



HAL
open science

Expression du Facteur XII dans le système nerveux central et son rôle dans l'apoptose neuronale

Eugenie Garnier

► **To cite this version:**

Eugenie Garnier. Expression du Facteur XII dans le système nerveux central et son rôle dans l'apoptose neuronale. Neurobiologie. Normandie Université, 2018. Français. NNT : 2018NORMC413 . tel-02996104

HAL Id: tel-02996104

<https://theses.hal.science/tel-02996104>

Submitted on 9 Nov 2020

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

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



Normandie Université

THÈSE

Pour obtenir le diplôme de doctorat

Spécialité ASPECTS MOLECULAIRES ET CELLULAIRES DE LA BIOLOGIE

Préparée au sein de l'Université de Caen Normandie

Expression du Facteur XII dans le système nerveux central et son rôle dans l'apoptose neuronale

**Présentée et soutenue par
Eugenie GARNIER**

**Thèse soutenue publiquement le 16/10/2018
devant le jury composé de**

M. OLIVIER CHRISTOPHE	Directeur de recherche, INSERM VILLEJUIF	Rapporteur du jury
Mme TIZIANA CREPALDI	Professeur, Université de Turin - Italie	Rapporteur du jury
Mme CARINE ALI	Professeur des universités, UNIVERSITE CAEN NORMANDIE	Président du jury
Mme GERALDINE LIOT	Maître de conférences, UNIVERSITE PARIS 11 PARIS-SUD	Membre du jury
Mme SARA MARTINEZ DE LIZARRONDO	Chercheur, UNIVERSITE CAEN NORMANDIE	Membre du jury
M. FABIAN DOCAGNE	Chargé de recherche à l'INSERM, UNIVERSITE CAEN NORMANDIE	Directeur de thèse

Thèse dirigée par FABIAN DOCAGNE, Physiopathologie et imagerie des troubles neurologiques



UNIVERSITÉ
CAEN
NORMANDIE



Normandie de Biologie Intégrative,
Santé, Environnement



La science pour la santé
From science to health

Remerciements

Deseo darle las gracias a Dr Sara Martinez de Lizarrondo por toda su ayuda. Fui tu primer alumno y espero que tengas buenos recuerdos. #TeamMartinez. Je tiens également à remercier le Dr Fabian Docagne pour son accueil dans son équipe et son encadrement durant ma thèse. Merci de m'avoir fait confiance durant ces années et d'avoir supervisé ces travaux.

Merci au Pr Denis Vivien de m'avoir ouvert les portes de son unité, et de nous permettre à tous de mener nos recherches dans des conditions exceptionnelles.

Je remercie chaleureusement le Dr Olivier Christophe et le Dr Tiziana Crepaldi d'avoir accepté et pris le temps d'évaluer ces travaux.

Je remercie également Dr Géraldine Liot d'avoir accepté de participer à ma soutenance. Vos travaux au sein du laboratoire ont été les piliers de ma thèse et j'espère leur avoir fait honneur.

Je remercie vivement le Pr Carine Ali. Après mon mémoire de Master 2, tu examines ma thèse. C'est un très grand plaisir pour moi que tu sois là aujourd'hui. L'Université Normande et l'unité ont beaucoup de chance de te compter parmi eux. Un petit clin d'œil à ton premier étudiant le Dr Benoît Roussel à qui tu as su transmettre ta pédagogie.

Je remercie les membres de mon bureau, C047, le bureau des « sans ambiance ». Merci aux Douceaux (Sara Souceau & Matthieu Lepine) pour toutes les soirées passées ensemble et pour notre unique tentative de soirée jeux de société. Merci à Camille Brodin pour toutes ses chansons motivantes et sa bonne humeur. Merci à Héloïse Lebas pour toute l'entraide au cours de ces années d'étude, thèse et master confondus. Merci à Elodie Hedou sans qui l'aventure MET n'aurait vraiment pas été la même.

Je remercie mon voisin de bureau Charly Helaine pour tout notre covoiturage très matinal et pour avoir été cherché mon téléphone portable à Douvre-La-Délivrande un vendredi soir à 20h.

Je remercie le Dr Eric Maubert pour toute sa précieuse aide en immunologie. Je remercie également les autres enseignants chercheurs, le Dr Cyrille Orset et le Dr Isabelle Bardou pour m'avoir donné envi de faire cette thèse.

Je remercie également tout mes autres voisins de bureau, Rhéda Stroiazzo, Vincent Zuba, le Dr Sophie Lenoir, Barbara Delaunay, Anastasia Lanquetin, Anna Rose, Pauline Hélie, Isabelle Wagnon, Yannick Hommet, Laurent Lebouvier, Sébastien Chagnot, Aurélie Ferré, Fanny Potzaha, Célia Seillier, Damien Levard et Alexandre Varangot, pour le simple fait d'avoir été présent. Au cours de ces années de travail j'ai énormément appris de toutes les personnes que j'ai côtoyées au sein de l'équipe.

Je remercie également mes sœurs et mon frère qu'ils soient de sang ou de cœur, Anne-Charlotte & Marie-Astrid Garnier, Audrey Thiebaut et Franck Graindorge.

Je remercie mon copain Simon Hamard pour son soutien lors de ces presque 10 années ensemble.

Enfin mes derniers remerciements vont à mes parents, Catherine & Sylvain Garnier pour toutes leurs aides, quelle soit morale, financière ou orthographique.



Résumé

Le facteur XII (FXII) est une sérine protéase de 80 kDa produite et sécrétée par le foie qui initie la voie intrinsèque de la coagulation. Diverses études ont montré un rôle délétère du FXII dans des pathologies cérébrales telles que l'accident vasculaire cérébral, la maladie d'Alzheimer et la sclérose en plaques. Néanmoins, l'impact direct du FXII sur le devenir des cellules neuronales reste inconnu. De plus, l'expression du FXII dans le système nerveux central (SNC) n'a pas encore été étudiée. Le premier objectif de nos travaux a été d'étudier le rôle du FXII dans l'apoptose neuronale puis dans un second temps d'étudier l'expression du FXII dans le SNC.

Dans notre étude, nous avons constaté que le FXII protège les neurones en culture de la mort apoptotique. Les effets bénéfiques du FXII résultent de l'interaction directe du FXII avec le récepteur du facteur de croissance épidermique (EGFR). L'activation de l'EGFR par le FXII déclenche les voies signalétiques antiapoptotiques MAPK. Il est intéressant de noter que la forme double chaîne du FXII, α FXIIa, exerce des effets protecteurs complémentaires en convertissant le précurseur du facteur de croissance hépatocytaire en sa forme mature, ce qui active à son tour le récepteur MET. Enfin, dans notre étude, nous avons observé que le FXII était exprimé dans le SNC (à la fois l'ARNm et la protéine). Cette expression est notamment retrouvée au niveau des neurones corticaux. Ce travail décrit un nouveau mécanisme d'action du FXII et décrit les neurones en tant que cellules cibles pour les effets facteur de croissance du FXII. Dans l'ensemble, ces travaux devraient donc aider à mieux comprendre comment le FXII agit dans les pathologies cérébrales en tant que sérine-protéase unique à l'interface de la thrombose, de l'inflammation et de la survie cellulaire.

Mots clés : Facteur XII, EGFR, MET, apoptose, neurones

Abstract

Factor XII (FXII) is an 80 kDa serine protease produced and secreted by the liver that participates in the intrinsic coagulation pathway. Various studies have shown a deleterious role of FXII in cerebral pathologies like stroke, Alzheimer disease and multiple sclerosis. Nevertheless, the direct impact of FXII on neuronal cell fate remains unknown. In addition, the expression of FXII in the central nervous system (CNS) has not been investigated yet. The first objective of our work was to study the role of FXII in neuronal apoptosis and then to study the expression of FXII in the CNS.

In our work, we found that FXII protects cultured neurons from apoptotic death by a growth factor-like effect. The beneficial effects of FXII result from the direct interaction with the epidermal growth factor receptor (EGFR). Activation of EGFR by FXII triggers antiapoptotic signaling MAPK pathways. Interestingly, the two chain form of FXII, α FXIIa, exerts complementary protective effects by converting the hepatocyte growth factor (HGF) precursor into its mature form, which in turn activates MET receptor. Finally in our work we observed FXII expression in the CNS (both mRNA and protein). This expression is particularly found in cortical neurons. This work describes a novel mechanism of action of FXII and discloses neurons as target cells for growth factor effects of FXII. Overall, these works should thus help further understanding how FXII acts in brain diseases as a unique serine-protease at the interface of thrombosis, inflammation and cell survival.

Key words : Factor XII, EGFR, MET, apoptosis, neurons

Table des matières

Remerciements	
Résumé.....	
Table des matières	
Index des Figures.....	
Index des Tableaux.....	
Abréviations	
INTRODUCTION	1
I. Le Facteur XII	1
1) Découverte	1
2) Activation	1
a) Clivage protéolytique	2
b) Activation du β FXIIa, forme tronquée de l' α FXIIa	5
c) Activité protéolytique de la forme simple chaîne FXII.....	6
d) Inhibition du Facteur XII.....	6
3) Rôles du Facteur XII dépendant de son domaine sérine protéase	8
a) Hémostase	8
b) Système Kallikréïne-Kinine.....	13
c) Rôles de la phase contact dans les pathologies du système nerveux central.....	15
4) Rôles du Facteur XII dépendant de son domaine fibronectine de type 2 et de l'interaction avec uPAR	18
a) Rôle du FXII dans l'angiogénèse.....	18
b) Rôle du FXII dans la sclérose en plaques	20
c) Rôle du FXII dans la cicatrisation	21
5) Rôles du Facteur XII dépendant de ses autres domaines	22
6) Expression du Facteur XII	23
II. Rôle domaine EGF-like	26
1) Le récepteur EGF	26
2) Rôle du domaine EGF-like du tPA dans l'apoptose cérébrale.....	27
3) Homologies structurelles des EGF-like domaines du tPA et du FXII	29
4) Expression du tPA dans le système nerveux central.....	30
5) Rôle sur l'apoptose du FXII ?	32
6) Rôle du FXII dans la voie HGF/MET	32
a) La voie HGF/MET.....	32

b)	Activation de la voie HGF/MET par le tPA et le FXII	33
7)	Rôle des récepteurs EGFR et MET dans l'apoptose	34
III.	L'apoptose	37
1)	Généralités	37
a)	Historique.....	37
b)	Morphologie de l'apoptose	38
2)	Mécanismes.....	39
a)	Voie extrinsèque (voie signaux de mort).....	40
b)	Voie intrinsèque (ou mitochondriale).....	40
c)	Issues biochimiques de l'apoptose	41
d)	Différence nécrose et apoptose	42
3)	Techniques de visualisation	44
a)	La fragmentation de l'ADN	44
b)	L'activation des caspases et les protéines de la famille de Bcl-2	45
c)	Domages de la membrane plasmique	45
d)	Domages mitochondriaux.....	45
4)	Rôles physiologique et pathologique de l'apoptose dans le système nerveux central	46
a)	Physiologie	46
b)	Pathologie	47
5)	Modèles <i>vitro</i> d'apoptose cérébrale.....	50
a)	Le modèle murin d'apoptose neuronale <i>in vitro</i> par sevrage en sera (SD).....	50
b)	Autres modèles	53
	OBJECTIFS DE L'ETUDE	57
	ETUDE 1 : Rôle du Facteur XII dans l'apoptose neuronale	61
1)	Avant-propos.....	61
a)	Contexte de l'étude	61
b)	Question posée	61
c)	Méthodes.....	62
d)	Principaux résultats.....	62
2)	Article Etude 1 – Coagulation Factor XII protects neurons from apoptosis by direct and indirect growth factor activity.....	63
	Abstract	64
	Introduction.....	65
	Materials and methods	67
	Results	71
	Discussion.....	75

Figure and Figure Legends	80
References.....	88
Supplemental figures	91
3) Conclusion Etude 1.....	95
ETUDE 2 : Expression du Facteur XII dans le système nerveux central.....	96
1) Avant-propos.....	96
a) Contexte de l'étude	96
b) Question posée	96
c) Méthodes.....	96
d) Principaux résultats.....	97
2) Introduction.....	98
3) Matériels et Méthodes.....	99
Animaux.....	99
Immunohistochimie	99
Cultures primaires de neurones corticaux murins.....	100
Cultures primaires d'astrocytes murins	100
Cultures primaires d'oligodendrocytes de rat (OPC)	101
Extraction et Quantification des ARN totaux	101
Transcription inverse.....	101
Quantitative PCR (qPCR)	102
Analyses statistiques	103
4) Résultats.....	103
Expression de la protéine FXII dans le cerveau de souris adultes	103
Variations de l'expression transcriptionnelle du FXII au cours du développement cérébral de la souris	105
Expression transcriptionnelle du FXII dans le cerveau de souris adulte.....	107
Variations de l'expression transcriptionnelle du FXII au cours du vieillissement cérébral chez la souris	108
5) Conclusion de l'étude 2.....	109
DISCUSSION.....	113
1) Rôle anti-apoptotique des différentes formes de Facteur XII	115
2) Interaction du FXII avec le récepteur EGFR.....	117
3) Rôle du FXII dans la voie anti-apoptotique HGF/MET.....	118
4) Coopération EGFR/MET dans l'apoptose neuronale médiée par le FXII	120
6) Pertinence <i>in vivo</i> des mécanismes décrits	123
a) Pertinence du mécanisme anti-apoptotique du FXII en physiologie.....	123

a) Pertinence du mécanisme anti-apoptotique du FXII en pathologie.....	124
7) Perspectives de l'étude	127
BIBLIOGRAPHIE	131

Index des Figures

Figure 1 : Photographie d'un prélèvement de sang du patient John Hageman par l'hématologue Oscar Ratnoff.	1
Figure 2 : Structure des différentes formes de FXII.	2
Figure 3 : Génération de l' α FXIIa par les polyP plaquettaires et expression des polyP dans le système nerveux central.	4
Figure 4 : Schématisation des différents activateurs et des différentes surfaces d'activation du FXII.	5
Figure 5 : Résumé des différentes étapes de l'Hémostase.	8
Figure 6 : Schématisation de la cascade d'activation de la voie intrinsèque de la coagulation.	10
Figure 7 : Schématisation de l'Hémostase primaire et secondaire.	11
Figure 8 : Schématisation de l'hémostase tertiaire.	13
Figure 9 : L'activation de la phase contact.	13
Figure 10 : Schématisation de la phase contact.	14
Figure 11 : Schématisation du modèle d'action du FXII dans l'AD selon l'équipe de Strickland.	16
Figure 12 : Rôle du FXII dans un modèle d'AVC ischémique par occlusion de l'artère cérébrale moyenne par filament.	17
Figure 13 : Modèle signalétique proposé par LaRusch et al., en 2010.	19
Figure 14 : Comparaison des scores cliniques EAE-MOG entre les souris sauvages (WT) et les souris déficientes en FXII (F12 ^{-/-}).	20
Figure 15 : Rôle de FXII dans la cicatrisation.	22
Figure 16 : Expression du FXII.	24
Figure 17 : Schématisation des différentes cascades de signalisation du récepteur EGF.	26
Figure 18 : Rôle anti-apoptotique du tPA indépendant de son domaine catalytique sur les neurones corticaux.	27
Figure 19 : Rôle anti-apoptotique du tPA sur les progéniteurs d'oligodendrocytes.	28
Figure 20 : Schématisation du rôle anti-apoptotique du tPA dans le cerveau.	29
Figure 21 : Comparatif des structures de deux sérines protéases impliquées dans l'hémostase : le simple chaîne FXII et le simple chaîne tPA.	30
Figure 22 : Expression du tPA dans le SNC par les différents types cellulaires : Neurones, Astrocytes, Microglie, Oligodendrocytes.	31
Figure 23 : Schématisation des différentes cascades de signalisation du récepteur MET.	32
Figure 24 : Schématisation de la coopération MET/EGFR.	34
Figure 25 : Prix Nobel de Physiologie ou Médecine en 2002.	37
Figure 26 : Illustration des différentes étapes morphologiques de l'apoptose.	39
Figure 27 : Schématisation des différentes étapes de l'apoptose.	42
Figure 28 : Evolution temporelle des principaux phénomènes délétères lors de l'ischémie cérébrale.	49
Figure 29 : Schématisation du protocole de sevrage en sera (SD, Serum Deprivation).	51
Figure 30 : Caractérisation du modèle de SD.	52
Figure 31 : Expression de FXII par les neurones striataux chez la souris adulte.	104
Figure 32 : Expression de FXII par les neurones hippocampiques chez la souris adulte.	104
Figure 33 : Expression de FXII par les neurones corticaux chez la souris adulte.	105
Figure 34 : Effet du développement cérébral sur la transcription de FXII dans le SNC.	106

Figure 35 : Expression de l'ARNm du FXII par le cerveau de souris adulte et par la cultures primaires de cellules cérébrales.....	107
Figure 36 : Effet du vieillissement cérébral sur la transcription de FXII dans le SNC.....	108
Figure 37 : Rôle anti-apoptotique du FXII sur les neurones corticaux murins.....	114
Figure 38 : Beta-Facteur XII (β FXIIa) n'a pas d'impact sur la mort neuronale.	115
Figure 39 : Effet de la Thrombine, d'un inhibiteur de PAR-1 (SCH-79797) et d'un inhibiteur de la Thrombine (Hirudine) sur l'apoptose neuronale.	116
Figure 40 : Activation en α FXIIa de la source FXII (Enzyme Research Laboratory).....	119
Figure 41 : Hypothèse de l'action du FXII simple chaîne, de la forme active α FXIIa et de la forme inactivée α FXIIa-PPACK, sur la coopération EGFR/MET.....	121
Figure 42 : Effet du FXII lors d'un modèle de nécrose neuronale (OGD).	122
Figure 43 : Immunoempreinte du Kininogène de haut poids moléculaire (HK).	123

