



Étude de la contribution de l'activateur tissulaire du plasminogène (tpa) vasculaire à la physiopathologie cérébrale

Jonathane Furon

► To cite this version:

Jonathane Furon. Étude de la contribution de l'activateur tissulaire du plasminogène (tpa) vasculaire à la physiopathologie cérébrale. Médecine humaine et pathologie. Normandie Université, 2022. Français. NNT : 2022NORMC411 . tel-03880826

HAL Id: tel-03880826

<https://theses.hal.science/tel-03880826>

Submitted on 1 Dec 2022

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

THÈSE

Pour obtenir le diplôme de doctorat

Spécialité ASPECTS MOLECULAIRES ET CELLULAIRES DE LA BIOLOGIE

Préparée au sein de l'Université de Caen Normandie

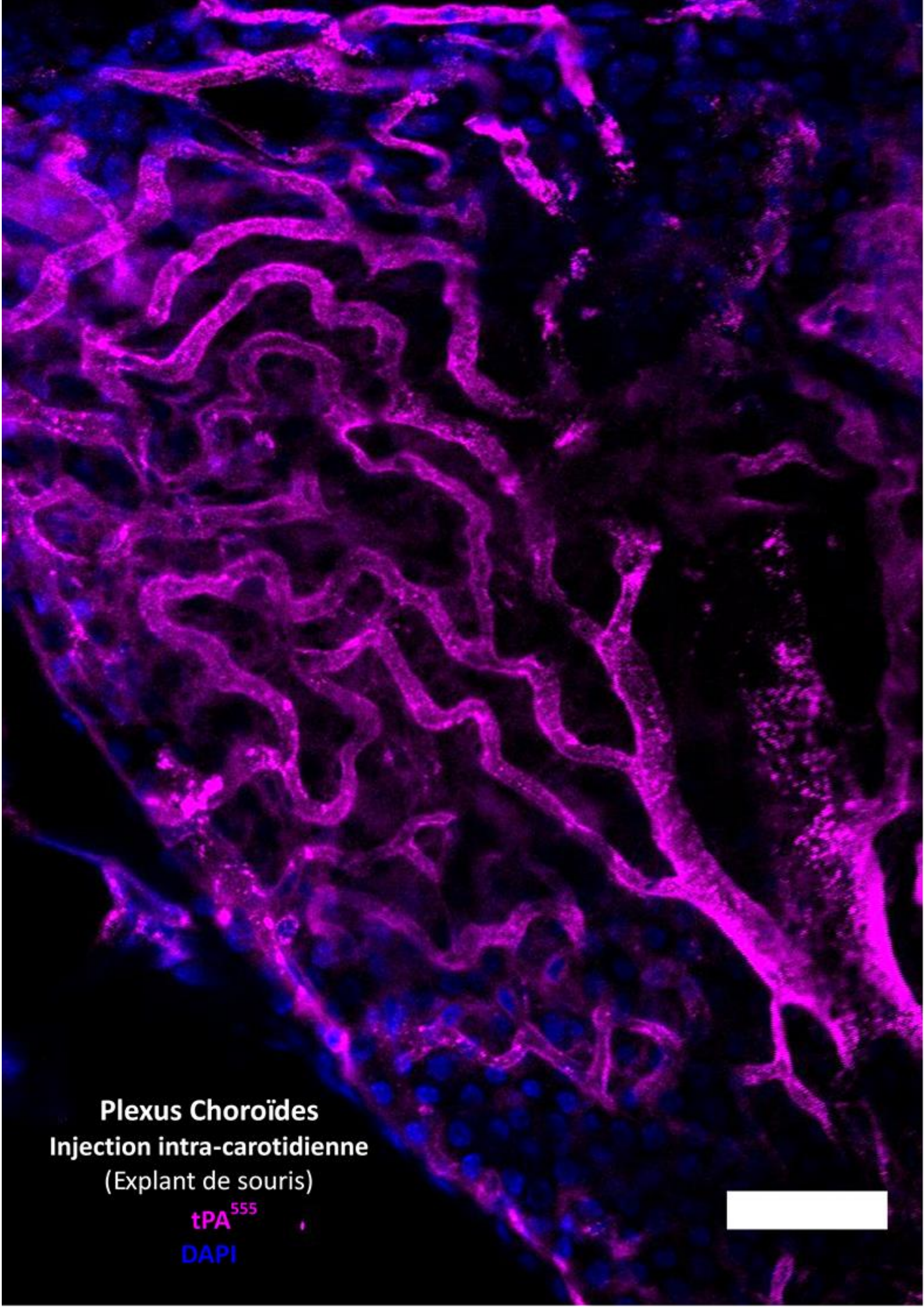
Etude de la contribution de l'activateur tissulaire du plasminogène (tpa) vasculaire à la physiopathologie cérébrale

**Présentée et soutenue par
JONATHANE FURON**

**Thèse soutenue le 09/11/2022
devant le jury composé de**

M. JEROME BADAUT	Directeur de recherche, CNRS	Rapporteur du jury
MME NATHALIE KUBIS	Professeur des universités PraticienHosp, UNIVERSITE PARIS 7 PARIS DIDEROT	Rapporteur du jury
M. PIERRE MANGIN	Directeur de recherche, Institut national de la santé et de la recherche médicale	Membre du jury
MME NATHALIE STRAZIELLE	Chercheur HDR, Université Lyon 1 Claude Bernard	Membre du jury
M. DENIS VIVIEN	Professeur des universités PraticienHosp, Université de Caen Normandie	Membre du jury
M. OMAR TOUZANI	Professeur des universités, 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)



Plexus Choroïdes
Injection intra-carotidienne
(Explant de souris)

tPA⁵⁵⁵
DAPI

*On travaille dur dans la vie pour se construire.
Travaille dur et souffre en silence, les résultats parleront
à ta place.*

« Le seul homme à ne jamais faire d'erreurs est celui qui ne fait rien. »

Theodore Roosevelt

*« Pour réussir, travailler dur, ne jamais abandonner et surtout chérir
une obsession magnifique. »*

Walt Disney

« Les portes de l'avenir sont ouvertes à ceux qui savent les pousser. »

Coluche

A mes parents,

Régis & Fabienne

Pour m'avoir permis d'atteindre mes objectifs.

Pour tout votre amour et tout votre soutien.

A toute ma famille.

A tous mes amis.

Je dédie ce travail de thèse

Le doctorat est une sacrée aventure qui nous fait évoluer et nous fait grandir. C'est aussi bien un sport d'équipe, qu'un sport individuel. J'ai appris énormément sur le plan scientifique et les plans pratico-technique. J'ai également appris énormément sur moi : j'ai développé ma créativité, appris à prendre des risques, ainsi que la patience, tout ça, parmi bien d'autres choses. C'est également un sport d'équipe parce que ces aboutissements individuels n'auraient jamais pu exister sans le soutien et la présence de nombreuses personnes ; je n'aurais jamais pu devenir qui je suis sans vous. C'est grâce à vous tous que je peux dire merci aujourd'hui.

REMERCIEMENTS

En premier lieu, je tiens à remercier le Professeur **Denis Vivien**. Merci Denis de m'avoir accueilli (comme beaucoup d'autres) au sein de ton laboratoire, et ce depuis que je suis venu te voir pour mon 1^{er} stage de Master. Je tiens à te remercier pour tous les moyens ainsi que le libre accès, que tu mets à notre disposition pour nos projets de recherche, nous permettant de faire, à mon sens, une « thèse de luxe ». Merci pour ta confiance en mes capacités à pouvoir développer mes propres travaux. Merci aussi pour ton aide à tout moment et ton respect. J'ai énormément appris durant toutes ces années et au fil de nos interactions.

Je tiens également à remercier le Professeur **Carine Ali**. Carine, que dire ? mis à part : un « immense MERCI » pour tout ; pour avoir été mon mentor, pour avoir cru en moi, merci de m'avoir soutenu à chaque étape que nous avons vécu, merci pour tes innombrables conseils, pour ta bienveillance, pour tout ton temps (24h/24, 7J/7), ton respect, ton écoute et bien sur ta compréhension durant ces 5 dernières années, que ce soit au sein de ma thèse ou à l'extérieur. J'ai tellement appris depuis le début de cette aventure, sur la science, sur la recherche, sur moi-même, et je n'oublierai rien de tout ça. Voir ta fierté à ces différents moments de ma fin de thèse : pendant ma présentation de Poster à la *FENS*, notre congrès *IFSP 2022* (avec notre récompense de travail d'équipe pour le *D. Collen YIA*), et même en cette fin d'aventure, c'est ma plus belle récompense. J'espère et je le souhaite de toutes mes forces que nous continuions ensemble et que nos interactions perdurent. En plus d'être la « Maman » de tes étudiants, tu es la « Maman » du labo. Encore merci pour tout Chef !!

Mes remerciements les plus sincères vont également à l'ensemble des membres de mon jury : Le professeur **Nathalie Kubis** ainsi que le docteur **Jérôme Badaut**, pour avoir accepté de relire et d'évaluer ce travail, merci pour toutes vos suggestions et vos échanges. Le professeur **Pierre Mangin** et le docteur **Nathalie Strazielle** pour avoir accepté d'examiner ce travail. Le professeur **Omar Touzani** pour avoir accepté

d'examiner ce travail mais également en souvenir des enseignements suivis durant l'intégralité de mon master. Tu es un scientifique doublé d'un pédagogue qui m'auront beaucoup marqué, et que je suis fier de connaître.

Merci à **Cyrille**, d'une part pour le côté « Pro », merci pour tout ce que tu m'as appris, tout ce que tu m'as transmis depuis le master, tout le savoir-faire de physio, l'éthique, le fonctionnement des structures. Merci d'avoir toujours pris ma défense sur mon projet et de m'avoir soutenu face à la critique. Et surtout pour le côté « Perso », tu as été comme un père au labo. Merci pour tous nos délires, nos conneries du matin, souvent au café devant l'entrée, tous nos « *Call on meeeeeee a eeeeeeee* » avec chorées svp, « *la beaufitude* », toutes nos imitations diverses et variées : le « *Vélo-Célia-ciraptor* », le paresseux de zootopie... Toutes nos vadrouilles (et j'en passe) et points « Bricolage » qui font toujours plaisir. Pour tout ça, merci professeur Orset (*Orset et al., Stroke 2007*, bien sûr haha).

Merci à **Ben** pour ton soutien permanent, tu auras toujours été de bons conseils, sur la musique Rock (bien sûr), sur les motos... et surtout sur la science. Merci pour tout, les délires, les bières, le Nerf, et ce pt'i Pogo aux Red Hot (*La bouffe épicée*).

Merci à **Sara M** pour ton aide, tes nombreux conseils, tes encouragements, ainsi que ta bonne humeur.

Merci à **Manue**, notre gestionnaire. Merci pour tout ton aide et ton soutien pendant ma thèse, merci pour tous ces petits cafs du matin accompagné de toutes ces belles discussions. J'espère que tu réussiras dans tes nouveaux projets, et j'espère qu'on se reverra un de ces quatre. Merci à toi aussi **Sandrine** pour tout ton aide et ton soutien également, surtout en cette fin de thèse.

Merci à **Jean-Michel**, pour tous les cafés, les discussions, tous ces fou-rires avec tous tes « Narvalloooo » ou « Bande de con ». Merci à **Yannick**, **Lolo** et **Marion** pour les conseils et les coups de mains, les discussions (moto, chasse ou même scientifique) et surtout la bonne humeur.

Un paragraphe très spécial pour la génération qui m’a cocooné. Tout d’abord mes 2 amours de biches **Fanny** et **Célia**. Un grand merci, depuis que je suis arrivé, vous avez été comme 2 grandes sœurs et je vous dois beaucoup pour ça. Vous m’avez toujours soutenu, vous avez toujours été là pour moi, avec une bienveillance et une amitié à toute épreuve. Merci pour toutes ces soirées, ces karaokés, la sortie « Camtard », tous ces cafés, ces apéros, ces pots, ces VnB....

Merci à vous 2 **Damien** et **Florent**, les deux compères. Merci pour tout votre soutien, tous ces moments partagés, les coups de mains, les délires, les bières, les manips, accompagnées des classiques de la variété française bien entendu ou des débats poussés.

Un merci tout particulier à **Faf**, **Audrey** et **Dam** pour avoir pris le temps de relire cette thèse, et pour tous les « Tips ». Merci les Docteur(s).

Le prochain paragraphe est pour « ma génération » avec qui j'ai commencé cette aventure, depuis le Master 2. Merci à **Léonie** ma première camarade de bureau et mon binôme de soutenance de thèse (on aura fait la paire jusqu'au bout), **Charlène, Caro, Quentin, Erwan, Fatima** (La re-seu), **Jadou, Chachou, Manon** (les cervosciens), **Cassandre** (l'équipe du haut haha) Sans oublier les copains du M2 qui ne sont plus à Caen, mais à qui on pense quand même, **Célia, Cassandre, Adeline, Romane** (aka le « *Cookie Gang* »). Cette aventure c'est poursuivi en thèse avec vous tous bien entendu mais également des nouvelles rencontres : **Amandine, Kun Kun, Martina, Islem, Francesca, Manue, Mario V, Éloïse, Mélina**. Je vous remercie pour tous ces très bons moments que nous avons pu partager ensemble.

Merci à toi **Quentin**, on a commencé cette aventure ensemble, et je n'oublierai jamais ces années où on aura été les « jumeaux maléfiques » de l'unité *haha*. On aura quand même mis une sacrée bonne ambiance et on aura malgré tout réussi à unifier beaucoup de gens en duo ou trio avec la Mervouille, « *hein ma pupuce* ». Je n'oublierai jamais toute cette complicité et tous ces bons moments passés aussi bien au labo qu'à l'extérieur (et y'en a tellement que je ne peux pas les lister). Aujourd'hui tu as pris un chemin différent, j'espère que tu y trouveras la paix. Comme j'ai toujours dit : « *il faut faire des choix dans la vie mais surtout il faut les assumer* ».

Merci à la *Team Cardio*, **Christophe** (pour tous ces « *Saluuuuut* » et toutes ces discussions chasse), **Laurent, Arthur** (mon 4^{ème} CSI, et collègue de galère de physio 2), **Margaux, PA, Sara, Laura, Alexandre (X2), Harlyne, Quentin D...** Pour tous ces échanges, ces débats de société et ces délires (à 90% en physio 2). Merci **Florent** et **Arthur** pour tout ce temps passer dans cette « *Zone de non droit* » en notre présence commune avec tout ce que cela implique.

Bien Évidemment je ne peux pas oublier toute l'équipe du CURB. Un grand merci à **Séverine, Céline** « *C'est pas les remerciements du siècle, je sais bien je ferais mieux à mon oral de Master promis* », **Charlotte, Palma, Antho, Charlène, Bruno, Romaric, Claudine, Laurine.**

Vient le tour de la « nouvelle génération ». Merci à vous **Paulo** (« *La seigneurie de ses morts* » tu connais), **Hortense** (Mazette), **Mélissa** (Maryline Monroe/Roger), **Hélène, Julie** (la bretonne à 75%), **Élise**, pout tout, depuis que l'on se connaît je n'ai passé que des bons moments avec vous et je vous en suis reconnaissant. Le petit groupe qu'on a eu (qui a perduré un peu) et tout ce qu'on a fait avec ces soirées, la sortie camping...témoigne de cette complicité.

Petit aparté pour les membres du bureau « C047 » que j'ai pu connaître : L'ancienne version, avec ma **Faf** d'amour, ma **Mervouille**, mon **Paulo** avec laquelle je me suis beaucoup épanoui scientifiquement. Ou on aura ris tous les jours avec cette bonne ambiance, toutes ces batailles de Nerf à traquer le Jean-Michel sauvage. Bref, tous les bons moments. Et la nouvelle version, avec toujours mon **Paulo** et les « Mazettes » (**Hortense, Charlotte, Mélissa**), **Mathys** et **Simon**. Merci pour tous ces fous rires et toutes ces batailles diverses et variées (qui mériteraient un chapitre d'histoire) à base de Nerf, d'eau, de glace, de douche (hein **Mélissa**), ou autres fournitures de bureau, et tous ces moments musique de fond (allant du RAP jusqu'à Slipknot) et les conneries en général. Un merci spécial à ma bichette **Mélissa**, pour toutes les bagarres, toutes les rigolades et pour la conception de mon film de thèse, comme tu dirais « *Toupoutoupoutou* ».

Merci aussi à **Audrey** « *Sensei la Pic* » (« *Cobra Kai never die* »), **Andréa** (je suis fier de toi mon *DD McFly*), **Elsa, Swannax, Mathys** (*Jazz Manouch mon cousin*), **Mimi, Charlotte** (« *Mange tes morts* » et « *coule la terrasse* » *haha*), **Simon, Pauline (Popo), Basile...** et les petits derniers **Tamara, Louis, Camille, Cheun, Marion, Juliette, Jasmine, Mélanie.**

Merci à tous les médecin(e)s que j'ai eu la chance de rencontrer et côtoyer au cours de ces différentes années : **Thomas M, Nicolas S, Charlotte A** (Les compères du Master), **Alin B, Suzanne G, J-F S, Marine R, Mastro, Ambre, R Célia B, Élise D...**

Merci à tous ceux de Cyceron en général (Je fais ça tard, j'en ai peut-être oublié) avec qui j'ai pu échanger, discuter, rigoler ou juste boire un café pendant toutes ces années : **Marion, Gaëtane, Laurent C, Jérôme(s), Fatéméh, Nathalie, Mickael, Loïc, Benoit, Audrey, Ahmed, Gina, Paolo, Aurore, Sybille, Shay, Syrielle...**

Merci au professeur **Vincent Berezowski** et au docteur **Géraldine Liot** qui au travers de mon CSI mon suivi et conseillé tout au long de ma thèse.

Aux **gardien(ne)s** : Merci pour tous ces cafés (les Weekends ou pendant les périodes de confinement), toutes ces discussions diverses et variées (la mairie, la musique, le RAP, la chasse, la pêche, la moto ou les travaux...), tous ces « Tu es encore là toi à cette heure-là... Rentre chez toi »

Aux **femmes de ménage** : tous ces matins à la fraîche « Bonjour » ça va bien ? » « Niquel comme un lundi...jusqu'au Vendredi »

Et tous ceux à qui j'ai juste dit tout simplement « *Bonjour* » le matin au café (d'ailleurs, merci à la cafetière pour ces milliers de millions de cafés).

Je veux maintenant dire un grand merci à tous les membres de ma famille qui m'ont toujours poussé vers le meilleur ! Tout d'abord la petite famille Marie : **Tonton, Tata, Baba, Mimi & Flora**. Je suis tellement heureux des liens que nous avons ressoudés après toutes ces années. Je pense que si je me suis tant épanoui durant ces dernières années, je vous le dois sincèrement. Je vous le dis, Mimi, Flora et Baba, tous nos délires (je ne vais pas les citer y'en a trop) et nos conneries avec « Les épaves », ces « soirées nouvel an, musique...bordel...moins bordel...de 12h... », ou juste nos conneries attablées (avec le fond musical adapté), que nous vivons ensemble et plus

simplement cet état d'esprit de famille qu'on partage, c'est juste quelque chose de magique et ça vaut plus à mes yeux tout l'or du monde. J'espère que ça durera longtemps. De même, merci à mon parrain **Norbert** et mon cousin **Manu**, merci d'être tout simplement là pour moi.

Enfin, un dernier paragraphe à mes parents et grands-parents. Merci à ma **grand-mère** chérie, pour tous les moments partagés ensemble. Tu m'as toujours supporté et tu as toujours cru en moi. Merci pour tous ces moments précieux mémé. Je t'aime ! Une petite pensée pour pépé **Albert**, **Bernard** et **Mémère/Pépère Furon** qui me regardent probablement de là-haut...J'espère que vous êtes fier. Je vous aime !

Merci à mes parents, mon papa **Régis** et ma maman **Fabie(nne)** pour TOUT : votre amour, votre soutien, votre présence au quotidien... On a vécu des moments très durs ces temps-ci, mais malgré tout cela vous m'avez toujours encouragé quand j'étais à bout, félicité quand je réussissais, vous avez toujours été là pour moi ! C'est grâce à vous que je suis qui je suis aujourd'hui, grâce à vous je que je suis parti d'où je suis parti pour arriver là où je suis aujourd'hui, grâce à vous que j'ai écrit ces lignes ce soir dans mon propre manuscrit. Je vous serai éternellement reconnaissant de m'avoir porté jusqu'à ce jour. Merci mes parents, Je vous aime !

AVANT-PROPOS

J'ai effectué ma thèse au sein de l'Unité INSERM U1237 « *Physiopathology and Imaging of Neurological Disorders* » (**PhIND**) dirigée par le Professeur Denis Vivien. Historiquement, la thématique de recherche de cette unité concerne les **sérines protéases**, et plus particulièrement l'activateur tissulaire du plasminogène ou **tPA**. Initialement découverte dans le **sang** où elle joue un rôle dans la cascade **fibrinolytique**, faisant aujourd'hui de cette protéase le seul traitement pharmacologique autorisé en clinique pour **lyser les caillots** lors d'une **ischémie cérébrale**. Cependant, ses fonctions ne se limitent pas à la fibrinolyse. En effet, le tPA est également exprimé dans le **parenchyme cérébral**, où il peut avoir des rôles variés, comme le contrôle de la mémoire ou du **couplage neurovasculaire**. Au-delà de ses **effets physiologiques**, le tPA a également des effets néfastes en **conditions pathologiques** : ainsi, lors de l'ischémie cérébrale, le tPA amplifie la mort neuronale **excitotoxique** et l'inflammation. Son implication dans ces processus peut alors être dépendante de son interaction directe avec différentes protéines et/ou récepteurs.

L'objectif majeur du laboratoire est donc de chercher à améliorer la **compréhension des mécanismes d'action du tPA** au sein du **système nerveux central** et de l'**unité neurovasculaire**, en conditions aussi bien **physiologique** que **pathologique**. Ces recherches ont pour but d'améliorer l'utilisation du **tPA en clinique** : c'est-à-dire **sauvegarder ses effets bénéfiques** tout en **supprimant ses effets délétères**.

Mes travaux de thèse visent donc à définir précisément la contribution du **tPA endogène vasculaire** *versus* **parenchymateux** dans la physiopathologie cérébrale, et plus particulièrement dans deux processus différents : l'un physiologique, lors du couplage neurovasculaire (**étude 1**) et du passage des barrières cérébrales (**étude 2**) et l'autre pathologique, lors d'une ischémie cérébrale (**étude 3**).

Ainsi, pour présenter mes travaux de recherche, je commencerai l'introduction par la description de la physiopathologie des **Accidents Vasculaires Cérébraux**. Je présenterai dans un second temps la molécule centrale de cette thèse : le **tPA**. Les résultats de mes travaux seront ensuite présentés sous **3 parties distinctes**, chacune présentée sous forme d'un **article**, précédé par une mise en **contexte bibliographique**, faisant lien entre le contexte de l'étude et les éléments spécifiquement liés au tPA dans ce contexte. Pour finir, les résultats seront commentés et **mis en perspective** dans une **discussion**.

RÉSUMÉ

L'accident vasculaire cérébral (AVC) ischémique est une pathologie aux conséquences souvent dramatiques et pour laquelle l'approche thérapeutique pharmacologique aiguë reste trop peu efficace. Celle-ci consiste à administrer l'activateur tissulaire du plasminogène (tPA), qui permet indirectement de dégrader la fibrine, le principal composant des caillots. Le tPA vasculaire est aussi produit de manière endogène par l'endothélium. Il est aussi exprimé par d'autres organes, dont le cerveau, et le tPA vasculaire peut entrer dans le parenchyme cérébral, *via* la barrière hémato-encéphalique (BHE). De ce fait, attribuer avec certitude une fonction cérébrale au tPA vasculaire est limité par l'absence d'outils précliniques permettant d'éliminer sélectivement le tPA circulant sans affecter le tPA des autres compartiments de l'organisme. Nos travaux visent donc à développer des outils originaux afin de définir précisément la contribution du tPA endogène vasculaire dans la physiopathologie cérébrale, et notamment dans deux processus distincts : l'un physiologique, lors du couplage neurovasculaire (CNV) et l'autre pathologique, lors d'une ischémie cérébrale. Nous avons développé un modèle de parabiose entre une souris sauvage (tPA^{WT}) et une souris totalement déficiente en tPA (tPA^{Null}), avec l'hypothèse que le partage de circulation sanguine restaure le niveau circulant de tPA chez la souris déficiente, sans affecter ce niveau dans les autres compartiments. Nous démontrons ainsi que les taux physiologiques de tPA vasculaire (produit libéré par les cellules endothéliales et hépatiques) favorisent le CNV *via* un mécanisme dépendant des récepteurs NMDA endothéliaux. De plus, nous apportons les premières démonstrations que le tPA vasculaire rejoint le cerveau en franchissant la barrière formée par les plexus choroïdes. Enfin, nous montrons que, dans le cadre d'un AVC thromboembolique, le tPA vasculaire endogène permet de protéger le cerveau en restaurant de manière efficace la perfusion cérébrale.

Mots clés : AVC, BHE, BSLCS, Cerveau, CNV, Parabiose, Plexus Choroïdes, tPA.

ABSTRACT

Stroke is a pathology with dramatic consequences and for which the acute pharmacological therapeutic approach remains too inefficient. This approach consists in administering tissue-type plasminogen activator (tPA), which indirectly allows to degrade fibrin, the main component of clots. Vascular tPA is also endogenously produced by the endothelium. It is also expressed by other organs, including the brain, and vascular tPA can enter the cerebral parenchyma, via the blood-brain barrier (BBB) and /or choroid plexuses. Thus, it is difficult to attribute a specific cerebral function to vascular tPA because no known preclinical tool can selectively eliminate circulating tPA without affecting tPA levels in the other compartments of the body. Our work therefore aims to develop original tools in order to precisely define the contribution of endogenous vascular tPA to cerebral physiopathology, and in particular two distinct processes: a physiological, during neurovascular coupling (NVC) and the other pathological, during stroke. We developed a parabiosis between a Wild-Type mouse (tPA^{WT}) and a totally tPA-deficient mouse (tPA^{Null}), with the hypothesis that blood circulation sharing restores the circulating level of tPA in the deficient mouse, without affecting the level in others compartments. We thus demonstrate that physiological levels of vascular tPA (product released by endothelial and hepatic cells) promote CNV via a mechanism dependent on endothelial NMDA receptors. Similarly, we provide the first demonstrations that vascular tPA reaches the brain by crossing the barrier formed by the choroid plexus. Finally, we show that in the context of a thromboembolic stroke, vascular tPA, despite specific effects, has an overall beneficial effect.

Key words: BBB, BCSFB, Brain, Choroid Plexus, NVC, Parabiosis, Stroke, tPA.

SOMMAIRE

REMERCIEMENTS.....	4
AVANT-PROPOS	11
RÉSUMÉ.....	13
ABSTRACT.....	13
SOMMAIRE	15
INDEX DES FIGURES ET TABLEAUX	19
LISTE DES ABRÉVIATIONS	23
INTRODUCTION.....	27
Chapitre 1 : Les Accidents Vasculaires Cérébraux.....	29
1.1 Généralités.....	1
1.1.1 Epidémiologie	2
1.1.2 Différents types d'AVC : hémorragique et ischémique	3
1.1.3 Facteurs de risque de l'AVC	4
1.2 Physiopathologie de l'AVC ischémique	7
1.2.1 Lésions vasculaires.....	8
1.2.2 Formation du caillot.....	8
1.2.3 Expansion du caillot et cascade fibrinolytique	10
1.2.4 Formation de la lésion et atteintes vasculaires et parenchymateuses	11
1.2.5 Altération de la barrière hémato-encéphalique	13
1.2.6 Atteintes parenchymateuses.....	15
1.3 Traitement de l'AVC ischémique.....	22
1.3.1 Phase aiguë : la thrombolyse (1995) et la thrombectomie (2015).....	22
1.3.2 Phase chronique : rééducation et réadaptation.....	24
Chapitre 2 : L'Activateur tissulaire du Plasminogène (tPA), enzyme centrale de la fibrinolyse.....	26
1.1 Historique de la découverte du tPA.....	27
1.2 La structure du tPA.....	29

1.3	Expression du tPA	32
1.3.1	Expression du tPA circulant	32
1.3.2	Expression et distribution du tPA périphérique.....	36
1.3.3	Expression et distribution du tPA au sein du système nerveux central .	37
1.4	Inhibition du tPA par les serpins.....	42
1.4.1	PAI-1.....	44
1.4.2	Neuroserpine	45
1.5	Les fonctions du tPA.....	46
1.5.1	Fonction(s) du tPA vasculaire	46
1.5.2	Fonction(s) du tPA parenchymateux.....	56
OBJECTIFS		76
RÉSULTATS.....		79
Partie 1.....		80
Article 1.....		87
<i>The choroid plexus: a door between the blood and the brain for tissue-type plasminogen activator.</i>		87
Partie 2.....		137
Article 2.....		145
<i>Blood tPA of liver origin contributes to neurovascular coupling involving brain endothelial NMDA receptors.....</i>		145
Partie 3.....		202
Article 3.....		208
<i>Parabiosis to discriminate the vascular versus parenchymal contribution of endogenous tissue-type plasminogen activator to stroke.....</i>		208
DISCUSSION		246
1.1 Le tPA vasculaire traverse la BSLCS pour rejoindre le parenchyme cérébral.....		247
1.1.1	L'épithélium choroïdien internalise le tPA vasculaire exogène	248
1.1.2	Quelle est la suite du cheminement du tPA ?	249
1.1.3	Mécanisme du passage du tPA vasculaire par les PCs.....	250
1.1.4	Autres éléments de discussion et perspectives	255
1.2 Le tPA vasculaire est impliqué dans le CNV		257

1.2.1	Le tPA circulant contrôle-t-il le CNV et si oui comment ?	258
1.2.2	Quelles sont les sources de tPA circulant impliquées dans le CNV ? ...	260
1.2.3	Le tPA vasculaire dans la modulation du CNV, en conditions pathologiques.	263
1.3	Le tPA vasculaire est bénéfique dans un modèle d'AVC thromboembolique.....	264
1.3.1	L'action du tPA vasculaire sur un caillot riche en fibrine <i>versus</i> riche en plaquettes	265
1.3.2	Le tPA vasculaire endogène permet une recanalisation artérielle progressive dans le modèle thrombo-embolique d'AVC	266
1.3.3	Le tPA vasculaire endogène réduit la taille des lésions ischémiques....	269
1.3.4	Perspectives : la nécessité d'approches complémentaires !.....	270
AUTRES TRAVAUX.....		273
Article 4		274
	<i>Bumetanide lowers acute hydrocephalus in a rat model of subarachnoid hemorrhage</i>	274
Article 5		282
	<i>Imagery evaluation of cerebrovascular inflammation and functional consequences induced by sublethal doses of sarin surrogate: non-invasive imaging methods to predict long-term deficits.....</i>	282
Article 6		283
	<i>Tolerogenic effect of antigen-encapsulating nanoparticles toward specific T cell response against N-methyl-D-aspartate receptor in an autoimmune encephalitis model</i>	283
Article 7		285
	<i>Blockage of the endothelial tPA-NMDA receptors signaling prevents inflammatory processes and risks of hemorrhagic transformations following ischemic stroke.....</i>	285
BIBLIOGRAPHIE.....		287
ANNEXES		344

INDEX DES FIGURES ET TABLEAUX

Figure 1 : Classification des AVC en deux catégories.....	1
Figure 2 : Incidence des AVC dans le monde en 2019.	2
Figure 3 : Répartition des différents types/ sous-types d'AVC.	3
Figure 4 : Incidence d'AVC attribuables à des facteurs de risques modifiables en 2019.	5
Figure 5 : Contribution des facteurs de risque modifiables à l'AVC.	6
Figure 6 : Réponse aux lésions vasculaires.....	8
Figure 7 : L'agrégation plaquettaire sur l'endothélium lésé.....	10
Figure 8 : Les territoires en souffrance lors d'une ischémie.....	12
Figure 9 : Évolution du foyer ischémique et de la pénombre au cours du temps.....	13
Figure 10 : Structure de la barrière hémato-encéphalique.	14
Figure 11 : Différentes étapes et mécanismes délétères lors d'une ischémie cérébrale.	16
Figure 12 : Profil temporel de la neuroinflammation post-ischémie.....	18
Figure 13 : Evaluation fonctionnelle par l'échelle modifiée de Rankin de patients victimes d'un AVC ischémique, à 3 mois selon le traitement reçu (placebo ou r-tPA ou thrombectomie).....	23
Figure 14 : Chronologie des grandes découvertes sur le tPA.....	28

Figure 15 : Structure et fonctions des domaines du tPA, sous ses 2 formes simple et double chaîne.	31
Figure 16 : La suppression de DACH1 dans les hépatocytes augmente le tPA hépatique, le tPA plasmatique et l'activité fibrinolytique systémique chez la souris.	34
Figure 17 : Le foie combiné aux cellules endothéliales établit le taux basal de tPA circulant.	35
Figure 18 : La clairance hépatique du tPA.....	36
Figure 19 : Activité et localisation du tPA en dehors du système nerveux.	37
Figure 20 : Distribution du tPA dans différents types cellulaires du SNC chez la souris.	38
Figure 21 : Caractérisation de neurones pyramidaux exprimant du tPA.....	39
Figure 22 : Expression du tPA par les astrocytes chez l'Homme.	40
Figure 23 : Le tPA impliqué dans la migration des précurseurs oligodendrocytaires et la remyélinisation suite à une lésion de la substance blanche.	41
Figure 24 : Le tPA est exprimé par la microglie.....	42
Figure 25 : Mode d'action des serpins. Interaction entre le tPA et la serpine au niveau de la RCL.	43
Figure 26 : Modulation de l'expression de PAI-1 et du tPA après une ischémie focale permanente dans le cortex de la souris.	45
Figure 27 : Mécanisme d'action de la fibrinolyse endogène.	46
Figure 28 : Spécificité de divers activateurs du plasminogène (naturels ou de synthèse).	48

Figure 29 : La barrière hématoencéphalique.	49
Figure 30 : Jonctions entre les cellules endothéliales au niveau de la BHE.	50
Figure 31 : Le tPA traverse la BHE intacte.....	51
Figure 32 : Effet du tPA sur la BHE.	52
Figure 33 : Effet du tPA vasculaire sur le couplage neurovasculaire.	55
Figure 34 : Le tPA est un neuromodulateur.	58
Figure 35 : Effet de l'absence du tPA sur la migration neuronale.....	60
Figure 36 : Mécanisme impliquant le tPA dans les processus de LTP.	62
Figure 37 : Elévation de la quantité d'ARN messenger du tPA suite à une activation neuronale chez le rat.	64
Figure 38 : Le tPA exprimé au niveau de l'amygdale module les réponses anxieuses induites par un stress.	66
Figure 39 : Le tPA protège les neurones de l'apoptose.....	67
Figure 40 : Le tPA est impliqué dans les processus de remyélinisation et de régénérescence axonale.	69
Figure 41 : Le tPA potentialise la mort neuronale excitotoxique dans l'hippocampe.	70
Figure 42 : Contrecarrer l'effet pro-excitotoxique du tPA en conservant son effet fibrinolytique.....	72
Figure 43 : Effets du tPA actif et inactif (S478A tPA) sur la mort neuronale induite par une injection de kainate dans l'hippocampe et sur l'activation microgliale.	73
Figure 44 : Représentation schématique des compartiments et des deux principales barrières du cerveau.....	81

Figure 45 : Caractéristiques morphologiques des plexus choroïdes.	82
Figure 46 : Comparaison morphologique des cellules épithéliales formant la BSLCS aux cellules endothéliales formant la BHE en microscopie électronique.....	83
Figure 47 : Principales fonctions des plexus choroïdes.	84
Figure 48 : La signalisation glutamatergique régule le DSC.....	139
Figure 49 : L'endothélium dans le CNV.	141
Figure 50 : Modèle expérimental d'étude du CNV.....	143
Figure 51 : Illustrations des étapes de la chirurgie de parabiose chez la souris.	204
Figure 52 : Système circulatoire dans la parabiose.....	205
Figure 53 : Etude de la réjuvenation dans le cadre du vieillissement physiologique, par modèle de parabiose.	206
Figure 54 : Le tPA ⁵⁵⁵ est retrouvé dans le cerveau après injection intraveineuse.	250
Figure 55 : Le récepteur LRP1 est exprimé sur les pôles basolatéral des CEPCs.....	252
Figure 56 : Effet de RAP selon le temps sur l'internalisation du tPA in vitro.....	253
Figure 57 : Le tPA est internalisé par les CEPCs après injection intraventriculaire..	256
Figure 58 : Le tPA est présent dans les cellules endothéliales du foie, mais pas dans les hépatocytes.....	263

LISTE DES ABRÉVIATIONS

ACM : artère cérébrale moyenne

ADAMTS : *a disintegrin and metalloproteinase with thrombospondin motifs*

AMPA : α amino-3-hydroxy-5-méthylisoazol-4-propionate

AQP4 : aquaporine-4

ARNm : acide ribonucléique messenger

ATF6 : *activating transcription factor 6*

ATP : adénosine triphosphate

AVC : accident vasculaire cérébral

BDNF : *brain-derived neurotrophic factor*

BHE : barrière hémato-encéphalique

BSLCS : barrière sang-liquide cérébrospinal

CCK : cholécystokinine

CNV : couplage neurovasculaire

CEPCs : cellules épithéliales de plexus choroïdes

CRF : *corticotropin-releasing factor*

CSPGs : chondroïtine sulphate protéoglycanes

DISC : *death-inducing signaling complex*

DSC : débit sanguin cérébral

EGF : *epidermal growth factor*

FADD : *Fas-Associated protein with Death Domain*

Fas-L : *fibroblast associated ligand*

ICAM-1 : *intercellular adhesion molecule 1*

IRM : *imagerie par résonance magnétique*

IV : *injection intraveineuse*

JAM : *junction adhesion molecules*

JNK : *c-jun n-terminal kinase*

LBS : *lysine binding site*

LCS : *liquide cérebrospinal*

LRP : *low density lipoprotein receptor-related protein*

LTP : *long term potentiation*

MAPK : *mitogen-activated protein kinase*

MEC : *matrice extracellulaire*

MMPs : *matrix metalloproteinases*

mTor-HIF-1 α : *mammalian target of rapamycin - hypoxia-inducible factor 1alpha*

NAC : *N-Acetyl-Cysteine*

NINDS : *national institute of neurological disorders and stroke*

NMDA : *n-methyl-d-aspartate*

NO : *nitric oxide*

NS : neuroserpine

PAI-1 : *plasminogen activator inhibitor-1*

PC : plexus choroïde

PDGF-CC : *platelet derived growth factor-cc*

PDGFR- α : *platelet-derived growth Factor receptor α*

PGL-2 : prostaglandine de type 2

RCL : *reactive center loop*

sc-tPA : *single-chain tPA*

Serpines : *serine proteinase inhibitor*

CMLs : Cellules musculaires lisses

SNC : système nerveux central

tc-tPA : *two-chain tPA*

TNF : *tumor necrosis factor*

TOAST : *trial of ORG 10172 in Acute Stroke Treatment*

tPA : *tissue-type plasminogen activator*

Trk-B : *tropomyosin receptor kinase b*

uPA : *urokinase-type plasminogen activator*

VCAM-1 : *vascular cell adhesion molecule 1*

VE-cadherin : *vascular endothelial cadherin*

VWF : *von willebrand factor*

INTRODUCTION

Chapitre 1 : Les Accidents Vasculaires

Cérébraux



1.1 Généralités

L'accident vasculaire cérébral (AVC) est l'apparition brutale de troubles neurologiques focaux, sans cause apparente autre que l'origine vasculaire. C'est la deuxième cause de mortalité (première cause chez la femme), après les maladies cardio-vasculaires, la deuxième cause de démence et la première cause de handicap acquis chez l'adulte.

L'acronyme AVC regroupe en réalité de multiples maladies, que l'on peut classer en deux grandes catégories : les AVC ischémiques, qui résultent de l'obstruction d'un vaisseau par un caillot sanguin et les AVC hémorragiques, causés par la rupture d'un vaisseau, souvent en mauvais état et soumis à une pression artérielle excessive. Bien que largement moins fréquents, les AVC hémorragiques engendrent plus de morts que les AVC ischémiques (2,8 *versus* 2,7 millions, respectivement) (**Figure 1** ; [Johnson et al., 2019](#)).

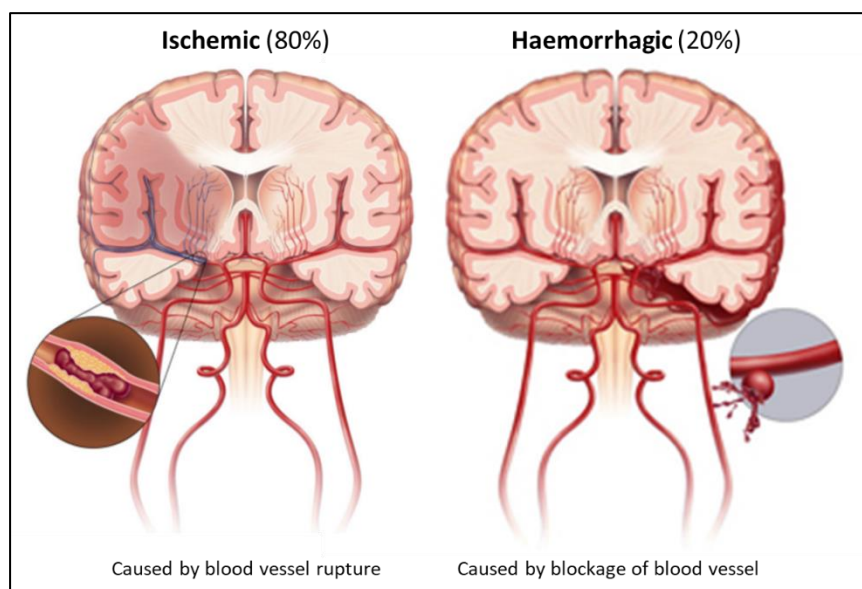


Figure 1 : Classification des AVC en deux catégories.

Les AVC ischémiques (80%) résultent de l'obstruction d'une artère par un caillot sanguin alors que les AVC hémorragiques (20%) résultent de la rupture d'un vaisseau (d'après la fondation des maladies du cœur et de l'AVC du Canada).

1.1.1 Epidémiologie

En France, chaque année, on recense environ 150 000 nouveaux cas, soit un AVC toutes les 4 minutes, engendrant 40 000 décès. À l'échelle mondiale, en 2019, le « *Global Burden of Diseases, Injuries, and Risk Factors Study* » estimait à 13,7 millions le nombre de nouveaux cas d'AVC par an, dont 5,5 millions à l'issue fatale (2,6 millions de femmes et 2,9 millions d'hommes) (Johnson et al., 2019 ; Figure 2).

Le coût humain (mortalité, espérance de vie, handicap...) et socio-économique (8,6 milliards d'euros en France en 2007 ; de Pouvourville, 2016) est conséquent, et les projections sont alarmantes. A l'heure actuelle, le nombre de victimes d'AVC dans les pays dits « à faible revenus » a dépassé celui des pays les plus riches (Fernandes & Caramelli, 2019). Avec le vieillissement global des populations (près des 3/4 des patients ont plus de 65 ans) et sans réel changement du côté de la prévention, le nombre de victimes pourrait doubler d'ici 2030 (Feigin et al., 2014).

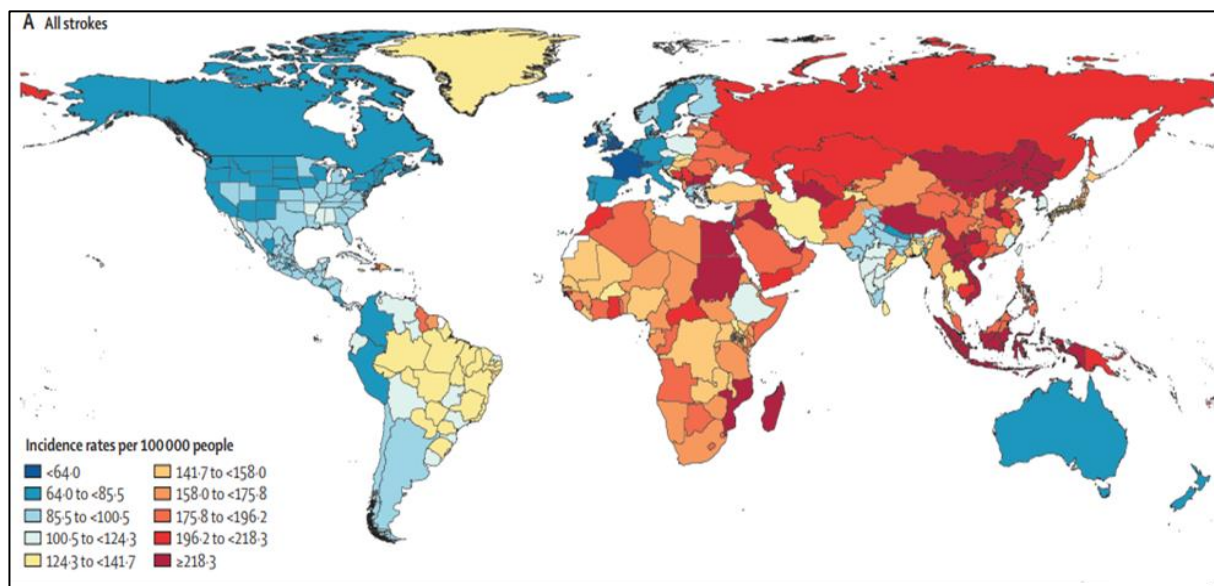


Figure 2 : Incidence des AVC dans le monde en 2019.

Carte standardisée selon l'âge pour 100 000 personnes, normalisée par type d'AVC et par pays, pour les deux sexes. D'après l'étude « *Global Burden of Disease* », sur la période 1990 - 2019 (Feigin et al., 2021).

1.1.2 Différents types d'AVC : hémorragique et ischémique

L'hémorragie cérébrale est une forme dévastatrice d'AVC, consécutive à la rupture d'une artère cérébrale, entraînant un saignement dans le parenchyme. On distingue deux grands types d'AVC hémorragiques en fonction de leur localisation : les hémorragies intra-parenchymateuses (environ 75% des patients) et les hémorragies méningées ou sous-arachnoïdiennes (autour de 25% des patients). Les hémorragies cérébrales sont le plus souvent liées à une hypertension non maîtrisée et, dans certains cas, à des anomalies structurelles (anévrismes ou malformations artério-veineuses, petites artères athérosclérotiques).

L'ischémie cérébrale est, quant à elle, caractérisée par l'obstruction d'un vaisseau sanguin cérébral. En 1993, Adams et collaborateurs ont classé les différents sous-types d'AVC ischémiques selon leur étiologie : ainsi, la classification TOAST (*Trial of ORG 10172 in Acute Stroke Treatment subtype classification*) permet de distinguer cinq types d'AVC ischémiques ([Adams et al., 1993](#) ; **Figure 3**).

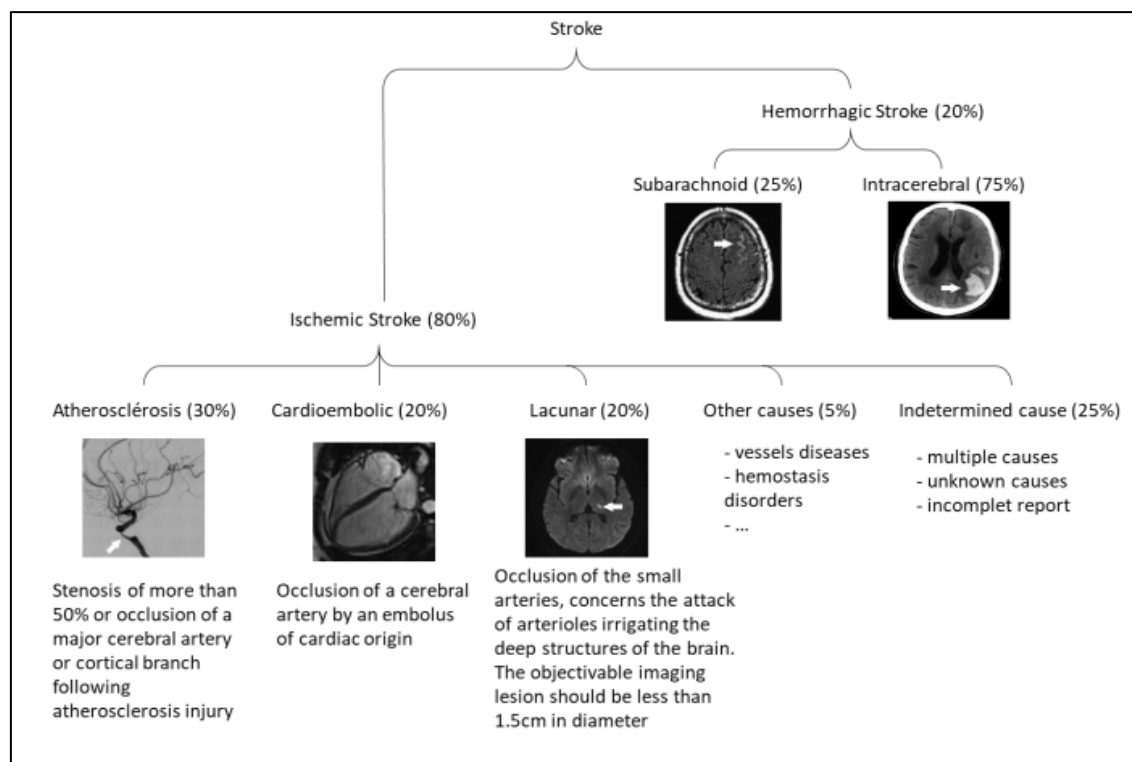


Figure 3 : Répartition des différents types/ sous-types d'AVC.
([Adams et al., 1993](#)).

Dans 30% des cas, il s'agit d'une athérosclérose au niveau des grosses artères et dans 25% des cas, d'une cardio-embolie. La cause peut aussi être l'occlusion de petites artères profondes (maladie des petites artères) qui provoque un infarctus dit lacunaire ([Wardlaw, 2005](#)). On distingue également deux autres catégories : une pour les « autres étiologies » (moins de 5%), regroupant les causes rares comme les dissections artérielles, les thrombophilies ou l'hyperhomocystéinémie, et une pour les causes indéterminées (environ 25%), dits AVC cryptogéniques ([Al-Shahi et al., 2006](#)).

1.1.3 Facteurs de risque de l'AVC

La survenue d'un AVC peut être associée à de nombreux facteurs de risque, dont certains sont modifiables, laissant place à des stratégies de prévention efficaces.

1.1.3.1 Facteurs de risque « modifiables »

L'étude *INTERSTROKE* a permis de montrer que neuf AVC sur dix seraient associés à des facteurs de risque modifiables (**Figure 4** ; [O'Donnell et al., 2016](#) ; [Feigin et al., 2019](#)).

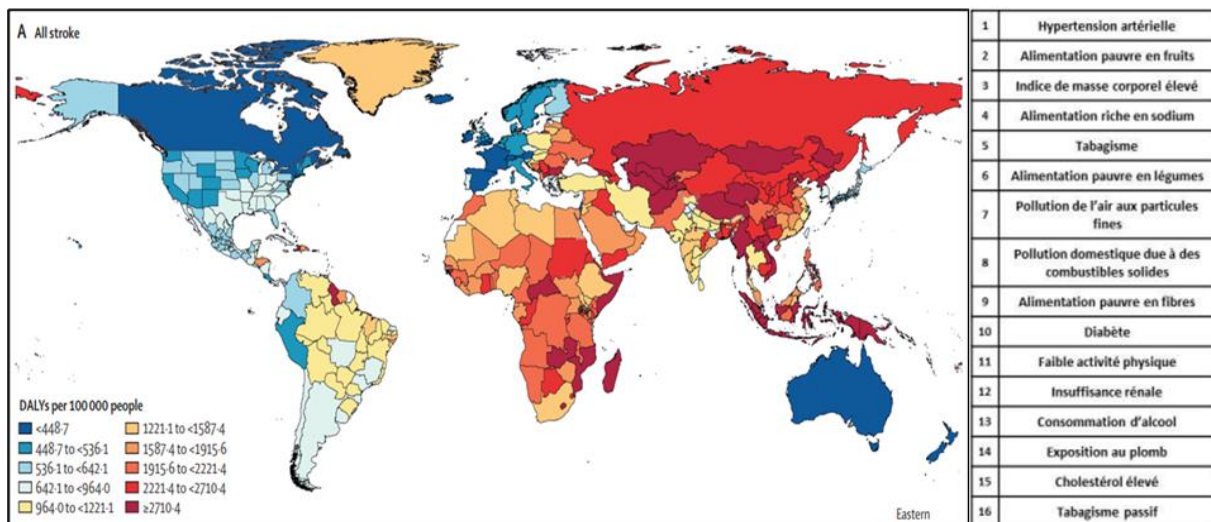


Figure 4 : Incidence d'AVC attribuables à des facteurs de risques modifiables en 2019.

Carte standardisée selon les DALYs (années de vie ajustées sur l'incapacité) pour 100 000 personnes et classification des facteurs de risque modifiables majeurs. D'après l'étude « *Global Burden of Disease* », sur la période 1990 - 2019 ([Feigin et al., 2021](#)).

Ces facteurs entrent dans trois catégories (**Figure 5**) : les facteurs comportementaux (le tabac, l'alimentation, l'alcool et l'absence d'activité physique), les facteurs environnementaux (la pollution et l'exposition au plomb) et les facteurs métaboliques (l'hypertension, le cholestérol, le diabète). Parmi tous ces facteurs, cinq sont majeurs : l'hypertension artérielle, responsable de près de la moitié des AVC ([O'Donnell et al., 2016](#)), l'obésité, la sédentarité, un mauvais régime alimentaire et le tabagisme ([Sarikaya et al., 2015](#)).

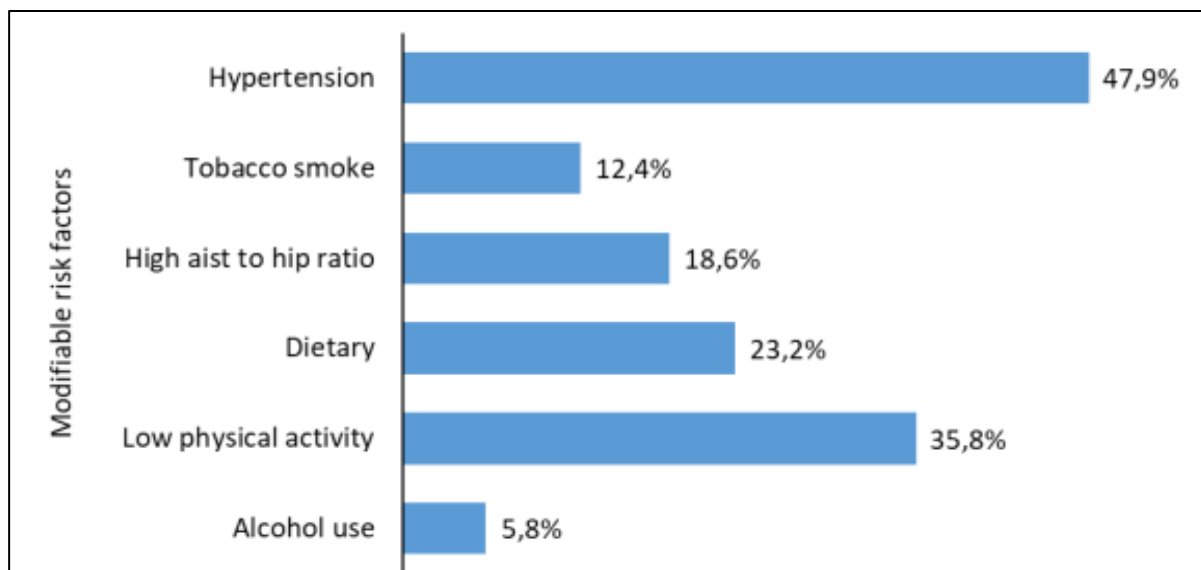


Figure 5 : Contribution des facteurs de risque modifiables à l'AVC.
(adapté de [Feigin et al., 2019](#)).

1.1.3.2 Facteurs de risques « non modifiables »

Parmi les facteurs de risques « non modifiables », le vieillissement est le facteur majeur, puisque 75% des cas concernent des personnes de plus de 65 ans ([Yousufuddin & Young, 2019](#)), et 50% des personnes de plus de 75 ans ([Boehme et al., 2017](#)). À partir de 55 ans, le nombre de cas d'AVC double tous les 10 ans ([Benjamin et al., 2018](#)).

Le sexe a également une influence sur le risque d'AVC : l'incidence est plus élevée chez les femmes que chez les hommes de moins de 30 ans, plus faible chez les femmes que chez les hommes d'âge moyen, et similaire chez les femmes et les hommes âgés de plus de 80 ans ([Vyas et al., 2021](#)). L'ethnie influence aussi le risque de survenue d'un AVC : aux Etats-Unis, le nombre d'AVC est plus important chez les populations afro-américaines et hispaniques ([Rosamond et al., 2007](#) ; [Benjamin et al., 2019](#)), et l'incidence est plus grande en Chine qu'en Europe ou aux États-Unis ([Johnson et al., 2019](#)).

On peut également attribuer des causes génétiques à la survenue de certains AVC. Même si ces facteurs génétiques sont encore mal connus, il semble y avoir un risque

plus accru de survenue d'AVC chez des personnes ayant des antécédents familiaux (Mvundura et al., 2008).

Récemment, une méta-analyse a été menée, à partir d'une étude d'association pangénomique (*genome-wide association study*, GWAS), regroupant les variations génétiques dans un pool important d'individus, afin d'étudier leurs corrélations avec des traits phénotypiques (Woo et al., 2014 ; Pulit et al., 2016 ; Neurology Working Group of the Cohorts for Heart and Aging Research in Genomic Epidemiology (CHARGE) Consortium, the Stroke Genetics Network (SiGN), 2017). Cette méta-analyse a permis d'associer 32 régions génomiques au risque d'AVC, et de manière intéressante, plus de la moitié des gènes impliqués dans le risque d'AVC sont aussi impliqués dans d'autres pathologies vasculaires (comme PITX2 impliqué dans les fibrillations atriales ou EDNRA associé à un épaississement de l'intima carotidienne) (Malik et al., 2018).

Dans ce travail de thèse, nous nous sommes intéressés uniquement à l'AVC ischémique, c'est pourquoi nous ne détaillerons pas, par la suite, la physiopathologie de l'AVC hémorragique.

1.2 Physiopathologie de l'AVC ischémique

Lors d'une ischémie cérébrale, différents compartiments vont être séquentiellement touchés. Le compartiment vasculaire sera immédiatement affecté, lors de la formation d'un thrombus ou le blocage d'un embolo qui induit *in situ* une diminution du débit sanguin cérébral (DSC). S'ensuit une perte de l'intégrité de la barrière hémato-encéphalique (BHE) et l'apparition de dommages parenchymateux.

1.2.1 Lésions vasculaires

Lors de diverses situations (par exemple les forces de cisaillements, la rupture d'une plaque d'athérome), la paroi artérielle peut subir un dommage aigu ou chronique. Le sous-endothélium (collagène IV, fibronectine, laminine) ainsi que le facteur tissulaire situé sur les cellules musculaires lisses (CMLs), se retrouvent exposés au flux sanguin et aux molécules d'adhésion endothéliales et plaquettaires, dont le facteur de von willebrand (VWF) (Furie & Furie, 2008 ; **Figure 6**). Il en résulte deux voies d'activation des plaquettes.

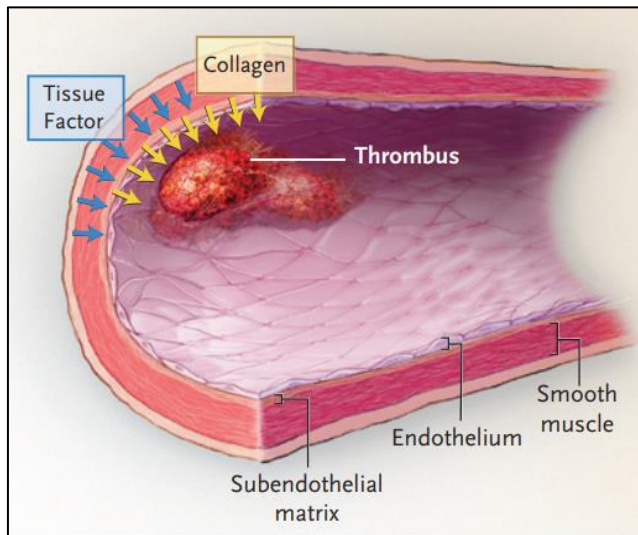


Figure 6 : Réponse aux lésions vasculaires.

Le collagène et le facteur tissulaire associés à la paroi des vaisseaux forment une barrière hémostatique pour maintenir clos le système circulatoire. Lorsque l'endothélium est endommagé, ils entrent en contact avec le sang et initient la formation d'un thrombus. Le collagène forme la première ligne de défense, et le facteur tissulaire la deuxième (Furie & Furie, 2008).

1.2.2 Formation du caillot

La composition des caillots à l'origine de l'occlusion d'une artère cérébrale varie selon l'étiologie de l'AVC : plutôt plaquettaire, lors d'un AVC d'origine athéromateuse, plutôt fibrineux lors d'un AVC d'origine cardio-embolique (Liebeskind et al., 2011), associé au principal constituant, les globules rouges. On parle également de thrombus quand le caillot se forme localement, ou d'embolie, quand un fragment de thrombus ou de plaque d'athérome migre vers le système vasculaire cérébral jusqu'à occlure un vaisseau de diamètre inférieur. De plus, cette composition varie dans le temps : en phase aiguë (dans les 3 premières heures), elle est plutôt

plaquettaire puis s'enrichit en fibrine (Liebeskind et al., 2011 ; Jolugbo & Ariëns, 2021). Les proportions des régions riches en plaquettes, fibrine et globules rouges varient en fonction des caillots (Di Meglio et al., 2019), ainsi les caillots riches en plaquettes sont plus résistants au tPA (Martinez de Lizarrondo et al., 2017).

1.2.2.1 Première ligne de défense : la voie dépendante du collagène

Le facteur de von Willebrand (VWF) est sécrété par les cellules endothéliales et les plaquettes activées, et lors d'une lésion de l'endothélium, il se lie à différents types de collagène (I, III et IV) (M. F. Hoylaerts et al., 1997). Les plaquettes, non activées, vont, dans un premier temps, interagir avec le VWF et le collagène présents au niveau des parois vasculaires. Ces plaquettes possèdent des récepteurs qui leur permettent de s'agréger entre elles et de se fixer aux éléments sous endothéliaux, de manière constitutive ou après activation (Jackson et al., 2009). Leur agrégation est réversible, mais elle ralentit leur attachement aux vaisseaux et leur activation (Fredrickson et al., 1998 ; Nieswandt et al., 2001). Elles peuvent alors former des liaisons plus stables avec le VWF et s'agréger entre elles (Varga-Szabo et al., 2008).

1.2.2.2 Deuxième ligne de défense : la voie dépendante du facteur tissulaire

Puis, le facteur tissulaire initie une seconde voie d'activation plaquettaire, totalement indépendante du VWF (Dubois et al., 2007). Le facteur tissulaire s'associe au facteur VIIa, pour activer le facteur IX, et initier une cascade protéolytique formant de la thrombine. Cette thrombine va ensuite être capable d'activer les plaquettes (Vu et al., 1991 ; Figure 7)

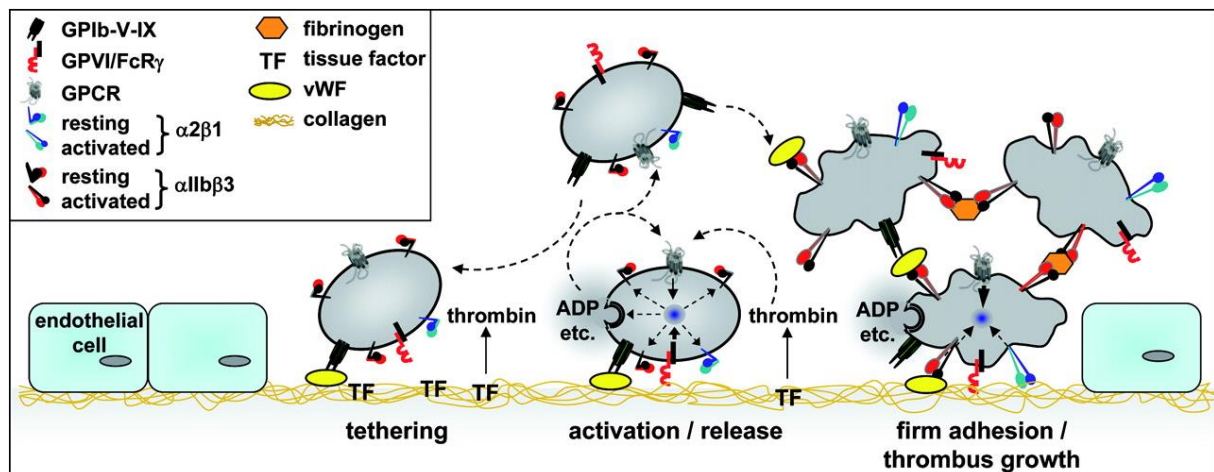


Figure 7 : L'agrégation plaquettaire sur l'endothélium lésé.

Les plaquettes roulent sur l'endothélium par interaction avec le VWF, puis s'activent et forment des liaisons stables avec le VWF et le collagène (Varga-Szabo et al., 2008).

1.2.3 Expansion du caillot et cascade fibrinolytique

Une fois activées, les plaquettes subissent un changement de conformation qui accroît leur affinité pour leurs ligands, le fibrinogène et le VWF (Du et al., 1993). De même, l'interaction inter-plaquettes s'amplifie, ce qui augmente la stabilité du thrombus, et permet également le recrutement de nouvelles plaquettes (Brass et al., 2005). Le flux sanguin résiduel peut forcer le thrombus en formation à se détacher de la paroi, et cet embolo peut aller obstruer une plus petite artère. En revanche, si l'ancrage est suffisant, le thrombus continue sa formation et finit par obstruer l'artère dans laquelle il s'est formé. Une fois ce caillot formé et stabilisé, les mécanismes naturels de fibrinolyse se déclenchent afin de le dégrader pour rétablir la circulation sanguine (Voir Chapitre 2 « 1.5.1.1 La Fibrinolyse »). Cependant, il arrive que la fibrinolyse ne soit pas suffisante pour contrecarrer la formation du caillot. La circulation se trouve interrompue, ce qui mène, dans le cas le plus graves, à une ischémie.

1.2.4 Formation de la lésion et atteintes vasculaires et parenchymateuses

Lors d'une occlusion artérielle, le lumen diminue voire disparaît, conduisant à une diminution du DSC.

Bien que le cerveau ne représente que 2% du poids du corps, il consomme 20% de l'oxygène et 25% du glucose corporel. De plus, le cerveau n'a pas de réserve énergétique, et l'activité métabolique cérébrale est basée sur la phosphorylation oxydative, ce qui veut dire que le cerveau nécessite un apport énergétique constant. Chez l'adulte, le DSC normal est estimé à 50 mL/min/100g de tissu pour la matière grise ([Amin & Schindler, 2017](#)). L'ischémie cérébrale se développe quand le DSC passe sous la barre des 22 mL/min/100g, même si les neurones sont capables de survivre quelques heures malgré une réduction de 50% du DSC. Quand le DSC est en dessous de 8 mL/100g/min, les perturbations métaboliques sont telles que les dommages deviennent irréversibles ([Astrup et al., 1981](#) ; **Figure 9**). A ce stade, l'ischémie cérébrale est constituée ([Dirnagl et al., 1999](#) ; [Chen et al., 2019](#)).

Diverses études ont montré que la réduction du DSC est hétérogène dans le territoire de l'occlusion artérielle (J. . Baron et al., 1981; Marchai et al., 1996). Ainsi, la zone affectée peut être divisée en trois aires ([Heiss, 2014](#) ; **Figure 8**) :

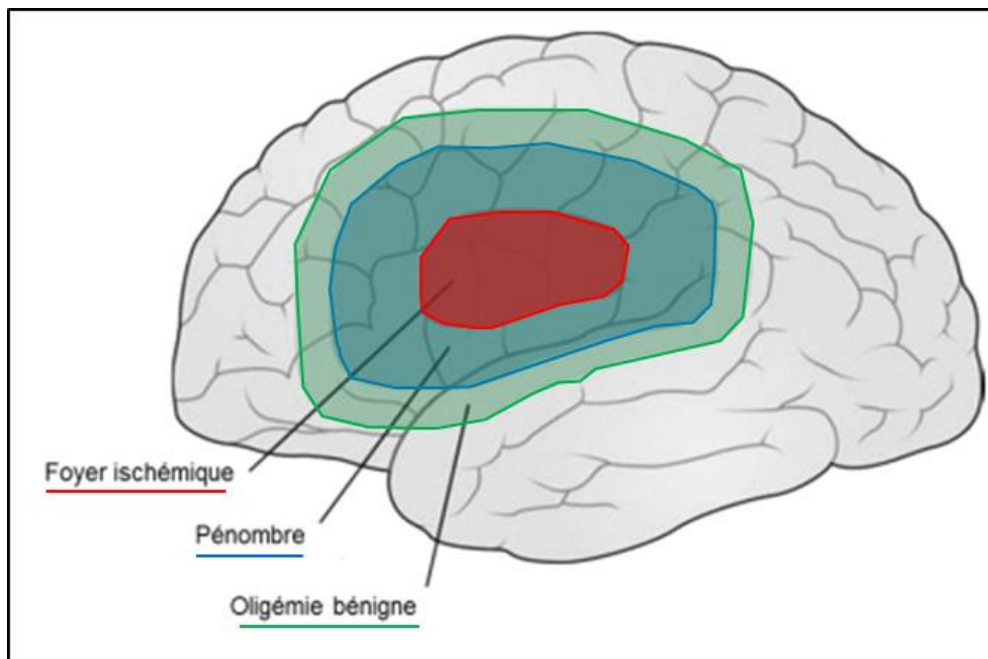


Figure 8 : Les territoires en souffrance lors d'une ischémie.

Répartition des 3 territoires de l'occlusion ischémique : le foyer ischémique, la pénombre ischémique, et une région d'oligémie bénigne (adapté de : [Mangrum et al., 2012](#)).

- **Le cœur ou foyer ischémique** ($\text{DSC} < 10 \text{ mL}/100\text{g}/\text{min}$) : il s'agit de la région centrale, située en aval de l'occlusion. C'est la région la plus touchée, car elle n'est pas perfusée par des branches collatérales ; la chute du DSC y est la plus importante et les lésions cellulaires sont très rapides et irréversibles ([Furlan et al., 1996](#) ; [Heiss et al., 2001](#)). En effet, les neurones exposés plus de 45 minutes à un DSC inférieur ou égal à $14 \text{ mL}/100\text{g}/\text{min}$ ont un faible taux de survie ([Heiss & Rosner, 1983](#)).
- **La pénombre ischémique** (DSC entre 10 et $22 \text{ mL}/100\text{g}/\text{min}$), borde le foyer et subit une réduction du DSC graduelle (20% à 50% de réduction). C'est une région « à risque », où le degré et la durée de l'hypoperfusion conditionnent le devenir des cellules. En absence d'une perfusion collatérale efficace et/ou d'une intervention pharmacologique de reperfusion, la pénombre évolue vers l'infarctissement ([Astrup et al., 1981](#) ; [Furlan et al., 1996](#)).

- La zone d'oligémie bénigne (DSC > 22 mL/100g/min), est légèrement hypoperfusée mais ne présente pas de dommage. En effet, le DSC y diminue mais pas suffisamment pour entraîner une lésion ([Manning et al., 2014](#)) ou affecter le métabolisme cellulaire ([Furlan et al., 1996](#)).

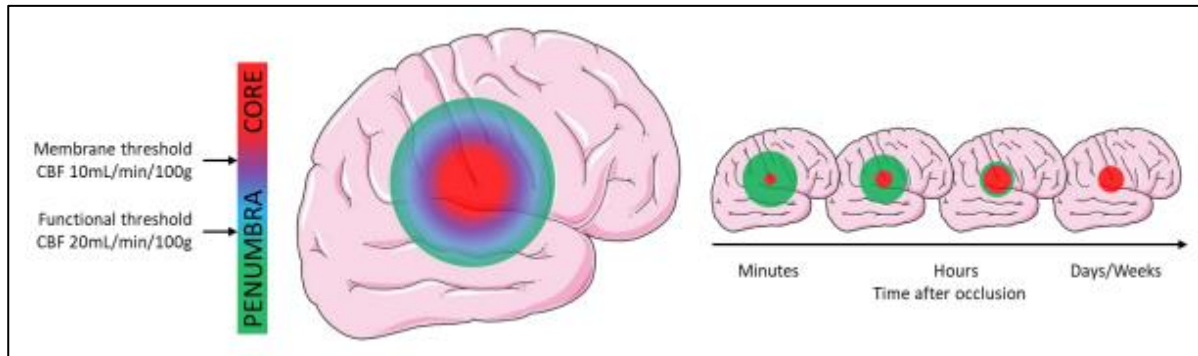


Figure 9 : Évolution du foyer ischemique et de la penombre au cours du temps.

Dans le foyer ischemique, où le DSC est le plus faible, les neurones entrent rapidement en nécrose et les dommages sont irréversibles. Dans la penombre, où la chute du DSC est moindre, les neurones peuvent survivre plus longtemps mais si le DSC n'est pas rétabli, ils rentreront à leur tour en nécrose. L'oligémie, hypoperfusée, ne présente aucune mort cellulaire (adapté de : [Astrup et al., 1981](#) ; [Dirnagl et al., 1999](#)).

1.2.5 Altération de la barrière hémato-encéphalique

La BHE est une des barrières physiologiques aux portes du SNC : elle assure une filtration sélective vis-à-vis des facteurs circulant du système vasculaire vers le parenchyme et inversement. Ainsi, elle protège le SNC de composés potentiellement toxiques. Elle est formée par les cellules endothéliales des vaisseaux, maintenues entre elles par des jonctions serrées, une lame basale de collagène IV, de laminine et de fibronectine, des péricytes, et des pieds astrocytaires qui viennent former un manchon autour des capillaires (**Figure 10** ; [Weiss et al., 2009](#)).

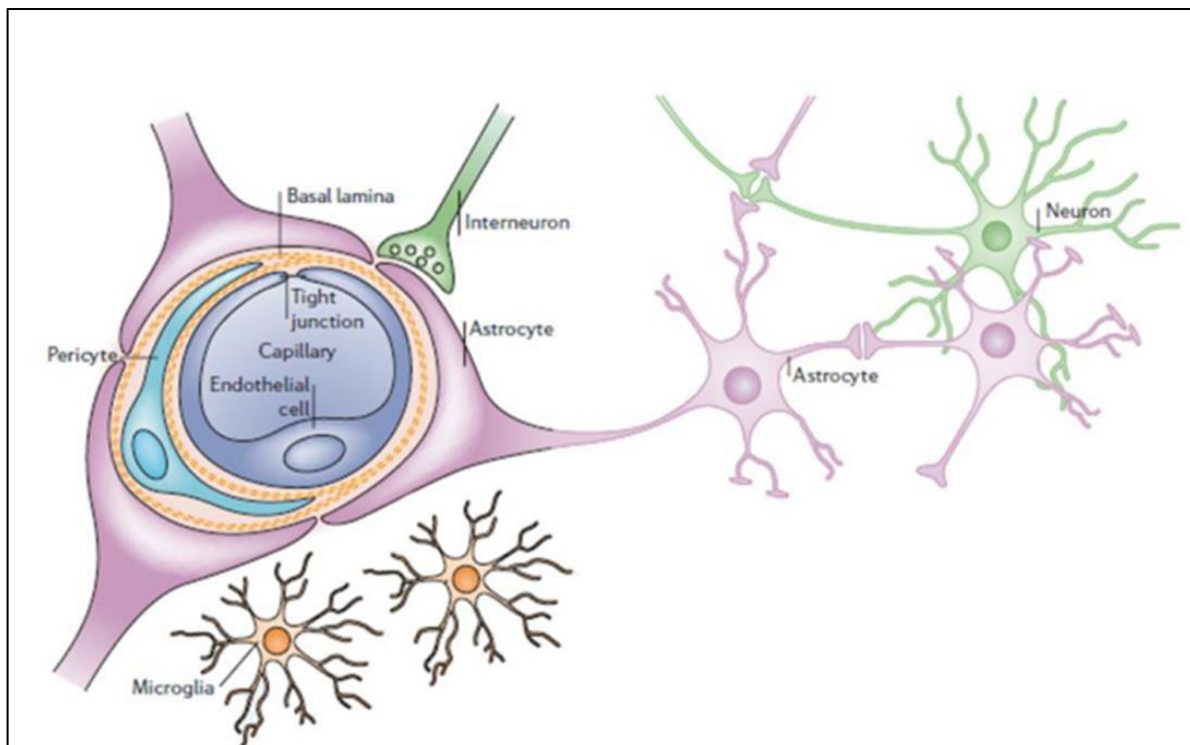


Figure 10 : Structure de la barrière hémato-encéphalique.

La BHE est formée par les cellules endothéliales reliées par des jonctions serrées, une lame basale, les péricytes, et les pieds astrocytaires (adapté de : [Abbott et al., 2006](#)).

Dans le cadre d'une ischémie, la perméabilité de la BHE est attribuée en partie à l'action des métalloprotéinases matricielles (MMPs) responsables de la dégradation des jonctions serrées entre les cellules endothéliales et de la lame basale ([Yang et al., 2007](#)). Cette « ouverture » de la BHE est en fait bi-phasique ([Kuroiwa et al., 1985](#)) : la première phase, a lieu dans les premières heures ([Rosenberg et al., 1998](#)), elle est réversible et serait attribuée à une augmentation de l'expression de MMP-2 ([Chang et al., 2003](#) ; [Nakaji et al., 2006](#)). La seconde phase, apparaît dans les 24 à 48 heures, avec une infiltration leucocytaire et une activation des MMP-3 et MMP-9 par des cytokines pro-inflammatoires (TNF, IL-1 β , etc) conduisant à une rupture irréversible de la BHE et à des dommages tissulaires sévères ([Rosenberg et al., 1998](#) ; [Rosenberg & Yang, 2007](#) ; [Pun et al., 2009](#) ; [Berezowski et al., 2012](#)).

La rupture de la BHE provoque une entrée d'eau au sein du parenchyme cérébral et induit un œdème vasogénique (Rosenberg & Yang, 2007). Cet œdème entraîne l'augmentation du volume cérébral, augmente la pression intracrânienne et induit des lésions d'ischémie-reperfusion (Klatzo, 1985). De plus, cet œdème augmente les risques de transformation hémorragique, ce qui pourrait contribuer à aggraver l'état des patients (Hornig et al., 1993).

1.2.6 Atteintes parenchymateuses

1.2.6.1 Les mécanismes cellulaires : défaillance énergétique et excitotoxicité

Comme décrit précédemment, le cerveau a besoin d'un apport constant en oxygène et en glucose, notamment pour maintenir ses gradients ioniques. En condition physiologique, les pompes Na^+/K^+ -ATPases sont les consommatrices majeures d'énergie dans le cerveau afin de maintenir une grande concentration intracellulaire en potassium, et une faible concentration intracellulaire en sodium. Cependant, une ischémie cérébrale déclenche une série d'évènements aboutissant à une mort cellulaire (Liu et al., 2002 ; Doyle et al., 2008). Trois mécanismes principaux mènent à la mort neuronale : la nécrose excitotoxique, l'apoptose et l'autophagie. Cependant, ils amorcent aussi certaines voies de signalisation inflammatoires. Ces phénomènes ne se déroulent pas en même temps, chacun ayant une cinétique propre (Dirnagl et al., 1999 ; Figure 11).

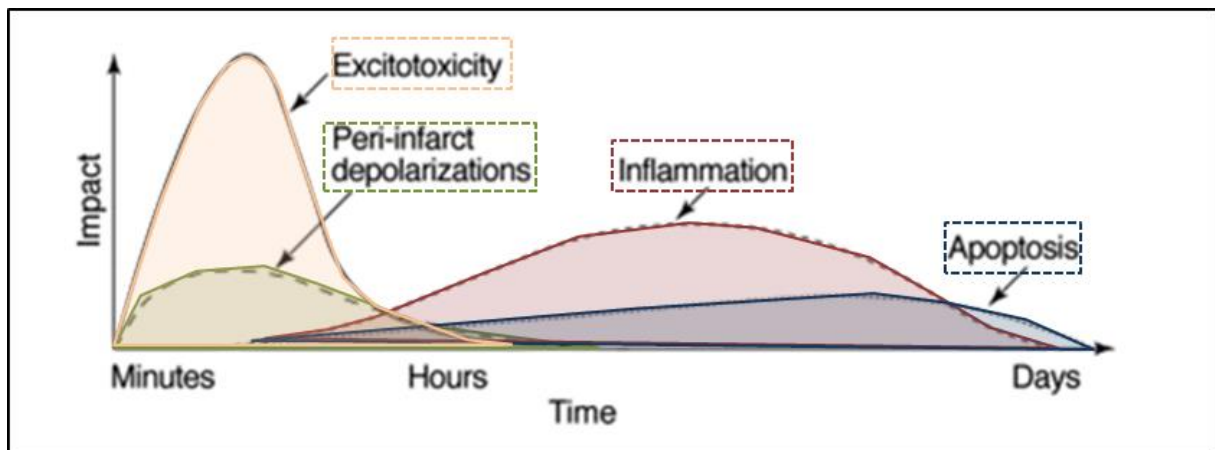


Figure 11 : Différentes étapes et mécanismes délétères lors d'une ischémie cérébrale.

Juste après le début de l'ischémie, les mécanismes d'excitotoxicité endommagent sévèrement les neurones. L'excitotoxicité peut aussi induire la mort du tissu par l'induction de dépolarisations neuronales à la périphérie du foyer ischémique et par un effet pro-inflammatoire (adapté de : [Dirnagl et al., 1999](#) ; [Zaleska et al., 2009](#)).

Suite à la survenue d'une ischémie, les neurones avoisinant le vaisseau obstrué sont en souffrance du fait qu'ils ne possèdent pas de réserves énergétiques, ils ont besoin d'un apport constant en oxygène et nutriments. En effet, la chute du DSC va conduire en 1 à 3 minutes à une perturbation de la chaîne respiratoire mitochondriale, stoppant la production d'adénosine triphosphate (ATP). La diminution de la production d'ATP est responsable d'une défaillance de la pompe Na^+/K^+ -ATPase : la redistribution des ions Na^+ et K^+ de part et d'autre de la membrane n'est alors plus effectuée, engendrant une sortie massive de potassium dans l'espace extracellulaire. S'ensuit une perturbation des pompes Ca^{2+} -ATPases et donc une augmentation de la concentration intracellulaire de calcium (Ca^{2+}). L'homéostasie ionique n'étant plus respectée, il y a apparition d'un œdème cytotoxique ([Martin et al., 1994](#)).

Ce stress induit une hyperactivation des neurones pré-synaptiques qui restent dépolarisés et vont libérer en grandes quantités des neurotransmetteurs dont le glutamate (qui est excitateur) dans la fente synaptique ([Sekerdag et al., 2018](#)). Cette importante disponibilité du glutamate va entraîner l'activation des récepteurs ionotropiques Kainate et AMPA (Acide α -Amino-3-hydroxy-5-Méthylisozazol-4-

Propionate), ainsi qu'une suractivation des récepteurs N-méthyl-D-aspartate (NMDA) menant à une entrée massive d'eau et d'ions Ca^{2+} dans les neurones post-synaptiques. Les ions Ca^{2+} en excès vont alors activer des enzymes capables de dégrader les structures cellulaires comme l'ADN ou le cytosquelette, menant à la mort du neurone. Cette mort neuronale initiée par l'excès de glutamate est appelée excitotoxicité. Tous ces déséquilibres induisent la mort rapide de type nécrotique d'une première population de neurones au niveau du cœur ischémique (Doyle et al., 2008). Ce phénomène d'excitotoxicité va entraîner une cascade d'événements désastreux car dans le tissu lésé, le glutamate en excès va venir suractiver les neurones voisins, qui vont également produire de plus en plus de glutamate. Ainsi, ce phénomène va s'étendre au tissu non lésé, qui entre alors lui aussi en souffrance : c'est le phénomène de dépolarisation, responsable de la formation de l'œdème cytotoxique (Dreier et al., 2015).

1.2.6.2 La neuroinflammation

L'inflammation est une réaction du système immunitaire, suite à une agression externe ou interne, qui a pour but d'éliminer les éléments nuisibles dans la zone atteinte et d'y réaliser des réparations tissulaires. Les réponses inflammatoires post-ischémie peuvent être décomposées en trois phases (Drieu et al., 2018) : une phase aiguë (premières heures après le début de l'ischémie), qui se traduit par une rapide activation puis une prolifération des cellules gliales résidentes, en particulier des cellules microgliales suivie par une infiltration dans la zone ischémisée des cellules inflammatoires circulantes (granulocytes, neutrophiles, monocytes, puis lymphocytes (Tanaka et al., 2003 ; Price et al., 2004 ; Buck et al., 2008 ; Jurcau & Simion, 2022). Cette inflammation va se dérouler plusieurs heures après le début de l'ischémie cérébrale, lorsque des facteurs de transcription pro-inflammatoires sont activés (Iadecola & Anrather, 2012). Au niveau moléculaire, elle s'accompagne de la synthèse de médiateurs aux effets tantôt bénéfiques, tantôt délétères sur la survie cellulaire

(Macrez et al., 2011). La phase subaiguë (premiers jours) correspond à la résorption de l'inflammation. Enfin, la phase tardive (jours et semaines) correspond à la réparation tissulaire par les astrocytes et la microglie (Drieu et al., 2018 ; Figure 12).

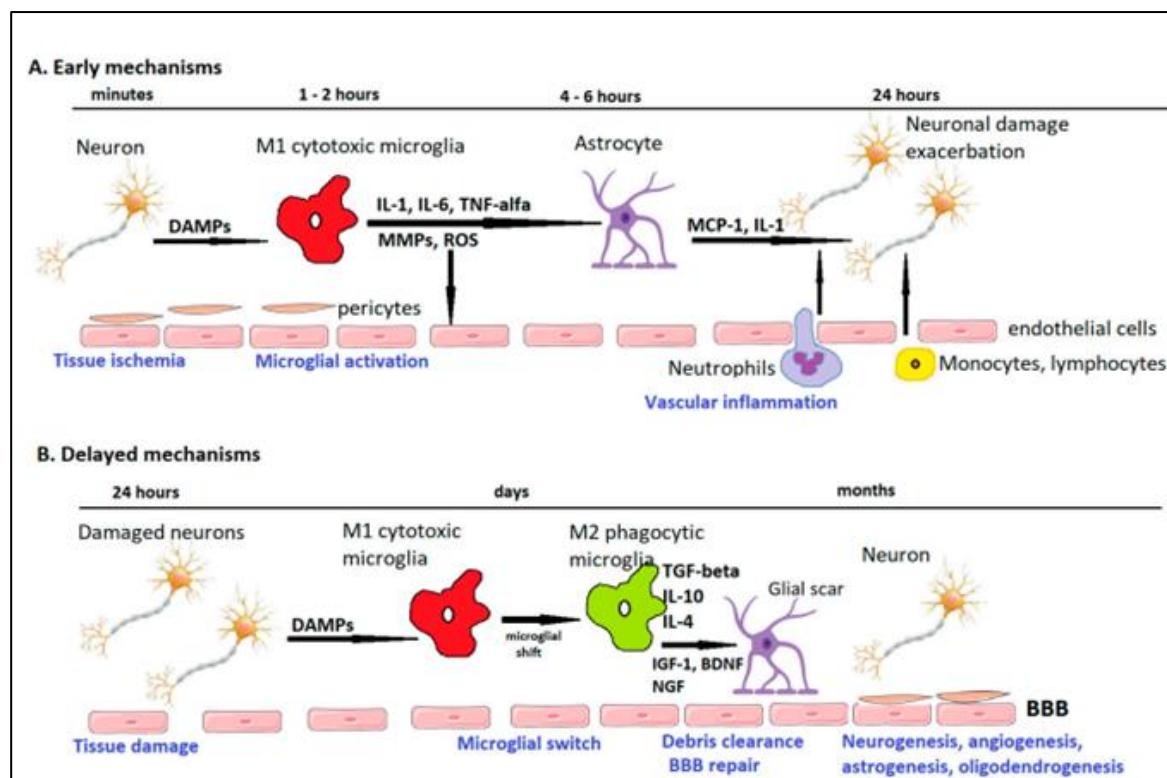


Figure 12 : Profil temporel de la neuroinflammation post-ischémie.

Juste après un AVC ischémique, les neurones libèrent des motifs moléculaires associés aux dommages (DAMP) qui conduisent à l'activation microgliale et endothéliale. La microglie polarisée pro-inflammatoire (phénotype M1) libère des interleukines pro-inflammatoires, ainsi que des MMP et des espèces réactives de l'oxygène (ROS), qui affaiblissent la BHE. Une BHE perméabilisée permet aux leucocytes d'infiltrer le parenchyme cérébral, de produire des facteurs pro-inflammatoires et d'exacerber les lésions tissulaires (Jurcau & Simion, 2022).

Ainsi, à la suite d'une ischémie cérébrale, la microglie, premier médiateur de l'inflammation, est activée, sachant qu'elle possède deux phénotypes : M1 (pro-inflammatoire) et M2 (anti-inflammatoires ; Prinz & Priller, 2014). Elle va produire plusieurs médiateurs pro-inflammatoires dans le milieu extracellulaire, tels que des chemokines (Boche et al., 2013) et des cytokines (Interleukine 1- β (IL-1 β), TNF) ; Stoll et al., 1998), déclenchant la synthèse de molécules d'adhésion à la surface des cellules endothéliales. Celles-ci étant à l'interface sang/parenchyme cérébral, elles vont jouer

un rôle majeur dans le recrutement et l'infiltration des cellules inflammatoires circulantes telles que les neutrophiles, les lymphocytes-T ou les monocytes/macrophages (Yilmaz & Granger, 2008 ; Tanaka et al., 2003 ; Amantea et al., 2015 ; Wimmer et al., 2018). Ces cellules infiltrées, tout comme les cellules endothéliales, vont à leur tour synthétiser des médiateurs de l'inflammation (cytokines, radicaux libres) (Amantea et al., 2009).

Dans la phase chronique, les leucocytes infiltrés activent également des MMPs, amplifiant ainsi l'inflammation et participant à la rupture de la BHE et au risque d'hémorragie (Gidday et al., 2005). L'ischémie et la reperfusion déclenchent également l'activation du système du complément (Eltzschig & Eckle, 2011). Une cicatrice gliale se forme autour du foyer ischémique dans les 2 semaines suivant l'AVC pour former une barrière physique limitant la réponse inflammatoire (Bao et al., 2012).

A noter que majoritairement délétère dans l'ischémie cérébrale, l'inflammation peut aussi monter un versant bénéfique de par sa participation à l'élimination des déchets, au remodelage tissulaire ou à la production de facteurs de croissance (Stoll et al., 1998).

1.2.6.3 L'apoptose

L'apoptose est un phénomène de mort cellulaire programmée qui lors d'une ischémie cérébrale, interviendrait plutôt dans la phase subaiguë et préférentiellement dans la zone de pénombre ischémique, où l'énergie est encore suffisante pour rentrer en mort cellulaire programmée. Elle va pouvoir coexister avec les phénomènes excitotoxiques (Martin et al., 1998). Il existe deux voies d'activation de l'apoptose : la voie intrinsèque et la voie extrinsèque, toutes deux sont activées dans l'ischémie cérébrale.

- **La voie intrinsèque** : elle met en jeu une augmentation de Ca^{2+} intracellulaire, qui va entraîner la libération du facteur inducteur de l'apoptose (AIF) et du cytochrome c dans le cytoplasme. Le cytochrome c va ensuite se lier au facteur d'activation de la procaspase-9 pour l'activer en caspase-9, qui, à son tour, activera la caspase-3 (Love, 2003). La caspase-3 va alors activer des endonucléases, promouvoir la fragmentation l'ADN et la formation de corps apoptotiques (Elena-Real et al., 2018). AIF est lui transféré dans le noyau où il promeut la fragmentation de l'ADN, indépendamment des caspases. Les dommages à l'ADN vont entraîner l'activation de p53, un facteur pro-apoptotique.
- **La voie extrinsèque** : elle implique des facteurs libérés dans le compartiment extracellulaire, tels que le *Fibroblast Associated Ligand* (Fas-L) qui va se lier à son récepteur *Fas*. La formation de ce complexe aboutit au recrutement de la protéine *Fas-Associated protein with Death Domain* (FADD) et interagit alors avec la procaspase-8. Le complexe ainsi formé, FasL–Fas–FADD– procaspase-8, *death-inducing signaling complex* (DISC) permet l'activation de la caspase-8 et sa libération dans le cytoplasme pour initier le clivage de la caspase-3. Ensuite, les mêmes mécanismes que ceux de la voie intrinsèque vont être mis en œuvre (Broughton et al., 2009 ; Radak et al., 2016).

1.2.6.4 L'autophagie

L'autophagie est un processus catabolique permettant à la cellule de dégrader et recycler son matériel cytoplasmique, assurant ainsi le maintien de l'homéostasie. L'autophagie peut être un effecteur de mort cellulaire, et ce, de trois manières principales : directe (c'est la mort cellulaire autophagique), ou en communiquant avec la voie apoptotique ou la voie nécroptotique. Bien qu'il soit clairement démontré que l'ischémie cérébrale s'accompagne d'une activation de l'autophagie dans les neurones au niveau de la lésion ([Carlioni et al., 2008](#) ; [Wen et al., 2008](#)) et dès le début de l'ischémie ([Ginet et al., 2009](#)), son rôle reste encore débattu.

Certaines études *in vitro* et *in vivo* démontrent que l'activation de l'autophagie peut être un mécanisme neuroprotecteur, notamment en dégradant les agrégats protéiques et les mitochondries endommagées et qui diminue les lésions ischémiques ([Zhang et al., 2013](#) ; [Carlioni et al., 2017](#) ; [Dai et al., 2017](#)). Alors que d'autres études démontrent que cette activation favoriserait la mort neuronale ischémique ([Thiebaut et al., 2022](#)).

Notons qu'au cours de l'ischémie cérébrale, les cellules gliales, en particulier les astrocytes, seraient aussi concernées par l'autophagie ([Qin et al., 2010](#) ; [Engelhardt et al., 2015](#)), mais peut être de façon moins importante que les neurones ([Tian et al., 2010](#)). Cette autophagie astrocytaire pourrait être délétère ([Ni et al., 2018](#)) ou bénéfique ([Kasprowska et al., 2017](#)). En revanche, l'activation de l'autophagie dans les cellules microgliales et les oligodendrocytes, reste non documentée lors d'une ischémie cérébrale, mais l'activation de l'autophagie dans les oligodendrocytes peut jouer un rôle crucial dans les lésions de la moelle épinière ([Mei et al., 2019](#)) et la démyélinisation ([Smith et al., 2013](#)).

1.3 Traitement de l'AVC ischémique

1.3.1 Phase aigüe : la thrombolyse (1995) et la thrombectomie (2015)

L'intervalle de temps entre le début des symptômes jusqu'à la prise en charge du patient conditionne en partie son pronostic. En effet, l'urgence est de rétablir une circulation sanguine rapide afin de réduire au maximum la souffrance tissulaire et, par association, l'étendue de dommages. Si le patient est pris à temps aux urgences et que le diagnostic est établi rapidement, il pourra (ou non) bénéficier d'une thrombolyse pharmacologique en association ou non à la thrombectomie.

Cette thrombolyse consiste à injecter la forme recombinante de l'activateur tissulaire du plasminogène (r-tPA) dans la circulation sanguine des patients afin de suppléer la fibrinolyse endogène (Voir Chapitre 2 « **1.5.1.1 La Fibrinolyse** »).

Aujourd'hui, l'injection de r-tPA est le seul traitement pharmacologique approuvé, et ce, suite à l'étude du National Institute of Neurological Disorders and Stroke (NINDS) de 1995, première grande étude clinique (333 patients) démontrant la composante bénéfique du tPA. Dans cette étude, le tPA a réduit les déficits des patients de 11 à 13%, mais a aussi augmenté le risque d'hémorragie de 6,4%, sans toutefois modifier la mortalité (NINDS, 1995 ; **Figure 13**). À la suite de cela, le r-tPA fut autorisé en 1995 comme traitement de l'AVC ischémique dans les trois heures suivant le début des symptômes, jusqu'à 2008, où cette fenêtre a été étendue à 4 heures 30 (Amiri et al., 2016 ; Hacke et al., 2018). Cependant, la thrombolyse présente certaines limites : un faible taux de reperfusion (Bhatia et al., 2010), un risque de transformation hémorragique et enfin une fenêtre thérapeutique relativement réduite (NINDS, 1995).

Mais, le r-tPA n'est plus la seule arme disponible pour traiter l'AVC ischémique. En effet, l'essai clinique MR CLEAN en 2015, a permis de confirmer l'effet bénéfique de la thrombectomie, qui consiste à retirer mécaniquement le caillot à l'aide d'un stent. L'essai clinique DAWN a montré que cette méthode de recanalisation est plus efficace que la thrombolyse (Nogueira et al., 2018) mais elle se limite aux gros vaisseaux (Alberts et al., 2015). Aujourd'hui, elle peut être pratiquée en association à la thrombolyse. Un nouvel essai clinique SWIFT montre qu'un patient éligible à un traitement au r-tPA doit le recevoir, même si une thrombectomie est pratiquée a posteriori (Fisher et al., 2022).

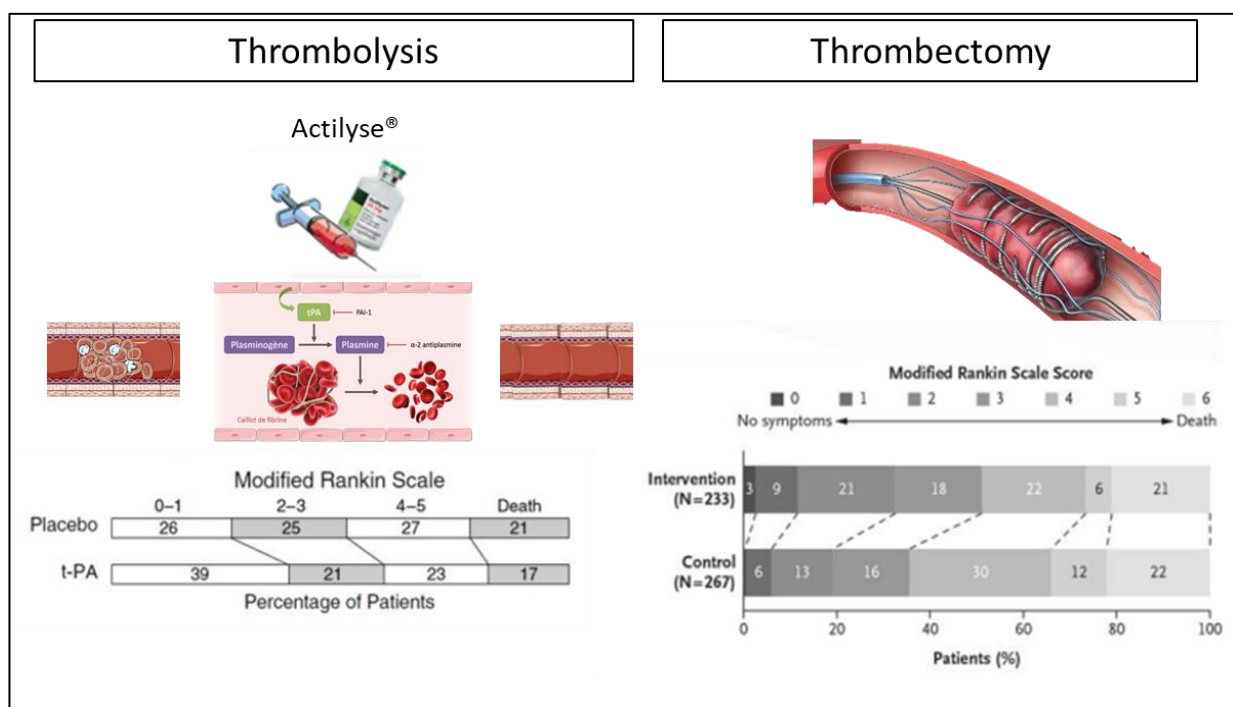


Figure 13 : Evaluation fonctionnelle par l'échelle modifiée de Rankin de patients victimes d'un AVC ischémique, à 3 mois selon le traitement reçu (placebo ou r-tPA ou thrombectomie).

La thrombolyse (à gauche) par injection de r-tPA dégrade le caillot par l'activation du plasminogène en plasmine, conduisant à la dégradation de la fibrine. La thrombectomie (à droite), consiste en un retrait mécanique du caillot sanguin. La recanalisation permet, dans la plupart des cas, une reperfusion tissulaire et améliore l'évolution fonctionnelle des patients. Des scores inférieurs ou égaux à 1 sur l'échelle modifiée de Rankin sont considérés comme indiquant un résultat favorable. Il y a une différence significative entre le groupe thrombectomie et le groupe témoin dans la distribution globale des scores (adapté de : NINDS, 1995 ; Bekemer et al., 2015).

1.3.2 Phase chronique : rééducation et réadaptation

Nous avons dit précédemment que l'AVC est la première cause de handicap moteur. De fait, suite à la phase aiguë, les patients rentrent dans une phase dite « chronique », où de longues semaines/mois sont nécessaires pour réduire au maximum les séquelles post-ischémiques, selon le territoire affecté lors de l'AVC. Pour cela, il y a une nécessité de mettre en place des stratégies de rééducation et réadaptation afin que l'impact des séquelles soit réduit au minimum.

Les patients vont pouvoir bénéficier de séances de kinésithérapie, d'orthophonie ou d'orthoptie pour prévenir et/ou traiter ces comorbidités post-AVC : la mobilité des membres, les déficits moteurs, la spasticité, le travail de l'équilibre, la marche, et la fonction de préhension, en résumé les fonctions nécessaires pour une indépendance dans les fonctions de la vie quotidienne. Pour les patients atteints d'aphasie, une rééducation intensive est primordiale pour améliorer la communication (écrite et/ou orale). Il y également une nécessité de rééducation cognitive, pour le travail de la mémoire et des fonctions exécutives tel que le raisonnement ou l'attention.

Ces dernières années, des méthodes thérapeutiques complémentaires ont été développées, notamment la Stimulation Magnétique Transcrânienne répétée pour influencer de manière non invasive sur les états d'excitation du cortex. En effet, des stimulations de 5Hz (haute fréquence) vont réactiver les zones hypoactives de l'hémisphère lésé, alors que d'autres stimulations de 1Hz (basse fréquence) sur l'hémisphère sain vont permettent d'y restaurer les processus inhibiteurs ([Lüdemann-Podubecká et al., 2015](#) ; [Dionísio et al., 2018](#) ; [Watanabe et al., 2018](#)). Récemment, la réalité virtuelle a émergé comme un outil qui pourrait améliorer les fonctions motrices ou cognitives post-AVC ([Laver et al., 2017](#) ; [Choi & Paik, 2018](#) ; [Ikbali Afsar et al., 2018](#) ; [Noveletto et al., 2020](#)).

Les Accidents Vasculaires Cérébraux

Pour résumer

- L'**AVC** représente la seconde cause de mortalité et de démence dans le monde, ainsi que la première cause de handicap acquis chez l'adulte. Cette pathologie résulte soit de l'**obstruction** (AVC ischémique ; 80%) soit de la **rupture** d'un vaisseau cérébral (AVC hémorragique ; 20%).
- Lors d'un AVC ischémique, l'occlusion d'un vaisseau conduit à une diminution du **débit sanguin cérébral** et donc à un arrêt d'apport en **oxygène et en glucose**. Les neurones n'ont plus d'énergie et meurent rapidement dans le « **foyer ischémique** ». Autour du foyer, dans la « **pénombre ischémique** », la chute du débit sanguin cérébral est moins importante, les neurones sont en souffrance mais peuvent être sauvés si la circulation est rétablie.
- Il est à retenir que le **tPA** (Actilyse®) est le seul traitement pharmacologique autorisé à la phase aigüe pour les AVC ischémiques : il permet l'activation du système fibrinolytique, et contribue à la dégradation de caillot de fibrine obstruant une artère. Cette **thrombolyse** peut ou non être associée à la **thrombectomie** mécanique.

Chapitre 2 : L'Activateur tissulaire du Plasminogène (tPA), enzyme centrale de la fibrinolyse



1.1 Historique de la découverte du tPA

L'activateur tissulaire du plasminogène (*tissue-type Plasminogen Activator* en anglais) ou tPA, a d'abord été décrit comme une protéase à sérine d'origine endothéliale, libérée dans la circulation sanguine et ayant des propriétés fibrinolytiques. En effet, le tPA peut activer le plasminogène en plasmine, elle-même capable de dégrader la fibrine, un constituant majeur des caillots sanguins. Ainsi, cette fonction lui permet d'être, à l'heure actuelle, le seul traitement pharmacologique en phase aiguë des AVC ischémiques (**Figure 14**). Le tPA est également exprimé par plusieurs types cellulaires dans le parenchyme cérébral. Ainsi, ses fonctions s'étendent au-delà du compartiment vasculaire, et nous allons détailler ci-après quelques fonctions physiologiques et pathologiques du tPA dans le SNC.

