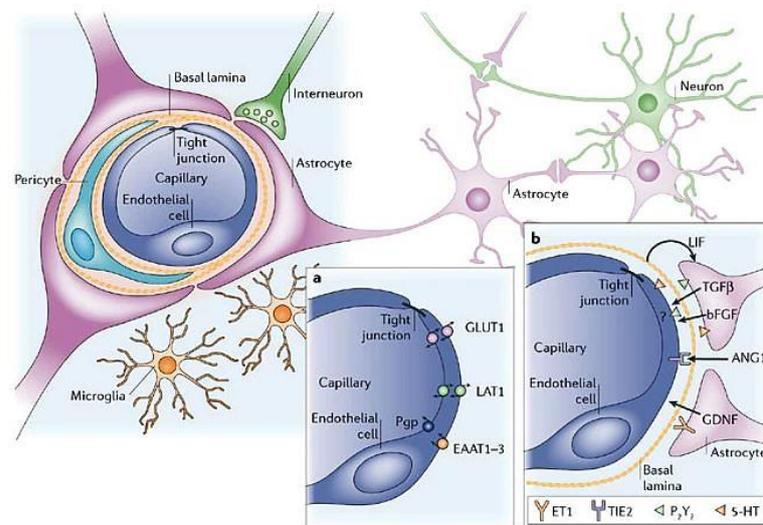
**Figure 17:** *Le tPA est un acteur clé du couplage neurovasculaire. A :* Les animaux tPA KO présentent un déficit de couplage neurovasculaire (contrairement aux animaux sauvages et aux animaux plasminogène KO), ne présentant pas d'augmentation du DSC dans le cortex somatosensoriel associé aux vibrisses stimulées (B). *C :* L'application locale de tPA permet de prévenir cet effet chez les animaux tPA KO. *D :* l'application de l'inhibiteur principal du tPA, PAI-1, atténue l'hyperémie fonctionnelle uniquement chez les animaux sauvages (Park et al., 2008).

En 2020, notre équipe a mis en évidence que l'interaction entre le tPA vasculaire et les récepteurs NMDA des cellules endothéliales permettait le couplage neurovasculaire. En effet, le blocage des récepteurs NMDA par des agents pharmacologiques tels que des antagonistes (MK-801) ou des anticorps empêchant l'interaction avec le tPA, que nous ne détaillerons par la suite, empêche l'augmentation du couplage neurovasculaire dans le cortex somatosensoriel suite aux stimulations des vibrisses (Anfray et al., 2020). Notre équipe a confirmé ce déficit de couplage neurovasculaire sur une nouvelle souche de souris déficientes en tPA, désignées tPA<sup>NULL</sup>. De plus, des animaux déficients en sous unité GluN1 des récepteurs NMDA uniquement sur les cellules endothéliales (GluN1-flox<sup>+/+</sup> / *Vascular Endothelial Cadherin-Cre*) présentent le même phénotype (Furon et al., 2023). Ces résultats confirment ainsi l'importance de l'interaction entre le tPA et les récepteurs NMDA des cellules endothéliales dans les phénomènes de couplage neurovasculaire.

### 2.5.3 Rôle du tPA vasculaire dans le maintien de la BHE

Toujours au sein du système sanguin, le tPA intervient dans un autre mécanisme très important : la perméabilité de la barrière hémato-encéphalique (BHE). Cette barrière physique au niveau des capillaires, protège le parenchyme, en filtrant spécifiquement certaines cellules ou molécules, nécessaires ou dangereuses pour les cellules nerveuses (Gosselet *et al.*, 2011). Elle est composée de plusieurs types cellulaires (Figure 18, Abbott *et al.*, 2006).

- **Les membranes basales astrocytaires**, ou *glia limitans*, sécrétées par les astrocytes et permettant l'ancrage des pieds astrocytaires aux vaisseaux.
- **Les astrocytes** et surtout les pieds astrocytaires recouvrant certains des vaisseaux et impliqués dans les échanges de molécules d'eau à travers la BHE *via* les aquaporines de type 4 (AQP4).
- **Les péricytes**, intégrés dans la membrane de la lame basale et intervenant dans la stabilité physique de la BHE.
- **La membrane basale** de l'endothélium, composée de laminine, collagène de type IV et de fibronectine.
- **Les cellules endothéliales**, reliées entre elles par des jonctions serrées appelées *zonulae occludens*, responsables de la perméabilité de la BHE, et par des jonctions adhérentes formées notamment par des cadhérines endothéliales.



**Figure 18 :** *Schéma illustrant les différents composants de la barrière hémato-encéphalique (BHE). Nous retrouvons notamment les pieds astrocytaires, les péricytes ainsi que les cellules endothéliales. Ensemble, ces éléments assurent l'homéostasie cérébrale en jouant un rôle de barrière sélective entre le sang et le cerveau (Abbott et al., 2006).*

Comme cité précédemment, la forme recombinante du tPA est utilisée dans le cadre du traitement des AVC ischémiques. Cependant, il peut aussi avoir des effets indésirables sur la BHE, surtout lorsqu'il est injecté en dehors de la fenêtre thérapeutique de 4 heures 30. En conditions physiologiques, il a été démontré *in vivo* et *in vitro* que le tPA pouvait traverser la BHE *via* un mécanisme de transcytose médié par les récepteurs LRP des cellules endothéliales (Benchenane et al., 2005) ainsi qu'être internalisé par les plexus choroïdes *via* LRP1 (Zuba et al., 2022). En conditions ischémiques, l'interaction du tPA avec les récepteurs LRP des cellules endothéliales, induirait la séparation des pieds astrocytaires, provoquant une perméabilisation de la BHE et conduirait à la survenue de transformations hémorragiques (Polavarapu et al., 2007) ou à l'entrée de tPA dans le parenchyme (Yepes et al., 2003). Il a également été mis en évidence le rôle du tPA dans l'augmentation de l'expression des métalloprotéinases matricielles de type 9 (en anglais : *Matrix Metalloproteinases* ou MMPs) provoquant la perméabilisation de la BHE. En effet, ces dernières sont responsables de la dégradation de protéines des lames basales de la BHE tels que la laminine et le collagène (Lakhan et al., 2013).

En outre, le tPA a la capacité de stimuler le PDGF-CC, qui, à son tour, peut interagir avec le récepteur  $\alpha$  du facteur de croissance plaquettaire (en anglais : *Platelet-Derived Growth Factor Receptor*, PDGFR- $\alpha$ ), localisé au niveau des astrocytes, entraînant une perméabilisation de la BHE (Su *et al.*, 2008).

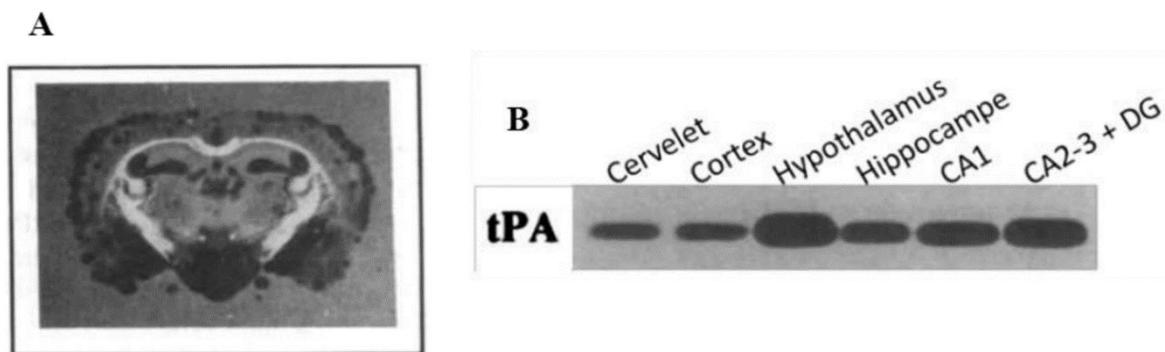
Il a également été mis en évidence que le tPA pouvait interagir avec les récepteurs NMDA des cellules endothéliales et induire une perméabilisation de la BHE dans un modèle de sclérose en plaques (Macrez *et al.*, 2016). De manière intéressante, il a été démontré que cette interaction pouvait être empêchée par l'utilisation d'un anticorps : le glunomab, empêchant l'interaction du domaine *Kring* 2 du tPA avec la région du domaine Amino-terminal (ATD) de la sous-unité GluN1 des récepteurs NMDA (Fernández-Monreal *et al.*, 2004 ; Macrez *et al.*, 2011). De plus, il a été démontré que le tPA était impliqué dans la diapédèse monocyttaire et induisait de l'inflammation en perméabilisant la BHE (Lopes Pinheiro *et al.*, 2016 ; Reijerkerk *et al.*, 2008). En 2010, il a été démontré que c'est notamment l'interaction du tPA avec les récepteurs NMDA et notamment la sous-unité GluN1, qui était responsable de la transmigration des monocytes à travers la BHE vers le parenchyme (Reijerkerk *et al.*, 2010).

## 2.6 Expression du tPA au sein du système nerveux central (SNC)

La présence de tPA au sein du cerveau a été mise en évidence par autoradiographie en 1981 par Soreq et Miskin. Leurs recherches avaient suggéré que le tPA parenchymateux était produit par les neurones ainsi que les cellules épithéliales du cervelet et des méninges (Soreq & Miskin, 1981). Ils avaient également émis l'hypothèse que les fonctions du tPA cérébral ne se limitaient pas à la thrombolyse, mais serait impliqué aussi dans des processus cérébraux au cours du développement ainsi qu'à l'âge adulte.

Quelques années plus tard, il a été montré chez l'homme, par le biais d'analyses transcriptionnelles (hybridation *in situ*), que le tPA était présent dans plusieurs régions du

SNC telles que la moelle épinière, le thalamus ou le cortex cérébral (Teesalu *et al.*, 2004). Chez la souris, son activité protéolytique (mesurée par zymographie *in situ*) a également été localisée dans de nombreuses régions, dont l'hippocampe, l'hypothalamus, le cortex et le cervelet (Figure 19, Sappino *et al.*, 1993). La présence de tPA au sein du SNC a depuis été confirmée par de nombreuses études (par exemple, Louessard *et al.*, 2016 ; Stevenson & Lawrence, 2018).



*Figure 19 : Localisation de l'activité protéolytique du tPA dans le SNC chez la souris, détectée par zymographie : in situ (A) et sur gel (B). Figure adaptée de (Sappino *et al.*, 1993).*

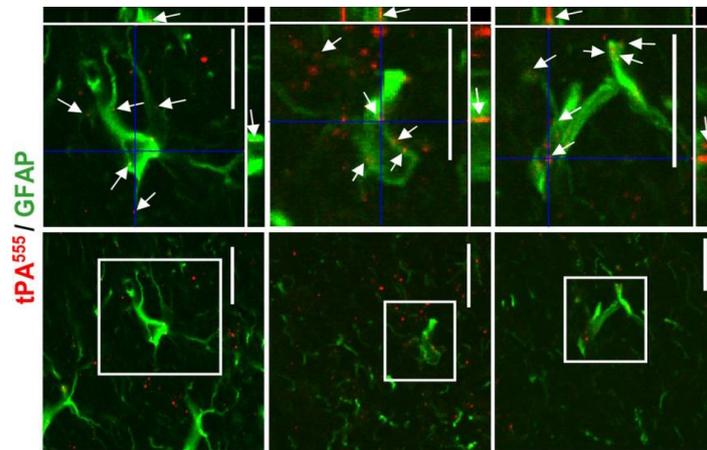
### 2.6.1 Expression du tPA par les astrocytes

L'expression de tPA par les astrocytes en conditions basales reste discutée (Louessard *et al.*, 2016 ; Stevenson & Lawrence, 2018 ; Toshniwal *et al.*, 1987). Certains auteurs ont rapporté l'expression du tPA au sein des pieds astrocytaires en contact avec la lame basale des vaisseaux (Polavarapu *et al.*, 2007) ainsi que dans les extensions astrocytaires au niveau des synapses (Jeanneret *et al.*, 2016).

Il a d'ailleurs été mis en évidence que la libération de tPA depuis les pieds astrocytaires induisait une perméabilisation de la BHE (Polavarapu *et al.*, 2007) et pouvait moduler les fonctions synaptiques (Gravanis & Tsirka, 2005).

La présence de tPA dans les astrocytes activés est documentée de manière plus consensuelle et serait notamment régulée par l'acide rétinoïque ou encore la protéine

kinase C (PKC) (Hultman *et al.*, 2008). Elle pourrait refléter une expression endogène et/ou résulter d'une recapture du tPA sécrété *via* les LRP présents sur les astrocytes (Fernández-Monreal *et al.*, 2004). Ce tPA va pouvoir être recyclé, permettant à la fois de réguler sa concentration synaptique et astrocytaire (autorégulation) (Figure 20, Cassé *et al.*, 2012).



**Figure 20 :** *Recapture in vivo du tPA par les astrocytes.* Le tPA couplé à un Alexa fluor 555 injecté dans le cerveau de souris est retrouvé colocalisé avec le marqueur des astrocytes activés, GFAP (Cassé *et al.*, 2012).

## 2.6.2 Expression du tPA par les cellules microgliales

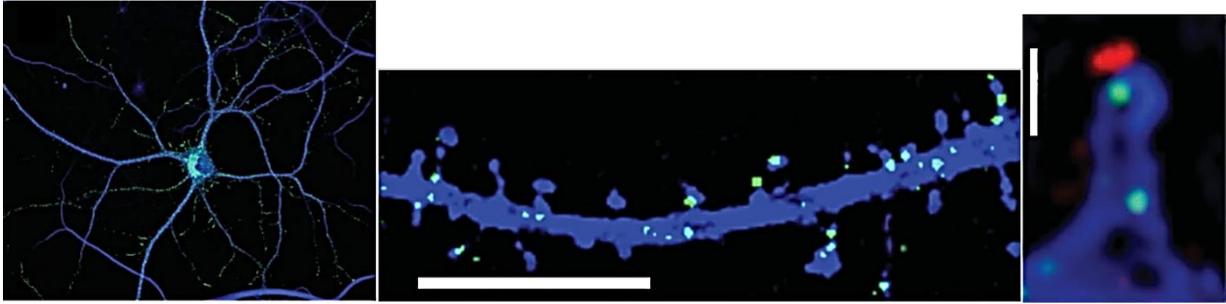
Tout comme pour les astrocytes, il n'y a pas de consensus concernant l'expression de tPA au sein de la microglie en conditions basales (Louessard *et al.*, 2016). Selon Rogove et collaborateurs, le tPA serait exprimé par la microglie et serait impliqué dans l'activation microgliale puisque des souris déficientes en tPA présentent une capacité d'activation microgliale réduite par rapport aux souris sauvages (Rogove *et al.*, 1999). Après un stress excitotoxique induisant de la neurodégénérescence, *in vitro*, l'ARN messager du tPA a été retrouvé au sein des cellules microgliales (Tsirka *et al.*, 1997). Quelques années plus tard, Siao et Tsirka ont démontré *in vitro* que des neurones en culture peuvent relarguer du tPA après stimulation au lipopolysaccharide (LPS) et ainsi activer la microglie. Ces auteurs ajoutent que ceci serait dépendant de l'interaction entre le domaine *Finger* du tPA et les récepteurs Annexine II de la microglie (Siao & Tsirka, 2002).

### 2.6.3 Expression du tPA par les oligodendrocytes

Concernant les oligodendrocytes, c'est en 2011 qu'il a été mis en évidence pour la première fois l'expression de tPA (Correa *et al.*, 2011). En effet, le tPA a été retrouvé dans la région du corps calleux, où les oligodendrocytes sont dits matures (capables de myéliniser), et son expression diminue au cours du vieillissement. De plus, le tPA présent dans les oligodendrocytes est impliqué dans la migration des précurseurs oligodendrocytaires ainsi que la régénération de la myéline suite à une atteinte de la substance blanche (Leonetti *et al.*, 2017). De récents travaux de l'équipe montrent également un défaut dans la différenciation des oligodendrocytes ainsi que la compaction de la myéline chez des souris déficientes en tPA (Delaunay *et al.*, données non publiées).

### 2.6.4 Expression du tPA par les neurones

Depuis les années 1980, plusieurs études se sont intéressées à l'expression neuronale de tPA. Par exemple, il a été démontré *in vitro* que le tPA pouvait être sécrété par les neurones granulaires du cervelet (Krystosek & Seeds, 1981b) et que cette sécrétion pouvait être issue du corps cellulaire ou du cône de croissance (Krystosek & Seeds, 1981a). Toujours *in vitro* dans un modèle de culture de neurones hippocampiques, il a été visualisé la présence de l'ARN messager et de la protéine tPA, colocalisée avec la synaptophysine II, au niveau des dendrites et des synapses (Shin *et al.*, 2004). Parmer et collaborateurs ont démontré que le tPA était stocké dans des vésicules catécholaminergiques, capables de naviguer dans le sens antérograde et rétrograde des axones ainsi que des dendrites (Parmer *et al.*, 1997). Par la suite, il a été démontré que le tPA était stocké dans des vésicules à cœur dense, positives pour la sécrétogranine II, transportant également des hormones ou encore des neuropeptides (Figure 21, Lochner *et al.*, 2006). De plus, cette étude a démontré que l'exocytose du tPA était dépendante de la concentration calcique extracellulaire.



*Figure 21 : Le tPA est exprimé par les neurones, stocké dans des vésicules à cœur dense dans les épines dendritiques. A gauche, visualisation du tPA-GFP (vert) colocalisant avec le marqueur de protéine dendritique MAP2 (bleu). Au centre, image du tPA-EYFP (jaune) dans les épines dendritiques des neurones hippocampiques en culture (DIV14) après 24 heures d'expression d'ECFP (bleu), barre d'échelle = 20  $\mu\text{m}$ . A droite, visualisation d'une synapse isolée à DIV17 (17 jours in vitro), avec en jaune le tPA-EYFP et en bleu l'ECFP. Visualisation en immunohistochimie (IHC) de la synapsine II en rouge, barre d'échelle = 1  $\mu\text{m}$  (Figure adaptée de [Lochner et al., 2006](#)).*

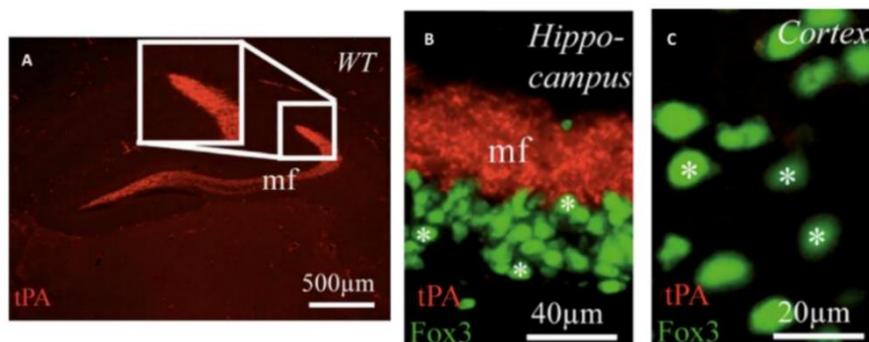
Notre équipe a mis en évidence le rôle neuromodulateur du tPA. Il a été mis en évidence que les neurones corticaux pouvaient exprimer du tPA, et qu'une dépolarisation neuronale induisait la libération de tPA, par un processus d'exocytose dépendante du calcium. De plus, l'équipe a montré que le tPA neuronal libéré, modulait la signalisation des récepteurs NMDA et que les astrocytes pouvaient recapter ce tPA nouvellement libéré, *via* un mécanisme dépendant des récepteurs LRP ([Nicole et al., 2001](#) ; [Fernández-Monreal et al., 2004](#)).

Encore plus récemment, deux études du laboratoire ont mis en évidence d'une part que le tPA était emmagasiné dans des vésicules VAMP-2 positives (en anglais : *vesicle-associated membrane protein 2*) ([Lenoir et al., 2019](#)) et d'autre part, que l'exocytose de ces vésicules positives au tPA conduisait conjointement à l'exocytose d'autres vésicules telles que les vésicules VGlut1 (en anglais : *Vesicular Glutamate transporter type 1*) positives, contenant du glutamate ([Varangot et al., 2023](#)).

L'ensemble des éléments cités ci-dessus suggèrent que le tPA exprimé par les neurones possède de nombreuses caractéristiques communes aux neurotransmetteurs.

C'est une protéine synthétisée au niveau présynaptique, stockée dans des vésicules à cœur dense, libérée dans la fente synaptique suite à une stimulation, agissant sur des récepteurs post-synaptiques (comme nous le verrons plus tard) et pouvant être recaptée de la fente synaptique par les astrocytes. En revanche, il ne possède pas un récepteur post-synaptique propre et doit être considéré comme un **neuromodulateur**, impliqué dans un nombre important de fonctions cérébrales/cognitives.

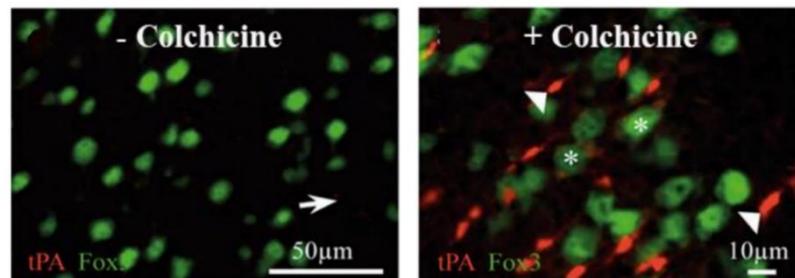
L'immunodétection du tPA avec les anticorps disponibles et les protocoles « classiques » de fixation/révélation ne sont étonnamment pas toujours adaptés pour les neurones corticaux. Par exemple, alors que l'on détecte aisément la protéine du tPA dans les fibres moussues hippocampiques, les neurones corticaux ne présentent pas d'immunomarquage (**Figure 22**, Louessard *et al.*, 2016). Ainsi, de nouvelles techniques de biologie moléculaire ont dû être développées pour pallier ce manque.



**Figure 22** : Immunodétection du tPA dans l'hippocampe et le cortex chez la souris adulte. **A** et **B** : Immunomarquage positif au sein des fibres moussues hippocampiques et absence d'immunomarquage dans le soma des neurones hippocampiques Fox3 positifs (étoiles). **C** : Immunomarquage négatif au tPA au sein des neurones corticaux Fox3 positifs (étoiles) (Figure adaptée de Louessard *et al.*, 2016).

Comme expliqué précédemment, alors que le tPA neuronal est stocké dans des vésicules qui transitent en permanence le long des neurites, Louessard et ses collaborateurs ont bloqué ce transport axo-dendritique, grâce à la colchicine, avec l'idée qu'une accumulation des vésicules néosynthétisées et non libérées favoriserait la détection du tPA. Ainsi, couplée à des analyses immunohistochimiques, transcriptionnelles et électrophysiologiques (en

anglais : *single-cell reverse transcription polymerase chain reaction, RT-PCR*), cette approche a permis de mettre en évidence la présence de tPA dans 10 à 15% des neurones corticaux excitateurs (Figure 23, adaptée de Louessard *et al.*, 2016).



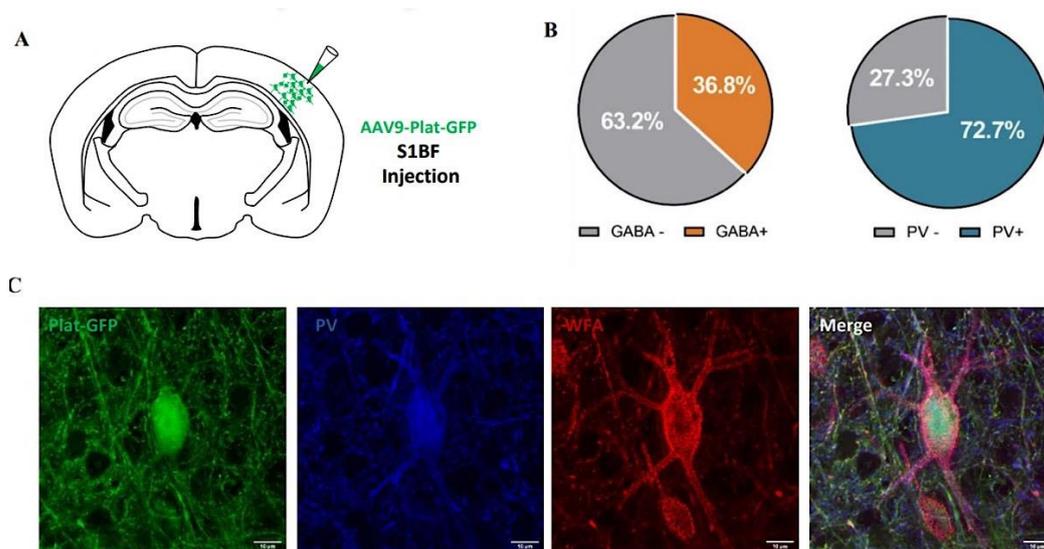
**Figure 23 :** Détection du tPA au sein des neurones corticaux chez la souris, avec ou sans traitement à la colchicine. **A :** Neurones Fox3 positifs, immuno-négatifs au tPA sans traitement à la colchicine. **B :** Présence de tPA au sein du soma des neurones corticaux Fox3 positifs (étoiles) et au sein des prolongements neuronaux (flèches), après blocage du transport des vésicules positives au tPA, par la colchicine (Figure adaptée de Louessard *et al.*, 2016).

Cette étude ne s'était pas particulièrement intéressée aux neurones inhibiteurs et peu d'autres études ont démontré l'expression de tPA par les neurones GABAergiques (en anglais : *gamma-aminobutyric acid*). Il a tout de même été mis en évidence la présence de tPA au sein de certains types d'interneurones spécifiques tels que ceux exprimant la somatostatine (SST), la parvalbumine (PV) ou le peptide vasointestinal (en anglais : *vasointestinal peptide* ou VIP) (Chu *et al.*, 2015 ; Fredriksson *et al.*, 2015 ; Stevenson & Lawrence, 2018).

En 2022, j'ai contribué à apporter de nouvelles connaissances concernant l'expression du tPA au sein des neurones chez la souris (Lépine *et al.*, 2022).

Nous avons utilisé une approche moléculaire innovante : un virus adéno-associé (en anglais : *adeno-associated virus*) dont le sérotype possède un tropisme spécifique pour les neurones et les astrocytes et codant pour une protéine fluorescente, la GFP (en anglais : *green fluorescent protein*), sous le contrôle d'une partie du promoteur du tPA (en anglais : *plasminogen activator tissue type*, Plat). Cette construction « rapporteur » une fois injectée dans le cortex somatosensoriel de souris sauvage, nous a permis de visualiser, parmi les

cellules transduites par les AAV9 Plat GFP, celles qui peuvent exprimer du tPA (Figure 24). Couplée à des analyses immunohistochimiques de différents marqueurs (anti-GFP, anti-GABA, anti-parvalbumine), cette technique a mis en évidence que parmi les cellules transduites (GFP positives), 37% expriment le GABA, dont pratiquement les  $\frac{3}{4}$  expriment la parvalbumine (PV).



**Figure 24** : L'injection de virus adéno-associés (AAV9) dans le cortex somatosensoriel primaire (S1BF) de souris adultes dévoile l'expression de tPA par des neurones inhibiteurs GABAergiques. **A** : injection d'AAV9 codant pour une protéine fluorescente (GFP) sous le contrôle du promoteur du tPA (Plat). **B** : Analyses quantitatives de l'expression du marqueur des neurones inhibiteurs (GABA) et des interneurons parvalbuminergiques (PV), parmi les cellules GFP positives. **C** : images représentatives d'une analyse en microscopie confocale permettant la co-détection de la GFP (vert), du marqueur des interneurons PV (bleu) et du marqueur des réseaux périneuronaux (en anglais : Perineuronal Nets : PNNs) avec la lectine *Wisteria Floribunda Agglutinin* (WFA, rouge). Fusion de l'ensemble des marquages (merge). (Figure adaptée de *Lépine et al., 2022*).

Comme nous le détaillerons dans la première partie des résultats 1, intitulée "**Contexte bibliographique de l'étude**", les interneurons à Parvalbumine présentent une particularité : ils sont entourés de structures matricielles appelées réseaux périneuronaux (PNNs). Nous verrons alors que le tPA exprimé par les interneurons PV, est impliqué dans la régulation des PNNs.

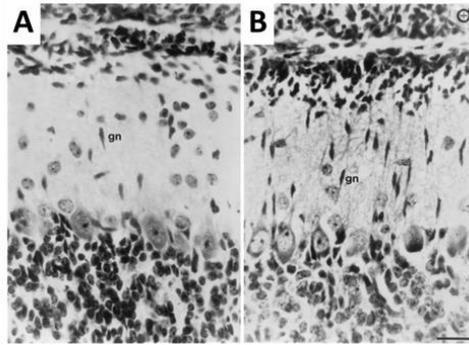
## 2.7 Les fonctions du tPA au sein du SNC

Depuis le début des années 1980, de nombreuses fonctions ont été attribuées au tPA au sein du système nerveux central. Ces fonctions s'étendent des aspects les plus cellulaires/moléculaires aux aspects plus cognitifs/comportementaux.

### 2.7.1 Implication du tPA dans le développement cérébral et la migration cellulaire

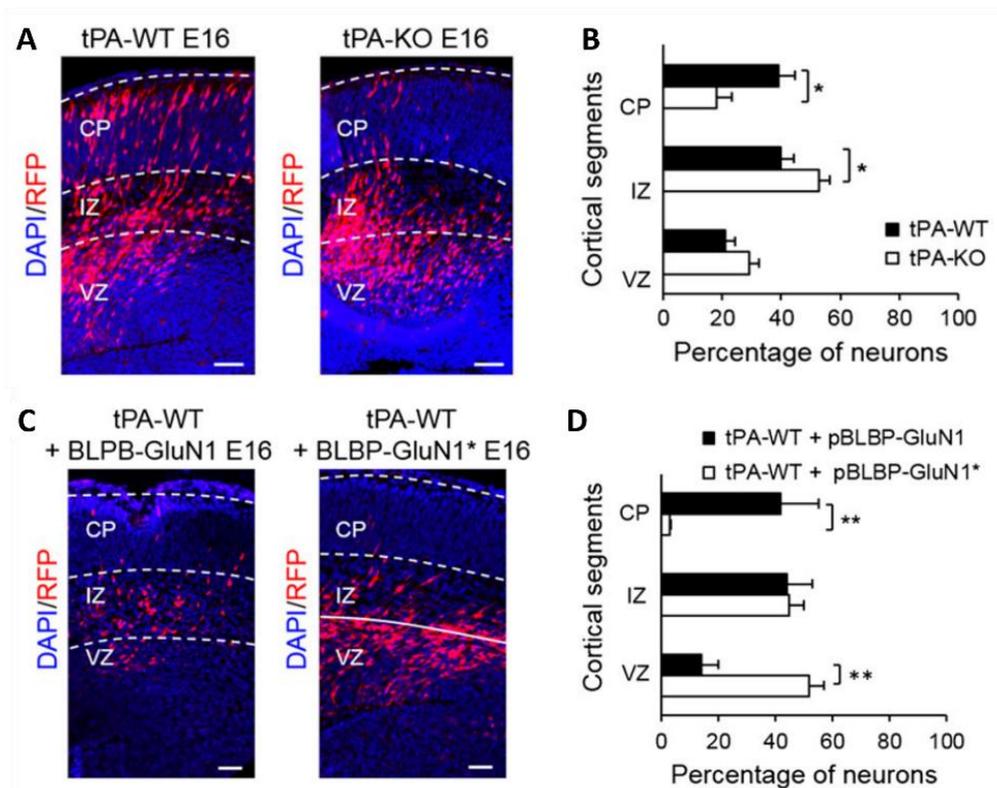
Le tPA est un acteur clé du développement cérébral et en particulier de la mise en place des circuits neuronaux. La première preuve a été faite dans le cervelet au début des années 1980 par Krystosek et Seeds, qui ont mis en évidence que le prolongement des cellules granulaires était capable de synthétiser du tPA lors du développement, en particulier durant les premières semaines après la naissance (Krystosek & Seeds, 1981b). Ils ont également mis en évidence la présence d'ARN messager du tPA en concomitance des pics de migration cellulaire, notamment au 7<sup>ème</sup> jour post-natal, jour très important dans la migration cellulaire. De plus, il a été montré qu'une fois la migration effectuée, cette quantité de tPA revenait à un niveau inférieur (Freidman & Seeds, 1995).

De manière intéressante, les auteurs ont observé que les souris tPA KO ont un retard de migration des cellules granulaires, se traduisant par une accumulation de cellules dans la couche moléculaire du cervelet (Figure 25, Seeds *et al.*, 1999).



*Figure 25 : Migration des cellules granulaires du cervelet chez des souris sauvages (A) et des souris n'exprimant plus le gène codant pour le tPA (B) (Seeds et al., 1999).*

Au niveau neuronal, le tPA est également impliqué dans la migration durant la corticogénèse, période durant laquelle les neuroblastes migrent de la zone ventriculaire vers la plaque corticale, en utilisant la glie radiaire pour se déplacer. En effet, les souris tPA KO, présentent un retard ainsi qu'une accumulation anormale de neuroblastes lors de leur migration, par l'intermédiaire des récepteurs NMDA présents sur la glie radiaire, et notamment de la sous-unité GluN1 (Figure 26, Pasquet et al., 2019).



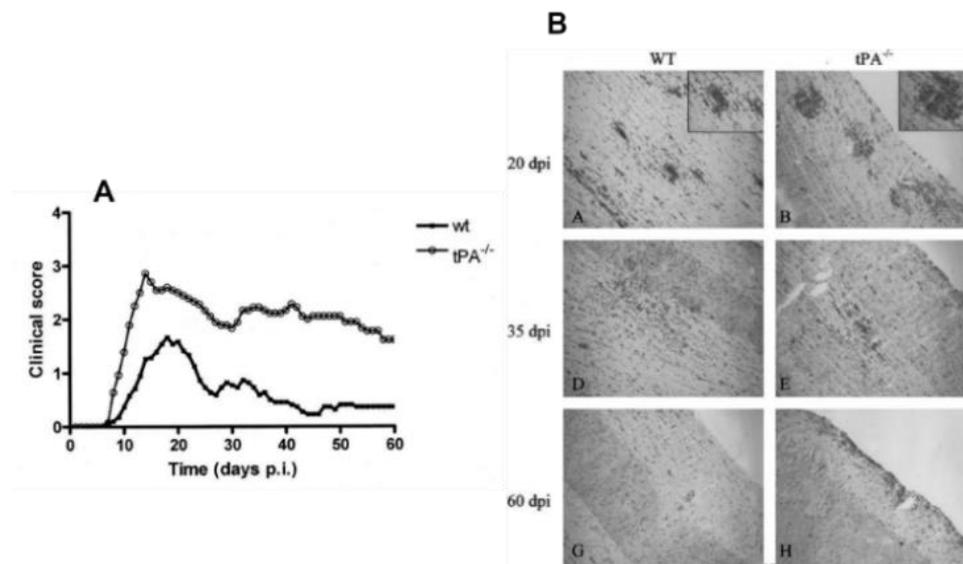
**Figure 26 : Rôle du tPA et des récepteurs NMDA dans la migration des neuroblastes pendant la corticogénèse.** **A et B :** Photos et quantifications des progéniteurs neuronaux dans les différentes couches corticales chez souris sauvages et retard de migration de ces progéniteurs neuronaux observés chez les souris déficientes en tPA (tPA KO) à 16 jours de vie embryonnaire (E16). L'électroporation *in utero* du plasmide pCAG-RFP à E14 permet de suivre les progéniteurs neuronaux (rouge). **C et D :** Photos et quantifications de l'importance de l'interaction entre le tPA et la sous unité GluN1 des récepteurs NMDA présents sur la glie radiaire, dans la migration des neuroblastes. La mutation de la sous-unité GluN1 empêchant cette interaction avec le tPA induit une accumulation des progéniteurs dans la zone ventriculaire (VZ) (Figure adaptée de *Pasquet et al., 2019*).

### 2.7.2 tPA et substance blanche

Comme cité précédemment, le tPA peut être exprimé au niveau des oligodendrocytes, et donc être présent de manière basale dans la substance blanche et pourrait influencer la physiopathologie de la lignée oligodendrocytaire. Ainsi, Correa et collaborateurs ont montré que la liaison du domaine *EGF-Like* du tPA aux récepteurs à l'EGF des oligodendrocytes permet d'empêcher l'apoptose des oligodendrocytes en condition d'ischémie (*Correa et al.,*

2011). De plus, en 2017, Leonetti et collaborateurs ont montré un effet du tPA dans la migration des oligodendrocytes (Leonetti *et al.*, 2017).

En effet, l'interaction entre le domaine *EGF-Like* du tPA et les récepteurs à l'EGF permet la migration des progéniteurs des oligodendrocytes. Le rôle du tPA dans la substance blanche a été largement étudié au sein de la sclérose en plaques, même s'il a été suggéré que sa contribution dans l'encéphalomyélite allergique expérimentale (EAE, un modèle de sclérose en plaques) était limitée, au vu de l'augmentation importante de PAI-1 dans la lésion (Gveric *et al.*, 2001). Cependant, des souris déficientes en tPA (tPA KO) présentent des symptômes plus sévères, une latence de récupération physique plus importante ainsi qu'une inflammation exacerbée par rapport à des souris sauvages (Figure 27, East *et al.*, 2005). De plus, des souris déficientes en PAI-1 montrent les résultats opposés (East *et al.*, 2008).



**Figure 27 :** *Implication du tPA dans la physiopathologie de la sclérose en plaques chez la souris.* **A :** les souris déficientes en tPA ont un développement de la maladie de la sclérose en plaques plus sévère et plus prolongé que les souris sauvages. **B :** La présence de macrophages (marqueurs F4/80), synonyme d'infiltration monocytaire et d'inflammation, est plus importante chez les souris déficientes en tPA (Figure adaptée de East *et al.*, 2005).

Plus récemment, il a été retrouvé des résultats inverses. En effet dans un modèle d'EAE, les souris tPA KO avaient des symptômes moins importants que les souris WT (Hélie *et al.*, 2021).

### 2.7.3 tPA, traumatismes médullaires et lésions nerveuses

En 2011, il a été démontré dans un modèle de traumatisme médullaire que l'utilisation de la chondroïtinase ABC (une enzyme d'origine bactérienne) pouvait dégrader les CSPGs (*Chondroitin sulfate proteoglycan*), et en particulier leurs chaînes de sucre, afin de promouvoir une récupération motrice et sensitive suite à des lésions de la moelle épinière. Cette étude s'est également intéressée au rôle du tPA dans ces processus et a démontré que des souris dépourvues en tPA (tPA KO) présentaient une diminution de la croissance des neurites et une récupération sensorielle et motrice atténuée malgré le traitement à la ChABC. Ces découvertes suggèrent que la cascade tPA/plasmine agit en aval de ChABC pour permettre une amélioration synergique de la récupération sensorielle et motrice (Bukhari *et al.*, 2011).

Toujours dans un modèle de traumatisme médullaire, il a été démontré que le tPA activait la pro-ADAMTS-4 (en anglais : *A disintegrin and metalloproteinase with thrombospondin motifs 4*) en sa forme active, celle-ci étant alors capable de dégrader les CSPGs, favorisant ainsi la repousse des axones et la récupération fonctionnelle des souris (Lemarchant *et al.*, 2014).

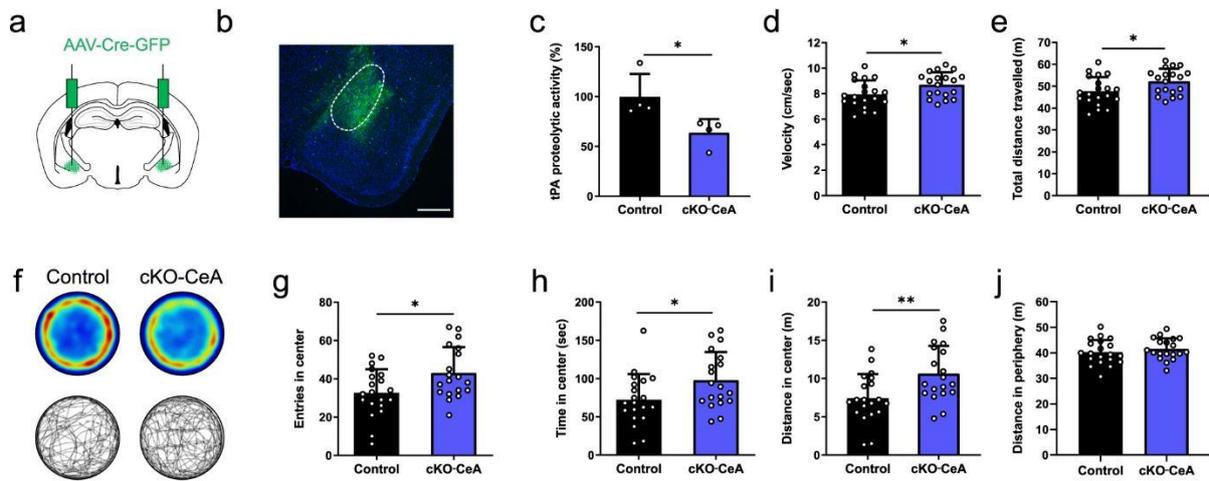
Dans un modèle de lésion du nerf sciatique, le tPA a la capacité de dégrader les dépôts de fibrine se formant au sein de la lésion, responsables de l'inflammation et de la dégénérescence axonale (Akassoglou *et al.*, 2000). Une autre expérience a montré que la régénération axonale était bien dépendante du tPA mais indépendante de son domaine catalytique et de ses fonctions fibrinolytiques (Minor *et al.*, 2009).

#### 2.7.4 tPA et cognition

Le tPA des régions corticales ou limbiques joue également des rôles importants dans certains processus cognitifs tels que la mémoire ou l'anxiété. Par exemple, une étude de l'équipe a mis en évidence un rôle du tPA dans les processus de mémoire spatiale car les souris déficientes en tPA présentaient des déficits lors de tests évaluant l'exploration ou la mémoire spatiale (Benchenane *et al.*, 2007). Sur le plan mécanistique, l'interaction entre le tPA et la sous unité GluN1 des récepteurs NMDA est responsable de ce phénotype mnésique. Pour montrer cela, les auteurs ont administré un peptide correspondant à la région NTD de la sous unité GluN1 des récepteurs NMDA à des souris sauvages, chez qui cette immunisation active reproduit le phénotype déficitaire des souris (Benchenane *et al.*, 2007). L'expression du tPA au sein du système limbique et notamment de l'hippocampe, a également fait l'objet d'études pour ses rôles dans des phénomènes émotionnels. En 2003, Pawlak et ses collaborateurs ont mis en évidence que les souris KO pour le tPA sont moins anxieuses que les souris sauvages (Pawlak *et al.*, 2003). De manière intéressante, une autre équipe a mis en évidence que des souris déficientes en neuroserpine sont plus anxieuses que leurs homologues sauvages (Madani *et al.*, 2003).

Il a également été mis en évidence que le tPA d'origine hippocampique était impliqué dans les mécanismes de peur conditionnée car les souris déficientes en tPA présentaient un conditionnement de peur réduit par rapport aux souris sauvages (Calabresi *et al.*, 2000).

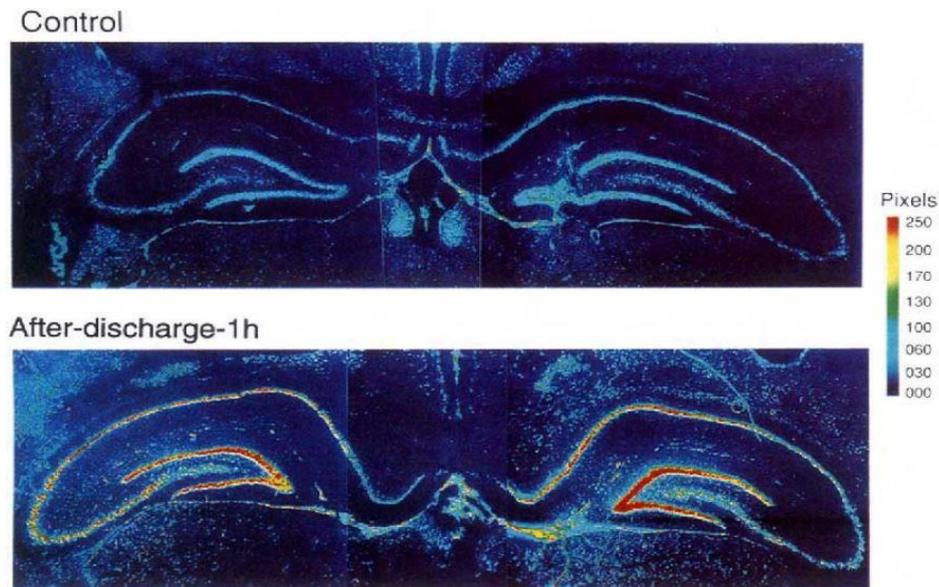
Plus récemment, une étude du laboratoire a mis en évidence un rôle du tPA originaire des neurones inhibiteurs GABAergiques PKC-Delta au sein de l'amygdale dans le contrôle de l'anxiété (Douceau *et al.*, 2022). La délétion conditionnelle du tPA dans l'amygdale centrale induit une hyperactivité locomotrice évaluée en *openfield* (un environnement anxiogène), se traduisant par une diminution de la réponse anxieuse (Figure 28, Douceau *et al.*, 2022).



**Figure 28 :** *Le tPA originaire de l'amygdale centrale est impliqué dans l'hyperactivité et l'anxiété. A :* Injection bilatérale d'AAV9-Cre-GFP chez des souris tPA flox<sup>+/+</sup> (cKO) ou flox<sup>-/-</sup> (WT). **B :** Immunohistochimie anti-GFP (vert) et anti-DAPI (bleu) dans la zone d'injection (amygdale centrale). **C :** L'activité protéolytique du tPA mesurée en zymographie diminue chez les souris délétées en tPA (cKO). **D-F :** La délétion du tPA dans l'amygdale centrale induit une hyperactivité locomotrice mesurée par Openfield (vélocité et distance parcourue). **G-J :** La délétion du tPA induit une diminution de la réponse anxieuse. Les souris cKO passent plus de temps et parcourent plus de distance au centre de l'openfield (Figure adaptée de Douceau et al., 2022).

### 2.7.5 tPA et plasticité synaptique

Aussi, le tPA est impliqué dans les phénomènes de plasticité et de consolidation synaptique, notamment dans la potentialisation à long terme (en anglais : *long term potentiation*, LTP) (Qian et al., 1993) et la dépression à long terme (en anglais : *long term depression*, LTD) (Collingridge et al., 2010). Ces phénomènes ont majoritairement été étudiés dans les régions hippocampiques et notamment le gyrus denté, dans lesquelles le tPA est très fortement exprimé (Sappino et al., 1993 ; Louessard et al., 2016). Qian et ses collaborateurs ont observé un pic de synthèse d'ARN messager du tPA au niveau des neurones hippocampiques, 1 heure après des stimulations électriques intenses et répétées (Figure 29, Qian et al., 1993). Ce résultat n'était plus retrouvé lorsque les récepteurs NMDA étaient inhibés pharmacologiquement par du MK-801, suggérant que l'effet de LTP était médié par les récepteurs NMDA d'une part et par le tPA d'autre part.



*Figure 29 : Illustration de l'augmentation rapide de l'expression d'ARN messager du tPA. Hybridation in situ contre les ARN messagers du tPA après 1 heure de stimulation électrique (60 Hz pendant 1 seconde avec des impulsions de 1 ms à 500  $\mu$ A) qui a induit une moyenne de 34 s de décharge totale) (Qian et al., 1993).*

Le rôle du tPA dans le développement de la plasticité synaptique a également été retrouvé au niveau du cervelet et des cellules de Purkinje chez des rats soumis à des tâches d'apprentissage moteur (Seeds et al., 1995). Il apparaît aussi que l'effet du tPA sur la LTP serait davantage lié à la forme simple chaîne du tPA (Parcq et al., 2012).

En 1998, Baranes et ses collaborateurs ont démontré que la LTP *in vitro* est reversée par l'ajout d'inhibiteurs du tPA (synthétique : tPA stop ou recombinant : PAI-1), mais potentialisée par l'ajout de tPA dans les cultures (Baranes et al., 1998). Ces mêmes résultats ont été observés *in vivo* chez des souris tPA KO, qui perdent leur capacité à générer de la LTP. Au contraire, les souris surexprimant le tPA ont une LTP augmentée (Madani et al., 1999). Ces effets du tPA sur les phénomènes de LTP peuvent faire intervenir plusieurs mécanismes autres que ceux dépendants du récepteur NMDA. Par exemple, en convertissant le plasminogène en plasmine active, le tPA favorise la dégradation des protéines de la MEC et ainsi renforce les connexions au niveau synaptique (Plow et al., 1995). La formation de plasmine par le tPA peut également aboutir à la conversion du pro-BDNF

en BDNF mature, un facteur de croissance impliqué dans le développement de synapses (Pang & Lu, 2004). Aussi, le tPA peut interagir avec les LRP (en particulier les LRP1) afin d'initier des cascades moléculaires impliquant la protéine Kinase A. L'ajout de bloqueurs de l'interaction tPA/LRP inhibe les phénomènes de LTP (Zhuo *et al.*, 2000). Enfin, il apparaît que la plasticité synaptique peut être liée à la capacité du tPA à cliver la rééline, cette dernière participant à la consolidation synaptique (Trotter *et al.*, 2014).

Encore une fois, à travers ces exemples, nous pouvons voir que le tPA peut, *via* ses différents domaines, interagir avec différents récepteurs et jouer des rôles importants dans des fonctions cellulaires/moléculaires et cognitives variées.

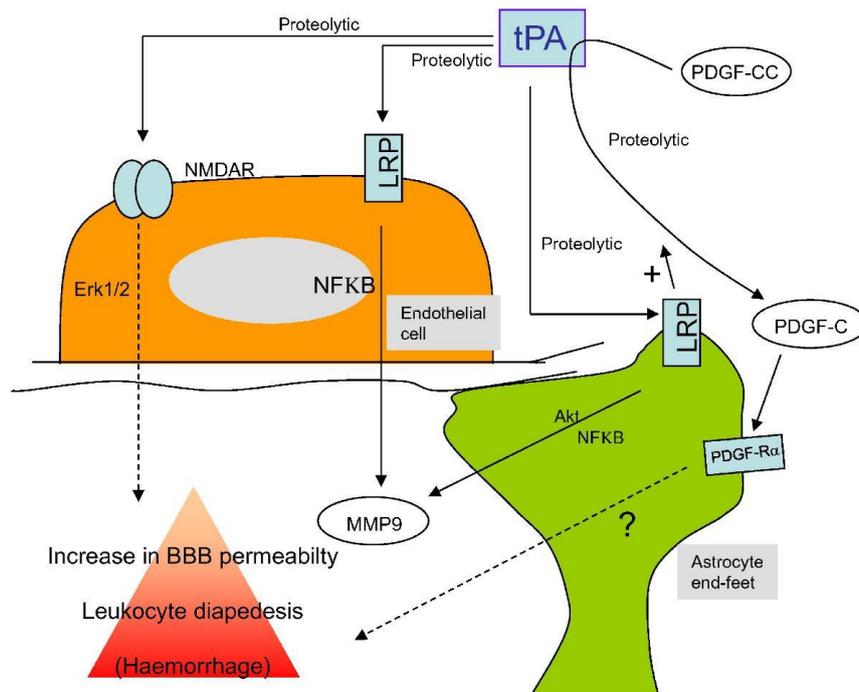
### 2.7.6 tPA, inflammation et neuroinflammation

Rogove et ses collaborateurs ont démontré que l'activation microgiale et la mort neuronale sont moins importantes chez des souris tPA KO comparées à leurs homologues WT, à la suite d'une injection hippocampique de kaïnate (Rogove *et al.*, 1999). La stimulation au LPS de neurones ou de microglie induit la libération de tPA *in vitro*. Le tPA *via* son domaine *Finger* peut interagir avec les récepteurs à l'Annexine II présent sur les cellules microgiales et ainsi les rendre actives (Siao & Tsirka, 2002). Alors, le tPA libéré par les neurones ou par d'autres types cellulaires peut agir telle une cytokine (c'est-à-dire indépendamment de son activité protéolytique) afin d'activer la microglie, dans un contexte inflammatoire. Il a été démontré dans un modèle d'AVC par occlusion de l'artère cérébrale moyenne (en anglais : *middle cerebral artery occlusion*, MCAo) que les souris déficientes en tPA ou en LRP1 sur les cellules microgiales présentent une activation microgiale amoindrie comparativement aux souris WT (Zhang *et al.*, 2009). De plus, le volume de lésion est réduit chez ces animaux déficients en récepteurs LRP1 microgiaux.

Le tPA est impliqué dans l'ouverture de la BHE provoquant ainsi la diapédèse leucocytaire. Plusieurs voies ont été étudiées : par exemple, il a été démontré que la sous-unité GluN1

des récepteurs NMDA endothéliaux régulaient la transduction du signal induit par le tPA, et contrôlait le passage des monocytes à travers la BHE, du sang vers le parenchyme (Reijerkerk *et al.*, 2010). Ces premières découvertes ouvrent des perspectives prometteuses pour le traitement de l'inflammation (Macrez *et al.*, 2016). Le tPA, *via* la génération de la plasmine, pourrait également cliver la protéine chémoattractante monocyttaire (en anglais : *monocyte chemoattractant protein 1*, MCP1) et ainsi induire le recrutement des monocytes ou de la microglie sur le site de lésion dans des modèles d'ischémie ou d'excitotoxicité (Yao & Tsirka, 2011).

Le tPA pourrait agir directement sur la migration des neutrophiles vers le cerveau, par une action non protéolytique et par l'activation des voies PI3K et Akt, aboutissant à la libération de MMP-9 (Mehra *et al.*, 2016). Aussi, par une action protéolytique en convertissant le plasminogène en plasmine ou en interagissant avec les récepteurs LRP, cette dernière serait capable de convertir la forme immature de la MMP-9 en sa forme active. Ces MMP-9 vont ensuite dégrader des protéines de la lame basale des vaisseaux ou induire le détachement des pieds astrocytaires et ainsi augmenter la perméabilité de la BHE. Le tPA peut également directement activer les mastocytes qui, en retour, perméabilisent la BHE (Figure 30, Mehra *et al.*, 2016).



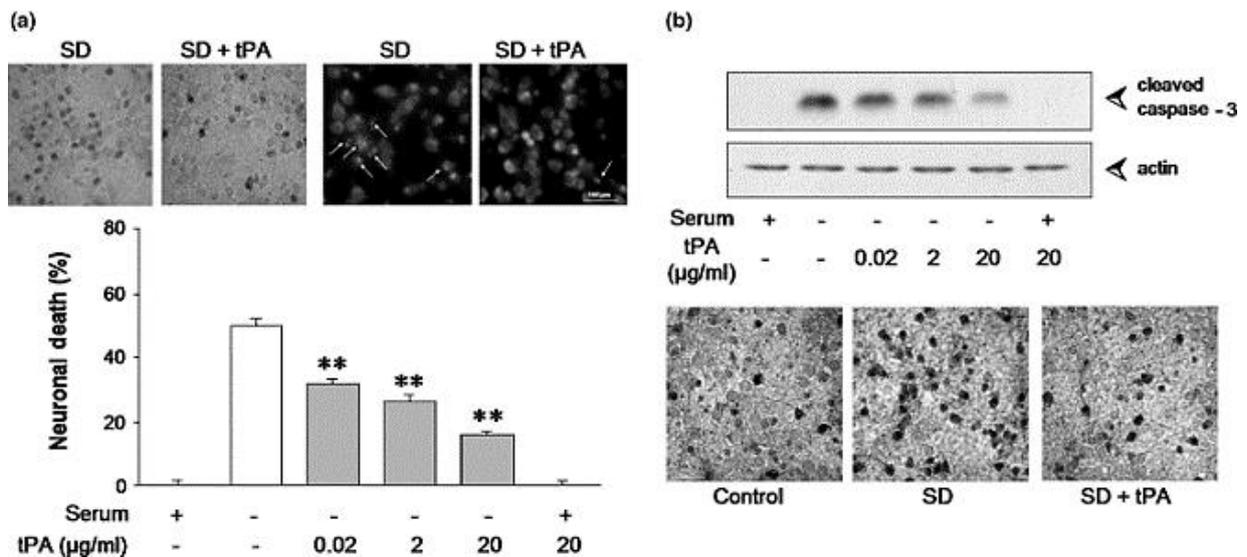
**Figure 30 :** *Implication du tPA dans l'inflammation par ses effets sur la BHE. Le tPA peut interagir avec les récepteurs LRP présents à la fois sur les cellules endothéliales (orange) et les astrocytes (vert). Les récepteurs LRP sont clivés ce qui induit le recrutement du facteur de transcription inflammatoire NF-κB (en anglais : nuclear factor-kappa B) conduisant à la libération de MMP-9. Ces dernières vont agir sur le BHE en augmentant sa perméabilité, induisant le passage des cellules immunitaires du sang vers le parenchyme. Sur les cellules endothéliales, le tPA pourrait cliver le récepteur NMDA et recruter la voie Erk1/2. Par ailleurs, l'activation protéolytique du facteur de croissance dérivé des plaquettes PDGF-CC en PDGF-C actif par le tPA peut également contribuer à détacher les pieds astrocytaires en activant le récepteur PDGFR-α des astrocytes. Cette activation du PDGF-CC est effectuée par l'interaction du tPA avec les récepteurs LRP des astrocytes (Figure issue de Mehra et al., 2016).*

De plus, l'équipe a montré que les souris tPA KO développent une EAE moins sévère que leurs homologues WT et avec une migration réduite des cellules lymphoïdes (lymphocyte T, B et NK (en anglais : *Natural killer*) et myéloïdes (neutrophiles ou monocytes) au sein de la moëlle épinière. Cet article a également mis en évidence que le tPA, *via* la génération de plasmine, augmente l'activation des lymphocytes T (Hélie et al., 2021).

### 2.7.7 tPA et apoptose

La littérature sur le rôle du tPA dans l'apoptose n'est pas consensuelle. Une première étude *in vitro* a démontré que les cellules microgliales une fois activées, peuvent libérer du tPA, et favoriser la mort apoptotique des neurones hippocampiques (Flavin *et al.*, 2000). Cette étude a également mis en évidence que l'ajout de tPA exogène dans les cultures exacerbait la mort neuronale. Cet effet était reversé par l'ajout d'inhibiteurs (naturel, PAI-1, ou synthétique, tPA-stop) du tPA. Toujours dans l'idée que le tPA serait pro-apoptotique, Liu et ses collaborateurs ont mis en avant *in vitro* sur des cultures de cellules endothéliales et de neurones traités au NMDA, que le tPA potentialisait l'apoptose en activant la caspase-8, activant à son tour la caspase-3 (Liu *et al.*, 2004). Cette étude a également démontré *in vivo* dans un modèle d'occlusion transitoire de l'artère cérébrale moyenne (45 minutes d'occlusion) que le tPA exacerbait le volume de lésion ainsi que le déficit neurologique, et que ceci était reversé par un inhibiteur de la caspase-8.

A l'inverse, l'équipe a montré que le tPA aurait plutôt un effet anti-apoptotique dans un modèle de sevrage en sérum sur des neurones corticaux *in vitro* (Figure 31, Liot *et al.*, 2006). Cet effet anti-apoptotique serait dépendant d'une réduction du clivage de la caspase-3 active.



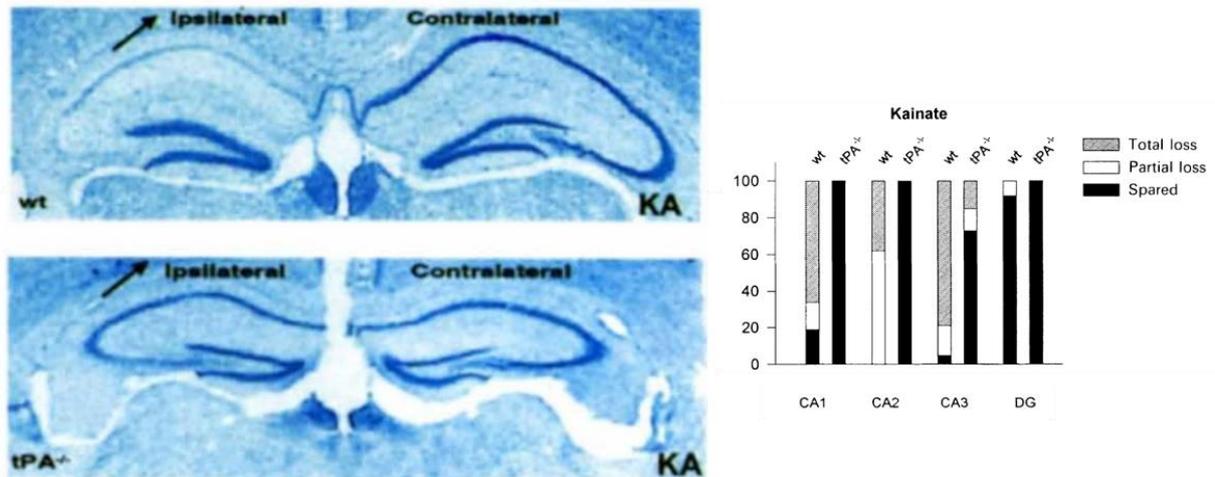
**Figure 31** : *Le tPA protège les neurones de l'apoptose dans un modèle in vitro d'apoptose. A* : Illustration des cultures en condition de sevrage en sérum (SD) avec ou sans tPA, coloré au bleu de trypan et à l'iodure de propidium (les flèches indiquent la fragmentation de l'ADN). La mort neuronale diminue avec la dose de tPA ajoutée dans les cultures. **B** : Immunoblots montrant que la quantité de caspase-3 clivée (active) diminue avec l'augmentation de la concentration de tPA (Liot et al., 2006).