Index des Tableaux

Tableau 1 : Inhibiteurs courants du FXII et de l' α FXIIa, modes d'action, et références associées.....	7
Tableau 2 : Comparaison des caractéristiques de l'apoptose et de la nécrose.....	43
Tableau 3 : Liste des neuf gènes de référence utilisés et leurs séquences d'amorces sens et antisens.	102
Tableau 4 : Récapitulatif des différents traitements pharmacologiques utilisés dans l'étude 1 et leurs effets.	114

Abréviations

AD : Alzheimer Disease

AIF : Apoptosis Inducing Factor

Apaf-1 : Apoptotic Peptidase Activating Factor 1

ATP : Adenosine Triphosphate

AVC : Stroke

A β : Peptide amyloïde- β

BHE : Blood Brain Barrier ; BBB

BK : Bradykinin

CAD : Caspase-Activated Deoxyribonuclease

DAPI : 4',6-diamidino-2-phénylindole

DD : Death Domain

DED : Death Effector Domain

DIV : Days In Vitro

EAE : Experimental autoimmune encephalomyelitis

EGF : Epidermal Growth Factor

EGF-like : Epidermal Growth Factor domain

EGFR : Epidermal Growth Factor receptor

EndoG : Endonucléase G

FXII : Factor XII simple chain

α FXIIa : activated form of Factor XII type α

β FXIIa : activated form of Factor XII type β

HGF : Hepatocyte Growth Factor

HK : High molecular weight Kininogen

MPTP : Mitochondrial Permeability Transition Pore

NETs : Neutrophil Extracellular Traps

NMDA : N-méthyl-D-Aspartate

OPC : Oligodendrocytes

PK : Pre-Kallikréïn

PLA : Proximity Ligation Assay

polyP : Polyphosphate

PtdSer : Phosphatidylserin

SD : Serum Deprivation

SEP : Multiple Sclerosis

SNC : Central Nervous System

TFD : Trophic Factor Deprivation

TNF : Tumor Necrosis Factor

TNFR : Tumor Necrosis Factor Receptor

tPA : Tissue type plasminogen activator

TUNEL : Terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP Nick End Labeling

uPA : Urokinase

uPAR : Urokinase Receptor

VWF : Von Willebrand Factor

WT : Wild-type Mouse

OGD : Oxygen Glucose Deprivation

INTRODUCTION

INTRODUCTION

I. Le Facteur XII

1) Découverte

En 1955 l'hématologue **Oscar Ratnoff** observe un temps de coagulation augmenté en tube lors d'un prélèvement sanguin de routine chez le patient **John Hageman**. Il détermine à l'époque que cela est dû à l'absence d'un facteur de coagulation jusqu'alors non-identifié (Ratnoff et al., 1955) (**Figure 1**). Ce facteur est tout d'abord dénommé Facteur Hageman et renommé par la suite **Facteur XII (FXII)**. Puis en étudiant la famille de ce patient, Oscar Ratnoff constate que ce déficit est un trouble autosomique récessif n'impactant que peu la coagulation (Margolius et Ratnoff, 1956). En effet, malgré un temps de coagulation allongé de façon marquée, les personnes atteintes d'un déficit en FXII n'ont aucune tendance à saigner spontanément ou de façon discontinue, à l'inverse d'une personne hémophile présentant des déficits en Facteur VIII et IX (Wang et al., 1997).

A partir de 1957, Oscar Ratnoff collabore avec **Earl Davie** pour purifier le FXII du plasma humain et ainsi décrire l'intégralité de la voie intrinsèque de la coagulation (Davie et Ratnoff, 1964).

A Toronto en 1981, en reconnaissance pour ses recherches sur la coagulation sanguine, la Société internationale de thrombose et d'hémostase (ISTH) décerne à Oscar Ratnoff la plus haute distinction, la **médaille Robert P. Grant**.

2) Activation

Le FXII, sérine protéase, est constitué d'une **chaîne lourde** composée de deux domaines fibronectines, deux domaines homologues au facteur de croissance épidermique (**EGF-like**),



Figure 1 : Photographie d'un prélèvement de sang du patient John Hageman par l'hématologue Oscar Ratnoff.

un domaine kringle et une région riche en proline et d'une **chaîne légère** composée du domaine catalytique (sérine protéase). Lors de son activation, le FXII simple chaîne est clivé en α FXIIa, double chaîne (Pathack et al., 2015). Il existe également une forme tronquée de l' α FXIIa, le β FXIIa, qui est clivé au niveau de la région riche en proline. Le β FXIIa ne possède donc que le domaine catalytique actif et une petite partie de la région riche en proline (Pathack et al., 2015) (**Figure 2**).

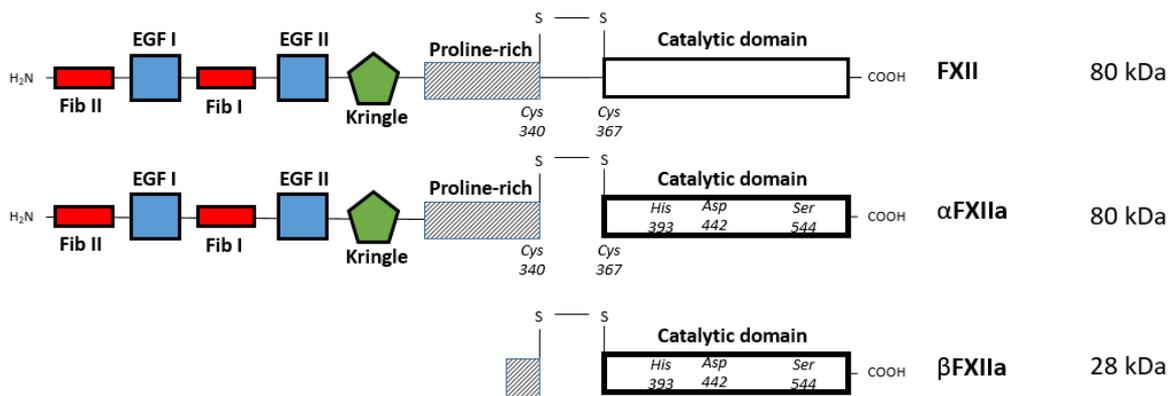


Figure 2 : Structure des différentes formes de FXII.

1/ La forme simple chaîne FXII 2/ La forme double chaîne α FXIIa 3/ La forme tronquée β FXIIa

Le FXII est communément considéré comme un zymogène, une proenzyme simple chaîne non-protéolytiquement active. L'activation du FXII en α FXIIa, sérine protéase active, est donc nécessaire pour avoir l'effet catalytique et se fait par clivage protéolytique *via* une surface (Renné et al., 2012). Toutefois une étude récente montre que le FXII simple-chaîne possède tout de même une activité protéase. Ainsi l'activation *in vivo* du FXII reste encore à l'heure actuelle **peu claire et controversée** (Ivanov et al., 2017).

a) Clivage protéolytique

Le clivage protéolytique constitue le mécanisme d'activation du FXII le plus communément admis par la communauté scientifique. L'activation du FXII est l'activation sur une surface d'échange du zymogène FXII en sérine protéase α FXIIa. En effet le zymogène FXII circulant se lie à une surface chargée (négative ou positive) et ce contact permet au FXII de s'immobiliser et d'être clivé protéolytiquement, soit par ses formes actives α FXIIa ou β FXIIa, il s'agit d'une

autoactivation, soit par l' **α -Kallikréine** ou le **kininogène de haut poids moléculaire** (HK, *High molecular weight Kininogen*), protéases participant au système Kallikréine-Kinine (Kaplan et Silverberg, 1987).

Le domaine **fibronectine de type 2** permet au FXII de se lier à une **surface négative comme positive par la présence d'un site de liaison**, « *surface binding site* » (Citarella et al., 1996 ; Müller et al., 2009). De **nombreuses surfaces chargées** ont été montrées comme permettant la conversion du FXII en α FXIIa et β FXIIa.

Le **zinc**, chargé positivement, a été décrit comme surface catalysant l'activation du FXII et est indispensable dans l'interaction du FXII avec certains récepteurs comme le récepteur à l'urokinase (récepteur à l'uPA ou uPAR) (Shibayama et al., 1994 ; Larush et al., 2010 ; Stavrou et al., 2018 ; Madhi et al., 2002).

Les **phosphatidylsérines** (PtdSer) permettent également la fixation du FXII. Les PtdSer sont exposées par exemple à la surface des plaquettes activées et des cellules en apoptose (Puddu et al., 2010 ; Fadok et al., 1992 ; Martin et al., 1995).

Les **polyphosphates** (polyP), enchaînement d'orthophosphates chargées négativement, ont été décrits comme servant de surface d'activation (Müller et al., 2009) (**Figure 3A et 3B**). Les polyP sont de petites molécules très conservées au cours de l'évolution et exprimées de façon ubiquitaire chez les mammifères. Les polyP sont notamment retrouvés libérés lors de la dégranulation des plaquettes activées mais également retrouvés comme exprimés au niveau du système nerveux central par les astrocytes et les neurones (Stotz et al., 2014 ; Holmström et al., 2013) (**Figure 3C et 3D**). De façon intéressante, les polyP peuvent être visualisés par le DAPI (4',6'-diamidine-2'-phenylindole dihydrochloride), intercalant de l'ADN, reconnaissant les charges négatives des polyP.

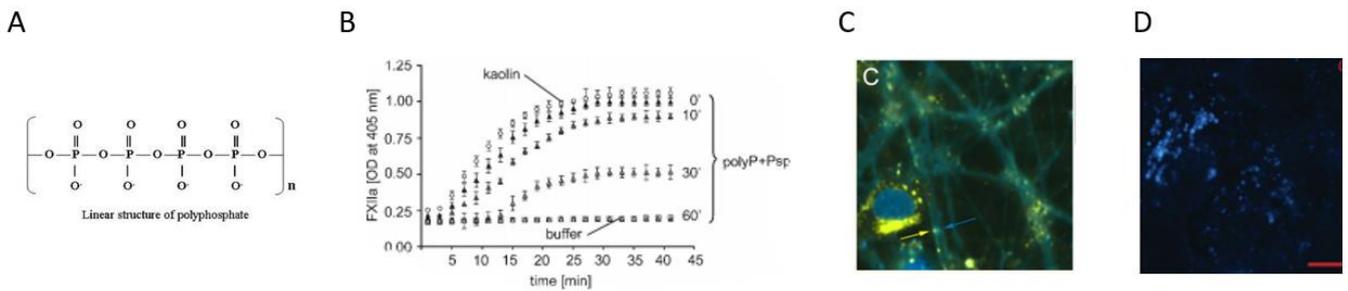


Figure 3 : Génération de l'αFXIIa par les polyP plaquettaires et expression des polyP dans le système nerveux central (Müller et al., 2009 ; Stotz et al., 2014 ; Holmström et al., 2013).

A. Schématisation de la structure des polyP. **B.** Incubation du plasma Humain pendant différents temps avec des polyP plaquettaires. Comparaison avec un contrôle négatif (tampon) et un contrôle positif (la kaoline, argile blanche). Visualisation de l'activation de l'αFXIIa par substrat chromogénique. **C.** Visualisation des polyP neuronaux par la technique de DAPI **D.** Visualisation des polyP astrocytaires par la technique de DAPI.

Plus récemment, les **NETs (Neutrophil Extracellular Traps)**, fibres extracellulaires composées majoritairement d'ADN et produites de façon dynamique par les neutrophiles, ont été identifiées comme surface chargée fixant le FXII et permettant son activation (Gould et al., 2014).

De plus, le **peptide Aβ (β-amyloïde)**, peptide formant les plaques séniles de la maladie d'Alzheimer, est décrit comme permettant la génération de thrombine *via* l'activation du FXII. L'agglomération des Aβ servirait ainsi de surface d'activation du FXII (Zamolodchikov et al., 2015).

Enfin des **surfaces artificielles**, telles que la **kaoline** (argile blanche) ou le **dextran sulfate**, permettent aussi la liaison du FXII et son activation *in vitro* (Griffin, 1978 ; Tankersley et al., 1983).

Il s'agit d'une liste non-exhaustive de surface d'activation. Le FXII a une énorme capacité de liaison et de très nombreuses autres surfaces sont décrites (collagène, fibrine, fibrinogène, héparine...).

b) Activation du β FXIIa, forme tronquée de l' α FXIIa

L' α FXIIa peut être clivé au niveau de sa région riche en proline par l' α -kallikréine et la trypsine, le domaine catalytique ainsi libéré donne la forme β FXIIa (Dunn et al., 1982) (Figure 2-4).

Bien que conservant son activité protéolytique vis-à-vis des substrats protéiques, le β FXIIa est incapable de se lier à des surfaces. Ainsi, ne possédant **aucun « surface binding site »**, le β FXIIa ne peut promouvoir tous les rôles associés et est notamment **incapable de promouvoir la coagulation** (détaillée par la suite). De plus, longtemps considéré comme un simple fragment d' α FXIIa, aucune étude ne s'est intéressée au rôle propre de la forme β FXIIa.

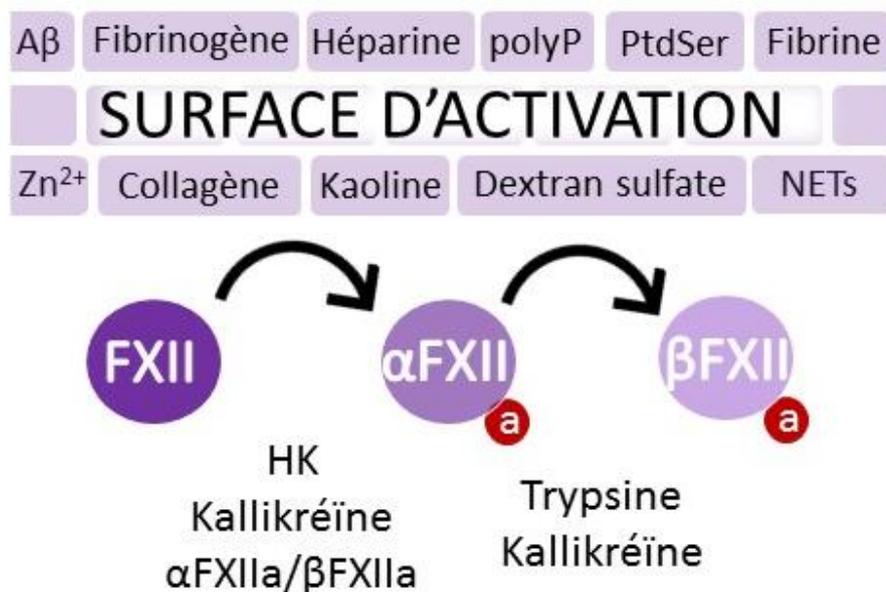


Figure 4 : Schématisation des différents activateurs et des différentes surfaces d'activation du FXII.

c) Activité protéolytique de la forme simple chaîne FXII

L'activation du FXII est depuis toujours peu claire. Plusieurs groupes ont proposé que le FXII gagnait son activité par sa conversion, sur une surface, en α FXIIa ou β FXIIa (comme décrit ci-dessus). L'activité du FXII, observée dans certains cas, ne serait due qu'à une impureté de la source de FXII qui serait contaminée par des traces d' α FXIIa ou β FXIIa (Silverberg et al., 1980 ; Tans et al., 1983).

Toutefois une étude de 2017, publiée par **l'équipe de Gailani**, remet en question cette hypothèse. Par l'utilisation de différents mutants du domaine catalytique du FXII, ils ont démontré que le **FXII simple chaîne présente une activité catalytique** (Ivanov et al., 2017). Leurs résultats supportent un modèle d'activation de la phase contact indépendant de l' α FXIIa, de l' α -Kallikréïne ou de l'HK. Le FXII monocaténaire catalyserait la conversion initiale de FXII en α FXIIa sur une surface. Puis, l'activité initiale du FXII étant relativement faible, l' α FXIIa nouvellement produit permettrait d'accélérer le processus et d'obtenir une quantité suffisante d' α FXIIa (Ivanov et al., 2017).

d) Inhibition du Facteur XII

Il existe différents types d'inhibiteurs pharmacologiques ciblant le FXII ou ses formes actives α FXIIa et β FXIIa. Ces inhibiteurs peuvent être classés en quatre catégories : les anticorps bloquants, les inhibiteurs biologiques, les petites molécules et enfin les oligonucléotides (**Tableau 1**).

Tableau 1 : Inhibiteurs courants du FXII et de l'αFXIIa, modes d'action, et références associées (D'après Kenne et Renné, 2014). En rouge inhibiteurs utilisés au cours de notre étude.