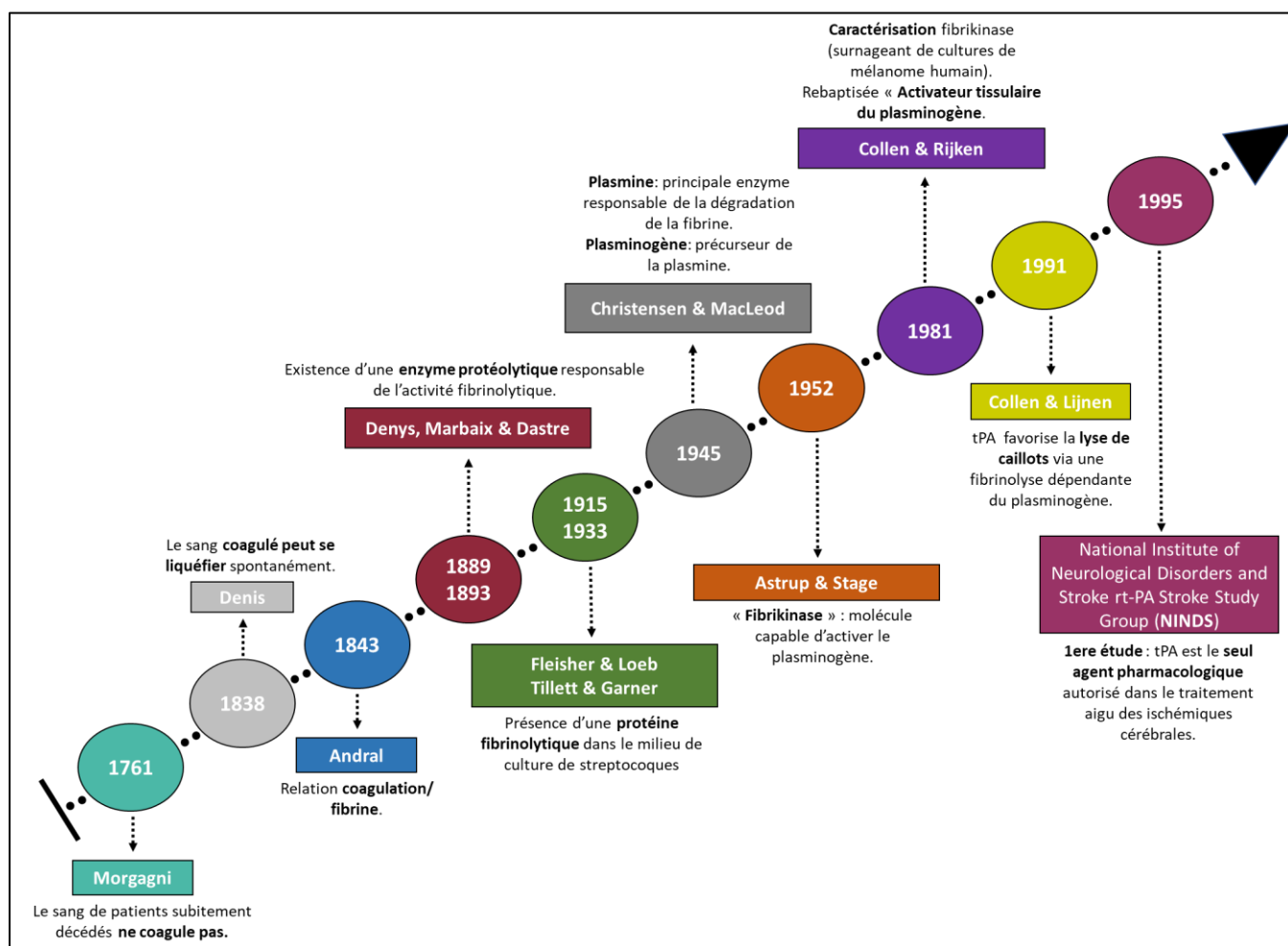


Figure 14 : Chronologie des grandes découvertes sur le tPA.

Au 18^{ème} siècle, Giovanni Battista **Morgagni** (1682-1771) rapportait ses observations sur le sang de patients subitement décédés qui **ne coagulait pas**. Entre 1889 et 1933, lorsque le système fibrinolytique commence à se dévoiler, il est découvert une **enzyme protéolytique** au centre de la **cascade fibrinolytique**, d'abord nommée « **Fibrinokinas** » en 1952 puis rebaptisée « **Activateur tissulaire du plasminogène** » après sa caractérisation par Désiré **Collen** (1943-) en 1981. L'étude NINDS, en 1995 évalue la possibilité d'utiliser le tPA comme **agent thrombolytique** lors d'un AVC ischémique. Ainsi, le tPA devient et reste à l'heure actuelle le **seul agent pharmacologique autorisé** dans le traitement aigu des **ischémiques cérébrales**, en association (ou non) à la thrombectomie.

1.2 La structure du tPA

Le tPA est une glycoprotéine de la famille des sérines protéases, codée par le gène PLAT localisé sur le chromosome 8 (Yang-Feng et al., 1986).

Il est synthétisé sous la forme d'une chaîne polypeptidique de 527 acides aminés, ayant une masse moléculaire d'environ 69 kDa (Pennica et al., 1983). Il possède 5 domaines structuraux répartis sur deux chaînes A (lourde) et B (légère), maintenues par 17 ponts disulfures. Chaque domaine permet d'interagir avec un partenaire spécifique, et donc d'exercer différentes fonctions. La chaîne lourde (chaîne A) amino-terminale contient les 4 domaines suivants (**Figure 15**) :

- ✓ Le **domaine Finger** : nommé ainsi pour sa forte homologie avec le premier domaine Finger de la fibronectine de type I (Bányai et al., 1983), ce domaine présente une forte affinité pour la fibrine et permet au tPA de former un complexe ternaire avec le plasminogène (Kagitani et al., 1985). Ce domaine est capable d'interagir avec des récepteurs membranaires, notamment les récepteurs aux lipoprotéines de faible densité (*Low Density Lipoprotein Receptor-related Protein* ou LRP) et avec les récepteurs de l'annexine-II (Bu et al., 1992 ; Hajjar et al., 1994). Enfin, ce domaine est également impliqué dans la liaison du tPA avec l'un de ses inhibiteurs, PAI-1 (inhibiteur de type 1 du plasminogène) (Kaneko et al., 1991).
- ✓ Le **domaine EGF-like** : nommé ainsi pour sa forte homologie avec le facteur de croissance épidermique (*epidermal growth factor* ou EGF), il est responsable de l'interaction du tPA avec le récepteur à l'EGF et de son activation (Hurtado et al., 2007 ; Correa et al., 2011). De plus, sa O-glycosylation participe à la recapture, ainsi qu'à la clairance du tPA dans le foie (Hajjar & Reynolds, 1994),

- ✓ Le **domaine Kringle-1** : les domaines Kringle sont caractérisés par la présence d'un site ayant une forte affinité pour la lysine (*Lysine Binding Site*, LBS), composé de deux acides aminés aromatiques (Trp242 et Trp253) formant une poche dans la structure tertiaire du tPA. Le site LBS du domaine Kringle-1 n'étant pas fonctionnel, son rôle reste flou. Néanmoins, il serait impliqué dans la recapture et la clairance du tPA par les cellules endothéliales hépatiques *via* une glycosylation sur son Asp117 qui peut alors interagir avec les récepteurs du mannose, présents sur ces cellules (Kuiper et al., 1996). Certaines pistes laissent penser qu'il jouerait un rôle dans l'inhibition de la prolifération des cellules endothéliales (Kim et al., 2003).

- ✓ Le **domaine Kringle-2** : *a contrario*, ce domaine contient un site LBS actif, ce qui lui a valu d'être plus étudié que le domaine K1. Il permet au tPA de se lier et d'activer différents substrats et récepteurs comme le plasminogène, le récepteur au *Platelet Derived Growth Factor*-CC (PDGF-CC ; Fredriksson et al., 2004). De même, il est capable d'interagir avec la sous-unité GluN1 des récepteurs NMDA (Lopez-Atalaya et al., 2008).

La chaîne légère du tPA (chaîne B) n'est, quant à elle, composée que d'un seul domaine (Figure 15) :

- ✓ Le **domaine Sérine Protéase** : Ce domaine catalytique comporte 3 acides aminés (His322, Asp371 et Ser478) formant un site actif appelé la triade catalytique qui confère au tPA son activité protéolytique par sa capacité à convertir le plasminogène en plasmine (Pennica et al., 1983). C'est également le site de liaison de l'inhibiteur le plus courant du tPA, l'inhibiteur de type 1 du plasminogène (*Plasminogen Activator Inhibitor-1* ou PAI-1 ; Andreasen et al., 1986).

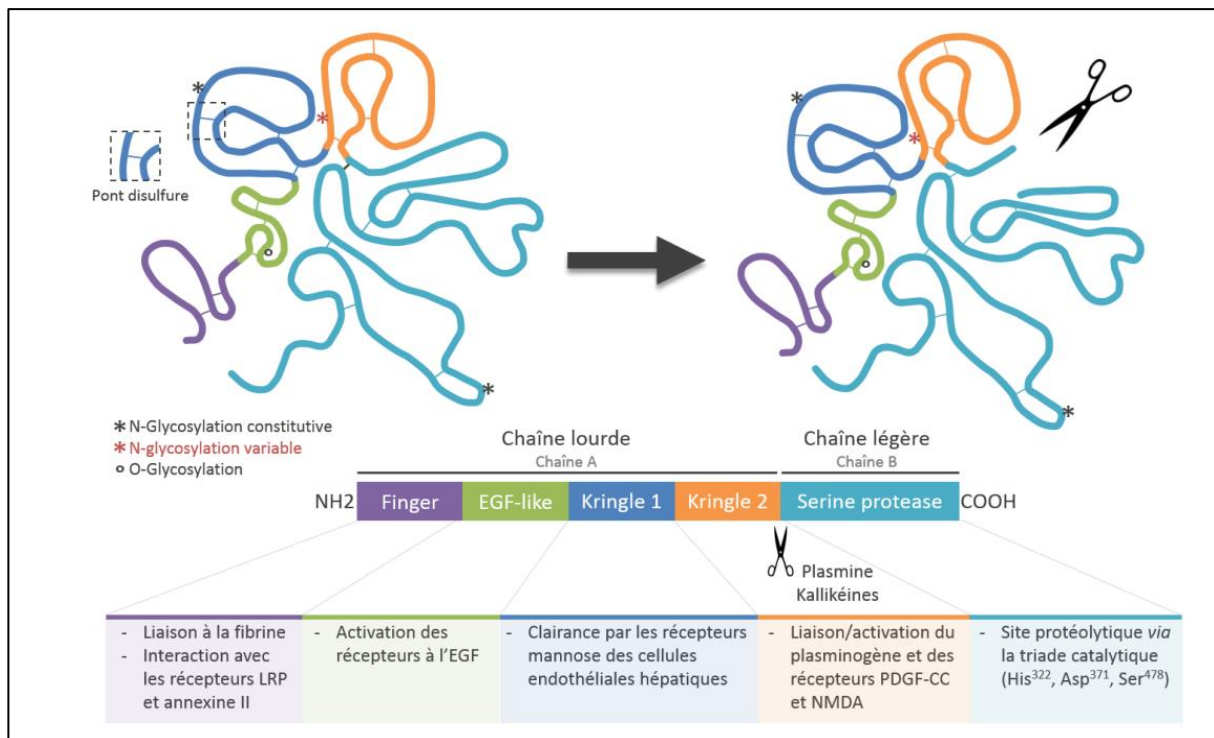


Figure 15 : Structure et fonctions des domaines du tPA, sous ses 2 formes simple et double chaîne.

Représentation schématique du tPA sous ses formes simple (sc-tPA) et double chaînes (tc-tPA) montrant ses 5 domaines (Finger, EGF, K1, K2 et Sérine Protéase), les 17 ponts disulfures, les 4 sites de glycosylations ainsi que le site de clivage (adapté de : [Chevilley et al., 2015](#) ; [Hébert et al., 2016](#)).

Comme tous les membres de la famille des sérines protéases, le tPA existe sous deux formes distinctes : une forme dite « simple chaîne » (*single-chain*, en anglais ou sc-tPA) ainsi qu'une forme « double chaîne » (*two-chain*, en anglais ou tc-tPA) ([Rijken & Collen, 1981](#)). Initialement synthétisé sous forme simple chaîne, la conversion sous forme double chaîne se produit *via* l'hydrolyse de la liaison peptidique reliant l'Arg275 à l'Ile276, sous l'action d'autres sérines protéases telles que la plasmine ou les kallikréines ([Wallén et al., 1982](#) ; [Ichinose et al., 1984](#) ; [Thelwell & Longstaff, 2007](#)). Sous cette seconde forme, les deux chaînes restent reliées par un pont disulfure entre les cystéines 299 (chaîne A) et 430 (chaîne B) ainsi que par la création d'un pont salin entre l'arginine 302 (chaîne A) et l'acide glutamique 445 (chaîne B) ([Lamba et al., 1996](#)).

Comparativement à ses homologues, le tPA demeure une sérine protéase « exceptionnelle » : alors que la plupart des sérines protéases ne sont actives que sous la forme double chaîne, le tPA va présenter une activité fibrinolytique identique sous ses deux formes sc-tPA et tc-tPA (Hoylaerts et al., 1982 ; Rijken et al., 1982). Plusieurs travaux tendent à montrer des différences fonctionnelles entre ces deux formes. En présence de fibrine, la forme double chaîne confère au tPA une activité catalytique supérieure (Wallén et al., 1982 ; Petersen et al., 1988) mais celle-ci est inactivée plus rapidement par ses différents inhibiteurs : ces deux formes ont donc une activité fibrinolytique globalement identique. En revanche, sans fibrine, le tc-tPA présente une activité cinq fois supérieure à celle du sc-tPA (Wallén et al., 1982 ; Parcq et al., 2012 ; Bertrand et al., 2015 ; Hedou et al., 2021).

1.3 Expression du tPA

1.3.1 Expression du tPA circulant

1.3.1.1 Synthèse et libération par les cellules endothéliales

Le tPA est principalement exprimé dans le compartiment vasculaire, où il circule sous sa forme simple chaîne à une concentration plasmatique d'environ 70pM (Binder et al., 1979 ; Rijken & Lijnen, 2009), concentration qui augmente avec l'âge (Tomadesso et al., 2022). Il est synthétisé et libéré par les cellules endothéliales de façon continue (Binder et al., 1979 ; Levin & Loskutoff, 1982 ; Angles-Cano et al., 1985), mais les cellules endothéliales peuvent également le stocker et le libérer en réponse à certains stimuli. Dans l'endothélium vasculaire cérébral, on retrouve le tPA majoritairement dans les micro-vaisseaux (< 100 µm de diamètre ; (Levin et al., 1997). Des études suggèrent que le tPA serait contenu avec le VWF au sein des corps de Weibel-Palade, (Sadler, 1998 ; Huber et al., 2002). Plus récemment, il a été observé que

le tPA serait stocké dans de petits granules distincts des corps de Weibel-Palade car dépourvus de VWF (Emeis et al., 1997 ; Knop et al., 2004 ; Knipe et al., 2010).

Le tPA peut alors être libéré par deux voies distinctes de sécrétion :

- **Exocytose « constitutive »** : cette voie permet une protection de la surface des cellules endothéliales vasculaires. En effet, quand il est sécrété de manière continue, le tPA reste en contact avec la membrane des cellules endothéliales. La surface interne des vaisseaux sanguins étant propice à la formation de fibrine, le tPA ainsi libéré peut exercer son activité fibrinolytique. Son inhibiteur, PAI-1, présent en plus grande quantité que le tPA dans le compartiment vasculaire peut faciliter le décrochage du tPA de la membrane et induire son inhibition lorsque la fibrinolyse n'est pas nécessaire (Suzuki et al., 2009).
- **Exocytose « contrôlée »** : le tPA peut également être sécrété en réponse à certains stimuli. Cette libération s'effectue sous le contrôle d'une voie de signalisation qui impliquerait l'activation de protéines-G ainsi qu'une augmentation de la concentration intracellulaire de Ca^{2+} (Van Den Eijnden-Schrauwen et al., 1997 ; Knop & Gerke, 2002). Parmi les facteurs permettant de déclencher cette sécrétion, il y a des molécules vasodilatatrices comme la desmopressine ou la bradykinine (Allen et al., 1985 ; Brown et al., 1997), certains agonistes issus de la cascade de coagulation comme la thrombine (Emeis et al., 1997), des facteurs hémodynamiques telle que l'augmentation de la pression sur les parois des vaisseaux (Diamond et al., 1990 ; Kawai et al., 1996), ou une occlusion veineuse d'un membre (Stegnar et al., 1988 ; Petäjä, 1989).

1.3.1.2 Synthèse et libération par les hépatocytes

Une étude récente a suggéré une source de production du tPA circulant autre que les cellules endothéliales : les hépatocytes (**Figure 17**). Le gène *DACH1* (*Dachshund*), codant pour un co-répresseur transcriptionnel ([Popov et al., 2010](#)), réprime également un activateur de facteur de transcription (*Activating transcription factor 6* en anglais, ou ATF6) présent dans les hépatocytes ([Ozcan et al., 2016](#)) qui serait responsable de l'expression du gène *PLAT*, codant pour le tPA. Une délétion conditionnelle de *DACH1* dans les hépatocytes se traduirait par une surexpression du gène *PLAT*, et donc une augmentation de la concentration et de l'activité du tPA plasmatique ([Zheng et al., 2019](#) ; **Figure 16**).

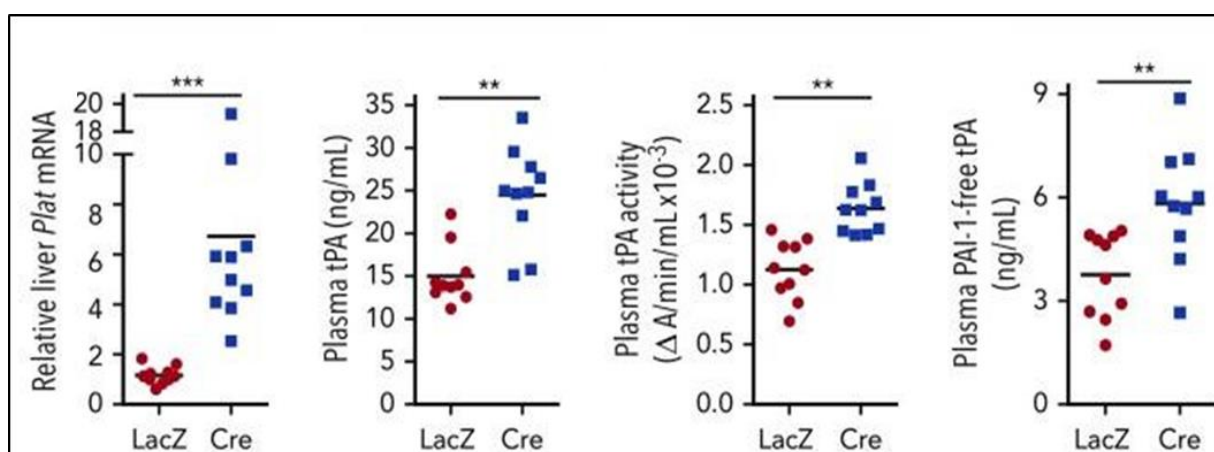


Figure 16 : La suppression de DACH1 dans les hépatocytes augmente le tPA hépatique, le tPA plasmatique et l'activité fibrinolytique systémique chez la souris.

Comparativement aux souris contrôles, le taux d'ARN messager ainsi que la quantité de protéines sont supérieurs chez des souris n'exprimant plus DACH1 ([Zheng et al., 2019](#)).

Cependant, comme nous allons le voir dans notre travail, au niveau hépatique, l'origine cellulaire de tPA circulant pourrait être les cellules endothéliales et non les hépatocytes (Yetim et al., en révision).

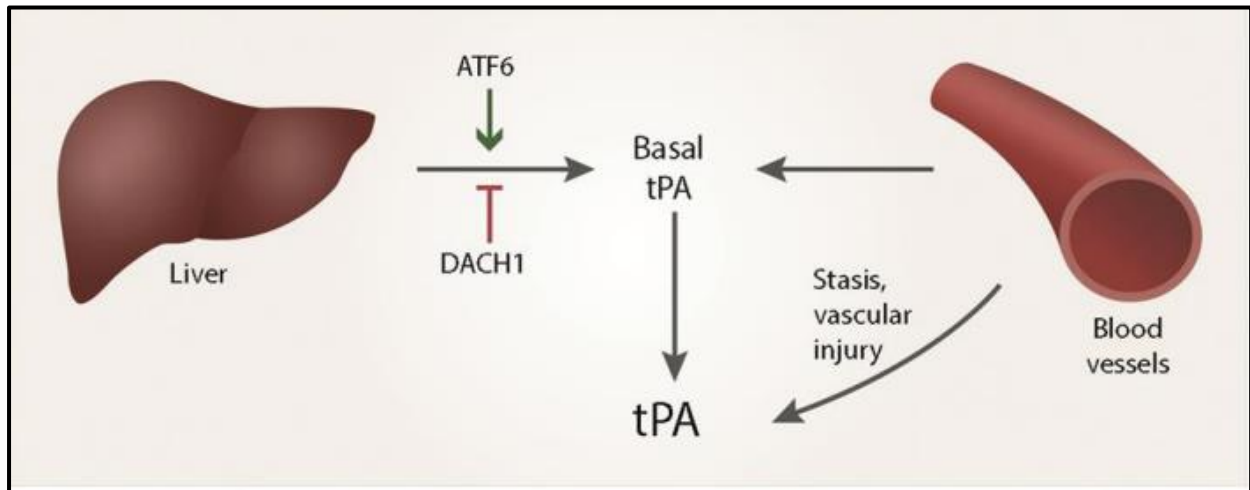


Figure 17 : Le foie combiné aux cellules endothéliales établit le taux basal de tPA circulant.

Les cellules endothéliales participent à la libération du tPA *via* 2 voies d'exocytoses. Le foie exprime le tPA *via* ATF6 et régulé par le corépresseur transcriptionnel DACH1 (Gonias, 2019).

1.3.1.3 Clairance du tPA circulant

La demi-vie du tPA circulant est d'environ six minutes (Verstraete et al., 1985). Le foie contribue essentiellement à la clairance du tPA grâce à un système de recapture très efficace par les hépatocytes et les cellules endothéliales hépatiques (Kuiper et al., 1988). Plusieurs récepteurs sont impliqués dans cette recapture : les récepteurs au mannose, sur les cellules endothéliales hépatiques (Kuiper et al., 1988), les LRP (Orth et al., 1994 ; Yepes et al., 2003), et les galectines (Nagaoka et al., 2003 ; **Figure 18**) au niveau hépatocytaire. A noter que la liaison du tPA avec son inhibiteur sanguin principal, PAI-1, augmente sa clairance (Chandler et al., 1997).

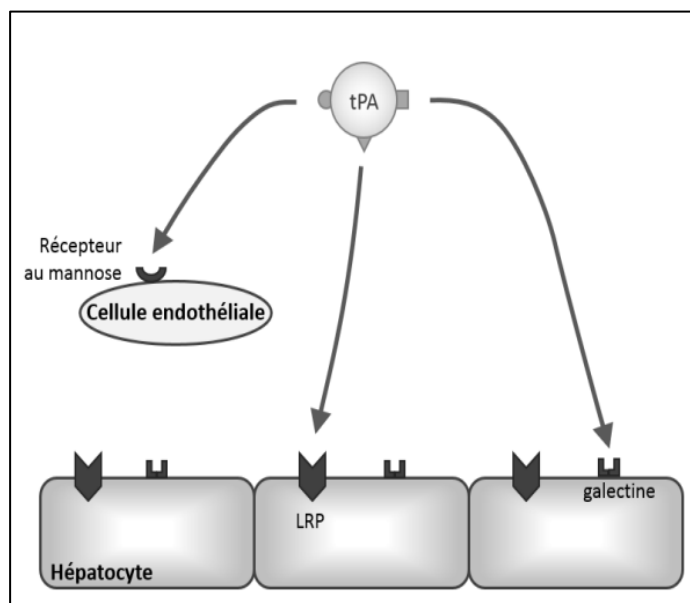


Figure 18 : La clairance hépatique du tPA.

Le tPA peut être recapté par trois voies : une dépendante des récepteurs au mannose à la surface des cellules endothéliales hépatiques. Les deux autres se trouvent au niveau des hépatocytes : une dépendante des LRP et une dépendante des récepteurs galectines (adapté de : Nagaoka et al., 2003).

1.3.2 Expression et distribution du tPA périphérique

Historiquement, la présence du tPA a été mise en évidence dans le sang. Mais entre les années 50 et la fin des années 90, il a été montré que le tPA est présent dans une multitude d'organes tels que les poumons, les reins, la prostate, les muscles, le cœur ou bien encore l'utérus (Albrechtsen, 1957 ; Rouf et al., 1996 ; **Figure 19**). Cette expression au sein des différents organes cités, est souvent associée à un remodelage des tissus et de leur vascularisation, comme, par exemple, dans l'utérus, où le tPA favorise la mise en place de l'endomètre (Lockwood & Schatz, 1996).

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

Figure 19 : Activité et localisation du tPA en dehors du système nerveux.

L'activité du tPA dans différents tissus humains est mesurée en unité internationale (IU) par gramme de tissu frais (Rouf et al., 1996 ; adapté de : Albrechtsen, 1957).

1.3.3 Expression et distribution du tPA au sein du système nerveux central

La présence du tPA au sein du SNC a été mise en évidence pour la première fois en 1981 par Soreq et Miskin. Ces derniers ont démontré son expression dans les cellules endothéliales tapissant les vaisseaux cérébraux et dans les neurones à différents stades du développement, lui prédisant ainsi d'autres rôles que celui la fibrinolyse vasculaire (Soreq & Miskin, 1981). Puis en 1993, Sappino et ses collaborateurs, ont mis en évidence, chez la souris, la présence des Acides RiboNucléiques messagers (ARNm) du tPA dans la plupart des régions cérébrales : le cervelet, l'hippocampe, l'hypothalamus, le striatum et le cortex. Cependant, son activité protéolytique n'a été détectée que dans l'hippocampe et l'hypothalamus (Sappino et al., 1993).

Chez l'Homme, Teesalu et collaborateurs ont détecté la présence d'ARNm du tPA par hybridation *in situ*, dans de nombreuses autres régions du cerveau telles que les plexus

choroïdes, le tronc cérébral, l'hypophyse, la moelle épinière et les différents noyaux thalamiques (Teesalu et al., 2004). De plus récents travaux, ont permis d'identifier plus précisément chez la souris, les régions corticales capables d'exprimer le tPA. Parmi celles-ci, on peut citer le cortex rétrosplénial, somatosensoriel primaire, périrhinal et piriforme, avec environ 10 à 15% de neurones excitateurs exprimant du tPA (Louessard et al., 2016).

À l'échelle cellulaire, le tPA est exprimé par les neurones, les mastocytes, les péricytes, les cellules endothéliales, les épendymocytes (Louessard et al., 2016, Figure 20), les astrocytes (Toshniwal et al., 1987), les oligodendrocytes (Correa et al., 2011) et la microglie (Siao et al., 2003), même si cette expression par les astrocytes, la microglie et les péricytes reste à l'heure actuelle discutée (Tsirka et al., 1995 ; Yamamoto et al., 2005 ; Qian et al., 2016).

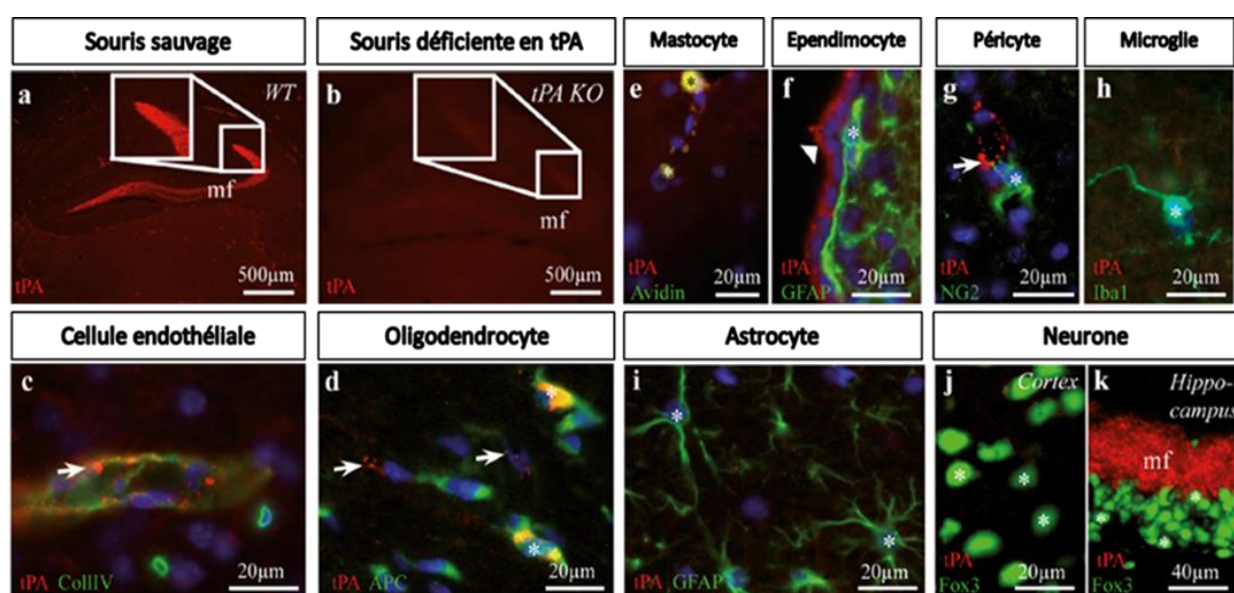


Figure 20 : Distribution du tPA dans différents types cellulaires du SNC chez la souris. Immunohistochimie sur coupes de cerveau de souris après injection de colchicine (inhibiteur du transport axonal). Le tPA (en rouge) est présent chez des souris sauvages (a,b) au sein des cellules endothéliales (c), des oligodendrocytes (d), mastocytes (e), des épendymocytes (f), des péricytes (g), de la microglie (h), des astrocytes (i) et des neurones (j,k) (adapté de : Louessard et al., 2016).

- **Dans les neurones** : l'expression neuronale pourrait être spécifique de sous populations, dont les neurones à parvalbumine, les fibres moussues, ou bien les neurones pyramidaux (Louessard et al., 2016 ; Lépine*, Douceau* et al., 2022 ; **Figure 21**). Le tPA, considéré comme un neuromodulateur, est synthétisé puis stocké dans des vésicules présynaptiques (Parmer et al., 1997 ; Shin et al., 2004), puis il est transporté dans des vésicules de sécrétion le long des dendrites (possible dans les deux sens) avant d'être libéré au niveau des cônes de croissance pour permettre l'élongation axonale (Lochner et al., 1998). Suite à une dépolarisation neuronale, le tPA peut être libéré à la synapse par un mécanisme d'exocytose dépendant du Ca^{2+} (Fernández-Monreal et al., 2004 ; Roussel et al., 2011 ; Louessard et al., 2017).

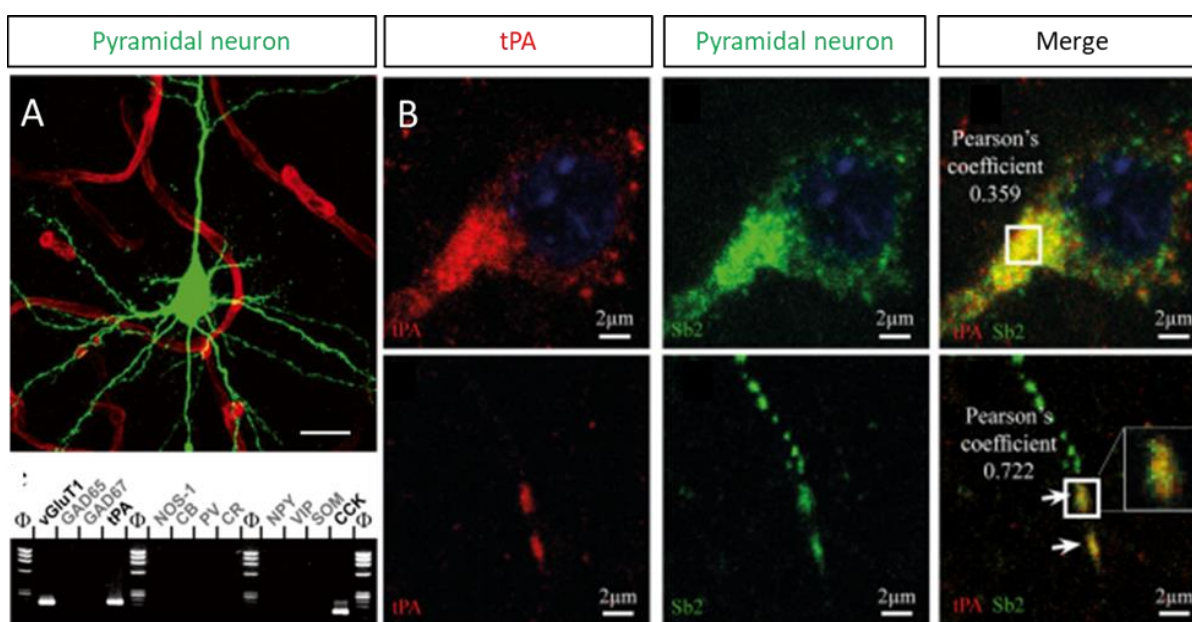


Figure 21 : Caractérisation de neurones pyramidaux exprimant du tPA.

(A) Enregistrement en patch-clamp d'un neurone pyramidal (en vert). Transcription inverse puis réaction en chaîne par polymérase sur une cellule (sc RT-PCR) révélant l'expression des ARNm du tPA ainsi que les ARNm du transporteur au glutamate (VGLUT1) et de la cholécystokinine (CCK). (B) Immunohistochimie sur coupes de cerveau de souris révélant la présence du tPA (en rouge) dans des vésicules synaptobrevine 2 positives (en vert, Sb2) (adapté de : Louessard et al., 2016).

- **Dans les astrocytes** : une fois libéré dans la fente synaptique par les neurones, le tPA peut être recapté par les astrocytes *via* les LRP. Les astrocytes seraient ensuite capables de libérer ce tPA endocytosé par un mécanisme impliquant la protéinase kinase C suite à l'activation des récepteurs kaïnate membranaires. Ce recyclage du tPA synaptique pourrait être à l'origine de la clairance du tPA au sein du SNC ([Cassé et al., 2012](#)). La synthèse du tPA par les astrocytes a été mise en évidence chez la souris ([Toshniwal et al., 1987](#)) puis chez l'homme ([Hultman et al., 2008](#) ; **Figure 22**). Hultman et collaborateurs ont montré que les astrocytes seraient capables d'exprimer et de libérer du tPA de façon régulée, mais ces résultats sont discutés ([Olsson et al., 2016](#) ; [Keragala et al., 2020](#)).

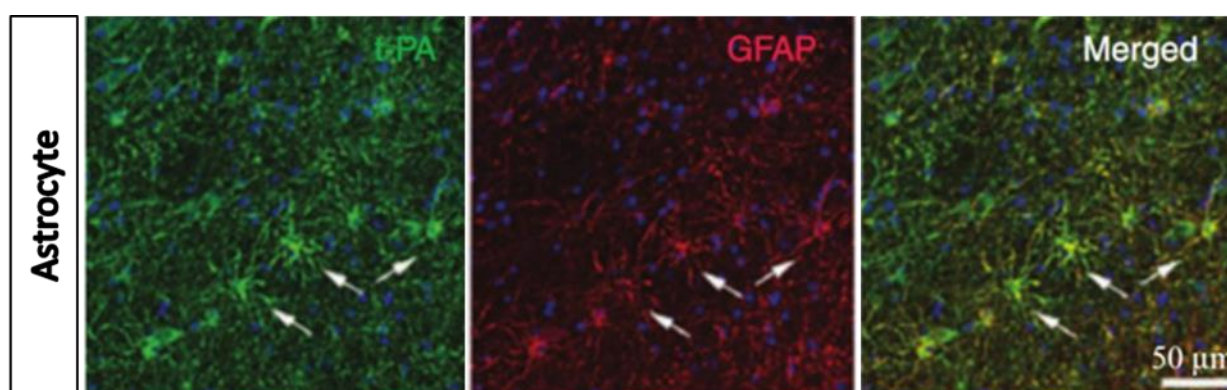


Figure 22 : Expression du tPA par les astrocytes chez l'Homme.

Le tPA (en vert, à gauche) est présent au niveau des astrocytes humains activés (en rouge, à droite, marquage GFAP) (adapté de : [Hultman et al., 2008](#)).

- **Dans les oligodendrocytes** : Il est également exprimé par les oligodendrocytes ([Correa et al., 2011](#) ; [Louessard et al., 2016](#) ; [Leonetti et al., 2017](#)), principalement les oligodendrocytes matures, avec une diminution de son expression au cours du vieillissement. De récents travaux du laboratoire ont montré que le tPA des oligodendrocytes est impliqué dans la migration des précurseurs oligodendrocytaires au cours du développement et durant la remyélinisation suite à une lésion de la substance blanche ([Leonetti et al., 2017](#) ; **Figure 23**).

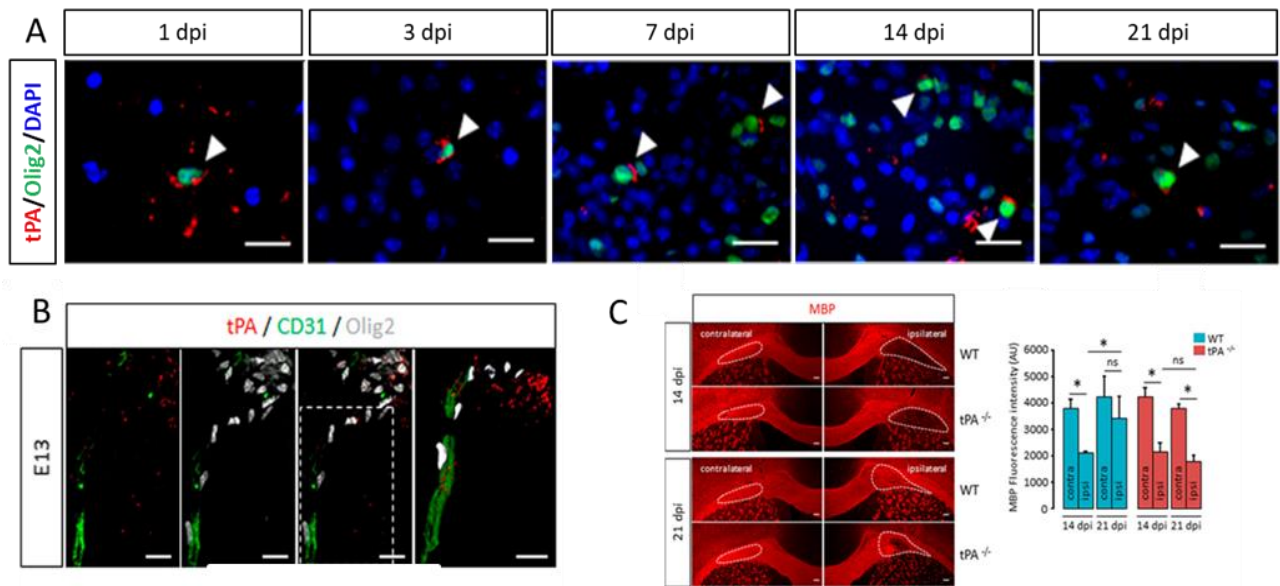


Figure 23 : Le tPA impliqué dans la migration des précurseurs oligodendrocytaires et la remyélinisation suite à une lésion de la substance blanche.

(A) Immunohistochimie sur coupe de cerveau de souris WT plusieurs jours après l'injection de lysolécithine montrant du tPA (en rouge) présent (flèche blanche) au niveau des oligodendrocytes (en vert, marquage Olig2). (B) immunocoloration du tPA (rouge), CD31 (vert) et Olig2 (gris) dans la corne ventrale droite des moelles épinières de souris WT à E13. (C) Photomicrographies et quantification correspondante de coupes cérébrales (lésion du corps calleux) montrant l'immunomarquage MBP (rouge) dans le corps calleux ipsilatéral et contralatéral des souris WT et tPA^{-/-}, 14 et 21 jours après injection (adapté de : [Leonetti et al., 2017](#)).

- **Dans la microglie** : la microglie est aussi capable de synthétiser/libérer du tPA, lors de processus inflammatoires ou neurodégénératifs. Le tPA est majoritairement associé à une microglie activée, et aurait probablement un rôle dans son activation ([Tsirka et al., 1995](#) ; [Rogove et al., 1999](#) ; [Siao et al., 2003](#) ; **Figure 24**).

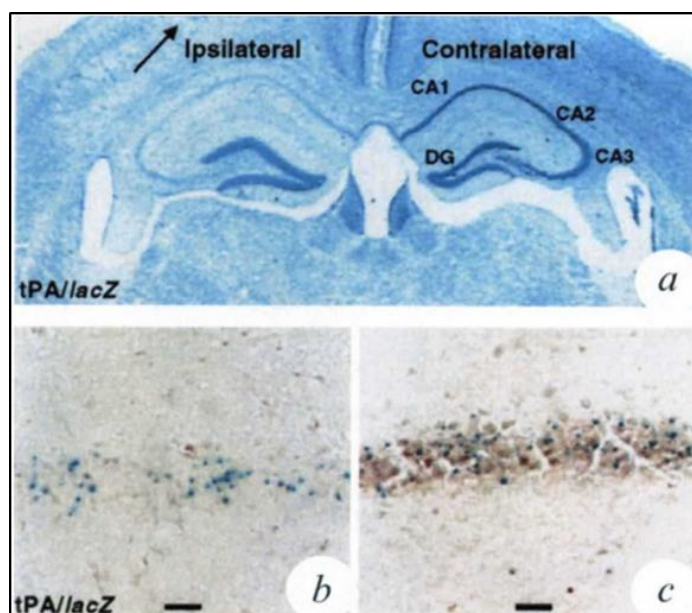


Figure 24 : Le tPA est exprimé par la microglie.

Photomicrographie de coupe coronale de cerveau de souris transgénique tPA/lacZ (fusion du promoteur du tPA avec un gène lacZ) après coloration au crésyl-violet, 5 jours après une injection hippocampique de kaïnate qui induit la mort des neurones hippocampiques dans les régions CA1-CA3 (a). Après activation dans la zone lésée, la microglie est capable de produire des ARNm du tPA (marquage β -galactosidase positif, en bleu) dans la zone lésée (b) et dans la zone saine (c) (Tsirka et al., 1995).

1.4 Inhibition du tPA par les serpinés

La discordance entre le niveau d'expression (ARNm ou protéine) du tPA et son activité au sein d'une même structure, notamment dans le parenchyme cérébral (Sappino et al., 1993), s'explique par l'existence d'inhibiteurs, qui appartiennent à la famille des serpinés (*SERine Proteinase INhibitor*).

Ces serpinés possèdent une conformation secondaire formant un domaine (le *core domain*) constitué de trois feuillets β et de huit ou neuf hélices α , ainsi qu'une boucle, appelée boucle du centre réactif (*reactive center loop*, ou RCL), qui permet leur interaction avec leurs protéases cibles. La serpine se fixe sur la protéase par l'intermédiaire de la RCL, puis la protéase clive cette boucle, formant une liaison covalente entre la serpine et la protéase. Ainsi, un complexe se forme permettant

l'inhibition de l'activité de la protéase (**Figure 25**). Les serpins peuvent aussi exister sous une forme latente, pour laquelle l'interaction avec la protéase n'est pas possible (Huntington et al., 2000 ; Silverman et al., 2001).

A l'heure actuelle, quatre serpins ont été identifiées comme inhibitrices du tPA : PAI-1, PAI-2, la neuroserpine (NS) et la protéase nexine-1 (Scott et al., 1985 ; Sprengers & Kluft, 1991 ; Osterwalder et al., 1996). Dans le parenchyme cérébral, les principaux inhibiteurs du tPA sont la NS et PAI-1 (Docagne et al., 1999 ; Hino et al., 2001), alors que dans la circulation sanguine, PAI-1 est le principal inhibiteur du tPA, la NS y étant très peu exprimée (Miranda & Lomas, 2006). La nexine-1, bien qu'impliquée dans l'hémostase, est à peine détectable dans le plasma. Elle est sécrétée par les cellules endothéliales, les CMLs et les plaquettes (Baker & Gronke, 1986 ; Leroy-Viard et al., 1989 ; Bouton et al., 2012). Dans le parenchyme cérébral, elle est exprimée par les cellules gliales et les neurones (Gloor et al., 1986 ; Simpson et al., 1994). Le rôle de PAI-2 reste peu documenté ; il est capable d'inhiber le tPA mais il demeure majoritairement intracellulaire et n'est pas détectable dans le plasma chez l'adulte, excepté lors d'une grossesse (Dougherty et al., 1999).

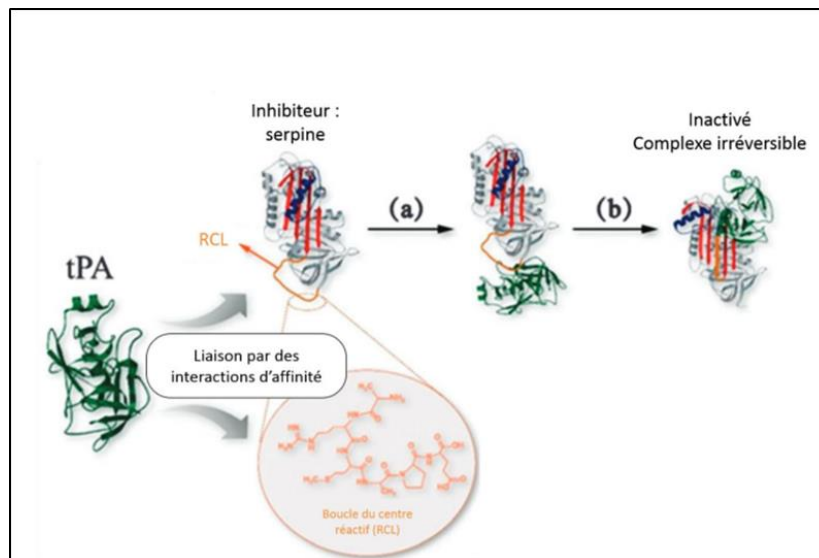


Figure 25 : Mode d'action des serpins. Interaction entre le tPA et la serpine au niveau de la RCL.

(a) Le tPA clive la boucle RCL, qui va alors s'insérer dans le feuillet βA . (b) La protéase est entraînée au pôle opposé et une liaison covalente inhibitrice se forme entre la serpine et la protéase (adapté de : Tang et al., 2015).

1.4.1 PAI-1

PAI-1 est une protéine de 50 kDa composée de 379 acides aminés. Elle est principalement retrouvée dans le plasma, et aurait pour origine les cellules endothéliales, les CMLs et les plaquettes (Sprengers & Kluft, 1987 ; Brogren et al., 2004).

Au niveau périphérique, elle est présente dans le foie, le tissu adipeux, les poumons, les reins ou le cœur, ainsi que dans de nombreux types cellulaires. Dans la circulation, PAI-1 est présente sous différentes formes : une active et libre, qui va perdre spontanément son activité (demi-vie de 90 minutes) et une inactive, liée au tPA (Lindahl et al., 1989).

PAI-1 étant en excès par rapport au tPA, la majorité du tPA se retrouve donc inhibée car complexée à PAI-1. Les complexes tPA/PAI-1 sont très stables, ce qui rend l'inhibition du tPA presque définitive (Zhou et al., 2001). A noter que PAI-1 est capable de se fixer aussi bien au sc-tPA qu'au tc-tPA (Rijken & Lijnen, 2009). La clairance hépatique du complexe tPA-PAI-1 est deux fois plus rapide que celle du tPA (Nagaoka et al., 2003). PAI-1 est également responsable d'une partie de la régulation du tPA dans le SNC (Sprengers & Kluft, 1987). En condition physiologique, PAI-1 n'est exprimé qu'en très faible quantité par les astrocytes (Hino et al., 2001 ; Bouton et al., 2012) mais en conditions pathologiques, comme par exemple lors d'un AVC, elle est surexprimée par de nombreux types cellulaires tels que les macrophages et les astrocytes (Docagne et al., 1999 ; Dietzmann et al., 2000 ; **Figure 26**). Dans le parenchyme, PAI-1 est un inhibiteur puissant du tPA, mais présente une baisse d'efficacité lors de la présence de fibrine, contrairement à la protéase nexine-1 qui, elle, est capable d'inhiber le tPA ainsi que la plasmine liée à la fibrine (Thelwell & Longstaff, 2007 ; Bouton et al., 2012).

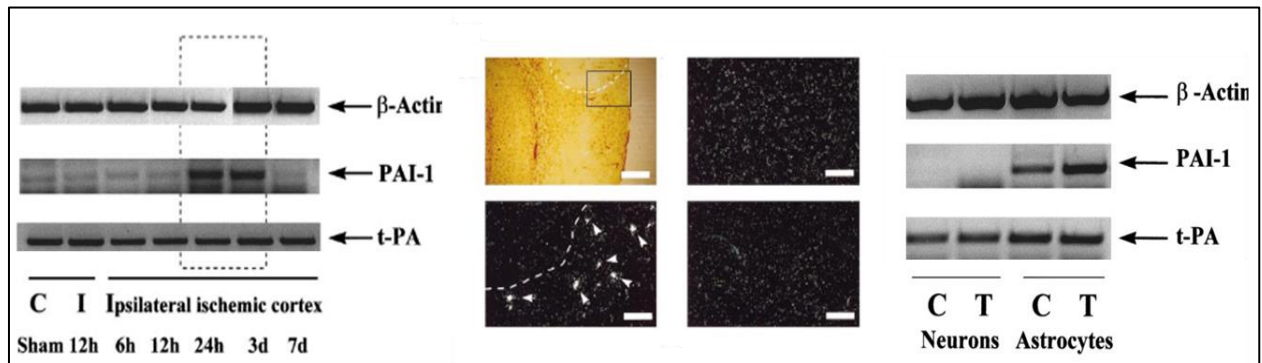


Figure 26 : Modulation de l'expression de PAI-1 et du tPA après une ischémie focale permanente dans le cortex de la souris.

Nous retrouvons du tPA ainsi que du PAI-1 dans le cortex ischémié, ainsi qu'une surexpression du PAI-1 plus particulièrement dans les astrocytes, comparativement aux neurones (adapté de : [Docagne et al., 1999](#)).

1.4.2 Neuroserpine

La NS, une protéine de 54-60 kDa, composée de 410 acides aminés, est exprimée presque exclusivement dans le SNC ; toutefois de très faibles quantités sont retrouvées dans certains organes tels que les reins, le cœur, les testicules ou le pancréas ([Schrimpf et al., 1997](#)). En revanche, de nombreuses études ont démontré que la NS n'est pas du tout exprimée par les cellules endothéliales : elle est donc absente de la circulation sanguine et n'a aucune influence sur le tPA vasculaire ([Osterwalder et al., 1996](#) ; [Hastings et al., 1997](#) ; [Docagne et al., 1999](#)).

Dans le SNC, la NS est principalement exprimée par les neurones, mais les astrocytes sont également capables de la synthétiser. Contrairement à PAI-1, la NS inhibe préférentiellement le tPA même si cette inhibition par la plasmine est peu stable, le tPA peut ainsi se libérer et retrouver son activité ([Barker-Carlson et al., 2002](#)). De ce fait, la durée de vie moyenne des complexes tPA/NS ne dépasse pas une dizaine de minutes ([Miranda & Lomas, 2006](#)). La NS inhibe préférentiellement le tc-tPA, même si les complexes formés avec le sc-tPA sont beaucoup plus stables ([Hastings et al., 1997](#) ; [Barker-Carlson et al., 2002](#) ; [Yepes & Lawrence, 2004](#)).

1.5 Les fonctions du tPA

1.5.1 Fonction(s) du tPA vasculaire

1.5.1.1 La fibrinolyse

La fibrinolyse est un mécanisme enzymatique permettant la dissolution des caillots de fibrine qui peuvent se former dans la circulation. Ce processus, très important pour le maintien de l'homéostasie vasculaire, s'articule autour d'une enzyme endogène principale, la plasmine, qui est capable de dégrader les chaînes de fibrine. La plasmine est une sérine protéase sécrétée par le foie sous la forme d'une pro-enzyme inactive : le plasminogène (Collen & Lijnen, 1991 ; **Figure 27**).

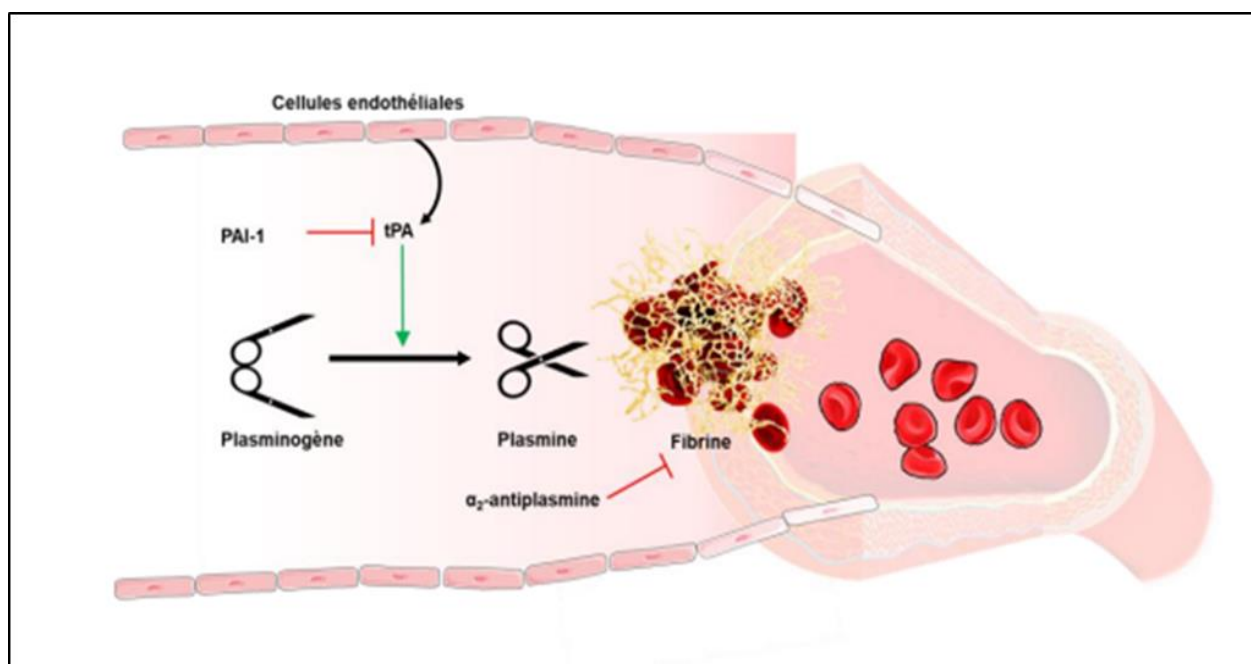


Figure 27 : Mécanisme d'action de la fibrinolyse endogène.

Le tPA est sécrété par les cellules endothéliales dans la circulation sanguine. Il est alors capable de convertir le plasminogène circulant en plasmine active à proximité des caillots de fibrine. La plasmine peut alors dégrader la fibrine et ainsi lyser les caillots. La régulation de la fibrinolyse s'effectue à deux niveaux : grâce à PAI-1 (inhibiteur du tPA) et à l'α₂-antiplasmine (inhibiteur de la plasmine).

Le tPA catalyse l'activation du plasminogène en plasmine. En absence de cofacteurs, le tPA n'est pas un très bon activateur du plasminogène. En revanche, en présence de fibrine, sa capacité à activer le plasminogène est multipliée par 100 (Hoylaerts et al., 1982). L'interaction entre le tPA et le plasminogène est facilitée quand leurs domaines respectifs de liaison à la fibrine sont proches. Ce complexe formé va permettre au tPA d'activer essentiellement le plasminogène présent au niveau du caillot de fibrine, tout en épargnant le tPA circulant (Medved & Nieuwenhuizen, 2003). Il permet également de placer la plasmine à l'abri de ses inhibiteurs (Chapin & Hajjar, 2015).

La fibrinolyse est régulée à deux niveaux pour éviter, d'une part une hyperfibrinolyse qui augmente le risque hémorragique, et d'autre part une altération de la BHE (Marcos-Contreras et al., 2016). Le premier niveau de régulation est l'inhibition de la plasmine par l' α 2-antiplasmine (Holmes et al., 1987), et le second est l'inactivation du tPA par PAI-1 (Figure 27).

Diverses formes recombinantes d'activateurs du plasminogène, notamment le ténecteplase et le rétéplase, ont été utilisées pour dégrader le(s) caillot(s) des patients atteints d'ischémie cérébrale ou d'infarctus du myocarde (Thiebaut et al., 2018 ; Figure 28). Ces variants ont été construits pour, par exemple, être moins sensibles aux inhibiteurs, avoir une plus longue demi-vie plasmatique ou encore avoir une spécificité plus forte pour la fibrine. Mais, à ce jour, aucun n'a montré de meilleure efficacité par rapport au tPA, qui reste la molécule de référence pour l'AVC ischémique (NINDS, 1995).

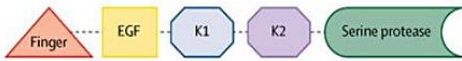
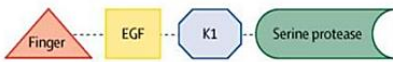
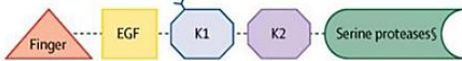
Plasminogen activator	Structure	Inhibitors	Route of administration	Half-life	FS*	SC†	TC‡
Eukaryotic forms							
tPA		PAI-1, PAI-2, protease Nexin-1, lysine analogues (TXA, EACA), C1-inhibitor	Bolus and infusion	3-4 min	++	+	+
uPA		PAI-1, PAI-2, amiloride, lysine analogues, C1-inhibitor	Bolus and infusion	7-20 min	-	+	+
Desmoteplase		Lysine analogues	Single bolus	4 hours	+++	-	+
Recombinant forms							
Tenecteplase		PAI-1, PAI-2, lysine analogues	Single bolus	20-24 min	+++	-	+
Reteplase		Lysine analogues	Double bolus	14-18 min	+	-	+

Figure 28 : Spécificité de divers activateurs du plasminogène (naturels ou de synthèse).

Illustration des principales différences structurales et pharmacocinétiques de divers activateurs du plasminogène (Thiebaut et al., 2018).

1.5.1.2 tPA et barrière hémato-encéphalique (BHE)

Comme dit précédemment, la BHE est l'une des barrières physiologiques aux portes du SNC. Elle se constitue d'une couche de cellules endothéliales des vaisseaux, reposant sur une membrane basale composée de laminine, de collagène de type IV et de fibronectine. On retrouve également des péricytes, enchâssés dans la membrane basale, qui vont assurer le maintien de l'intégrité et la fonctionnalité de cette barrière, notamment grâce à une communication privilégiée avec les cellules endothéliales (Abbott et al., 2006). Les capillaires sont entourés d'un manchon ininterrompu de pieds astrocytaires qui permettent un transport d'eau par l'expression d'aquaporines. La proximité de ces pieds astrocytaires avec les cellules endothéliales suggère l'existence d'interactions complexes entre ces différentes cellules qui permettent probablement la régulation de nombreuses fonctions (Figure 29).

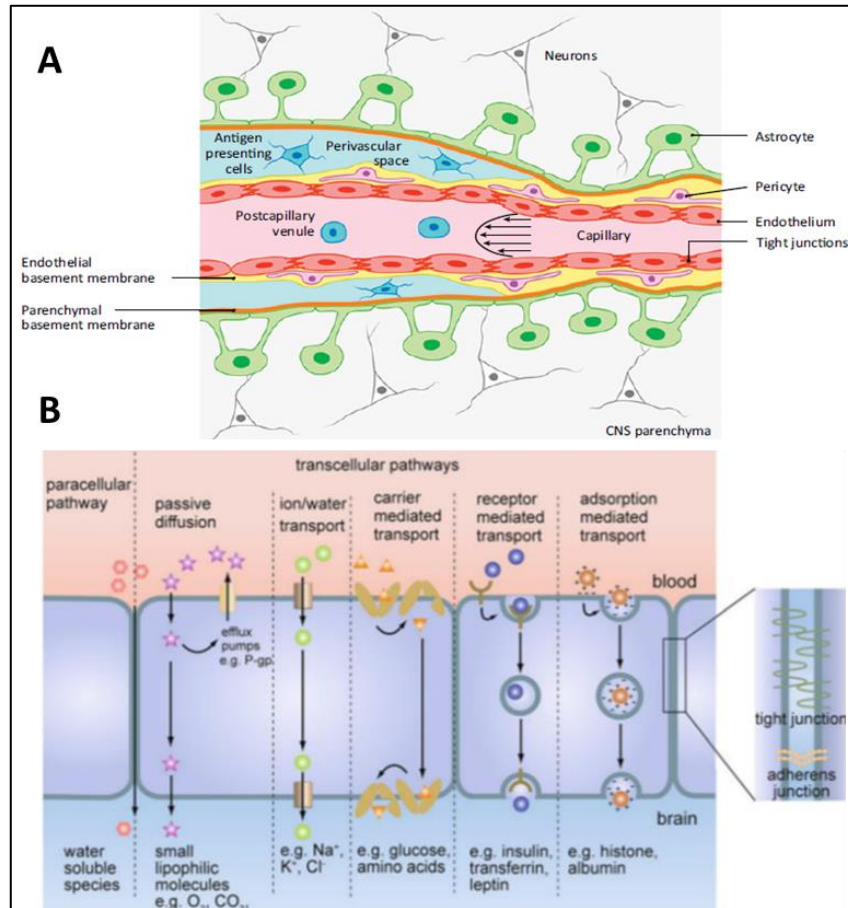


Figure 29 : La barrière hématoencéphalique.

La BHE est constituée par les cellules endothéliales reliées par des jonctions serrées, la lame basale, les péricytes et les astrocytes (A). Représentation schématique des différentes voies de transport moléculaire paracellulaire et transcellulaire possibles à travers la BHE (B) (adapté de : [Abbott et al., 2006](#) ; [Jamieson et al., 2017](#)).

Les cellules endothéliales des capillaires cérébraux n'ont pas de fenestration et sont unies par des jonctions étanches qui diminuent drastiquement le flux paracellulaire et transforment l'endothélium en une interface unique entre le sang et le parenchyme cérébrale (Figure 30). En effet, elles vont être liées par des jonctions serrées ([Simard et al., 2003](#)), ainsi que des jonctions adhérentes, faisant intervenir la cadhérine endothéliale vasculaire (VE-cadherin), protéine transmembranaire interagissant entre chaque cellule endothéliale ([Schulze & Firth, 1993](#)) et des jonctions serrées appelées également zonulae occludens ([Copin & Gasche, 2003](#)) donnant ce caractère imperméable à travers l'endothélium. Enfin, ces cellules expriment une variété

d'enzymes capables de dégrader les composés potentiellement neurotoxiques (Engelhardt & Sorokin, 2009).

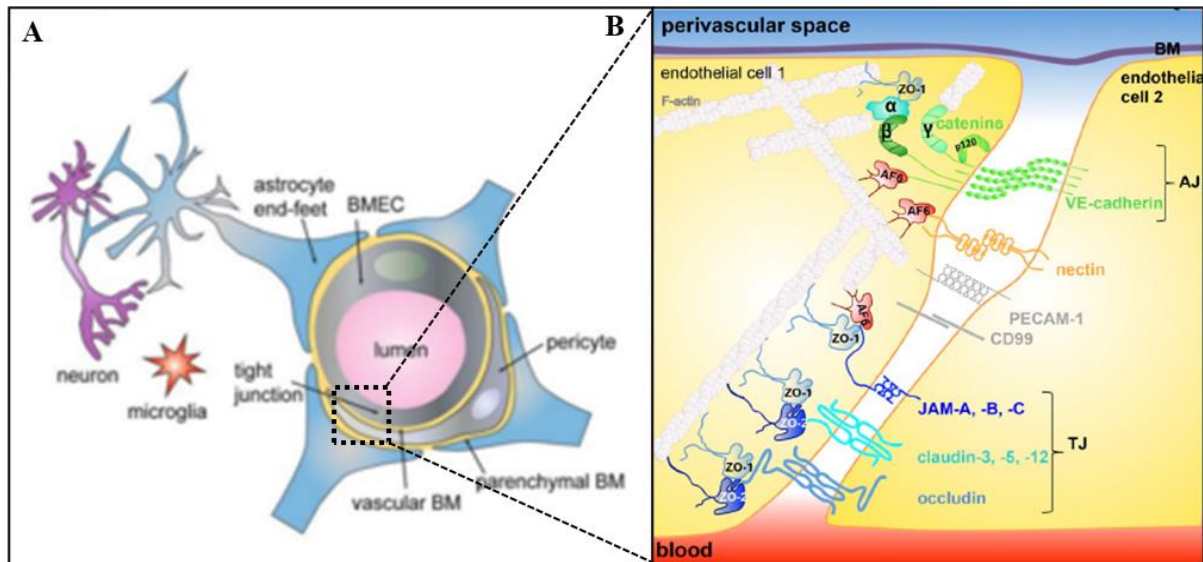


Figure 30 : Junctions entre les cellules endothéliales au niveau de la BHE.

(A) La BHE est constituée par les cellules endothéliales reliées par des jonctions serrées, la lame basale, les péricytes et les astrocytes. (B) Composition moléculaire des « *tight junctions* » et « *adherens junctions* » endothéliales (adapté de : Jamieson et al., 2017 ; Tietz & Engelhardt, 2015).

En condition physiologique, la BHE assure une filtration sélective vis-à-vis des facteurs circulant du système vasculaire. Ainsi, la très grande majorité des peptides et des protéines circulantes ne peuvent pas la traverser, seules les petites molécules capables de diffuser au travers des membranes comme l'oxygène, le dioxyde de carbone, et les molécules lipophiles peuvent diffuser librement. Néanmoins, de nombreux transporteurs impliqués dans l'efflux de médiateurs solubles sont exprimés et permettent l'apport contrôlé de nutriments aux cellules du SNC (Daneman, 2012). Le passage des molécules au travers de la BHE, s'effectue par 3 mécanismes de transport : la diffusion, le transport actif ou l'endocytose. La BHE possède également des transporteurs membranaires d'efflux qui assurent l'expulsion de molécules lipophiles du parenchyme vers le compartiment sanguin.

Il a été montré qu'en dehors de toute atteinte, le tPA vasculaire peut atteindre le parenchyme cérébral sans altérer l'intégrité de la BHE par un passage trans-endothélial polarisé, qui repose, comme la clairance hépatique, sur un membre de la famille des récepteurs des LDL, LRP1 ([Benchenane et al., 2005a](#) ; [Mehra et al., 2016](#) ; **Figure 31**).

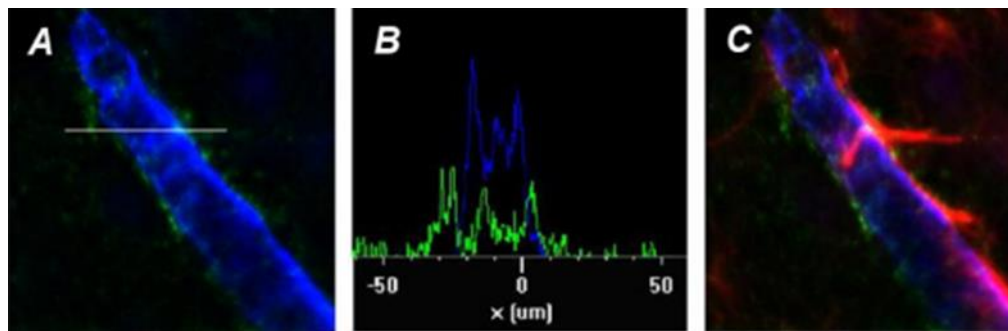


Figure 31 : Le tPA traverse la BHE intacte.

Du tPA biotinylé (vert) a été injectée par voie intraveineuse aux souris dans des conditions contrôles, 45 minutes après injection, le tPA est retrouvé dans les cellules parenchymateuses. (A) Immunomarquage contre le tPA biotinylé (vert) et le collagène IV (bleu) au niveau d'un capillaire, et intensité de fluorescence correspondants (B) de chaque pixel présent dans une ligne traversant ce capillaire (comme indiqué en A). (C) Immunomarcages contre le tPA biotinylé (vert), le collagène IV (bleu) et le GFAP (rouge) au niveau du capillaire (adapté de : [Benchenane et al., 2005a](#)).

En conditions pathologiques, le tPA augmente la perméabilisation de la BHE et aggrave les lésions neuronales dans un contexte excitotoxique/ischémique. ([Yepes et al., 2003](#) ; [Benchenane et al., 2005b](#) ; [López-Atalaya et al., 2007](#)). Ces données suggèrent que limiter l'entrée du tPA dans le parenchyme à travers la BHE serait une piste thérapeutique à exploiter en clinique. En faveur de cette hypothèse, Lopez-Atalaya et collaborateurs ont montré que l'homologue du tPA chez la chauve-souris, le desmoteplase, pouvait entrer en compétition avec le tPA pour le passage de la BHE par LRP1 et ainsi empêcher l'effet aggravateur du tPA sur une lésion excitotoxique chez le rat. L'interaction du tPA avec les LRP mène également au décrochage des pieds astrocytaires au niveau de la BHE engendrant des œdèmes périvasculaires ([Cheng et](#)

al., 2006 ; Polavarapu et al., 2007 ; **Figure 32**). En outre, *via* ses domaines sérine protéase et K2, le tPA est capable d'interagir et d'activer un facteur de croissance, le PDGF-CC, ce qui active les récepteurs α du facteur de croissance plaquettaire (*Platelet-Derived Growth Factor Receptor α* , PDGFR- α) situés sur les astrocytes et péricytes. L'action du tPA sur ces récepteurs entraîne elle aussi une perméabilisation de la BHE, augmentant ainsi le risque hémorragique (Su et al., 2008).

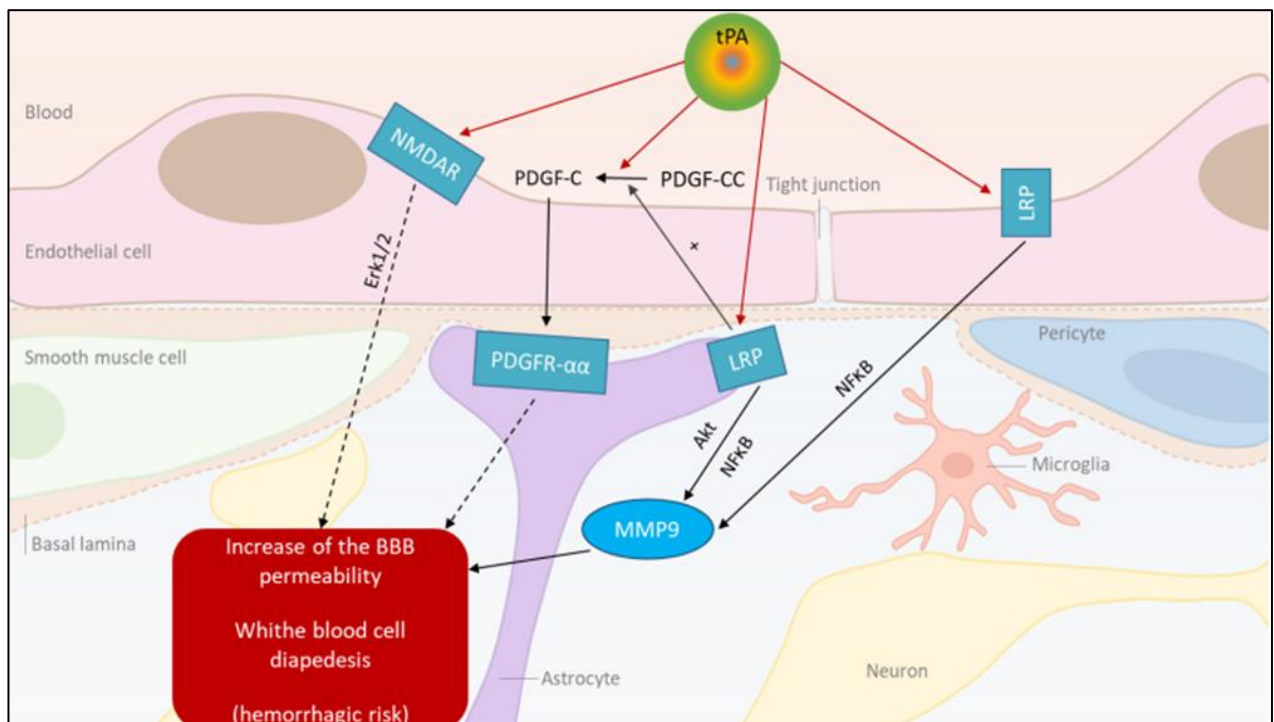


Figure 32 : Effet du tPA sur la BHE.

Le tPA interagit avec les LRP des astrocytes et des cellules endothéliales provoquant une augmentation de la production des MMP9 qui eux engendrent une altération de la BHE. De plus, l'activation du PDGF-CC par le tPA contribue au détachement des pieds astrocytaires de la lame basale *via* une interaction avec les récepteurs PDGFR- α . Cette activation est facilitée par l'interaction du tPA avec les récepteurs LRP à la surface des astrocytes (adapté de : [Abbott et al., 2006](#) ; [Mehra et al., 2016](#)).

De même, le tPA dégrade la BHE par l'activation de plusieurs métalloprotéinases matricielles, notamment MMP-9, 2 et 3 ([Lijnen, 2001](#)). Diverses études ont montré que cette perméabilisation de la BHE est en fait biphasique ([Yang & Rosenberg, 2011](#)). La première phase, qui apparaît quelques heures après la reperfusion, est réversible, transitoire et serait due à une augmentation de MMP-2. La seconde phase, plus tardive et importante, apparaît dans les 24 à 48 heures. Elle se caractérise par une infiltration leucocytaire et une activation des MMP-3 et 9, par des cytokines pro-inflammatoires (TNF, IL-1 β , etc). Ces MMPs activées participent à la dégradation de la matrice extracellulaire, fragiliser les jonctions serrées, altérer la lame basale des vaisseaux cérébraux ([Wang et al., 2003](#) ; [Suzuki et al., 2009](#)) et donc provoque une rupture irréversible de la BHE. D'ailleurs, chez des animaux déficients en MMP-9 ([Asahi et al., 2000](#)) ou en MMP-3 ([Suzuki et al., 2007](#)), la BHE n'est pas altérée après thrombolyse au tPA.

Cette perméabilisation entraîne l'apparition d'un œdème vasogénique ([Rosenberg & Yang, 2007](#)), et aboutit à des dommages tissulaires ([Berezowski et al., 2012](#)). Cet œdème augmente également les risques de transformation hémorragique et, de ce fait, pourrait contribuer à aggraver l'état des patients ([Hornig et al., 1993](#)). D'ailleurs, des études cliniques ont montré que chez l'Homme, le taux de MMP-9 sanguin est corrélé au risque de transformation hémorragique après thrombolyse ([Montaner et al., 2001](#)).

1.5.1.3 tPA et couplage neurovasculaire (CNV)

Le couplage neurovasculaire (CNV) est un mécanisme permettant d'optimiser l'apport sanguin de manière locale lors de l'activité neuronale ([Iadecola, 2017](#)). Il repose sur une relation très étroite entre plusieurs acteurs : les vaisseaux sanguins, les neurones et astrocytes. Le CNV serait induit par la libération de facteurs vasoactifs tels que le monoxyde d'azote (*nitric oxyde* ; NO) ou la prostaglandine de type 2 (PGL-2) suite à l'activation neuronale et permettrait d'adapter localement l'apport en substrats

énergétiques au niveau des régions cérébrales activées (Voir Résultats Partie 2 « **Contexte bibliographique de l'étude** »).

Il a été montré que le tPA pouvait se fixer sur les cellules endothéliales, suggérant ainsi un rôle du tPA dans le tonus vasculaire ([Barnathan et al., 1988](#)). En ce sens, chez le rat, l'injection intraveineuse de tPA diminue la réactivité vasculaire, ce qui pourrait contribuer aux effets délétères de la reperfusion post-ischémie ([Cipolla et al., 2000](#)).

Par la suite, Armstead et collaborateurs ont montré que le tPA induit une vasodilatation dépendante d'une libération de NO en condition physiologique ([Armstead et al., 2004](#)). Ces auteurs ont également rapporté une altération du CNV causée par le tPA après une ischémie ou un traumatisme crânien. Cette altération serait dépendante de l'interaction du tPA avec les récepteurs NMDA. Cette interaction active les voies Mitogen-Activated Protein Kinase (MAPK ; c-Jun N-terminal kinase (JNK) et ERK), conduisant à une dérégulation des canaux potassiques impliqués dans la dilatation des vaisseaux ([Armstead et al., 2016](#)).

Mais, le tPA pourrait également interagir avec les LRP et activer la voie MAPK p38, prévenant alors l'altération de l'autorégulation après l'ischémie ([Armstead et al., 2004, 2005](#)).

Une démonstration plus claire de la modulation du CNV par le tPA a été apportée par l'équipe de Iadecola, qui a mis en évidence un déficit de CNV lors de la stimulation des vibrisses chez des animaux déficients en tPA ([Park et al., 2008](#)). Ce déficit est compensé après application de tPA directement au niveau du cortex sensoriel. L'hypothèse de ces auteurs suggère qu'une interaction du tPA synaptique avec les récepteurs NMDA post-synaptiques stimulerait la production de NO par l'oxyde nitrique synthase neuronale et induirait la vasodilatation ([Park et al., 2008](#)).

Les derniers travaux de notre équipe ont, quant à eux, montré que l'hyperhémie fonctionnelle en réponse à la stimulation des vibrisses chez la souris est modulée par l'interaction du tPA circulant avec les récepteurs NMDA endothéliaux. Ainsi, l'injection intraveineuse de tPA induit une restauration de l'hyperhémie fonctionnelle chez des souris déficientes en tPA ([Anfray et al., 2020](#) ; **Figure 33**).

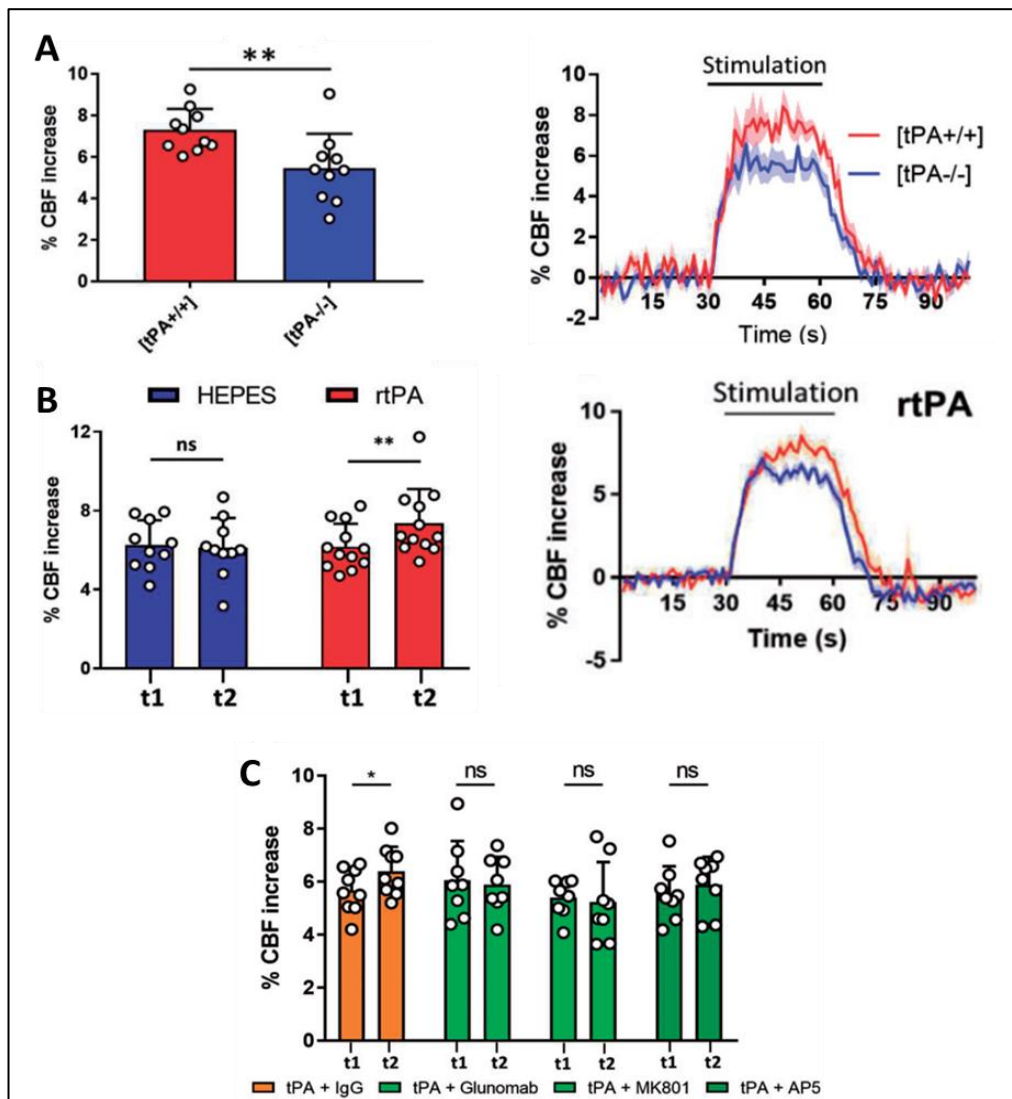


Figure 33 : Effet du tPA vasculaire sur le couplage neurovasculaire.

(A) L'augmentation du DSC induite par la stimulation des vibrisses est réduite chez des souris déficientes en tPA (B) L'injection intraveineuse de r-tPA permet de restaurer ce déficit de la réponse hémodynamique chez les souris tPA KO. (C) L'effet vasodilatateur du tPA lors du CNV peut être inhibé *via* l'injection intraveineuse d'inhibiteurs des récepteurs NMDA chez les souris tPA KO. Ici, t1 représente la mesure du DSC avant et t2 après l'injection des produits pharmacologiques (adapté de : [Anfray et al., 2020](#)).

1.5.2 Fonction(s) du tPA parenchymateux

En parallèle de ses fonctions vasculaires, le tPA intervient dans le contrôle et la régulation de nombreuses fonctions physiopathologiques au niveau du parenchyme cérébral. Comme nous l'avons détaillé précédemment, le tPA est synthétisé par différents types cellulaires du SNC et il est retrouvé dans de nombreuses régions cérébrales.

1.5.2.1 Le tPA comme neuromodulateur

Dans le SNC, le glutamate est le principal neurotransmetteur exciteur ; il agit sur deux types de récepteurs : métabotropiques ou ionotropiques. Les récepteurs ionotropiques sont responsables de la transmission excitatrice rapide, alors que les récepteurs métabotropiques en sont plutôt des modulateurs. Il existe trois types récepteurs ionotropes : les récepteurs NMDA, kaïnate et AMPA (α amino-3-hydroxy-5-méthylisoazol-4-propionate).

Lors de l'activité neuronale, la dépolarisation des neurones glutamatergiques provoque l'exocytose du glutamate dans la fente synaptique mais aussi une exocytose de tPA, lui aussi contenu dans des vésicules synaptiques (Gualandris et al., 1996). Dans la synapse, le tPA peut agir comme un neuromodulateur glutamatergique, selon un mécanisme particulier : il clive l'extrémité N-terminale de la sous-unité GluN1 des récepteurs NMDA, dont il potentialise ainsi l'activité en augmentant l'influx calcique à travers le canal (Nicole et al., 2001 ; Fernández-Monreal et al., 2004 ; **Figure 34**). Plus précisément, l'interaction entre tPA et le récepteur NMDA s'effectue au niveau des domaines K2 et catalytique du tPA et le domaine N-terminal (au niveau de l'arginine260) pour la sous-unité GluN1 du récepteur NMDA, formant un complexe ternaire (Lopez-Atalaya et al., 2008).

Il est à noter que ce mécanisme neuromodulateur pourrait être préférentiel des récepteurs NMDA contenant la sous-unité GluN2D ([Baron et al., 2010](#)) et que seul le sc-tPA peut induire ce clivage ([Parcq et al., 2012](#)).

L'interaction du tPA avec les récepteurs NMDA est impliquée dans des processus physiologiques comme la mémoire ou l'apprentissage ([Benchenane et al., 2007](#) ; [Obiang et al., 2012](#)), mais aussi pathologiques comme l'excitotoxicité ou l'épilepsie ([Qian et al., 1993](#) ; [Nicole et al., 2001](#) ; [Parcq et al., 2012](#) ; [Bertrand et al., 2015](#)).

Au niveau de la synapse, le tPA a également un rôle de gliotransmetteur. En effet, les astrocytes qui libèrent un certain nombre de gliotransmetteurs ([Bender & Norenberg, 2000](#) ; [Mothet et al., 2005](#)) jouent un rôle dans la régulation des taux de tPA extracellulaire. Ils sont capables de recapter rapidement le tPA issu des neurones par une endocytose constitutive médiée par le LRP, puis de le libérer par exocytose de manière régulée dans la synapse ([Cassé et al., 2012](#)). De même, le glutamate extracellulaire inhibe la libération de tPA par les astrocytes, cette action inhibitrice du glutamate est médiée par la signalisation de la protéine kinase C (PKC) induite par le récepteur kaïnate ([Cassé et al., 2012](#)).

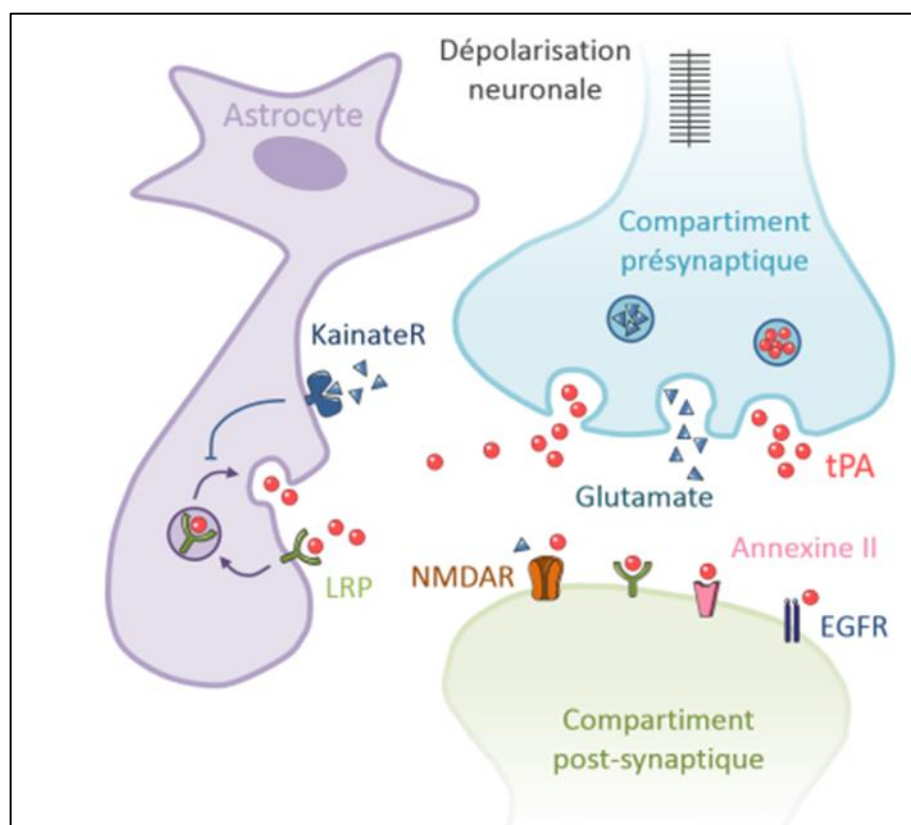


Figure 34 : Le tPA est un neuromodulateur.

Suite à une dépolarisation neuronale, le tPA contenu dans des vésicules synaptiques est libéré dans la fente synaptique pour aller interagir avec les récepteurs post-synaptiques. L'excès de tPA à la synapse est recapté par les astrocytes *via* les LRP (adapté de : Hébert et al., 2016).

1.5.2.2 tPA, développement cérébral et migration cellulaire

Le développement cérébral résulte d'un enchaînement complexe d'événements, incluant une prolifération cellulaire, une différenciation, une migration, puis la mise en place de connexions et d'interactions entre les différents types cellulaires (Gupta et al., 2002 ; Nadarajah et al., 2003 ; Van den Aamele et al., 2014). Ces différentes phases nécessitent le plus souvent la dégradation de la matrice extracellulaire (MEC ; Lu et al., 2011). Pour cela, les cellules sécrètent des métalloprotéases telles que les MMPs ou les désintégrines et des métalloprotéinases à motif thrombospondines (*a disintegrin and metalloproteinase with thrombospondin motifs*, ADAMTS), mais aussi des sérines protéases telles que le tPA. Des souris déficientes en tPA présentent une migration

neuronale retardée, mise en évidence par une accumulation des cellules granulaires au sein de la couche moléculaire du cervelet ([Seeds et al., 1999](#)).

Dans le SNC en développement, le tPA est fortement exprimé dans les zones de migration neuronale et de remodelage tissulaire. Ces résultats suggèrent que le tPA est impliqué dans la migration cellulaire et donc dans le remodelage tissulaire du SNC lors du développement, en jouant un rôle dans la dégradation de la MEC ([Fredriksson et al., 2004](#)).

Plus récemment, des travaux du laboratoire ont démontré que le tPA est impliqué dans la migration des progéniteurs d'oligodendrocytes au cours du développement. Cet effet implique une activation des récepteurs à l'EGF présents sur les progéniteurs d'oligodendrocytes ([Leonetti et al., 2017](#)). Une seconde étude du laboratoire a montré le rôle du tPA dans la migration des neurones corticaux. En effet, le tPA interagit, *via* son domaine K2, avec les récepteurs NMDA des cellules de la glie radiaire et l'inhibition de cette interaction entraîne un retard de migration des neurones vers les couches corticales engendrant des déficits fonctionnels ([Pasquet et al., 2019](#) ; **Figure 35**).

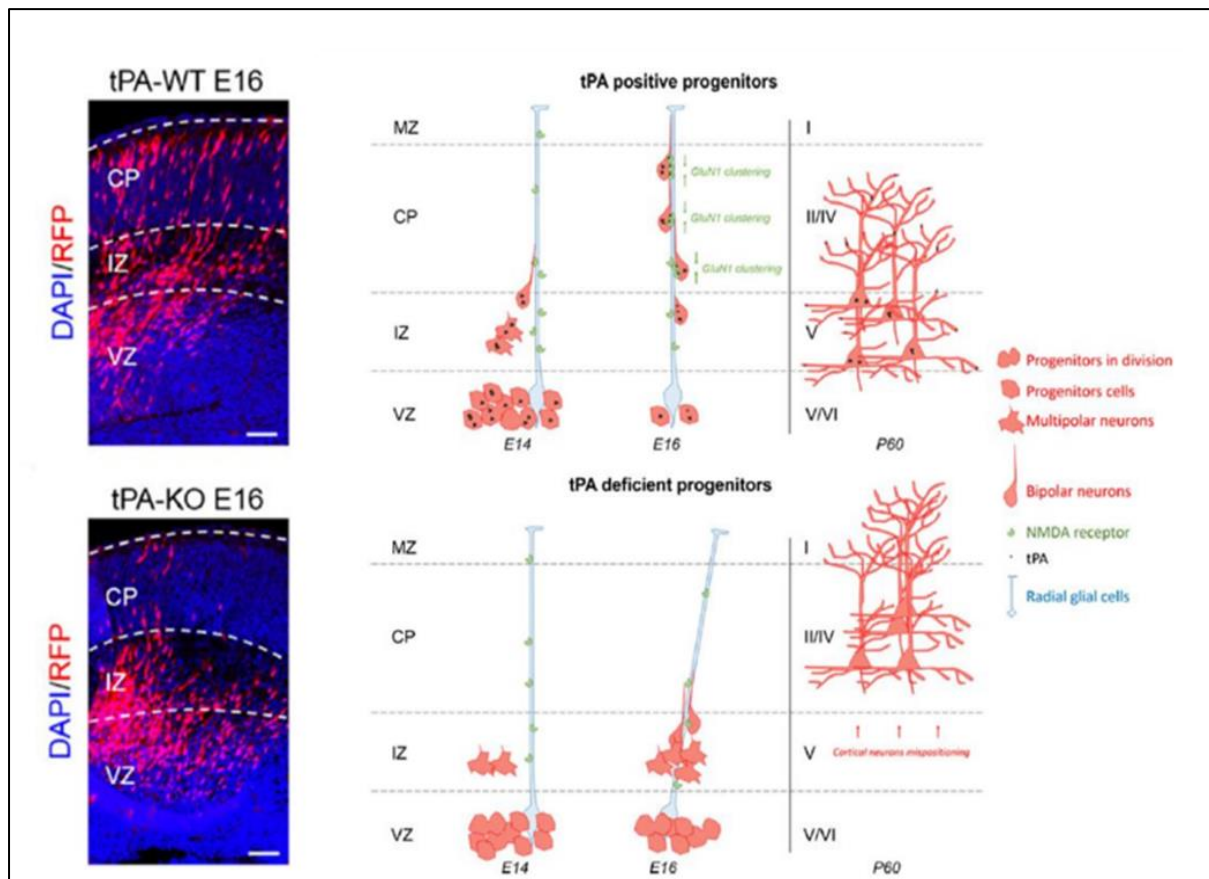


Figure 35 : Effet de l'absence du tPA sur la migration neuronale.

A gauche, la distribution des neurones marqués au RFP (*Red Fluorescent Protein*) dans le cortex chez des souris tPA WT et KO à E16. A droite, une représentation schématique de la corticogenèse. Le tPA libéré par les progéniteurs neuronaux favorise la maturation des cellules de la glie radiaire par l'activation des récepteurs NMDA présents à leur surface. L'absence de tPA affecte l'orientation de la glie radiaire sans impacter la fixation des pieds sur la surface piaie. Pour résumer, l'absence de tPA à E14 retarde la migration neuronale à E16, il en découle une altération de la stratification des couches corticales II, IV et V chez l'adulte (adapté de : [Pasquet et al., 2019](#)).

De même, plusieurs études ont ciblé le rôle du tPA et ses inhibiteurs sur la pousse neuritique. Le tPA est sécrété au niveau des cônes de croissance ([Verrall & Seeds, 1989](#)) et favorise la dégradation de la MEC, *via* l'activation du plasminogène et des MMP, facilitant la progression du cône de croissance ([García-Rocha et al., 1994](#) ; [Lochner et al., 1998](#)). En effet, l'absence ou l'inhibition de l'activité du tPA provoque un blocage de la croissance axonale dans des cultures de neurones ([Pittman et al., 1989](#) ; [Baranes](#)

et al., 1998), alors que l'ajout ou la surexpression de tPA augmente la pousse neuritique (Pittman & DiBenedetto, 1995 ; Baranes et al., 1998 ; Lee et al., 2007) .

Comme énoncé précédemment, le tPA serait impliqué dans la migration des précurseurs oligodendrocytaires au cours du développement et durant la remyélinisation suite à une lésion de la substance blanche (Leonetti et al., 2017). De plus, le tPA a un effet anti-apoptotique sur les neurones (Liot et al., 2006) et sur les oligodendrocytes (Correa et al., 2011).

1.5.2.3 tPA et plasticité synaptique

Une des fonctions de notre cerveau est de trier et enregistrer des informations. Ce phénomène qui n'est autre que la mémoire se traduit par une augmentation importante et durable de l'efficacité synaptique au niveau cérébral.

En condition physiologique, le tPA est fortement exprimé dans des régions cérébrales comme l'hippocampe ou l'amygdale (Teesalu et al., 2004), ayant un rôle majeur dans les processus d'apprentissage et de mémoire. Un mécanisme moléculaire décrit comme support de ces deux fonctions est la potentialisation à long terme (*Long Term Potentiation*, ou LTP). Ce mécanisme consiste en un renforcement de l'efficacité synaptique après une stimulation excitatrice répétée (Nabavi et al., 2015). Ce phénomène initialement découvert en 1973 chez le lapin (Bliss & Lømo, 1973), a été observé dans d'autres régions du cerveau comme le cortex moteur (Iriki et al., 1989), l'amygdale et le striatum (Uno & Ozawa, 1991).

Il a été rapidement mis en évidence un rôle central du système glutamatergique dans ce mécanisme, impliquant les récepteurs AMPA (Morishita et al., 2005) et les récepteurs NMDA (Collingridge et al., 1983). Une stimulation à haute fréquence induit la libération de glutamate en grande quantité dans la fente synaptique. Le glutamate va d'abord activer les récepteurs AMPA, induisant une dépolarisation du neurone

post-synaptique et provoquant l'expulsion des ions magnésiums bloquant les récepteurs NMDA. Puis, dans un second temps, le glutamate peut activer les récepteurs NMDA et permettre l'entrée du Ca^{2+} dans le neurone post-synaptique. Cette entrée de Ca^{2+} induit un ensemble de cascades moléculaires responsables du renforcement synaptique (Malenka & Bear, 2004 ; Figure 36).

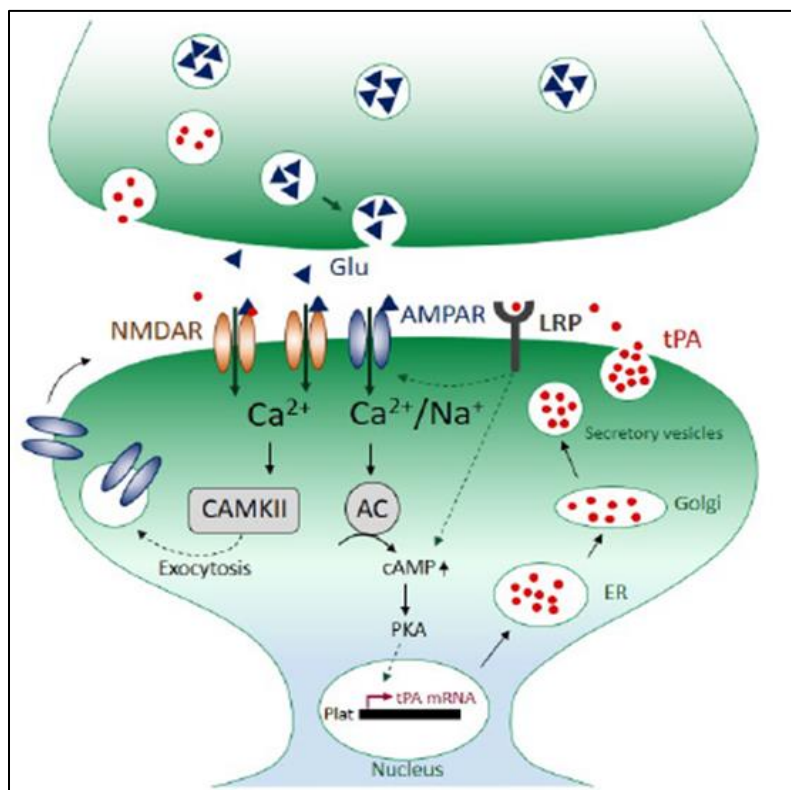


Figure 36 : Mécanisme impliquant le tPA dans les processus de LTP.

Lors de l'induction de la LTP, la fixation du glutamate (Glu) sur les récepteurs AMPA et NMDA induit l'entrée de sodium (Na^+) et de calcium (Ca^{2+}) et permet la dépolarisation postsynaptique. L'entrée de Ca^{2+} induit l'activation de la CAMKII et conduit à l'exocytose des récepteurs AMPA tandis que l'activation de l'adénylate cyclase (AC) augmente la signalisation de la voie l'AMPc/PKA et stimule la synthèse de tPA et sa libération post-synaptique. Le tPA sécrété dans la fente synaptique va alors pouvoir interagir avec les récepteurs LRP et stimuler des voies intracellulaires impliquées dans la potentialisation synaptique. Le tPA sécrété au niveau pré et post-synaptique peut également potentialiser directement l'entrée de Ca^{2+} en se fixant au récepteur NMDA (adapté de Zhuo et al., 2000 ; Samson & Medcalf, 2006 ; Citri & Malenka 2008).

En 1993, Qian et ses collaborateurs ont démontré que le tPA participait à la LTP. De fait, une activation des neurones hippocampiques, conduit à une augmentation rapide des ARNm codant le tPA (Qian et al., 1993 ; **Figure 37**). Une augmentation similaire a été reportée dans les neurones de Purkinje, dans le cervelet de rats soumis à un apprentissage de tâches motrices (Seeds et al., 1995). Des études *in vitro* ont également montré que l'ajout d'inhibiteurs du tPA (PAI-1 ou tPA-stop) interférait avec la phase tardive de la LTP alors que l'ajout de tPA potentialisait ce processus (Baranes et al., 1998). Les mêmes résultats ont été retrouvés chez des souris génétiquement modifiées : la surexpression *in vivo* du tPA augmente la LTP et améliore les processus d'apprentissage et de mémorisation (Madani et al., 1999); à l'inverse, les souris dépourvues en tPA présentent un déficit d'apprentissage, déficit reversé par l'infusion de tPA dans l'hippocampe (Pawlak et al., 2002). Des travaux du laboratoire ont mis en évidence le fait que les effets du tPA sur la LTP seraient plutôt médiés par le sc-tPA que par le tc-tPA (Parcq et al., 2012). L'ensemble de ces études montrent une modulation de la LTP par le tPA, ainsi que sur les fonctions d'apprentissage et de mémoire (Baranes et al., 1998 ; Lochner et al., 2006).

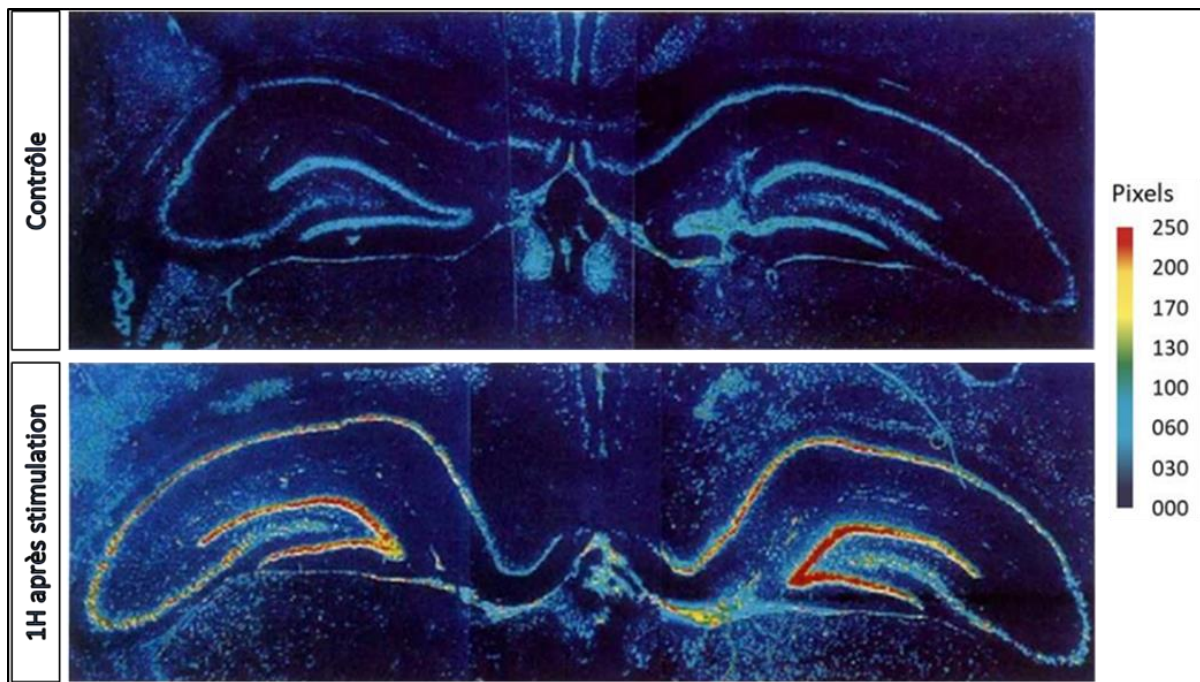


Figure 37 : Elévation de la quantité d'ARN messager du tPA suite à une activation neuronale chez le rat.

Hybridation *in situ* des ARNm du tPA dans l'hippocampe de rat en conditions normales et 1 heure après stimulation électrique du gyrus denté (adapté de : [Qian et al., 1993](#)).

En plus de son interaction avec les récepteurs NMDA, le tPA pourrait agir sur la LTP à travers les mécanismes suivants :

- Par son interaction avec les récepteurs LRP, ce qui pourrait faciliter la pousse neuritique et la formation de nouvelles synapses ([Lee et al., 2014](#) ; [Zhuo et al., 2000](#)).
- Par la dégradation de la MEC, ce qui faciliterait la création de nouvelles synapses ([Baranes et al., 1998](#)).
- Par sa capacité à activer le facteur neurotrophique issu du cerveau (*Brain derived neurotrophic factor*, ou BDNF) essentiel à la LTP ([Pang et al., 2004](#)).
- Par sa capacité à cliver la rééline, une protéine importante dans la régulation des fonctions synaptiques ([Trotter et al., 2013](#)).