Il a également été mis en évidence que le tPA protégeait les oligodendrocytes de l'apoptose à travers un effet « cytokine like » médié par l'interaction avec son domaine EGF-like et l'activation de la voie phosphatidylinositol-3-Kinase (PI3K) / Akt (Correa et al., 2011). Aussi, Liang et ses collaborateurs ont révélé qu'un pré-traitement des neurones au tPA diminuait l'apoptose comparativement aux neurones non traités (Liang et al., 2016). Dans un modèle de traumatisme crânien chez la souris, il a également été prouvé que l'inhibition du tPA endogène aggrave l'apoptose neuronale ainsi que les lésions axonales (Zhao et al., 2020).

Plusieurs récepteurs pourraient être impliqués dans l'effet du tPA lors de l'apoptose, tels que les récepteurs NMDA comme nous le verrons plus tard (Echeverry et al., 2010), les récepteurs à l'EGF (Bertrand et al., 2015 ; Lemarchand et al., 2016) ou encore les récepteurs à l'annexine II (Lee et al., 2007).

### 2.7.8 tPA, récepteurs NMDA, transmission glutamatergique et excitotoxicité

Tsirka et ses collaborateurs découvrent que la neurodégénérescence normalement induite par l'injection de kainate dans l'hippocampe n'est pas retrouvée chez des souris déficientes en tPA (Figure 32, *Tsirka et al., 1995*).



*Figure 32 : Les souris déficientes en tPA (tPA KO) sont résistantes à la mort neuronale excitotoxique induite par l'injection de kainate. Coloration au crésyl violet de coupes coronales d'hippocampes issues de souris WT et de souris tPA KO, 5 jours après l'injection de kainate. Histogrammes représentant le pourcentage de la longueur de l'hippocampe présentant une perte neuronale totale (gris), partielle (blanc) ou pas de perte (noir) chez les souris tPA KO et WT. Les souris déficientes en tPA ne présentent pas de perte neuronale comparées aux souris sauvages (Figure adaptée de *Tsirka et al., 1995*)*

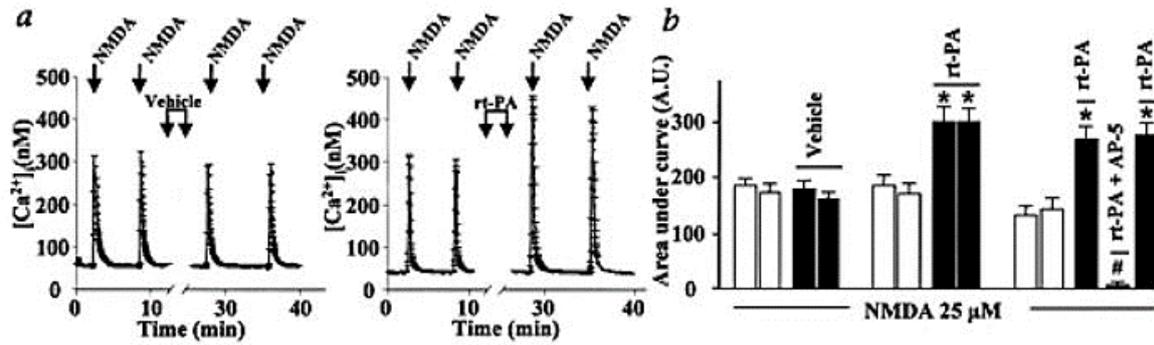
Une année plus tard, ces mêmes auteurs montrent qu'en plus du tPA endogène, l'ajout de tPA exogène chez des souris sauvages, aggrave ce type de nécrose neuronale excitotoxique (*Tsirka et al., 1996*). Ainsi, ces études ont proposé que le tPA endogène ou exogène serait pro-neurotoxique dans des modèles d'excitotoxicité (*Tsirka et al., 1997*).

Dans notre équipe, il a été démontré que le tPA était impliqué dans les mécanismes de nécrose excitotoxique induite par la sur-activation non pas des récepteurs kainate, mais des récepteurs NMDA.

Les récepteurs du glutamate de type NMDA sont ionotropiques, c'est-à-dire qu'ils permettent le passage de cations monovalents ( $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ ) et de calcium ( $\text{Ca}^{2+}$ ). Au repos, ils sont bloqués par l'ion magnésium ( $\text{Mg}^{2+}$ ) de manière dépendante du voltage (Hogan-Cann & Anderson, 2016). Ce sont des hétérotétramères aux propriétés électrophysiologiques dépendantes de leur composition. Ils sont constitués par l'association obligatoire de deux sous-unités GluN1 (codée par le gène *Grin1*) avec deux sous-unités GluN2 (codée par 4 gènes, *Grin2A* à *Grin2D*) ou GluN3 (codée par 2 gènes, *Grin3A* et *Grin3B*) (Traynelis *et al.*, 2010). Toutes les sous unités sont organisées en quatre domaines :

- **Le domaine amino-terminal (ATD)**, extracellulaire et impliqué dans la fixation des modulateurs allostériques.
- **Le domaine de liaison du ligand** (en anglais : *Ligand Binding Domain, LBD*) sur lequel peut se fixer des ligands tels que le glutamate ou la glycine.
- **Le domaine transmembranaire** (en anglais : *Trans-Membrane Domain, TMD*) composé de 4 fragments transmembranaires perméables aux ions.
- **Le domaine carboxy-terminal intracellulaire** (en anglais : *Carboxy-Terminal Domain, CTD*) impliqué dans le trafic et notamment l'ancrage des récepteurs.

L'équipe a démontré que l'interaction entre le tPA et les récepteurs NMDA a des conséquences très importantes sur la signalisation glutamatergique. Dès 2001, il a été démontré *in vitro* que le tPA pouvait potentialiser l'influx de  $\text{Ca}^{2+}$  dans les neurones, induit par l'application de NMDA et que cet effet était empêché par l'utilisation d'AP5, un inhibiteur réversible des récepteurs NMDA (Figure 33, Nicole *et al.*, 2001). De plus, les auteurs ont montré par immunoprécipitation que le tPA interagit physiquement avec GluN1 puis clive cette sous-unité dans son domaine ATD. Cette étude a donc suggéré pour la première fois que le tPA, en se liant à, puis en clivant la sous unité GluN1, potentialise l'activité des récepteurs NMDA, jusqu'à des niveaux potentiellement neurotoxiques.



**Figure 33 :** *Le tPA potentialise l'influx calcique induit par le NMDA. A et B : L'application de NMDA (25  $\mu$ M) dans les cultures neuronales augmente le calcium ( $Ca^{2+}$ ) intracellulaire (deux premiers pics avant traitement). Le traitement au r-tPA à une concentration de 20  $\mu$ g/ml augmente cet influx calcique intracellulaire, sauf s'il est co-incubé au même moment que l'AP5 (Nicole et al., 2001).*

Ces résultats ont été ré-évalués par une autre équipe, selon laquelle le tPA agirait indirectement, *via* la génération de plasmine, qui elle, réaliserait la protéolyse de GluN1 (Matys & Strickland, 2003).

Quelques années plus tard, Fernandez-Monreal et ses collaborateurs ont confirmé que le tPA interagissait avec la partie ATD de la sous-unité GluN1. De plus, leurs analyses de mutations ponctuelles ont mis en évidence que l'arginine en position 260 était responsable du clivage de la sous unité GluN1 par le tPA (Fernández-Monreal et al., 2004). Des expériences de microscopie calcique ont montré que le tPA ne potentialisait plus l'influx calcique induit par le NMDA dans des cultures cellulaires contenant une mutation de l'arginine 260. Comme déjà évoqué dans ce manuscrit, le tPA, *via* son domaine *Kringle 2*, a la possibilité de se lier à la sous unité GluN1 des récepteurs NMDA, en particulier au niveau de l'arginine en position 260 (Lopez-Atalaya et al., 2008).

La constitution des récepteurs NMDA ainsi que la forme du tPA a également des effets différentiels sur la signalisation NMDA. En 2010, une étude a démontré que le tPA clivait préférentiellement les récepteurs NMDA contenant la sous unité GluN2B (Baron et al., 2010). Par ailleurs, seule la forme simple chaîne est capable de potentialiser l'influx calcique induit par la stimulation au NMDA. *A contrario*, le traitement avec la forme *tc*-tPA induit une

diminution de l'influx calcique induit par la stimulation au NMDA (Hedou *et al.*, 2021 ; Parcq *et al.*, 2012).

A la suite de ces études novatrices, plusieurs travaux ont ensuite développé des outils afin de bloquer l'interaction entre le tPA et la sous unité GluN1 des récepteurs NMDA.

La première étude de l'équipe date de 2007 et Benchenane et ses collaborateurs ont expérimenté des approches d'immunisation active. Pour cela, des souris ont été immunisées avec le domaine ATD recombinant (rATD-GluN1). L'immunisation a permis de réduire significativement les lésions induites par injection striatale de NMDA ainsi que celles induites par l'ischémie cérébrale. De plus, l'altération de la mémoire spatiale retrouvée chez les souris tPA KO a également été observée chez les souris immunisées, soulignant l'importance de l'interaction entre le tPA et la sous-unité GluN1 des récepteurs NMDA dans ces fonctions cognitives (Benchenane *et al.*, 2007).

En 2010, toujours au sein de l'unité d'accueil, la même stratégie d'immunisation active a été utilisée et les animaux ont été soumis un an après au modèle d'AVC ischémique thromboembolique. Ici, l'AVC joue le rôle de « rappel vaccinal », et démontre bien l'existence du clivage de GluN1 et l'effet pro-excitotoxique du tPA *in vivo* : l'hypothèse est que l'AVC provoque une libération de tPA, et que ce dernier va cliver les sous-unités GluN1 des récepteurs NMDA, libérant de l'ATD, alors reconnu par le système immunitaire comme étranger et induisant la production rapide d'anticorps anti-ATD. Cette étude a également démontré que les animaux immunisés avec la partie rATD-GluN1 avaient toujours des anticorps dans le plasma, un an après immunisation, ce qui permettait de diminuer les dommages ischémiques après thrombolyse par r-tPA en dehors de la fenêtre thérapeutique de 4 heures chez la souris (Macrez *et al.*, 2010).

Plus tard, l'équipe a utilisé une stratégie d'immunisation passive, en injectant cette fois-ci les immunoglobulines produites chez des souris immunisées en parallèle contre l'ATD. Ces anticorps polyclonaux, en injection intraveineuse unique, diminuaient les lésions ischémiques ainsi que la perméabilisation de la BHE, tout en améliorant les scores

neurologiques dans un modèle d'AVC ischémique et en augmentant la fenêtre thérapeutique du traitement au r-tPA (Macrez *et al.*, 2011). Par la suite, l'équipe a produit un anticorps monoclonal, appelé glunomab, ayant montré son efficacité dans divers modèles précliniques d'excitotoxicité, d'AVC ou de sclérose en plaques (Lesept *et al.*, 2016 ; Macrez *et al.*, 2016 ; Mehra *et al.*, 2016 ; Wagnon *et al.*, 2020 ; Louet *et al.*, 2022) encourageant le lancement d'essais cliniques à l'horizon 2025 (l'humanisation de l'anticorps est en cours, avec la société *Lys Therapeutics*).

Il a aussi été démontré en 2008 que l'injection de tPA dans la substance noire de rats induisait une dégénérescence des neurones dopaminergiques, à l'exception de ceux exprimant le GABA, ainsi que la dégradation de la BHE, l'activation de la microglie et l'augmentation de l'expression des récepteurs NMDA (Villarán *et al.*, 2009). Ces données sont intéressantes car elles suggèrent qu'il existerait des populations de neurones moins sensibles que d'autres, face à ces phénomènes excitotoxiques...

### 2.7.9 tPA endogène : neurotoxique ou neuroprotecteur ?

Nombreuses sont les études à s'être intéressées aux rôles du tPA exogène dans les phénomènes excitotoxiques/ischémiques. Concernant le rôle du tPA endogène, les études n'ont pas trouvé de consensus et une nouvelle fois, le tPA peut avoir des rôles neurotoxiques ou bien neuroprotecteurs, selon les études, les modèles utilisés, ou encore le type cellulaire source. L'ensemble des arguments seront répertoriés dans les tableaux présents dans la partie « **contexte bibliographique de l'étude** » en partie **résultats 2**.

## Résumé

Nous avons pu voir que l'activateur tissulaire du plasminogène (**tPA**) est une sérine protéase ayant des rôles pléiotropes, au-delà de sa propriété fibrinolytique, à l'origine de son utilisation en clinique, encore **seul traitement pharmacologique de la phase aigüe des AVC ischémiques**.

Grâce à ses cinq domaines structuraux, **le tPA interagit avec divers récepteurs**, tels que les LRP, l'annexine II, les récepteurs à l'EGF, les récepteurs au mannose et aux galectines (*Kringle 1*), les récepteurs au PDGF-CC ou encore les récepteurs NMDA. Cette diversité explique les multiples actions possibles du tPA dans le SNC.

L'équipe a découvert une propriété majeure du tPA : elle se comporte comme un **neuromodulateur** de la transmission glutamatergique, par sa capacité à interagir avec les récepteurs NMDA. Cette propriété est impliquée dans divers processus neurobiologiques majeurs : **corticogénèse, plasticité synaptique, émotion, anxiété, survie neuronale...**

Comme nous allons l'expliquer par la suite, malgré une littérature relativement abondante, il subsiste des interrogations quant aux sources et aux rôles du tPA dans le système nerveux. Certaines de ces interrogations ont fait l'objet de mon travail de thèse.



# Objectifs

Le tPA est une protéase dont l'expression dans le cerveau, et notamment dans les neurones du cortex, reste techniquement difficile à étudier. Grâce, entre autres, à l'utilisation des vecteurs viraux adéno-associés (AAV), nous avons pu mettre en évidence que le tPA est exprimé par des neurones inhibiteurs, et en particulier ceux exprimant la parvalbumine.

Ainsi, mon [premier objectif](#) de ce travail de thèse a été de contribuer à l'étude du(des) rôle(s) du tPA exprimé par les interneurons à parvalbumine (PV) dans la régulation des réseaux périneuronaux (PNNs).

Tel que nous l'avons évoqué dans l'introduction, le tPA endogène aux neurones est impliqué dans de nombreuses fonctions. Cependant, les études concernant ses rôles dans les phénomènes excitotoxiques n'a jamais été consensuel. Mon [deuxième objectif](#) de thèse a été d'étudier, à l'aide d'outils innovants, le(s) rôle(s) du tPA endogène aux neurones dans la phase aiguë de l'excitotoxicité et de l'ischémie.



# Résultats

## Résultats : article 1

### *Parvalbumin interneuron-derived tissue-type plasminogen activator shapes perineuronal net structure.*

Matthieu Lépine,<sup>#</sup> Sara Douceau,<sup>#</sup> Gabrielle Devienne, [Paul Prunotto](#), Sophie Lenoir, Caroline Regnaud, Elsa Pouette, Juliette Piquet, Laurent Lebouvier, Yannick Hommet, Eric Maubert, Véronique Agin, Bertrand Lambolez, Bruno Cauli, Carine Ali <sup>#</sup> and Denis Vivien<sup>#</sup>.

<sup>#</sup>Contributed equally.

BMC Biology (2022)

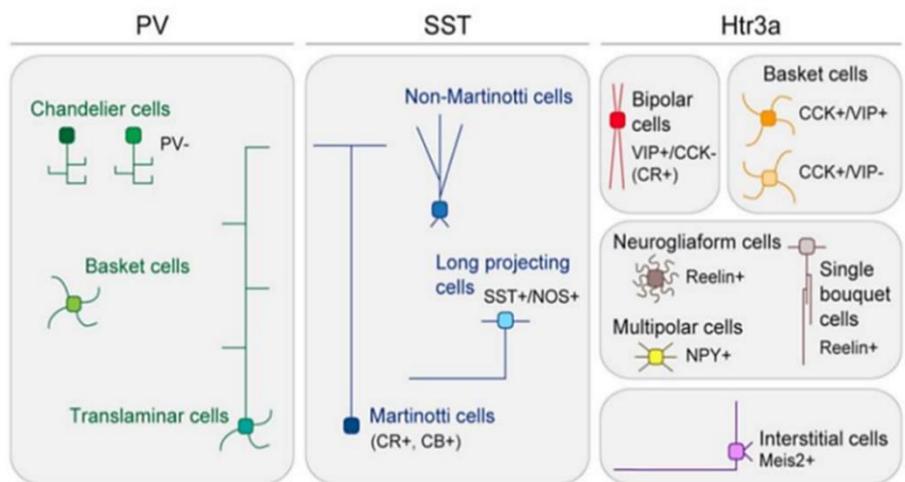
## Contexte bibliographique de l'étude 1

Le tPA est principalement connu pour sa capacité à convertir le plasminogène en plasmine active, une protéase ciblant notamment la fibrine (Pennica *et al.*, 1983). Cette propriété fibrinolytique a permis à la forme recombinante du tPA de révolutionner la prise en charge des AVC ischémiques (NINDS, 1995).

Outre cette fonction vasculaire, le tPA régule de nombreux processus cérébraux physiologiques, tels que la migration neuronale, la transmission glutamatergique, le couplage neurovasculaire, la plasticité synaptique mais aussi le devenir neurologique lors d'atteintes du SNC (pour revue, Thiebaut *et al.*, 2018). Chaque fonction du tPA dépend notamment de ses cibles moléculaires et cellulaires, mais aussi de son origine et de son domaine protéique impliqué. Il est donc important d'identifier précisément les sources cellulaires de tPA dans le SNC. Cependant, les anticorps disponibles et/ou techniques d'immunodétection classiques ne permettent pas de répondre entièrement à cette problématique.

Au sein du parenchyme, plusieurs études ont démontré l'expression de tPA dans les neurones excitateurs (Hultman *et al.*, 2008 ; Louessard *et al.*, 2016 ; Siao *et al.*, 2003 ; Stevenson & Lawrence, 2018), mais peu se sont intéressées aux neurones inhibiteurs. Il a cependant été suggéré que le tPA pourrait être exprimé dans les interneurones à parvalbumine (PV) (Chu *et al.*, 2015).

On décrit aujourd'hui au sein du cortex cérébral une cinquantaine de types d'interneurones GABAergiques, aux propriétés morphologiques, moléculaires et électrophysiologiques spécifiques. De manière simplifiée, on en distingue trois classes, selon leur profil d'expression de marqueurs spécifiques (Figure 34, Lim *et al.*, 2018). La première (majoritaire) est caractérisée par la présence de parvalbumine (PV), la deuxième par la présence de somatostatine (SST) et la dernière, très hétérogène, par la présence du récepteur à la sérotonine 5HT3a (Lim *et al.*, 2018).



*Figure 34 : Schéma représentant les trois principales classes d'interneurones au sein du néocortex chez la souris : interneurones à parvalbumine (PV), à somatostatine (SST) ou aux récepteurs à la sérotonine 5HT3ar (Lim et al., 2018).*

Les interneurones à PV représentent plus de 50% des interneurones du cerveau et sont nommés ainsi en raison de la protéine de liaison au  $\text{Ca}^{2+}$  qu'ils expriment : la parvalbumine. Ils sont généralement retrouvés dans les couches 2 à 6 (majoritairement dans la couche 4) du cortex cérébral ou dans l'hippocampe (Rossier et al., 2015).

Ces interneurones sont dits « *fast-spiking* » (à décharge rapide) car ils sont caractérisés par des potentiels d'action à haute fréquence pouvant atteindre plusieurs centaines de Hz et sont capables de se repolariser très rapidement. Ils interviennent dans la régulation de l'activité des neurones pyramidaux excitateurs, *via* leurs contacts somatiques ou axonaux (Lewis et al., 2012). Ils permettent ainsi le contrôle et la synchronisation des oscillations gamma (ondes retrouvées notamment lors de processus cognitifs élevés de perception ou d'attention). Pour ce faire, les interneurones à PV utilisent différents modes d'inhibition. Le plus connu est le *feedback* inhibiteur, où les cellules pyramidales excitatrices émettent des potentiels d'action (PA) pour activer ces interneurones à PV et ainsi être inhibées en retour (Roux & Buzsáki, 2015).

Le dialogue entre les interneurones à PV et les neurones pyramidaux n'est pas uniquement un jeu de libération synaptique de neurotransmetteurs. Comme nous le détaillerons par la suite, il existe un intermédiaire matriciel entre ces deux populations neuronales, capable de réguler le tonus inhibiteur/excitateur et de s'y adapter : c'est le *Perineuronal Net* (PNN). Grâce à la chémogénétique, Devienne et ses collaborateurs (2019) ont montré que l'inhibition de l'activité des interneurones à PV ou des cellules pyramidales excitatrices environnantes réduit la quantité de PNNs associés (Devienne *et al.*, 2021).

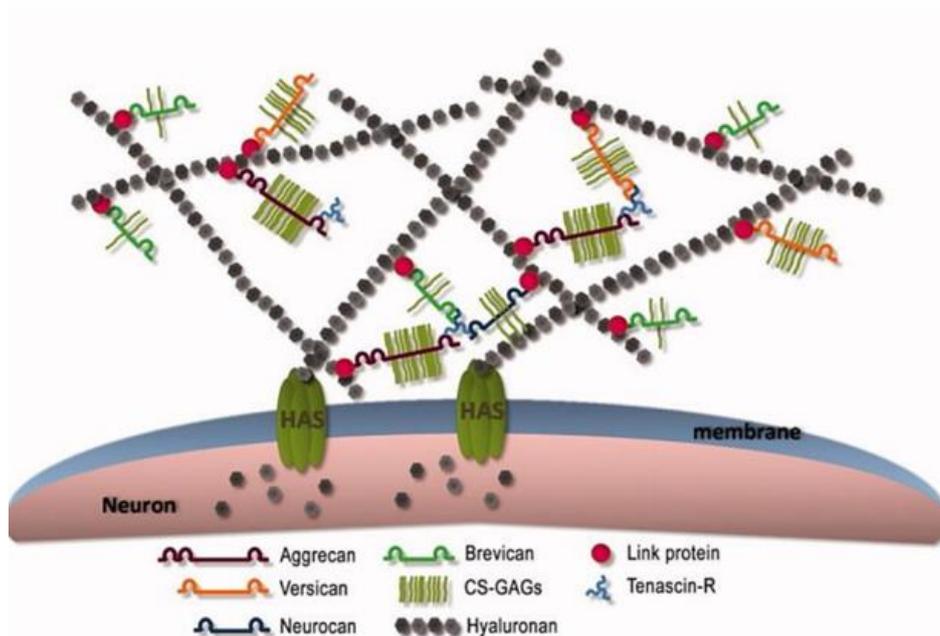
A l'inverse, on sait que la densité de PNNs module elle-même l'efficacité synaptique des interneurones PV et des cellules pyramidales (Wang & Fawcett, 2012). Il convient donc probablement de parler de communication tripartite plutôt que de dialogue interneurone PV/neurone pyramidal. Du fait de cette communication intime entre ces différents acteurs, il est compréhensible que des pathologies neurologiques ou développementales telles que l'épilepsie, la schizophrénie ou encore les troubles du spectre autistique puissent se manifester dans les cas où ces systèmes de contrôle sont modifiés (Hashemi *et al.*, 2017). Il a, par exemple, été montré que l'inhibition des interneurones à PV du cortex préfrontal médian induit des effets néfastes sur les processus attentionnels (Kim *et al.*, 2016).

### La particularité des interneurones PV : les réseaux périneuronaux (PNNs)

Décrits en 1893 par Camillo Golgi, les PNNs sont des structures matricielles spécifiques, retrouvées majoritairement autour des interneurones à PV (Karetko & Skangiel-Kramska, 2009). Ils sont distribués dans plusieurs régions du cerveau tels que le cervelet, les noyaux gris centraux, l'hypothalamus, l'hippocampe ou encore le cortex visuel ou somatosensoriel. Les PNNs sont composés d'acide hyaluronique (HA), synthétisé et amarré à la membrane plasmique par les Hyaluronates Synthétases (HAS1 à HAS3) (Figure 35). L'HA constitue le squelette général du PNN, sur lequel d'autres protéines vont se lier, grâce à des protéines de liaison (les HAPLNs (*hyaluronan and proteoglycans link proteins*) ou les Tenascines). Les protéines de liaison permettent la stabilisation des PNNs et la formation de cette structure

condensée (Kwok *et al.*, 2011). Les PNNs sont composés de protéoglycanes, en particulier de chondroïtine sulfate protéoglycanes (CSPGs).

Parmi eux, on retrouve la famille des lecticans, composée de l'aggrecan, le neurocan, le versican et le brevican. L'aggrecan est indispensable à la formation des PNNs (Kwok *et al.*, 2011).



*Figure 35 : Structure des PNNs.* Les HAS (Hyaluronates synthases) présentes à la surface du neurone synthétisent l'HA (acide hyaluronique). Les Lecticans (Aggrecan, Versican, Neurocan et Brevican) font partie de la famille des CSPGs et se lient aux HA pour former le complexe PNN. Ce dernier est consolidé par des protéines de liaisons telles que les HAPLNs (hyaluronan and proteoglycans link proteins) et/ou les Tenascines (Kwok *et al.*, 2011).

Les PNNs se forment progressivement autour des neurones et leur maturation s'effectue à des temps différents selon leur localisation. Les PNNs immatures pourraient initier les premiers liens entre le cytosquelette et la matrice extracellulaire pour former les futurs PNNs matures (Karetko & Skangiel-Kramska, 2009). Leur maturation est ensuite fortement dépendante de l'activité cérébrale puisque des expériences visant à bloquer les canaux sodium dépendants du voltage ou à élever des chatons dans l'obscurité (privant ainsi de stimuli lumineux) ont montré une inhibition de la formation des PNNs dans le cortex visuel (Kwok *et al.*, 2011). La fonction la plus étudiée des PNNs est la plasticité, en particulier lors

d'une fenêtre temporelle, appelée période critique (Sorg *et al.*, 2016). C'est une période à haut potentiel plastique durant laquelle par exemple, les expériences sensorielles stabilisent petit à petit les réseaux synaptiques, jusqu'à les « figer », notamment par la synthèse de PNNs.

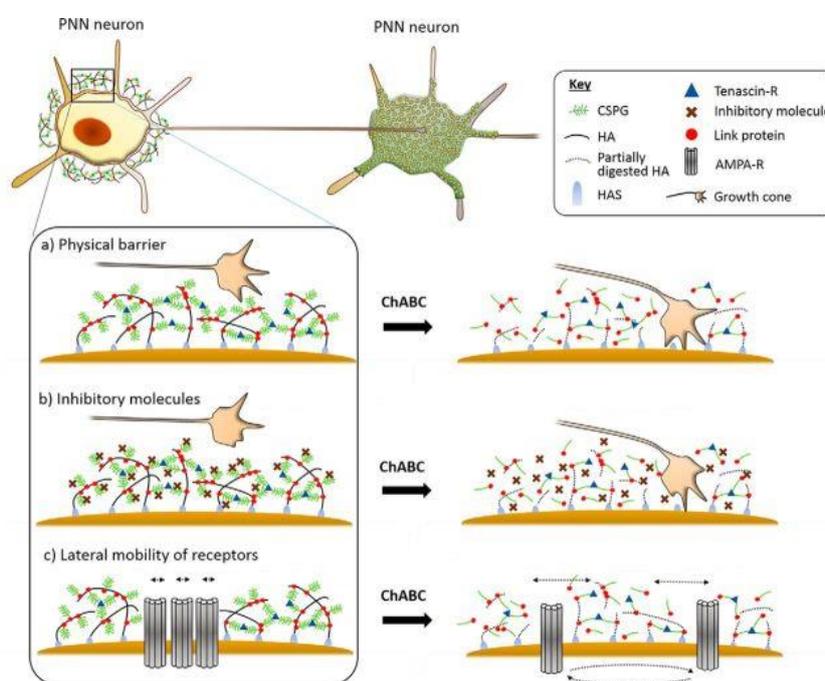
Selon Sorg et ses collaborateurs en 2016, les PNNs pourraient limiter la plasticité selon trois mécanismes (Figure 36, Sorg *et al.*, 2016).

- Ils formeraient une barrière physique empêchant de nouvelles connexions synaptiques avec les cellules environnantes.
- Certains composants des PNNs pourraient capter des molécules inhibitrices de la plasticité (comme la sémaphorine A3).
- Ils moduleraient la mobilité des récepteurs de neurotransmetteurs (dont les récepteurs glutamatergiques AMPA) à la membrane des interneurons à PV et modifieraient ainsi les échanges ioniques.

Les PNNs sont des structures dynamiques pouvant être modulées, ce qui représente un enjeu thérapeutique de taille. Par exemple, l'utilisation d'une enzyme bactérienne, la chondroïtinase ABC (ChABC), dégrade les PNNs et permettrait un retour de la plasticité chez l'adulte (Pizzorusso *et al.*, 2002). La ChABC a ainsi montré son effet bénéfique/réparateur dans divers modèles, dont des modèles de lésion de la moelle épinière (Bradbury *et al.*, 2002) ou encore dans des modèles murins de pathologie Tau (Yang *et al.*, 2015).

Cela dit, à l'inverse, les PNNs peuvent constituer une barrière protectrice contre des éléments neurotoxiques comme le peptide amyloïde (Lemarchant *et al.*, 2014). Plusieurs données suggèrent que certaines protéases extracellulaires sont responsables de cette dégradation des PNNs. Par exemple, en 2015, Kelly et ses collaborateurs ont rapporté une diminution significative de la dégradation des PNNs suite à une privation monoculaire chez des souris MMP-9 KO (n'exprimant plus la MMP-9) (Kelly *et al.*, 2015). En parallèle, il a également été montré que ces expériences de privation monoculaire induisent une

augmentation de l'activité protéolytique du tPA, indiquant également un potentiel rôle de cette protéase (Mataga *et al.*, 2002).



**Figure 36 :** *Rôles des PNNs dans l'inhibition de la plasticité via trois mécanismes et rétablissement de la plasticité via un traitement par Ch-ABC. A : Formation d'une barrière physique empêchant de nouvelles entrées synaptiques. B : Capteur de molécules inhibitrices de la plasticité. C : Modulation de la mobilité des récepteurs AMPA à la surface du neurone (Sorg *et al.*, 2016).*

L'ensemble de ces données ainsi que la découverte de l'expression du tPA au sein des interneurones à PV nous ont poussés à formuler l'hypothèse que le tPA en tant que protéase pouvait être impliqué dans la régulation des PNNs (Lépine *et al.*, 2022). En effet, il pourrait être impliqué dans la régulation des réseaux périneuronaux *via* l'activation de certaines protéases matricielles telles que la MMP-9 (Kelly *et al.*, 2015). En prenant en compte le fait que les pro-MMP-9 peuvent être activées par la plasmine et qu'une augmentation d'activité du tPA a été observée lors de protocole de privation monoculaire (Mataga *et al.*, 2002) nous pourrions imaginer que la libération de tPA dans l'environnement du PNN (par les interneurones à PV et/ou les neurones pyramidaux) favorise la formation de plasmine, puis de MMP-9, conduisant à la dégradation du PNN.

## Principaux outils utilisés

Tout d'abord, pour identifier les neurones capables d'exprimer le tPA, nous avons utilisé une technique basée sur des virus adéno-associés (AAV) possédant le sérotype 9, connu pour cibler les neurones. Nos AAV exprimaient la GFP (en anglais : *Green Fluorescent Protein*), sous le contrôle du promoteur du gène codant pour le tPA (PLAT).

Dans le but d'étudier le rôle du tPA exprimé par les interneurons à PV dans la régulation des PNNS, nous avons généré une souche de souris transgéniques présentant une déficience en tPA sélective des interneurons à PV. Pour cela, nous avons croisé des souris tPA flox<sup>+/+</sup> (cKO) ou tPA flox<sup>-/-</sup> (WT, Ctrl) avec des souris exprimant la recombinaise Cre sous le contrôle d'un promoteur spécifique de la parvalbumine : tPA flox<sup>+/+</sup> PV Cre<sup>+/-</sup> (cKO) ou tPA flox<sup>-/-</sup> PV Cre<sup>+/-</sup> (WT, Ctrl).

Enfin, pour mieux comprendre les mécanismes régissant l'interaction entre le tPA et les PNNS, nous avons réalisé des cultures cellulaires d'interneurones en prélevant l'éminence ganglionnaire médiale d'embryons âgés de 14 jours (Franchi *et al.*, 2018). Des approches pharmacologiques ont été utilisées sur les cultures provenant d'embryons de souris WT ou cKO afin d'explorer les mécanismes sous-jacents.

## Principaux résultats obtenus

- ✚ Les interneurons GABA à PV expriment du tPA.
- ✚ Les souris sélectivement déficientes en tPA dans les neurones à PV ont des PNNS plus denses que leurs homologues WT.
- ✚ Le tPA, en convertissant le plasminogène en plasmine, dégrade les PNNS et en particulier le CSPG Aggrecan

# Article 1

## 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 Cauli<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, immunohistology, 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

<sup>†</sup>Matthieu Lépine, Sara Douceau, Carine Ali and Denis Vivien contributed equally to this work.

\*Correspondence: ali@cyceron.fr

<sup>1</sup> Normandie Univ, UNICAEN, INSERM, INSERM UMR-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

## 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



© 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.

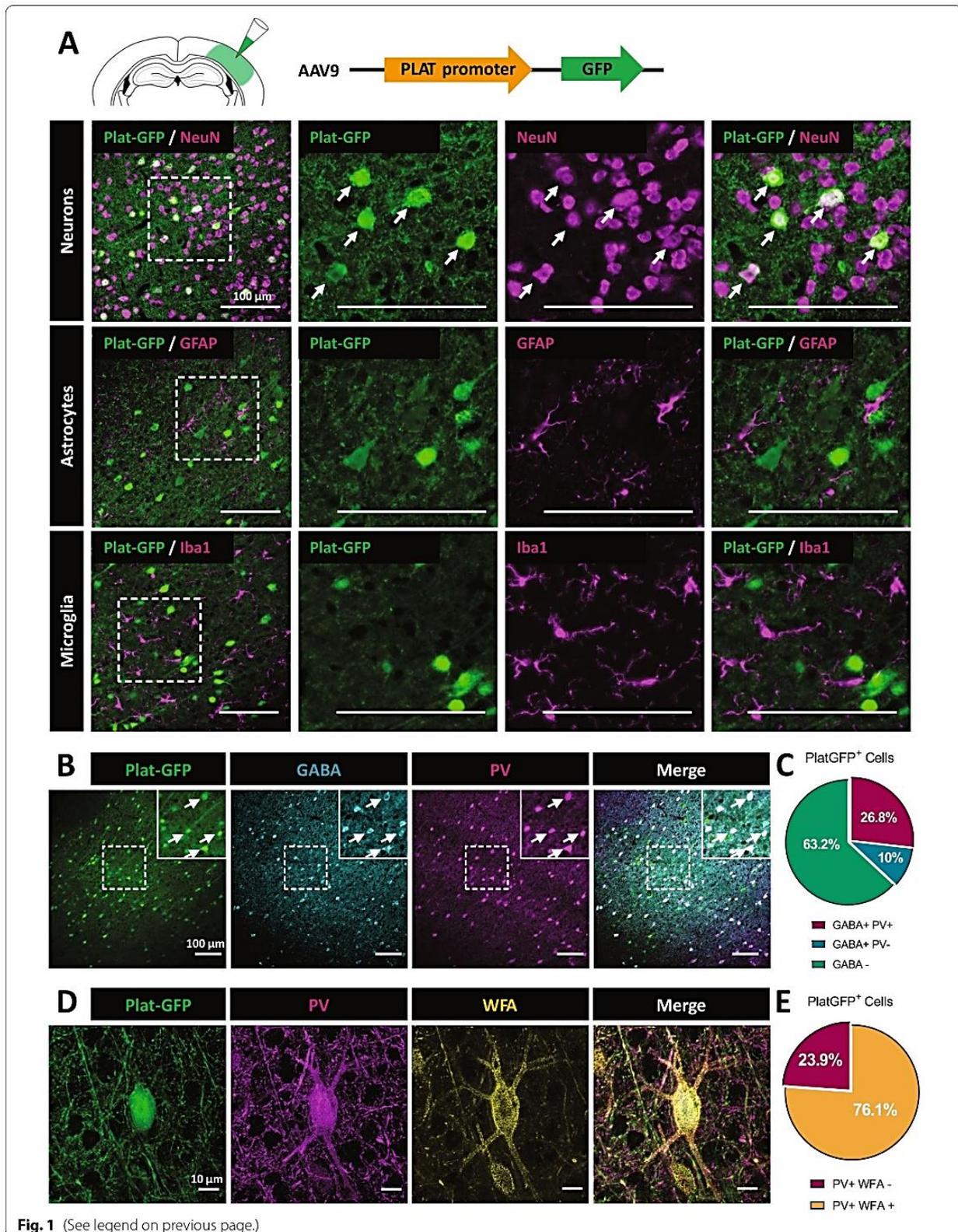
## Results

### 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 enwrapped with PNNs. **A** AAV-Plat-GFP was injected in the somatosensory cortex of adult wild-type mice. Co-immunohistochemistry of the GFP reporter (green) with the neuronal marker NeuN (magenta), the astrocyte marker GFAP (magenta), and the microglial marker Iba-1 (magenta) in the somatosensory cortex of adult WT mice 3 weeks after AAV injection. AAV-Plat-GFP induces expression of GFP in neurons but not in astrocytes or microglia (Scale bar: 100  $\mu$ 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 enwrapped with PNNs (stained with WFA; Fig. 1D,E). In situ hybridization confirmed the presence of tPA mRNA in PV interneurons, and more precisely those enwrapped by 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*, *Ptpr*, *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*, *Ptpr*, and *Sema3a*.

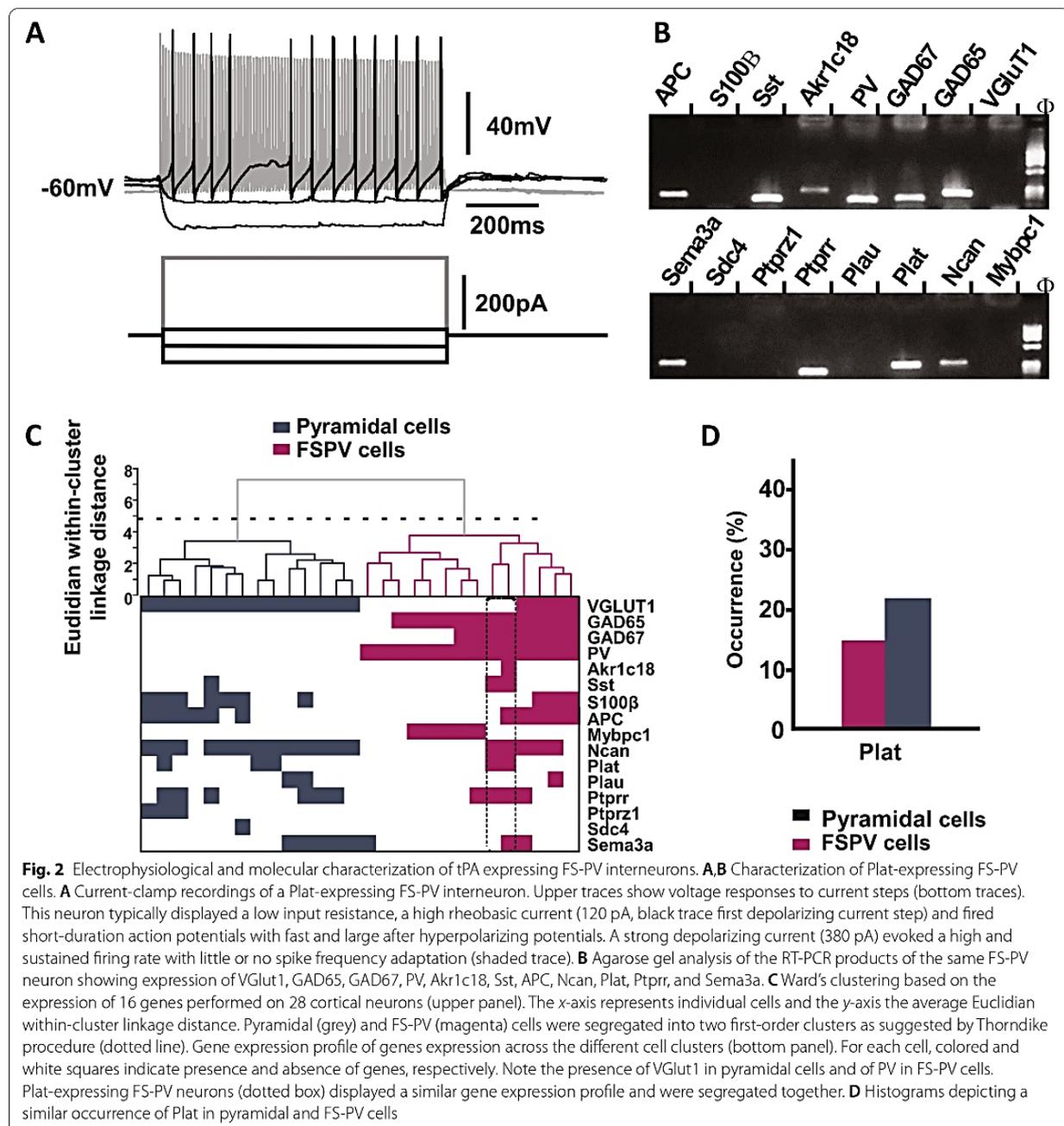
Analyzed neurons were grouped together according to their overall molecular similarity using Ward's clustering [14], yielding two main groups (Fig. 2C). All neurons in the left cluster were pyramidal cells expressing *VGLUT1* but none in either cluster expressed GADs or PV. By contrast, all neurons in 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*, and *Ptpr*. *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 knockout mouse strain lacking tPA in PV cells by crossing

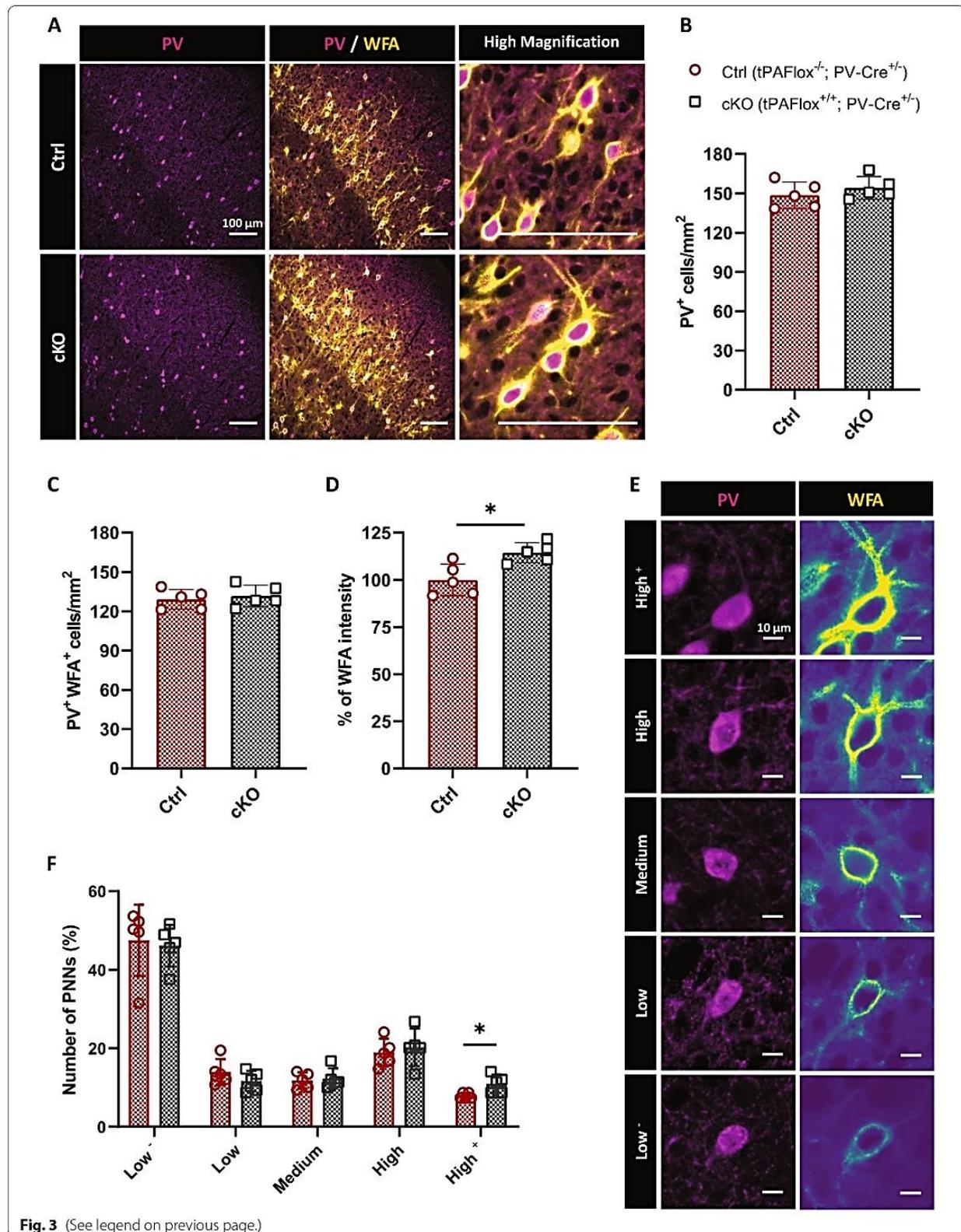
tPA<sup>Flox</sup><sup>+/+</sup> mice with PV-Cre<sup>+/−</sup> mice (tPA<sup>Flox</sup><sup>−/−</sup>; PV-Cre<sup>+/−</sup> mice were used as controls, Additional file 1: Fig. S5). In both genotypes, the total number of PV interneurons, as well as the number of PV interneurons enwrapped with PNNs, was 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 enwrapped 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 24h 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 $Flox^{+/+}$ ; PV-Cre $^{+/-}$  mice (cKO) and their control littermates (Ctrl), tPA $Flox^{-/-}$ ; PV-Cre $^{+/-}$  mice (Scale bar: 100  $\mu$ m). Quantitative analysis of the density of PV cells (**B**) and PNN-containing PV cells (**C**) in both genotypes. **D** Average WFA intensity was quantified in both groups. **E** PNNs were assigned to different categories based on the intensity of WFA staining (Scale bar: 10  $\mu$ m). The percentage of each PNN subtype (**F**) and the graph show mean  $\pm$  sem ( $N=5$  animals;  $n=4$  coronal sections per animal). Mann-Whitney test; \*,  $p<0.05$



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.

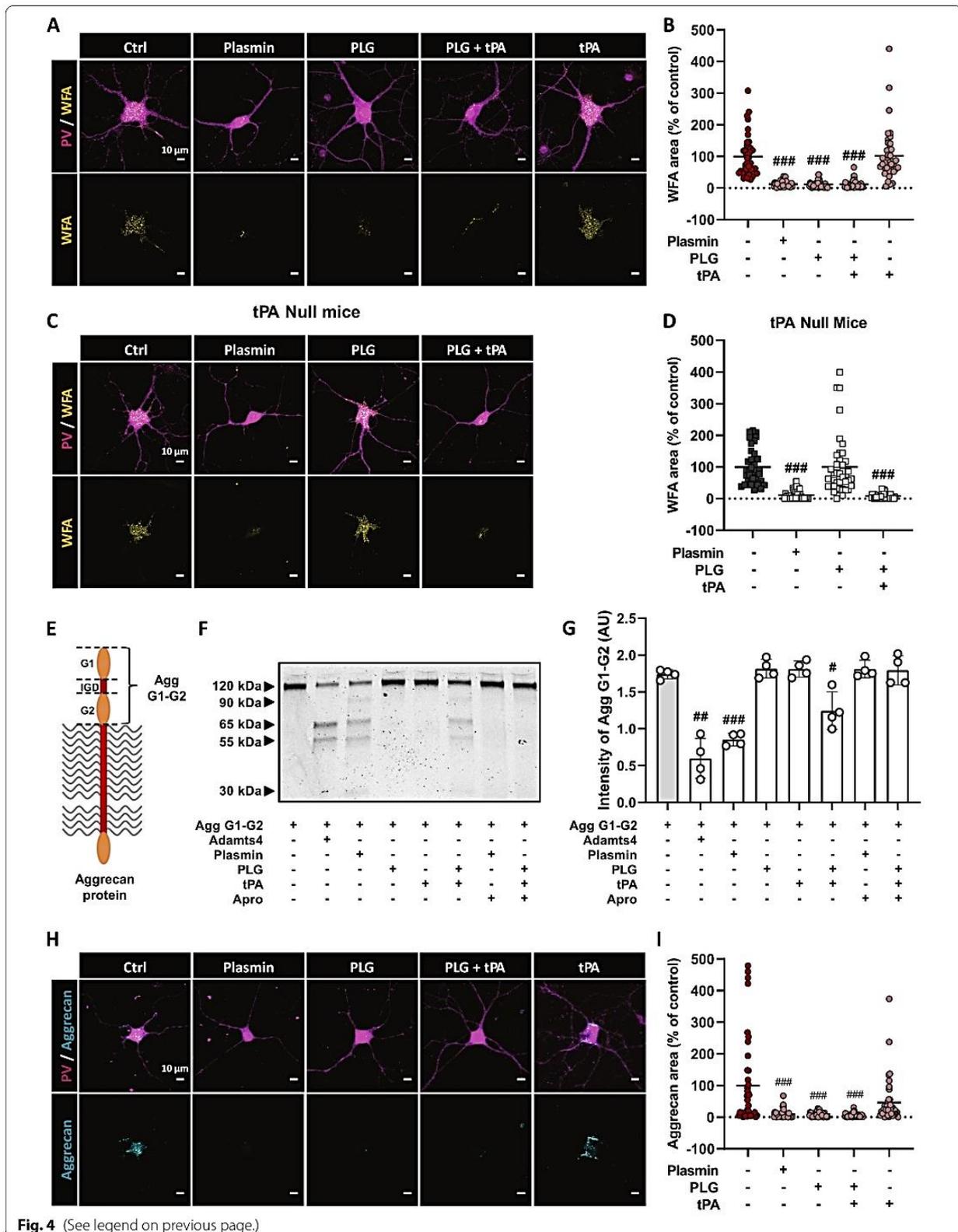
tPA expression was previously reported in excitatory pyramidal neurons using in situ hybridization techniques, immunohistochemistry, and single-cell PCR coupled with patch-clamp recordings [46, 75]. Sparse and inconsistent studies have also reported tPA expression in some subtypes of GABAergic interneurons. 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



**Fig. 4** (See legend on previous page.)

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 C57BL6N/Tac 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  $\mu\text{L}$  at a rate of 0.2  $\mu\text{L}/\text{min}$ . 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 transcatheter 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  $\mu\text{m}$  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  $\mu\text{m}$ .

#### 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  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , 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-arabinofuranoside hydrochloride (5  $\mu\text{M}$ , 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 0.1M 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  $\mu\text{m}$ . 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; LRP5: 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; VIP: 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.** Plat-GFP reporter expression in the cortex after LPS treatment. **Figure S3.** Plat-GFP reporter expression in excitatory neurons in the cortex. **Figure S4.** tPA mRNA 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 Merlini 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, JP, YH, 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, Physiopathology 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 U1119, 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, Lederfein 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, Yamamuro K, Flanigan 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 FlpO 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, Báldi 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, Dudek 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, Lambolez 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, Lambolez 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, Bajnath 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, Kleinschnitz 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/eLife.41520>.
- Favuzzi E, Marques-Smith A, Fernandes C, Ewers H, Correspondence BR. Activity-dependent gating of parvalbumin interneuron function by the perineuronal net protein brevican. *Neuron.* 2017;95:639–55. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2017.06.028>.
- Fawcett JW, Oohashi 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, Tonoli 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, Craciun 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>.
- Frishknecht 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 P, Lüthi 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 cleaving 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;345:1255–63. <https://doi.org/10.1126/science.1255263>.
- Kawaguchi 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, Berceci 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. Lambolez B, Audinat E, Bochet P, 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, Pomeschchik Y, Kidin 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, Lebourrier 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, Muller 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, Bucci 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. *Transl 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 T, 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, Carmeliet 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, Lebourrier 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/nn998>.
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, Horner AE, Spillantini 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. Slaker M, Churchill L, Todd RP, Blacktop 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, Koskiniemi M, Vaheri 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 W-Y, 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, Haile 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* 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/s00018-019-03005-8>.

## 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 Regnauld<sup>a</sup>, Elsa Pouettré<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)**

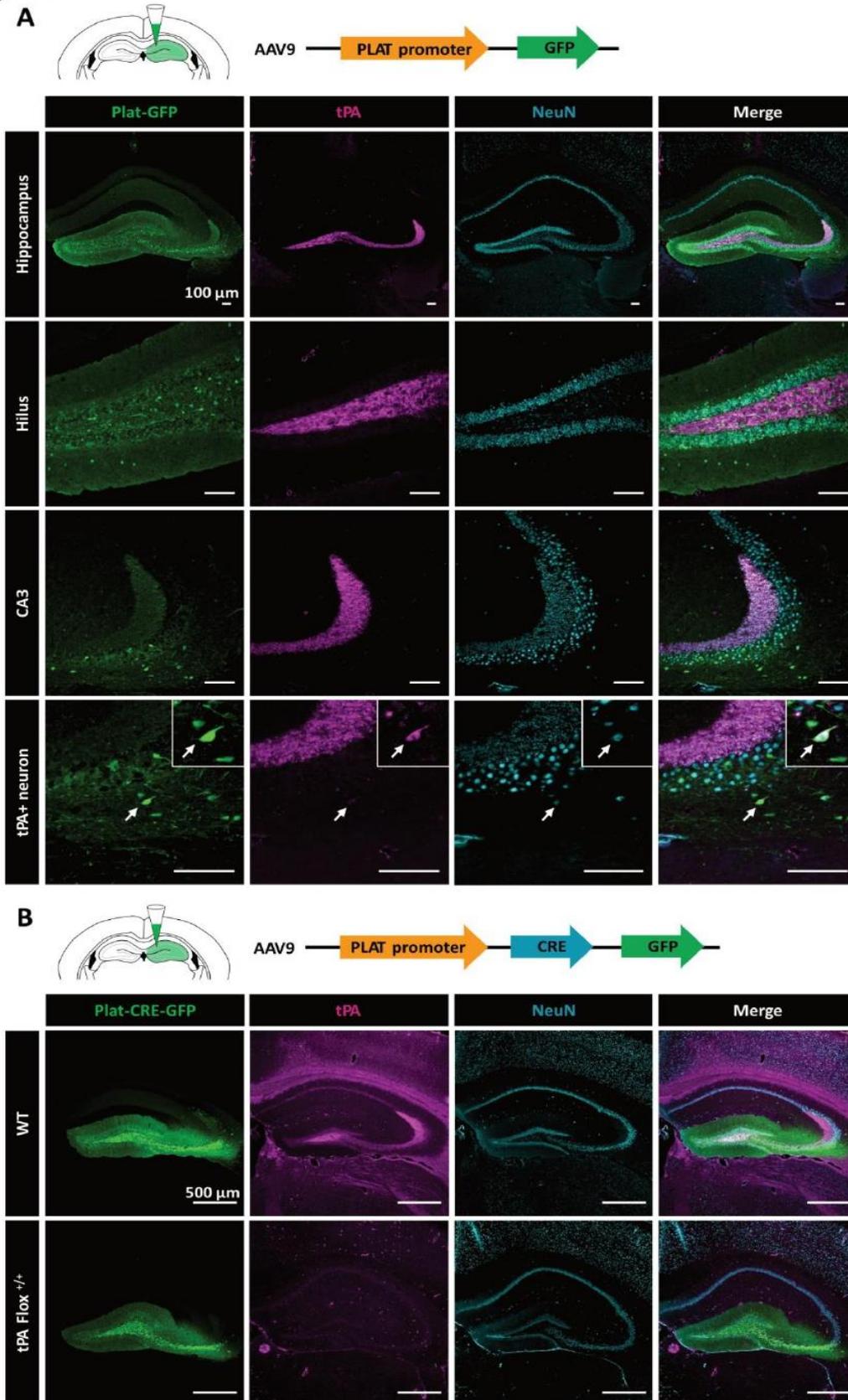
#### **This file include:**

Figure S1 to S8

Table S1

Supplementary materials and methods

Fig. S1

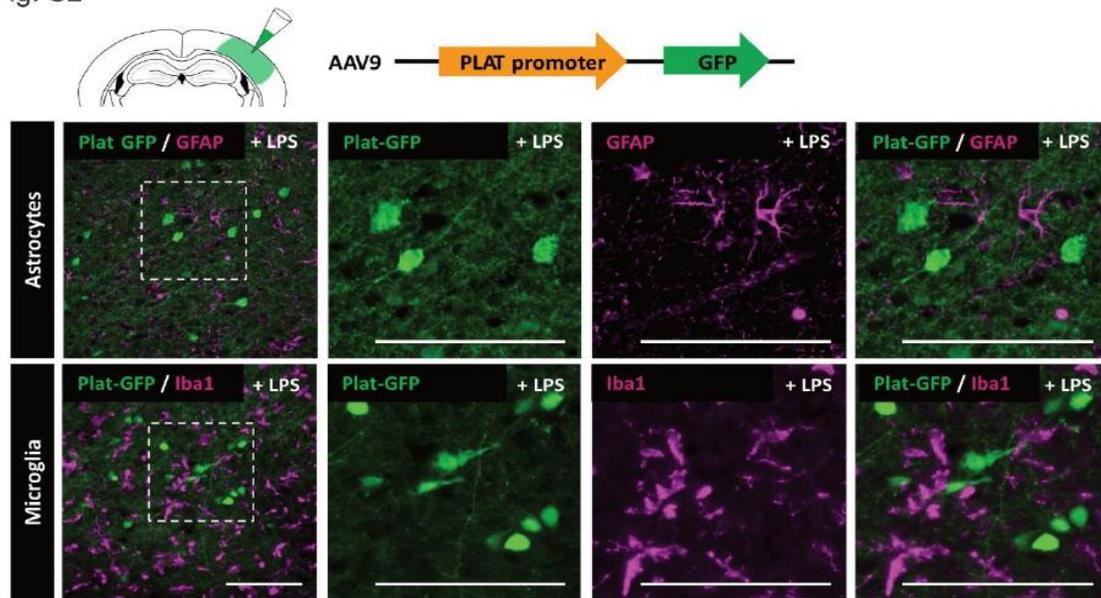


**Figure S1: Characterization of a tPA-reporter construct, for *in vivo* investigations – AAV9-Plat-GFP**

(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 [42,44]. 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 [42].

(B) To validate the specificity of the Plat-GFP construct, tPA<sup>Flox<sup>+/+</sup></sup> mice [24] 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<sup>Flox<sup>+/+</sup></sup> 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.