Classe	Nom	Cible	Mode d'action	Référence
Anticorps	3F7	αFXIIa	Anticorps humanisé bloquant le domaine catalytique du αFXIIa	(Larsson et al., 2014)
	15H8	FXII	Anticorps ciblant la chaîne lourde du FXII	(Matafonov et al., 2014)
	C6B7	βFXIIa	Anticorps ciblant la forme βFXIIa	(Pixley et al., 1993)
	B7C9	FXII	Anticorps ciblant la chaîne lourde du FXII	(Pixley et al., 1987)
	2 et/ou 215	βFXIIa	Anticorps ciblant la forme βFXIIa	(Esnouf et al., 2000)
	P5-2-1	FXII	Anticorps ciblant la chaîne lourde du FXII	(Saito et al., 1985)
	Anti-HF	FXII	Anticorps ciblant le FXII	(Small et al., 1985)
Inhibiteurs Biologiques	CTI	αFXIIa Trypsine	Forme un complexe avec l'αFXIIa	(Hojima et al., 1980 ; Yau et al., 2012)
	YAP	αFXIIa	Se lie à l'αFXIIa	(Rajapakse et al., 2005)
	Infestine-4	αFXIIa	Se lie à l'αFXIIa	(Hagedorn et al., 2010 ; Xu et al., 2014)
	Dimiconin	FXII	Inhibe l'activation du FXII	(Ishimaru et al., 2012)
	C1INH	FXIIa FXIa α-kallikréine	Inhibe les sérines protéases	(Davis et al., 2010)
	Ir-CPI	αFXIIa FXIa α-kallikréine	Se lie à l'αFXIIa, FXIa, α-kallikréine	(Decrem et al., 2009)
	COU254	αFXIIa	Se lie à l'αFXIIa	(Kraft et al., 2010)
Petites molécules	PPACK	FXII αFXIIa α-kallikréine	Inhibe l'activité catalytique de l'αFXIIa et de l'α-kallikréine	(Kleinschnitz et al., 2006)
	Peptide Bicyclique 3	FXII	Inhibe l'activation du FXII	(Baeriswyl et al., 2013)
Oligonucléotides	RNA-apter	FXII αFXIIa	Se lie au FXII et à l'αFXIIa mais n'interfère pas avec l'activité catalytique	(Woodruff et al., 2013)
	ASO	FXII	Se lie à l'ARNm et à la protéine FXII pour l'inhiber	(Revenko et al., 2011)

3) Rôles du Facteur XII dépendant de son domaine sérine protéase

Le premier rôle du FXII décrit fut historiquement celui d'initier la voie intrinsèque de la coagulation, il participe ainsi activement à **l'hémostase**. Mais très vite le FXII a été montré comme initiant également le **système Kallikréine-Kinine**. Dans ce système, le FXII permet la génération de bradykinine, qui, en se fixant sur ses récepteurs, joue un rôle pro-inflammatoire. Il a été suggéré que la synergie de ces deux voies d'activation était délétère dans des pathologies du système nerveux central : **la maladie d'Alzheimer et les accidents vasculaires cérébraux**, suite à des études sur des modèles animaux.

a) Hémostase

L'hémostase représente l'ensemble des processus permettant l'arrêt du saignement suite à une lésion tissulaire et nécessite l'activité de nombreuses sérines protéases dont le FXII. Elle est subdivisée en trois parties (**Figure 5**) :

- 1/ **Hémostase primaire** faisant intervenir les plaquettes.
- 2/ **Hémostase secondaire** constituée des cascades de coagulation.
- 3/ **Hémostase tertiaire** ou fibrinolyse qui permet la dissolution du caillot sanguin.

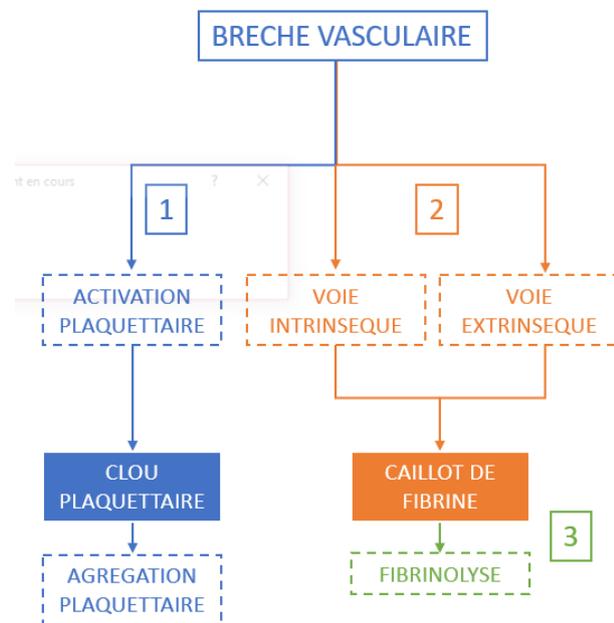


Figure 5 : Résumé des différentes étapes de l'Hémostase.

Hémostase primaire : clou plaquettaire

Lors d'une lésion tissulaire, la matrice extracellulaire sous endothéliale est exposée au sang. Cette matrice contient de nombreuses macromolécules, ligands des récepteurs plaquettaires, permettant une **adhésion** rapide des plaquettes : le collagène, la facteur Von Willebrand (VWF), la laminine, la fibronectine et la thrombosporine (Jackson et al., 2009).

L'interaction du collagène et VWF avec les récepteurs plaquettaire GpVI et GpIb α conduit à l'**activation** plaquettaire. L'activation plaquettaire se traduit par une **dégranulation** des plaquettes, granules contenant certaines surfaces d'activation du FXII (Heemskerk et al., 2002) :

- Les granules α contiennent de la P-sélectine, du fibrinogène, de la fibronectine, du facteur V, du facteur VIII, du facteur plaquettaire IV, du facteur de croissance dérivé des plaquettes et du facteur de croissance tumorale α (TNF- α)
- Les granules δ ou les granules denses contiennent de l'adénosine triphosphate (ATP), de l'adénosine diphosphate, du calcium, de la sérotonine, de l'histamine, des **polyP** et de l'épinéphrine.

Enfin suite à leur adhésion et leur activation, l'**agrégat** plaquettaire permet *in fine* la formation d'un **clou plaquettaire** et interrompt le saignement (Nieswandt et al., 2001).

Lors de leur activation et leur adhésion, les plaquettes **exposent leurs PtdSer** à la surface (Puddu et al., 2010). Ce sont les PtdSer qui recrutent les facteurs de coagulation notamment le FXII et ainsi déclenchent l'hémostase secondaire (Furie, 2009) (**Figure 7**).

Hémostase secondaire : voies de coagulation

Les cascades de coagulation de l'hémostase secondaire permettent la formation de fibrine, constituant majeur du caillot sanguin. Les cascades de coagulation ou voies de coagulation sont composées de facteurs, majoritairement des sérines protéases, qui agissent en clivant des protéines en aval. Ces voies peuvent être subdivisées en trois : 1/ la voie intrinsèque 2/ la voie extrinsèque 3/ La voie commune.

La voie intrinsèque de la coagulation est initiée par le **FXII**. Celui-ci est produit et sécrété par le foie puis libéré dans la circulation générale. L'activation du FXII nécessite une surface d'activation que constitue les PtdSer des plaquettes ou encore les polyP libérés par les plaquettes (Van der Meijden et al., 2009) (**Figure 6**). A noter que le domaine fibronectine de type 2 est nécessaire à la coagulation car *via* le « *surface binding site* », il permet la liaison du FXII et de l' α FXIIa au **Facteur XI** pour l'activer (Citarella et al., 1998) (**Figure 7**).

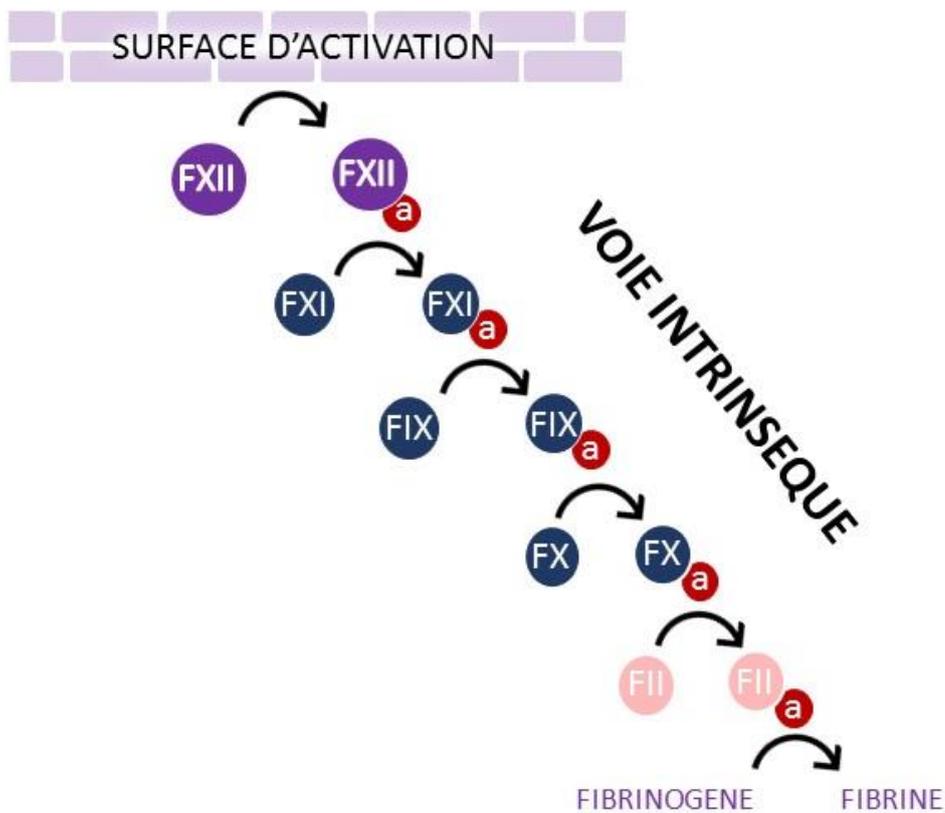


Figure 6 : Schématisation de la cascade d'activation de la voie intrinsèque de la coagulation. L'activation du FXII permet in fine la formation de fibrine.

La **voie extrinsèque** de la coagulation est initiée par le **Facteur tissulaire**. En cas de lésion, le facteur tissulaire est exprimé par les fibroblastes de l'adventice vasculaire et les cellules endothéliales (Wilcox et al., 1989 ; Jennings, 2009 ; Furie, 2009). Le facteur tissulaire se fixe à la surface des plaquettes *via* les PtdSer et permet le recrutement du Facteur VII (Wolberg et Campbell, 2008) (**Figure 7**).

La **voie commune de la coagulation** débute au moment de l'activation du **Facteur X**. En effet les voies extrinsèque et intrinsèque convergent pour permettre l'activation du Facteur X, puis l'activation de la **thrombine (ou Facteur II)**, elle-même permettant l'activation de la **Fibrine** (Wilcox et al., 1989 ; Jennings, 2009 ; Furie, 2009) (**Figure 7**).

A noter que la voie intrinsèque n'est pas considérée à l'heure actuelle comme une voie essentielle à la coagulation, mais plutôt comme une voie annexe permettant l'augmentation de la production de thrombine (Triplett, 2002).

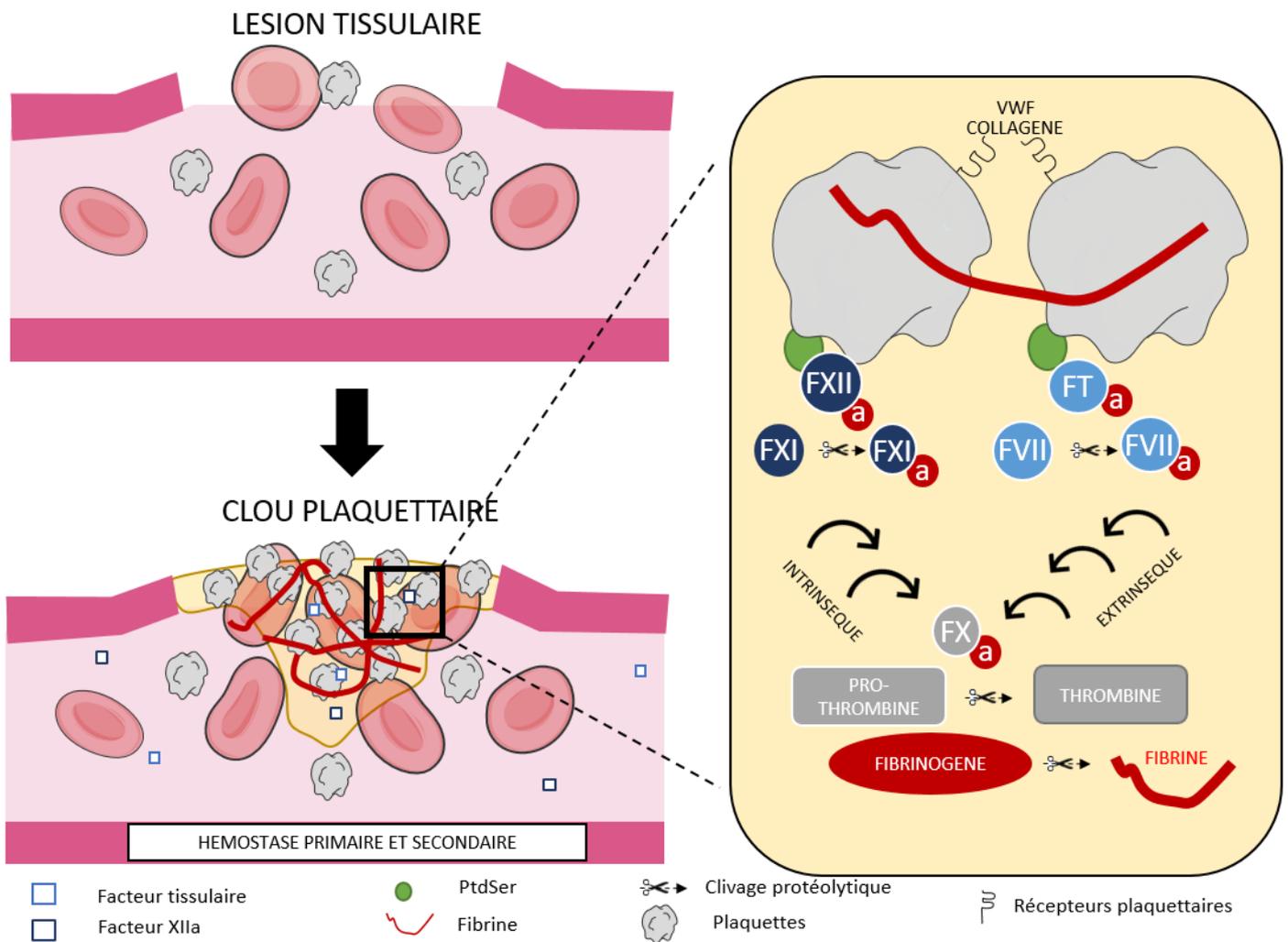


Figure 7 : Schématisation de l'Hémostase primaire et secondaire.

Hémostase tertiaire : fibrinolyse

L'hémostase tertiaire ou **fibrinolyse** est le mécanisme enzymatique initié par la plasmine, capable de dégrader les caillots de fibrine. La plasmine est produite et sécrétée par le foie sous la forme d'une pro-enzyme inactive, le plasminogène (Collen et Lijnen, 1991).

Il existe deux sérines protéases, activatrices principales du plasminogène chez l'homme : **l'activateur tissulaire du plasminogène (tPA) et l'urokinase (uPA)**.

Le tPA est produit par les cellules endothéliales sous une forme simple chaîne. Même si sous sa forme simple chaîne le tPA est capable de cliver le plasminogène, cette capacité est démultipliée en présence de fibrine (Hoylaerts et al., 1982). Le tPA va ainsi se fixer à la fibrine et activer la plasmine principalement au niveau du thrombus (Medved et Nieuwenhuizen, 2003) (**Figure 8**).

L'uPA est sécrétée comme pro-enzyme par les cellules endothéliales et est activée par une liaison de haute affinité à son récepteur de surface uPAR. Une fois activée, l'uPA catalyse l'activation du plasminogène (Fowler et al., 1998 ; Vincenza Carriero et al., 2009) (**Figure 8**).

Le FXII a également été identifié comme permettant la fibrinolyse. Des études *in vitro* ont montré que non seulement α FXIIa, forme active du FXII, mais aussi les autres protéases de la phase contact, kallikréine et Facteur XI activé, sont capables de **cliver le plasminogène** et contribuent ainsi à la fibrinolyse (Colman, 1969 ; Mandle et Kaplan, 1979 ; Konings et al., 2015). Même si la génération de plasmine reste plus rapide par le tPA, la plus grande concentration plasmatique d' α FXIIa lui confère tout de même une capacité fibrinolytique non négligeable (Miles et al., 1983). Il a également été rapporté que l' α FXIIa stimulait la fibrinolyse de manière indirecte en inactivant PAI-1, l'inhibiteur principal du tPA *in vivo* (Tanaka et al., 2009).

Enfin le FXII et l' α FXIIa présentent une **forte affinité pour la fibrine et le fibrinogène**. Cette affinité permet au FXII de se servir de la fibrine ou du fibrinogène comme d'une surface d'activation (Medved et Nieuwenhuizen, 2003) (**Figure 8**).