1.5.2.4 tPA et comportement

Comme nous venons de le voir, le tPA est très présent dans l'hippocampe et il est impliqué dans la plasticité synaptique. De même, il est impliqué dans plusieurs types de comportements impliquant la mémoire (Calabresi et al., 2000). Plusieurs études ont montré que le tPA était nécessaire dans l'apprentissage et la mémoire spatiale (Calabresi et al., 2000 ; Benchenane et al., 2007 ; Oh et al., 2014). Divers travaux du laboratoire ont permis de mettre en évidence que l'interaction entre le tPA et le récepteur NMDA est nécessaire pour promouvoir l'apprentissage spatial dans l'hippocampe et le cortex entorhinal (Benchenane et al., 2007 ; Obiang et al., 2012 ; Hébert et al., 2016)

L'amygdale est connue pour jouer un rôle clé dans l'anxiété, la réponse au stress et la peur. Le tPA, qui est également exprimé dans l'amygdale et dans le noyau de la strie terminale, est impliqué dans le développement de l'anxiété à la suite d'un stress, en favorisant le remodelage synaptique (Pawlak et al., 2003 ; **Figure 38**) et en favorisant l'effet du facteur de libération de corticotrophines (*corticotropin-releasing factor*, CRF), un modulateur majeur du stress (Matys et al., 2004).

D'autres études ont rapporté que des souris déficientes en tPA avaient un comportement moins anxieux que leurs congénères sauvages (Pawlak et al., 2003 ; Matys et al., 2004 ; Matys et al., 2005). De plus, des souris déficientes en neuroserpine, ont un comportement plus anxieux que les souris sauvages (Madani et al., 2003). Cependant, une étude récemment menée au laboratoire montre que sur un score composite de dépression chez la souris, il n'y a pas de différence entre les souris déficientes en tPA et les souris non déficientes, alors que des souris déficientes en PAI-1 présentent, elles un phénotype de type dépressif (Party et al., 2019).

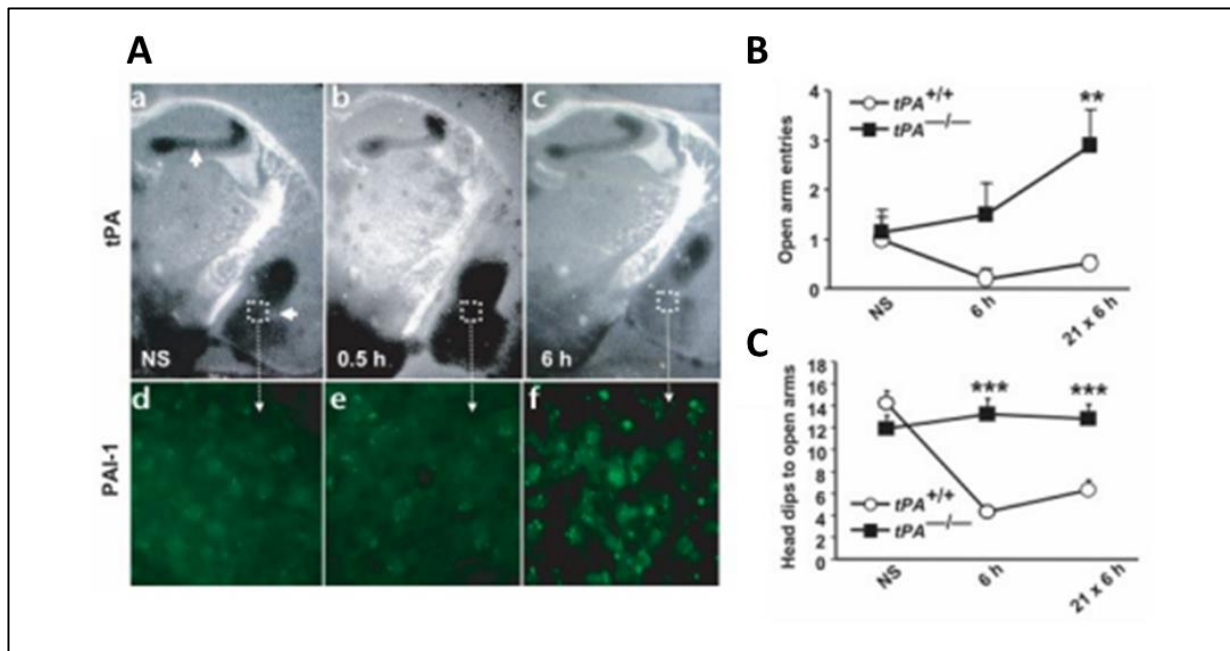


Figure 38 : Le tPA exprimé au niveau de l'amygdale module les réponses anxieuses induites par un stress.

(A) Un stress par contention augmente l'activité protéolytique du tPA au niveau de l'amygdale centrale et médiale à différents temps (a, b c). La diminution de l'activité du tPA au niveau de l'amygdale médiale 6 heures après l'induction d'un stress est corrélée à une augmentation de l'expression de PAI-1. (B-C) L'anxiété, mesurée à l'aide du labyrinthe en croix surélevé est similaire entre les souris tPA WT et KO en condition basale. Un stress de contention augmente les réponses anxieuses chez les souris WT (diminution de l'exploration des bras ouverts) mais pas chez les souris tPA KO (adapté de : Pawlak et al., 2003).

1.5.2.5 tPA et apoptose

Le tPA pourrait jouer un rôle dans l'apoptose des neurones et des oligodendrocytes, mais les résultats des études sont discordants. En 2000, par exemple, il a été montré *in vitro* que la microglie activée était capable de sécréter du tPA et que ce tPA était pro-apoptotique pour les neurones hippocampiques (Flavin et al., 2000). Puis en 2004, un effet pro-apoptotique du tPA a été montré sur des cellules endothéliales humaines et sur des neurones corticaux de souris (Liu et al., 2004).

A l'inverse, d'autres études reportent un effet anti-apoptotique du tPA. Liot et collaborateurs, au sein du laboratoire ont reporté en 2006 que le tPA protégeait des cultures de neurones corticaux contre l'apoptose par sevrage en sérum. Cet effet passe par une réduction de l'activité de la caspase 3, acteur majeur de la cascade apoptotique, et est indépendant de l'activité protéolytique du tPA (Liot et al., 2006 ; Figure 39).

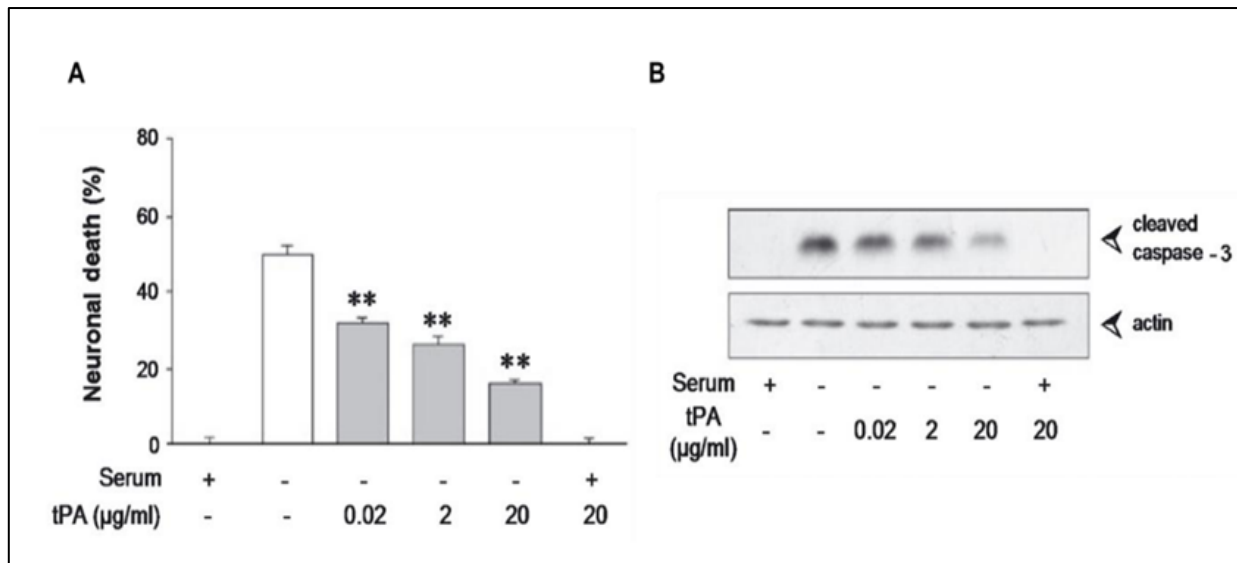


Figure 39 : Le tPA protège les neurones de l'apoptose.

(A) Quantification de la mort neuronale apoptotique après 24 heures de sevrage en sérum. La mort neuronale diminue avec la quantité de tPA. (B) Western Blot montrant que le tPA induit une diminution dépendante de la dose du clivage de la caspase 3 (adapté de : Liot et al., 2006).

Cet effet impliquerait plutôt l'axe phosphoinositide 3-kinase/Akt (PI3K), AMPK (*activated protein kinase*) ou mTor-HIF-1 α (*mammalian target of rapamycin - Hypoxia-inducible factor 1alpha*) afin de protéger les oligodendrocytes de l'apoptose (Correa et al., 2011 ; Wu et al., 2013). Les récepteurs à l'origine de l'activation de ces voies ne sont pas encore clairement identifiés, mais il semblerait que les récepteurs à l'annexine II (Siao & Tsirka, 2002 ; Lee et al., 2007) et/ou les récepteurs à l'EGF (Correa et al., 2011 ; Bertrand et al., 2015 ; Lemarchand et al., 2016), et/ou les récepteurs NMDA contenant la sous-unité GluN2A (Echeverry et al., 2010) puissent y participer.

Le tPA est aussi capable de cliver le plasminogène en plasmine, qui va à son tour cliver le pro-BDNF en BDNF mature, ainsi que le facteur de croissance nerveuse (*Nerve growth factor*, NGF) ce qui engendre une activation du récepteur Kinase à la tropomyosine B (*Tropomyosin receptor kinase B*, Trk-B) et une diminution de l'apoptose (Head et al., 2009).

1.5.2.6 tPA et substance blanche

Après une lésion de la moelle épinière, l'expression du tPA augmente, et participerait aux processus de remyélinisation et de régénérescence axonale. De fait, en condition inflammatoire (dans le cas de la sclérose en plaques par exemple), des dépôts de fibrine se forment au niveau des lésions, aggravant la réponse inflammatoire, et accentuant la dégénération axonale. Le tPA, par son action pro-fibrinolytique, est capable de réduire les dépôts de fibrine et donc les dommages axonaux (Akassoglou et al., 2000 ; Gveric et al., 2001 ; Gverić et al., 2003 ; **Figure 40**). Au contraire, une étude de Minor et collaborateurs a montré que ce mécanisme de régénération axonale par le tPA est indépendant de sa capacité à cliver le plasminogène (Minor et al., 2009).

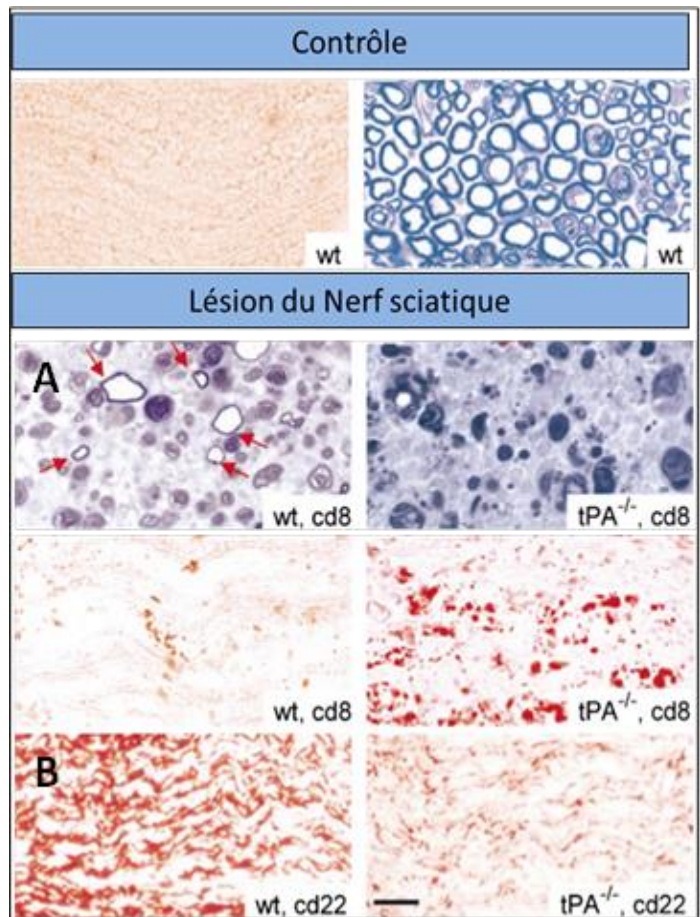


Figure 40 : Le tPA est impliqué dans les processus de remyélinisation et de régénérescence axonale.

(A) Des coupes de moelle épinière de souris avec coloration, montrent que des souris déficientes en tPA ($tPA^{-/-}$) présentent une dégénérescence axonale plus importante que des souris sauvages (wt), 8 jours après lésion du nerf sciatique (cd8) en coloration au bleu de toluidine. (B) Ces mêmes souris déficientes en tPA présentent moins d'axones myélinisés que des souris sauvages, 22 jours après la lésion du nerf sciatique (cd22) avec coloration au Oil Red O, un marqueur de la myéline (adapté de : [Akassoglou et al., 2000](#)).

De même, le tPA serait impliqué dans la dégradation des Chondroïtine Sulphate Protéoglycanes (CSPGs), des protéines de la MEC ayant un effet inhibiteur sur la repousse axonale ([Bukhari et al., 2011](#)).

Une étude du laboratoire a mis en lumière la capacité du tPA à activer ADAMTS-4, une protéase capable de dégrader les CSPGs, et ainsi d'améliorer la repousse axonale ainsi que la récupération fonctionnelle à la suite d'un traumatisme médullaire ([Lemarchant et al., 2014](#)). En condition physiologique, l'expression d'ADAMTS-4 par les oligodendrocytes contribue également au processus de myélinisation ([Pruvost et al., 2017](#)). Enfin, le tPA promeut la migration et la survie des oligodendrocytes en cas de lésion de la substance blanche, *via* son domaine EGF ([Correa et al., 2011](#) ; [Leonetti et al., 2017](#)).

1.5.2.7 Le tPA dans la potentialisation de l'excitotoxicité

Nous avons décrit précédemment le fait que l'excès de glutamate extracellulaire entraîne une mort dite excitotoxique, conséquence d'une suractivation des récepteurs NMDA, se traduisant par une entrée massive de Ca^{2+} dans le neurone. De plus, le tPA étant capable de cliver l'extrémité N-terminale de la sous-unité GluN1 des récepteurs NMDA, potentialise l'entrée de Ca^{2+} dans les neurones, participant aux effets sur la plasticité synaptique en condition physiologique.

Néanmoins, dans un cadre pathologique, ce mécanisme renforce les effets pro-excitotoxiques du glutamate et contribue à l'aggravation des lésions (Nicole et al., 2001). Les premières démonstrations d'un rôle délétère du tPA (dans la neurotoxicité) ont été apportées en 1995, où les auteurs ont montré que des souris déficientes en tPA sont protégées contre la neurotoxicité induite par l'injection intra-hippocampique d'un agoniste glutamatergique : le kaïnate (Tsirka et al., 1995 ; Figure 41).

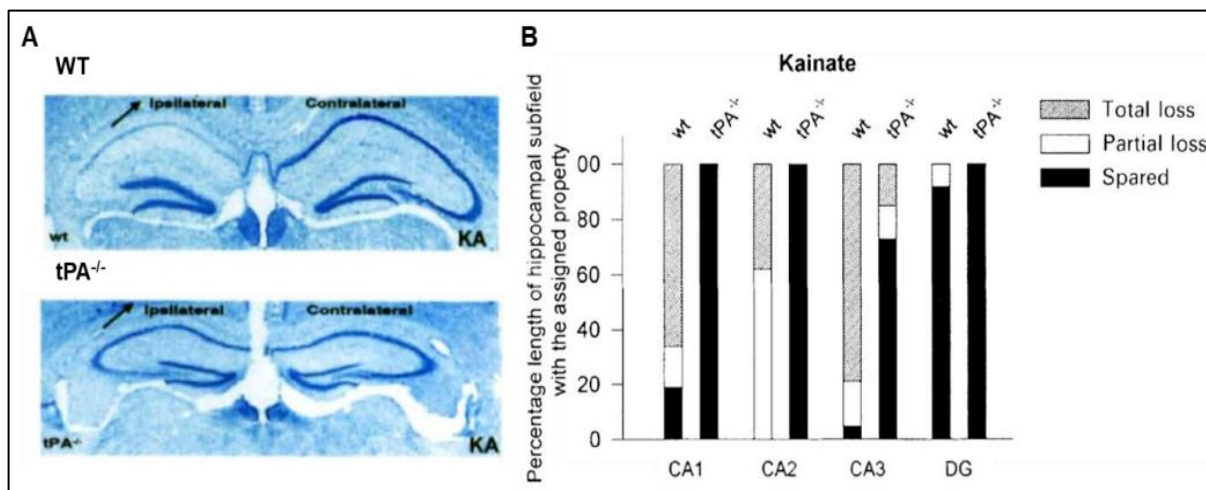


Figure 41 : Le tPA potentialise la mort neuronale excitotoxique dans l'hippocampe.

(A) Injection d'un agoniste du glutamate (kaïnate) dans l'hippocampe chez des souris tPA KO n'entraîne pas de mort neuronale contrairement aux souris WT. (B) Mesure de la longueur d'hippocampe présentant une perte neuronale totale, partielle, ou non affectée. Les souris déficientes en tPA présentent une perte neuronale nettement réduite comparées aux souris WT (adapté de : Tsirka et al., 1995).

La confirmation de ces données a été faite en 1998 dans un modèle d'ischémie cérébrale par l'occlusion intraluminale de l'artère cérébrale moyenne (ACM) : des souris déficientes en tPA ont un volume de lésion inférieur à celui de souris sauvages. Il a également été montré que l'injection de tPA dans la circulation provoquait une augmentation du volume de lésion ([Wang et al., 1998](#)).

Dans le cas d'une ischémie cérébrale induite par un thrombus, bien que le tPA ait des effets bénéfiques concernant la lyse du thrombus et la restauration de la circulation sanguine grâce à son activité fibrinolytique, il exerce des effets délétères en potentialisant la mort neuronale de type excitotoxique. Chez des souris tPA ou PAI-1 KO, une déficience en tPA *via* une inactivation de son gène induit une diminution de la taille de l'infarctus, *a contrario* une augmentation de l'activité du tPA (*via* une inactivation du gène PAI-1) augmente la taille de la lésion ([Nagai et al., 1999](#)). Ces résultats montrent bien que le tPA peut avoir des effets opposés dans le cadre spécifique d'une ischémie cérébrale : bénéfique lorsqu'il est dans le compartiment vasculaire par son rôle dans la fibrinolyse, mais également délétère lorsqu'il est dans le parenchyme cérébral, puisqu'il va promouvoir l'excitotoxicité et la mort neuronale.

Notons que plusieurs hypothèses mécanistiques ont été proposées pour expliquer l'effet pro-excitotoxique du tPA :

- Sa capacité à activer le plasminogène en plasmine ([Tsirka et al., 1997](#))
- Sa capacité à activer la microglie ([Rogove & Tsirka, 1998](#)).
- Sa capacité à cliver la sous-unité GluN1 des récepteurs NMDA et à potentialiser l'entrée de Ca^{2+} dans les neurones ([Nicole et al., 2001](#) ; [Parcq et al., 2012](#)).
- Sa capacité à se lier aux LRP, comme co-récepteur de l'effet potentialisateur de l'activité des récepteurs NMDA ([Samson et al., 2008](#)).

Un des objectifs du laboratoire est de développer des stratégies afin d'empêcher l'effet pro-excitotoxique du tPA tout en conservant son effet fibrinolytique. L'une d'elle est le développement d'un anticorps dirigé contre le domaine N-terminal de la sous-unité GluN1 : le *Glunomab*®, qui bloque la fixation du tPA sur cette sous-unité, limitant les effets délétères du tPA (Macrez et al., 2011 ; Seillier et al., 2022 ; Figure 42). Une seconde est la mise au point d'un tPA mutant dans lequel le domaine K2 a été modifié, plus précisément au niveau du site de liaison à la lysine (LBS). Ce mutant ne pouvant pas interagir avec les récepteurs NMDA, cela réduit l'effet excitotoxique du tPA (Goulay et al., 2018 ; Parcq et al., 2013 ; Figure 42). Ces deux stratégies sont actuellement en développement par deux startups.

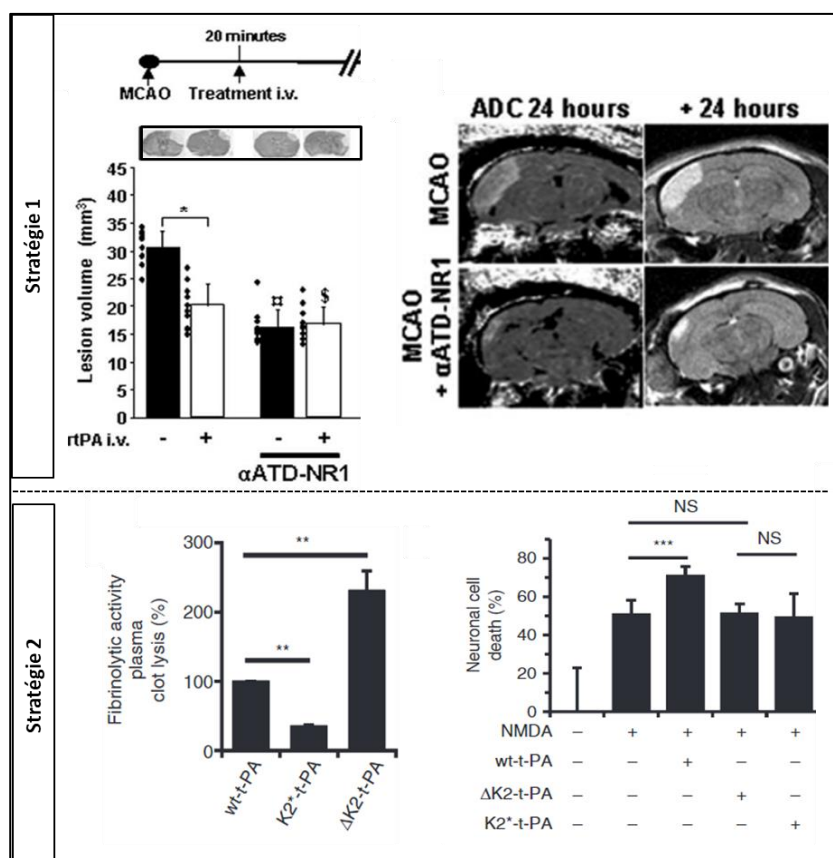


Figure 42 : Contrecarrer l'effet pro-excitotoxique du tPA en conservant son effet fibrinolytique.

(A) Des souris soumises à une ischémie cérébrale avec co-injection de r-tPA et de *Glunomab*®, présentent un volume de lésion à 24 heures moins important que des souris ayant reçu du r-tPA seul. (B) Le tPA mutant pour son domaine K2, conserve son activité fibrinolytique mais voit son effet pro-excitotoxique aboli, réduisant la mort neuronale *in vitro* (adapté de : Macrez et al., 2011 ; Parcq et al., 2013).

1.5.2.8 tPA et inflammation

La majorité des études associent fortement le tPA aux processus d'excitotoxicité, d'apoptose et d'inflammation (Mehra et al., 2016). En effet, le tPA peut moduler la réponse inflammatoire en jouant un rôle dans l'activation microgliale. Par exemple, en condition excitotoxique, des souris déficientes en tPA, en plus d'avoir une mort neuronale réduite, ont une activation microgliale nettement réduite (Rogove et al., 1999 ; Figure 43).

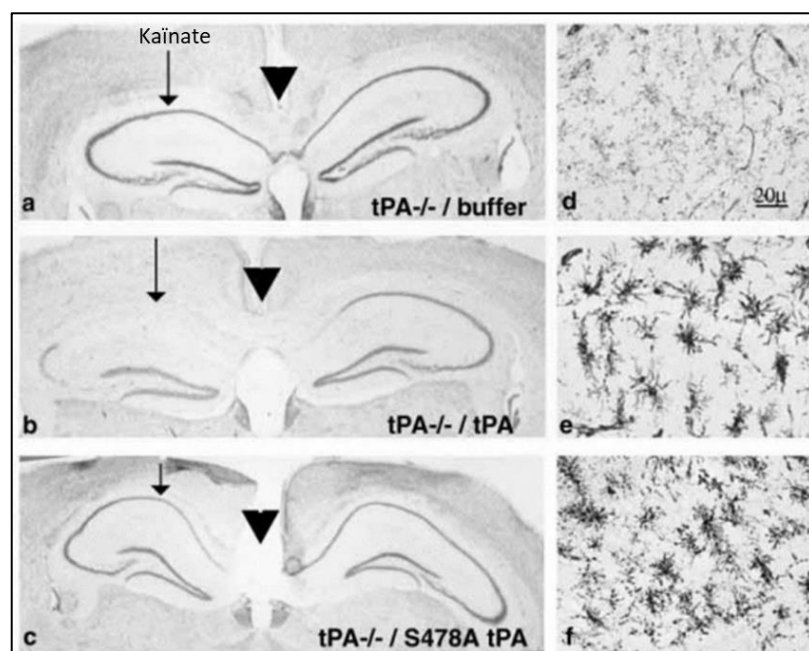


Figure 43 : Effets du tPA actif et inactif (S478A tPA) sur la mort neuronale induite par une injection de kaïnate dans l'hippocampe et sur l'activation microgliale.

L'injection intra-hippocampique de kaïnate n'a pas d'effet sur la mort neuronale chez les souris déficientes en tPA (a) et n'induit pas d'activation microgliale (d). L'injection de tPA combiné au kaïnate, chez les souris déficientes en tPA, induit une mort neuronale hippocampique (b) et une activation des cellules microgliales (e). L'injection de tPA inactif (S478A tPA) chez les souris déficientes en tPA, combinée au kaïnate n'entraîne pas de mort neuronale hippocampique (c) mais engendre une activation des cellules microgliales (f) (Rogove et al., 1999).

Sécrété par les neurones et la microglie présents au niveau de la lésion cérébrale, le tPA, grâce à la liaison de son domaine Finger sur l'annexine II, agit comme une cytokine et active la microglie ([Siao & Tsirka, 2002](#) ; [Siao et al., 2003](#)). Une autre hypothèse pour l'effet activateur du tPA sur la microglie implique les LRP1 microgliaux : l'injection de tPA augmente l'activation microgliale chez les souris déficientes en tPA mais pas chez les souris déficientes en LRP microgliaux ([Zhang et al., 2009](#)).

Le tPA va être également impliqué dans l'infiltration des monocytes dans le parenchyme. Une étude a montré que des monocytes provoquent un relargage de tPA par les cellules endothéliales *in vitro* et que ce tPA participe à la diapédèse des monocytes de par la dégradation des protéines de jonctions ([Reijerkerk et al., 2008](#)). De même, ils ont montré que la dégradation de la BHE et la transmigration des monocytes étaient dépendante de l'interaction du tPA à la sous-unité GluN1 des récepteurs NMDA ([Reijerkerk et al., 2010](#)). Les travaux du laboratoire ont aussi mis en évidence une réduction de l'infiltration de cellules immunitaires à travers la BHE après blocage de l'interaction tPA/récepteurs NMDA ([Macrez, et al., 2011](#)).

L'Activateur tissulaire du Plasminogène

(tPA), enzyme centrale de la fibrinolyse

Pour résumer

- Le tPA est une **sérine protéase** aux multiples fonctions, existant sous deux formes (**simple et double chaînes**), chacune étant fibrinolytique mais pouvant avoir des propriétés différentes.
- Initialement découvert dans le compartiment vasculaire, le tPA est produit et libéré par les **cellules endothéliales** ; il intervient dans la **fibrinolyse** par sa capacité à cliver le plasminogène en plasmine active, elle-même capable de dégrader les caillots de fibrine.
- Le tPA est également synthétisé dans le **parenchyme cérébral** : il est impliqué dans de nombreuses fonctions aussi bien **bénéfiques** (développement, apprentissage, mémoire...) que **délétères** (altération de la BHE, mort excitotoxique...).
- Le tPA est considéré comme un **neuromodulateur** : les neurones l'expriment et le libèrent suite à une dépolarisation. Une fois dans la fente synaptique, il interagit avec des récepteurs post-synaptiques (NMDA, LRP, ...) où il peut aussi être recapté par les astrocytes.
- Le tPA vasculaire peut agir directement sur l'endothélium cérébral et sur la BHE (par exemple, lors du couplage neuro-vasculaire) mais pourrait aussi influencer les processus parenchymateux, par sa capacité à **traverser la BHE** aussi bien en situation pathologique que physiologique.

OBJECTIFS

Le tPA est une **sentinelle de la fluidité** du compartiment vasculaire, par sa capacité à convertir le **plasminogène** en **plasmine** active. Sur cette base, la **thrombolyse** par injection intraveineuse d'Actilyse, une forme recombinante de tPA, a révolutionné la prise en charge des patients victimes **d'AVC ischémique**.

La littérature clinique et préclinique suggère que le tPA vasculaire peut influencer des processus physiologiques tels que la contribution aux **réponses vasculaires cérébrales** (couplage neurovasculaire), le **développement cérébral**, ou bien encore certains processus **mnésiques**. Mais, il pourrait mettre en danger les **cellules nerveuses** et l'interface **sang/cerveau**, dont l'intégrité est déjà compromise en conditions pathologiques, notamment lors d'un AVC. Néanmoins attribuer avec certitude une fonction cérébrale au tPA vasculaire est **compliqué** pour plusieurs raisons : d'une part, en plus de son **origine endothéliale**, il est aussi exprimé par de **nombreux types cellulaires** dont des cellules du **parenchyme cérébral** (neurones, microglie et oligodendrocytes) ; d'autre part, le tPA vasculaire (endogène ou recombinant) peut passer du **compartiment vasculaire** au **parenchyme cérébral**, *via* la **BHE** (et comme nous le verrons aussi *via* la **BSLCS**).

Enfin, les éléments bibliographiques en faveur d'un rôle clef du tPA sanguin dans la physiopathologie cérébrovasculaire **restent critiquables** du fait de la **limite des techniques** et **modèles** employés jusqu'ici. En effet, ils sont pour la plupart obtenus chez des animaux dont le tPA est invalidé dans **tout l'organisme**, et/ou en augmentant l'expression du tPA à des **niveaux non adaptés**. De plus, **aucun outil** n'est aujourd'hui disponible pour **sélectivement éliminer** le **tPA circulant** sans affecter le tPA des autres compartiments de l'organisme.

Les travaux de ma thèse visent donc à pallier ces limites afin de définir précisément la contribution du tPA endogène **vasculaire** *versus* **parenchymateux** à des processus **physiologiques** ou **pathologiques**.

J'ai pu mener en parallèle trois études :

Étude 1 : Le tPA d'origine vasculaire peut-il franchir les barrières vers le SNC ?

Cette étude se base sur le fait que le **tPA** vasculaire traverse la **BHE** sous le contrôle du récepteur **LRP1**, que les **plexus choroïdes** sont une route de migration pour les cellules inflammatoires, et qu'ils expriment également à leur surface le récepteur **LRP1**.

Étude 2 : Quel est le rôle « physiologique » du tPA vasculaire dans le couplage neurovasculaire ? Cette étude se base sur le fait que le **tPA** vasculaire, de par sa capacité à interagir avec les récepteurs **NMDA** endothéliaux, influence la **réponse hémodynamique** dans un modèle de stimulation des vibrisses chez des souris

Étude 3 : Quel est le rôle « physiologique » du tPA vasculaire dans un modèle d'AVC thromboembolique chez la souris ? Cette étude se base sur le fait que le **tPA** vasculaire **endogène** exerce une action fibrinolytique et dégrade les caillots **riches** en **fibrine**, et qu'en condition ischémique, le tPA exogène permet une **thrombolyse** mais **extravase** à travers la **BHE** perméabilisée et potentialise la **mort neuronale excitotoxique**.

Pour chacune de ces études, les résultats seront précédés d'une partie introductive spécifique, permettant de resituer le contexte propre à chaque problématique.

RÉSULTATS

Partie 1

Article 1 :

"The choroid plexus: a door between the blood and the brain for tissue-type plasminogen activator."

Vincent Zuba[#], Jonathane Furon[#], Mathys Bellemain-Sagnard, Sara Martinez de Lizarrondo, Laurent Lebouvier, Marina Rubio, Yannick Hommet, Maxime Gauberti, Denis Vivien*, Carine Ali*

Fluids and Barriers of the CNS, 2022

Contexte bibliographique de l'étude

Les échanges vers et depuis le SNC sont contrôlés grâce à plusieurs **barrières**, dont les plus connues sont la **barrière hémato-encéphalique** (BHE) et la **barrière sang-liquide cérébrospinal** (BSLCS) (Abbott et al., 2006 ; Figure 44). Outre ces deux barrières, on trouve également la barrière leptoméningée, la barrière LCS-neuroépithélium (seulement pendant le développement), la barrière hémato-rétinienne et la barrière « nez-cerveau » (Liddelow, 2011) . Ces dernières années, les plexus choroïdes siègent de la BSLCS, ont émergé comme une interface remplissant des fonctions essentielles à l'homéostasie du SNC, prenant en compte un rôle de barrière physique entre le sang et le LCS (Tietz & Engelhardt, 2015).

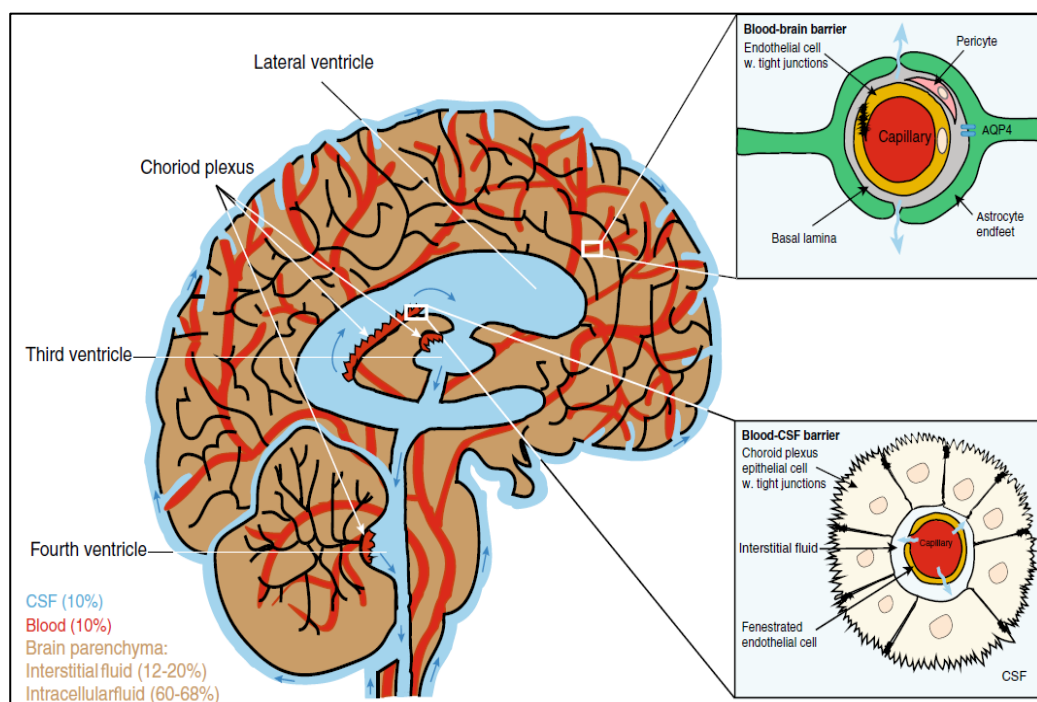


Figure 44 : Représentation schématique des compartiments et des deux principales barrières du cerveau.

Le sang est séparé du LCS et du liquide interstitiel par la BHE et la BSLCS respectivement. Des jonctions serrées entre les cellules endothéliales sanguines constituent la BHE. La barrière hémato-LCS est formée par des jonctions étroites entre les cellules épithéliales du plexus choroïde (Jessen et al., 2015).

Au sein du cerveau se trouvent les **ventricules**, des cavités remplies de **liquide cébrospinal** (LCS). Dans ces ventricules cérébraux, flottent quatre structures particulières, les **plexus choroïdes** (PCs ; [Dohrmann, 1970](#)) : un au niveau du toit du **troisième ventricule** (en position centrale), physiquement lié à deux PCs latéraux au centre des **ventricules latéraux** ; enfin, le PC du **quatrième ventricule**, qui n'est pas lié physiquement aux trois autres, apposé au toit de ce ventricule.

Ces PCs présentent une particularité remarquable : contrairement à la BHE ce sont leurs **cellules épithéliales** (CEPCs), et non les cellules endothéliales, qui forment une barrière physique, polarisée, exposée à des signaux dérivés du cerveau du côté **apical**, *via* le LCS, et à des signaux périphériques du côté **basal**, *via* la circulation ([Gherzi-Egea et al., 2018](#) ; [Kaur et al., 2016](#) ; **Figure 45**).

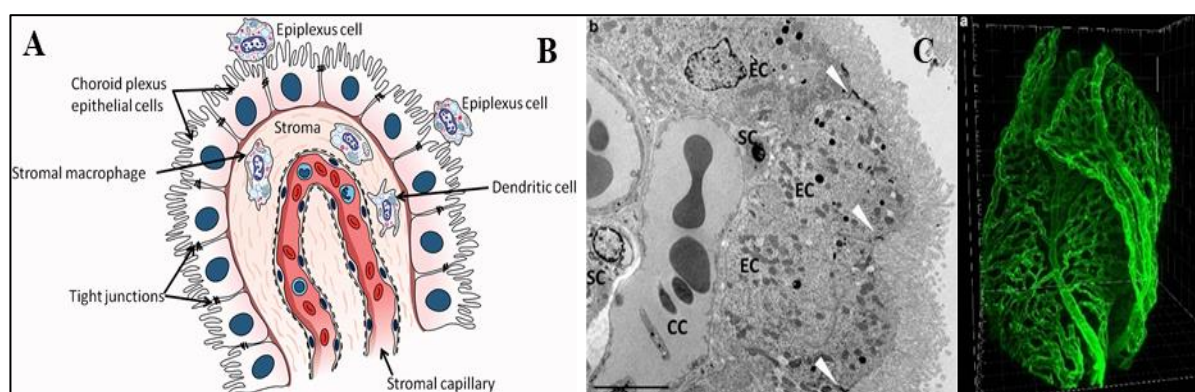


Figure 45 : Caractéristiques morphologiques des plexus choroïdes.

(A) Représentation de la constitution d'un PC. (B) Organisation cellulaire du PC en microscopie électronique. (C) Représentation 3D du réseau vasculaire des PCs (adapté de : [Gherzi-Egea et al., 2018](#) ; [Kaur et al., 2016](#)).

Alors que les cellules endothéliales formant la BHE n'ont pas de fenestrations et sont unies par des jonctions étanches, les capillaires des PCs sont eux fenêtrés ([Gherzi-Egea et al., 2018](#) ; **Figure 46**).

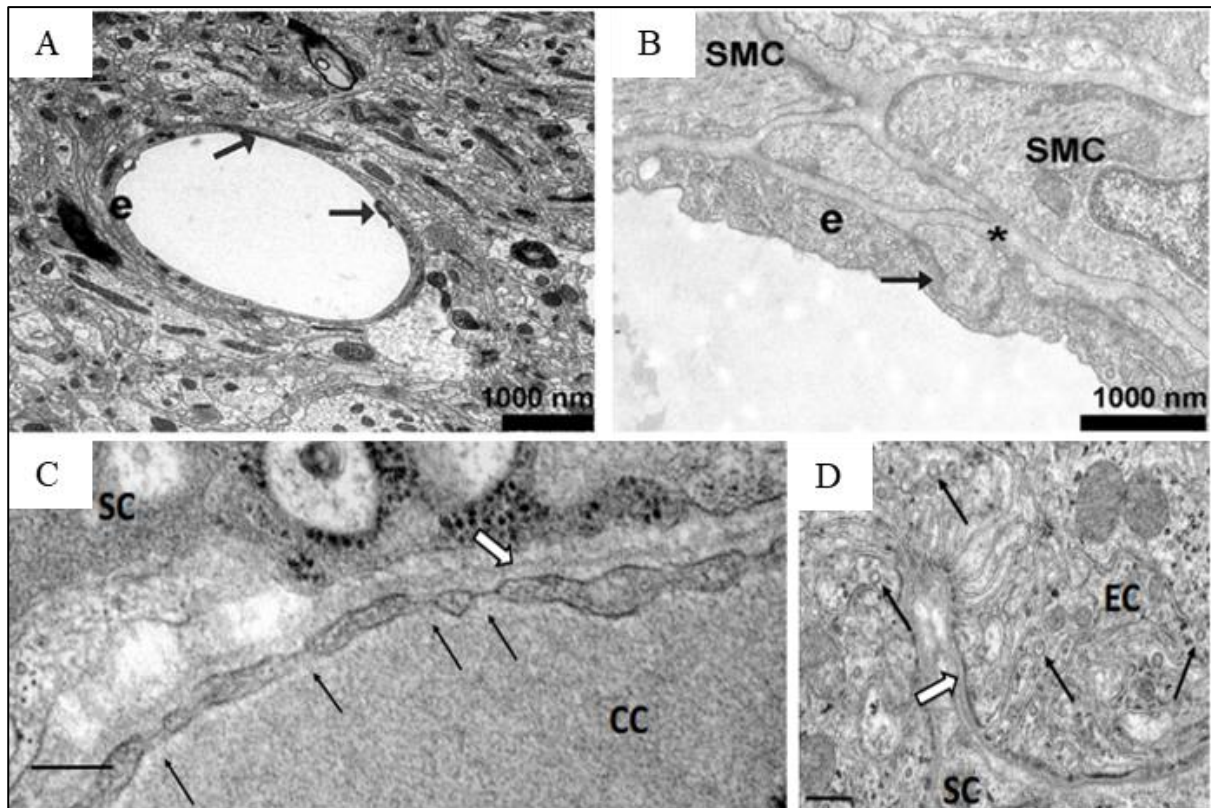


Figure 46 : Comparaison morphologique des cellules épithéliales formant la BSLCS aux cellules endothéliales formant la BHE en microscopie électronique.

(A, B) Au niveau des capillaires, les cellules endothéliales sont liées par des *tight junctions* (TJ ; flèche noire) (A). Ces capillaires se distinguent des plus gros vaisseaux, par leur diamètre et des couches supplémentaires de cellules musculaires lisses (B). e = endothélium ; * = lame basale ; SMC = cellule musculaire lisse ; flèche = TJ. (C, D) Les cellules épithéliales (EC) sont scellées par des jonctions serrées (flèches blanches), apposées aux cellules stromales (SC) et aux capillaires choroïdiens (CC). L'endothélium présente des fenestrations (flèches) (C), ainsi que des replis basolatéraux où des vésicules de transport (flèches) se forment (D). Les flèches blanches en c et d pointent vers les membranes basales endothéliales et épithéliales, respectivement (adapté de : [Gherzi-Egea et al., 2018](#) ; [Dyrna et al., 2013](#)).

Les CEPCs sont recouvertes d'une bordure apicale dense de **microvillosités** et sont interconnectées par des **jonctions serrées et adhérentes**. Elles sont apposées aux **cellules stromales** et aux **capillaires choroïdiens**. Les vaisseaux sanguins pénètrent ce stroma et forment de grandes boucles capillaires fenêtrées juxtaposées à l'épithélium ([Tietz & Engelhardt, 2015](#)).

Les CPs exercent deux fonctions majeures : la synthèse de LCS et l'interface physique entre le compartiment sanguin et les ventricules. Ce rôle prédominant de barrière physique est associé à des fonctions de **senseur**, de **transport**, de et **sécrétion** majeure pour le maintien du bon fonctionnement cérébral (Gherzi-Egea et al., 2018 ; Figure 47) :

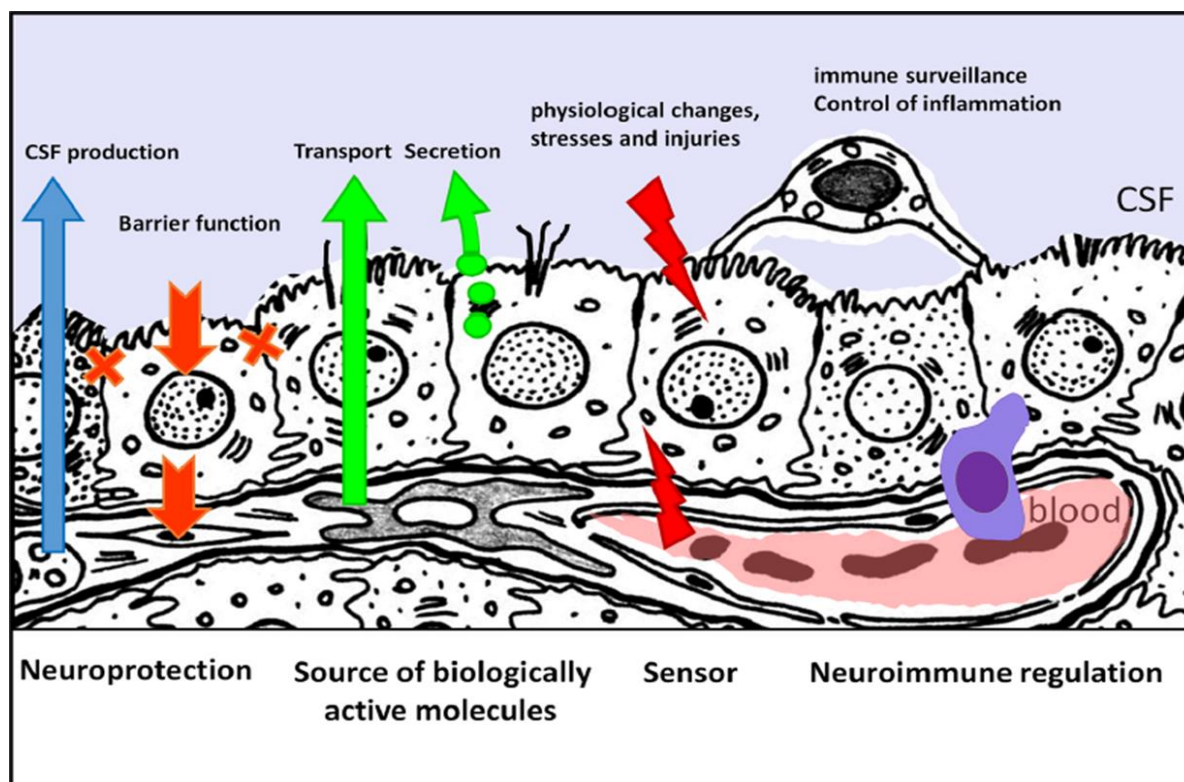


Figure 47 : Principales fonctions des plexus choroïdes.

Les PCs exercent des fonctions neuroprotectrices *via* la sécrétion de LCS (flèche bleue) qui permet le maintien de l'homéostasie cérébrale, et *via* leur capacité à empêcher l'entrée ou à augmenter l'efflux de composés délétères tels que ceux *via* l'action des jonctions serrées qui scellent la voie paracellulaire (flèches et croix orange). Ils sont une source importante de molécules biologiquement actives (flèches vertes). Les CEPCs sont sensibles aux modifications physiologiques de l'homéostasie cérébrale et aux agressions périphériques ou centrales telles que l'inflammation (flèches rouges). Cette fonction sentinelle, et leur implication dans le contrôle du trafic des cellules immunitaires entre le sang et le LCS (cellule bleue) confèrent aux PCs une fonction de surveillance neuro-immune du cerveau qui se renforce lorsque l'organisme est sollicité (Gherzi-Egea et al., 2018).

- **Barrière Sang-CSF** : Les CEPCs forment une barrière physique entre le sang et le LCS, ce qui leur confère un rôle important dans le **transport bidirectionnel** de l'eau, des protéines, micronutriments, ions et autres facteurs essentiels. Ces échanges sont nécessaires notamment pour le développement et la **survie neuronale et gliale** (Spector et al., 2015). De même, elles sentent les **changements homéostatiques** et empêchent l'accumulation de composés nocifs pour le SNC, participant ainsi à l'**immunosurveillance** et au maintien d'un environnement interne stable, ce qui les rend intéressantes dans l'étude de certaines pathologies (Gherzi-Egea et al., 2018) telles que la sclérose en plaques (Engelhardt et al., 2001), les AVC (Ge et al., 2017 ; Llovera et al., 2017) ou bien encore les traumatismes crâniens (Johanson et al., 2011).
- **Production du LCS** : Les PCs secrètent la majorité du LCS (Wright et al., 2012), même si une partie mineure a pour origine le parenchyme cérébral, et proviendrait de l'ultrafiltration à travers les vaisseaux cérébraux. Le mécanisme de sécrétion du LCS est **complexe et régulé** : un flux actif et unidirectionnel d'ions transite au travers des CEPCs et induit un **gradient osmotique** entraînant un mouvement d'eau constant du stroma vers le système ventriculaire, notamment grâce à la présence de **canaux à eau comme l'aquaporine-1 (AQP-1)**.
- **Sécrétion de protéines** : Les PCs sont une **niche neurogène** et ont aussi la capacité de sécréter des **facteurs neurotrophiques**, tels que le **facteur neurotrophique dérivé du cerveau (BDNF)** (Timmusk et al., 1995 ; Borlongan et al., 2004 ; Huang et al., 2014).

De nombreuses données suggèrent que le tPA circulant (endogène ou exogène) contrôle des processus physiopathologiques cérébraux, tels que la **réactivité cérébrovasculaire**, l'**intégrité de la BHE**, l'**inflammation** et le **devenir neuronal**. Que cela se produise par des actions directes sur les cellules parenchymateuses et/ou indirectement *via* des barrières entre le sang et le SNC reste incertain. Comme dit précédemment, le tPA vasculaire peut rejoindre le parenchyme, en traversant la BHE *via* le récepteur LRP1, en conditions physiologique ou pathologique (Benchenane et al., 2005a ; Mehra et al., 2016 ; Benchenane et al., 2005b ; Yepes et al., 2003 ; López-Atalaya et al., 2007). Compte tenu de cette fonction de barrière, la BSLCS se présente comme une interface d'intérêt pour étudier le passage de molécule provenant du compartiment vasculaire (Solár et al., 2020). Dans cette étude, nous avons postulé que le **tPA vasculaire** puisse aussi atteindre le parenchyme cérébral *via* la BSLCS.

L'objectif de notre étude est donc de déterminer si et comment le tPA vasculaire peut rejoindre le parenchyme cérébral à travers cette barrière formée par les PC. Pour ce faire, nous avons produit des protéines de fusion afin de tracer le tPA *in vitro*, dans des cultures primaires de CEPCs, dans des explants de CP et enfin *in vivo*, chez la souris. Nous avons également étudié les mécanismes sous-jacents du transport du tPA avec des approches pharmacologiques et moléculaires.

Article 1

The choroid plexus: a door between the blood and the brain for tissue-type plasminogen activator.

Principaux résultats obtenus

- Les cellules épithéliales de plexus choroïdes internalisent le tPA par des vésicules d'endocytose recouvertes de clathrine et le transportent du sang vers le LCS : cette démonstration a été faite *in vitro*, *ex vivo* et également *in vivo*.
- L'internalisation de tPA par les cellules épithéliales de plexus choroïdes est un phénomène actif, médiée par LRP1 (membre de la famille des LRP), de manière similaire à la BHE.
- Le domaine Finger du tPA est essentiel pour le passage du tPA à travers les cellules épithéliales de plexus choroïdes : cette démonstration a été faite *ex vivo* et *in vivo*.
- Le domaine Finger du tPA serait une stratégie intéressante pour permettre à protéines de fusion d'atteindre le LCS puis le parenchyme cérébral.

L'ensemble de nos résultats permet de mieux comprendre le cheminement du tPA d'origine vasculaire vers le SNC. De plus, ces résultats ouvrent des pistes intéressantes pour une utilisation plus sûre du tPA et pour de nouvelles stratégies d'administration de médicaments.

The choroid plexus: a door between the blood and the brain for tissue-type plasminogen activator

Vincent Zuba^{1#}, Jonathane Furon^{1#}, Mathys Bellemain-Sagnard¹, Sara Martinez de Lizarrondo¹, Laurent Lebouvier¹, Marina Rubio¹, Yannick Hommet¹, Maxime Gauberti¹, Denis Vivien^{1,2*}, Carine Ali^{1*}

¹Normandie Univ, UNICAEN, INSERM, INSERM UMR-S U1237, Physiopathology and Imaging of Neurological Disorders, Institut Blood and Brain @ Caen-Normandie, Cyceron, Caen, 14074, France.

²Department of clinical research, Caen-Normandie Hospital (CHU), Caen, France

* equal contribution

Corresponding author: Pr. Carine Ali

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

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

Abstract

Background: In the vascular compartment, the serine protease tissue-type plasminogen activator (tPA) promotes fibrinolysis, justifying its clinical use against vasculo-occlusive diseases. Accumulating evidence shows that circulating tPA (endogenous or exogenous) also controls brain physiopathological processes, like cerebrovascular reactivity, blood-brain barrier (BBB) homeostasis, inflammation and neuronal fate. Whether this occurs by direct actions on parenchymal cells and/or indirectly via barriers between the blood and the central nervous system (CNS) remains unclear. Here, we postulated that vascular tPA can reach the brain parenchyma *via* the blood-cerebrospinal fluid barrier (BCSFB), that relies on choroid plexus (CP) epithelial cells (CPECs).

Methods: We produced various reporter fusion proteins to track tPA in primary cultures of CPECs, in CP explants and *in vivo* in mice. We also investigated the mechanisms underlying tPA transport across the BCSFB, with pharmacological and molecular approaches.

Results: We first demonstrated that tPA can be internalized by CPECs in primary cultures and in *ex vivo* CPs explants. *In vivo*, tPA can also be internalized by CPECs both at their basal and apical sides. After intra-vascular administration, tPA can reach the cerebral spinal fluid (CSF) and the brain parenchyma. Further investigation allowed discovering that the transcytosis of tPA is mediated by Low-density-Lipoprotein Related Protein-1 (LRP1) expressed at the surface of CPECs and depends on the finger domain of tPA. Interestingly, albumin, which has a size comparable to that of tPA, does not normally cross the CPs, but switches to a transportable form when grafted to the finger domain of tPA.

Conclusions: These findings provide new insights on how vascular tPA can reach the brain parenchyma, and open therapeutic avenues for CNS disorders.

Keywords: Tissue-type plasminogen activator, choroid plexus, epithelium, Low density lipoprotein receptor-related protein, barrier, transport, finger domain, drug delivery

Background

The blood-brain barrier (BBB) has often been considered as being “the” barrier of the CNS. However, over the past 10 years, choroid plexuses (CP) have (re)emerged as another critical interface, fulfilling essential functions for CNS homeostasis (Tietz and Engelhardt, 2015). Floating in brain ventricles, CPs were originally described as being responsible for the secretion of the cerebrospinal fluid (CSF), with critical consequences on intracranial pressure (Dandy & Blackfan, 1919). Among others, under physiological conditions, CPs also have functions of sensor, neurotrophic niche, and regulator of some behaviours (Arnaud et al., 2021; Gherzi-Egea et al., 2018; Planques et al., 2019; Shipley et al., 2020). CPs participate in the pathogenesis and progression of various neurological diseases as well as in the spread of inflammatory responses from the periphery to the CNS (Bors et al., 2018; Coisne & Engelhardt, 2011; Huber et al., 2001; Kaur et al., 2016; Llovera et al., 2017; Moorea & Oglesbeeb, 2012; Nishihara et al., 2020; Shechter et al., 2013; Vercellino et al., 2008; Xiang et al., 2017).

CPs consist in a densely vascularized matrix, the stroma, populated by immune cells and surrounded by epithelial cells. Thanks to their apical tight junctions, the choroid plexus epithelial cells (CPECs) form a physical barrier at the interface between the blood and the CSF (Engelhardt & Sorokin, 2009). Owing to the numerous transporters expressed by CPECs, the blood-CSF barrier (BCSFB) is a real hub of exchanges (Spector et al., 2015). The BCSFB also stands as a target for drug delivery and/or for prevention of entry/accumulation of toxic mediators (Bryniarski et al., 2020; Solár et al., 2020).

In this study, we were interested in a key fibrinolytic protease, tissue-type plasminogen activator (tPA). When released in the bloodstream from endothelial cells and/or hepatocytes (Levin et al., 1997; Zheng et al., 2019), tPA can cleave plasminogen into active plasmin, leading to the degradation of fibrin clots (Collen et al., 1991). Accordingly, the recombinant form of tPA (Actilyse, Alteplase) is of therapeutic value for several vasculo-occlusive conditions, including pulmonary embolism, deep vein thrombosis and ischemic stroke (Hacke et al., 2018; Izcovich et al., 2020; Wardlaw et al., 2012). Beside fibrinolysis, circulating tPA (endogenous and exogenous) exerts various effects in/on the normal or pathological CNS (for review, see Thiebaut et al., 2018). Some of these cerebral effects of circulating tPA occur by direct actions on the vessel wall. For instance, physiological neurovascular coupling, a phenomenon that links neuronal activity to cerebral blood flow, is tuned by intraluminal tPA acting on N-methyl-D-aspartate receptors (NMDAR) on endothelial cells (Anfray et al., 2020). Conversely, under pathological conditions, this tPA/NMDAR endothelial partnership promotes BBB leakage and inflammation (Macrez et al., 2016). Beside these direct effects on the brain vasculature, tPA can also “escape” from the blood (Benchenane et al., 2005), and add to parenchymal tPA to increase neuronal activity and neuronal loss (Nicole et al., 2001). This escape was thought to result from the polarized trans-endothelial transport of tPA, driven by Low-density-Lipoprotein Related Protein-1 (LRP1), a member of the LDL receptor-related protein family (Benchenane et al., 2005).

In light of the recent literature about the BCSFB, it is relevant to determine whether - and if so, how - vascular tPA also crosses the CPs. In the present study, we showed that CPECs can uptake tPA coming from the blood or from the CSF and that, CPECs transport vascular tPA and translocate it into the CSF. With *in vitro* and *in vivo* models, we showed that the influx of tPA is an active mechanism relying on LRP1 at the surface of CPECs. Interestingly, we identified

the finger domain of tPA as being involved in this uptake, and that grafting this finger domain to albumin, allows its passage through CPECs. Our findings open interesting avenues for new strategies of drug delivery and maybe for a safer use of tPA during stroke, as blocking its entry in the brain parenchyma would prevent its pro-neurotoxic effect without affecting its beneficial thrombolytic action.

Materials and methods

Labelling of recombinant proteins with AlexaFluor®

Apart from BSA coupled to AlexaFluor⁴⁸⁸ or AlexaFluor⁵⁵⁵, which were commercially available (Life Technologies), recombinant proteins were conjugated to AlexaFluor⁴⁸⁸ or AlexaFluor⁵⁵⁵ as follows. For tPA, Actilyse® (Boehringer Ingelheim) was first dialyzed in a 0.3M bicarbonate buffer, pH 8.4, at 4 ° C for 48 hours, in order to remove excipients, in particular arginine (the dialysis buffer was changed every twelve hours). Next, recombinant proteins were mixed with 1 mg of AlexaFluor⁵⁵⁵ ($\lambda_{\text{excitation}}$: 555nm; $\lambda_{\text{emission}}$: 592nm) or AlexaFluor⁴⁸⁸ ($\lambda_{\text{excitation}}$: 494nm and $\lambda_{\text{emission}}$: 517nm) Succinimidyl Ester (Life Technologies), diluted in 100μL of dimethyl sulfoxide, for 6 hours at room temperature and with constant stirring. In order to remove excess AlexaFluor, the solution was dialyzed in a bicarbonate buffer first, and then in a phosphate buffered saline containing arginine hydrochloride to avoid protein precipitation.

Production of recombinant ΔF -tPA and F-BSA

HEK293/FRT cells were used as the eukaryotic system for production of recombinant proteins with the Flp-in system (ThermoFisher scientific). After selection with hygromycin B, stable cells were placed in production without serum (60 petri dishes per protein, diameter 10 cm), culture media were changed every 4 days for 12 days. The PCDNA3.1-Rattus tPA delta finger construct was made from the PCDNA3.1-Rattus-tPA vector. The latter is constructed like this:

ATG-6His-BamHI-tPA-Stop-XhoI. tPA delta finger was amplified by PCR from amino acid 79 of tPA of pCDNA3.1-Rattus tPA (beginning of the EGF like domain) to the stop and cloned between BamHI and XhoI of the pCDNA3.1-Rattus tPA construct. We thus obtained ATG-6His-BamHI-tPA delta finger-Stop-XhoI. The human albumin cDNA was purchased from GenScript (vector pCDNA3.1+/C-(K)DYK-Albumin, #OHu18744). We amplified the cDNA of the finger domain by PCR from a pCDNA5.1-Rattus tPA construct (finger: 36->78), the domain was amplified with ATG, the signal peptide for secretion and the 6his tag of the pCDNA5.1-Rattus tPA construct. It was then cloned between NheI and HindIII of the pCDNA3.1+/C-(K)DYK-Albumin vector. Finally we obtained an amino terminal cloning: ATG-6His-Finger-Albumin-Stop.

The 6xHistidine fused to the N-terminal of Δ F-tPA and of F-BSA allows purification of recombinant proteins by high performance liquid chromatography using Nickel-Nitrilotriacetic Acid affinity columns (Ni-NTA, GE Healthcare) and a mobile phase imidazole gradient. Positive elutions were pooled, concentrated and dialyzed in phosphate buffer. The Δ F-tPA and F-BSA proteins were then coupled to AlexaFluor⁴⁸⁸ and AlexaFluor⁵⁵⁵, respectively, as described above, except that there was no initial dialysis.

Animals

Eight weeks old male Swiss mice (35–45g, Centre Universitaire de Ressources Biologiques, Normandy University, Caen, France) were housed at 21 °C in a 12-hour light/dark cycle with food and water *ad libitum*. All procedures with anaesthesia were performed by an initial exposure to 5% isoflurane, followed by a maintaining phase of 1.5%–2% isoflurane 30%O₂/70%N₂O.

Intravenous (IV) Injection of Alexa-coupled recombinant proteins, CSF sampling and tissue collection.

Anesthetized mice were placed in a stereotaxic frame. Recombinant proteins were injected in the tail vein, in 200µL of saline (0.9% NaCl) over approximately 5 seconds.

Following the IV injection, the mice were kept anesthetized in the stereotaxic frame and monitored while awaiting for the sampling of CSF and brain. Lidocaine (a local pain reliever) was applied on the incision plan 5 minutes before starting surgery. The upper muscular planes of the neck were detached and spread apart in order to unmask the *cisterna magna*. Once the cistern was unmasked, a glass micropipette was inserted in order to collect the CSF (up to 7-8µL), which was transferred in a tube on dry ice and stored at -80°C. Mice were immediately subjected to intracardiac perfusion of heparinized saline at 4°C followed by a phosphate buffer solution, 0.1M and pH 7.4, with 4% paraformaldehyde. Following perfusion, the brain and cerebellum were extracted and placed in a phosphate buffered saline (PBS) solution containing 20% sucrose for 48 hours (renewed four times). Tissues were included in Cryomatrix™ (Thermo Scientific) and stored at -80 °C. Ten µm thick sections were made using a cryostat (Leica, CM3050S), placed on poly-lysine slides and were stored at -80°C.

Immunohistochemistry

Tissue sections were rinsed and rehydrated in PBS and are then incubated in a PBS solution containing 0.25% of Triton X-100 overnight at room temperature and in a humid atmosphere, with an anti-TTR antibody to label the CPECs (1:1000; Abcam 9015) or anti CD-31, a marker of the endothelium (1:1000; BD Pharmingen 553370). The next day sections were incubated in PBS containing 0.25% Triton™ X-100 and Fab'2 fragments directed against the host species primary antibody (1:1000; Jackson ImmunoResearch) for 90 minutes at room temperature and humid atmosphere. Sections were covered with an assembly medium

(Fluoromount-G®, SouthernBiotech) containing, or not, DAPI and a coverslip. The slides were then observed and microphotographed with an inverted confocal microscope (Leica TCS SP8) to be analysed with Fiji Is Just ImageJ. For each animal, a dozen images were acquired on 5 sections (4 of the brain and one of the cerebellum). On each image, the CPECs were manually counted, thanks to TTR immunostaining, as well as the spots of fluorescence within CPECs.

A subset of slices was also stained with an antibody against NeuN (mouse monoclonal antibody MAB377; 1:500; Merck Millipore, Alexa⁶⁴⁷-conjugated secondary antibody donkey anti-mouse, 1:800, Jackson ImmunoResearch) to determine if tPA⁵⁵⁵ can be detected in the brain parenchyma (30 minutes after intravenous administration).

tPA/BSA levels in the CSF.

After addition of loading buffer (Sucrose, SDS, Bromophenol Blue), the CSF samples (5µl) were subjected to electrophoresis (SDS-PAGE) under non-reducing conditions (200V, 50min) on a 10% polyacrylamide gel. The fluorescence signal was measured in the gel using an ImageQuant™ LAS 4000 camera (GE Healthcare), and the signal quantification was done with Fiji is just ImageJ. Alternatively, tPA was immunodetected after transfer onto a PVDF membrane, using a goat anti-tPA antibody (1:500) and a peroxylase-conjugated secondary antibody (1/160000).

Primary cultures of CPECs.

The CPECs were isolated based on a protocol described in rats by Monnot & Zheng (2013), with some modifications. After cervical dislocation, preceded by deep anaesthesia with 5% isoflurane (in 30% O₂ / 70% N₂O), and recovery of the brains of ten 8-week-old Swiss mice, the plexuses from 3rd and 4th ventricles and lateral ventricles were dissected under a binocular lens. The plexuses were diluted in 1ml of ice-cold HBSS (Hank's Balanced Salt Solution, Sigma) and underwent enzymatic digestion with pronase (Pronase E from Streptomyces griseus,

Serva Electrophoresis) at 2mg/ml for 20 minutes at 37 °C and 5% CO₂. Digestion was stopped by adding 4 mL of ice-cold HBSS. The plexus clusters were centrifuged at 4 °C for 5 min at 800 g, the supernatant, which mainly contains debris, was removed, the pellet suspended in 6ml of ice-cold HBSS, centrifuged again at 800g for 5 min. The pellet was then suspended in 2ml of growth medium (sodium pyruvate 110µg/ml, glutamine 2mM, fetal calf serum 10%, epidermal growth factor 0.01mg/ml and 1% of diluted penicillin/streptomycin in Essential Medium Modified by Dulbecco, DMEM) at 37°C then mechanically dissociated using a syringe with a 21G needle. The dissociated cells were firstly seeded in a 35mm dish and incubated at 37 °C and 5% CO₂ for 4 h so that the fibroblasts and macrophages adhere to the plastic. After 4 hours, CPECs in suspension in the dish were collected and seeded in 24-well plates previously treated with type I collagen from rat tail (Cultrex [™]) at 0.1mg/mL in acetic acid 0.02M. After 48 hours, the plates were rinsed with PBS and the medium was replaced by medium supplemented with cytosine arabinoside (Ara-C). Cells were then rinsed, and the medium changed every other day until use after 8 days *in vitro*. The continued presence of the inhibitor of DNA synthesis Ara-C specifically inhibits the growth of contaminating cells such as stromal fibroblasts. Unlike CPECs, these cells express nucleoside transporters unable to distinguish ribose and arabinose residues and thus incorporate Ara-C into their genomic DNA, which results in specific suppression of their growth (Lazarevic & Engelhardt, 2015).

Internalization of tPA by cultured CPECs.

Cultured CPECs were rinsed twice with PBS at 37°C, then maintained for 1 hour in a serum-free medium, and treated with tPA⁵⁵⁵ (at the indicated doses/durations). After treatment, cells were rinsed three times with cold PBS. Proteins were extracted at 4 °C in a 50mM Tris-HCl buffer, pH 7.4, 150mM NaCl and 0.5% Triton [™] X-100 (TNT buffer) supplemented with protease and phosphatase inhibitors 1µg/mL. After centrifugation (12000g at 4°C for 20min),

the supernatants were collected and then assayed using the Pierce BCA Protein assay kit. After adding loading buffer (Sucrose, SDS, Bromophenol Blue), the total proteins were separated according to their molecular mass by electrophoresis (SDS-PAGE) on a 10% polyacrylamide gel under non-reducing conditions (200V, 50min). The fluorescence of tPA⁵⁵⁵ was detected directly in the gel with an ImageQuant™ LAS 4000 camera, and the signal quantification was done with Fiji Is Just ImageJ.

RNA silencing.

LRP1 Stealth RNAi™ oligoribonucleotides were transfected at a concentration of 20nM into CPECs cultures using Lipofectamine 2000 (2 g, Invitrogen). Sequences were: siLRP1_01 sense UGGCUGACGGGAAACUUCUACUUUG; siLRP1_01 antisense CAAAGUAGAAGUUUCCCGUCAGCCA; siLRP1_02 sense CACACCCAUUUGCCGUGACACUGU; siLRP1_02 antisense UACAGUGUCACGGCAAUGGGUGUG; siLRP1_03 sense CCAAGGUGUGAGGUGAACAAGUGUA; siLRP1_03 antisense UACACUUGUUCACCUACACCUUGG.

Stealth RNAi™ siRNA Negative Control, Medium GC negative control duplex (Invitrogen™) was used as the control condition (scramble). After 48h, cells were rinsed 3 times with PBS, and total proteins were recovered. The efficacy of extinction was checked by western blot: after adding loading buffer (Sucrose, SDS, Bromophenol Blue), the total proteins were separated according to their molecular mass by electrophoresis (SDS-PAGE) on a 10% polyacrylamide gel under non-reducing conditions (200V, 50min). Then, Proteins were transferred (120min, 200mA) onto a cellulose membrane in a humid environment (24mM Tris, 192mM glycine, 20% ethanol). Membranes were incubated in a 2% TTBS-BSA solution (Tween Tris Buffered Saline, 10mM Tris, 200mM NaCl, 0.1% Tween - 2% BSA, pH 7.4) for 1h and then incubated overnight at 4 C with the primary anti-LRP1 antibody (Abcam 92544) diluted 1:1000 in the TTBS-BSA 2%

buffer. Membranes were incubated with the secondary antibody coupled to peroxidase, diluted 1:50000 in 2% TTBS-BSA, for 1h at room temperature. The detection was performed using the Pierce ECL Plus Western blotting substrate kit, membranes were then placed in the ImageQuant™ LAS 4000 camera and the signal quantification done with Fiji Is Just ImageJ.

Internalization of recombinant proteins on CPs explants

Whole CPs were collected from mice (8-weeks-old Swiss males) and were quickly washed with PBS at 37°C. They were then exposed for the indicated time to the specified Alexa-conjugated protein. After treatment PCs were rinsed three times with PBS and fixed with 4% paraformaldehyde in PBS 0.1 M and pH 7.4, for 15min. PCs were mounted in Fluoromount-G® then micro-photographed with an inverted confocal microscope (Leica TCS SP8) to be then analysed with Fiji Is Just ImageJ. The various proteins were quantified by their fluorescence within the CPECs, which were delimited manually.

Statistical analyses

Results are expressed as mean $\pm$ the Standard Error of the Mean (SEM). The samples being unpaired and having low numbers a Mann-Whitney U test was used. Statistical analyses were performed using Mann-Whitney test with GraphPad software. Data were considered statistically different if probability values (p) were at least < 0.05 .

Results

Choroid plexus epithelial cells transport tPA: *in vitro* and *in vivo* demonstrations of influx and efflux pathways.

The potential transport of tPA through the CPs and its underlying mechanisms were investigated by tracking human recombinant tPA tagged with AlexaFluor⁵⁵⁵ (tPA⁵⁵⁵) or

AlexaFluor⁴⁸⁸ (tPA⁴⁸⁸). We first used a model of primary culture of mouse CPECs (based on Monnot and Zheng, 2013). After 8 days, cultured CPECs display characteristics identical to those of the CPs *in situ* (Figure 1A), namely a cuboid morphology, the expression of the marker transthyretin (TTR) and the presence of tight junctions (occludin staining). Cultured CPECs were able to uptake extracellular tPA⁵⁵⁵ (40nM) in a time-dependent process (visible as increasing numbers of intracellular Alexa⁵⁵⁵ punctiform stainings, Figure 1B). Measures of tPA⁵⁵⁵ levels in protein extracts from cell monolayers resolved by electrophoresis (Figure 1C) confirmed these observations, with a sharp rise up to 5 min after initiating exposure, and an ongoing increase up to 60min (after 5min, the amount of internalized tPA⁵⁵⁵ already corresponded to 41.84% of what was internalized after 60min). CPECs were also exposed for 15min to doses of tPA⁵⁵⁵, increasing from 20nM to 400nM. Intracellular fluorescent dots accumulated when increasing doses of tPA⁵⁵⁵ (Figure 1D). In-gel quantifications confirmed that the uptake of tPA⁵⁵⁵ in CPECs rose with the amount of tPA⁵⁵⁵ applied in the medium (after exposure to 20nM, the amount of internalized tPA⁵⁵⁵ corresponded to 11.72% of what was internalized with 400nM) (Figure 1E). To support these findings, freshly isolated explants of mouse CPs were exposed to tPA⁵⁵⁵ and BSA⁴⁸⁸, used as a control (Bovine Serum Albumin is also a circulating protein, with a molecular weight comparable to that of tPA, as shown on Figure 2A). CPECs exhibited strong accumulation of tPA⁵⁵⁵, but barely no signal for BSA⁴⁸⁸ (Figure 2B, C). Inverting fluorophores on our tracked proteins gave similar results (Figure 2D-F). In addition, we observed that 30 minutes after their intravenous co-injection (50µg each), while tPA⁵⁵⁵ was detected in CPECs, Alexa⁴⁸⁸ extravasated out of choroidal vessels, but remained in the stroma without being taken up by CPECs (supplementary Figure 1). Together, these *in vitro* and *ex vivo* results show that, CPECs uptake tPA, in a time- and dose-dependent manner, but do not uptake BSA.

Then, mice were injected intravenously with 50µg of tPA⁵⁵⁵ and 50µg of BSA⁴⁸⁸, and CSF and brains were harvested 10, 30, 60 or 120min later (Figure 3A). In CPs, confocal microscopy (Figure 3B) revealed dots of tPA⁵⁵⁵ as early as from 10min, being more numerous at 30 and 60 min, and then virtually absent 120min after intravenous injection. A z-stack of confocal images clearly shows that dots of tPA⁵⁵⁵ were located inside CPECs (Figure 3C). We also found that tPA was internalized in clathrin-coated endocytotic vesicles, as it was co-localized with the marker AP2 (Pearson's coefficient of 65%; supplementary Figure 2). We did not find any BSA⁴⁸⁸ in CPs after intravenous injection. We quantified the number of TTR immune-positive cells with dots of tPA⁵⁵⁵ as an index of the internalization of tPA by CPECs (Figure 3D). This index followed a bell curve shape, peaking 30min post-injection. After two hours, tPA was no longer detected in the CPs, suggesting a passage of tPA⁵⁵⁵ from the blood to the CSF. Accordingly, an immunoblot analysis on CSF samples harvested at different time points, revealed the appearance of tPA in the CSF starting between 30 and 60min post intravenous injection (Figure 3E). Since the antibody used is specific for human tPA and does not recognize murine tPA, this confirms that vascular tPA crosses the CPs and reaches the CSF. Of note, when administered in the ventricle, tPA⁵⁵⁵ was also detected in the CPECs, suggesting that CPs also allow the clearance of tPA from the CSF (Supplementary figure 3). We also found that after an intravenous injection, the decline in tPA⁵⁵⁵ levels in the blood parallels the increase in tPA⁵⁵⁵ levels in the CSF (Supplementary figure 4). Moreover, to ensure that the observed transport occurs directly from the choroidal circulation to the CPECs, and not via indirect pathways, we administered tPA⁵⁵⁵ in the internal carotid and demonstrated that very shortly after (5 minutes), dots of tPA⁵⁵⁵ were detected in the stroma and in CPECs (Supplementary figure 5). Importantly, in barrier-protected parenchymal areas, we could detect tPA⁵⁵⁵ in neurons, suggesting that once in the CSF, tPA can enter the parenchyma (Figure 3F). In barrier-free

areas, both tPA⁵⁵⁵ and BSA⁴⁸⁸ reached the brain parenchyma (exemplified here in the median eminence: 30min after injection, fluorescent BSA and tPA diffused outside the vascular system, Supplementary figure 6).

Overall, these results show that after an intravenous injection, tPA is internalized by CPECs and is then transported to the CSF. This suggests that CPs are a potential route of entry for tPA into the brain parenchyma.

The uptake of tPA by choroid plexus epithelial cells is mediated by LRP1

Transcytosis/uptake of tPA has been attributed in various cell types to members of the LRP family, in particular to LRP1 (Benchenane, Berezowski, Fernández-Monreal, et al., 2005; Fernández-Monreal et al., 2004). A 3D projection of confocal images acquired after intravenous injection of tPA⁵⁵⁵ in mice and coupled to the immunodetection of LRP1 on TTR positive cells supports the hypothesis that LRP1 could be responsible for tPA transport by CPECs. Indeed, we found dots of tPA⁵⁵⁵ close to LRP1 immunolabellings at the basolateral pole of CPECs (Figure 4A). In cultured CPECs, that also express LRP1 (Figure 4B), we first found that tPA⁵⁵⁵ internalization was likely an active mechanism. Indeed, when exposed to 40nM of tPA⁵⁵⁵ for 15min, CPECs protein extracts displayed fluorescent signals when exposure was performed at 37°C but not when performed at 4°C (data not shown). To evaluate the participation of a member of the LRP family, we compared the internalization of tPA by CPECs in the absence or presence of RAP (Receptor Associated Protein, 500nM), a competitive LRP antagonist (Figure 4C-D). CPECs co-exposed to tPA⁵⁵⁵ and RAP presented fewer tPA⁵⁵⁵ dots than cells exposed to tPA⁵⁵⁵ alone (Figure 4C). This result was confirmed by electrophoresis, showing a 41.22% reduction in tPA⁵⁵⁵ internalization induced by RAP co-treatment (Figure 4D). To evaluate the participation of LRP1 in the uptake of tPA by the CPECs, we knocked-down its

expression with a siRNA strategy. The extinction of LRP1 expression was 58.77% effective (Figure 4E). When compared to control CPECs or CPECs transfected with a scramble siRNA, CPECs transfected with LRP1 siRNA internalized 32.55% less tPA⁵⁵⁵ (Figure 4F). Importantly, *in vivo*, we confirmed the role of LRP1 in transporting tPA in CPECs. Indeed, there was around 60% loss of tPA⁵⁵⁵-related fluorescence in CPECs when RAP (90µg) was co-administered intravenously with tPA⁵⁵⁵ (50µg), compared to tPA⁵⁵⁵ alone (Figure 4 G-H).

The finger domain of tPA is critical for the passage of tPA across choroid plexus epithelial cells

Among its five functional domains (Figure 5A), the finger domain of tPA is known to be the one interacting with LRP1. To assess its involvement in the passage of CPECs, we produced a tPA devoid of its finger domain (Δ F-tPA), and alternatively, we grafted the finger domain of tPA to albumin (F-BSA) (Figure 5E). Both mutant proteins were also tagged with an Alexa Fluor for their tracking (Figure 5B, F). *Ex-vivo*, CP explants were exposed to 40 nM of tPA⁵⁵⁵ and with increasing doses of Δ F-tPA⁴⁸⁸ (40nM, 200nM or 400nM) for 15min (Figure 5C, D). As expected, tPA⁵⁵⁵ was internalized by CPECs whereas Δ F-tPA was not, even with a 10 fold higher concentration. The finger domain of tPA is therefore necessary for internalization by CPECs. Interestingly, fusing the finger domain of tPA to BSA conferred the new ability to BSA to be internalized by CPECs *ex vivo* (Figure 5G, H).

These *ex vivo* observations were confirmed *in vivo*, in mice injected intravenously with 50µg of tPA⁵⁵⁵/ Δ F-tPA⁴⁸⁸ or with 50µg of F-BSA⁵⁵⁵/ BSA⁴⁸⁸ (Figure 6A). A confocal microscopy analysis (Figure 6B) revealed dots of tPA⁵⁵⁵ in TTR positive cells, 30 and 60min after injection. However, virtually no dots were detected for Δ F-tPA⁴⁸⁸. We quantified the number of TTR immune-positive cells with dots of tPA⁵⁵⁵ and dots of Δ F-tPA⁴⁸⁸ as an index of their

internalization by CPECs (Figure 6C). This index was null for ΔF -tPA⁴⁸⁸ and peaked 30min post-injection of tPA⁵⁵⁵, with 73.09% more cells containing tPA⁵⁵⁵ than at 60min. Interestingly, the confocal microscopy analysis (Figure 6D) revealed dots of F-BSA⁵⁵⁵ in TTR positive cells, 30 and 60min after IV injection, while no dots were detected for BSA⁴⁸⁸. The corresponding quantification confirmed that BSA *per se*, cannot be uptaken by CPECs, but that grafting the finger domain of tPA then allows the internalization of the fusion protein (Figure 6E). This index followed a bell curve shape, with a peak of internalization of tPA⁵⁵⁵ reached 30min post-injection, with 56.84% more cells containing tPA⁵⁵⁵, than at 60min and no detection of ΔF -tPA⁴⁸⁸. Also important, as confirmed by electrophoresis of corresponding CSF samples, F-BSA⁵⁵⁵ can cross the BCSFB, like tPA⁵⁵⁵ (Figure 6F, G). The finger domain of tPA is thus an interesting strategy to allow therapeutic fusion proteins reaching the CSF and the brain parenchyma.

Discussion

Besides ensuring the adequate cerebral perfusion, circulating tPA controls brain physiopathology, at least by a direct action on the neurovascular unit. Here, we show that in addition to the BBB (Benchenane et al., 2005a), the BCSFB is also a door to the brain for circulating tPA. Thus, together with endothelial and parenchymal cells that produce tPA, both the BBB and the BCSFB contribute to modulate the levels of tPA in the different compartments of the brain.

When considering inward flux to the brain, CPs have two interesting features: the presence of fenestrations between choroidal endothelial cells and a rich vascular density. Vascular peptides/proteins (even of several hundred kDa) can cross the highly permeable

choroidal endothelium via either fenestrae or vesicular shuttling. When reaching the CPEC basement membrane, some peptides/proteins might enter the CSF via paracellular convection and diffusion through apical tight junctions, while other could undergo transcytosis by pinocytosis, or via a specific receptor-mediated process, including the transferrin receptor, the insulin receptor or members of the low-density lipoprotein (LDL) receptor family. Here, we identified LRP1 of CPEC as a mediator of the transport of tPA from the blood to the CSF.

The lack of polarity of cultured CPECs and the fact that tPA exposure on explants occurs at both sides, do not allow distinguishing influx and efflux processes. *In vivo*, we demonstrate that both influx and efflux of tPA through the CPs exist. A β , has also been shown to be transported and/or taken up by CPs when present either at the apical or basal side, with a preferred CSF-to-blood direction (Fujiyoshi et al., 2011). Thus a single molecule can be internalized and/or transported from both CSF and blood, not only depending on its gradient of concentration, but also on energy dependent systems. The relative efficacy of influx versus efflux transport, which may vary depending on tPA levels circulating in blood and CSF would deserve additional investigation. The relative delay of detection of tPA in the CSF after intravenous administration may suggest that it could come from alternative routes. But since tPA can be found in the stroma and in CPECs very early after delivery through the carotid artery, the CP is undoubtedly an interface allowing the transport of tPA from the blood to the CSF.

Several members of the LDL receptor family have been identified in the CPs, including the LDL receptor (LDLR), LRP1, LRP2 (megalin/gp 330, although probably at low levels (Chun et al., 1999), and LRP8/ApoE receptor 2 (Strazielle & Gherzi-Egea, 2016). None of these has been investigated in relationship with tPA transport in the CPs. Instead, they have received more

attention in the context of Alzheimer’s disease, in particular LRP1 and LRP2 of which A  like tPA, is a ligand. In this context, age and/or disease-related alterations in LRP1 and LRP2 levels could reduce the efflux of A   and concourse to the pathogenesis of Alzheimer’s disease (Crissey et al., 2011; Liu et al., 2014; Stopa et al., 2018). Together with PgP, LRP1 is believed to drive the efflux of A   from the CSF to the blood while LRP2 would drive the influx of A  , together with RAGE. This would imply that LRP1 is expressed at the apical side and LRP2 at the basolateral side of CPECs, which would not be compatible with our findings of an influx of tPA mediated by LRP1. In fact, the literature about the subcellular localization of LRP on CPECs is inconsistent (Zheng et al., 1994; Stockinger et al., 1998; Carro et al., 2005; Crissey et al., 2011). In our hands, *in vivo* immunostainings for LRP1 were stronger at the basal/basolateral sides. Thus, our findings support the hypothesis of a LRP1-dependent influx of tPA, while the efflux may be LRP-1 independent. Altogether, without excluding other mechanisms, our data show that the LRP-1 driven uptake is an important pathway of transport of vascular tPA in CPECs.

Together, the BBB and BCSFB prevent the parenchymal passage of all but a fraction of small uncharged molecules. Accordingly, parenteral delivery results in low levels of drugs in the CNS, which likely limits their efficacy. Interestingly, low energy shockwave pulse has recently been shown to increase the permeation of the BCSFB to some molecules (Kung et al., 2022). Alternative routes of administration including direct delivery into the CSF (intrathecal administration) or into the parenchyma (convection-enhanced delivery) might overcome this limit of parenteral delivery, but are invasive and risky (for review see (Fowler et al., 2020). Receptor-mediated transcytosis may be another promising mechanism to deliver protein through CNS barriers. For instance, molecular trojan based on the fusion of therapeutic protein motifs to antibodies against the transferrin receptor or the insulin receptor allow brain delivery of otherwise non-transportable proteins (Kouhi et al., 2021). The present study adds

to these approaches and opens interesting prospects. We show that vascular tPA can cross the BCSFB via LRP1-mediated transcytosis, as demonstrated earlier at the BBB level (Benchenane et al., 2005a and Benchenane et al., 2005b). Together, both the BBB and BCSFB pathways may allow tPA accessing neurons to modulate their activity. We also determine that among its five functional domains, the finger domain of tPA is mandatory for the transport of tPA across the CPs. Depending on the context, it could be interesting to open, or conversely, to close these two roads to the brain for circulating tPA. For instance, in vasculo-occlusive conditions, engineering a tPA deleted of its finger domain could increase its availability in the blood, together with limited side-effects on the neurovascular unit. On the other hand, some conditions likely require the presence of tPA in the CSF. For instance, reduced tPA CSF levels in AD patients (versus patients with subjective or mild cognitive impairment) have been suggested to contribute to some neurodegenerative pathways of the disease (Hanzel et al., 2014). Restoring tPA levels in the CSF via vascular delivery might counteract this.

Another interesting finding is that while albumin is not normally transported through the CPECs, fusion to the finger domain of tPA this time allowed passage from the blood to the CSF via CPECs. Further studies should explore the actual therapeutic efficacy of such a strategy on protein molecules with known protective actions on brain cells, but unable to reach their target after iv injection.

Conclusions

To summarize, our study shows that the choroid plexus is a door to the brain for vascular tPA. By dissecting the molecular determinants of the passage of tPA across the choroidal epithelium, we uncover opportunities to modulate exchanges from the blood to the central nervous system.

Abbreviations:

Blood-brain-barrier (BBB), cerebrospinal fluid (CSF), blood-CSF-barrier (BCSFB), choroid plexuses (CPs), choroid plexus epithelial cells (CPECs), low density lipoprotein receptor-related protein (LRP), tissue-type plasminogen activator (tPA), transthyretin (TTR)

Declarations

Ethics approval and consent to participate: All experiments were approved by the Ethical Committee and received authorization #11043 from the Ministry of Higher Education, Research and Innovation. The experiments were performed with respect for animal welfare and in accordance with French (decree 87/848) and European (2010/63/EU) regulations.

Consent for publication: Does not apply.

Availability of data and materials: The datasets analyzed during the current study are available from the corresponding author on request.

Competing interests: none.

Funding: This work was funded by the Institut National de la Santé Et de la Recherche Médicale, Caen Normandy University and the Regional Council of Normandy.

Authors' contributions: C. Ali, D. Vivien, S. Martinez de Lizarrondo, M. Gauberti and V. Zuba conceptualized the study. L. Lebouvier and Y. Hommet produced the recombinant proteins. V. Zuba, J. Furon, M. Bellemain-Sagnard and M. Rubio performed the experiments, performed data acquisition and analysis. C. Ali, J. Furon and V. Zuba wrote the manuscript. C. Ali and D. Vivien supervised the project and secured funding. All the Authors reviewed the manuscript.

Acknowledgements: We are grateful to Dr. Benoit Roussel for his technical advices.

References

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>

Arnaud, K., Oliveira Moreira, V., Vincent, J., Dallerac, G., Dubreuil, C., Dupont, E., Richter, M., Müller, U. C., Rondi-Reig, L., Prochiantz, A., & Di Nardo, A. A. (2021). Choroid plexus APP regulates adult brain proliferation and animal behavior. *Life Science Alliance*, 4(11). <https://doi.org/10.26508/lsa.202000703>

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., Berezowski, V., Fernández-Monreal, M., Brillault, J., Valable, S., Dehouck, M.-P., Cecchelli, R., Vivien, D., Touzani, O., & Ali, C. (2005). Oxygen Glucose Deprivation Switches the Transport of tPA Across the Blood–Brain Barrier From an LRP-Dependent to an Increased LRP-Independent Process. *Stroke*, 36(5), 1059–1064. <https://doi.org/10.1161/01.STR.0000163050.39122.4f>

Bors, L., Tóth, K., Tóth, E. Z., Bajza, Á., Csorba, A., Szigeti, K., Máthé, D., Perlaki, G., Orsi, G., Tóth, G. K., & Erdő, F. (2018). Age-dependent changes at the blood-brain barrier. A Comparative structural and functional study in young adult and middle aged rats. *Brain*

Research Bulletin, 139(January), 269–277.

<https://doi.org/10.1016/j.brainresbull.2018.03.001>

Bryniarski, M. A., Ren, T., Rizvi, A. R., Snyder, A. M., & Morris, M. E. (2020). Targeting the Choroid Plexuses for Protein Drug Delivery. *Pharmaceutics*, 12(10), 963. <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics12100963>

Carro, E., Spuch, C., Trejo, J. L., Antequera, D., & Torres-Aleman, I. (2005). Choroid Plexus Megalin Is Involved in Neuroprotection by Serum Insulin-Like Growth Factor I. *Journal of Neuroscience*, 25(47), 10884–10893. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.2909-05.2005>

Chun, J. T., Wang, L., Pasinetti, G. M., Finch, C. E., & Zlokovic, B. V. (1999). Glycoprotein 330/Megalin (LRP-2) Has Low Prevalence as mRNA and Protein in Brain Microvessels and Choroid Plexus. *Experimental Neurology*, 157(1), 194–201. <https://doi.org/10.1006/exnr.1999.7052>

Coisne, C., & Engelhardt, B. (2011). Tight Junctions in Brain Barriers During Central Nervous System Inflammation. *Antioxidants & Redox Signaling*, 15(5), 1285–1303. <https://doi.org/10.1089/ars.2011.3929>

Collen, D., Lu, H. R., Lijnen, H. R., Nelles, L., & Stassen, J. M. (1991). Thrombolytic and pharmacokinetic properties of chimeric tissue-type and urokinase-type plasminogen activators. *Circulation*, 84(3), 1216–1234. <https://doi.org/10.1161/01.CIR.84.3.1216>

Crissey, P., Miller, M. C., Chiu, C., Boylan, M., Caralopoulos, I. N., Gonzalez, L., Johanson, C. E., & Silverberg, G. D. (2011). Amyloid-beta transporter expression at the blood-CSF barrier is age-dependent. *Fluids and Barriers of the CNS*, 8(1), 21. <https://doi.org/10.1186/2045-8118-8-21>

Dandy, W. E., & Blackfan, K. D. (1919). INTERNAL HYDROCEPHALUS. *Journal of Neurosurgery*, 21(7), 588–635. <https://doi.org/10.3171/jns.1964.21.7.0588>

Engelhardt, B., & Sorokin, L. (2009). The blood–brain and the blood–cerebrospinal fluid barriers: function and dysfunction. *Seminars in Immunopathology*, 31(4), 497–511. <https://doi.org/10.1007/s00281-009-0177-0>

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>

Fowler, M., Cotter, J., Knight, B., Sevic-Muraca, E., Sandberg, D., & Sirianni, R. (2020). Intrathecal Drug Delivery in the Era of Nanomedicine M. In *Physiology & behavior*. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2020.02.006>. Intrathecal

Fujiyoshi, M., Tachikawa, M., Ohtsuki, S., Ito, S., Uchida, Y., Akanuma, S., Kamiie, J., Hashimoto, T., Hosoya, K., Iwatsubo, T., & Terasaki, T. (2011). Amyloid- β peptide(1-40) elimination from cerebrospinal fluid involves low-density lipoprotein receptor-related protein 1 at the blood-cerebrospinal fluid barrier. *Journal of Neurochemistry*, 118(3), 407–415. <https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.2011.07311.x>

Gherzi-Egea, J.-F., Strazielle, N., Catala, M., Silva-Vargas, V., Doetsch, F., & Engelhardt, B. (2018). Molecular anatomy and functions of the choroidal blood-cerebrospinal fluid barrier in health and disease. *Acta Neuropathologica*, 135(3), 337–361. <https://doi.org/10.1007/s00401-018-1807-1>

Hacke, W., Lyden, P., Emberson, J., Baigent, C., Blackwell, L., Albers, G., Bluhmki, E., Brott, T., Cohen, G., Davis, S. M., Donnan, G. A., Grotta, J. C., Howard, G., Kaste, M., Koga, M., von Kummer, R., Lansberg, M. G., Lindley, R. I., Olivot, J.-M., ... Lees, K. R. (2018). Effects of alteplase for acute stroke according to criteria defining the European Union and United States marketing authorizations: Individual-patient-data meta-analysis of randomized trials. *International Journal of Stroke*, 13(2), 175–189. <https://doi.org/10.1177/1747493017744464>

Hanzel, C. E., Iulita, M. F., Eyjolfssdottir, H., Hjorth, E., Schultzberg, M., Eriksdotter, M., & Cuello, A. C. (2014). Analysis of Matrix Metallo-Proteases and the Plasminogen System in Mild Cognitive Impairment and Alzheimer’s Disease Cerebrospinal Fluid. *Journal of Alzheimer’s Disease*, 40(3), 667–678. <https://doi.org/10.3233/JAD-132282>

Huber, J. D., Egleton, R. D., & Davis, T. P. (2001). Molecular physiology and pathophysiology of tight junctions in the blood–brain barrier. *Trends in Neurosciences*, 24(12), 719–725. [https://doi.org/10.1016/S0166-2236\(00\)02004-X](https://doi.org/10.1016/S0166-2236(00)02004-X)

Izcovich, A., Criniti, J. M., Popoff, F., Lu, L., Wu, J., Ageno, W., Witt, D. M., Jaff, M. R., Schulman, S., Manja, V., Verhamme, P., Rada, G., Zhang, Y., Nieuwlaat, R., Wiercioch, W., Schünemann, H. J., & Neumann, I. (2020). Thrombolytics for venous thromboembolic events: a systematic review with meta-analysis. *Blood Advances*, 4(7), 1539–1553. <https://doi.org/10.1182/bloodadvances.2020001513>

Kaur, C., Rathnasamy, G., & Ling, E.-A. (2016). The Choroid Plexus in Healthy and Diseased Brain. *Journal of Neuropathology & Experimental Neurology*, 75(3), 198–213. <https://doi.org/10.1093/jnen/nlv030>

Kouhi, A., Pachipulusu, V., Kapenstein, T., Hu, P., Epstein, A. L., & Khawli, L. A. (2021). Brain Disposition of Antibody-Based Therapeutics: Dogma, Approaches and Perspectives. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(12), 6442. <https://doi.org/10.3390/ijms22126442>

Kung, Y., Chen, K. Y., Liao, W. H., Hsu, Y. H., Wu, C. H., Hsiao, M. Y., Huang, A. P. H., & Chen, W. S. (2022). Facilitating drug delivery in the central nervous system by opening the blood-cerebrospinal fluid barrier with a single low energy shockwave pulse. *Fluids and Barriers of the CNS*, 19(1), 1–13. <https://doi.org/10.1186/s12987-021-00303-x>

Lazarevic, I., & Engelhardt, B. (2015). Modeling immune functions of the mouse blood–cerebrospinal fluid barrier in vitro: primary rather than immortalized mouse choroid plexus epithelial cells are suited to study immune cell migration across this brain barrier. *Fluids and Barriers of the CNS*, 13(1), 2. <https://doi.org/10.1186/s12987-016-0027-0>

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(2), 139–148. <https://doi.org/10.1242/jcs.110.2.139>

Liu, C.-B., Wang, R., Dong, M.-W., Gao, X.-R., & Yu, F. (2014). Amyloid-beta transporter expression at the choroid plexus in normal aging: the possibility of reduced resistance to oxidative stress insults. *Sheng Li Xue Bao : [Acta Physiologica Sinica]*, 66(2), 158–168. <https://doi.org/10.13294/j.aps.2014.0019>

Llovera, G., Benakis, C., Enzmann, G., Cai, R., Arzberger, T., Ghasemigharagoz, A., Mao, X., Malik, R., Lazarevic, I., Liebscher, S., Ertürk, A., Meissner, L., Vivien, D., Haffner, C., Plesnila, N., Montaner, J., Engelhardt, B., & Liesz, A. (2017). The choroid plexus is a key cerebral invasion

route for T cells after stroke. *Acta Neuropathologica*, 134(6), 851–868.

<https://doi.org/10.1007/s00401-017-1758-y>

Macrez, R., Ortega, M. C., Bardou, I., Mehra, A., Fournier, A., Van Der Pol, S. M. A., Haelewyn, B., Maubert, E., Lesept, F., Chevilley, A., De Castro, F., De Vries, H. E., Vivien, D., Clemente, D., & Docagne, F. (2016). Neuroendothelial NMDA receptors as therapeutic targets in experimental autoimmune encephalomyelitis. *Brain*, 139(9), 2406–2419.

<https://doi.org/10.1093/brain/aww172>

Monnot, A. D., & Zheng, W. (2013). Culture of choroid plexus epithelial cells and in vitro model of blood-CSF barrier. *Methods in Molecular Biology* (Clifton, N.J.), 945(3), 13–29.

https://doi.org/10.1007/978-1-62703-125-7_2

Moorea, S. A., & Oglesbeeb, M. J. (2012). Involvement of the choroid plexus in the inflammatory response after acute spinal cord injury in dogs: An immunohistochemical study.

Vet Immunol Immunopathol, 148(0), 348–352.

<https://doi.org/10.1016/j.vetimm.2012.07.001>.Involvement

Nicole, O., Docagne, F., Ali, C., Margail, 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), 59–64. <https://doi.org/10.1038/83358>

Nishihara, H., Soldati, S., Mossu, A., Rosito, M., Rudolph, H., Muller, W. A., Latorre, D., Sallusto, F., Sospedra, M., Martin, R., Ishikawa, H., Tenenbaum, T., Schroten, H., Gosselet, F., & Engelhardt, B. (2020). Human CD4+ T cell subsets differ in their abilities to cross endothelial and epithelial brain barriers in vitro. *Fluids and Barriers of the CNS*, 17(1), 1–18.

<https://doi.org/10.1186/s12987-019-0165-2>

Planques, A., Oliveira Moreira, V., Dubreuil, C., Prochiantz, A., & Di Nardo, A. A. (2019). OTX2 Signals from the Choroid Plexus to Regulate Adult Neurogenesis. *Eneuro*, 6(2), ENEURO.0262-18.2019. <https://doi.org/10.1523/ENEURO.0262-18.2019>

Shechter, R., Miller, O., Yovel, G., Rosenzweig, N., London, A., Julia, R., Kim, K.-W., Klein, E., Kalchenko, V., Bendel, P., Lira, S. A., Jung, S., & Schwartz, M. (2013). Recruitment of Beneficial M2 Macrophages to Injured Spinal Cord Is Orchestrated by Remote Brain Choroid Plexus. *Immunity*, 38(3), 555–569. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2013.02.012>.Recruitment

Shiple, F. B., Dani, N., Xu, H., Deister, C., Cui, J., Head, J. P., Sadegh, C., Fame, R. M., Shannon, M. L., Flores, V. I., Kishkovich, T., Jang, E., Klein, E. M., Goldey, G. J., He, K., Zhang, Y., Holtzman, M. J., Kirchhausen, T., Wyart, C., ... Lehtinen, M. K. (2020). Tracking Calcium Dynamics and Immune Surveillance at the Choroid Plexus Blood-Cerebrospinal Fluid Interface. *Neuron*, 108(4), 623–639. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2020.08.024>.Tracking

Solár, P., Zamani, A., Kubíčková, L., Dubový, P., & Joukal, M. (2020). Choroid plexus and the blood–cerebrospinal fluid barrier in disease. *Fluids and Barriers of the CNS*, 17(1), 35. <https://doi.org/10.1186/s12987-020-00196-2>

Spector, R., Keep, R. F., Robert Snodgrass, S., Smith, Q. R., & Johanson, C. E. (2015). A balanced view of choroid plexus structure and function: Focus on adult humans. *Experimental Neurology*, 267, 78–86. <https://doi.org/10.1016/j.expneurol.2015.02.032>

Stockinger, W., Hengstschläger-Ott, E., Novak, S., Matus, A., Hüttinger, M., Bauer, J., Lassmann, H., Schneider, W. J., & Nimpf, J. (1998). The Low Density Lipoprotein Receptor Gene Family. *Journal of Biological Chemistry*, 273(48), 32213–32221. <https://doi.org/10.1074/jbc.273.48.32213>

Stopa, E. G., Tanis, K. Q., Miller, M. C., Nikonova, E. V., Podtelezhnikov, A. A., Finney, E. M., Stone, D. J., Camargo, L. M., Parker, L., Verma, A., Baird, A., Donahue, J. E., Torabi, T., Eliceiri, B. P., Silverberg, G. D., & Johanson, C. E. (2018). Comparative transcriptomics of choroid plexus in Alzheimer's disease, frontotemporal dementia and Huntington's disease: implications for CSF homeostasis. *Fluids and Barriers of the CNS*, 15(1), 18. <https://doi.org/10.1186/s12987-018-0102-9>

Strazielle, N., & Gherzi-Egea, J.-F. (2016). Potential Pathways for CNS Drug Delivery Across the Blood-Cerebrospinal Fluid Barrier. *Current Pharmaceutical Design*, 22(35), 5463–5476. <https://doi.org/10.2174/1381612822666160726112115>

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. *The Lancet Neurology*, 17(12), 1121–1132. [https://doi.org/10.1016/S1474-4422\(18\)30323-5](https://doi.org/10.1016/S1474-4422(18)30323-5)

Tietz, S., & Engelhardt, B. (2015). Brain barriers: Crosstalk between complex tight junctions and adherens junctions. *Journal of Cell Biology*, 209(4), 493–506. <https://doi.org/10.1083/jcb.201412147>

Vercellino, M., Votta, B., Condello, C., Piacentino, C., Romagnolo, A., Merola, A., Capello, E., Mancardi, G. L., Mutani, R., Giordana, M. T., & Cavalla, P. (2008). Involvement of the choroid plexus in multiple sclerosis autoimmune inflammation: A neuropathological study. *Journal of Neuroimmunology*, 199(1–2), 133–141. <https://doi.org/10.1016/j.jneuroim.2008.04.035>

Wardlaw, J. M., Murray, V., Berge, E., del Zoppo, G., Sandercock, P., Lindley, R. L., & Cohen, G. (2012). Recombinant tissue plasminogen activator for acute ischaemic stroke: an updated

systematic review and meta-analysis. *The Lancet*, 379(9834), 2364–2372.

[https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(12\)60738-7](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(12)60738-7)

Xiang, J., Routhe, L. J., Andrew Wilkinson, D., Hua, Y., Moos, T., Xi, G., & Keep, R. F. (2017). The choroid plexus as a site of damage in hemorrhagic and ischemic stroke and its role in responding to injury. *Fluids and Barriers of the CNS*, 14(1), 1–13.

<https://doi.org/10.1186/s12987-017-0056-3>

Zheng, G., Bachinsky, D. R., Stamenkovic, I., Strickland, D. K., Brown, D., Andres, G., & McCluskey, R. T. (1994). Organ distribution in rats of two members of the low-density lipoprotein receptor gene family, gp330 and LRP/alpha 2MR, and the receptor-associated protein (RAP). *Journal of Histochemistry & Cytochemistry*, 42(4), 531–542.

<https://doi.org/10.1177/42.4.7510321>

Zheng, Z., Nayak, L., Wang, W., Yurdagul, A., Wang, X., Cai, B., Lapping, S., Ozcan, L., Ramakrishnan, R., Pestell, R. G., Jain, M. K., & Tabas, I. (2019). An ATF6-tPA pathway in hepatocytes contributes to systemic fibrinolysis and is repressed by DACH1. *Blood*, 133(7), 743–753.