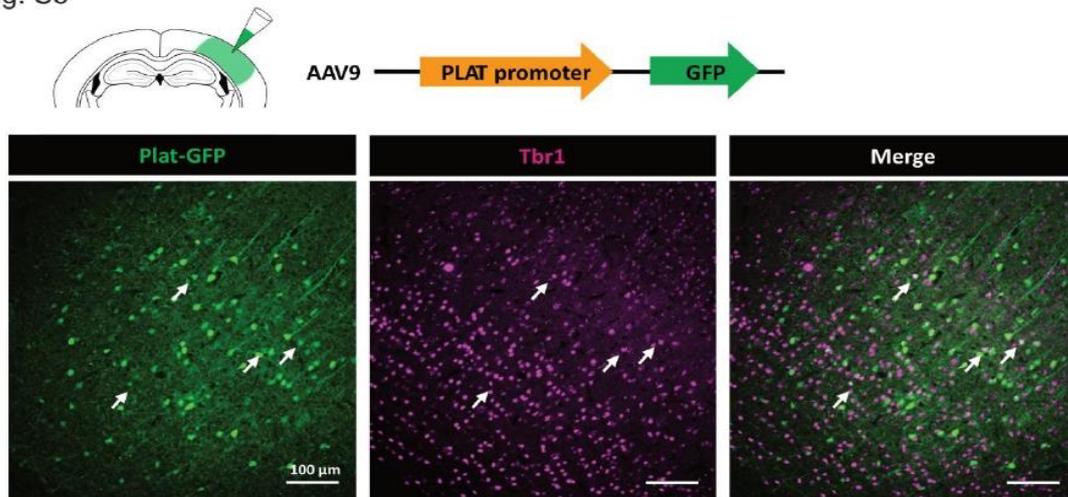
Fig. S2



**Figure S2: Plat-GFP expression in the somatosensory cortex of LPS-treated mice**

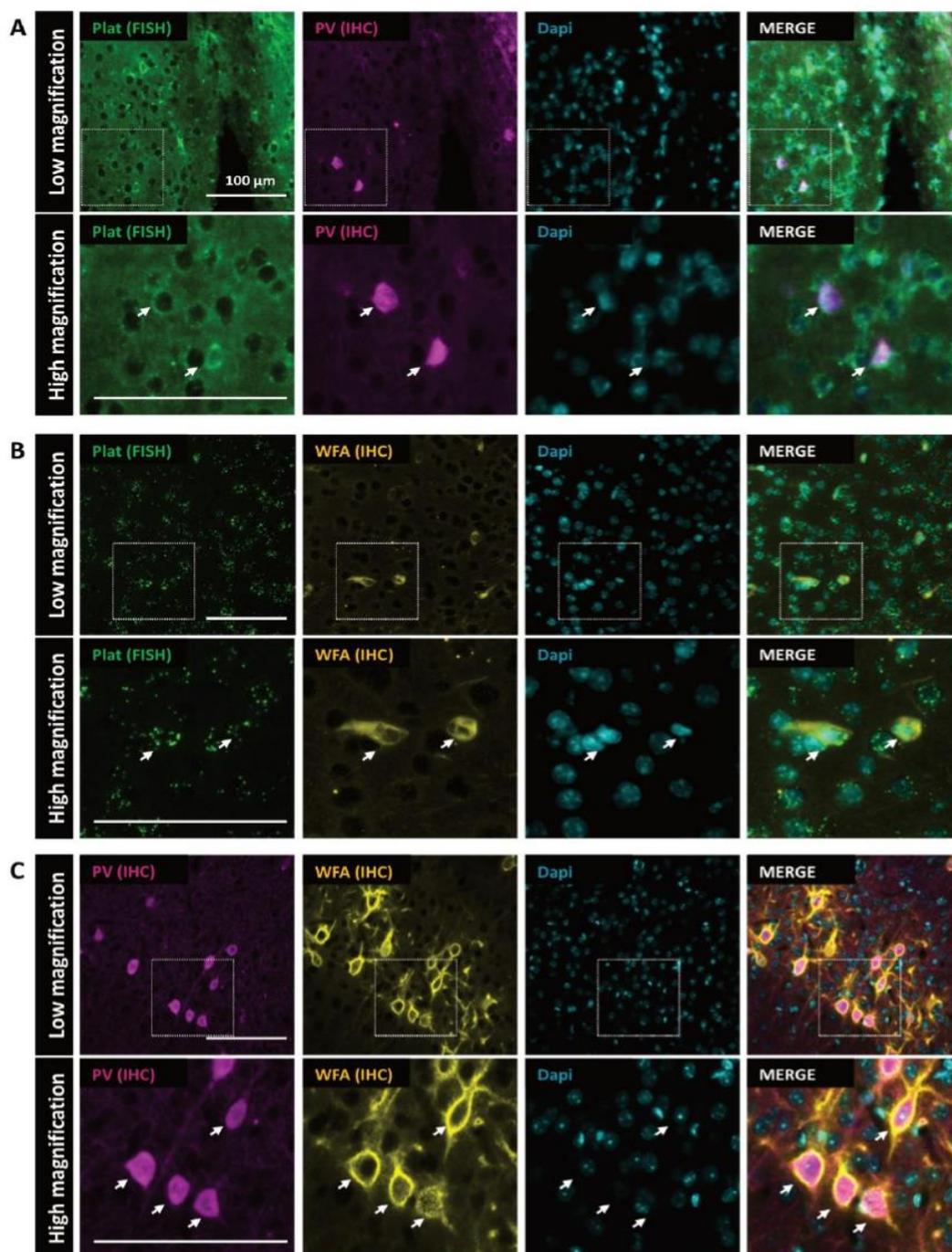
AAV-Plat-GFP was injected in the somatosensory cortex of adult wild-type mice. Co-immunohistochemistry of the GFP reporter (green) with the astrocyte marker GFAP (magenta) and the microglial marker Iba-1 (magenta) in the somatosensory cortex of adult WT mice under inflammatory conditions (LPS injection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

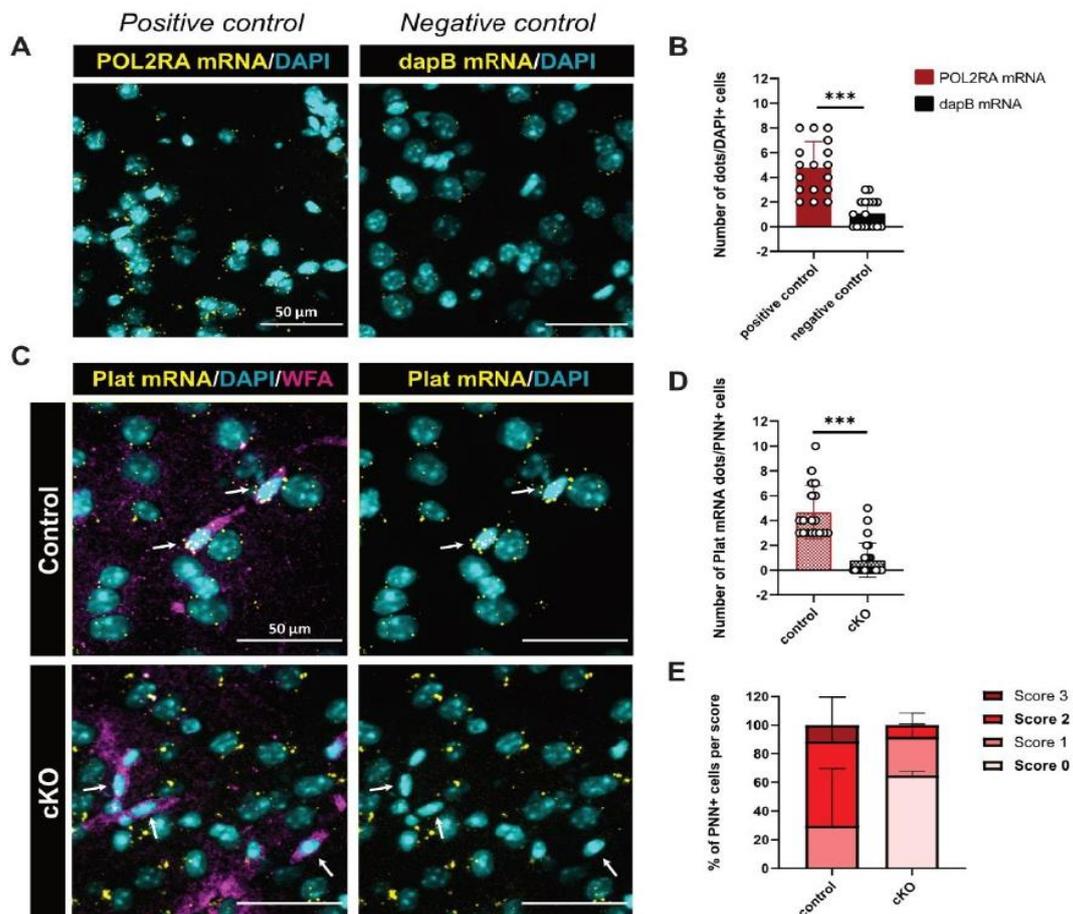
Fig. S4



**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  $\mu\text{m}$ .

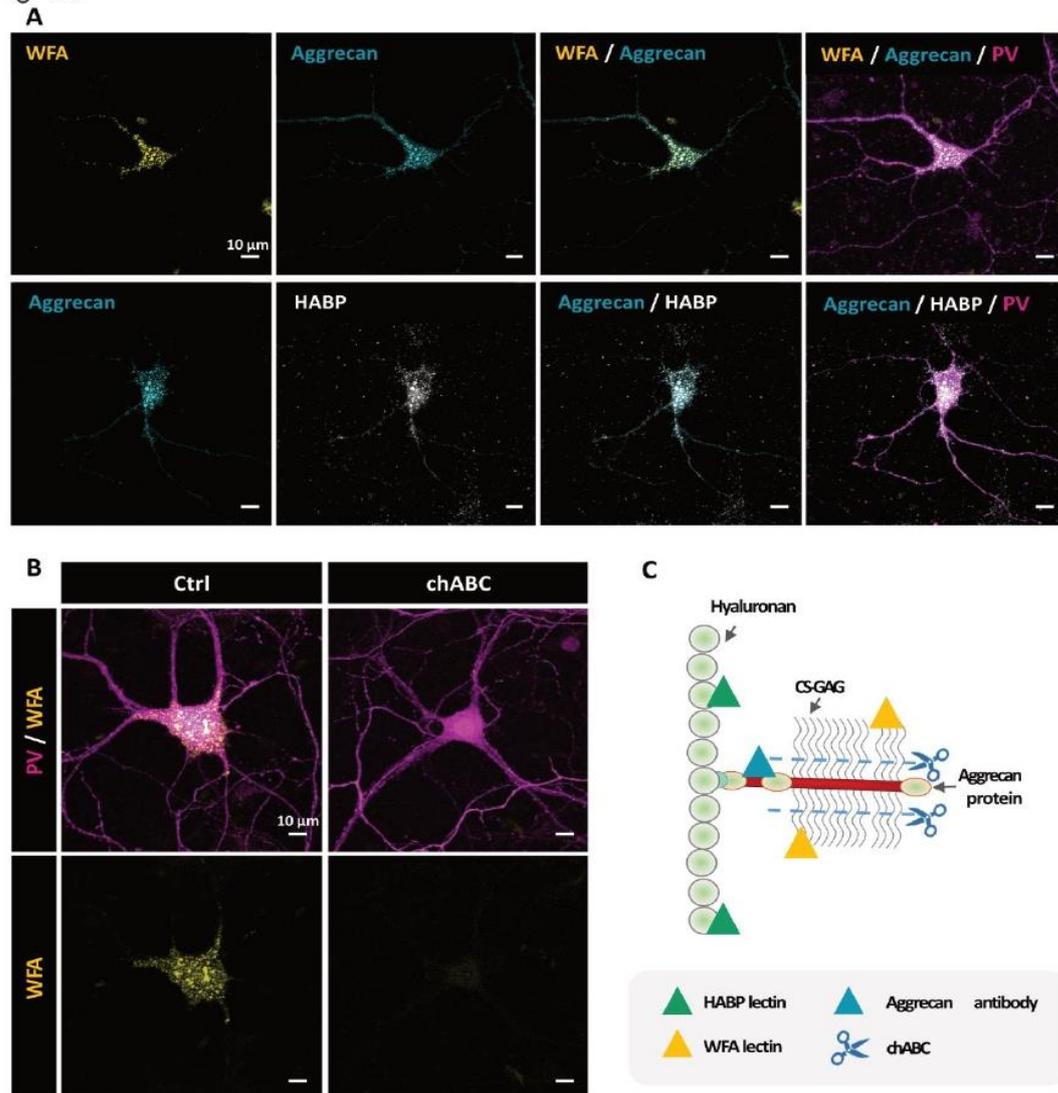
Fig. S5



**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.

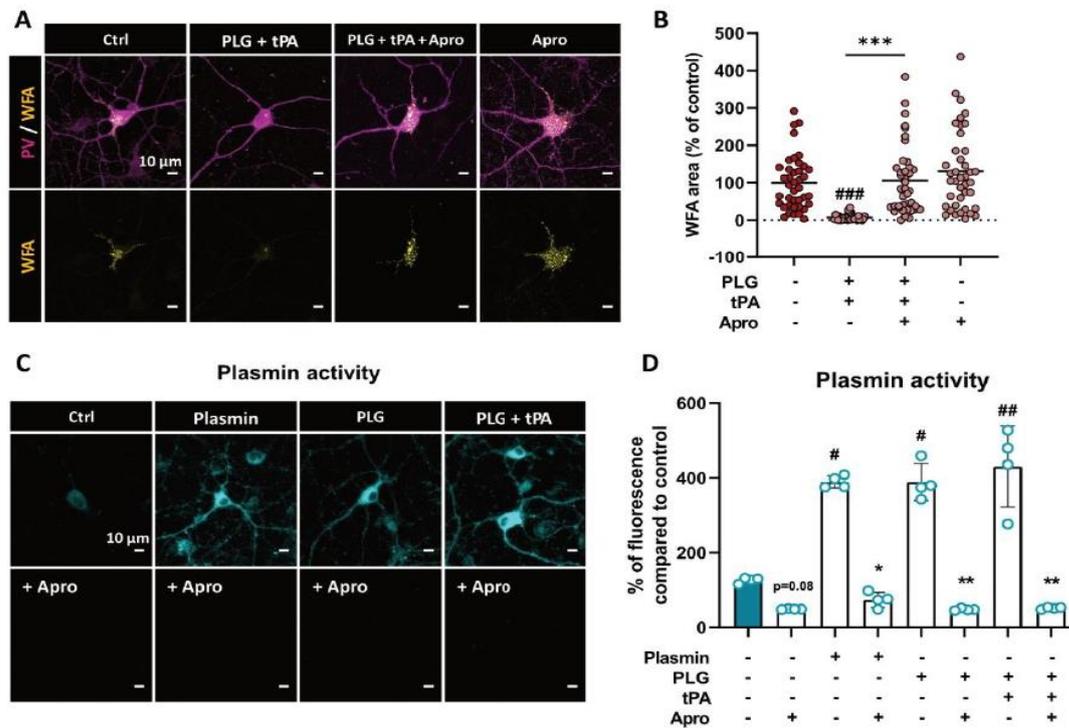
Fig. S6



**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  $\mu\text{m}$ .

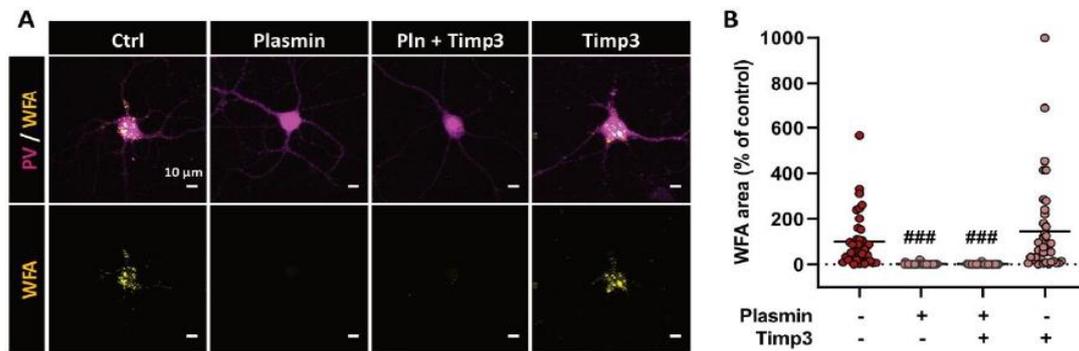
Fig. S7



**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: CCCTTAGAACGGAGTCCGGCT Antisense, 1169: TATCCGACCACCAGCAGCAG	592	Sense, 621: ACGACAGCCTTTTGCGGTTC Antisense, 968: CAAAGTAGCGGGCTGAGAG	366
GAD65* NM_008078.2	Sense, 99: CCAAAAGTTCACGGGCGG Antisense, 454: TCCTCCAGATTTGCGGTTG	373	Sense, 219: CACCTGCGACCAAAAACCT Antisense, 447: GATTTGCGGTTGGTCTGCC	247
GAD67* NM_008077.4	Sense, 83: ATGATACTTGGTGTGGCGTAGC Antisense, 314: GTTTGCTCCTCCCGTTCTTAG	253	Sense, 159: CAATAGCCTGGAAGAGAAGAGTCG Antisense, 314: GTTTGCTCCTCCCGTTCTTAG	178
PV* NM_013645.3	Sense, 104: GCCTGAAGAAAAAGAACCCG Antisense, 275: AATCTTGCCGTCCCATCT	191	Sense, 122: CGGATGAGGTGAAGAAGGTGT Antisense, 265: TCCCATCTCTGCTCCAGC	163
Akr1c18 NM_134066	Sense, 290: GGTCAACTTCCATCGTCCA Antisense, 667: GCACCATAGGCAACCAGAAC	397	Sense, 374: ATCTCATTCAATCCAGTCTC Antisense, 610: GCTCTGGTTGAGATAAAGATGGC	259
Sst NM_009215.1	Sense, 1: ATGCTGTCTGCCGTCTCCA Antisense, 231: GCCTCATCTCGCTCTGCTCA	250	Sense, 41: GCATCGTCTGGCTTTGGG Antisense, 191: GGGTCCAGGGCATCACTT	168
S100beta NM_009115.3	Sense, 57: CGGGCGAGAGGTGACAA Antisense, 172: TCTTCGTCCAGCGTCTCCAT	133	Sense, 57: CGGGCGAGAGGTGACAA Antisense, 133: TGTCCACCACTTCTGTCTCC	93
APC NM_007462	Sense, 1598: GGACCAGGACAAAACCCAATG Antisense, 1962: TGTAATTACATCTGCTCGCCA	386	Sense, 1642: TCTGTCCTGCTGTGTGTCT Antisense, 1826: GGCAACATCTCCAAAGTCAAG	207
Mybp1 NM_001252372	Sense, 774: CGTAGGAGGTGAAGCAGCA Antisense, 1102: TCTGCCAACTCCACGACAAA	247	Sense, 825: CTGCTGAAAAATGCCAACCC Antisense, 974: TGCCTCCTTATCCACCTGA	168
Ncan NM_007789	Sense, 159: TGCTGCTGTGGCTGCTTCTC Antisense, 521: CAGCGATACAGCCAGAGTC	381	Sense, 193: TCAGGACACACAGGACACCA Antisense, 383: CAGCAGAAGGGTAGCATTGG	309
Plat NM_008872	Sense, 157: CTGCTGCTTTGTGGACTGGC Antisense, 464: ATGTCACAGCGTTTCCCTACA	327	Sense, 175: GCTTTCCCATGCTGACCA Antisense, 449: CCTACAAATCCATCAGGGCACT	293
Plau NM_008873	Sense, 974: GCACAGCCATCCAGGTCC Antisense, 1237: GTTACAGATAAGCGGTCTCCA	281	Sense, 1010: CCCCCAAGGTTTACTGATGCTC Antisense, 1180: CCGCAGCACACAGCATTTTA	191
Ptpr NM_	Sense, 543: AAGAAGAGCCTGGACATCGC Antisense, 903: TGCCTTCTCCTGGTTTCCG	380	Sense, 582: AACTACCACTCCCCTTCCGAAG Antisense, 774: AGATCCGAAGCAGGTTATGTT	213
Ptprz1 NM_001081306	Sense, 421: TGTTGAAGAGATTGGCTGGTCC Antisense, 806: CCTCAAACTGGAAAATCTGTC	406	Sense, 447: CAGGAGCACTAAATCAAAAAA Antisense, 794: AAAATCTGTCCGCATCAAAGCA	368
Sdc4 NM_011521	Sense, 222: TCTGGATGACACGGAGGAGC Antisense, 546: GTCGTAATGCCTTCGTCTTTC	344	Sense, 284: ATAACCACATCCCTGAGAATGC Antisense, 496: AGGAAAACGGCAAAGAGGAT	233
Scna3a NM_009152	Sense, 653: GGCTGGTTCACCTGGGATTGC Antisense, 1035: CCCAGTCCACAGGCATACA	401	Sense, 671: GCCTGTCTTTCTGGGGTGT 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°C. Slides were treated by target retrieval reagents for 5min at 100°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.



## Résultats: article 2

*The Janus face of endogenous neuronal tPA: promoting self-protection but worsening the death of neighboring neurons*

[Paul Prunotto](#), Pauline Marie, Laurent Lebouvier, Yannick Hommet, Denis Vivien\*, Carine Ali\*

*Cell Death & Differentiation*, en préparation

## Contexte bibliographique de l'étude 2

Comme nous avons pu le montrer dans l'introduction, le tPA est présent dans le sang où il exerce son action fibrinolytique, mais également dans le parenchyme où son implication est multiple. Son expression au sein de différents types de neurones a été démontrée de manière parcellaire, cependant, ses rôles dans les phénomènes excitotoxiques/ischémiques sont discutés. L'ensemble des arguments (pour un effet bénéfique *versus* délétère du tPA neuronal) sont répertoriés dans les tableaux suivants (**Tableaux 1 et 2**).

### Le tPA endogène aux neurones est neurotoxique (Tableau 1)

Références	Modèles d'études	Mécanismes impliqués
(Tsirka <i>et al.</i> , 1995, 1996, 1997)	<i>In vivo</i>	Les souris déficientes en tPA (tPA KO) sont résistantes à la mort neuronale excitotoxique induite par l'injection de kainate.
(Wang <i>et al.</i> , 1998)	<i>In vivo</i>	Les souris déficientes en tPA (tPA KO) ont des volumes de lésion 50% plus petits que les souris WT suite à l'occlusion de l'artère cérébrale moyenne.
(Nagai <i>et al.</i> , 1999)	<i>In vitro</i>	Le sevrage en oxygène et en glucose (en anglais : <i>oxygen and glucose deprivation, OGD</i> ) induit une mort neuronale plus importante dans les cultures cellulaires issues de souris WT comparativement aux cultures issues de souris tPA KO.
(Nicole <i>et al.</i> , 2001)	<i>In vitro</i>	Les cultures neuronales issues de souris tPA KO présentent une mortalité neuronale induite par ajout de NMDA, moins importante que leur homologue WT.
(Gabriel <i>et al.</i> , 2003)	<i>In vitro</i>	Le TGF- $\alpha$ protège les neurones de l'excitotoxicité induite par le NMDA dans les cultures mixtes <i>via</i> une expression augmentée de PAI-1 par une voie dépendante de ERK dans les astrocytes.

(Tsuji <i>et al.</i> , 2005)	<i>In vivo</i>	Le tPA endogène perméabilise la BHE en exacerbant l'activité des MMP-9 qui dégrade la lame basale des vaisseaux.
(Lebeurrier <i>et al.</i> , 2005)	<i>In vivo</i> <i>In vitro</i>	L'injection intracorticale de neuroserpine diminue le volume de lésion induit par injection de NMDA dans le striatum et dans le cortex.
(Lee <i>et al.</i> , 2007)	<i>In vitro</i>	Les cultures issues de souris tPA KO ont une activité moindre des MMP, inhibant ainsi la dégradation de la matrice extracellulaire et prévenant l'apoptose neuronale.
(Su <i>et al.</i> , 2008)	<i>In vitro</i> <i>In vivo</i>	Le tPA endogène participe à l'ouverture de la BHE <i>via</i> la régulation des récepteurs PDGF-R $\alpha$ .
(Polavarapu <i>et al.</i> , 2007)	<i>In vivo</i>	Le tPA participe à l'ouverture de la BHE <i>via</i> sa liaison avec les récepteurs LRP des astrocytes, détachant ainsi les pieds astrocytaires des vaisseaux
(Zhang <i>et al.</i> , 2009)	<i>In vitro</i> <i>In vivo</i>	Le tPA augmente l'activité des MMP-9 <i>via</i> l'activation des récepteurs LRP-1 des cellules microgliales et participe à l'ouverture la BHE.
(Macrez <i>et al.</i> , 2011)	<i>In vitro</i> <i>In vivo</i>	Le tPA participe à l'ouverture de la BHE et la migration trans-endothéliale des monocytes <i>via</i> son interaction avec les récepteurs NMDA.
(Ma <i>et al.</i> , 2012)	<i>Ex vivo</i>	La neuroserpine protège les neurones du sevrage en oxygène et en glucose en inhibant la mort neuronale induite par le tPA.
(Omouendze <i>et al.</i> , 2013)	<i>In vivo</i>	L'inhibition du tPA protège le cerveau des lésions néonatales chez le rat, dépendamment de l'activité des MMP-2 et 9 vasculaires.

Tableau 1 : Arguments en faveur d'un effet neurotoxique du tPA endogène dans l'excitotoxicité/l'ischémie cérébrale.

## Le tPA endogène aux neurones est neuroprotecteur (Tableau 2)

Références	Modèles d'études	Mécanismes impliqués
(Centonze <i>et al.</i> , 2002)	<i>In vivo</i>	Le tPA augmente la mort neuronale apoptotique plutôt que la mort neuronale nécrotique, réduisant les effets pro-inflammatoires.
(Yepes <i>et al.</i> , 2002)	<i>In vitro</i>	Le tPA est protecteur contre la nécrose excitotoxique dans un modèle de crises et convulsions induite par injection de kainate dans l'amygdale.
(Liot <i>et al.</i> , 2006)	<i>In vitro</i>	Les neurones corticaux sont protégés par le tPA dans les protocoles d'OGD indépendamment de sa capacité fibrinolytique, mais par l'activation de la voie PI3-kinase et une réduction de l'activation de caspase-3.
(Echeverry <i>et al.</i> , 2010)	<i>In vitro</i> <i>In vivo</i>	Le tPA est impliqué dans la survie neuronale après une lésion ischémique hippocampique chez la souris. L'absence d'activité du tPA dans la lésion rend les neurones plus vulnérables à la mort ischémique.
(Correa <i>et al.</i> , 2011)	<i>In vitro</i> <i>In vivo</i>	Le tPA protège les oligodendrocytes de l'apoptose à travers un effet « cytokine like » médié par l'interaction avec son domaine EGF-like et le récepteur à l'EGF oligodendrocytaires. Cet effet anti-apoptotique du tPA est médié par le recrutement de la voie Erk1/2 et Akt, impliqué dans la survie neuronale.
(Haile <i>et al.</i> , 2012)	<i>In vitro</i> <i>In vivo</i>	Le tPA endogène libéré en situation ischémique induit l'expression du TNF dépendamment de la plasmine et ses interactions avec les récepteurs NMDA. Le TNF induit l'expression de l'inhibiteur de la kinase dépendante des cyclines p21, inhibant la mort apoptotique.
(F. Wu <i>et al.</i> , 2012)	<i>In vitro</i> <i>In vivo</i>	Le tPA endogène induit une survie cellulaire des neurones corticaux exposés à une OGD par l'activation de la voie mTOR et la régulation du facteur HIF-1 $\alpha$ . Le tPA induit l'expression du transporteur du glucose GLUT3 permettant la captation de glucose par les neurones corticaux.

(F. Wu, <i>et al.</i> , 2013)	<i>In vivo</i>	Le tPA endogène protège le cerveau dans un modèle d'excitotoxicité induite par injection intra-striatale de NMDA. Cet effet est médié par l'activation des récepteurs NMDA contenant la sous unité <i>GLUN2A</i> , induisant la phosphorylation des signaux extracellulaire (ERK) entraînant l'activation de CREB et l'induction du facteur de transcription neuroprotecteur Atf3.
(F. Wu, <i>et al.</i> , 2013)	<i>In vitro</i>	L'OGD induit la libération de tPA dans la fente synaptique ce qui induit l'activation d'AMPK augmentant la récupération du glucose et l'ATP neuronal. Cet effet du tPA est dépendant des récepteurs NMDA.
(Lemarchand <i>et al.</i> , 2016)	<i>In vitro</i> <i>In vivo</i>	Les neurones hippocampiques en situation de stress se protègent eux-mêmes <i>via</i> un mécanisme dépendant du tPA et ses interactions avec les récepteurs à l'EGF.
(Cai <i>et al.</i> , 2021)	<i>In vitro</i> <i>In vivo</i>	Les souris tPA KO sont plus sensibles à la mort neuronale que leurs homologues sauvages dans un modèle d'occlusion de l'ACM pendant 1 heure. Le tPA exerce un effet neuroprotecteur en augmentant la phosphorylation de AMPK et l'expression de FUNDC1, une protéine impliquée dans l'autophagie.

Tableau 2 : Arguments en faveur d'un effet neuroprotecteur du tPA endogène dans l'excitotoxicité/l'ischémie cérébrale.

A l'heure actuelle, nous ne savons pas quel est le véritable rôle du tPA neuronal endogène aux neurones dans les mécanismes excitotoxiques/ischémiques et en particulier à la phase aiguë. L'utilisation d'animaux entièrement déficients en tPA ne permet pas de distinguer les effets vasculaires *versus* parenchymateux, ni même les effets selon les différents types cellulaires exprimant le tPA.

## Principaux outils utilisés

Afin de répondre à la question concernant le rôle du tPA endogène aux neurones lors de la phase aiguë des mécanismes excitotoxiques/ischémiques, nous avons employé des approches basées sur des AAV portant le sérotype 9, qui ciblent principalement les neurones. Les AAV exprimaient la GFP sous le contrôle du promoteur du gène PLAT, codant pour le tPA. L'injection de ces AAV-pPlat-GFP a permis de mettre en évidence la présence de tPA dans les neurones transduits. Inversement, dans le but d'invalider spécifiquement le tPA dans les neurones corticaux, nous avons utilisé ces mêmes constructions, incorporant également la Cre recombinase. Ainsi, l'injection des AAV Plat-Cre-GFP chez des souris tPA flox<sup>+/+</sup> (tPA-cKO<sup>Neu</sup>), a permis d'invalider l'expression de tPA dans les neurones transduits et le démasquer lorsqu'injecté chez des souris tPA flox<sup>-/-</sup> (WT). Pour induire l'excitotoxicité dans le cortex somatosensoriel des souris, nous avons procédé à une injection de NMDA intracorticale. Le modèle d'AVC ischémique adopté est le modèle thromboembolique (Orset *et al.*, 2007). Ce modèle consiste en l'application de thrombine au niveau de l'ACM, afin de créer un caillot riche en fibrine obstruant la circulation et provoquant des lésions corticales. L'effet du tPA dans les phénomènes de nécrose excitotoxique a été étudié par des études d'IRM et des analyses immunohistochimiques à des temps précoces.

## Principaux résultats obtenus

- ✚ 1/3 des neurones du cortex somato-sensoriel exprime du tPA.
- ✚ Les neurones à tPA montrent une moindre sensibilité à l'excitotoxicité induite par le NMDA que les neurones dépourvus de tPA.
- ✚ Les neurones à tPA ont une double action en condition excitotoxique : se protéger eux-mêmes mais avoir un effet paracrine toxique sur les neurones voisins non tPA.
- ✚ Les animaux délétés en tPA dans le cortex somatosensoriel présentent des lésions ischémiques plus importantes ainsi qu'une nécrose excitotoxique des neurones excitateurs et inhibiteurs plus prononcée que leurs homologues WT.

# Article 2

**The Janus face of endogenous neuronal tPA: promoting self-protection and worsening the death of neighboring neurons**

**Abbreviated title: Endogenous neuronal tPA: a self-protective protease**

[Paul Prunotto](#)<sup>1</sup>, Pauline Marie<sup>1</sup>, Laurent Lebouvier<sup>1</sup>, Yannick Hommet<sup>1</sup>, Denis Vivien<sup>1,2,\*</sup>,  
Carine Ali<sup>1,\*</sup>

<sup>1</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>2</sup> Department of clinical research, CHU de Caen Normandie, Caen, France

\* Authors with equal contribution

**Corresponding author:**

Pr. Carine Ali, INSERM U1237 “Physiopathology and Imaging of Neurological Disorders”,  
GIP Cyceron - Institut BB@C - Bd Becquerel, BP 5229- 14074 Caen Cedex, France. Email:  
[ali@cyceron.fr](mailto:ali@cyceron.fr)

**Conflict of interest statement:** None

## **Abstract**

**Background:** Recombinant tissue-type plasminogen activator (r-tPA / Actilyse) stands as the prevailing pharmacological solution for treating ischemic stroke patients, of whom because their endogenous circulating tPA alone is unable to promote fibrinolysis and favorable outcome. Beyond the tPA contributed by circulating endothelial cells and hepatocytes, neurons may also express tPA, sparking debates regarding its impact on neuronal fate ranging from pro-survival to neurotoxic properties.

**Methods:** In order to investigate the role of neuronal tPA during brain injuries, we developed models leading to its conditional deletion in neurons, employing AAV9-pPlat-GFP and AAV9-pPlat-Cre-GFP along with tPA floxed mice. These models were subjected to N-methyl-D-aspartate (NMDA)-induced excitotoxicity or thromboembolic ischemic stroke in mice.

**Results:** Initially, we established that our AAV9 constructs selectively transduce neurons, bypassing other brain cell types. Subsequently, we demonstrated that tPA expressing neurons exhibit greater resistance against NMDA-induced excitotoxicity compared to tPA negative neurons. The targeted removal of tPA in neurons heightened the susceptibility of these neurons to cell death and exerted a paracrine neurotoxic effect on tPA non-expressing neurons. Under ischemic conditions, the self-neuroprotective influence of tPA encompassed both excitatory (GFP<sup>+</sup>/Tbr1<sup>+</sup>) and inhibitory (GFP<sup>+</sup>/GABA<sup>+</sup>) neurons.

**Conclusion:** Our findings unmask the self-protective role of tPA generated by glutamatergic and GABAergic neurons under excitotoxic/ischemic conditions. Simultaneously, neuronal tPA contributes to the excitotoxic death of neighboring tPA non-expressing neurons.

**Keywords:** tissue-type plasminogen activator, excitotoxicity, stroke, neuronal sensitivity.

**Abbreviations:** **AAV:** Adeno-associated Virus. **AMPK:** AMP-activated protein kinase. **CBF:** Cerebral Blood Flow. **tPA-cKO<sup>Neu</sup>:** tPA conditional Knock-out in neurons. **KO:** Knock-out. **GABA:** gamma-amino-butyric acid. **GFP:** Green Fluorescent Protein. **HIF-1 $\alpha$ :** hypoxia-inducible factor 1 subunit alpha. **LRP1:** Low density lipoprotein receptor-related protein 1. **MIF:** macrophage/microglial inhibiting factor. **MRI:** Magnetic Resonance Imaging. **mTOR:** mammalian target of rapamycin. **NMDA:** N-methyl-D-Aspartate. **r-tPA:** recombinant-Tissue-type Plasminogen Activator. **Tbr1:** t-box brain transcription factor 1. **tPA:** Tissue-type Plasminogen Activator. **WT:** Wild-type.

## **Background**

Recombinant tissue-type plasminogen activator (r-tPA) (or its derivate Tenecteplase) is the only pharmacological treatment at the acute phase of ischemic stroke, based on its ability to convert plasminogen into active plasmin and thus to promote thrombolysis (1). tPA is also a multifaceted mediator of brain physiopathology (2–4). In the brain parenchyma, tPA is expressed in different structures such as the hippocampus, amygdala or somatosensory cortex and by different cell types including activated microglia, oligodendrocytes and neurons (Correa et al., 2011; Louessard et al., 2016; Rogove et al., 1999). Regarding neurons, tPA has been identified *in vitro*, in neuronal cell lines and in primary cultured neurons (8,9). In cultured cortical and hippocampal neurons, tPA is stored in endosomal and exosomal vesicles in axons and dendrites (10–12). After activity-dependent exocytosis, tPA released in the synaptic cleft can either potentiate N-methyl-D-Aspartate (NMDA) receptor-dependent glutamatergic signaling, or be recycled in astrocytes, thus behaving as a neuromodulator (12–15). The expression of tPA by neurons *in vivo* has been shown in hippocampal CA1 neurons (and

corresponding mossy fibers) and in cortical neurons, although in these latter, immunodetection was not possible with conventional techniques (6,16,17).

The potential neuronal toxicity of exogenous tPA is well documented, in particular under excitotoxic conditions (14,18), although protection against apoptosis (19) and/or autophagy (20) have also been reported. By contrast, the actual role of endogenous tPA in the control of neuronal fate, especially during stroke remains highly debated. A meta-analysis of the impact of tPA deficiency in mechanical stroke models (21) concluded that endogenous tPA has no effect on brain infarction, due to the huge heterogeneity of results (*ie*, both smaller and bigger lesions reported). This likely arises from different extents of contribution of circulating *versus* parenchymal tPA to stroke pathogenic events, depending on the model used (22–24). The use of tPA KO mice has yielded a plethora of data regarding the global toxic or protective impact of tPA. However, this mouse model does not allow elucidating the implications of tPA at a cellular scale. To our knowledge, Tsirka's team is the only one that has specifically investigated cell-type specific contribution of tPA, by re-introducing tPA expression in microglia or in neurons in tPA KO mice (25). However, this study expressed tPA, under the control of the macrophage colony-stimulating factor (M-CSF) proto-oncogene promoter or the neurofilament light chain (NF-L) promoter, leading to an over-expression of the protease, even in cells that do not normally express it.

Instead, here we used serotype 9 adeno-associated viral (AAV) constructs with the tPA promoter of *Plat* (pPlat), the gene encoding for tPA. We used two original constructs (AAV9-pPlat-GFP and AAV9-pPlat-Cre-GFP) to unmask or delete endogenous tPA expression only in transduced neurons, in mice expressing lox-P sites in exon-3 of the *Plat* gene. Our aim was to investigate the *in vivo* influence of endogenous tPA specifically released by neurons at the early stages of excitotoxic and ischemic conditions. We demonstrate that tPA is expressed by some GABAergic and glutamatergic cortical neurons, and this neuronal tPA displays a self-protective

role against NMDA-mediated excitotoxicity and ischemic neuronal death. Simultaneously, neuronal tPA contributes to the excitotoxic death of neighboring tPA non-expressing neurons.

## **Materials and Methods**

### Animals:

Experiments were conducted in compliance with the French ethical law (Decree 2013-118) and the European Communities Council guidelines (2010/63/EU). The protocols were approved by the local ethics committee, under the French Ministry of Research and Higher Education (agreement numbers Cenomexa #25267 and #37835 and Ce5/2012/062), and all appropriate international, national, and institutional guidelines for the care and the use of animals were followed. All *in vivo* or *ex vivo* studies were performed on 5 to 8-week-old male Swiss mice (30-35g) or C57BL6J mice (tPA Flox<sup>+/+</sup>; tPA-cKO<sup>Neu</sup> mice when injected by the AAV9-pPlat-Cre-GFP and their control tPA Flox<sup>-/-</sup> littermates: WT mice, 20-25g). The animals were kept under a 12-hour light/12-hour dark cycle with free access to food and water in standard polypropylene cages (22 x 37 x 19 cm, Charles River, L'Arbresle, France; 3 mice per cage).

### Adeno-Associated Virus (AAV) production

Viral particles were provided by Gilles Bonvento and Alexis Bemelmans (INSERM U1169/MIRCen CEA, Fontenay aux Roses 92265, France). The pPlat-GFP clone, which encodes for the green fluorescent protein under the control of a 1.2-kb sequence of the human Plasminogen Activator promoter and the pPlat-Cre-GFP clone, which encodes for the Cre recombinase and the GFP under the control of a 1.2-kb sequence of the human Plasminogen Activator promoter, were purchased from GeneCopoeia (Catalog No.: HPRM12655-PF02). The cDNA encoding for the Cre recombinase was subcloned by fusion into the pPlat-GFP (Infusion HD cloning Kit Clontech-Takarabio). The pPlat-GFP and the pPlat-Cre-GFP were then

subcloned in the pDONR221 for AAV production. 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 AAV9 serotype vector was used in this study. Self-complementary AAV vectors expressing the Plat-Cre-GFP construct were produced by transfecting HEK293 cells with the adenovirus helper plasmid (pXX6-80), the AAV packaging plasmid carrying the rep2 and cap8 genes, and the AAV2 shuttle plasmid containing the Plat-Cre-GFP transgene in a self-complementary genome. The recombinant vectors were purified by ultracentrifugation on a discontinuous iodixanol density gradient and then dialyzed 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)) with five buffer changes of three hours each. The physical particles were quantified by real-time PCR, and the vector titers were expressed as viral genomes per milliliter (vg/mL).

#### Intracortical stereotaxic injection of AAV9

For AAV injections, 5-week-old mice were deeply anesthetized under 5% isoflurane in a gas mixture consisting of 70% nitrous oxide and 30% oxygen. The depth of anesthesia was monitored by the absence of reflexes upon paw pinch. The mice were then placed in a stereotaxic frame (Harvard Apparatus), under anesthesia (2.5% isoflurane; 70% N<sub>2</sub>O / 30%O<sub>2</sub>) with the aid of ear bars to immobilize the cranial box. Local lidocaine was applied to prevent pain caused by ear bars. The animal temperature was maintained at 37°C using a heating pad placed under the animal and monitored by a rectal probe. The skull was cleaned with alcohol and then with Betadine to limit infections during surgery and at the time of suture. The skull was incised, and the bregma coordinates were recorded, a craniotomy was performed at the injection site using a dental drill, allowing then inserting the AAV-containing micropipette at the chosen stereotaxic coordinates. The coordinates used for intracortical injections in the primary somatosensory cortex were -0.5 mm AP (anteroposterior), +/- 3.3 mm ML

(medial/lateral), and -0.8- and 0.4-mm D (depth from the brain surface). AAV9 was injected in both primary somatosensory cortices. The viral particles ( $1.25 \times 10^{13}$  vg/mL; 2 x 0.25  $\mu$ L per hemisphere) were injected at a rate of 0.2  $\mu$ L/min to allow progressive diffusion in the brain parenchyma and to preserve the tissue. The micropipette was left in place for 3 minutes after the complete injection volume had been administered and then slowly withdrawn to prevent the reflux of viral particles from the injection site. The surgical site was cleaned with Betadine and the skin sutured. The duration of anesthesia was identical for all experimental groups (30 minutes). Three weeks after infections, animals were subjected to either direct immunohistochemistry, NMDA injection or stroke. This procedure has already been used and validated, showing that AAV9-pPlat-Cre-GFP does indeed remove tPA from mossy fibers of hippocampal neurons in tPA Flox<sup>+/+</sup> mice, without deleting but demasking it in tPA Flox<sup>-/-</sup> (4).

#### Intracortical NMDA injection

For the unilateral injections of NMDA, 8-week-old mice were deeply anesthetized under 5% isoflurane in a gas mixture consisting in 70% nitrous oxide and 30% oxygen. The depth of anesthesia was monitored by the absence of reflexes upon paw pinch. The mice were then placed in a stereotaxic frame (Harvard Apparatus), under anesthesia (2.5% isoflurane; 70% N<sub>2</sub>O / 30% O<sub>2</sub>) with the aid of ear bars to immobilize the cranial box. Local lidocaine was applied to prevent pain caused by ear bars. The animal temperature was maintained at 37°C using a heating pad placed under the animal and monitored by a rectal probe. The skull was cleaned with alcohol and then with Betadine to limit infections during surgery and at the time of suture. The skull was incised, and the bregma coordinates were recorded, a craniotomy was performed at the injection site using a dental drill, allowing then inserting the NMDA-containing micropipette at the chosen stereotaxic coordinates. The coordinates used for intracortical injections in the right primary somatosensory cortex were -0.5 mm AP (anteroposterior), +3.3 mm ML (medial/lateral), and -0.6 D (depth from the brain surface). NMDA (2.5 nanomoles; 1

x 0.33  $\mu\text{L}$ ) were injected at a rate of 0.2  $\mu\text{L}/\text{min}$  to allow progressive diffusion in the brain parenchyma and to preserve the tissue. The micropipette was left in place for 3 minutes after the complete injection volume had been administered and then slowly withdrawn to prevent the reflux of NMDA solution from the injection site. At 30 minutes, 1 hour, or 2 hours after NMDA injection, animals were euthanized for immunohistochemical analysis.

#### Thromboembolic model of stroke

Eight-week-old mice were deeply anesthetized under 5% isoflurane in a gas mixture consisting of 70% nitrous oxide and 30% oxygen. The depth of anesthesia was verified by the absence of reflexes when the paw was pinched. The mice were then placed in a stereotaxic frame using ear bars under anesthesia (2.5% isoflurane; 60%  $\text{N}_2\text{O}/40\% \text{O}_2$ ) to immobilize the skull. Local lidocaine application was performed to prevent pain caused by the ear bars. The animal temperature was maintained at  $37^\circ\text{C}$  using a warming pad placed under the animal, and its temperature was monitored using a rectal probe. An incision was made between the right eye and ear, and the masseter muscle was dissociated from the lateral aspect of the parietal bone and then cut into two parts. After locating the middle cerebral artery (MCA), a craniotomy was performed at the M1-M2 segments of the bifurcation of the MCA. The skull was cooled and cleaned with saline during the craniotomy. The dura mater was then excised. Cerebral ischemia was induced by *in situ* injection of murine thrombin (1  $\mu\text{L}$ , 1 IU, Kordia) using a hematologic micropipette fixed to the articulated arm of the stereotaxic frame where the animal was positioned. The duration of anesthesia was the same for all animals: approximately 15 minutes before occlusion and 25 minutes after, totaling 40 minutes. After protecting the craniotomy with a hemostatic compress (Pangen®), the skin was sutured. Animals were euthanized after MRI session, 6 hours post-ischemia.

### Magnetic Resonance Imaging

Six hours after stroke onset, lesion volumes, hemorrhagic transformations (HT) and tissular perfusion were measured using a Pharmascan 7-Tesla/12 cm Magnetic Resonance Imaging (7T-MRI, Bruker). The mice were deeply anesthetized with 5% isoflurane and maintained with 1.5-2% isoflurane in 30% O<sub>2</sub>/70% N<sub>2</sub>O during image acquisition. T2-weighted images were used to analyze lesion sizes, while T2\*-weighted sequences were used to detect hemorrhagic events. Tissular perfusion were acquired by using an Arterial spin labelling (ASL) sequence. Lesion sizes were quantified using ImageJ software. The duration of the MRI examination was estimated to be 25 minutes, including mouse placement in the cradle and computer sequence preparation.

### Antibodies

The following antibodies and/or tracers were used: mouse anti-NeuN (1:800, MAB377, Merck); rabbit anti-Green fluorescent protein (GFP, 1:1000, ab6556, abcam); goat anti-Green fluorescent protein (GFP, 1:1000, ab5450, 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- Gamma aminobutyric acid (GABA, 1:500, A2052, Sigma Aldrich); Rabbit anti-CD31 (1:1000, ab28364, abcam); NeuroTrace™ 435/455 Blue Fluorescent Nissl Stain (1:300, N21479, Invitrogen); rabbit anti- Oligodendrocyte transcription factor (Olig2, 1:3000, ab9610, Millipore); chicken anti-T-box brain transcription factor 1 (tbr1, 1:250, ab2261, Merck).

### Immunohistochemistry

Mice were deeply anesthetized with a mixture of 5% isoflurane in 70% nitrous oxide and 30% oxygen. A transcardial perfusion was performed using 0.9% NaCl solution with 3% heparin, followed by fixation with a solution containing 4% paraformaldehyde in 0.1M PBS with a pH

of 7.4. The brains were removed, cryoprotected for 48 hours in a 20% sucrose solution in 0.1M PBS (pH 7.4), and then frozen in Tissue-Tek. Cryostat sections of 10  $\mu\text{m}$  were collected on Poly-Lysine slides and stored at  $-80^{\circ}\text{C}$ . Primary antibodies were incubated with the sections overnight at room temperature. Corresponding Fab'2-conjugated secondary antibodies were diluted at 1:800 (Jackson Immunoresearch). Images were captured using a Leica DM6000 microscope with a CoolSnap camera and visualized with Metamorph 7.0 software (Molecular Devices) or Leica TCS SP8 Confocal/STED 3x microscope with an oil-immersion 40x, 1.44-N.A. objective at a resolution of 1024x1024 pixels, a speed of 600 Hz, and a step size of 35 $\mu\text{m}$ .

#### Histological analysis

Images were further processed using ImageJ software or QuPath Open Software. All analyses were performed blindly to the genotype. For the quantification of neuronal loss in tPA-expressing neurons or tPA-non-expressing neurons, the number of NeuN<sup>+</sup>/GFP<sup>-</sup> or NeuN<sup>+</sup>/GFP<sup>+</sup> cells in the lesion area or in the contralateral area were manually counted (at least 5 images per hemisphere, from 4 mice per group for 30 minutes and 1-hour group and 5 mice for 2 hours group). For the quantification of neuronal loss in tPA-cKO<sup>Neu</sup> or WT mice after NMDA injection or stroke, the number of DAPI<sup>+</sup>, NeuN<sup>+</sup> or Neurotrace<sup>+</sup> cells overlapping or not with GFP<sup>+</sup> cells in the lesion area or in the contralateral area were manually counted (at least 5 images per hemisphere, from at least 4 mice per group).

The presence of the Cre recombinase in the transduces neurons was controlled by immunohistochemistry, as seen in **supplementary data 1** (anti-mouse; MAB3120).

Neuronal circularity was calculated using the following equation:  $\text{circularity} = 4\pi \times \frac{\text{area}^2}{\text{perimetre}}$

(26). This score provides an indication of morphological changes in neurons, with a score close to 1 indicating a normal neuron and a score close to 0 indicating a suffering neuron.

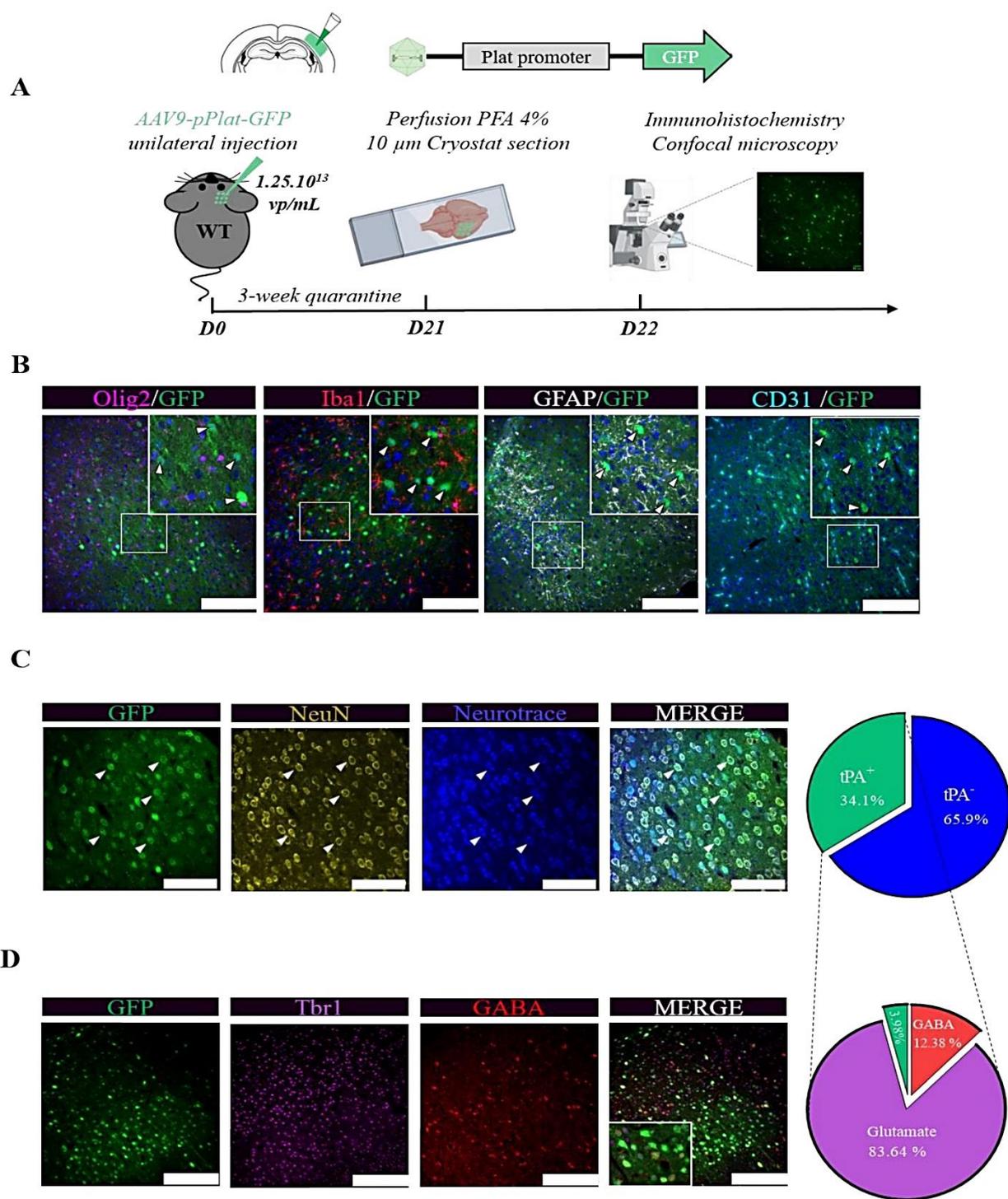
### Statistics

Statistical analyses were performed using GraphPad Prism software (version 9.0). In some cases, the analysis of the datasets using parametric approaches proved to be inadequate due to the violation of normality assumptions, as indicated by the results of Shapiro-Wilk tests. Hence, appropriate selection of either parametric or non-parametric approaches was made as per the requirement. We conducted two-way ANOVA tests with multiple comparisons to analyze the number of tPA-non-expressing or tPA-expressing neurons in the lesion or the contralateral area and the absolute number of neurons (NeuN) or tPA-expressing neurons (NeuN<sup>+</sup>/GFP<sup>+</sup>) in the lesion and contralateral cortical areas between WT and tPA-cKO<sup>Neu</sup> mice at 1-hour and 2-hours post-NMDA injection. The same test was used to quantify the mortality of neurons after stroke. The inclusion of multiple comparisons allowed us to examine the specific differences between groups and time points, providing a comprehensive understanding of the effects of genotype and time on neuronal populations in these regions. *Post-hoc* tests using the Bonferroni correction were performed to determine significant differences between specific groups. Same analyses were performed for the experimental condition six hours post induction of ischemic stroke. The statistical test used to compare genotypes for lesion volumes was the parametric Student's t-test. For the other comparisons, we conducted two-way ANOVA tests with multiple comparisons, followed by Bonferroni *post-hoc* tests. These analyses allowed us to assess significant differences between groups while considering the effects of multiple factors simultaneously. All tests were two-tailed.

## Results

### **tPA is expressed by excitatory and inhibitory cortical neurons *in vivo*.**

Three weeks after the intracortical injection of AAV9-pPlat-GFP viral particles, the brains of swiss mice were collected for immunohistochemical analyses (**Figure 1A**). Neither microglia (Iba1 marker, red), oligodendrocytes (Olig2 marker, magenta), astrocytes (GFAP marker, white) nor endothelial cells (CD31 marker, cyan) expressed GFP (white arrows) (**Figure 1B**). By contrast, GFP was associated with the neuronal marker NeuN (yellow) or the Neurotrace Nissl staining (blue) (**Figure 1C**). These data show that in our experiments, our constructs only transduce neurons. Around 34% of all cells expressing NeuN and stained by the Neurotrace Nissl staining were positive for GFP (**Figure 1C**), showing that one third of neurons in this cortical area express tPA. Around 84% of GFP positive neurons co-expressed the transcription factor *tbr1*, a marker of excitatory neurons (magenta) while 12% expressed GABA, a marker of inhibitory interneurons (red) (**Figure 1D**). tPA is thus expressed by inhibitory and excitatory cortical neurons.

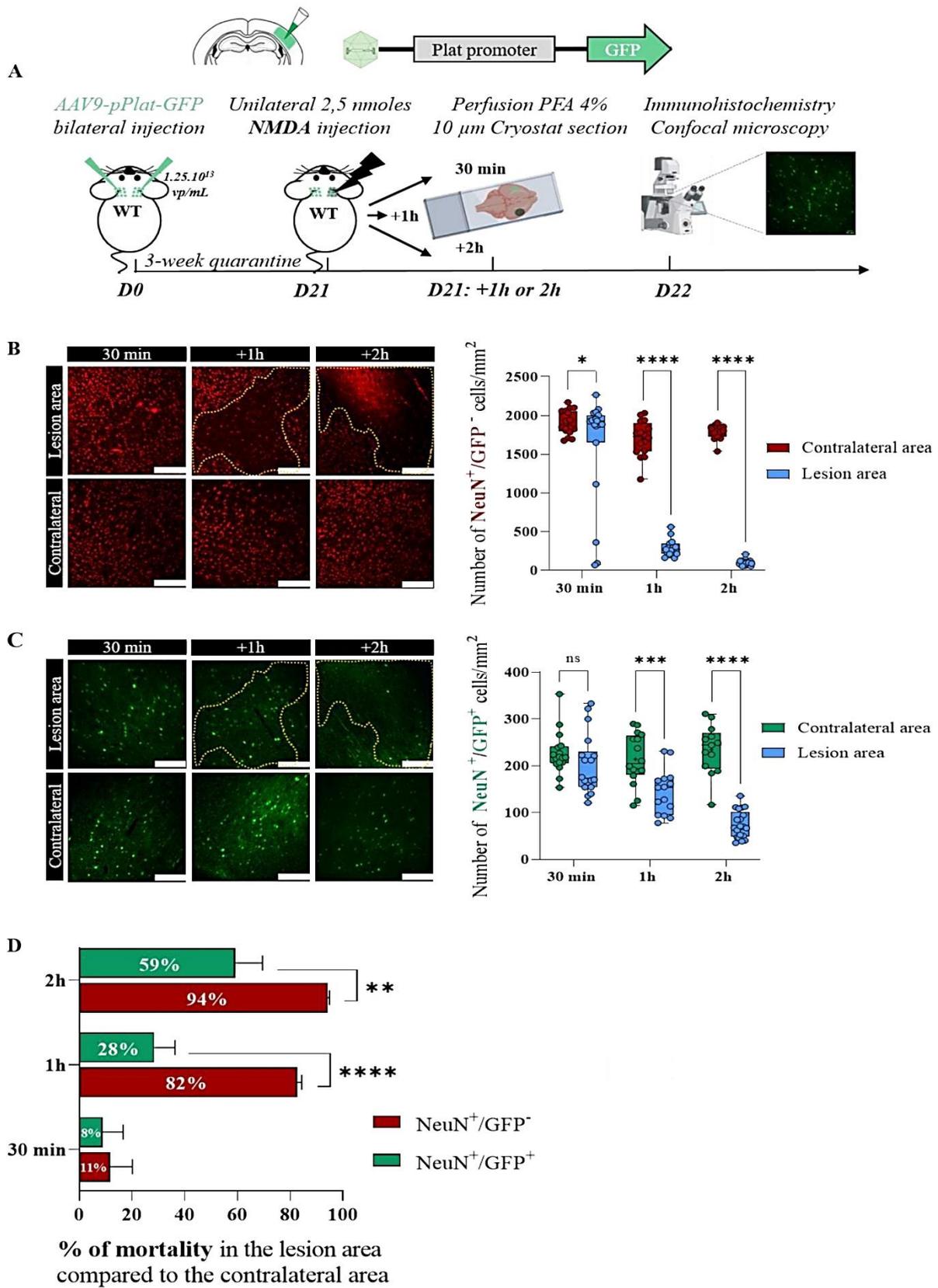


**Figure 1: tPA is expressed by cortical neurons *in vivo*.**

**A.** Schematic experimental protocol showing the unilateral injection of 2 x 0.25 $\mu$ L of 1.25 x 10<sup>13</sup> vp/mL of AAV9-Plat-GFP in tPA flox <sup>-/-</sup> mice (WT, -0.3 mm AP, +/- 3.3 mm ML, - 0.8 & 0.4 mm DV). **B.** Representative images of immunohistochemical analyses showing that AAV9-Plat-GFP does not transduce oligodendrocytes (magenta), microglia (red), astrocytes (gray), and blood vessels (cyan). Scale bar=100 $\mu$ m, X20. **C.** Representative images and corresponding quantifications of immunohistochemical analyses showing that AAV9-Plat - GFP transduces around one third of neurons (yellow; NeuN and Blue; Neurotrace). Scale bar=100 $\mu$ m, objective=X40. **D.** Quantification of the proportion of neurons GABA-expressing (a marker of inhibitory neurons) or tbr1 (a marker of excitatory neurons) among the population of GFP (tPA) positive neurons, in the transduced area. Scale bar=100 $\mu$ m, X20.

### **In the cortex, tPA expressing neurons are more resistant to excitotoxicity than tPA non-expressing neurons**

With the aim of elucidating the role of neuronal tPA in excitotoxic phenomena, we injected AAV9-Plat-GFP into both the right and left somatosensory cortices of mice, and 3 weeks after, excitotoxicity was induced by a stereotaxic injection of the NMDA (2.5 nmoles) in the right somatosensory cortex. Brains were then collected at three acute time points after injury: 30 minutes, 1 hour, and 2 hours post-NMDA injection (**Figure 2A**). Following NMDA injection, the density of tPA non-expressing cortical neurons was significantly reduced in the lesion as early as 30 minutes, while that of tPA expressing neurons did not reduce before 1h (**Figures 2B, 2C**). Accordingly, the mortality of tPA non-expressing cortical neurons increased with time to reach 94% mortality at 2 hours, while that of tPA expressing was 59% at the same time (**Figures 2D**).