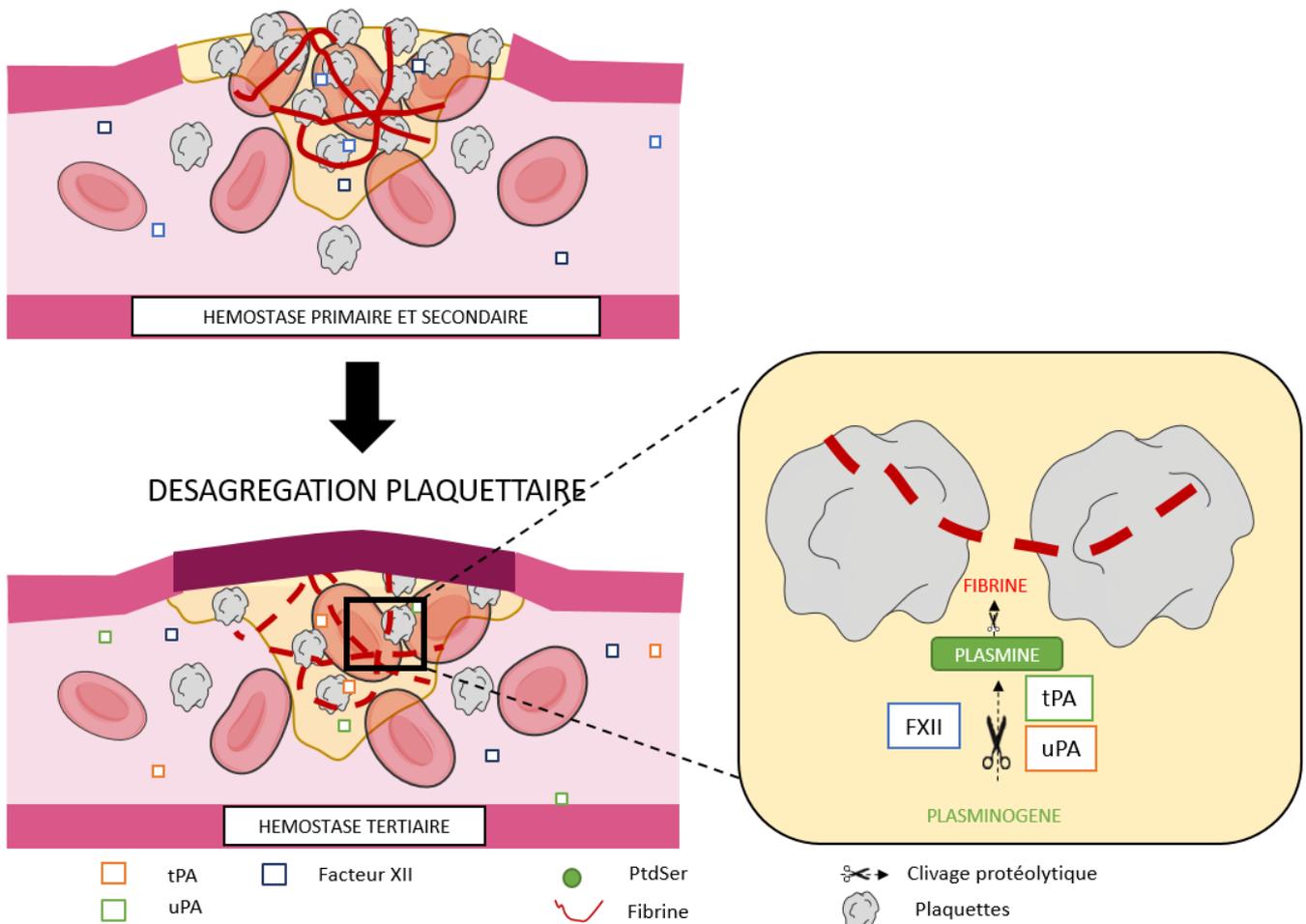


Figure 8 : Schématisation de l'hémostase tertiaire.

b) Système Kallikréine-Kinine

L' α FXIIa mais également le β FXIIa ont la capacité de cliver le précurseur de la kallikréine, Pré-Kallikréine (PK). Puis l' α -Kallikréine générée peut à son tour cliver le FXII, boucle de régulation du FXII (Cochrane et al., 1973). L' α -Kallikréine nouvellement générée clive le HK. Le fragment de kinogène résultant est appelé **bradykinine (BK)**. La liaison de la BK

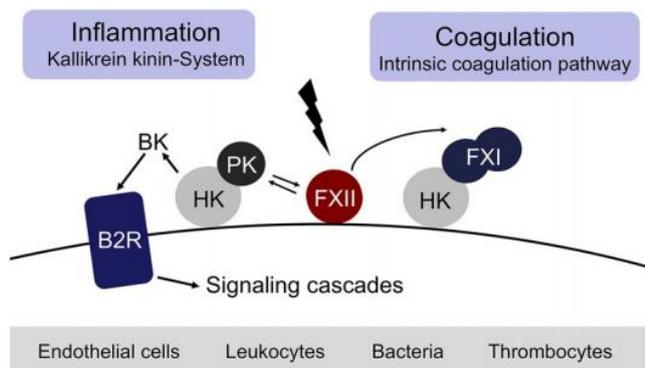


Figure 9 : L'activation de la phase contact (Renné et al., 2012).

L'activation du FXII en α FXIIa permet d'activer la coagulation mais également permet la production indirecte de BK.

sur ses récepteurs B1 (B1R) et B2 (B2R) active différentes voies de signalisation **pro-inflammatoires**. Ainsi la BK induit la dilatation des vaisseaux, le chimiotactisme des neutrophiles et augmente la perméabilité vasculaire (Leeb-Lundberg et al., 2005) (**Figure 9**). En outre il a été décrit que la BK permettait l'ouverture de la barrière hémato-encéphalique (BHE) (Bartus et al., 1996).

L'activation du système kallikréine-kinine est également appelé activation de la phase contact. La génération d' α FXIIa permet pas la suite d'initier la voie intrinsèque de la coagulation. Ces deux voies travaillent en synergie (**Figure 10**).

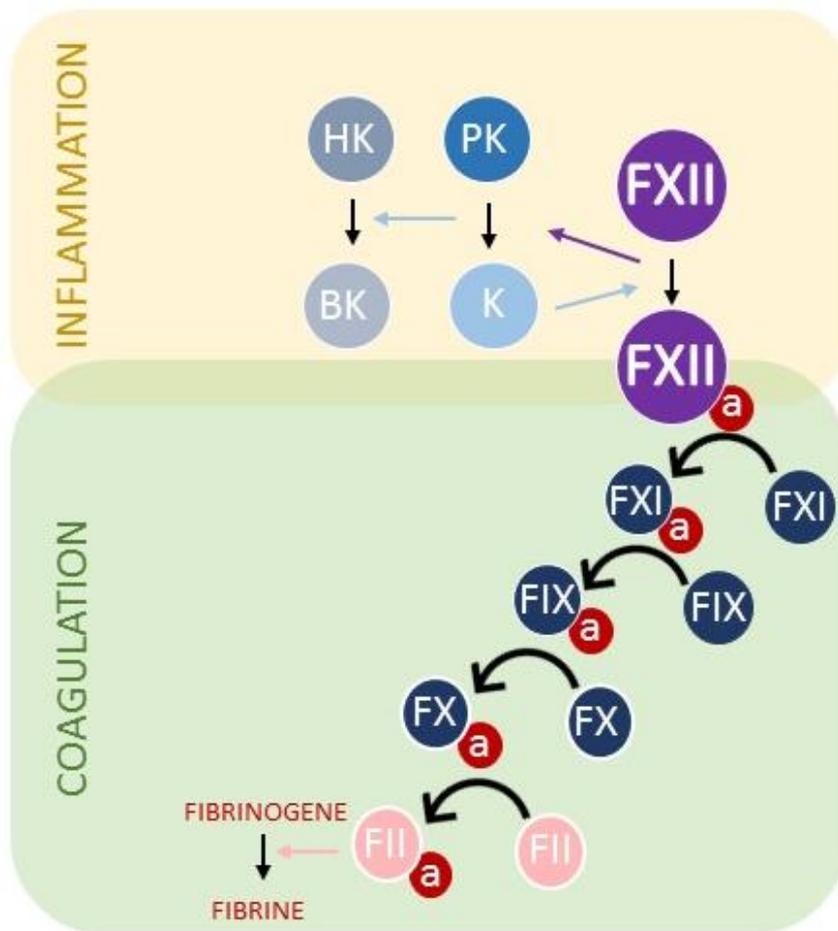


Figure 10 : Schématisation de la phase contact.

Les rôles pro-coagulants et pro-inflammatoires de la phase contact ont été par la suite caractérisés comme délétères dans des pathologies cérébrales : la maladie d'Alzheimer, et les accidents vasculaires cérébraux.

c) Rôles de la phase contact dans les pathologies du système nerveux central

Rôle du FXII dans la maladie d'Alzheimer

La maladie d'Alzheimer (AD, *Alzheimer disease*) est caractérisée par le dépôt de plaques A β et est accompagnée de **perte étendue de neurones cérébraux**. C'est cette perte progressive de neurones qui sous-tend le déclin cognitif et la détérioration progressive des fonctions neuronales.

De très récentes études se sont intéressées au rôle du FXII dans l'AD. En 2015, l'équipe de Strickland a démontré que le plasma de patient atteints d'AD présentait une **activation accrue de la phase contact** : augmentation de l'activation du FXII, augmentation de l'activation de l' α -kallikréine, augmentation du clivage du HK et donc augmentation de la génération de BK (Zamolodchikov et al., 2015). Une activation accrue de la phase contact a également été observée dans le plasma de souris doubles mutantes pour PS/APP (modèle murin d'AD) et dans le plasma de souris sauvages injectées en intraveineux avec le peptide A β (Zamolodchikov et al., 2015).

En 2016, ils ont décrit la capacité du peptide A β à **servir de surface d'activation** pour le FXII (Zamolodchikov et al., 2016).

Enfin en 2017, cette même équipe a publié que la déplétion du FXII au niveau hépatique permettait de diminuer le **déclin cognitif**, en diminuant l'**activation microgliale et astrocytaire** et en diminuant les **dépôts de fibrine**, chez des souris doubles mutantes PS/APP (Chen et al., 2017).

Suite à ses études, l'équipe de Strickland a proposé le **modèle suivant (Figure 11)** :

Le peptide A β permettrait l'activation du FXII dans la circulation, puis l'activation de la voie intrinsèque de la coagulation et du système Kallikréine-Kinine dans le plasma de patient AD.

1/ Le système Kallikréine-kinine ainsi activé permet la production de BK. La BK agirait sur ses récepteurs B2 présents à la surface des cellules endothéliales composant la BHE. L'activation des récepteurs B2 entraînerait une perméabilisation de la barrière. La BK pourrait donc entrer dans le parenchyme et irait activer ses récepteurs B1 présents à la surface des astrocytes et des neurones, induisant ainsi une **neuroinflammation**.

2/ En parallèle, la fibrine produite suite à l'activation de la voie intrinsèque de la coagulation pourrait rentrer dans le parenchyme cérébral et engendrerait les **dommages neuronaux** observés lors de l'AD.

L'ensemble de ces phénomènes agirait sur le déclin cognitif de l'AD.

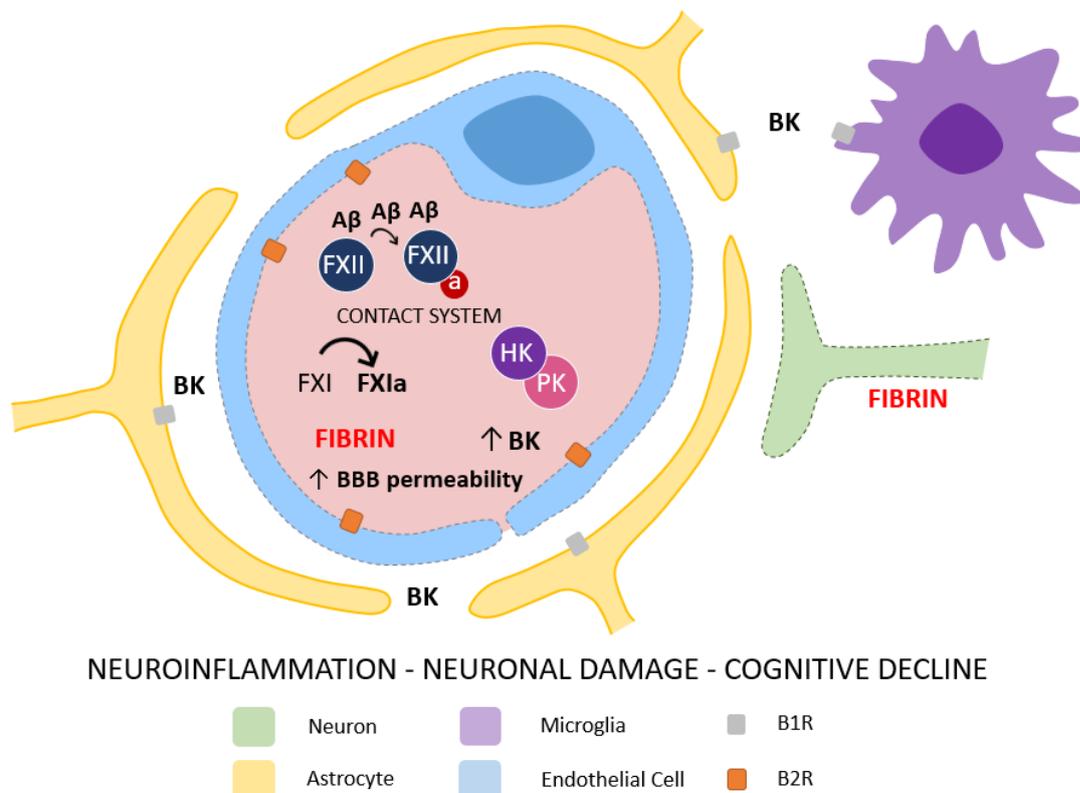


Figure 11 : Schématisation du modèle d'action du FXII dans l'AD selon l'équipe de Strickland (d'après Chen et al., 2017).

Rôle du FXII dans les Accidents Vasculaires Cérébraux

Un accident vasculaire cérébral (AVC) résulte de l'interruption de la circulation sanguine dans le cerveau, en général quand un vaisseau sanguin éclate ou est bloqué par un caillot. L'apport en oxygène et en nutriments est stoppé, ce qui endommage les tissus cérébraux. (Définition de l'OMS en 2016). Les AVC sont classiquement subdivisés en deux groupes : 1/ les **AVC de type hémorragique** dus à la rupture d'un vaisseau cérébral 2/ les **AVC de type ischémique** résultant de l'occlusion d'un vaisseau cérébral.

Depuis ces dix dernières années, la communauté scientifique a émis l'hypothèse que le FXII ne participerait pas à l'hémostase physiologique mais plutôt à la thrombose pathologique. En effet une étude en 2006 a montré que les **souris déficientes en FXII présentaient un volume de lésion deux fois moins élevé** que les souris de type sauvage, suite à une occlusion de l'artère cérébrale moyenne par le modèle de filament (Kleinschnitz et al., 2006) (**Figure 12A et 12B**). Cette déficience permet également d'améliorer le score neurologique des souris suite à l'occlusion (Kleinschnitz et al., 2006) (**Figure 12C**).

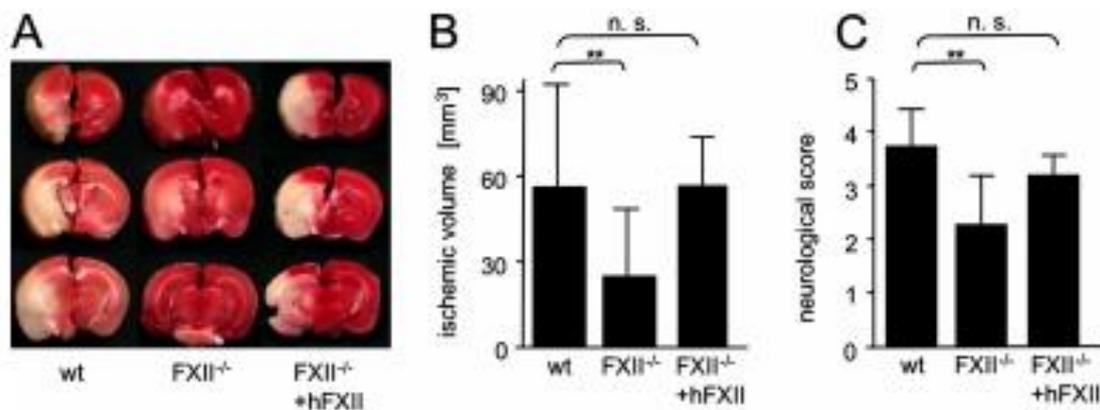


Figure 12 : Rôle du FXII dans un modèle d'AVC ischémique par occlusion de l'artère cérébrale moyenne par filament (Kleinschnitz et al., 2006). Souris sauvages (WT) Vs Souris déficiente en FXII (FXII^{-/-}) Vs Souris déficientes en FXII avec injection intraveineux de FXII humain (FXII^{-/-} +hFXII) A. Volume de lésion sur tranche de cerveaux par TTC B. Quantification du volume de lésion C. Neuroscore

Par la suite, l'utilisation **d'infestine-4**, inhibiteur de la forme active α FXIIa, s'est avérée bénéfique dans le même modèle d'occlusion de l'artère cérébrale moyenne (Krupka et al., 2016 ; May et al., 2016 ; Hagedorn et al., 2010).

Une étude de cohorte plus récente a mis en évidence une **corrélation entre le niveau plasmatique de FXII et le risque d'AVC hémorragique chez l'homme**, mais étonnement pas entre le niveau de FXII plasmatique et les risques d'AVC ischémiques ou d'infarctus du myocarde (Johansson et al., 2017). Cette étude de cohorte n'est donc pas en adéquation avec les études précliniques antérieures.

4) Rôles du Facteur XII dépendant de son domaine fibronectine de type 2 et de l'interaction avec uPAR

En plus de ses interactions avec une surface et avec le Facteur XI, il a été démontré que le domaine fibronectine de type 2 du FXII lui permettait de se lier aux **cellules endothéliales, aux neutrophiles, aux plaquettes et aux cellules dendritiques**. En effet le blocage de ce domaine empêche son interaction avec le **récepteur à l'uPA** présent à la surface des cellules endothéliales, des neutrophiles et des cellules dendritiques (Larusch et al., 2010 ; Stavrou et al., 2018 ; Mahdi et al., 2002). Aux niveaux des plaquettes, le FXII peut se lier *via* ce domaine aux récepteurs plaquettaires **Gplb de type IX et V**, récepteurs exprimés lors d'une activation plaquettaire (Bradford et al., 2000).