<https://doi.org/10.1182/blood-2018-07-864843>

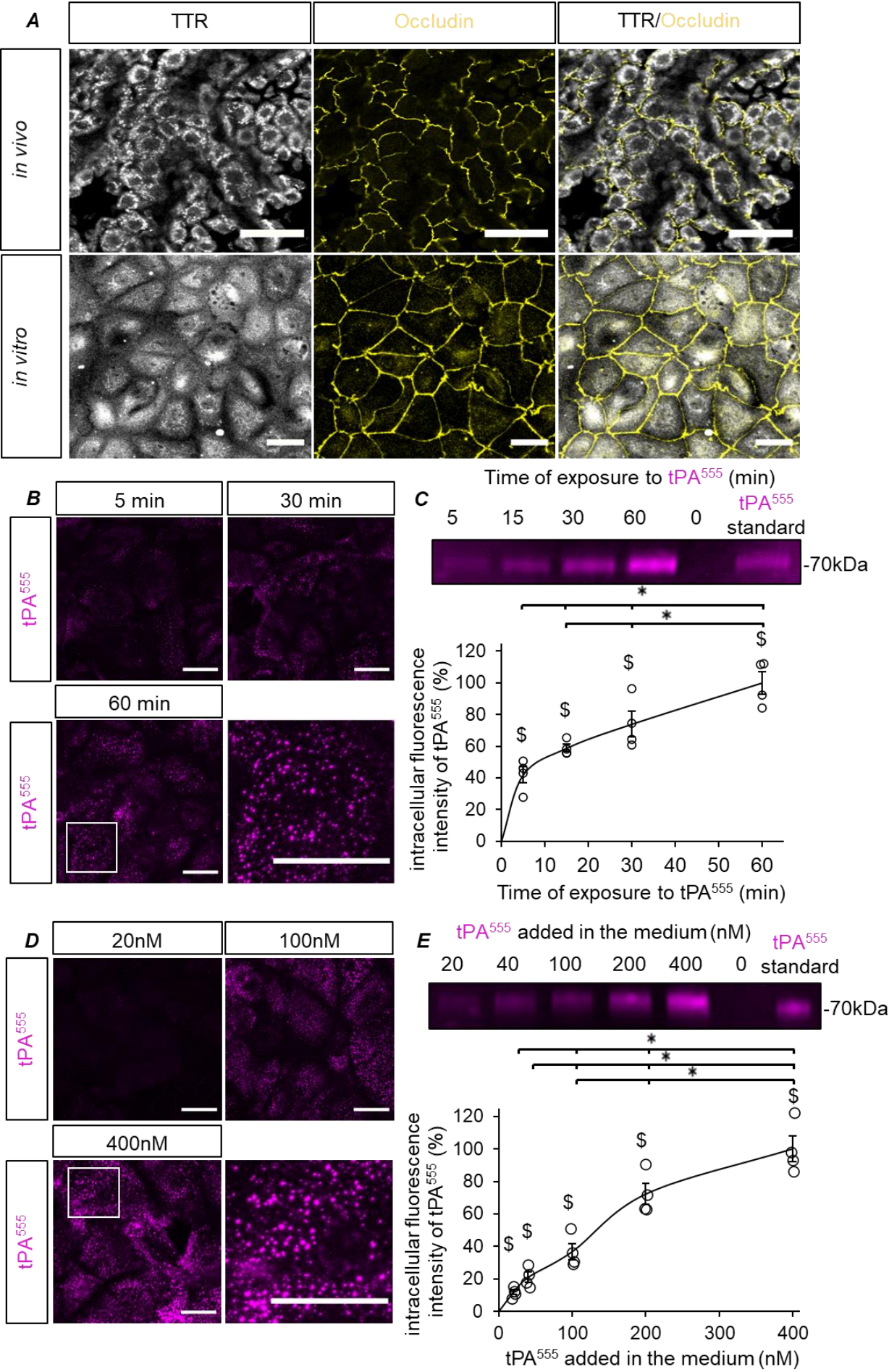


Figure 1: CPECs uptake tPA *in vitro*. **A**, Photomicrographs show that both CPECs in culture (top panel) and CPECs *in situ* (lower panel) express the marker TTR (white) and tight junctions (Occludin, yellow), scale bar 30µm. **B-E**, Primary cultures of CPECs were exposed to 40nM tPA⁵⁵⁵ for 5-60min (**B-C**) or to tPA⁵⁵⁵ (20-400nM) for 15min (**D-E**). (**B, D**) Photomicrographs (representative of n=4) show time- and dose-dependent accumulation of tPA⁵⁵⁵ (magenta) in cell monolayers. Higher magnifications suggest an accumulation in vesicles; scale bar 40µm. (**C, E**) Electrophoresis (representative of n=4) and corresponding quantifications of fluorescence (expressed as percentage of maximal uptake; mean ±SEM; n=4) of protein extracts from monolayer of CPECs exposed to tPA⁵⁵⁵ (40nM) for 5-60min (**B-C**) or to 20-400nM tPA⁵⁵⁵ for 15min (**D-E**). * Significant difference ($p<0.05$), \$ significant difference *versus* control

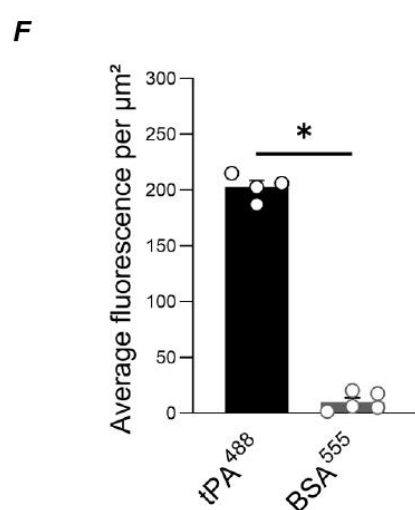
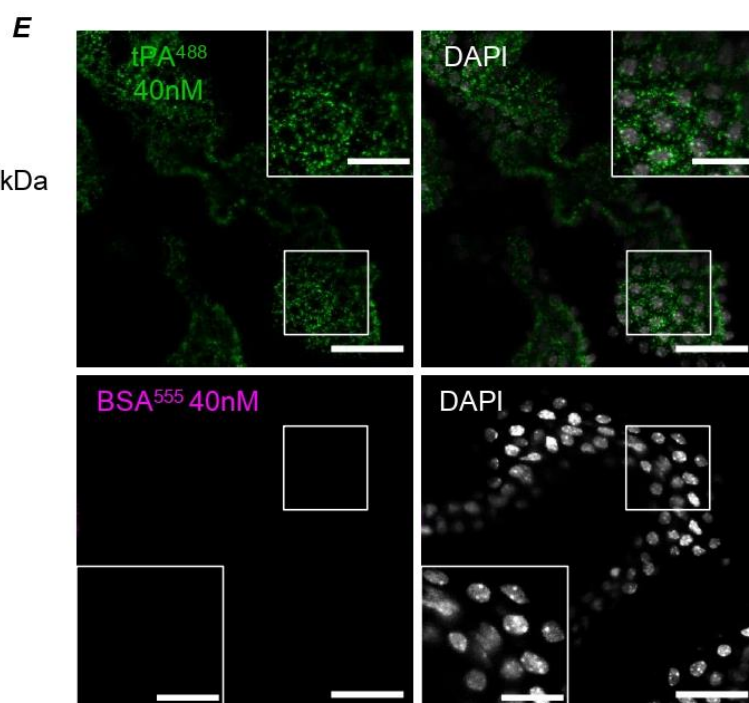
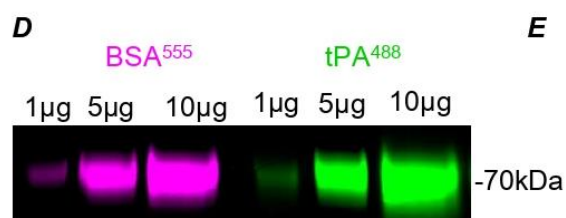
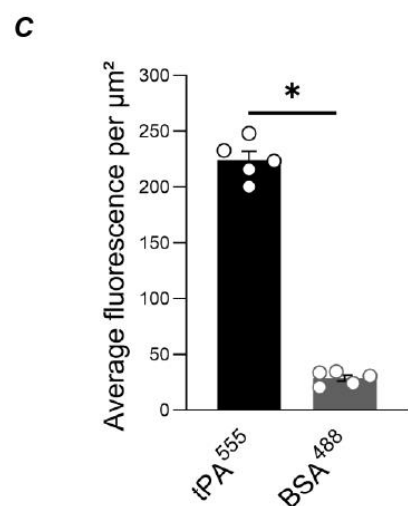
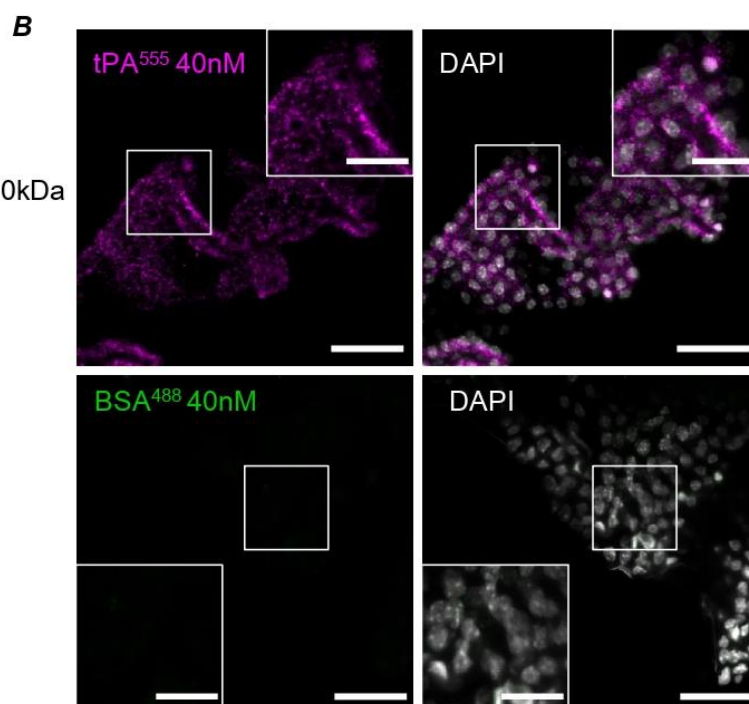
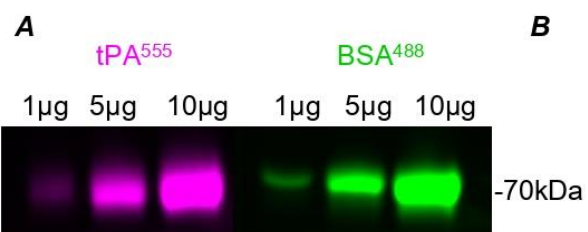


Figure 2: CPECs uptake tPA *ex vivo*. Freshly isolated CP explants were treated for 15min with tPA and BSA (40nM each), alternatively coupled to Alexa⁵⁵⁵ or Alexa⁴⁸⁸. **A**, Dose-dependent fluorescent signal generated by tPA⁵⁵⁵ (magenta) and BSA⁴⁸⁸ (green) after SDS-PAGE. **B**, Representative confocal photomicrographs of CP explants exposed 15min to 40nM of tPA⁵⁵⁵ (magenta), BSA⁴⁸⁸ (green) and DAPI staining (white). Scale bar 40µm and 30µm in the magnified inserts. **C**, Graph shows quantification of fluorescence in CP explants (n=5, mean ±SEM), * Significant difference ($p<0.05$). **D**, Dose-dependent fluorescent signal generated by tPA⁴⁸⁸ (green) and BSA⁵⁵⁵ (magenta) after SDS-PAGE. **E**, Representative confocal photomicrographs of CP explants exposed 15min to 40nM of tPA⁴⁸⁸ (green), BSA⁵⁵⁵ (magenta) and DAPI staining (white). Scale bar 40µm and 30µm in the magnified inserts. **F**, Graph shows quantification of fluorescence in CP explants (n=5, mean ±SEM), * Significant difference ($p<0.05$).

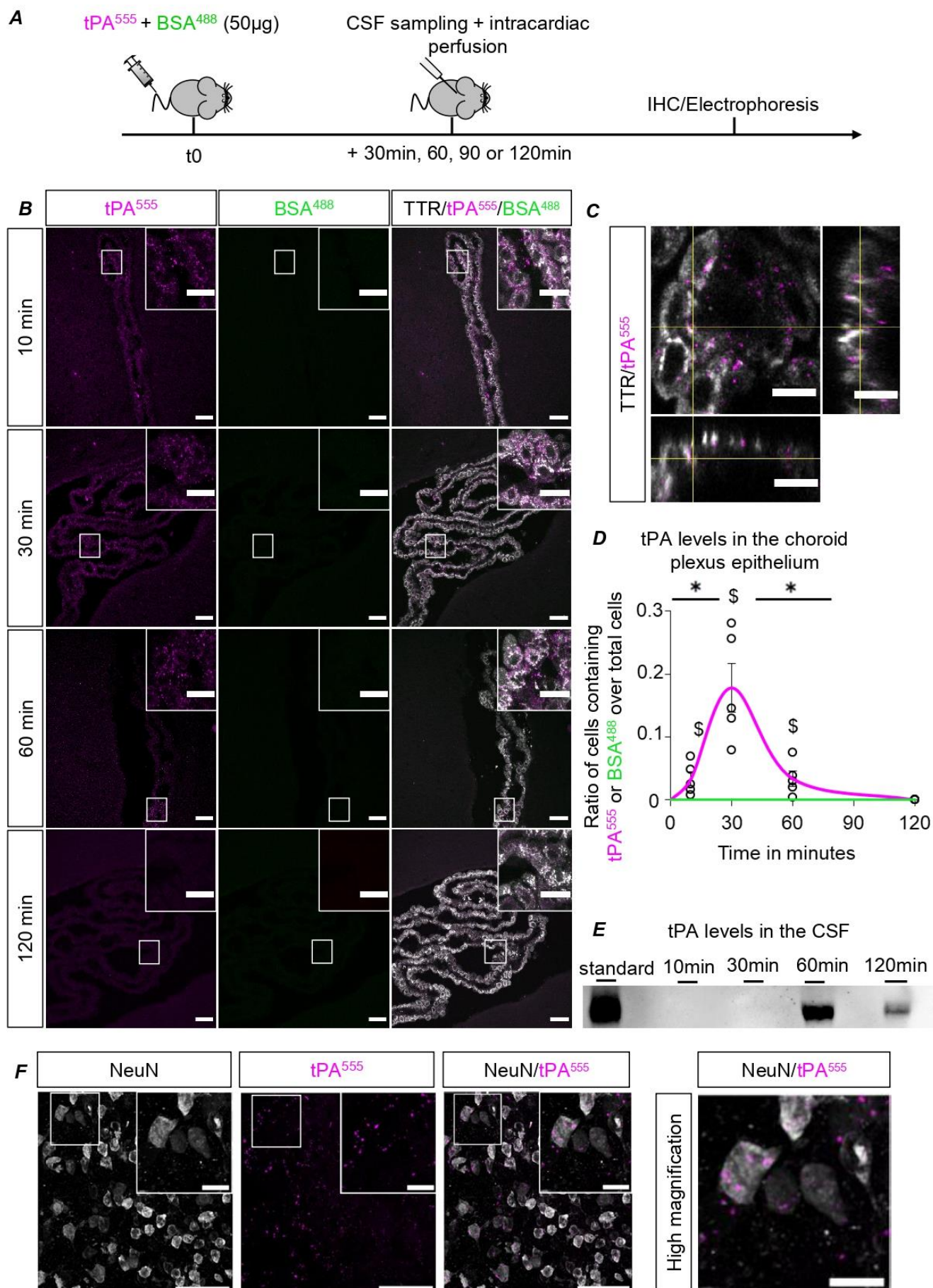


Figure 3: CPECs uptake tPA *in vivo*. **A**, Experimental design: mice were injected intravenously with 50µg of tPA⁵⁵⁵ and BSA⁴⁸⁸, CSF and brains were harvested 10, 30, 60 or 120min later for protein analysis by electrophoresis and immunohistochemistry, respectively. **B**, Confocal photomicrographs of CPs sections (representative of n=5) with tPA⁵⁵⁵ (magenta), BSA⁴⁸⁸ (green) and TTR (white) staining, scale bar 40µm and 20µm in the magnified inserts. **C**, Confocal photomicrograph of a CP section (representative of n=5), tPA⁵⁵⁵ (magenta) and TTR (white) staining, panels show projection over the XZ axis (bottom) and over the YZ axis (right), scale bar 10µm. **D**, Graph shows mean ratio ±SEM (n=5) of CPECs containing tPA⁵⁵⁵ or BSA⁴⁸⁸ over total CPECs. The magenta curve corresponds to tPA⁵⁵⁵ and the green one to BSA⁴⁸⁸, * significant difference ($p<0.05$), \$ significant difference from 0min and 120min ($p=0.008$). **E**, Western-Blot for tPA levels in the CSF samples at each time-point. **F**, Confocal photomicrographs acquired in the brain parenchyma (representative of n=5) with tPA⁵⁵⁵ (magenta) and NeuN (white) staining, scale bar 40µm and 10µm in the magnified inserts.

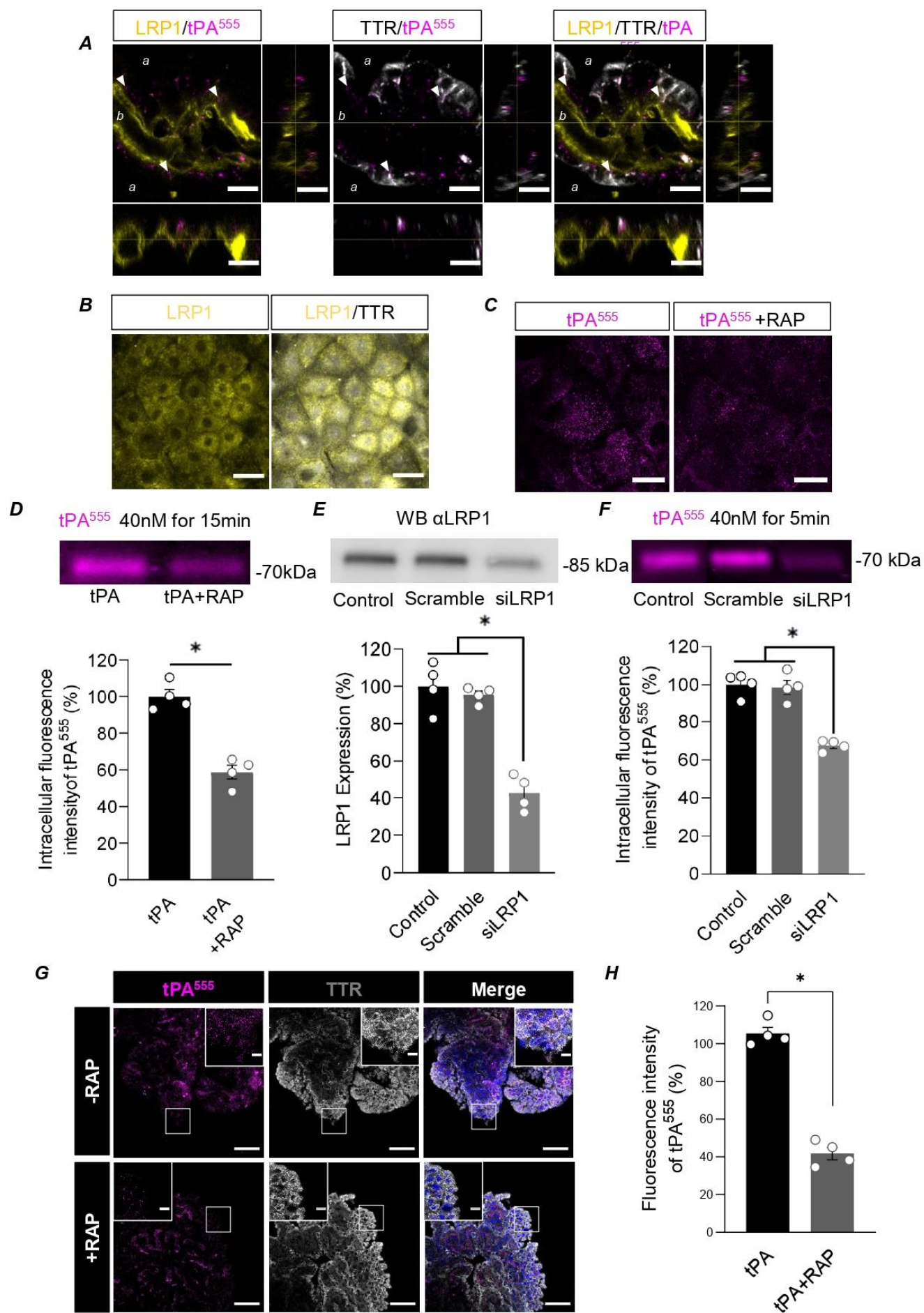


Figure 4: Internalization of tPA CPECs is an active process, mediated by LRP1. **A**, Representative photomicrographs (n=5) of CPs harvested from mice intravenously injected with tPA⁵⁵⁵ (tPA⁵⁵⁵ in magenta, LRP1 in yellow, and TTR in white); panels show projection over the XZ axis (bottom) and over the YZ axis (right), scale bar 10µm. Arrowheads point examples of tPA⁵⁵⁵ dots that can be found close to LRP1 staining in TTR positive cells. a: apical side; b: basal side. **B**, Representative photomicrographs (n=4) of cultured CPECs show LRP1 (yellow) and TTR (white), scale bar 40µm. **C**, Representative photomicrographs (n=4) of CPECs exposed for 15 minutes to tPA⁵⁵⁵ (40 nM) alone or with RAP (500nM), scale bar 40µm. **D**, Representative electrophoresis (representative of n=4) and corresponding quantification (mean ± SEM, * significant difference ($p < 0.05$)), of protein extracts from monolayer of CPECs exposed for 15 minutes to tPA⁵⁵⁵ (40nM) alone or with RAP (500nM). **E**, Representative western blot against LRP1 and corresponding quantification after transfection of cultured CPECs with nothing (Control), negative control (Scramble) or siRNA anti-LRP1 (siLRP1) (n=4, mean ± SEM of LRP1 expressed as percentage of control). **F**, Representative electrophoresis and corresponding quantification of protein extracts from monolayer of CPECs exposed for 15 minutes to tPA⁵⁵⁵ (40nM) after transfection with control, scramble or siLRP1 (n=4, mean ± SEM of LRP1 expressed as percentage of control). **G-H**, mice were injected intravenously with 50µg of tPA⁵⁵⁵ alone or together with 90µg of RAP. 30min later, PCs were freshly isolated for immunohistochemistry. **G**, Representative confocal photomicrographs (n=4) of a stack of CPs explants, with tPA⁵⁵⁵ (magenta), TTR (white) and DAPI (blue) staining. **H**, Quantifications of tPA⁵⁵⁵ fluorescence intensity in CPs explants. Scale bar 50µm and 10µm in the magnified inserts.

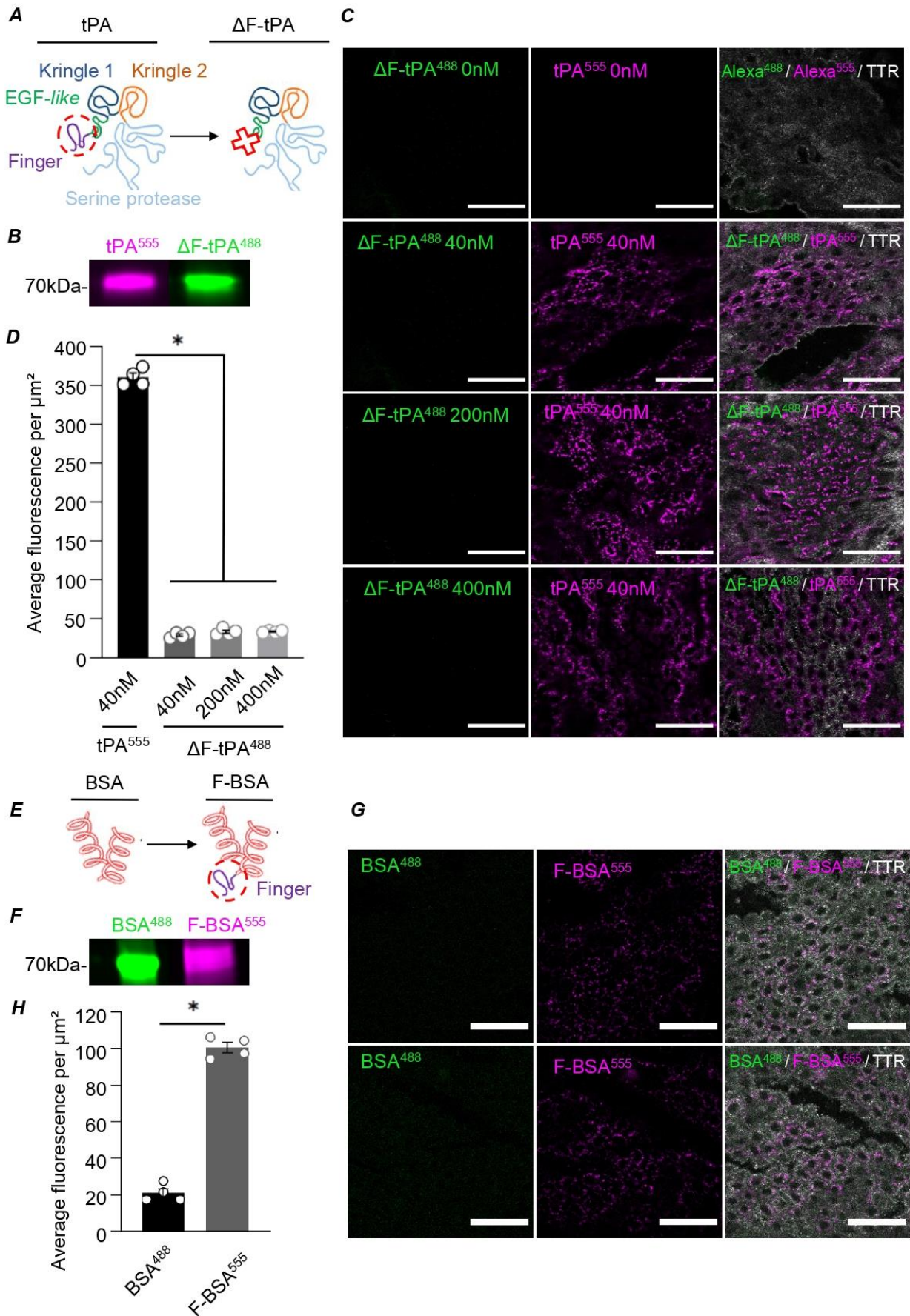


Figure 5: The Finger domain of tPA allows the internalization of tPA and BSA by CPECs *ex vivo*. **A**, Schematic representation of the functional domains of tPA and its mutant form ΔF -tPA, deleted of the finger domain. **B**, Electrophoresis of 5 μ g of tPA⁵⁵⁵ (magenta) and ΔF tPA⁴⁸⁸ (green) in SDS-PAGE and revelation in fluorescence. **C-D**, Representative photomicrographs and corresponding quantifications of CPs explants exposed to tPA⁵⁵⁵ (40nM) and ΔF -tPA⁴⁸⁸ (40nM, 200nM or 400nM) for 15min (n=4, mean $\pm$ SEM). **E**, Schematic representation of BSA and its mutant form F-BSA, adding the finger domain of tPA. **F**, Electrophoresis of 5 μ g of BSA⁴⁸⁸ (green) and F-BSA⁵⁵⁵ (magenta) in SDS-PAGE and revelation in fluorescence. **G, H**, Representative photomicrographs and corresponding quantifications of CPs explants exposed to BSA⁴⁸⁸ (40nM) and F-BSA⁵⁵⁵ (40nM) for 15min (n=4, mean $\pm$ SEM). TTR staining (white) is shown on the merged images (C and F). Scale bar: 40 μ m.

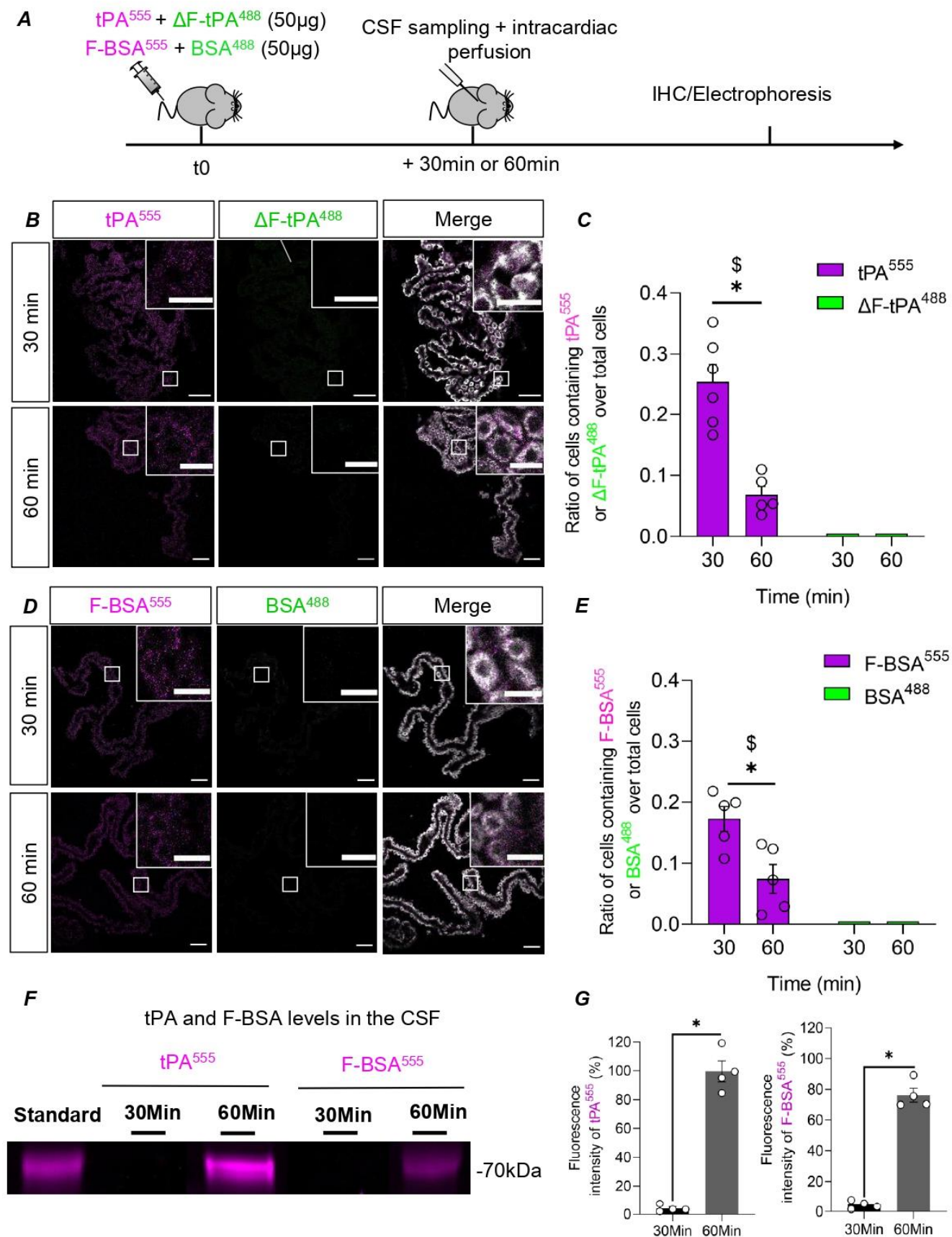


Figure 6: The Finger domain of tPA allows the transport of tPA and BSA across the BCSF barrier *in vivo*. **A**, Experimental design: mice were injected intravenously with 50  g of tPA⁵⁵⁵/  F-tPA⁴⁸⁸ or F-BSA⁵⁵⁵/BSA⁴⁸⁸, CSF and brains were harvested 30 or 60min later for protein analysis by electrophoresis and immunohistochemistry, respectively. **B-C**, Representative confocal photomicrographs and corresponding quantification (mean ratio of CPECs containing tPA⁵⁵⁵ or   F-tPA⁴⁸⁸ over total CPECs   SEM, n=5) of CPs sections with tPA⁵⁵⁵ (magenta),   F-tPA⁴⁸⁸ (green) and TTR (white) staining; scale bar 40  m and 20  m in the magnified inserts. * significant difference ($p<0.05$), \$ significant difference from 0min ($p=0.0022$). **D-E**, Representative confocal photomicrographs and corresponding quantification (mean ratio of CPECs containing tPA⁵⁵⁵ or   F-tPA⁴⁸⁸ over total CPECs   SEM, n=5) of CPs sections with F-BSA⁵⁵⁵ (magenta), BSA⁴⁸⁸ (green) and TTR (white) staining; scale bar 40  m and 20  m in the magnified inserts. * significant difference ($p<0.05$), \$ significant difference from 0min ($p=0.0079$). **F-G**, Representative electrophoresis and corresponding quantification for tPA⁵⁵⁵ and F-BSA⁵⁵⁵ levels in CSF samples at 30 and 60min (mean   SEM, n=4).

Supplementary materials

Material and methods:

Co-localization study

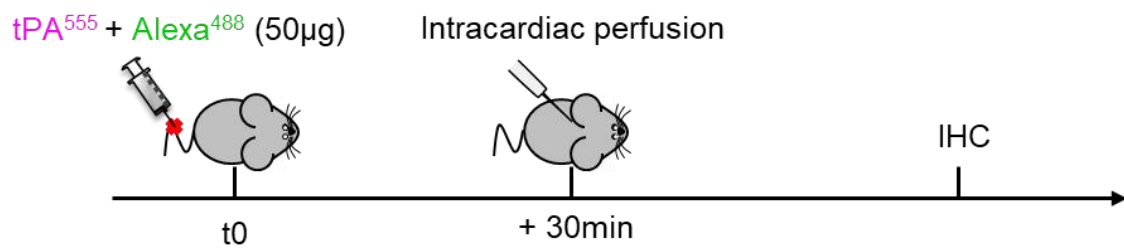
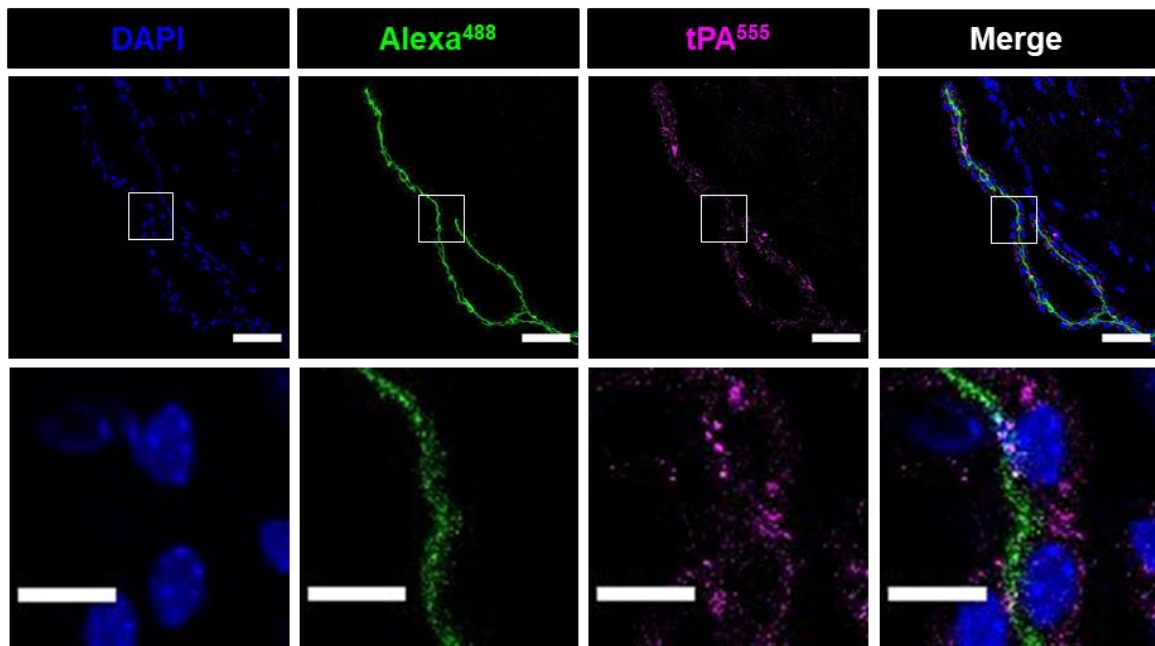
To determine if tPA was internalized via clathrin-coated endocytosis vesicles, CPs harvested 10 min after injection of tPA⁵⁵⁵, fixed and immunostained for the AP2 adaptator complex (1:500, Abcam Ab2730). Images acquired by confocal microscopy were also analysed using the *Imaris* Microscopy Image Analysis Software, to ensure co-localization between tPA and AP2 via the calculation of the Pearson's coefficient (from 6 different slices/ROIs).

Intracerebroventricular injection of Alexa-coupled recombinant tPA

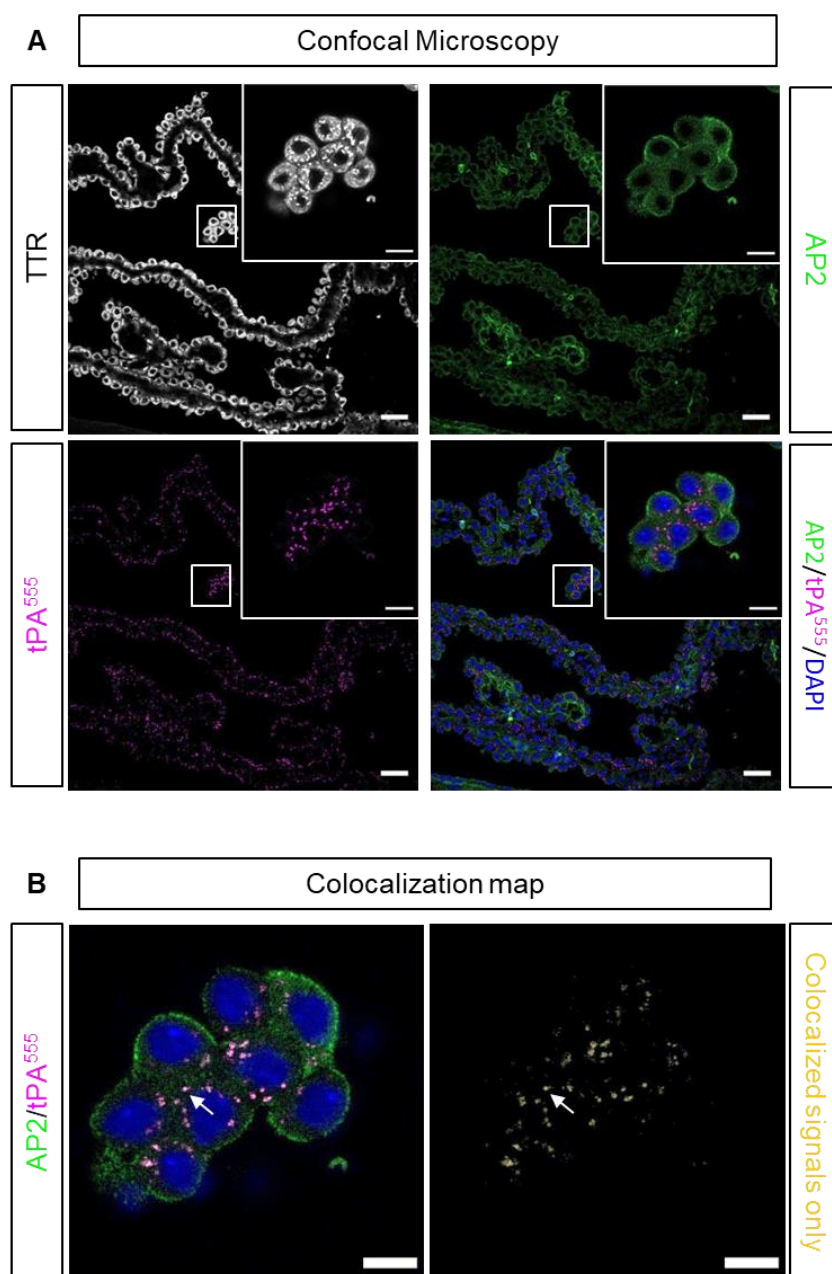
Anesthetized mice were placed in a stereotaxic frame. Lidocaine (a local pain reliever) was applied on the incision plan 5 minutes before surgery. The skin was incised in order to unmask the skull a small craniotomy was performed (coordinates -0.2mm anteroposterior; +1mm lateral; -2mm depth from bregma). A glass micropipette containing 1µL of Alexa-coupled recombinant tPA (0.9 mg/mL) was inserted and the content was gently injected in the left lateral ventricle at a rate of 0.25µL/min. The glass pipette was left in place 2 min after injection and slowly removed to prevent reflux.

Intra-carotidian injection of Alexa-coupled recombinant tPA

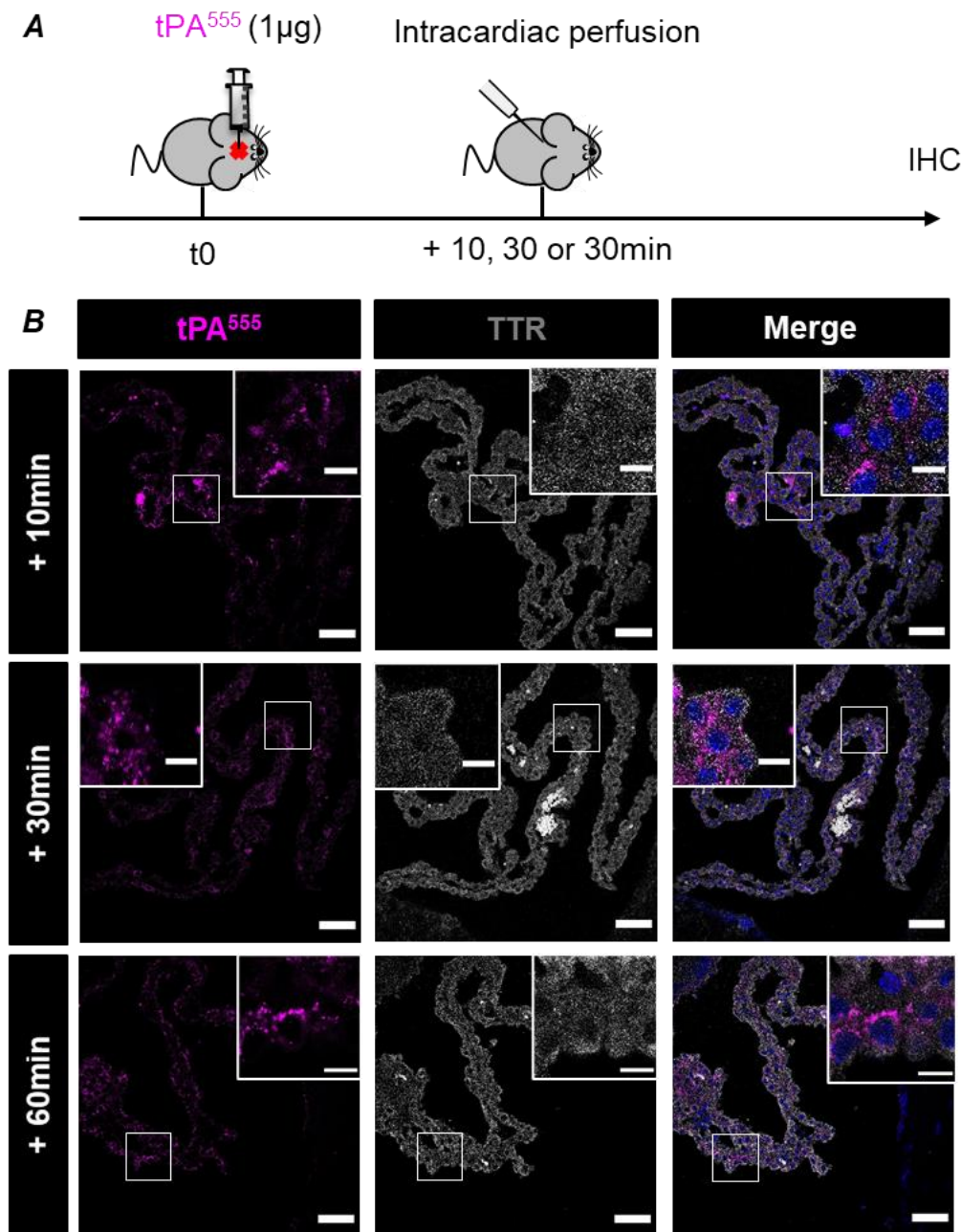
Anesthetized mice were placed on the back and a midline incision was performed in the neck. The Right Common Carotid Artery was isolated. A Piece of Whatman[™] Filter Paper Strip was placed under the artery, then a catheter was inserted. 50µg of tPA⁵⁵⁵ were injected in 200µL of saline (0.9% NaCl) over approximately 5 seconds. Afterwards, brains were harvested, and PCs freshly isolated. PCs were rinsed three times with PBS, fixed with 4% paraformaldehyde in PBS 0.1 M and pH 7.4, for 15min, placed on poly-lysine slides, mounted in Fluoromount-G®.

A**B**

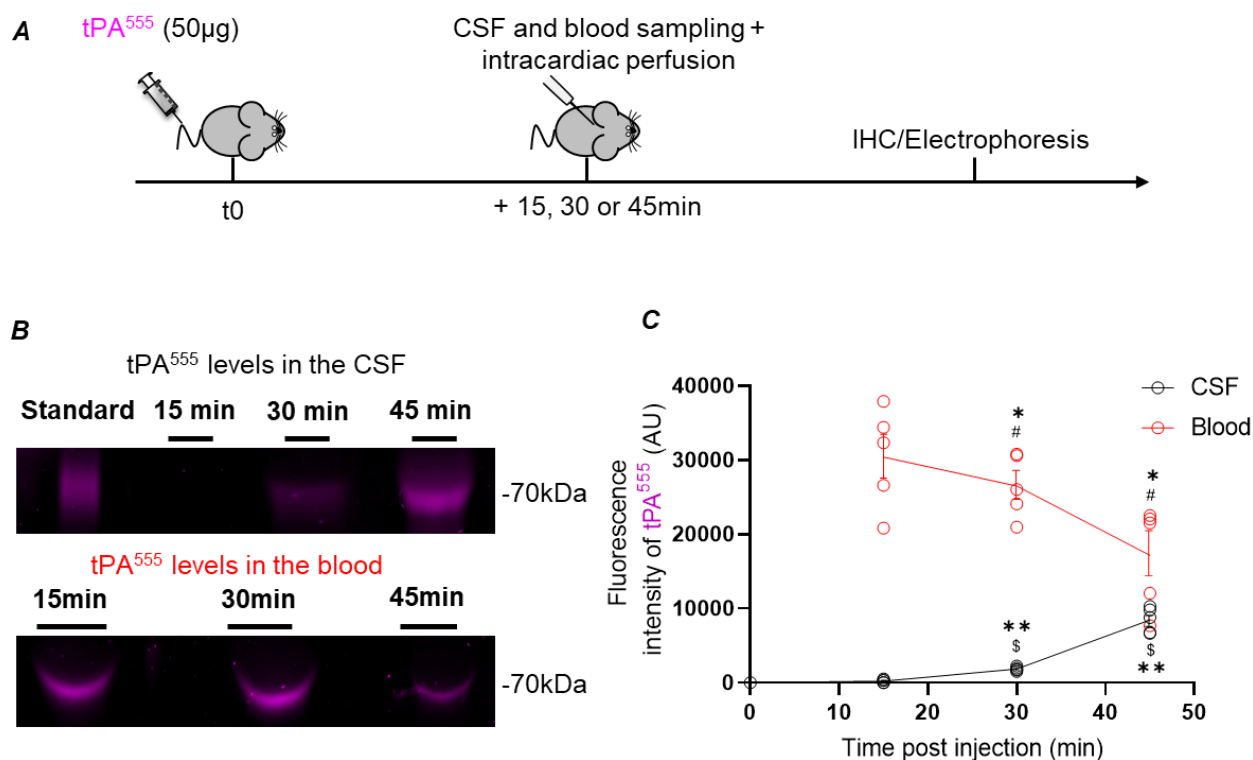
Supplementary Figure 1: In contrast to tPA coupled to Alexa, Alexa alone is not taken-up by CPECs *in vivo*. **A**, Experimental design: mice were injected intravenously with of tPA⁵⁵⁵ and Alexa⁴⁸⁸ (50 μ g each), brains were harvested 30min later for immunohistochemistry. **B**, Representative confocal photomicrographs (n=4) of CPs sections with tPA⁵⁵⁵ (magenta), Alexa⁴⁸⁸ (green) and DAPI (blue) staining; scale bar 50 μ m (upper panels) and 10 μ m in the magnified inserts (lower panels).



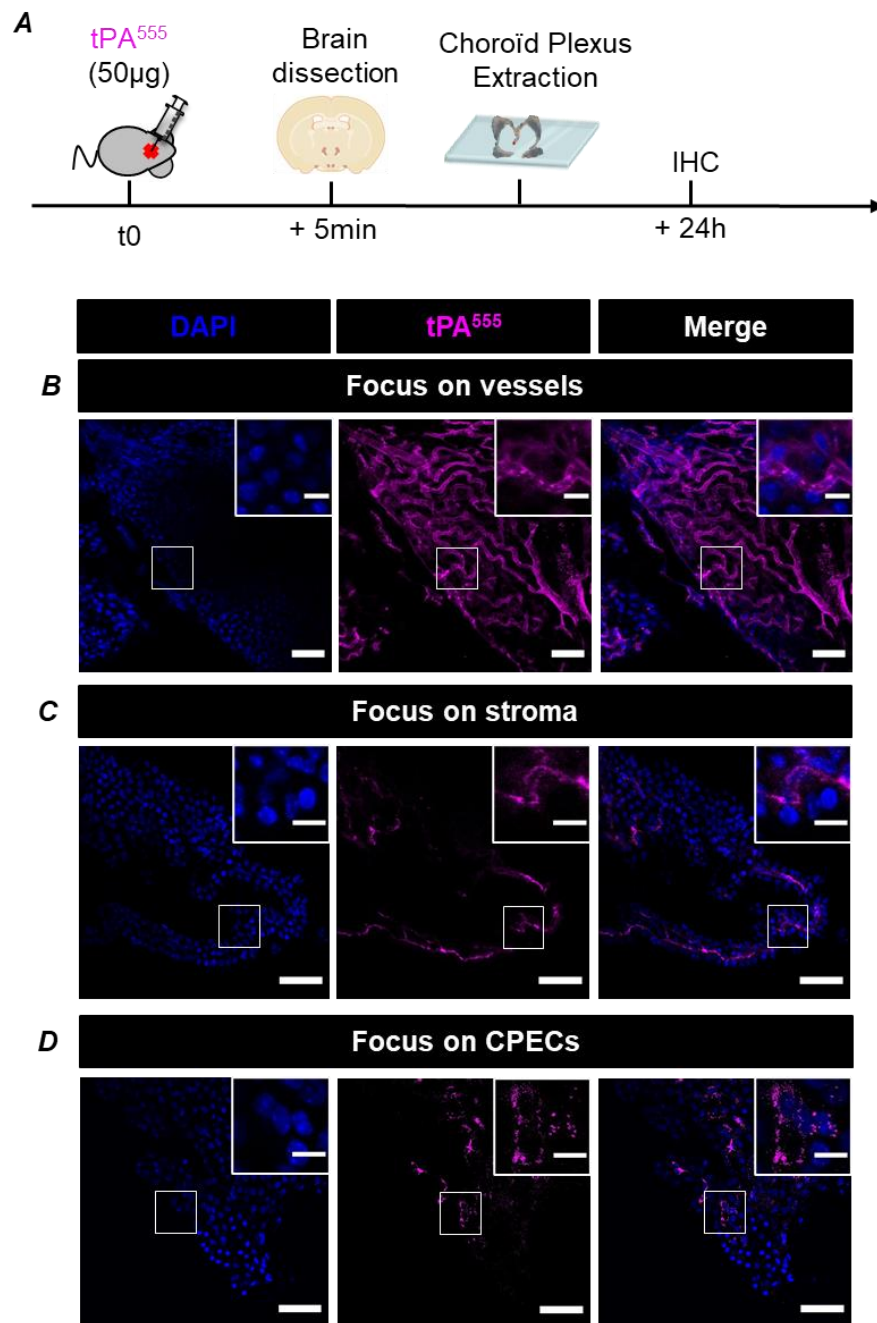
Supplementary Figure 2: CPECs Internalized tPA by clathrin-coated endocytosis vesicles. A, Confocal photomicrographs (representative of $n=6$ slices) of CPs sections with tPA⁵⁵⁵ (left bottom, magenta), TTR (left top, white) and AP2 (right top, green) staining; scale bar 50 μ m and 10 μ m in the magnified inserts. **B,** Image analysis of confocal photomicrographs using the Imaris Microscopy Image Analysis Software to study the colocalization between tPA⁵⁵⁵ and AP2 staining (yellow, right). tPA endocytosis (white arrow); scale bar 10 μ m.



Supplementary Figure 3: Existence of an efflux pathway for tPA. **A**, Experimental design: mice received an intra-cerebroventricular injection of tPA^{555} (1 μ l at 0.9mg/ml), and brains were harvested 10, 30 or 60min later for immunohistochemistry. **B**, Representative confocal photomicrographs (n=4) of CPs sections with tPA^{555} (magenta), LRP1 (green), TTR (white) and DAPI (blue) staining; scale bar 50 μ m and 10 μ m in the magnified inserts.

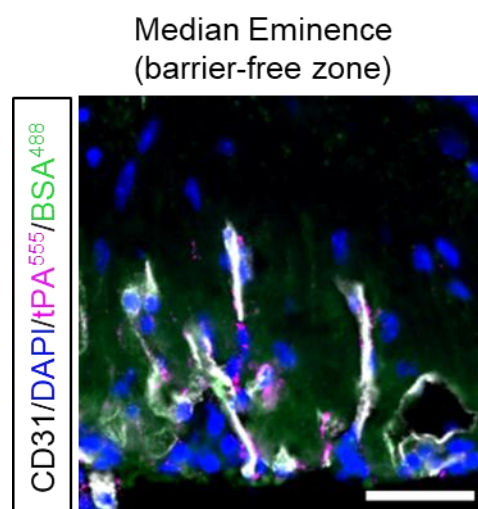


Supplementary Figure 4: Evolution of tPA^{555} levels in the blood and CSF. **A**, Experimental design illustrating that mice were injected intravenously with 50 μ g of tPA^{555} and BSA⁴⁸⁸, CSF, blood and brains were harvested 15, 30, or 45min later for protein analysis by electrophoresis (2 μ l of CSF and 1 μ l of plasma were resolved for each animal). **B**, Representative electrophoreses and **C**, corresponding quantification for tPA^{555} levels in the plasma and in the CSF (mean $\pm$ SEM, n=5). ** significant difference (p<0.005)



Supplementary Figure 5: tPA⁵⁵⁵ is rapidly taken-up by CPECs after intra-carotid injection.

A, Experimental design: mice were injected in the carotid with 50µg of tPA⁵⁵⁵, brains were harvested 5min later, and PCs freshly isolated for immunohistochemistry. **B**, **C**, **D**: Representative confocal photomicrographs (n=5) of a stack of CPs explants with tPA⁵⁵⁵ (magenta) and DAPI staining (blue), focus on PCs vasculature (**B**), on PCs stroma (**C**) and on CPECs (**D**). Scale bar 50µm and 10µm in the magnified inserts.



Supplementary Figure 6: Confocal photomicrograph shows tPA⁵⁵⁵ (magenta) and BSA⁴⁸⁸ (green) extravasation out of vessels (CD31 staining in white), in the Median Eminence, a barrier free zone; DAPI staining (blue), scale bar 40µm.

Partie 2

Article 2 :

"Blood tPA of liver origin contributes to neurovascular coupling involving brain endothelial NMDA receptors."

Mervé Yetim, Jonathane Furon, Sara Martinez de Lizarrondo, Elsa Pouette, Eric Maubert, Yannick Hommet, Laurent Lebouvier, Ze Zheng, Carine Ali, and Denis Vivien

Fluids and Barriers of the CNS, en révision

Contexte bibliographique de l'étude

Le fait que le cerveau ait des besoins énergétiques importants tout en possédant des réserves énergétiques limitées, le rend totalement dépendant d'un **approvisionnement continu et régulé en sang**. Pour cela, le cerveau met en place des stratégies afin d'optimiser un **apport sanguin correct et continu**, et notamment l'anatomie de la vascularisation, ou encore l'**autorégulation** qui permet un maintien du DSC à un niveau adéquat lors d'un changement de la pression artérielle sanguine (Lassen, 1941). Sur le plan anatomique, le « **polygone de Willis** » et les anastomoses collatérales permettent une suppléance en cas de déficit dans une branche artérielle (Blinder et al., 2013).

Le DSC varie en fonction de la consommation énergétique locale, il sera donc plus élevé dans les régions consommant le plus d'énergie. De plus, l'augmentation de l'activité neuronale entraîne une augmentation du DSC très restreinte au niveau des zones activées. A la suite d'une activité neuronale, la mise en place d'une cascade de signalisation permet de garantir un apport d'énergie *via* **l'augmentation du DSC local** (grâce aux artères, artérioles et capillaires cérébraux) : ce phénomène d'optimisation est appelé le **Couplage neurovasculaire** (CNV) ou l'hyperémie fonctionnelle (Constantino Iadecola, 2017 ; Sweeney et al., 2018). Le CNV se définit donc comme la relation étroite entre l'activation neuronale et la réponse hémodynamique qu'elle provoque. Il est assuré par des communications étroites entre plusieurs acteurs : les **neurones**, la **glie**, les **cellules musculaires lisses**, les **péricytes** et les **cellules endothéliales** (Schaeffer & Iadecola, 2021). Cependant, les mécanismes mis en jeu sont complexes et sont pour certains non élucidés.

Le mécanisme à l'origine du CNV est un phénomène actif qui trouve sa source directement au niveau de la synapse *via* des **neurotransmetteurs** et en particulier par le **glutamate** (Bonvento et al., 2002). En effet, suite à une activité neuronale, la

libération synaptique de neurotransmetteurs active plusieurs voies de signalisation dans les neurones post-synaptiques, les astrocytes péri-synaptiques et les cellules vasculaires (Chaigneau et al., 2007 ; Nielsen & Lauritzen, 2001), et entraîne la libération de **facteurs vasoactifs** tels que le **monoxyde d'azote** (*nitric oxyde* ; NO) ou la **prostaglandine de type 2** (PGL-2) permettant d'adapter localement l'apport en substrats énergétiques. La **signalisation glutamatergique**, et donc les récepteurs NMDA, jouent alors un rôle prépondérant dans le CNV (Busija et al., 2007 ; Attwell et al., 2010 ; Figure 48).

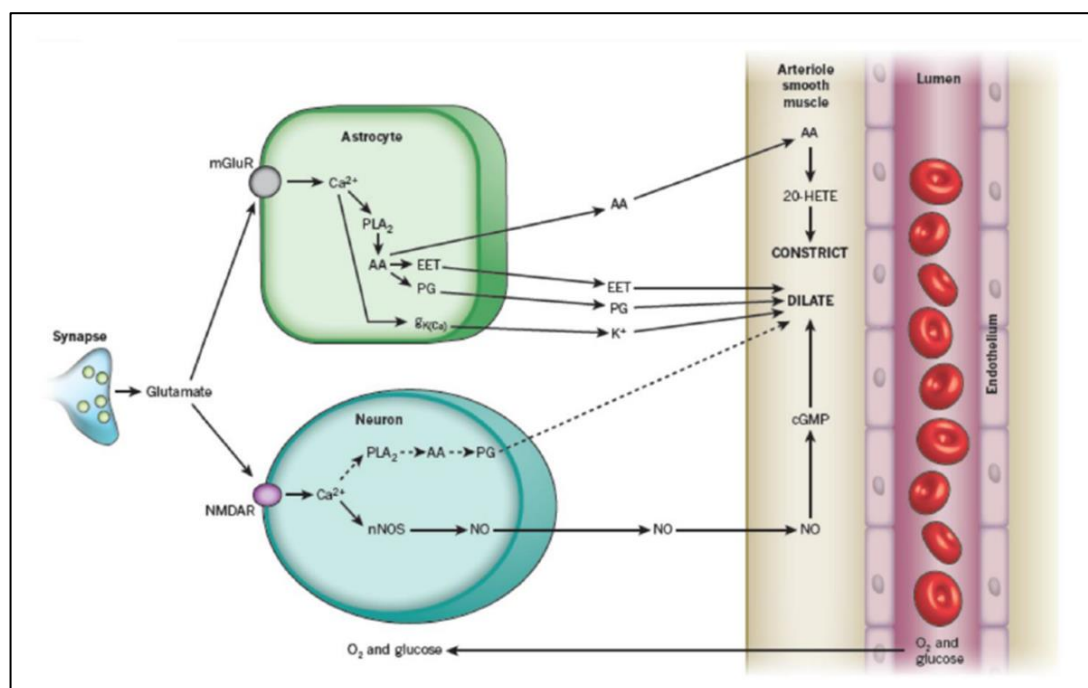


Figure 48 : La signalisation glutamatergique régule le DSC.

Les neurones et les astrocytes régulent le DSC en envoyant des messagers qui influencent les muscles lisses entourant les artérioles. Au niveau des neurones, le glutamate libéré dans la synapse interagit avec les récepteurs NMDA, ce qui augmente la concentration en Ca^{2+} intracellulaire. De même, le glutamate augmente également la concentration intracellulaire en Ca^{2+} dans les astrocytes en activant les récepteurs métabotropiques (mGluR). L'ensemble des facteurs libérés par ces voies de signalisation favorise la dilatation des vaisseaux (Attwell et al., 2010).

Le glutamate libéré dans la fente synaptique va activer les récepteurs **NMDA** neuronaux, provoquer une entrée de Ca^{2+} dans le neurone post-synaptique et l'activation de la **NO-synthase neuronale** (*neuronal Nitric Oxide Synthase*, nNOS), ainsi que le recrutement de la **cyclooxygénase 2** (COX-2). La synthèse et la libération de NO et de ces prostanoïdes vont participer à la relaxation des **CMLs**, donc à la dilatation du vaisseau (Busija et al., 2007 ; Lecrux & Hamel, 2016). En effet, l'inhibition des **nNOS** réduit l'augmentation du DSC en réponse à l'activité neuronale, suggérant le rôle du NO dans le CNV (Ma et al., 1996). Des interneurons peuvent également intervenir dans la modulation du CNV (Lecrux et al., 2011).

En ce qui concerne les **astrocytes**, ils vont se faire le **relais** entre l'activité neuronale et la réponse hémodynamique des vaisseaux, étant à proximité des synapses et des microvaisseaux. Le glutamate libéré dans la fente synaptique va activer les récepteurs **métabotropiques** présents à la surface des astrocytes, provoquant une augmentation du flux calcique intracellulaire (Porter & McCarthy, 1996 ; Zonta et al., 2003), et induire la libération de **potassium** vers les CMLs, mais également la libération de prostaglandines et autres facteurs pouvant induire une **vasodilatation** (Filosa et al., 2006 ; Mishra, 2017). De plus, les astrocytes vont **recapturer** le potassium libéré pour le détourner vers les **pieds astrocytaires** (Paulson & Newman, 1987) et induire une relaxation des CMLs (Knot et al., 1996). En effet, les capillaires cérébraux sont très sensibles au potassium libéré par les pieds astrocytaires (Cleary et al., 2020).

Les **cellules endothéliales** sont connues pour réguler le DSC en réponse à des agents pharmacologiques, notamment *via* la synthèse de divers agents vasoactifs tels que le NO ou les **prostanoïdes**, mais leur rôle dans le CNV n'est pas **tout à fait élucidé**.

Des études suggèrent que les **cellules endothéliales** peuvent propager de façon **rétrograde** la signalisation induite par le CNV le long des **artérioles** (Duling & Berne, 1970). Dans la circulation cérébrale, le mécanisme de propagation de la vasodilatation impliquerait des **canaux potassiques rectifiant entrant** (KIR), très présents au niveau des cellules endothéliales cérébrales, déclenchant la libération de NO endothélial et de prostanoides (Tallini et al., 2007 ; Segal, 2015) ; **Figure 49**).

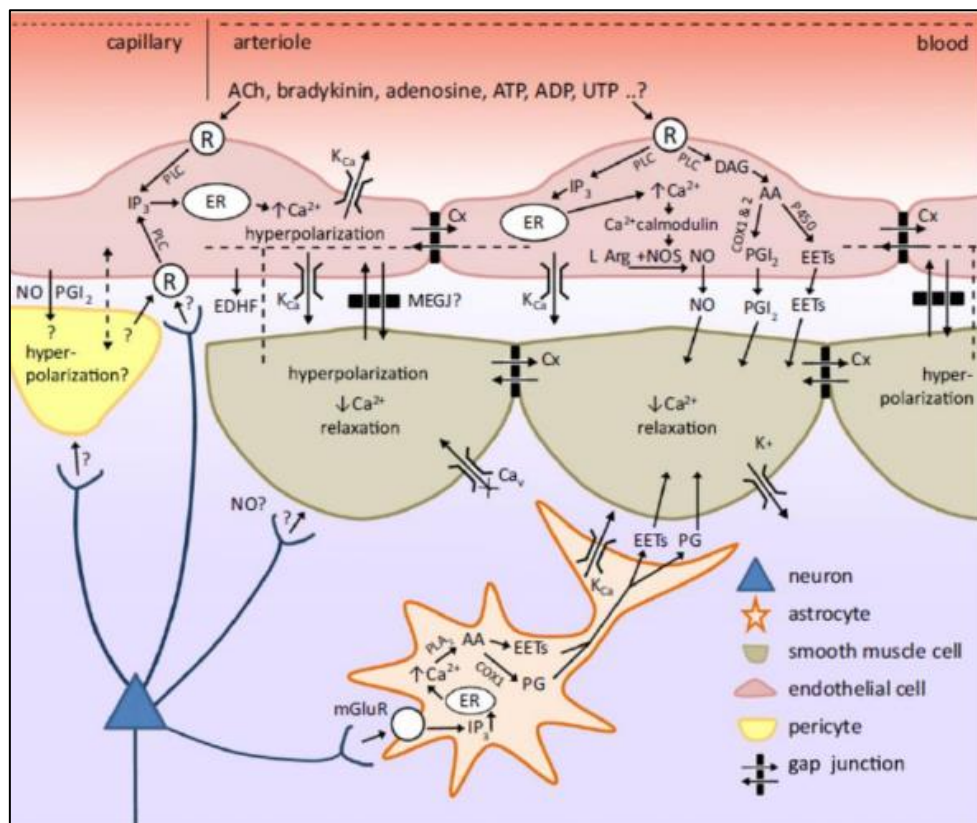


Figure 49 : L'endothélium dans le CNV.

Les cellules endothéliales augmentent leur Ca^{2+} en réponse à l'interaction avec l'acétylcholine (ACh), la bradykinine (BK), l'ATP, l'ADP, l'UTP, et l'adénosine. Cette augmentation de Ca^{2+} est également à l'origine de la production de métabolites qui vont participer à la relaxation des SMCs. L'augmentation de Ca^{2+} aboutit aussi à l'hyperpolarisation de la cellule *via* l'ouverture de canaux potassiques. Cette hyperpolarisation peut se propager de cellule à cellule par les jonctions communicantes et peut potentiellement se propager aux SMCs *via* des jonctions communicantes (Chen et al., 2014).

Enfin, le rôle précis des **péricytes** dans la vasodilatation des capillaires est mal connu du fait du manque d'identification **spécifique des capillaires**. Néanmoins, des études suggèrent la présence de **péricytes contractiles** contenant de l'actine (α -SMA), comme les cellules musculaires lisses et d'autres non contractiles autour des capillaires ([Hartmann et al., 2015](#) ; [Attwell et al., 2016](#)) . Ces dernières années, une accumulation de preuves tendent à défendre l'idée que les péricytes contribuent à la **vasodilatation des capillaires**. Une récente étude a démontré *in vivo* que les péricytes capillaires contribuent à la résistance basale du flux sanguin et à la lente modulation du flux sanguin dans tout le cerveau ([Hartman et al., 2021](#)). De même, il a été montré que la constriction capillaire en réponse à l'hyperémie dans le cadre d'une sténose artérielle dépend des péricytes ([Methner et al., 2019](#)).

La contribution du **tPA** au **couplage neurovasculaire** a été proposée par Park et collaborateurs en 2008. Le modèle utilisé dans cette étude consistait à stimuler les **vibrisses gauches** d'une souris, tout en enregistrant les **variations** de **DSC**, sur toute la **surface cérébrale** par imagerie laser à contraste de Speckle ([Park et al., 2008](#) ; **Figure 50**). En effet, les vibrisses des souris sont des organes sensoriels très sensibles et très importants pour percevoir l'environnement. De ce fait, le cortex somatosensoriel (également appelé **cortex barrel** des vibrisses) est très développé et facile d'accès pour l'étude du couplage neurovasculaire. Ce modèle est utilisé dans notre laboratoire, avec quelques adaptations : les **paramètres physiologiques** des souris (température, rythme cardiaque, saturation en O₂, pCO₂ et pH sanguin) ont été mesuré et maintenus stables (ventilation mécanique et sous médétomidine) (**Figure 50**), et la crâne est **resté intact** pour ne pas risquer de modifier le CNV ([Anfray et al., 2020](#)).

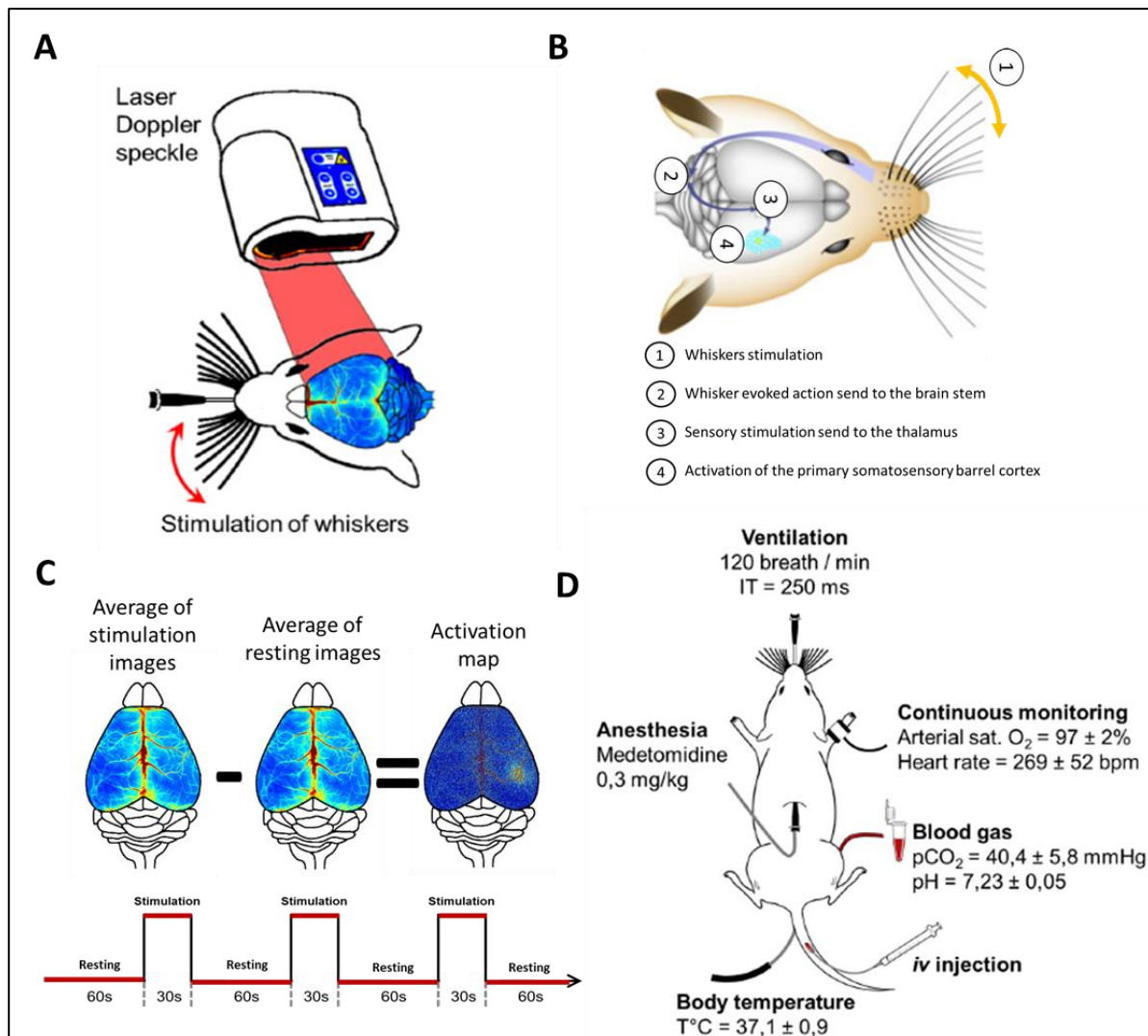


Figure 50 : Modèle expérimental d'étude du CNV.

(A) Protocole expérimental, consistant à enregistrer le DSC à la surface du cerveau (crâne intact) de la souris grâce à un laser Doppler speckle au cours de la stimulation des vibrisses. (B) Schéma de la voie d'activation du cortex barrel en réponse à la stimulation des vibrisses gauches. (C) Séquence de stimulation et génération d'une carte d'activation du cortex barrel : 3 stimulations de 30 secondes ont été réalisées avec 90 secondes d'intervalle entre chaque stimulation, permettant au DSC de retrouver son niveau basal. (D) Mesure des paramètres physiologiques dans les conditions expérimentales (adapté de : [Petersen, 2007](#) ; [Anfray et al., 2020](#)).

Dans la physiopathologie cérébrale, nous savons que le tPA, et plus particulièrement le tPA vasculaire (Anfray et al., 2020), joue un rôle dans la modulation de l'hyperémie fonctionnelle, de par sa capacité à influencer la signalisation NMDA (Park et al., 2008). En parallèle, il est avéré que les **cellules endothéliales** et les **hépatocytes** sont les principales sources de tPA circulant (Zheng et al., 2019). Dans la circulation sanguine, le tPA libéré est rapidement inhibé par **PAI-1**, limitant ses interactions. Le contrôle de l'équilibre entre les taux sanguins de tPA et de PAI-1 joue un rôle majeur dans un certain nombre de maladies neurovasculaires telles que les **AVC** ou la **maladie d'Alzheimer** (Medcalf, 2017 ; Park et al., 2020 ; Shi et al., 2021). Ces observations soulèvent la possibilité que des modifications des niveaux physiologiques de tPA circulant puissent contribuer à des **modifications du CNV** et des fonctions/dysfonctionnements cérébraux ultérieurs.

L'objectif de notre étude est donc d'examiner en détails le **rôle du tPA circulant**, dans l'hyperémie fonctionnelle induite par la stimulation des vibrisses chez la souris. Pour cela, nous avons utilisé un large éventail d'outils génétiques, notamment des souris **déficientes en tPA** ou en **PAI-1**, la délétion **conditionnelle** de tPA **endothélial** ou des récepteurs **NMDA endothéliaux** et enfin une technique chirurgicale adaptée, la **parabiose** (qui sera détaillée dans la partie 3).

Article 2

Blood tPA of liver origin contributes to neurovascular coupling involving brain endothelial NMDA receptors.

Principaux résultats obtenus

- L'axe tPA/PAI-1 influence l'hyperémie fonctionnelle induite par la stimulation des vibrisses : une déficience en tPA réduit l'hyperémie fonctionnelle, alors qu'une déficience en PAI-1 l'augmente.
- Le niveau basal de tPA circulant influence directement le CNV.
- Les récepteurs NMDA endothéliaux sont nécessaires pour médier cet effet du tPA vasculaire sur le CNV.
- L'activation de la voie de la bradykinine favorise la libération de tPA dans la circulation sanguine et le CNV.
- Le tPA libéré par les cellules endothéliales du foie contribue à la régulation du CNV.

Blood tPA of liver origin contributes to neurovascular coupling involving brain endothelial NMDA receptors.

Mervé Yetim,¹ Jonathane Furon,¹ Sara Martinez de Lizarrondo,¹ Elsa Pouetere,¹ Eric Maubert,¹ Yannick Hommet,¹ Laurent Lebouvier,¹ Ze Zheng,²⁻³ Carine Ali,¹ and Denis Vivien^{1-4 *}

¹Normandie University, UNICAEN, INSERM UMR-S U1237, Physiopathology and Imaging of Neurological Disorders (PhIND), GIP Cyceron, Institut Blood and Brain @ Caen-Normandie (BB@C), 14000 Caen, France; ²Department of Medicine, Medical College of Wisconsin, Milwaukee, WI, USA; ³Blood Research Institute, Versiti Blood Center of Wisconsin, Milwaukee, WI, USA; and ⁴Department of clinical research, Caen-Normandie University Hospital, CHU, Avenue de la côte de Nacre, Caen, France.

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

Abstract

Regulation of the cerebral blood flow (CBF) involves complex mechanisms with direct influences on brain functions and dysfunctions. Among these mechanisms it was proposed that the serine protease tissue-type plasminogen activator (tPA) could play a role in the control of neurovascular coupling (NVC) induced by whiskers stimulation in rodents through its action on N-methyl-D-Aspartate receptors (NMDARs). In the present study, using tPA^{Null} mice, conditional deletions of either endothelial tPA (VECad-Cre^{ΔtPA}) or endothelial NMDARs GluN1 subunit (VECad-Cre^{ΔGluN1}), parabioses between wild-type and tPA^{Null} mice, hydrodynamic transfections-induced deletion of liver tPA, hepatectomy and pharmacological approaches in mice, we have unveiled this mechanism in detail. We thus demonstrate that physiological concentrations of vascular tPA, produced and released by the liver endothelial cells in a bradykinin type 2 receptors-dependent manner, promotes NVC, by a mechanism dependent of brain endothelial NMDA receptors. These data highlight a new mechanism of the regulation of NVC involving both endothelial tPA and NMDA receptors.

Keywords

NVC, tPA, NMDA, GluN1, liver.

Introduction

Functional hyperemia, also named neurovascular coupling (NVC), allows local energy supply to brain cells, with key roles in the pathophysiology of the brain (1,2). For instance, brain disorders such as stroke or Alzheimer's Disease are associated with CBF dysregulations (3).

Initially described by its ability to activate plasminogen into plasmin in the blood (4), the tissue-type Plasminogen Activator (tPA) is a serine protease widely expressed in the central nervous system (CNS) (5,6), especially by neurons and endothelial cells (7,8). Extending its functions above the conversion of plasminogen into plasmin, tPA interferes with a variety of neuronal receptors (9), including N-Methyl-D-Aspartate receptors (NMDARs). Through these mechanisms, tPA is considered as a neuromodulator implicated in various brain functions and dysfunctions, including learning and memory processes (10,11), anxiety behavior (12,13) and neurovascular diseases such as stroke, in which it contributes to the homeostasis of the blood brain barrier and the neuronal survival (14,15).

Park et al. proposed tPA as an actor of NVC by its ability to influence NMDAR signaling (16) and proposed that the PAI-1/tPA (type 1 plasminogen activator inhibitor) pathway could counteract the harmful neurovascular and cognitive effects of A β (17). In parallel, Anfray et al. have proposed that the circulating tPA could contribute to NVC (18). It is thus interesting to note that, in the central nervous system, the tPA initially reported to be expressed and released by endothelial cells is also expressed and released by neurons; both cells also express NMDA receptors (19–22).

Endothelial cells and hepatocytes are thought to be the main sources of vascular tPA (23), with the level of free tPA counterbalanced by its serpin PAI-1 (24,25). The control of this balance between the levels of blood tPA and PAI-1 thus plays a major contribution in a number of neurovascular diseases (17,26,27). There is a growing body of evidence that activation of endothelial luminal bradykinin receptors promotes the luminal release of tPA by endothelial cells (28), whereas angiotensin-II leads to release of PAI-1 (29). Nevertheless, regulation of plasma levels of PAI-1 cannot be explained solely by the renin-angiotensin system (30).

These observations raise the possibility that modifications of the physiological levels of vascular tPA may contribute to modifications of neurovascular coupling and subsequent brain functions/dysfunctions. Therefore, we further examined the role of tPA, especially the circulating tPA, in functional hyperemia induced by whiskers stimulation in mice, by using a large set of genetic tools, including tPA deficient mice, PAI-1 deficient mice, conditional deletion of either the endothelial tPA or for endothelial NMDA receptors and finally parabiosis between wild type and tPA deficient mice. We thus demonstrate that vascular tPA, from liver endothelial cells origin, contributes to neurovascular coupling through modulation of brain endothelial NMDA receptors signaling. Using parallel pharmacological and genetic approaches we also demonstrated a bradykinin dependent control of the vascular tPA levels with direct impact on functional hyperemia.

Materials and methods

Animals

All experiments were conducted in accordance with the French ethical law (Decree 2013-118) and the European Communities Council guidelines (2010/63/EU). Protocols were approved by our local ethics committee dependent on the French Ministry of Research and Higher Education (agreement numbers Cenomexa #19208, #19978 and Ce5/2012/062). All applicable international, national, and/or institutional guidelines for the care and use of animals were followed.

All experiments were performed on 8-10 weeks old male C57BL/6 (Janvier Labs, Le Genest-Saint-Isle, France), tPA Null mice and their wild type (WT) littermates (see mouse lines section), VeCadCre/tPAlox mice and their WT littermates (see mouse lines section), VeCadCre/Grin1lox mice and their WT littermates (see mouse lines section) were bred in our animal facilities (CURB, Caen, France) and housed in a 12h light/12h dark cycle with free access to water and food.

Mouse lines

Because of the large number of animals used in this study and the large number of different strains, we decided to use only males. We are nevertheless aware that collecting data from females would be important as well. All the animals used thereafter are from the same genetic background (C57BL6J), with for each genotype a corresponding littermate colony used as control. tPA Null mice and tPAlox mice were generated by our group (31) in collaboration with the Mouse Clinical Institute (ICS,

Illkirch, France, <http://www.ics-mci.fr>). To induce tPA Null mice, tPAlox mice (C57BL6J background) in which exon 3 of the *Plat* gene was flanked by loxP sites were crossed with CMV-Cre mice to induce of Cre-mediated excision the third exon of the *Plat* gene in germline. PAI-1^{-/-} mice were obtained from professor H.R. Lijnen, Centre for Molecular and Vascular Biology, University of Leuven, Belgium. Grin1lox mice (B6.129S4-Grin1tm2Stl/J; # 005246) were obtained from The Jackson Laboratory (32). VE-Cadherin-Cre mice (B6.FVB-Tg(Cdh5-cre)7Mlia/J; # 006137) were obtained from F. Millat (33), Institute of Radioprotection and Nuclear Safety, Fontenay-aux-Roses, France. tPAlox and Grin1lox mice were crossed with VE-Cadherin-Cre mice to obtain VE-Cadherin-Cre/tPAlox (VECad-Cre^{ΔtPA}) and VE-Cadherin-Cre/Grin1lox mice (VECad-Cre^{ΔGluN1}).

Pharmacological treatments

Different treatments were injected intravenously during experiments. Recombinant tPA (rtPA) (10mg/kg) prepared as previously described (18) was infused for ten minutes (a bolus of 150μl for a total volume of 300μl). rtPA is used at 10 mg/kg, instead of 0.9 mg/kg when injected intravenously in human, because the human rtPA is ten-fold less active than the mouse tPA to activate its well-known target, the mouse plasminogen. A selective bradykinin type 2 receptor agonist (B2Rag) ([Phe8 Ψ(CH-NH)-Arg9]-Bradykinin, Tocris) was used at 7, 15, 30 μg/kg, 0.1ml for each dose or a unique dose for ELISA (60μg/kg, 0.1ml) or for mean arterial pressure (MAP) measure (30μg/kg, 0.1ml). Angiotensin II (Angiotensin II acetate, Sigma, 1μg/kg/min), was infused during 20 minutes to obtain a MAP of 120mmHg for acute hypertension.

Animal preparation prior measurement of the cerebral blood flows induced by whiskers stimulation

Animals were anesthetized using 5% isoflurane (Isoflurane Belamont) in 70% N₂O/30% O₂. Mice were intubated and placed under mechanical ventilation (120 BPM, 10ml/kg) by maintaining anesthesia with 2% isoflurane in 70% N₂O/30% O₂. Caudal vein and femoral artery were catheterized for pharmacological injections (see pharmacological treatments section) and to evaluate physiological parameters: pCO₂, pH and MAP. As previously described (18), mice were placed in a stereotaxic frame. An incision was made along the midline head skin to expose the skull and lidocaine spray (Xylocaine, 5% spray®, AstraZeneca) was applied on the head. Whiskers on the left side were cut to let a length of 1 cm. Anesthesia was switched with subcutaneous infusion of medetomidine (Domitor®, Pfizer, 0.1mg/kg) then isoflurane, N₂O and O₂ were stopped ten minutes later. For isoflurane's effects dissipation and CBF stabilization, twenty minutes have waited before acquisitions. Physiological parameters were measured in parallel experiments (see Additional File 1). We decided not to use ketamine, since our study involves NMDA receptors as a possible target.

Laser Doppler Speckle Flowmetry

Laser Doppler Flowmetry (LDF) was used to measure relative cerebral blood flow (CBF) during whiskers stimulations, of the whole surface of the brain with intact skull. Acquisitions were made with a laser speckle contrast imager (MoorFLPI-2, Moor Instrument, Exposure Time: 20s, Filter: 25 frames, Sample Interval: 1000ms, Image Resolution: 752 x 580). The whole whiskers were mechanically shaken (4Hz) during 30s three times between 60s of resting time. Analysis was made with MoorFLPI-2

Review V5.0 software, stimulation frames and resting frames were averaged and subtracted to obtain an activation map corresponding of the barrel cortex. CBF of this area was calculated to obtain a percentage of CBF change from baseline, then the three stimulations were averaged together.

Parabiosis

For parabiosis (34), mice were anesthetized (see animal preparation section), Buprenorphine (Buprecare®, Axience, 0.1mg/kg) to proceed with the surgery. Animals were placed in the lateral position, back-to-back. A longitudinal skin incision was performed, gently the skin was detached and joints were attached with non-absorbable suture. The skin of the two mice were connected with non-absorbable sutures. Controls were performed to assess the efficacy of parabiosis, using measurements of blood glucose levels and DOTA-Gd MRI analyses (Additional File 2).

Partial hepatectomy

Animals were anesthetized (see animal preparation section), Buprenorphine (Buprecare®, Axience, 0.1mg/kg) to proceed with the surgery. Briefly, a transverse laparotomy was made. Left lateral lobe, left and right median lobes were ligatured using non-resorbable sutures, allowing a resection of around 70% of the total liver. For sham condition, only a transverse laparotomy was made. experiments were performed 24h after partial hepatectomy (see Laser Doppler Speckle section).

ELISA for tPA

Plasma total tPA from mice was analysed using commercial ELISA kits (Innovative Research, Inc.) according to the manufacturer's instructions. Blood samples were collected by intracardiac puncture as previously described (18).

Immunohistochemistry

Deeply anesthetized mice were transcardially perfused with cold heparinized saline (15 ml/min), then with 4% paraformaldehyde in 0.1 M sodium phosphate buffer, pH 7.4 (150 ml, 15 ml/min). Brain and liver sections were incubated overnight at room temperature with primary antibodies rabbit anti-tPA (1:1500, generous gift from R. Lijnen, Leuven) and rat anti-CD31 (1:1000, 553370, BD Biosciences). Primary antibodies were revealed using Fab'2 fragment anti-rabbit IgG linked to CY3 and anti-rat IgG linked to FITC (1:800, Jackson ImmunoResearch) co-incubated 90 min at room temperature, then coverslipped using mounting medium containing DAPI. Images were digitally captured using an epifluorescence microscope (Leica DM6000). Images were assessed using ImageJ software (NIH).

Statistical analyses

Results are expressed as box plots with medians, 1st and 3rd quartiles, min and max with values for each mouse. Time courses represent the mean $\pm$ the standard error of the mean (SEM) in transparency. Statistical analysis was performed using Mann-Whitney test, Kruskal Wallis test or ANOVA with Tukey test with GraphPad software. Data were considered statistically different if probability values (p) were at least <0.05 .

Results

The tPA/PAI-1 axis influences functional hyperemia induced by whiskers stimulation.

We decided to perform our experiments by maintaining the skull of animals intact and closed, to prevent any artefacts due to craniectomy. Also, important, our animals were maintained sedated using medetomidine instead of ketamine to prevent possible interferences with NMDA receptors signaling. We showed that the CBF increase evoked by whiskers stimulation is significantly impaired in tPA-deficient mice (tPA^{Null}) when compared to WT littermates (Figure 1B-C) ($+5.65 \pm 0.49\%$ for tPA^{Null} mice, n=16, vs. $+7.16 \pm 0.46\%$ of CBF increase for WT mice, n=18, i.e. -21% of CBF increase for tPA^{Null} mice compared to tPA^{WT} mice, p-value 0.0167). In parallel, similar experiments were performed in 8-10 weeks old wild type and PAI-1 deficient. As expected, CBF increase evoked by whiskers stimulation is significantly increased in PAI-1-deficient mice (PAI-1^{KO}) when compared to WT littermates (Figure 1D-E) ($+10.9 \pm 0.67\%$ for PAI-1^{KO} mice, n=10, vs. $+9.17 \pm 0.35\%$ of CBF increase for PAI-1^{WT} mice, n=10, i.e. +19.1% of CBF increase for PAI-1^{KO} mice compared to PAI-1^{WT} mice, p-value 0.0433). No modification of the baseline was observed between groups (this is true also for the rest of the above data presented in this study). These data demonstrate that the endogenous ratio tPA/PAI-1 plays a key role in modulating the patency of neurovascular coupling.

Physiological level of circulating tPA influences NVC

Additional questions are whether these phenotypes are due to the levels of tPA present in the bloodstream. To address this, we decided to use a model of parabiosis between tPA^{WT} and tPA^{Null} mice (Figure 2A, and Additional File 2). We used three types of parabiosis, tPA^{WT}/tPA^{WT}, tPA^{Null}/tPA^{Null} and tPA^{WT}/tPA^{Null} maintained during a period of 3 weeks, prior to whiskers stimulation-induced NVC assays (the stimulated animal appeared in bold). As reported for individual animals, when testing a tPA^{Null} mice (**tPA^{Null}**) of a parabiosis composed of a pair of tPA^{Null} (**tPA^{Null}/tPA^{Null}**), we revealed an impaired NVC compared to a **tPA^{WT}** animal from a pair of tPA^{WT} animals (**tPA^{WT}/tPA^{WT}**) (Figure 2B-C-D) ($+9.2 \pm 0.4\%$ for **tPA^{Null}/tPA^{Null}** mice, $n=8$, vs. $+11.3 \pm 0.4\%$ of CBF increase for **tPA^{WT}/tPA^{WT}** mice, $n=7$, i.e. -18.5% of CBF increase for **tPA^{Null}/tPA^{Null}** mice compared to **tPA^{WT}/tPA^{WT}** mice, p -value 0.0122). Interestingly, parallel experiments performed from tPA^{Null} mice of hetero-parabiosis (tPA^{Null}/tPA^{WT}) animals, revealed a rescue of NVC to levels similar to the tPA^{WT} animals (Figure 2B-D-E) ($+12 \pm 0.6\%$ of CBF increase for tPA^{Null} mice from a pair of **tPA^{Null}/tPA^{WT}** mice, $n=10$, vs. $+9.2 \pm 0.4\%$ for tPA^{Null} mice from a pair of **tPA^{Null}/tPA^{Null}** mice, $n=8$, p -value 0.0007). All together, these data demonstrate that endogenous levels of circulating tPA directly influence NVC.

Endothelial NMDA receptors mediate the vascular tPA-dependent NVC induced by whiskers stimulation.

Our data first reveal an increased neurovascular coupling in VECad-Cre^{ΔGluN1} mice (20,32) (conditional deletion of endothelial GluN1, Figure 3A) compared to VECad-Cre^{WT} control mice (Figure 3C-F) ($+10 \pm 0.7\%$ for VECad-Cre^{ΔGluN1} mice, $n=10$, vs. $+7.5 \pm 0.8\%$ of CBF increase for VECad-Cre^{WT} mice, $n=8$, i.e. $+33.8\%$ of CBF increase

for VECad-Cre^{ΔGluN1} mice compared to VECad-Cre^{WT} mice, p-value 0.0454). The intravenous injection of rtPA (10 mg/kg) was tested in parallel on the two strains. Although intravenous (iv) rtPA led to an increased neurovascular coupling in wild type (VECad-Cre^{WT}) mice, it did not in endothelial deleted GluN1 transgenic mice (VECad-Cre^{ΔGluN1}) (Figure 3C-F) (+12.2 ± 1.8% of CBF increase for VECad-Cre^{WT} mice treated by rtPA, n=8, vs. +7.4 ± 0.8% for untreated VECad-Cre^{WT} mice, n=10, i.e. +62.2% of CBF increase VECad-Cre^{WT} mice treated with rtPA compared to untreated VECad-Cre^{WT} mice, p-value 0.0119, +3% of CBF increase for VECad-Cre^{ΔGluN1} mice treated with rtPA compared to untreated VECad-Cre^{ΔGluN1} mice, p-value >0.999). This set of original data demonstrate first that it is the circulating tPA which underlies neurovascular coupling induced by whiskers stimulation in mice; and second, that the endothelial NMDA receptors are required to mediate this effect of vascular tPA.

Activation of the bradykinin pathway promotes release of tPA in the blood stream and neurovascular coupling.

In order to further investigate how endothelial function/dysfunction may contribute to the ability of vascular tPA to modulate NVC, we decided to test how the couple angiotensin and bradykinin (and related pathways) may be involved, respectively reported to contribute to the regulation of the levels of PAI-1 and tPA in the circulation (35,36). Thus, animals subjected to whiskers stimulation induced NVC, were previously subjected to intravenous injections of either [Phe8Ψ(CH-NH)-Arg9]-Bradykinin (see methods section) as an agonist for bradykinin type II receptors (B2Rag) (Figure 4A) or angiotensin-II (Ang-II, 1 μg/kg/min) (see methods section, Additional File 5A). As expected, the B2R agonist (30 μg/kg) led to a decrease of basal mean arterial blood pressure (60 ± 4 mmHg for B2Rag treated animals vs. 91.5 ± 2.9

mmHg for control animals, $n=4$ per group, p -value 0.0286, Additional File 3) and angiotensin-II ($1\mu\text{g/kg/min}$) led to an increase of basal arterial blood pressure (122.5 ± 4.7 mmHg for Angiotensin-II treated animals vs. 85.75 ± 4 mmHg for control animals, $n=4$ per group, p -value 0.0286, without affecting physiopathological parameters (Additional File 4). Using this procedure, we showed that the CBF increase evoked by whiskers stimulation was not significantly modified in angiotensin-II treated wild type animals (Additional File 5B-E) ($+9 \pm 0.6\%$ of CBF increase for tPA^{WT} mice treated with Ang-II, $n=10$, vs. $+10.1 \pm 0.3\%$ of CBF increase for tPA^{WT} mice, $n=10$, p -value 0.1067), but that it was significantly increased in B2Rag treated animals compared to the control non treated group (Figure 4 B-E) ($+6 \pm 0.4\%$ of CBF increase for tPA^{WT} mice, $n=8$, vs. $+9.7 \pm 1.1\%$ of CBF increase for tPA^{WT} treated with B2Rag at $30\mu\text{g/kg}$, $n=8$, p -value 0.0251). We then compared tPA^{WT} and tPA^{Null} mice, treated intravenously with increasing concentrations of the agonist of B2Rag (0, 7, 15, $30\mu\text{g/kg}$). Our data (Figure 4B-E), clearly revealed a dose dependent potentiation of the NVC by the agonist of B2R in tPA^{WT} animals and no effect on the tPA^{Null} mice ($+18.4\%$ of CBF increase for tPA^{Null} mice at $7\mu\text{g/kg}$ of B2Rag, $n=6$, p -value 0.1951, vs. $+28.5\%$ of CBF increase for tPA^{WT} mice, $n=8$ at $7\mu\text{g/kg}$ of B2Rag, p -value 0.0472, when compared to the non-treated tPA^{Null} or tPA^{WT} mice). Parallel experiments were performed to estimate the levels of circulating tPA in the circulation of tPA^{WT} mice subjected to $60\mu\text{g/kg}$ of B2Rag as described above (Figure 4F). In agreement with our previous data on NVC, B2Rag led to an increase of vascular tPA ($+8.7$ ng/ml of total tPA after injection of B2Rag, $n=4-5$, p -value 0.0159, Figure 4F). Altogether, these data reveal that activation the bradykinin pathway leads to an increased release of tPA in the blood stream and subsequent potentiation of whiskers stimulation-induced NVC.

tPA released from liver endothelial cells contributes to the regulation of NVC.

We then investigated the cell originate of the circulating tPA involved in the control of NVC. Our data reveal a reduced neurovascular coupling in VECad-Cre^{ΔtPA} mice (33) (conditional deletion of endothelial tPA, Figure 5A) compared to VECad-Cre^{WT} control mice ($+10.02 \pm 0.3\%$ for VECad-Cre^{ΔtPA} mice, $n=17$, vs. $+11.4 \pm 0.5\%$ of CBF increase for VECad-Cre^{WT} mice, $n=14$, i.e. -12% of CBF increase for VECad-Cre^{ΔtPA} mice compared to VECad-Cre^{WT} mice, p -value 0.0358, Figure 5B-D). This set of data demonstrate that the tPA produced and released by endothelial cells directly contribute to the modulation of NVC. Since tPA was also expressed from liver, possibly from hepatocytes (37), we decided to investigate whether partial hepatectomy (see methods section) may influence NVC induced by whiskers stimulation (Figure 6). These experiments were performed both on tPA^{WT} and tPA^{Null} mice. As reported above (Figure 1A-C), tPA^{Null} mice displayed a deficit in NVC induced by whiskers stimulation compared to WT animals ($+7.16 \pm 0.46\%$ of CBF increase for WT mice, $n=18$, vs. $+5.67 \pm 0.49\%$ for tPA^{Null} mice, $n=16$, i.e. -20.5% of CBF increase for tPA^{Null} mice compared to tPA^{WT} mice, p -value 0.0167), an effect also observed in WT animals following partial hepatectomy ($+9.58 \pm 0.45\%$ for Ligatured tPA^{WT} mice, $n=9$, vs. $+11.63 \pm 0.63\%$ of CBF increase for Sham tPA^{WT} mice, $n=4$, i.e. -17.5% of CBF increase for Ligatured tPA^{WT} mice compared to Sham tPA^{WT} mice, p -value 0.037). No difference was observed between tPA^{WT} and tPA^{Null} mice following partial hepatectomy ($+10.38 \pm 0.7\%$ for Ligatured tPA^{Null} mice, $n=10$, vs. $+9.58 \pm 0.45\%$ of CBF increase for Ligatured tPA^{WT} mice, $n=9$, i.e. $+8.3\%$ of CBF increase for Ligatured tPA^{Null} mice compared to Ligatured tPA^{WT} mice, p -value 0.41). The data suggest that the vascular tPA involved in NVC induced by whiskers stimulation is from liver origin. To determine whether this

tPA from liver originate was produced by endothelial cells or hepatocytes, we performed conditional deletion of possible hepatocytic tPA (see methods section) (Additional File 7). Using the VECad-Cre^{ΔtPA} mice, we performed hydrodynamic transfection of hepatocytes using a pLIVE-Cre-GFP promoter. Anti-GFP and anti-CRE immunostainings confirmed the hepatocytic expression of the Cre-GFP in hepatocytes (Additional File 6), leading to an additional conditional deletion (in addition of the endothelial deletion of tPA reported above (see Figure 6) of a putative hepatocytic tPA. Our data revealed no modification of neurovascular coupling in VECad-Cre^{ΔtPA} mice transfected with a pLIVE-Cre-GFP (conditional deletion of endothelial and hepatocytic tPA) compared to VECad-Cre^{ΔtPA} mice transfected with an empty-pLIVE (conditional deletion of endothelial tPA only) (Additional File 7) ($+10.45 \pm 0.59\%$ of CBF increase for VECad-Cre^{ΔtPA} mice transfected with pLIVE-CRE-GFP, $n=6$, vs. $+11.36 \pm 0.7\%$ for VECad-Cre^{ΔtPA} mice transfected with empty-pLive, $n=10$, i.e. $+8.64\%$ of CBF increase for VECad-Cre^{ΔtPA} mice transfected with pLIVE-CRE-GFP compared to VECad-Cre^{ΔtPA} mice transfected with an empty-pLIVE, p -value 0.29). Altogether, these data demonstrate that the tPA involved in NVC induced by whiskers stimulation is from liver endothelial origin. These data are in agreement with the immunohistochemistry performed from mouse brain and liver tissues (Figure 7), confirming the presence of tPA in both liver and brain endothelial cells.

Discussion

We have demonstrated that physiological levels of vascular tPA, from liver origin, contributes to the modulation of functional hyperemia mediated by brain endothelial NMDAR activation. Indeed, deficiency in tPA reduced functional hyperemia induced by whiskers stimulation in mice, whereas deficiency of PAI-1 increased it. Deletion of tPA is rescued by intravenous injection of tPA or by parabiosis with WT animals. Our data also reveal a key role of endothelial cells in this process, with conditional deletion of endothelial tPA leading to reduced functional hyperemia induced by whiskers stimulation and deletion of endothelial NMDA receptors leading to lack of response to tPA induced NVC. We also show that bradykinin receptors type 2 activation induces both release of tPA in the vasculature and subsequent potentiation of NVC. Our data also demonstrate that physiological levels of vascular tPA directly contribute to the efficiency of neurovascular coupling. Finally, we evidenced that the vascular tPA involved in the NVC induced by whiskers stimulation is from liver endothelial cells origin. Altogether, these data unmask a new pathway contributing to the complex neurovascular coupling regulation.

This new mechanism may explain, some of the physiological and pathological brain functions of tPA reported so far. For instance, tPA was reported to display important functions in learning and memory processes (10,11), cognitive processes directly linked with neuronal activation and subsequent neurovascular coupling (38). Similarly, tPA and its inhibitor PAI-1 have been reported to interfere with A β -induced attenuation of neurovascular coupling (17). Up to know and in agreement with an extensive literature, mechanisms of NVC associated with these phenotypes, were mainly

associated with events occurring from the parenchyma to the vasculature. Our present data lead to integrate that NVC also involved mechanisms occurring from the blood stream to the vasculature (3). It is thus interesting to note, that blood transfusion from young to old mice, was reported to revitalize old brain and to reverse subsequent decline (39).

Neurovascular coupling has been linked to neuronal activation in general, mediated by a wide variety of vasoactive agents targeting different segments of the cerebrovascular tree (1). Of these, Nitric Oxide (NO) derived from NMDAR activity mediates a significant fraction of the response, and tPA is required for the full expression of this component by enabling NO production during NMDAR activation (16,18). Here we found that the levels of circulating tPA activity also contribute to neurovascular coupling. NMDA receptors signaling is a key process of neuronal mediated NVC (40). Here, we demonstrate that the NMDA receptors-dependent control of NVC also involve the NMDA receptors expressed at the luminal side of the endothelial cells. Endothelial NMDA receptors have been already identified as key actors of neuroinflammatory processes (20), also known to influence the efficiency of NVC (41).

Some studies have indicated that tPA modulates Ca^{2+} influx through NMDAR by interacting with the extracellular domain of the GluN1 subunit (42). Other studies have suggested that tPA does not act on NMDAR directly, but through LRP1 (Low Density Lipoprotein Related Protein-1) (43–45), which, like neuronal Oxyde Nitric Synthase (nNOS), is bridged to the NMDA receptor complex through the adaptor protein Post Synaptic Density Protein-95 (PSD-95) (46–49). All these studies were reported from neuronal investigations. But NMDA receptors are also exhibited by endothelial cells (22,50) and LRP1 too (51,52). On endothelial cells, tPA was reported to mediate NMDAR-dependent signaling, involving differential phosphorylation of proteins

associated with tight-junctions, such as the myosin light chain (MLC-1) (50). Our observation that the effects of vascular tPA on functional hyperemia are prevented by the conditional deletion of endothelial GluN1 subunit of NMDA are supported by the above literature. Our data also suggest that endothelial NMDA receptors play a negative vasoconstrictive tonus on the vessels in basal conditions, a process inhibited by tPA.

Increases in PAI-1 expression have also been described in relation with neurovascular and cardiovascular diseases (53–55). PAI-1 levels are also modulated in neurodegenerative disorders, especially in the context of Alzheimer's disease (56), a disease in which neurovascular coupling is dramatically affected (57–59). Thus, targeting the tPA dependent and NMDAR dependent modulation of NVC may have important clinical applications. Bradykinin (BK) is a vasoactive polypeptide that has cardioprotective effects (60), causing endothelium-dependent vasodilation by activating its endothelial B2 receptors, present in the lumen side of the vessels (61). Interestingly, BK has been shown to promote tPA secretion in isolated perfused vascular systems (62). Here, we evidenced that BK, and not angiotensin, promotes the release of active tPA in the blood stream in vivo via B2R, leading to a tPA-dependent specific increase of NVC. PAI-1 is among the factors released in the circulation by endothelial cells in the context of endothelial dysfunction (63). At the opposite release of tPA is more usually associated with normal endothelial function (64,65). In parallel, it is widely accepted that vascular endothelial cells, through the release of NO, prostacyclin, tPA and PAI-1, play important roles in the regulation of thrombosis and fibrinolysis, mechanisms also highly related with impaired NVC (66–68).

The consensus would be that the main amount of tPA in the blood stream would come from hepatocytes and that the endothelial cells would contribute to the local and/or fast

changes in tPA levels (69,70) . Our present data reveal that the vascular tPA involved in the control of the NVC induced by whiskers stimulation is coming from the liver, but from endothelial origin.

In conclusion, we have demonstrated that changes in circulating tPA levels, modulated by activation of endothelial bradykinin receptors, presumably coming from the liver endothelial cells, contributed to the regulation of NVC, through modulation of cerebral endothelial NMDA receptors. The data unveil a previously unappreciated role of the circulating tPA in the control of neurovascular coupling and subsequent cerebral physiopathology axis with potential therapeutic implications.