**Figure 2: tPA cortical neurons are more resistant to excitotoxicity than non tPA neurons**

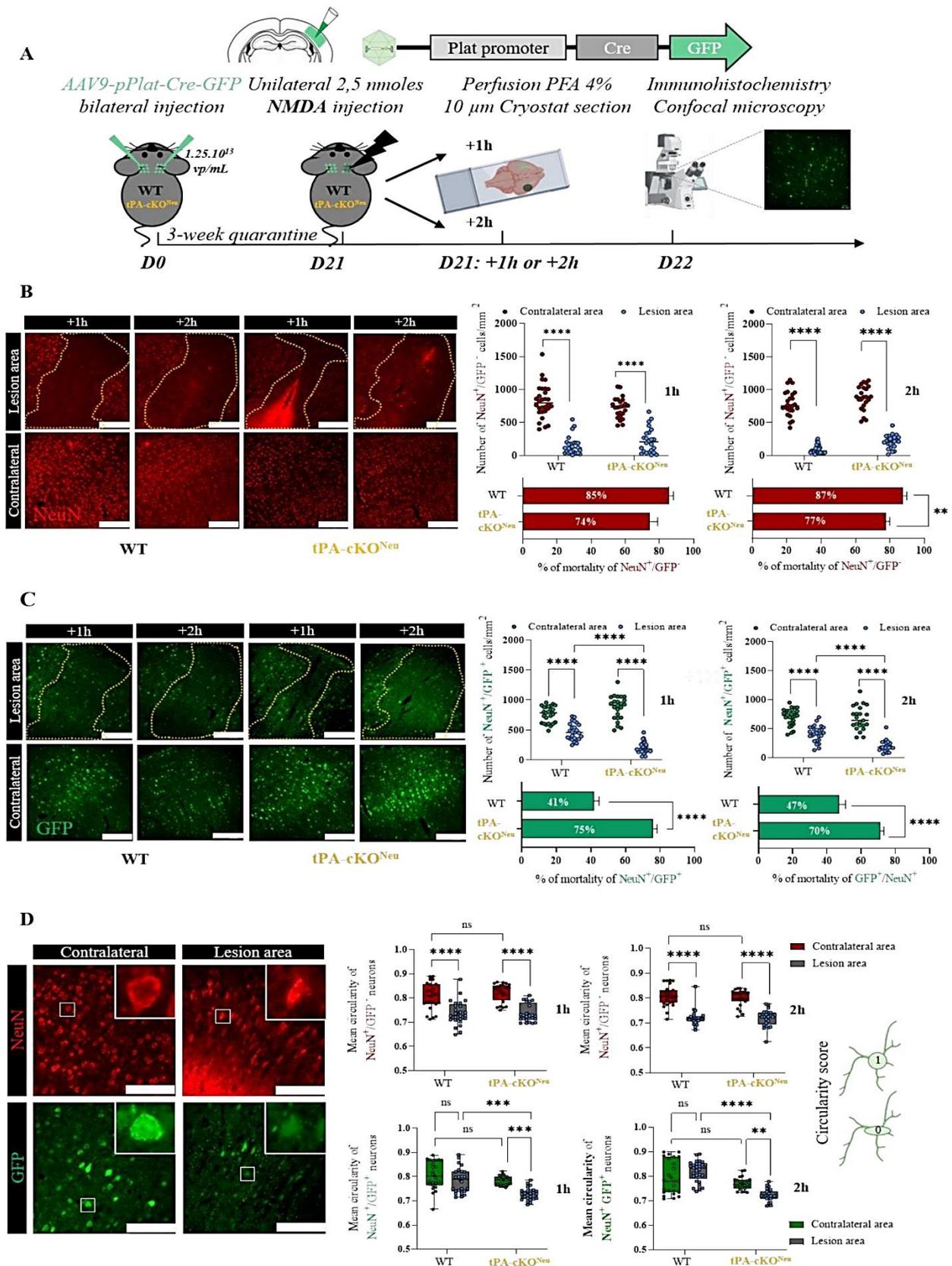
**A.** Schematic experimental protocol showing the AAV9-Plat-GFP injection in both somatosensory cortices of swiss mice, followed by the unilateral injection of NMDA into the right somatosensory cortex. Brain were collected at 30 minutes, 1 and 2 hours after the NMDA injection to immunohistochemical analyses. **B and C.** Representative images and quantification of the number of tPA non-expressing neurons (red) and tPA-expressing neurons (green) in the lesion area compared to the contralateral area, at 30 minutes, 1 and 2 hours post NMDA injection (N=4 mice for 30 minutes and 1h groups, N=5 mice for 2h group; Two-Way ANOVA, Multiple Comparison, Bonferroni post-hoc;  $p < 0.05 = *$ ,  $p < 0.001 = ***$ ,  $p < 0.0001 = ****$ ). Scale bar=100 $\mu$ m, X20. **D.** Quantification of the percentage of tPA non-expressing (red) and tPA-expressing neurons (green) mortality at 30 minutes, 1 and 2 hours post NMDA injection (N=4 mice for 30 minutes and 1h groups, N=5 mice for 2h group; Two-Way ANOVA, Multiple Comparison, Bonferroni post-hoc;  $p < 0.01 = **$ ,  $p < 0.0001 = ****$ ).

### **The Janus face of the neuronal tPA: self-protective for tPA expressing neurons but neurotoxic for tPA negative neighboring neurons at the acute phase of excitotoxicity**

We then investigated whether endogenous neuronal tPA participates in the acute phase of excitotoxic neuronal death. tPA Flox<sup>-/-</sup> or tPA Flox<sup>+/+</sup> mice were bilaterally injected with AAV9-pPlat-Cre-GFP into the somatosensory cortex, allowing either unmasking (Flox<sup>-/-</sup>: wild-type, WT) or unmasking and deleting (tPA Flox<sup>+/+</sup>: tPA conditional knockout in neurons, tPA-cKO<sup>Neu</sup>) neuronal tPA in transduced neurons. After 3 weeks, mice received a unilateral injection of NMDA (2.5 nmoles) into the right somatosensory cortex and brain tissues were collected for immunohistochemical analyses at 1 hour or 2 hours post-NMDA injection (**Figure 3A**).

The mortality of tPA non-expressing neurons (NeuN<sup>+</sup>/GFP<sup>-</sup>, red) was severely increased in the lesion area compared to the contralateral area and being more severe in WT mice at 2h (85% for WT mice and 74% for tPA-cKO<sup>Neu</sup> mice at 1-hour and 87% for WT mice and 77% for tPA-cKO<sup>Neu</sup> mice at 2 hours, **Figure 3B**). Again, we observed that tPA expressing neurons (NeuN<sup>+</sup>/GFP<sup>+</sup>) are more resistant to excitotoxicity than tPA non-expressing neurons (41% *versus* 85% mortality at 1h and 47 *versus* 87% mortality at 2h, **Figures 3B-C**). Strikingly, the mortality of tPA expressing neurons was significantly higher in tPA-cKO<sup>Neu</sup> mice compared to WT mice (75 *versus* 41% at 1h and 70 *versus* 47% at 2h, **Figures 3C**).

These data evidence a self-protective effect of tPA on tPA expressing neurons against NMDA-induced excitotoxicity, and by contrast a deleterious effect for neighboring tPA non-expressing neurons. Accordingly, the circularity of tPA non-expressing neurons (NeuN<sup>+</sup>/GFP<sup>-</sup> cells), an index of cell suffering (26), was equally reduced in both genotypes at 1 and 2-hours after NMDA injection. By contrast, circularity of tPA expressing neurons was not affected by NMDA injection in WT mice but was reduced in tPA-cKO<sup>Neu</sup> mice (**Figure 3D**).



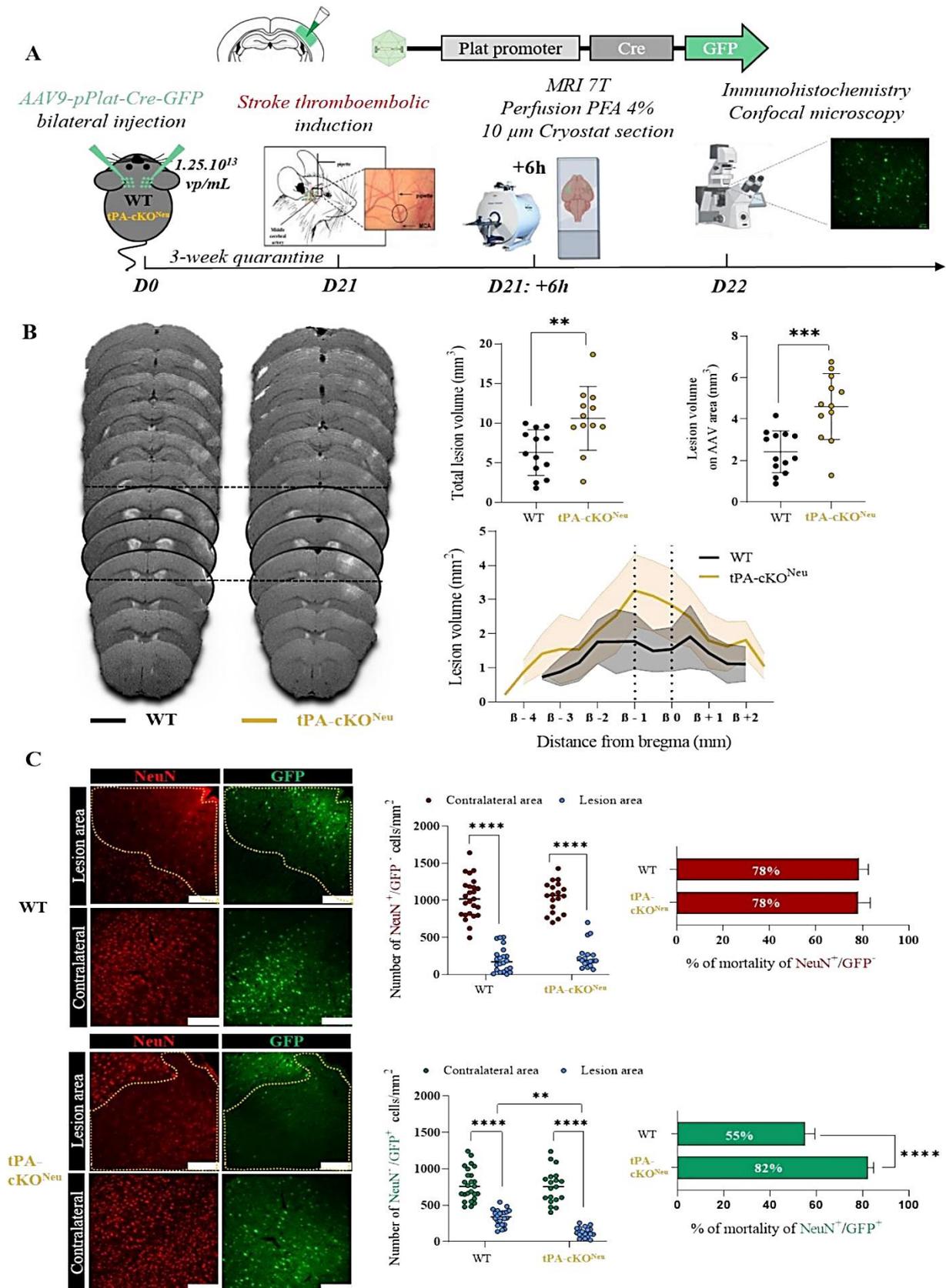
**Figure 3: tPA from cortical neurons promotes neuronal survival at the acute phase of excitotoxicity**

**A.** Schematic experimental protocol showing first, the AAV9-Plat-Cre-GFP injection in tPA<sup>-/-</sup> (WT) or flox<sup>+/+</sup> (tPA-cKO<sup>Neu</sup>) mice and second, the NMDA injection followed by IHC. **B and C.** Representative images and quantification of the number of tPA non-expressing neurons (red) and tPA-expressing neurons (green) in the lesion area compared to the contralateral area, at 1 and 2 hours post NMDA injection (N= 5 (+1h) and N=6 (+2h) mice per time for WT and N= 4 (+1h) and 4 (+2h) for tPA-cKO<sup>Neu</sup>; Two-way ANOVA, Multiple comparison, Bonferroni post hoc;  $p < 0.0001 = ****$ ). The percentage of mortality was calculated for both genotypes at 1 and 2-hours post-excitotoxicity induction (N= 5 (+1h) and N=6 (+2h) mice per time for WT and N= 4 (+1h) and 4 (+2h) for tPA-cKO<sup>Neu</sup>. Mann-Whitney test;  $p < 0.01 = **$  for NeuN<sup>+</sup>/GFP<sup>-</sup> cells and Unpaired t.test,  $p < 0.0001 = ****$  for NeuN<sup>+</sup>/GFP<sup>+</sup> cells. Scale bar=100 $\mu$ m, X20. **D.** Representative images and quantification of the tPA non-expressing (red) and tPA-expressing (green) cortical neuronal circularity in the lesion area and the contralateral area of WT or tPA-cKO<sup>Neu</sup> mice, 1 and 2-hours post-excitotoxicity induction (N= 5 (+1h) and N=6 (+2h) mice per time for WT and N= 4 (+1h) and 4 (+2h) for tPA-cKO<sup>Neu</sup>; Two-way ANOVA, Multiple comparison, Bonferroni post hoc;  $p < 0.01 = **$ ,  $p < 0.001 = ***$ ,  $p < 0.0001 = ****$ ). Scale bar=100 $\mu$ m, X40.

### Neuronal tPA acts as a self-neuroprotective mediator at the acute phase of ischemic stroke

The role of endogenous neuronal tPA at the acute phase of ischemic stroke was then investigated in WT or tPA-cKO<sup>Neu</sup> mice subjected to a model of thromboembolic occlusion of middle cerebral artery occlusion (MCAO). Subsequently, ischemic lesions were assessed 6 hours post-occlusion using T2 and T2\* MRI sequences and immunohistochemical analyses (**Figure 4A**). Interestingly, we found that both genotypes have a similar hypoperfusion in the lesion area (**Supplementary data 2**). tPA-cKO<sup>Neu</sup> mice exhibited larger lesion volumes than WT mice, when considering both the total lesion volume (6.2 mm<sup>3</sup> for WT and 10.5 mm<sup>3</sup> for tPA-cKO<sup>Neu</sup>) and the lesion volume within the anatomic slices covering the AAV-9 injection sites (2.4 mm<sup>3</sup> for WT and 4.5 mm<sup>3</sup> for tPA-cKO<sup>Neu</sup>, **Figure 4B**). The density of tPA non-expressing neurons was similarly reduced in both genotypes. Consistent with this, the mortality was equal in WT and tPA-cKO<sup>Neu</sup> mice (78 %, **Figure 4C**). Regarding tPA expressing neurons, their density and survival was more severe in tPA-cKO<sup>Neu</sup> mice compared to WT mice (82 versus 55% mortality in tPA-cKO<sup>Neu</sup> and WT mice, respectively, **Figure 4C**)

These data evidence that during thromboembolic stroke, neuronal tPA reduces infarct lesions, induces a self-protective effect on tPA expressing neurons, but has no effect on neighboring tPA non-expressing neurons.

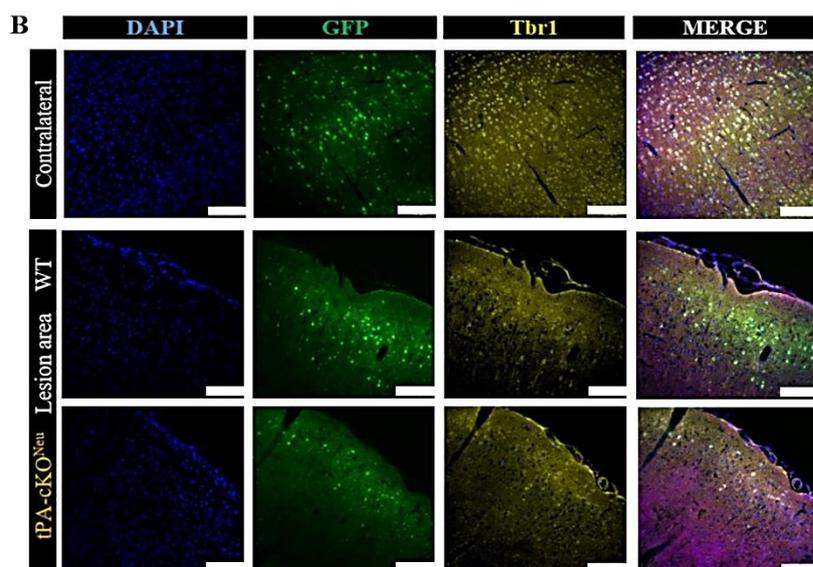
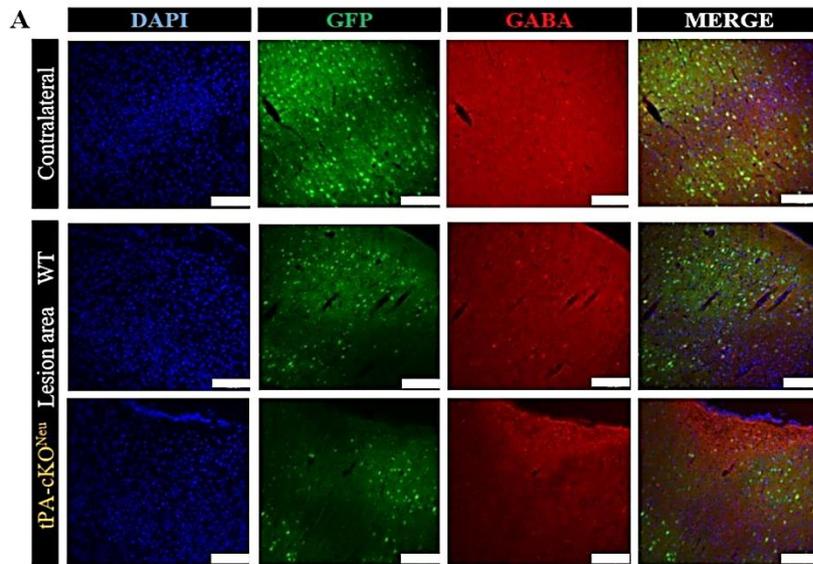


**Figure 4: Neuronal tPA acts as a neuroprotective mediator at the acute phase of ischemic stroke**

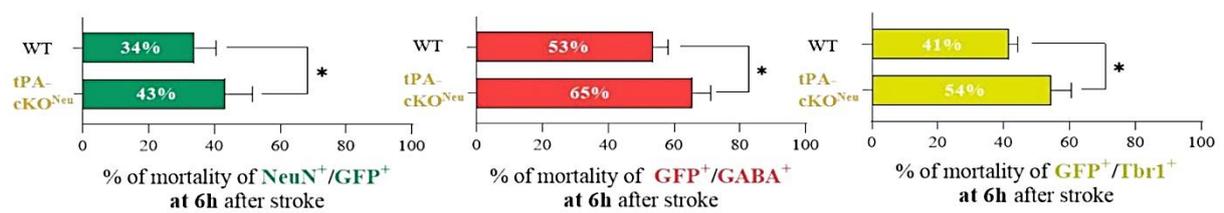
**A.** Schematic experimental protocol showing the AAV9-Plat-Cre-GFP injection, the induction of the thromboembolic model of stroke, the MRI T2 sequences and the IHC performed 6h after stroke. **B.** Illustration Representative images and quantification of the total lesion volume and the lesion volume in the AAV area injection for WT and tPA-cKO<sup>Neu</sup> mice (N= 13 for WT and N=12 for tPA-cKO<sup>Neu</sup>; Unpaired t. test;  $p < 0.01 = **$ ,  $p < 0.001 = ***$ ). **C.** Representative images and quantification of tPA non-expressing neurons (red) and tPA-expressing neurons (green) in the lesion area compared to the contralateral area, 6-hours post-ischemia (N= 5 WT and N=4 tPA-cKO<sup>Neu</sup>; Two-way ANOVA, Multiple comparison, Bonferroni post hoc;  $p < 0.01 = **$ ,  $p < 0.0001 = ****$ ). The percentage of mortality was calculated for both genotypes at 6-hours post-ischemia (N= 5 for WT and N=6 for tPA-cKO<sup>Neu</sup> mice. Mann-Whitney test for NeuN<sup>+</sup>/GFP<sup>-</sup> cells and Unpaired t.test,  $p < 0.0001 = ****$  for NeuN<sup>+</sup>/GFP<sup>+</sup> cells. Scale bar=100 $\mu$ m, X20.

### **Excitatory and inhibitory tPA expressing neurons have a similar resistance to stroke**

Finally, we investigated the acute vulnerability of the different subtypes of tPA-expressing neurons to stroke. First, we confirmed that WT mice had a lower proportion of tPA positive neuronal loss compared to tPA-cKO<sup>Neu</sup> mice, with a mortality of 15% and 53%, respectively (**Figure 5A**). The loss of tPA expressing inhibitory neurons (GFP<sup>+</sup>/GABA<sup>+</sup> cells) was lower in WT (42% mortality) than in tPA-cKO<sup>Neu</sup> (64% mortality) mice (**Figure 5A, B**). Similarly, the loss of tPA positive glutamatergic neurons, was significantly lower in WT compare to tPA-cKO<sup>Neu</sup> mice (54% versus 37% loss, **Figure 5C, E**).



**C**



**Figure 5: Excitatory and inhibitory tPA-expressing neurons have a similar sensitivity to excitotoxicity**

**A and B.** Representative images and quantification (**C**) of the percentage of tPA-expressing neurons (green), inhibitory tPA-expressing neurons (GABA<sup>+</sup>, red) and tPA-expressing neurons (red) and excitatory tPA-expressing neurons (tbr1<sup>+</sup>, yellow) mortality 6-hours post-ischemia for WT and tPA-cKO<sup>Neu</sup> mice (N=5 for WT and 4 for tPA-cKO<sup>Neu</sup> mice; unpaired t.test; p<0.05=\*). Scale bar=100μm, X20.

## Discussion

Our data indicate (illustrated on supplementary data 3) that endogenous tPA is expressed by several subtypes of cortical neurons and that this neuronal tPA acts as a protective or deleterious factor against neuronal death in an excitotoxic/ischemic context, depending on whether it acts as an autocrine factor or a paracrine one.

Whether endogenous tPA is protective or neurotoxic is still a subject of debate (14,27,28). To date, most conclusions were drawn for acute/subacute stages of diseases, and globalized all origins of tPA. Here we demonstrate for the first time that a significant proportion of excitatory and inhibitory neurons express tPA and that neuronal tPA, at physiological levels, confers neuroprotection at early stages against excitotoxicity and stroke. We have also highlighted that the ambivalence of neuronal tPA, being protective for tPA expressing neurons (autocrine effect) but neurotoxic for neurons that do not express it (paracrine effect).

Many previous studies have used tPA knockout (tPA KO) mice to investigate the roles of tPA, but it has been subsequently demonstrated that this model has some limitations (29). Indeed, tPA KO mice carry a specific chromosomal segment derived from the 129 strain, which co-segregates with the targeted *Plat* allele. Moreover, alterations in additional genes such as *Arhgef18*, *Mcf2l*, and *Mcp1* can introduce complexities when interpreting data (4,30). Also, tPA KO mice do not allow studying the contribution of different compartments (circulation versus parenchyma, (24)) or of a specific cell population in the brain parenchyma.

Some authors have used inhibitors of tPA (serpins), as an alternative to tPA KO mice. Such approaches have the advantage to locally and acutely block tPA (24). However, it is important to keep in mind that serpins block tPA catalytic activity, but unlikely the “cytokine-like” effects of tPA (5,7,31). Moreover, serpin/tPA complexes may conserve some biological activities, and/or accelerate the clearance of tPA (32). Of note, Rogove and Tsirka (1998) could highlight

the role of microglia-derived tPA in excitotoxicity, by infusing macrophage/microglial inhibiting factor (MIF) to block microglial activation (33). The same group also used genetic approaches to reintroduce tPA expression only in either neurons or microglial cells in tPA KO mice (Siao et al., 2003). They could thus provide convincing evidence that tPA exerts cell-type specific functions under excitotoxic conditions.

Adding to the previous literature, here, we used a new mouse strain, with floxed alleles flanking exon 3 of the tPA gene. This targeted genetic modification differs from tPA KO mice, as it allows creating conditional tPA KO. Furthermore, it is known that the immunodetection of tPA in neurons is very challenging using conventional methods (6). Accordingly, we have also used two adeno-viral constructs, allowing *in vivo* detecting (AAV9-pPlat-GFP) or deleting and detecting tPA (AAV9-pPlat-Cre-GFP) specifically in neurons, thanks to the specificity of the AAV9 serotype in our conditions (35,36).

In our hands, investigating early stages of pathogenic pathways, tPA expressing cortical neurons are protected from excitotoxicity and stroke compared to tPA non-expressing neurons, and this protection is due to their own production of tPA. We also observed that tPA non-expressing neurons exhibit a higher mortality in WT mice compared to tPA-cKO<sup>Neu</sup> mice, after excitotoxicity, but not after stroke. Neuronal tPA may thus have early opposite autocrine and paracrine activities during excitotoxicity, and only early autocrine activities during stroke.

Despite their above-mentioned limits, tPA KO have shed light on the multifaceted aspects and modes of action of tPA. Tsirka and collaborators first demonstrated that tPA KO mice exhibited resistance to excitotoxic neuronal death induced by kainate injection in the hippocampus (27,37,38). In cultured cortical neurons, endogenous tPA did not alter kainate or  $\alpha$ -amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionic acid (AMPA)-induced neuronal death, but aggravated NMDA-induced calcium influx and neuronal death. This was shown by using tPA KO neuronal

cultures, or addition of its natural inhibitors, plasminogen activator inhibitor type 1 (PAI-1, (14)) or neuroserpin (39). Furthermore, *in vitro*, activated microglial cells can release tPA and promote apoptotic cell death of hippocampal neurons (Flavin et al., 2000). Centonze and colleagues have also suggested that tPA may enhance ischemia-induced delayed neuronal apoptosis, based on findings that striatal slices from tPA KO mice subjected to oxygen and glucose deprivation (OGD) are unable to display NMDA-dependent post-ischemic long-term synaptic potentiation (40). However, other studies have shown neuroprotective effects of endogenous tPA. Echeverry and collaborators revealed that tPA is a neuroprotective mediator of ischemic preconditioning in the hippocampus (41), which was later suggested to be driven by a plasmin and NMDA receptors-dependent neuronal expression of TNF, and the subsequent upregulation of cyclin-dependent kinase inhibitor p21, an anti-apoptotic factor (42). This group has also shown that endogenous tPA promotes cell survival in cortical neurons exposed to OGD by recruiting the mTOR pathway and HIF-1 $\alpha$  (43). Additionally, tPA induces the expression of the glucose transporter GLUT3, facilitating glucose uptake by cortical neurons and reducing lesion volumes following intra-striatal NMDA injection (44), thanks to NMDA receptors containing the GluN2A subunit, rapid phosphorylation of extracellular signal-regulated kinases (ERK), activation of CREB, and induction of the neuroprotective transcription factor Atf3. The authors also demonstrated that OGD leads to tPA release into the synaptic cleft, activating AMPK and enhancing neuronal glucose recovery and ATP production, a process dependent on NMDA receptors. More recently, Lemarchand and collaborators demonstrated that hippocampal slices from tPA KO mice were more susceptible to OGD compared to WT slices, an effect dependent on EGF receptors (45). Recently, it has been shown that tPA exerted neuroprotective effects by increasing AMPK phosphorylation and FUNDC1 expression, a protein involved in autophagy, as demonstrated in a model of 1 hour occlusion of the middle

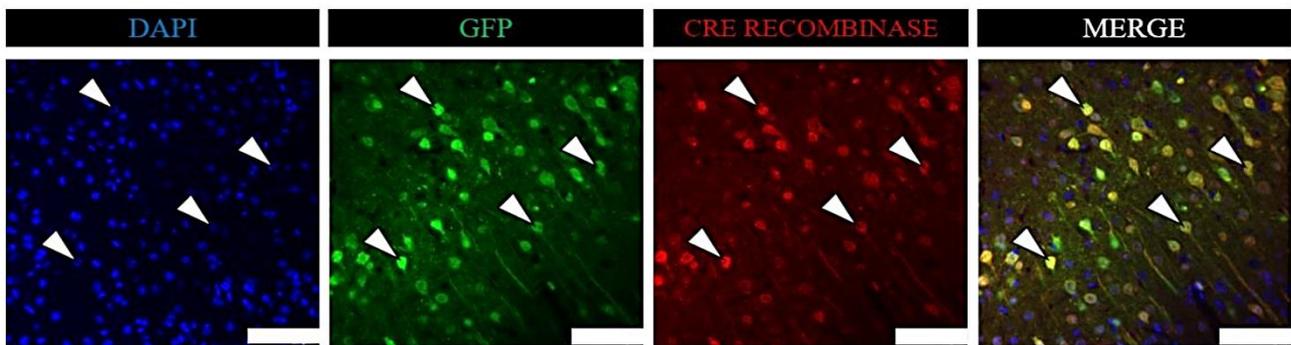
cerebral artery. In this model, tPA KO mice exhibited increased neuronal death compared to their wild-type littermates (46).

### **Conclusion**

In conclusion, our study provides compelling evidence for the impact of endogenous neuronal tPA, at physiological levels, on neuronal fate during the early phases of excitotoxicity and stroke. The use of our innovative AAV9 constructs allowed to uncover the self-neuroprotective role of tPA derived from tPA-expressing neurons, in the context of excitotoxicity or ischemic stroke. We also highlight the potential toxic paracrine-effect of tPA from tPA-expressing on tPA non-expressing neurons in a context of excitotoxicity. These findings contribute to our understanding of the intricate roles of tPA in neuronal function and highlight its potential as a therapeutic target for ischemic stroke treatment.

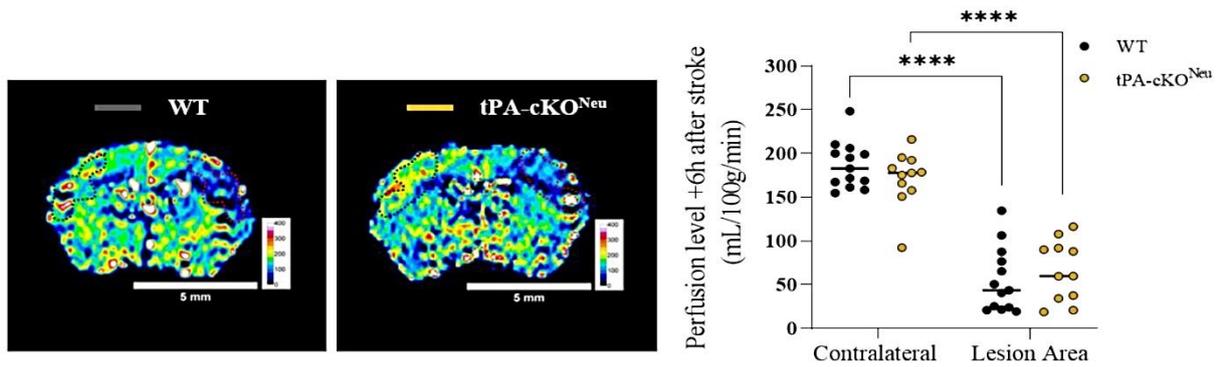
**Supplementary data 1**

Control immunohistochemistry against the Cre-recombinase and the GFP. Scale bar=100 $\mu$ m,  
X40.



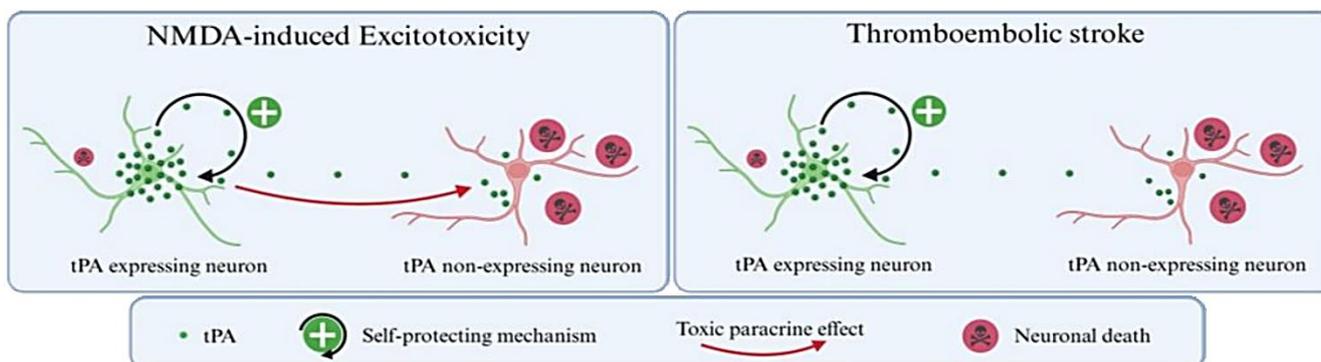
### Supplementary data 2

Representative images and quantification of ASLMRI sequencing at 6-hours after stroke, in the contralateral and the lesion area of WT and tPA-cKO<sup>Neu</sup> mice (N=13 for WT mice and N=11 for tPA-cKO<sup>Neu</sup> mice).



### Supplementary data 3

Schematic representation of the (autocrine) self-protective action of neuronal tPA together with its potential (paracrine) impact on tPA non-expressing neurons after excitotoxic or ischemic conditions.



## References

1. NINDS. Tissue Plasminogen Activator for Acute Ischemic Stroke. *New England Journal of Medicine* [Internet]. 1995 Dec 14 [cited 2023 May 15];333(24):1581–8. Available from: <http://www.nejm.org/doi/abs/10.1056/NEJM199512143332401>
2. Sappino AP, Madani R, Huarte J, Belin D, Kiss JZ, Wohlwend A, et al. Extracellular proteolysis in the adult murine brain. *Journal of Clinical Investigation* [Internet]. 1993 [cited 2023 Jun 7];92(2):679. Available from: </pmc/articles/PMC294901/?report=abstract>
3. 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* [Internet]. 2004 [cited 2023 Jun 7];92(2):358–68. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15269833/>
4. Douceau S, Lemarchand E, Hommet Y, Lebouvier L, Joséphine C, Bemelmans AP, et al. PKC $\delta$ -positive GABAergic neurons in the central amygdala exhibit tissue-type plasminogen activator: role in the control of anxiety. *Mol Psychiatry* [Internet]. 2022 Apr 10 [cited 2023 Jun 12];27(4):2197–205. Available from: <https://www.nature.com/articles/s41380-022-01455-4>
5. Correa F, Gauberti M, Parcq J, Macrez R, Hommet Y, Obiang P, et al. Tissue plasminogen activator prevents white matter damage following stroke. *J Exp Med* [Internet]. 2011 Jun 6 [cited 2023 Jun 7];208(6):1229. Available from: </pmc/articles/PMC3173251/>
6. 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* [Internet]. 2016 Sep 1 [cited 2023 Jun 7];53(7):5000–12. Available from: <https://link.springer.com/article/10.1007/s12035-015-9432-7>
7. Rogove AD, Siao CJ, Keyt B, Strickland S, Tsirka SE. Activation of microglia reveals a non-proteolytic cytokine function for tissue plasminogen activator in the central nervous system. *J Cell Sci* [Internet]. 1999 Nov 15 [cited 2023 Jun 13];112(22):4007–16. Available from: <https://dx.doi.org/10.1242/jcs.112.22.4007>
8. Krystosek A, Seeds NW. Plasminogen activator secretion by granule neurons in cultures of developing cerebellum. *Proc Natl Acad Sci U S A* [Internet]. 1981 [cited 2023 Jun 7];78(12):7810. Available from: </pmc/articles/PMC349361/?report=abstract>
9. Parmer RJ, Mahata M, Mahata S, Sebald MT, O'Connor DT, Miles LA. 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. *Journal of Biological Chemistry*. 1997 Jan 17;272(3):1976–82.

10. Lochner JE, Honigman LS, Grant WF, Gessford SK, Hansen AB, Silverman MA, et al. Activity-Dependent Release of Tissue Plasminogen Activator from the Dendritic Spines of Hippocampal Neurons Revealed by Live-Cell Imaging. *J Neurobiol* [Internet]. 2006 [cited 2023 Jun 7];66:564–77. Available from: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/neu.20250>
11. Lenoir S, Varangot A, Lebouvier L, Galli T, Hommet Y, Vivien D. Post-synaptic release of the neuronal tissue-type plasminogen activator (tPA). *Front Cell Neurosci* [Internet]. 2019 Apr 12 [cited 2023 Jun 7];13:164. Available from: [/pmc/articles/PMC6491899/](https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fncl.2019.00164)
12. Varangot A, Lebatard S, Bellemain-Sagnard M, Lebouvier L, Hommet Y, Vivien D. Modulations of the neuronal trafficking of tissue-type plasminogen activator (tPA) influences glutamate release. *Cell Death Dis* [Internet]. 2023 Jan 1 [cited 2023 Jun 7];14(1). Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/36650132/>
13. Fernández-Monreal M, López-Atalaya JP, Benchenane K, Cacquaevel M, Dulin F, Le Caer JP, et al. Arginine 260 of the amino-terminal domain of NR1 subunit is critical for tissue-type plasminogen activator-mediated enhancement of N-methyl-D-aspartate receptor signaling. *Journal of Biological Chemistry* [Internet]. 2004 Dec 3 [cited 2023 Jul 18];279(49):50850–6. Available from: [https://www.researchgate.net/publication/8267367\\_Arginine\\_260\\_of\\_the\\_Amino-terminal\\_Domain\\_of\\_NR1\\_Subunit\\_Is\\_Critical\\_for\\_Tissue-type\\_Plasminogen\\_Activator-mediated\\_Enhancement\\_of\\_N-Methyl-D-aspartate\\_Receptor\\_Signaling](https://www.researchgate.net/publication/8267367_Arginine_260_of_the_Amino-terminal_Domain_of_NR1_Subunit_Is_Critical_for_Tissue-type_Plasminogen_Activator-mediated_Enhancement_of_N-Methyl-D-aspartate_Receptor_Signaling)
14. Nicole O, Docagne F, Ali C, Margaille I, Carmeliet P, Mackenzie ET, et al. The proteolytic activity of tissue-plasminogen activator enhances NMDA receptor-mediated signaling. *Nat Med*. 2001;7(1).
15. Pittman, Randall. Release of Plasminogen Activator and a Calcium-Dependent Metalloprotease from Cultured Sympathetic and Sensory Neurons. *Dev Biol*. 1985;110:91–101.
16. Stevenson TK, Lawrence DA. Characterization of Tissue Plasminogen Activator Expression and Trafficking in the Adult Murine Brain. *eNeuro* [Internet]. 2018 Jul 1 [cited 2023 Jul 18];5(4):119–37. Available from: [/pmc/articles/PMC6080846/](https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fncl.2018.00119)
17. Lépine M, Douceau S, Devienne G, Prunotto P, Lenoir S, Regnaud C, et al. Molecular and morphological analysis of the developing nemertean brain indicates convergent evolution of complex brains in Spiralia. 2021 [cited 2023 Jun 8]; Available from: <https://doi.org/10.1186/s12915-022-01419-8>
18. Villarán RF, de Pablos RM, Argüelles S, Espinosa-Oliva AM, Tomás-Camardiel M, Herrera AJ, et al. The intranigral injection of tissue plasminogen activator induced blood-brain barrier disruption, inflammatory process and degeneration of the dopaminergic system of the rat. *Neurotoxicology* [Internet]. 2009 May [cited 2023 Aug 18];30(3):403–13. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19442825/>

19. Liot G, Roussel BD, Lebourrier N, Benchenane K, López-Atalaya JP, Vivien D, et al. Tissue-type plasminogen activator rescues neurones from serum deprivation-induced apoptosis through a mechanism independent of its proteolytic activity. *J Neurochem*. 2006 Sep;98(5):1458–64.
20. Thiebaut AM, Buendia I, Ginet V, Lemarchand E, Boudjadja MB, Hommet Y, et al. Thrombolysis by PLAT/tPA increases serum free IGF1 leading to a decrease of deleterious autophagy following brain ischemia. *Autophagy* [Internet]. 2022 [cited 2023 Jul 27];18(6):1297–317. Available from: <https://www.tandfonline.com/action/journalInformation?journalCode=kaup20>
21. Dong MX, Hu QC, Shen P, Pan JX, Wei YD, Liu YY, et al. Recombinant Tissue Plasminogen Activator Induces Neurological Side Effects Independent on Thrombolysis in Mechanical Animal Models of Focal Cerebral Infarction: A Systematic Review and Meta-Analysis. 2016;
22. Nagai N, Urano T, Endo A, Takahashi H, Takada Y, Takada A. Neuronal degeneration and a decrease in laminin-like immunoreactivity is associated with elevated tissue-type plasminogen activator in the rat hippocampus after kainic acid injection. *Neurosci Res*. 1999 Feb 1;33(2):147–54.
23. Griemert EV, Recarte Pelz K, Engelhard K, Schäfer MK, Thal SC. PAI-1 but Not PAI-2 Gene Deficiency Attenuates Ischemic Brain Injury After Experimental Stroke. *Transl Stroke Res* [Internet]. 2019 Aug 15 [cited 2023 Sep 5];10(4):372. Available from: </pmc/articles/PMC6647425/>
24. Torrente D, Su EJ, Schielke GP, Warnock M, Stevenson T, Mann K, et al. Tissue Plasminogen Activator Interaction with NMDAR1 Promotes Dopaminergic Neuron Degeneration in a Model of A-Synuclein-Mediated Neurotoxicity. *SSRN Electronic Journal* [Internet]. 2022 Mar 22 [cited 2023 Jul 19]; Available from: <https://papers.ssrn.com/abstract=4059525>
25. Siao CJ, Fernandez SR, Tsirka SE. Cell type-specific roles for tissue plasminogen activator released by neurons or microglia after excitotoxic injury. *Journal of Neuroscience*. 2003;23(8):3234–42.
26. Ankam S, Teo BKK, Pohan G, Ho SWL, Lim CK, Yim EKF. Temporal Changes in Nucleus Morphology, Lamin A/C and Histone Methylation During Nanotopography-Induced Neuronal Differentiation of Stem Cells. *Front Bioeng Biotechnol* [Internet]. 2018 May 31 [cited 2023 Jul 5];6(MAY). Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29904629/>
27. Tsirka SE, Gualandris A, Amaral DG, Strickland S. Excitotoxin-induced neuronal degeneration and seizure are mediated by tissue plasminogen activator. *Nature* 1995 377:6547 [Internet]. 1995 Sep 28 [cited 2023 Aug 30];377(6547):340–4. Available from: <https://www.nature.com/articles/377340a0>

28. Yepes M. The Plasminogen Activation System Promotes Neurorepair in the Ischemic Brain. *Curr Drug Targets* [Internet]. 2019 Jun 11 [cited 2023 May 4];20(9):953–9. Available from: <http://www.eurekaselect.com/168272/article>
29. Szabo R, Samson AL, Lawrence DA, Medcalf RL, Bugge TH. Passenger mutations and aberrant gene expression in congenic tissue plasminogen activator-deficient mouse strains. *J Thromb Haemost* [Internet]. 2016 Aug 1 [cited 2023 Jul 5];14(8):1618. Available from: </pmc/articles/PMC5322813/>
30. Hayashi T, Yoshida T, Ra M, Taguchi R, Mishina M. IL1RAPL1 associated with mental retardation and autism regulates the formation and stabilization of glutamatergic synapses of cortical neurons through RhoA signaling pathway. *PLoS One* [Internet]. 2013 Jun 13 [cited 2023 Jul 5];8(6). Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23785489/>
31. Mantuano E, Azmoon P, Brifault C, Banki MA, Gilder AS, Campana WM, et al. Tissue-type plasminogen activator regulates macrophage activation and innate immunity. *Blood* [Internet]. 2017 Sep 9 [cited 2023 Sep 5];130(11):1364. Available from: </pmc/articles/PMC5600142/>
32. Gonias SL, Banki MA, Gilder AS, Azmoon P, Campana WM, Mantuano E. PAI1 blocks NMDA receptor-mediated effects of tissue-type plasminogen activator on cell signaling and physiology. *J Cell Sci* [Internet]. 2018 Jul 7 [cited 2023 Aug 3];131(14). Available from: </pmc/articles/PMC6080607/>
33. Rogove AD, Tsirka SE. Neurotoxic responses by microglia elicited by excitotoxic injury in the mouse hippocampus. 1998 [cited 2023 Sep 5]; Available from: <http://biomednet.com/elecref/0960982200800019>
34. Siao CJ, Fernandez SR, Tsirka SE. Cell Type-Specific Roles for Tissue Plasminogen Activator Released by Neurons or Microglia after Excitotoxic Injury. 2003;
35. Haggerty DL, Grecco GG, Reeves KC, Atwood B. Adeno-Associated Viral Vectors in Neuroscience Research. *Mol Ther Methods Clin Dev* [Internet]. 2020 Jun 6 [cited 2023 Sep 5];17:69. Available from: </pmc/articles/PMC6931098/>
36. Hammond SL, Leek AN, Richman EH, Tjalkens RB. Cellular selectivity of AAV serotypes for gene delivery in neurons and astrocytes by neonatal intracerebroventricular injection. *PLoS One* [Internet]. 2017 Dec 1 [cited 2023 Sep 5];12(12). Available from: </pmc/articles/PMC5731760/>
37. Tsirka SE, Rogove AD, Strickland S. Neuronal cell death and tPA. *Nature* 1996 384:6605 [Internet]. 1996 [cited 2023 Jun 7];384(6605):123–4. Available from: <https://www.nature.com/articles/384123b0>
38. Tsirka SE, Rogove AD, Bugge TH, Degen JL, Strickland S. An Extracellular Proteolytic Cascade Promotes Neuronal Degeneration in the Mouse Hippocampus. 1997;

39. Lebeurrier N, Liot G, Lopez-Atalaya JP, Orset C, Fernandez-Monreal M, Sonderegger P, et al. The brain-specific tissue-type plasminogen activator inhibitor, neuroserpin, protects neurons against excitotoxicity both in vitro and in vivo. *Mol Cell Neurosci* [Internet]. 2005 Dec [cited 2023 Jun 23];30(4):552–8. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16209928/>
40. Centonze D, Saulle E, Pisani A, Bonsi P, Tropepi D, Bernardi G, et al. Tissue plasminogen activator is required for striatal post-ischemic synaptic potentiation. *Neuroreport* [Internet]. 2002 Jan 21 [cited 2023 Jun 23];13(1):115–8. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11924871/>
41. Echeverry R, Wu J, Haile WB, Guzman J, Yepes M. Tissue-type plasminogen activator is a neuroprotectant in the mouse hippocampus. *J Clin Invest* [Internet]. 2010 Jun 6 [cited 2023 May 3];120(6):2194. Available from: </pmc/articles/PMC2877952/>
42. Haile WB, Wu J, Echeverry R, Wu F, An J, Yepes M. Tissue-type plasminogen activator has a neuroprotective effect in the ischemic brain mediated by neuronal TNF- $\alpha$ . *Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism* [Internet]. 2012 [cited 2023 Jun 23];32:57–69. Available from: [www.jcbfm.com](http://www.jcbfm.com)
43. Wu F, Wu J, Nicholson AD, Echeverry R, Haile WB, Catano M, et al. Tissue-Type Plasminogen Activator Regulates the Neuronal Uptake of Glucose in the Ischemic Brain. *The Journal of Neuroscience* [Internet]. 2012 Jul 7 [cited 2023 Jun 23];32(29):9848. Available from: </pmc/articles/PMC3437989/>
44. Wu F, Echeverry R, Wu J, An J, Haile WB, Cooper DS, et al. Tissue-type plasminogen activator protects neurons from excitotoxin-induced cell death via activation of the ERK1/2-CREB-ATF3 signaling pathway. *Mol Cell Neurosci* [Internet]. 2013 Jan [cited 2023 Jun 23];52:9–19. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23063501/>
45. Lemarchand E, Maubert E, Haelewyn B, Ali C, Rubio M, Vivien D. Stressed neurons protect themselves by a tissue-type plasminogen activator-mediated EGFR-dependent mechanism. *Cell Death Differ* [Internet]. 2016 Jan 1 [cited 2023 May 3];23(1):123. Available from: </pmc/articles/PMC4815983/>
46. Cai Y, Yang E, Yao X, Zhang X, Wang Q, Wang Y, et al. FUNDC1-dependent mitophagy induced by tPA protects neurons against cerebral ischemia-reperfusion injury. *Redox Biol* [Internet]. 2021 Jan 1 [cited 2023 May 4];38. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33212415/>



# Discussion

## Discussion résultats 1

Dans cette étude, nous avons exploré le rôle du tPA dans la régulation des réseaux périneuronaux (PNNs) entourant les interneurons à parvalbumine (PV) dans le cortex cérébral de la souris. Les PNNs sont des structures matricielles primordiales lors du développement et pour contrôler l'équilibre entre neurotransmissions excitatrices et inhibitrices. Mais leur présence limite également la plasticité neuronale. Sur la base de données du Allen Institute démontrant la présence d'un panel de protéases matricielles autour des PNNs (i.e, dans les neurones pyramidaux et dans les FS-PV), nous avons monté un consortium avec deux équipes parisiennes (B. Cauli/B. Lambolez/J. Rossier du NPS-IBPS et A. di Nardo/A. Prochiantz du Collège de France), pour définir le rôle du tPA dans la « triade » FS-PV/PNNs/neurones pyramidaux (projet P2N2, financé par l'ANR). Ainsi, initialement, ma thèse visait à tester l'hypothèse selon laquelle le tPA originaire des interneurons à PV, pouvait participer au métabolisme des PNNs, avec une possibilité de manipuler ce système pour favoriser la plasticité synaptique post-AVC.

Nous avons premièrement découvert que le tPA est exprimé par les interneurons FS-PV, ce qui nous a conduit à évaluer son impact sur la structure des PNNs. Pour ce faire, nous avons utilisé des souris conditionnellement déficientes en tPA, uniquement dans les interneurons à PV, pour démontrer que l'absence de tPA conduit à une augmentation de la densité des PNNs dans le cortex somatosensoriel. *In vitro*, en utilisant des cultures d'interneurones, nous avons également élucidé le mécanisme d'action du tPA, démontrant que la conversion du plasminogène en plasmine par le tPA est nécessaire pour la dégradation des PNNs, notamment par le clivage de l'aggrecan. Ces résultats, publiés dans BMC Biology (Lépine *et al.*, 2022) mettent en évidence un nouveau mécanisme potentiel de régulation de la structure des PNNs par le tPA issu des interneurons à PV, ce qui ouvre de nouvelles perspectives pour mieux comprendre la plasticité cérébrale et envisager des approches thérapeutiques ciblées dans le contexte de troubles neurologiques et développementaux.

## 1.1 Quel(s) rôle(s) pour le tPA originaire des interneurones à PV dans la récupération fonctionnelle post-ischémie ?

Suite à la publication de notre article, une partie de mes travaux de thèse a été consacrée à définir si le tPA exprimé par les interneurones à PV peut jouer un rôle dans la récupération post-AVC ischémique, en particulier *via* la régulation des PNNs. De nombreux travaux de la littérature montrent que la dégradation des PNNs permet de restaurer une plasticité synaptique dans divers modèles de dominance oculaire ou de lésion de la moelle épinière (Bradbury *et al.*, 2002 ; Pizzorusso *et al.*, 2002). Peu d'études se sont intéressées aux rôle(s) du tPA dans la régulation des PNNs, dans le contexte de l'AVC ischémique. Il a tout de même été démontré, d'une part, que l'activité protéolytique du tPA était augmentée à la suite d'un AVC, et d'autre part, que de la densité de PNNs était diminuée post-AVC, notamment chez les animaux élevés en milieu enrichi (Madinier *et al.*, 2014 ; Quattromani *et al.*, 2018). Aussi, de nombreuses études ont démontré le rôle direct ou indirect (via la génération de plasmine ou l'activation des MMPs par exemple) du tPA dans la régulation des CSPGs (Lakhan *et al.*, 2013 ; Lemarchant *et al.*, 2014 ; Verslegers *et al.*, 2013 ; Zhao *et al.*, 2006). Il est alors probable que le tPA des interneurones à PV puisse aussi être impliqué dans la régulation des PNNs, favorisant ainsi la plasticité post-ischémie.

Pour répondre à cette question, nous avons mis en place le protocole illustré en **Figure 37**. Nous avons utilisé la même souche de souris que celle de l'étude 1, à savoir des souris délétées en tPA, spécifiquement dans les interneurones à PV (tPA flox<sup>+/+</sup> PV Cre<sup>+/-</sup> : **cKO**) ou leur homologues WT (tPA flox<sup>-/-</sup> PV Cre<sup>+/-</sup> : **Ctrl**). Les souris étaient âgées de 8 semaines au début du protocole. Trois jours avant l'induction de l'AVC ischémique, les souris ont été évaluées par le test d'agrippement, afin de connaître leur niveau basal de force des pattes antérieures. Toutes les souris ont également été évaluées par actimétrie, test mesurant l'activité horizontale (avant-arrière) et verticale spontanée (mouvements haut-bas). Le modèle d'AVC ischémique utilisé est le modèle thromboembolique développé au laboratoire (Orset *et al.*, 2007), réalisé par l'injection de thrombine dans l'artère cérébrale moyenne, créant ainsi un caillot riche en fibrine.

Vingt-quatre heures après l'AVC ischémique, les animaux ont été imaged par IRM T2 afin d'étudier l'étendue des lésions ischémiques, T2\* afin de vérifier la présence d'hémorragie et ASL (en anglais : *arterial spin labelling, ASL*) pour étudier la perfusion cérébrale. Aussi, à 1, 3, 7 et 15 jours post-AVC, la force des souris a été réévaluée par le test d'agrippement et d'actimétrie. Pour chaque génotype, cinq souris par temps ont été mises à mort pour des analyses immunohistochimiques.

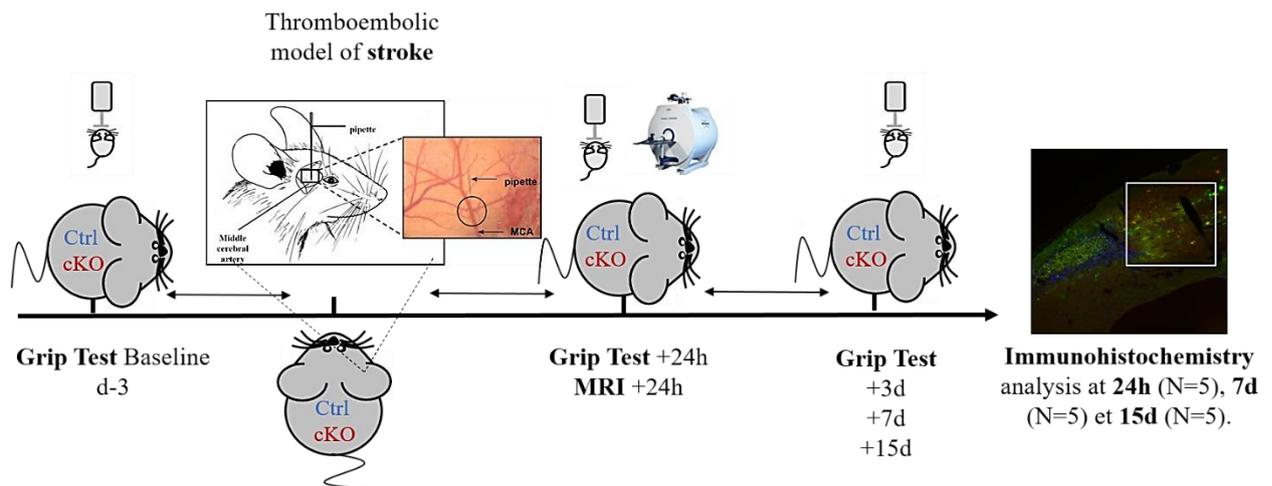
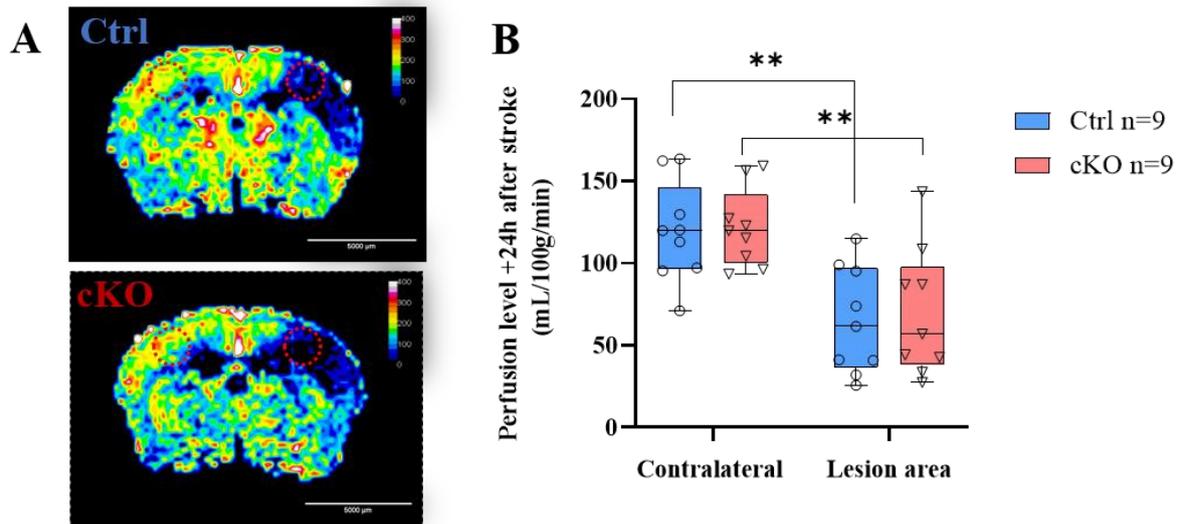


Figure 37 : Vue générale du protocole expérimental.

### 1.1.1 Le tPA des interneurons à PV influence-t-il le débit sanguin cérébral post-AVC ischémique ?

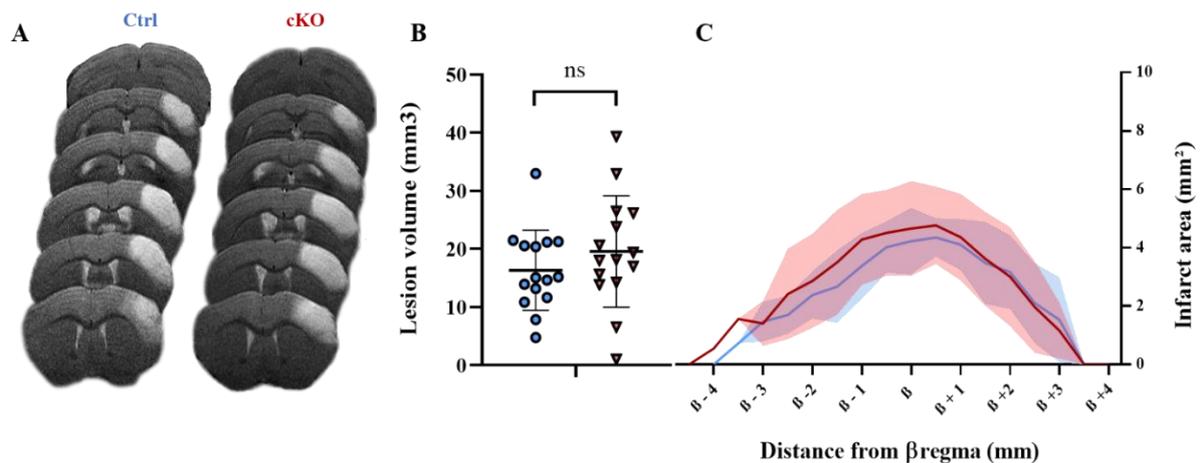
L'ASL a montré une diminution de la perfusion tissulaire au niveau du cortex somatosensoriel ischémié (cKO= 70,2 mL/100g/min et Ctrl= 64,98 mL/100g/min), en comparaison du cortex controlatéral (cKO= 121,6 mL/100g/min et Ctrl= 119,2 mL/100g/min) chez les deux groupes. Aucune différence entre les deux génotypes n'a été observée (Figure 38), ce qui indique que le tPA issu des interneurons à PV n'influence pas le débit sanguin cérébral, que ce soit dans la lésion ou dans l'hémisphère controlatéral.



*Figure 38 : La délétion du tPA au sein des interneurons à PV n'affecte pas la perfusion cérébrale 24 heures après l'induction d'un AVC thromboembolique. A : Illustration de la séquence de perfusion tissulaire par IRM (ASL), pour les deux génotypes. B : Quantification de la perfusion tissulaire dans la lésion et l'hémisphère controlatéral pour les deux génotypes (N=9 souris par groupe, Two-Way ANOVA, comparaison multiple, post-hoc Bonferonni ;  $p < 0,1 = *$ ,  $p < 0,01 = **$ ).*

### 1.1.2 Le tPA des interneurons à PV impacte-t-il le volume de lésion ischémique ?

Concernant la lésion ischémique, nous n'avons pas observé de différence significative entre les deux génotypes. En effet, les souris Ctrl présentaient des lésions corticales moyennes de 16.45 mm<sup>3</sup> contre 19,55 mm<sup>3</sup> pour les souris spécifiquement délétées en tPA dans les interneurons à PV (Figure 39A, B). Nous avons également mis en évidence que la répartition antéro-postérieure de la lésion était également similaire entre les groupes (Figure 39C).