L'interaction du domaine fibronectine de type 2 du FXII avec le récepteur à l'uPA a été identifié comme permettant au FXII de jouer un rôle dans l'angiogénèse, la cicatrisation et la sclérose en plaques.

a) Rôle du FXII dans l'angiogénèse

Bien que la plupart des recherches se concentrent sur le FXII en tant que sérine protéase, pour la première fois en 2010 il avait été montré que le FXII présentait des activités angiogéniques sur des cellules endothéliales en culture (cellules endothéliales primaires de la veine ombilicale humaine, HUVECs), et indépendamment de son activité enzymatique.

En effet LaRusch et collaborateurs ont observé en 2010 que la stimulation de cellules **HUVECs** avec du FXII permettait la phosphorylation des protéines signalétiques **Erk1/2 et Akt**. Puis *via* l'utilisation d'un anticorps bloquant pour le domaine 2 du récepteur **uPAR** (LRG20), ils ont montré que cette phosphorylation était reversée. Cet anticorps bloque également la fixation du FXII sur le récepteur (LaRusch et al., 2010).

Ils ont par la suite montré qu'un anticorps bloquant des **intégrines $\beta 1$ et α** , tout comme un inhibiteur de la phosphorylation du récepteur **EGF (Epidermal Growth Factor Receptor)** (AG1478) reversaient également les effets du FXII. Enfin ils ont établi que le FXII initiait également l'**angiogénèse** des cellules en matrigel. A noter que l'ensemble de ces effets sont **zinc dépendant** (LaRusch et al., 2010).

Les auteurs ont donc proposé le modèle suivant : Le Facteur XII, *via* sa fixation sur le domaine 2 du récepteur uPAR, permet le recrutement des intégrines $\beta 1$ et α . Ces intégrines mobilisent le récepteur EGF et l'activent. EGFR phosphoryle les protéines signalétiques Erk1/2 et Akt et confère au FXII un rôle pro-prolifératif sur les cellules endothéliales (**Figure 13**).

Les auteurs précisent que ce modèle d'interaction ne serait **pas physiologique** car nécessiterait une quantité plasmatique très importante en zinc. Ainsi il s'agirait plutôt d'une capacité angiogénique du FXII dans le cas de lésion tissulaire où les plaquettes activées libèrent une grande quantité de zinc dans le plasma.

Suite à cette découverte, l'activation du récepteur à l'uPA par le FXII a été montré comme jouant un rôle dans l'aggravation de la sclérose en plaques et dans la cicatrisation.

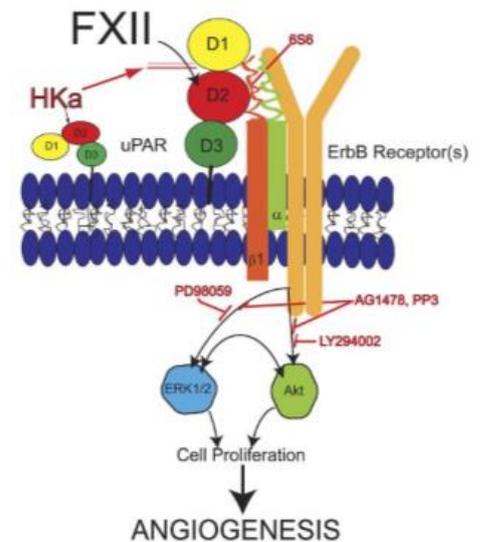


Figure 13 : Modèle signalétique proposé par LaRusch et al., en 2010 (Renné et al., 2012).

b) Rôle du FXII dans la sclérose en plaques

La sclérose en plaques (SEP) est une maladie auto-immune du système nerveux central (SNC), caractérisée par une démyélinisation accompagnée dans la majorité des cas par une **infiltration anormale de cellules immunitaires** et d'une rupture de la BHE conduisant ou non à des dommages axonaux (Compston and Coles, 2008). Il s'agit de la première cause de handicap non traumatique chez le jeune adulte (Compston and Coles, 2002). Toutefois, malgré l'identification de 100 gènes de susceptibilité, l'origine de la SEP reste inconnue (International Multiple Sclerosis Genetics Consortium et al., 2013).

L'une des principales caractéristiques de la SEP est la présence de zones de démyélinisation dans le cerveau et/ou la moelle épinière des patients. Ces lésions sont caractérisées par une destruction de la gaine de myéline et une **mort des oligodendrocytes**. L'évolution de la maladie peut entraîner, dans des phases plus tardives, une perte axonale et neuronale. C'est cette perte neuronale plus tardive qui participe à l'atrophie cérébrale et à l'élargissement ventriculaire retrouvés chez les patients SEP (Dendrou et al., 2015).

Afin d'étudier cette pathologie, il existe des modèles animaux tels que les modèles **EAE**, pour *Encéphalite Autoimmune Experimentale*. Ces modèles consistent en l'injection d'un peptide de myéline (MOG ou PLP) et l'adjuvant complet de Freund permettant de mimer les signes cliniques de la SEP (McRae et al., 1992).

De récentes études ont montré un rôle du FXII dans la SEP.

En effet une étude en 2016 a montré que la déficience en FXII chez la souris permettait de réduire les signes cliniques dans un modèle murin de sclérose en plaques (EAE-MOG) (**Figure 14**). Ainsi le FXII apparaîtrait comme **délétère dans l'EAE** (Göbel et al., 2016).

Au niveau mécanistique, les auteurs se sont rendus compte que le FXII stimule la **génération de lymphocytes TH17**, lymphocytes caractérisés dans la sécrétion de l'interleukine-17, cytokine pro-inflammatoire (Miossec,

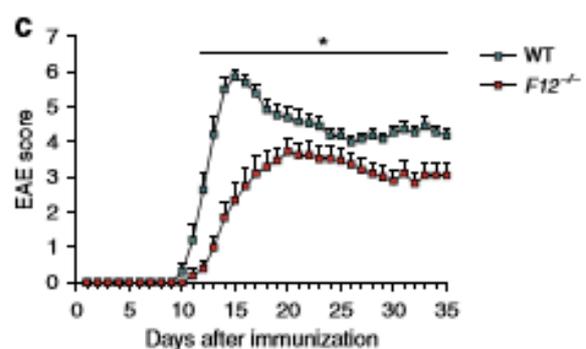


Figure 14 : Comparaison des scores cliniques EAE-MOG entre les souris sauvages (WT) et les souris déficientes en FXII (F12^{-/-}) (Göbel et al., 2016). Les scores cliniques sont significativement diminués chez les souris déficientes en FXII.

2016). Cette stimulation lymphocytaire par le FXII est médiée par l'activation à la surface des **cellules dendritiques périphériques du récepteur à l'uPA** (Göbel et al., 2016). Le recrutement des cellules dendritiques périphériques par le FXII aboutit ainsi à une différenciation des lymphocytes en lymphocytes TH17 (Göbel et al., 2016).

Enfin cette année, une étude a montré une augmentation des niveaux plasmatiques de FXII chez les patients atteints de SEP (Zioliotto et al., 2018).

c) Rôle du FXII dans la cicatrisation

Une unique étude, publiée en Mars dernier, a montré un rôle du FXII dans la cicatrisation (Stavrou et al., 2018). En effet Stavrou et collaborateurs ont constaté une **cicatrisation** moins importante chez les souris déficientes en FXII et cette diminution de cicatrisation était corrélée à un recrutement excessif des neutrophiles au niveau de la plaie (Stavrou et al., 2018). Par le biais de siRNA ciblant la production du FXII hépatique, les auteurs se sont rendus compte que le FXII circulant n'était responsable qu'en partie de cette activité du FXII sur les neutrophiles (Gould et al., 2014 ; Stavrou, 2018).

Ils ont également observé *in vitro* que le FXII promulguait la **migration et l'adhésion des neutrophiles murins et humains par l'activation du récepteur à l'uPA de façon zinc dépendante** (Stavrou et al., 2018). De plus les auteurs ont remarqué que le FXII permettait *via* uPAR d'augmenter l'expression de **l'intégrine $\alpha_M\beta_2$** , intégrine responsable de la mort des neutrophiles par **NETose**. Les NETs ainsi libérés servent de surface d'activation du FXII (Stavrou et al., 2018). Enfin ils ont également vu une **expression des ARNm du FXII et de la protéine FXII par les neutrophiles**.

L'équipe d'Alvin Schmaier a donc proposé le modèle suivant : Lors d'une lésion tissulaire, les plaquettes activées vont produire une grande quantité de zinc. Ainsi le FXII va pouvoir se fixer sur les neutrophiles et induire leur recrutement *via* l'activation du récepteur à l'uPA. Cela va enclencher une libération de FXII par les neutrophiles, boucle d'auto-activation, mais également une migration, une adhésion et un chimiotactisme des neutrophiles. En parallèle, le FXII peut également induire la mort des neutrophiles par NETose. Il régule ainsi à la fois, la

suractivation des neutrophiles sur le site de la lésion, facteur aggravant de la plaie, mais également son activation par la production de NETs (**Figure 15**).

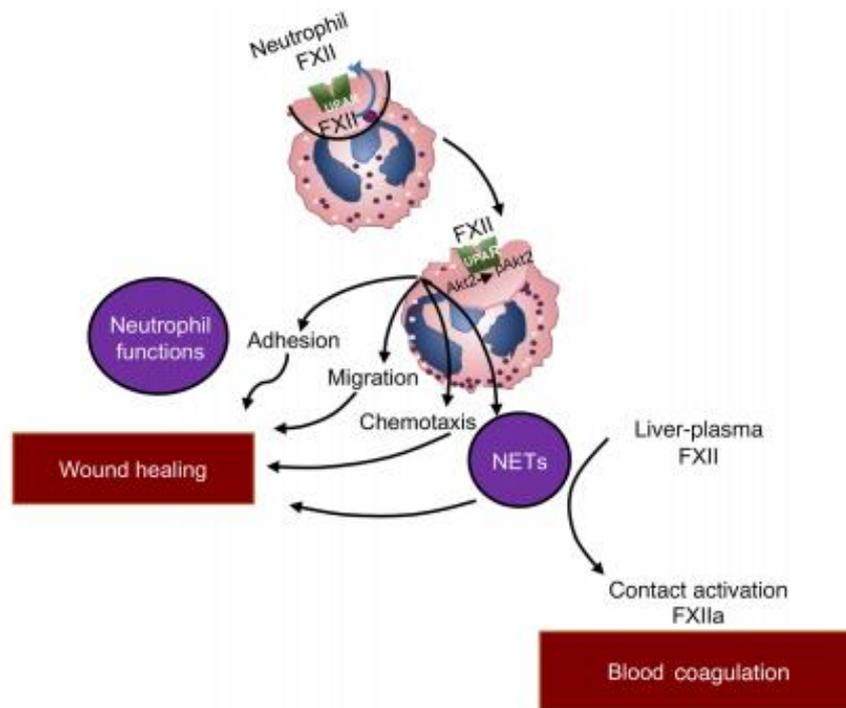


Figure 15 : Rôle de FXII dans la cicatrisation (Stavrou et al., 2018).

Le FXII plasmatique permet l'activation du récepteur à l'uPA à la surface des neutrophiles de façon zinc dépendant. L'activation du récepteur permet la libération du FXII par les neutrophiles et induit ainsi une boucle d'auto-activation des neutrophiles. L'activation du récepteur permet également l'adhésion, la migration et le chimiotactisme des neutrophiles au niveau de la lésion. Enfin, en parallèle, le FXII permet également l'induction de la mort des neutrophiles par NETose. Les NETs libérés servent de surface d'activation pour le FXII.

5) Rôles du Facteur XII dépendant de ses autres domaines

L' α FXIIa a été reconnu pour réguler l'expression du **récepteur Fc γ II**, récepteur Fc présent sur les monocytes, reconnaissant les IgG circulantes ou présentes à la surface des cellules (Chien et al., 1988). Il a également été démontré que le FXII et l' α FXIIa amélioreraient la **prolifération des hépatocytes** (Gordon et al., 1996 ; Schmeidler-Sapiro et al., 1991). Cependant, même si un rôle des domaines EGF-like est suspecté, ces différentes interactions ne sont toujours pas associées à un domaine en particulier.

Ainsi, si les rôles du domaine catalytique et du domaine fibronectine de type 2 du FXII commencent à être bien caractérisés, les rôles du domaine Fibronectine de type I, du domaine

kringle, de la région riche en proline et **des domaines EGF-like** du FXII restent pour l'heure **inconnus**.

6) Expression du Facteur XII

Le facteur XII est une sérine protéase **produite et sécrétée par le foie**. Il est issu du **gène F12**, situé sur le chromosome 13, composé de 13 introns et 14 exons (Saito et al., 1983 ; Stavrou et Schmaier 2010). Sa concentration plasmatique est très élevée, **30 µg/mL soit 375 nM**. L'expression du FXII, autre qu'hépatique, reste peu étudiée.

Une étude a montré une expression du FXII au niveau de la **moelle épinière de souris** et que cette expression était augmentée lors du modèle murin de sclérose en plaques, EAE. Toutefois l'immunohistochimie réalisée n'indique pas le type cellulaire impliqué (Göbel et al., 2014) **(Figure 16A)**.

Une étude a également identifié son expression par les **neutrophiles** à la fois à la surface mais également de façon intracellulaire (Stavrou et al., 2018) **(Figure 16C)**. Enfin une étude antérieure avait établi une expression du FXII par les fibroblastes pulmonaires humains (Jablonska et al., 2010) **(Figure 16B)**.

A noter que même si l'expression du FXII dans le cerveau n'a pas été clairement établie, une ouverture de la BHE peut faciliter son entrée dans le parenchyme et ainsi lui permet d'aller agir sur les cellules cérébrales. Par exemple, la BK activée par le FXII dans le système Kallikréïne-kinine a déjà été montrée comme permettant l'ouverture de la BHE (Bartus et al., 1996 ; Chen et al., 2017). Elle pourrait donc ainsi permettre un accès du FXII au parenchyme.

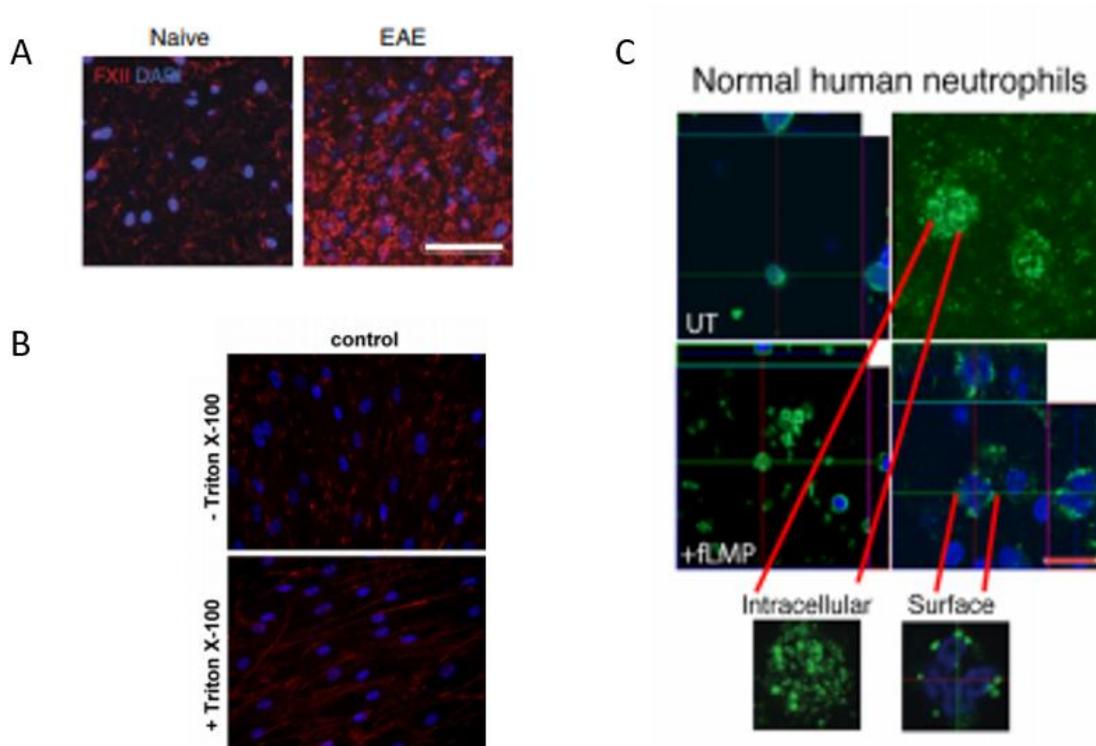


Figure 16 : Expression du FXII.

A. Expression du FXII dans la région lombaire de la moelle épinière de souris sauvages avec injection d'adjuvant complet de Freud (naive) et souris sauvages EAE injection de la MOG et des adjuvants complets de Freud (EAE-MOG) (Göbel et al., 2014). Analyse histologique sur coupe, marquage rouge pour le FXII et bleu pour le DAPI. **B.** Expression du FXII par les fibroblastes pulmonaires humains normaux avec ou sans perméabilisation (+/- Triton) (Jablonska et al., 2010). Images confocales du FXII en rouge et du DAPI en bleu. **C.** Expression intra- et extracellulaire du FXII par les neutrophiles humains normaux inactifs (UT) ou actifs (ajout de N-formylmethionyl peptide ; +fMLP) (Stavrou et al., 2018). Image confocale du FXII en vert et du DAPI en bleu.

LE FACTEUR XII



Il existe **trois formes** de FXII : La forme simple chaîne **FXII**, les formes doubles chaînes **α FXIIa** et **β FXIIa**.



L'activation du FXII est peu claire. Communément admis, le FXII simple chaîne est un zymogène c'est-à-dire une forme non-active. Il acquiert son activité par clivage protéolytique de **α -kallikréine** ou du **kininogène de haut poids moléculaire** ou encore de ses formes **actives α FXIIa et β FXIIa (autoactivation)**. De nombreuses surfaces servent à cette activation : polyphosphates, NETs, zinc...