List of abbreviations

Ang-II: Angiotensin-II; B2Rag: Selective Bradykinin type 2 Receptor agonist; BK: Bradykinin; CBF: Cerebral Blood Flow; CNS: Central Nervous System; MAP: Mean Arterial Pressure; MLC: Myosin Light Chain; NMDAR: N-Methyl-D-Aspartate receptors; NO: Nitric Oxide; NVC: Neurovascular Coupling; PAI-1: type 1 Plasminogen Activator Inhibitor; PSD-95: Post Synaptic Density Protein-95; rtPA: recombinant tPA; tPA: tissue-type Plasminogen Activator.

Acknowledgments

This work was supported by grants from the Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche and INSERM (French National Institute for Health and Medical Research) (HCERES U1237-2017/2022) and the PLATMED European program (EURONANOMED2020-143).

Conflict of Interest

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

Authorship contributions

D.V., C.A., SMDL., Y.H., MY, JF, Z.Z. designed the study. D.V., C.A., Z.Z., M.Y. wrote the manuscript; M.Y., J.F., E.P., E.M., Y.H., L.L. performed experiments. All authors analyzed the data and reviewed the manuscript.

References

1. Iadecola C. The Neurovascular Unit Coming of Age: A Journey through Neurovascular Coupling in Health and Disease. Vol. 96, Neuron. Cell Press; 2017. p. 17–42.
2. Sweeney MD, Kisler K, Montagne A, Toga AW, Zlokovic B v. The role of brain vasculature in neurodegenerative disorders. Vol. 21, Nature Neuroscience. Nature Publishing Group; 2018. p. 1318–31.
3. Girouard H, Iadecola C. Neurovascular coupling in the normal brain and in hypertension, stroke, and Alzheimer disease. Vol. 100, Journal of Applied Physiology. 2006. p. 328–35.
4. Collen D, Lijnen HR. Tissue-type plasminogen activator: a historical perspective and personal account. 2004.
5. 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. Thrombosis and Haemostasis. 2004;92(2):358–68.
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. Molecular Neurobiology. 2016 Sep 1;53(7):5000–12.
7. 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. *Journal of Neurobiology*. 2006 May;66(6):564–77.

8. Angles-Cano E, Balaton A, le Bonniec B, Genot E, Elion J, Sultan Y. Production of monoclonal antibodies to the high fibrin-affinity, tissue- type plasminogen activator of human plasma. Demonstration of its endothelial origin by immunolocalization. *Blood*. 1985 Oct 1;66(4).

9. 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(12).

10. Hébert M, Anfray A, Chevilley 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. *Cerebral Cortex*. 2017 Oct 1;27(10):4783–96.

11. 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. *Journal of Cell Science*. 2007 Feb 15;120(4):578–85.

12. Pawlak R, Magarinos AM, Melchor J, McEwen B, Strickland S. Tissue plasminogen activator in the amygdala is critical for stress-induced anxiety-like behavior. *Nature Neuroscience*. 2003 Feb 1;6(2):168–74.

13. 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 Nov 16;101(46).

14. Wardlaw JM, Doubal FN, Valdes-Hernandez M, Wang X, Chappell FM, Shuler K, et al. Blood-brain barrier permeability and long-term clinical and imaging outcomes in cerebral small vessel disease. *Stroke*. 2013 Feb;44(2):525–7.
15. Marcos-Contreras OA, Martinez De Lizarrondo S, Bardou I, Orset C, Pruvost M, Anfray A, et al. Hyperfibrinolysis increases blood-brain barrier permeability by a plasmin-and bradykinin-dependent mechanism. 2016; Available from: <http://ashpublications.org/blood/article-pdf/128/20/2423/1397103/blood705384.pdf>
16. Park L, Gallo EF, Anrather J, Wang G, Norris EH, Paul J, et al. Key role of tissue plasminogen activator in neurovascular coupling [Internet]. 2008. Available from: www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.0708823105
17. Park L, Zhou J, Koizumi K, Wang G, Anfray A, Ahn SJ, et al. TPA deficiency underlies neurovascular coupling dysfunction by amyloid- β . *Journal of Neuroscience*. 2020 Oct 14;40(42):8160–73.
18. Anfray A, Drieu A, Hingot V, Hommet Y, Yetim M, Rubio M, et al. Circulating tPA contributes to neurovascular coupling by a mechanism involving the endothelial NMDA receptors. *Journal of Cerebral Blood Flow and Metabolism*. 2020 Oct 1;40(10):2038–54.
19. Nakazawa K, McHugh TJ, Wilson MA, Tonegawa S. NMDA receptors, place cells and hippocampal spatial memory. Vol. 5, *Nature Reviews Neuroscience*. Nature Publishing Group; 2004. p. 361–72.
20. 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 Sep 1;139(9):2406–19.

21. Reijerkerk A, Kooij G, van der Pol SMA, Leyen T, Lakeman K, van het Hof B, et al. The NR1 subunit of NMDA receptor regulates monocyte transmigration through the brain endothelial cell barrier. *Journal of Neurochemistry*. 2010 Apr;113(2):447–53.
22. Peters EC, Gee MT, Pawlowski LN, Kath AM, Polk FD, Vance CJ, et al. Amyloid- β disrupts unitary calcium entry through endothelial NMDA receptors in mouse cerebral arteries. *J Cereb Blood Flow Metab*. 2021 Aug 31;
23. Zheng Z, Nayak L, Wang W, Yurdagul A, Wang X, Cai B, et al. An ATF6-tPA pathway in hepatocytes contributes to systemic fibrinolysis and is repressed by DACH1. *Blood*. 2019;133(7).
24. Samad F, Yamamoto K, Loskutoff DJ. Distribution and regulation of plasminogen activator inhibitor-1 in murine adipose tissue in vivo: Induction by tumor necrosis factor- α and lipopolysaccharide. *Journal of Clinical Investigation*. 1996 Jan 1;97(1):37–46.
25. Ny T, Sawdey M, Lawrence D, Millan JL, Loskutoff DJ. Cloning and sequence of a cDNA coding for the human beta-migrating endothelial-cell-type plasminogen activator inhibitor. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1986 Sep;83(18).
26. Medcalf RL. Fibrinolysis: from blood to the brain. *Journal of Thrombosis and Haemostasis*. 2017 Nov 1;15(11):2089–98.
27. Shi K, Zou M, Jia DM, Shi S, Yang X, Liu Q, et al. TPA Mobilizes Immune Cells That Exacerbate Hemorrhagic Transformation in Stroke. *Circulation Research*. 2021;62–75.
28. Brown NJ, Gainer J v, Murphey LJ, Vaughan DE. Bradykinin Stimulates Tissue Plasminogen Activator Release From Human Forearm Vasculature Through B 2

Receptor-Dependent, NO Synthase-Independent, and Cyclooxygenase-Independent Pathway [Internet]. 2000. Available from: <http://www.circulationaha.org>

29. Kerins DM, Hao Q, Vaughan DE. Angiotensin induction of PAI-1 expression in endothelial cells is mediated by the hexapeptide angiotensin IV. *Journal of Clinical Investigation*. 1995;96(5):2515–20.
30. Nordt TK, Lohrmann J, Bode C. Regulation of PAI-1 expression by genetic polymorphisms. Impact on atherogenesis. *Thromb Res*. 2001 Sep 30;103 Suppl 1.
31. Pasquet N, Douceau S, Naveau M, Lesept F, Louessard M, Lebouvier L, et al. Tissue-Type Plasminogen Activator Controlled Corticogenesis Through a Mechanism Dependent of NMDA Receptors Expressed on Radial Glial Cells. *Cerebral Cortex*. 2019 Jun 1;29(6):2482–98.
32. Léger C, Dupré N, Aligny C, Bénard M, Lebon A, Henry V, et al. Glutamate controls vessel-associated migration of GABA interneurons from the pial migratory route via NMDA receptors and endothelial protease activation. *Cellular and Molecular Life Sciences*. 2020 May 1;77(10):1959–86.
33. Alva JA, Zovein AC, Monvoisin A, Murphy T, Salazar A, Harvey NL, et al. VE-cadherin-cre-recombinase transgenic mouse: A tool for lineage analysis and gene deletion in endothelial cells. *Developmental Dynamics*. 2006 Mar;235(3):759–67.
34. Kamran P, Sereti KI, Zhao P, Ali SR, Weissman IL, Ardehali R. Parabiosis in mice: a detailed protocol. *J Vis Exp*. 2013;(80).
35. Vaughan DE, Lazos SA, Tong K. Angiotensin II Regulates the Expression of Plasminogen Activator Inhibitor-1 in Cultured Endothelial Cells: A Potential Link

between the Renin-Angiotensin System and Thrombosis. *Journal of Clinical Investigation*. 1995;95(3):995–1001.

36. Minai K, Matsumoto T, Horie H, Ohira N, Takashima H, Yokohama H, et al. Bradykinin stimulates the release of tissue plasminogen activator in human coronary circulation: effects of angiotensin-converting enzyme inhibitors. *J Am Coll Cardiol*. 2001 May;37(6).

37. Ping Zhang L, Takahara T, Yata Y, Furui K, Jin B, Kawada N, et al. Increased expression of phninogen activator and phsminogen activator inhibitor during liver fibrogenesis of ratx role of stellate cells. *Journal of Hepatology*. 1999;31:703–11.

38. Lefferts WK, Deblois JP, Barreira T v, Heffernan KS. Neurovascular coupling during cognitive activity in adults with controlled hypertension. *J Appl Physiol [Internet]*. 2018;125:1906–16. Available from: <http://www.jappl.org>

39. Wyss-Coray T. Ageing, neurodegeneration and brain rejuvenation. Vol. 539, *Nature*. Nature Publishing Group; 2016. p. 180–6.

40. Mapelli L, Gagliano G, Soda T, Laforenza U, Moccia F, D'Angelo EU. Granular layer neurons control cerebellar neurovascular coupling through an NMDA receptor/NO-dependent system. *Journal of Neuroscience*. 2017 Feb 1;37(5):1340–51.

41. Fulop GA, Ahire C, Csipo T, Tarantini S, Kiss T, Balasubramanian P, et al. Cerebral venous congestion promotes blood-brain barrier disruption and neuroinflammation, impairing cognitive function in mice. *Geroscience*. 2019 Oct 1;41(5):575–89.

42. Nicole O, Docagne F, Ali C, Margaill I, Carmeliet P, MacKenzie ET, et al. The proteolytic activity of tissue-plasminogen activator enhances NMDA receptor-mediated signaling. *Nat Med.* 2001 Jan;7(1).
43. Martin AM, Kuhlmann C, Trossbach S, Jaeger S, Waldron E, Roebroek A, et al. The functional role of the second NPXY motif of the LRP1 β -chain in tissue-type plasminogen activator-mediated activation of N-methyl-D-aspartate receptors. *Journal of Biological Chemistry.* 2008 May 2;283(18):12004–13.
44. Samson AL, Nevin ST, Croucher D, Niego B, Daniel PB, Weiss TW, et al. Tissue-type plasminogen activator requires a co-receptor to enhance NMDA receptor function. *Journal of Neurochemistry.* 2008 Nov;107(4):1091–101.
45. Mantuano E, Lam MS, Gonias SL. LRP1 assembles unique co-receptor systems to initiate cell signaling in response to tissue-type plasminogen activator and Myelin-associated glycoprotein. *Journal of Biological Chemistry.* 2013 Nov 22;288(47):34009–18.
46. Gotthardt M, Trommsdorff M, Nevitt MF, Shelton J, Richardson JA, Stockinger W, et al. Interactions of the low density lipoprotein receptor gene family with cytosolic adaptor and scaffold proteins suggest diverse biological functions in cellular communication and signal transduction. *Journal of Biological Chemistry.* 2000 Aug 18;275(33):25616–24.
47. May P, Rohlmann A, Bock HH, Zurhove K, Marth JD, Schomburg ED, et al. Neuronal LRP1 Functionally Associates with Postsynaptic Proteins and Is Required for Normal Motor Function in Mice. *Molecular and Cellular Biology.* 2004 Oct 15;24(20):8872–83.

48. Nakajima C, Kulik A, Frotscher M, Herz J, Schäfer M, Bock HH, et al. Low density lipoprotein receptor-related protein 1 (LRP1) modulates N-methyl-D-aspartate (NMDA) receptor-dependent intracellular signaling and NMDA-induced regulation of postsynaptic protein complexes. *Journal of Biological Chemistry*. 2013 Jul 26;288(30):21909–23.
49. Norris EH, Strickland S. Modulation of NR2B-regulated contextual fear in the hippocampus by the tissue plasminogen activator system. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2007 Aug 14;104(33).
50. 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. *Journal of Neuroscience*. 2020 Feb 19;40(8):1778–87.
51. Shibata M, Yamada S, Ram Kumar S, Calero M, Bading J, Frangione B, et al. Clearance of Alzheimer’s amyloid-  1-40 peptide from brain by LDL receptor-related protein-1 at the blood-brain barrier. *Journal of Clinical Investigation*. 2000;106(12):1489–99.
52. Storck SE, Pietrzik CU. Endothelial LRP1 – A Potential Target for the Treatment of Alzheimer’s Disease: Theme: Drug Discovery, Development and Delivery in Alzheimer’s Disease Guest Editor: Davide Brambilla. Vol. 34, *Pharmaceutical Research*. Springer New York LLC; 2017. p. 2637–51.
53. Jung RG, Simard T, Labinaz A, Ramirez FD, di Santo P, Motazedian P, et al. Role of plasminogen activator inhibitor-1 in coronary pathophysiology. Vol. 164, *Thrombosis Research*. Elsevier Ltd; 2018. p. 54–62.

54. Yu BY, Subudeng G, Du CG, Liu ZH, Zhao YF, Namei E, et al. Plasminogen activator, tissue type regulates germinal vesicle breakdown and cumulus expansion of bovine cumulus-oocyte complex in vitro. *Biology of Reproduction*. 2019 Jun 1;100(6):1473–81.
55. Rosenberg RD, Aird WC. Vascular-bed--specific hemostasis and hypercoagulable states. *N Engl J Med*. 1999 May 20;340(20).
56. Oh J, Lee HJ, Song JH, Park SI, Kim H. Plasminogen activator inhibitor-1 as an early potential diagnostic marker for Alzheimer's disease. *Experimental Gerontology*. 2014 Dec 1;60:87–91.
57. Tarantini S, Tran CHT, Gordon GR, Ungvari Z, Csiszar A. Impaired neurovascular coupling in aging and Alzheimer's disease: Contribution of astrocyte dysfunction and endothelial impairment to cognitive decline. Vol. 94, *Experimental Gerontology*. Elsevier Inc.; 2017. p. 52–8.
58. Nicolakakis N, Aboukassim T, Ongali B, Lecrux C, Fernandes P, Rosa-Neto P, et al. Complete rescue of cerebrovascular function in aged Alzheimer's disease transgenic mice by antioxidants and pioglitazone, a peroxisome proliferator-activated receptor γ agonist. *Journal of Neuroscience*. 2008 Sep 10;28(37):9287–96.
59. Kisler K, Nelson AR, Montagne A, Zlokovic B v. Cerebral blood flow regulation and neurovascular dysfunction in Alzheimer disease. Vol. 18, *Nature Reviews Neuroscience*. Nature Publishing Group; 2017. p. 419–34.
60. Starkopf J, Bugge E, Ytrehus K. Preischemic bradykinin and ischaemic preconditioning in functional recovery of the globally ischaemic rat heart. *Cardiovasc Res*. 1997 Jan;33(1).

61. van Guilder GP, Pretorius M, Luther JM, Byrd JB, Hill K, Gainer J v., et al. Bradykinin type 2 receptor BE1 genotype influences bradykinin-dependent vasodilation during angiotensin-converting enzyme inhibition. In: Hypertension. 2008. p. 454–9.
62. Emeis JJ. Perfused rat hindlegs. A model to study plasminogen activator release. Thromb Res. 1983 May 1;30(3).
63. Jacobs A, Schutte AE, Ricci C, Pieters M. Plasminogen activator inhibitor-1 activity and the 4G/5G polymorphism are prospectively associated with blood pressure and hypertension status. Journal of Hypertension. 2019 Dec 1;37(12):2361–70.
64. Stein CM, Brown N, Vaughan DE, Lang CC, Wood AJ. Regulation of local tissue-type plasminogen activator release by endothelium-dependent and endothelium-independent agonists in human vasculature. J Am Coll Cardiol. 1998 Jul;32(1).
65. Muldowney JA, Vaughan DE. Tissue-type plasminogen activator release: new frontiers in endothelial function. J Am Coll Cardiol. 2002 Sep 4;40(5).
66. Thors B, Halld  rsson H, Jónsdóttir G, Thorgeirsson G. Mechanism of thrombin mediated eNOS phosphorylation in endothelial cells is dependent on ATP levels after stimulation. Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Cell Research. 2008 Oct;1783(10):1893–902.
67. Koide M, Bonev AD, Nelson MT, Wellman GC. Inversion of neurovascular coupling by subarachnoid blood depends on large-conductance Ca²⁺-activated K⁺(BK) channels. Proc Natl Acad Sci U S A. 2012 May 22;109(21).

68. Braaten J v, Handt S, Jerome WG, Kirkpatrick J, Lewis JC, Hantgan RR. Regulation of fibrinolysis by platelet-released plasminogen activator inhibitor 1: light scattering and ultrastructural examination of lysis of a model platelet-fibrin thrombus. *Blood*. 1993 Mar 1;81(5).
69. Zheng Z, Nakamura K, Gershbaum S, Wang X, Thomas S, Bessler M, et al. Interacting hepatic PAI-1/tPA gene regulatory pathways influence impaired fibrinolysis severity in obesity. *Journal of Clinical Investigation*. 2020 Aug 3;140(8):4348–59.
70. Emeis J. The Control of tPA and PAI-1 Secretion from the Vessel Wall. *Vascular Medicine Review*. 1995 May 3;vmr-6(2).

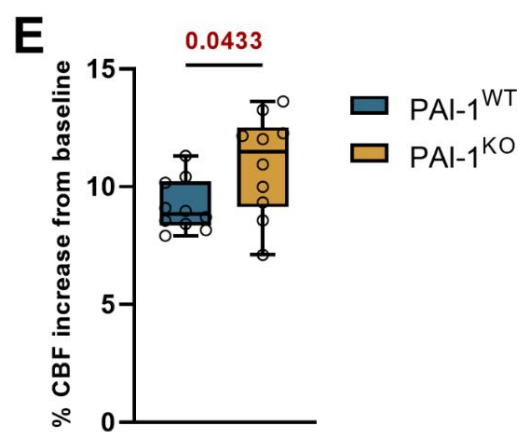
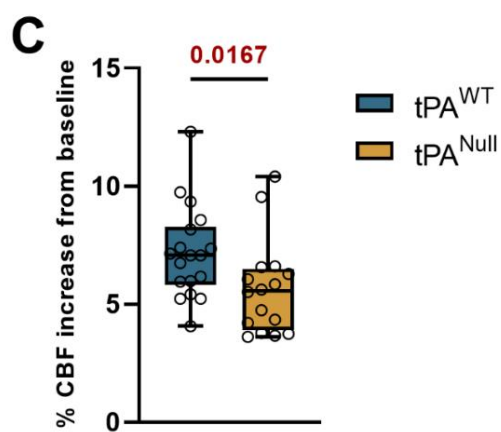
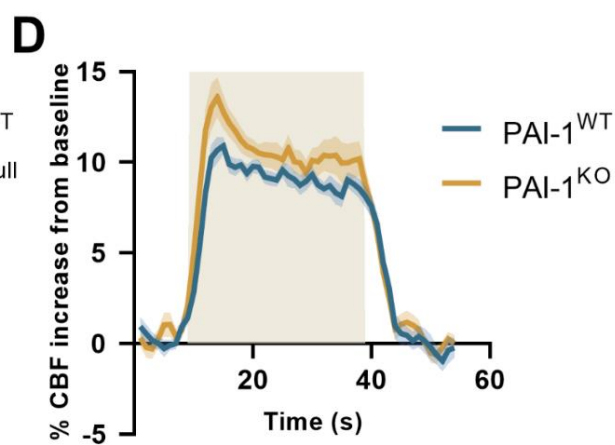
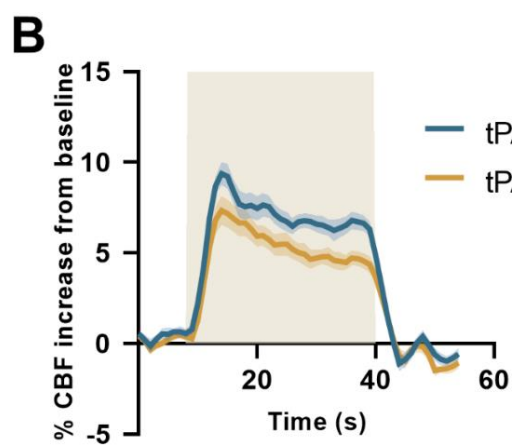
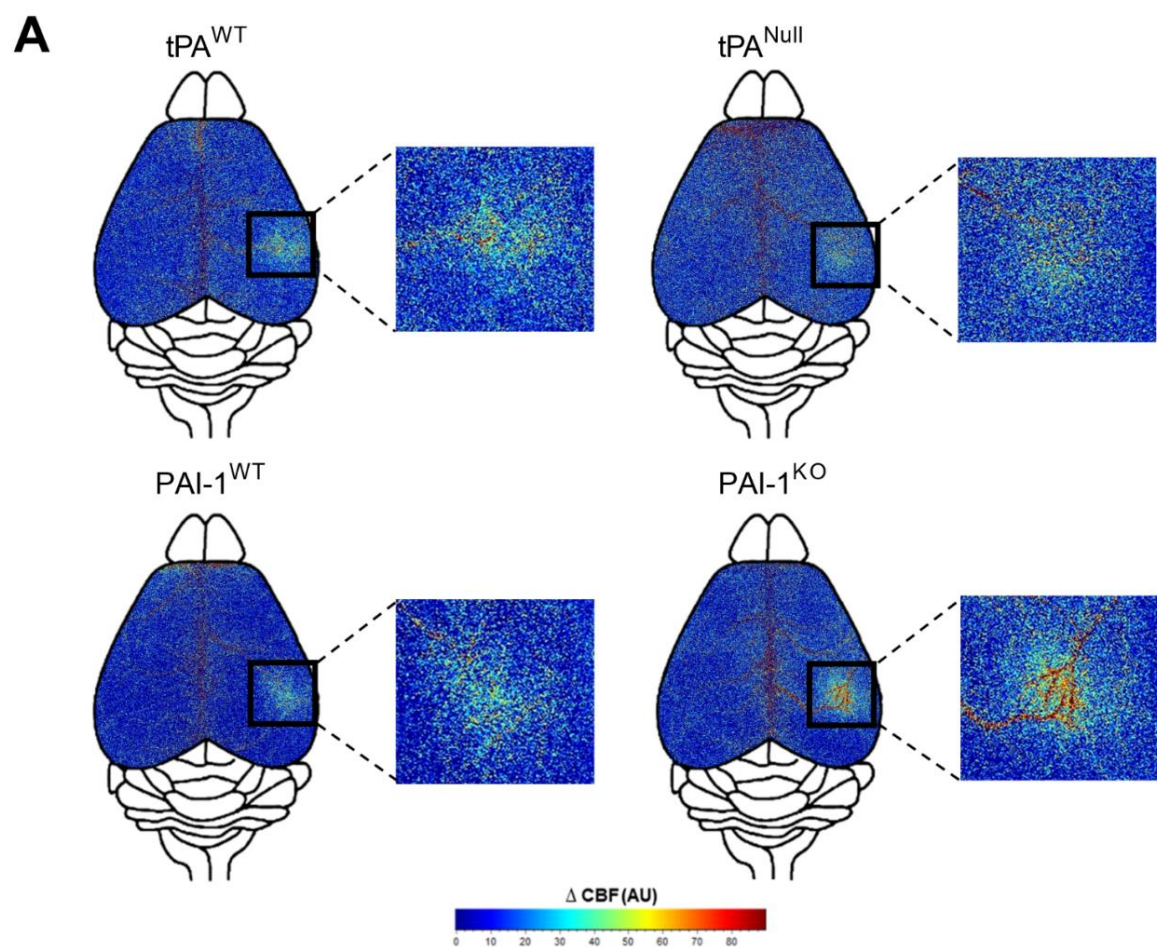


Figure 1: The tPA/PAI-1 axis controls NVC. A: Colormap corresponds to the activation map related Δ CBF changes during whiskers stimulations of tPA^{Null}, PAI-1^{KO} mice and their wild type littermates. Maps were obtained by subtraction of stimulation frames and resting frames. Warm colours indicate an elevation of CBF during whiskers stimulations. **B, D:** Time course of % CBF increase (mean $\pm$ SEM) during whiskers stimulations (■) of tPA^{Null} (**B**) and PAI-1^{-/-} (**D**) mice (■) and their littermates (■). **C, E:** Box plots show the variations of % CBF increase from baseline during whiskers stimulations of tPA^{Null} (**C**) and PAI-1^{-/-} (**E**) mice and their littermates. Box plot with medians, 1st and 3rd quartiles, min and max with values for each mouse. *p < 0.05 from tPA^{WT} or PAI-1^{WT}, Mann-Whitney test, n=18/16 tPA^{WT}/tPA^{Null}, n=10 PAI-1^{WT}/PAI-1^{KO}.

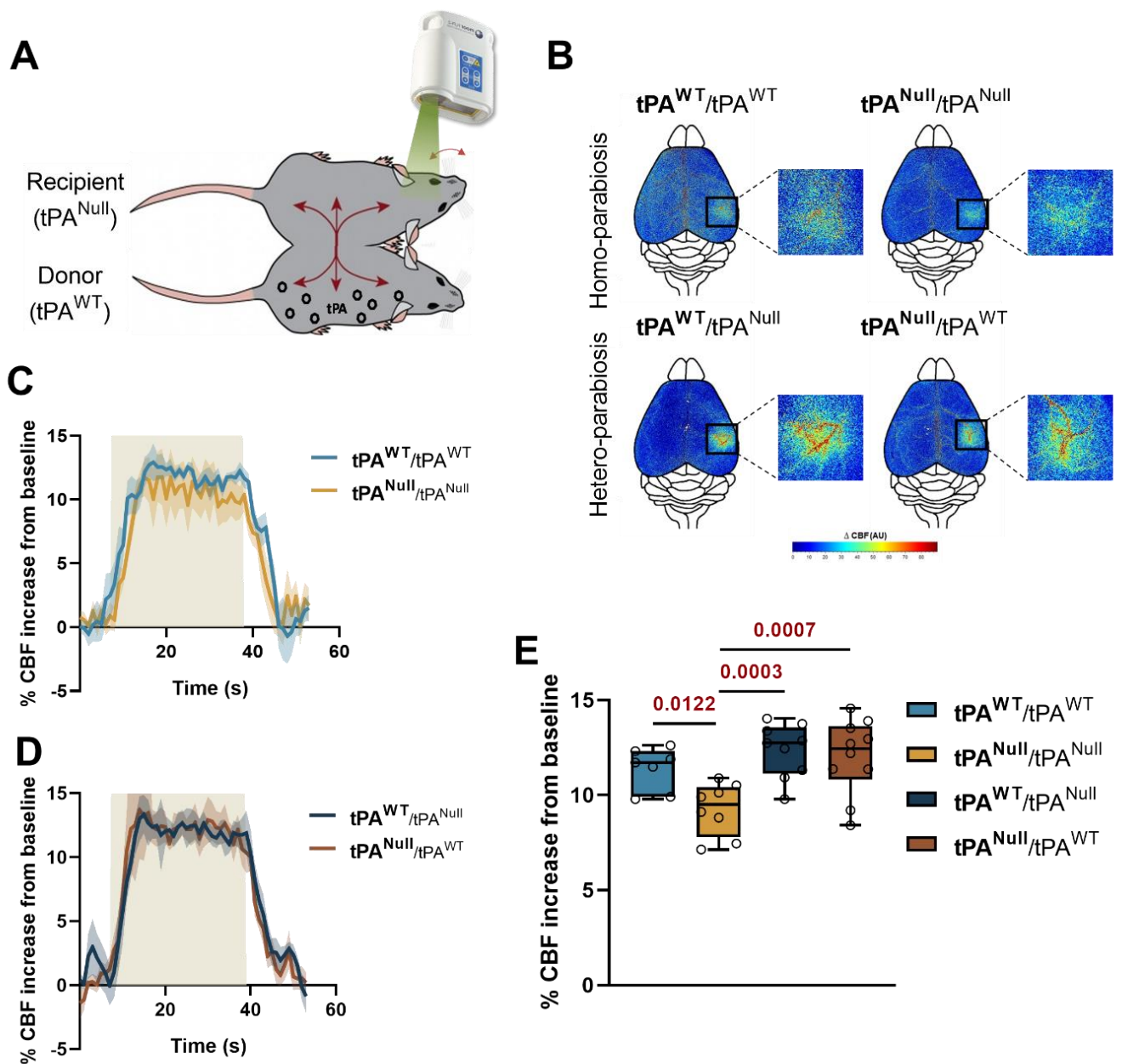
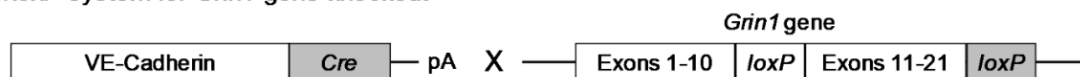


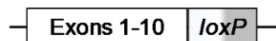
Figure 2: Endogenous tPA levels influence NVC. **A:** Schematic representation of the procedure of whiskers stimulations paradigm between two mice (tPA^{Null} and tPA^{WT}) in parabiosis. tPA from the donor (tPA^{WT}) will be share to the recipient (tPA^{Null}). **B:** Colormap corresponds to the activation map related ΔCBF changes during whiskers stimulations in parabiont tPA^{Null} or tPA^{WT} mice. Warm colours indicate an elevation of CBF during whiskers stimulations. **C-D:** Time course of % CBF increase (mean $\pm$ SEM) during whiskers stimulations (■) in homo-parabiosis tPA^{WT} (—) and tPA^{Null} (—) mice (**C**) and hetero-parabiosis tPA^{WT} (—) and tPA^{Null} (—) mice (**D**). **E:** Box plots show the variation of % CBF increase from baseline during whiskers stimulations in homo-parabiosis **tPA^{WT}/tPA^{WT}** and **tPA^{Null}/tPA^{Null}** , and hetero-parabiosis **tPA^{WT}/tPA^{Null}** and **tPA^{Null}/tPA^{WT}** (the stimulated mice is mentioned in bold). Box plot with medians, 1st and 3rd quartiles, min and max with values for each mouse. * $p < 0.05$ and from **tPA^{Null}/tPA^{Null}** , one-way ANOVA and Uncorrected Fisher's LSD tests, $n=7$ **tPA^{WT}/tPA^{WT}** , $n=8$ **tPA^{Null}/tPA^{Null}** , $n=9$ **tPA^{WT}/tPA^{Null}** , $n=10$ **tPA^{Null}/tPA^{WT}** (n represents the number of stimulated animals).

A

Cre/loxP system for Grin1 gene knockout



In endothelial cells



In other cells

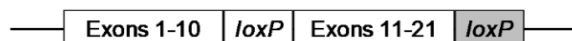
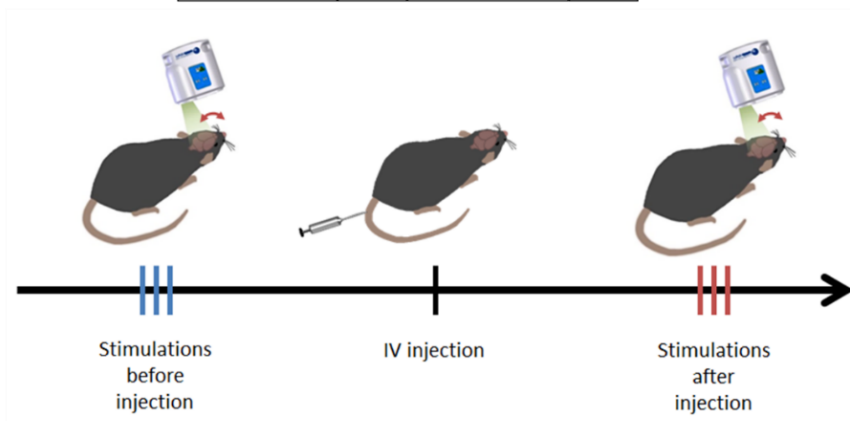
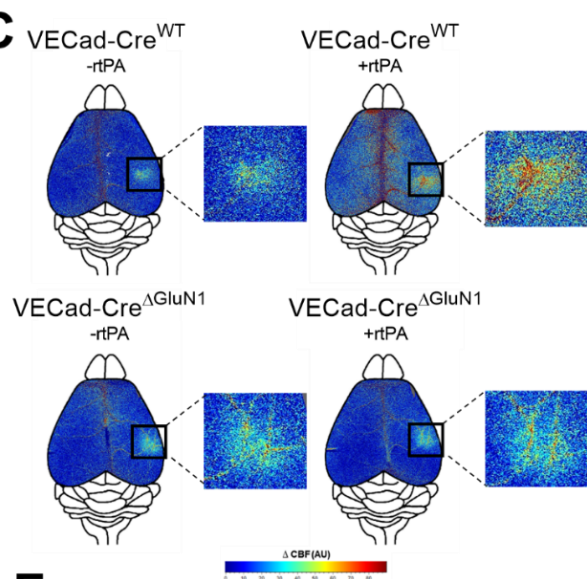
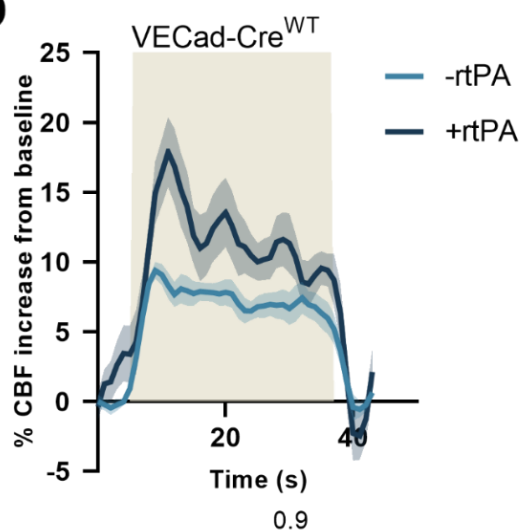
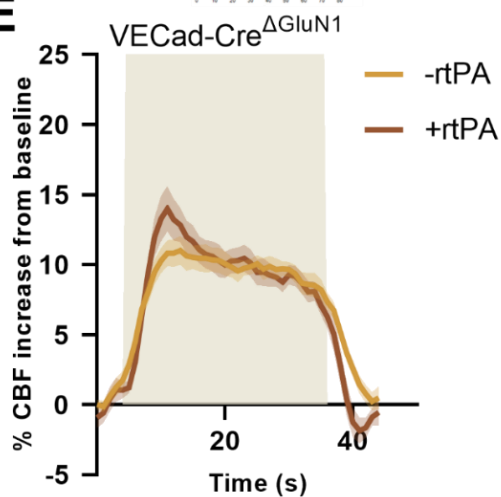
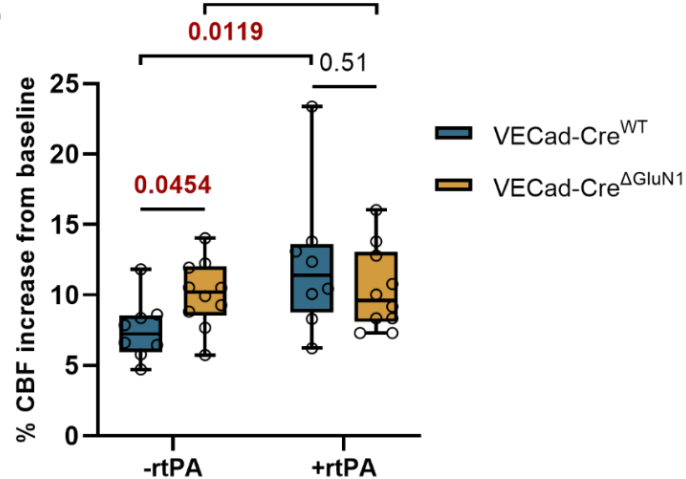
**B****C****D****E****F**

Figure 3: Endothelial NMDAR controls NVC, an effect mediated by vascular tPA.

A: Schematic representation of the generation of VE-Cadherin Cre/Grin-1 Lox mice. The cadherin 5 promoter was used to drive expression of CRE recombinase in the vascular endothelium. LoxP sites were flanked in the transmembrane and C-term regions of Grin-1 gene (exons 11-21). This configuration carries out the deletion of endothelial Grin-1 gene while conserving Grin-1 in other cells. **B:** Schematic representation of the experimental timeline of whiskers stimulation paradigm. 3 trains of stimulations were made on laser speckle flowmetry before IV infusion of rtPA for 10 minutes and 3 additional trains after. **C:** Colormap corresponds to the activation map related Δ CBF changes during whiskers stimulations in VECad-Cre ^{Δ GluN1} mice and their littermate before and after IV infusion of rtPA. Warm colours indicate an elevation of CBF during whiskers stimulations. **D-E:** Time course of % CBF increase (mean $\pm$ SEM) during whiskers stimulations (■) in VECad-Cre ^{Δ GluN1} mice (**E**) and their littermate (**D**), before (—/—) and after (—/—) IV infusion of rtPA. **F:** Box plots show the variations of % CBF increase from baseline during whiskers stimulations in VECad-Cre ^{Δ GluN1} mice and their wild type littermates before and after IV infusions of rtPA. Box plot with medians, 1st and 3rd quartiles, min and max with values for each mouse. * $p < 0.05$ from VECad-Cre^{WT} or -rtPA, Kruskal-Wallis and Uncorrected Dunn's tests, $n=8$ VECad-Cre^{WT}, $n=10$ VECad-Cre ^{Δ GluN1}.

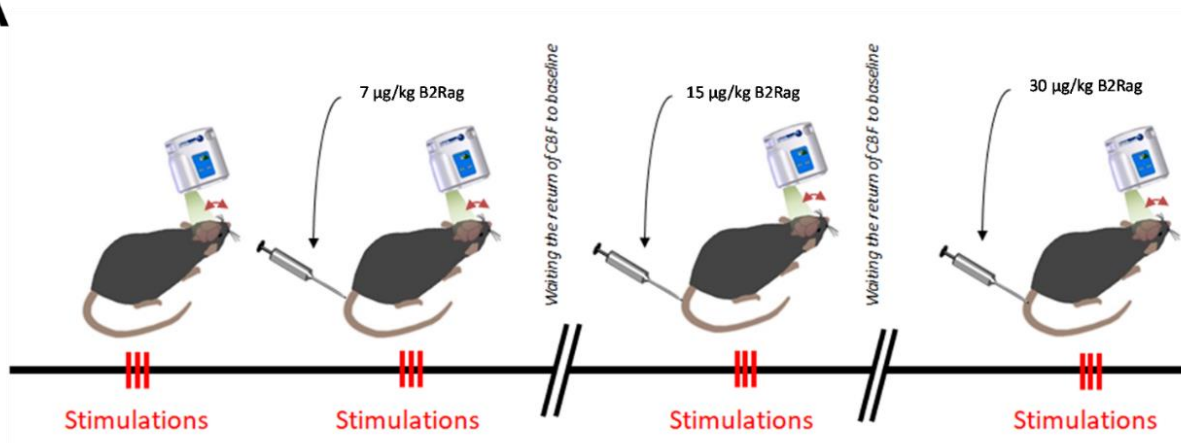
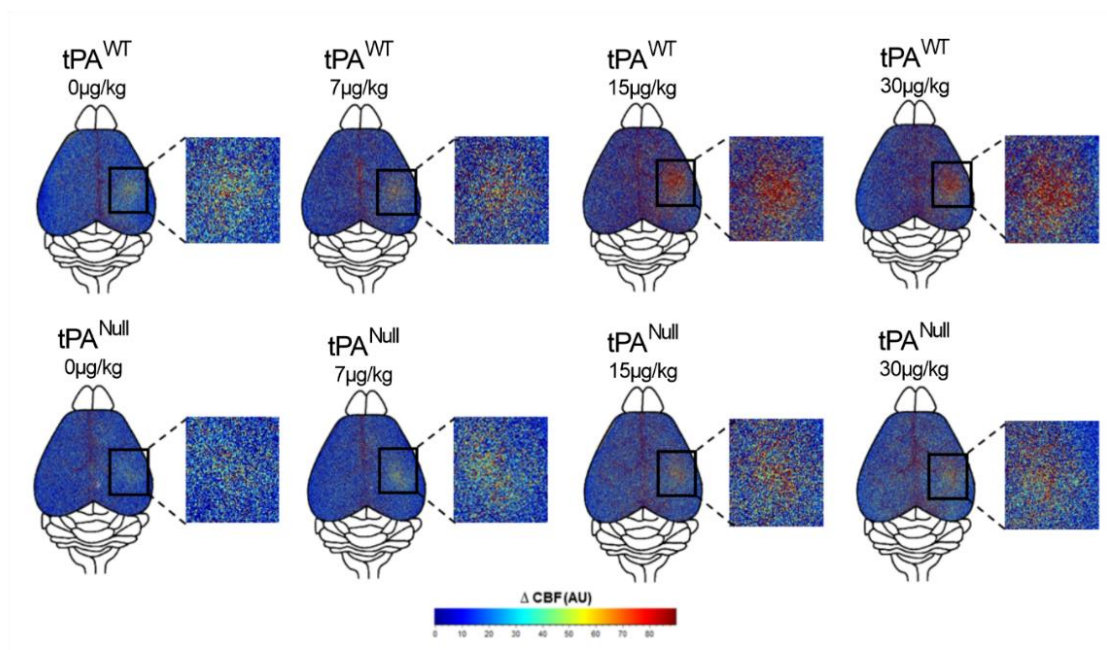
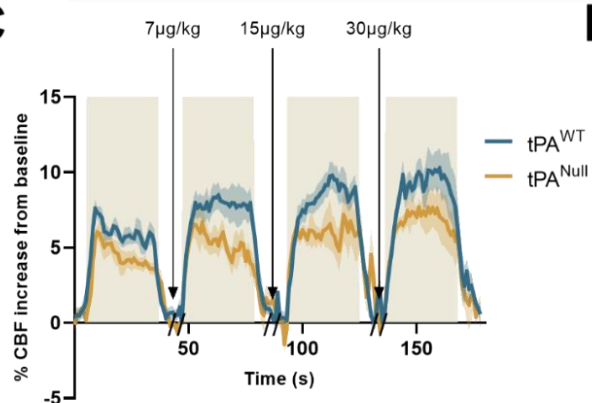
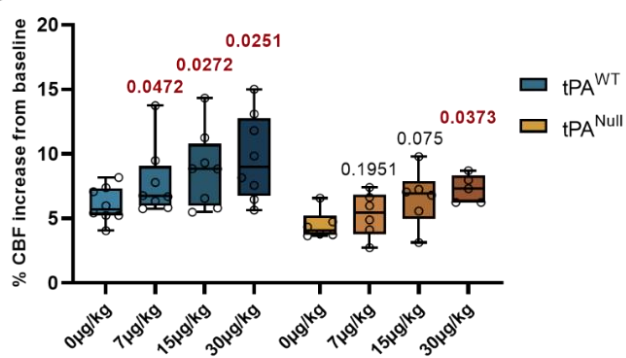
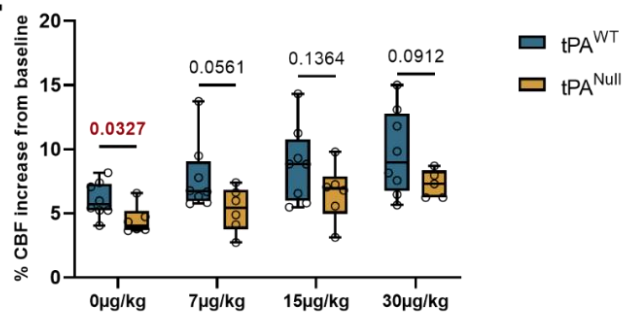
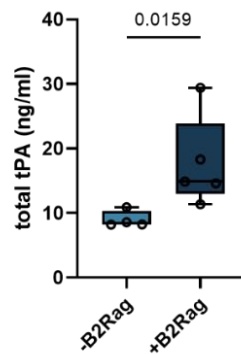
A**B****C****D****E****F**

Figure 4: Intravenous administration of bradykinin type 2 receptor agonist (B2Rag) influences NVC in a tPA-dependent manner. **A:** Schematic representation of the experimental timeline of whiskers stimulation paradigm. 3 trains of stimulations were made on laser speckle flowmetry 10 minutes after IV injection of B2Rag at different doses (0, 7, 15 and 30 $\mu\text{g/kg}$). Between each dose, the return of CBF to baseline was waited. **B:** Colormap corresponds to the activation map related ΔCBF changes during whiskers stimulation in tPA^{Null} mice and their wild type littermates for the different doses of B2Rag (0, 7, 15 and 30 $\mu\text{g/kg}$). Warm colours indicate an elevation of CBF during whiskers stimulations. **C:** Time course of % CBF increase (mean $\pm$ SEM) during whiskers stimulations (■) in tPA^{Null} mice (■) and their littermate (■), at different doses of B2Rag (0, 7, 15 and 30 $\mu\text{g/kg}$). **D-E:** Box plots show the variations of % CBF increase from baseline during whiskers stimulation in tPA^{Null} mice and their wild type littermates for the different doses of B2Rag (0, 7, 15 and 30 $\mu\text{g/kg}$). Box plot with medians, 1st and 3rd quartiles, min and max with values for each mouse. * $p < 0.05$ from 0mg/kg or tPA^{WT} , Two-Way-ANOVA and Uncorrected Fisher's LSD tests, $n=8$ tPA^{WT} , $n=6$ tPA^{Null} . **F:** Box plots representing ELISA analyses of total tPA in tPA^{WT} mice treated or not with the B2Rag. A saline solution or 60 $\mu\text{g/kg}$ of B2Rag were injected intravenously and plasma samples were collected 5 minutes later and subjected to ELISA analysis. Box plots with medians, 1st and 3rd quartiles, min and max with values for each mouse. * $p < 0.05$ from Vehicle, Mann-Whitney test, $n=4$ Vehicle, $n=5$ B2Rag.

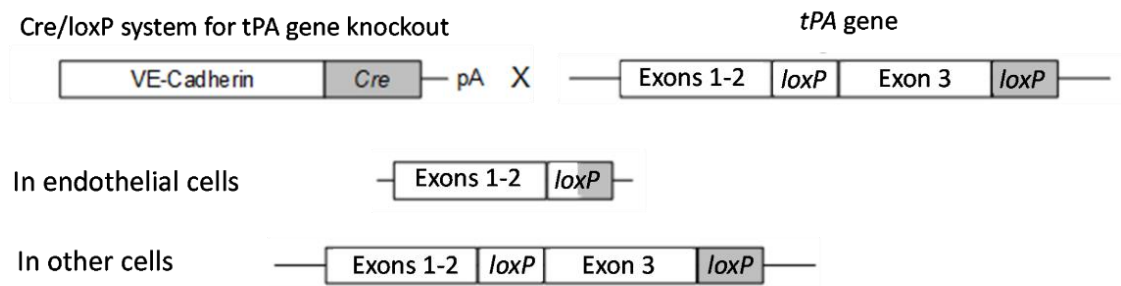
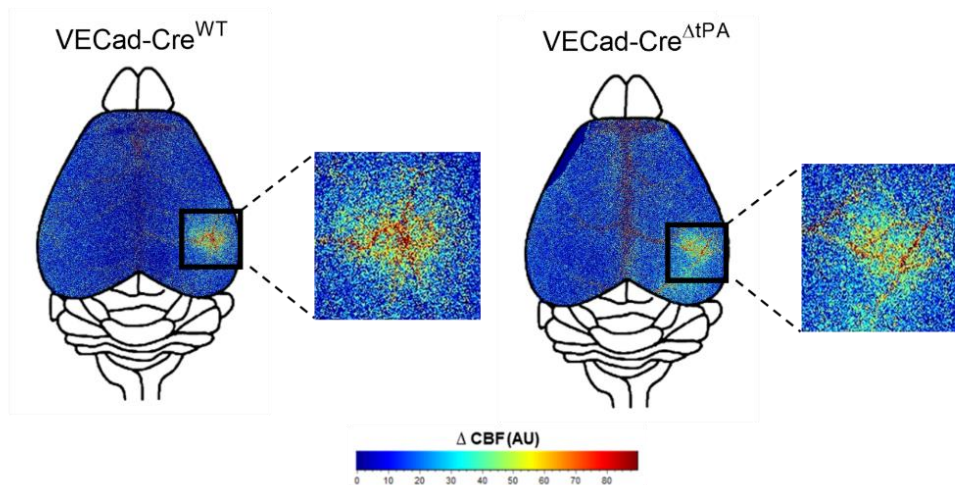
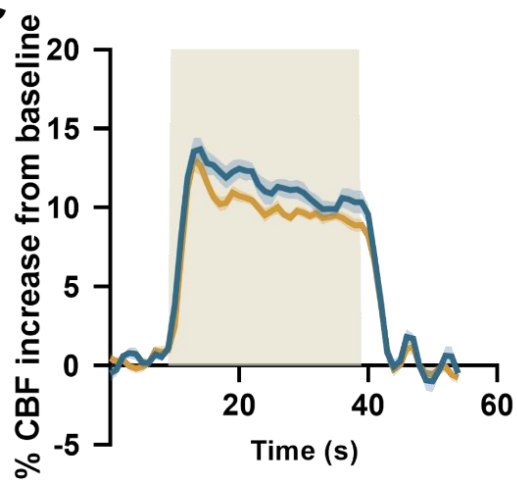
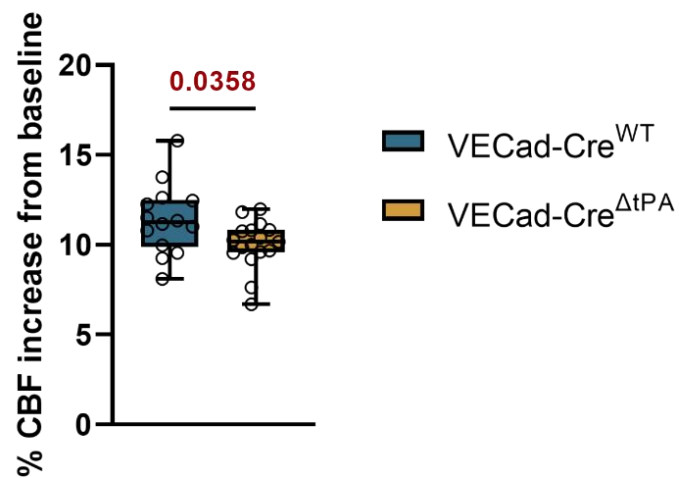
A Cre/loxP system for tPA gene knockout**B****C****D**

Figure 5: Endothelial tPA controls NVC. **A:** Schematic representation of the generation of VE-Cadherin Cre/tPA Lox mice. The cadherin 5 promoter was used to drive expression of Cre recombinase in the vascular endothelium. LoxP sites were flanked in the exon 3 of tPA gene. This configuration carries out the deletion of endothelial tPA gene while conserving tPA in other cells. **B:** Colormap corresponds to the activation map related Δ CBF changes during whiskers stimulations of VECad-Cre ^{Δ tPA} mice and their wild type littermates. Maps were obtained by subtraction of stimulation frames and resting frames. Warm colours indicate an elevation of CBF during whiskers stimulations. **C:** Time course of % CBF increase (mean $\pm$ SEM) during whiskers stimulations (■) of VECad-Cre ^{Δ tPA} (▨) and their littermates (▤). **D:** Box plots show the variations of % CBF increase from baseline during whiskers stimulation of VECad-Cre ^{Δ tPA} mice and their littermates. Box plot with medians, 1st and 3rd quartiles, min and max with values for each mouse. *p < 0.05 from VECad-Cre^{WT}, Mann-Whitney test, n=14/17 VECad-Cre^{WT}/ VECad-Cre ^{Δ tPA}.

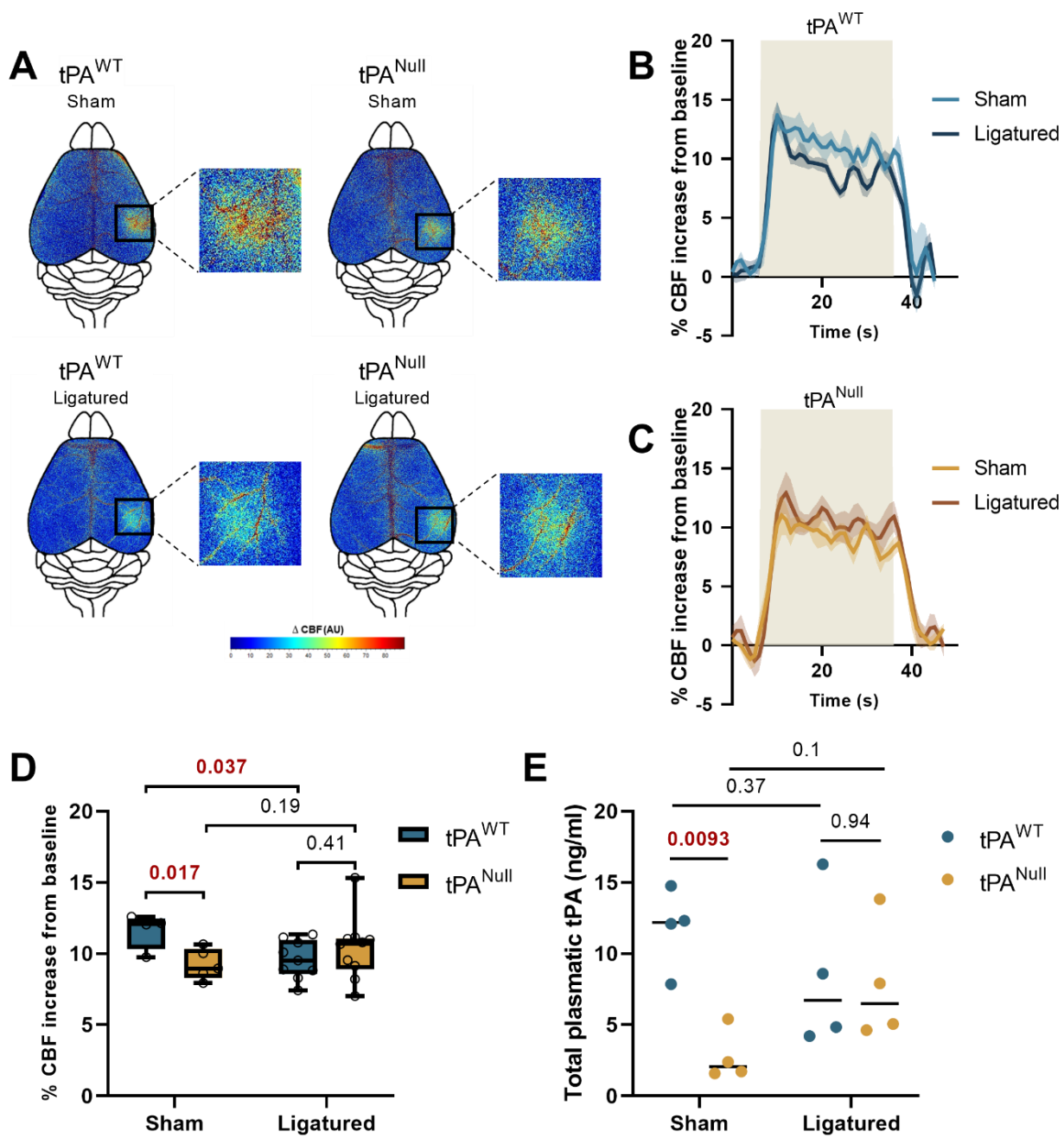


Figure 6: Partial hepatectomy influences NVC. A: Colormap corresponds to the activation map related Δ CBF changes during whiskers stimulations in tPA^{Null} mice and their littermate in sham and ligatured conditions 24h after partial hepatectomy. Warm colours indicate an elevation of CBF during whiskers stimulations. **B-C:** Time course of % CBF increase (mean $\pm$ SEM) during whiskers stimulations (■) in tPA^{Null} mice (**C**) and their littermate (**B**), in sham (—/—) or ligatured (—/—) conditions. **D:** Box plots show the variation of % CBF increase from baseline during whiskers stimulations in tPA^{Null} mice and their littermate in sham and ligatured conditions. Box plot with medians, 1st and 3rd quartiles, min and max with values for each mouse. **E:** Mean $\pm$ SEM representing ELISA analyses of total tPA in tPA^{Null} mice and their littermate in sham and ligatured conditions (n=4 for each group). 24h after partial hepatectomy, plasma samples were collected and subjected to ELISA analysis. *p < 0.05 from sham tPA^{WT}, Kruskal-Wallis and Uncorrected Dunn's tests, n=4 sham tPA^{WT}, n=9 ligatured tPA^{WT}, n=5 sham tPA^{Null}, n=10 ligatured tPA^{Null}.

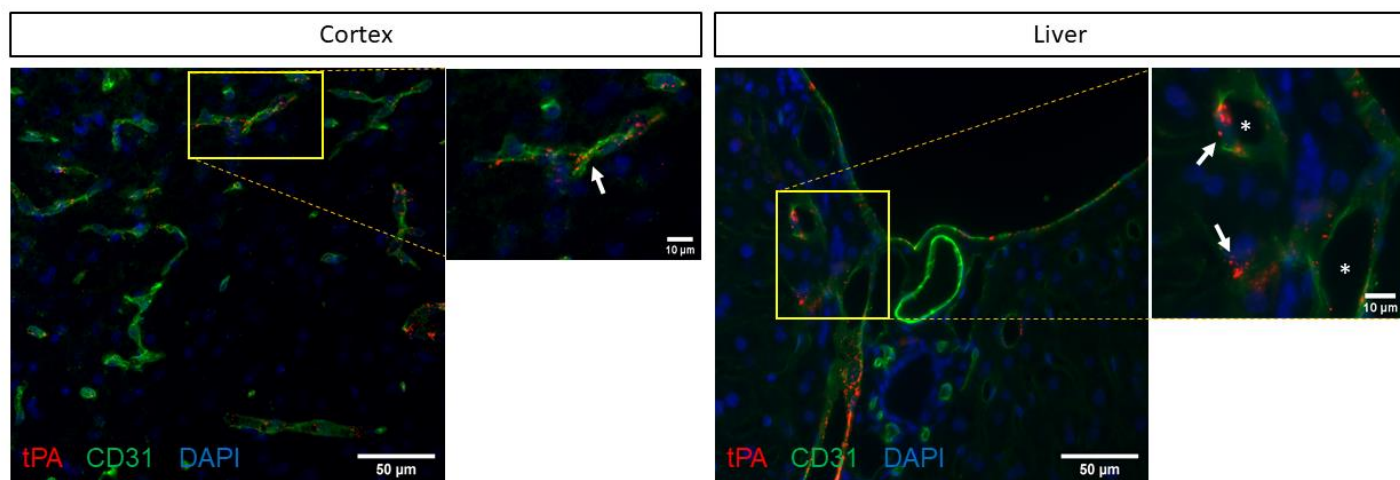


Figure 7: tPA is present in brain and liver endothelial cells. Epifluorescence images of brain cortex and liver slices from C57BL/6 adult mice (Scale bar = 50 μm , zooms = 10 μm) revealing tPA (red), CD31 (green) and cells nuclei (DAPI, blue). tPA was observed in endothelial cells (arrow) in both brain cortex and liver. Lumen of vessels was represented by stars. Images were digitally captured using a camera (CoolSNAP; Photometrics) and/or with an inverted confocal microscope (SP5, Leica). Images were visualized respectively with Metavue 5.0 software (Molecular Devices, USA) and LAS AF lite software (LEICA).

Additional materials and methods

Magnetic Resonance Imaging (MRI)

The MRI studies were realized 3 weeks after parabiosis surgery. Parabionts were placed in a rat cradle (to image both animals at the same time). Animals were anesthetized using 5% isoflurane (Isoflurane Belamont) in 50% N₂O/50% O₂, then maintained under 2% isoflurane in 100% N₂O/100% O₂. They were monitored by a breathing module in order to adapt the anesthesia according to the respiratory rate and they were thermoregulated by a heating blanket between 36.5°C and 37.5°C. The chimerism validation was assessed by injecting DOTA-Gd (Dotarem®), 0.01mMol/ml through a tail vein catheter in MRI. Then MRI sequences (7T MRI, Bruker, Germany) of T2-weighted and T1-weighted are respectively realized on whole animals' body. MRI analyses were performed until 75 minutes after the injection. Images analysis were made with an extension of ImageJ (Fiji). We obtained final images by making subtraction between "After Injection Time" and "Before Injection Time", to correct the signal difference for T1-weighted sequence.

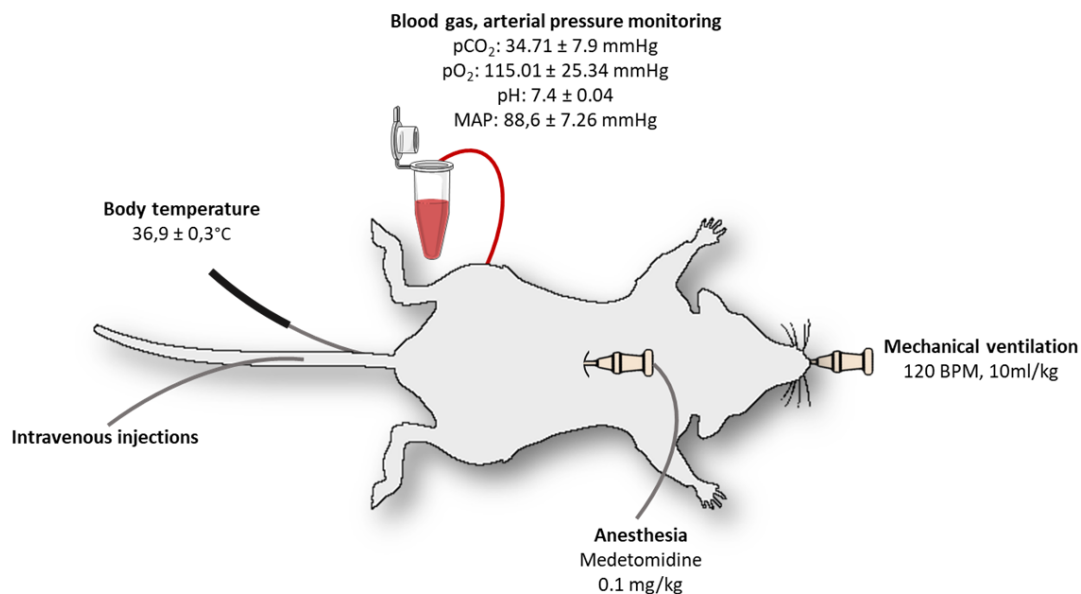
Hydrodynamic transfection

Hydrodynamic transfections were performed as previously described³⁴. Awake mice were injected with either 100µg engineered pLIVE encoding Cre-green fluorescent protein (pLIVE-Cre-GFP) or pLIVE plasmid alone (empty-pLIVE). A large volume (10% of body weight) of plasmid-containing saline buffer (0.9% NaCl) was injected into the caudal vein in less than 5 seconds for hepatic transfection. After 48 hours, Laser Doppler Speckle was realized (see Laser Doppler Speckle section) to measure

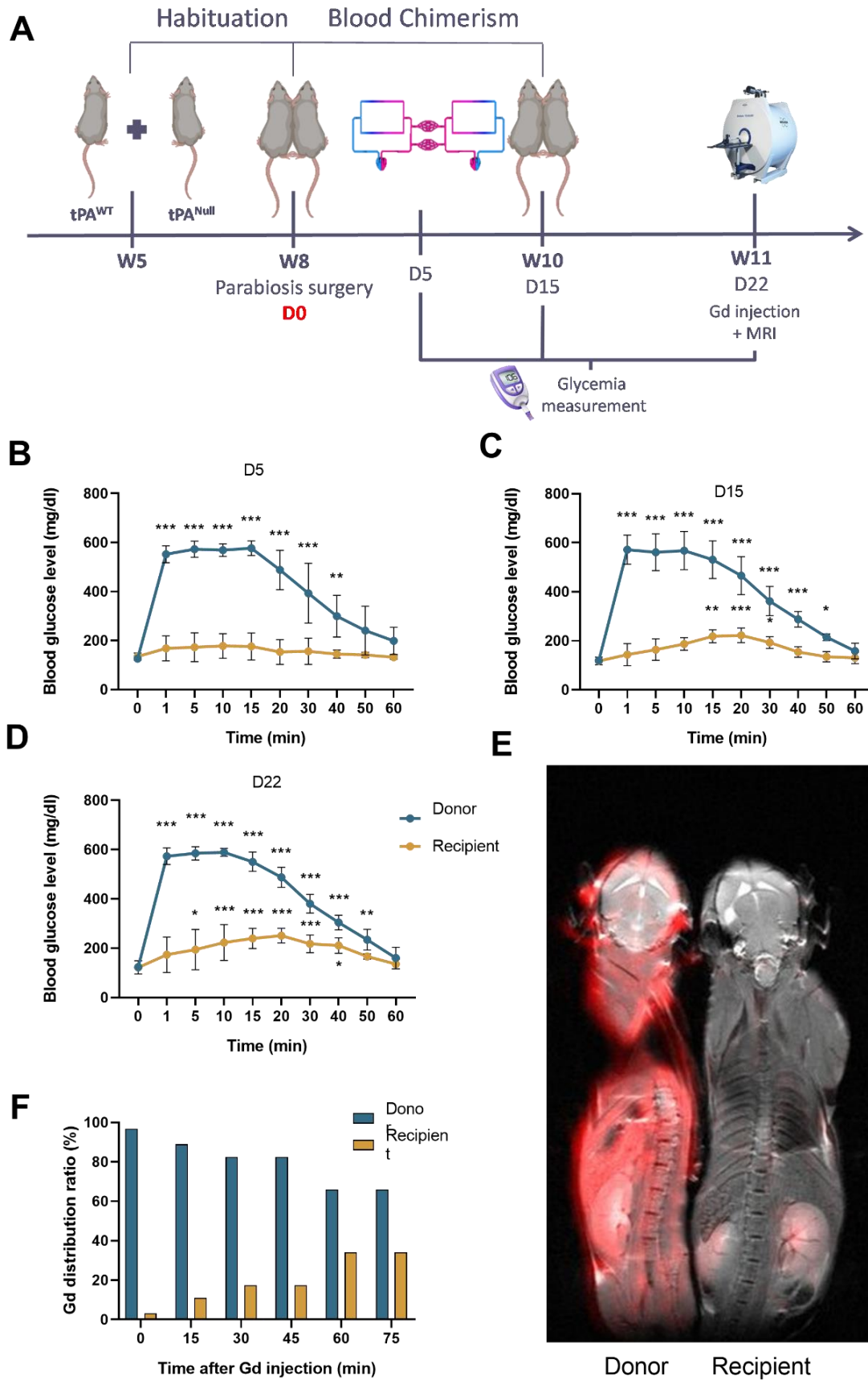
modifications of the CBF induced by whiskers stimulations. Liver tissues were collected after transcardiac perfusions with cold heparinized saline (15 ml/min) followed by a solution of 4% paraformaldehyde (see Supplemental materials and methods section).

Immunohistochemistry

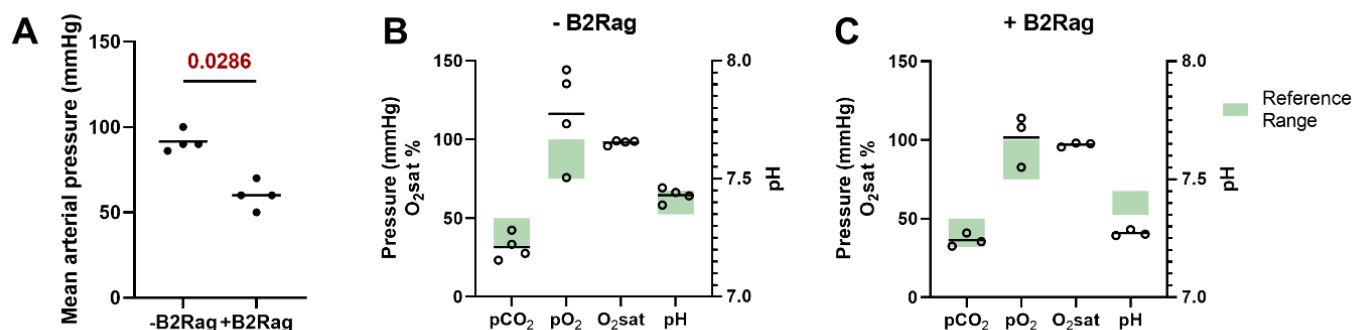
Deeply anesthetized mice were transcardially perfused with cold heparinized saline (15 ml/min), then with 4% paraformaldehyde in 0.1 M sodium phosphate buffer, pH 7.4 (150 ml, 15 ml/min). Liver segments were removed and washed in veronal buffer containing 20% sucrose for 24h, and frozen in Tissue-Tek (Miles Scientific). Transversal sections of liver (10 μ m) were cut on a cryostat, then collected on poly-D-lysine slides and stored at -80°C. Liver sections were incubated overnight at room temperature with primary antibodies rabbit anti GFP (1:1000, ab6556, Abcam), mouse anti Cre-recombinase (1:1000, MAB3120, Millipore) and phalloidin (1:1000, ab176759, Abcam). Primary antibodies were revealed using Fab'2 fragment anti-rabbit IgG linked to FITC and anti-mouse linked to CY3 (1:800, Jackson ImmunoResearch) co-incubated 90 min at room temperature. Sections were then coverslipped using mounting medium containing DAPI. Images were digitally captured using an epifluorescence microscope (Leica DM6000). Images were assessed using ImageJ software (NIH).



Supplemental figure 1: Mice physiological parameters measured during whiskers stimulations. Mice physiological parameters during experimental procedure of whiskers stimulations. Mice were mechanically ventilated (120 BPM, 10 ml/kg). Blood samples were collected by a femoral catheter and mean arterial pressure (MAP) was measured. Pharmacological treatments were injected via a tail vein catheter. Data are mean with SD, $n=8$.



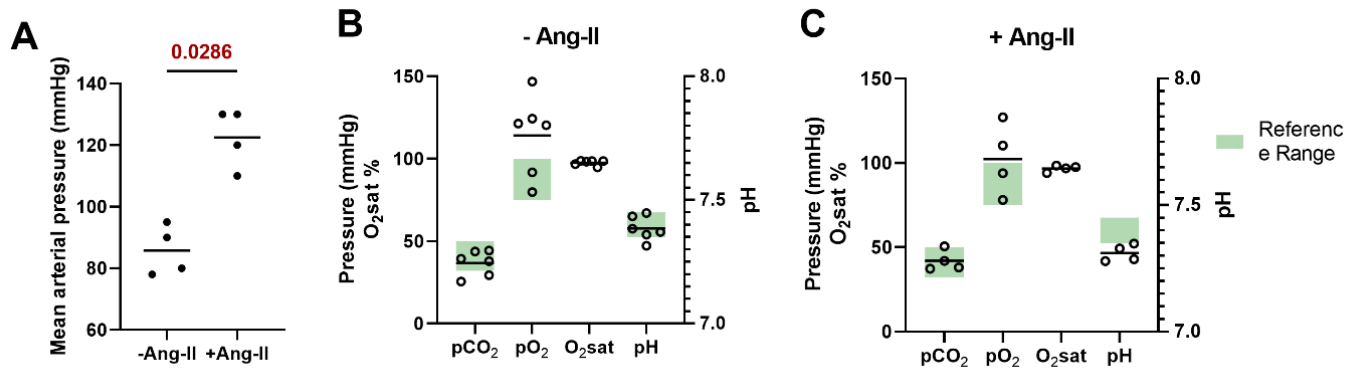
Supplemental figure 2: Parabiosis model and chimerism validation methods. A: Schematic representation of experimental study design for parabiosis surgery and chimerism validation. **B-D:** Parabiosis chimerism validation by IV injection of glucose (100 μ l, 1.2 g/kg) at T0 in tail vein of donor mice, glycemia (mg/dl) of both donor and recipient mice was measured during 1 hour, at different time points following parabiosis surgery (D5, n=5, figure **B**; D15, n=7, figure **C**; D22, n=7, figure **D**). **E:** Representative MRI acquisition of parabionts after IV DOTA-gd injection (200 μ l, 0.01 mMol/ml) in donor mice to validate parabiosis model. T1-weighted image (red) represents DOTA-Gd signal and was superposed on anatomical T2-weighted image. **F:** Quantification of DOTA-Gd distribution between parabionts at different time points. Data are mean with SD for each group. *p < 0.05, **p < 0.005 and ***p < 0.001 from T0, 2-way ANOVA test.



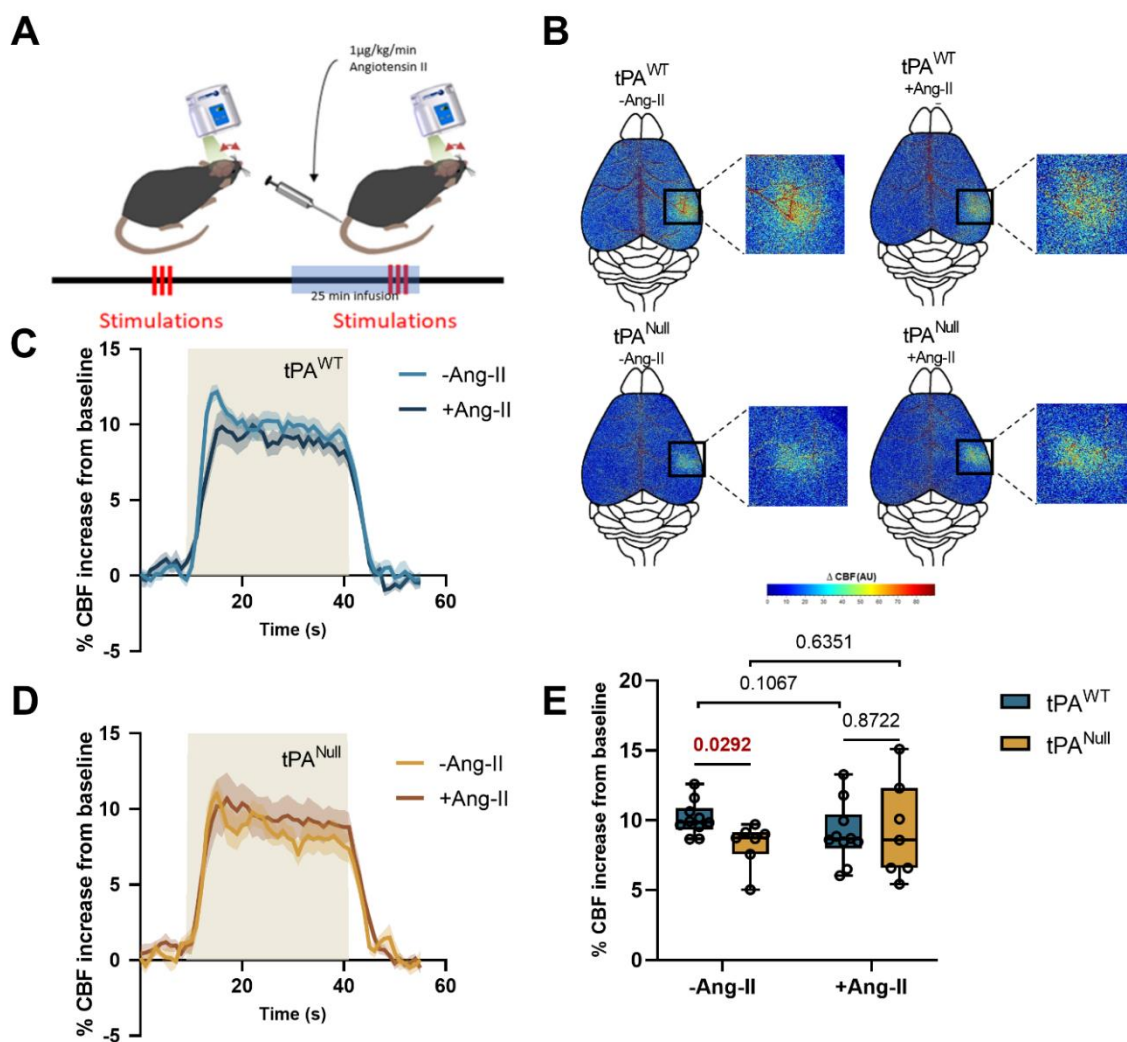
Supplemental figure 3: Mean arterial blood pressure and blood gases before and after injection of B2Rag in mice. A: Mean arterial pressure (MAP, mmHg) before (-B2Rag) and after IV injection of 30 μ g/kg of B2Rag (+B2Rag). Data are Mean with values for each mouse. **B-C:** Measurement of arterial blood gas before (-B2Rag, **C**) and after IV injection of 30 μ g/kg of B2Rag (+B2Rag, **D**). pCO₂, pO₂, O₂sat and pH were measured with 100 μ l of blood on RAPIDLab® 348EX Blood Gas System. Data

are mean with values for each mouse and reference range for these measurements.

* $p < 0.05$ from -B2Rag, Mann-Whitney test, $n=4$ per group.

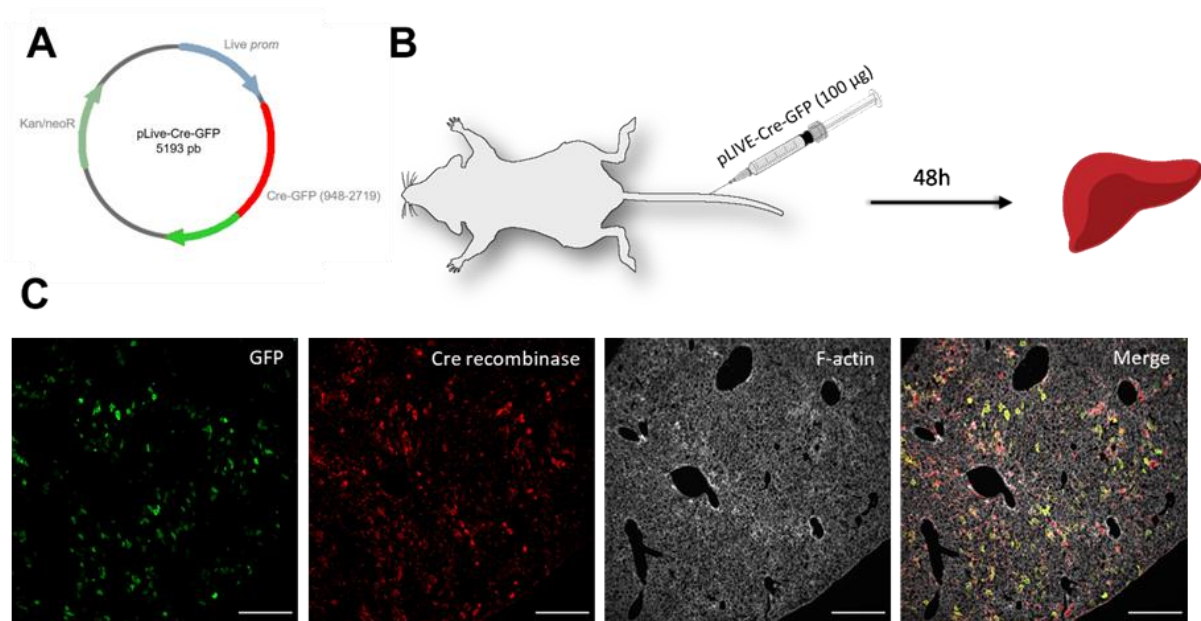


Supplemental figure 4: Mean arterial blood pressure and blood gases before and after injection of Ang-II in mice. **A:** Mean arterial pressure (MAP, mmHg) before (-Ang-II) and 25 minutes after IV infusion of 1 $\mu\text{g/kg/min}$ of Ang-II (+Ang-II). Data are Mean with values for each mouse. **B-C:** Measurement of arterial blood gas before (-Ang-II, **B**) and 25 minutes after IV infusion of 1 $\mu\text{g/kg/min}$ of Ang-II (+Ang-II, **C**). pCO₂, pO₂, O₂sat and pH were measured with 100 μl of blood on RAPIDLab® 348EX Blood Gas System. Data are mean with values for each mouse and reference range for these measurements. * $p < 0.05$ from -Ang-II, Mann-Whitney test, $n=4$ per group.



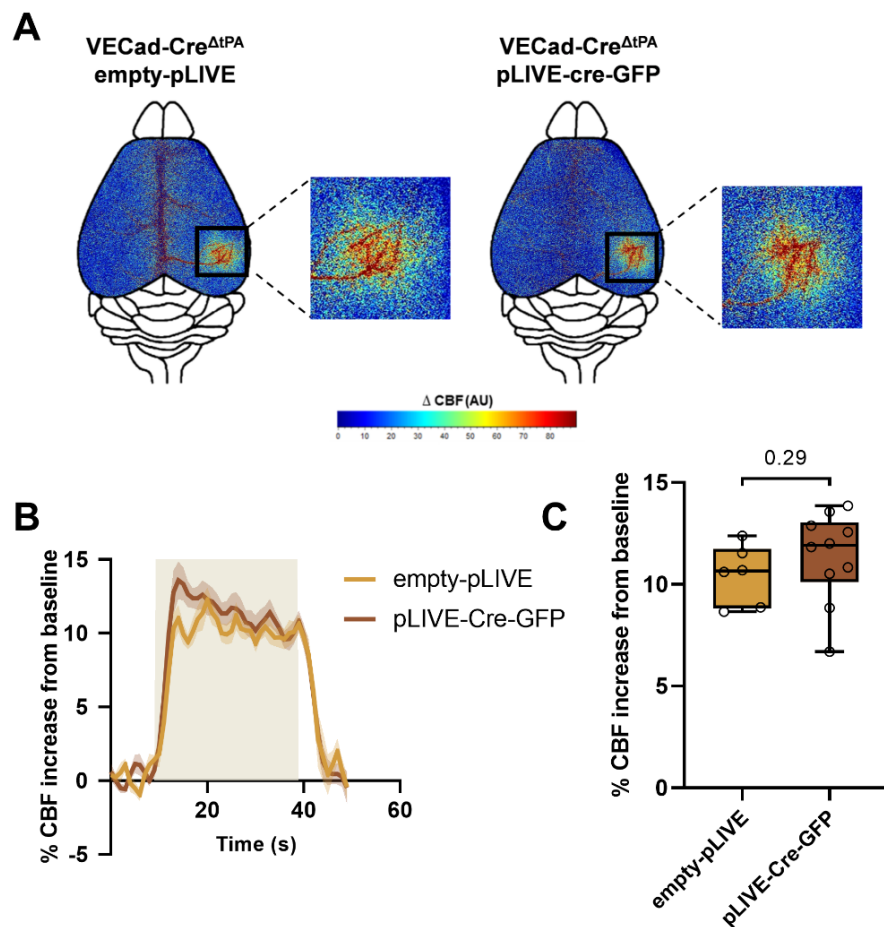
Supplemental figure 5: Intravenous administration of angiotensin-II (Ang-II) does not influence NVC in a tPA dependent manner. **A:** Schematic representation of the experimental timeline of whiskers stimulations paradigm. 3 trains of stimulations were made on laser speckle flowmetry before IV infusion of angiotensin-II (1 $\mu\text{g/kg/min}$) during 25 minutes, followed by 3 additional trains of stimulations. **B:** Colormap corresponds to the activation map related ΔCBF changes during whiskers stimulations in tPA^{Null} mice and their littermate before and after IV infusion of Ang-II. Warm colours indicate an elevation of CBF during whiskers stimulations. **C-D:** Time course of % CBF

increase (mean $\pm$ SEM) during whiskers stimulations (■) in tPA^{Null} mice (D) and their littermate (C), before (—/—) and after (—/—) IV infusion of Ang-II. E: Box plots show the variation of % CBF increase from baseline during whiskers stimulations in tPA^{Null} mice and their littermate before and after IV infusion of Ang-II. Box plot with medians, 1st and 3rd quartiles, min and max with values for each mouse. *p < 0.05 from tPA^{WT}, Kruskal-Wallis and Uncorrected Dunn's tests, n=10 tPA^{WT}, n=7 tPA^{Null}.



Supplemental figure 6: Hydrodynamic transfection of pLIVE-Cre-GFP in VECad-Cre^{ΔtPA} mice. **A:** Construction scheme of plasmid pLIVE-Cre-GFP. The cDNA of Cre-GFP was PCR amplified from a pCAG-Cre-GFP plasmid and fused into multiple cloning sites of the pLIVE plasmid between BamHI and NotI. **B:** Experimental schematic representation of hydrodynamic transfection of pLIVE-Cre-GFP. 48 h after transfection of the plasmid, livers from transfected VECad-Cre^{ΔtPA} mice were collected. **C:** Epifluorescence images of liver slice from transfected VECad-Cre^{ΔtPA} mice with pLIVE-Cre-GFP (scale bar = 500μm). Immunostaining reveals GFP (green), Cre-recombinase (red) and actin filaments with phalloidin (grey), confirming the transfection

of the plasmid in hepatocytes. Images were digitally captured using a camera (CoolSNAP; Photometrics) and/or with an inverted confocal microscope (SP5, Leica). Images were visualized respectively with Metavue 5.0 software (Molecular Devices, USA) and LAS AF lite software (LEICA).



Supplemental figure 7: Deletion of tPA in hepatocytes does not influence NVC in VECad-Cre ΔtPA mice. A: Colormap corresponds to the activation map related ΔCBF changes during whiskers stimulations in VECad-Cre ΔtPA mice transfected with promoters empty-pLIVE or pLIVE-Cre-GFP. Warm colours indicate an elevation of CBF during whiskers stimulations. **B:** Time course of % CBF increase (mean $\pm$ SEM) during whiskers stimulations (■) of VECad-Cre ΔtPA transfected with empty-pLIVE (—)

or pLIVE-Cre-GFP (—). **C:** Box plots show the variations of % CBF increase from baseline during whiskers stimulations of VECad-Cre^{ΔtPA} mice transfected with promoters empty-pLIVE or pLIVE-Cre-GFP. Box plot with medians, 1st and 3rd quartiles, min and max with values for each mouse. *p < 0.05 from empty-pLIVE, Mann-Whitney test, n=6 empty-pLIVE, n=10 pLIVE-Cre-GFP.

Partie 3

Article 3 :

" Parabiosis to discriminate the vascular *versus* parenchymal contribution of endogenous tissue-type plasminogen activator to stroke."

Jonathane Furon, Florent Lebrun, Mervé Yetim, Pauline Marie, Quentin Gérard, Cyrille Orset, Sara Martinez de Lizarrondo, Denis Vivien*, Carine Ali^{1*}

En préparation

Contexte bibliographique de l'étude

Afin de comprendre l'influence d'un organisme sur son conjoint chez des « **siamois** », dans les années 1860, Paul Bert présente dans son œuvre "la greffe animale", une technique chirurgicale permettant de connecter physiquement deux organismes vivants (Bert, 1863), qui fut plus tard appelée « **parabiose** » (des mots grecs, *para* « outre » et *bios* « vie » ; Sauerbruch & Heyde, 1912). En effet, il a suturé la peau de deux rats albinos et a découvert que des fluides administrés en IV passaient de la **circulation d'un animal à son partenaire**. Il a donc postulé que les animaux connectés chirurgicalement développent **spontanément un système circulatoire unique** et partagé par **anastomose** (Bert, 1863)

Les premières chirurgies de parabioses consistaient en de courtes incisions au flanc de chaque animal, mais la technique a évolué au fil des années, et les incisions cutanées s'étendent maintenant sur **tout le flanc** ; de plus, dans certains modèles, les membres sont suturés au niveau des articulations et les parois abdominales sont jointes afin d'augmenter la **stabilité** et la **surface de vascularisation** (Conboy et al., 2013 ; Figure 51). Bien que d'autres espèces animales aient été incluses dans des expériences de parabiose (Harris, 2013), il s'avère que les rongeurs récupèrent le mieux de la chirurgie, et avec une meilleure résistance contre les infections de plaies. Par conséquent, la majorité des investigations ont été menées sur des **rats** ou des **souris**.

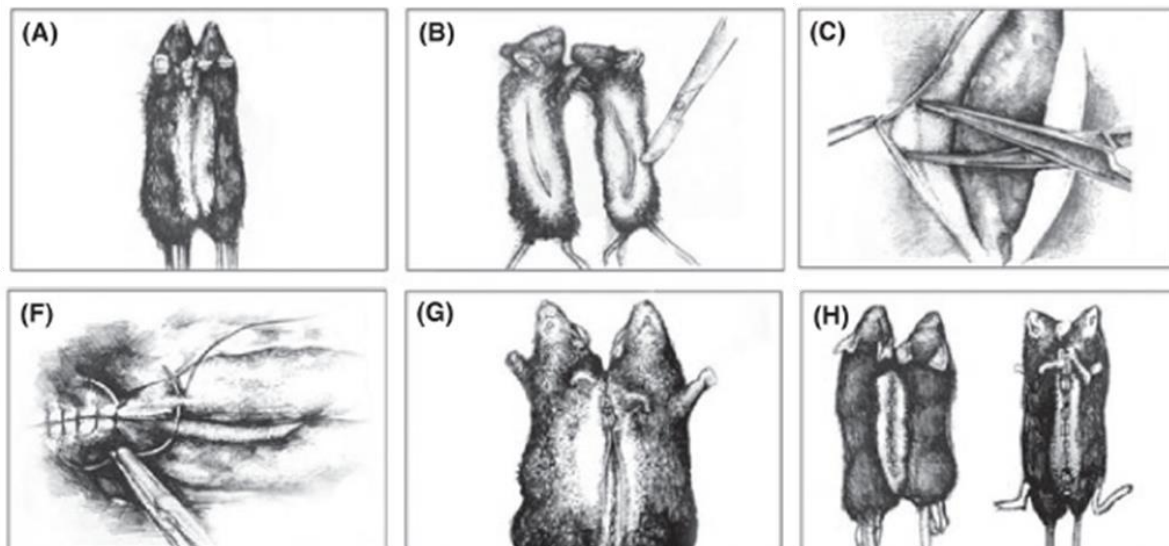


Figure 51 : Illustrations des étapes de la chirurgie de parabiose chez la souris.

Les souris sont rasées le long des flancs opposés (A), et une incision cutanée est pratiquée tout le long (B). La peau est libérée de la muqueuse péritonéale sous-jacente de chaque lambeau cutané (C), en prenant soin de ne pas endommager le péritoine. La connexion est sécurisée en suturant les articulations correspondantes (coudes et genoux), à l'aide d'un fil passé dans les tissus mous de chaque articulation (F). Avec la paire retournée pour révéler les lambeaux cutanés ventraux (G), le processus de suture des articulations est répété, entraînant la génération de parabionts stables (H) (adaptées de [Conboy et al., 2013](#)).

Les premières études sur la parabiose ont rapporté des cas d'**intoxication parabiotique** où l'un des deux partenaires est mort subitement ([Finerty & Panos, 1951](#) ; [Hall & Hall, 1956](#)). Bien que cette intoxication soit principalement due au manque d'**uniformité génétique** entraînant un rejet de tissu, grâce à l'optimisation de cette technique un taux de survie similaire à d'autres procédures chirurgicales invasives (> 80 %) peut maintenant être atteint chez les souris. Aujourd'hui, après toutes les optimisations décrites au fil des années, la **parabiose** se définit comme une **union chirurgicale** de la peau de deux organismes de **même fond génétique**, permettant le partage de la circulation sanguine entre eux **sans réaction immunitaire** indésirable (Figure 52). Les animaux sont reliés par les articulations du coude et du genou, puis leur peau est suturée tout le long de leurs corps. Deux semaines après la procédure, les systèmes

circulatoires **partagés** sont normalement **stabilisés** (Kamran et al., 2013 ; Call & Zhang, 2015).

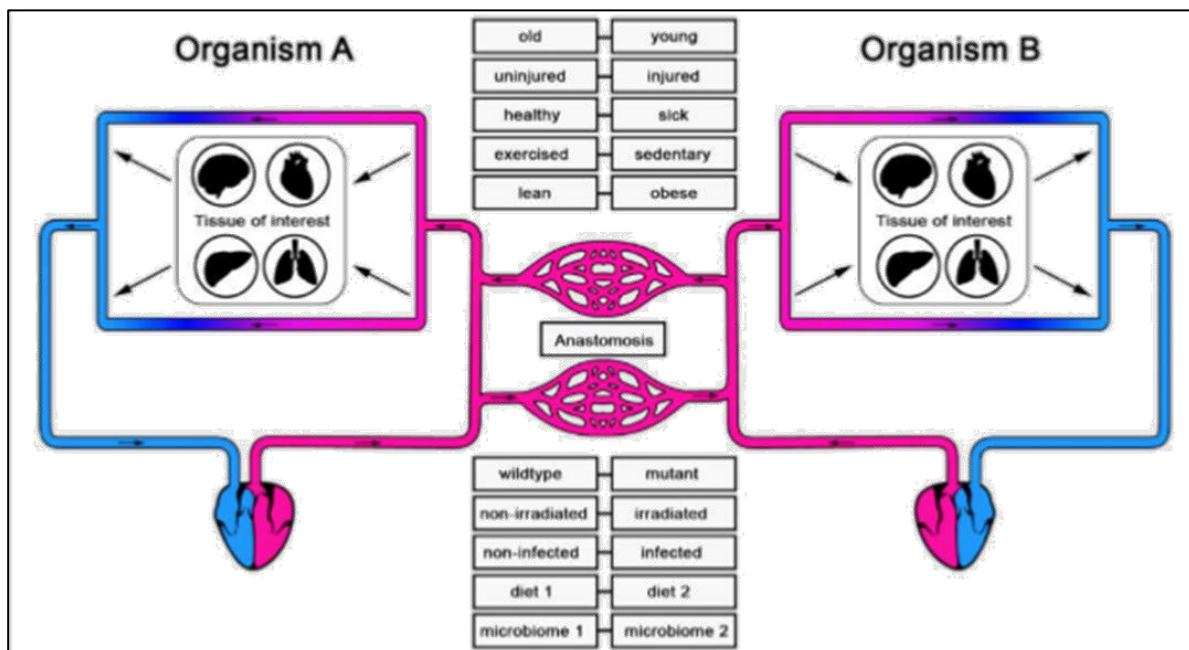


Figure 52 : Système circulatoire dans la parabiose

Les organismes A et B (de même fond génétique) partagent un apport sanguin commun, qui se développe spontanément par anastomose post-opératoire. Ainsi, une parabiose entre deux organismes avec différentes conditions physiologiques peut être utilisé pour évaluer l'effet systémique d'un organisme sur un tissu particulier d'intérêt chez son partenaire. (Eggel & Wyss-Coray, 2014).

Au cours des années **1960-1980**, un pic de publications utilisant la parabiose a été atteint, lié à une question principale de l'époque, à savoir si les **facteurs humoraux transmissibles** présents chez un animal avaient un effet physiologique sur son partenaire adjacent. En 1969, Coleman a découvert un **facteur de satiété**, qui fut identifié plus tard par Friedman comme étant la **leptine** (Zhang et al., 1994), grâce à la greffe d'une souris susceptible de développer un diabète de type II à une souris consanguine sauvage (Coleman & Hummel, 1969 ; Coleman, 2010). De même, les travaux de Knudsen ont montré le rôle du **rein dans l'hypertension** à l'aide de la parabiose (Knudsen et al., 1969).

Outre l'étude des facteurs humoraux, la parabiose a permis d'étudier les effets induits par l'exposition d'un **organisme âgé** à un **environnement systémique jeune**. En greffant ainsi des animaux d'âges différents, Ludwig et Elashoff ont fourni la première preuve qu'un organisme âgé **vivait plus longtemps**, en réponse à l'environnement jeune apporté (Ludwig & Elashoff, 1972). Ces dix dernières, ce modèle performant a fait ses preuves dans l'étude de la **communication hormonale** (Pierce et al., 2017), ou la **migration des cellules souches hématopoïétiques** (Conboy & Rando, 2012). Récemment, la parabiose s'est avérée essentiel pour étudier la **physiologie du vieillissement**, et notamment l'étude de **facteurs circulants de jeunesse**, pour « rajeunir » des parabiontes sénescents (Conese et al., 2017 ; Figure 53).

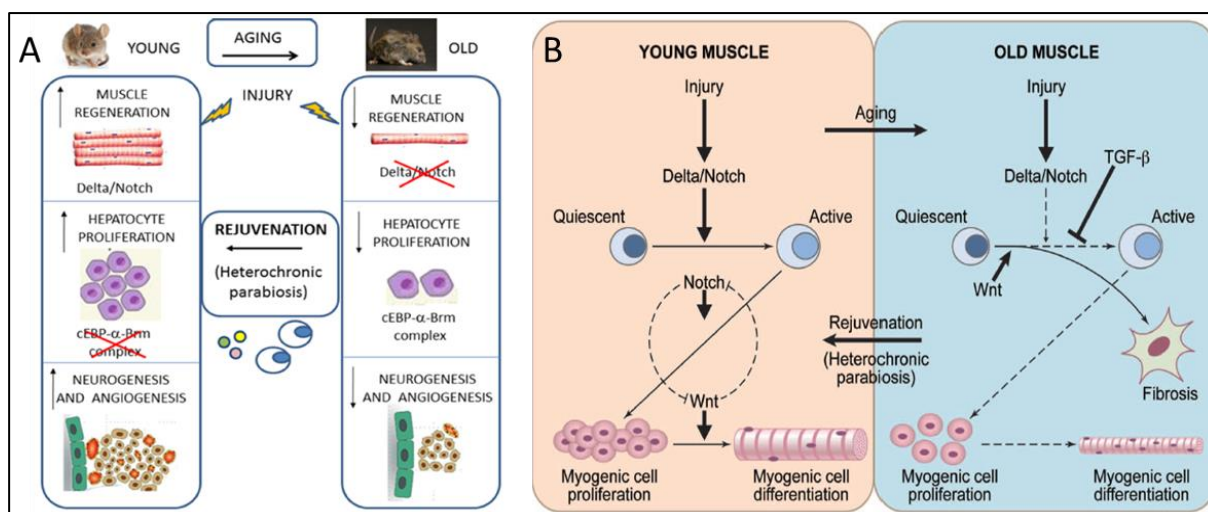


Figure 53 : Étude de la réjuvénation dans le cadre du vieillissement physiologique, par modèle de parabiose.

A la différence des animaux âgés dont les muscles se régénèrent mal, lorsqu'un jeune animal subit une blessure, il va augmenter sa capacité de myogenèse, de neurogenèse et d'angiogenèse afin de réparer ses muscles (A), notamment grâce à l'activation de la signalisation Notch (B). Dans le cadre de la parabiose hétérochronique, les facteurs systémiques jeunes sont capables de rajeunir les cellules souches âgées pour favoriser une meilleure régénération (adapté de Conboy & Rando, 2012 ; Conese et al., 2017).

En conditions pathologiques, bien que le tPA ait des effets **bénéfiques** au niveau vasculaire, pour la **lyse** du **thrombus** et la **restauration** de la circulation sanguine grâce à son activité fibrinolytique (par l'activation du plasminogène en plasmine), il pourrait également avoir des effets **délétères**, comme par exemple la **mort neuronale** en fonction du récepteur mis en jeu (Thiebaut et al., 2018). Le tPA favorise aussi l'**inflammation**, d'une part en induisant l'**activation microgliale** (Zhang et al., 2009) et d'autre part en promouvant l'**infiltration** des **leucocytes** à travers la BHE (Macrez et al., 2011). Que cela se produise par des actions **directes** sur les cellules parenchymateuses et/ou **indirectement** *via* des barrières entre le sang et le SNC reste incertain.

L'objectif de notre étude est donc d'examiner en détail le rôle du tPA circulant (endogène) dans le cas d'une ischémie cérébrale. Nous avons donc développé une parabiose entre une souris entièrement **déficiente en tPA** (tPA^{Null}) et une souris **sauvage** (tPA^{WT}). Notre hypothèse est que le partage de la circulation sanguine entre les animaux ramènerait les **taux circulants de tPA** à des **niveaux physiologiques** chez la souris déficiente, sans affecter les autres **compartiments de l'organisme**.

Article 3

Parabiosis to discriminate the vascular versus parenchymal contribution of endogenous tissue-type plasminogen activator to stroke.

Principaux résultats obtenus

- Le tPA endogène est bénéfique dans un modèle d'AVC thromboembolique
- La parabiose révèle l'effet du tPA endogène circulant *versus* parenchymateux lors d'un AVC thromboembolique

Parabiosis discriminates the vascular *versus* parenchymal contribution of endogenous tissue-type plasminogen activator to stroke.

Jonathane Furon¹, Florent Lebrun^{1,2}, Mervé Yétim¹, Pauline Marie¹, Quentin Gérard¹, Cyrille Orset¹, Sara Martinez de Lizarrondo¹, Denis Vivien^{1,3*}, Carine Ali^{1*}

¹ Normandie University, UNICAEN, INSERM UMR-S U1237, Physiopathology and Imaging of Neurological Disorders (PhIND), GIP Cyceron, Institut Blood and Brain @ Caen-Normandie (BB@C), Caen, France.

² STROK@LLIANCE, Caen, France.

³ Department of clinical research, Caen-Normandie University Hospital, CHU, Caen, France.

*: authors with equal contribution

Corresponding author: Prof. Carine Ali ; UMR-S Normandie Univ, UNICAEN, INSERM U1237, Physiopathology and Imaging of Neurological Disorders (PhIND), GIP CYCERON, Institut Blood and Brain @ Caen-Normandie (BB@C), Bvd Becquerel, BP 5229, 14074 Caen Cedex, France; Tel: +33231470265; E-mail: ali@cyceron.fr

Abstract

Intravenous injection of recombinant tissue-type plasminogen activator (tPA) is a thrombolytic agent has revolutionized ischemic stroke management. Several observations suggest that recombinant tPA, may also worsen the loss of integrity of nerve cells and of the blood/brain interface during stroke, thus limiting the benefit of thrombolysis. Little is known about the actual impact of endogenous tPA expressed in the brain parenchyma *versus* in the circulation, during stroke. Accordingly, here, we developed parabioses between tPA deficient mice (tPA^{NULL}) and/or wild-type mice (tPA^{WT}), anticipating that a tPA^{WT} restores circulating levels of tPA to normal levels in a tPA^{NULL} parabiont, without affecting levels in other organs. Then, stroke damages were investigated by MRI in a thrombo-embolic or a thrombotic stroke model, induced by thrombin- or FeCl₃, respectively. In the thrombin stroke model, after 24 hours, tPA^{NULL}/tPA^{NULL} parabionts displayed less spontaneous recanalization/reperfusion and larger infarct volumes compared to tPA^{WT}/tPA^{WT} littermates. However, when linked to a tPA^{WT} ischemic tPA^{NULL} mice had less severe perfusion deficits and brain infarcts than when linked to a tPA^{NULL} mouse. In the FeCl₃ model of stroke, homo- and hetero-typic parabionts did not differ in the extent of brain damages and did not recanalize/reperfuse. All together, these data suggest that endogenous parenchymal tPA has a limited overall impact during thromboembolic stroke, and that endogenous circulating tPA from endothelial cells sustain a partially efficient vascular patency.

Keywords

Parabiosis, thromboembolic stroke, thrombolysis, endothelium, cerebral blood flow, magnetic resonance imaging

Introduction

To date, the rapid re-establishment of blood perfusion is the only therapeutic approach that has proven efficient in reducing brain lesions and functional deficits at the acute stage of ischemic stroke. Reperfusion is achievable *via* pharmacological dissolution (thrombolysis) and/or mechanical removal (endovascular thrombectomy). Thrombolysis with Actilyse (Alteplase) has revolutionized the treatment of ischemic stroke (NINDS, 1995) and has paved the way to the development of innovative clot-busting drugs, including Tenecteplase (Gauberti et al., 2021; Li et al., 2022). Despite a favorable risk/benefit ratio, the overall clinical profit of Actilyse may be reduced because of low rate of recanalization, a risk of intracerebral bleeding (Sandercock et al., 2012; Tang et al., 2022) and side effects on/above the neurovascular unit (J.-W. Cheng et al., 2018).

Actilyse is a recombinant form of a natural key fibrinolytic protease, tissue-type plasminogen activator (tPA), that can cleave plasminogen into active plasmin, leading to the degradation of fibrin clots (Collen & Lijnen, 1991). Under pathophysiological conditions, endothelial cells and hepatocytes (E.G. Levin et al., 1997; Z. Zheng, Nayak, Wang, Arif Yurdagul, et al., 2019) release endogenous tPA in the bloodstream (Schaller & Gerber, 2011), possibly exacerbated under hypoxia/ischemia or high shear stress (D. Huber et al., 2002). tPA is also expressed in key brain structures (*eg* hippocampus, cortex, amygdala), there, originating from several cell types including neurons, activated microglia (Louessard et al., 2016; Siao et al., 2003; Lépine, Douceau et al., under revision).

tPA can interact with various extracellular or membrane partners/substrates/receptors in the brain parenchyma. This diversity explains why and how tPA has been described as a critical mediator of brain pathophysiology throughout life (for review see Thiebaut et al., 2018). Among others, tPA is now admitted to modulate neuronal fate (Tsirka et al., 1995; Liot et al.,

2006; Nicole et al., 2001), neuro-inflammation (Tsirka et al., 1996; Zhang et al., 2009), learning and memory processes (Benchenane et al., 2004; Hébert et al., 2016), anxiety behavior (Tomasz Matys et al., 2004), blood-brain barrier (BBB) homeostasis (Yepes et al., 2003; Macrez et al., 2016). Of note, some of these functions do not depend on the conversion of plasminogen into plasmin, and do not even imply tPA enzymatic activity.