**Figure 39 :** La délétion du tPA originaire des interneurons PV n'influence pas le volume et l'étendue de la lésion ischémique. **A :** Illustration de la lésion ischémique imagée par IRM T2. **B et C :** Quantification du volume de lésion et répartition des lésions dans l'espace selon le génotype, N=15 souris par groupe (t.test,  $p=0,2854$ , ns).

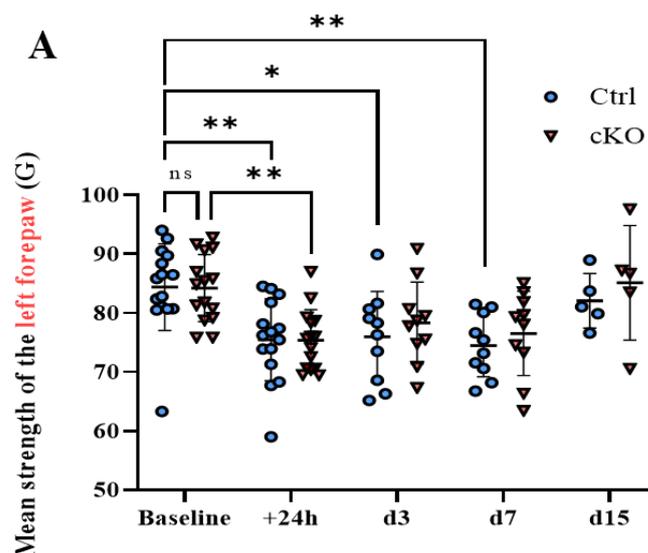
L'IRM restant une technique d'analyse macroscopique, elle ne nous permet peut-être pas d'observer d'effet du tPA des interneurons à PV dans le volume de lésion ischémique. Ainsi, il pourrait être envisagé de creuser cette piste *in vitro*, en réalisant des cultures d'interneurones issues de souris Ctrl ou cKO, puis de les soumettre à un sevrage en oxygène et glucose (en anglais : OGD, *Oxygen and Glucose Deprivation*) afin de mimer un AVC ou d'induire une toxicité au NMDA pour créer des conditions excitotoxiques. Nous pourrions alors, évaluer la mort neuronale en fonction de la présence de tPA dans les interneurons à PV et ainsi déceler des différences plus fines.

### 1.1.3 Le tPA des interneurons à PV joue-t-il un rôle dans la récupération fonctionnelle post-AVC ?

En parallèle, nous avons évalué la récupération fonctionnelle des souris en utilisant le test d'agrippement (en anglais : *Grip Test*). Nous avons pu mettre en évidence que les deux génotypes avaient une diminution significative de la force de la patte gauche (associée au

cortex ischémié) 24 heures après ischémie (Ctrl = 84,37 G avant AVC et 75.46 G à 24 heures et cKO= 84.21 G avant AVC et 75.39 G à 24 heures, **Figure 40**).

Seuls les animaux Ctrl présentait toujours une diminution significative de la force de la patte gauche, 3 jours et 7 jours après l'ischémie (**Figure 40A**). Ces résultats suggèrent alors que le tPA issu des interneurons à PV ralentit la récupération fonctionnelle. Ceci semblait aller à l'encontre de notre hypothèse initiale, puisque nous avons pensé que comme en condition basale (Lépine *et al.*, 2022), le tPA issu des interneurons à PV pourrait, en conditions ischémiques, participer à la dégradation des PNNs, et donc favoriser la plasticité synaptique et ainsi la récupération.



**Figure 40** : Évaluation de la récupération fonctionnelle post-ischémie par le test d'agrippement (Grip Test). L'effectif était de N=15 Ctrl et N=15 cKO avant AVC et à 24 heures, N=10 à 3 et 7 jours post ischémie et N=5 à 15 jours (Two-way ANOVA, comparaisons multiples, post-hoc Bonferroni ;  $p < 0,05 = *$ ,  $p < 0,01 = **$ ).

Notons qu'une seule évaluation fonctionnelle chez le rongeur post-ischémie ne permet généralement pas d'évaluer l'ensemble des éventuels déficits. Le grip test permet une évaluation motrice, objectivant un déficit du membre supérieur opposé à la lésion chez le rongeur (Drieu *et al.*, 2020 ; Lebrun *et al.*, 2022), comme nous avons aussi pu l'observer dans notre expérience.

Nous avons alors également réalisé le test d'actimétrie, qui mesure automatiquement les mouvements horizontaux et verticaux des souris. Nous n'avons pas montré de différence d'activité physique entre les deux groupes (données non montrées). Face à cette discordance entre grip test et actimétrie, il serait intéressant de compléter le phénotypage comportemental de nos animaux ischémiés, grâce à d'autres tests évaluant les capacités motrices (test du *rotarod* à accélération, le test de l'*openfield*, test de retrait d'adhésif etc...) ou cognitives (test de la piscine de Morris), ou encore un test récemment mis au point au laboratoire d'accueil, permettant d'évaluer l'héminégligence (dont les détails ne peuvent pour le moment pas être divulgués).

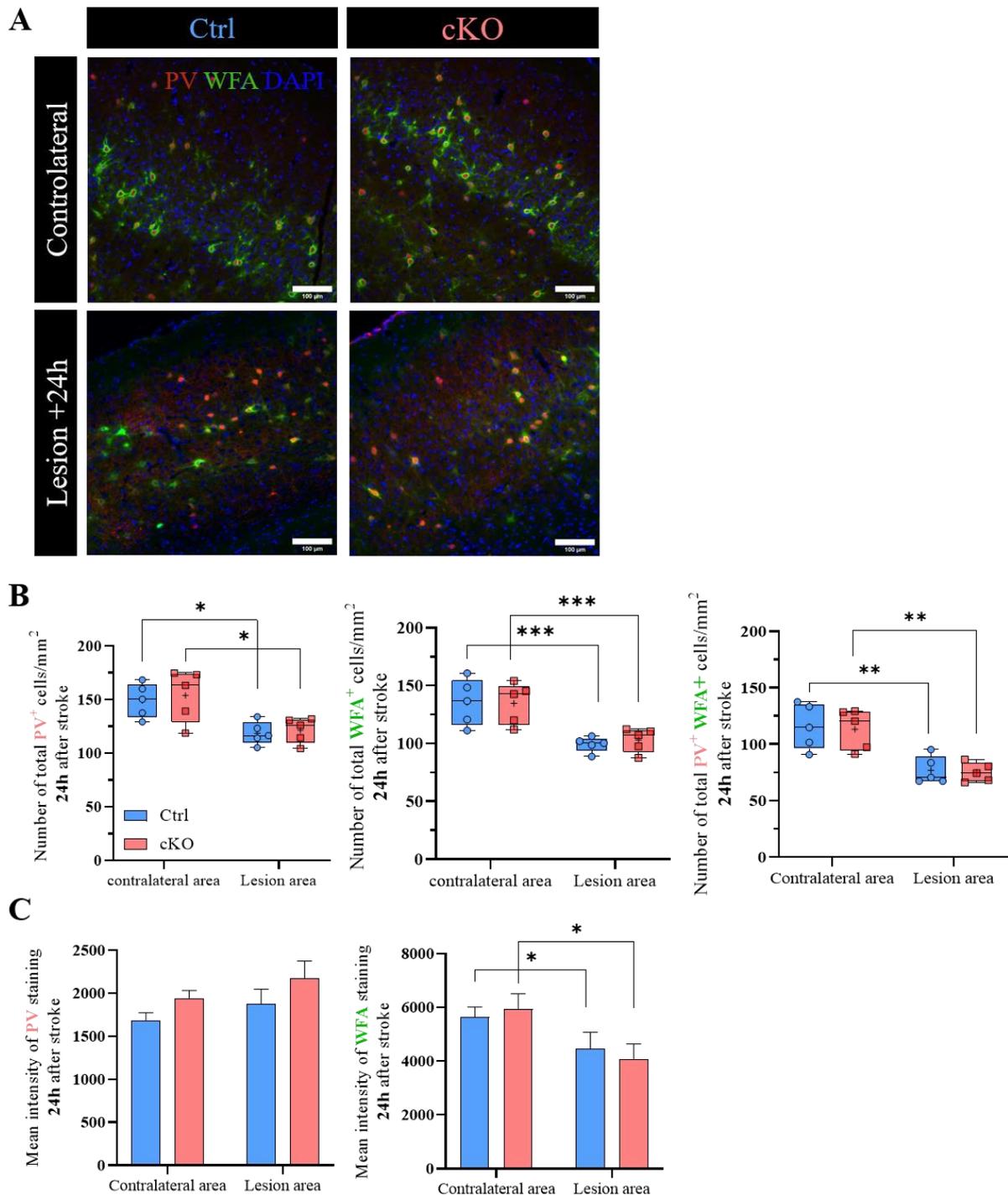
### 1.1.3 Le tPA des interneurones à PV participe-t-il à la modification de la structure des PNNs ?

Afin d'expliquer la différence dans la récupération fonctionnelle observée par le grip test entre les animaux Ctrl et les animaux dépourvus de tPA dans les interneurones à PV, nous avons étudié les interneurones à PV et les PNNs. Ainsi, 24 heures, 7 jours et 15 jours post-AVC, 5 animaux par génotype ont été utilisés pour des analyses histologiques (**Figure 41A**). Nous avons utilisé un anticorps anti-parvalbumine (1 :3000, ab11427, abcam) et la lectine *Wisteria floribunda Agglutinin* biotinylée qui marque les PNNs (WFA, 1 :1000, L1516, Sigma Aldrich).

Ainsi, 24 heures après l'induction de l'AVC, les deux génotypes présentent la même diminution du nombre d'interneurones à PV dans la lésion, comparativement à l'hémisphère controlatéral (Ctrl : 149,1 PV/mm<sup>2</sup> dans l'hémisphère controlatéral et 118,6 PV/mm<sup>2</sup> dans la lésion (-20.45 %), cKO : 153.8 PV/mm<sup>2</sup> dans l'hémisphère controlatéral et 121,2 PV/mm<sup>2</sup> dans la lésion (-21,19 %) (**Figure 41A, B, C**).

Nous observons les mêmes résultats concernant le nombre de PNNs entourant les interneurones à PV (Ctrl : 115,6 PV<sup>+</sup> PNNs<sup>+</sup>/mm<sup>2</sup> dans l'hémisphère controlatéral et 76,72 dans lésion (-33,63 %), cKO : 113,3 PV<sup>+</sup> PNNs<sup>+</sup>/mm<sup>2</sup> dans l'hémisphère controlatéral et 75,04 dans la lésion (-33,76 %) (**Figure 41A, B**), ainsi que concernant le nombre total de PNNs (Ctrl : 134,5 PNNs/mm<sup>2</sup> dans l'hémisphère controlatéral et 100,4 dans la lésion (-25,35 %), cKO : 135,9 PNNs/mm<sup>2</sup> dans l'hémisphère controlatéral et 101,9 dans la lésion (-25,01 %) (**Figure 41A, B**).

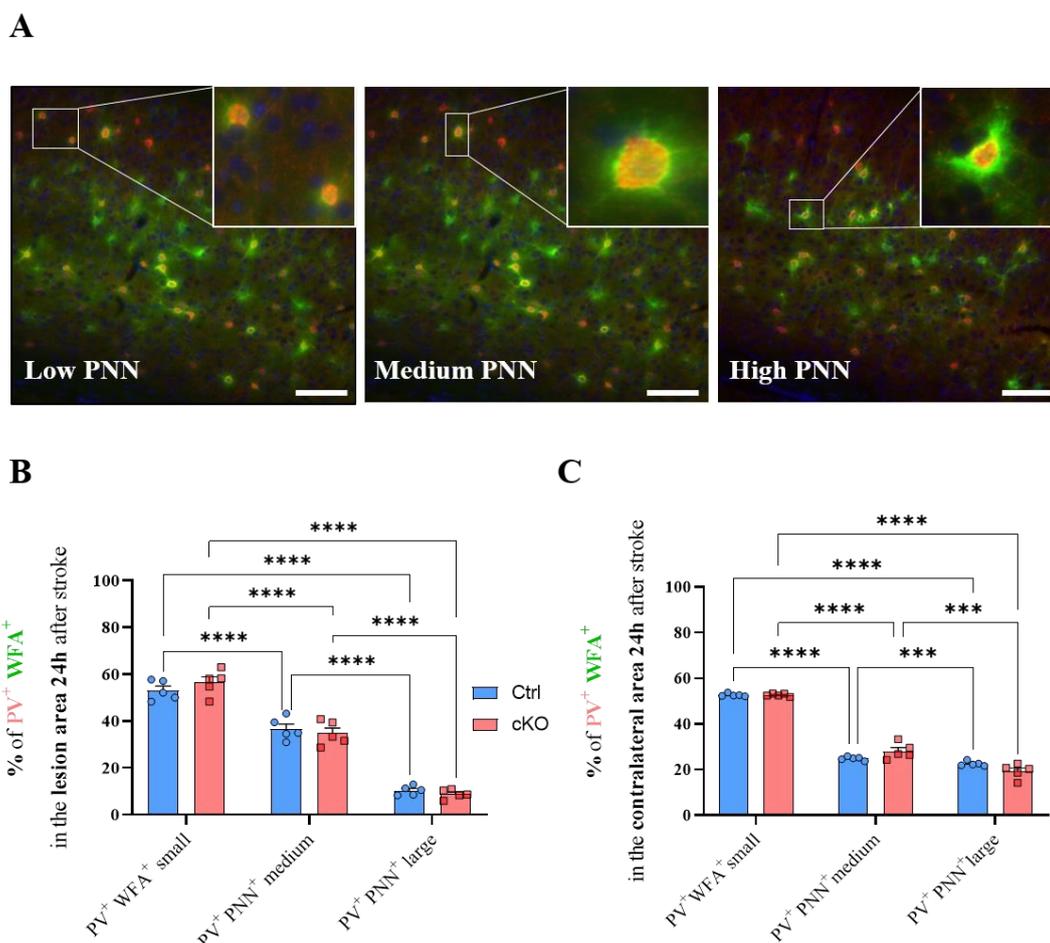
En accord avec ces données, nous n'observons aucune différence entre les deux groupes, liée à la fluorescence du marquage PV entre la lésion et l'hémisphère controlatéral. Cependant, l'intensité de fluorescence lié à la WFA est significativement diminuée pour les deux groupes dans la lésion (**Figure 41C**).



**Figure 41** : Illustrations et quantifications des interneurones à PV et des PNNs chez des souris Ctrl et cKO, 24 heures après l'induction de l'AVC. **A**. Illustration des marquages PV et WFA, en fonction du génotype et de l'hémisphère. Objectif 20X, barre d'échelle = 100 $\mu$ m. **B**. Quantification de nombre total d'interneurones à PV, du nombre de PNNs seul ou entourant un interneurone à PV (N=5 souris par groupe, (Two-way ANOVA, comparaisons multiples, post-hoc Bonferroni ;  $p < 0.05 = *$ ,  $p < 0.01 = **$ ,  $p < 0.001 = ***$ )). **C**. Quantification de l'intensité du marquage PV et WFA (Two-way ANOVA, comparaisons multiples, post-hoc Bonferroni ;  $p < 0.05 = *$ ).

Nous avons également classé les PNNs entourant les interneurons à PV, en fonction de la densité du marquage WFA, selon trois classes : « *low PNN* » avec une faible densité de marquage WFA, « *medium PNN* », présentant une densité moyenne de marquage WFA et « *high PNN* » présentant une forte densité de marquage des PNNs (Figure 42A).

Vingt-quatre heures post-ischémie, les deux souches de souris ne se distinguent pas, et présentent majoritairement du « *small PNN* » que ce soit dans la lésion ou dans l'hémisphère controlatéral (Figure 42B, C). Seul les « *high PNN* » sont significativement diminués dans lésion par rapport au cortex controlatéral à 24 heures pour les deux groupes.



**Figure 42 :** Illustrations et quantifications de la proportion de PNNs selon leur densité, dans l'hémisphère lésé et l'hémisphère controlatéral 24 heures post-AVC. **A :** Illustration des catégories de PNNs dits « *small* », « *medium* » et « *large* ». **B et C :** Quantifications de la distribution des PNNs selon leurs classes et l'hémisphère étudié (N=5 souris par groupe, Two-way ANOVA, comparaisons multiples, post-hoc Bonferroni,  $p < 0.001 = ***$ ,  $p < 0.0001 = ****$ ). Objectif 20X, barre d'échelle = 100 $\mu$ m.

Les mêmes résultats ont été obtenus 7 et 15 jours post-ischémie, toujours sans différence entre les deux souches (données non montrées). L'AVC entraîne une dégradation des PNN « *small* » et « *medium* » (et non des « *High* » PNNs comme c'est le cas à 24 heures) entourant ou non les interneurones à PV, ainsi que des interneurones à PV, mais ces effets ne dépendent pas du tPA venant des interneurones à PV.

En 2018, Dzyubenko et ses collaborateurs avaient aussi rapporté une perte des PNNs (marqueurs WFA et Aggrecan) accompagnée d'une perte neuronale, 10 jours post-ischémie (Dzyubenko *et al.*, 2018). Cette étude s'est également intéressée à l'analyse de l'ultrastructure des PNNs en combinant des approches quantitatives en 3D et des modèles mathématiques et a démontré que les réseaux WFA étaient plus diffus et dispersés seulement chez des animaux ischémiés. Ce type d'analyse morphologique en 3D est un élément intéressant à envisager pour la suite de nos travaux car il permettrait de déceler des différences inter-génotypiques fines, que nos analyses 2D ne nous ont pas permis d'observer. Dans la littérature, d'autres articles ont décrit des méthodes standardisées et automatiques d'analyses des PNNs (Kaushik *et al.*, 2021 ; Slaker *et al.*, 2016) sur lesquelles nous aurions pu nous baser pour nos quantifications.

De plus, une autre étude avait mis en évidence que l'AVC ischémique par photothrombose, entraînait une diminution des PNNs (marqueurs Cat-315, ciblant l'aggrecan) dans l'hémisphère ipsilatéral, 7 jours post-AVC (Quattromani *et al.*, 2018). Cet effet était plus important lorsque les animaux étaient placés dans un environnement enrichi, entraînant une dégradation plus importante des PNNs ainsi qu'une meilleure récupération fonctionnelle. Selon les auteurs, les animaux ayant subi une ischémie, puis placés en environnement enrichi, auraient une activité des MMP9 et du tPA augmentée, ce qui participerait à la dégradation des PNNs permettant ainsi une meilleure récupération fonctionnelle. En revanche, les auteurs n'avaient pas mis en évidence une diminution du nombre d'interneurones à PV suivant l'AVC, contrairement à nous. Nous pourrions, nous aussi, dans notre modèle d'AVC qui se rapproche le plus de la clinique, tester l'effet de l'environnement enrichi, permis grâce à des cages de Marlau, pour nos souris Ctrl et cKO.

De plus, dans la littérature, il a été démontré que la consommation d'un régime riche en graisses altérait les PNNs dans le cortex préfrontal de rats mâles, comme en témoigne une diminution du nombre et de l'intensité du marquage WFA (Dingess *et al.*, 2018). Cependant, de manière intéressante, les auteurs montrent des effets opposés chez les rats femelles (Dingess *et al.*, 2020). D'autres études ont mis en évidence des différences anatomiques des PNNs, dépendantes du sexe (Cornez *et al.*, 2015). Alors, il serait intéressant de recommencer notre étude en ajoutant des femelles. De même, nous pourrions nous intéresser à d'autres facteurs de risque que le régime hyperlipidique, comme l'âge, l'hyperglycémie (par exemple, avec des injections intra-péritonéales de streptozotocine, Furman, 2021) ou bien la surcharge pondérale (modèles de souris obèses : a/a, Lep<sup>ob</sup>/Lep<sup>ob</sup>).

Afin de confirmer l'ensemble de nos résultats, nous pourrions évaluer les capacités motrices et cognitives chez des animaux Ctrl et cKO, puis nous pourrions injecter *in vivo* l'enzyme bactérienne ChABC, destructrice des PNNs et ré-évaluer le comportement des animaux en fonction du génotype (Ctrl ou cKO). Cela nous permettrait, d'une part de connaître le rôle des PNNs dans la récupération fonctionnelle et, d'autre part, de confirmer/infirmer que le tPA issu des interneurons à PV ralentit la récupération fonctionnelle indépendamment des PNNs.

En résumé, l'ensemble de nos données semble indiquer que le tPA originaire des interneurons à PV n'influence pas les lésions ischémiques, mais ralentit la récupération fonctionnelle après un AVC, par un mécanisme probablement indépendant des PNNs. C'est pourquoi nous avons, par la suite, exploré d'autres pistes. Cependant, il est important de considérer aussi la part du tPA provenant des autres neurones, à savoir pyramidaux excitateurs. Il serait alors intéressant de réitérer cette expérience sur des souris issues de croisements entre des souris tPA flox<sup>+/+</sup> et des souris emx1-Cre pour déléter le tPA dans les neurones excitateurs (Gorski *et al.*, 2002 ; Guo *et al.*, 2000).

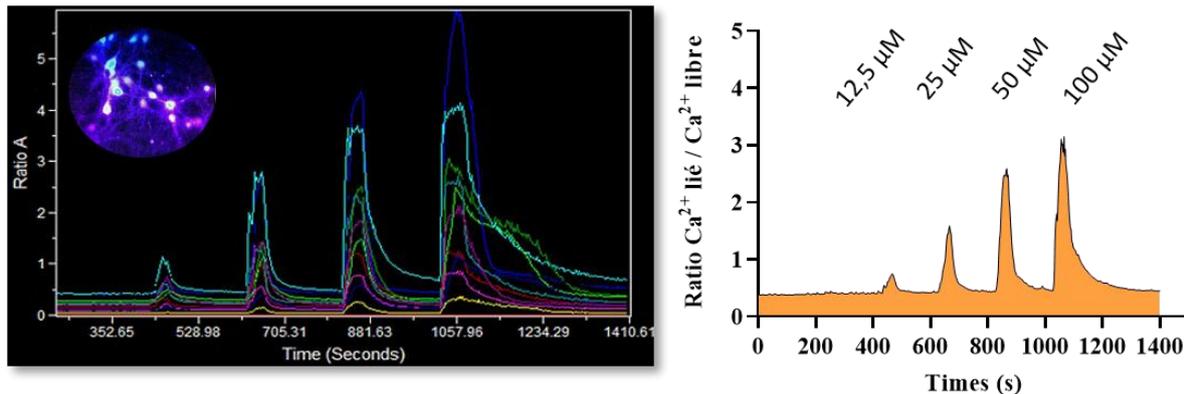
### 1.1.4 L'axe tPA-NMDA des interneurons à PV serait-il impliqué ?

Nous avons émis l'hypothèse que le tPA pourrait interagir avec les récepteurs NMDA des interneurons PV (peut-être plus accessibles grâce à la dégradation des PNNs par l'ischémie). Plusieurs études ont mis en évidence la présence des récepteurs NMDA sur les interneurons (Booker & Wyllie, 2021). Par exemple, il a été retrouvé des ARN messagers ainsi que des protéines des sous-unités GluN1, GluN2A, GluN2B sur les interneurons à PV dans l'hippocampe (von Engelhardt *et al.*, 2015) ou le cortex (Huntley *et al.*, 2020). Par ailleurs, quelques études avaient auparavant démontré *in vitro* et *in vivo* que l'utilisation d'antagonistes des récepteurs NMDA, comme la kétamine, réduisait la transmission synaptique des interneurons (Kinney *et al.*, 2006 ; Zhang *et al.*, 2008) et que ces récepteurs régulaient également l'expression de la parvalbumine, les propriétés de décharge des interneurons à PV et ainsi la plasticité synaptique à court terme (Caillard *et al.*, 2000).

C'est pourquoi, nous avons étudié l'effet du tPA endogène aux interneurons à PV, sur la signalisation calcique, dépendante des récepteurs NMDA. Pour ce faire, nous avons, dans un premier temps, réalisé des expériences de vidéo-microscopie calcique sur des cultures d'interneurons (Franchi *et al.*, 2018) issues de l'éminence ganglionnaire médiane (EGM) de souris sauvages.

### 1.1.5 Le flux calcique induit par stimulation au NMDA augmente de manière dépendant de la dose sur des cultures d'interneurones.

Grâce à la vidéo-microscopie utilisant le Fura-2AM comme sonde, nous avons premièrement observé que les interneurones répondaient aux stimulations induites par le NMDA de manière dose-dépendante (Figure 43).



*Figure 43 : Représentation graphique de l'augmentation de calcium intracellulaire induite par ajout de NMDA à dose croissante dans les cultures d'interneurones à DIV12.*

### 1.1.6 Le tPA potentialise l'influx calcique et la mort des interneurones induits par le NMDA

Par la suite, nous avons voulu savoir si les cultures d'interneurones étaient sensibles à la potentialisation de l'influx calcique dépendante des récepteurs NMDA, induite par le tPA. En effet, il a été démontré à plusieurs reprises que les neurones corticaux présentaient cette potentialisation de l'influx calcique par le tPA (Bertrand *et al.*, 2015 ; Lesept *et al.*, 2016 ; Nicole *et al.*, 2001 ; Parcq *et al.*, 2012).

Nous avons donc comparé l'influx de calcium induit par le NMDA avant et après traitement au tPA sur des cultures de neurones corticaux (excitateurs) et les neurones de l'EGM (inhibiteurs) (protocole illustré en Figure 44).

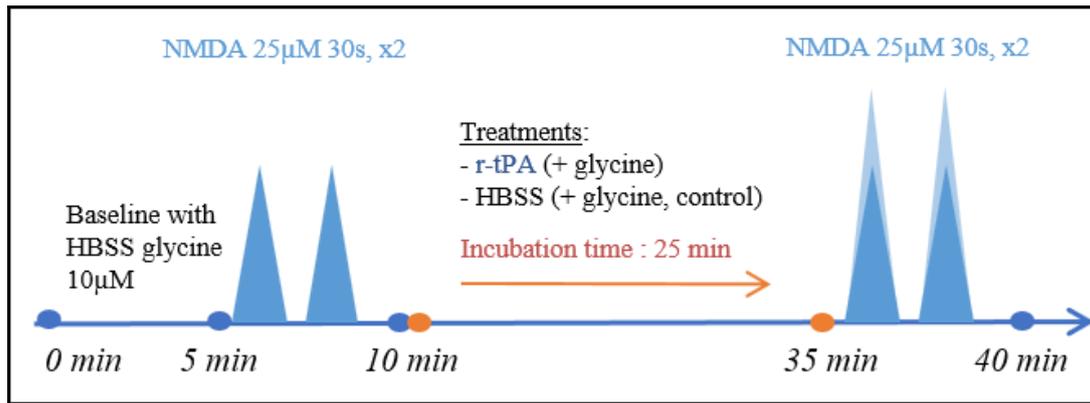


Figure 44 : Illustration du protocole d'imagerie par vidéo-microscopie calcique.

Premièrement, nous avons pu observer que le tPA potentialise l'influx calcique sur des cultures de neurones corticaux, en moyenne de 30% comparativement à la condition contrôle (Figure 45A, B, C). A la même concentration (300 nM), le tPA peut aussi potentialiser l'influx calcique dépendant des récepteurs NMDA, sur des cultures d'interneurones (Figure 45 A, B, D). Pour connaître l'implication du tPA exprimé par les interneurones à PV dans ce mécanisme, il serait intéressant d'aller plus loin et de réaliser ces mêmes expériences sur des cultures issues de souris cKO.

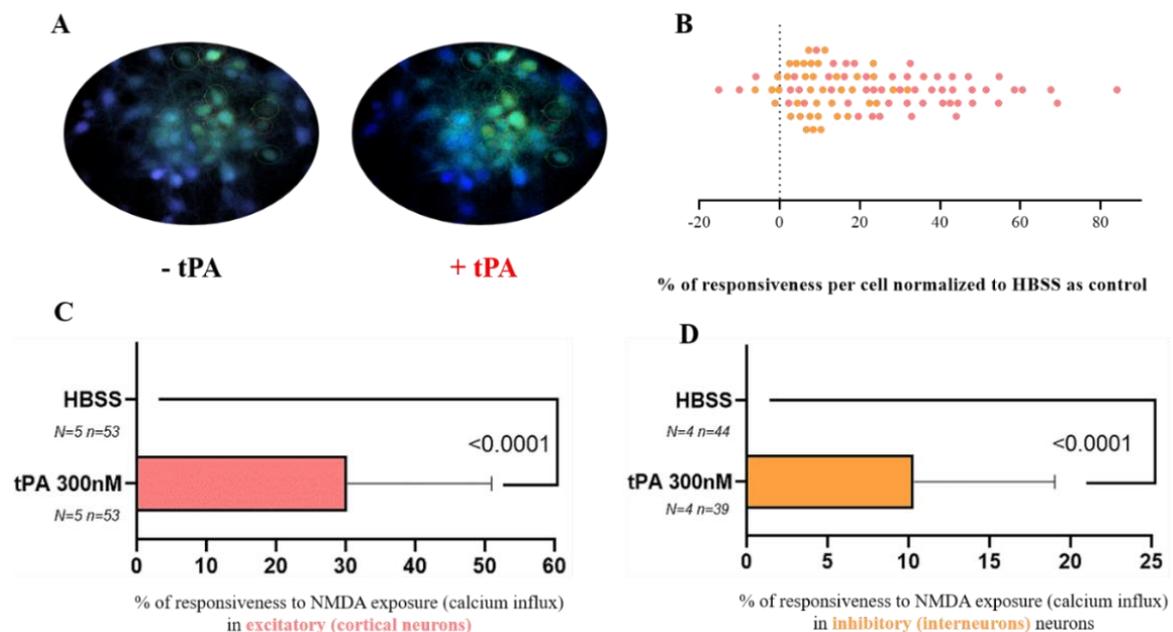
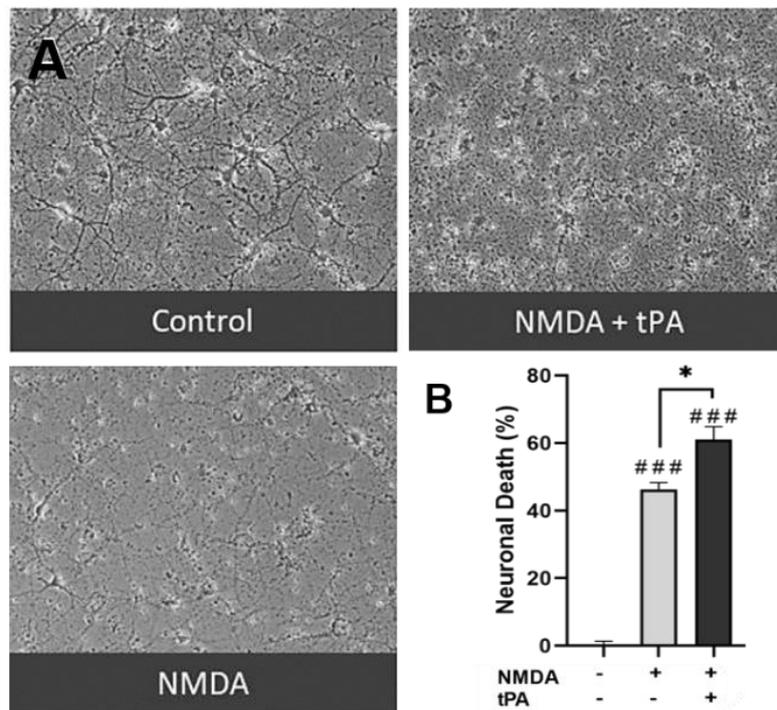


Figure 45 : Le tPA potentialise l'influx calcique des neurones corticaux (+30% en moyenne, B et C) ainsi que des interneurones (+10% en moyenne, A, B et D).

Par ailleurs, comme il avait déjà été observé par Matthieu Lépine dans l'équipe (données non publiées), nous avons aussi démontré que le tPA aggrave la mort excitotoxique des interneurones, induite par le NMDA (Figure 46).



**Figure 46** : le tPA potentialise la mort des interneurones induite par NMDA in vitro. **A.** Illustration des différentes conditions de traitement. **B.** Quantification de la mort neuronale par dosage de la LDH (Lactate Déshydrogénase) extracellulaire (t.test  $p < 0.05 = *$ ).

Ainsi, comme largement documenté pour les neurones corticaux, nous montrons que le tPA augmente l'influx de calcium à travers les récepteurs NMDA, ainsi que la mort excitotoxique, sur des interneurones en culture. Il serait alors intéressant de comprendre les mécanismes sous-jacents, et notamment de savoir si, comme les récepteurs NMDA des neurones corticaux excitateurs, le tPA interagit (*via* son domaine *Kringle 2*) puis clive la sous-unité GluN1 des récepteurs NMDA des interneurones (Fernández-Monreal *et al.*, 2004). Ainsi, nous pourrions prévoir d'utiliser du tPA muté pour son domaine *Kringle 2* (Lopez-Atalaya *et al.*, 2008) et vérifier que cette mutation empêche cette potentialisation de l'influx calcique par le tPA sur des cultures d'interneurones à PV.

Nous pourrions aussi réaliser ces mêmes expériences sur des cultures d'interneurones issus de souris KI<sup>178A</sup>, récemment générées pour le laboratoire (par l'Institut de la clinique de la souris, Illkirch-Graffenstaden), dont la lysine en position 178 a été remplacée par une alanine, sur la sous unité GluN1 des récepteurs NMDA. Cette mutation empêche l'interaction du tPA avec les récepteurs NMDA (Lesept *et al.*, 2016). Enfin, nous pourrions aussi empêcher l'interaction du tPA avec les récepteurs NMDA par l'utilisation de Glunomab, l'anticorps en développement entre l'équipe et la société *LysTherapeutics*.

Nous sommes les premiers à démontrer l'existence d'une signalisation tPA/récepteur NMDA sur les interneurones à PV en vidéo microscopie calcique. Cette signalisation pourrait-elle contrôler la vitesse de récupération fonctionnelle post-AVC ?

- Chez les animaux WT, la dégradation des PNNs par l'ischémie, pourrait conduire à l'augmentation de la possibilité d'interagir avec les récepteurs NMDA et ainsi l'augmentation de l'activité de ces récepteurs par le tPA. Comme nous venons de le voir, ceci engendrerait l'augmentation du calcium intracellulaire et favoriserait la mort neuronale. Par ailleurs, nous savons par la littérature que la densité de PNNs module l'efficacité synaptique des interneurones à PV mais aussi des cellules pyramidales (Wang & Fawcett, 2012). Il est alors possible que la défaillance des interneurones à PV ait des répercussions sur leurs fonctions de contrôle de l'activité des neurones pyramidaux excitateurs, en défaveur de la récupération fonctionnelle.

- A l'inverse, chez les souris cKO, l'absence de tPA des interneurones à PV n'induirait pas la potentialisation de l'influx calcique par le tPA ainsi que la mort neuronale dépendant des récepteurs NMDA. Dans cette configuration, ces interneurones à PV continueraient d'exercer la régulation de l'activité des neurones pyramidaux excitateurs, *via* leurs contacts somatiques ou axonaux (Lewis *et al.*, 2012), et ceci engendrerait ce phénotype de récupération fonctionnelle plus rapide. Dans cette hypothèse, le maintien d'une hypoexcitabilité des neurones excitateurs par les interneurones à PV serait alors bénéfique. Cela dit il ne faut une nouvelle fois pas oublier la part du tPA originaire des autres neurones, qui pourrait influencer ces hypothèses.

Il pourrait donc être intéressant de réaliser les expériences d'électrophysiologie entre les souris Ctrl et cKO, afin de savoir si la dégradation des PNNs ainsi que l'influence du tPA sur les récepteurs NMDA a des conséquences sur les fréquences de décharge des interneurons à PV. De plus, cela nous permettrait de savoir si les interneurons à PV maintiennent leur action dans le contrôle de la neurotransmission excitatrice, *via* leurs connexions sur les neurones pyramidaux notamment.

Pour terminer, nous pouvons également penser qu'au-delà de l'AVC ischémique, d'autres pathologies seraient susceptibles d'être influencées par le tPA exprimé par les interneurons à PV dans la régulation des PNNs et la plasticité synaptique. Par exemple, dans le modèle de pathologie Tau, il a été démontré que la dégradation des PNNs par la ChABC induisait un retour des capacités de mémorisation (Yang *et al.*, 2015). Il serait alors intéressant d'y étudier l'implication du tPA exprimé par les interneurons à PV dans la régulation des PNNs ou la signalisation NMDA.

## Conclusion générale sur les résultats 1

Dans l'**article 1**, nous avons identifié le tPA au sein des interneurons FS-PV, ce qui a motivé nos recherches concernant son rôle dans la régulation des PNNs. Nous avons mis en évidence que l'absence de tPA entraînait une augmentation de la densité des PNNs dans le cortex somatosensoriel. Parallèlement, nos investigations *in vitro* ont démontré que la conversion du plasminogène en plasmine par le tPA s'avérait cruciale pour la dégradation des PNNs, notamment *via* le clivage de l'aggrecan.

Par la suite, nous avons montré que les souris déficientes en tPA uniquement dans les interneurons à PV (cKO) ont une récupération fonctionnelle plus rapide que leurs contrôles après un AVC thromboembolique, mais le mécanisme en jeu ne semble pas impliquer les PNNs. Nous avons montré que le tPA augmente l'activation du récepteur NMDA sur les interneurons à PV, et il reste à déterminer si cet effet pourrait expliquer la cinétique différentielle de récupération fonctionnelle.



## Discussion résultats 2

### 2.2 Quel(s) rôle(s) pour le tPA endogène aux neurones, à la phase aigüe des phénomènes excitotoxiques/ischémiques ?

Dans cette seconde étude, nous avons cherché à comprendre le rôle du tPA endogène aux neurones, à la phase aigüe de l'excitotoxicité et de l'AVC. Pour ce faire, nous avons utilisé des modèles innovants de biologie moléculaire, *in vivo* chez la souris.

#### 2.2.1 Démasquer le tPA neuronal *in vivo*, un défi technique

Comme nous pouvons le voir dans littérature, l'immunodétection de la protéine du tPA avec les anticorps disponibles et les protocoles classiques de fixation/révélation reste incomplète au niveau neuronal. Par exemple, alors qu'on détecte aisément le tPA dans les fibres moussues de l'hippocampe, le blocage du transport-axodendritique par la colchicine est nécessaire pour faciliter son immunodétection dans les neurones corticaux excitateurs (Louessard *et al.*, 2016). Ici, nous avons utilisé des constructions permettant de démasquer (AAV9-pPlat-GFP) ou de déléter (AAV9-pPlat-Cre-GFP) le tPA *in vivo*, dans les cellules capables de l'exprimer. Ces outils ont récemment été caractérisés et validés *via* l'injection d'AAV9-pPlat-GFP dans le gyrus denté de l'hippocampe, révélant une expression rapportrice de la GFP par les cellules granulaires et les fibres moussues, absente chez les souris tPA<sup>NULL</sup>. De plus, une colocalisation entre la GFP et le marquage anti-tPA dans les fibres moussues a été retrouvée (Douceau *et al.*, 2022).

Alors que le tropisme des AAV9 pour les neurones est reconnu (Klein *et al.*, 2008 ; Alves *et al.*, 2016), certaines données démontrent aussi un tropisme pour les astrocytes (Alves *et al.*, 2016). Mais nous n'avons pas observé d'expression de la GFP par les astrocytes après infection. Alves et collaborateurs avaient utilisé des constructions sous le contrôle d'un promoteur ubiquitaire (CAG, en anglais : *Chicken  $\beta$ -actin/cytomegalovirus*) alors que nous avons utilisé le promoteur de Plat.

Or, l'expression du tPA dans les astrocytes est controversée (Toshniwal *et al.*, 1987 ; Docagne *et al.*, 1999 ; Louessard *et al.*, 2016 ; Stevenson & Lawrence, 2018).

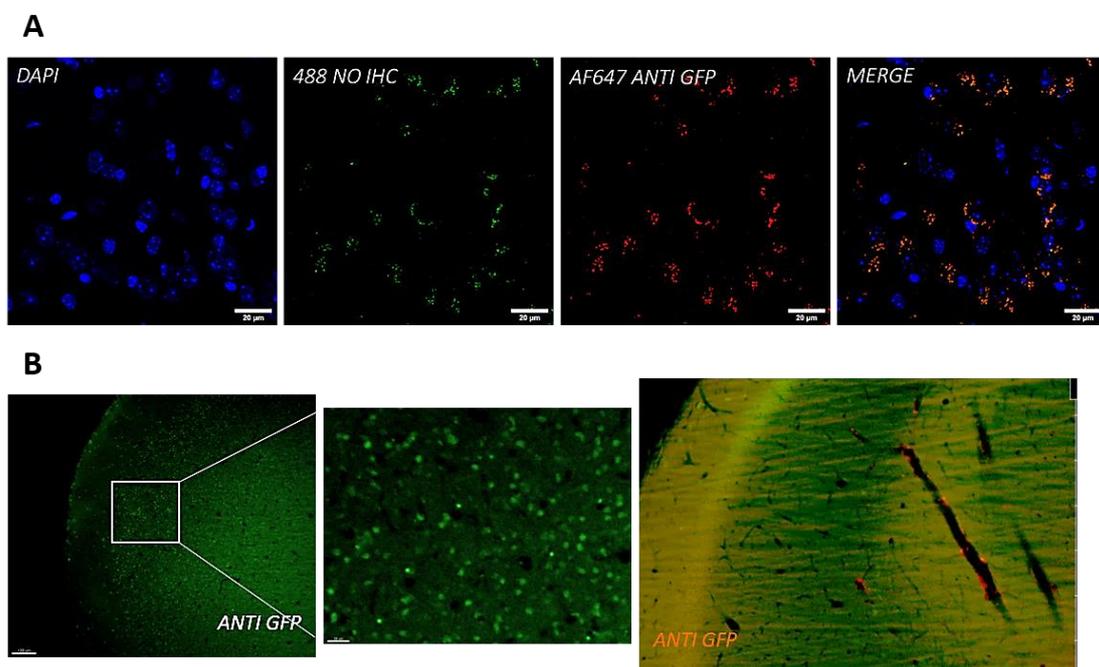
En conditions physiologiques, certains auteurs montrent l'absence de synthèse de tPA par les astrocytes (Buisson *et al.*, 1998), mais d'autres suggèrent que les pieds périvasculaires (Polavarapu *et al.*, 2007) et les extensions synaptiques des astrocytes (Jeanneret *et al.*, 2016) expriment du tPA. En conditions pathologiques, des études ont rapporté l'expression de tPA dans les astrocytes activés (Hultman *et al.*, 2008). Mais dans nos expériences (Lépine *et al.*, 2022, Prunotto *et al.*, en préparation), ni l'insertion de la pipette, ni le LPS, ni le NMDA, ni l'AVC expérimental n'ont permis de visualiser la présence de GFP dans les astrocytes activés. Ainsi, les AAV9-pPlat-GFP ne permettent pas selon nous de visualiser le tPA dans les astrocytes, activés ou non.

Par la suite, nous avons observé que 34% des neurones expriment du tPA, ce qui est bien supérieur aux 15% retrouvés dans une étude précédente du laboratoire (Louessard *et al.*, 2016). Cependant dans cet article, les auteurs avaient utilisé de la colchicine afin de bloquer le transport axo-dendritique du tPA pour l'accumuler dans les corps cellulaires des neurones et ainsi faciliter son immunodétection. Contrairement à nous, cette technique ne leur a pas permis de démasquer la présence du tPA dans des neurones inhibiteurs, ce qui pourrait expliquer la différence entre nos résultats. Aussi, il apparaît que l'utilisation de la colchicine puisse induire des crises d'épilepsie ou des convulsions chez la souris, entraînant également de la neurotoxicité, pouvant impacter l'expression du tPA neuronal (Karami *et al.*, 2020 ; Reynolds & Oakley, 1984 ; Sutula *et al.*, 1983).

Parmi les neurones à tPA, nous avons ensuite mis en évidence que 84% expriment Tbr1 (marqueur des neurones glutamatergiques) et 12% sont positifs pour le GABA (marqueur des neurones GABAergiques). Ces résultats diffèrent de ceux obtenus dans l'article 1 (Lépine *et al.*, 2022) montrant que 37% des neurones à tPA étaient positifs pour le marquage GABA. Cette divergence ne peut pas s'expliquer par la construction utilisée, sa dose, ou les coordonnées stéréotaxiques puisqu'elles sont identiques dans les deux études.

Nous avons récemment produit une nouvelle souche de souris, appelée Plat-IRES-CRE-eGFP (**Figure 47**), exprimant la protéine eGFP ainsi que la Cre recombinase dans tous les types cellulaires capables d'exprimer du tPA. Dans cette construction, la séquence IRES (en anglais : *internal ribosome entry site*) permet de traduire deux protéines à partir d'une seule molécule d'ARNm et ce, sous le contrôle du promoteur du gène codant pour le tPA (Plat). De plus, une cassette T2A capable de s'auto-cliver une fois traduite a été intercalée entre la Cre et la eGFP, ce qui traduit deux protéines distinctes et non fusion, identifiables par des marquages anti-Cre ou anti-GFP, par exemple.

Nous sommes en train de caractériser cette souche et vérifier l'expression de tPA et de la Cre-recombinase dans les types cellulaires connus. Les premières expériences en microscopie confocale (**Figure 47A**) et en microscopie à feuillet de lumière (en collaboration avec Primacen à Rouen (**Figure 47B**), semblent indiquer la présence de la eGFP dans les neurones du cortex et les vaisseaux sanguins.



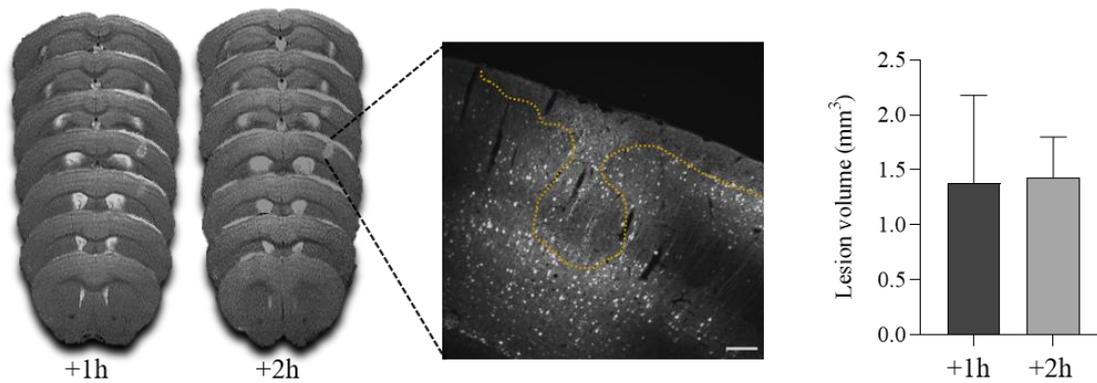
**Figure 47 :** *Immunohistochimie et analyse en microscopie confocale et en microscopie à feuillet de lumière chez une souris Plat-IRES-Cre-eGFP. A. Photo de microscopie confocale représentative de l'expression de la eGFP, marquée ou non par un anticorps, dans le cortex somatosensoriel. B. Photo représentative en microscopie par feuillet de lumière de l'expression de la eGFP (vert et rouge) dans le cortex ou les vaisseaux sanguins (barre d'échelle = 100µm).*

A l'avenir, ces souris pourront aussi être utilisées pour visualiser le tPA dans les types cellulaires d'intérêt, mais également pour le déléter par la présence de la Cre sous le contrôle de l'IRES et du promoteur Plat, *via* le système Cre-Lox.

L'utilisation des AAV nous a permis de démasquer, ou bien de déléter le tPA des neurones transduits. Cependant, cette approche ne nous permet pas de transduire l'ensemble des neurones mais uniquement dans la zone d'injection. Alors, pour contrer cette limite, il pourrait être intéressant d'utiliser une autre souche de souris, issue du croisement de souris nestin-Cre (Tronche *et al.*, 1999) avec des souris tPA flox<sup>+/+</sup>. Ceci permettrait d'évaluer la part du tPA à la phase aiguë des phénomènes excitotoxiques, dans tous les types de neurones (excitateurs et inhibiteurs) et dans plusieurs régions cérébrales.

### 2.2.2 L'expression du tPA par les neurones leur confère une résistance face à l'excitotoxicité

Pour comprendre le rôle du tPA neuronal à la phase aiguë des phénomènes excitotoxiques, nous avons injecté 2,5 nanomoles de NMDA, comme précédemment dans l'équipe (Baron *et al.*, 2010). Cette dose induit des lésions de l'ordre de 1 à 1,5 mm<sup>3</sup> et préserve encore des neurones 2 heures post-injection (Figure 48). D'un point de vue comportemental, notre protocole n'induit pas de troubles évident, contrairement aux modèles utilisant de plus grandes doses de NMDA (Lebeurrier *et al.*, 2005 ; Lesept *et al.*, 2016 ; Macrez *et al.*, 2011) qui peuvent engendrer du « *circling* » (tourner en rond) ou des crises épileptiques.



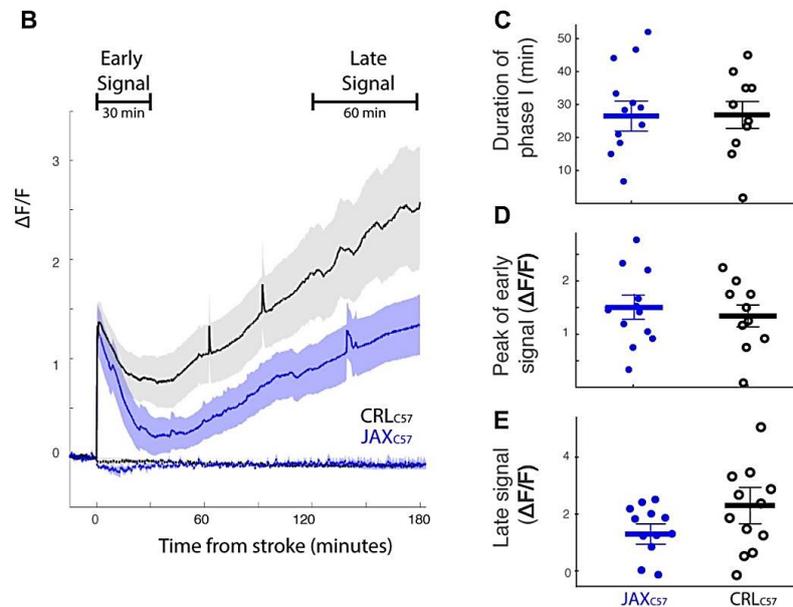
**Figure 48 :** Caractérisation de la lésion excitotoxique induite par l'injection intracorticale de NMDA à une concentration de 2,5 nanomoles (N=5 souris par groupe).

A la suite de l'induction de l'excitotoxicité, nous avons mis à mort les animaux à des temps très précoces : 30 minutes, 1 heure et 2 heures. Nous nous sommes spécifiquement focalisés sur la phase aiguë car nous savons, de par la littérature, que le tPA est un *immediate early gene*, par exemple lors de la LTP (Qian *et al.*, 1993). Nous pourrions d'ailleurs vérifier qu'il en est de même dans nos conditions, en recherchant la présence des ARN messagers du tPA à nos temps aigus, par hybridation *in situ* (en anglais : *fluorescent in situ hybridization*, FISH).

Dans un premier temps, nous avons pu observer qu'à la phase la plus précoce (30 minutes après l'injection de NMDA), la mortalité (environ 10%) des neurones n'est pas différente, qu'ils expriment ou non le tPA. Mais plus tard (1h et 2h), les neurones à tPA présentent une mortalité significativement plus faible que les neurones sans tPA.

Discutons tout d'abord cette temporalité. Si l'on garde en tête la capacité du tPA à potentialiser l'influx calcique à travers les récepteurs NMDA activés (Nicole *et al.*, 2001), on pourrait imaginer que le tPA neuronal « exprimerait » son effet pro-excitotoxique qu'à partir d'un certain seuil temporel, ou sur le plan moléculaire, à partir d'un certain seuil d'influx calcique. De manière intéressante, Nelson et collaborateurs (Figure 49, Nelson *et al.*, 2020) ont montré l'existence de deux phases d'augmentation du calcium intracellulaire post-AVC : une première phase très transitoire et précoce, puis une deuxième phase avec une

augmentation progressive du calcium. Ce profil serait compatible avec une première phase de mort neuronale indépendante du tPA, suivie d'une phase évoluant avec la disponibilité croissante du tPA, et donc possiblement l'accès à des cibles cellulaires/moléculaires propres.



**Figure 49:** Signal de fluorescence révélant deux phases temporelles distinctes de concentration de calcium intracellulaire, suite à une occlusion permanente de l'artère cérébrale moyenne distale. **B, C, D et E.** Signal de calcium fluorescent (durée, pic et latence) enregistré à partir de souris JaxC57 (C57BL/6J, bleu) et d'une souris CRLC57 (C57BL/6NCrl, noir) en réponse à l'occlusion. Au moment zéro, les animaux ont été déconnectés de l'enregistrement et emmenés pour la chirurgie. Les enregistrements avant et après la chirurgie ont été enchaînés dans la présentation des données. Le signal fluorescent est représenté comme le changement de signal par rapport à la ligne de base,  $1F/F_0$ , où  $F_0$  est une moyenne du signal des 15 premières minutes d'enregistrement (Figure adaptée de Nelson *et al.*, 2020).

En ce qui concerne la différence de sensibilité face à la mort excitotoxique entre les neurones exprimant ou non du tPA on peut envisager diverses hypothèses : le recrutement de récepteurs NMDA de différentes compositions (par exemple les récepteurs NMDA contenant la sous unité GluN2B seraient déclencheurs d'excitotoxicité et d'apoptose neuronale alors que les récepteurs NMDA contenant la sous-unité GluN2A seraient protecteurs (Zhu *et al.*, 2018). Par ailleurs, l'effet protecteur/délétère pourrait également

dépendre de la conformation du tPA, à savoir sc-tPA ou bien tc-tPA. On sait par exemple que seule la forme simple chaîne du tPA est capable de potentialiser l'influx calcique induit par les récepteurs NMDA (Hedou *et al.*, 2021 ; Parcq *et al.*, 2012). Ces différentes pistes restent à explorer.

### 2.2.3 La délétion conditionnelle du tPA dans les neurones est délétère pour leur survie dans un contexte excitotoxique

Nous avons voulu confirmer notre hypothèse selon laquelle les neurones exprimant du tPA seraient plus résistants à la mort par nécrose excitotoxique, en réalisant des délétions conditionnelles du tPA uniquement dans les neurones.

Pour ce faire, nous avons utilisé une nouvelle souche de souris C57BL/6J tPA flox<sup>+/+</sup> (dont l'exon 3 du gène codant pour le tPA est floxé par la présence de site *LoxP* de part et d'autre de l'exon) et leur homologues WT (tPA flox<sup>-/-</sup>). L'injection stéréotaxique d'AAV9-pPlat-Cre-GFP nous a alors permis d'invalider spécifiquement le tPA *in situ*, dans les neurones transduits par les AAV quand injecté chez des souris tPA flox<sup>+/+</sup> (tPA-cKO<sup>Neu</sup>) et de le démasquer quand injecté chez des souris tPA flox<sup>-/-</sup> (WT).

Nous avons pu observer que les neurones corticaux n'exprimant pas le tPA meurent plus chez les souris WT que chez les souris spécifiquement délétées en tPA dans les neurones transduits, 2 heures après l'injection de NMDA. Le tPA des neurones à tPA pourrait donc avoir un effet paracrine néfaste sur les neurones voisins ne l'exprimant pas.

A notre connaissance, ce phénomène n'a jamais été décrit dans la littérature. Pour vérifier ce résultat, nous pourrions réaliser des expériences *in vitro*, dans des systèmes microfluidiques à deux compartiments distincts. Ainsi, nous pourrions avoir d'une part des neurones corticaux issus de souris WT, et d'autre part, de neurones corticaux issus de souris tPA Null (entièrement déficientes en tPA). En ajoutant du NMDA dans les cultures, les neurones WT, libèrerait du tPA qui atteindrait ensuite les neurones sans tPA.

De plus rendre le tPA neuronal endogène fluorescent permettrait également de faire du *tracking in vitro* mais également *in vivo* en utilisant du microscope biphotonique. Cela renseignerait sur la localisation, le transit et les effets d'un tPA autocrine protecteur pour les neurones qui en possède et paracrine toxique pour les neurones voisins dépourvus de tPA.

Il serait également intéressant de réaliser des cultures de neurones WT ou Null, de les stimuler avec du NMDA puis de récupérer le milieu conditionné issu de neurones et de le transférer sur des cultures de neurones Null, soumis à un stress excitotoxique.

Nous avons aussi observé chez les WT que tout comme dans l'expérience précédente, les neurones à tPA présentent une mortalité plus faible que les neurones n'exprimant pas le tPA. Ces données suggèrent une nouvelle fois que les neurones à tPA sont résistants à l'excitotoxicité. De plus, nous mettons en évidence que la mortalité des neurones à tPA est significativement plus élevée chez les souris tPA-cKO<sup>Neu</sup>, dans des conditions où le tPA a été spécifiquement délété dans les neurones transduits.

Ainsi, il y aurait alors un effet auto-protecteur du tPA pour les neurones qui l'expriment. Cette hypothèse est très intéressante et va dans le même sens que des résultats précédemment publiés par le laboratoire (Lemarchand *et al.*, 2016). En effet, même s'ils avaient utilisé des souris complètement délété en tPA (tPA KO), ces auteurs avaient démontré que les neurones hippocampiques, en situation de stress induit par une OGD, se protègent eux-mêmes *via* un mécanisme dépendant du tPA et de ses interactions avec les récepteurs à l'EGF. Dans un modèle d'ischémie globale les auteurs rapportent également une augmentation de l'expression du tPA dès 3 heures et une augmentation de la mort neuronale hippocampique chez les souris tPA KO. Par la suite, ils ont réalisé des procédures d'OGD *ex vivo* sur des coupes d'hippocampe et ont bloqué l'interaction entre le tPA et les récepteurs NMDA (anti-ATD-GluN1), les récepteurs LRP (RAP) ou les récepteurs à l'EGF (AG1478). Ils ont démontré que seul le blocage de l'interaction entre le tPA et les récepteurs à l'EGF prévenait cet effet protecteur du tPA chez des souris WT et non chez des souris tPA Null.

Ces données vont également dans le sens d'autres travaux démontrant que le tPA est protecteur *via* une action dépendante des récepteurs à l'EGF au niveau des oligodendrocytes (Correa *et al.*, 2011).

Nous n'avons pas encore pu étudier le mécanisme impliqué dans l'autoprotection des neurones à tPA par le tPA. Cependant, il serait très intéressant de réaliser ces mêmes expériences mais en ajoutant des conditions de blocage des voies connues pour interagir avec le tPA. Ainsi nous pourrions par exemple :

- Injecter du Glunomab pour bloquer l'interaction entre le domaine *Kringle 2* du tPA et les récepteurs NMDA, ou bien réaliser notre modèle sur des souris KI<sup>178A</sup>.
- Injecter du RAP pour bloquer les interactions entre le domaine *Finger* du tPA avec les récepteurs LRP.
- Utiliser un antagoniste des récepteurs EGF prévenant l'interaction avec le domaine *EGF-Like* du tPA, afin de comprendre le mécanisme impliqué.

Enfin, afin de vérifier que les effets observés sont dépendants ou non de l'activité protéolytique du tPA, nous pourrions également injecter du PAI-1 ou de la neuroserpine.

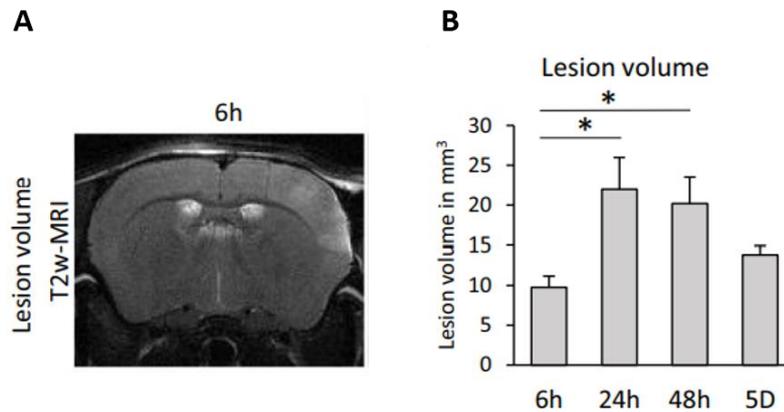
Aussi, il est tout à fait possible que l'expression de tPA par les neurones en situation excitotoxique, entraîne l'activation de voies de signalisation favorisant la survie neuronale. Dans un modèle d'apoptose induite par l'OGD, il a été démontré que le tPA protégeait les neurones corticaux grâce à un mécanisme indépendant de sa fonction fibrinolytique, impliquant l'activation de la voie de la PI3-kinase et la réduction de l'activation de la caspase-3 (Liot *et al.*, 2006). D'autres études ont suggéré que le tPA endogène aux neurones est libéré en conditions excitotoxiques induisant l'expression neuronale du TNF et conduisant à la régulation à la hausse de l'inhibiteur de la kinase dépendante des cyclines p21 et inhibant la mort apoptotique (Haile *et al.*, 2012). Il pourrait alors être intéressant de réaliser à nouveau nos expériences et de prélever les cerveaux de nos animaux WT et tPA-cKO<sup>Neu</sup> pour réaliser des Western Blot afin de révéler la présence ou non de marqueurs spécifiques de l'apoptose tels que la caspase-3 par exemple.