Néanmoins la **non-activité de la forme simple chaîne FXII a été remis en cause** en 2017 (Ivanov et al., 2017).



Seul les rôles du **domaine catalytique** et du **domaine fibronectine de type 2** sont connus. Ils ont été montrés comme étant **délétères** dans certaines pathologies du système nerveux central : **sclérose en plaques, AVC et maladie d'Alzheimer**.



L'**expression du FXII, autre qu'hépatique, est peu étudiée**. Il a été montré comme exprimé par les cellules de la moelle épinière chez la souris (Göbel et al., 2016). Toutefois le type cellulaire impliqué dans cette expression n'a pas été étudié.

Les rôles dépendants du domaine catalytique du FXII ont été les premiers étudiés. En effet ce domaine permet une activité pro-coagulante et pro-inflammatoire du FXII, montrée comme délétère dans l'AD et les AVC. De plus la liaison de son domaine fibronectine de type 2 avec le récepteur à l'uPA participe aux rôles du FXII dans la SEP, l'angiogénèse et la cicatrisation. Toutefois, à l'heure actuelle, aucun rôle n'est clairement attribué aux autres domaines du FXII et notamment pour les domaines EGF-like.

Dans le laboratoire Phind U1237, il a été établi qu'une autre sérine protéase, le tPA, caractérisée comme exprimée dans le SNC, pouvait *via* son domaine EGF-like se lier au récepteur EGF et exercer des rôles « *growth factor like* » sur les cellules cérébrales.

II. Rôle domaine EGF-like

1) Le récepteur EGF

Le récepteur EGF également appelé ErbB1 est une protéine transmembranaire faisant partie de la famille EGFR qui comprend également ErbB2, ErbB3, ErbB4 (Pines et al., 2010). Le monomère EGFR est inactif. Après la liaison du ligand au niveau de son site de liaison, le récepteur se dimérise et se transactive par transphosphorylation de sa région tyrosine kinase (Pines et al., 2010). En plus de former des homodimères actifs, EGFR peut être également associé à un autre membre de la famille des récepteurs ErbB pour former cette fois-ci des hétérodimères actifs (Pines et al., 2010).

Sept ligands se lient et activent le récepteur chez les mammifères : EGF, le TGF- α (*Transforming Growth Factor α*), le facteur de croissance de type EGF liant l'héparine, la bétacelluline, l'amphiréguline, l'épiréguline et l'épigène (Singh et al., 2016). L'AG1478 (ou Tyrphostin) est un inhibiteur sélectif du récepteur EGF. Il bloque la transphosphorylation du récepteur (Banno et al., 2015).

L'EGFR phosphoryle des protéines signalétiques initiant ainsi plusieurs cascades de transduction. Il s'agit principalement des voies MAPK, PI3K-Akt et JAK-STAT (**Figure 17**) (Oda et al., 2005). Ces voies permettent la prolifération cellulaire, la mobilité cellulaire, l'invasion cellulaire et inhibent l'apoptose.

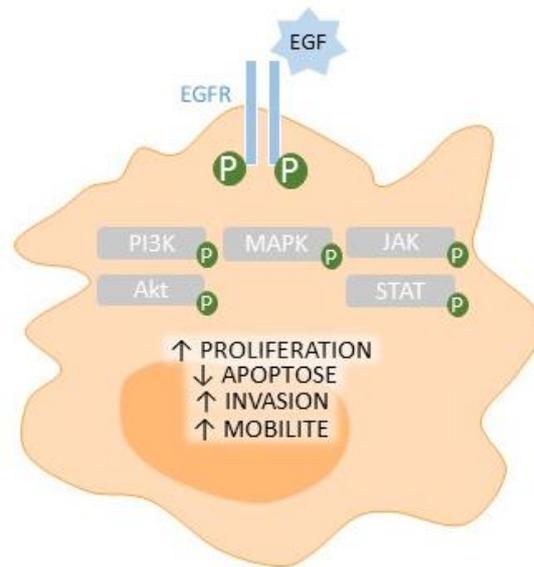


Figure 17 : Schématisation des différentes cascades de signalisation du récepteur EGF.

L'un des ligands clé de l'EGFR est l'EGF. Mais il a été décrit que des sérines protéases possédant des domaines EGF-like pouvait interagir avec le récepteur EGF, au même titre que l'EGF (Correa et al., 2011 ; Bertrand et al., 2015).

2) Rôle du domaine EGF-like du tPA dans l'apoptose cérébrale

Plusieurs études de l'unité Phind U1237 ont établi un effet anti-apoptotique du tPA sur deux types cellulaires : **les neurones et les oligodendrocytes**.

En effet, en 2006, l'équipe a démontré que des doses croissantes de tPA, *in vitro*, permettaient de diminuer la mort apoptotique des neurones corticaux induite par le modèle SD (*Serum Deprivation*) (Liot et al., 2006) (**Figure 18A**). Le tPA induit la diminution du clivage de la **caspase-3**, protéase pro-apoptotique, de façon dose-dépendant (Liot et al., 2006) (**Figure 18B**). Cet effet est indépendant de son activité catalytique car l'utilisation d'un « tPA stop », tPA inhibé au niveau de son domaine catalytique, n'a pas d'effet sur la mort neuronale (Liot et al., 2006) (**Figure 18C**). Enfin le laboratoire a établi que le tPA phosphoryle les protéines signalétiques **Erk1/2 (MAPK) et Akt** (Liot et al., 2006).

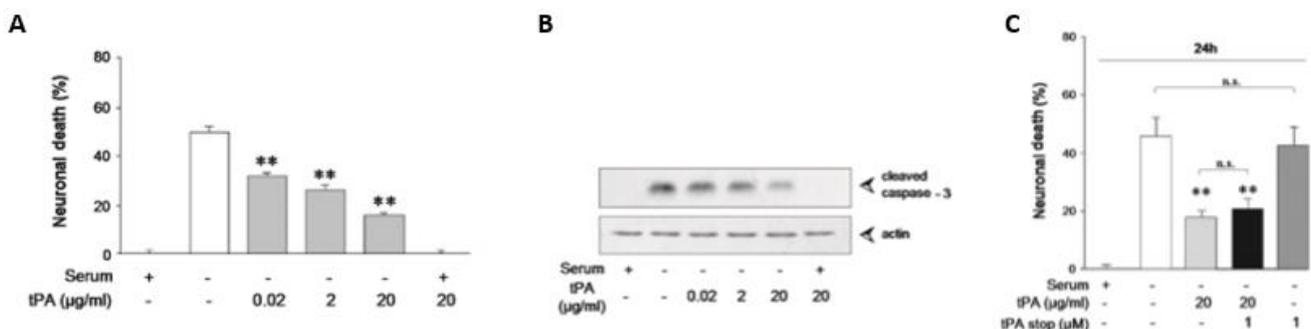


Figure 18 : Rôle anti-apoptotique du tPA indépendant de son domaine catalytique sur les neurones corticaux (Liot et al., 2006).

A. Quantification de la mort neuronale avec ou sans ajout de doses croissantes de tPA [0.02-20 µg/mL] sur des neurones corticaux murins sevrés ou non en sera pendant 24H (+/- SD ; +/- apoptose). **B.** Analyse par immunoempreinte du clivage de la caspase-3, protéase pro-apoptotique, avec ou sans des doses croissantes de tPA [0.02-20 µg/mL] sur des neurones corticaux murins sevrés ou non en sera pendant 24H (+/- SD ; +/- apoptose). Comparaison des mêmes échantillons avec la protéine de référence actine. **C.** Quantification de la mort neuronale avec ou sans 20 µg/mL de tPA ou 1 µg/mL de tPA stop, tPA protéolytiquement inactif sur des neurones corticaux murins sevrés ou non en sera (+/- SD ; +/- apoptose) pendant 24H.

Par la suite en 2011, une étude de l'unité s'est intéressée à l'effet du tPA sur les progéniteurs d'oligodendrocytes. Des doses croissantes de tPA diminuent la mort des progéniteurs d'oligodendrocytes par l'activation des protéines Erk1/2 et Akt, ce qui conduit à une diminution de l'expression de **Bax et Bad**, protéines pro-apoptotiques, et à une augmentation d'expression de **Bcl-2 et Bcl-xl**, protéines anti-apoptotiques (Correa et al., 2011) (**Figure 19A et 19D**).

Ces effets sont dépendants de la fixation du **domaine EGF-like** du tPA sur le **récepteur EGF** présent à la surface des neurones et des oligodendrocytes (Correa et al., 2011 ; Bertrand et al., 2015) (**Figure 19B et 19C**).

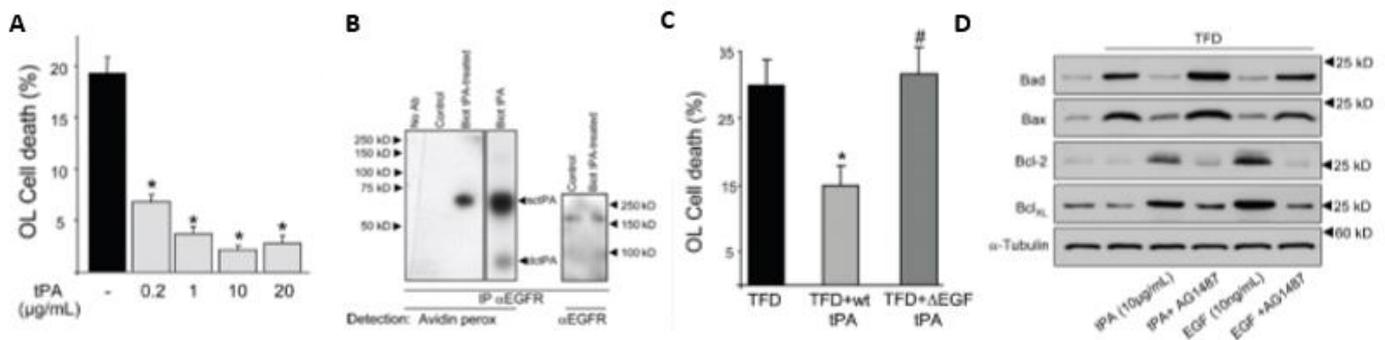


Figure 19 : Rôle anti-apoptotique du tPA sur les progéniteurs d'oligodendrocytes (Correa et al., 2011).

A. Quantification de la mort des progéniteurs d'oligodendrocytes (OL) avec ou sans ajout de doses croissantes de tPA [0.2-20 µg/mL] sur des progéniteurs murins d'oligodendrocytes sevrés ou non en facteurs trophiques pendant 24H (+/- TFD ; +/- apoptose). **B.** Co-immunoprécipitation du tPA biotinylé avec un anticorps anti α-EGFR. Visualisation de la fixation du tPA sur le récepteur EGF par révélation de la biotine par avidine-préoxydase. Contrôle de la visualisation du récepteur EGF sur la même membrane **C.** Quantification de la mort des progéniteurs d'oligodendrocytes (OL) avec ou sans ajout de tPA natif (tPA wt) ou tPA sans domaine EGF-like (ΔEGF tPA) sur des progéniteurs murins d'oligodendrocytes sevrés ou non en facteurs trophiques pendant 24H (+/- TFD ; +/- apoptose). **D.** Immunoempreinte révélant les variations des protéines pro (Bad et Bax) et anti-apoptotiques (Bcl-2 et Bcl-xl) avec ou sans ajout de 10 µg/mL de tPA, 10 µg/mL de tPA + AG1478 (inhibiteur EGFR), 10 ng/mL EGF et 10 ng/mL EGF + AG1478 sur des progéniteurs d'oligodendrocytes sevrés ou non en facteurs trophiques pendant 24H (+/- TFD ; +/- apoptose). Comparaison des mêmes échantillons avec la protéine de référence α-Tubuline.

Ainsi l'équipe Phind U1237 a pu démontrer que le tPA réduit l'apoptose des neurones et des progéniteurs d'oligodendrocytes par sa fixation *via* son domaine EGF-like sur le récepteur EGF.

Ils ont également décrit les mécanismes intracellulaires impliqués (Liot et al., 2006 ; Correa et al., 2011 ; Bertrand et al., 2015) (**Figure 20**).

Le FXII a été décrit précédemment comme présentant deux domaines EGF-like. De plus ces domaines se sont avérés structurellement semblables à celui du tPA.

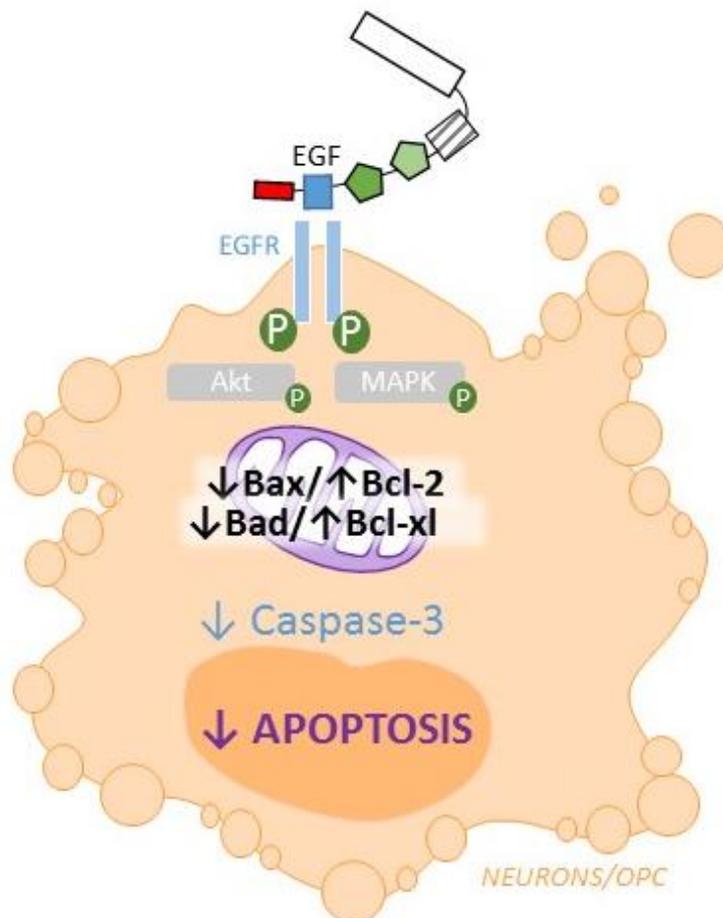


Figure 20 : Schématisation du rôle anti-apoptotique du tPA dans le cerveau (d'après Correa et al., 2011 ; Liot et al., 2006)

3) Homologies structurelles des EGF-like domaines du tPA et du FXII

Des analyses structurelles ont révélé que le FXII présentait des homologies structurelles avec d'autres protéines telles que le tPA (Stavrou et Schmaier, 2010) (**Figure 21**).

En effet le FXII présente **40% d'homologie structurale avec le tPA** (Stavrou et Schmaier, 2010). Ces deux sérines protéases ont en commun des domaines Finger ou Fribronectine, des domaines EGF-like, des domaines kringle et enfin leurs domaines catalytiques (Stavrou et Schmaier, 2010). En particulier les domaines EGF-like et kringle montrent un haut degré d'homologie (Cool et al., 1985 ; Beringer et Kroon-Batenburg, 2013).

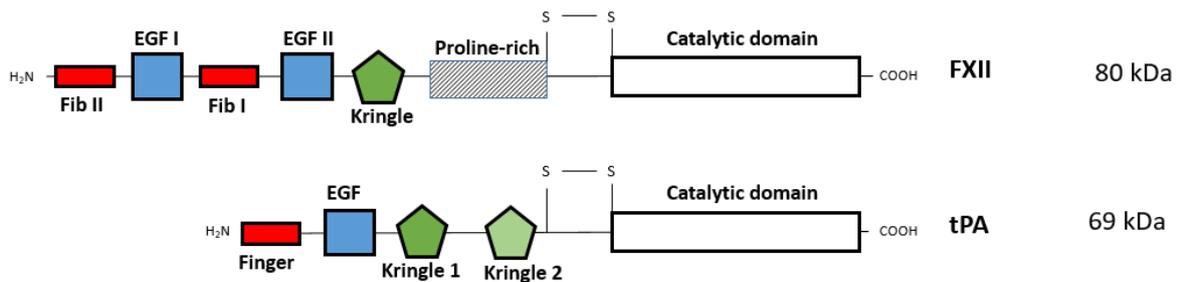


Figure 21 : Comparatif des structures de deux sérines protéases impliquées dans l'hémostase : le simple chaîne FXII et le simple chaîne tPA.

4) Expression du tPA dans le système nerveux central

Le FXII comme le tPA joue un rôle dans l'hémostase et ils ont tous les deux été identifiés comme jouant un rôle dans le cerveau. Toutefois, si l'expression cérébrale du FXII a été peu étudiée, une seule immunohistochimie de la moelle ne révélant pas le type cellulaire impliqué, l'expression du tPA au sein du système nerveux central, elle, a été largement documentée (Göbel et al., 2016).

En effet le tPA est exprimé et sécrété par **différents types cellulaires du SNC**. Au niveau transcriptionnel, les ARNm du tPA sont exprimés dans les différentes régions cérébrales : hippocampe, cervelet, striatum et cortex (Sappino et al., 1993). L'expression neuronale du tPA est la mieux caractérisée. Les **neurones** stockent le tPA dans des vésicules à cœur dense au niveau des épines synaptiques, puis suite à une dépolarisation, ils sont capables de le libérer par exocytose (Fernandez-Monreal et al., 2004 ; Lochner et al., 2005). Selon plusieurs études, les **astrocytes** se sont révélés capables de synthétiser du tPA (Cassé et al., 2012). De plus les **cellules microgliales** présentent également une expression du tPA et sa libération pourrait être à l'origine de processus neurodégénératifs (Tsirka et al., 1995). Enfin, au niveau de la

substance blanche, le laboratoire Phind U1237 a mis en évidence une expression du tPA par les **oligodendrocytes matures myélinisants** et que cette expression diminuait au cours du vieillissement (Correa et al., 2011) (**Figure 22**).