Beside vascular fibrinolysis, circulating tPA may as well participate in some of the above-mentioned CNS (dys)functions. These cerebral effects of circulating tPA might occur by direct actions on the vessel wall. For instance, physiological neurovascular coupling, a phenomenon that links neuronal activity to cerebral blood flow, is tuned by intraluminal tPA acting on N-methyl-D-aspartate (NMDAR) on endothelial cells (Anfray et al., 2020; Yétim et al., under revision). Conversely, under pathological conditions, this circulating tPA/NMDAR endothelial partnership promotes BBB leakage and inflammation (Macrez et al., 2016; Mehra et al., 2020). In addition to these direct effects on the brain vasculature, tPA can also “escape” from the blood (Benchenane et al., 2005; Zuba, Furon et al., under revision), and add to parenchymal tPA to increase neuronal activity and aggravate neuronal loss (Nicole et al., 2001; Anfray et al., 2021)

Preclinical studies investigating the role/effect of tPA during ischemic stroke have led to controversial findings, reporting either beneficial (Tabrizi et al., 1999; Jiang et al., 2000; Orset et al., 2007) or deleterious effects (Wang et al., 1998; Liu et al., 2004; El Amki et al., 2012; Orset et al., 2016; Zhao et al., 2017). But this literature can be criticized, because results are mostly obtained in mice whose tPA is invalidated throughout the organism, and/or by increasing the expression of tPA to irrelevant levels (mice genetically modified to overexpress or not expressing tPA, hydrodynamic transfection, intraveinuous injection of rtPA, etc.). Moreover, potential genetic contamination of tPA-deficient mice have raised concerns about the specificity of some phenotypic features in this mouse strain (Szabo et al., 2016).

Thus, up to now, elucidation of the real contribution of endogenous vascular tPA to brain physiopathology remains challenging. Here, we aimed at developing an original tool that allows discriminating the effects of endogenous vascular tPA on cerebral physiopathology. For this, we developed heterochronic parabioses between wild type (tPA^{WT}) and tPA-deficient (tPA^{NULL}) mice, with the assumption that blood circulation sharing restores the circulating level of tPA in the deficient mouse, without affecting the level in the other compartments.

Materials and Methods

Animals

All experiments were conducted in accordance with the French ethical law (Decree 2013-118) and the European Communities Council guidelines (2010/63/EU). Protocols were approved by the local ethics committee (Cenomexa) accredited by the French Ministry of Research and Higher Education (agreement numbers #19978, #19435). All applicable international, national, and/or institutional guidelines for the care and use of animals were followed.

Experiments were performed on 8-12 weeks old male mice (see mouse lines section), bred in our animal facilities (CURB, Caen, France) and housed in a 12h light/12h dark cycle with free access to water and food.

Mouse lines

C57BL/6 mice were from Janvier Labs (Le Genest-Saint-Isle, France). We also used tPA^{Null} mice and their wild type (tPA^{WT}) littermates, VeCadCre/tPA^{Flox} mice and their WT littermates (VeCadCre/tPA^{WT}), all from the same genetic background (C57BL/6J). In collaboration with the Mouse Clinical Institute (ICS, Illkirch, France, <http://www.ics-mci.fr>), we have engineered tPA^{Null} mice and tPA^{Flox} mice to obtain mice fully deficient in tPA and with conditional deletion of tPA, respectively. To induce tPA^{Null} mice, tPA^{Flox} mice in which exon 3 of the *Plat* gene was flanked by loxP sites were crossed with CMV-Cre mice to excise exon 3 of the *Plat* gene in germline. We also used a mouse line with a conditional knockout of tPA in endothelial cells by crossing tPA^{Flox} mice with VE-Cadherin-Cre mice (B6.FVB-Tg(Cdh5-cre)7Mlia/J; # 006137; kind gift from F. Millat, Institute of Radioprotection and Nuclear Safety, Fontenay-aux-Roses, France), to obtain VECad-Cre^{ΔtPA} mice and their WT littermates VECad-Cre^{WT}.

Parabiosis

Parabioses were performed following the procedure described by Kamran et al., 2013. Three weeks before the surgery, the two mice (5 weeks old - of same size and weight) were housed together in the same cage so that they acclimate to each other. On the day of the surgery, mice were anesthetized using 5% isoflurane in 70% N₂O/30% O₂ and then maintained using 1.5-2% isoflurane in 70% N₂O/30% O₂. Analgesia was obtained by Buprenorphine (Buprécare®, Axience, 0.1mg/kg). Animals were placed on the lateral position, back-to-back. A longitudinal skin incision was performed starting to 0.5 cm above the elbow to 0.5 cm below the knee. The skin from the subcutaneous fascia was gently detached to create 0.5 cm of free skin and both elbow and knee joints were attached with non-absorbable suture. The skin of the two mice was connected with 4-0 non-absorbable sutures. The animals were weighed and followed daily for

two post-operative weeks. Post-operatively, parabionts were weighted every day and their potential discomfort/pain was assessed on a scale developed (by us) for parabiosis, and with the *mouse grimace scale*. Animals had free access to food (kibble, compote) and hydration directly into the cage. They also received an anti-inflammatory agent (Doliprane 6g/l) in the bottles as well as in the food (compote).

Blood glucose levels measurement to assess chimerism

To check the successful establishment of circulation chimerism, we assessed glycemia in both parabionts (Liu et al., 2020) after injecting glucose to only one parabiont. Mice were anesthetized using 5% isoflurane in 70% N₂O/30% O₂ and then maintained using 1.5-2% isoflurane in 70% N₂O/30% O₂. The donor mouse (parabiont that received the injection) was administered 100 µL of glucose (1.2 g/kg) within 10s via the tail vein. At different time points after injection (1, 5, 10, 15, 20, 30, 40, 50 and 60 min), a drop of blood (10-25 µl) was collected via a scissor-made incision at the tail extremity of both donor and recipient mice. Glycemia was measured on strips (Accu-Check performa; Ref: 06453996200) thanks to a commercially available glucometer (Accu-Check performa; Ref: 06870228001).

Gadolinium diffusion to assess chimerism

The chimerism was also assessed by injecting DOTA-Gd (Dotarem®), 0.01mmol/ml through a tail vein catheter in MRI. Then whole-body MRI sequences (7T MRI, Bruker, Germany) of T2-weighted and T1-weighted were acquired up to one hour after the injection, on both animals at the same time. Images were processed with an extension of ImageJ (Fiji), and analyses consisted in subtracting signals “Before” to “After” injection on the T1-weighted images. T1-

weighted were superimposed to the T2-weighted images to visualize the localization of gadolinium in organs.

Near-Infrared Fluorescence Imaging (NIRF) of Evans Blue diffusion to assess chimerism

Evans Blue (EB; 200µl, 2%) were intravenously injected in the tail of the donor parabiont. After 60 min, animals were placed in the planar NIRF system (Photon Imager; Biospace; excitation wavelength was set to 650 nm with a 700-nm high-pass emission filter.) for a whole-body analysis. Then, after euthanasia, the brain, heart, liver, kidneys, spleen and eyes (n=3 per group) were harvested and placed in the planar NIRF system (Photon Imager; Biospace). Measurement of the fluorescence of all organs was performed at the same time; therefore, background fluorescence was the same for all organs.

Stroke models

Animals were anesthetized with isoflurane 5% and maintained with 2% isoflurane in a 70%/30% mixture of NO₂/O₂. Rectal temperature was controlled at 37±0.5°C throughout the surgical procedure using a heating system. Mice were placed in a stereotaxic device, the skin between the right eye and ear was incised, and the middle cerebral artery (MCA) was exposed after a small craniotomy. Two stroke etiologies were reproduced in these animals.

Stroke with a fibrin rich / tPA sensitive clot: after excision of the dura mater a micropipette filled with purified murine alpha-thrombin (0.05 mg; Stago BNL) was introduced into the MCA lumen, then 1 µL of thrombin (1.5UI) was injected to induce *in situ* clot formation. The pipette was removed 10 minutes post-occlusion (Orset et al., 2007). This model was performed on

tPA^{Null} or VECad-Cre^{ΔtPA} mice and their respective WT littermates (without parabiosis) and in one animal of homo-typic (WT/WT; Null/Null) and hetero-typic (Null/WT) parabiotic pairs.

Stroke with a platelet rich / tPA resistant clot: a triangle piece of Whatman™ filter paper strip was placed on the intact dura mater over the endothelium, then freshly prepared FeCl₃ (40%, Sigma-Aldrich) was apply on the Whatman paper for 4 minutes and washed twice with saline (Martinez de Lizarrondo et al., 2017; van Moorsel et al., 2022). This model was performed in one animal of homo-typic (WT/WT; Null/Null) and hetero-typic (Null/WT) parabiotic pairs.

Laser Doppler Speckle Flowmetry to assess cerebral blood flow (CBF) during stroke induction

Laser Doppler Flowmetry (LDF) was used to measure relative CBF of the whole surface of the brain with intact skull. Immediately after stroke induction, images were continuously recorded for 40 min using a laser speckle contrast imager (MoorFLPI-2, Moor Instrument, Exposure Time: 20s, Filter: 25 frames, Sample Interval: 1000ms, Image Resolution: 752 x 580). Analysis was made with MoorFLPI-2 Review V5.0 software. Results are the % of CBF loss in the ipsilateral hemisphere/ROI compared to the contralateral hemisphere/ROI.

Magnetic Resonance Imaging (MRI) of post-stroke lesion volume and residual CBF

MRI analyses were carried out on a Pharmascan 7 T/12 cm system using surface coils (Bruker, Germany). Non-paired or parabionts were placed in a rat cradle (to image both animals at the same time). Animals were anesthetized using 5% isoflurane in 50% N₂O/50% O₂, then maintained under 2% isoflurane in 50% N₂O/50% O₂. They were monitored by a breathing

module in order to adapt the anesthesia according to the respiratory rate and they were thermoregulated by a heating blanket between 36.5°C and 37.5°C.

Twenty-four hours post-stroke, T2-weighted images were acquired using a multi-slice multi-echo sequence: TE/TR 33 ms/2500 ms. Lesion volumes were quantified using the ImageJ software. Two-dimensional time-of-flight angiographies (TE/TR 12 ms/7 ms) were acquired and analyses of the MCA angiogram were also performed to control the recanalization status of the MCA. The angiographic score of MCA (angioscore) is inspired on the TICI grade flow scoring (Fugate et al., 2013). Score 0 refers to the absence of any anterograde flow beyond the MCA. Score 1 is incomplete filling of the distal bed. Score 2 is almost complete filling of the distal territory. Score 3 is complete filling of the distal territory. Arterial Spin Labeling (ASL) sequence was performed from a single slice of the T2-weighted images, for a quantitative mapping of brain tissue perfusion.

Blood sampling

After induction, animals were maintained anesthetized with isoflurane 5%. Animals were spontaneously breathing during the intracardiac infusion. A thoracotomy allowed accessing the heart. After ventricular puncture of approximately 0.5-1ml of blood, in an anticoagulant fraction (Sodium Citrate 0.129M; 1/9 of the volume of blood collected), a cannula was inserted into the left ventricle of the heart. Then, a peristaltic pump injected about 20 ml heparinized NaCl at 4°C with a flow rate of 15 ml/min to rinse the vascular system. These samples were centrifuged twice at 1500g for 15 min at room temperature (RT) to separate the plasma and obtain platelet-poor plasma.

ELISA for tPA

Mouse plasma was collected as described in the *Blood sampling section*. Total plasmatic tPA from mice were analysed using a commercial ELISA kit (Innovative Research, Inc.) according to the manufacturer's instructions.

Statistical analyses

Statistical analyses were performed using GraphPad software: Mann–Whitney test for ASL/inter-groups and lesion volume analysis in tPA^{Null} and VECad-Cre^{ΔtPA} line (mean +/- SEM); Kruskal-Wallis test for Speckle Doppler analysis in tPA^{Null}, VECad-Cre^{ΔtPA} line and tPA^{Null} under parabiosis (mean +/- SEM); Friedman test for ASL/intra-groups analysis in tPA^{Null}, VECad-Cre^{ΔtPA} line and tPA^{Null} under parabiosis (mean +/- SEM); 2way ANOVA with Tukey's test for ASL/inter-groups analysis in tPA^{Null} line under parabiosis (mean +/- SEM), Glycemia measurement (mean +/- SD) and ELISA assay/inter-groups (mean +/- SEM); one way ANOVA test for lesion volume analysis in tPA^{Null} line under parabiosis; Kruskal-Wallis and Uncorrected Dunn's tests for ELISA assay/intra-groups. Data were considered statistically different if probability values (p) were at least < 0.05.

Results

Endogenous tPA is beneficial in a model of thrombo-embolic stroke

In order to study the effect of endogenous circulating tPA in relevant preclinical models, we first compared a new tPA-deficient mouse strain (tPA^{NULL}, Douceau et al., 2022) and its wild type littermate (tPA^{WT}) in a model of ischemic stroke in which the occlusive clot is sensitive to thrombolysis (Orset et al., 2007; Martinez de Lizarrondo et al., 2017) (Figure 1A). In this thrombin-induced model, the impact of tPA deficiency is a global reflect of the vascular and parenchymal effects of the endogenous protease. The drop in CBF achieved at the initiation of stroke (measured by Speckle flowmetry) was identical in both genotypes (figure 1B, 37.62 % in tPA^{NULL} versus 39.94 % in tPA^{WT}, n=10 per group, p=0,6842). However, 24 hours later, the analysis of angiographic scores showed that while full or partial recanalization of the MCA has occurred in 90% of tPA^{WT} mice, the majority of tPA^{NULL} mice showed no recanalization (figure 1C). In line with this, ASL maps of CBF (Figure 1D-F), showed that the ischemic area remained largely hypoperfused compared to its contralateral homologue in tPA^{NULL} mice (27.28 % versus contralateral). This hypoperfusion was less severe in tPA^{WT} animals (60.31 % versus contralateral) (Figure 1F, E). Consistent with these vascular aspects, the infarcted lesion was 38.79% bigger in tPA^{NULL} versus tPA^{WT} mice (n=10 per group, 26.01 mm³ versus 18.74 mm³, p=0,0232, figure 1G-H). Altogether, these findings demonstrate the overall benefit of endogenous tPA in a thrombo-embolic model of stroke.

Parabiosis unmasks the effect of endogenous circulating versus parenchymal tPA during thrombo-embolic stroke

We then sought to determine the respective contribution of vascular and parenchymal tPA to the above-described phenotype after thrombin-induced stroke. We thus developed parabiosis

with the idea that *via* the shared circulation, a tPA^{WT} mouse could restore circulating levels of a tPA^{NULL} mouse to normal levels, without influencing other compartments.

We first validated the surgical approach by showing the actual sharing of blood between two WT parabionts. First, 5, 15 or 22 days post-surgery, glycemia was followed-up for 1 hour in both the donor and the recipient parabionts after a single bolus of glucose iv. In the donor mouse, whatever the delay post-surgery, glycemia reached a plateau within 1 minute and began to decline back to normal levels from 15 minutes post-bolus. In the recipient animal, glucose levels did not rise when the test was performed after 5 days of parabiosis. Fifteen days post-surgery, glycemia increased in the blood of the recipient 15 and 20 minutes after the bolus was administered to the donor. Twenty-two days post-surgery, glycemia increased in the blood of the recipient from 5 to 40 minutes after the bolus was administered to the donor (Figure 2A). These data show that the chimerism between both animals is effective after 22 days. This was confirmed first by T1 MRI analyses (Figure 2B-C), showing the diffusion of gadolinium from the donor to the recipient, and with NIRF imaging (Figure 2D-E), showing the transfer of vascular Evans blue from the donor to the recipient (see images of whole bodies and of isolated non perfused organs). Finally, we performed ELISA assays of circulating tPA levels in homo- (tPA^{WT}/tPA^{WT} and tPA^{NULL}/tPA^{NULL} pairs) and hetero-chronic parabionts (tPA^{WT}/tPA^{NULL} pairs) (Figure 2F). tPA levels were identical in each parabiont of each pair. As expected, circulating tPA levels in the tPA^{NULL} parabionts of tPA^{WT}/tPA^{NULL} pairs were back to the levels of tPA^{WT} animals. This shows that with parabiosis, the tPA^{WT} mouse acts as a donor of circulating tPA, which validates our strategy of rescue.

We then constituted 4 experimental groups: tPA^{NULL}(tPA^{NULL}), tPA^{WT}(tPA^{WT}), tPA^{NULL}(tPA^{WT}) and tPA^{WT}(tPA^{NULL}) in which one animal was subjected to thrombin-induced

stroke (the animal in brackets is the non stroked animal, Figure 3A). The drop in CBF achieved at the initiation of stroke was identical in the four groups (Figure 3B), suggesting that clot formation was homogeneous. However, after 24h, the quantification of CBF by ASL in the lesioned area showed that the residual hypoperfusion was more severe in the absence of tPA throughout the body ($tPA^{NULL}(tPA^{NULL})$ versus $tPA^{WT}(tPA^{WT})$). Despite the sharing of circulation, the tPA^{WT} of $tPA^{NULL}(tPA^{WT})$ pairs did not rescue spontaneous reperfusion in their tPA^{NULL} partners (Figure 3D-E).

As observed in non parabiotic animals (Figure 1), the infarcted lesion was bigger in tPA^{NULL} versus tPA^{WT} mice of the homotypic pairs (+69,4%, $n=10$ per group, 30.16 mm^3 versus 17.80 mm^3 , $p < 0.0001$, figure 3I-J). In heterotypic $tPA^{NULL}(tPA^{WT})$ pairs, the tPA^{WT} parabiont partly protected the tPA^{NULL} against stroke-induced infarction (21% smaller lesion in the tPA^{NULL} when linked to a tPA^{WT} versus to a tPA^{NULL} mouse). Together, these data show that in this stroke model, endogenous vascular tPA is a key player in the evolution of stroke damages, with a prevailing beneficial activity.

The most likely mechanism responsible for the beneficial effect of circulating tPA observed in the thrombin model is promotion of reperfusion by clot lysis/prevention of micro-thrombosis. We thus constituted another series of 4 experimental groups: $tPA^{NULL}(tPA^{NULL})$, $tPA^{WT}(tPA^{WT})$, $tPA^{NULL}(tPA^{WT})$ and $tPA^{WT}(tPA^{NULL})$ in which one animal was subjected to the ferric chloride-induced stroke model, which is not sensitive to tPA-driven thrombolysis (Figure 4A). The drop in CBF achieved at the initiation of stroke was identical in the four groups (figure 4B), suggesting that clot formation was homogeneous. In contrast to the findings in the thrombin-stroke model, after 24h, none of the animals, whatever its group, showed spontaneous reperfusion in the lesioned area (Figure 4C-H). Importantly, the stroke lesions were similar in the four groups: 20.40 mm^3 in the $tPA^{WT}(tPA^{WT})$, 23.52 mm^3 in the $tPA^{NULL}(tPA^{NULL})$, 22.70 mm^3 in the $tPA^{NULL}(tPA^{WT})$ and 23.51 mm^3 in the $tPA^{WT}(tPA^{NULL})$. Together, these data

confirm that FeCl₃ produces a tPA-resistant clot, and that in this context, endogenous tPA has no impact at all, neither in the blood nor in the parenchyma.

Back to the thrombin-induced model of stroke, we sought to determine if, in response to clot formation, endothelial cells release enough tPA to promote spontaneous reperfusion/recanalization. We thus used a mouse line with a conditional knockout of tPA in endothelial cells. These mice with a selective depletion of tPA from endothelial origin recapitulated the phenotype of tPA^{NULL} mice. First, the extent of CBF loss achieved at the initiation of stroke was identical in both the VECad-Cre^{ΔtPA} and VECad-Cre^{WT} (Figure 5B, 44.13% *versus* 47.76%, $p=0,5132$, $n=10$ per group). However, 24 hours later, while all VECad-Cre^{WT} animals had totally or partially recanalized, VECad-Cre^{ΔtPA} performed worse, with up to 40% of animals with no recanalization (Figure 5C). The extent of residual hypoperfusion in the lesioned area tended to be worse in the VECad-Cre^{ΔtPA} (Figure 5D-F), and the infarcted lesion was 18.95% bigger in VECad-Cre^{ΔtPA} *versus* VECad-Cre^{WT} mice ($n=10$ per group, 25.32 mm³ *versus* 21.27 mm³, Figure 5G-H, $p=0,0147$).

Discussion

While the utility of tPA for the treatment of ischemic stroke is not questioned, even in the thrombectomy era (Gauberti et al., 2021; Powers et al., 2019), several limits exist, some being associated to the access/eligibility to the drug, others being associated to the drug itself (Sandercock et al., 2012), which could well be true as well for endogenous tPA.

Our aim here was to specifically address the role of vascular *versus* parenchymal endogenous tPA. We demonstrate thanks to various conditional knockout mice and parabiosis, that physiological levels of circulating tPA allow after 24 h a significant reperfusion of the ischemic brain, which translates into brain protection.

The same question as ours has recently been addressed by Torrente and colleagues (2022), using an interesting alternative approach targeting the two main inhibitors of tPA: neuroserpin (NSP), which is only expressed in the brain, and the type 1 plasminogen activator inhibitor, PAI-1, which is mainly expressed in (but not restricted to) the circulation. The authors compared the phenotype of PAI-1 KO *versus* NSP KO mice after stroke, with the assumption that NSP deficiency unmasks the effect of parenchymal tPA, while PAI-1 deficiency unmasks the effect of tPA in the circulation. Their findings suggest that NSP deficiency enhances tPA activity in the parenchyma which increases BBB permeability and worsens stroke outcomes, while PAI-1 deficiency enhances fibrinolysis and improves recovery.

Here we used another strategy to dissect the parenchymal *versus* circulating effects of tPA. First, we used a new mouse strain, the tPA^{Null} mice, that we have developed since the classical tPA KO strain has been questioned (Szabo et al., 2016). Physiologically, these tPA^{Null} mice display hyperactivity, reduced anxiety, and impaired spatial memory (Douceau et al., 2022). We also developed a unique approach, parabiosis, with the idea that when paired to a tPA^{Null} mouse, a tPA^{WT} mouse should allow rescuing circulating levels of tPA to physiological ranges in the deficient mouse. Our main findings are that in a model of thrombo-embolic stroke, known to be sensitive to tPA, endogenous circulating tPA can, with time, allow the recanalization of the occluded artery, as well as reperfusion in the ischemic tissue, thus avoiding expansion of the infarct.

We did not observe any effect of genotypes on CBF drops at stroke initiation. In the same model of stroke and in the absence of any treatment, it has been shown by laser doppler (El Amki et al., 2012; Orset et al., 2007) and by ultrafast ultrasound imaging (Hingot et al., 2020), that no reperfusion/recanalization has yet occurred after 2h in the ischemic area. Thus, the spontaneous reperfusion/recanalization we observed 24h later may begin at later stages than in these first 2 hours of stroke. Another interesting finding is that, in the same model, a diabody specific for

TAFI and PAI-1 administered early after stroke onset (20 minutes) caused a twofold decrease in brain infarct size 24 hours later, and was even more efficient than administration of exogenous tPA at the same time point (Wyseure et al., 2015). This indicates that endogenous PAI-1 prevents the very early action of tPA but that later on, active levels of tPA are then sufficient to allow reperfusion/recanalization and brain protection.

Dong et al. published in 2016 an interesting meta-analysis of the impact of mechanical stroke models in tPA KO mice. They concluded that due to a huge heterogeneity, endogenous tPA had no effect on brain infarction. Indeed, both smaller and bigger lesions have been observed in tPA KO mice (Wang et al., 1998; Nagai et al., 1999; Tabrizi et al., 1999; Roussel et al., 2009). In fact, no study, before the present one, has ever tested tPA deficient mice in a stroke model involving a thromboembolic blood clot. Overall, this highlights the importance of the choice of relevant stroke models. It may be that tPA (endogenous or exogenous) is beneficial via its thrombolytic activity, in stroke models with secondary brain thrombosis or thromboembolism (Tabrizi et al., 1999; Jiang et al., 2000; Orset et al., 2007). Otherwise, or if thrombolysis is performed outside of its therapeutic window, the neurotoxic tPA effects may prevail (Wang et al., 1998; Liu et al., 2004; El Amki et al., 2012; Orset et al., 2016; Zhao et al., 2017).

Our data did not suggest a major contribution of parenchymal endogenous tPA to brain lesions. But, it is important to mention that in the ischemic brain, endogenous tPA may exert deleterious effects on the grey matter, but protective effects on the white matter (Correa et al., 2011; Pu et al., 2019).

Finally, it could be relevant to determine which form of tPA is involved in the observed effects. Indeed, single chain and two chain forms of have similar thrombolytic properties in the presence

of fibrin (Parcq et al., 2012), but some functions of tPA are specific of its single chain form, especially its ability to promote NMDAR signaling and excitotoxicity (Parcq et al., 2012) and the two chain form is less efficient to reduce lesion volume and BBB leakage, and to improve functional recovery (Anfray et al., 2021).

List of abbreviations: ASL, BBB, CBF, CNS, LDF, IV, MCA, MRI, NIRF, NMDAR, NPS, PAI-1, tPA

Declarations

Ethics approval and consent to participate: All experiments were approved by the Ethical Committee and received authorization #19435 and 19978 from the Ministry of Higher Education, Research and Innovation. The experiments were performed with respect for animal welfare and in accordance with French (decree 87/848) and European (2010/63/EU) regulations.

Availability of data and materials: The datasets analyzed during the current study are available from the corresponding author on request.

Competing interests: none.

Acknowledgements: This work was supported by

Authors' contributions: C.A, D.V, J.F designed the study. J. F, F.L, M.Y, Q.G, SML, P.M, C.O performed the experiments. J.F performed data acquisition and analysis. C.A, J.F and D.V wrote the manuscript. All the Authors reviewed the manuscript.

References

Anfray, A., Brodin, C., Drieu, A., Potzеха, F., Dalarun, B., Agin, V., Vivien, D., & Orset, C. (2021). Single- and two- chain tissue type plasminogen activator treatments differentially influence cerebral recovery after stroke. *Experimental Neurology*, 338(October 2020), 1–10. <https://doi.org/10.1016/j.expneurol.2021.113606>

Anfray, A., Drieu, A., Hingot, V., Hommet, Y., Yetim, M., Rubio, M., Deffieux, T., Tanter, M., Orset, C., & Vivien, D. (2020). Circulating tPA contributes to neurovascular coupling by a mechanism involving the endothelial NMDA receptors. *Journal of Cerebral Blood Flow and Metabolism*, 40(10), 2038–2054. <https://doi.org/10.1177/0271678X19883599>

Benchenane, K., Berezowski, V., Fernández-Monreal, M., Brillault, J., Valable, S., Dehouck, M.-P., Cecchelli, R., Vivien, D., Touzani, O., & Ali, C. (2005). Oxygen Glucose Deprivation Switches the Transport of tPA Across the Blood–Brain Barrier From an LRP-Dependent to an Increased LRP-Independent Process. *Stroke*, 36(5), 1059–1064. <https://doi.org/10.1161/01.STR.0000163050.39122.4f>

Benchenane, K., López-Atalaya, J. P., Fernández-Monreal, M., Touzani, O., & Vivien, D. (2004). Equivocal roles of tissue-type plasminogen activator in stroke-induced injury. *Trends in Neurosciences*, 27(3), 155–160. <https://doi.org/10.1016/j.tins.2003.12.011>

Cheng, J.-W., Zhang, X.-J., Cheng, L.-S., Li, G.-Y., Zhang, L.-J., Ji, K.-X., Zhao, Q., & Bai, Y. (2018). Low-Dose Tissue Plasminogen Activator in Acute Ischemic Stroke: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Journal of Stroke and Cerebrovascular Diseases*, 27(2), 381–390. <https://doi.org/10.1016/j.jstrokecerebrovasdis.2017.09.014>

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>

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. *Journal of Experimental Medicine*, 208(6), 1229–1242. <https://doi.org/10.1084/jem.20101880>

Douceau, S., Lemarchand, E., Hommet, Y., Lebouvier, L., Joséphine, C., Bemelmans, A. P., Maubert, E., Agin, V., & Vivien, D. (2022). PKC δ -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>

El Amki, M., Lerouet, D., Coqueran, B., Curis, E., Orset, C., Vivien, D., Plotkine, M., Marchand-Leroux, C., & Margaill, I. (2012). Experimental modeling of recombinant tissue plasminogen activator effects after ischemic stroke. *Experimental Neurology*, 238(2), 138–144. <https://doi.org/10.1016/j.expneurol.2012.08.005>

Fugate, J. E., Klunder, A. M., & Kallmes, D. F. (2013). Fugate, Klunder, Kallmes - 2013 - What is meant by TICI.

Gauberti, M., Martinez de Lizarrondo, S., & Vivien, D. (2021). Thrombolytic strategies for ischemic stroke in the thrombectomy era. *Journal of Thrombosis and Haemostasis*, 19(7), 1618–1628. <https://doi.org/10.1111/jth.15336>

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>

Hingot, V., Brodin, C., Lebrun, F., Heiles, B., Chagnot, A., Yetim, M., Gauberti, M., Orset, C., Tanter, M., Couture, O., Deffieux, T., & Vivien, D. (2020). Early ultrafast ultrasound imaging of cerebral perfusion correlates with ischemic stroke outcomes and responses to treatment in mice. *Theranostics*, 10(17), 7480–7491. <https://doi.org/10.7150/thno.44233>

Huber, D., Cramer, E. M., Kaufmann, J. E., Meda, P., Massé, J. M., Kruithof, E. K. O., & Vischer, U. M. (2002). Tissue-type plasminogen activator (t-PA) is stored in Weibel-Palade bodies in human endothelial cells both in vitro and in vivo. *Blood*, 99(10), 3637–3645. <https://doi.org/10.1182/blood.V99.10.3637>

Jiang, Z. W., Gong, Q. Z., Di, X., Zhu, J., & Lyeth, B. G. (2000). Dicyclomine, an M1 muscarinic antagonist, reduces infarct volume in a rat subdural hematoma model. *Brain Research*, 852(1), 37–44. [https://doi.org/10.1016/S0006-8993\(99\)02230-1](https://doi.org/10.1016/S0006-8993(99)02230-1)

Kamran, P., Sereti, K. I., Zhao, P., Ali, S. R., Weissman, I. L., & Ardehali, R. (2013). Parabiosis in mice: a detailed protocol. *Journal of Visualized Experiments : JoVE*, 80, 1–5. <https://doi.org/10.3791/50556>

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(2), 139–148. <https://doi.org/10.1242/jcs.110.2.139>

Li, S., Pan, Y., Wang, Z., Liang, Z., Chen, H., Wang, D., Sui, Y., Zhao, X., Wang, Y., Du, W. L., Zheng, H., & Wang, Y. (2022). Safety and efficacy of tenecteplase *versus* alteplase in patients with acute ischaemic stroke (TRACE): a multicentre, randomised, open label, blinded-endpoint (PROBE) controlled phase II study. *Stroke and Vascular Neurology*, 7(1), 47–53. <https://doi.org/10.1136/svn-2021-000978>

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>

Liu, X., Bai, X., Li, M., Li, H., Zhang, Y., & Yang, B. (2020). Detecting establishment of shared blood supply in parabiotic mice by caudal vein glucose injection. *Journal of Visualized Experiments*, 2020(156), 1–6. <https://doi.org/10.3791/60411>

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>

Macrez, R., Ortega, M. C., Bardou, I., Mehra, A., Fournier, A., Van Der Pol, S. M. A., Haelewyn, B., Maubert, E., Lesept, F., Chevilley, A., De Castro, F., De Vries, H. E., Vivien, D., Clemente, D., & Docagne, F. (2016). Neuroendothelial NMDA receptors as therapeutic targets in experimental autoimmune encephalomyelitis. *Brain*, 139(9), 2406–2419. <https://doi.org/10.1093/brain/aww172>

Martinez de Lizarrondo, S., Gakuba, C., Herbig, B. A., Repess  , Y., Ali, C., Denis, C. V., Lenting, P. J., Touz  , E., Diamond, S. L., Viven, D., & Gauberti, M. (2017). Potent

thrombolytic effect of N-Acetylcysteine on arterial thrombi. *Circulation*, 136(7), 646–660. <https://doi.org/10.1161/CIRCULATIONAHA.117.027290>. Potent

Matys, T., Pawlak, R., Matys, E., Pavlides, C., McEwen, B. S., & Strickland, S. (2004). Tissue plasminogen activator promotes the effects of corticotropin- releasing factor on the amygdala and anxiety-like behavior. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 101(46), 16345–16350. <https://doi.org/10.1073/pnas.0407355101>

Mehra, A., Guérit, S., Macrez, R., Gosselet, F., Sevin, E., Lebas, H., Maubert, E., de Vries, H. E., Bardou, I., Vivien, D., & Docagne, F. (2020). Nonionotropic action of endothelial NMDA receptors on blood–brain barrier permeability via Rho/ROCK-mediated phosphorylation of myosin. *Journal of Neuroscience*, 40(8), 1778–1787. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.0969-19.2019>

Nagai, N., De Mol, M., Lijnen, H. R., Carmeliet, P., & Collen, D. (1999). Role of plasminogen system components in focal cerebral ischemic infarction: A gene targeting and gene transfer study in mice. *Circulation*, 99(18), 2440–2444. <https://doi.org/10.1161/01.CIR.99.18.2440>

Nicole, O., Docagne, F., Ali, C., Margaill, 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), 59–64. <https://doi.org/10.1038/83358>

NINDS. (1995). Tissue plasminogen activator for acute ischemic stroke. *The New England Journal of Medicine*, 333(24), 1581–1587.

Orset, C., Haelewyn, B., Allan, S. M., Ansar, S., Campos, F., Cho, T. H., Durand, A., Amki, M. El, Fatar, M., Grudzinski, S., Lizasoain, I., Lo, E., Macrez, R., Margaill, I., Maysami, S., Nighoghossian, N., Orbe, J., Antonio, J., Parienti, J., ... Compostela, S. De. (2016). Stroke : a Retrospective Pooled Analysis. 47(5), 1312–1318. <https://doi.org/10.1161/STROKEAHA.116.012238>. Efficacy

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>

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), 1983–1991. <https://doi.org/10.1038/cdd.2012.86>

Powers, W. J., Rabinstein, A. A., Ackerson, T., Adeoye, O. M., Bambakidis, N. C., Becker, K., Biller, J., Brown, M., Demaerschalk, B. M., Hoh, B., Jauch, E. C., Kidwell, C. S., Leslie-Mazwi, T. M., Ovbiagele, B., Scott, P. A., Sheth, K. N., Southerland, A. M., Summers, D. V., & Tirschwell, D. L. (2019). Guidelines for the early management of patients with acute ischemic stroke: 2019 update to the 2018 guidelines for the early management of acute ischemic stroke a guideline for healthcare professionals from the American Heart Association/American Stroke A. In *Stroke* (Vol. 50, Issue 12). <https://doi.org/10.1161/STR.0000000000000211>

Pu, H., Shi, Y., Zhang, L., Lu, Z., Ye, Q., Leak, R. K., Xu, F., Ma, S., Mu, H., Wei, Z., Xu, N., Xia, Y., Hu, X., Kevin Hitchens, T., Bennett, M. V. L., & Chen, J. (2019). Protease-independent action of tissue plasminogen activator in brain plasticity and neurological recovery after ischemic stroke. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 116(18), 9115–9124. <https://doi.org/10.1073/pnas.1821979116>

Roussel, B. D., MacRez, R., Jullienne, A., Agin, V., Maubert, E., Dauphinot, L., Potier, M. C., Plawinski, L., Castel, H., Hommet, Y., Munuera, J., Montaner, J., Yepes, M., Ali, C., & Vivien, D. (2009). Age and albumin D site-binding protein control tissue plasminogen activator levels: Neurotoxic impact. *Brain*, 132(8), 2219–2230. <https://doi.org/10.1093/brain/awp162>

Sandercock, P., Wardlaw, J. M., Lindley, R. I., Dennis, M., Cohen, G., Murray, G., Innes, K., Venables, G., Czlonkowska, A., Kobayashi, A., Ricci, S., Murray, V., Berge, E., Slot, K. B., Hankey, G. J., Correia, M., Peeters, A., Matz, K., Lyrrer, P., ... Blackwell, L. (2012). The benefits and harms of intravenous thrombolysis with recombinant tissue plasminogen activator within 6 h of acute ischaemic stroke (the third international stroke trial [IST-3]): A randomised controlled trial. *The Lancet*, 379(9834), 2352–2363. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(12\)60768-5](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(12)60768-5)

Schaller, J., & Gerber, S. S. (2011). The plasmin-antiplasmin system: Structural and functional aspects. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 68(5), 785–801. <https://doi.org/10.1007/s00018-010-0566-5>

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>

Szabo, R., Samson, A. L., Lawrence, D. A., Medcalf, R. L., & Bugge, T. H. (2016). Passenger mutations and aberrant gene expression in congenic tissue plasminogen activator-deficient mouse strains. *Journal of Thrombosis and Haemostasis*, 14(8), 1618–1628. <https://doi.org/10.1111/jth.13338>

Tabrizi, P., Wang, L., Seeds, N., McComb, J. G., Yamada, S., Griffin, J. H., Carmeliet, P., Weiss, M. H., & Zlokovic, B. V. (1999). Tissue plasminogen activator (tPA) deficiency exacerbates cerebrovascular fibrin deposition and brain injury in a murine stroke model studies in tPA-deficient mice and wild-type mice on a matched genetic background. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, 19(11), 2801–2806. <https://doi.org/10.1161/01.ATV.19.11.2801>

Tang, G., Cao, Z., Luo, Y., Wu, S., & Sun, X. (2022). Prognosis associated with asymptomatic intracranial hemorrhage after acute ischemic stroke: a systematic review and meta-analysis. *Journal of Neurology*, 269(7), 3470–3481. <https://doi.org/10.1007/s00415-022-11046-6>

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. *The Lancet Neurology*, 17(12), 1121–1132. [https://doi.org/10.1016/S1474-4422\(18\)30323-5](https://doi.org/10.1016/S1474-4422(18)30323-5)

Torrente, D., Su E.J., Fredriksson L., Warncok M., Bushart D., Mann K.M., Emal C.D., & Lawrence D.A (2022). Compartmentalized Actions of the Plasminogen Activator Inhibitors, PAI-1 and Nsp, in Ischemic Stroke. *Translational Stroke Research*, 15(5), 801-815. <https://doi.org/10.1007/s12975-022-00992-y>

Tsirka, S. E., Rogove, A. D., & Strickland, S. (1996). Neuronal cell death and tPA [4]. *Nature*, 384(6605), 123–124. <https://doi.org/10.1038/384123b0>

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

van Moorsel, M. V. A., de Maat, S., Vercruysse, K., van Leeuwen, E. M., Jacqmarcq, C., Bonnard, T., Vivien, D., van der Worp, H. B., Dijkhuizen, R., & Maas, C. (2022). VWF-targeted thrombolysis to overcome rh-tPA resistance in experimental thrombotic stroke models. *Blood*. <https://doi.org/10.1182/blood.2022016342>

Wang, Y. F., Tsirka, S. E., Strickland, S., Stieg, P. E., Soriano, S. G., & Lipton, S. A. (1998). Tissue plasminogen activator (tPA) increases neuronal damage after focal cerebral ischemia in wild-type and tPA-deficient mice. *Nature Medicine*, 4(2), 228–231. <https://doi.org/10.1038/nm0298-228>

Wang, Y., Wang, X., Zhang, X., Chen, S., Sun, Y., Liu, W., Jin, X., & Zheng, G. (2020). D1 receptor-mediated endogenous tPA upregulation contributes to blood-brain barrier injury after acute ischaemic stroke. *Journal of Cellular and Molecular Medicine*, 24(16), 9255–9266. <https://doi.org/10.1111/jcmm.15570>

Wyseure, T., Rubio, M., Denorme, F., De Lizarrondo, S. M., Peeters, M., Gils, A., De Meyer, S. F., Vivien, D., & Declerck, P. J. (2015). Innovative thrombolytic strategy using a heterodimer diabody against TAFI and PAI-1 in mouse models of thrombosis and stroke. *Blood*, 125(8), 1325–1332. <https://doi.org/10.1182/blood-2014-07-588319>

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), 1533–1540. <https://doi.org/10.1172/JCI200319212>

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 and Metabolism*, 29(12), 1946–1954. <https://doi.org/10.1038/jcbfm.2009.174>

Zhao, X. J., Larkin, T. M., Lauver, M. A., Ahmad, S., & Ducruet, A. F. (2017). Tissue plasminogen activator mediates deleterious complement cascade activation in stroke. *PLoS ONE*, 12(7), 1–15. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0180822>

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), 743–753. <https://doi.org/10.1182/blood-2018-07-864843>

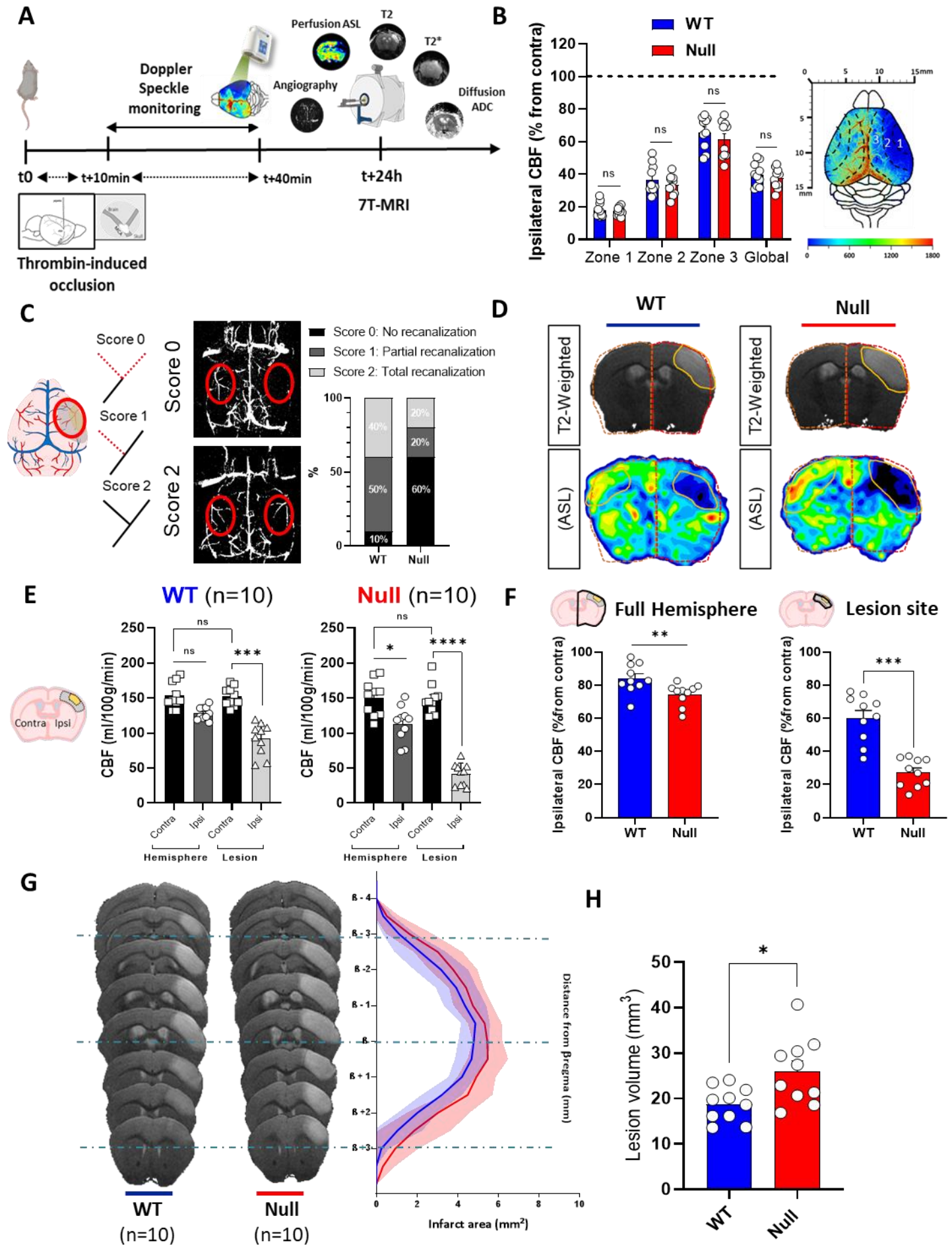


Figure legends

Figure 1:

A. Schematic representation of the experimental timeline for laser Doppler flowmetry monitoring of cerebral blood volumes until 40 min after MCAo and MRI follow-up 24 h after stroke induction. **B.** Colormaps and corresponding quantification showing the decrease of CBF in ipsilateral hemisphere, during stroke induction in tPA^{WT} or tPA^{Null} mice, using Laser Doppler Flowmetry measurement. Measurements are made either in full ipsilateral hemisphere (global) or subdivided in 3 categories; (Zone 1 = ischemic focus; Zone 2 = Penumbra; Zone 3 = Oligemia) and compared with contralateral mirror ROIs. Color intensity goes from blue (no CBF signal) to red (strong CBF signal). Circles represent values for each mouse (mean ± SEM, n=10 per group). Kruskal-Wallis test. **C.** Representative 3D-reconstructed angiographies illustrating recanalization score 0 (top) or score 2 (bottom) at 24h after stroke. Quantification of Percentage of recanalization score at 24 hours after stroke onset in tPA^{WT} or tPA^{Null} mice (mean ± SEM, n=10 per group). Score 0 = complete occlusion; Score 1 = incomplete filling of the distal territory; Score 2 = complete recanalization. **D.** Representative Arterial Spin Labeling (ASL) mapping from a single T2-weighted slice (slice with the bregma), at 24 after stroke, in tPA^{WT} and tPA^{Null} mice. **E.** Quantification of tissular perfusion in the lesion site and full hemisphere, compared to contralateral hemisphere in tPA^{WT} and tPA^{Null} groups, independently at 24 hours after stroke. Each points represent values for each mouse (mean ± SEM, n=10 per group). **p < 0.005, ***p < 0.001, Friedman test. **F.** Comparison of the tissular perfusion in the full hemisphere and lesion site between the 2 groups at 24 hours after stroke. Each points represent values for each mouse (mean ± SEM, n=10 per group). **p < 0.005, ***p < 0.001 Mann–Whitney test. **G.** Representative T2-weighted MRI brain images of the ischemic lesion at 24 hours after stroke (left) and oedema distribution around the bregma (right), in tPA^{WT} and tPA^{Null} mice. **H.** Quantification of lesion volume at 24 hours after stroke in tPA^{WT} and tPA^{Null} mice (mean ± SEM, n=10 per group). *p < 0.05, Mann–Whitney test.

Figure 2:

A. Parabiosis chimerism validation by IV injection of glucose (100 l, 1.2 g/kg) in tail vein of donor mice, glycemia (mg/dl) of both donor and recipient mice was measured from T0 during 1 hour, at D5, D15 and D22 following parabiosis surgery (mean $\pm$ SD, D5: n=5; D15: n=7; D22: n=7). $p < 0.05$, $**p < 0.005$ and $***p < 0.001$ from T0, 2-way ANOVA test. **B.** Representative MRI acquisition of parabionts at different time points following IV DOTA-gd injection (200  l, 0.01 mMol/ml) in donor mice to validate parabiosis model. T1-weighted image (white, right) represents DOTA-Gd signal and was superposed on anatomical T2-weighted image (left). **C.** Quantification of DOTA-Gd distribution between parabionts at different time points after injection. **D.** Representative photomicrographs (n=3) *ex vivo* and using near-infrared Fluorescence Imaging (NIRF) technique of liver for donor and recipient mice 60 min after EV injection, compared to a control mice. Color intensity goes from blue (no EB intensity) to red (strong EB intensity). **E.** Representative photomicrographs (n=3) of different organs of both parabionts, 60 min after EV injection, compared to a control mice. Organs are compared *ex vivo* and using NIRF technique. **F.** Graphs representing ELISA analyses of total tPA in both parabiont of each group: homo-typic (WT/WT; Null/Null) and hetero-typic (Null/WT). Plasma samples were collected at 3 weeks after parabiosis and subjected to ELISA analysis (mean $\pm$ SEM, n=4 for WT/WT and n=5 for Null/Null and Null/WT). $*p < 0.05$, Kruskal-Wallis and Uncorrected Dunn's tests and 2-way ANOVA test.

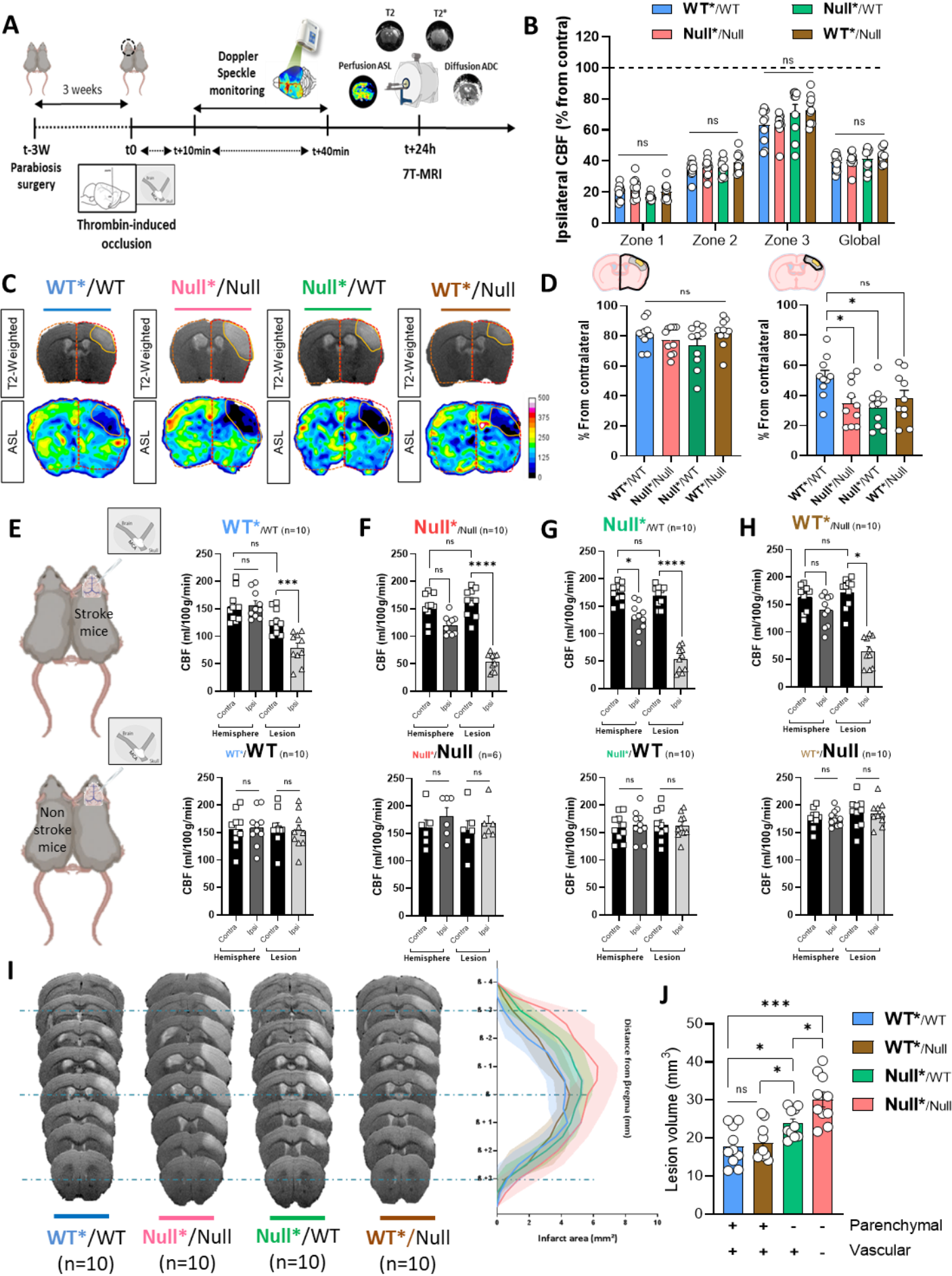


Figure 3:

A. Schematic representation of the experimental timeline for laser Doppler flowmetry monitoring of cerebral blood volumes until 40 min after MCAo and MRI follow-up 24 h after stroke induction. **B.** Quantification showing the decrease of CBF in ipsilateral hemisphere, during stroke induction in homo-typic (**WT***/**WT**; **Null***/**Null**) and hetero-typic (**Null***/**WT**; **WT***/**Null**) groups (the ischemic mouse is mentioned in bold with *), using Laser Doppler Flowmetry measurement. Measurements are made either in full ipsilateral hemisphere (global) or subdivided in 3 categories; (Zone 1 = ischemic focus; Zone 2 = Penumbra; Zone 3 = Oligemia) and compared with contralateral mirror ROIs. Circles represent values for each mouse (mean $\pm$ SEM, n=10 per group). Kruskal-Wallis test. **C.** Representative Arterial Spin Labeling (ASL) mapping from a single T2-weighted slice (slice with the bregma), at 24 hours after stroke, in homo-typic (**WT***/**WT**; **Null***/**Null**) and hetero-typic (**Null***/**WT**; **WT***/**Null**) groups. **D.** Comparison of the tissular perfusion in the lesion site and full hemisphere between all groups at 24 hours after stroke. Each points represent values for each mouse (mean $\pm$ SEM, n=10 per group). 2way ANOVA with Tukey's test. **E-H.** Quantification of tissular perfusion in the lesion site and full hemisphere, compared to contralateral hemisphere (top) and comparison with the non stroked parabiont (bottom) in **WT***/**WT** (**E**), **Null***/**Null** (**F**), **Null***/**WT** (**G**), **WT***/**Null** (**H**) groups, at 24 hours after stroke. Each points represent values for each mouse (mean $\pm$ SEM, n=10 per group). *p < 0.05, ***p < 0.001, ****p < 0.001, Friedman test. **I.** Representative T2-weighted MRI brain images of the ischemic lesion at 24 hours after stroke (left) and oedema distribution around the bregma (right) in homo-typic (**WT***/**WT**; **Null***/**Null**) and hetero-typic (**Null***/**WT**; **WT***/**Null**) groups. **J.** Quantification of lesion volume at 24 hours after in homo and hetero-typic groups (mean $\pm$ SEM, n=10 per group). *p < 0.05, One Way ANOVA test.

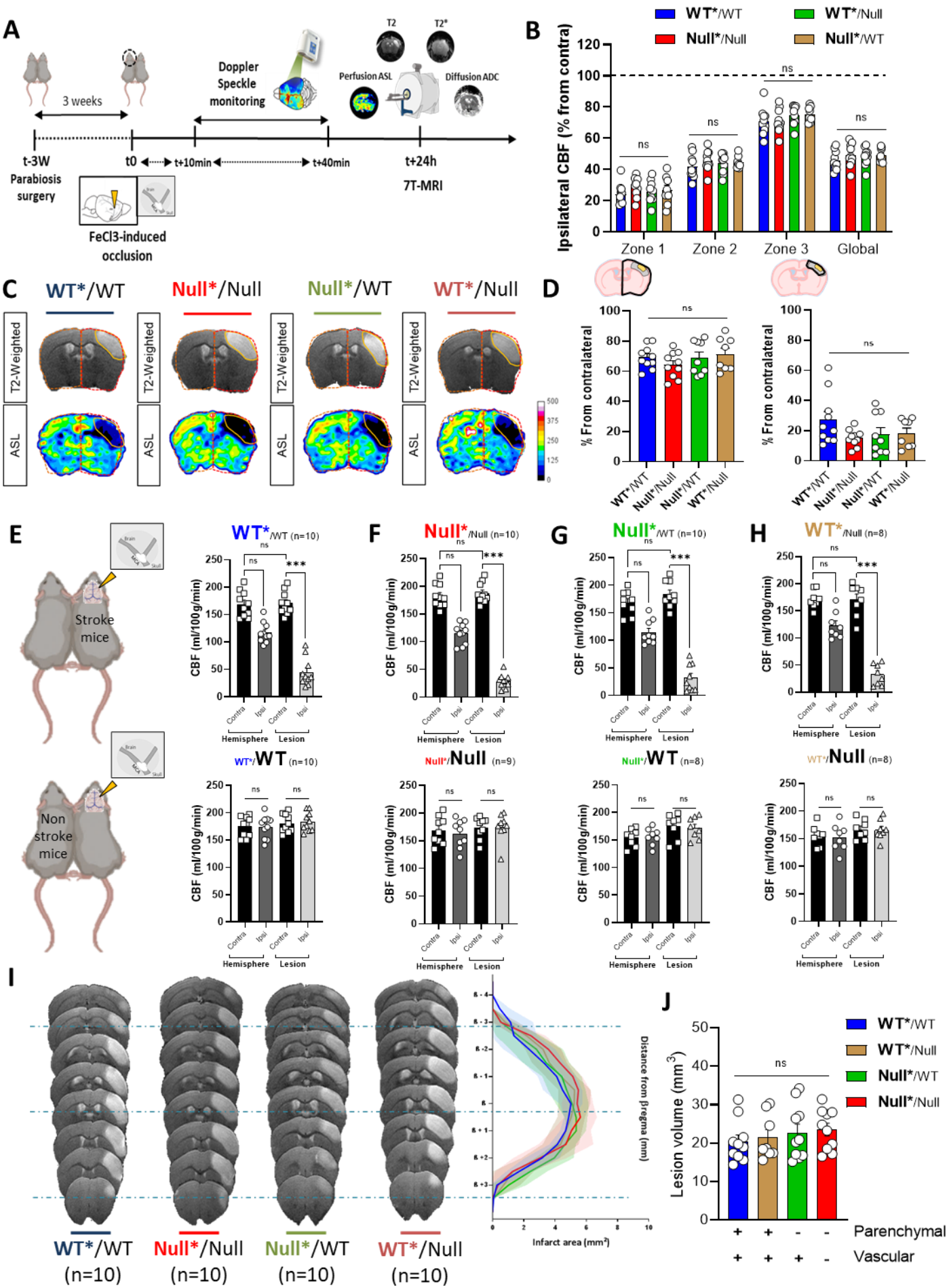


Figure 4:

A. Schematic representation of the experimental timeline for laser Doppler flowmetry monitoring of cerebral blood volumes until 40 min after MCAo and MRI follow-up 24 h after stroke induction. **B.** Quantification showing the decrease of CBF in ipsilateral hemisphere, during stroke induction in homo-typic (**WT*/WT**; **Null*/Null**) and hetero-typic (**Null*/WT**; **WT*/Null**) groups (the ischemic mouse is mentioned in bold with *), using Laser Doppler Flowmetry measurement. Measurements are made either in full ipsilateral hemisphere (global) or subdivided in 3 categories; (Zone 1 = ischemic focus; Zone 2 = Penumbra; Zone 3 = Oligemia) and compared with contralateral mirror ROIs. Circles represent values for each mouse (mean $\pm$ SEM, n=10 per group). Kruskal-Wallis test. **C.** Representative Arterial Spin Labeling (ASL) mapping from a single T2-weighted slice (slice with the bregma), at 24 hours after stroke, in homo-typic (**WT*/WT**; **Null*/Null**) and hetero-typic (**Null*/WT**; **WT*/Null**) groups. **D.** Comparison of the tissular perfusion in the lesion site and full hemisphere between all groups at 24 hours after stroke. Each points represent values for each mouse (mean $\pm$ SEM, n=8 **WT*/Null**, n=10 per group). 2way ANOVA with Tukey's test. **E-H.** Quantification of tissular perfusion in the lesion site and full hemisphere, compared to contralateral hemisphere (top) and comparison with the non stroked parabiont (bottom) in **WT*/WT** (**E**), **Null*/Null** (**F**), **Null*/WT** (**G**), **WT*/Null** (**H**) groups, at 24 hours after stroke. Each points represent values for each mouse (mean $\pm$ SEM, n=8 **WT*/Null**, n=10 per group). *p < 0.05, ***p < 0.001, ****p < 0.001, Friedman test. **I.** Representative T2-weighted MRI brain images of the ischemic lesion at 24 hours after stroke (left) and oedema distribution around the bregma (right) in homo-typic (**WT*/WT**; **Null*/Null**) and hetero-typic (**Null*/WT**; **WT*/Null**) groups. **J.** Quantification of lesion volume at 24 hours after in homo and hetero-typic groups (mean $\pm$ SEM, n=8 **WT*/Null**, n=10 per group). *p < 0.05, One Way ANOVA test.

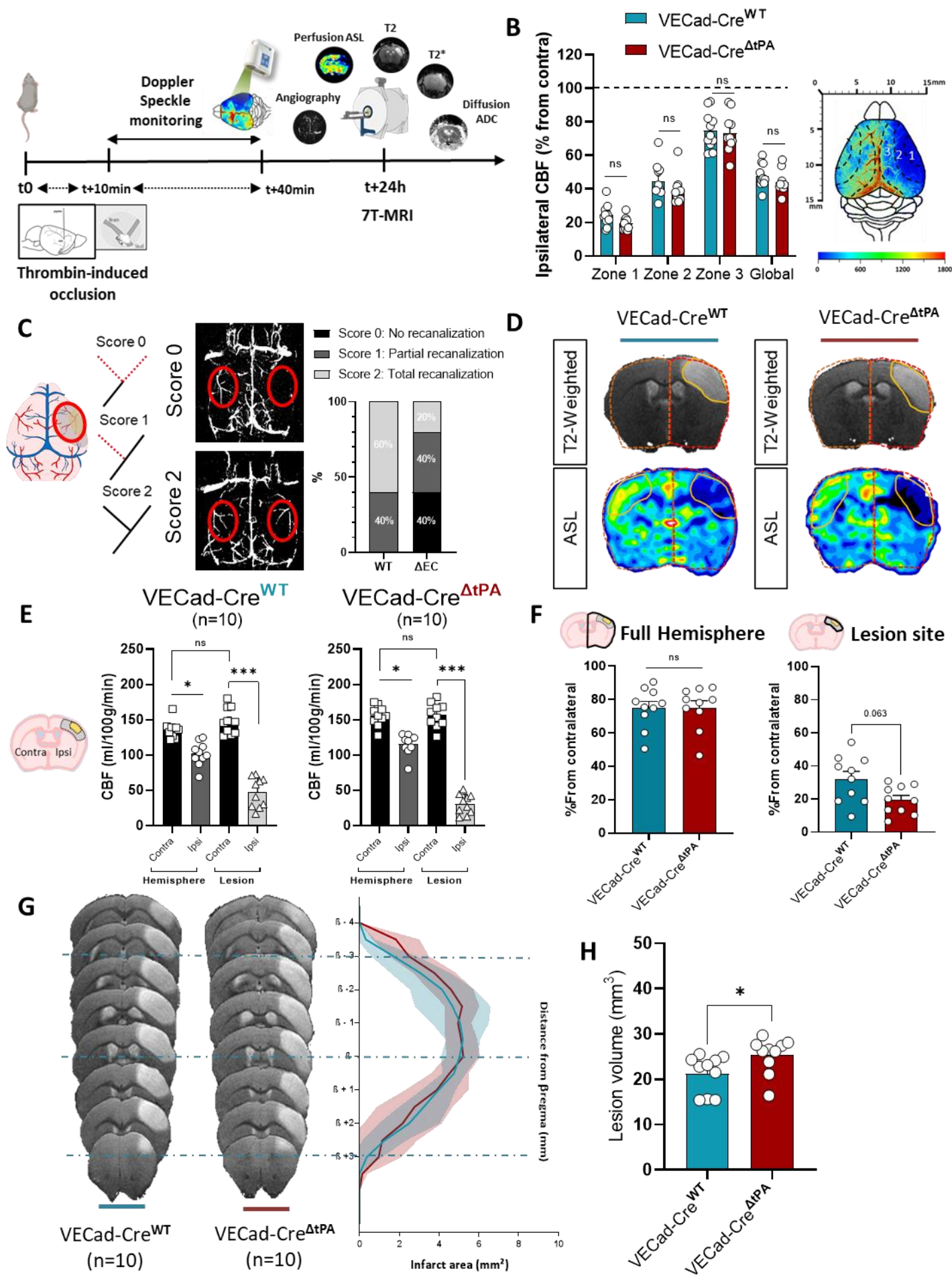


Figure 5:

A. Schematic representation of the experimental timeline for laser Doppler flowmetry monitoring of cerebral blood volumes until 40 min after MCAo and MRI follow-up 24 h after stroke induction. **B.** Colormaps and corresponding quantification showing the decrease of CBF in ipsilateral hemisphere, during stroke induction in VECad-Cre^{WT} or VECad-Cre^{ΔtPA} mice, using Laser Doppler Flowmetry measurement. Measurements are made either in full ipsilateral hemisphere (global) or subdivided in 3 categories; (Zone 1 = ischemic focus; Zone 2 = Penumbra; Zone 3 = Oligemia) and compared with contralateral mirror ROIs. Color intensity goes from blue (no CBF signal) to red (strong CBF signal). Circles represent values for each mouse (mean ± SEM, n=10 per group). Kruskal-Wallis test. **C.** Representative 3D-reconstructed angiographies illustrating recanalization score 0 (top) or score 2 (bottom) at 24h after stroke. Quantification of Percentage of recanalization score at 24 hours after stroke onset in VECad-Cre^{WT} or VECad-Cre^{ΔtPA} mice (mean ± SEM, n=10 per group). Score 0 = complete occlusion; Score 1 = incomplete filling of the distal territory; Score 3 = complete recanalization. **D.** Representative Arterial Spin Labeling (ASL) mapping from a single T2-weighted slice (slice with the bregma), at 24 after stroke, in VECad-Cre^{WT} or VECad-Cre^{ΔtPA} mice. **E.** Comparison of the tissular perfusion in the full hemisphere and lesion site between the 2 groups at 24 hours after stroke. Each points represent values for each mouse (mean ± SEM, n=10 per group). *p < 0.005, Mann–Whitney test. **F.** Quantification of tissular perfusion in the lesion site and full hemisphere, compared to contralateral hemisphere in VECad-Cre^{WT} or VECad-Cre^{ΔtPA} groups, independently at 24 hours after stroke. Each points represent values for each mouse (mean ± SEM, n=10 per group). **p < 0.005, ***p < 0.001, Friedman test. **G.** Representative T2-weighted MRI brain images of the ischemic lesion at 24 hours after stroke (left) and oedema distribution around the bregma (right), in VECad-Cre^{WT} or VECad-Cre^{ΔtPA} mice. **H.** Quantification of lesion volume at 24 hours after stroke in VECad-Cre^{WT} or VECad-Cre^{ΔtPA} mice (mean ± SEM, n=10 per group). *p < 0.05, Mann–Whitney test.

DISCUSSION

Dans ce travail, nous nous sommes intéressés au tPA circulant, afin d'en comprendre mieux l'origine et d'élucider si et comment, il interagit avec le système nerveux pour en modifier les (dys)fonctions. Un premier point de ce travail a consisté à cibler et identifier une nouvelle porte d'entrée dans le SNC pour le tPA d'origine vasculaire, à savoir les plexus choroïdes, une interface unique entre le sang et le LCS.

1.1 Le tPA vasculaire traverse la BSLCS pour rejoindre le parenchyme cérébral

En 2005, les travaux de l'équipe ont suggéré que le tPA circulant pouvait contrôler des processus physiopathologiques cérébraux, par sa capacité à rejoindre le parenchyme en traversant la BHE. Notamment, les auteurs ont pu détecter du tPA dans le LCS, 1 heure après l'avoir injecté par voie intraveineuse chez le rat, et ont aussi observé une co-localisation du tPA avec la lame basale et les pieds astrocytaires, en immunohistologie ([Benchenane, et al., 2005a, b](#)). La BHE est donc depuis une quinzaine d'années considérée comme une porte vers le cerveau pour le tPA circulant. Dans ce travail, nous nous sommes intéressés à une autre barrière, la BSLCS formée par les PCs, qui s'avère être une voie critique de migration, notamment pour les cellules inflammatoires, vers le parenchyme cérébral ([Spector et al., 2015](#) ; [Engelhardt & Ransohoff, 2012](#) ; [Gherzi-Egea et al., 2018](#)).

Nous avons donc testé l'hypothèse selon laquelle les PCs pourraient être une voie d'entrée du tPA vers parenchyme cérébral.

1.1.1 L'épithélium choroidien internalise le tPA vasculaire exogène.

La 1^{ère} étape a été de développer un modèle de culture primaire de CEPCs de souris, adapté du protocole développé chez le rat par [Monnot & Zheng \(2013\)](#). Les cultures primaires permettent d'obtenir un modèle de barrière notamment *via* l'établissement des jonctions serrées inter-cellules, comparativement aux lignées cellulaires inductibles qui elles n'expriment pas toujours les protéines caractéristiques d'un épithélium ou n'établissent pas des jonctions serrées complètes ([Lazarevic & Engelhardt, 2015](#)).

Nous avons montré que les CEPCs sont capables d'internaliser du tPA exogène (tPA⁵⁵⁵), avec une accumulation dépendante de la dose et du temps d'exposition, et bloquée à 4°C. Ces résultats démontrent que l'internalisation du tPA par les CEPCs *in vitro* est un phénomène actif.

Nous avons confirmé l'existence de cette internalisation du tPA, *ex vivo* sur des explants fraîchement isolés, puis *in vivo* : chez la souris, suite à une injection intraveineuse, nous observons du tPA⁵⁵⁵ dans l'épithélium des PCs, et nous démontrons un profil d'internalisation en forme de cloche, avec un pic 30 minutes post-injection. Deux hypothèses pourraient expliquer cette courbe en cloche : soit le tPA traverse les CEPCs pour gagner le LCS, soit il est internalisé puis dégradé dans les CEPCs.

Notons également que le marquage ponctiforme observé est très évocateur d'un transport vésiculaire. Nous avons d'ailleurs des éléments en ce sens, puisqu'*in vivo* le signal tPA est colocalisé avec AP2, un marqueur des vésicules d'endocytose recouvertes de clathrine.

1.1.2 Quelle est la suite du cheminement du tPA ?

1.1.2.1 Le tPA rejoint le LCS en traversant les PCs.

Nous détectons du tPA dans le LCS à partir de 60 minutes après une IV chez la souris. Ces observations confortent l'idée du passage du tPA à travers les PCs vers le LCS et corroborent les résultats de Benchenane et collaborateurs, qui ont également détecté du tPA dans le LCS 60 minutes après une injection IV chez le rat. Nous constatons également que la baisse des niveaux de tPA⁵⁵⁵ dans le sang est parallèle à l'augmentation des niveaux de tPA⁵⁵⁵ dans le LCS.

1.1.2.2 Cheminement vers le parenchyme cérébral.

Quel est le devenir du tPA, une fois arrivé dans le LCS ? Est-il éliminé et si oui comment (par exemple par des macrophages périvasculaires qui d'ailleurs expriment eux aussi LRP1 ([Engelhardt & Ransohoff, 2012](#) ; [Nilsson et al., 2012](#)), ou est-il transporté jusque dans le parenchyme cérébral, *via* les cellules bordant les ventricules ou plus loin *via* le système glymphatique ([Jessen et al., 2015](#)) ?

Des résultats préliminaires en immunohistologie nous ont permis d'observer la présence de tPA⁵⁵⁵ à la fois à la bordure ventriculaire et dans le cortex, suite à une injection intraveineuse de tPA (**Figure 54**).

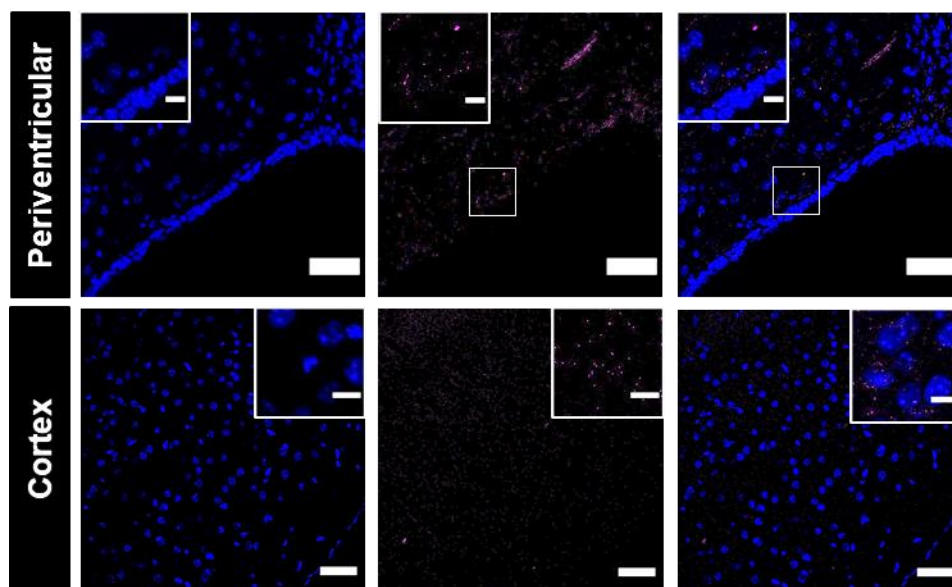


Figure 54 : Le tPA⁵⁵⁵ est retrouvé dans le cerveau après injection intraveineuse.

Photomicrographies confocales représentatives (n=5) de sections de PCs 45 minutes après une injection intraveineuse, avec marquages tPA⁵⁵⁵ (magenta) et DAPI (bleu). Barre d'échelle 50µm et 10µm dans les inserts.

Il faudrait compléter ces observations, sans exclure la possibilité que ce tPA trouvé dans le parenchyme puisse avoir aussi traversé la BHE, et répondre à une question importante : quel est l'impact fonctionnel du tPA présent dans le LCS après avoir traversé les PC ? Les quantités de tPA traversant les PCs sont-elles suffisamment élevées pour agir sur le parenchyme ? Nous avons plusieurs pistes d'exploration, qui incluent un immunomarquage c-fos, un marqueur d'activation neuronale ([Petrisko & Konat, 2021](#)), ou un traceur fluorescent pour le calcium (GCaMP), molécule de signalisation impliquée dans certains effets du tPA ([Nicole et al., 2001](#)).

1.1.3 Mécanisme du passage du tPA vasculaire par les PCs.

Nous avons par la suite voulu disséquer les mécanismes cellulaires et moléculaires impliqués dans l'internalisation du tPA par les CEPCs. Parmi les processus permettant les échanges au niveau de la BSLCS, la transcytose médiée par

des membres de la famille des récepteurs LDL est plausible. Les CEPCs expriment plusieurs membres de la famille des récepteurs LDL et notamment LRP1, LRP2 (mégaline) bien que probablement à de faibles niveaux (Chun et al., 1999) et LRP8/ApoE 2 (Strazielle & Gherzi-Egea, 2016). Or, la transcytose de tPA grâce aux membres de la famille LRP, en particulier LRP1, a été décrite dans divers types cellulaires, dont les astrocytes et les cellules endothéliales de la BHE (Fernández-Monreal et al., 2004 ; Benchenane et al., 2005).

1.1.3.1 L'internalisation du tPA est un processus actif, médié par LRP1.

Nous avons donc émis l'hypothèse qu'un membre de la famille LRP pouvait être responsable du transport du tPA dans les PCs. Aussi, nous avons soumis nos cultures de CEPCs à un co-traitement de tPA et de RAP, un inhibiteur compétitif des LRP (Jensen et al., 2009). L'internalisation du tPA est réduite de 41,22 % par RAP ; le passage de tPA dans les CEPCs implique donc un membre de la famille LRP. *In vivo*, nous avons confirmé cette implication, après une co-injection de tPA et de RAP. Nous observons une diminution de 60 % de l'internalisation du tPA. L'utilisation de la technique des ARN interférants *in vitro* confirme l'implication de LRP1, mais pas de LRP2. Alors que la localisation de LRP1 à la membrane des CEPCs reste discutée (Carro et al., 2005 ; Crissey et al., 2011), nos analyses immunohistologiques montrent une co-localisation du tPA avec LRP1 au pôle baso-latéral des CEPCs (Figure 55). L'ensemble de ces résultats valide l'implication de LRP1 dans l'entrée du tPA dans les CEPCs.

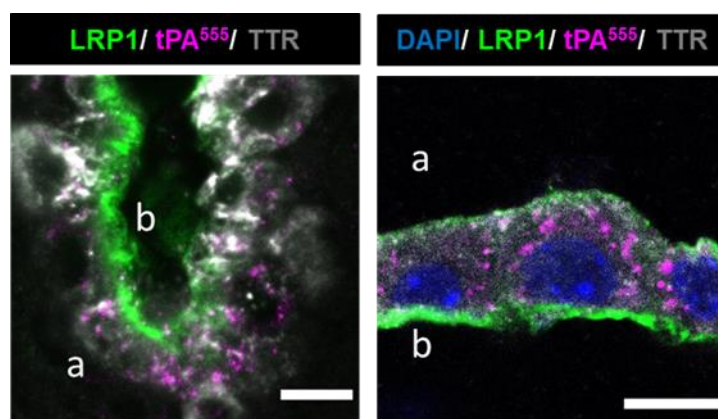


Figure 55 : Le récepteur LRP1 est exprimé sur les pôles basolatéral des CEPCs.

Photomicrographies confocales représentatives (n=5) de sections de PCs, 30 minutes après injection intraveineuse, avec marquages tPA⁵⁵⁵ (magenta), LRP1 (vert) et TTR (blanc). (a) représente le côté apical (LCS) et (b) le côté basal (vasculaire). Barre d'échelle 10µm.

Dans nos diverses expériences, nous n'observons pas une abolition totale du transport du tPA lorsqu'on bloque les LRP/LRP1. LRP/LRP1 n'est peut-être pas le seul récepteur impliqué. Une étude pilote serait en faveur de cette hypothèse, et suggère que LRP1 pourrait être le premier mécanisme impliqué (**Figure 56**). Dans l'étude principale, nous avons testé une co-incubation de RAP et de tPA pendant 15 minutes. Cette fois-ci, nous avons testé ce co-traitement des cultures de CEPCs pendant 5, 15 et 30 minutes. Sur cette cinétique, nous observons aux temps courts une diminution quasi complète de l'internalisation du tPA (80% à 5 minutes) par RAP, mais à des temps plus tardifs, RAP n'a plus que 50% d'effet. Ceci pourrait suggérer que l'internalisation de tPA par LRP1 pourrait être le premier mécanisme mis en jeu, et serait suivie par un autre processus.

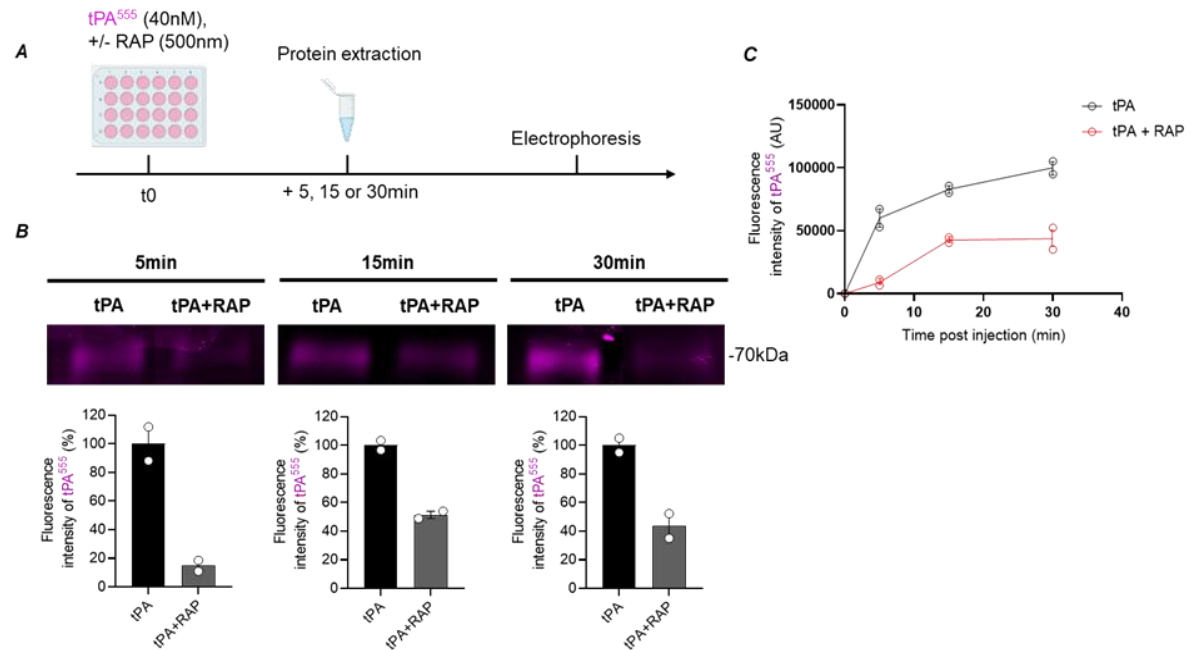


Figure 56 : Effet de RAP selon le temps sur l'internalisation du tPA in vitro.

A, protocole expérimental : des cultures primaires de CEPCs ont été exposées au tPA⁵⁵⁵ (40 nM) seul ou avec du RAP (500 nM) pendant 5, 15 et 30 min. Les protéines ont été extraites et l'intensité de fluorescence de tPA⁵⁵⁵ a été quantifiée par électrophorèse. **B**, Électrophorèse représentative et quantification correspondante (moyenne ± SEM, n=2). **C**, Les graphiques montrent la quantification des niveaux de tPA⁵⁵⁵, des extraits de monocouche de CEPC exposés pendant 5, 15 et 30 min (moyenne ± SEM, n=2) à tPA⁵⁵⁵ (40 nM) seul ou avec RAP (500 nM).

Quel(s) pourrai(en)t être le(s) autre(s) récepteur(s) acteurs de la transcytose du tPA ? D'après la littérature, l'annexine 2 apparaît comme un candidat potentiel, d'une part car elle est également exprimée par les PCs (Dreier et al., 1998), d'autre part car elle est connue pour interagir avec le domaine Finger du tPA (Siao & Tsirka, 2002) et qu'elle participe aux voies endocytotiques (Luo & Hajjar, 2013). Il serait donc pertinent de tester la contribution possible de l'annexine 2, par exemple par la technique des ARN interférants.

1.1.3.2 Le domaine Finger du tPA est nécessaire pour l'internalisation dans les CEPCs.

Pour évaluer l'implication du domaine Finger du tPA, connu pour interagir avec LRP1, dans le passage des CEPCs, nous avons développé un tPA mutant dépourvu de son domaine Finger (ΔF -tPA). Nos observations aussi bien *ex vivo* et *in vivo* ont démontré que le ΔF -tPA mutant ne peut pas être internalisé par les CEPCs, contrairement au tPA entier. De manière intéressante, la fusion du domaine Finger du tPA à la BSA permet à l'inverse l'entrée de ce mutant dans les CEPCs, contrairement à la BSA native. Ces résultats montrent la nécessité du domaine Finger du tPA pour le transport de cette protéase à travers les PCs.

1.1.3.3 De nouvelles pistes thérapeutiques ?

L'identification du rôle prépondérant du domaine Finger du tPA dans le transport à travers les CEPCs ouvre d'intéressantes perspectives.

Par exemple, dans le cas d'un AVC ischémique, l'injection exogène d'un tPA délété du domaine Finger pourrait augmenter sa disponibilité dans le sang afin d'accroître son activité fibrinolytique, et également limiter ses effets néfastes sur le SNC. A l'inverse on pourrait utiliser ce domaine Finger pour contourner les barrières cérébrales. Ces barrières, par nature, empêchent le passage de nombreux facteurs circulants. Le bénéfice de divers médicaments est donc limité non par manque d'efficacité, mais plutôt par l'existence même de ces barrières thérapeutiques. L'injection directe des agents thérapeutiques dans le parenchyme ou le LCS pourrait palier les limites des administrations intraveineuses, mais ces techniques seraient trop invasives, avec un rapport bénéfice/risque trop élevé, au moins pour des traitements aigus (Fowler et al., 2020). Diverses approches alternatives, notamment de vectorisation des médicaments sont en cours (Kouhi et al., 2021 ; Naseri Kouzehgarani et al., 2022). Au vu de nos

résultats, le ciblage de la transcytose médiée par les récepteurs de la BHE ou de la BSLCS serait prometteur, comme par exemple, les travaux de l'équipe de Pardridge, qui ciblent le récepteur transferrine pour faire rentrer des molécules bénéfiques comme le BDNF (Yhang & Pardridge, 2001 ; Pardridge, 2020). En ce qui nous concerne, nous prévoyons de greffer le domaine Finger du tPA à divers candidats thérapeutiques, dont nous testerons l'efficacité dans les modèles d'AVC ischémiques.

1.1.4 Autres éléments de discussion et perspectives

Notons que dans nos cultures, les cellules épithéliales ne sont pas polarisées, et il serait intéressant de confirmer nos découvertes en développant un modèle de BSLCS à 2 compartiments, permettant de distinguer les voies d'efflux/influx à travers les CEPCs (Falasca et al., 2011). De nouvelles expériences nous ont permis de montrer l'existence d'une voie d'efflux : en injectant du tPA⁵⁵⁵ non pas dans le sang mais dans le LCS, par infusion intra-cérébroventriculaire (ICV), on peut effectivement détecter du tPA⁵⁵⁵ dans les CEPCs (**Figure 57**). Notre hypothèse est que le sens de migration à travers les PCs, est dicté par le gradient de concentration du tPA dans le LCS et dans le sang.

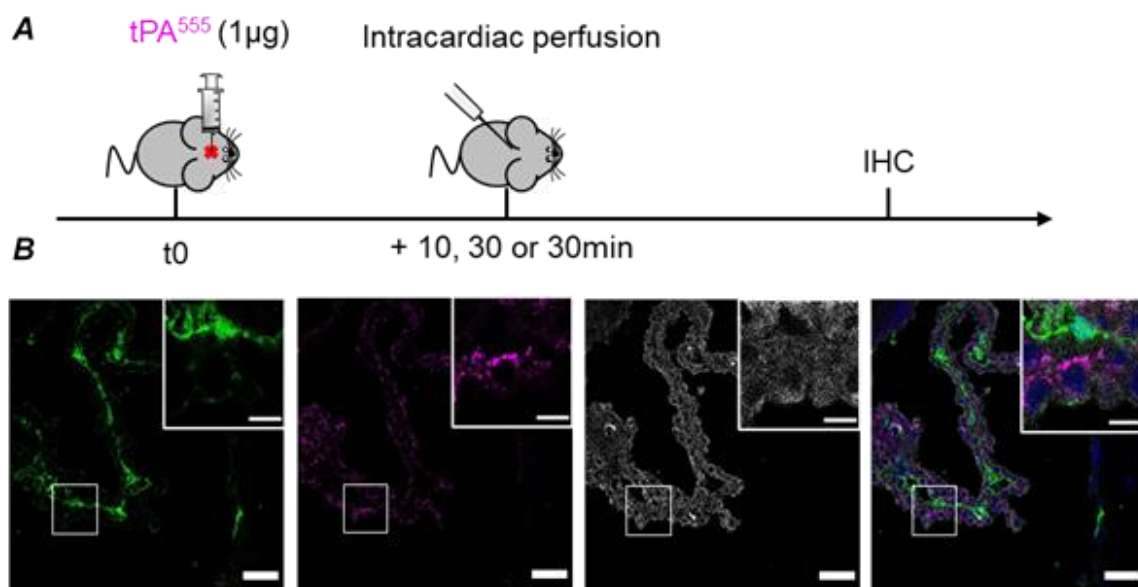


Figure 57 : Le tPA est internalisé par les CEPCs après injection intraventriculaire.

A, Design expérimentale : les souris ont reçu une injection intra-cérébroventriculaire d'1 μl (0,9 mg/ml) de tPA⁵⁵⁵, les cerveaux ont été isolés 10, 30 ou 60 minutes plus tard pour l'immunohistochimie. **B**, Photomicrographies confocales représentatives (n=4) de sections de PCs, avec marquages tPA⁵⁵⁵ (magenta), LRP1 (vert), TTR (blanc) et DAPI (bleu) ; barre d'échelle 50 μm et 10 μm dans les inserts.

Pour la suite du travail, nous avons donc étudié l'impact du tPA circulant dans le SNC en conditions physiopathologiques. Ainsi, un point fort de ce travail a consisté à développer un modèle de parabiose entre des souris sauvages (tPA^{WT}) et/ou des souris totalement déficientes en tPA (tPA^{Null}). Notre hypothèse était qu'en partageant leur système circulatoire, la souris tPA^{WT} pouvait palier la déficience en tPA de la souris tPA^{Null} dans le sang, sans affecter les autres compartiments.

Comme nous l'avons décrit dans la partie 3 des résultats, la parabiose est une union chirurgicale de deux organismes permettant le partage de la circulation sanguine, grâce à la formation de micro-vaisseaux au niveau du site de jonction ([Kamran et al., 2013](#) ; [Yang et al., 2021](#)).

La mise en place de ce modèle nous a d’abord demandé d’adapter les postes de travail et d’assurer que les périodes pré- intra- et post-opératoires soient les plus éthiques pour les animaux. Puis, diverses étapes de validation du chimérisme ont été préalables aux études fonctionnelles.

1.2 Le tPA vasculaire est impliqué dans le CNV

Le CNV est un mécanisme majeur dans le bon fonctionnement cérébral, afin de garantir un apport énergétique *via* l’augmentation du DSC local lors d’une activité neuronale. Les mécanismes sous-jacents au CNV restent, sur certains aspects, méconnus, notamment en ce qui concerne l’effet du tPA endogène, avec une hypothèse d’action parenchymateuse ([Anfray et al., 2020](#)) et une autre d’action luminale ([Park et al., 2008](#)). Afin d’étayer les hypothèses liant tPA endogène et tonus vasculaire, nous nous sommes donc orientés vers un modèle d’étude robuste et bien caractérisé : la stimulation sensorielle des vibrisses chez la souris ([Petersen, 2007](#) ; **Figure 46**).

Dans ce modèle, nous avons choisi un suivi par imagerie par contraste de *speckle* laser, qui utilise le décalage de fréquence (produit par l’effet Doppler) pour mesurer la vitesse du flux sanguin ([Briers, 2001](#)). Cette modalité permet de mesurer le DSC superficiel directement à travers le crâne de la souris. Même si l’amincissement du crâne permet de recueillir un signal plus intense ([Anfray et al., 2020](#)), nous avons décidé de le laisser intact, afin de préserver l’intégrité du cerveau et la pression intracrânienne. Par ailleurs, cette modalité d’imagerie était un bon compromis pour l’étude des parabiontes, car moins encombrante que l’appareil d’imagerie par ultrasons fonctionnels (fUS ; [Hingot et al., 2020](#)), également disponible au laboratoire.

En ce qui concerne l’anesthésie, nous avons privilégié l’utilisation d’un agoniste des récepteurs α -2 adrénergiques, la médétomidine. Ce sédatif est particulièrement adapté à notre problématique, car il exerce peu d’effets vasculaires ([Sinclair, 2003](#) ; [Weber et](#)

al., 2006 ; Pawela et al., 2009). Certaines études sur le CNV, utilisent l'association kétamine-xylazine (Wright et al., 2017), seulement l'effet inhibiteur de la kétamine sur les récepteurs NMDA est limitant. La circulation croisée des parabiontes a nécessité d'adapter le mode d'admission de la médétomidine : nous nous sommes affranchis de l'infusion continue pour ne garder que le bolus initial dans chaque partenaire.

Pour stabiliser au mieux les paramètres physiologiques de nos animaux lors de l'étude du CNV, il aurait fallu les placer sous ventilation mécanique (Coburn, 2020), mais à ce jour, nous n'avons pas réussi à intuber les 2 partenaires d'une parabiose, pour des limites techniques et d'encombrement. Ceci dit, nous avons mesuré les paramètres physiologiques de nos animaux, et nous n'avons pas observé de modifications majeures liées à la parabiose

Ayant discuté quelques aspects méthodologiques, nous allons maintenant détailler les résultats de nos travaux.

1.2.1 Le tPA circulant contrôle-t-il le CNV et si oui comment ?

1.2.1.1 Le couple tPA/PAI-1 endogène contrôle l'hyperémie fonctionnelle en réponse à la stimulation des vibrisses.

Dans un premier temps, nous avons confirmé que, comme précédemment observé chez les souris tPA^{KO} (Anfray et al., 2020), la nouvelle souche de souris déficientes en tPA développée par le laboratoire (tPA^{Null}) présente un déficit de la réponse hémodynamique par rapport aux souris tPA^{WT}. En parallèle, nous avons étudié le CNV sur des souris déficientes en PAI-1, le principal inhibiteur du tPA dans la circulation sanguine. A l'inverse de ce que nous observons chez les souris tPA^{Null}, les souris PAI-1^{KO} montrent une augmentation du CNV plus importante que les souris PAI-1^{WT}. Ces résultats permettent de confirmer que le tPA, et plus précisément la

balance endogène entre les niveaux endogènes de tPA et de PAI-1, contrôle l'hyperémie fonctionnelle.

1.2.1.2 Le tPA endogène circulant favorise l'hyperémie fonctionnelle.

Puisque les souris entièrement déficientes en tPA ne permettent pas de discriminer les effets du tPA vasculaire *versus* parenchymateux, nous avons développé une parabiose entre une souris tPA^{WT} (donneuse) et une souris tPA^{Null} (receveuse), afin de restaurer les taux de tPA circulants chez la tPA^{Null}.

Chez les parabiontes homotypiques, le phénotype observé est identique à celui observé chez des souris sans parabiose : un déficit pour les couples déficients (tPA^{Null}/tPA^{Null}) par rapport aux couples sauvages (tPA^{WT}/tPA^{WT}). Le déficit de la souris déficiente est corrigé quand elle est couplée à une souris sauvage, pour devenir même identique à l'hyperémie fonctionnelle des souris tPA^{WT}. Ces observations montrent que le partage de tPA circulant à partir de la souris donneuse suffit pour corriger le déficit de la souris tPA^{Null}.

Ceci pourrait être en désaccord avec l'hypothèse d'une libération localisée par les cellules endothéliales. Mais une explication possible, non exclusive, serait que, le tPA circulant provenant de la souris tPA^{WT} lève le tonus inhibiteur exercé par les récepteurs NMDA, décrit plus loin.

1.2.1.3 Les récepteurs NMDA endothéliaux réduisent l'hyperémie fonctionnelle.

Nous nous sommes basés encore une fois sur l'étude d'Anfray et collaborateurs, montrant un effet du tPA vasculaire par son interaction avec les récepteurs NMDA endothéliaux au niveau artériel/artériolaire (Anfray et al., 2020).

Nous avons utilisé une souche de souris présentant une délétion conditionnelle de la sous-unité GluN1 des récepteurs NMDA, spécifiquement sur les cellules endothéliales, en croisant une souris « VE-Cadherin-Cre » et une souris « Grin-1-loxP ». Les souris déficientes pour GluN1, GluN1^{KO} présentent une augmentation de l'hyperémie par rapport aux souris GluN1^{WT}. Ces résultats suggèrent que les récepteurs NMDA exercent un tonus vasoconstricteur en conditions basales.

L'injection intra-veineuse de tPA chez les souris GluN1^{KO} ne modifie pas le CNV, comparativement aux souris GluN1^{KO} sans injection. En revanche, cette injection de tPA augmente l'hyperémie fonctionnelle chez les souris GluN1^{WT}. Le tPA exogène peut donc moduler l'hyperémie *via* son interaction avec la sous-unité GluN1 des récepteurs NMDA, et l'effet vasoconstricteur du récepteur NMDA en conditions basales, serait inhibé par le tPA.

1.2.2 Quelles sont les sources de tPA circulant impliquées dans le CNV ?

1.2.2.1 Les cellules endothéliales produisent, stockent et libèrent du tPA dans la circulation, suite à un stimulus, notamment *via* les récepteurs à la Bradykinine B2.

Comme décrit dans l'introduction, le tPA est principalement présent dans le compartiment vasculaire, synthétisé et libéré par les cellules endothéliales de façon continue ou suite à certains stimuli. Dans la circulation, il est très rapidement inhibé par son principal inhibiteur, PAI-1, présent en grande quantité. Mais les souris déficientes en tPA ont tout de même un CNV moins important que les souris sauvages (Park et al., 2008). Deux hypothèses ont tenté d'expliquer cet effet du tPA sur le CNV : l'une repose sur une origine neuronale du tPA et une action côté parenchyme (Park et

al., 2020), l'autre sur une action intraluminale, par la libération de tPA par les cellules endothéliales à proximité de la zone activée (Anfray et al., 2020).

Afin de savoir quelle est la contribution du tPA endothélial, nous avons généré une souche de souris transgéniques présentant une délétion conditionnelle du tPA dans les cellules endothéliales en croisant des souris « VE-Cadherin-Cre » et des souris « tPA-loxP » (développées au laboratoire). Ce knockout conditionnel diminue la réponse vasculaire à la stimulation des vibrisses, par rapport aux souris WT. Ces résultats montrent la contribution directe du tPA produit par les cellules endothéliales dans le CNV.

D'autre part, nous montrons l'implication de la Bradydine (BK) dans l'effet du tPA sur le CNV. La BK est un agent vasodilatateur capable donc de réguler le flux sanguin local (Nokkari et al., 2018). Cette kinine agit sur deux types de récepteurs, les récepteurs B1 et B2 (Leeb-Lundberg et al., 2005) : B2 est exprimé de manière constitutive à la surface des cellules endothéliales et musculaires lisses (Raidoo et al., 1997), et B1 est exprimé en cas de lésions ou d'inflammation (da Costa et al., 2014 ; Pruneau et al., 2010). De plus, nous savons que la BK peut induire la libération de tPA dans la circulation (Rahman et al., 2014). Pour déterminer la potentielle implication de la BK dans l'effet du tPA libéré par les cellules endothéliales, nous avons injecté différentes doses d'un agoniste des récepteurs B2 (Drapeau et al., 1988), à des souris tPA^{Null} ou tPA^{WT}. Cette injection a augmenté l'hyperémie fonctionnelle chez les souris tPA^{Null} et tPA^{WT}. Cette augmentation est obtenue à la dose la plus faible d'agoniste (7 µg/kg) chez les souris tPA^{WT}, mais uniquement à la plus forte dose (30 µg/kg) chez les souris tPA^{Null}. Et pour cause, les tPA^{Null} ne possédant pas de tPA, ne présentent pas une augmentation aussi importante de la réponse vasculaire, l'effet de l'agoniste serait donc lié à une autre cible, qui pourrait être le NO produit par l'activation des récepteurs B2 (Mathis et al., 1996). Chez les tPA^{WT} la même injection, induit une production et une libération de tPA circulant *via* l'activation des récepteurs B2. Ces résultats montrent que le couple B2/tPA favorise le CNV.

1.2.2.2 La contribution du foie à l'effet du tPA sur le CNV.

Récemment, il a été suggéré que l'endothélium vasculaire ne serait pas la seule source de tPA circulant, puisque près de la moitié du tPA pourrait venir des hépatocytes (Zheng et al., 2019). Nous nous sommes donc intéressés à l'implication du foie dans la libération de tPA vasculaire et son implication dans la modulation du CNV.

Nous avons procédé à une hépatectomie partielle (70% du foie total) en ligaturant la base du lobe latéral gauche, et les lobes médians droit et gauche (Hori et al., 2012), chez des souris tPA^{Null} et tPA^{WT}. Suite à cette hépatectomie, les souris tPA^{WT} ont une diminution significative du CNV comparativement aux souris tPA^{WT} non ligaturées. Aucune différence n'est observée chez les tPA^{Null}. Ceci suggère que du tPA circulant, issu du foie, module le CNV. Le tPA circulant est normalement inhibé très rapidement par PAI-1, donc on peut se demander si le complexe tPA/PAI-1 peut influencer le CNV. En théorie, puisque PAI-1 ne bloque pas le domaine K2 du tPA (Kaneko et al., 1991), le tPA pourrait se lier au récepteur NMDA, dont on montre l'implication de notre étude. De plus, il est probable que le foie libère une quantité importante de tPA dans la circulation sanguine, lui permettant ainsi d'atteindre le cerveau.

Nous avons voulu investiguer la potentielle implication du tPA qui serait libéré par les hépatocytes (Zheng et al., 2019) dans le CNV. Nous avons eu recours à un modèle de transfection hydrodynamique (Marcos Contreras et al., 2016) afin de cibler une partie des hépatocytes *via* l'utilisation d'un plasmide pLIVE-Cre-GFP chez des souris VECad-Cre^{ΔtPA}. Nous n'avons pas observé de modification du CNV chez les animaux affectés par cette transfection. Il est donc probable que les hépatocytes ne soient en fait pas une source de tPA. Des analyses supplémentaires en immunohistochimie semblent confirmer ceci (**Figure 58**)

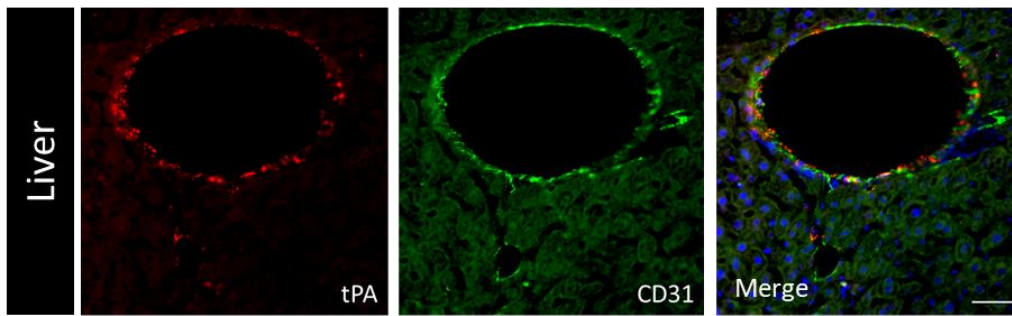


Figure 58 : Le tPA est présent dans les cellules endothéliales du foie, mais pas dans les hépatocytes.

Photomicrographies représentatives (n=4) de coupe de foie, 48 heures après transfection hydrodynamique d'un plasmide pLIVE-Cre-GFP, ciblant les hépatocytes. Le marquage pour le tPA (rouge) montre une colocalisation avec le marquage des cellules endothéliales (CD31 ; vert). En revanche la Green Fluorescent Protein (GFP) du plasmide, ne montre pas de tPA dans d'autres types cellulaires. DAPI (bleu), barre d'échelle 50µm.

En conclusion, nous démontrons que le tPA issu du foie est impliqué dans la modulation du CNV dans ce modèle de stimulation des vibrisses. Ce tPA serait sécrété par les cellules endothéliales hépatiques plutôt que les hépatocytes, mais ces données restent à confirmer. Une question demeure, comment le tPA hépatique peut agir à une telle distance sur une réponse qui est aussi rapide entre la stimulation des vibrisses et l'augmentation du DSC ?

1.2.3 Le tPA vasculaire dans la modulation du CNV, en conditions pathologiques.

On connaît relativement bien le rôle du tPA parenchymateux dans le contexte de la maladie d'Alzheimer. Par sa capacité à cliver le plasminogène en plasmine, il favorise la dégradation des peptides A β (Park et al., 2020). L'expression du tPA parenchymateux diminue avec l'âge (Obiang et al., 2011), et son inhibition par PAI-1 augmente dans la circulation (Cortes-Canteli & Iadecola, 2020), entraînant ainsi une

diminution de la dégradation de l'A β qui pourrait donc limiter la réactivité vasculaire en cas d'angiopathie amyloïde ([Cacquevel et al., 2007](#)).

Dans notre étude, nous avons clairement montré que le tPA circulant, à des niveaux physiologiques, contrôle le CNV. Récemment, Tomadesso et collaborateurs (2022) ont montré que les taux de tPA augmentent dans le plasma avec le vieillissement, mais pas lors de la maladie d'Alzheimer ([Tomadesso et al., 2022](#)). Cette augmentation liée à l'âge serait-elle une tentative pour limiter le déficit du CNV décrite chez les sujets âgés ([Stefanova et al., 2013](#) ; [Fabiani et al., 2014](#) ; [Toth et al., 2014](#)) ? Pourquoi on ne l'observe pas chez les patients atteints de la maladie d'Alzheimer, alors qu'eux aussi ont un déficit du CNV ([Carbonell et al., 2016](#) ; [Iadecola, 2017](#)) ?

Ces mêmes questions pourraient se poser dans le cadre des AVC ischémiques, à la suite desquels la réactivité des vaisseaux est altérée, l'autorégulation est diminuée et la réponse vasculaire à une stimulation est réduite ([Girouard & Iadecola, 2006](#)).

Dans l'ensemble, il serait donc intéressant de comprendre comment le tPA vasculaire et comment le tPA parenchymateux contrôlent la réactivité vasculaire lors du vieillissement normal ou pathologique. Ces connaissances pourraient contribuer à limiter les déficits fonctionnels/cognitifs dans ces situations.

1.3 Le tPA vasculaire est bénéfique dans un modèle d'AVC thromboembolique

Dans la dernière partie de ce travail, nous nous sommes penchés sur l'impact spécifique du tPA circulant endogène dans le cadre d'un AVC ischémique. Nous avons basé notre travail sur la littérature clinique et préclinique qui décrit des effets bénéfiques ou délétères du tPA lors des AVC, selon la cible, selon la cinétique etc. Par exemple, alors que le tPA permet la lyse d'un thrombus et la restauration de la

circulation sanguine (Collen & Lijnen, 1991), il favorise la perméabilisation de la BHE et l'inflammation, et aggrave les lésions neuronales (Nicole et al., 2001 ; Yepes et al., 2003 ; Benchenane et al., 2005b ; López-Atalaya et al., 2007 ; Zhang et al., 2009 ; Macrez et al., 2011).