Enfin, pour terminer sur cette troisième expérience, nous avons pu mettre en évidence une souffrance neuronale objectivée par l'index de circularité (Ankam *et al.*, 2018). Nous avons observé que les neurones n'exprimant pas de tPA ont un score de circularité significativement réduit dans la lésion 1 et 2 heures post-excitotoxicité et que la délétion du tPA dans les neurones à tPA entraînant également ce phénotype allongé.

Ainsi, ceci est la traduction morphologique que la présence de tPA dans les neurones leur confère une résistance face à l'excitotoxicité. Cet index de circularité n'avait, à notre connaissance, pas été utilisé pour qualifier la mortalité neuronale, cependant, il permet de confirmer nos précédents résultats.

#### 2.2.4 Et dans un contexte ischémique ?

Suite à nos précédentes observations d'un tPA à double face (protecteur pour les neurones qui en possèdent et délétères pour les neurones n'en possédant pas), nous avons voulu savoir si ce phénomène était également présent à la phase précoce de l'AVC ischémique. Nous avons induit un AVC thromboembolique par injection de thrombine au niveau de l'artère cérébrale moyenne, chez des souris tPA flox <sup>+/+</sup> et <sup>-/-</sup> préalablement infectées par l'AAV9-pPlat-Cre-GFP. Ce modèle d'AVC, développé en 2007 au laboratoire (Orset *et al.*, 2007), est le premier modèle chez la souris permettant de réaliser une thrombolyse comme en clinique, avec aussi une fenêtre thérapeutique précise (Orset *et al.*, 2016). Selon la théorie (Dirnagl *et al.*, 1999) la vague excitotoxique aurait lieu au stade précoce de l'AVC et c'est à ce stade que nous nous sommes intéressés. Dans notre modèle, nous avons observé des lésions ischémiques relativement diffuses, de l'ordre de 5 à 10 mm<sup>3</sup> 6 heures post-occlusion. Ces données convergent avec celles de Drieu et collaborateurs (Figure 50, Drieu *et al.*, 2020) montrant des lésions de l'ordre de 10mm<sup>3</sup> à 6 heures post-occlusion alors qu'à 24h et 48h, la lésion est maximale (20-22 mm<sup>3</sup>), puis régresse. Nous avons donc mis à mort les animaux juste après l'IRM, 6 heures post-ischémie, pour des analyses immunohistochimiques.



**Figure 50** : Image IRM T2, représentative du volume de lésion induit par l'AVC ischémique (A) et quantifications associées (B) (Drieu et al., 2020).

Grâce à l'IRM de perfusion (en anglais : *arterial spin labeling*, ASL), nous avons pu observer que les deux génotypes ne se distinguent pas, et présentent une hypoperfusion identique, par rapport au cortex controlatéral. Mais sur le plan lésionnel, les souris dont le tPA a été délété dans les neurones (tPA-cKO<sup>Neu</sup>) présentent des volumes de lésions plus grands que leurs homologues WT, en particulier dans la zone de diffusion des AAV, suggérant un réel effet de la délétion du tPA dans les neurones dans l'aggravation de la lésion ischémique à 6 heures. Notons que la séquence IRM T2 utilisée n'est pas optimale pour quantifier les lésions ischémiques précoces, et qu'il serait pertinent d'utiliser d'autres séquences, tel que le coefficient de diffusion apparent (en anglais : *apparent diffusion coefficient*, ADC, (Mintorovitch et al., 1991 ; Ito et al., 1996).

Nos analyses immunohistochimiques montrent que la mortalité des neurones à tPA est moins importante que celles des neurones n'exprimant pas de tPA, chez les souris WT. Une nouvelle fois, nous démontrons une résistance des neurones à tPA face à la mort neuronale induite cette fois-ci par l'AVC ischémique. Cette différence n'est pas retrouvée lorsque le tPA des neurones est délété, chez les tPA-cKO<sup>Neu</sup>.

De manière étonnante, contrairement à nos observations dans le modèle d'injection corticale de NMDA, nous n'observons plus d'effet paracrine toxique du tPA neuronal sur les neurones non tPA voisins. Ceci pourrait résulter des mécanismes pathogènes plus complexes mis en jeu lors de l'AVC que dans l'excitotoxicité pure. Il serait donc pertinent d'explorer davantage ces pistes mécanistiques, qui aux stades précoces pourraient dépendre de l'hypoxie/absence de glucose, du statut énergétique, des phénomènes de dépolarisation (spreading depression, dépolarisation neuronale locale), de la première phase de perméabilisation de la BHE et/ou de l'infiltration de cellules immunitaires (Prakash & Carmichael, 2015 ; Puig *et al.*, 2018 ; Qin *et al.*, 2022).

On sait par exemple que l'hypoxie est un activateur puissant de la voie du facteur de transcription HIF1 (HIF, en anglais : *hypoxia inducible factor*), qui active la synthèse de nombreux acteurs de la cascade ischémique, impliqués par exemple dans l'initiation de l'apoptose (Bruick, 2000 ; Sowter *et al.*, 2001), l'état d'activation des cellules endothéliales (donc la perméabilité de la BHE, Simard *et al.*, 2010 ; Yang *et al.*, 2019), ou encore la neuroprotection (Mitroshina *et al.*, 2021).

Pour l'ensemble des conclusions de notre étude montrant des différences entre les neurones exprimant ou non du tPA, et dans diverses situations physiopathologiques (normales, excitotoxiques ou ischémiques) il serait intéressant de compléter nos travaux par des analyses de séquence d'ARN (RNA sequencing). Les analyses des familles fonctionnelles qui seront différenciellement activées/inhibées pourraient nous apporter d'importantes pistes pour comprendre, et donc moduler, la complexité d'action du tPA neuronal.

### 2.2.5 L'effet protecteur du tPA est-il sensible au phénotype neurochimique des neurones qui l'expriment ?

Le système GABAergique est impliqué dans l'évolution de la lésion ischémique post-AVC, en maintenant une hypoexcitabilité dans la pénombre par l'inhibition de l'excitabilité des neurones excitateurs (Carmichael, 2012 ; Alia *et al.*, 2016). Le blocage des récepteurs GABA entraîne d'ailleurs une amélioration de la récupération motrice post-AVC en diminuant l'inhibition des neurones dans la zone péri-lésée et en augmentant ainsi la transmission glutamatergique (Clarkson *et al.*, 2010 ; Lebrun *et al.*, 2022). Alors, nous nous sommes demandés s'il existait une sensibilité différentielle des neurones à tPA dans ce contexte ischémique, en fonction de leur phénotype neurochimique (glutamatergique ou GABAergique). Nous avons pu observer que les neurones à tPA excitateurs et inhibiteurs étaient tous deux protégés, contrairement aux neurones excitateurs et inhibiteurs délétés en tPA (tPA-cKO<sup>Neu</sup>) et n'avons pas observé de sensibilité différentielle entre les neurones à tPA excitateurs et inhibiteurs.

Il serait intéressant de réitérer cette expérience sur des souris issues de croisements entre des souris tPA flox<sup>+/+</sup> et des souris emx1-Cre ou nkx2.1-Cre pour déléter le tPA respectivement dans les neurones excitateurs (Gorski *et al.*, 2002 ; Guo *et al.*, 2000) ou inhibiteurs (Xu *et al.*, 2008).

Il convient de finir sur la remarque suivante : l'utilisation des AAV-Cre-GFP peut induire de la neurotoxicité, notamment dûe à des agrégats de noyaux de la protéine GFP (Ansari *et al.*, 2016), mais aussi augmenter l'activation des astrocytes et de la microglie, dès 5 semaines et jusqu'à 10 semaines post-injection (Boch *et al.*, données non publiées, présentée au congrès NeuroFrance à Lyon). Nous n'avons pas observé de tels issues, probablement car leur volume d'injection est supérieur au nôtre (2 x 1 micro litres contre 2 x 0.25 micro litres), et que notre vitesse d'injection de 0,2 micro litres par minute, permet de réduire au maximum les effets indésirables liés à l'injection intracorticale.

Cela dit, afin de s'assurer que les effets observés dans notre étude, ne soient pas liés à la neurotoxicité induite par la GFP, nous pourrions utiliser une autre protéine fluorescente dans nos constructions AAV. Effectivement, les protéines CFP (en anglais : *cyan fluorescent protein*) et YFP (en anglais : *yellow fluorescent protein*) semblent être moins toxiques et pourraient être considérées à l'avenir (Taghizadeh & Sherley, 2008).

En outre, il serait très pertinent d'ajouter des données à 24 heures post-ischémie car cela permettrait de conclure sur un rôle protecteur du tPA *via* une réduction du volume de lésion ou bien un retardement dans sa formation, suggérant que cette différence est rattrapée à 24 heures.

## Conclusion générale sur les résultats 2

Dans notre seconde étude (**article 2**), nous avons démontré la présence du tPA au sein des neurones corticaux *via* l'utilisation des vecteurs AAV9-pPlat-GFP.

Dans un contexte excitotoxique, nous avons démontré que les neurones exprimant le tPA présentent une résistance accrue par rapport à leurs homologues dépourvus de cette protéine. De plus, nous avons mis en lumière le double rôle des neurones à tPA lors de l'excitotoxicité : ils se protègent eux-mêmes tout en exerçant un effet toxique paracrine sur les neurones voisins non dotés de tPA.

Enfin, dans un contexte d'ischémie thromboembolique, nous avons également observé un effet protecteur du tPA neuronal, se traduisant par des volumes de lésions ischémiques réduits par rapport aux animaux ayant subi une délétion spécifique du tPA au niveau neuronal. L'effet bénéfique autocrine existe aussi à la phase précoce de l'AVC et concerne aussi bien les neurones GABAergiques que glutamatergiques.

## Conclusion générale des travaux de thèse

L'article 1 révèle que les interneurons GABAergiques à parvalbumine expriment du tPA et que celui-ci contrôle la densité des réseaux périneuronaux (PNNs). En effet, ce tPA, en convertissant le plasminogène en plasmine, dégrade l'aggrecan, un constituant majeur des PNNs. Par ailleurs, dans un contexte ischémique, nous démontrons que les souris déficientes en tPA uniquement dans les interneurons à PV (cKO) ont une récupération fonctionnelle plus rapide que les souris contrôles, par un mécanisme qui ne semble pas dépendre des PNNs. De plus, nous avons démontré que le tPA augmente l'activation du récepteur NMDA des interneurons à PV, mais il reste à déterminer si cet effet contribue à la différence de récupération fonctionnelle post-ischémique.

L'article 2 indique qu'1/3 des neurones du cortex somato-sensoriel expriment du tPA. Les neurones à tPA sont moins sensibles à l'excitotoxicité induite par le NMDA que les neurones qui n'expriment pas de tPA. De plus, en situation excitotoxique, les neurones à tPA ont un double rôle : ils se protègent eux-mêmes, mais ont un effet toxique paracrine sur les neurones voisins dépourvus de tPA. Par ailleurs, les animaux déficients en tPA dans les neurones du cortex somatosensoriel montrent des lésions excitotoxiques/ischémiques plus graves que les animaux témoins.

Si l'on confronte l'ensemble de nos travaux présentés dans ce manuscrit, nous pourrions conclure que le tPA exprimé par les interneurons à parvalbumine aurait un impact plutôt négatif sur la récupération fonctionnelle après un AVC (**Article 1**) et que les neurones GABAergiques seraient auto-protégés par leur tPA (**Article 2**). Ainsi, cette protection pourrait finalement se révéler néfaste pour la récupération fonctionnelle, en maintenant une hypoexcitabilité des neurones excitateurs. Ces données soulignent l'importance de ne pas borner les études à uniquement des observations histologiques et que ces dernières doivent s'accompagner de démonstrations fonctionnelles et finalistes.



# Autres travaux

# Persistent neuroinflammation and behavioural deficits after single mild traumatic brain injury

Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism  
2022, Vol. 42(12) 2216–2229  
© The Author(s) 2022  
Article reuse guidelines:  
sagepub.com/journals-permissions  
DOI: 10.1177/0271678X221119288  
journals.sagepub.com/home/jcbfm  


Antoine Drieu<sup>1</sup>, Anastasia Lanquetin<sup>1</sup>, Paul Prunotto<sup>1</sup>,  
Zuhal Gulhan<sup>2</sup>, Swannie Pédrón<sup>1</sup>, Gloria Vegliante<sup>3</sup>,  
Daniele Tolomeo<sup>3</sup>, Sophie Serrière<sup>2</sup>, Johnny Vercouillie<sup>2</sup>,  
Laurent Galineau<sup>2</sup>, Clovis Tauber<sup>2</sup>, Bertrand Kuhnast<sup>4</sup>,  
Marina Rubio<sup>1</sup>, Elisa R Zanier<sup>3</sup>, Damien Levard<sup>1</sup> ,  
Sylvie Chalou<sup>2</sup>, Denis Vivien<sup>1,5</sup> and Carine Ali<sup>1</sup>

## Abstract

Despite an apparently silent imaging, some patients with mild traumatic brain injury (TBI) experience cognitive dysfunctions, which may persist chronically. Brain changes responsible for these dysfunctions are unclear and commonly overlooked. It is thus crucial to increase our understanding of the mechanisms linking the initial event to the functional deficits, and to provide objective evidence of brain tissue alterations underpinning these deficits. We first set up a murine model of closed-head controlled cortical impact, which provoked persistent cognitive and sensorimotor deficits, despite no evidence of brain contusion or bleeding on MRI, thus recapitulating features of mild TBI. Molecular MRI for P-selectin, a key adhesion molecule, detected no sign of cerebrovascular inflammation after mild TBI, as confirmed by immunostainings. By contrast, *in vivo* PET imaging with the TSPO ligand [<sup>18</sup>F]DPA-714 demonstrated persisting signs of neuroinflammation in the ipsilateral cortex and hippocampus after mild TBI. Interestingly, immunohistochemical analyses confirmed these spatio-temporal profiles, showing a robust parenchymal astrogliosis and microgliosis, at least up to 3 weeks post-injury in both the cortex and hippocampus. In conclusion, we show that even one single mild TBI induces long-term behavioural deficits, associated with a persistent neuro-inflammatory status that can be detected by PET imaging.

## Keywords

Mild traumatic brain injury, molecular MRI, neuroinflammation, persisting behavioural deficits, TSPO microPET imaging

Received 4 January 2022; Revised 17 June 2022; Accepted 20 June 2022

## Introduction

Each year, 69 million people suffer a traumatic brain injury (TBI), which is the leading cause of mortality in young adults and a major cause of death and disability across all ages worldwide.<sup>1,2</sup> The classification of TBI can be etiological, symptomatologic, prognostic or anatomopathological. Practice guidelines include structural imaging and neurological scoring, including the 15-point Glasgow Coma Scale, in their criteria for classifying injury severity as being severe, moderate, or mild TBI.<sup>3</sup> Clinical research has mainly been directed toward moderate and severe TBI, but the majority (70–90%) of patients suffer from mild TBI (miTBI).

<sup>1</sup>Normandie Univ, UNICAEN, INSERM, INSERM UMR-S U1237, Physiopathology and Imaging of Neurological Disorders, Institut Blood and Brain @ Caen-Normandie, Cyceron, France

<sup>2</sup>UMR 1253, iBrain, Université de Tours, INSERM, Tours, France

<sup>3</sup>Department of Neuroscience, Istituto di Ricerche Farmacologiche Mario Negri, IRCCS, Milan, Italy

<sup>4</sup>IMIV, Service Hospitalier Frédéric Joliot, CEA, Inserm, Université Paris Sud, CNRS, Université Paris-Saclay, Orsay, France

<sup>5</sup>Department of Clinical Research, Caen-Normandie Hospital (CHU), Caen, France

## Corresponding author:

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

Email: ali@cyceron.fr

Cumulative epidemiological data show that moderate or severe TBI, and very likely mild TBI, are important risk factors for disabilities (the so-called “silent epidemic”), including neurodegenerative diseases or psychiatric disorders.<sup>4–6</sup> The sparse quantitative estimations vary greatly, but patients with mild TBI may suffer from physical symptoms, cognitive dysfunctions, anxiety, depression, post-traumatic stress disorder, that risk to interfere with professional or social life.<sup>1,7,8</sup> Mild TBI is thus a serious condition and it is important to predict who are at risk patients and to understand the underlying pathogenic mechanisms. The current armamentarium remains insufficient, but imaging, or multimodal imaging is likely a key to success for these goals.

After the initial biomechanical injury, TBI induces a progressive secondary injury, which includes a neuroinflammatory response.<sup>9</sup> Accordingly, the ability to monitor inflammatory responses can have major diagnostic/prognostic implications for TBI. Beside plasma/CSF biomarkers, some brain biomarkers of inflammation can be targeted in humans by molecular imaging such as single photon emission computed tomography (SPECT) or positron emission tomography (PET). In this context, highly sensitive imaging of neuroinflammation is available using translocator protein (TSPO) PET ligands. Indeed, brain imaging of TSPO is now recognized as a relevant index of active microglia and is increasingly used in acute brain injuries such as stroke<sup>10</sup> neurodegenerative diseases such as Alzheimer’s disease and multiple sclerosis,<sup>11,12</sup> and moderate to severe TBI.<sup>13</sup> In parallel, molecular magnetic resonance imaging (MRI) to study endothelial activation has recently emerged as a promising axis of research,<sup>14</sup> with solid proof-of-concept studies in animal models. The recently developed contrast agents called micro-sized particles of iron oxide (MPIO) have significantly improved molecular MRI sensitivity and specificity. MPIOs harboring antibodies against adhesion molecules recruited at the endothelial luminal membrane (including VCAM-1 and P-selectin), have proven as highly relevant MRI tools to detect neuroinflammation in various pathological conditions,<sup>15–17</sup> including transient ischemic attack for which –like for miTBI –conventional MRI shows no evidence of brain infarction.<sup>18</sup>

Here, in mice, we tailored a model of miTBI below any detectable damage by conventional MRI, to test whether miTBI is associated to selective cognitive deficits and whether advanced translatable imaging of inflammation by molecular MRI or PET may inform on functional post-TBI sequelae.

## Material and methods

### Ethics

All experiments were performed and reported in accordance with the Animal Research: Reporting of In Vivo Experiments (ARRIVE) guidelines (<http://www.nc3rs.org.uk><sup>19</sup>) in accordance with French laws (act no. 87–848; Ministère de l’Agriculture et de la Forêt), European Communities Council Directives of November 24, 1986 (86/609/EEC) guidelines, and have been approved by the ethical committee (authorization number #15301). The Mario Negri Institute adheres to the principles set out in the following laws, regulations, and policies governing the care and use of laboratory animals: Italian Governing Law (D.lgs 26/2014; Authorization no.19/2008-A issued March 6, 2008 by Ministry of Health). They were reviewed and approved by the Mario Negri Institute Animal Care and Use Committee which includes ad hoc members for ethical issues, and by the Italian Ministry of Health (Decreto no. D/07/2013-B and 301/2017-PR).

### Animals

Experiments were performed on two months-old male Swiss mice (35–45 g; Centre Universitaire de Ressources Biologiques, Normandy University, Caen, France) or on male C57BL/6J mice (20–24 g; from Envigo for the Istituto di Ricerche Farmacologiche Mario Negri). Animals were housed at 21°C in a 12 h light/dark cycle with food and water with *ad libitum* free access. For each experiment, the number of animals used has been approved by the ethical committee. Sample sizes have been defined via an online power analysis tool (<https://clincalc.com/stats/samplesize.aspx>) and/or on our expertise.

### Surgical procedure for traumatic brain injury

For surgeries, mice were anesthetized with isoflurane 5% and maintained under anesthesia with 1.5–2.5% isoflurane in a 70%/30% gas mixture (N<sub>2</sub>O/O<sub>2</sub>). The body temperature was maintained at 37 ± 0.5°C throughout using a feedback-regulated heating system. Breathing was constantly checked and adjusted with anesthesia level. A sagittal incision (not midline to avoid major bleeding) was made to expose the skull. Mice were placed on a stereotaxic frame, and the head was maintained using both nose and ear bars. The whole body was elevated using a 3 cm-high box to limit contrecoup injuries. Then, the left parietal skull was cleaned with a cotton bud. Close-head controlled cortical impact (CCI) brain injury was induced using a 3 mm diameter rigid impactor driven by an electromagnetic controlled impact device (ImpactOne, Leica<sup>20</sup>)

rigidly mounted at an angle of 20° from the vertical plane and applied between the bregma and lambda of the left exposed skull (deformation depth was either 1.5 mm for mild TBI (miTBI) and 2 mm for moderate TBI (modTBI); velocity: 5.0 m/s; time of impact: 0.2 s, see schematic cartoon in Fig. S1). Using these two depths, skull fractures were not detected in miTBI mice, but were present on modTBI mice. Mice were sutured and placed in a separate box until recovery (i.e., restoration of a normal gait). Sham animals were subjected to the same procedure, except that they did not receive any impact.

As positive controls of molecular imaging, a series of mice was either injected with LPS in the striatum (1 µg) or subjected to severe TBI, induced by a 1 mm depth impact after craniectomy, as described earlier.<sup>21</sup>

### MRI of brain lesions

Mice were deeply anesthetized with 5% isoflurane in 30/70% O<sub>2</sub>/N<sub>2</sub>O and then maintained under anesthesia during all the experiment with 1.5–2.5% anesthesia in 30/70% O<sub>2</sub>/N<sub>2</sub>O. Imaging was carried out on a Pharmascan 7T/12 cm system using surface coils (Bruker, Germany). T2-weighted sequences were used to visualize oedema formation at 1, 7 and 21 days post-TBI using MSME sequences (multi-spin multi-echo): TE/TR: 51 ms/2500 ms TE/TR 33 ms/2500 ms with a 70\*70\*500 µm<sup>3</sup> spatial resolution. Haemorrhagic events were assessed using T2\*-weighted sequences (TE/TR: 7.7 ms/500 ms TE/TR 8.7064 ms/500 ms). Lesion size was calculated using Image J software (v1.52k, NIH).

### Behavioural assessments

A separate group of animals was subjected to behavioural tests before and after inducing mild or moderate TBI. Based on the literature,<sup>22,23</sup> our minimally invasive sham procedure was not expected to impact the behavioural parameters measured *per se*, so that no sham animals were included. Mouse weight was monitored before each behavioural assessment, the day and the day after the surgical procedure. A control MRI (T2 and T2\*) session was systematically performed 24 h after surgery to exclude animals with lesion and/or bleeding. One mouse with moderate TBI died a few days after surgery and two mice displayed brain haemorrhage after mild TBI; these three animals have thus been excluded from further analyses.

**Place recognition test.** Spatial memory was tested 7 days before and 7 and 21 days after mild TBI (n = 10 mice/group) in a white plastic Y-maze with three identical arms (34 × 7 × 14.5 cm). Mice were tested after a

two-session procedure with a 2h30 intersession interval, as previously described.<sup>24</sup> During the acquisition session, one arm was randomly closed with a guillotine door. The position of the closed arm was chosen randomly among the three arms. Each mouse was placed in one of the two other arms (arms A and B), with its head facing away from the center of the maze and allowed to explore the two accessible arms for 5 min. Mice were then placed in their home cage for 2h30 before being subjected to the retention test, in which they had free access to all three arms for 5 min. The number of visits to each arm (considered only when the mouse passed two-thirds of the arm) was recorded for each session. Spatial memory was assessed through the comparison of the percentage of visits in each arm for the 5 min of the retention test. In the absence of deficits, the percentage of visits in the new arm is higher than 33% (the threshold of random visit).

**Open field.** Mice were placed in a squared box (31.5 × 31.5 cm) for 10 minutes as previously described,<sup>25</sup> 7 days before and 7 and 21 days after mild TBI (n = 10 mice/group). Animals were video-tracked (DMK 21AF04, The Imaging Source®) and distance and velocity were analyzed with EthoVision XT 11.5 software (Noldus). Additionally, a central region of 15 × 15 cm was defined, and the percentage of time spent in the center area was measured to assess anxiety-like behaviour. Rodents typically spend more time exploring the periphery of the arena by walking along the walls (thigmotaxis) than the central area.<sup>26</sup>

### Targeting-moiety conjugation to MPIOs and molecular imaging

Microparticles of iron oxide (MPIOs; diameter 1.08 µm) with p-toluenesulphonyl reactive surface groups (Invitrogen) were used for peptide conjugation.<sup>16</sup> Purified polyclonal goat anti-mouse antibodies for P-selectin (R&D Systems, clone AF737) were covalently conjugated to MPIOs in borate buffer with ammonium sulphate (pH 9.5), by incubation at 37°C for 48 h. The specificity of these MPIOs targeting P-selectin has been validated in a previous study.<sup>18</sup> MPIOs were then washed in phosphate buffered saline (PBS) containing 0.5% bovine serum albumin (BSA) at 4°C and incubated for 24 h at room temperature, to block the remaining active groups. MPIOs were rinsed in PBS (0.1% BSA) and stored at 4°C.

Imaging was carried out at Cyceron on a Pharmascan 7T/12 cm system using surface coils (Bruker) or at IRFMN on a 7T Bruker Biospec (Ettlingen, Germany) running ParaVision 6.01 and equipped with a quadrature cryogenic surface coil as transmitter and receiver. Three-dimensional

T2\*-weighted gradient echo imaging with flow compensation (GEFC) (spatial resolution of  $70 \times 70 \times 70 \mu\text{m}^3$ ), TE/TR 13.2 ms/200 ms and a flip angle (FA) of  $21^\circ$  was performed to visualize MPIOs. Specifications with the 7T Bruker Biospec system were the followings: resolution of  $80 \times 80 \times 80 \mu\text{m}^3$ , TE/TR = 7.5 ms/50 ms, FA of  $14^\circ$ . A baseline GEFC image was acquired before and after MPIO injection to evaluate the percentage of signal variation.

MRI acquisitions started immediately after the intravenous injection of MPIOs (200  $\mu\text{l}$  of 2 mg Fe/kg of conjugated MPIOs) and lasted 17–20 min. The quality of conjugated MPIOs was systematically checked in a mouse that received an intrastriatal injection of lipopolysaccharide (1  $\mu\text{l}$ , 1 mg/kg; coordinates: 0.5 mm anterior, 2.0 mm lateral,  $-3$  mm ventral from the Bregma).

Furthermore, a high-resolution angiography was performed using a 3D-FLASH sequence suppressing signals from static tissue (Field of view (FOV) =  $30 \times 16 \times 8.4 \text{ mm}^3$ ; Resolution  $100 \times 100 \times 100 \mu\text{m}^3$ , FA of  $80^\circ$ ; TE/TR = 3.1 ms/16 ms; Number of average (NA) = 6; scan time: 16 min), only in mice subjected to the severe TBI model.

### [<sup>3</sup>H]DPA-714 autoradiography

Seven days ( $n = 7$  mice/group) or 21 days ( $n = 6$  mice/group) after mild TBI, brains were harvested, frozen in isopentane cooled at  $-35^\circ\text{C}$  and stored at  $-80^\circ\text{C}$ . Coronal brain sections 20- $\mu\text{m}$  thick (coordinates: Bregma  $-2.30$  mm according to Franklin & Paxinos) were sliced using a cryostat at  $-20^\circ\text{C}$  (CM 3050S<sup>TM</sup>, Leica, Germany), collected on gelatin-coated slides and stored at  $-80^\circ\text{C}$  for at least 4 days. The density of TSPO binding sites was measured by *ex vivo* autoradiographic experiments using [<sup>3</sup>H]DPA-714 (Molar activity 2.01 GBq/ $\mu\text{mol}$ ).<sup>27,28</sup> Brain sections were allowed to equilibrate at room temperature (RT) for 3 hours and then incubated with 1 nmol/L of [<sup>3</sup>H]DPA-714 in 50 mmol/L Tris-HCl buffer pH 7.4 at RT for 60 minutes. The non-specific binding was measured in the presence of 1  $\mu\text{mol/L}$  PK-11195 (Sigma Aldrich, Lyon, France). Sections were rinsed twice in ice cold buffer ( $4^\circ\text{C}$ ) for 5 minutes, then briefly in distilled water at  $4^\circ\text{C}$  and dried at RT. Acquisitions were compiled over a period of 4 hours using the  $\beta$ -imager<sup>TM</sup> 2000 (Biospace Lab, Paris, France). Four sections were analyzed per mouse. ROIs were manually drawn on the ipsi- and contro-lateral hippocampus and frontal cortex. The level of bound radioactivity was directly determined by counting the number of  $\beta$ -particles emitted from the delineated area using the  $\beta$ -vision software (Biospace Lab, France). The radio-ligand signal in the ROIs was expressed as counts per

minute per square millimeter (cpm/ $\text{mm}^2$ ). Specific binding was determined by subtracting nonspecific binding from total binding.

### MicroPET experiments

PET experiments were conducted 21 days post mild TBI (5 mice). [<sup>18</sup>F]DPA-714 was prepared as described elsewhere<sup>29</sup> and obtained with a molar activity of 96 GBq/ $\mu\text{mol}$  at the time of injection. Mice were deeply anesthetized with isoflurane at 4–5% in  $\text{O}_2$  and maintained with 1.5–2% isoflurane during scanning. Mice were placed on a thermo-regulated bed (Minerve, France) in the prone position with a nose cone. Acquisitions were made on a microPET-CT SuperArgus system (Sedecal, Madrid, Spain) which has an effective axial/transaxial FOV of 4.8/6.7 cm, a spatial resolution less than 2 mm and a sensitivity above 2.5% in the whole FOV. Before PET acquisition, a 5-minute computed tomography (CT) scan was acquired for attenuation correction. [<sup>18</sup>F]DPA-714 was administered into the tail vein as a bolus ( $22 \pm 1$  MBq). During the 50 minutes of PET acquisition, the respiratory rate and body temperature were monitored and kept as constant as possible.

The PET list-mode scans were rebinned into 27 frames: 4 frames of 10-seconds followed by 4 of 20-seconds, 4 of 60-seconds, 14 of 180-seconds, and 1 of 120-seconds. Each scan was corrected for randoms, scatter and attenuation, and the images were reconstructed using a 2D OSEM algorithm (GE Healthcare, France) into voxels of  $0.3875 \times 0.3875 \times 0.775 \text{ mm}^3$ . Dynamic PET images were corrected for partial volume effect using a Reblurred Van Cittert approach.<sup>30</sup> The estimation of the system point spread function (PSF) was slightly narrowed to avoid Gibbs ringing artifacts. Data summed over the entire acquisition were used for image registration. Since brain anatomy is very similar for mice of similar weight relatively to PET resolution, registration was accomplished as a rigid body transformation, with no warping or scaling. Each summed scan was individually smoothed with a Gaussian filter to improve the signal-to-noise ratio and to reduce the bias of misregistration into Mirrione template space. For this smoothing, a kernel of  $0.6 \times 0.6 \times 0.6 \text{ mm}^3$  FWHM was used. Each scan was coregistered using PMOD v3.4 software (PMOD Technologies Ltd, Switzerland) to a <sup>18</sup>FDG PET template in Mirrione coordinates using a mutual information similarity function with Powell's convergence optimization method.<sup>31</sup> The registered images were then used to create a template that was also registered to Mirrione space. Finally, all initial PET images were registered again to this template. The results were visually checked for misregistration.

To normalize the [ $^{18}\text{F}$ ]DPA-714 uptake, tissue activity was divided by the average whole brain activity. Each voxel of the 3D volume was paired with its corresponding contralateral voxel. Based on the Mirrione's template, regions of interest of at least 50 contiguous significant voxels were drawn from the z-score map using PMOD v3.2 software (PMOD Technologies Ltd, Switzerland). These regions of interest were then applied to individual [ $^{18}\text{F}$ ]DPA-714 images to retrieve [ $^{18}\text{F}$ ]DPA-714 uptake values in each brain.

### Immunohistochemistry

One, 7 or 21 days post-TBI, deeply anesthetized mice were transcardially perfused with cold heparinized saline (15 mL) and fixed with 100 mL of 2% paraformaldehyde and 0.2% picric acid phosphate buffer (pH 7.4) ( $n=4$  or 6 mice/group). Brains were post-fixed with 2% paraformaldehyde and 0.2% picric acid phosphate buffer (18 hours; 4°C) and cryoprotected (sucrose 20% in PBS; 24 hours; 4°C) before freezing in Tissue-Tek (Miles Scientific, Naperville, IL, USA). Cryostat-cut sections (10  $\mu\text{m}$ -thick sections) were collected on poly-lysine slides and stored at  $-80^\circ\text{C}$  before processing.

Sections were co-incubated overnight with rabbit polyclonal anti-mouse Iba1 (1:1000, Wako 019-19741), rat polyclonal anti-mouse CD68 (1:1000, Abcam 53444), goat polyclonal anti-mouse P-selectin (1:1000, RD System AF737), chicken polyclonal anti-mouse GFAP (1:2000, Abcam 4674), sheep anti-fibrinogen (1:10000, kind gift from Dr. E. Anglès Cano) and rabbit polyclonal anti-mouse Laminin (1:1500, Abcam 11575). Primary antibodies were revealed by using Fab'2 fragments of Donkey anti-rabbit linked to FITC or Cy5, anti-rat linked to Cy3, anti-goat IgG linked to FITC (1:600, Jackson ImmunoResearch, West Grove, USA). Infiltrated immunoglobulins were detected with a Cy3-conjugated Donkey Anti-Mouse IgG (1:600, Jackson ImmunoResearch 715-165-150). Washed sections were coverslipped with antifade medium containing DAPI. Epifluorescence images were digitally captured using a Leica DM6000 epifluorescence microscope-coupled coolsnap camera, visualized with Leica MM AF 2.2.0 software (Molecular Devices, USA) and further processed using ImageJ 1.52k software. Data collection and analyses were performed in a random order and blind to the experimental group, as well as to the ipsi/contralateral side. The quantifications were done in both ipsi- and contralateral cortices and hippocampi. A total of 15 to 18 images were quantified per animal. The number of astrocytes, microglia, activated microglia as well as infiltrated/perivascular macrophages were quantified in a total of 9 to 12 regions of interest,

divided in ipsi- versus contralateral sides of the TBI. We then compared the average number of cells between ipsi- and contralateral sides of the TBI. We also quantified the number of cells in sham animals that underwent all the surgical procedures but the TBI.

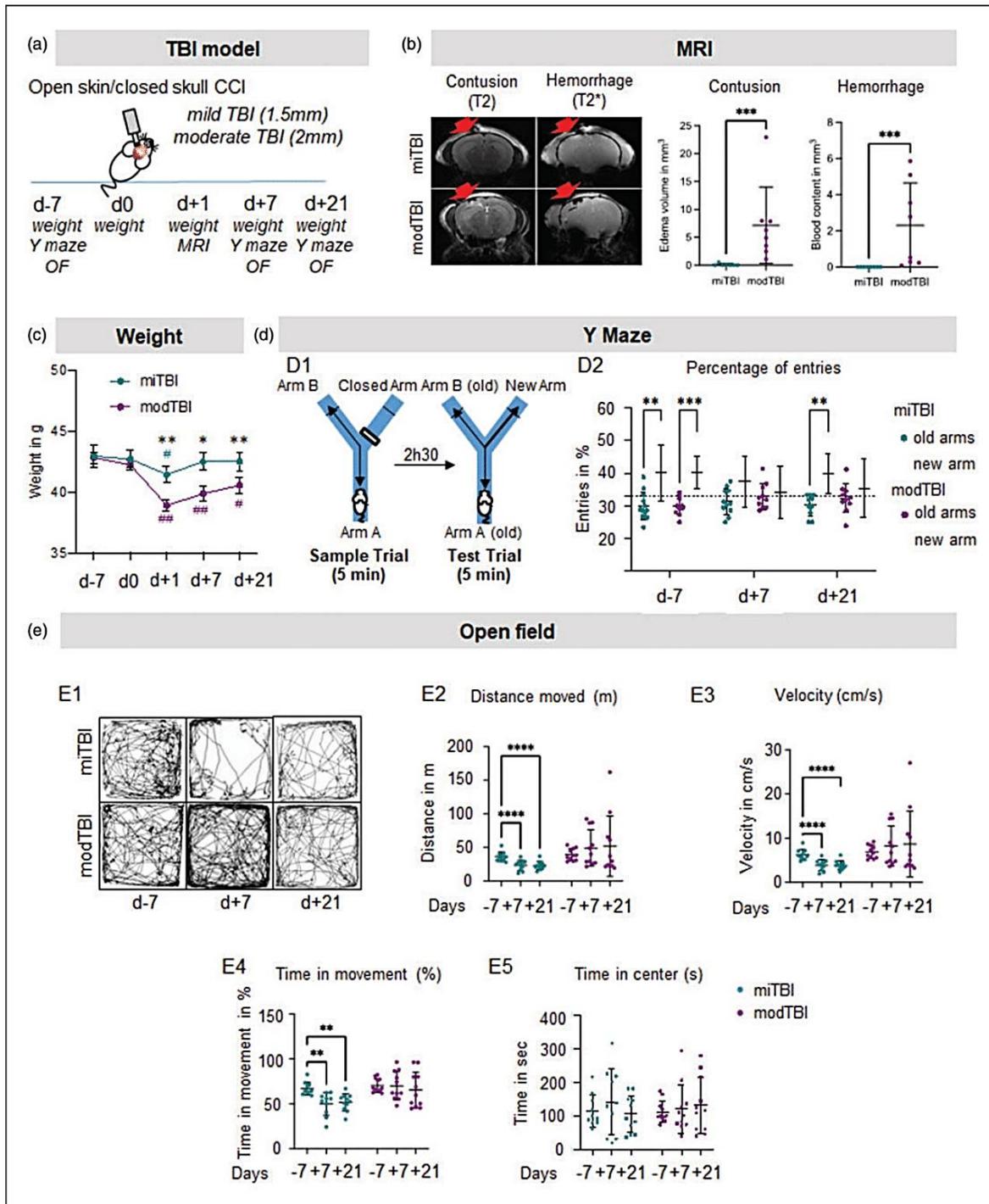
### Statistical analyses

Results are the mean  $\pm$  SD. For immunohistochemical analyses, cell counts were compared between ipsilateral versus contralateral regions of interest by the non-parametric Wilcoxon paired test. For cognitive functions (Y maze test and open field test), variables were compared by 2-way ANOVA followed by multiple comparisons with FDR corrections. For autoradiography, comparisons between the binding both sides were performed using the 2-way ANOVA and Bonferroni post-hoc test. The level of significance was  $p < 0.05$ . The intra-animal comparison of [ $^{18}\text{F}$ ]DPA-714 uptake between the ipsi- and contra-lateral sides in a brain area was performed using a Student *t*-test (normality was assessed using the Shapiro-Wilk test). For the *in vivo* microPET experiment, individual differences were calculated between paired voxels; 3D z-scores maps were calculated using a paired Wilcoxon non-parametric test. The statistical threshold was set at  $p < 0.01$ . All statistical tests were performed using GraphPad Prism software v9, San Diego, USA. All the experiments were done in a blind manner, and blinding was revealed after all analyses were processed.

## Results

### *Despite the lack apparent lesion on conventional MRI, a single mild TBI induces persistent behavioural deficits*

We first characterized our model of closed-head CCI to tailor the biomechanical injury to a degree not associated with brain damage on conventional MRI, thus mimicking one single mild TBI. Two depths of CCI (Figure 1(a)) were analyzed by MRI 24h after TBI (Figure 1(b)). Impact immediately induced a respiratory arrest that was similar in both groups (Fig. S2,  $t=33.18$  sec in miTBI;  $t=57.27$  sec in modTBI,  $p=0.1024$ ,  $n=11$  mice/group). CCI at 1.5 mm depth did not induce any skull fracture and did not translate into measurable parenchymal lesion or bleeding on MRI (Figure 1(b)). By contrast, CCI at 2.0 mm depth led to a skull fracture, bleeding in the parenchyma in some animals, and to a 6  $\text{mm}^3$  edematous lesion ( $n=7-8$  mice/group; Figure 1(b)). Based on these imaging findings, we thus selected CCI at 1.5 mm as a model of mild TBI (miTBI) and CCI at 2 mm as a model of moderate-to-severe TBI (modTBI).



**Figure 1.** Mild TBI is undetectable by conventional MRI but induces long-term behavioural deficits. (a) Experimental design showing that two depths of impact (1.5 mm: mild TBI; 2 mm: moderate TBI) have been compared in the CCI model. (b) Representative T2-weighted (contusion) and T2\*-weighted (hemorrhage) MRI acquisitions and corresponding quantifications 24 hours after mild or moderate TBI.  $n = 7/8$  mice/group. \* $p < 0.05$  vs mild TBI; \*\* $p < 0.01$  vs mild TBI; \*\*\* $p < 0.001$  vs mild TBI, Mann-Whitney test; # $p < 0.05$  vs d0; ### $p < 0.01$  vs d0, Wilcoxon paired-test. Red arrows indicate the site of impact. (c) Measures of mouse weights 7 days before TBI, and day 0, 1, 7 and 21 days after TBI. (d) Schematic representation of Y maze behavioural test and quantifications of the percentage of entries in the new arm 7 days before and 7 and 21 days after mild or moderate TBI and (e) Representative sample traces and corresponding quantifications of the total distance moved, velocity, time of movement and time spend in the center on the open field test 7 days before, 7 and 21 days after mild or moderate TBI.  $n = 10$  mice/group, # $p < 0.05$  vs new arm, Wilcoxon paired-test; ### $p < 0.01$  vs d-7 Wilcoxon paired-test.

We then compared functional outcome after miTBI versus modTBI, as a function of time, before and after TBI. In both groups, mice lost weight 24 h after surgical procedure. Interestingly, miTBI mice recovered their weight at 7 days, while modTBI mice did not (Figure 1(c)). Four mice (out of 11) displayed circling episodes after modTBI (none in the miTBI group). These animals were not excluded from the study but contributed to the heterogeneity of the results. Spatial memory was evaluated using the Y maze 7 days before, then 7 and 21 days post-TBI (Figure 1(d1)). As expected, mice from both groups were initially able to differentiate the new arm from the old arms (number of entries >33.33%; Figure 1(d2)). However, mice were no longer able to discriminate old arms and the newly open arm 7 days after miTBI or modTBI (respectively  $p=0.30$  and  $p=0.75$  compared to 33.33%; Figure 1(d2)). Interestingly, this deficit was only transient in the miTBI group (38.2%,  $p=0.004$  compared to 33.33% at d+21) but not in the modTBI group (35.4%,  $p=0.32$  compared to 33.33% at d+21; Figure 1(d2)).

We also evaluated the general activity of mice using the open field test (Figure 1(e1)). We found an important decrease in the total distance ( $-36\%$  d+7- and d+21 *vs* before surgery, Figure 1(e2)), the velocity ( $-37\%$  d+7 and d+21 *vs* before surgery; Figure 1(e3)), and the time in movement ( $-26\%$  and  $-28\%$  d+7 and d+21 *vs* before surgery; Figure 1(e4)) in miTBI animals 7 and 21 days after miTBI. Velocity, distance and time in movement were significantly higher in modTBI animals versus miTBI animals. We did not detect any anxiety-like behaviour, since animals did not reduce their time spent in the center of the open field after surgery (Figure 1(e5)).

Altogether, these data highlighted that this mouse model of single miTBI induces persistent behavioural deficits without any evidence of a cerebral lesion on conventional imaging.

### Mild TBI does not induce cerebrovascular inflammation

In the absence of macroscopic lesion, we suspected that subtle cerebrovascular alterations may explain these behavioural deficits. In a previous study, we found in a mouse model of transient ischemic attack, that while conventional MRI detects no damage, molecular MRI, using MPIOs targeting the adhesion molecule P-selectin, allows a sensitive detection of an area of cerebrovascular inflammation.<sup>18</sup> We postulated that miTBI could as well induce an activation of the cerebral endothelium, and we thus transposed molecular imaging of P-selectin to our model, 1, 7 or 21 days post-miTBI (Figure 2). MPIOs coated with antibodies against

P-selectin were indeed able to bind the cerebral endothelium challenged by LPS-induced inflammation (Figure S3A for molecular MRI and S3B-C for immunohistochemistry). However, ultrasensitive MRI after administration of  $\alpha$ P-selectin MPIOs in miTBI mice did not detect any positive signal on MRI 1- (Figure 2(a) and (b);  $n=4$  mice/condition), 7- or 21-days post miTBI (Figure 2(a1);  $n=6$  mice/time). Sham animals and modTBI animals did not show any P-sel signals after 1 day (Figure 2(d)). The absence of P-selectin expression was confirmed by immunohistochemistry, with all six animals per group showing no signal at all (Figure 2(e);  $n=6$  mice/time). These data coincide with the absence of any leukocyte infiltration into the brain parenchyma after miTBI (data not shown). The lack of molecular MRI signal was not due to a failure of the technique: in a model of severe TBI (Figure S3D-H),  $\alpha$ P-selectin MPIOs induced a strong signal in the ipsilateral hemisphere (Figure 2(f)), which coincides with P-selectin expression by immunohistochemistry (Figure 2(g)). The specificity of the signal obtained by molecular MRI using MPIOs conjugated to P-selectin signal was confirmed by an absence of signal using MPIOs conjugated to isotypic immunoglobulins (IgG) (Figure S3H).

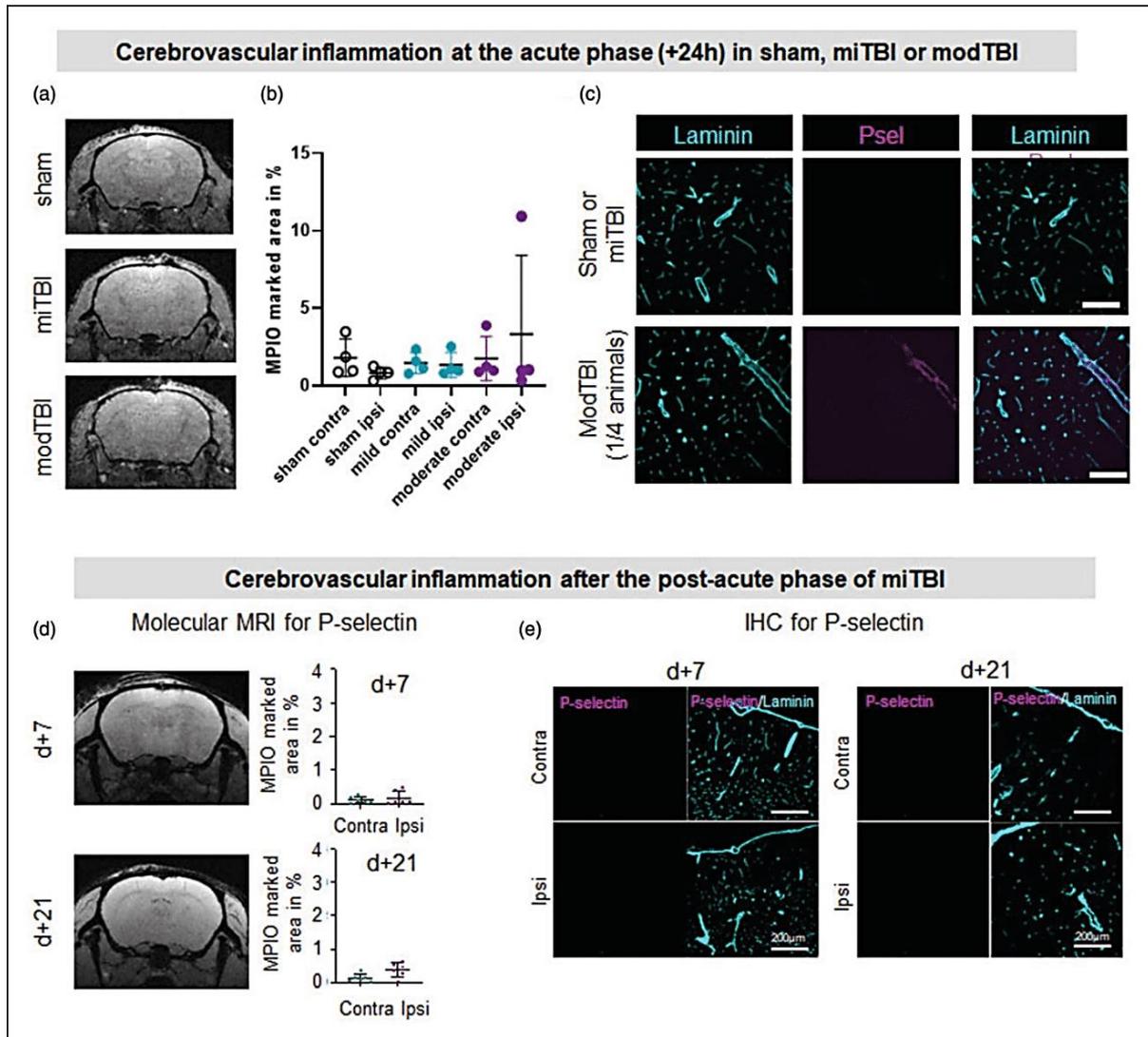
To assess blood-brain barrier (BBB) integrity, we performed stainings of fibrin/ogen and IgG. Although we could detect some positive signals for both fibrin/ogen and IgG in modTBI, we could not detect signals in miTBI (Figure S4), suggesting that the BBB integrity is unaffected by miTBI.

Altogether, these molecular MRI data show that in contrast to moderate-to-severe TBI, miTBI does not induce acute or delayed cerebrovascular inflammation.

### MicroPET imaging of TSPO unmasks neuroinflammation after mild TBI

We then took advantage of the development of radio-labeled ligands of TSPO to investigate whether miTBI induces parenchymal neuroinflammation. First, *ex vivo* autoradiography was performed with [<sup>3</sup>H]DPA-714 (Figure 3(a1)). In the cortex, we observed a significantly higher specific binding of [<sup>3</sup>H]DPA-714 in the ipsi- *vs* contralateral cortex both at 7 days ( $8.90 \pm 1.00$  *vs*  $4.64 \pm 0.22$  cpm/mm<sup>2</sup>) and 21 days ( $8.73 \pm 0.57$  *vs*  $5.52 \pm 0.34$  cpm/mm<sup>2</sup>) after miTBI (Figure 3(a2)). In the hippocampus, a significantly higher specific binding of [<sup>3</sup>H]DPA-714 was measured in the ipsi- *vs* contralateral hemisphere both at 7 days ( $10.14 \pm 0.51$  *vs*  $6.14 \pm 0.32$  cpm/mm<sup>2</sup>) and 21 days ( $10.04 \pm 0.23$  *vs*  $6.78 \pm 0.25$  cpm/mm<sup>2</sup>) after miTBI (Figure 3(a3)).

These positive *ex vivo* autoradiography studies prompted us to explore TSPO imaging *in vivo* using the fluor-18 labeled analog of DPA-714. Analyses of

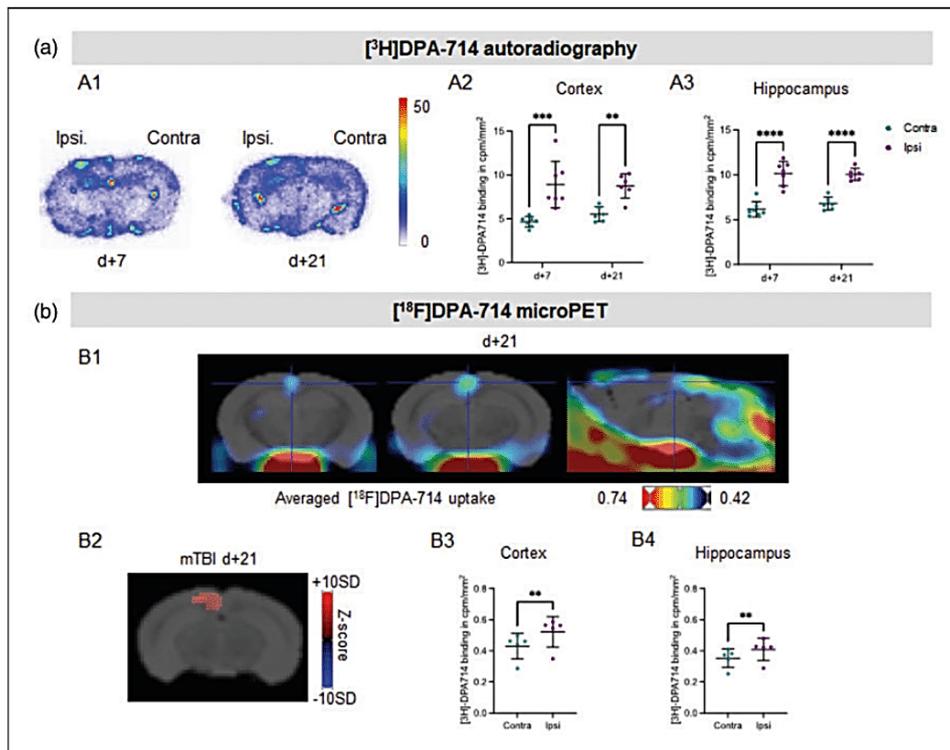


**Figure 2.** Unlike severe TBI, mild TBI does not induce cerebrovascular inflammation. (a, b) Representative T2\*-GEFC  $\alpha$ P-selectin MPIO acquisitions 24 h after sham surgery, miTBI or modTBI and their respective MPIO-marked area quantifications (n = 4 per condition). (c) Representative photomicrographs of P-selectin immunostaining 24 h after sham surgery, miTBI or modTBI (blood vessels were stained with laminin) (representative of 4 mice/group). (d) Representative T2\*-GEFC  $\alpha$ P-selectin MPIO acquisitions 7 and 21 days after miTBI and their respective MPIO-marked area quantifications and (e) Representative photomicrographs of P-selectin immunostaining 7 and 21 days after miTBI (blood vessels were stained with laminin) (n = 6 mice/group).

microPET acquisitions thus showed that the average images of [ $^{18}$ F]DPA-714 uptake detect an increased binding of the tracer in the cortex 21 days after miTBI (n = 5 mice/group; Figures 3(b1) and (b2)). The Z-score maps revealed a significant increased uptake of [ $^{18}$ F]DPA-714 in the ipsi- vs. contra-lateral cortex with a z-score value of  $6.05 \pm 1.86$  (Figure 3 (b3)). A small but significant increase in the ipsilateral uptake of [ $^{18}$ F]DPA-714 was also observed in a group of 50 voxels located in the hippocampus (z-score =  $5.74 \pm 1.32$ , Figure 3(b4)).

### *Mild TBI induces a long-lasting neuroinflammatory response in both ipsilateral cortex and hippocampus*

Since TSPO is generally considered as a marker of microglial/astroglial activation, we performed immunohistochemical analyses to support our PET findings. One day after miTBI, the number of microglial cells (Iba1+) tended to increase in the ipsilateral cortex (Figure S5A, +26% vs contralateral hemisphere), while the the number of activated microglial cells was already higher (Iba1+/CD68+) (Figure S5C, +1040%



**Figure 3.** [ $^3\text{H}$ ]DPA-714 imaging reveals long-lasting neuroinflammation induced by miTBI. (a) *Ex vivo* autoradiographic experiment. (a1) Representative coronal brain sections of [ $^3\text{H}$ ]DPA-714 autoradiography 7 days and 21 days after miTBI. (a2) Quantifications of [ $^3\text{H}$ ]DPA-714 binding in cortex and hippocampus.  $n = 7$  mice/group,  $***p < 0.001$  vs contralateral ROI; 2-way ANOVA and (b) *In vivo* microPET experiment. (b1) Representative fusion images between a MRI template and images of averaged uptake of [ $^{18}\text{F}$ ]DPA-714 in 2 coronal images (left panels), and one sagittal image (right panel). (b2) Representative coronal brain image of Z-score maps fused with a MRI template showing [ $^{18}\text{F}$ ]DPA-714 uptake.  $n = 5$  mice,  $p < 0.01$  vs contralateral ROI. (b3,4) Quantifications of [ $^{18}\text{F}$ ]DPA-714 uptake in (b3) cortex and (b4) hippocampus 21 days after miTBI.  $n = 5$  mice,  $p = 0.0015$  vs contralateral cortex;  $p = 0.0022$  vs contralateral hippocampus.

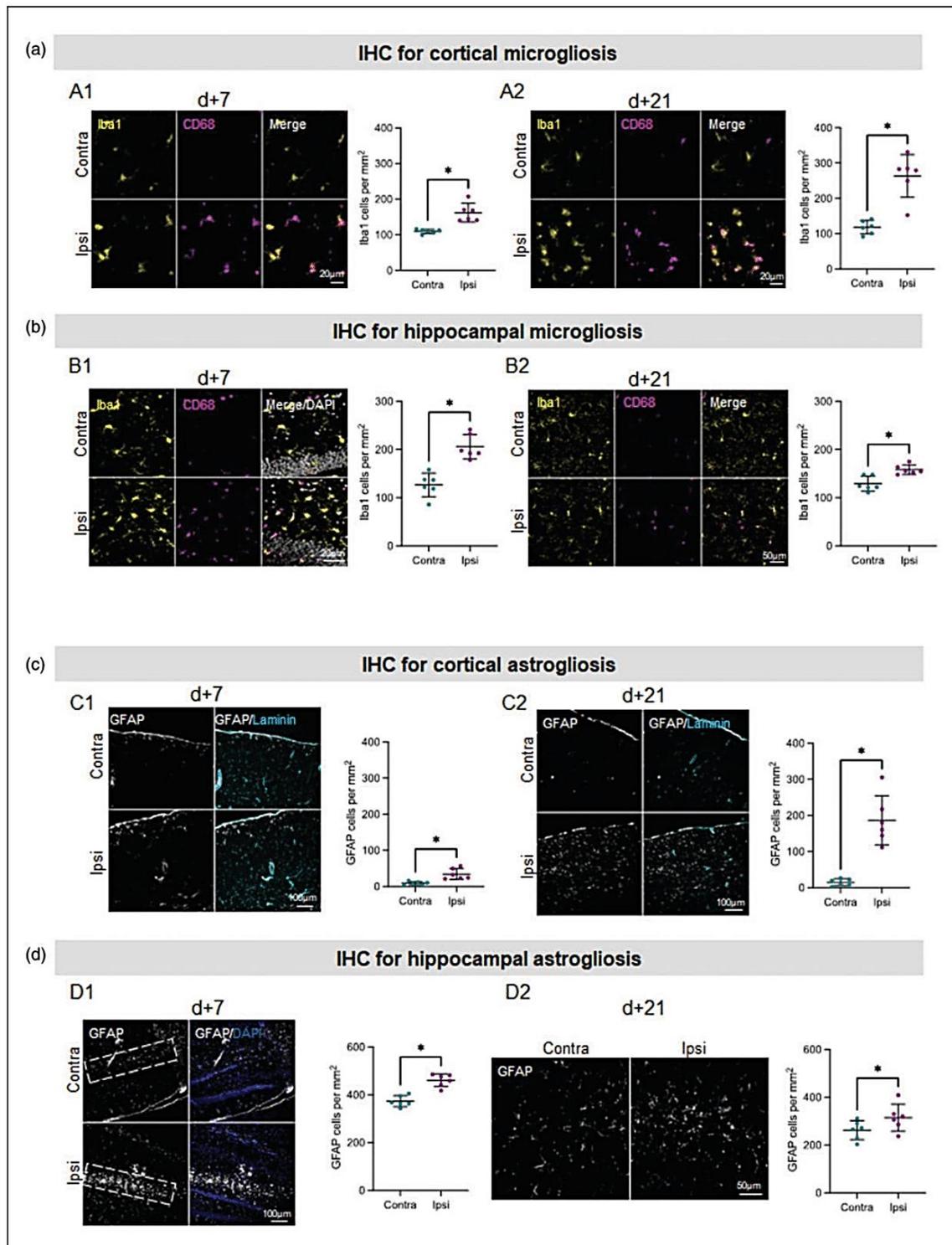
*vs* contralateral hemisphere). The number of Iba1+/CD68+ cells near blood vessels, which we identified as infiltrated/perivascular macrophages began to increase (Figure S5B, +52% *vs* contralateral hemisphere). Microglial activation as well as the proportion of infiltrated/perivascular macrophages markedly increased at both 7- and 21 days after miTBI (7 days: Figure 4(a1), respectively; +774, +148, +233% *vs* contralateral hemisphere; 21 days: Figure 4(a2) and Figure S6A-3B, respectively; +219, +755 and +239% *vs* contralateral hemisphere).

Furthermore, microglial cell number also markedly increased 7 days after miTBI in the ipsilateral hippocampus (Figure 4(b1), +163% *vs* contralateral hemisphere), as well as activated microglia and infiltrated/perivascular macrophages (Figure S6C, respectively +379 and +230% *vs* contralateral hemisphere). This increase in microglial cell numbers persisted up to 21 days after miTBI but to a lesser degree than at 7 days (Figure 4(b2), +123% *vs* contralateral hemisphere), as well as activated microglia and infiltrated/perivascular

macrophages (Figure S6C, respectively +278 and +152% *vs* contralateral hemisphere).