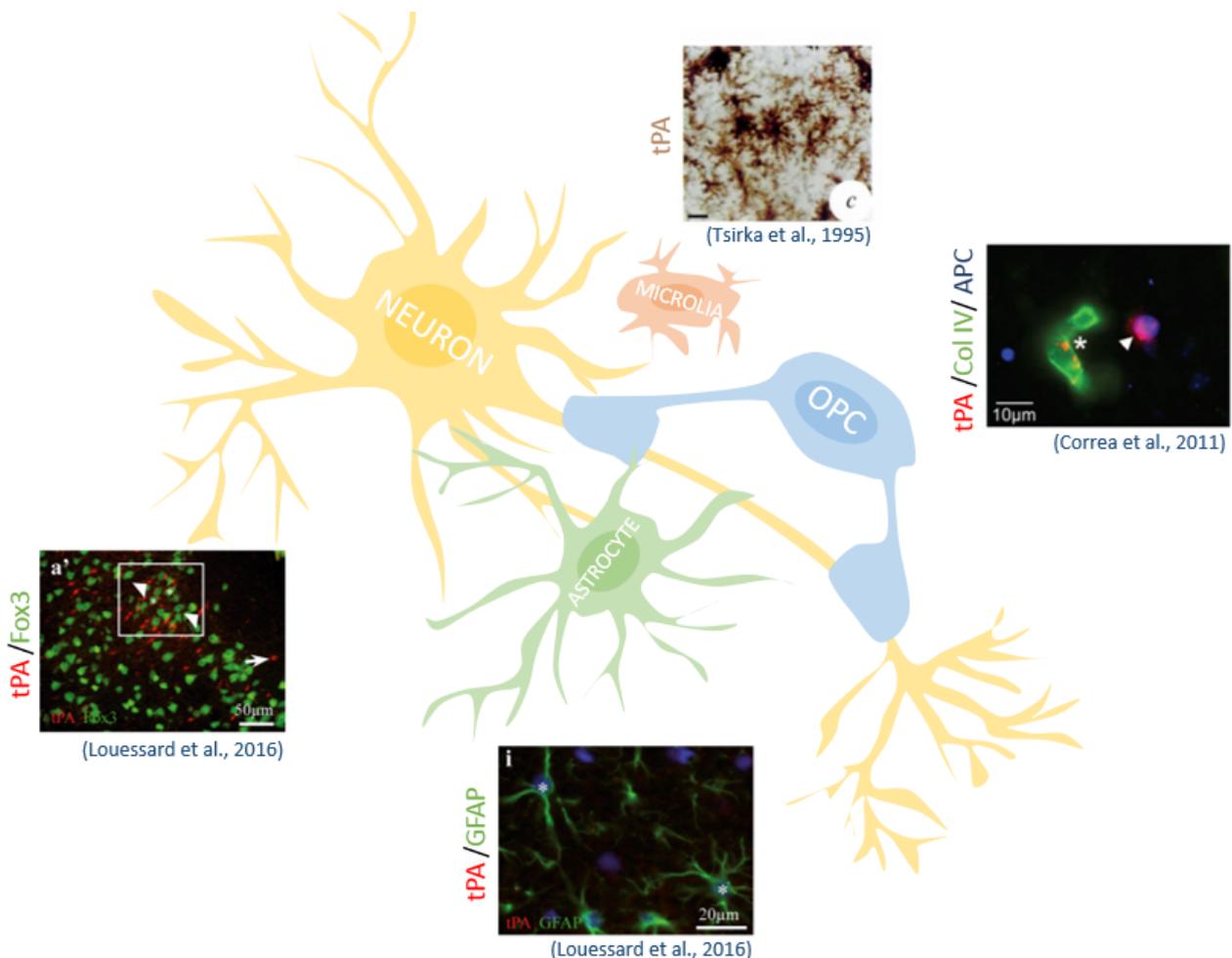


Figure 22 : Expression du tPA dans le SNC par les différents types cellulaires : Neurones, Astrocytes, Microglie, Oligodendrocytes (d'après Tsirka et al., 1995 ; Correa et al., 2011 ; Louessard et al., 2016). **Microglie :** Immunomarquage du tPA en marron chez des souris sauvages dans le striatum. **Oligodendrocytes (OPC) :** Immunomarquage du tPA en rouge, des vaisseaux (Col IV) en vert et des OPC (APC) en bleu. **Neurones :** Immunomarquage du tPA en rouge et des neurones (Fox3) en vert. **Astrocytes :** Immunomarquage du tPA en rouge et des astrocytes (GFAP) en vert.

Le tPA est donc décrit comme exprimé dans le SNC. De plus l'équipe Phind U1237, via diverses publications au cours de ces dix dernières années, a décrit des rôles du domaine EGF-like du tPA dans les processus apoptotiques. Les homologies structurelles entre le FXII et le tPA sont

essentiellement situées au niveau des domaines EGF-like qu'ils ont en commun. Aucun rôle de ce domaine n'a vraiment été clairement établi pour le FXII.

5) Rôle sur l'apoptose du FXII ?

Aucune étude n'a clairement établi un rôle du FXII sur l'apoptose. Toutefois deux études suggèrent un rôle de celui-ci sur l'apoptose des cellules placentaires et des lymphocytes.

En effet l'utilisation d'un **anticorps bloquant pour le FXII** chez la souris gestante augmente l'apoptose des cellules placentaires (Velayuthaprabhu et al., 2011). De plus *in vitro*, il a été montré que le FXII se fixait à la **surface des lymphocytes T en apoptose** *via* les PtdSer et permettait ainsi aux cellules apoptotiques d'avoir une activité pro-coagulante (Yang et al., 2017).

EGFR n'est pas le seul récepteur présentant des effets anti-poptotiques. D'autres récepteurs tyrosines kinases tels que le récepteur MET ont été décrit comme permettant la survie cellulaire, de plus le FXII a par le passé été identifié comme l'un des activateurs de la voie HGF/MET.

6) Rôle du FXII dans la voie

HGF/MET

a) La voie HGF/MET

MET est un hétérodimère transmembranaire composé de deux chaînes α et β reliées par des ponts disulfures (Gherardi et al., 2012 ; Stamos et al., 2004). L'activation du récepteur MET se fait par son ligand unique le facteur de croissance hépatocytaire (HGF) (Gak et al., 1992 ; Naldini et al., 1991).

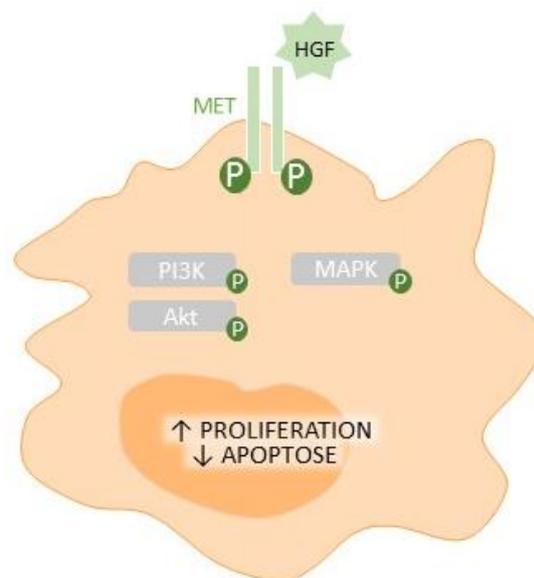


Figure 23 : Schématisation des différentes cascades de signalisation du récepteur MET.

L'HGF est d'abord sécrété sous une proforme inactive (pro-HGF). En effet, la proforme est capable de se lier au récepteur mais ne peut l'activer (Lokker et al., 1992). L'activation de l'HGF se fait par clivage protéolytique. L'un des activateurs les plus connus pour l'HGF est l'HGFA (Miyazawa et al., 1998). La fixation de l'HGF mature (ou double chaîne) sur le récepteur MET entraîne l'homodimérisation du récepteur et la phosphorylation de ses deux résidus tyrosines (Rodrigues et Park, 1993).

Une fois que le récepteur MET est activé, de nombreuses protéines de signalisation vont être sollicitées pour mettre en place ses réponses biologiques. Ainsi comme EGFR, MET est capable de phosphoryler les protéines MAPK, PI3K/Akt, permettant au récepteur de jouer un rôle dans la prolifération cellulaire et la survie cellulaire (Paumelle et al., 2002 ; Xiao et al., 2001) (**Figure 23**).

b) Activation de la voie HGF/MET par le tPA et le FXII

Une étude *in vitro* a montré que la tPA pouvait **convertir le pro-Hepatocyte Growth Factor** (Pro-HGF) en mature HGF (Mars et al., 1993). A noter que la présence du tPA seul n'est pas suffisant pour avoir l'effet. Cela nécessite la présence de son co-facteur, la fibrine, comme surface d'activation (Mars et al., 1993). Ce même potentiel de conversion a également été montré pour l' α FXIIa et sa forme tronquée β FXIIa. Mais, à la différence du tPA, les deux formes actives du FXII sont suffisantes pour convertir le Pro-HGF en HGF (Shimomura et al., 1995).

L'HGF est le ligand unique du récepteur MET, impliqué majoritairement en oncologie. Des études ont observé un effet **anti-apoptotique de la voie HGF/MET dans le cerveau**. L'HGF provoque la survie des **motoneurones, des neurones hippocampiques et des neurones corticaux** (Maina et Klein, 1999 ; Hayashi et al., 2001). De plus l'étude *in vitro* des effets de l'HGF sur l'apoptose des neurones corticaux a permis de déterminer qu'il s'agissait de l'implication des voies **Erk1/2 (MAPK) et PI3K/Akt**. Enfin il a été établi que l'HGF entraîne le blocage de la translocation de **Bax** du cytoplasme vers le noyau et permet l'expression de **Bcl-2 et Bcl-xl** (He et al., 2008).

7) Rôle des récepteurs EGFR et MET dans l'apoptose

EGFR et MET activent un large éventail de voies, prolifération, motilité, migration, invasion et la **survie cellulaire**. Ces deux récepteurs sont décrits pour inhiber l'apoptose. Cette capacité pro-survie en fait des cibles désignées dans le cas de cancer, lors d'une diminution pathologique d'apoptose (Wieduwilt et Moasser, 2008).

Contrairement au récepteur EGF qui compte **plusieurs substrats** (EGF, tPA, TGF...), le récepteur MET ne comporte qu'un substrat unique, l'**HGF**.

De nombreuses publications ont décrit une **coopération entre EGFR et MET en cancérologie**.

Il a notamment été montré qu'une inhibition du récepteur EGFR était palliée par une activation du récepteur MET par l'HGF, expliquant la résistance aux traitements ciblant uniquement le récepteur EGFR (Yano et al., 2008 ; Mueller et al., 2008). A l'inverse, l'une des tyrosines kinases de EGFR a été montrée comme permettant la phosphorylation directe du récepteur MET (Yamamoto et al., 2006). De plus l'HGF a été montré comme pouvant activer le récepteur EGFR (Reznik et al., 2008). Ainsi l'HGF peut activer en synergie les récepteurs EGFR et MET (Reznik et al., 2008) (**Figure 24**).

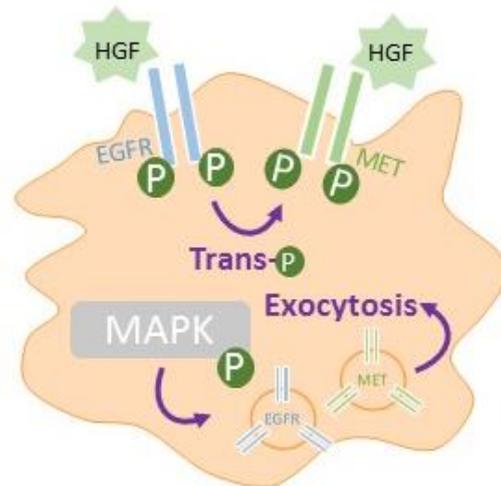


Figure 24 : Schématisation de la coopération MET/EGFR

Les protéines partenaires SRC, MAPK et intégrine $\beta 1$ ont été désignées comme participant activement à cette coopération MET/EGFR (Yamamoto et al., 2006 ; Dulak et al., 2011 ; Breindel et al., 2013 ; Ju et Zhou, 2013). Par exemple, suite à l'activation d'EGFR à la surface de différentes lignées cancéreuses, les protéines signalétiques MAPK (Erk 1 et 2) permettent la phosphorylation du récepteur MET en l'absence d'HGF (Breindel et al., 2013). Les MAPK permettent également d'augmenter l'exocytose des récepteurs EGFR et MET et ainsi

augmentent la disponibilité des récepteurs (Breindel et al., 2013) (**Figure 24**). **La coopération EGFR/MET n'a pour le moment pas été étudiée en apoptose.**

Rôle domaine EGF-like



Le **domaine EGF-like du tPA** joue un **rôle antiapoptotique** sur les neurones et les progéniteurs d'oligodendrocytes *via* le **récepteur EGF**.



Le FXII et le tPA présentent **40% d'homologie structurelle** et notamment au niveau des **domaines EGF** qu'ils ont en commun.



Contrairement au FXII, **l'expression du tPA** a été largement étudiée dans le cerveau. Le tPA est exprimé dans l'ensemble des **régions cérébrales par les neurones, les astrocytes, les oligodendrocytes et les cellules microgliales**. De plus **aucune étude** ne s'est intéressée au rôle du **FXII sur l'apoptose**.



La bibliographie suggère un rôle potentiel du FXII dans la **voie anti-apoptotique HGF/MET**.



Il existe un **coopération entre les récepteurs MET et EGF en cancérologie**. Cette coopération n'a pas été établie dans l'apoptose.

Le FXII et le tPA sont deux sérines protéases impliquées dans l'hémostase. Une analyse structurelle a également révélé un haut degré d'homologies structurelles entre elles deux notamment au niveau des domaines EGF-like qu'ils ont en commun.

Plusieurs publications de l'unité Phind U1237 ont établi un rôle anti-apoptotique du tPA dépendant de la fixation de son domaine EGF-like sur le récepteur EGF. Des études suggèrent un rôle du FXII dans l'apoptose.

III. L'apoptose

1) Généralités

a) Historique

Le terme apoptose, du grec « apo - au loin et ptosis – chute » signifiant feuilles tombant d'un arbre, fut pour la première fois utilisé par **Kerr, Wyllie et Currie en 1972** pour détailler un type de mort cellulaire morphologiquement distinct des autres (Kerr et al., 1972).

Par la suite les composants moléculaires et cellulaires de l'apoptose ont été décrits dans deux études importantes. Les études génétiques, chez le nématode *Caenorhabditis elegans*, ont permis de révéler trois gènes impliqués dans la régulation de l'apoptose et du développement : CED-3, CED-4 et CED-9 (mort cellulaire anormale -3, -4 et -9) (Brenner 1974 ; Sulston et Horvitz, 1977 ; Ellis et Horvitz, 1986) (Figure 25).



Sydney Brenner



H. Robert Horvitz



E. Sulston



Figure 25 : Prix Nobel de Physiologie ou Médecine en 2002.

Le prix Nobel de physiologie ou de médecine 2002 a été décerné conjointement à Sydney Brenner, H. Robert Horvitz et John E. Sulston, pour leurs découvertes concernant la régulation génétique du développement et la mort cellulaire programmée.

Par la suite, Bcl-2, un oncogène humain surexprimé dans le lymphome folliculaire, fut montré comme un régulateur clé de l'apoptose (Tsujimoto et al., 1984).

b) Morphologie de l'apoptose

Kerr et collaborateurs ont identifié les caractéristiques morphologiques de l'apoptose par la microscopie électronique et la microscopie à lumière blanche (Kerr et al., 1972) (**Figure 26**). Ainsi durant le début du processus, nous pouvons visualiser un **rétrécissement cellulaire** et des **pycnoses**, terme décrivant la rétractation du noyau cellulaire (Kerr et al., 1972). Par la suite, le rétrécissement cellulaire entraîne une condensation du cytoplasme conduisant à un rapprochement des différents organites. Les pycnoses, elles, sont la résultante de la **condensation de la chromatine**, caractéristique la plus représentative de l'apoptose. La condensation de la chromatine mène à la caryorrhexie, c'est-à-dire à une fragmentation du noyau cellulaire et dissolution de celui-ci dans le cytoplasme.

L'intégrité des organites est toujours maintenue, l'ensemble étant enfermé dans une membrane plasmique intacte. La cellule apoptotique bourgeonne transitoirement pour former ce qu'on appelle « **les corps apoptotiques** » qui exposent à leur surface les **PtdSer**, facilitant ainsi leur reconnaissance par les cellules phagocytaires (Fadok et al., 2000 ; Fadok et al., 2001).

Ces corps sont ensuite **phagocytés** par des macrophages, des cellules parenchymateuses ou des cellules néoplasiques, et sont dégradés dans les phagolysosomes.

Généralement, aucune réaction inflammatoire n'est associée au processus d'apoptose. Ceci s'explique par la non-libération du contenu cellulaire, la rapidité de la phagocytose par les cellules environnantes et enfin par le fait que les cellules englobantes ne produisent pas de cytokines anti- ou pro-inflammatoires (Savill et Fadok 2000 ; Kurosaka et al., 2003).