Avec une vingtaine d'années d'expertise dans le domaine, le laboratoire cherche à élucider les mécanismes d'actions du tPA pour améliorer son utilisation en clinique. Ceci repose notamment sur l'utilisation de techniques/outils (IRM) et de modèles (diverses étiologies) les plus translationnels possibles. Dans la présente étude, je me suis donc intéressé à l'impact du tPA vasculaire endogène, et j'ai utilisé un large éventail d'outils génétiques (souris totalement déficientes en tPA (tPA^{Null}) ou sans tPA endothélial (VECad-Cre^{ΔtPA}), ou sans tPA circulant (parabiose hétérotypique tPA^{WT}/tPA^{Null}) ou technologiques (IRM avec utilisation de nombreuses modalités d'évaluation).

1.3.1 L'action du tPA vasculaire sur un caillot riche en fibrine *versus* riche en plaquettes

En clinique, le rtPA demeure le seul traitement pharmacologique des AVC ischémiques. Mais il offre un faible taux de recanalisation (environ 30% ; Bhatia et al., 2010), notamment car il n'est pas efficace sur tous les thrombi, selon leur localisation, leur taille et bien sûr, leur composition. En particulier, lorsque les thrombi sont riches en plaquettes, ils sont résistants au tPA (Kim et al., 2006). Les thrombi artériels proviennent souvent de lésions athéroscléreuses, néanmoins, leur composition varie dans le temps en phase aiguë (dans les 3 premières heures), plutôt plaquettaire puis s'enrichit en fibrine (Liebeskind et al., 2011 ; Jolugbo & Ariëns, 2021).

Plusieurs modèles d'étude de l'AVC ischémique ont été développés chez les rongeurs (Macrae, 2011), mais la plupart, en particulier chez la souris, ne reposent pas sur un caillot occlusif, et peu d'études proposent d'aborder différentes étiologies.

Dans notre étude, nous avons opté pour un modèle d'AVC thromboembolique, développé au laboratoire (Orset et al., 2007). Dans ce modèle, nous induisons *in situ* la formation d'un caillot par injection locale (embranchement de l'artère cérébrale moyenne) de thrombine, un agent pro-thrombotique. Le caillot formé est riche en fibrine, donc sensible au tPA, qui plus est avec une fenêtre thérapeutique comme en clinique (Orset et al., 2007 ; Orset et al., 2016). Nous avons également utilisé un modèle d'AVC thrombotique, initié par l'application de FeCl₃ sur l'endothélium de l'ACM, générant la formation d'un caillot riche en plaquettes et résistant au tPA (Karatas et al., 2011 ; Tomkins et al., 2015). Ce modèle a permis au laboratoire de démontrer le potentiel antithrombotique de la N-Acétyl-Cysteine (NAC ; Martinez de Lizarrondo et al., 2017).

1.3.2 Le tPA vasculaire endogène permet une recanalisation artérielle progressive dans le modèle thrombo-embolique d'AVC

A la phase aiguë du modèle (40 minutes suivant l'induction de l'ischémie), la débimétrie par Doppler *speckle*, montre une diminution de la perfusion hémisphérique de près de 60%, pour l'ensemble de nos souches et pour nos deux modèles d'ischémie. De même, nous détectons un gradient de chute de perfusion dans le territoire ischémié, nous permettant de délimiter 3 zones (péri)lésionnelles : le cœur, la pénombre et l'oligémie. L'absence de reperfusion spontanée à ce stade précoce laisse penser qu'au stade (hyper)aigu, le tPA endogène n'est pas capable de s'opposer au caillot, car libéré en quantité insuffisante et/ou car inactif (présence d'inhibiteurs, manque de formation de plasmine ?). Pourtant, les cellules endothéliales sont connues pour exprimer et

libérer rapidement du tPA dans la première heure après un AVC ischémique (Zlokovic et al., 2005 ; Zhu et al., 2019) et une augmentation de l'activité endogène du tPA est observée après une courte période d'ischémie (Yepes et al., 2003 ; Echeverry et al., 2010 ; Sashindranath et al., 2011), spécifiquement dans l'hémisphère ischémié (Wang et al., 1998).

Quoiqu'il en soit, à un stade précoce, le tPA endogène ne suffit pas, et explique pourquoi les approches pharmacologiques précoces et adaptées à la nature du caillot, elles, sont efficaces : diverses études ont montré une reperfusion du territoire ischémié, dans les 40 minutes suivant l'occlusion après thrombolyse au rtPA, dans un modèle thrombine (Orset et al., 2007 ; Hingot et al., 2020 ; van Moorsel et al., 2022) ou à la NAC dans le modèle FeCl₃ (Martinez de Lizarrondo et al., 2017).

Dans le modèle thrombine sans parabiose, nous avons aussi évalué la recanalisation à 24 heures en utilisant l'angiographie. Nous n'avons malheureusement pas pu effectuer cette analyse sur les parabioses. En effet, l'imagerie des 2 parabiontes demande la mise en place d'un système de berceau qui n'empêche pas assez de limiter les mouvements lors de la séquence angiographie.

L'angiographie montre que 60% des souris tPA^{Null} ne présentent aucune recanalisation spontanée à 24 heures, alors que 90% des souris contrôles présentent une recanalisation totale ou partielle de l'ACM. De plus, les souris VECad-Cre^{ΔtPA} présentent un stade intermédiaire, puisqu'en absence de tPA endothélial, 40% des animaux ne recanalisent pas à 24h, soit un taux de recanalisation plus important que pour les animaux tPA^{Null}. Ces résultats démontrent que les souris mettent en place des systèmes pour permettre la re-circulation du sang dans l'artère occluse, dont une synthèse endogène de tPA à partir des cellules endothéliales.

En complément, la quantification du DSC a montré que malgré une recanalisation artérielle totale ou partielle, la zone ischémiée reste hypoperfusée pour l'ensemble des animaux, mais avec un gradient de sévérité pour les souris déficientes.

L'hypoperfusion tissulaire hémisphérique était également plus sévère chez les animaux dont le tPA est délété dans l'organisme entier ou dans les cellules endothéliales. Le partage de la circulation par parabiose hétérochronique (tPA^{Null}/tPA^{WT}) n'a pas permis la reperfusion spontanée chez le partenaire tPA^{Null}.

Il est très probable que le mécanisme responsable de l'effet bénéfique du tPA circulant observé dans ce modèle d'AVC induit par la thrombine soit la promotion de la reperfusion par la lyse du caillot/la prévention de la micro-thrombose par le tPA endogène. Nos observations concordent avec les résultats obtenus lors d'une thrombolyse par rtPA ou sc-tPA dans le même modèle, induisant une reperfusion cérébrale importante, notamment en promouvant la recanalisation artérielle, permettant de réduire la taille des lésions ischémiques ([Orset et al., 2007](#) ; [Hingot, Brodin et al., 2021](#)). Cette thrombolyse exogène étant bien plus efficace que l'effet du tPA endogène seul.

Dans le cas du modèle FeCl₃, aucun animal, quel que soit son groupe, n'a montré de reperfusion spontanée dans la zone lésée, contrairement aux résultats du modèle thrombine. Ces données montrent que dans le cas d'un caillot riche en plaquettes, le tPA endogène n'a aucun impact, ni dans le sang ni dans le parenchyme. Dans ce sens, un traitement par la NAC induit une recanalisation artérielle mais ne peut pas empêcher la re-thrombose, car elle déstabilise la partie externe du thrombus constituée de plaquettes liés par le FWV, mais pas le noyau. Par conséquent, seule la co-administration avec un inhibiteur de GpIIb/IIIa conduit à une recanalisation complète ([Martinez de Lizarrondo et al., 2017](#)). De plus, la NAC ne montre pas d'effet bénéfique dans un modèle permanent d'ischémie cérébrale ([Shahripour et al., 2014](#)).

1.3.3 Le tPA vasculaire endogène réduit la taille des lésions ischémiques

L'évaluation de la taille de l'œdème cérébral a montré que le volume d'infarctus était plus important chez les souris tPA^{NULL} et VECad-Cre^{ΔtPA}, comparativement à leurs contrôles. Ceci est en accord avec une recanalisation et une reperfusion imparfaite. Les mesures sur les parabiontes homotypiques ont montré les mêmes différences. En revanche chez des parabiontes hétérotypiques, le parabionte tPA^{WT} protège en partie le tPA^{NULL}.

Prises ensembles, ces données suggèrent fortement que dans ce modèle thrombine, le tPA vasculaire endogène est un acteur clé dans l'évolution des dommages causés par l'AVC. Une explication des écarts observés peut être que le tPA est bénéfique *via* son activité thrombolytique, dans des modèles d'AVC avec thrombose cérébrale secondaire ou thromboembolique (Tabrizi et al., 1999 ; Jiang et al., 2000 ; Orset et al., 2007). Dans un modèle de lésion vasculaire photochimique, le devenir des souris tPA^{KO} dépendait de la gravité de la lésion, suggérant que le tPA endogène protège contre les lésions cérébrales en cas d'occlusion transitoire, mais que cet effet protecteur s'inverse en cas d'occlusion persistante (Nagai et al., 2002). De plus, la taille des lésions est associée au nombre de microthrombi et à l'intensité des dommages causés par l'occlusion (Kawai et al., 1996 ; Kawano et al., 1998 ; Takamatsu et al., 2000). Ainsi, Dans des modèles d'occlusion imitant la recanalisation suivie d'une re-thrombose (Kawano et al., 1998), le tPA endogène réduit la taille de la lésion en dégradant le microthrombi dans les cas de lésions légères. Cette activité fibrinolytique spontanée est réduite chez des tPA^{KO} (Carmeliet et al., 1994). En revanche, dans un modèle filament transitoire, les souris tPA^{KO} ont des infarctus plus petits, ce qui suggère que le tPA peut avoir des effets néfastes après une ischémie cérébrale (Wang et al., 1998 ; Liberatore et al., 2003 ; Kilic et al., 2005), notamment sur la BHE, et la viabilité

neuronale (Nicole et al., 2001 ; Lebeurrier et al., 2005 ; Liot et al., 2006). Mais des résultats opposés ont été observés chez des tPA^{KO} (Tabrizi et al., 1999).

De plus, nos données montrent que dans un modèle FeCl₃ le tPA endogène n'a aucun impact, ni dans le compartiment vasculaire, ni parenchymateux. En effet, la taille des lésions est similaire dans les quatre groupes, ceci étant probablement dû au fait que les animaux n'ont montré aucune reperfusion spontanée.

1.3.4 Perspectives : la nécessité d'approches complémentaires !

1.3.4.1 Qu'en est-il des déficits neurologiques ?

Il est important de compléter notre étude par l'évaluation des capacités motrices et sensorielles des souris après l'ischémie afin de caractériser plus précisément les bénéfices et effets néfastes du tPA endogène sur la récupération fonctionnelle. Le « *Gripp test* » apparaît maintenant comme un test de référence pour évaluer les tâches liées au cortex somatosensoriel où la lésion ischémique est observée. (Gao et al., 2008 ; Takeshita et al., 2017 ; Anfray et al., 2021). Dans le cas des parabioses, nous n'avons procédé à aucune étude comportementale, avec l'argument que la parabiose induit une atrophie musculaire sur la patte avant des souris (du côté de la jonction) et donc ne permettrait pas une mesure correcte. Néanmoins des études montrent qu'il est possible d'évaluer certaines fonctions comportementales chez des parabiontes (Magi et al., 1965). Dans notre cas, il serait intéressant de tester une approche optimisée du *gripp test*, pour évaluer la récupération fonctionnelle de la souris ischémisée. Nous pourrions tenter l'optimisation de la mesure sur les deux pattes, notamment *via* l'impression 3D de pièces supplémentaires à apporter à l'appareil initial. Nous pourrions même avoir recours à des systèmes de « Catwalk® » ou de « Rotarod® », et les optimiser afin de mesurer des paramètres complémentaires (Balkaya et al., 2013).

1.3.4.2 Quid de la composante parenchymateuse ?

De manière quelque peu surprenante, nous n'apportons que peu d'éléments sur le versant parenchymateux.

Le premier impératif est de démontrer que notre postulat est vrai, en ce qui concerne les parabioses : nous devons démontrer que le tPA issu de la souris tPA^{WT} dans une parabiose hétérotypique ramène les niveaux de tPA circulants de la souris tPA^{NULL} à un niveau normal, sans changer le niveau de tPA dans le parenchyme. Il est d'autant plus important de vérifier ce point, que Benchenane et collaborateurs, et notre étude actuelle, montrent que le tPA circulant peut franchir les barrières et entrer dans le parenchyme cérébral.

Des investigations préliminaires ont confirmé en immunohistologie l'absence de tPA chez les souris tPA^{Null} en parabiose hétérotypique. Ceci reste néanmoins à confirmer par des dosages de tPA en western blot et/ou ELISA.

Dans notre modèle d'AVC induit par le FeCl₃, le tPA endogène, qu'il soit circulant ou parenchymateux, ne semble avoir aucun impact sur le devenir du tissu cérébral. Pourtant, la littérature suggère fortement une implication du tPA parenchymateux aux dommages ischémiques, que ce soit dans un sens neurotoxique ou neuroprotecteur (Tsirka et al., 1996 ; Fernández-Monreal et al., 2004 ; Liot et al., 2006 ; Zhang et al., 2009). Dans notre modèle d'AVC induit par la thrombine, malgré une hypoperfusion résiduelle identique, les souris tPA^{WT} et tPA^{Null} en parabiose hétérotypique présentent des différences de volume d'infarctus, la tPA^{WT} présentant une lésion plus petite que la tPA^{Null}. S'agit-il d'un impact direct du tPA endogène au parenchyme ? Si cela s'avère être le cas, il serait donc ici neuroprotecteur. Il nous faudrait effectuer une inhibition du tPA directement dans le parenchyme pour cibler spécifiquement cette composante : appliquer un de ses inhibiteurs comme PAI-1 ou NSP, ou bloquer son interaction avec le récepteur NMDA par un anticorps en cours de développement au laboratoire, le Glunomab®

Dans l'ensemble, ce travail de thèse a permis d'apporter de nouvelles connaissances sur la contribution du tPA vasculaire à la physiopathologie cérébrale. Ces connaissances pourraient ainsi aider à développer des stratégies thérapeutiques, optimisées, pour les patients atteints d'AVC, et pourquoi pas d'autres pathologies.

AUTRES TRAVAUX

Article 4

Bumetanide lowers acute hydrocephalus in a rat model of subarachnoid hemorrhage

Thomas Metayer^{1,2}, MD, MSc; Orset Cyrille², PhD; Carine Ali², PhD; Jonathane Furon², MSc; Nicolas Szabla², MD, MSc; Evelyne Emery^{1,2,3}, MD, PhD; Denis Vivien^{2,3,4}, PhD, Thomas Gaberel^{1,2,3,4}, MD, PhD.

¹Department of Neurosurgery, University Hospital of Caen, Caen, F-14000, France

²Normandie Univ, UNICAEN, INSERM, U1237, PhIND "Physiopathology and Imaging of Neurological Disorders", Institut Blood and Brain @ Caen-Normandie, Cyceron, 14000 Caen, France

³Medical School, University of Caen Normandy, Caen, F-14000, France

⁴Department of Clinical Research, Caen-Normandie University Hospital, CHU, 14000, Caen, France

CORRESPONDING AUTHOR

Dr. Thomas Metayer

Service de Neurochirurgie, CHU de Caen, Avenue de la Côte de Nacre, F-14000 CAEN, France

E-mail address: thomas.metayer@neurochirurgie.fr

Telephone: +33 02 31 06 46 03



Bumetanide lowers acute hydrocephalus in a rat model of subarachnoid hemorrhage

Thomas Metayer^{1,2} · Cyrille Orset² · Carine Ali² · Jonathane Furon² · Nicolas Szabla² · Evelyne Emery^{1,2,3} · Denis Vivien^{2,3,4} · Thomas Gaberel^{1,2,3}

Received: 3 May 2021 / Accepted: 13 December 2021

© The Author(s), under exclusive licence to Springer-Verlag GmbH Austria, part of Springer Nature 2021

Abstract

Background Subarachnoid hemorrhage (SAH) can lead to acute hydrocephalus (AH). AH pathophysiology is classically attributed to an obstruction of the arachnoid granulations by blood. Recent findings in rodents suggest that after intraventricular hemorrhage, AH is related to cerebrospinal fluid (CSF) hypersecretion by the choroid plexus (CP), as it can be reduced by intracerebroventricular (ICV) injection of bumetanide.

Objective Here, we investigated if and how CSF hypersecretion and/or CSF outflow disorders contribute to post-SAH hydrocephalus.

Methods Ninety-four Wistar rats were used. SAH was induced by the endovascular perforation technique. The presence of AH was confirmed by magnetic resonance imaging (MRI), and rats with AH were randomly assigned to 4 groups: control group, superior sagittal sinus (SSS) thrombosis to block CSF reabsorption, ICV injection of saline, and ICV injection of bumetanide to decrease CSF secretion. Clinical outcome was evaluated with a neuroscore. A second MRI was performed 24 h later to evaluate the ventricular volume.

Results Fifty percent of rats that survived SAH induction had AH. Their ventricular volume correlated well to the functional outcome after 24 h ($r = 0.803$). In rats with AH, 24 h later, ventricular volume remained equally increased in the absence of any further procedure. Similarly, ICV injection of saline or SSS thrombosis had no impact on the ventricular volume. However, ICV injection of bumetanide reduced AH by 35.9% ($p = 0.002$).

Conclusion In rodents, post-SAH hydrocephalus is may be due to hypersecretion of CSF by the CP, as it is limited by ICV injection of bumetanide. However, we cannot exclude other mechanisms involved in post-SAH acute hydrocephalus.

Keywords Bumetanide · Hydrocephalus · Subarachnoid hemorrhage · CSF pathways

Abbreviations

AH	Acute hydrocephalus
CP	Choroid plexus
DCI	Delayed cerebral ischemia
CSF	Cerebrospinal fluid
EVD	External ventricular drain
ICV	Intracerebroventricular
IVH	Intraventricular hemorrhage
PHH	Post-hemorrhagic hydrocephalus
SAH	Subarachnoid hemorrhage
SSS	Superior sagittal sinus

This article is part of the Topical Collection on *CSF Circulation*

✉ Thomas Metayer
thomas.metayer@neurochirurgie.fr

¹ Department of Neurosurgery, University Hospital of Caen, 14000 Caen, France

² Normandie Univ, UNICAEN, INSERM, U1237, PhIND “Physiopathology and Imaging of Neurological Disorders,” Institut Blood and Brain at Caen-Normandie, Cyceron, 14000 Caen, France

³ Medical School, University of Caen Normandy, 14000 Caen, France

⁴ Department of Clinical Research, Caen-Normandie University Hospital, CHU, 14000 Caen, France

Introduction

Subarachnoid hemorrhage (SAH), which is in most cases related to intracranial aneurysm rupture, is a severe form of stroke [4]. It can lead to the accumulation of cerebrospinal fluid (CSF) in the skull, a complication called acute hydrocephalus (AH), which is a risk factor for poor neurological outcome. In the literature, the incidence of AH varies greatly, but in most studies, it is comprised between 20 and 30% of all SAH [2, 3, 12, 22]. Currently, the only treatment of AH is surgical, with the insertion of an external ventricular drain (EVD). EVD is associated with a high rate of complications, especially CSF infection [15].

AH pathophysiology remains unclear, but it is generally attributed to an obstruction of arachnoid granulations by blood extravasated in the subarachnoid space. This would prevent the CSF outflow to cranial sinus veins [3]. Recently, this “CSF outflow” hypothesis has been questioned, in another form of hemorrhagic stroke, intraventricular hemorrhage (IVH). A study has been shown that post-hemorrhagic hydrocephalus (PHH) is related to CSF hypersecretion by the choroid plexus (CP) and not to a decrease of CSF outflow [13]. This CSF hypersecretion was related to an inflammatory response to the presence of blood in the ventricular system. In the present study, we wanted to determinate the mechanisms responsible for post-SAH hydrocephalus in rats, distinguishing CSF hypersecretion from arachnoid granulation obstruction. For this, we compared the impact of bumetanide, an inhibitor of the $\text{Na}^+/\text{K}^+/\text{2Cl}^-$ transporter (NKCC1) that contributes to half of the CSF production by the CP [13, 21] versus superior sagittal sinus (SSS) thrombosis.

Material and methods

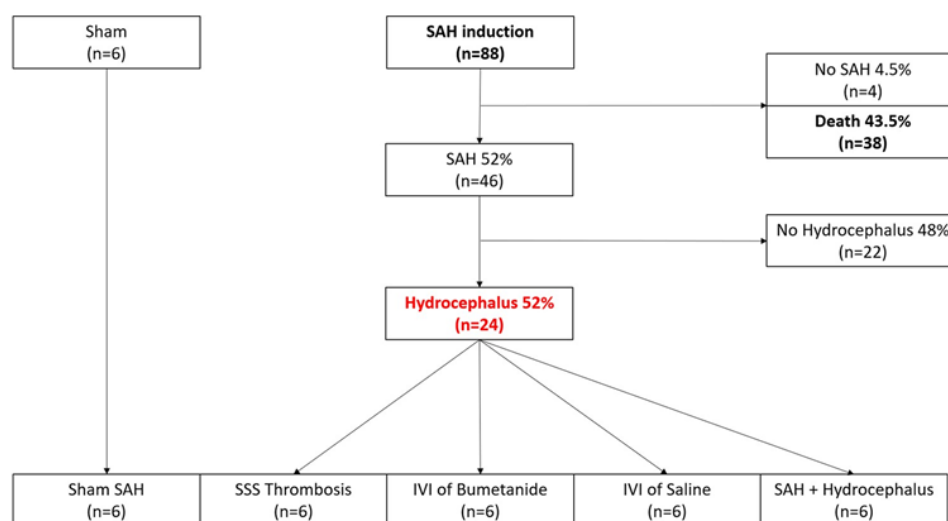
Animals

Experiments were performed in female WISTAR rats (body weight 290 ± 23 g; age 3–5 months; CURB, Caen, France). All efforts were made to limit animal suffering. Experiments were carried out following the ARRIVE guidelines (www.nc3rs.org.uk) and in accordance with the European Communities Council Directive (86/609/EEC) regarding the care and use of animals for experimental procedures and were approved by the local ethical committee CENOMEXA #1902. Animals were housed under standard 12:12 light–dark conditions and allowed free access to water and food. All the experiments were performed in rats anesthetized with isoflurane (2%) in 70%/30% NO_2/O_2 . Body temperature was maintained at 37°C with a rectal temperature probe and homoeothermic heating pad. Rats were mask ventilated. Rats received subcutaneous buprenorphine (0.05 mg/kg) at the time of anesthesia and during the imaging procedure.

Experimental design (Fig. 1)

Ninety-four rats were first allocated to one experimental group: SAH induction or sham SAH. In the SAH induction group, 24 h after surgery, a magnetic resonance imaging (MRI) was performed to look for the presence of SAH and AH. Rats that died before this MRI were excluded from the final analysis. Only rats with SAH and AH were kept for further experiments and were randomly assigned to one of the 4 following groups: control, superior sagittal sinus (SSS) thrombosis, intracerebroventricular (ICV) injection of saline, and ICV injection of bumetanide. Sample sizes

Fig. 1 Flow chart of the study. SAH hemorrhage was induced by endovascular puncture. The presence of SAH and of hydrocephalus was assessed in the surviving rats by MRI 24 h later. Rats with post-SAH hydrocephalus were then randomized to receive ICV injection of bumetanide, ICV injection of saline, no injection, and SSS thrombosis. We also constituted a sham group. We then evaluated the impact of these different procedures on hydrocephalus by MRI 24 h later



were evaluated as follows: in Karimy et al.'s study, ICV bumetanide decreased the ventricular volume by approximately 40% (from $5 \pm 1 \text{ mm}^3$ to $3 \pm 1 \text{ mm}^3$). A power analysis using an $\alpha = 0.05$ and a $\beta = 0.9$ calculated that the smaller sample size required to compare ventricular volume was 6 per group [13]. The surgical procedures were performed on the same day, and a second MRI was performed 24 h later to evaluate the ventricular volume, and for the SSS group the presence of a SSS thrombosis. The average baseline weight was $285 \text{ g} \pm 20 \text{ g}$ for the sham group, $274 \text{ g} \pm 16 \text{ g}$ for the HC + saline group, $263 \text{ g} \pm 23 \text{ g}$ for the HC + SSS thrombosis group and $270 \text{ g} \pm 15 \text{ g}$ for the HC + bumetanide group.

Surgical procedures

SAH induction [11]

The left external carotid artery was identified under a microscope, transected distally, and reflected caudally in line with the internal carotid artery. A 5.0 nylon monofilament suture was inserted into the stump of the external carotid artery through the common carotid artery bifurcation and into the internal carotid artery. The filament was pushed distally into the intracranial internal carotid artery to cause a vascular perforation. The filament was then withdrawn. Sham rats were subjected to the same procedure without arterial perforation. The skin was then sutured, and the animals were allowed to recover.

Induction of superior sagittal sinus (SSS) thrombosis [18]

Twenty-four hours after SAH induction, 6 rats with AH detected by MRI were randomly selected to undergo SSS thrombosis induction. The skull was exposed by a median skin incision. The periosteum was carefully removed, and bregma and lambda sutures were identified. A high-speed drill was used to create a central and narrow longitudinal cranial window over the entire length of the SSS under a microscope. The drill tip was repeatedly cooled during craniotomy with saline. The sinus was exposed, leaving the sinus and dura mater intact. Thrombosis of the sinus was induced by the careful topical application of a small strip of filter paper soaked in 40% ferric chloride for 4 min. Afterwards, saline was flushed several times to remove traces of ferric chloride the field. The skin wound was closed, and the animals were allowed to recover.

Intraventricular injection (bumetanide or saline) [13]

Twenty-four hours after SAH induction, rats with AH detected by MRI were randomly selected to receive an ICV injection of bumetanide or of saline ($n = 6$ per condition).

The skull was exposed by a median skin incision. For ICV injection, we used the following stereotaxic coordinates, relative to bregma: anteroposterior -1 mm , lateral 1.6 mm , and depth 3.6 mm (atlas of WISTAR Rats). A craniotomy was performed, and then the injection of bumetanide or saline was performed in the right lateral ventricle using a micropipette. Three μL of bumetanide at a concentration of 0.5 mg per mL was injected over approximately 3 min. The skin wound was then closed, and the animals were allowed to recover.

MRI experiments

MRI was performed 24 h and 48 h after SAH induction in a 7TPharma scan MRI system (Bruker, Germany). Rats were anesthetized with isoflurane (2%) in 70%/30% NO_2/O_2 . Body temperature was maintained at 37°C with a rectal temperature probe and homoeothermic heating pad. The acquisition of T2 fast spin-echo and T2* gradient-echo sequences were evaluated using field of view of 35×35 , matrix of 256×256 , and 30 coronal slices (0.1 mm thick).

MRI analysis

All ventricular volumes from the frontal horn of the lateral ventricle to the foramen of Luschka were outlined, and the areas were measured by ImageJ software (NIH). The combined ventricular areas over all slices were multiplied by section thickness to calculate ventricle volume. AH was defined as a ventricular volume at 24 h after SAH that was 3 standard deviations greater than the mean in sham animals [16, 19]. SSS thrombosis was evaluated using the same T2 fast spin-echo and T2* gradient-echo sequences [18]. The ventricular volume was analyzed by an investigator blinded to treatment.

Clinical evaluation

Neurological deficits were evaluated before each MRI session (at 24 and 48 h post-SAH) using a 4 points neuroscore [6]. Neuroscore was 0, no deficit; 1, slight deficit; 2, circling; 3, massive circling or no movement; and 4, death. The neuroscore was analyzed by an investigator blinded to treatment.

Statistical analyses

Statistical analyses were carried out via BiostatGV (<https://biostatgv.sentiweb.fr/>). Normality was tested using a Shapiro–Wilk test, and then if the test was parametric, a student test (for paired samples or for independent samples) was performed. In case of normality not respected, a non-parametric Mann–Whitney test was carried out. For the comparisons between more than 2 groups of quantitative values, we used

the Kruskal–Wallis test and then Mann–Whitney tests to compare the groups two by two. Data were also analyzed using Spearman rank correlation test. Significance was set at $p < 0.05$. Results were expressed as means, with standard deviation from the mean.

Results

Acute hydrocephalus after in the endovascular perforation model in rats (Fig. 1; Fig. 2)

Of the 94 rats, 88% had an SAH induction and 6 a sham procedure. Endovascular puncture led to SAH in 84 rats (95.4%); 38 rats (43.5%) died before the first MRI. On the other 50 rats, 46 (92%) had a SAH confirmed by MRI. Forty-four rats had a pure SAH, and two rats had an associated intraventricular hemorrhage. Among these 46 rats, 24 (52%) had an acute hydrocephalus (Figs. 1 and 2a). The mean ventricular volume at 24 h was similar in the sham SAH group ($15.6 \pm 4.1 \text{ mm}^3$) and in the SAH without AH group ($15.8 \pm 3.1 \text{ mm}^3$; $p = 0.88$ versus sham SAH group) (Fig. 2b), whereas it was significantly higher in the SAH with AH group ($47.7 \pm 18.3 \text{ mm}^3$; $p = 0.0002$ versus sham SAH group) (Fig. 2b). The ventricular volume

correlated with the neurological status as assessed by a 4 points neuroscore ($r = 0.8$, $p < 0.001$) (Fig. 2c).

Mechanisms of acute hydrocephalus after SAH

In the absence of any intervention, the ventricular volume of rats with AH did not change 24 h after the first MRI (ventricular volume variation = $1.07\% \pm 5.1\%$) (Fig. 3a–b). The same observation was made for the animals in the groups AH + saline and HC + SSS thrombosis ($p = 0.93$ and $p = 0.81$ versus hydrocephalus, respectively) (Fig. 3a–b). Intraventricular injection of bumetanide significantly decreased the ventricular volume from $46.7 \pm 11.9 \text{ mm}^3$ to $30.1 \pm 8.8 \text{ mm}^3$, corresponding to a decrease of 35.9% (Fig. 3a–b). This decrease was significantly lower when compared to the hydrocephalus group ($p = 0.002$), AH + saline group ($p = 0.002$), and HC + SSS thrombosis ($p = 0.002$). However, the decrease in the ventricular volume in the AH + bumetanide group did not lead to a significant functional improvement as assessed by a 4 points neuroscore ($p = 0.97$, neuroscore = 1.5 ± 0.5 in the AH + bumetanide group versus 1.8 ± 0.9 in the AH + saline group) (Fig. 3c).

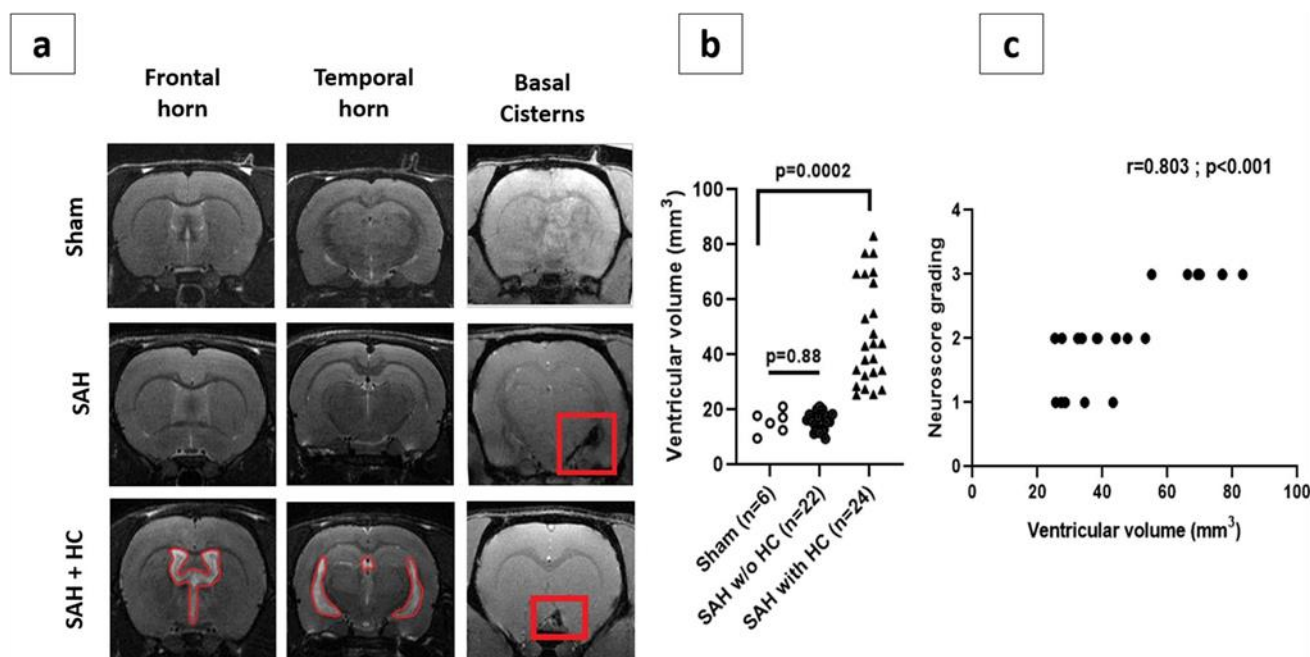


Fig. 2 Hydrocephalus after SAH in rats. a Representative T2-weighted MRI pictures of sham rats (top panel), SAH rats (middle panel) and SAH rats with hydrocephalus (lower panel) 24 h after SAH induction. The red squares highlight the SAH, visible as a hypointense lesion in the basal cisterns. In the SAH + HC group, the ventricles are delineated in red to highlight their dilatation, defining the hydrocephalus. b Ventricular volume 24 h after endovascular per-

foration for sham rats was $15.6 \pm 4.06 \text{ mm}^3$, it was $15.5 \pm 3.2 \text{ mm}^3$ for SAH rats without hydrocephalus ($p = 0.88$ versus sham; Mann–Whitney test) and $47.7 \pm 18.6 \text{ mm}^3$ for SAH rats with hydrocephalus ($p = 0.0002$ versus sham; Mann–Whitney test). c There was a clear correlation between the ventricular volume and a 4 points neuroscore ($r = 0.803$; $p < 0.001$; Spearman rank correlation test).

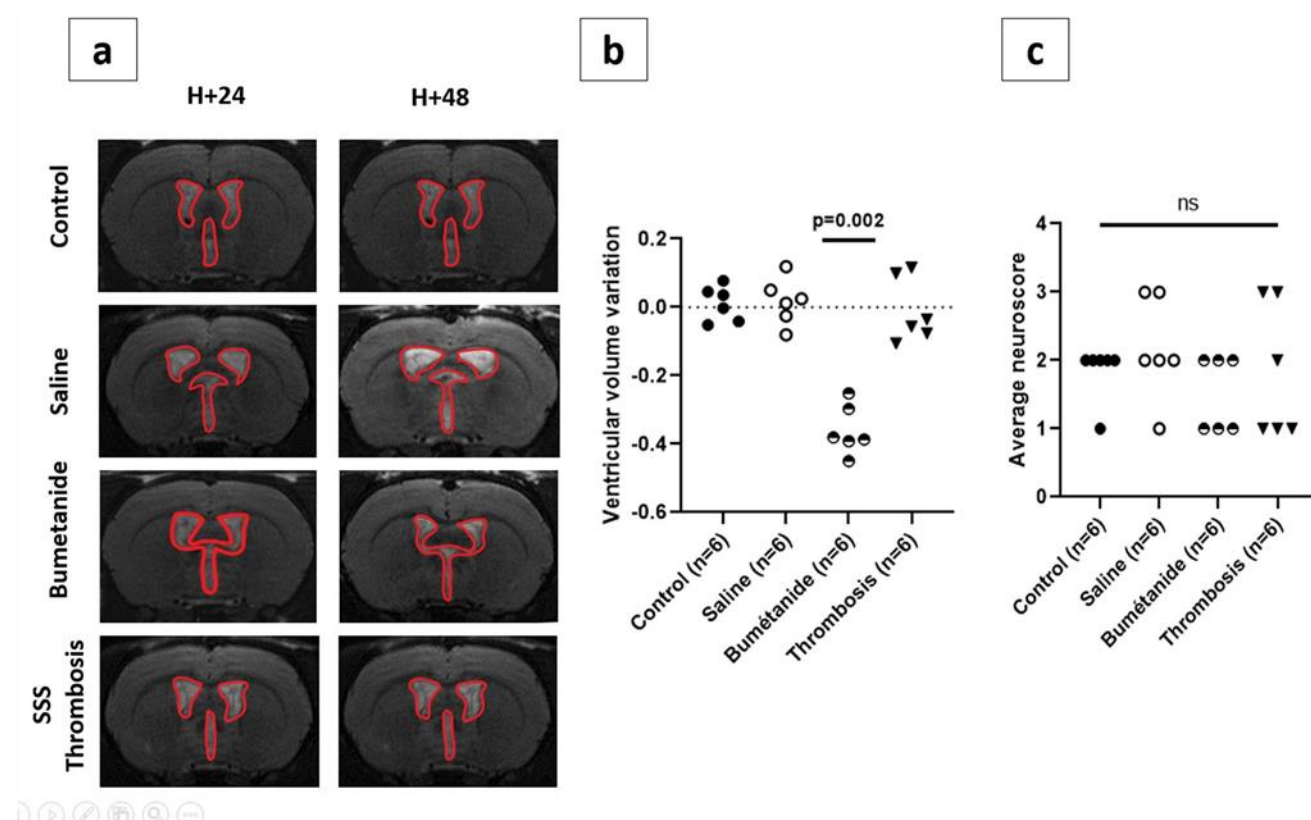


Fig. 3 Impact of bumetanide and SSS thrombosis on the ventricular volume in post-SAH hydrocephalus. **a** Representative coronal T2-weighted MRI images of in rats with SAH with hydrocephalus. Lateral ventricles and the third ventricle are delineated in red. Twenty-four hour after SAH induction, the ventricular volume was similar across the 4 groups of rats with hydrocephalus. Twenty-four hour later, the ventricular volume decreased only in the rats receiving ICV injection of bumetanide. **b** Measure of the ventricular volume

variation between 24 and 48 after SAH induction. In rats with HC, HC + saline injection and HC + SSS thrombosis, the ventricular volume did not change ($p = 0.93$ and 0.81 , respectively, versus control; Mann-Whitney test). In the HC + bumetanide group, the ventricular volume decreased by 35.9% ($p = 0.002$ versus control; Mann-Whitney test). **c** There was no impact of saline injection, bumetanide injection, and SSS thrombosis on the functional outcome as assessed by a 5-point neuroscore scale ($p = 0.97$; Kruskal-Wallis test)

Discussion

Main results

In our study, 52% of the rats that survived to the SAH induction experienced AH. The ventricular volume well correlated with the functional outcome, with a higher neuroscore in the animals with the most important ventricular dilatation. SSS thrombosis had no effect on ventricular volume, whereas ICV injection of bumetanide decreased the ventricular volume by 35.9% . Taken together, our results suggest that AH after SAH is related to CP hypersecretion sensitive to ICV bumetanide injection and is not related to an obstruction of the arachnoid granulation located alongside the SSS.

AH after SAH is related to CP hypersecretion sensitive to bumetanide

Interestingly, a recent study showed that in PHH, IVH induced a hypersecretion of CSF in rats, which represented a revolution of our understanding of PHH [13]. In this study, IVH induced CP inflammation and CSF hypersecretion dependent on a TLR4–NF- κ B signaling pathway, via the SPAK–NKCC1 co-transporter complex. NKCC1 was sensitive to ICV injection of bumetanide, a commonly used diuretic. In PHH, ICV injection of bumetanide decreased the ventricular volume by nearly 40% . In our study, we also observed that ICV injection of bumetanide decreases the ventricular volume, especially since we know that SAH

induced CP inflammation, which is linked to the development of AH [23].

The classical hypothesis explaining AH after SAH or IVH was linked to a decrease in the resorption of CSF by the arachnoid villi which themselves drain into the superior sagittal sinus. If the arachnoid villi are obstructed by blood, we hypothesize that sinus thrombosis will reduce CSF resorption hence increasing AH [3]. We found that SSS thrombosis has no impact on AH. There are however three possible explanations to our observation: (1) obstruction of the arachnoid villi by blood clots has no impact on the occurrence of AH; (2) obstruction of the arachnoid villi by blood clots induces a maximal hydrocephalus, which cannot be increased by sinus thrombosis; and (3) arachnoid villi obstruction plays a role in AH occurrence, but at least in rodent, other CSF exit routes are able to drain the CSF in excess [17, 25]. We believe that the first hypothesis could be the right one, based on other publication: AH can be induced in mice by acellular CSF of patients suffering from SAH [24]. The obstructive hypothesis is thus again questioned and favors the inflammatory pathway.

Hypersecretion of CSF can lead to intracranial hypertension and death. It is surprising to see such a mechanism occur. It has been proven that after a SAH, the glymphatic system is severely impaired. It leads to a decrease in brain cleaning and can lead to the phenomena of delayed cerebral ischemia (DCI) [1, 7, 9, 14, 17]. One explanation may be that CP hypersecretion increased the functioning of the glymphatic system, allowing to decrease the toxicity of the blood component in the brain parenchyma. This hypothesis must be further studied.

Limitations

We must acknowledge several limitations to the present study. First, the lack of mechanistic evaluation in order to see if the ventricular volume reduction induced by ICV injection of bumetanide has the same mechanisms as described in IVH [13]. Second, the lack of impact of ICV injection of bumetanide on functional outcome. This is probably related to a lack of power, as the neuroscore tended to be lower in the bumetanide group. Third, we did not thoroughly investigate all the suspected pathways for CSF drainage. With a normal intracranial pressure, evidence supporting the role of arachnoid granulations in the drainage of CSF are weak [20]. It would have been ideal to find a way to block the CSF drainage through the cribriform plate or through the lumbar roots, which are other way of exit of the CSF. Fourth, the neuroscore is not the most appropriate score. We could have used the Garcia's score which was unknown to us at the start of this study [8]. Finally, there is a controversy about the role of NKCC1 as a contributor to CSF production, some studies argued for unconventional outward NKCC1 transport in

choroid plexus, and other supports the conventional inward transport [5, 10, 21].

Conclusion

Post-SAH hydrocephalus in rodents is possibly related to an increased secretion of CSF by the choroid plexus, probably through inflammatory mechanisms. The decrease in the secretion of CSF in rodents by NKCC1 blockage is an interesting hypothesis. A clear understanding of CSF production and the role of NKCC1 to normal CSF production and to acute hydrocephalus must be further studied, before any evaluation of bumetanide in a clinical trial.

Declarations

Conflict of interest The authors declare no competing interests.

References

1. Akins PT, Guppy KH (2021) Does impaired glymphatic drainage cause glymphedema? A review tailored to neurocritical care and neurosurgery. *Neurocrit Care*. <https://doi.org/10.1007/s12028-021-01224-1>
2. Black PM (1986) Hydrocephalus and vasospasm after subarachnoid hemorrhage from ruptured intracranial aneurysms. *Neurosurgery* 18(1):12–16
3. Chen S, Luo J, Reis C, Manaenko A, Zhang J (2017) Hydrocephalus after subarachnoid hemorrhage: pathophysiology, diagnosis, and treatment. *Biomed Res Int* 2017:8584753
4. Connolly ES, Rabinstein AA, Carhuapoma JR et al (2012) Guidelines for the management of aneurysmal subarachnoid hemorrhage: a guideline for healthcare professionals from the American Heart Association/American Stroke Association. *Stroke* 43(6):1711–1737
5. Delpire E, Gagnon KB (2019) Elusive role of the Na-K-2Cl cotransporter in the choroid plexus. *Am J Physiol Cell Physiol* 316(4):C522–C524
6. Foerch C, Arai K, Jin G, Park K-P, Pallast S, van Leyen K, Lo EH (2008) Experimental model of warfarin-associated intracerebral hemorrhage. *Stroke* 39(12):3397–3404
7. Gaberel T, Gakuba C, Goulay R, Martinez De Lizarrondo S, Hanouz J-L, Emery E, Touze E, Vivien D, Gauberti M (2014) Impaired glymphatic perfusion after strokes revealed by contrast-enhanced MRI: a new target for fibrinolysis? *Stroke* 45(10):3092–3096
8. Garcia JH, Wagner S, Liu KF, Hu XJ (1995) Neurological deficit and extent of neuronal necrosis attributable to middle cerebral artery occlusion in rats. Statistical validation. *Stroke* 26(4):627–634 discussion 635
9. Goulay R, Flament J, Gauberti M et al (2017) Subarachnoid hemorrhage severely impairs brain parenchymal cerebrospinal fluid circulation in nonhuman primate. *Stroke* 48(8):2301–2305
10. Gregoriades JMC, Madaris A, Alvarez FJ, Alvarez-Leefmans FJ (2019) Genetic and pharmacological inactivation of apical Na⁺-K⁺-2Cl⁻ cotransporter 1 in choroid plexus epithelial cells reveals

- the physiological function of the cotransporter. *Am J Physiol Cell Physiol* 316(4):C525–C544
11. Guo D, Wilkinson DA, Thompson BG, Pandey AS, Keep RF, Xi G, Hua Y (2017) MRI characterization in the acute phase of experimental subarachnoid hemorrhage. *Transl Stroke Res* 8(3):234–243
 12. Hasan D, Vermeulen M, Wijedicks EF, Hijdra A, van Gijn J (1989) Management problems in acute hydrocephalus after subarachnoid hemorrhage. *Stroke* 20(6):747–753
 13. Karimy JK, Zhang J, Kurland DB et al (2017) Inflammation-dependent cerebrospinal fluid hypersecretion by the choroid plexus epithelium in posthemorrhagic hydrocephalus. *Nat Med* 23(8):997–1003
 14. Liu E, Peng X, Ma H, Zhang Y, Yang X, Zhang Y, Sun L, Yan J (2021) The involvement of aquaporin-4 in the interstitial fluid drainage impairment following subarachnoid hemorrhage. *Front Aging Neurosci*. <https://doi.org/10.3389/fnagi.2020.611494>
 15. Lozier AP, Sciacca RR, Romagnoli MF, Connolly ES (2002) Ventriculostomy-related infections: a critical review of the literature. *Neurosurgery* 51(1):170–181 discussion 181–182
 16. Okubo S, Strahle J, Keep RF, Hua Y, Xi G (2013) Subarachnoid hemorrhage-induced hydrocephalus in rats. *Stroke* 44(2):547–550
 17. Plog BA, Nedergaard M (2018) The glymphatic system in central nervous system health and disease: past, present, and future. *Annu Rev Pathol* 13:379–394
 18. Röttger C, Bachmann G, Gerriets T, Kaps M, Kuchelmeister K, Schachenmayr W, Walberer M, Wessels T, Stolz E (2005) A new model of reversible sinus sagittalis superior thrombosis in the rat: magnetic resonance imaging changes. *Neurosurgery* 57(3):573–580 discussion 573–580
 19. Shishido H, Zhang H, Okubo S, Hua Y, Keep RF, Xi G (2016) The effect of gender on acute hydrocephalus after experimental subarachnoid hemorrhage. *Acta Neurochir Suppl* 121:335–339
 20. Sokolowski W, Barszcz K, Kupeczyńska M, Czubał N, Skibniewski M, Purzyć H (2018) Lymphatic drainage of cerebrospinal fluid in mammals - are arachnoid granulations the main route of cerebrospinal fluid outflow? *Biologia (Bratisl)* 73(6):563–568
 21. Steffensen AB, Oernbo EK, Stoica A, Gerkau NJ, Barbuskaite D, Tritsarlis K, Rose CR, MacAulay N (2018) Cotransporter-mediated water transport underlying cerebrospinal fluid formation. *Nat Commun* 9(1):2167
 22. van Asch CJJ, van der Schaaf IC, Rinkel GJE (2010) Acute hydrocephalus and cerebral perfusion after aneurysmal subarachnoid hemorrhage. *AJNR Am J Neuroradiol* 31(1):67–70
 23. Wan Y, Hua Y, Garton HJL, Novakovic N, Keep RF, Xi G (2019) Activation of epiplexus macrophages in hydrocephalus caused by subarachnoid hemorrhage and thrombin. *CNS Neurosci Ther* 25(10):1134–1141
 24. Wan S, Wei J, Hua Y, Koduri S, Keep RF, Xi G, Pandey AS (2020) Cerebrospinal fluid from aneurysmal subarachnoid hemorrhage patients leads to hydrocephalus in nude mice. *Neurocrit Care*. <https://doi.org/10.1007/s12028-020-01031-0>
 25. Zuurbier SM, van den Berg R, Troost D, Majoie CB, Stam J, Coutinho JM (2015) Hydrocephalus in cerebral venous thrombosis. *J Neurol* 262(4):931–937

Publisher's note Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.

Article 5

Imagery evaluation of cerebrovascular inflammation and functional consequences induced by sublethal doses of sarin surrogate: non-invasive imaging methods to predict long-term deficits.

Quentin GERARD¹, Karine THIBAUT², Jonathane FURON¹, Denis VIVIEN¹, Gregory DAL BO², Cyrille ORSET¹

¹INSERM, PhIND, Université Caen-Normandie, Caen, France,

²IRBA, Toxicology & Chemical Risks Department, Brétigny, France,

Aims. Organophosphate (OP) compounds are highly toxic chemicals widely used as pesticides, but also as chemical warfare nerve agent (NA). The incidence of accidental poisoning with OP pesticides is associated with nearly 100,000 annual deaths worldwide for 2 million reported cases of intoxication. More worryingly, the use of neurotoxic weapons demonstrates the ever-persistent threat. NA exposure leads to the irreversible inhibition of cholinesterases, affecting both the peripheral and the central nervous system (CNS). In the CNS, if the cholinergic hyperactivity is not quickly stopped, it will lead to seizure and epileptic activity that will induce brain damages, neuronal degeneration, BBB dysfunction, cerebral edema and significant neuroinflammation. However, the effects of NA on the neurovascular system remain poorly understood. This work aimed to explore anatomical and functional neurovascular consequences of an exposure of a sarin surrogate (NIMP).

Methods. For that purpose, MRI molecular imaging of the adhesion molecules (VCAM-1) was used to uncover neurovascular inflammation *in vivo* after 2 different sublethal doses of a sarin analog exposition (0.5LD50 and 0.9LD50). Functional consequences were measured on the somatosensory cortex using speckle contrast imaging.

Results. We demonstrate that cerebrovascular inflammation was already perceptible 6 hours after exposure up to 7 days for the highest dose. Neurovascular coupling was altered up to 1 month after NIMP exposure whatever the dose as shown by speckle imaging.

Conclusions. This method allows to detect neurovascular inflammation after mild OP exposure which would improve the diagnosis and management of patients to avoid long-term cerebral impact.

Article 6

Tolerogenic effect of antigen-encapsulating nanoparticles toward specific T cell response against N-methyl-D-aspartate receptor in an autoimmune encephalitis model

LESEC Léonie^a, REGNAULD Caroline^a, FURON Jonathane^a, MAZERT-DREON Aurélie^b, GROO Anne-Claire^b, MILLER Stephen^c, NEEF Tobias^c, LEPRINCE Jérôme^d, LEFRANC Benjamin^d, VIVIEN Denis^{a,e}, DOCAGNE Fabian^a, LE MAUFF Brigitte^{a,f}, TOUTIRAIS Olivier^{a,f}

^a Normandie Univ, UNICAEN, INSERM, GIP Cyceron, Institut Blood and Brain @Caen-Normandie (BB@C), UMR-S U1237, Physiopathology and Imaging of Neurological Disorders (PhIND), Caen, France.

^b Normandie Univ, UNICAEN, CERMN, F-14000 Caen, France.

^c Department of Microbiology-Immunology, Feinberg School of Medicine, Northwestern University, Chicago, IL and Interdepartmental Immunobiology Center, Feinberg School of Medicine, Northwestern University, Chicago, IL, USA

^d Normandie Univ, UNIROUEN, INSERM, U1239, Neuronal and Neuroendocrine Differentiation and Communication, Rouen, France

^e Department of clinical research, Caen University Hospital, CHU Caen, France.

^f Department of Immunology and Histocompatibility (HLA), Caen University Hospital, CHU Caen, France.

Abstract

Anti-N-Methyl-D-Aspartate receptor (NMDA) autoimmune encephalitis (NMDAR AE) is an autoimmune disease characterized by severe psychiatric and neurological symptoms. While the pathogenic role of antibodies (Ab) directed against the GluN1 subunit of NMDAR is well described in this disease, the immune mechanisms involved in the generation of the autoimmune B cell response, especially the role of T helper cells, are poorly understood. Previously, we have developed a B-cell-mediated mouse model of NMDAR-AE by immunization with a GluN1359-378 peptide that drives a series of symptoms that recapitulate AE such as anxiety behavior and spatial memory impairment. Here, in this mouse model, we highlighted anti-GluN1 specific CD4⁺ but also CD8⁺ T cells in both spleen and meninges. T helper cells have a polyfunctional profile suggesting a T and B cell crosstalk to generate anti-GluN1 pathogenic Abs. Interestingly, the use of a tolerogenic strategy with PLGA (poly(lactic-co-glycolic acid)) nanoparticles (NPs) loaded with antigen, decreased T cell response against GluN1 peptide without affecting symptoms of the disease. In conclusion, this study identified, for the first time, a potential contribution of T helper cells in the pathology of NMDAR AE and pave the way for the development of future NP-based tolerogenic approaches to treat relapses.

Article 7

Blockage of the endothelial tPA-NMDA receptors signaling prevents inflammatory processes and risks of hemorrhagic transformations following ischemic stroke

Florent Lebrun^{1, 2}, Damien Levard¹, Eloise Lemarchand¹, Mervé Yetim¹, Jonathane Furon¹, Fanny Potzehl¹, Flavie Lesept³, Manuel Blanc³, Benoit Haelewyn⁴, Marina Rubio¹, Carine Ali¹, Annelise Letourneur², Nicolas Violle², Cyrille Orset^{1*}, Denis Vivien^{1,5*\$}

¹Normandie University, UNICAEN, INSERM UMR-S U1237, Physiopathology and Imaging of Neurological Disorders (PhIND), GIP Cyceron, Institut Blood and Brain @ Caen-Normandie (BB@C), 14000 Caen, France;

²Etap-Lab Strok@lliance

³Lys-Therapeutics

⁴GIP Cyceron

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

* equal contribution

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

Background and aim: The only FDA-approved drug treatment of ischemic stroke relies on the intravenous injection of the recombinant tissue-type plasminogen activator (rtPA, Alteplase/Actilyse®) alone or combined with thrombectomy. By increasing the activity of endothelial and neuronal N-methyl-D-aspartate receptors (NMDAR), tPA is reported to display deleterious effects on neurovascular units and brain parenchyma. To counteract this, we developed a novel strategy relying on a monoclonal antibody, Glunomab, targeting the deleterious effects of both endogenous and recombinant tPA.

Methods: Glunomab was designed to prevent tPA from interacting with the GluN1 subunit of NMDAR. We then evaluated its efficacy in different animal models of thromboembolic stroke either alone or combined with early or late recombinant tPA-driven thrombolysis, including comorbidity studies such as diabetes. Calcium imaging, Magnetic Resonance Imaging (MRI), laser speckle flowmetry, behavioural tasks and/or immunohistochemistry were used to evaluate treatment efficacy.

Results: Glunomab blocks the tPA-dependent potentiation of NMDAR signalling without disturbing its physiological activity. After a single i.v. administration either in standalone or combined with rtPA-induced thrombolysis, Glunomab reduced brain lesion volumes along with haemorrhagic transformations, translating in improved long-term neurological outcomes. Moreover, the therapeutic synergy of Glunomab with rtPA was also demonstrated in diabetic animals, an important parameter as diabetes is one of the main comorbidity displayed by stroke patients.

Conclusions: Glunomab drastically limits ischemic damages induced by both endogenous and recombinant tPA. A humanized form of Glunomab is currently under development for clinical application, as a potential game-changer treatment for stroke patients.

BIBLIOGRAPHIE

A

- Abbott, N. J., Rönnbäck, L., & Hansson, E. (2006). Astrocyte-endothelial interactions at the blood-brain barrier. *Nature Reviews. Neuroscience*, 7(1), 41–53. <https://doi.org/10.1038/nrn1824>
- Adams, H. ., Bendixen, B. ., Kappelle, L. ., Biller, J., Love, B. ., Gordon, D. ., & Marsh, E. . (1993). Classification of Subtype of Acute Ischemic Stroke. *Stroke*, 23(1), 35–41.
- 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. *Journal of Cell Biology*, 149(5), 1157–1166. <https://doi.org/10.1083/jcb.149.5.1157>
- Al-Shahi, R., White, P. M., Davenport, R. J., & Lindsay, K. W. (2006). Subarachnoid haemorrhage. *British Medical Journal*, 333(7561), 235–240. <https://doi.org/10.1136/bmj.333.7561.235>
- Alberts, M. J., Shang, T., & Magadan, A. (2015). Endovascular therapy for acute ischemic stroke: Dawn of anew era. *JAMA Neurology*, 72(10), 1101–1103. <https://doi.org/10.1001/jamaneurol.2015.1743>
- Albrechtsen, O. K. (1957). The Fibrinolytic Activity of Human Tissues. *British Journal of Haematology*, 3(3), 284–291. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2141.1957.tb05798.x>
- Allen, R. A., Kluft, C., & Brommer, E. J. P. (1985). Effect of chronic smoking on fibrinolysis. *Arteriosclerosis*, 5(5), 443–450. <https://doi.org/10.1161/01.atv.5.5.443>
- Amantea, D., Micieli, G., Tassorelli, C., Cuartero, M. I., Ballesteros, I., Certo, M., Moro, M. A., Lizasoain, I., & Bagetta, G. (2015). Rational modulation of the innate immune system for neuroprotection in ischemic stroke. *Frontiers in Neuroscience*, 9(APR), 1–20. <https://doi.org/10.3389/fnins.2015.00147>
- Amantea, D., Nappi, G., Bernardi, G., Bagetta, G., & Corasaniti, M. T. (2009). Post-ischemic brain damage: Pathophysiology and role of inflammatory mediators. *FEBS Journal*, 276(1), 13–26. <https://doi.org/10.1111/j.1742-4658.2008.06766.x>
- Amin, H. ., & Schindler, J. . (2017). Vascular Neurology Board Review. In *Vascular Neurology Board Review*. <https://doi.org/10.1891/9780826168535>
- Amiri, H., Bluhmki, E., Bendszus, M., Eschenfelder, C. C., Donnan, G. A., Leys, D., Molina, C., Ringleb, P. A., Schellinger, P. D., Schwab, S., Toni, D., Wahlgren, N., & Hacke, W. (2016). European Cooperative Acute Stroke Study-4: Extending the time for thrombolysis in emergency neurological deficits ECASS-4: ExTEND. *International*

Journal of Stroke, 11(2), 260–267. <https://doi.org/10.1177/1747493015620805>

Andral, G., 1843. Essai d'hématologie pathologique. Fortin, Masson et Cie.

Andreasen, P. A., Riccio, A., Welinder, K. G., Douglas, R., Sartorio, R., Nielsen, L. S., Oppenheimer, C., Blasi, F., & Danø, K. (1986). Plasminogen activator inhibitor type-1 : reactive center and amino-terminal heterogeneity determined by protein and cDNA sequencing. *FEBS Letters*, 209(2), 213–218. [https://doi.org/10.1016/0014-5793\(86\)81113-9](https://doi.org/10.1016/0014-5793(86)81113-9)

Anfray, A., Brodin, C., Drieu, A., Potzha, F., Dalarun, B., Agin, V., Vivien, D., & Orset, C. (2021). Single- and two- chain tissue type plasminogen activator treatments differentially influence cerebral recovery after stroke. *Experimental Neurology*, 338(October 2020), 1–10. <https://doi.org/10.1016/j.expneurol.2021.113606>

Anfray, A., Drieu, A., Hingot, V., Hommet, Y., Yetim, M., Rubio, M., Deffieux, T., Tanter, M., Orset, C., & Vivien, D. (2020). Circulating tPA contributes to neurovascular coupling by a mechanism involving the endothelial NMDA receptors. *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>

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. *Journal of Neurotrauma*, 21(9), 1204–1211. <https://doi.org/10.1089/neu.2004.21.1204>

Armstead, W., Riley, J., Yarovoi, S., Higazi, A. A.-R., & Cines, D. (2016). Abstract 172: tPA Variant tPA-A296-299 Prevents Impairment of Cerebral Autoregulation After Stroke Through LRP Dependent Increase in cAMP and p38 MAPK. *Stroke*, 47(suppl_1), 2096–2102. https://doi.org/10.1161/str.47.suppl_1.172

Arnaud, K., Oliveira Moreira, V., Vincent, J., Dallerac, G., Dubreuil, C., Dupont, E., Richter, M., Müller, U. C., Rondi-Reig, L., Prochiantz, A., & Di Nardo, A. A. (2021). Choroid plexus APP regulates adult brain proliferation and animal behavior. *Life Science Alliance*, 4(11). <https://doi.org/10.26508/lsa.202000703>

Asahi, M., Asahi, K., Jung, J. C., Del Zoppo, G. J., Fini, M. E., & Lo, E. H. (2000). Role for matrix metalloproteinase 9 after focal cerebral ischemia: Effects of gene knockout and enzyme inhibition with BB-94. *Journal of Cerebral Blood Flow and Metabolism*, 20(12), 1681–1689. <https://doi.org/10.1097/00004647-200012000-00007>

Astrup, Siesjo, & Symon. (1981). Thresholds in Cerebral Ischemia — The Ischemic Penumbra. *Stroke*, 12(6), 723–725. <https://doi.org/10.1161/01.str.8.3.299>

Attwell, D., Buchan, A. M., Charpak, S., Lauritzen, M., MacVicar, B. A., & Newman, E. A. (2010). Glial and neuronal control of brain blood flow. *Nature*, 468(7321), 232–243. <https://doi.org/10.1038/nature09613>

Attwell, D., Mishra, A., Hall, C. N., O'Farrell, F. M., & Dalkara, T. (2016). What is a pericyte? *Journal of Cerebral Blood Flow and Metabolism*, 36(2), 451–455. <https://doi.org/10.1177/0271678X15610340>

B

Baker, J. B., & Gronke, R. S. (1986). Protease nexins and cellular regulation. *Seminars in Thrombosis and Hemostasis*, 12(3), 216–220. <https://doi.org/10.1055/s-2007-1003554>

Balkaya, M., Kröber, J., Gertz, K., Peruzzaro, S., & Endres, M. (2013). Characterization of long-term functional outcome in a murine model of mild brain ischemia. *Journal of Neuroscience Methods*, 213(2), 179–187. <https://doi.org/10.1016/j.jneumeth.2012.12.021>

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)

Bao, Y., Qin, L., Kim, E., Bhosle, S., Guo, H., Febbraio, M., Haskew-Layton, R. E., Ratan, R., & Cho, S. (2012). CD36 is involved in astrocyte activation and astroglial scar formation. *Journal of Cerebral Blood Flow and Metabolism*, 32(8), 1567–1577. <https://doi.org/10.1038/jcbfm.2012.52>

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*, 21(4), 813–825. [https://doi.org/10.1016/S0896-6273\(00\)80597-8](https://doi.org/10.1016/S0896-6273(00)80597-8)

Barker-Carlson, K., Lawrence, D. A., & Schwartz, B. S. (2002). Acyl-enzyme complexes between tissue-type plasminogen activator and neuroserpin are short-lived in Vitro. *Journal of Biological Chemistry*, 277(49), 46852–46857. <https://doi.org/10.1074/jbc.M207740200>

Barnathan, E. S., Kuo, A., Van Der Keyl, H., McCrae, K. R., Larsen, G. R., & Cines, D. B. (1988). Tissue-type plasminogen activator binding to human endothelial cells. Evidence for two distinct binding sites. *Journal of Biological Chemistry*, 263(16), 7792–7799. [https://doi.org/10.1016/s0021-9258\(18\)68568-0](https://doi.org/10.1016/s0021-9258(18)68568-0)

Baron, A., Hommet, Y., Cassé, F., & Vivien, D. (2010). Tissue-type plasminogen activator induces plasmin-dependent proteolysis of intracellular neuronal nitric oxide

synthase. *Biology of the Cell*, 102(10), 539–547. <https://doi.org/10.1042/bc20100072>

Baron, J. ., Bousser, M. ., Comar, D., Soussaline, F., & Castaigne, P. (1981). Noninvasive Tomographic Study of Cerebral Blood Flow and Oxygen Metabolism in vivo. *European Journal of Neurology*, 20, 273–284.

Bavarsad Shahripour, R., Harrigan, M. R., & Alexandrov, A. V. (2014). N-acetylcysteine (NAC) in neurological disorders: Mechanisms of action and therapeutic opportunities. *Brain and Behavior*, 4(2), 108–122. <https://doi.org/10.1002/brb3.208>

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., Berezowski, V., Fernández-Monreal, M., Brillault, J., Valable, S., Dehouck, M.-P., Cecchelli, R., Vivien, D., Touzani, O., & Ali, C. (2005). Oxygen Glucose Deprivation Switches the Transport of tPA Across the Blood–Brain Barrier From an LRP-Dependent to an Increased LRP-Independent Process. *Stroke*, 36(5), 1059–1064. <https://doi.org/10.1161/01.STR.0000163050.39122.4f>

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(4), 578–585. <https://doi.org/10.1242/jcs.03354>

Benchenane, K., López-Atalaya, J. P., Fernández-Monreal, M., Touzani, O., & Vivien, D. (2004). Equivocal roles of tissue-type plasminogen activator in stroke-induced injury. *Trends in Neurosciences*, 27(3), 155–160. <https://doi.org/10.1016/j.tins.2003.12.011>

Bender, A. S., & Norenberg, M. D. (2000). Effect of ammonia on GABA uptake and release in cultured astrocytes. *Neurochemistry International*, 36(4–5), 389–395. [https://doi.org/10.1016/S0197-0186\(99\)00130-8](https://doi.org/10.1016/S0197-0186(99)00130-8)

Benjamin, E. J., Muntner, P., Alonso, A., Bittencourt, M. S., Callaway, C. W., Carson, A. P., Chamberlain, A. M., Chang, A. R., Cheng, S., Das, S. R., Delling, F. N., Djousse, L., Elkind, M. S. V., Ferguson, J. F., Fornage, M., Jordan, L. C., Khan, S. S., Kissela, B. M., Knutson, K. L., ... Virani, S. S. (2019). Heart Disease and Stroke Statistics-2019 Update: A Report From the American Heart Association. In *Circulation* (Vol. 139, Issue 10). <https://doi.org/10.1161/CIR.0000000000000659>

Benjamin, E. J., Virani, S. S., Callaway, C. W., Chamberlain, A. M., Chang, A. R., Cheng,

S., Chiuve, S. E., Cushman, M., Delling, F. N., Deo, R., De Ferranti, S. D., Ferguson, J. F., Fornage, M., Gillespie, C., Isasi, C. R., Jiménez, M. C., Jordan, L. C., Judd, S. E., Lackland, D., ... Muntner, P. (2018). Heart disease and stroke statistics - 2018 update: A report from the American Heart Association. In *Circulation* (Vol. 137, Issue 12). <https://doi.org/10.1161/CIR.0000000000000558>

Berezowski, V., Fukuda, A. M., Cecchelli, R., & Badaut, J. (2012). Endothelial cells and astrocytes: A concerto en duo in ischemic pathophysiology. *International Journal of Cell Biology*, 2012. <https://doi.org/10.1155/2012/176287>

Berkhemer, O. A. *et al.* (2015) 'A Randomized Trial of Intraarterial Treatment for Acute Ischemic Stroke', *New England Journal of Medicine*, 372(1), pp. 11–20. doi: 10.1056/nejmoa1411587.

Bert P. De la greffe animale. Thèse pour le doctorat en médecine. 1863 Aug 8.

Bertrand, T., Lesept, F., Chevilly, A., Lenoir, S., Aimable, M., Briens, A., Hommet, Y., Bardou, I., Parcq, J., & Vivien, D. (2015). Conformations of tissue plasminogen activator (tPA) orchestrate neuronal survival by a crosstalk between EGFR and NMDAR. *Cell Death and Disease*, 6(10), 1–9. <https://doi.org/10.1038/cddis.2015.296>

Brown, N. J., Nadeau, J. H., & Vaughan, D. E. (1997). Selective stimulation of tissue type plasminogen activator (t-PA) in vivo by infusion of bradykinin. *Thrombosis and Haemostasis*, 77(3).

Bhatia, R., Hill, M. D., Shobha, N., Menon, B., Bal, S., Kochar, P., Watson, T., Goyal, M., & Demchuk, A. M. (2010). Low rates of acute recanalization with intravenous recombinant tissue plasminogen activator in ischemic stroke: Real-world experience and a call for action. *Stroke*, 41(10), 2254–2258. <https://doi.org/10.1161/STROKEAHA.110.592535>

Binder, B. R., Spragg, J., & Austen, K. F. (1979). Purification and characterization of human vascular plasminogen activator derived from blood vessel perfusates. *Journal of Biological Chemistry*, 254(6), 1998–2003. [https://doi.org/10.1016/s0021-9258\(17\)37756-6](https://doi.org/10.1016/s0021-9258(17)37756-6)

Blinder, P., Tsai, P. ., Kaufhold, J. ., Knutsen, P. ., Suh, H., & Kleindelf, D. (2013). The cortical angiome: an interconnected vascular network with noncolumnar patterns of blood flow. *Nature Neuroscience*, 16(7), 889–897. <https://doi.org/10.1038/nn.3426>.The

Bliss, T. V. P., & Lømo, T. (1973). Long-lasting potentiation of synaptic transmission in the dentate area of the unanaesthetized rabbit following stimulation of the perforant path. *The Journal of Physiology*, 232(2), 357–374. <https://doi.org/10.1113/jphysiol.1973.sp010274>

Boche, D., Perry, V. H., & Nicoll, J. A. R. (2013). Review: Activation patterns of microglia and their identification in the human brain. *Neuropathology and Applied*

Neurobiology, 39(1), 3–18. <https://doi.org/10.1111/nan.12011>

Boehme, A. ., Esenwa, C., & Elkind, M. S. . (2017). Stroke: Risk factors and prevention. *Journal of the Pakistan Medical Association*, 120(3), 472–495. <https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.116.308398.Stroke>

Bonvento, G., Sibson, N., & Pellerin, L. (2002). Does glutamate image your thoughts? *Trends in Neurosciences*, 25(7), 359–364. [https://doi.org/10.1016/S0166-2236\(02\)02168-9](https://doi.org/10.1016/S0166-2236(02)02168-9)

Borlongan, C. V., Skinner, S. J. M., Geaney, M., Vasconcellos, A. V., Elliott, R. B., & Emerich, D. F. (2004). Intracerebral transplantation of porcine choroid plexus provides structural and functional neuroprotection in a rodent model of stroke. *Stroke*, 35(9), 2206–2210. <https://doi.org/10.1161/01.STR.0000138954.25825.0b>

Bors, L., Tóth, K., Tóth, E. Z., Bajza, Á., Csorba, A., Szigeti, K., Máthé, D., Perlaki, G., Orsi, G., Tóth, G. K., & Erdő, F. (2018). Age-dependent changes at the blood-brain barrier. A Comparative structural and functional study in young adult and middle aged rats. *Brain Research Bulletin*, 139(January), 269–277. <https://doi.org/10.1016/j.brainresbull.2018.03.001>

Bouton, M. C., Boulaftali, Y., Richard, B., Arocas, V., Michel, J. B., & Jandrot-Perrus, M. (2012). Emerging role of serpinE2/protease nexin-1 in hemostasis and vascular biology. *Blood*, 119(11), 2452–2457. <https://doi.org/10.1182/blood-2011-10-387464>

Brass, L. F., Zhu, L., & Stalker, T. J. (2005). Minding the gaps to promote thrombus growth and stability. *Journal of Clinical Investigation*, 115(12), 3385–3392. <https://doi.org/10.1172/JCI26869>

Briers, J. D. (2001). Laser Doppler, speckle and related techniques for blood perfusion mapping and imaging. *Physiological Measurement*, 22(4). <https://doi.org/10.1088/0967-3334/22/4/201>

Brogren, H., Karlsson, L., Andersson, M., Wang, L., Erlinge, D., & Jern, S. (2004). Platelets synthesize large amounts of active plasminogen activator inhibitor 1. *Blood*, 104(13), 3943–3948. <https://doi.org/10.1182/blood-2004-04-1439>

Broughton, B. R. S., Reutens, D. C., & Sobey, C. G. (2009). Apoptotic mechanisms after cerebral ischemia. *Stroke*, 40(5). <https://doi.org/10.1161/STROKEAHA.108.531632>

Bryniarski, M. A., Ren, T., Rizvi, A. R., Snyder, A. M., & Morris, M. E. (2020). Targeting the Choroid Plexuses for Protein Drug Delivery. *Pharmaceutics*, 12(10), 963. <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics12100963>

Bu, G., Williams, S., Strickland, D. K., & Schwartz, A. L. (1992). Low density lipoprotein receptor-related protein/ α 2-macroglobulin receptor is an hepatic receptor for tissue-type plasminogen activator. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 89(16), 7427–7431. <https://doi.org/10.1073/pnas.89.16.7427>

Buck, B. H., Liebeskind, D. S., Saver, J. L., Bang, O. Y., Yun, S. W., Starkman, S., Ali, L. K., Kim, D., Villablanca, J. P., Salamon, N., Razinia, T., & Ovbiagele, B. (2008). Early neutrophilia is associated with volume of ischemic tissue in acute stroke. *Stroke*, 39(2), 355–360. <https://doi.org/10.1161/STROKEAHA.107.490128>

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>

Busija, D. ., Bari, F., Domoki, F., & Louis, T. (2007). Mechanisms Involved in the Cerebrovascular Dilator Effects of N- methyl-D-aspartate in Cerebral Cortex. *Brain Research Reviews*, 56(1), 89–100. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3624763/pdf/nihms412728.pdf>

C

Cacquevel, M., Launay, S., Castel, H., Benchenane, K., Chéenne, S., Buée, L., Moons, L., Delacourte, A., Carmeliet, P., & Vivien, D. (2007). Ageing and amyloid-beta peptide deposition contribute to an impaired brain tissue plasminogen activator activity by different mechanisms. *Neurobiology of Disease*, 27(2), 164–173. <https://doi.org/10.1016/j.nbd.2007.04.004>

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>

Call, J., & Zhang, M. (2015). *Parabiosis Protocol*.

Carbonell, F., Zijdenbos, A. P., McLaren, D. G., Iturria-Medina, Y., & Bedell, B. J. (2016). Modulation of glucose metabolism and metabolic connectivity by β -amyloid. *Journal of Cerebral Blood Flow and Metabolism*, 36(12), 2058–2071. <https://doi.org/10.1177/0271678X16654492>

Carlioni, S., Buonocore, G., & Balduini, W. (2008). Protective role of autophagy in neonatal hypoxia-ischemia induced brain injury. *Neurobiology of Disease*, 32(3), 329–339. <https://doi.org/10.1016/j.nbd.2008.07.022>

Carlioni, 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), 1–11. <https://doi.org/10.1111/jpi.12434>

Carmeliet, P., Schoonjans, L., Kieckens, L., Ream, B., Degen, J., Bronson, R., De Vos, R., Van Den Oord, J. J., Collen, D., & Mulligan, R. C. (1994). Physiological consequences of loss of plasminogen activator gene function in mice. *Nature*, 368(6470), 419–424. <https://doi.org/10.1038/368419a0>

Carro, E., Spuch, C., Trejo, J. L., Antequera, D., & Torres-Aleman, I. (2005). Choroid Plexus Megalin Is Involved in Neuroprotection by Serum Insulin-Like Growth Factor I. *Journal of Neuroscience*, 25(47), 10884–10893. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.2909-05.2005>

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. *Journal of Neuroscience*, 32(15), 5186–5199. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.5296-11.2012>

Chaigneau, E., Tiret, P., Lecoq, J., Ducros, M., Knöpfel, T., & Charpak, S. (2007). The relationship between blood flow and neuronal activity in the rodent olfactory bulb. *Journal of Neuroscience*, 27(24), 6452–6460. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.3141-06.2007>

Chandler WL, Alessi MC, Aillaud MF, Henderson P, Vague P, and Juhan-Vague I (1997) Clearance of Tissue Plasminogen Activator (TPA) and TPA/Plasminogen Activator Inhibitor Type 1 (PAI-1) Complex Circulation 96, 761–768.

Chang, D. Il, Hosomi, N., Lucero, J., Heo, J. H., Abumiya, T., Mazar, A. P., & Del Zoppo, G. J. (2003). Activation Systems for Latent Matrix Metalloproteinase-2 Are Upregulated Immediately after Focal Cerebral Ischemia. *Journal of Cerebral Blood Flow and Metabolism*, 23(12), 1408–1419. <https://doi.org/10.1097/01.WCB.0000091765.61714.30>

Chapin, J. C., & Hajjar, K. A. (2015). Fibrinolysis and the control of blood coagulation John NIH Public Access. *Blood Reviews*, 29(1), 17–24. <https://doi.org/10.1016/j.blre.2014.09.003>.Fibrinolysis

Chen, B.R., Kozberg, M.G., Bouchard, M.B., Shaik, M.A., Hillman, E.M.C., 2014. A Critical Role for the Vascular Endothelium in Functional Neurovascular Coupling in the Brain. *J. Am. Heart Assoc.* 3, e000787. doi:10.1161/JAHA.114.000787

Chen, C., Bivard, A., Lin, L., Levi, C. R., Spratt, N. J., & Parsons, M. W. (2019). Thresholds for infarction vary between gray matter and white matter in acute ischemic stroke: A CT perfusion study. *Journal of Cerebral Blood Flow and Metabolism*, 39(3), 536–546. <https://doi.org/10.1177/0271678X17744453>

Cheng, J.-W., Zhang, X.-J., Cheng, L.-S., Li, G.-Y., Zhang, L.-J., Ji, K.-X., Zhao, Q., & Bai, Y. (2018). Low-Dose Tissue Plasminogen Activator in Acute Ischemic Stroke: A

Systematic Review and Meta-Analysis. *Journal of Stroke and Cerebrovascular Diseases*, 27(2), 381–390. <https://doi.org/10.1016/j.jstrokecerebrovasdis.2017.09.014>

Cheng, T., Petraglia, A. L., Li, Z., Thiagarajan, M., Zhong, Z., Wu, Z., Liu, D., Maggirwar, S. B., Deane, R., Fernández, J. A., LaRue, B., Griffin, J. H., Chopp, M., & Zlokovic, B. V. (2006). Activated protein C inhibits tissue plasminogen activator-induced brain hemorrhage. *Nature Medicine*, 12(11), 1278–1285. <https://doi.org/10.1038/nm1498>

Chevilly, A. *et al.* (2015) 'Impacts of tissue-type plasminogen activator(tPA) on neuronal survival', *Frontiers in Cellular Neuroscience*, 9(OCTOBER). doi: 10.3389/fncel.2015.00415.

Choi, Y. H., & Paik, N. J. (2018). Mobile game-based virtual reality program for upper extremity stroke rehabilitation. *Journal of Visualized Experiments*, 2018(133), 1–8. <https://doi.org/10.3791/56241>

Chun, J. T., Wang, L., Pasinetti, G. M., Finch, C. E., & Zlokovic, B. V. (1999). Glycoprotein 330/Megalin (LRP-2) Has Low Prevalence as mRNA and Protein in Brain Microvessels and Choroid Plexus. *Experimental Neurology*, 157(1), 194–201. <https://doi.org/10.1006/exnr.1999.7052>

Cipolla, M. J., Lessov, N., & Clark, W. M. (2000). Postischemic attenuation of cerebral artery reactivity is increased in the presence of tissue plasminogen activator. *Stroke*, 31(4), 940–945. <https://doi.org/10.1161/01.STR.31.4.940>

Cipolla, M.J., 2009. The Cerebral Circulation. Morgan & Claypool Life Sciences.

Citri, A. and Malenka, R. C. (2008) 'Synaptic plasticity: Multiple forms, functions, and mechanisms', *Neuropsychopharmacology*, 33(1), pp. 18–41. doi: 10.1038/sj.npp.1301559.

Cleary, C. M., Moreira, T. S., Takakura, A. C., Nelson, M. T., Longden, T. A., & Mulkey, D. K. (2020). Vascular control of the CO₂/H⁺- dependent drive to breathe. *ELife*, 9, 1–23. <https://doi.org/10.7554/ELIFE.59499>

Coburn, R. F. (2020). Coronary and cerebral metabolism-blood flow coupling and pulmonary alveolar ventilation-blood flow coupling may be disabled during acute carbon monoxide poisoning. *Journal of Applied Physiology*, 129(5), 1039–1050. <https://doi.org/10.1152/jappphysiol.00172.2020>

Coisne, C., & Engelhardt, B. (2011). Tight Junctions in Brain Barriers During Central Nervous System Inflammation. *Antioxidants & Redox Signaling*, 15(5), 1285–1303. <https://doi.org/10.1089/ars.2011.3929>

Coleman, D. L., & Hummel, K. P. (1969). Effects of parabiosis of normal with genetically diabetic mice. *The American Journal of Physiology*, 217(5), 1298–1304. <https://doi.org/10.1152/ajplegacy.1969.217.5.1298>

- Coleman, Douglas L. (2010). A historical perspective on leptin. *Nature Medicine*, 16(10), 1097–1099. <https://doi.org/10.1038/nm1010-1097>
- 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>
- Collen, D., Lu, H. R., Lijnen, H. R., Nelles, L., & Stassen, J. M. (1991). Thrombolytic and pharmacokinetic properties of chimeric tissue-type and urokinase-type plasminogen activators. *Circulation*, 84(3), 1216–1234. <https://doi.org/10.1161/01.CIR.84.3.1216>
- Collingridge, G. ., Kehl, S. ., & H, M. (1983). Excitatory amino acids in synaptic transmission in the shaffer collateral-commissural pathway of the rat hippocampus. *The Journal of Physiology*, 334(334), 33–46. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1197298/pdf/jphysiol00666-0045.pdf%0Ahttp://medcontent.metapress.com/index/A65RM03P4874243N.pdf>
- Conboy, I. M., & Rando, T. A. (2012). Heterochronic parabiosis for the study of the effects of aging on stem cells and their niches. *Cell Cycle*, 11(12), 2260–2267. <https://doi.org/10.4161/cc.20437>
- Conboy, M. J., Conboy, I. M., & Rando, T. A. (2013). Heterochronic parabiosis: historical perspective and methodological considerations for studies of aging and longevity. *Aging Cell*, 12(3), 525–530. <https://doi.org/10.1111/accel.12065>
- Conese, M., Carbone, A., Beccia, E., & Angiolillo, A. (2017). The Fountain of Youth: A tale of parabiosis, stem cells, and rejuvenation. *Open Medicine (Poland)*, 12(1), 376–383. <https://doi.org/10.1515/med-2017-0053>
- Conradi, H., 1902. Über die Beziehung der Autolyse zur Blutgerinnung. *Beitr Chem Physiol Path* 1, 136.
- Copin, J. C., & Gasche, Y. (2003). [Morphology and physiology of the blood-brain barrier]. *Ann Fr Anesth Reanim*, 22(3), 202–214. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt= Citation&list_uids=12747988
- 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. *Journal of Experimental Medicine*, 208(6), 1229–1242. <https://doi.org/10.1084/jem.20101880>
- Cortes-Canteli, M., & Iadecola, C. (2020). Alzheimer's Disease and Vascular Aging: JACC Focus Seminar. *Journal of the American College of Cardiology*, 75(8), 942–951. <https://doi.org/10.1016/j.jacc.2019.10.062>
- Crissey, P., Miller, M. C., Chiu, C., Boylan, M., Caralopoulos, I. N., Gonzalez, L.,

Johanson, C. E., & Silverberg, G. D. (2011). Amyloid-beta transporter expression at the blood-CSF barrier is age-dependent. *Fluids and Barriers of the CNS*, 8(1), 21. <https://doi.org/10.1186/2045-8118-8-21>

D

da Costa, P. L. N., Sirois, P., Tannock, I. F., & Chammas, R. (2014). The role of kinin receptors in cancer and therapeutic opportunities. *Cancer Letters*, 345(1), 27–38. <https://doi.org/10.1016/j.canlet.2013.12.009>

Dai, S. H., Chen, T., Li, X., Yue, K. Y., Luo, P., Yang, L. K., Zhu, J., Wang, Y. H., Fei, Z., & Jiang, X. F. (2017). Sirt3 confers protection against neuronal ischemia by inducing autophagy: Involvement of the AMPK-mTOR pathway. *Free Radical Biology and Medicine*, 108(August 2016), 345–353. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2017.04.005>

Dandy, W. E., & Blackfan, K. D. (1919). INTERNAL HYDROCEPHALUS. *Journal of Neurosurgery*, 21(7), 588–635. <https://doi.org/10.3171/jns.1964.21.7.0588>

Daneman, R. (2012). The blood-brain barrier in health and disease. *Annals of Neurology*, 72(5), 648–672. <https://doi.org/10.1002/ana.23648>

Dastre, A., 1893. Fibrinolyse dans le sang. *Arch Norm Pathol* 5, 661

de Pouvourville, G. (2016). Coût de la prise en charge des accidents vasculaires cérébraux en France. *Archives of Cardiovascular Diseases Supplements*, 8(2), 161–168. [https://doi.org/10.1016/S1878-6480\(16\)30330-5](https://doi.org/10.1016/S1878-6480(16)30330-5)

Denys, De Marbaix, 1889. Les peptonisations provoquées par le chloroforme. *Cell. Recl. Cytol. Histol.* 5, 197.

Di Meglio, L., Desilles, J. P., Ollivier, V., Nomenjanahary, M. S., Di Meglio, S., Deschildre, C., Loyau, S., Olivot, J. M., Blanc, R., Piotin, M., Bouton, M. C., Michel, J. B., Jandrot-Perrus, M., Ho-Tin-Noé, B., & Mazighi, M. (2019). Acute ischemic stroke thrombi have an outer shell that impairs fibrinolysis. *Neurology*, 93(18), E1686–E1698. <https://doi.org/10.1212/WNL.0000000000008395>

Diamond, S. L., Sharefkin, J. B., Dieffenbach, C., Frasier-Scott, K., McIntire, L. V., & Eskin, S. G. (1990). Tissue plasminogen activator messenger RNA levels increase in cultured human endothelial cells exposed to laminar shear stress. *Journal of Cellular Physiology*, 143(2), 364–371. <https://doi.org/10.1002/jcp.1041430222>

- Dietzmann, K., Bossanyi, P. V., Krause, D., Wittig, H., Mawrin, C., & Kirches, E. (2000). Expression of the plasminogen activator system and the inhibitors PAI-1 and PAI-2 in posttraumatic lesions of the CNS and brain injuries following dramatic circulatory arrests: An immunohistochemical study. *Pathology Research and Practice*, 196(1), 15–21. [https://doi.org/10.1016/S0344-0338\(00\)80017-5](https://doi.org/10.1016/S0344-0338(00)80017-5)
- Dionísio, A., Duarte, I. C., Patrício, M., & Castelo-Branco, M. (2018). The Use of Repetitive Transcranial Magnetic Stimulation for Stroke Rehabilitation: A Systematic Review. *Journal of Stroke and Cerebrovascular Diseases*, 27(1), 1–31. <https://doi.org/10.1016/j.jstrokecerebrovasdis.2017.09.008>
- 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- β 1 as a regulator of the serpins/t-PA axis in cerebral ischemia. *The FASEB Journal*, 13(11), 1315–1324. <https://doi.org/10.1096/fasebj.13.11.1315>
- Dohrmann, G. . (1970). The choroid plexus: A historical review. *Brain Research*, 18(2), 197–218. [https://doi.org/10.1016/0006-8993\(70\)90324-0](https://doi.org/10.1016/0006-8993(70)90324-0)
- Douceau, S., Lemarchand, E., Hommet, Y., Lebouvier, L., Joséphine, C., Bemelmans, A. P., Maubert, E., Agin, V., & Vivien, D. (2022). PKC δ -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>
- Dougherty, K. M., Pearson, J. M., Yang, A. Y., Westrick, R. J., Baker, M. S., & Ginsburg, D. (1999). The plasminogen activator inhibitor-2 gene is not required for normal murine development or survival. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 96(2), 686–691. <https://doi.org/10.1073/pnas.96.2.686>
- 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>
- Drapeau, G., Rhaleb, N. E., Dion, S., Jukic, D., & Regoli, D. (1988). [Phe δ ψ (CH $_2$ -NH)Arg 9]bradykinin, a B $_2$ receptor selective agonist which is not broken down by either kininase I or kininase II. *European Journal of Pharmacology*, 155(1–2), 193–195. [https://doi.org/10.1016/0014-2999\(88\)90423-2](https://doi.org/10.1016/0014-2999(88)90423-2)
- Dreier, J. P., Reiffurth, C., Woitzik, J., Hartings, J. A., Drenckhahn, C., Windler, C., Friedman, A., Macvicar, B., & Herreras, O. (2015). How spreading depolarization can be the pathophysiological correlate of both migraine aura and stroke. *Acta*

Neurochirurgica, Supplementum, 120, 137–140. https://doi.org/10.1007/978-3-319-04981-6_23

Dreier, R., Schmid, K. W., Gerke, V., & Riehemann, K. (1998). Differential expression of annexins I, II and IV in human tissues: An immunohistochemical study. *Histochemistry and Cell Biology*, 110(2), 137–148. <https://doi.org/10.1007/s004180050275>

Drieu, A., Levard, D., Vivien, D., & Rubio, M. (2018). Anti-inflammatory treatments for stroke: from bench to bedside. *Therapeutic Advances in Vaccines*, 11, 1–15. <https://doi.org/10.1177/https>

Du, L., Yu, R. ., Hua, Z. ., & Zhu, D. . (1993). Hybridization to an Anti-activated Platelet Monoclonal Antibody Enhances Fibrinolytic Potency on Urokinase. *Science in China*, 36(12).

Dubois, C., Panicot-Dubois, L., Gainor, J. F., Furie, B. C., & Furie, B. (2007). Thrombin-initiated platelet activation in vivo is vWF independent during thrombus formation in a laser injury model. *Journal of Clinical Investigation*, 117(4), 953–960. <https://doi.org/10.1172/JCI30537>

Duling, B. ., & Berne, R. . (1970). Longitudinal Gradients in Periarteriolar Oxygen Tension. *Circulation Research*, 27(5), 669–678. <https://doi.org/10.1161/01.res.27.5.669>

Dyrna, F. *et al.* (2013) ‘The blood-brain barrier’, *Journal of Neuroimmune Pharmacology*, 8(4), pp. 763–773. doi: 10.1007/s11481-013-9473-5.

E

Echeverry, R., Wu, J., Haile, W. ., Guzman, J., & Tepes, M. (2010). Tissue-type plasminogen activator is a neuroprotectant in the central nervous system. *The Journal of Clinical Investigation*, 120(6), 2194–2205. <https://doi.org/10.3389/fncel.2015.00304>

Edvinsson, L., Hamel, E., 2002. Perivascular nerves in brain vessels. *Cereb. Blood Flow Metab.* 43–67.

Edvinsson, L., Krause, D.N., 2002. Cerebral blood flow and metabolism. *Eur. J. Neurol.* 9, 550– 550.

El Amki, M., Lerouet, D., Coqueran, B., Curis, E., Orset, C., Vivien, D., Plotkine, M., Marchand-Leroux, C., & Margail, I. (2012). Experimental modeling of recombinant tissue plasminogen activator effects after ischemic stroke. *Experimental Neurology*, 238(2), 138–144. <https://doi.org/10.1016/j.expneurol.2012.08.005>

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 ϵ -dependent Apaf-1 inhibition article. *Cell Death and Disease*, 9(3), 1–12. <https://doi.org/10.1038/s41419-018-0408-1>

Eltzschig, H. ., & Eckle, T. (2011). Ischemia and reperfusion—from mechanism to translation Holger. *Nature Medicine*, 17(11), 1–26. <https://doi.org/10.1038/nm.2507.Ischemia>

Emeis, J. J., Van Den Eijnden-Schrauwen, Y., Van Den Hoogen, C. M., De Priester, W., Westmuckett, A., & Lupu, F. (1997). An endothelial storage granule for tissue-type plasminogen activator. *Journal of Cell Biology*, 139(1), 245–256. <https://doi.org/10.1083/jcb.139.1.245>

Eggel, A. and Wyss-Coray, T. (2014) ‘A revival of parabiosis in biomedical research’, *Swiss Medical Weekly*, 144, pp. 1–12. doi: 10.4414/smw.2014.13914.

Engelhardt, B, Wolburg-Buchholz, K., & Wolburg, H. (2001). Involvement of the Choroid Plexus in Central Nervous System Inflammation. *Microscopy Research and Technique*, 52(1), 112–129. <http://ovidsp.ovid.com/ovidweb.cgi?T=JS&PAGE=reference&D=emed5&NEWS=N&AN=2001033227>

Engelhardt, Britta, & Ransohoff, R. M. (2012). Capture, crawl, cross: The T cell code to breach the blood-brain barriers. *Trends in Immunology*, 33(12), 579–589. <https://doi.org/10.1016/j.it.2012.07.004>

Engelhardt, Britta, & Sorokin, L. (2009). The blood–brain and the blood–cerebrospinal fluid barriers: function and dysfunction. *Seminars in Immunopathology*, 31(4), 497–511. <https://doi.org/10.1007/s00281-009-0177-0>

Engelhardt, S., Huang, S., Patkar, S., Gassmann, M., & Ogunshola, O. O. (2015). *Differential responses of blood-brain barrier associated cells to hypoxia and ischemia: a comparative study*. 1–16.

F

Fabiani, M., Gordon, B. ., Maclin, E. ., Pearson, M. ., Brumback-Peltz, C. ., Low, K. ., McAuley, E., Sutton, B. ., Kramer, A. ., & Gratton, G. (2014). Neurovascular coupling in normal aging: A combined optical, ERP and fMRI study. *Neuroi*, 85(1).

<https://doi.org/10.1016/j.neuroimage.2013.04.113>. Neurovascular

Falasca, M., Raimondi, C., & Maffucci, T. (2011). Boyden chamber. *Methods in Molecular Biology*, 769(4), 87–95. https://doi.org/10.1007/978-1-61779-207-6_7

Feigin, V. L., Forouzanfar, M. H., Krishnamurthi, R., Mensah, G. A., Bennett, D. A., Moran, A. E., Sacco, R. L., Anderson, L., Donnell, M. O., Venketasubramanian, N., Barker-collo, S., Lawes, C. M. M., Wang, W., Shinohara, Y., Witt, E., & Ezzati, M. (2014). *from the Global Burden of Disease Study 2010*. 383(9913), 245–254.

Feigin, V. L., Nichols, E., Alam, T., Bannick, M. S., Beghi, E., Blake, N., Culpepper, W. J., Dorsey, E. R., Elbaz, A., Ellenbogen, R. G., Fisher, J. L., Fitzmaurice, C., Giussani, G., Glennie, L., James, S. L., Johnson, C. O., Kassebaum, N. J., Logroscino, G., Marin, B., ... Vos, T. (2019). Global, regional, and national burden of neurological disorders, 1990–2016: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2016. *The Lancet Neurology*, 18(5), 459–480. [https://doi.org/10.1016/S1474-4422\(18\)30499-X](https://doi.org/10.1016/S1474-4422(18)30499-X)

Feigin, V. L. *et al.* (2019) ‘Global, regional, and national burden of neurological disorders, 1990–2016: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2016’, *The Lancet Neurology*, 18(5), pp. 459–480. doi: 10.1016/S1474-4422(18)30499-X.

Feigin, V. L. *et al.* (2021) ‘Global, regional, and national burden of stroke and its risk factors, 1990–2019: A systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2019’, *The Lancet Neurology*, 20(10), pp. 1–26. doi: 10.1016/S1474-4422(21)00252-0.

Fernandes, B. F. S., & Caramelli, P. (2019). Ischemic stroke and infectious diseases in low-income and middle-income countries. *Current Opinion in Neurology*, 32(1), 43–48. <https://doi.org/10.1097/WCO.0000000000000641>

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>

Ficher, U., Kaesmacher, J., Plattne, P., Butikofer, L., Mordasini, P., Deppeler, S., Cognard, C., Pereira, V.M., Siddiqui, A.H., Froehler, M.T., Furla, A.J., Chapot, R., Strbian, D., Wiesmann, M., Bressan, J., Lerch, S., Liebeskind, D.S., Saver, J.L., Gralla, J., SWIFT DDIRECT study investigator (2022). *SWIFT DIRECT: Solitaire™ With the Intention For Thrombectomy Plus Intravenous t-PA Versus DIRECT Solitaire™ Stent-retriever Thrombectomy in Acute Anterior Circulation Stroke: Methodology of a randomized, controlled, multicentre study*. *International Journal of Stroke*, 17(6) :698-705. <https://doi.org/10.1177/17474930211048768>

Filosa, J. A., Bonev, A. D., Straub, S. V., Meredith, A. L., Wilkerson, M. K., Aldrich, R. W., & Nelson, M. T. (2006). Local potassium signaling couples neuronal activity to vasodilation in the brain. *Nature Neuroscience*, 9(11), 1397–1403.

<https://doi.org/10.1038/nn1779>

Finerty JC, Panos TC. Parabiosis Intoxication. *Experimental Biology and Medicine*. 1951 Apr 1;76(4):833–5.

Flavin, M. ., Zhao, G., & Ho, L. . (2000). Microglial Tissue Plasminogen Activator (tPA) Triggers Neuronal Apoptosis In Vitro. *Glia*, 29, 347–354.

Fowler, M., Cotter, J., Knight, B., Sevic-Muraca, E., Sandberg, D., & Sirianni, R. (2020). Intrathecal Drug Delivery in the Era of Nanomedicine M. In *Physiology & behavior*. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2020.02.006>. Intrathecal

Fredrickson, B. J., Dong, J. F., McIntire, L. V., & López, J. A. (1998). Shear-dependent rolling on von Willebrand factor of mammalian cells expressing the platelet glycoprotein Ib-IX-V complex. *Blood*, 92(10), 3684–3693. <https://doi.org/10.1182/blood.v92.10.3684>

Fredriksson, L., Li, H., Fieber, C., Li, X., & Eriksson, U. (2004). Tissue plasminogen activator is a potent activator of PDGF-CC. *EMBO Journal*, 23(19), 3793–3802. <https://doi.org/10.1038/sj.emboj.7600397>

Fugate, J. E., Klunder, A. M., & Kallmes, D. F. (2013). *Fugate, Klunder, Kallmes - 2013 - What is meant by TICI*.

Fujiyoshi, M., Tachikawa, M., Ohtsuki, S., Ito, S., Uchida, Y., Akanuma, S., Kamiie, J., Hashimoto, T., Hosoya, K., Iwatsubo, T., & Terasaki, T. (2011). Amyloid- β peptide(1-40) elimination from cerebrospinal fluid involves low-density lipoprotein receptor-related protein 1 at the blood-cerebrospinal fluid barrier. *Journal of Neurochemistry*, 118(3), 407–415. <https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.2011.07311.x>

Furie, B., & Furie, B. C. (2008). Mechanisms of thrombus formation. *Mechanisms of Disease. The New England Journal of Medicine*, 359(9), 938–949. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18753650>

Furlan, M., Marchai, G., Viader, F., Derlon, J. M., & Baron, J. C. (1996). Spontaneous neurological recovery after stroke and the fate of the ischemic penumbra. *Annals of Neurology*, 40(2), 216–226. <https://doi.org/10.1002/ana.410400213>

G

Gao, B., Kilic, E., Baumann, C. R., Hermann, D. M., & Bassetti, C. L. (2008). Gamma-hydroxybutyrate accelerates functional recovery after focal cerebral ischemia. *Cerebrovascular Diseases*, 26(4), 413–419. <https://doi.org/10.1159/000151683>

García-Rocha, M., Avila, J., & Armas-Portela, R. (1994). Tissue-type plasminogen activator (tPA) is the main plasminogen activator associated with isolated rat nerve growth cones. *Neuroscience Letters*, 180(2), 123–126. [https://doi.org/10.1016/0304-3940\(94\)90502-9](https://doi.org/10.1016/0304-3940(94)90502-9)

Gauberti, M., Martinez de Lizarrondo, S., & Vivien, D. (2021). Thrombolytic strategies for ischemic stroke in the thrombectomy era. *Journal of Thrombosis and Haemostasis*, 19(7), 1618–1628. <https://doi.org/10.1111/jth.15336>

Ge, R., Tornero, D., Hirota, M., Monni, E., Laterza, C., Lindvall, O., & Kokaia, Z. (2017). Choroid plexus-cerebrospinal fluid route for monocyte-derived macrophages after stroke. *Journal of Neuroinflammation*, 14(1), 1–15. <https://doi.org/10.1186/s12974-017-0909-3>

Gherzi-Egea, J.-F., Strazielle, N., Catala, M., Silva-Vargas, V., Doetsch, F., & Engelhardt, B. (2018). Molecular anatomy and functions of the choroidal blood-cerebrospinal fluid barrier in health and disease. *Acta Neuropathologica*, 135(3), 337–361. <https://doi.org/10.1007/s00401-018-1807-1>

Gidday, J. M., Gasche, Y. G., Copin, J. C., Shah, A. R., Perez, R. S., Shapiro, S. D., Chan, P. H., & Park, T. S. (2005). Leukocyte-derived matrix metalloproteinase-9 mediates blood-brain barrier breakdown and is proinflammatory after transient focal cerebral ischemia. *American Journal of Physiology - Heart and Circulatory Physiology*, 289(2 58-2), 558–568. <https://doi.org/10.1152/ajpheart.01275.2004>

Ginet, V., Puyal, J., Clarke, P. G. H., & Truttmann, A. C. (2009). Enhancement of autophagic flux after neonatal cerebral hypoxia-ischemia and its region-specific relationship to apoptotic mechanisms. *American Journal of Pathology*, 175(5), 1962–1974. <https://doi.org/10.2353/ajpath.2009.090463>

Gloor, S., Odink, K., Guenther, J., & Monard, D. (1986). A Glia-Derived Neurite Promoting with Protease Inhibitory Activity Belongs to the Protease Nexins. *Cell*, 47, 687–693.

Girouard, H., & Iadecola, C. (2006). Neurovascular coupling in the normal brain and

in hypertension, stroke, and Alzheimer disease. *Journal of Applied Physiology*, 100(1), 328–335. <https://doi.org/10.1152/japplphysiol.00966.2005>

Gonias, S. L. (2019) 'Hepatocyte tPA: Where have you been hiding?', *Blood*, 133(7), pp. 631–632. doi: 10.1182/blood-2018-12-891515.

Goulay, R., Naveau, M., Gaberel, T., Vivien, D., & Parcq, J. (2018). Optimized tPA: A non-neurotoxic fibrinolytic agent for the drainage of intracerebral hemorrhages. *Journal of Cerebral Blood Flow and Metabolism*, 38(7), 1180–1189. <https://doi.org/10.1177/0271678X17719180>

Gualandris, A., Jones, T. E., Strickland, S., & Tsirka, S. E. (1996). Membrane depolarization induces calcium-dependent secretion of tissue plasminogen activator. *Journal of Neuroscience*, 16(7), 2220–2225. <https://doi.org/10.1523/jneurosci.16-07-02220.1996>

Gupta, A., Tsai, L. H., & Wynshaw-Boris, A. (2002). Life is a journey: A genetic look at neocortical development. *Nature Reviews Genetics*, 3(5), 342–355. <https://doi.org/10.1038/nrg799>

Gveric, D., Hanemaaijer, R., Newcombe, J., Van Lent, N. A., Sier, C. F. M., & Cuzner, M. L. (2001). Plasminogen activators in multiple sclerosis lesions implications for the inflammatory response and axonal damage. *Brain*, 124(10), 1978–1988. <https://doi.org/10.1093/brain/124.10.1978>

Gverić, D., Herrera, B., Petzold, A., Lawrence, D. A., & Cuzner, M. L. (2003). Impaired fibrinolysis in multiple sclerosis: A role for tissue plasminogen activator inhibitors. *Brain*, 126(7), 1590–1598. <https://doi.org/10.1093/brain/awg167>

H

Hacke, W., Lyden, P., Emberson, J., Baigent, C., Blackwell, L., Albers, G., Bluhmki, E., Brott, T., Cohen, G., Davis, S. M., Donnan, G. A., Grotta, J. C., Howard, G., Kaste, M., Koga, M., von Kummer, R., Lansberg, M. G., Lindley, R. I., Olivot, J.-M., ... Lees, K. R. (2018). Effects of alteplase for acute stroke according to criteria defining the European Union and United States marketing authorizations: Individual-patient-data meta-analysis of randomized trials. *International Journal of Stroke*, 13(2), 175–189. <https://doi.org/10.1177/1747493017744464>

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)

Hall CE, Hall O. On the nature of parabiosis intoxication: shock as the precipitating cause. *J Exp Med*. 1956 Feb 1; 103(2):263–72. [PubMed: 13286431]

Hanzel, C. E., Iulita, M. F., Eyjolfsdottir, H., Hjorth, E., Schultzberg, M., Eriksdotter, M., & Cuello, A. C. (2014). Analysis of Matrix Metallo-Proteases and the Plasminogen System in Mild Cognitive Impairment and Alzheimer's Disease Cerebrospinal Fluid. *Journal of Alzheimer's Disease*, 40(3), 667–678. <https://doi.org/10.3233/JAD-132282>

Harris, R. (2013). Contribution made by parabiosis to the understanding of energy balance regulation. *Biochim Biophys Acta*, 1832(9), 1449–1455. <https://doi.org/10.1016/j.bbadis.2013.02.021>.Contribution

Hartman, D. ., Berthiaume, A. ., Grant, R. ., Grant, R. ., Harril, S. ., Koski, T., Tieu, T., McDowell, K. ., Faino, A. ., Kelly, A. ., & Shih, A. . (2021). Brain capillary pericytes exert a substantial but slow influence on blood flow. *Nature Neuroscience*, 24(5), 633–345. <https://doi.org/10.1038/s41593-020-00793-2>.Brain

Hartmann, D. A., Underly, R. G., Watson, A. N., & Shih, A. Y. (2015). A murine toolbox for imaging the neurovascular unit. *Microcirculation*, 22(3), 168–182. <https://doi.org/10.1111/micc.12176>

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. *Journal of Biological Chemistry*, 272(52), 33062–33067. <https://doi.org/10.1074/jbc.272.52.33062>

Head, B. ., Patel, H. ., Niesman, I. ., Drummond, J. ., Roth, D. ., & Patel, M. . (2009). NIH Public Access Author Manuscript Anesthesiology. Author manuscript; available in PMC 2010 April 1. Published in final edited form as: Anesthesiology. 2009 April ; 110(4): 813–825. doi:10.1097/ALN.0b013e31819b602b. Inhibition of p75 Neurotrophin Recepto. *Anesthesiology*, 110(4), 813–825. <https://doi.org/10.1097/ALN.0b013e31819b602b>.Inhibition

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>

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>

Heiss, W. D. (2014). Radionuclide imaging in ischemic stroke. *Journal of Nuclear Medicine*, 55(11), 1831–1841. <https://doi.org/10.2967/jnumed.114.145003>

Heiss, W., Kracht, L. W., Thiel, A., Grond, M., & Pawlik, G. (2001). <Wolf Dieter Heiss 2001. Pneumbral probability thresholds of cortical flumzenil binding and blood flow predicting tissue outcome in pateints with cerebral ischemia.pdf>. 20–29.