We also performed immunohistochemical analyses 7- and 21-days post miTBI to assess astroglial activation as another index of neuroinflammation ( $n = 6$  mice/group). We found an increase in the number of cortical GFAP positive astrocytes 7 days after miTBI (Figure 4(c1); +385% *vs* contralateral hemisphere), which was even more pronounced 21 days after miTBI (Figure 4(c2); +1218% *vs* contralateral hemisphere). There was a notable astrocytic reactivity in the hippocampus 7 days after miTBI (see dotted areas in Figure 4(d1); +123% *vs* contralateral hemisphere). Hippocampal astrocyte numbers also increased 21 days after miTBI, but less than 7 days after miTBI (Figure 4(d2); +119% *vs* contralateral hemisphere).

Taken together, these data highlight that microPET was able to detect non-apparent lesions on MRI, which were correlated with persistent microglia/astrocyte activation in both the cortex and hippocampus.



**Figure 4.** Immunohistochemistry analyses reveal long-lasting neuroinflammation induced by miTBI. (a and b) Long-lasting microgliosis induced by miTBI using Iba1 and CD68 immunostainings. (a) Cortical microgliosis. Representative photomicrographs of microglia and respective quantifications (a1) 7 days and (a2) 21 days after miTBI. (b) Hippocampal microgliosis. Representative photomicrographs of microglia and respective quantifications (b1) 7 days and (b2) 21 days after miTBI. (c,d) Mild TBI provokes a long lasting astrogliosis. (a) GFAP positive astrocytes were found in the cortex 7 days after miTBI. (b) Astrocytes were found abundantly in the cortex 21 days after miTBI. (c) GFAP positive astrocytes were found abundantly in the hippocampus 7 days after miTBI. (d) Astrocytes were found in the hippocampus 21 days after miTBI.  $n = 6$  mice/group, \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$  vs contralateral ROI, Wilcoxon paired-test.

## Discussion

The individual impact (severity of damages and cost) of patients with miTBI is lower than moderate to severe cases, but obviously, as a whole, this group of patients should not be neglected as they represent the largest contribution to the global burden of TBI<sup>1</sup>. For these patients, there is limited medical intervention for both diagnosis and acute therapy, and even less at the mid- and long-terms. However, a significant portion of miTBI patients suffers from persisting neurocognitive/psychological dysfunctions.<sup>1</sup> Furthermore, there is compelling evidence showing that patients suffering from repetitive miTBI (pediatric individuals, soldiers and sports players) develop brain abnormalities that likely explain long-term deficits.<sup>32</sup>

Here, we chose to investigate pathogenic mechanisms in a murine model of miTBI, the closed-head controlled cortical impact. This model has several advantages, including preservation of the skull and dura, and the fact that injury severity can be graded by adjusting impact depth and/or velocity.<sup>33</sup> Accordingly, we show that under a specific threshold of impact depth, conventional MRI detects neither contusion nor bleeding. Yet, animals in this case acutely lost weight, but more importantly, exhibited transient behavioural deficits in spatial memory and general activity that persist for at least after 21 days. These findings add to previous ones, that reported white and gray matter lesions associated with chronic behavioural deficits in mice subjected to opened-skull controlled cortical impact.<sup>34</sup> Collectively, these studies highlight the importance of considering patients with one single miTBI as patients with potential disabilities later in life. Risk-stratification by biomarker(s) may help predicting which patients with miTBI will develop cognitive/neurological dysfunctions.<sup>35</sup> Formerly, we developed a technique of molecular MRI targeting endothelial activation to uncover an area of inflammation in an experimental model of transient ischemic attack (another condition with no infarction on conventional imaging).<sup>18</sup> Using the same approach here, as well as a series of histological analyses, we detected cerebrovascular inflammation after moderate-to-severe TBI but not after miTBI. This indicates that therapeutic interventions focusing on cerebrovascular inflammation and leukocyte recruitment may be relevant to moderate-severe TBI,<sup>17,36</sup> but not to miTBI patients. By contrast, we found that one single miTBI induces a marked persistent parenchymal inflammatory response (microgliosis and astrogliosis), up to 3 weeks post injury, consistent with histological observations on human biopsies.<sup>37</sup> TBI has extensively been associated with microglial activation.<sup>38,39</sup> It also has been shown in another model of miTBI consisting on

compressing the thinned-skull bone, microglia can become activated.<sup>40</sup> Although one could argue that Iba1 is not a specific marker for microglial cells as it can also reflect infiltrating monocytes,<sup>38</sup> the absence of cerebrovascular inflammation in our model suggests that Iba1 staining mostly corresponds to microglia. Moreover, plasmatic levels of GFAP have been suggested to be a strong predictor/surrogate marker of miTBI severity, which also supports the idea that neuroinflammation is a key player after miTBI.<sup>41</sup> Considering its spatio-temporal profile, the neuroinflammatory response elicited in the present model of miTBI may participate in the functional deficits we observed, as previously shown in other mouse models of TBI.<sup>42–45</sup> Notably, the inflammatory response in our miTBI model occurred not only immediately underneath the biomechanical impact (i.e., at the cortical level), but also deeper in the brain, in the hippocampus, a structure well-known to control key memory processes. It would be very interesting to explore how manipulation of this inflammatory response could affect the persistent behavioural deficits. Indeed, anti-inflammatory treatments after TBI has shown some promising results, in both preclinical and clinical studies.<sup>46–48</sup>

Based on the higher frequency of TBI in men than in women, we performed our studies in male mice. It could be interesting to extend our work to females, as sex-related differences have been well documented in (neuro)inflammatory responses, including in intrinsic properties of microglial cells.<sup>49</sup>

Compared to fluid biomarkers, imaging biomarkers have the advantage to shed light on the brain pathogenic mechanisms recruited, and this at the spatial level. For instance, SPECT and PET studies have been performed to investigate regional perfusion and metabolic disturbances after miTBI.<sup>50</sup> TSPO imaging stands as an interesting approach, considering the great number of available radiotracers compatible with the clinical setting. With TSPO imaging, Coughlin and colleagues have provided alarming data showing that repetitive miTBI in NFL players induce a significant neuroinflammatory response, which may relate to brain dysfunctions.<sup>51</sup> Higher TSPO signals have also been reported even long after single events of moderate and severe TBI.<sup>13,52</sup> Finally, a recent study with the TSPO tracer [<sup>18</sup>F]PBR111 has suggested that combining PET and DTI could help predicting long term functional outcome after moderate TBI.<sup>53</sup> Altogether, these clinical observations pledge for the interest of TPSP imaging, but to our knowledge, no data is yet available for patients after a single mild TBI.

TSPO imaging in experimental models has largely confirmed the occurrence of an extensive neuroinflammatory response after moderate or severe TBI.<sup>54–58</sup>

Regarding mTBI, a previous microPET study did not report a higher brain uptake of [<sup>18</sup>F]DPA-714<sup>58</sup>. By contrast, we were able to detect a long-lasting increased signal in the ipsilateral hemisphere in our closed-head mild TBI model, both *ex vivo* (autoradiography with [<sup>3</sup>H]DPA-714) and *in vivo* (microPET with [<sup>18</sup>F]DPA-714). Thanks to its higher resolution compared to microPET, autoradiography suggested the occurrence of neuroinflammation both at the cortical and hippocampal levels. This was further supported by our immunostainings, reporting a strong and persisting microglial activation in the cortex and hippocampus. While microglia, astrocytes and endothelial cells may all be able to produce TSPO,<sup>59</sup> our immunohistochemical and molecular imaging analyses suggest that the PET signals we observed originated from glial, but not endothelial responses.

In conclusion, we provide a solid proof of concept that one single mild TBI can induce long-lasting behavioural deficits, as well as a neuroinflammatory response, despite no lesion detectable by conventional imaging techniques. As revealed by our microPET study, we propose that patients with mTBI and persistent cognitive abnormalities could suffer from neuroinflammatory responses, possibly at the origin of functional sequelae.

## Abbreviations

CCI: controlled cortical impact; CSF: cerebrospinal fluid; GFAP: glial fibrillary acid protein; Iba1: Iodinated calcium-binding adapter molecule-1; LPS: lipopolysaccharide; MPIO: Microparticle of iron oxide; MRI: magnetic resonance imaging; MSME: multi-spin multi-echo; mTBI: mild traumatic brain injury; PET: positron emission tomography; SPECT: single photon emission computed tomography; TBI: traumatic brain injury; TSPO: translocator protein; USPIO: ultra-small particles of iron oxide; VCAM-1: vascular cell adhesion molecule-1

## Funding

The author(s) disclosed receipt of the following financial support for the research, authorship, and/or publication of this article: This work was supported by Institut National de la Santé Et de la Recherche Médicale (INSERM), Caen Normandy University (UNICAEN), Institut pour la Recherche sur la Moelle épinière et l'Encéphale (IRME), Union Nationale des Associations de Familles de Traumatisés crâniens et de Cérébro-lésés (UNAFTC), and by Labex IRON (ANR-11-LABX-18-01).

## Acknowledgements

We are grateful to Julie Busson for technical assistance.

## Declaration of conflicting interests

The author(s) declared no potential conflicts of interest with respect to the research, authorship, and/or publication of this article.

## Authors' contributions

Designed the study (AD, SC, DV, CA), performed experiments (AD, AL, PP, ZG, SP, GV, DT, SS, JV, DL, BK, CA), analysed data (AD, AL, ZG, GV, SS, LG, CT, EZ), drafted the manuscript (AD, AL, LG, MR, EZ, SC, DV, CA).

## ORCID iD

Damien Levard  <https://orcid.org/0000-0002-7275-3170>

## Supplemental material

Supplemental material for this article is available online.

## References

1. Maas AIR, Menon DK, Adelson PD, et al. Traumatic brain injury: integrated approaches to improve prevention, clinical care, and research. *Lancet Neurol* 2017; 16: 987–1048.
2. Dewan MC, Rattani A, Gupta S, et al. Estimating the global incidence of traumatic brain injury. *J Neurosurg* 2019; 130: 1080–1097.
3. Teasdale G and Jennett B. Assessment of coma and impaired consciousness: a practical scale. *The Lancet* 1974; 304: 81–84.
4. Cruz-Haces M, Tang J, Acosta G, et al. Pathological correlations between traumatic brain injury and chronic neurodegenerative diseases. *Transl Neurodegener* 2017; 6: 20.
5. Gardner RC and Yaffe K. Epidemiology of mild traumatic brain injury and neurodegenerative disease. *Mol Cell Neurosci* 2015; 66: 75–80.
6. Perry DC, Sturm VE, Peterson MJ, et al. Association of traumatic brain injury with subsequent neurological and psychiatric disease: a meta-analysis. *JNS* 2016; 124: 511–526.
7. Madsen T, Erlangsen A, Orlovskaya S, et al. Association between traumatic brain injury and risk of suicide. *JAMA* 2018; 320: 580–588.
8. Stein MB, Jain S, Giacino JT, et al. Risk of posttraumatic stress disorder and major depression in civilian patients after mild traumatic brain injury: a TRACK-TBI study. *JAMA Psychiatry* 2019; 76: 249–258.
9. Jassam YN, Izzy S, Whalen M, et al. Neuroimmunology of traumatic brain injury: time for a paradigm shift. *Neuron* 2017; 95: 1246–1265.
10. Zinnhardt B, Wiesmann M, Honold L, et al. In vivo imaging biomarkers of neuroinflammation in the development and assessment of stroke therapies – towards clinical translation. *Theranostics* 2018; 8: 2603–2620.
11. Dani M, Wood M, Mizoguchi R, et al. Microglial activation correlates in vivo with both tau and amyloid in Alzheimer's disease. *Brain* 2018; 141: 2740–2754.

12. Hagens MH, Killestein J, Yaqub MM, et al. Cerebral rituximab uptake in multiple sclerosis: a <sup>89</sup>Zr-immunoPET pilot study. *Mult Scler* 2018; 24: 543–545.
13. Ramlackhansingh AF, Brooks DJ, Greenwood RJ, et al. Inflammation after trauma: microglial activation and traumatic brain injury. *Ann Neurol* 2011; 70: 374–383.
14. Gauberti M, Fournier AP, Docagne F, et al. Molecular magnetic resonance imaging of endothelial activation in the central nervous system. *Theranostics* 2018; 8: 1195–1212.
15. Fournier AP, Quenault A, Lizarrondo SM, et al. Prediction of disease activity in models of multiple sclerosis by molecular magnetic resonance imaging of P-selectin. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2017; 114: 6116–6121.
16. Gauberti M, Montagne A, Marcos-Contreras OA, et al. Ultra-sensitive molecular MRI of vascular cell adhesion molecule-1 reveals a dynamic inflammatory penumbra after strokes. *Stroke* 2013; 44: 1988–1996.
17. Vegliante G, Tolomeo D, Drieu A, et al. Longitudinal molecular magnetic resonance imaging of endothelial activation after severe traumatic brain injury. *JCM* 2019; 8: 1134.
18. Quenault A, Martinez de Lizarrondo S, Etard O, et al. Molecular magnetic resonance imaging discloses endothelial activation after transient ischaemic attack. *Brain* 2017; 140: 146–157.
19. Percie Du Sert N, Hurst V, Ahluwalia A, et al. The ARRIVE guidelines 2.0: updated guidelines for reporting animal research. *J Cereb Blood Flow Metab* 2020; 40: 1769–1777.
20. Brody DL, Mac Donald C, Kessens CC, et al. Electromagnetic controlled cortical impact device for precise, graded experimental traumatic brain injury. *J Neurotrauma* 2007; 24: 657–673.
21. Zanier ER, Bertani I, Sammali E, et al. Induction of a transmissible tau pathology by traumatic brain injury. *Brain* 2018; 141: 2685–2699.
22. Toyama K, Spin JM, Abe Y, et al. Controlled isoflurane anesthesia exposure is required for reliable behavioral testing in murine surgical models. *J Pharmacol Sci* 2019; 140: 106–108.
23. Yasko JR, Moss IL and Mains RE. Transcriptional profiling of non-injured nociceptors after spinal cord injury reveals diverse molecular changes. *Front Mol Neurosci* 2019; 12: 284.
24. Obiang P, Macrez R, Jullienne A, et al. GluN2D subunit-containing NMDA receptors control tissue plasminogen activator-mediated spatial memory. *J Neurosci* 2012; 32: 12726–12734.
25. Pruvost M, Lépine M, Leonetti C, et al. ADAMTS-4 in oligodendrocytes contributes to myelination with an impact on motor function. *Glia* 2017; 65: 1961–1975.
26. Prut L and Belzung C. The open field as a paradigm to measure the effects of drugs on anxiety-like behaviors: a review. *Eur J Pharmacol* 2003; 463: 3–33.
27. Damont A, Garcia-Argote S, Buisson DA, et al. Efficient tritiation of the translocator protein (18 kDa) selective ligand DPA-714. *J Labelled Comp Radiopharm* 2015; 58: 1–6.
28. Foucault-Fruchard L, Doméné A, Page G, et al. Neuroprotective effect of the alpha 7 nicotinic receptor agonist PHA 543613 in an in vivo excitotoxic adult rat model. *Neuroscience* 2017; 356: 52–63.
29. Sérrière S, Tauber C, Vercouillie J, et al. Amyloid load and translocator protein 18 kDa in APP<sup>swe</sup>PS1-dE9 mice: a longitudinal study. *Neurobiol Aging* 2015; 36: 1639–1652.
30. Carasso AS. Linear and nonlinear image deblurring: a documented study. *SIAM J Numer Anal* 1999; 36: 1659–1689.
31. Mirrione MM, Schiffer WK, Fowler JS, et al. A novel approach for imaging brain-behavior relationships in mice reveals unexpected metabolic patterns during seizures in the absence of tissue plasminogen activator. *NeuroImage* 2007; 38: 34–42.
32. Fehily B and Fitzgerald M. Repeated mild traumatic brain injury: potential mechanisms of damage. *Cell Transplant* 2017; 26: 1131–1155.
33. Ren Z, Iliff JJ, Yang L, et al. ‘Hit & run’ model of closed-skull traumatic brain injury (TBI) reveals complex patterns of post-traumatic AQP4 dysregulation. *J Cereb Blood Flow Metab* 2013; 33: 834–845.
34. Leconte C, Benedetto C, Lentini F, et al. Histological and behavioral evaluation after traumatic brain injury in mice: a ten months follow-up study. *J Neurotrauma* 2020; 37: 1342–1357.
35. Sharma R, Rosenberg A, Bennett ER, et al. A blood-based biomarker panel to risk-stratify mild traumatic brain injury. *Plos ONE* 2017; 12: e0173798.
36. Needham EJ, Helmy A, Zanier ER, et al. The immunological response to traumatic brain injury. *J Neuroimmunol* 2019; 332: 112–125.
37. Engel S, Schluesener H, Mittelbronn M, et al. Dynamics of microglial activation after human traumatic brain injury are revealed by delayed expression of macrophage-related proteins MRP8 and MRP14. *Acta Neuropathol* 2000; 100: 313–322.
38. Willis EF, MacDonald KPA, Nguyen QH, et al. Repopulating microglia promote brain repair in an IL-6-dependent manner. *Cell* 2020; 180: 833–846.e16.
39. Witcher KG, Bray CE, Chunchai T, et al. Traumatic brain injury causes chronic cortical inflammation and neuronal dysfunction mediated by microglia. *J Neurosci* 2021; 41: 1597–1616.
40. Roth TL, Nayak D, Atanasijevic T, et al. Transcranial amelioration of inflammation and cell death after brain injury. *Nature* 2014; 505: 223–228.
41. Gill J, Latour L, Diaz-Arrastia R, et al. Glial fibrillary acidic protein elevations relate to neuroimaging abnormalities after mild TBI. *Neurology* 2018; 91: e1385–e1389.
42. Caplan HW, Cardenas F, Gudenkauf F, et al. Spatiotemporal distribution of microglia after traumatic brain injury in male mice. *ASN Neuro* 2020; 12: 1759091420911770.
43. Henry RJ, Ritzel RM, Barrett JP, et al. Microglial depletion with CSF1R inhibitor during chronic phase of experimental traumatic brain injury reduces neurodegeneration and neurological deficits. *J Neurosci* 2020; 40: 2960–2974.



# Bibliographie

## A

- Abbott, N. J., Rönnbäck, L., & Hansson, E. (2006). Astrocyte–endothelial interactions at the blood–brain barrier. *Nature Reviews Neuroscience* 2006 7:1, 7(1), 41–53. <https://doi.org/10.1038/nrn1824>
- Adams, H. P., Bendixen, B. H., Kappelle, J., L Jaap, Biller, J., Love, B. B., David, J., Gordon, L., Eugene, J., & Lii, M. (1993). *Classification of Subtype of Acute Ischemic Stroke Definitions for Use in a Multicenter Clinical Trial*.
- Adhami, F., Liao, G., Morozov, Y. M., Schloemer, A., Schmithorst, V. J., Lorenz, J. N., Dunn, R. S., Vorhees, C. V., Wills-Karp, M., Degen, J. L., Davis, R. J., Mizushima, N., Rakic, P., Dardzinski, B. J., Holland, S. K., Sharp, F. R., & Kuan, C. Y. (2006). Cerebral Ischemia-Hypoxia Induces Intravascular Coagulation and Autophagy. *The American Journal of Pathology*, 169(2), 566. <https://doi.org/10.2353/AJPATH.2006.051066>
- Akassoglou, K., Kombrinck, K. W., Degen, J. L., & Strickland, S. (2000). Tissue Plasminogen Activator–Mediated Fibrinolysis Protects against Axonal Degeneration and Demyelination after Sciatic Nerve Injury. *The Journal of Cell Biology*, 149(5), 1157. <https://doi.org/10.1083/JCB.149.5.1157>
- Alamowitch, S., Turc, G., Palaiodimou, L., Bivard, A., Cameron, A., De Marchis, G. M., Fromm, A., Kõrv, J., Roaldsen, M. B., Katsanos, A. H., & Tsvigoulis, G. (2023). European Stroke Organisation (ESO) expedited recommendation on tenecteplase for acute ischaemic stroke. *European Stroke Journal*, 8(1), 8–54. <https://doi.org/10.1177/23969873221150022>
- Alia, C., Spalletti, C., Lai, S., Panarese, A., Micera, S., & Caleo, M. (2016). Reducing GABAA-mediated inhibition improves forelimb motor function after focal cortical stroke in mice. *Scientific Reports*, 6. <https://doi.org/10.1038/SREP37823>
- Alves, S., Bode, J., Bemelmans, A. P., Von Kalle, C., Cartier, N., & Tews, B. (2016). Ultramicroscopy as a novel tool to unravel the tropism of AAV gene therapy vectors in the brain. *Scientific Reports* 2016 6:1, 6(1), 1–12. <https://doi.org/10.1038/srep28272>
- Andrabi, S. S., Parvez, S., & Tabassum, H. (2020). Ischemic stroke and mitochondria: mechanisms and targets. *Protoplasma*, 257(2), 335–343. <https://doi.org/10.1007/S00709-019-01439-2>
- Andral, G. (1845). *Essai d'hématologie pathologique*.

- Anfray, A., Drieu, A., Hingot, V., Hommet, Y., Yetim, M., Rubio, M., Deffieux, T., Tanter, M., Orset, C., & Vivien, D. (2020). Circulating tPA contributes to neurovascular coupling by a mechanism involving the endothelial NMDA receptors. *Journal of Cerebral Blood Flow and Metabolism*, *40*(10), 2038–2054. <https://doi.org/10.1177/0271678X19883599>
- Angles-Cano, E., Balaton, A., Le Bonniec, B., Genot, E., Elion, J., & Sultan, Y. (1985). Production of Monoclonal Antibodies to the High Fibrin-Affinity, Tissue-Type Plasminogen Activator of Human Plasma. Demonstration of Its Endothelial Origin by Immunolocalization. *Blood*, *66*(4), 913–920. <https://doi.org/10.1182/BLOOD.V66.4.913.913>
- Ankam, S., Teo, B. K. K., Pohan, G., Ho, S. W. L., Lim, C. K., & Yim, E. K. F. (2018). Temporal Changes in Nucleus Morphology, Lamin A/C and Histone Methylation During Nanotopography-Induced Neuronal Differentiation of Stem Cells. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, *6*(MAY). <https://doi.org/10.3389/FBIOE.2018.00069>
- Ansari, A. M., Ahmed, A. K., Matsangos, A. E., Lay, F., Born, L. J., Marti, G., Harmon, J. W., & Sun, Z. (2016). Cellular GFP Toxicity and Immunogenicity: Potential Confounders in in Vivo Cell Tracking Experiments. *Stem Cell Reviews*, *12*(5), 553. <https://doi.org/10.1007/S12015-016-9670-8>
- Armstead, W. M., Cines, D. B., & Higazi, A. A. R. (2004). Altered NO Function Contributes to Impairment of uPA and tPA Cerebrovasodilation after Brain Injury. *https://Home.Liebertpub.Com/Neu*, *21*(9), 1204–1211. <https://doi.org/10.1089/NEU.2004.21.1204>
- Astrup, T., & Stage, A. (1952). Isolation of a soluble fibrinolytic activator from animal tissue. *Nature*, *170*(4335), 929. <https://doi.org/10.1038/170929A0>

## B

- Badaut, J., Ashwal, S., Tone, B., Regli, L., Tian, H. R., & Obenaus, A. (2007). Temporal and Regional Evolution of Aquaporin-4 Expression and Magnetic Resonance Imaging in a Rat Pup Model of Neonatal Stroke. *Pediatric Research* *2007* *62*:3, *62*(3), 248–254. <https://doi.org/10.1203/pdr.0b013e3180db291b>
- Bandera, E., Botteri, M., Minelli, C., Sutton, A., Abrams, K. R., Stat, C., & Latronico, N. (2006). *Cerebral Blood Flow Threshold of Ischemic Penumbra and Infarct Core in Acute Ischemic Stroke A Systematic Review*. <https://doi.org/10.1161/01.STR.0000217418.29609.22>

- Banerjee, C., Moon, Y. P., Myunghee, Paik, C., Rundek, T., Mora-Mclaughlin, C., Vieira, J. R., Sacco, R. L., & Elkind, M. S. V. (2012). *Duration of Diabetes and Risk of Ischemic Stroke the Northern Manhattan Study*. <https://doi.org/10.1161/STROKEAHA.111.641381>
- Bányai, L., Váradi, A., & Patthy, L. (1983). Common evolutionary origin of the fibrin-binding structures of fibronectin and tissue-type plasminogen activator. *FEBS Letters*, *163*(1), 37–41. [https://doi.org/10.1016/0014-5793\(83\)81157-0](https://doi.org/10.1016/0014-5793(83)81157-0)
- Baranes, D., Lederfein, D., Huang, V. 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*, *27*(4), 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 and Differentiation*, *17*(5), 860–871. <https://doi.org/10.1038/CDD.2009.172>
- 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*(17), 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. *Journal of Cell Science*, *120*(Pt 4), 578–585. <https://doi.org/10.1242/JCS.03354>
- Berkhemer, O., Fransen, P., Beumer, D., van den Berg, L., Lingsma, H., Yoo, A., Schonewille, W., Vos, J., Nederkoorn, P., Wermer, M., van Walderveen, M., Staals, J., Hofmeijer, J., van Oostayen, J., Lycklama à Nijeholt, G., Boiten, J., Brouwer, P., Emmer, B., de Bruijn, S., ... con-, D. (2015). A Randomized Trial of Intraarterial Treatment for Acute Ischemic Stroke. *N Engl J Med*, *372*, 11–20. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1411587>
- 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. *Nature Publishing Group*, 1–9. <https://doi.org/10.1038/cddis.2015.296>

- Bicknell, G. R., & Cohen, G. M. (1995). Cleavage of DNA to large kilobase pair fragments occurs in some forms of necrosis as well as apoptosis. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 207(1), 40–47. <https://doi.org/10.1006/BBRC.1995.1150>
- Binder, B. R., Spragg, J., & Austen, K. F. (1978). Purification and characterization of human vascular plasminogen activator derived from blood vessel perfusates. *The Journal of Biological Chemistry*, 254(6).
- Boehme, A. K., Esenwa, C., Elkind, M. S. V, Fisher, M., Iadecola, C., & Sacco, R. (2017). Stroke Risk Factors, Genetics, and Prevention. *Circulation Research*, 120(3), 472–495. <https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.116.308398>
- Booker, S. A., & Wyllie, D. J. A. (2021). Invited review NMDA receptor function in inhibitory neurons. *Neuropharmacology*, 196, 108609. <https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2021.108609>
- Boulaftali, Y., Ho-Tin-Noe, B., Pena, A., Loyau, S., Venisse, L., François, D., Richard, B., Arocas, V., Collet, J. P., Jandrot-Perrus, M., & Bouton, M. C. (2011). Platelet protease nexin-1, a serpin that strongly influences fibrinolysis and thrombolysis. *Circulation*, 123(12), 1326–1334. <https://doi.org/10.1161/CIRCULATIONAHA.110.000885>
- Bouton, M.-C., Boulaftali, Y., Richard, B., Ronique Arocas, V., Michel, J.-B., & Jandrot-Perrus, M. (2012). *Emerging role of serpinE2/protease nexin-1 in hemostasis and vascular biology*. <https://doi.org/10.1182/blood>
- Bradbury, E. J., Moon, L. D. F., Popat, R. J., King, V. R., Bennett, G. S., Patel, P. N., Fawcett, J. W., & McMahon, S. B. (2002). Chondroitinase ABC promotes functional recovery after spinal cord injury. *Nature*, 416(6881), 636–640. <https://doi.org/10.1038/416636A>
- Bruick, R. K. (2000). Expression of the gene encoding the proapoptotic Nip3 protein is induced by hypoxia. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 97(16), 9082–9087. <https://doi.org/10.1073/PNAS.97.16.9082>
- 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  $\beta$ 1. *The FASEB Journal*, 12(15), 1683–1691. <https://doi.org/10.1096/FASEBJ.12.15.1683>
- Bukhari, N., Torres, L., Robinson, J. K., & Tsirka, S. E. (2011). Axonal Regrowth after Spinal Cord Injury via Chondroitinase and the Tissue Plasminogen Activator (tPA)/Plasmin System. *Journal of Neuroscience*, 31(42), 14931–14943. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.3339-11.2011>

Bycroft, C., Freeman, C., Petkova, D., Band, G., Elliott, L. T., Sharp, K., Motyer, A., Vukcevic, D., Delaneau, O., O'Connell, J., Cortes, A., Welsh, S., Young, A., Effingham, M., McVean, G., Leslie, S., Allen, N., Donnelly, P., & Marchini, J. (2018). The UK Biobank resource with deep phenotyping and genomic data. *Nature* 2018 562:7726, 562(7726), 203–209. <https://doi.org/10.1038/s41586-018-0579-z>

## C

Caillard, O., Moreno, H., Schwaller, B., Llano, I., Celio, M. R., & Marty, A. (2000). Role of the calcium-binding protein parvalbumin in short-term synaptic plasticity. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 97(24), 13372. <https://doi.org/10.1073/PNAS.230362997>

Cai, Y., Yang, E., Yao, X., Zhang, X., Wang, Q., Wang, Y., Liu, J., Fan, W., Yi, K., Kang, C., & Wu, J. (2021). FUNDC1-dependent mitophagy induced by tPA protects neurons against cerebral ischemia-reperfusion injury. *Redox Biology*, 38. <https://doi.org/10.1016/J.REDOX.2020.101792>

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. *European Journal of Neuroscience*, 12(3), 1002–1012. <https://doi.org/10.1046/J.1460-9568.2000.00991.X>

Campbell, B. C. V., De Silva, D. A., Macleod, M. R., Coutts, S. B., Schwamm, L. H., Davis, S. M., & Donnan, G. A. (2019). Ischaemic stroke. *Nature Reviews Disease Primers*, 5(1). <https://doi.org/10.1038/S41572-019-0118-8>

Carloni, S., Riparini, G., Buonocore, G., & Balduini, W. (2017). Rapid modulation of the silent information regulator 1 by melatonin after hypoxia-ischemia in the neonatal rat brain. *Journal of Pineal Research*, 63(3). <https://doi.org/10.1111/JPI.12434>

Carmichael, S. T. (2012). Brain excitability in stroke: the yin and yang of stroke progression. *Archives of Neurology*, 69(2), 161–167. <https://doi.org/10.1001/ARCHNEUROL.2011.1175>

Carmona, P., Mendez, N., Ili, C. G., & Brebi, P. (2020). The Role of Clock Genes in Fibrinolysis Regulation: Circadian Disturbance and Its Effect on Fibrinolytic Activity. *Frontiers in Physiology*, 11, 129. <https://doi.org/10.3389/FPHYS.2020.00129>

- Cassé, F., Bardou, I., Danglot, L., Briens, A., Montagne, A., Parcq, J., Alahari, A., Galli, T., Vivien, D., & Docagne, F. (2012). Glutamate Controls tPA Recycling by Astrocytes, Which in Turn Influences Glutamatergic Signals. *The Journal of Neuroscience*, 32(15), 5186. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.5296-11.2012>
- Centonze, D., Saulle, E., Pisani, A., Bonsi, P., Tropepi, D., Bernardi, G., & Calabresi, P. (2002). Tissue plasminogen activator is required for striatal post-ischemic synaptic potentiation. *Neuroreport*, 13(1), 115–118. <https://doi.org/10.1097/00001756-200201210-00027>
- Chalet, L., Boutelier, T., Christen, T., Raguene, D., Debatisse, J., Eker, O. F., Becker, G., Nighoghossian, N., Cho, T. H., Canet-Soulas, E., Wildgruber, M., Reidler, P., Mechtouff, L., Chalet, L., Boutelier, T., Christen, T., Raguene, D., Debatisse, J., Faruk Eker, O., ... Canet-Soulas, E. (2022). Clinical Imaging of the Penumbra in Ischemic Stroke: From the Concept to the Era of Mechanical Thrombectomy. *Frontiers in Cardiovascular Medicine* | *Www.Frontiersin.Org*, 9, 861913. <https://doi.org/10.3389/fcvm.2022.861913>
- Chandler, W. L., Alessi, M. C., Aillaud, M. F., Henderson, P., Vague, P., & Juhan-Vague, I. (1997). Clearance of tissue plasminogen activator (TPA) and TPA/plasminogen activator inhibitor type 1 (PAI-1) complex: relationship to elevated TPA antigen in patients with high PAI-1 activity levels. *Circulation*, 96(3), 761–768. <https://doi.org/10.1161/01.CIR.96.3.761>
- Chevilly, A., Lesept, F., Lenoir, S., Ali, C., Parcq, J., & Vivien, D. (2015). Impacts of tissue-type plasminogen activator(tPA) on neuronal survival. *Frontiers in Cellular Neuroscience*, 9(OCTOBER). <https://doi.org/10.3389/fncel.2015.00415>
- Chobanian, A. V, Bakris, G. L., Black, H. R., Cushman, W. C., Green, L. A., Izzo, J. L., Jones, D. W., Materson, B. J., Oparil, S., Wright, J. T., & Roccella, E. J. (2003). SEVENTH REPORT OF THE JOINT NATIONAL COMMITTEE ON PREVENTION, DETECTION, EVALUATION, AND TREATMENT OF HIGH BLOOD PRESSURE. <https://doi.org/10.1161/01.HYP.0000107251.49515.c2>
- Christensen, L. R., & Macleod, C. M. (1945). A PROTEOLYTIC ENZYME OF SERUM: CHARACTERIZATION, ACTIVATION, AND REACTION WITH INHIBITORS. *The Journal of General Physiology*, 28(6), 559–583. <https://doi.org/10.1085/JGP.28.6.559>
- Chu, P., Chen, E., Bajnath, A., & Brumberg, J. C. (2015). Cell type specificity of tissue plasminogen activator in the mouse barrel cortex. *Data in Brief*, 4, 332. <https://doi.org/10.1016/J.DIB.2015.06.008>

- Clarkson, A. N., Huang, B. S., MacIsaac, S. E., Mody, I., & Carmichael, S. T. (2010). Reducing excessive GABA-mediated tonic inhibition promotes functional recovery after stroke. *Nature* 2010 468:7321, 468(7321), 305–309. <https://doi.org/10.1038/nature09511>
- Collen, D., & Lijnen, H. (1991). Basic and Clinical Aspects of Fibrinolysis and Thrombolysis. *Blood*, 78(12), 3114–3124. <https://doi.org/10.1182/BLOOD.V78.12.3114.3114>
- Collingridge, G. L., Peineau, S., Howland, J. G., & Wang, Y. T. (2010). Long-term depression in the CNS. *Nature Reviews. Neuroscience*, 11(7), 459–473. <https://doi.org/10.1038/NRN2867>
- Cornez, G., Ter Haar, S. M., Cornil, C. A., & Balthazart, J. (2015). Anatomically discrete sex differences in neuroplasticity in zebra finches as reflected by perineuronal nets. *PloS One*, 10(4). <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PONE.0123199>
- 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(6), 1229. <https://doi.org/10.1084/JEM.20101880>
- Crippa, M. P. (2007). Urokinase-type plasminogen activator. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 39(4), 690–694. <https://doi.org/10.1016/J.BIOCEL.2006.10.008>
- Cruz-Flores, S., Rabinstein, A., Biller, J., Elkind, M. S. V, Griffith, P., Gorelick, P. B., Howard, G., Leira, E. C., Morgenstern, L. B., Ovbiagele, B., Peterson, E., Rosamond, W., Trimble, B., & Valderrama, A. L. (2011). *AHA/ASA Scientific Statement Racial-Ethnic Disparities in Stroke Care: The American Experience Council on Cardiovascular Nursing, Council on Epidemiology and Prevention, and Council on Quality of Care and Outcomes Research*. <https://doi.org/10.1161/STR.0b013e3182213e24>

## D

- D'Anna, L., Dolkar, T., Vittay, O., Dixon, L., Foschi, M., Russo, M., Levee, V., Bentley, P., Brown, Z., Hall, C., Halse, O., Jamil, S., Jenkins, H., Kalladka, D., Kwan, J., Malik, A., Patel, M., Rane, N., Roi, D., ... Investigators, the I. S. T. (2023). Comparison of Drip-and-Ship Versus Mothership Delivery Models of Mechanical Thrombectomy Delivery. *Stroke: Vascular and Interventional Neurology*, 3(2). <https://doi.org/10.1161/SVIN.122.000690>
- Dastre, A. (1893). Fibrinolyse dans le sang. *Arch Norm Pathol*, 5, 661–673.

- De Lizarrondo, S. M., Gakuba, C., Herbig, B. A., Repessé, Y., Ali, C., Denis, C. V., Lenting, P. J., Touzé, E., Diamond, S. L., Vivien, D., & Gauberti, M. (2017). Potent thrombolytic effect of N-Acetylcysteine on arterial thrombi. *Circulation*, *136*(7), 646. <https://doi.org/10.1161/CIRCULATIONAHA.117.027290>
- Denis, P.-S. (1799-1863). A. du texte. (1838). *Essai sur l'application de la chimie à l'étude physiologique du sang de l'homme et à l'étude physiologico-pathologique, hygiénique et thérapeutique des maladies de cette humeur: ouvrage présenté à l'Académie des sciences, le 2 janvier 1838 / par P.-S. Denis*, <https://gallica.bnf.fr/ark:/12148/bpt6k91987f>
- Denys, J., & De Marbraix, H. (1889). Les peptonisations provoquées par le chloroforme. *Cellule*, *5*, 197–251.
- Devienne, G., Picaud, S., Cohen, I., Piquet, J., Tricoire, L., Testa, D., Di Nardo, A. A., Rossier, J., Cauli, B., & Lambolez, B. (2021). Regulation of Perineuronal Nets in the Adult Cortex by the Activity of the Cortical Network. *The Journal of Neuroscience*, *41*(27), 5779. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.0434-21.2021>
- Dichgans, M., Pulit, S. L., & Rosand, J. (2019). Stroke genetics: discovery, biology, and clinical applications. *The Lancet. Neurology*, *18*(6), 587–599. [https://doi.org/10.1016/S1474-4422\(19\)30043-2](https://doi.org/10.1016/S1474-4422(19)30043-2)
- Dingess, P. M., Harkness, J. H., Slaker, M., Zhang, Z., Wulff, S. S., Sorg, B. A., & Brown, T. E. (2018). Consumption of a High-Fat Diet Alters Perineuronal Nets in the Prefrontal Cortex. *Neural Plasticity*, *2018*. <https://doi.org/10.1155/2018/2108373>
- Dingess, P. M., Zhang, Z., Sorg, B. A., Ferrario, C. R., & Brown, T. E. (2020). Sex and region-specific effects of high fat diet on PNNs in obesity susceptible rats. *Physiology & Behavior*, *222*, 112963. <https://doi.org/10.1016/J.PHYSBEH.2020.112963>
- Dirnagl, U., Iadecola, C., & Moskowitz, M. A. (1999). Pathobiology of ischaemic stroke: an integrated view. *Trends in Neurosciences*, *22*(9), 391–397. [https://doi.org/10.1016/S0166-2236\(99\)01401-0](https://doi.org/10.1016/S0166-2236(99)01401-0)
- 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 Journal: Official Publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, *13*(11), 1315–1324. <https://doi.org/10.1096/FASEBJ.13.11.1315>
- Dong, Z., Saikumar, P., Weinberg, J. M., & Venkatachalam, M. A. (1997). Internucleosomal DNA cleavage triggered by plasma membrane damage during necrotic cell death. Involvement

of serine but not cysteine proteases. *The American Journal of Pathology*, 151(5), 1205. [/pmc/articles/PMC1858099/?report=abstract](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/1858099/)

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. *Molecular Psychiatry*, 27(4), 2197–2205. <https://doi.org/10.1038/s41380-022-01455-4>

Downward, J. (1999). How BAD phosphorylation is good for survival. *Nature Cell Biology* 1999 1:2, 1(2), E33–E35. <https://doi.org/10.1038/10026>

Doyle, K. P., Simon, R. P., & Stenzel-Poore, M. P. (2008). Mechanisms of ischemic brain damage. *Neuropharmacology*, 55(3), 310–318. <https://doi.org/10.1016/J.NEUROPHARM.2008.01.005>

Drieu, A., Buendia, I., Levard, D., Hélie, P., Brodin, C., Vivien, D., & Rubio, M. (2020). Immune Responses and Anti-inflammatory Strategies in a Clinically Relevant Model of Thromboembolic Ischemic Stroke with Reperfusion. *Translational Stroke Research*, 11(3), 481–495. <https://doi.org/10.1007/S12975-019-00733-8>

Dzyubenko, E., Manrique-Castano, D., Kleinschnitz, C., Faissner, A., & Hermann, D. M. (2018). Topological remodeling of cortical perineuronal nets in focal cerebral ischemia and mild hypoperfusion. *Matrix Biology*, 74, 121–132. <https://doi.org/10.1016/J.MATBIO.2018.08.001>

## E

East, E., Baker, D., Pryce, G., Lijnen, H. R., Louise Cuzner, M., & Gverić\*, D. G. (2005). *A Role for the Plasminogen Activator System in Inflammation and Neurodegeneration in the Central Nervous System during Experimental Allergic Encephalomyelitis.*

East, E., Gverić, D., Baker, D., Pryce, G., Lijnen, H. R., & Cuzner, M. L. (2008). Chronic relapsing experimental allergic encephalomyelitis (CREAE) in plasminogen activator inhibitor-1 knockout mice: the effect of fibrinolysis during neuroinflammation. *Neuropathology and Applied Neurobiology*, 34(2), 216–230. <https://doi.org/10.1111/J.1365-2990.2007.00889.X>

Echeverry, R., Wu, J., Haile, W. B., Guzman, J., & Yepes, M. (2010). Tissue-type plasminogen activator is a neuroprotectant in the mouse hippocampus. *The Journal of Clinical Investigation*, 120(6), 2194. <https://doi.org/10.1172/JCI41722>

Edwards, D. J., Liu, C. Y., Dunning, K., Fregni, F., Laine, J., Leiby, B. E., Rogers, L. M., & Harvey, R. L. (2023). Electric Field Navigated 1-Hz rTMS for Poststroke Motor Recovery: The E-FIT Randomized Controlled Trial. *Stroke*, *54*(9), 2254–2264. <https://doi.org/10.1161/STROKEAHA.123.043164>

Elena-Real, C. A., Díaz-Quintana, A., González-Arzola, K., Velázquez-Campoy, A., Orzáez, M., López-Rivas, A., Gil-Caballero, S., De La Rosa, M., & Díaz-Moreno, I. (2018). Cytochrome c speeds up caspase cascade activation by blocking 14-3-3 $\epsilon$ -dependent Apaf-1 inhibition. *Cell Death & Disease* *2018* *9*:3, 9(3), 1–12. <https://doi.org/10.1038/s41419-018-0408-1>

## F

Feigin, V. L., Brainin, M., Norrving, B., Martins, S., Sacco, R. L., Hacke, W., Fisher, M., Pandian, J., & Lindsay, P. (2022). World Stroke Organization (WSO): Global Stroke Fact Sheet 2022. *International Journal of Stroke: Official Journal of the International Stroke Society*, *17*(1), 18–29. <https://doi.org/10.1177/17474930211065917>

Fernández-Monreal, M., López-Atalaya, J. P., Benchenane, K., Cacquaavel, M., Dulin, F., Le Caer, J. P., Rossier, J., Jarrige, A. C., MacKenzie, E. T., Colloc'h, N., Ali, C., & Vivien, D. (2004). Arginine 260 of the amino-terminal domain of NR1 subunit is critical for tissue-type plasminogen activator-mediated enhancement of N-methyl-D-aspartate receptor signaling. *Journal of Biological Chemistry*, *279*(49), 50850–50856. <https://doi.org/10.1074/JBC.M407069200>

Fernández-Monreal, M., López-Atalaya, J. P., Benchenane, K., Léveillé, F., Cacquevel, M., Plawinski, L., MacKenzie, E. T., Bu, G., Buisson, A., & Vivien, D. (2004). Is tissue-type plasminogen activator a neuromodulator? *Molecular and Cellular Neuroscience*, *25*(4), 594–601. <https://doi.org/10.1016/J.MCN.2003.11.002>

Fischer, U., Kaesmacher, J., Strbian, D., Eker, O., Cognard, C., Plattner, P. S., Bütikofer, L., Mordasini, P., Deppeler, S., Pereira, V. M., Albucher, J. F., Darcourt, J., Bourcier, R., Benoit, G., Papagiannaki, C., Ozkul-Wermester, O., Sibolt, G., Tiainen, M., Gory, B., ... Gralla, J. (2022). Articles Thrombectomy alone versus intravenous alteplase plus thrombectomy in patients with stroke: an open-label, blinded-outcome, randomised non-inferiority trial. *Www.TheLancet. Com*, *400*, 2022. [www.thelancet.com](http://www.thelancet.com)

- Fisicaro, F., Lanza, G., Grasso, A. A., Pennisi, G., Bella, R., Paulus, W., & Pennisi, M. (2019). Repetitive transcranial magnetic stimulation in stroke rehabilitation: review of the current evidence and pitfalls. *Therapeutic Advances in Neurological Disorders*, 12. <https://doi.org/10.1177/1756286419878317>
- Flavin, M. P., Zhao, G., & Ho, L. T. (2000). Microglial Tissue Plasminogen Activator (tPA) Triggers Neuronal Apoptosis In Vitro. *GLIA*, 29, 347–354. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1098-1136\(20000215\)29:4](https://doi.org/10.1002/(SICI)1098-1136(20000215)29:4)
- Flossmann, E., Schulz, U. G. R., & Rothwell, P. M. (2004). Systematic review of methods and results of studies of the genetic epidemiology of ischemic stroke. *Stroke*, 35(1), 212–227. <https://doi.org/10.1161/01.STR.0000107187.84390.AA>
- Franchi, S. A., Macco, R., Astro, V., Tonoli, D., Savino, E., Valtorta, F., Sala, K., Botta, M., & de Curtis, I. (2018). A method to culture GABAergic interneurons derived from the medial ganglionic eminence. *Frontiers in Cellular Neuroscience*, 11(423), 423. <https://doi.org/10.3389/FNCEL.2017.00423/FULL>
- Fransen, P. S. S., Beumer, D., Berkhemer, O. A., van den Berg, L. A., Lingsma, H., van der Lugt, A., van Zwam, W. H., van Oostenbrugge, R. J., Roos, Y. B. W. E. M., Majoie, C. B., & Dippel, D. W. J. (2014). MR CLEAN, a multicenter randomized clinical trial of endovascular treatment for acute ischemic stroke in the Netherlands: Study protocol for a randomized controlled trial. *Trials*, 15(1), 1–11. <https://doi.org/10.1186/1745-6215-15-343/FIGURES/2>
- Fredriksson, L., Li, H., Fieber, C., Li, X., & Eriksson, U. (2004). Tissue plasminogen activator is a potent activator of PDGF-CC. *The EMBO Journal*, 23(19), 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. *Annals of Clinical and Translational Neurology*, 2(7), 722–738. <https://doi.org/10.1002/ACN3.209>
- Freidman, G. C., & Seeds, N. W. (1995). Tissue plasminogen activator mRNA expression in granule neurons coincides with their migration in the developing cerebellum. *Journal of Comparative Neurology*, 360(4), 658–670. <https://doi.org/10.1002/CNE.903600410>
- Furlan, M., Marchal, G., Viader, F., Derlon, J.-M., & Baron, J.-C. (1996). *Spontaneous Neurological Recovery after Stroke and the Fate of the Ischemic Penumbra*. <https://doi.org/10.1002/ana.410400213>

Furman, B. L. (2021). Streptozotocin-Induced Diabetic Models in Mice and Rats. *Current Protocols*, 1(4), e78. <https://doi.org/10.1002/CPZ1.78>

Furon, J., Yetim, M., Pouette, E., Martinez de Lizarrondo, S., Maubert, E., Hommet, Y., Lebouvier, L., Zheng, Z., Ali, C., & Vivien, D. (2023). Blood tissue Plasminogen Activator (tPA) of liver origin contributes to neurovascular coupling involving brain endothelial N-Methyl-D-Aspartate (NMDA) receptors. *Fluids and Barriers of the CNS*, 20(1), 1–17. <https://doi.org/10.1186/S12987-023-00411-W/FIGURES/7>

## G

Gabriel, C., Ali, C., Lesné, S., Fernández-Monreal, M., Docagne, F., Plawinski, L., MacKenzie, E. T., Buisson, A., & Vivien, D. (2003). Transforming growth factor alpha-induced expression of type 1 plasminogen activator inhibitor in astrocytes rescues neurons from excitotoxicity. *FASEB Journal: Official Publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, 17(2), 277–279. <https://doi.org/10.1096/FJ.02-0403FJE>

Gelderblom, M., Leypoldt, F., Steinbach, K., Behrens, D., Choe, C. U., Siler, D. A., Arumugam, T. V., Orthey, E., Gerloff, C., Tolosa, E., & Magnus, T. (2009). Temporal and spatial dynamics of cerebral immune cell accumulation in stroke. *Stroke*, 40(5), 1849–1857. <https://doi.org/10.1161/STROKEAHA.108.534503>

Ghosh, A., Carnahan, J., & Greenberg, M. E. (1994). Requirement for BDNF in activity-dependent survival of cortical neurons. *Science (New York, N.Y.)*, 263(5153), 1618–1623. <https://doi.org/10.1126/SCIENCE.7907431>

Gonias, S. L. (2019). Hepatocyte tPA: where have you been hiding? *Blood*, 133(7), 631–632. <https://doi.org/10.1182/BLOOD-2018-12-891515>

Gonias, S. L., Banki, M. A., Gilder, A. S., Azmoon, P., Campana, W. M., & Mantuano, E. (2018). PAI1 blocks NMDA receptor-mediated effects of tissue-type plasminogen activator on cell signaling and physiology. *Journal of Cell Science*, 131(14). <https://doi.org/10.1242/JCS.217083>

Gorski, J. A., Talley, T., Qiu, M., Puellas, L., Rubenstein, J. L. R., & Jones, K. R. (2002). Cortical excitatory neurons and glia, but not GABAergic neurons, are produced in the Emx1-expressing lineage. *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience*, 22(15), 6309–6314. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.22-15-06309.2002>

- Gosselet, F., Candela, P., Cecchelli, R., & Fenart, L. (2011). La barrière hémato-encéphalique - Une nouvelle cible thérapeutique dans la maladie d'Alzheimer ? *Médecine/Sciences*, 27(11), 987–992. <https://doi.org/10.1051/MEDSCI/20112711015>
- Gravanis, I., & Tsirka, S. E. (2005). Tissue plasminogen activator and glial function. *Glia*, 49(2), 177–183. <https://doi.org/10.1002/GLIA.20115>
- Guo, H., Hong, S., Jin, X. L., Chen, R. S., Avasthi, P. P., Tu, Y. Te, Ivanko, T. L., & Li, Y. (2000). Specificity and efficiency of Cre-mediated recombination in Emx1-Cre knock-in mice. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 273(2), 661–665. <https://doi.org/10.1006/BBRC.2000.2870>
- Gveric, D., Hanemaaijer, R., Newcombe, J., van Lent, N. A., M Sier, C. F., & Louise Cuzner, M. (2001). Plasminogen activators in multiple sclerosis lesions Implications for the inflammatory response and axonal damage. *Brain*, 124.

## H

- Haile, W. B., Wu, J., Echeverry, R., Wu, F., An, J., & Yepes, M. (2012). Tissue-type plasminogen activator has a neuroprotective effect in the ischemic brain mediated by neuronal TNF- $\alpha$ . *Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism*, 32, 57–69. <https://doi.org/10.1038/jcbfm.2011.106>
- Hajjar, K. A., Jacovina, A. T., & Chacko, J. (1994). An endothelial cell receptor for plasminogen/tissue plasminogen activator. I. Identity with annexin II. *Journal of Biological Chemistry*, 269(33), 21191–21197. [https://doi.org/10.1016/S0021-9258\(17\)31947-6](https://doi.org/10.1016/S0021-9258(17)31947-6)
- Hajjar, K. A., & Reynolds, C. M. (1994).  $\alpha$ -Fucose-mediated binding and degradation of tissue-type plasminogen activator by HepG2 cells. *Journal of Clinical Investigation*, 93(2), 703. <https://doi.org/10.1172/JCI117023>
- Hardingham, G. E., Fukunaga, Y., & Bading, H. (2002). Extrasynaptic NMDARs oppose synaptic NMDARs by triggering CREB shut-off and cell death pathways. *Nature Neuroscience*, 5(5), 405–414. <https://doi.org/10.1038/NN835>
- Hashemi, E., Ariza, J., Rogers, H., Noctor, S. C., & Martínez-Cerdeño, V. (2017). The Number of Parvalbumin-Expressing Interneurons Is Decreased in the Prefrontal Cortex in Autism. *Cerebral Cortex*, 27(3), 1931–1943. <https://doi.org/10.1093/CERCOR/BHW021>

- Hastings, G. A., Coleman, T. A., Haudenschild, C. C., Stefansson, S., Smith, E. P., Barthlow, R., Cherry, S., Sandkvist, M., & Lawrence, D. A. (1997). Neuroserpin, a brain-associated inhibitor of tissue plasminogen activator is localized primarily in neurons. Implications for the regulation of motor learning and neuronal survival. *The Journal of Biological Chemistry*, 272(52), 33062–33067. <https://doi.org/10.1074/JBC.272.52.33062>
- Hébert, M., Lesept, F., Vivien, D., & Macrez, R. (2016). The story of an exceptional serine protease, tissue-type plasminogen activator (tPA). *Revue Neurologique*, 172(3), 186–197. <https://doi.org/10.1016/j.neurol.2015.10.002>
- Hedin, S. G. (1903). On the presence of a proteolytic enzyme in the normal serum of the ox. *The Journal of Physiology*, 30(2), 195. <https://doi.org/10.1113/JPHYSIOL.1903.SP000989>
- Hedou, E., Douceau, S., Chevilly, A., Varangot, A., Thiebaut, A. M., Triniac, H., Bardou, I., Ali, C., Maillason, M., Crepaldi, T., Comoglio, P., Lemarchand, E., Agin, V., Roussel, B. D., & Vivien, D. (2021). Two-Chains Tissue Plasminogen Activator Unifies Met and NMDA Receptor Signalling to Control Neuronal Survival. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(24). <https://doi.org/10.3390/IJMS222413483>
- Heiss, W. -D, & Rosner, G. (1983). Functional recovery of cortical neurons as related to degree and duration of ischemia. *Annals of Neurology*, 14(3), 294–301. <https://doi.org/10.1002/ANA.410140307>
- Hélie, P., Camacho-Toledano, C., Leseq, L., Seillier, C., Miralles, A. J., Cristina 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*. <https://doi.org/10.1186/s12974-021-02102-5>
- 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*. [www.elsevier.com/locate/neulet](http://www.elsevier.com/locate/neulet)
- Ho, E. L., Josephson, S. A., Lee, H. S., & Smith, W. S. (2009). Cerebrovascular complications of methamphetamine abuse. *Neurocritical Care*, 10(3), 295–305. <https://doi.org/10.1007/S12028-008-9177-5>
- Hogan-Cann, A. D., & Anderson, C. M. (2016). Physiological Roles of Non-Neuronal NMDA Receptors. *Trends in Pharmacological Sciences*, 37(9), 750–767. <https://doi.org/10.1016/J.TIPS.2016.05.012>

- Hornig, C. R., Bauer, T., Simon, C., Trittmacher, S., & Dorndorf, W. (1993). Hemorrhagic transformation in cardioembolic cerebral infarction. *Stroke*, *24*(3), 465–468. <https://doi.org/10.1161/01.STR.24.3.465>
- Hultman, K., Tjärnlund-Wolf, A., Fish, R. J., Wilhelmsson, U., Rydenhag, B., Pekny, M., Kruithof, E. K. O., & Jern, C. (2008). Retinoids and activation of PKC induce tissue-type plasminogen activator expression and storage in human astrocytes. *Journal of Thrombosis and Haemostasis*, *6*(10), 1796–1803. <https://doi.org/10.1111/J.1538-7836.2008.03084.X>
- Huntley, M. A., Srinivasan, K., Friedman, B. A., Wang, T. M., Yee, A. X., Wang, Y., Kaminker, J. S., Sheng, M., Hansen, D. V., & Hanson, J. E. (2020). Genome-Wide Analysis of Differential Gene Expression and Splicing in Excitatory Neurons and Interneuron Subtypes. *Journal of Neuroscience*, *40*(5), 958–973. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.1615-19.2019>
- 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*(9), 1266. <https://doi.org/10.1136/GUT.2006.097188>
- |
- Iadecola, C., & Anrather, J. (2011). The immunology of stroke: from mechanisms to translation. *Nature Publishing Group*, *17*. <https://doi.org/10.1038/nm.2399>
- Ichinose, A., Kiesel, W., & Fujikawa, K. (1984). Proteolytic activation of tissue plasminogen activator by plasma and tissue enzymes. *FEBS Letters*, *175*(2), 412–418. [https://doi.org/10.1016/0014-5793\(84\)80779-6](https://doi.org/10.1016/0014-5793(84)80779-6)
- Ito, J., Marmarou, A., Barzó, P., Fatouros, P., & Corwin, F. (1996). Characterization of edema by diffusion-weighted imaging in experimental traumatic brain injury. *Journal of Neurosurgery*, *84*(1), 97–103. <https://doi.org/10.3171/JNS.1996.84.1.0097>

## J

- Jang, I. K., Gold, H. K., Ziskind, A. A., Fallon, J. T., Holt, R. E., Leinbach, R. C., May, J. W., & Collen, D. (1989). Differential sensitivity of erythrocyte-rich and platelet-rich arterial thrombi to lysis with recombinant tissue-type plasminogen activator. A possible explanation for resistance to coronary thrombolysis. *Circulation*, 79(4), 920–928. <https://doi.org/10.1161/01.CIR.79.4.920>
- Jeanneret, V., Wu, F., Merino, P., Torre, E., Diaz, A., Cheng, L., Yepes, M., Rossier, J., Frischknecht, R., & Chi-Fung Kwok, J. (2016). *Tissue-type Plasminogen Activator (tPA) Modulates the Postsynaptic Response of Cerebral Cortical Neurons to the Presynaptic Release of Glutamate*. <https://doi.org/10.3389/fnmol.2016.00121>
- Jiang, H., Li, X., Chen, S., Lu, N., Yue, Y., Liang, J., Zhang, Z., & Yuan, Y. (2016). Plasminogen Activator Inhibitor-1 in depression: Results from Animal and Clinical Studies OPEN. *Nature Publishing Group*. <https://doi.org/10.1038/srep30464>

## K

- 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. *The Journal of Biochemistry*, 111(2), 244–248. <https://doi.org/10.1093/OXFORDJOURNALS.JBCHEM.A123744>
- Kapral, M. K., Fang, J., Hill, M. D., Silver, F., Richards, J., Jaigobin, C., & Cheung, A. M. (2005). *Sex Differences in Stroke Care and Outcomes Results from the Registry of the Canadian Stroke Network*. <https://doi.org/10.1161/01.STR.0000157662.09551.e5>
- Karami, M., Nejadbrahim, A., Roghani, M., & Fakhroleslam, Z. (2020). *Journal of Basic and Clinical Pathophysiology Injection of colchicine into the dorsal striatum of rat's brain induces epilepsy*. <https://doi.org/10.22070/JBCP.2020.5511.1133>
- Karetko, M., & Skangiel-Kramska, J. (2009). Diverse functions of perineuronal nets. *Acta Neurobiologiae Experimentalis*, 69(4).
- Kasprowska, D., Machnik, G., Kost, A., & Gabryel, B. (2017). Time-Dependent Changes in Apoptosis Upon Autophagy Inhibition in Astrocytes Exposed to Oxygen and Glucose

- Deprivation. *Cellular and Molecular Neurobiology*, 37(2), 223–234. <https://doi.org/10.1007/S10571-016-0363-2>
- Kaushik, R., Lipachev, N., Matuszko, G., Kochneva, A., Dvoeglazova, A., Becker, A., Paveliev, M., & Dityatev, A. (2021). Fine structure analysis of perineuronal nets in the ketamine model of schizophrenia. *The European Journal of Neuroscience*, 53(12), 3988–4004. <https://doi.org/10.1111/EJN.14853>
- Kelly, E. A., Russo, A. S., Jackson, C. D., Lamantia, C. E. L., & Majewska, A. K. (2015). Proteolytic regulation of synaptic plasticity in the mouse primary visual cortex: analysis of matrix metalloproteinase 9 deficient mice. *Frontiers in Cellular Neuroscience*, 9(September). <https://doi.org/10.3389/FNCEL.2015.00369>
- Kim, H., Ährlund-Richter, S., Wang, X., Deisseroth, K., & Carlén, M. (2016). Prefrontal Parvalbumin Neurons in Control of Attention. *Cell*, 164(1–2), 208. <https://doi.org/10.1016/J.CELL.2015.11.038>
- Kinney, J. W., Davis, C. N., Tabarean, I., Conti, B., Bartfai, T., & Behrens, M. M. (2006). A specific role for NR2A-containing NMDA receptors in the maintenance of parvalbumin and GAD67 immunoreactivity in cultured interneurons. *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience*, 26(5), 1604–1615. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.4722-05.2006>
- Klein, R. L., Dayton, R. D., Tatom, J. B., Henderson, K. M., & Henning, P. P. (2008). AAV8, 9, Rh10, Rh43 vector gene transfer in the rat brain: effects of serotype, promoter and purification method. *Molecular Therapy: The Journal of the American Society of Gene Therapy*, 16(1), 89–96. <https://doi.org/10.1038/SJ.MT.6300331>
- 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(12), 2183. <https://doi.org/10.1182/BLOOD-2010-03-276170>
- Krystosek, A., & Seeds, N. W. (1981a). Plasminogen Activator Release at the Neuronal Growth Cone. *Science*, 213(4515), 1534. <https://doi.org/10.1126/SCIENCE.7197054>
- Krystosek, A., & Seeds, N. W. (1981b). Plasminogen activator secretion by granule neurons in cultures of developing cerebellum. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 78(12), 7810. <https://doi.org/10.1073/PNAS.78.12.7810>
- Kuiper, J., Otter, M., Rijken, D. C., & Van Berkel, T. J. C. (1988). Characterization of the interaction in vivo of tissue-type plasminogen activator with liver cells. *Journal of Biological Chemistry*, 263(34), 18220–18224. [https://doi.org/10.1016/S0021-9258\(19\)81348-0](https://doi.org/10.1016/S0021-9258(19)81348-0)

- Kuriakose, D., & Xiao, Z. (2020). *Molecular Sciences Pathophysiology and Treatment of Stroke: Present Status and Future Perspectives*. <https://doi.org/10.3390/ijms21207609>
- Kwok, J. C. F., Dick, G., Wang, D., & Fawcett, J. W. (2011). Extracellular matrix and perineuronal nets in CNS repair. *Developmental Neurobiology*, 71(11), 1073–1089. <https://doi.org/10.1002/DNEU.20974>

## L

- Lakhan, S. E., Kirchgessner, A., Tepper, D., & Leonard, A. (2013). Matrix Metalloproteinases and Blood-Brain Barrier Disruption in Acute Ischemic Stroke. *Frontiers in Neurology*, 4. <https://doi.org/10.3389/FNEUR.2013.00032>
- Lamba, D., Bauer, M., Huber, R., Fischer, S., Rudolph, R., Kohnert, U., & Bode, W. (1996). The 2.3 Å Crystal Structure of the Catalytic Domain of Recombinant Two-chain Human Tissue-type Plasminogen Activator. *Journal of Molecular Biology*, 258(1), 117–135. <https://doi.org/10.1006/JMBI.1996.0238>
- Langhorne, P., Coupar, F., & Pollock, A. (2009). Motor recovery after stroke: a systematic review. *The Lancet Neurology*, 8(8), 741–754. [https://doi.org/10.1016/S1474-4422\(09\)70150-4](https://doi.org/10.1016/S1474-4422(09)70150-4)
- Lebeurrier, N., Liot, G., Lopez-Atalaya, J. P., Orset, C., Fernandez-Monreal, M., Sonderegger, P., Ali, C., & Vivien, D. (2005). The brain-specific tissue-type plasminogen activator inhibitor, neuroserpin, protects neurons against excitotoxicity both in vitro and in vivo. *Molecular and Cellular Neurosciences*, 30(4), 552–558. <https://doi.org/10.1016/J.MCN.2005.09.005>
- Lebrun, F., Violle, N., Letourneur, A., Muller, C., Fischer, N., Levilly, A., Orset, C., Sors, A., & Vivien, D. (2022). Post-acute delivery of  $\alpha 5$ -GABAA antagonist, S 44819, improves functional recovery in juvenile rats following stroke. *Experimental Neurology*, 347. <https://doi.org/10.1016/J.EXPNEUROL.2021.113881>
- Lee, H. Y., Hwang, I. Y., Im, H., Koh, J. Y., & Kim, Y. H. (2007). Non-proteolytic neurotrophic effects of tissue plasminogen activator on cultured mouse cerebrocortical neurons. *Journal of Neurochemistry*, 101(5), 1236–1247. <https://doi.org/10.1111/J.1471-4159.2007.04417.X>
- Lemarchand, E., Maubert, E., Haelewyn, B., Ali, C., Rubio, M., & Vivien, D. (2016). Stressed neurons protect themselves by a tissue-type plasminogen activator-mediated EGFR-dependent mechanism. *Cell Death and Differentiation*, 23(1), 123. <https://doi.org/10.1038/CDD.2015.76>

- Lemarchant, S., Pruvost, M., Hébert, M., Gauberti, M., Hommet, Y., Briens, A., Maubert, E., Gueye, Y., Féron, F., Petite, D., Mersel, M., Do Rego, J. C., Vaudry, H., Koistinaho, J., Ali, C., Agin, V., Emery, E., & Vivien, D. (2014). tPA promotes ADAMTS-4-induced CSPG degradation, thereby enhancing neuroplasticity following spinal cord injury. *Neurobiology of Disease*, *66*, 28–42. <https://doi.org/10.1016/J.NBD.2014.02.005>
- Lenoir, S., Varangot, A., Lebouvier, L., Galli, T., Hommet, Y., & Vivien, D. (2019). Post-synaptic release of the neuronal tissue-type plasminogen activator (tPA). *Frontiers in Cellular Neuroscience*, *13*, 164. <https://doi.org/10.3389/FNCEL.2019.00164/FULL>
- 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*. <https://doi.org/10.1186/s13024-017-0160-5>
- Lépine, M., Douceau, S., Devienne, G., Prunotto, P., Lenoir, S., Regnaud, C., Pouette, E., Piquet, J., Lebouvier, L., Hommet, Y., Maubert, E., Agin, V., Lambalez, B., Cauli, B., Ali, C., & Vivien, D. (2022). Parvalbumin interneuron-derived tissue-type plasminogen activator shapes perineuronal net structure. *BMC Biology*, *20*(1). <https://doi.org/10.1186/S12915-022-01419-8>
- 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 & Disease*, *7*(11), e2466. <https://doi.org/10.1038/CDDIS.2016.279>
- Levi, M., Biemond, B. J., Van Zonneveld, A. J., Wouter ten Cate, J., & Pannekoek, H. (1992). Inhibition of plasminogen activator inhibitor-1 activity results in promotion of endogenous thrombolysis and inhibition of thrombus extension in models of experimental thrombosis. *Circulation*, *85*(1), 305–312. <https://doi.org/10.1161/01.CIR.85.1.305>
- 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. *Journal of Cell Science*, *110* (Pt 2) (2), 139–148. <https://doi.org/10.1242/JCS.110.2.139>
- Lewis, D. A., Curley, A. A., Glausier, J. R., & Volk, D. W. (2012). Cortical parvalbumin interneurons and cognitive dysfunction in schizophrenia. *Trends in Neurosciences*, *35*(1), 57–67. <https://doi.org/10.1016/J.TINS.2011.10.004>
- Leys, Di., Hommet, Y., Jacquet, C., Moulin, S., Sibon, I., Mas, J. L., Moulin, T., Giroud, M., Sagnier, S., Cordonnier, C., Medeiros De Bustos, E., Turc, G., Ronzière, T., Bejot, Y., Detante, O., Ouk,

- T., Mendyk, A. M., Favrole, P., Zuber, M., ... Vivien, D. (2016). Proportion of single-chain recombinant tissue plasminogen activator and outcome after stroke. *Neurology*, *87*(23), 2416–2426. <https://doi.org/10.1212/WNL.0000000000003399>
- Liang, C., Ding, M., Du, F., Cang, J., & Xue, Z. (2016). Tissue plasminogen activator (tPA) attenuates propofol-induced apoptosis in developing hippocampal neurons. *SpringerPlus*, *5*(1). <https://doi.org/10.1186/S40064-016-2091-Y>
- Liebner, S., Dijkhuizen, R. M., Reiss, Y., Plate, K. H., Agalliu, D., & De, S. L. (2018). Functional morphology of the blood-brain barrier in health and disease. *Acta Neuropathologica*, *135*, 311–336. <https://doi.org/10.1007/s00401-018-1815-1>
- Lim, L., Mi, D., Llorca, A., & Marín, O. (2018). Development and functional diversification of cortical interneurons. *Neuron*, *100*(2), 294. <https://doi.org/10.1016/J.NEURON.2018.10.009>
- 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. *Journal of Neurochemistry*, *98*(5), 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. *Nature Medicine*, *10*(12), 1379–1383. <https://doi.org/10.1038/NM1122>
- 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>
- Lopes Pinheiro, M. A., Kooij, G., Mizze, M. R., Kamermans, A., Enzmann, G., Lyck, R., Schwaninger, M., Engelhardt, B., & de Vries, H. E. (2016). Immune cell trafficking across the barriers of the central nervous system in multiple sclerosis and stroke. *Biochimica et Biophysica Acta*, *1862*(3), 461–471. <https://doi.org/10.1016/J.BBADIS.2015.10.018>
- Lopez-Atalaya, J. P., Roussel, B. D., Levrat, D., Parcq, J., Nicole, O., Hommet, Y., Benchenane, K., Castel, H., Leprince, J., To Van, D., Bureau, R., Rault, S., Vaudry, H., Petersen, K. U., Santos, J. S. D. O., Ali, C., & Vivien, D. (2008). Toward safer thrombolytic agents in stroke: Molecular requirements for NMDA receptor-mediated neurotoxicity. *Journal of Cerebral Blood Flow and Metabolism*, *28*(6), 1212–1221. [https://doi.org/10.1038/JCBFM.2008.14/ASSET/IMAGES/LARGE/10.1038\\_JCBFM.2008.14-FIG7.JPEG](https://doi.org/10.1038/JCBFM.2008.14/ASSET/IMAGES/LARGE/10.1038_JCBFM.2008.14-FIG7.JPEG)

- Louessard, M., Lacroix, A., Martineau, M., Mondielli, G., Montagne, A., Lesept, F., Lambolez, B., Cauli, B., Mothet, J. P., Vivien, D., & Maubert, E. (2016). Tissue Plasminogen Activator Expression Is Restricted to Subsets of Excitatory Pyramidal Glutamatergic Neurons. *Molecular Neurobiology*, *53*(7), 5000–5012. <https://doi.org/10.1007/S12035-015-9432-7/METRICS>
- Louet, E. R., Glavan, M., Orset, C., Parcq, J., Hanley, D. F., & Vivien, D. (2022). tPA-NMDAR Signaling Blockade Reduces the Incidence of Intracerebral Aneurysms. *Translational Stroke Research*, *13*(6), 1005–1016. <https://doi.org/10.1007/S12975-022-01004-9>
- Love, S. (2003). Apoptosis and brain ischaemia. *Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry*, *27*(2), 267–282. [https://doi.org/10.1016/S0278-5846\(03\)00022-8](https://doi.org/10.1016/S0278-5846(03)00022-8)
- Lucas, D. R., & Newhouse, J. P. (1957). The Toxic Effect of Sodium L-Glutamate on the Inner Layers of the Retina. *A.M.A. Archives of Ophthalmology*, *58*(2), 193–201. <https://doi.org/10.1001/ARCHOPHT.1957.00940010205006>

## M

- Macrez, R., Ali, C., Toutirais, O., Le Mauff, B., Defer, G., Dirnagl, U., & Vivien Denis, D. (2011). Stroke and the immune system: from pathophysiology to new therapeutic strategies. *The Lancet Neurology*, *10*(5), 471–480. [https://doi.org/10.1016/S1474-4422\(11\)70066-7](https://doi.org/10.1016/S1474-4422(11)70066-7)
- 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*(12), 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: A Journal of Neurology*, *139*(Pt 9), 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 Journal*, *18*(11), 3007–3012. <https://doi.org/10.1093/EMBOJ/18.11.3007>

- Madani, R., Kozlov, S., Akhmedov, A., Cinelli, P., Kinter, J., Lipp, H. P., Sonderegger, P., & Wolfer, D. P. (2003). Impaired explorative behavior and neophobia in genetically modified mice lacking or overexpressing the extracellular serine protease inhibitor neuroserpin. *Molecular and Cellular Neuroscience*, 23(3), 473–494. [https://doi.org/10.1016/S1044-7431\(03\)00077-0](https://doi.org/10.1016/S1044-7431(03)00077-0)
- Madinier, A., Quattromani, M. J., Sjölund, C., Ruscher, K., & Wieloch, T. (2014). Enriched housing enhances recovery of limb placement ability and reduces aggrecan-containing perineuronal nets in the rat somatosensory cortex after experimental stroke. *PLoS One*, 9(3). <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PONE.0093121>
- Ma, J., Yu, D., Tong, Y., & Mao, M. (2012). Effect of neuroserpin in a neonatal hypoxic-ischemic injury model ex vivo. *Biol Res*, 45, 357–362.
- Martínez-Coria, H., Arrieta-Cruz, I., Cruz, M.-E., & López-Valdés, H. E. (2021). *Physiopathology of ischemic stroke and its modulation using memantine: evidence from preclinical stroke*. <https://doi.org/10.4103/1673-5374.293129>
- Martin, L. J., Al-Abdulla, N. A., Brambrink, A. M., Kiesch, J. R., Sieber, F. E., & Portera-Cailliau, C. (1998). Neurodegeneration in Excitotoxicity, Global Cerebral Ischemia, and Target Deprivation: A Perspective on the Contributions of Apoptosis and Necrosis. *Brain Research Bulletin*, 46(4), 281–309. [https://doi.org/10.1016/S0361-9230\(98\)00024-0](https://doi.org/10.1016/S0361-9230(98)00024-0)
- Mataga, N., Nagai, N., & Hensch, T. K. (2002). Permissive proteolytic activity for visual cortical plasticity. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 99(11), 7717–7721. <https://doi.org/10.1073/PNAS.102088899>
- Matys, T., & Strickland, S. (2003). Tissue plasminogen activator and NMDA receptor cleavage. *Nature Medicine*, 9(4), 371–373. <https://doi.org/10.1038/NM0403-371>
- Mehra, A., Ali, C., Parcq, J., Vivien, D., & Docagne, F. (2016). The plasminogen activation system in neuroinflammation. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease*, 1862(3), 395–402. <https://doi.org/10.1016/J.BBADIS.2015.10.011>
- Minor, K., Phillips, J., & Seeds, N. W. (2009). Tissue plasminogen activator promotes axonal outgrowth on CNS myelin after conditioned injury. *Journal of Neurochemistry*, 109(3), 706–715. <https://doi.org/10.1111/J.1471-4159.2009.05977.X>
- Mintorovitch, J., Moseley, M. E., Chileuitt, L., Shimizu, H., Cohen, Y., & Weinstein, P. R. (1991). Comparison of diffusion- and T2-weighted MRI for the early detection of cerebral ischemia and reperfusion in rats. *Magnetic Resonance in Medicine*, 18(1), 39–50. <https://doi.org/10.1002/MRM.1910180106>

- Miranda, E., & Lomas, D. A. (2006). Neuroserpin: a serpin to think about. *Cellular and Molecular Life Sciences: CMLS*, 63(6), 709–722. <https://doi.org/10.1007/S00018-005-5077-4>
- Mitroshina, E. V., Savyuk, M. O., Ponimaskin, E., & Vedunova, M. V. (2021). Hypoxia-Inducible Factor (HIF) in Ischemic Stroke and Neurodegenerative Disease. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, 9. <https://doi.org/10.3389/FCELL.2021.703084>
- Mohamed, A., Fatima, N., Shuaib, A., & Saqqur, M. (2021). Comparison of mothership versus drip-and-ship models in treating patients with acute ischemic stroke: A systematic review and meta-analysis. <https://doi.org/10.1177/17474930211013285>, 17(2), 141–154. <https://doi.org/10.1177/17474930211013285>
- Morgagni, G. B. (1761). Founders of Modern Medicine: Giovanni Battista Morgagni. (1682-1771). *Medical Library and Historical Journal*, 1(4), 270. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1698114/>

## N

- Nagai, N., Urano, T., Endo, A., Takahashi, H., Takada, Y., & Takada, A. (1999). Neuronal degeneration and a decrease in laminin-like immunoreactivity is associated with elevated tissue-type plasminogen activator in the rat hippocampus after kainic acid injection. *Neuroscience Research*, 33(2), 147–154. [https://doi.org/10.1016/S0168-0102\(98\)00125-4](https://doi.org/10.1016/S0168-0102(98)00125-4)
- Nagaoka, M. R., Kouyoumdjian, M., & Borges, D. R. (2003). Hepatic clearance of tissue-type plasminogen activator and plasma kallikrein in experimental liver fibrosis. *Liver International*, 23(6), 476–483. <https://doi.org/10.1111/J.1478-3231.2003.00872.X>
- Nelson, A. N., Calhoun, M. S., Thomas, A. M., Tavares, J. L., Ferretti, D. M., Dillon, G. M., & Mandelblat-Cerf, Y. (2020). Temporal Progression of Excitotoxic Calcium Following Distal Middle Cerebral Artery Occlusion in Freely Moving Mice. *Frontiers in Cellular Neuroscience*, 14. <https://doi.org/10.3389/FNCEL.2020.566789>
- Ng, Y. S., Stein, J., Ning, M., & Black-Schaffer, R. M. (2007). *Comparison of Clinical Characteristics and Functional Outcomes of Ischemic Stroke in Different Vascular Territories*. <https://doi.org/10.1161/STROKEAHA.106.475483>

- 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. *Nature Medicine*, 7(1). <https://doi.org/10.1038/83358>
- NINDS. (1995). Tissue Plasminogen Activator for Acute Ischemic Stroke. *New England Journal of Medicine*, 333(24), 1581–1588. <https://doi.org/10.1056/NEJM199512143332401>
- Ni, Y., Gu, W. W., Liu, Z. H., Zhu, Y. M., Rong, J. G., Kent, T. A., Li, M., Qiao, S. G., An, J. Z., & Zhang, H. L. (2018). RIP1K Contributes to Neuronal and Astrocytic Cell Death in Ischemic Stroke via Activating Autophagic-lysosomal Pathway. *Neuroscience*, 371, 60–74. <https://doi.org/10.1016/J.NEUROSCIENCE.2017.10.038>
- Nogueira, R. G., Jadhav, A. P., Haussen, D. C., Bonafe, A., Budzik, R. F., Bhuva, P., Yavagal, D. R., Ribo, M., Cognard, C., Hanel, R. A., Sila, C. A., Hassan, A. E., Millan, M., Levy, E. I., Mitchell, P., Chen, M., English, J. D., Shah, Q. A., Silver, F. L., ... Jovin, T. G. (2018). Thrombectomy 6 to 24 Hours after Stroke with a Mismatch between Deficit and Infarct. *New England Journal of Medicine*, 378(1), 11–21.



- O'Donnell, M. J., Denis, X., Liu, L., Zhang, H., Chin, S. L., Rao-Melacini, P., Rangarajan, S., Islam, S., Pais, P., McQueen, M. J., Mondo, C., Damasceno, A., Lopez-Jaramillo, P., Hankey, G. J., Dans, A. L., Yusuf, K., Truelsen, T., Diener, H. C., Sacco, R. L., ... Yusuf, S. (2010). Risk factors for ischaemic and intracerebral haemorrhagic stroke in 22 countries (the INTERSTROKE study): a case-control study. *Lancet (London, England)*, 376(9735), 112–123. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(10\)60834-3](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(10)60834-3)
- Olney, J. W. (1969). Brain lesions, obesity, and other disturbances in mice treated with monosodium glutamate. *Science (New York, N.Y.)*, 164(3880), 719–721. <https://doi.org/10.1126/SCIENCE.164.3880.719>
- Omouendze, P. L., Henry, V. J., Porte, B., Dupré, N., & Carmeliet, P. (2013). Hypoxia-Ischemia or Excitotoxin-Induced Tissue Plasminogen Activator-Dependent Gelatinase Activation in Mice Neonate Brain Microvessels. *PLoS ONE*, 8(8), 71263. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0071263>
- Orset, C., Haelewyn, B., Allan, S. M., Ansar, S., Campos, F., Cho, T. H., Durand, A., El Amki, M., Fatar, M., Garcia-Yébenes, I., Gauberti, M., Grudzinski, S., Lizasoain, I., Lo, E., Macrez, R.,

- Margaill, I., Maysami, S., Meairs, S., Nighoghossian, N., ... Vivien, D. (2016). Efficacy of Alteplase in a Mouse Model of Acute Ischemic Stroke: A Retrospective Pooled Analysis. *Stroke*, *47*(5), 1312–1318. <https://doi.org/10.1161/STROKEAHA.116.012238>
- Orset, C., Macrez, R., Young, A. R., Panthou, D., Angles-Cano, E., Maubert, E., Agin, V., & Vivien, D. (2007). Mouse model of in situ thromboembolic stroke and reperfusion. *Stroke*, *38*(10), 2771–2778. <https://doi.org/10.1161/STROKEAHA.107.487520>
- Osterwalder, T., Contartese, J., Stoeckli, E. T., Kuhn, T. B., & Sonderegger, P. (1996). Neuroserpin, an axonally secreted serine protease inhibitor. *The EMBO Journal*, *15*(12), 2944–2953. <https://doi.org/10.1002/J.1460-2075.1996.TB00657.X>
- Owolabi, M. O., Thrift, A. G., Mahal, A., Ishida, M., Martins, S., Johnson, W. D., Pandian, J., Abd-Allah, F., Yaria, J., Phan, H. T., Roth, G., Gall, S. L., Beare, R., Phan, T. G., Mikulik, R., Akinyemi, R. O., Norrving, B., Brainin, M., Feigin, V. L., ... Zhang, P. (2022). Primary stroke prevention worldwide: translating evidence into action. *The Lancet. Public Health*, *7*(1), e74. [https://doi.org/10.1016/S2468-2667\(21\)00230-9](https://doi.org/10.1016/S2468-2667(21)00230-9)

## P

- Pang, P. T., & Lu, B. (2004). Regulation of late-phase LTP and long-term memory in normal and aging hippocampus: role of secreted proteins tPA and BDNF. *Ageing Research Reviews*, *3*(4), 407–430. <https://doi.org/10.1016/J.ARR.2004.07.002>
- 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 and Differentiation*, *19*(12), 1983. <https://doi.org/10.1038/CDD.2012.86>
- Park, L., Gallo, E. F., Anrather, J., Wang, G., Norris, E. H., Paul, J., Strickland, S., & Iadecola, C. (2008). Key role of tissue plasminogen activator in neurovascular coupling. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *105*(3), 1073. <https://doi.org/10.1073/PNAS.0708823105>
- 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. *Journal of Biological Chemistry*, 272(3), 1976–1982.  
<https://doi.org/10.1074/JBC.272.3.1976>

- Party, H., Dujarrier, C., Hébert, M., Lenoir, S., Martinez De Lizarrondo, S., Delépée, R., Fauchon, C., Bouton, M. C., Obiang, P., Godefroy, O., Save, E., Lecardeur, L., Chabry, J., Vivien, D., & Agin, V. (2019). Plasminogen Activator Inhibitor-1 (PAI-1) deficiency predisposes to depression and resistance to treatments. *Acta Neuropathologica Communications*, 7(1), 1–12. <https://doi.org/10.1186/S40478-019-0807-2/FIGURES/4>
- Pasquet, N., Douceau, S., Naveau, M., Lesept, F., Louessard, M., Lebouvier, L., Hommet, Y., Vivien, D., & Bardou, I. (2019). Tissue-Type Plasminogen Activator Controlled Corticogenesis Through a Mechanism Dependent of NMDA Receptors Expressed on Radial Glial Cells. *Cerebral Cortex*, 29, 2482–2498. <https://doi.org/10.1093/cercor/bhy119>
- Pawlak, R., Magarinos, A. M., Melchor, J., McEwen, B., & Strickland, S. (2003). Tissue plasminogen activator in the amygdala is critical for stress-induced anxiety-like behavior. *Nature Neuroscience* 2003 6:2, 6(2), 168–174. <https://doi.org/10.1038/nn998>
- Pennica, D., Holmes, W. E., Kohr, W. J., Harkins, R. N., Vehar, 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(5897), 214–221. <https://doi.org/10.1038/301214A0>
- Petersen, L. C., Johannessen, M., Foster, D., Kumar, A., & Mulvihill, E. (1988). The effect of polymerised fibrin on the catalytic activities of one-chain tissue-type plasminogen activator as revealed by an analogue resistant to plasmin cleavage. *Biochimica et Biophysica Acta*, 952(3), 245–254. [https://doi.org/10.1016/0167-4838\(88\)90123-9](https://doi.org/10.1016/0167-4838(88)90123-9)
- Pirson, F. A. V. (Anne), Hinsenveld, W. H., Goldhoorn, R. J. B., Staals, J., de Ridder, I. R., van Zwam, W. H., van Walderveen, M. A. A., Lycklama à Nijeholt, G. J., Uyttenboogaart, M., Schonewille, W. J., van der Lugt, A., Dippel, D. W. J., Roos, Y. B. W. E. M., Majoie, C. B. L. M., & van Oostenbrugge, R. J. (2021). MR CLEAN-LATE, a multicenter randomized clinical trial of endovascular treatment of acute ischemic stroke in The Netherlands for late arrivals: study protocol for a randomized controlled trial. *Trials*, 22(1), 1–13. <https://doi.org/10.1186/S13063-021-05092-0/FIGURES/4>
- Pizzorusso, T., Medini, P., Berardi, N., Chierzi, S., Fawcett, J. W., & Maffei, L. (2002). Reactivation of ocular dominance plasticity in the adult visual cortex. *Science (New York, N.Y.)*, 298(5596), 1248–1251. <https://doi.org/10.1126/SCIENCE.1072699>

- Plow, E. F., Herren, T., Redlitz, A., Miles, L. A., & Hoover-Plow, J. L. (1995). The cell biology of the plasminogen system. *The FASEB Journal*, 9(10), 939–945. <https://doi.org/10.1096/FASEBJ.9.10.7615163>
- Polavarapu, R., Carolina Gongora, M., 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*. 109, 3270–3278. <https://doi.org/10.1182/blood-2006-08>
- Prakash, R., & Carmichael, S. T. (2015). *Blood-brain barrier breakdown and neovascularization processes after stroke and traumatic brain injury*. <https://doi.org/10.1097/WCO.0000000000000248>
- Puig, B., Brenna, S., & Magnus, T. (2018). Molecular Communication of a Dying Neuron in Stroke. *International Journal of Molecular Sciences*, 19(9). <https://doi.org/10.3390/IJMS19092834>

## Q

- 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(6411), 453–457. <https://doi.org/10.1038/361453a0>
- Qin, A.-P., Liu, C.-F., Qin, Y. Y., Hong, L.-Z., Xu, M., Yang, L., Liu, J., Qin, Z.-H., & Zhang, H.-L. (2010). *Autophagy was activated in injured astrocytes and mildly decreased cell survival following glucose and oxygen deprivation and focal cerebral ischemia*.
- Qin, C., Yang, S., Chu, Y.-H., Zhang, H., Pang, X.-W., Chen, L., Zhou, L.-Q., Chen, M., Tian, D.-S., & Wang, W. (2022). *Signaling pathways involved in ischemic stroke: molecular mechanisms and therapeutic interventions*. <https://doi.org/10.1038/s41392-022-01064-1>
- Quattromani, M. J., Pruvost, M., Guerreiro, C., Backlund, F., Englund, E., Aspberg, A., Jaworski, T., Hakon, J., Ruscher, K., Kaczmarek, L., Vivien, D., & Wieloch, T. (2018). Extracellular Matrix Modulation Is Driven by Experience-Dependent Plasticity During Stroke Recovery. *Molecular Neurobiology*, 55(3), 2196. <https://doi.org/10.1007/S12035-017-0461-2>

## R

- Radak, D., Katsiki, N., Resanovic, I., Jovanovic, A., Sudar-Milovanovic, E., Zafirovic, S., A. Mousad, S., & R. Isenovic, E. (2017). Apoptosis and Acute Brain Ischemia in Ischemic Stroke. *Current Vascular Pharmacology*, 15(2), 115–122. <https://doi.org/10.2174/1570161115666161104095522>
- Reijerkerk, A., Kooij, G., Van Der Pol, S. M. A., Leyen, T., Lakeman, K., Van Het Hof, B., Vivien, D., & De Vries, H. E. (2010). The NR1 subunit of NMDA receptor regulates monocyte transmigration through the brain endothelial cell barrier. *Journal of Neurochemistry*, 113(2), 447–453. <https://doi.org/10.1111/J.1471-4159.2010.06598.X>
- Reijerkerk, A., Kooij, G., van der Pol, S. M. A., Leyen, T., van het Hof, B., Couraud, P.-O., Vivien, D., Dijkstra, C. D., & de Vries, H. E. (2008). Tissue-type plasminogen activator is a regulator of monocyte diapedesis through the brain endothelial barrier. *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)*, 181(5), 3567–3574. <https://doi.org/10.4049/JIMMUNOL.181.5.3567>
- Reynolds, A. F., & Oakley, J. C. (1984). *The colchicine experimental epileptic focus: an intracellular study*.
- Rijken, D. C., & Collen, D. (1981). Purification and characterization of the plasminogen activator secreted by human melanoma cells in culture. *Journal of Biological Chemistry*, 256(13), 7035–7041. [https://doi.org/10.1016/s0021-9258\(19\)69095-2](https://doi.org/10.1016/s0021-9258(19)69095-2)
- Rijken, D. C., Hoylaerts, M., & Collen, D. (1982). Fibrinolytic Properties of One-chain and Two-chain Human Extrinsic (Tissue-type) Plasminogen Activator\*. *THE JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY Printed in U.S.A.*, 257, 19–21. [https://doi.org/10.1016/S0021-9258\(19\)81052-9](https://doi.org/10.1016/S0021-9258(19)81052-9)
- Rijken, D. C., & Lijnen, H. R. (2009). New insights into the molecular mechanisms of the fibrinolytic system. *Journal of Thrombosis and Haemostasis*, 7(1), 4–13. <https://doi.org/10.1111/J.1538-7836.2008.03220.X>
- Rijken, D. C., Wijngaards, G., Zaal-de Jong, M., & Welbergen, J. (1979). Purification and partial characterization of plasminogen activator from human uterine tissue. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Protein Structure*, 580(1), 140–153. [https://doi.org/10.1016/0005-2795\(79\)90205-8](https://doi.org/10.1016/0005-2795(79)90205-8)
- Roger, V. L., Go, A. S., Lloyd-Jones, D. M., Benjamin, E. J., Berry, J. D., Borden, W. B., Bravata, D. M., Dai, S., Ford, E. S., Fox, C. S., Fullerton, H. J., Gillespie, C., Hailpern, S. M., Heit, J. A., Howard, V. J., Kissela, B. M., Kittner, S. J., Lackland, D. T., Lichtman, J. H., ... Turner, M. B. (2012). *AHA Statistical Update*. <https://doi.org/10.1161/CIR.0b013e3182456d46>

- Rogove, A. D., Siao, C. J., Keyt, B., Strickland, S., & Tsrka, S. E. (1999). Activation of microglia reveals a non-proteolytic cytokine function for tissue plasminogen activator in the central nervous system. *Journal of Cell Science*, *112*(22), 4007–4016. <https://doi.org/10.1242/JCS.112.22.4007>
- Rosenberg, G. A., & Yang, Y. (2007). Vasogenic edema due to tight junction disruption by matrix metalloproteinases in cerebral ischemia. *Neurosurgical Focus*, *22*(5). <https://doi.org/10.3171/FOC.2007.22.5.5>
- Rossier, J., Bernard, A., Cabungcal, J. H., Perrenoud, Q., Savoye, A., Gallopin, T., Hawrylycz, M., Cuénod, M., Do, K., Urban, A., & Lein, E. S. (2015). Cortical fast-spiking parvalbumin interneurons enwrapped in the perineuronal net express the metalloproteinases Adamts8, Adamts15 and Neprilysin. *Molecular Psychiatry*, *20*(2), 154. <https://doi.org/10.1038/MP.2014.162>
- Rouf, S. A., Moo-Young, M., & Chisti, Y. (1996). Tissue-type plasminogen activator: Characteristics, applications and production technology. *Biotechnology Advances*, *14*(3), 239–266. [https://doi.org/10.1016/0734-9750\(96\)00019-5](https://doi.org/10.1016/0734-9750(96)00019-5)
- Roux, L., & Buzsáki, G. (2015). Tasks for inhibitory interneurons in intact brain circuits. *Neuropharmacology*, *0*, 10. <https://doi.org/10.1016/J.NEUROPHARM.2014.09.011>

## S

- Samson, A. L., Nevin, S. T., Croucher, D., Niego, B., Daniel, P. B., Weiss, T. W., Moreno, E., Monard, D., Lawrence, D. A., & Medcalf, R. L. (2008). Tissue-type plasminogen activator requires a co-receptor to enhance N-Methyl-D-Aspartate receptor function. *Journal of Neurochemistry*, *107*(4), 1091. <https://doi.org/10.1111/J.1471-4159.2008.05687.X>
- 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. *Journal of Clinical Investigation*, *92*(2), 679. <https://doi.org/10.1172/JCI116637>
- Saver, J. L. (2006). *Time Is Brain-Quantified*. <https://doi.org/10.1161/01.STR.0000196957.55928.ab>
- Schrimpf, S. P., Bleiker, A. J., Brecevic, L., Kozlov, S. V., Berger, P., Osterwalder, T., Krueger, S. R., Schinzel, A., & Sonderegger, P. (1997). Human Neuroserpin (PI12): cDNA Cloning and

Chromosomal Localization to 3q26. *Genomics*, 40(1), 55–62.  
<https://doi.org/10.1006/GENO.1996.4514>

Seeds, N. W., Basham, M. E., & Haffke, S. P. (1999). Neuronal migration is retarded in mice lacking the tissue plasminogen activator gene. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 96(24), 14118. <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 (New York, N.Y.)*, 270(5244), 1992–1994. <https://doi.org/10.1126/SCIENCE.270.5244.1992>

Seillier, C., Lesept, F., Toutirais, O., Potzaha, F., Blanc, M., & Vivien, D. (2022). Targeting NMDA Receptors at the Neurovascular Unit: Past and Future Treatments for Central Nervous System Diseases. *International Journal of Molecular Sciences*, 23(18). <https://doi.org/10.3390/IJMS231810336>

Shen, Z., Xiang, M., Chen, C., Ding, F., Wang, Y., Shang, C., Xin, L., Zhang, Y., & Cui, X. (2022). Glutamate excitotoxicity: Potential therapeutic target for ischemic stroke. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 151, 113125. <https://doi.org/10.1016/J.BIOPHA.2022.113125>

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. *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience*, 24(42), 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. *Journal of Neuroscience*, 23(8), 3234–3242. <https://doi.org/10.1523/jneurosci.23-08-03234.2003>

Siao, C. J., & Tsirka, S. E. (2002). Tissue Plasminogen Activator Mediates Microglial Activation via Its Finger Domain through Annexin II. *The Journal of Neuroscience*, 22(9), 3352. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.22-09-03352.2002>

Sillanpää, N., Saarinen, J. T., Rusanen, H., Elovaara, I., Dastidar, P., & Soimakallio, S. (2013). Location of the clot and outcome of perfusion defects in acute anterior circulation stroke treated with intravenous thrombolysis. *AJNR. American Journal of Neuroradiology*, 34(1), 100–106. <https://doi.org/10.3174/AJNR.A3149>

Simard, J. M., Kahle, K. T., & Gerzanich, V. (2010). Molecular mechanisms of microvascular failure in central nervous system injury--synergistic roles of NKCC1 and SUR1/TRPM4. *Journal of Neurosurgery*, 113(3), 622–629. <https://doi.org/10.3171/2009.11.JNS081052>

- Slaker, M. L., Harkness, J. H., & Sorg, B. A. (2016). *A standardized and automated method of perineuronal net analysis using Wisteria floribunda agglutinin staining intensity*. <https://doi.org/10.1016/j.ibror.2016.10.001>
- Song, Y. M., & Cho, H. J. (2008). Risk of stroke and myocardial infarction after reduction or cessation of cigarette smoking: A cohort study in Korean men. *Stroke*, *39*(9), 2432–2438. <https://doi.org/10.1161/STROKEAHA.107.512632>
- Soreq, H., & Miskin, R. (1981). Plasminogen activator in the rodent brain. *Brain Research*, *216*(2), 361–374. [https://doi.org/10.1016/0006-8993\(81\)90138-4](https://doi.org/10.1016/0006-8993(81)90138-4)
- Sorg, B. A., Berretta, S., Blacktop, J. M., Fawcett, J. W., Kitagawa, X. H., Kwok, J. C. F., & Miquel, M. (2016). *Mini-Symposium Casting a Wide Net: Role of Perineuronal Nets in Neural Plasticity*. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.2351-16.2016>
- Sowter, H. M., Ratcliffe, P. J., Watson, P., Greenberg, A. H., & Harris, A. L. (2001). HIF-1-dependent regulation of hypoxic induction of the cell death factors BNIP3 and NIX in human tumors. *Cancer Res*, *61*(18).
- Sprengers, E., & Kluft, C. (1987). Plasminogen Activator Inhibitors. *Blood*, *69*(2), 381–387. <https://doi.org/10.1182/BLOOD.V69.2.381.381>
- Stevenson, T. K., & Lawrence, D. A. (2018). Characterization of Tissue Plasminogen Activator Expression and Trafficking in the Adult Murine Brain. *ENeuro*, *5*(4), 119–137. <https://doi.org/10.1523/ENEURO.0119-18.2018>
- 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. *Nature Medicine*, *14*(7), 731. <https://doi.org/10.1038/NM1787>
- Suk, S. H., Sacco, R. L., Boden-Albala, B., Cheun, J. F., Pittman, J. G., Elkind, M. S., & Paik, M. C. (2003). Abdominal obesity and risk of ischemic stroke: The Northern Manhattan Stroke Study. *Stroke*, *34*(7), 1586–1592. <https://doi.org/10.1161/01.STR.0000075294.98582.2F>
- Sutula, T., Goldschmidt, R., & Steward, O. (1983). Mechanisms of colchicine neurotoxicity in the dentate gyrus: dissociation of seizures and cell death. *Experimental Neurology*, *81*(3), 683–693. [https://doi.org/10.1016/0014-4886\(83\)90335-7](https://doi.org/10.1016/0014-4886(83)90335-7)

## T

- Taghizadeh, R. R., & Sherley, J. L. (2008). CFP and YFP, but not GFP, provide stable fluorescent marking of rat hepatic adult stem cells. *Journal of Biomedicine & Biotechnology*, 2008(1). <https://doi.org/10.1155/2008/453590>
- Tanswell, P., Modi, N., Combs, D., & Danays, T. (2002). *Pharmacokinetics and pharmacodynamics of tenecteplase in fibrinolytic therapy of acute myocardial infarction*.
- Teesalu, T., Kulla, A., Simisker, A., Sirén, V., Lawrence, D. A., Asser, T., & Vaheri, A. (2004). Tissue plasminogen activator and neuroserpin are widely expressed in the human central nervous system. *Thrombosis and Haemostasis*, 92(2), 358–368. <https://doi.org/10.1160/TH02-12-0310>
- Thiebaut, A. M., Buendia, I., Ginet, V., Lemarchand, E., Boudjadja, M. B., Hommet, Y., Lebouvier, L., Lechevallier, C., Maillason, M., Hedou, E., Déglon, N., Oury, F., Rubio, M., Montaner, J., Puyal, J., Vivien, D., & Roussel, B. D. (2022). Thrombolysis by PLAT/tPA increases serum free IGF1 leading to a decrease of deleterious autophagy following brain ischemia. *Autophagy*, 18(6), 1297–1317. <https://doi.org/10.1080/15548627.2021.1973339>
- 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. In *the Lancet Neurology* (Vol. 17, Issue 12, pp. 1121–1132). Lancet Publishing Group. [https://doi.org/10.1016/S1474-4422\(18\)30323-5](https://doi.org/10.1016/S1474-4422(18)30323-5)
- Thiebaut, A. M., Hedou, E., Marciniak, S. J., Vivien, D., & Roussel, B. D. (2019). Proteostasis During Cerebral Ischemia. *Frontiers in Neuroscience*, 13(JUN). <https://doi.org/10.3389/FNINS.2019.00637>
- Tian, Y., Li, Z., Hu, W., Ren, H., Tian, E., Zhao, Y., Lu, Q., Huang, X., Yang, P., Li, X., Wang, X., Kovács, A. L., Yu, L., & Zhang, H. (2010). *C. elegans* screen identifies autophagy genes specific to multicellular organisms. *Cell*, 141(6), 1042–1055. <https://doi.org/10.1016/J.CELL.2010.04.034>
- Tomadesso, C., de Lizarrondo, S. M., Ali, C., Landeau, B., Mézenge, F., Perrotin, A., de La Sayette, V., Vivien, D., & Chételat, G. (2022). Plasma Levels of Tissue-Type Plasminogen Activator (tPA) in Normal Aging and Alzheimer’s Disease: Links with Cognition, Brain Structure, Brain Function and Amyloid Burden. *Frontiers in Aging Neuroscience*, 14, 871214. <https://doi.org/10.3389/FNAGI.2022.871214/FULL>

- Toshniwal, P. K., Tiku, M. L., Tiku, K., & Skosey, J. L. (1987). Secretion of plasminogen activator by cerebral astrocytes and its modulation. *Journal of the Neurological Sciences*, *80*(2), 307–321. [https://doi.org/10.1016/0022-510X\(87\)90165-1](https://doi.org/10.1016/0022-510X(87)90165-1)
- Tournier-Lasserre, E., Iba-Zizen, M.-T., Romero, N., & Bousser, M.-G. (1991). *Short Communications Autosomal Dominant Syndrome with Strokelike Episodes and Leukoencephalopathy*. <http://ahajournals.org>
- 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. *Pharmacological Reviews*, *62*(3), 405. <https://doi.org/10.1124/PR.109.002451>
- Tronche, F., Kellendonk, C., Kretz, O., Gass, P., Anlag, K., Orban, P. C., Bock, R., Klein, R., & Schütz, G. (1999). *Disruption of the glucocorticoid receptor gene in the nervous system results in reduced anxiety*. <http://genetics.nature.com>
- Trotter, J. H., Lussier, A. L., Psilos, K. E., Mahoney, H. L., Sponaugle, A. E., Hoe, H. S., Rebeck, G. W., & Weeber, E. J. (2014). EXTRACELLULAR PROTEOLYSIS OF REELIN BY TISSUE PLASMINOGEN ACTIVATOR FOLLOWING SYNAPTIC POTENTIATION. *Neuroscience*, *274*, 299. <https://doi.org/10.1016/J.NEUROSCIENCE.2014.05.046>
- Tsirka, S. E., Gualandris, A., Amaral, D. G., & Strickland, S. (1995). Excitotoxin-induced neuronal degeneration and seizure are mediated by tissue plasminogen activator. *Nature* *1995* *377:6547*, *377*(6547), 340–344. <https://doi.org/10.1038/377340a0>
- Tsirka, S. E., Rogove, A. D., Bugge, T. H., Degen, J. L., & Strickland, S. (1997). *An Extracellular Proteolytic Cascade Promotes Neuronal Degeneration in the Mouse Hippocampus*.
- Tsirka, S. E., Rogove, A. D., & Strickland, S. (1996). Neuronal cell death and tPA. *Nature* *1996* *384:6605*, *384*(6605), 123–124. <https://doi.org/10.1038/384123b0>
- Tsuji, K., Aoki, T., Tejima, E., Arai, K., Lee, S. R., Atochin, D. N., Huang, P. L., Wang, X., Montaner, J., & Lo, E. H. (2005). Tissue Plasminogen Activator Promotes Matrix Metalloproteinase-9 Upregulation After Focal Cerebral Ischemia. *Stroke*, *36*(9), 1954–1959. <https://doi.org/10.1161/01.STR.0000177517.01203.EB>

## V

- Varangot, A., Lebatard, S., Bellemain-Sagnard, M., Lebouvier, L., Hommet, Y., & Vivien, D. (2023). Modulations of the neuronal trafficking of tissue-type plasminogen activator (tPA) influences glutamate release. *Cell Death & Disease, 14*(1). <https://doi.org/10.1038/S41419-022-05543-9>
- Verma, M., Lizama, B. N., & Chu, C. T. (2022). Excitotoxicity, calcium and mitochondria: a triad in synaptic neurodegeneration. *Translational Neurodegeneration, 11*(1). <https://doi.org/10.1186/S40035-021-00278-7>
- Verslegers, M., Lemmens, K., Van Hove, I., & Moons, L. (2013). Matrix metalloproteinase-2 and -9 as promising benefactors in development, plasticity and repair of the nervous system. *Progress in Neurobiology, 105*, 60–78. <https://doi.org/10.1016/J.PNEUROBIO.2013.03.004>
- Villarán, R. F., de Pablos, R. M., Argüelles, S., Espinosa-Oliva, A. M., Tomás-Camardiel, M., Herrera, A. J., Cano, J., & Machado, A. (2009). The intranigral injection of tissue plasminogen activator induced blood-brain barrier disruption, inflammatory process and degeneration of the dopaminergic system of the rat. *Neurotoxicology, 30*(3), 403–413. <https://doi.org/10.1016/J.NEURO.2009.02.011>
- von Engelhardt, J., Bocklisch, C., Tönges, L., Herb, A., Mishina, M., & Monyer, H. (2015). GluN2D-containing NMDA receptors-mediate synaptic currents in hippocampal interneurons and pyramidal cells in juvenile mice. *Frontiers in Cellular Neuroscience, 9*. <https://doi.org/10.3389/FNCEL.2015.00095>

## W

- Wagnon, I., Hélie, P., Bardou, I., Regnaud, C., Leseq, 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*(10), 2957–2972. <https://doi.org/10.1093/BRAIN/AWAA250>
- Wang, D., & Fawcett, J. (2012). The perineuronal net and the control of cns plasticity. *Cell and Tissue Research, 349*(1), 147–160. <https://doi.org/10.1007/S00441-012-1375-Y/METRICS>

- Wang, Y. F., Tsirka, S. E., Strickland, S., Stieg, P. E., Soriano, S. G., & Lipton, S. A. (1998). Tissue plasminogen activator (tPA) increase neuronal damage after focal cerebral ischemia in wild-type and tPA-deficient mice. *Nature Medicine* 1998 4:2, 4(2), 228–231. <https://doi.org/10.1038/nm0298-228>
- Wannamethee, S. G., & Shaper, A. G. (1996). Patterns of Alcohol Intake and Risk of Stroke in Middle-aged British Men. *Stroke*, 27(6), 1033–1039. <https://doi.org/10.1161/01.STR.27.6.1033>
- Weibel, E., & Palade, G. (1964). NEW CYTOPLASMIC COMPONENTS IN ARTERIAL ENDOTHELIA. *The Journal of Cell Biology*, 23, 101–112.
- 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. *The Lancet*, 318(8254), 1018–1020. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(81\)91217-4](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(81)91217-4)
- Woodford, H., & Price, C. (2007). EMG biofeedback for the recovery of motor function after stroke. *The Cochrane Database of Systematic Reviews*, 2007(2). <https://doi.org/10.1002/14651858.CD004585.PUB2>
- Wu, F., Echeverry, R., Wu, J., An, J., Haile, W. B., Cooper, D. S., Catano, M., & Yepes, M. (2013). Tissue-type plasminogen activator protects neurons from excitotoxin-induced cell death via activation of the ERK1/2-CREB-ATF3 signaling pathway. *Molecular and Cellular Neurosciences*, 52, 9–19. <https://doi.org/10.1016/J.MCN.2012.10.001>
- Wu, F., Nicholson, A. D., Haile, W. B., Torre, E., An, J., Chen, C., Lee, A. K., Duong, D. M., Dammer, E. B., Seyfried, N. T., Tong, F. C., Votaw, J. R., & Yepes, M. (2013). Tissue-type plasminogen activator mediates neuronal detection and adaptation to metabolic stress. *Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism*, 33, 1761–1769. <https://doi.org/10.1038/jcbfm.2013.124>
- Wu, F., Wu, J., Nicholson, A. D., Echeverry, R., Haile, W. B., Catano, M., An, J., Lee, A. K., Duong, D., Dammer, E. B., Seyfried, N. T., Tong, F. C., Votaw, J. R., Medcalf, R. L., & Yepes, M. (2012). Tissue-Type Plasminogen Activator Regulates the Neuronal Uptake of Glucose in the Ischemic Brain. *The Journal of Neuroscience*, 32(29), 9848. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.1241-12.2012>
- Wu, G. Y., Deisseroth, K., & Tsien, R. W. (2001). Activity-dependent CREB phosphorylation: convergence of a fast, sensitive calmodulin kinase pathway and a slow, less sensitive mitogen-activated protein kinase pathway. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 98(5), 2808–2813. <https://doi.org/10.1073/PNAS.051634198>

Wu, J., Echeverry, R., Guzman, J., & Yepes, M. (2010). Neuroserpin Protects Neurons from Ischemia-Induced Plasmin-Mediated Cell Death Independently of Tissue-Type Plasminogen Activator Inhibition. *The American Journal of Pathology*, 177(5), 2576–2584. <https://doi.org/10.2353/AJPATH.2010.100466>

## X

Xu, Q., Tam, M., & Anderson, S. A. (2008). Fate mapping Nkx2.1-lineage cells in the mouse telencephalon. *Journal of Comparative Neurology*, 506(1), 16–29. <https://doi.org/10.1002/CNE.21529>

## Y

Yaghi, S., Willey, J. Z., Cucchiara, B., Goldstein, J. N., Gonzales, N. R., Khatri, P., Kim, L. J., Mayer, S. A., Sheth, K. N., & Schwamm, L. H. (2017). Treatment and Outcome of Hemorrhagic Transformation After Intravenous Alteplase in Acute Ischemic Stroke: A Scientific Statement for Healthcare Professionals from the American Heart Association/American Stroke Association. *Stroke*, 48(12), e343–e361. <https://doi.org/10.1161/STR.000000000000152>

Yang-Feng, T. L., Opdenakker, G., Volckaert, G., & Francke, U. (1986). Human tissue-type plasminogen activator gene located near chromosomal breakpoint in myeloproliferative disorder. *American Journal of Human Genetics*, 39(1), 79. [/pmc/articles/PMC1684028/?report=abstract](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/1684028/)

Yang, S., Cacquevel, M., Saksida, L. M., Bussey, T. J., Schneider, B. L., Aebischer, P., Melani, R., Pizzorusso, T., Fawcett, J. W., & Spillantini, M. G. (2015). Perineuronal net digestion with chondroitinase restores memory in mice with tau pathology. *Experimental Neurology*, 265, 48. <https://doi.org/10.1016/J.EXPNEUROL.2014.11.013>

Yang, X. L., Zeng, M. L., Shao, L., Jiang, G. T., Cheng, J. J., Chen, T. X., Han, S., Yin, J., Liu, W. H., He, X. H., & Peng, B. W. (2019). NFAT5 and HIF-1 $\alpha$  Coordinate to Regulate NKCC1 Expression in Hippocampal Neurons After Hypoxia-Ischemia. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, 7. <https://doi.org/10.3389/FCELL.2019.00339>

- Yao, Y., & Tsirka, S. E. (2011). Truncation of monocyte chemoattractant protein 1 by plasmin promotes blood-brain barrier disruption. *Journal of Cell Science*, *124*(Pt 9), 1486–1495. <https://doi.org/10.1242/JCS.082834>
- Yepes, M., & Lawrence, D. A. (2004). Tissue-type plasminogen activator and neuroserpin: A well-balanced act in the nervous system? *Trends in Cardiovascular Medicine*, *14*(5), 173–180. <https://doi.org/10.1016/j.tcm.2004.03.004>
- Yepes, M., Sandkvist, M., Coleman, T. A., Moore, E., Wu, J.-Y., Mitola, D., Bugge, T. H., & Lawrence, D. A. (2002). Regulation of seizure spreading by neuroserpin and tissue-type plasminogen activator is plasminogen-independent. *The Journal of Clinical Investigation*, *109*(12), 1571–1578. <https://doi.org/10.1172/JCI14308>
- 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. *Journal of Clinical Investigation*, *112*(10), 1533. <https://doi.org/10.1172/JCI19212>
- Yiin, G. S. C., Howard, D. P. J., Paul, N. L. M., Li, L., Luengo-Fernandez, R., Bull, L. M., Welch, S. J. V., Gutnikov, S. A., Mehta, Z., & Rothwell, P. M. (2014). Age-specific incidence, outcome, cost, and projected future burden of atrial fibrillation-related embolic vascular events: a population-based study. *Circulation*, *130*(15), 1236–1244. <https://doi.org/10.1161/CIRCULATIONAHA.114.010942>

## Z

- Zhang, C., An, J., Haile, W. B., Echeverry, R., Strickland, D. K., & Yepes, M. (2009). Microglial low-density lipoprotein receptor-related protein 1 mediates the effect of tissue-type plasminogen activator on matrix metalloproteinase-9 activity in the ischemic brain. *Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism*, *29*, 1946–1954. <https://doi.org/10.1038/jcbfm.2009.174>
- Zhang, Y., Behrens, M. M., & Lisman, J. E. (2008). Prolonged exposure to NMDAR antagonist suppresses inhibitory synaptic transmission in prefrontal cortex. *Journal of Neurophysiology*, *100*(2), 959–965. <https://doi.org/10.1152/JN.00079.2008>

- Zhao, B. Q., Wang, S., Kim, H. Y., Storrie, H., Rosen, B. R., Mooney, D. J., Wang, X., & Lo, E. H. (2006). Role of matrix metalloproteinases in delayed cortical responses after stroke. *Nature Medicine*, *12*(4), 441–445. <https://doi.org/10.1038/NM1387>
- Zhao, J. J., Liu, Z. W., Wang, B., Huang, T. Q., Guo, D., Zhao, Y. L., & Song, J. N. (2020). Inhibiting endogenous tissue plasminogen activator enhanced neuronal apoptosis and axonal injury after traumatic brain injury. *Neural Regeneration Research*, *15*(4), 667. <https://doi.org/10.4103/1673-5374.266914>
- Zhao, L., Jiang, C., Tao, Y., Gao, Y., Xu, Y., Zhang, R., Liu, K., Gu, H., Wang, Y., Xu, Y., & Song, B. (2022). Rationale and design of a phase 3b, prospective, randomized, open label, blinded-endpoint, multicenter trial of the efficacy and safety of urokinase thrombolysis comparing with antiplatelet agents for patients with minor stroke. *International Journal of Stroke: Official Journal of the International Stroke Society*, *17*(4), 474–477. <https://doi.org/10.1177/17474930211014344>
- Zheng, Z., Nayak, L., Wang, W., Arif Yurdagul, A. Y., 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*(7), 743. <https://doi.org/10.1182/BLOOD-2018-07-864843>
- Zhou, X., Hollern, D., Liao, J., Andrechek, E., & Wang, H. (2013). NMDA receptor-mediated excitotoxicity depends on the coactivation of synaptic and extrasynaptic receptors. *Cell Death & Disease*, *4*(3). <https://doi.org/10.1038/CDDIS.2013.82>
- Zhu, J., Xu, S., Li, S., Yang, X., Yu, X., & Zhang, X. (2018). Up-regulation of GluN2A-containing NMDA receptor protects cultured cortical neuron cells from oxidative stress. *Heliyon*, *4*(11). <https://doi.org/10.1016/J.HELIYON.2018.E00976>
- 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*.
- Zhu, W. M., Neuhaus, A., Beard, D. J., Sutherland, B. A., & Deluca, G. C. (2022). Neurovascular coupling mechanisms in health and neurovascular uncoupling in Alzheimer's disease. *Brain*, *145*(7), 2276–2292. <https://doi.org/10.1093/BRAIN/AWAC174>
- Zuba, V., Furon, J., Bellemain-Sagnard, M., Martinez de Lizarrondo, S., Lebouvier, L., Rubio, M., Hommet, Y., Gauberti, M., Vivien, D., & Ali, C. (2022). The choroid plexus: a door between the blood and the brain for tissue-type plasminogen activator. *Fluids and Barriers of the CNS*, *2022*(1), 80. <https://doi.org/10.1186/s12987-022-00378-0>



# Activateur tissulaire du plasminogène (tPA) neuronal : implications dans la modulation des réseaux périneuronaux (PNNs) et la physiopathologie des accidents vasculaires cérébraux (AVC) ischémiques

## Résumé

L'activateur tissulaire du plasminogène (tPA) est principalement reconnu pour son rôle dans la fibrinolyse, en convertissant le plasminogène en plasmine active, un processus crucial dans la dissolution des caillots sanguins. Cette propriété fait de sa forme recombinante le seul traitement pharmacologique pour le traitement des AVC ischémiques. Les accidents cérébraux sont caractérisés par une brusque interruption de l'approvisionnement sanguin au cerveau, déclenchant une cascade de réponses cellulaires, dont la nécrose excitotoxique. Cependant, le tPA ne se limite pas à son rôle vasculaire, il agit également en tant que neuromodulateur de la transmission glutamatergique en interagissant avec les récepteurs NMDA, influençant ainsi divers processus neurobiologiques. Cette thèse a poursuivi deux objectifs principaux. D'une part, elle a examiné le rôle du tPA exprimé par les interneurons à parvalbumine (PV) dans la régulation des réseaux périneuronaux (PNNs) dans des conditions normales et lors de la récupération fonctionnelle post-ischémie. D'autre part, elle a exploré le rôle du tPA endogène aux neurones dans la phase aiguë de l'excitotoxicité et de l'ischémie en utilisant des approches novatrices basées sur Adénovirus-associés (AAV). Dans la première étude, l'absence de tPA des PV a entraîné une augmentation significative de la densité des PNNs dans le cortex somatosensoriel, avec une contribution cruciale du tPA dans la dégradation de l'Aggrecan. De manière intéressante, les souris déficientes en tPA uniquement dans les interneurons à PV ont présenté une récupération fonctionnelle plus rapide après un AVC thromboembolique, bien que les PNNs n'aient pas semblé jouer un rôle direct dans ce processus. Il a été observé que le tPA augmente l'activation du récepteur NMDA sur les interneurons à PV, suggérant un lien potentiel avec la récupération fonctionnelle. Dans la seconde étude, nous avons confirmé la présence de tPA au sein des neurones corticaux grâce à l'utilisation de vecteurs AAV9-pPlat-GFP. En situation excitotoxique, les neurones exprimant le tPA ont montré une résistance accrue par rapport à ceux dépourvus de cette protéine, tout en exerçant un effet toxique paracrine sur les neurones voisins non exprimant le tPA. De plus, lors d'une ischémie thromboembolique, la délétion du tPA neuronal a eu des effets délétères, augmentant les volumes de lésions ischémiques et la mort neuronale, indépendamment du phénotype neurochimique des neurones (excitateurs vs inhibiteurs). Ces résultats novateurs enrichissent notre compréhension du rôle du tPA neuronal dans la régulation des réseaux périneuronaux et des phénomènes excitotoxiques/ischémiques, offrant de nouvelles perspectives pour la recherche en neurobiologie et la prise en charge des AVC.

**Mots clés** : tPA, interneurons PV/neurons, PNNs, excitotoxicité, AVC ischémiques

## Abstract

Tissue-type plasminogen activator (tPA) is primarily known for its role in fibrinolysis, converting plasminogen into active plasmin, a critical process in the dissolution of blood clots. This property makes its recombinant form the only pharmacological treatment for ischemic strokes. Strokes are characterized by a sudden interruption of blood supply to the brain, triggering a cascade of cellular responses, including excitotoxic cell death. However, tPA's role extends beyond vascular functions, as it also acts as a neuromodulator of glutamatergic transmission by interacting with NMDA receptors, influencing various neurobiological processes. This thesis pursued two main objectives. Firstly, it examined the role of tPA expressed by parvalbumin (PV) interneurons in the regulation of perineuronal nets (PNNs) under normal conditions and in post-ischemic functional recovery. Secondly, it explored the role of endogenous neuronal tPA in the acute phase of excitotoxicity and ischemia using innovative approaches based on Adeno-Associated Viruses (AAV). In the first study, the absence of tPA in PV interneurons led to a significant increase in PNN density in the somatosensory cortex, with tPA playing a crucial role in aggrecan degradation. Interestingly, mice deficient in tPA only in PV interneurons showed faster functional recovery after thromboembolic stroke, even though PNNs did not seem to play a direct role in this process. It was observed that tPA increased the activation of NMDA receptors on PV interneurons, suggesting a potential link with functional recovery. In the second study, we confirmed the presence of tPA within cortical neurons using AAV9-pPlat-GFP vectors. In an excitotoxic context, tPA-expressing neurons exhibited increased resistance compared to those without tPA, while also exerting a paracrine toxic effect on neighboring neurons lacking tPA. Furthermore, during thromboembolic ischemia, neuronal tPA deletion had deleterious effects, increasing ischemic lesion volumes and neuronal death, regardless of the neurochemical phenotype of the neurons (excitatory vs inhibitory). These groundbreaking results enhance our understanding of the role of neuronal tPA in the regulation of perineuronal networks and excitotoxic/ischemic phenomena, offering new perspectives for neurobiology research and stroke management.

**Keywords**: tPA, PV interneurons/neurons, PNNs, excitotoxicity, ischemic stroke