Hingot, V., Brodin, C., Lebrun, F., Heiles, B., Chagnot, A., Yetim, M., Gauberti, M., Orset, C., Tanter, M., Couture, O., Deffieux, T., & Vivien, D. (2020). Early ultrafast ultrasound imaging of cerebral perfusion correlates with ischemic stroke outcomes and responses to treatment in mice. *Theranostics*, 10(17), 7480–7491. <https://doi.org/10.7150/thno.44233>

Hino, H., Akiyama, H., Iseki, E., Kato, M., Kondo, H., Ikeda, K., & Kosaka, K. (2001). Immunohistochemical localization of plasminogen activator inhibitor-1 in rat and human brain tissues. *Neuroscience Letters*, 297(2), 105–108. [https://doi.org/10.1016/S0304-3940\(00\)01679-7](https://doi.org/10.1016/S0304-3940(00)01679-7)

Holmes, W. E., Nelles, L., Lijnen, H. R., & Collen, D. (1987). Primary structure of human $\alpha 2$ -antiplasmin, a serine protease inhibitor (serpin). *Journal of Biological Chemistry*, 262(4), 1659–1664. [https://doi.org/10.1016/s0021-9258\(19\)75687-7](https://doi.org/10.1016/s0021-9258(19)75687-7)

Hori, T., Ohashi, N., Chen, F., Baine, A. M. T., Gardner, L. B., Hata, T., Uemoto, S., & Nguyen, J. H. (2012). Simple and reproducible hepatectomy in the mouse using the clip technique. *World Journal of Gastroenterology*, 18(22), 2767–2774. <https://doi.org/10.3748/wjg.v18.i22.2767>

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>

Hossmann, K.-A., 1996. Excitotoxic mechanisms in focal ischemia. *Adv. Neurol.* 71, 69–74

Hoylaerts, M. F., Yamamoto, H., Nuyts, K., Vreys, I., Deckmyn, H., & Vermynen, J. (1997). Von Willebrand factor binds to native collagen VI primarily via its A1 domain. *Biochemical Journal*, 324(1), 185–191. <https://doi.org/10.1042/bj3240185>

Hoylaerts, M., Rijken, D. C., Lijnen, H. R., & Collen, D. (1982). Kinetics of the activation of plasminogen by human tissue plasminogen activator. Role of fibrin. *Journal of Biological Chemistry*, 257(6), 2912–2919. [https://doi.org/10.1016/s0021-9258\(19\)81051-7](https://doi.org/10.1016/s0021-9258(19)81051-7)

- Huang, T., Larsen, K. T., Ried-Larsen, M., Møller, N. C., & Andersen, L. B. (2014). The effects of physical activity and exercise on brain-derived neurotrophic factor in healthy humans: A review. *Scandinavian Journal of Medicine and Science in Sports*, 24(1), 1–10. <https://doi.org/10.1111/sms.12069>
- Huber, D., Cramer, E. M., Kaufmann, J. E., Meda, P., Massé, J. M., Kruithof, E. K. O., & Vischer, U. M. (2002). Tissue-type plasminogen activator (t-PA) is stored in Weibel-Palade bodies in human endothelial cells both in vitro and in vivo. *Blood*, 99(10), 3637–3645. <https://doi.org/10.1182/blood.V99.10.3637>
- Huber, J. D., Egleton, R. D., & Davis, T. P. (2001). Molecular physiology and pathophysiology of tight junctions in the blood–brain barrier. *Trends in Neurosciences*, 24(12), 719–725. [https://doi.org/10.1016/S0166-2236\(00\)02004-X](https://doi.org/10.1016/S0166-2236(00)02004-X)
- 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>
- Huntington, J. A., Read, R. J., & Carrell, R. W. (2000). Structure of a serpin-protease complex shows inhibition by deformation. *Nature*, 407(6806), 923–926. <https://doi.org/10.1038/35038119>
- 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), 1266–1274. <https://doi.org/10.1136/gut.2006.097188>

I

- Iadecola, Constantino. (2017). The neurovascular unit coming of age: a journey through neurovascular coupling in health and disease Costantino 96(1): 17–42. doi:10.1016/j.neuron.2017.07.030. The neurovascular unit coming of age: a journe. *Physiology & Behavior*, 176(1), 1–53. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2017.07.030>.The
- Iadecola, Costantino, & Anrather, J. (2012). N-terminal α -Dystroglycan (α aDG-N): A Potential Serum Biomarker for Duchenne Muscular Dystrophy. 17(7), 796–808. <https://doi.org/10.1038/nm.2399>.The
- Ichinose, A., Kisiel, 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)

Ikbali Afsar, S., Mirzayev, I., Umit Yemisci, O., & Cosar Saracgil, S. N. (2018). Virtual Reality in Upper Extremity Rehabilitation of Stroke Patients: A Randomized Controlled Trial. *Journal of Stroke and Cerebrovascular Diseases*, 27(12), 3473–3478. <https://doi.org/10.1016/j.jstrokecerebrovasdis.2018.08.007>

Iriki, A., Pavlides, C., Keller, A., & Asanuma, H. (1989). Long-term potentiation in the motor cortex. *Science*, 245(4924), 1385–1387. <https://doi.org/10.1126/science.2551038>

Izcovich, A., Criniti, J. M., Popoff, F., Lu, L., Wu, J., Ageno, W., Witt, D. M., Jaff, M. R., Schulman, S., Manja, V., Verhamme, P., Rada, G., Zhang, Y., Nieuwlaat, R., Wiercioch, W., Schünemann, H. J., & Neumann, I. (2020). Thrombolytics for venous thromboembolic events: a systematic review with meta-analysis. *Blood Advances*, 4(7), 1539–1553. <https://doi.org/10.1182/bloodadvances.2020001513>

J

Jackson, S. P., Nesbitt, W. S., & Westein, E. (2009). Dynamics of platelet thrombus formation. *Journal of Thrombosis and Haemostasis*, 7(SUPPL. 1), 17–20. <https://doi.org/10.1111/j.1538-7836.2009.03401.x>

Jamieson, J. J., Searson, P. C. and Gerecht, S. (2017) ‘Engineering the human blood-brain barrier in vitro’, *Journal of Biological Engineering*, 11(1), pp. 1–11. doi: 10.1186/s13036-017-0076-1.

Jensen, J. K., Dolmer, K., Schar, C., & Gettins, P. G. W. (2009). Receptor-associated protein (RAP) has two high-affinity binding sites for the low-density lipoprotein receptor-related protein (LRP): Consequences for the chaperone functions of RAP. *Biochemical Journal*, 421(2), 273–282. <https://doi.org/10.1042/BJ20090175>

Jessen, N. ., Finmann Munk, A. ., Lundgaard, I., & Nedergaard, M. (2015). The Glymphatic System – A Beginner’s Guide Nadia. *Neurochemical Research*, 40(11), 2583–2599. <https://doi.org/10.1007/s11064-015-1581-6>.The

Jiang, Z. W., Gong, Q. Z., Di, X., Zhu, J., & Lyeth, B. G. (2000). Dicyclomine, an M1 muscarinic antagonist, reduces infarct volume in a rat subdural hematoma model. *Brain Research*, 852(1), 37–44. [https://doi.org/10.1016/S0006-8993\(99\)02230-1](https://doi.org/10.1016/S0006-8993(99)02230-1)

Johanson, C., Stopa, E., Mcmillan, P., Roth, D., Funk, J., & Krinke, G. (2011). The Distributional Nexus of Choroid Plexus to Cerebrospinal Fluid, Ependyma and Brain: Toxicologic/Pathologic Phenomena, Periventricular Destabilization, and Lesion Spread. *Toxicologic Pathology*, 39(1), 186–212. <https://doi.org/10.1177/0192623310394214>

Johnson, C. O., Nguyen, M., Roth, G. A., Nichols, E., Alam, T., Abate, D., Abd-Allah, F., Abdelalim, A., Abraha, H. N., Abu-Rmeileh, N. M., Adebayo, O. M., Adeoye, A. M., Agarwal, G., Agrawal, S., Aichour, A. N., Aichour, I., Aichour, M. T. E., Alahdab, F., Ali, R., ... Murray, C. J. L. (2019). Global, regional, and national burden of stroke, 1990–2016: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2016. *The Lancet Neurology*, 18(5), 439–458. [https://doi.org/10.1016/S1474-4422\(19\)30034-1](https://doi.org/10.1016/S1474-4422(19)30034-1)

Jolugbo, P., & Ariëns, R. A. S. (2021). Thrombus Composition and Efficacy of Thrombolysis and Thrombectomy in Acute Ischemic Stroke. *Stroke*, 52(3), 1131–1142. <https://doi.org/10.1161/STROKEAHA.120.032810>

Jurcau, A., & Simion, A. (2022). Neuroinflammation in cerebral ischemia and ischemia/reperfusion injuries: From pathophysiology to therapeutic strategies. *International Journal of Molecular Sciences*, 23(1). <https://doi.org/10.3390/ijms23010014>

K

Kagitani, H., Tagawa, M., Hatanaka, K., Ikari, T., Saito, A., Bando, H., Okada, K., & Matsuo, O. (1985). Expression in *E. coli* of finger-domain lacking tissue-type plasminogen activator with high fibrin affinity. *FEBS Letters*, 189(1), 145–149. [https://doi.org/10.1016/0014-5793\(85\)80860-7](https://doi.org/10.1016/0014-5793(85)80860-7)

Kamran, P., Sereti, K. I., Zhao, P., Ali, S. R., Weissman, I. L., & Ardehali, R. (2013). Parabiosis in mice: a detailed protocol. *Journal of Visualized Experiments : JoVE*, 80, 1–5. <https://doi.org/10.3791/50556>

Kaneko, M., Minuro, J., Matsuda, M., & Sakata, Y. (1991). The plasminogen activator inhibitor-1 binding site in the Kringle-2 domain of tissue_type plasminogen activator. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 178(3), 1160–1166. <https://builtsurvey.utm.my/>

Karatas, H., Erdener, S. E., Gursay-Ozdemir, Y., Gurer, G., Soylemezoglu, F., Dunn, A. K., & Dalkara, T. (2011). Thrombotic distal middle cerebral artery occlusion produced by topical FeCl₃ application: A novel model suitable for intravital microscopy and thrombolysis studies. *Journal of Cerebral Blood Flow and Metabolism*, 31(6), 1452–1460. <https://doi.org/10.1038/jcbfm.2011.8>

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>

- Kaur, C., Rathnasamy, G., & Ling, E.-A. (2016). The Choroid Plexus in Healthy and Diseased Brain. *Journal of Neuropathology & Experimental Neurology*, 75(3), 198–213. <https://doi.org/10.1093/jnen/nlv030>
- Kawai, Y., Matsumoto, Y., Watanabe, K., Yamamoto, H., Satoh, K., Murata, M., Handa, M., & Ikeda, Y. (1996). Hemodynamic forces modulate the effects of cytokines on fibrinolytic activity of endothelial cells. *Blood*, 87(6), 2314–2321. <https://doi.org/10.1182/blood.v87.6.2314.bloodjournal8762314>
- Kawano, K. I., Ikeda, Y., Kondo, K., & Umemura, K. (1998). Increased cerebral infarction by cyclic flow reductions: Studies in the guinea pig MCA thrombosis model. *American Journal of Physiology - Regulatory Integrative and Comparative Physiology*, 275(5 44-5). <https://doi.org/10.1152/ajpregu.1998.275.5.r1578>
- Keragala, C. B., Woodruff, T. M., Liu, Z., Niego, B., Ho, H., McQuilten, Z., & Medcalf, R. L. (2020). Tissue-Type Plasminogen Activator and Tenecteplase-Mediated Increase in Blood Brain Barrier Permeability Involves Cell Intrinsic Complement. *Frontiers in Neurology*, 11(December), 1–12. <https://doi.org/10.3389/fneur.2020.577272>
- Kilic, E., Kilic, Ü., Reiter, R. J., Bassetti, C. L., & Hermann, D. M. (2005). Tissue-plasminogen activator-induced ischemic brain injury is reversed by melatonin: Role of iNOS and Akt. *Journal of Pineal Research*, 39(2), 151–155. <https://doi.org/10.1111/j.1600-079X.2005.00228.x>
- Kim, E., Heo, J., Lee, S., Kim, D. ., Suh, S. ., Kim, J., & Kim, D. . (2006). Prediction of thrombolytic efficacy in acute ischemic stroke using thin-section noncontrast CT. *Neurology*, 67(10), 1846–1848. <http://search.ebscohost.com/login.aspx?direct=true&db=cin20&AN=106149747&site=ehost-live>
- Kim, J. A., Tran, N. D., Wang, S. J., & Fisher, M. J. (2003). Astrocyte regulation of human brain capillary endothelial fibrinolysis. *Thrombosis Research*, 112(3), 159–165. <https://doi.org/10.1016/j.thromres.2003.10.021>
- Klatzo, I. (1985). Brain oedema following brain ischaemia and the influence of therapy. *British Journal of Anaesthesia*, 57(1), 18–22. <https://doi.org/10.1093/bja/57.1.18>
- 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), 2183–2191. <https://doi.org/10.1182/blood-2010-03-276170>
- Knop, M., Aareskjold, E., Bode, G., & Gerke, V. (2004). Rab3D and annexin A2 play a role in regulated of vWF, but not tPA, from endothelial cells. *EMBO Journal*, 23(15), 2982–2992. <https://doi.org/10.1038/sj.emboj.7600319>
- Knop, M., & Gerke, V. (2002). Ca²⁺-regulated secretion of tissue-type plasminogen

activator and von Willebrand factor in human endothelial cells. *Biochimica et Biophysica Acta - Proteins and Proteomics*, 1600(1–2), 162–167. [https://doi.org/10.1016/S1570-9639\(02\)00457-0](https://doi.org/10.1016/S1570-9639(02)00457-0)

Knot, H. J., Zimmermann, P. A., & Nelson, M. T. (1996). Extracellular K⁺-induced hyperpolarizations and dilatations of rat coronary and cerebral arteries involve inward rectifier K⁺ channels. *Journal of Physiology*, 492(2), 419–430. <https://doi.org/10.1113/jphysiol.1996.sp021318>

Knudsen, K. D., Iwai, J., Heine, M., Leidl, G., & Dahl, L. K. (1969). *Genetic onfluence on the development of renoprival hypertension in prabiotic rats*. 1353–1365.

Kouhi, A., Pachipulusu, V., Kapenstein, T., Hu, P., Epstein, A. L., & Khawli, L. A. (2021). Brain Disposition of Antibody-Based Therapeutics: Dogma, Approaches and Perspectives. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(12), 6442. <https://doi.org/10.3390/ijms22126442>

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)

Kuiper, Johan, Van't Hof, A., Otter, M., Biessen, E. A. L., Rijken, D. C., & Van Berkel, T. J. C. (1996). Interaction of mutants of tissue-type plasminogen activator with liver cells: Effect of domain deletions. *Biochemical Journal*, 313(3), 775–780. <https://doi.org/10.1042/bj3130775>

Kung, Y., Chen, K. Y., Liao, W. H., Hsu, Y. H., Wu, C. H., Hsiao, M. Y., Huang, A. P. H., & Chen, W. S. (2022). Facilitating drug delivery in the central nervous system by opening the blood-cerebrospinal fluid barrier with a single low energy shockwave pulse. *Fluids and Barriers of the CNS*, 19(1), 1–13. <https://doi.org/10.1186/s12987-021-00303-x>

Kuroiwa, T., Ting, P., Martinez, H., & Klatzo, I. (1985). The biphasic opening of the blood-brain barrier to proteins following temporary middle cerebral artery occlusion. *Acta Neuropathologica*, 68(2), 122–129. <https://doi.org/10.1007/BF00688633>

L

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>

Lassen, N. A. (1941). and Oxygen. *Physiological Reviews*, 39(2), 183–238.

Laver, K. E., Lange, B., George, S., Deutsch, J. E., Saposnik, G., & Crotty, M. (2017). Virtual reality for stroke rehabilitation. *Cochrane Database of Systematic Reviews*, 2017(11). <https://doi.org/10.1002/14651858.CD008349.pub4>

Lazarevic, I., & Engelhardt, B. (2015). Modeling immune functions of the mouse blood–cerebrospinal fluid barrier in vitro: primary rather than immortalized mouse choroid plexus epithelial cells are suited to study immune cell migration across this brain barrier. *Fluids and Barriers of the CNS*, 13(1), 2. <https://doi.org/10.1186/s12987-016-0027-0>

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 Neuroscience*, 30(4), 552–558. <https://doi.org/10.1016/j.mcn.2005.09.005>

Lecrux, C., & Hamel, E. (2016). Neuronal networks and mediators of cortical neurovascular coupling responses in normal and altered brain states. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 371(1705). <https://doi.org/10.1098/rstb.2015.0350>

Lecrux, Clotilde, Toussay, X., Kocharyan, A., Fernandes, P., Neupane, S., Lévesque, M., Plaisier, F., Shmuel, A., Cauli, B., & Hamel, E. (2011). Pyramidal neurons are “neurogenic hubs” in the neurovascular coupling response to whisker stimulation. *Journal of Neuroscience*, 31(27), 9836–9847. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.4943-10.2011>

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>

- Lee, S. H., Ko, H. M., Kwon, K. J., Lee, J., Han, S. H., Han, D. W., Cheong, J. H., Ryu, J. H., & Shin, C. Y. (2014). TPA regulates neurite outgrowth by phosphorylation of LRP5/6 in neural progenitor cells. *Molecular Neurobiology*, 49(1), 199–215. <https://doi.org/10.1007/s12035-013-8511-x>
- Leeb-Lundberg, L. M. F., Marceau, F., Müller-Esterl, W., Pettibone, D. J., & Zuraw, B. L. (2005). International union of pharmacology. XLV. Classification of the kinin receptor family: From molecular mechanisms to pathophysiological consequences. *Pharmacological Reviews*, 57(1), 27–77. <https://doi.org/10.1124/pr.57.1.2>
- 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), 123–131. <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>
- Leonetti, C., Macrez, R., Pruvost, M., Hommet, Y., Bronsard, J., Fournier, A., Perrigault, M., Machin, I., Vivien, D., Clemente, D., De Castro, F., Maubert, E., & Docagne, F. (2017). Tissue-type plasminogen activator exerts EGF-like chemokinetic effects on oligodendrocytes in white matter (re)myelination. *Molecular Neurodegeneration*, 12(1), 1–16. <https://doi.org/10.1186/s13024-017-0160-5>
- Leroy-Viard, K., Jandrot-Perrus, M., Tobelem, G., & Guillin, M. C. (1989). Covalent binding of human thrombin to a human endothelial cell-associated protein. *Experimental Cell Research*, 181(1), 1–10. [https://doi.org/10.1016/0014-4827\(89\)90177-8](https://doi.org/10.1016/0014-4827(89)90177-8)
- 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(2), 139–148. <https://doi.org/10.1242/jcs.110.2.139>
- Levin, Eugene G., & Loskutoff, D. J. (1982). Cultured bovine endothelial cells produce both urokinase and tissue-type plasminogen activators. *Journal of Cell Biology*, 94(3), 631–636. <https://doi.org/10.1083/jcb.94.3.631>
- Li, S., Pan, Y., Wang, Z., Liang, Z., Chen, H., Wang, D., Sui, Y., Zhao, X., Wang, Y., Du, W. L., Zheng, H., & Wang, Y. (2022). Safety and efficacy of tenecteplase *versus* alteplase in patients with acute ischaemic stroke (TRACE): a multicentre, randomised, open label, blinded-endpoint (PROBE) controlled phase II study. *Stroke and Vascular Neurology*, 7(1), 47–53. <https://doi.org/10.1136/svn-2021-000978>

- Liberatore, G. T., Samson, A., Bladin, C., Schleuning, W. D., & Medcalf, R. L. (2003). Vampire bat salivary plasminogen activator (desmoteplase): A unique fibrinolytic enzyme that does not promote neurodegeneration. *Stroke*, 34(2), 537–543. <https://doi.org/10.1161/01.STR.0000049764.49162.76>
- Liddelow, S. A. (2011). Fluids and barriers of the CNS: A historical viewpoint. *Fluids and Barriers of the CNS*, 8(1), 2. <https://doi.org/10.1186/2045-8118-8-2>
- Liebeskind, D. S., Sanossian, N., Yong, W. H., Tsang, M. P., Moya, A. L., Zheng, D. D., Abolian, M., Kim, D., Ali, L. K., & Shah, S. H. (2011). CT and MRI early vessel signs reflect clot composition in acute stroke. 42(5), 1237–1243. <https://doi.org/10.1161/STROKEAHA.110.605576.CT>
- Lijnen, H.R., 2001. Plasmin and matrix metalloproteinases in vascular remodeling. *Thromb. Haemost.* 86, 324–333.
- Lindahl TL, Sigurdardottir O, and Wiman B (1989) Stability of plasminogen activator inhibitor 1 (PAI-1). *Thromb Haemost* 62, 748–51.
- 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, C.-B., Wang, R., Dong, M.-W., Gao, X.-R., & Yu, F. (2014). Amyloid-beta transporter expression at the choroid plexus in normal aging: the possibility of reduced resistance to oxidative stress insults. *Sheng Li Xue Bao : [Acta Physiologica Sinica]*, 66(2), 158–168. <https://doi.org/10.13294/j.aps.2014.0019>
- 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>
- Liu, D., Lu, C., Wan, R., Auyeung, W. W., & Mattson, M. P. (2002). Activation of mitochondrial ATP-dependent potassium channels protects neurons against ischemia-induced death by a mechanism involving suppression of bax translocation and cytochrome c release. *Journal of Cerebral Blood Flow and Metabolism*, 22(4), 431–443. <https://doi.org/10.1097/00004647-200204000-00007>
- Liu, X., Bai, X., Li, M., Li, H., Zhang, Y., & Yang, B. (2020). Detecting establishment of shared blood supply in parabiotic mice by caudal vein glucose injection. *Journal of Visualized Experiments*, 2020(156), 1–6. <https://doi.org/10.3791/60411>
- Llovera, G., Benakis, C., Enzmann, G., Cai, R., Arzberger, T., Ghasemigharagoz, A., Mao, X., Malik, R., Lazarevic, I., Liebscher, S., Ertürk, A., Meissner, L., Vivien, D., Haffner, C., Plesnila, N., Montaner, J., Engelhardt, B., & Liesz, A. (2017). The choroid

plexus is a key cerebral invasion route for T cells after stroke. *Acta Neuropathologica*, 134(6), 851–868. <https://doi.org/10.1007/s00401-017-1758-y>

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. *Journal of Neurobiology*, 66(6), 564–577. <https://doi.org/10.1002/neu.20250>

Lochner, J. E., Kingma, M., Kuhn, S., Meliza, C. D., Cutler, B., & Scalettar, B. A. (1998). Real-time imaging of the axonal transport of granules containing a tissue plasminogen activator/green fluorescent protein hybrid. *Molecular Biology of the Cell*, 9(9), 2463–2476. <https://doi.org/10.1091/mbc.9.9.2463>

Lockwood CJ, and Schatz F (n.d.) A biological model for the regulation of peri-implantational hemostasis and menstruation. *J Soc Gynecol Investig* 3, 159–65.

López-Atalaya, J. P., Roussel, B. D., Ali, C., Maubert, E., Petersen, K. U., Berezowski, V., Cecchelli, R., Orset, C., & Vivien, D. (2007). Recombinant Desmodus rotundus salivary plasminogen activator crosses the blood-brain barrier through a low-density lipoprotein receptor-related protein-dependent mechanism without exerting neurotoxic effects. *Stroke*, 38(3), 1036–1043. <https://doi.org/10.1161/01.STR.0000258100.04923.84>

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>

Louessard, M., Bardou, I., Lemarchand, E., Thiebaut, A. M., Parcq, J., Leprince, J., Terrisse, A., Carraro, V., Fafournoux, P., Bruhat, A., Orset, C., Vivien, D., Ali, C., & Roussel, B. D. (2017). Activation of cell surface GRP78 decreases endoplasmic reticulum stress and neuronal death. *Cell Death and Differentiation*, 24(9), 1518–1529. <https://doi.org/10.1038/cdd.2017.35>

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

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)

Lu, P., Takai, K., Weaver, V. M., & Werb, Z. (2011). Extracellular Matrix degradation

and remodeling in development and disease. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 3(12), 1–24. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a005058>

Lüdemann-Podubecká, J., Bösl, K., Theilig, S., Wiederer, R., & Nowak, D. A. (2015). The effectiveness of 1Hz rTMS over the primary motor area of the unaffected hemisphere to improve hand function after stroke depends on hemispheric dominance. *Brain Stimulation*, 8(4), 823–830. <https://doi.org/10.1016/j.brs.2015.02.004>

Ludwig, F. C., & Elashoff, R. M. (1972). Mortality in syngeneic rat parabionts of different chronological age. *Transactions of the New York Academy of Sciences*, 34(7), 582–587. <https://doi.org/10.1111/j.2164-0947.1972.tb02712.x>

Luo, M., & Hajjar, K. . (2013). Annexin A2 System in Human Biology: Cell Surface and Beyond. *Seminars in Thrombosis and Hemostasis*, 39(4), 1–7. <https://doi.org/10.1055/s-0033-1334143>.Annexin

M

Ma, J., Ayata, C., Huang, P. L., Fishman, M. C., & Moskowitz, M. A. (1996). Regional cerebral blood flow response to vibrissal stimulation in mice lacking type I NOS gene expression. *American Journal of Physiology - Heart and Circulatory Physiology*, 270(3 39-3). <https://doi.org/10.1152/ajpheart.1996.270.3.h1085>

Macrae, I. (2011). Preclinical stroke research - Advantages and disadvantages of the most common rodent models of focal ischaemia. *British Journal of Pharmacology*, 164(4), 1062–1078. <https://doi.org/10.1111/j.1476-5381.2011.01398.x>

Macrez, R., Obiang, P., Gauberti, M., Roussel, B., Baron, A., Parcq, J., Cassé, F., Hommet, Y., Orset, C., Agin, V., Bezin, L., Berrocoso, T. G., Petersen, K. U., Montaner, J., Maubert, E., Vivien, D., & Ali, C. (2011). Antibodies preventing the interaction of tissue-type plasminogen activator with N-methyl-D-aspartate receptors reduce stroke damages and extend the therapeutic window of thrombolysis. *Stroke*, 42(8), 2315–2322. <https://doi.org/10.1161/STROKEAHA.110.606293>

Macrez, R., Ortega, M. C., Bardou, I., Mehra, A., Fournier, A., Van Der Pol, S. M. A., Haelewyn, B., Maubert, E., Lesept, F., Chevilly, A., De Castro, F., De Vries, H. E., Vivien, D., Clemente, D., & Docagne, F. (2016). Neuroendothelial NMDA receptors as therapeutic targets in experimental autoimmune encephalomyelitis. *Brain*, 139(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)
- Magi, F., Moruzzi, G., Rossi, F., Zanchetti, A., & Jouvet, M. (1965). Humoral mediation of radiation-induced motivation in parabiont rats. *Science*, 150(3704), 1747–1748. <https://doi.org/10.1126/science.150.3704.1747>
- Malenka, R. C., & Bear, M. F. (2004). LTP and LTD: An embarrassment of riches. *Neuron*, 44(1), 5–21. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2004.09.012>
- Malik, R., & Consortium, M. (2018). Multiancestry genome-wide association study of 520,000 subjects identifies 32 loci associated with stroke and stroke subtypes. *Nature Genetics*, 50(4), 524–537. <https://doi.org/10.1038/s41588-018-0058-3>. Multiancestry
- Manning, N. W., Campbell, B. C. V., Oxley, T. J., & Chapot, R. (2014). Acute ischemic stroke time, penumbra, and reperfusion. *Stroke*, 45(2), 640–644. <https://doi.org/10.1161/STROKEAHA.113.003798>
- Marchai, G., Furlan, M., Beaudouin, V., Rioux, P., Hauttement, J. L., Serrati, C., De La Sayette, V., Doze, F. Le, Viader, F., Derlon, J. M., & Baron, J. C. (1996). Early spontaneous hyperperfusion after stroke: A marker of favourable tissue outcome? *Brain*, 119(2), 409–419. <https://doi.org/10.1093/brain/119.2.409>
- Marcos-Contreras, O. A., De Lizarrondo, S. M., Bardou, I., Orset, C., Pruvost, M., Anfray, A., Frigout, Y., Hommet, Y., Lebouvier, L., Montaner, J., Vivien, D., & Gauberti, M. (2016). Hyperfibrinolysis increases blood-brain barrier permeability by a plasmin- and bradykinin-dependent mechanism. *Blood*, 128(20), 2423–2434. <https://doi.org/10.1182/blood-2016-03-705384>
- 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)
- Martin, R. L., Lloyd, H. G. E., & Cowan, A. I. (1994). The early events of oxygen and glucose deprivation: setting the scene for neuronal death? *Trends in Neurosciences*, 17(6), 251–257. [https://doi.org/10.1016/0166-2236\(94\)90008-6](https://doi.org/10.1016/0166-2236(94)90008-6)
- Martinez de Lizarrondo, S., Gakuba, C., Herbig, B. A., Repessé, Y., Ali, C., Denis, C. V., Lenting, P. J., Touzé, E., Diamond, S. L., Viven, D., & Gauberti, M. (2017). Potent

thrombolytic effect of N-Acetylcysteine on arterial thrombi. *Circulation*, 136(7), 646–660. <https://doi.org/10.1161/CIRCULATIONAHA.117.027290>. Potent

Mathis, S. A., Criscimagna, N. L., & Leeb-Lundberg, L. M. F. (1996). B1 and B2 kinin receptors mediate distinct patterns of intracellular Ca²⁺ signaling in single cultured vascular smooth muscle cells. *Molecular Pharmacology*, 50(1), 128–139.

Matys, T., Pawlak, R., & Strickland, S. (2005). Tissue plasminogen activator in the bed nucleus of stria terminalis regulates acoustic startle. *Neuroscience*, 135(3), 715–722. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2005.06.076>

Matys, Tomasz, Pawlak, R., Matys, E., Pavlides, C., McEwen, B. S., & Strickland, S. (2004). Tissue plasminogen activator promotes the effects of corticotropin-releasing factor on the amygdala and anxiety-like behavior. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 101(46), 16345–16350. <https://doi.org/10.1073/pnas.0407355101>

Medcalf, R. L. (2017). Fibrinolysis: from blood to the brain. *Journal of Thrombosis and Haemostasis*, 15(11), 2089–2098. <https://doi.org/10.1111/jth.13849>

Medved, L., Nieuwenhuizen, W., 2003. Molecular mechanisms of initiation of fibrinolysis by fibrin. *Thromb. Haemost.* 89, 409–419.

Mehra, A., Ali, C., Parcq, J., Vivien, D., & Docagne, F. (2016). The plasminogen activation system in neuroinflammation. *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Basis of Disease*, 1862(3), 395–402. <https://doi.org/10.1016/j.bbadis.2015.10.011>

Mehra, A., Guérit, S., Macrez, R., Gosselet, F., Sevin, E., Lebas, H., Maubert, E., de Vries, H. E., Bardou, I., Vivien, D., & Docagne, F. (2020). Nonionotropic action of endothelial NMDA receptors on blood–brain barrier permeability via Rho/ROCK-mediated phosphorylation of myosin. *Journal of Neuroscience*, 40(8), 1778–1787. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.0969-19.2019>

Mei, X., Wang, H., Zhang, H., Liu, C., Guo, Z., Wang, Y., Yuan, Y., Zhao, Z., Li, D., & Tang, P. (2019). Blockade of receptor for advanced glycation end products promotes oligodendrocyte autophagy in spinal cord injury. *Neuroscience Letters*, 698(June 2018), 198–203. <https://doi.org/10.1016/j.neulet.2019.01.030>

Methner, C., Mishra, A., Golgotiu, K., Li, Y., Wei wei, B., Yanez, N. ., Zlokovic, B. ., Wang, R. ., Alkayed, N. ., Kaul, S., & Iliff, J. (2019). *Pericyte constriction underlies capillary de-recruitment during hyperemia 2 in the setting of arterial stenosis.*

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>

Miranda, E., & Lomas, D. A. (2006). Neuroserpin: A serpin to think about. *Cellular and*

Molecular Life Sciences, 63(6), 709–722. <https://doi.org/10.1007/s00018-005-5077-4>

Mishra, A. (2017). Binaural blood flow control by astrocytes: listening to synapses and the vasculature. *Journal of Physiology*, 595(6), 1885–1902. <https://doi.org/10.1113/JP270979>

Monnot, A. D., & Zheng, W. (2013). Culture of choroid plexus epithelial cells and in vitro model of blood-CSF barrier. *Methods in Molecular Biology (Clifton, N.J.)*, 945(3), 13–29. https://doi.org/10.1007/978-1-62703-125-7_2

Montaner, J., Alvarez-Sabín, J., Molina, C. A., Anglés, A., Abilleira, S., Arenillas, J., & Monasterio, J. (2001). Matrix metalloproteinase expression is related to hemorrhagic transformation after cardioembolic stroke. *Stroke*, 32(12), 2762–2767. <https://doi.org/10.1161/hs1201.99512>

Moorea, S. A., & Oglesbeeb, M. J. (2012). Involvement of the choroid plexus in the inflammatory response after acute spinal cord injury in dogs: An immunohistochemical study. *Vet Immunol Immunopathol*, 148(0), 348–352. <https://doi.org/10.1016/j.vetimm.2012.07.001>. Involvement

Morgani, J., 1761. De sedibus et causis morborum per anatomen indagatis tomus primus. Liber.

Morishita, W., Marie, H., & Malenka, R. C. (2005). Distinct triggering and expression mechanisms underlie LTD of AMPA and NMDA synaptic responses. *Nature Neuroscience*, 8(8), 1043–1050. <https://doi.org/10.1038/nn1506>

Mothet, J. P., Pollegioni, L., Ouanounou, G., Martineau, M., Fossier, P., & Baux, G. (2005). Glutamate receptor activation triggers a calcium-dependent and SNARE protein-dependent release of the gliotransmitter D-serine. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 102(15), 5606–5611. <https://doi.org/10.1073/pnas.0408483102>

Mvundura, M., Mcgruder, H., Khoury, M. J., Valdez, R., & Yoon, P. W. (2008). Family history as a risk factor for early-onset stroke/transient ischemic attack among adults in the United States. *Public Health Genomics*, 13(1), 13–20. <https://doi.org/10.1159/000209879>

N

Nabavi, S., Fox, R., Proulx, C. D., Lin, J. Y., Tsien, R. Y., & Malinow, R. (2015). *Engineering a memory with LTP and LTP*. 511(7509), 348–352. <https://doi.org/10.1038/nature13294.Engineering>

Nadarajah, B., Alifragis, P., Wong, R. O. L., & Parnavelas, J. G. (2003). Neuronal migration in the developing cerebral cortex: Observations based on real-time imaging. *Cerebral Cortex*, 13(6), 607–611. <https://doi.org/10.1093/cercor/13.6.607>

Nagai, N., De Mol, M., Lijnen, H. R., Carmeliet, P., & Collen, D. (1999). Role of plasminogen system components in focal cerebral ischemic infarction: A gene targeting and gene transfer study in mice. *Circulation*, 99(18), 2440–2444. <https://doi.org/10.1161/01.CIR.99.18.2440>

Nagai, Nobuo, Zhao, B. Q., Suzuki, Y., Ihara, H., Urano, T., & Umemura, K. (2002). Tissue-type plasminogen activator has paradoxical roles in focal cerebral ischemic injury by thrombotic middle cerebral artery occlusion with mild or severe photochemical damage in mice. *Journal of Cerebral Blood Flow and Metabolism*, 22(6), 648–651. <https://doi.org/10.1097/00004647-200206000-00002>

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>

Nakaji, K., Ihara, M., Takahashi, C., Itohara, S., Noda, M., Takahashi, R., & Tomimoto, H. (2006). Matrix metalloproteinase-2 plays a critical role in the pathogenesis of white matter lesions after chronic cerebral hypoperfusion in rodents. *Stroke*, 37(11), 2816–2823. <https://doi.org/10.1161/01.STR.0000244808.17972.55>

Naseri Kouzehgarani, G., Kumar, P., Bolin, S. E., Reilly, E. B., & Lefebvre, D. R. (2022). Biodistribution Analysis of an Anti-EGFR Antibody in the Rat Brain: Validation of CSF Microcirculation as a Viable Pathway to Circumvent the Blood-Brain Barrier for Drug Delivery. *Pharmaceutics*, 14(7). <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics14071441>

National Institute of Neurological Disorders and Stroke rt-PA Stroke Study Group, 1995. A Systems Approach to Immediate Evaluation and Management of Hyperacute Stroke. *Stroke*. 1997 ;28 :1530–1540. doi : 10.1161/01.str.28.8.1530

Neurology Working Group of the Cohorts for Heart and Aging Research in Genomic Epidemiology (CHARGE) Consortium, the Stroke Genetics Network (SiGN), and the

- I. S. G. C. (ISGC). (2017). *Identification of additional risk loci for stroke and small vessel disease: a meta-analysis of genome-wide association studies* Neurology Working Group of the Cohorts for Heart and Aging Research in Genomic Epidemiology (CHARGE) Consortium, the Stroke Gene. 15(7), 695–707. [https://doi.org/10.1016/S1474-4422\(16\)00102-2](https://doi.org/10.1016/S1474-4422(16)00102-2). Identification
- 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>
- 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), 59–64. <https://doi.org/10.1038/83358>
- Nielsen, A. N., & Lauritzen, M. (2001). Coupling and uncoupling of activity-dependent increases of neuronal activity and blood flow in rat somatosensory cortex. *The Journal of Physiology*, 533(3), 773–785. <https://doi.org/10.1111/j.1469-7793.2001.00773.x>
- Nieswandt, B., Brakebusch, C., Bergmeier, W., Schulte, V., Bouvard, D., Mokhtari-Nejad, R., Lindhout, T., Heemskerk, J. W. M., Zirngibl, H., & Fässler, R. (2001). Glycoprotein VI but not $\alpha 2\beta 1$ integrin is essential for platelet interaction with collagen. *EMBO Journal*, 20(9), 2120–2130. <https://doi.org/10.1093/emboj/20.9.2120>
- Nilsson, A., Vesterlund, L., & Oldenborg, P. A. (2012). Macrophage expression of LRP1, a receptor for apoptotic cells and unopsonized erythrocytes, can be regulated by glucocorticoids. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 417(4), 1304–1309. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2011.12.137>
- NINDS. (1995). Tissue plasminogen activator for acute ischemic stroke. *The New England Journal of Medicine*, 333(24), 1581–1587.
- Nishihara, H., Soldati, S., Mossu, A., Rosito, M., Rudolph, H., Muller, W. A., Latorre, D., Sallusto, F., Sospedra, M., Martin, R., Ishikawa, H., Tenenbaum, T., Schroten, H., Gosselet, F., & Engelhardt, B. (2020). Human CD4⁺ T cell subsets differ in their abilities to cross endothelial and epithelial brain barriers in vitro. *Fluids and Barriers of the CNS*, 17(1), 1–18. <https://doi.org/10.1186/s12987-019-0165-2>
- 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. <https://doi.org/10.1056/nejmoa1706442>

Nokkari, A., Abou-El-Hassan, H., Mechref, Y., Mondello, S., Kindy, M. S., Jaffa, A. A., & Kobeissy, F. (2018). Implication of the Kallikrein-Kinin system in neurological disorders: Quest for potential biomarkers and mechanisms. *Progress in Neurobiology*, 165–167, 26–50. <https://doi.org/10.1016/j.pneurobio.2018.01.003>

Noveletto, F., Soares, A. V., Eichinger, F. L. F., Domenech, S. C., Hounsell, M. D. S., & Filho, P. B. (2020). Biomedical Serious Game System for Lower Limb Motor Rehabilitation of Hemiparetic Stroke Patients. *IEEE Transactions on Neural Systems and Rehabilitation Engineering*, 28(6), 1481–1487. <https://doi.org/10.1109/TNSRE.2020.2988362>

O

O'Donnell, M. J., Chin, S. L., Rangarajan, S., Xavier, D., Liu, L., Zhang, H., Rao-Melacini, P., Zhang, X., Pais, P., Agapay, S., Lopez-Jaramillo, P., Damasceno, A., Langhorne, P., McQueen, M. J., Rosengren, A., Dehghan, M., Hankey, G. J., Dans, A. L., Elsayed, A., ... Yusuf, S. (2016). Global and regional effects of potentially modifiable risk factors associated with acute stroke in 32 countries (INTERSTROKE): a case-control study. *The Lancet*, 388(10046), 761–775. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(16\)30506-2](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(16)30506-2)

Obiang, P., Macrez, R., Jullienne, A., Bertrand, T., Lesept, F., Ali, C., Maubert, E., Vivien, D., & Agin, V. (2012). GluN2D subunit-containing NMDA receptors control tissue plasminogen activator-mediated spatial memory. *Journal of Neuroscience*, 32(37), 12726–12734. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.6202-11.2012>

Obiang, P., Maubert, E., Bardou, I., Nicole, O., Launay, S., Bezin, L., Vivien, D., & Agin, V. (2011). Enriched housing reverses age-associated impairment of cognitive functions and tPA-dependent maturation of BDNF. *Neurobiology of Learning and Memory*, 96(2), 121–129. <https://doi.org/10.1016/j.nlm.2011.03.004>

Oh, S. B., Byun, C. J., Yun, J. H., Jo, D. G., Carmeliet, P., Koh, J. Y., & Lee, J. Y. (2014). Tissue plasminogen activator arrests Alzheimer's disease pathogenesis. *Neurobiology of Aging*, 35(3), 511–519. <https://doi.org/10.1016/j.neurobiolaging.2013.09.020>

Olsson, M., Hultman, K., Dunoyer-Geindre, S., Curtis, M. A., Faull, R. L. M., Kruithof, E. K. O., & Jern, C. (2016). Epigenetic regulation of tissue-type plasminogen activator in human brain tissue and brain-derived cells. *Gene Regulation and Systems Biology*, 10, 9–13. <https://doi.org/10.4137/GRSB.S30241>

Orset, C., Haelewyn, B., Allan, S. M., Ansar, S., Campos, F., Cho, T. H., Durand, A.,

Amki, M. El, Fatar, M., Grudzenski, S., Lizasoain, I., Lo, E., Macrez, R., Margail, I., Maysami, S., Nighoghossian, N., Orbe, J., Antonio, J., Parienti, J., ... Compostela, S. De. (2016). *Stroke: a Retrospective Pooled Analysis*. 47(5), 1312–1318. <https://doi.org/10.1161/STROKEAHA.116.012238>. Efficacy

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>

Orth, K., Willnow, T., Herz, J., Gething, M. J., & Sambrook, J. (1994). Low density lipoprotein receptor-related protein is necessary for the internalization of both tissue-type plasminogen activator-inhibitor complexes and free tissue-type plasminogen activator. *Journal of Biological Chemistry*, 269(33), 21117–21122. [https://doi.org/10.1016/s0021-9258\(17\)31937-3](https://doi.org/10.1016/s0021-9258(17)31937-3)

Osterwalder, T., Contartese, J., Stoeckli, E. T., Kuhn, T. B., & Sonderegger, P. (1996). Neuroserpin, an axonally secreted serine protease inhibitor. *EMBO Journal*, 15(12), 2944–2953. <https://doi.org/10.1002/j.1460-2075.1996.tb00657.x>

Ozcan, L., Ghorpade, D. ., Zheng, Z., de Souza, J. ., Chen, K., Bessler, M., Bagloo, M., Schroppe, B., Pestell, R., & Tabas, I. (2016). Hepatocyte DACH1 is Increased in Obesity Via Nuclear Exclusion of HDAC4 and Promotes Hepatic Insulin Resistance Lale. *Physiology & Behavior*, 15(10), 2214–2225. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2016.05.006>. Hepatocyte

P

Pang, P. T., Teng, H. K., Zaitsev, E., Woo, N. T., Sakata, K., Zhen, S., Teng, K. K., Yung, W. H., Hempstead, B. L., & Lu, B. (2004). Cleavage of proBDNF by tPA/plasmin is essential for long-term hippocampal plasticity. *Science*, 306(5695), 487–491. <https://doi.org/10.1126/science.1100135>

Parcq, J., Bertrand, T., Baron, A. F., Hommet, Y., Anglès-Cano, E., & Vivien, D. (2013). Molecular requirements for safer generation of thrombolytics by bioengineering the tissue-type plasminogen activator A chain. *Journal of Thrombosis and Haemostasis*, 11(3), 539–546. <https://doi.org/10.1111/jth.12128>

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., Anglès-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), 1983–1991. <https://doi.org/10.1038/cdd.2012.86>

Pardridge, W. M. (2020). Blood-Brain Barrier and Delivery of Protein and Gene Therapeutics to Brain. *Frontiers in Aging Neuroscience*, 11(January), 1–27. <https://doi.org/10.3389/fnagi.2019.00373>

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), 1073–1078. <https://doi.org/10.1073/pnas.0708823105>

Park, L., Zhou, J., Koizumi, K., Wang, G., Anfray, A., Ahn, S. J., Seo, J., Zhou, P., Zhao, L., Paul, S., Anrather, J., & Iadecola, C. (2020). tPA deficiency underlies neurovascular coupling dysfunction by amyloid- β . *Journal of Neuroscience*, 40(42), 8160–8173. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.1140-20.2020>

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>

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(6), 2482–2498. <https://doi.org/10.1093/cercor/bhy119>

Paulson, O. B., & Newman, E. A. (1987). Does the release of potassium from astrocyte endfeet regulate cerebral blood flow? *Science*, 237(4817), 896–898. <https://doi.org/10.1126/science.3616619>

Pawela, C. ., Biswal, B. ., Hudetz, A. ., Schulte, M. ., Li, R., Jones, S. ., Cho, Y. ., Matloub, H. ., & Hyde, J. . (2009). A protocol for use of medetomidine anesthesia in rats for extended studies using task-induced BOLD contrast and resting- state functional connectivity. *NeuroImage*, 46(4), 1137–1147. <https://doi.org/10.1016/j.neuroimage.2009.03.004.A>

Pawlak, R., Nagai, N., Urano, T., Napiorkowska-Pawlak, D., Ihara, H., Takada, Y., Collen, D., & Takada, A. (2002). Rapid, specific and active site-catalyzed effect of

tissue-plasminogen activator on hippocampus-dependent learning in mice. *Neuroscience*, 113(4), 995–1001. [https://doi.org/10.1016/S0306-4522\(02\)00166-5](https://doi.org/10.1016/S0306-4522(02)00166-5)

Pawlak, Robert, 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*, 6(2), 168–174. <https://doi.org/10.1038/nn998>

Pennica, D., Holmes, W. ., Kohr, W. ., Harkins, R. ., Vehar, G. ., Ward, C. ., Bennett, W. ., Yelverton, E., Seeburg, P. ., Heyneker, H. ., & Goeddel, D. . (1983). 24. Hanson Cloning and expression of human tissue-type plasminogen activator cDNA in E. coli. *Nature*, 301(20), 214–221.

Petäjä, J. (1989). Fibrinolytic response to venous occlusion for 10 and 20 minutes in healthy subjects and in patients with deep vein thrombosis. *Thrombosis Research*, 56(2), 251–263.

Petersen, C. C. H. (2007). The functional organization of the barrel cortex. *Neuron*, 56(2), 339–355. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2007.09.017>

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 (BBA)/Protein Structure and Molecular*, 952(C), 245–254. [https://doi.org/10.1016/0167-4838\(88\)90123-9](https://doi.org/10.1016/0167-4838(88)90123-9)

Petrisko, T. J., & Konat, G. W. (2021). Peripheral viral challenge increases c-fos level in cerebral neurons. *Metabolic Brain Disease*, 36(7), 1995–2002. <https://doi.org/10.1007/s11011-021-00819-z>

Pierce, H., Zhang, D., Magnon, C., Lucas, D., Christin, J., Huggins, M., Schwartz, G. ., & Frenette, P. . (2017). Cholinergic signals from the CNS regulate G-CSF-mediated HSC mobilization from bone marrow via a glucocorticoid signaling relay Halley. *Cell Stem Cell*, 20(5), 648–658. <https://doi.org/10.1016/j.stem.2017.01.002>. Cholinergic

Pittman, R. N., Ivins, J. K., & Buettner, H. M. (1989). Neuronal plasminogen activators: Cell surface binding sites and involvement in neurite outgrowth. *Journal of Neuroscience*, 9(12), 4269–4286. <https://doi.org/10.1523/jneurosci.09-12-04269.1989>

Pittman, Randall N., & DiBenedetto, A. J. (1995). PC12 Cells Overexpressing Tissue Plasminogen Activator Regenerate Neurites to a Greater Extent and Migrate Faster than Control Cells in Complex Extracellular Matrix. *Journal of Neurochemistry*, 64(2), 566–575. <https://doi.org/10.1046/j.1471-4159.1995.64020566.x>

Planques, A., Oliveira Moreira, V., Dubreuil, C., Prochiantz, A., & Di Nardo, A. A. (2019). OTX2 Signals from the Choroid Plexus to Regulate Adult Neurogenesis. *Eneuro*, 6(2), ENEURO.0262-18.2019. <https://doi.org/10.1523/ENEURO.0262-18.2019>

- Polavarapu, R., Gongora, M. C., Yi, H., Ranganathan, S., Lawrence, D. A., Strickland, D., & Yepes, M. (2007). Tissue-type plasminogen activator-mediated shedding of astrocytic low-density lipoprotein receptor-related protein increases the permeability of the neurovascular unit. *Blood*, 109(8), 3270–3278. <https://doi.org/10.1182/blood-2006-08-043125>
- Popov, V. ., Wu, K., Powell, M. ., Mardon, G., Wang, C., & Pestell, R. . (2010). The Dachshund gene in Development and Hormone-Responsive Tumorigenesis. *Trends in Endocrinology & Metabolism*, 21(1). <https://doi.org/10.1016/j.tem.2009.08.002>.The
- Porter, J. ., & McCarthy, K. . (1996). Hippocampal Astrocytes In Situ Respond to Glutamate Released from Synaptic Terminals. *The Journal of Neuroscience*, 16(16), 5073–5081.
- Powers, W. J., Rabinstein, A. A., Ackerson, T., Adeoye, O. M., Bambakidis, N. C., Becker, K., Biller, J., Brown, M., Demaerschalk, B. M., Hoh, B., Jauch, E. C., Kidwell, C. S., Leslie-Mazwi, T. M., Ovbiagele, B., Scott, P. A., Sheth, K. N., Southerland, A. M., Summers, D. V., & Tirschwell, D. L. (2019). Guidelines for the early management of patients with acute ischemic stroke: 2019 update to the 2018 guidelines for the early management of acute ischemic stroke a guideline for healthcare professionals from the American Heart Association/American Stroke A. In *Stroke* (Vol. 50, Issue 12). <https://doi.org/10.1161/STR.0000000000000211>
- Price, C. J. S., Menon, D. K., Peters, A. M., Ballinger, J. R., Barber, R. W., Balan, K. K., Lynch, A., Xuereb, J. H., Fryer, T., Guadagno, J. V., & Warburton, E. A. (2004). Cerebral neutrophil recruitment, histology, and outcome in acute ischemic stroke: An imaging-based study. *Stroke*, 35(7), 1659–1664. <https://doi.org/10.1161/01.STR.0000130592.71028.92>
- Prinz, M., & Priller, J. (2014). Microglia and brain macrophages in the molecular age: From origin to neuropsychiatric disease. *Nature Reviews Neuroscience*, 15(5), 300–312. <https://doi.org/10.1038/nrn3722>
- Pruneau, D., Bélichard, P., Sahel, J.-A., & Combal, J.-P. (2010). Targeting the kallikrein-kinin system as a new therapeutic approach to diabetic retinopathy. *Current Opinion in Investigational Drugs (London, England : 2000)*, 11(5).
- Pruvost, M., Lépine, M., Leonetti, C., Etard, O., Naveau, M., Agin, V., Docagne, F., Maubert, E., Ali, C., Emery, E., & Vivien, D. (2017). ADAMTS-4 in oligodendrocytes contributes to myelination with an impact on motor function. *Glia*, 65(12), 1961–1975. <https://doi.org/10.1002/glia.23207>
- Pu, H., Shi, Y., Zhang, L., Lu, Z., Ye, Q., Leak, R. K., Xu, F., Ma, S., Mu, H., Wei, Z., Xu, N., Xia, Y., Hu, X., Kevin Hitchens, T., Bennett, M. V. L., & Chen, J. (2019). Protease-independent action of tissue plasminogen activator in brain plasticity and neurological recovery after ischemic stroke. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the*

United States of America, 116(18), 9115–9124. <https://doi.org/10.1073/pnas.1821979116>

Pulit, S. L., McArdle, P. F., Wong, Q., Malik, R., Gwinn, K., Achterberg, S., Algra, A., & Amouyel, P. (2016). The NINDS Stroke Genetics Network: a genome-wide association study of ischemic stroke and its subtypes. *Lancet Neurol*, 15(2), 174–184. [https://doi.org/10.1016/S1474-4422\(15\)00338-5](https://doi.org/10.1016/S1474-4422(15)00338-5).The

Pun, P. B. L., Lu, J., & Moolchhala, S. (2009). Involvement of ROS in BBB dysfunction. *Free Radical Research*, 43(4), 348–364. <https://doi.org/10.1080/10715760902751902>

Q

Qian, J. Y., Chopp, M., & Liu, Z. (2016). Mesenchymal stromal cells promote axonal outgrowth alone and synergistically with astrocytes via tPA. *PLoS ONE*, 11(12), 1–16. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0168345>

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*. 361(February), 453–457.

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. *Autophagy*, 6(6), 738–753. <https://doi.org/10.4161/auto.6.6.12573>

R

Radak, D., Katsiki, N., Resanovic, I., Jovanovic, A., Sudar-Milovanovic, E., Zafirovic, S., A. Mousad, S., & R. Isenovic, E. (2016). Apoptosis and Acute Brain Ischemia in Ischemic Stroke. *Current Vascular Pharmacology*, 15(2), 115–122. <https://doi.org/10.2174/1570161115666161104095522>

Rahman, A. ., Murrow, J. ., Ozkor, M. ., Kavtaradze, N., Lin, J., De Starcke, C., Hooper, W. ., Manatunga, A., Hayek, S., & Quyyumi, A. . (2014). Endothelium-Derived Hyperpolarizing Factor Mediates Bradykinin Stimulated Tissue Plasminogen Activator Release In Humans. *Journal of Vascular Research*, 51(3), 200–208. <https://doi.org/10.1159/000362666>.Endothelium-Derived

- Raidoo, D. M., Ramsaroop, R., Naidoo, S., Müller-Esterl, W., & Bhoola, K. D. (1997). Kinin receptors in human vascular tissue: Their role in atheromatous disease. *Immunopharmacology*, 36(2–3), 153–160. [https://doi.org/10.1016/S0162-3109\(97\)00015-5](https://doi.org/10.1016/S0162-3109(97)00015-5)
- 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. *The Journal of Immunology*, 181(5), 3567–3574. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.181.5.3567>
- 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. *Journal of Biological Chemistry*, 257(6), 2920–2925. [https://doi.org/10.1016/s0021-9258\(19\)81052-9](https://doi.org/10.1016/s0021-9258(19)81052-9)
- Rijken, Dingeman 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>
- Rogove, A. D., & Tsirka, S. E. (1998). Neurotoxic responses by microglia elicited by excitotoxic injury in the mouse hippocampus. *Current Biology*, 8(1), 19–25. [https://doi.org/10.1016/S0960-9822\(98\)70016-8](https://doi.org/10.1016/S0960-9822(98)70016-8)
- Rogove, Andrew D., Siao, C. J., Keyt, B., Strickland, S., & Tsirka, 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>
- Rosamond, W., Flegal, K., Friday, G., Furie, K., Go, A., Greenlund, K., Haase, N., Ho, M., Howard, V., Kissela, B., Kittner, S., Lloyd-Jones, D., McDermott, M., Meigs, J., Moy, C., Nichol, G., O'Donnell, C. J., Roger, V., Rumsfeld, J., ... Hong, Y. (2007). Heart disease and stroke statistics - 2007 Update: A report from the American Heart Association Statistics Committee and Stroke Statistics Subcommittee. In *Circulation* (Vol. 115, Issue 5). <https://doi.org/10.1161/CIRCULATIONAHA.106.179918>
- Rosenberg, G.A, & Yang, Y. (2007). Vasogenic edema due to tight junction disruption by matrix metalloproteinases in cerebral ischemia. *Neurosurgical Focus*, 22(5), 1–9. http://www.medscape.com/viewarticle/558995_1

Rosenberg, Gary A., Estrada, E. Y., & Dencoff, J. E. (1998). Matrix metalloproteinases and TIMPs are associated with blood-brain barrier opening after reperfusion in rat brain. *Stroke*, 29(10), 2189–2195. <https://doi.org/10.1161/01.STR.29.10.2189>

Rosner, J., Reddy, V., Lui, F., 2021. Neuroanatomy, Circle of Willis, in: StatPearls. StatPearls Publishing, Treasure Island (FL).

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)

Roussel, B. D., Mysiorek, C., Rouhiainen, A., Jullienne, A., Parcq, J., Hommet, Y., Culot, M., Berezowski, V., Cecchelli, R., Rauvala, H., Vivien, D., & Ali, C. (2011). HMGB-1 promotes fibrinolysis and reduces neurotoxicity mediated by tissue plasminogen activator. *Journal of Cell Science*, 124(12), 2070–2076. <https://doi.org/10.1242/jcs.084392>

S

Sadler, J. E. (1998). Biochemistry and genetics of von Willebrand factor. *Annual Review of Biochemistry*, 67, 395–424. <https://doi.org/10.1146/annurev.biochem.67.1.395>

Samson, A. L. and Medcalf, R. L. (2006) ‘Tissue-Type Plasminogen Activator: A Multifaceted Modulator of Neurotransmission and Synaptic Plasticity’, *Neuron*, 50(5), pp. 673–678. doi: 10.1016/j.neuron.2006.04.013.

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 NMDA receptor function. *Journal of Neurochemistry*, 107(4), 1091–1101. <https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.2008.05687.x>

Sandercock, P., Wardlaw, J. M., Lindley, R. I., Dennis, M., Cohen, G., Murray, G., Innes, K., Venables, G., Czlonkowska, A., Kobayashi, A., Ricci, S., Murray, V., Berge, E., Slot, K. B., Hankey, G. J., Correia, M., Peeters, A., Matz, K., Lyrrer, P., ... Blackwell, L. (2012). The benefits and harms of intravenous thrombolysis with recombinant tissue plasminogen activator within 6 h of acute ischaemic stroke (the third international stroke trial [IST-3]): A randomised controlled trial. *The Lancet*, 379(9834), 2352–2363. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(12\)60768-5](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(12)60768-5)

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), 679–685. <https://doi.org/10.1172/JCI116637>

Sarikaya, H., Ferro, J., & Arnold, M. (2015). Stroke prevention - Medical and lifestyle measures. *European Neurology*, 73(3–4), 150–157. <https://doi.org/10.1159/000367652>

Sashindranath, M., Samson, A. L., Downes, C. E., Crack, P. J., Lawrence, A. J., Li, Q. X., Ng, A. Q. P., Jones, N. C., Farrugia, J. J., Abdella, E., Vassalli, J. D., Madani, R., & Medcalf, R. L. (2011). Compartment- and context-specific changes in tissue-type plasminogen activator (tPA) activity following brain injury and pharmacological stimulation. *Laboratory Investigation*, 91(7), 1079–1091. <https://doi.org/10.1038/labinvest.2011.67>

Sauerbrueh and Heyde: Miinchen. med. Wehnschr., 1910, lvii, 2617.

Schaeffer, S., & Iadecola, C. (2021). Revisiting the neurovascular unit. *Nature Neuroscience*, 24(9), 1198–1209. <https://doi.org/10.1038/s41593-021-00904-7>

Schaller, J., & Gerber, S. S. (2011). The plasmin-antiplasmin system: Structural and functional aspects. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 68(5), 785–801. <https://doi.org/10.1007/s00018-010-0566-5>

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>

Schulze, C., & Firth, J. A. (1993). Immunohistochemical localization of adherens junction components in blood-brain barrier microvessels of the rat. *Journal of Cell Science*, 104(3), 773–782. <https://doi.org/10.1242/jcs.104.3.773>

Scott, R. W., Bergman, B. L., Bajpai, A., Hersh, R. T., Rodriguez, H., Jones, B. N., Barreda, C., Watts, S., & Baker, J. B. (1985). Protease nexin. Properties and a modified purification procedure. *Journal of Biological Chemistry*, 260(11), 7029–7034. [https://doi.org/10.1016/s0021-9258\(18\)88883-4](https://doi.org/10.1016/s0021-9258(18)88883-4)

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), 14118–14123. <https://doi.org/10.1073/pnas.96.24.14118>

Seeds, N. W., Williams, B. L., & Bickford, P. C. (1995). Tissue plasminogen activator induction in purkinje neurons after cerebellar motor learning. *Science*, 270(5244), 1992–1994. <https://doi.org/10.1126/science.270.5244.1992>

Segal, S. S. (2015). Integration and modulation of intercellular signaling underlying blood flow control. *Journal of Vascular Research*, 52(2), 136–157. <https://doi.org/10.1159/000439112>

Seillier, C., Lesept, F., Toutirais, O., Potzha, F., Blanc, M., & Vivien, D. (2022). *Targeting*

NMDA Receptors at the Neurovascular Unit: Past and Future Treatments for Central Nervous System Diseases. Table 1, 1–39.

Sekerdag, E., Solaroglu, I., & Gursoy-Ozdemir, Y. (2018). Cell Death Mechanisms in Stroke and Novel Molecular and Cellular Treatment Options. *Current Neuroparmacology*, 16(9), 1396–1415. <https://doi.org/10.2174/1570159x16666180302115544>

Shechter, R., Miller, O., Yovel, G., Rosenzweig, N., London, A., Julia, R., Kim, K.-W., Klein, E., Kalchenko, V., Bendel, P., Lira, S. A., Jung, S., & Schwartz, M. (2013). Recruitment of Beneficial M2 Macrophages to Injured Spinal Cord Is Orchestrated by Remote Brain Choroid Plexus. *Immunity*, 38(3), 555–569. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2013.02.012>.Recruitment

Shi, K., Zou, M., Jia, D. M., Shi, S., Yang, X., Liu, Q., Dong, J. F., Sheth, K. N., Wang, X., & Shi, F. D. (2021). TPA Mobilizes Immune Cells That Exacerbate Hemorrhagic Transformation in Stroke. *Circulation Research*, 128(1), 62–75. <https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.120.317596>

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. *Journal of Neuroscience*, 24(42), 9425–9433. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.2457-04.2004>

Shiple, F. B., Dani, N., Xu, H., Deister, C., Cui, J., Head, J. P., Sadegh, C., Fame, R. M., Shannon, M. L., Flores, V. I., Kishkovich, T., Jang, E., Klein, E. M., Goldey, G. J., He, K., Zhang, Y., Holtzman, M. J., Kirchhausen, T., Wyart, C., ... Lehtinen, M. K. (2020). Tracking Calcium Dynamics and Immune Surveillance at the Choroid Plexus Blood-Cerebrospinal Fluid Interface. *Neuron*, 108(4), 623–639. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2020.08.024>.Tracking

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), 3352–3358. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.22-09-03352.2002>

Silverman, G. A., Bird, P. I., Carrell, R. W., Church, F. C., Coughlin, P. B., Gettins, P. G. W., Irving, J. A., Lomas, D. A., Luke, C. J., Moyer, R. W., Pemberton, P. A., Remold-O'Donnell, E., Salvesen, G. S., Travis, J., & Whisstock, J. C. (2001). The serpins are an expanding superfamily of structurally similar but functionally diverse proteins. Evolution, mechanism of inhibition, novel functions, and a revised nomenclature. *Journal of Biological Chemistry*, 276(36), 33293–33296. <https://doi.org/10.1074/jbc.R100016200>

- Simard, M., Arcuino, G., Takano, T., Liu, Q. S., & Nedergaard, M. (2003). Signaling at the gliovascular interface. *Journal of Neuroscience*, 23(27), 9254–9262. <https://doi.org/10.1523/jneurosci.23-27-09254.2003>
- Simpson, C. S., Johnston, H. M., & Morris, B. . (1994). Neuronal expression of protease-nexin 1 mRNA in rat brain. *Neuroscience*, 170, 286–290.
- Sinclair, M. D. (2003). A review of the physiological effects of α 2-agonists related to the clinical use of medetomidine in small animal practice. *Canadian Veterinary Journal*, 44(11), 885–897.
- Smith, C. M., Mayer, J. A., & Duncan, I. D. (2013). Autophagy promotes oligodendrocyte survival and function following dysmyelination in a long-lived myelin mutant. *Journal of Neuroscience*, 33(18), 8088–8100. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.0233-13.2013>
- Solár, P., Zamani, A., Kubíčková, L., Dubový, P., & Joukal, M. (2020). Choroid plexus and the blood–cerebrospinal fluid barrier in disease. *Fluids and Barriers of the CNS*, 17(1), 35. <https://doi.org/10.1186/s12987-020-00196-2>
- Soreq, H., & Miskin, R. (1981). Plasminogen activator in the rodent brain. *Brain Research*, 216(2), 361–374.
- Spector, R., Keep, R. F., Robert Snodgrass, S., Smith, Q. R., & Johanson, C. E. (2015). A balanced view of choroid plexus structure and function: Focus on adult humans. *Experimental Neurology*, 267, 78–86. <https://doi.org/10.1016/j.expneurol.2015.02.032>
- Spector, R., Robert Snodgrass, S., & Johanson, C. E. (2015). A balanced view of the cerebrospinal fluid composition and functions: Focus on adult humans. *Experimental Neurology*, 273, 57–68. <https://doi.org/10.1016/j.expneurol.2015.07.027>
- Sprengers, E. ., & Kluft, C. (1991). Plasminogen activator inhibitors. *Blood*, 69(2), 381–387. <https://doi.org/10.3109/9780203213131-22>
- Stefanova, I., Stephan, T., Becker-Bense, S., Dera, T., Brandt, T., & Dieterich, M. (2013). Age-related changes of blood-oxygen-level-dependent signal dynamics during optokinetic stimulation. *Neurobiology of Aging*, 34(10), 2277–2286. <https://doi.org/10.1016/j.neurobiolaging.2013.03.031>
- Stegnar, M., Keber, D., Peternel, P., & Kluft, C. (1988). Diminished release of tissue plasminogen activator during venous occlusion in manual workers. *Fibrinolysis and Proteolysis*, 2(3), 175–179. [https://doi.org/10.1016/0268-9499\(88\)90032-X](https://doi.org/10.1016/0268-9499(88)90032-X)
- Stockinger, W., Hengstschläger-Ottinad, E., Novak, S., Matus, A., Hüttinger, M., Bauer, J., Lassmann, H., Schneider, W. J., & Nimpf, J. (1998). The Low Density Lipoprotein Receptor Gene Family. *Journal of Biological Chemistry*, 273(48), 32213–32221. <https://doi.org/10.1074/jbc.273.48.32213>

- Stoll, G., Jander, S., & Schroeter, M. (1998). Inflammation and glial responses in ischemic brain lesions. *Progress in Neurobiology*, 56(2), 149–171. [https://doi.org/10.1016/S0301-0082\(98\)00034-3](https://doi.org/10.1016/S0301-0082(98)00034-3)
- Stopa, E. G., Tanis, K. Q., Miller, M. C., Nikonova, E. V., Podtelezchnikov, A. A., Finney, E. M., Stone, D. J., Camargo, L. M., Parker, L., Verma, A., Baird, A., Donahue, J. E., Torabi, T., Eliceiri, B. P., Silverberg, G. D., & Johanson, C. E. (2018). Comparative transcriptomics of choroid plexus in Alzheimer's disease, frontotemporal dementia and Huntington's disease: implications for CSF homeostasis. *Fluids and Barriers of the CNS*, 15(1), 18. <https://doi.org/10.1186/s12987-018-0102-9>
- Strazielle, N., & Gherzi-Egea, J.-F. (2016). Potential Pathways for CNS Drug Delivery Across the Blood-Cerebrospinal Fluid Barrier. *Current Pharmaceutical Design*, 22(35), 5463–5476. <https://doi.org/10.2174/1381612822666160726112115>
- 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), 731–737. <https://doi.org/10.1038/nm1787>
- Suzuki, H., Sozen, T., Hasegawa, Y., Chen, W., & Zhang, J. H. (2009). Caspase-1 inhibitor prevents neurogenic pulmonary edema after subarachnoid hemorrhage in mice. *Stroke*, 40(12), 3872–3875. <https://doi.org/10.1161/STROKEAHA.109.566109>
- Suzuki, Y., Nagai, N., Umemura, K., Collen, D., & Lijnen, H. R. (2007). Stromelysin-1 (MMP-3) is critical for intracranial bleeding after t-PA treatment of stroke in mice. *Journal of Thrombosis and Haemostasis*, 5(8), 1732–1739. <https://doi.org/10.1111/j.1538-7836.2007.02628.x>
- Sweeney, P. W., Walker-Samuel, S., & Shipley, R. J. (2018). Insights into cerebral haemodynamics and oxygenation utilising in vivo mural cell imaging and mathematical modelling. *Scientific Reports*, 8(1), 1–15. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-19086-z>
- Szabo, R., Samson, A. L., Lawrence, D. A., Medcalf, R. L., & Bugge, T. H. (2016). Passenger mutations and aberrant gene expression in congenic tissue plasminogen activator-deficient mouse strains. *Journal of Thrombosis and Haemostasis*, 14(8), 1618–1628. <https://doi.org/10.1111/jth.13338>

T

Tabrizi, P., Wang, L., Seeds, N., McComb, J. G., Yamada, S., Griffin, J. H., Carmeliet, P., Weiss, M. H., & Zlokovic, B. V. (1999). Tissue plasminogen activator (tPA) deficiency exacerbates cerebrovascular fibrin deposition and brain injury in a murine stroke model studies in tPA-deficient mice and wild-type mice on a matched genetic background. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, 19(11), 2801–2806. <https://doi.org/10.1161/01.ATV.19.11.2801>

Takamatsu, H., Tsukada, H., Kakiuchi, T., Tatsumi, M., & Umemura, K. (2000). Changes in local cerebral blood flow in photochemically induced thrombotic occlusion model in rats. *European Journal of Pharmacology*, 398(3), 375–379. [https://doi.org/10.1016/S0014-2999\(00\)00292-2](https://doi.org/10.1016/S0014-2999(00)00292-2)

Takeshita, H., Yamamoto, K., Nozato, S., Inagaki, T., Tsuchimochi, H., Shirai, M., Yamamoto, R., Imaizumi, Y., Hongyo, K., Yokoyama, S., Takeda, M., Oguro, R., Takami, Y., Itoh, N., Takeya, Y., Sugimoto, K., Fukada, S. I., & Rakugi, H. (2017). Modified forelimb grip strength test detects aging-associated physiological decline in skeletal muscle function in male mice. *Scientific Reports*, 7(January), 1–9. <https://doi.org/10.1038/srep42323>

Tallini, Y. N., Brekke, J. F., Shui, B., Doran, R., Hwang, S. M., Nakai, J., Salama, G., Segal, S. S., & Kotlikoff, M. I. (2007). Propagated endothelial Ca²⁺ waves and arteriolar dilation in vivo: Measurements in Cx40BAC-GCaMP2 transgenic mice. *Circulation Research*, 101(12), 1300–1309. <https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.107.149484>

Tanaka, R., Komine-Kobayashi, M., Mochizuki, H., Yamada, M., Furuya, T., Migita, M., Shimada, T., Mizuno, Y., & Urabe, T. (2003). Migration of enhanced green fluorescent protein expressing bone marrow-derived microglia/macrophage into the mouse brain following permanent focal ischemia. *Neuroscience*, 117(3), 531–539. [https://doi.org/10.1016/S0306-4522\(02\)00954-5](https://doi.org/10.1016/S0306-4522(02)00954-5)

Tang, G., Cao, Z., Luo, Y., Wu, S., & Sun, X. (2022). Prognosis associated with asymptomatic intracranial hemorrhage after acute ischemic stroke: a systematic review and meta-analysis. *Journal of Neurology*, 269(7), 3470–3481. <https://doi.org/10.1007/s00415-022-11046-6>

Tang, Z. *et al.* (2015) 'Conjugation of polymers to proteins through an inhibitor-derived peptide: Taking up the inhibitor "berth"', *Chemical Communications*, 51(50), pp. 10099–10102. doi: 10.1039/c5cc02659h.

- Teesalu, T., Kulla, A., Simisker, A., Sirén, V., Lawrence, D., Asser, T., & Vaheri, A. (2004). Tissue plasminogen activator and neuroserpin are widely expressed in the human central nervous system. *Thrombosis and Haemostasis*, 92(08), 358–368. <https://doi.org/10.1160/TH02-12-0310>
- Thelwell, C., & Longstaff, C. (2007). The regulation by fibrinogen and fibrin of tissue plasminogen activator kinetics and inhibition by plasminogen activator inhibitor 1. *Journal of Thrombosis and Haemostasis*, 5(4), 804–811. <https://doi.org/10.1111/j.1538-7836.2007.02422.x>
- 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. *The Lancet Neurology*, 17(12), 1121–1132. [https://doi.org/10.1016/S1474-4422\(18\)30323-5](https://doi.org/10.1016/S1474-4422(18)30323-5)
- Tian, F. F., Deguchi, K., Yamashita, T., Ohta, Y., Morimoto, N., Shang, J., Zhang, X., Liu, N., Ikeda, Y., Matsuura, T., & Abe, K. (2010). In vivo imaging of autophagy in a mouse stroke model. *Autophagy*, 6(8), 1107–1114. <https://doi.org/10.4161/auto.6.8.13427>
- Tietz, S., & Engelhardt, B. (2015). Brain barriers: Crosstalk between complex tight junctions and adherens junctions. *Journal of Cell Biology*, 209(4), 493–506. <https://doi.org/10.1083/jcb.201412147>
- Timmusk, T., Lendahl, U., Funakoshi, H., Arenas, E., Persson, H., & Metsis, M. (1995). Identification of brain-derived neurotrophic factor promoter regions mediating tissue-specific, axotomy-, and neuronal activity-induced expression in transgenic mice. *Journal of Cell Biology*, 128(1–2), 185–199. <https://doi.org/10.1083/jcb.128.1.185>
- 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(June). <https://doi.org/10.3389/fnagi.2022.871214>
- Tomkins, A. J., Schleicher, N., Murtha, L., Kaps, M., Levi, C. R., Nedelmann, M., & Spratt, N. J. (2015). Platelet rich clots are resistant to lysis by thrombolytic therapy in a rat model of embolic stroke. *Experimental and Translational Stroke Medicine*, 7(1), 1–9. <https://doi.org/10.1186/s13231-014-0014-y>

Toshniwal, P. K., Firestone, S. L., Barlow, G. H., & Tiku, M. L. (1987). Characterization of astrocyte plasminogen activator. *Journal of the Neurological Sciences*, 80(2–3), 277–287. [https://doi.org/10.1016/0022-510X\(87\)90162-6](https://doi.org/10.1016/0022-510X(87)90162-6)

Toth, P., Tarantini, S., Tucsek, Z., Ashpole, N. M., Sosnowska, D., Gautam, T., Ballabh, P., Koller, A., Sonntag, W. E., Csiszar, A., & Ungvari, Z. (2014). Resveratrol treatment rescues neurovascular coupling in aged mice: Role of improved cerebrovascular endothelial function and downregulation of NADPH oxidase. *American Journal of Physiology - Heart and Circulatory Physiology*, 306(3). <https://doi.org/10.1152/ajpheart.00744.2013>

Trotter, J., Lee, G. H., Kazdoba, T. M., Crowell, B., Domogauer, J., Mahoney, H. M., Franco, S. J., Müller, U., Weeber, E. J., & D'Arcangelo, G. (2013). Dab1 is required for synaptic plasticity and associative learning. *Journal of Neuroscience*, 33(39), 15652–15668. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.2010-13.2013>

Tsirka, S. E., Rogove, A. D., & Strickland, S. (1996). Origin of patterning in neural tubes SIR. *Nature*, 384(6605), 123–124. <https://doi.org/10.1038/384123b0>

Tsirka, Stella E., Bugge, T. H., Degen, J. L., & Strickland, S. (1997). Neuronal death in the central nervous system demonstrates a non-fibrin substrate for plasmin. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 94(18), 9779–9781. <https://doi.org/10.1073/pnas.94.18.9779>

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

U

Uno, M., & Ozawa, N. (1991). Long-term potentiation of the amygdalo-striatal synaptic transmission in the course of development of amygdaloid kindling in cats. *Neuroscience Research*, 12(1), 251–262. [https://doi.org/10.1016/0168-0102\(91\)90115-F](https://doi.org/10.1016/0168-0102(91)90115-F)

V

Varga-Szabo, D., Pleines, I. and Nieswandt, B. (2008) 'Cell adhesion mechanisms in platelets', *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, 28(3), pp. 403–413. doi: 10.1161/ATVBAHA.107.150474.

Van den Aemele, J., Tiberi, L., Vanderhaeghen, P., & Espuny-Camacho, I. (2014). Thinking out of the dish: What to learn about cortical development using pluripotent stem cells. *Trends in Neurosciences*, 37(6), 334–342. <https://doi.org/10.1016/j.tins.2014.03.005>

Van Den Eijnden-Schrauwen, Y., Atsma, D. E., Lupu, F., De Vries, R. E. M., Kooistra, T., & Emeis, J. J. (1997). Involvement of calcium and G proteins in the acute release of tissue- type plasminogen activator and von Willebrand factor from cultured human endothelial cells. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, 17(10), 2177–2187. <https://doi.org/10.1161/01.ATV.17.10.2177>

van Moorsel, M. V. A., de Maat, S., Vercruysse, K., van Leeuwen, E. M., Jacqmarcq, C., Bonnard, T., Vivien, D., van der Worp, H. B., Dijkhuizen, R., & Maas, C. (2022). VWF-targeted thrombolysis to overcome rh-tPA resistance in experimental thrombotic stroke models. *Blood*. <https://doi.org/10.1182/blood.2022016342>

Varga-Szabo, D., Pleines, I., & Nieswandt, B. (2008). Cell adhesion mechanisms in platelets. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, 28(3), 403–413. <https://doi.org/10.1161/ATVBAHA.107.150474>

Vercellino, M., Votta, B., Condello, C., Piacentino, C., Romagnolo, A., Merola, A., Capello, E., Mancardi, G. L., Mutani, R., Giordana, M. T., & Cavalla, P. (2008). Involvement of the choroid plexus in multiple sclerosis autoimmune inflammation: A neuropathological study. *Journal of Neuroimmunology*, 199(1–2), 133–141. <https://doi.org/10.1016/j.jneuroim.2008.04.035>

Verrall, S., & Seeds, N. W. (1989). Characterization of 125I-tissue plasminogen activator binding to cerebellar granule neurons. *Journal of Cell Biology*, 109(1), 265–271. <https://doi.org/10.1083/jcb.109.1.265>

Verstraete M, Bounameaux H, de Cock F, Van de Werf F, and Collen D (1985) Pharmacokinetics and systemic fibrinogenolytic effects of recombinant human tissue-type plasminogen activator (rt-PA) in humans. *J Pharmacol Exp Ther* 235, 506–12.

Vu, T. K. H., Hung, D. T., Wheaton, V. I., & Coughlin, S. R. (1991). Molecular cloning

of a functional thrombin receptor reveals a novel proteolytic mechanism of receptor activation. *Cell*, 64(6), 1057–1068. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(91\)90261-V](https://doi.org/10.1016/0092-8674(91)90261-V)

Vyas, M. V., Silver, F. L., Austin, P. C., Yu, A. Y. X., Pequeno, P., Fang, J., Laupacis, A., & Kapral, M. K. (2021). Stroke Incidence by Sex across the Lifespan. *Stroke, February*, 447–451. <https://doi.org/10.1161/STROKEAHA.120.032898>

W

Wallén, P., Bergsdorf, N., & Rånby, M. (1982). Purification and identification of two structural variants of porcine tissue plasminogen activator by affinity adsorption on fibrin. *BBA - General Subjects*, 719(2), 318–328. [https://doi.org/10.1016/0304-4165\(82\)90105-2](https://doi.org/10.1016/0304-4165(82)90105-2)

Wang, X., Lee, S. R., Arai, K., Lee, S. R., Tsuji, K., Rebeck, G. W., & Lo, E. H. (2003). Lipoprotein receptor-mediated induction of matrix metalloproteinase by tissue plasminogen activator. *Nature Medicine*, 9(10), 1313–1317. <https://doi.org/10.1038/nm926>

Wang, Y. F., Tsirka, S. E., Strickland, S., Stieg, P. E., Soriano, S. G., & Lipton, S. A. (1998). Tissue plasminogen activator (tPA) increases neuronal damage after focal cerebral ischemia in wild-type and tPA-deficient mice. *Nature Medicine*, 4(2), 228–231. <https://doi.org/10.1038/nm0298-228>

Wardlaw, J. M. (2005). What causes lacunar stroke? *Journal of Neurology, Neurosurgery and Psychiatry*, 76(5), 617–619. <https://doi.org/10.1136/jnnp.2004.039982>

Wardlaw, Joanna M., Murray, V., Berge, E., del Zoppo, G., Sandercock, P., Lindley, R. L., & Cohen, G. (2012). Recombinant tissue plasminogen activator for acute ischaemic stroke: an updated systematic review and meta-analysis. *The Lancet*, 379(9834), 2364–2372. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(12\)60738-7](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(12)60738-7)

Watanabe, K., Kudo, Y., Sugawara, E., Nakamizo, T., Amari, K., Takahashi, K., Tanaka, O., Endo, M., Hayakawa, Y., & Johkura, K. (2018). Comparative study of ipsilesional and contralesional repetitive transcranial magnetic stimulations for acute infarction. *Journal of the Neurological Sciences*, 384(November 2017), 10–14. <https://doi.org/10.1016/j.jns.2017.11.001>

Weber, R., Ramos-Cabrera, P., Wiedermann, D., Van Camp, N., & Hoehn, M. (2006). A fully noninvasive and robust experimental protocol for longitudinal fMRI studies in the rat. *NeuroImage*, 29(4), 1303–1310. <https://doi.org/10.1016/j.neuroimage.2005.08.028>

- Weiss, N., Miller, F., Cazaubon, S., & Couraud, P. O. (2009). The blood-brain barrier in brain homeostasis and neurological diseases. *Biochimica et Biophysica Acta - Biomembranes*, 1788(4), 842–857. <https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2008.10.022>
- Wen, Y. D., Sheng, R., Zhang, L. S., Han, R., Zhang, X., Zhang, X. D., Han, F., Fukunaga, K., & Qin, Z. H. (2008). Neuronal injury in rat model of permanent focal cerebral ischemia is associated with activation of autophagic and lysosomal pathways. *Autophagy*, 4(6), 762–769. <https://doi.org/10.4161/auto.6412>
- Wimmer, I., Zrzavy, T., & Lassmann, H. (2018). Neuroinflammatory responses in experimental and human stroke lesions. *Journal of Neuroimmunology*, 323(May), 10–18. <https://doi.org/10.1016/j.jneuroim.2018.07.003>
- Woo, D., Falcone, G. J., Devan, W. J., Brown, W. M., Biffi, A., Howard, T. D., Anderson, C. D., Brouwers, H. B., Valant, V., Battey, T. W. K., Radmanesh, F., Raffeld, M. R., Baedorf-Kassis, S., Deka, R., Woo, J. G., Martin, L. J., Haverbusch, M., Moomaw, C. J., Sun, G., ... Rosand, J. (2014). Meta-analysis of genome-wide association studies identifies 1q22 as a susceptibility locus for intracerebral hemorrhage. *American Journal of Human Genetics*, 94(4), 511–521. <https://doi.org/10.1016/j.ajhg.2014.02.012>
- Wright, B. L. C., Lai, J. T. F., & Sinclair, A. J. (2012). Cerebrospinal fluid and lumbar puncture: A practical review. *Journal of Neurology*, 259(8), 1530–1545. <https://doi.org/10.1007/s00415-012-6413-x>
- Wright, P. W., Brier, L. M., Bauer, A. Q., Baxter, G. A., Kraft, A. W., Reisman, M. D., Bice, A. R., Snyder, A. Z., Lee, J. M., & Culver, J. P. (2017). Functional connectivity structure of cortical calcium dynamics in anesthetized and awake mice. *PLoS ONE*, 12(10), 1–27. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0185759>
- Wu, F., Echeverry, R., Wu, J., An, J., Haile, W. ., Cooper, D. ., Catano, M., & Yepes, M. (2013). Tissue-type Plasminogen Activator Protects Neurons from Excitotoxin-induced Cell Death via Activation of the ERK ½ - CREB-ATF3 Signaling Pathway. *Molecular and Cellular Neuroscience*, 52, 9–19. <https://doi.org/10.1016/j.mcn.2012.10.001>. Tissue-type
- Wyseure, T., Rubio, M., Denorme, F., De Lizarrondo, S. M., Peeters, M., Gils, A., De Meyer, S. F., Vivien, D., & Declerck, P. J. (2015). Innovative thrombolytic strategy using a heterodimer diabody against TAFI and PAI-1 in mouse models of thrombosis and stroke. *Blood*, 125(8), 1325–1332. <https://doi.org/10.1182/blood-2014-07-588319>

X

Xiang, J., Routhe, L. J., Andrew Wilkinson, D., Hua, Y., Moos, T., Xi, G., & Keep, R. F. (2017). The choroid plexus as a site of damage in hemorrhagic and ischemic stroke and its role in responding to injury. *Fluids and Barriers of the CNS*, 14(1), 1–13. <https://doi.org/10.1186/s12987-017-0056-3>

Y

Yamamoto, C., Sugato, M., Fujiwara, Y., & Kaji, T. (2005). Selective promotion of plasminogen activator inhibitor-1 secretion by activation of proteinase-activated receptor-1 in cultured human brain microvascular pericytes: Comparison with endothelial cells. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*, 28(2), 208–211. <https://doi.org/10.1248/bpb.28.208>

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), 79–87.

Yang, C., Liu, Z. L., Wang, J., Bu, X. Le, Wang, Y. J., & Xiang, Y. (2021). Parabiosis modeling: Protocol, application and perspectives. *Zoological Research*, 42(3), 253–261. <https://doi.org/10.24272/J.ISSN.2095-8137.2020.368>

Yang, Y., Estrada, E. Y., Thompson, J. F., Liu, W., & Rosenberg, G. A. (2007). Matrix metalloproteinase-mediated disruption of tight junction proteins in cerebral vessels is reversed by synthetic matrix metalloproteinase inhibitor in focal ischemia in rat. *Journal of Cerebral Blood Flow and Metabolism*, 27(4), 697–709. <https://doi.org/10.1038/sj.jcbfm.9600375>

Yang, Y., & Rosenberg, G. A. (2011). Blood-brain barrier breakdown in acute and chronic cerebrovascular disease. *Stroke*, 42(11), 3323–3328. <https://doi.org/10.1161/STROKEAHA.110.608257>

Yepes, M., & Lawrence, D. A. (2004). Neuroserpin: A selective inhibitor of tissue-type plasminogen activator in the central nervous system. *Thrombosis and Haemostasis*, 91(3), 457–464. <https://doi.org/10.1160/th03-12-0766>

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), 1533–1540. <https://doi.org/10.1172/JCI200319212>

Yilmaz, G., & Granger, D. . (2008). Cell adhesion molecules and ischemic stroke. *Neurological Research*, 30(8), 783–793. <https://doi.org/10.1179/174313208X341085>.CELL

Yousufuddin, M., & Young, N. (2019). *www.aging-us.com AGING 2019, Vol. 11, No. 9. 11(9), 2542–2544.*

Z

Zaleska, M. M. *et al.* (2009) 'The development of stroke therapeutics: Promising mechanisms and translational challenges', *Neuropharmacology*, 56(2), pp. 329–341. doi: 10.1016/j.neuropharm.2008.10.006.

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 and Metabolism*, 29(12), 1946–1954. <https://doi.org/10.1038/jcbfm.2009.174>

Zhang, X., Yan, H., Yuan, Y., Gao, J., Shen, Z., Cheng, Y., Shen, Y., Wang, R. R., Wang, X., Hu, W. W., Wang, G., & Chen, Z. (2013). Cerebral ischemia-reperfusion-induced autophagy protects against neuronal injury by mitochondrial clearance. *Autophagy*, 9(9), 1321–1333. <https://doi.org/10.4161/auto.25132>

Zhang, Y., Proenca, R., Maffei, M., Barone, M., Leopold, L., & Friedman, J. (1994). Positional cloning of the mouse obese gene and its human homologue. *Nature*, 372(DECEMBER), 425–432. <https://www.nature.com/articles/372425a0.pdf>

Zhang, Yun, & Pardridge, W. M. (2001). Conjugation of brain-derived neurotrophic factor to a blood-brain barrier drug targeting system enables neuroprotection in regional brain ischemia following intravenous injection of the neurotrophin. *Brain Research*, 889(1–2), 49–56. [https://doi.org/10.1016/S0006-8993\(00\)03108-5](https://doi.org/10.1016/S0006-8993(00)03108-5)

Zhao, X. J., Larkin, T. M., Lauver, M. A., Ahmad, S., & Ducruet, A. F. (2017). Tissue plasminogen activator mediates deleterious complement cascade activation in stroke. *PLoS ONE*, 12(7), 1–15. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0180822>

Zheng, G., Bachinsky, D. R., Stamenkovic, I., Strickland, D. K., Brown, D., Andres, G.,

& McCluskey, R. T. (1994). Organ distribution in rats of two members of the low-density lipoprotein receptor gene family, gp330 and LRP/alpha 2MR, and the receptor-associated protein (RAP). *Journal of Histochemistry & Cytochemistry*, 42(4), 531–542. <https://doi.org/10.1177/42.4.7510321>

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), 743–753. <https://doi.org/10.1182/blood-2018-07-864843>

Zheng, Z., Nayak, L., Wang, W., Yurdagul, A., Wang, X., Cai, B., Lapping, S., Ozcan, L., Ramakrishnan, R., Pestell, R. G., Jain, M. K., & Tabas, I. (2019). An ATF6-tPA pathway in hepatocytes contributes to systemic fibrinolysis and is repressed by DACH1. *Blood*, 133(7), 743–753. <https://doi.org/10.1182/blood-2018-07-864843>

Zhou, A., Faint, R., Charlton, P., Dafforn, T. R., Carrell, R. W., & Lomas, D. A. (2001). Polymerization of Plasminogen Activator Inhibitor-1. *Journal of Biological Chemistry*, 276(12), 9115–9122. <https://doi.org/10.1074/jbc.M010631200>

Zhuo, M. *et al.* (2000) 'Role of tissue plasminogen activator receptor LRP in hippocampal long- term potentiation', *Journal of Neuroscience*, 20(2), pp. 542–549. doi: 10.1523/jneurosci.20-02-00542.2000.

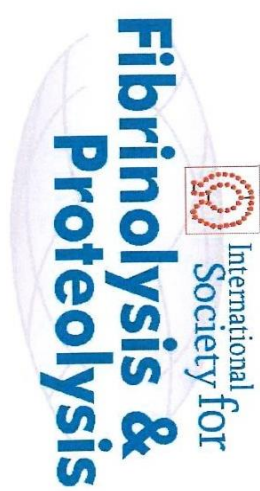
Zhu, J., Wan, Y., Xu, H., Wu, Y., Hu, B., & Jin, H. (2019). The role of endogenous tissue-type plasminogen activator in neuronal survival after ischemic stroke: friend or foe? *Cellular and Molecular Life Sciences*, 76(8), 1489–1506. <https://doi.org/10.1007/s00018-019-03005-8>

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. *Journal of Neuroscience*, 20(2), 542–549. <https://doi.org/10.1523/jneurosci.20-02-00542.2000>

Zlokovic, B. ., Zhang, C., Liu, D., Fernandez, J., Griffinn, J. ., & Chopp, M. (2005). Functional Recovery after Embolic Stroke in Rodents by Activated Protein C. *Annals of Neurology*, 58, 474–477.

Zonta, M., Sebelin, A., Gobbo, S., Fellin, T., Pozzan, T., & Carmignoto, G. (2003). Glutamate-mediated cytosolic calcium oscillations regulate a pulsatile prostaglandin release from cultured rat astrocytes. *Journal of Physiology*, 553(2), 407–414. <https://doi.org/10.1113/jphysiol.2003.046706>

ANNEXES



Has awarded the 2022

D. Colleen Young Investigator Award, 2nd Prize

for outstanding contributions to the field of Fibrinolysis and Proteolysis

to

Jonathane FURON

IIIrd Joint Meeting of the International Society for Fibrinolysis and Proteolysis and the
Plasminogen Activation Workshop XVIth

Caen, September 6, 2022


N. Mutch
Chairman


P. Kim
Executive Director


D. Vivien
Congress President

Contribution of circulating tissue-type Plasminogen Activator (tPA) to cerebral physiopathology

Jonathane Furon¹, Florent Lebrun^{1,2}, Quentin Gérard¹, Mervé Yetim², Cyrille Orset¹, Denis Vivien^{1,3}, Carine Ali¹

¹Normandie University, UNICAEN, INSERM UMR-S U1237, Physiopathology and Imaging of Neurological Disorders (PhIND), GIP Cycleron, Institut Blood and Brain @ Caen-Normandie (BB@C), 14000 Caen, France.

²ETAP-Lab, STROK@LLIANCE, 54500 Vandœuvre-les-Nancy, France.

³Department of clinical research, Caen-Normandie University Hospital, 14000 Caen, France.

@: furon@cycleron.fr



1. Introduction

Intravenous injection of recombinant tissue-type plasminogen activator (tPA) as a thrombolytic agent has revolutionized the management of ischemic stroke patients. Several observations suggest that both endogenous (neuronal and endothelial) and exogenous tPA, may influence the (dys)functions of nerve cells and of the interface between the blood and the brain. However, the respective role of neuronal versus circulating tPA in the cerebrovascular physiopathology is not well known. We sought to develop a tool to selectively remove tPA from the circulation, without affecting tPA in other compartments. We therefore performed parabioses between tPA deficient mice (tPANULL) and/or wild-type mice (tPA^{WT}).

3. Results

1. Neurovascular coupling (NVC)

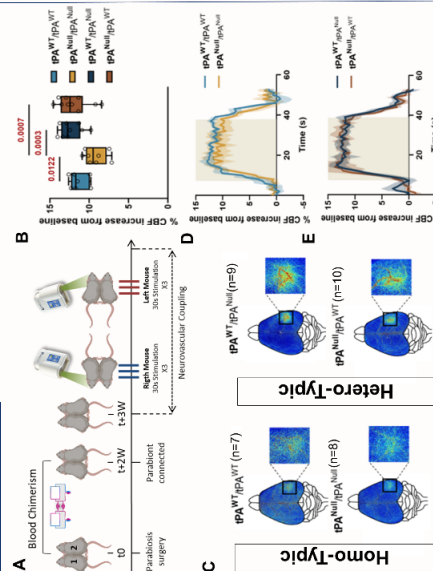


Fig. 1: Circulating tPA contributes to NVC. A. Schematic representation of experimental study design for parabiosis surgery and whiskers stimulations. B. Box plots show the variation of % CBF increase from baseline during whiskers stimulations in homo-parabiosis tPA^{WT}/tPA^{WT} and tPA^{WT}/tPA^{NUL} mice. C. Colormap corresponds to the activation map related to ΔCBF changes during whiskers stimulations in parabiosis tPA^{WT} or tPA^{NUL} mice. D. Time course of % CBF increase (mean ± SEM) during whiskers stimulations (1) in homo-parabiosis tPA^{WT} (blue) and tPA^{NUL} (red) mice. E. tPA^{WT} tPA^{WT} (n=7) and tPA^{WT} tPA^{NUL} (n=8) mice.

2. Thromboembolic stroke

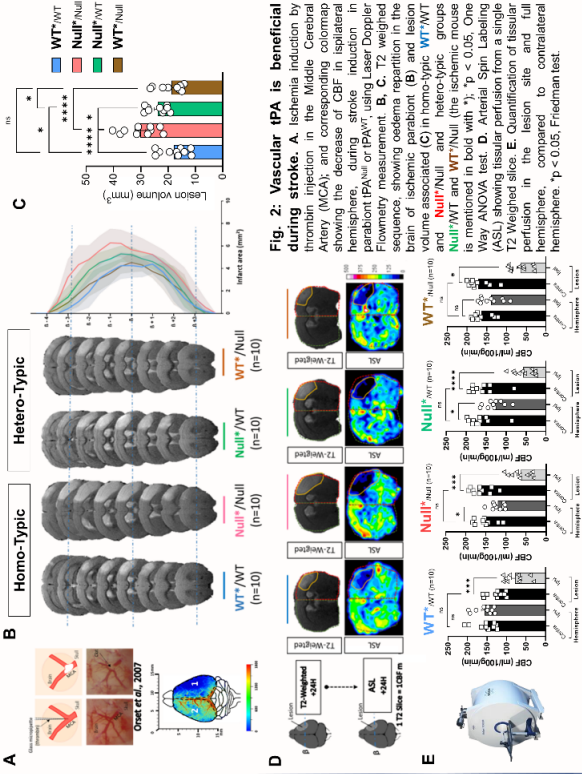
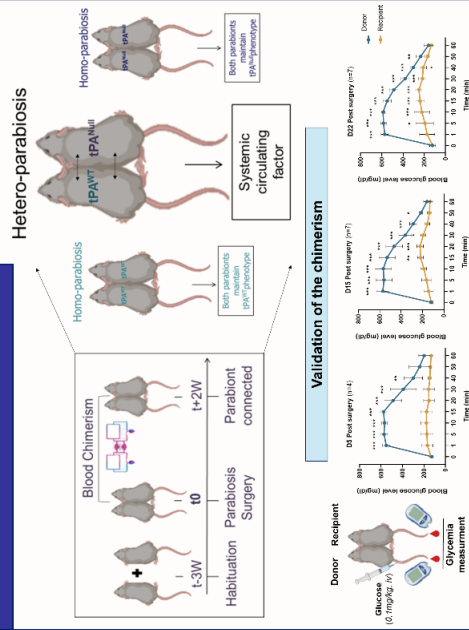
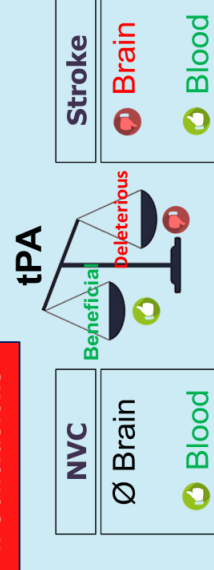


Fig. 2: Vascular tPA is beneficial during stroke. A. Ischemia induction by thrombin injection in the Middle Cerebral Artery (MCA), and corresponding colormap showing the decrease of CBF in ipsilateral hemisphere. B. Cerebral perfusion in parabiosis tPA^{WT} or tPA^{NUL} mice using Laser Doppler Flowmetry measurement. C. T2 weighted sequence, showing oedema repartition in the brain of ischemic parabiosis (B) and lesion volume associated (C) in homo-typic tPA^{WT} and tPA^{NUL} mice. D. Atrial Spin Labeling (ASL) showing lesion repartition from a single ASL image. E. Lesion volume and total perfusion in the lesion slice and full hemisphere, compared to contralateral hemisphere. *p < 0.05, Friedman test.

2. Methods: Parabiosis



4. Conclusions





UNIVERSITÉ
CAEN
NORMANDIE

Instituts
thématiques



Inserm

Institut national
de la santé et de la recherche médicale

Université de Caen Normandie

UFR des Sciences - Département Biologie Sciences Terre

Année universitaire 2021-2022

Master 1 Neurosciences : Parcours Neurosciences Moléculaires, Cellulaires et Intégrées

**Mise au point de techniques de détection du pro-BDNF et du BDNF mature
dans les plexus choroïdes de souris**

Valentine Bouteiller

Sous la direction du Pr. Carine Ali et de Jonathane Furon

UMR-S INSERM U1237

Physiopathology and Imaging of Neurological Disorders (PhIND)

Dirigée par le Pr. Denis Vivien

Institut Blood and Brain @Caen-Normandie

GIP Cyceron, Boulevard Becquerel, 14074 CAEN

PhIND



PHYSIOPATHOLOGY
& IMAGING OF
NEUROLOGICAL DISORDERS



BB@C
BLOOD & BRAIN @ CAEN NORMANDIE



Cyceron
PLATEFORME D'IMAGERIE BIOMÉDICALE

RÉSUMÉ

L'accident vasculaire cérébral (AVC) ischémique est une pathologie aux conséquences souvent dramatiques et pour laquelle l'approche thérapeutique pharmacologique aiguë reste trop peu efficace. Celle-ci consiste à administrer l'activateur tissulaire du plasminogène (tPA), qui permet indirectement de dégrader la fibrine, le principal composant des caillots. Le tPA vasculaire est aussi produit de manière endogène par l'endothélium. Il est aussi exprimé par d'autres organes, dont le cerveau, et le tPA vasculaire peut entrer dans le parenchyme cérébral, *via* la barrière hémato-encéphalique (BHE). De ce fait, attribuer avec certitude une fonction cérébrale au tPA vasculaire est limité par l'absence d'outils précliniques permettant d'éliminer sélectivement le tPA circulant sans affecter le tPA des autres compartiments de l'organisme. Nos travaux visent donc à développer des outils originaux afin de définir précisément la contribution du tPA endogène vasculaire dans la physiopathologie cérébrale, et notamment dans deux processus distincts : l'un physiologique, lors du couplage neurovasculaire (CNV) et l'autre pathologique, lors d'une ischémie cérébrale. Nous avons développé un modèle de parabiose entre une souris sauvage (tPA^{WT}) et une souris totalement déficiente en tPA (tPA^{Null}), avec l'hypothèse que le partage de circulation sanguine restaure le niveau circulant de tPA chez la souris déficiente, sans affecter ce niveau dans les autres compartiments. Nous démontrons ainsi que les taux physiologiques de tPA vasculaire (produit libéré par les cellules endothéliales et hépatiques) favorisent le CNV *via* un mécanisme dépendant des récepteurs NMDA endothéliaux. De plus, nous apportons les premières démonstrations que le tPA vasculaire rejoint le cerveau en franchissant la barrière formée par les plexus choroïdes. Enfin, nous montrons que, dans le cadre d'un AVC thromboembolique, le tPA vasculaire endogène permet de protéger le cerveau en restaurant de manière efficace la perfusion cérébrale.

Mots clés : AVC, BHE, BSLCS, Cerveau, CNV, Parabiose, Plexus Choroïdes, tPA.

ABSTRACT

Stroke is a pathology with dramatic consequences and for which the acute pharmacological therapeutic approach remains too inefficient. This approach consists in administering tissue-type plasminogen activator (tPA), which indirectly allows to degrade fibrin, the main component of clots. Vascular tPA is also endogenously produced by the endothelium. It is also expressed by other organs, including the brain, and vascular tPA can enter the cerebral parenchyma, via the blood-brain barrier (BBB) and/or choroid plexuses. Thus, it is difficult to attribute a specific cerebral function to vascular tPA because no known preclinical tool can selectively eliminate circulating tPA without affecting tPA levels in the other compartments of the body. Our work therefore aims to develop original tools in order to precisely define the contribution of endogenous vascular tPA to cerebral physiopathology, and in particular two distinct processes: a physiological, during neurovascular coupling (NVC) and the other pathological, during stroke. We developed a parabiosis between a Wild-Type mouse (tPA^{WT}) and a totally tPA-deficient mouse (tPA^{Null}), with the hypothesis that blood circulation sharing restores the circulating level of tPA in the deficient mouse, without affecting the level in others compartments. We thus demonstrate that physiological levels of vascular tPA (product released by endothelial and hepatic cells) promote CNV via a mechanism dependent on endothelial NMDA receptors. Similarly, we provide the first demonstrations that vascular tPA reaches the brain by crossing the barrier formed by the choroid plexus. Finally, we show that in the context of a thromboembolic stroke, vascular tPA, despite specific effects, has an overall beneficial effect.

Key words: BBB, BCSFB, Brain, Choroid Plexus, NVC, Parabiosis, Stroke, tPA.