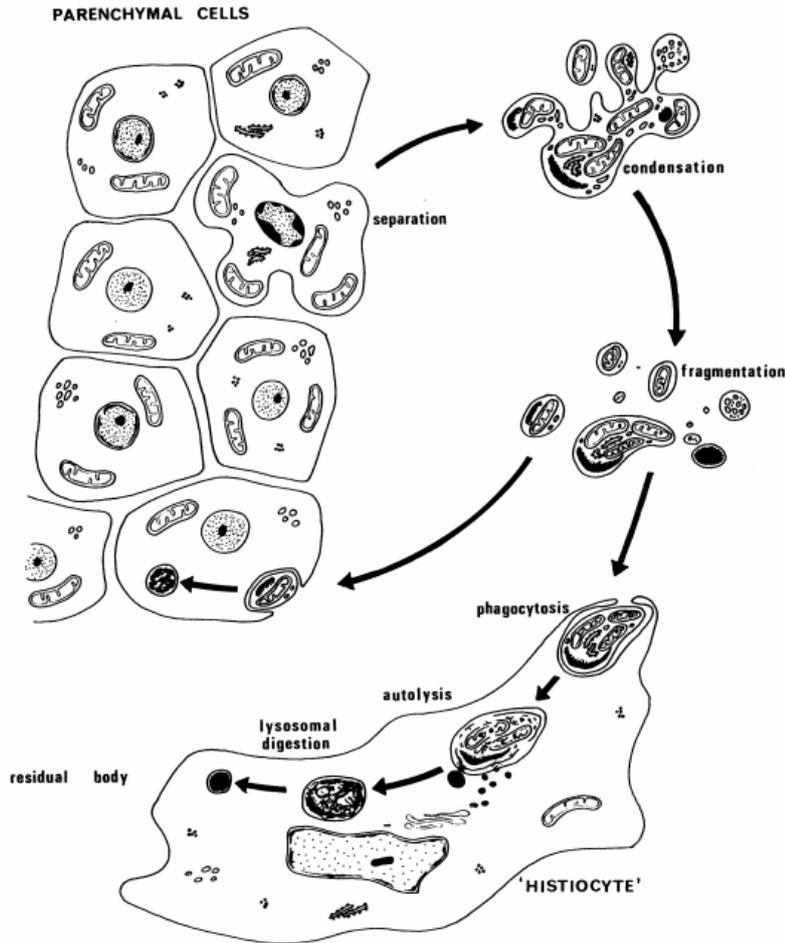


Figure 26 : Illustration des différentes étapes morphologiques de l'apoptose (Kerr et al., 1962).

Schématisme historique de la morphologie du processus d'apoptose retrouvée dans la publication de Kerr et ses collaborateurs.

2) Mécanismes

Il existe deux voies distinctes d'activation de l'apoptose : 1/ **Une voie dite intrinsèque** mettant en jeu les mitochondries. Cette voie est gouvernée principalement par des protéines appartenant à la famille de Bcl-2. 2/ **Une voie dite extrinsèque**, induite par signaux de stress extracellulaires, impliquant des récepteurs de la famille des facteurs de nécrose tumorale (TNF, Tumor Necrosis Factor) (**Figure 23**). Elles conduisent toutes deux à l'activation des **effecteurs caspases** (Cystéines Aspartyl-Protéases), permettant le clivage de plusieurs molécules.

a) Voie extrinsèque (voie signaux de mort)

La voie extrinsèque de l'apoptose est induite par des signaux de stress extracellulaires qui sont détectés et propagés par des récepteurs transmembranaires spécifiques. L'apoptose extrinsèque est initiée par la liaison de **ligands dits létaux** sur leurs récepteurs, appelés « **récepteurs de mort** ». Ces récepteurs sont des protéines transmembranaires appartenant à la super famille des récepteurs au facteur de nécrose tumorale (TNFR), qui compte huit membres (Fas, TNF-R1, DR3, DR4, DR, DR6, p75 et EDAR) (Reed, 2000). Ces récepteurs sont composés d'un domaine extracellulaire N-terminale, riche en cystéines permettant la fixation du ligand et sa trimérisation. Ils sont également composés d'un domaine transmembranaire permettant leur ancrage à la membrane et enfin d'un domaine intracellulaire en position C-terminale, composé d'un **domaine de mort (DD, Death Domain)** (Reed, 2000).

La fixation du ligand induit la trimérisation du récepteur, le recrutement du domaine effecteur (domaine **DED ; Death Effector Domain**) par le DD. Le DED attire les **procaspases -8 et -10**. Le rapprochement de plusieurs procaspases conduit à leur autoactivation (Muzio et al., 1998 ; Martin et al., 1998) et à **l'activation directe ou indirecte** de la caspase effectrice **caspase-3** (Hirata et al., 1998 ; Stennicke et al., 1998).

En opposition à l'activation directe de la caspase effectrice par les caspases -8 ou -10, l'activation indirecte de celle-ci passe par les mitochondries et rejoint ainsi par l'intermédiaire de la protéine **Bid**, protéine de la famille de Bcl-2, la voie intrinsèque ou mitochondriale (Ren et al., 2010).

b) Voie intrinsèque (ou mitochondriale)

La voie intrinsèque, également appelée voie mitochondriale, est régulée par les membres de la **famille de Bcl-2**. Cette famille est subdivisée en trois groupes : les pro-apoptotiques ou également appelées membres BH3 (Bim, Bid, Puma, Noxa, Hrk, Bmf et Bad), les molécules

effectrices pro-apoptotiques (**Bax** et Bak) et les protéines de la famille Bcl-2 anti-apoptotiques (**Bcl-2**, Bcl-xl, Mcl1, A1 et Bcl-B) (Czabotar et al., 2014).

Dans les cellules saines, l'action de Bax/Bak est inhibée par des membres de la famille Bcl-2 anti-apoptotiques. En revanche, lors d'une réponse à un stimulus apoptotique (développement, absence de facteur de croissance et/ou de survie, agents génotoxiques), les membres BH3 sont surproduits (Ham et al., 2005 ; Vela et al., 2013). Cette surproduction entraîne une libération du **cytochrome c** par les mitochondries. En temps normal le cytochrome c se maintient dans la mitochondrie et participe à la chaîne respiratoire, mais en cas d'apoptose, sa libération conduit à sa complexation avec **Apaf-1** (Apoptotic Peptidase Activating Factor 1) et forme des **apoptosomes**. A l'état basal, Apaf-1 est présent dans le cytosol mais sous une forme repliée inactive. La complexation avec le cytochrome c l'active et ce de façon dépendante de l'ATP (Zou et al., 1997 ; Kluck et al., 1997 ; Reubold et Eschenburg, 2012).

Ce sont par la suite les apoptosomes qui recrutent la procaspase monomère 9 qui se dimérise. Ce dimère subit un clivage autocatalytique pour former un complexe hétérotétramérique actif. La **caspase-9** active initie ensuite l'activation de la caspase effectrice de l'apoptose **caspase-3** (Zou et al., 1999).

c) Issues biochimiques de l'apoptose

Les caspases effectrices peuvent cliver plus de 1 300 substrats différents. La **fragmentation de l'ADN**, l'exposition des PtdSer à la surface cellulaire et la **perte du potentiel mitochondrial** par ouverture des pores mitochondriaux (MPTP) sont les caractéristiques biochimiques de l'apoptose (Masato et al., 1998 ; Fadok et al., 1992 ; Shimizu et al., 1999).

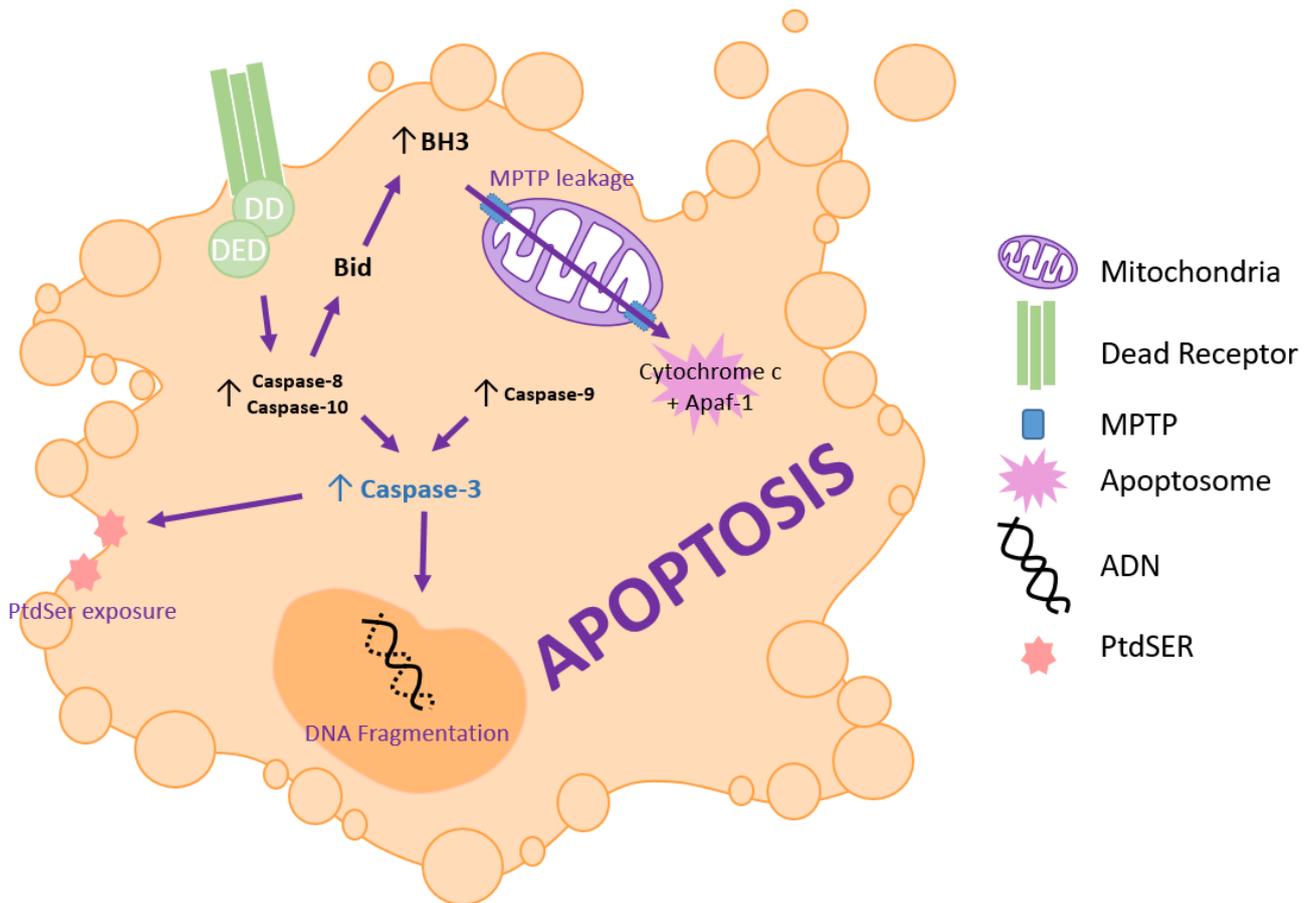


Figure 27 : Schématisation des différentes étapes de l'apoptose.

d) Différence nécrose et apoptose

La nécrose fut pendant longtemps considérée comme le seul processus conduisant à la mort cellulaire.

D'un point de vue morphologique pure, l'apoptose et la nécrose diffèrent. **La nécrose fait référence à un gonflement cellulaire par rupture précoce de la membrane**, contrairement à l'apoptose qui, elle, fait référence à un rétrécissement cellulaire sans rupture membranaire (Farber et El Mofty, 1975 ; Proskuryakov et al., 2003). Toutefois, il existe un chevauchement entre ces deux processus. En effet l'apoptose, tout comme la nécrose, résulte d'un réseau biochimique partagé décrit comme le « **continuum apoptose-nécrose** » (Raffray and Cohen, 1997). Par exemple, ces deux types de mort comprennent une diminution de la disponibilité des caspases, enzymes clés lors de l'apoptose et/ou la nécrose mais également une diminution

de l'ATP intracellulaire (Kroemer et al., 2009). Ainsi l'activation de l'un plutôt que l'autre va dépendre de la nature du signal de mort, du type de tissu, du stade de développement et du milieu physiologique (Kroemer et al., 2009).

La nécrose reste un processus passif et incontrôlé qui en général concerne de vastes champs de cellules tandis que l'apoptose est contrôlée et dépend de l'énergie intracellulaire disponible et elle peut affecter une cellule seule comme un groupe de cellules (Kroemer et al., 2009) (**Tableau 2**).

Tableau 2 : Comparaison des caractéristiques de l'apoptose et de la nécrose

		APOPTOSE	NECROSE
Caractéristiques Générales		Touche une cellule isolée ou plusieurs cellules dispersées Pas de réaction inflammatoire Processus actif	Touche un tissu ou plusieurs cellules Réaction inflammatoire Processus passif
Caractéristiques morphologiques	Niveau membranaire	Bourgeonnement de la membrane et formation de corps apoptotique Pas de rupture de la membrane plasmique Atrophie de la cellule	Pas de protubérances membranaires Rupture précoce de la membrane Gonflement de la cellule
	Niveau cytoplasmique	Organites cellulaires intacts	Destruction des organites cellulaires
	Niveau nucléaire	Atrophie nucléaire Condensation de la chromatine	Gonflement nucléaire Dispersion de la chromatine en agrégats
Caractéristiques biochimiques et moléculaires	Niveau membranaire	Modification membranaires favorisant la phagocytose par inversion des phosphatidylsérines membranaires	Eclatement membranaire
	Niveau cytoplasmique	Activation de protéases (caspases)	Activation de protéases (caspases)
	Niveau nucléaire	Digestion de l'ADN en fragments multiples de 180-200 pbs Nécessité d'un activité transcriptionnelle	Digestion aléatoire de l'ADN

3) Techniques de visualisation

In vivo, la visualisation de l'apoptose reste complexe à étudier. En effet il s'agit d'un processus rapide et les corps apoptotiques sont très rapidement phagocytés. Toutefois l'apoptose est un processus présentant une cascade d'activation complexe et une morphologie bien particulière. Ainsi l'apoptose peut être évaluée à différentes étapes et le regroupement de plusieurs critères tels que la **fragmentation de l'ADN**, **l'activation des caspases**, **les dommages membranaires et les dommages mitochondriaux**, permettent de déterminer si la cellule étudiée meurt bien par apoptose.

a) La fragmentation de l'ADN

Le clivage de l'ADN internucléosomale peut être identifié par une échelle d'ADN sur gel d'agarose par simple **électrophorèse**. De plus la fragmentation de l'ADN, due à l'apoptose, empêche la cellule de fixer l'iodure de propidium, intercalant de l'ADN (Telford et al., 1991 ; Formichi et al., 2000). Cette caractéristique peut être visualisée par **cytométrie en flux** (Nicoletti et al., 1991). La cytométrie fournit des mesures quantitatives au cours du temps de l'étendue de l'apoptose par évaluation des cellules apparaissant fluorescentes, cellules fixant l'iodure de propidium. Toutefois ces deux techniques ne sont pas envisageables pour un échantillon présentant peu d'apoptose ou pour des cellules apoptotiques sans clivage internucléosomique de l'ADN.

La technique de **TUNEL** (Terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP Nick End Labeling) est utilisée pour évaluer les produits de clivage des endonucléases, indépendamment de leur taille et de leur origine, en marquant enzymatiquement les ruptures du brin d'ADN (Ito et Otsuki, 1998 ; Correa et al., 2011). En effet cette technique ajoute, par l'enzyme *terminal transferase*, des dUTP en 3' sur les fragments d'ADN. Ainsi la fragmentation de l'ADN, par la technique de TUNEL, peut être visualisée par différentes sondes en microscopie à fluorescence ou en cytométrie.

Enfin la fragmentation de l'ADN peut être visualisée par un intercalant de l'ADN tel que le **DAPI**, agent fluorescent permettant de visualiser les noyaux en microscopie à fluorescence. En cas d'apoptose les noyaux apparaissent fragmentés (Servais et al., 2006).

b) L'activation des caspases et les protéines de la famille de Bcl-2

Différents dosages peuvent être utilisés pour identifier les caspases activées, cela comprend **les immunoempreintes** (*Western blot*) et les **immunohistochimies ou immunocytochimies** (Gurtu et al., 1997). En effet il existe sur le marché différents anticorps, qu'ils soient polyclonaux ou monoclonaux, reconnaissant à la fois les procaspases et les caspases clivées. Il en est de même pour l'ensemble des protéines de la famille de Bcl-2.

c) Dommages de la membrane plasmique

La translocation des PtdSer à la surface des cellules apoptotiques peut être détectée par **l'Annexine V** marquée à un fluorochrome (Van Engeland et al., 1996 ; Hingorani et al., 2011). L'Annexine V possède une forte affinité pour les PtdSer.

d) Dommages mitochondriaux

Des colorants métaboliques ou d'intégrité membranaire peuvent être utilisés pour étudier l'activité mitochondriale des cellules, par exemple le **fluorophore JC-1**, témoin de la perméabilité membranaire des mitochondries par accumulation du fluorophore dans la cellule (Lieven et al., 2003).

Ces différentes techniques d'évaluation de l'apoptose ont permis d'établir des rôles de l'apoptose dans le SNC.

- 4) Rôles physiologique et pathologique de l'apoptose dans le système nerveux central
 - a) Physiologie

Il a été démontré qu'afin de maintenir l'homéostasie chez l'adulte, environ 10 millions de cellules prolifèrent chaque jour, pour contrebalancer les cellules mortes par apoptose (Renehan et al., 2001). Et ce nombre peut être augmenté significativement lors du développement et du vieillissement physiologique et notamment au niveau du SNC.

L'apoptose lors du développement cérébral

L'apoptose se produit dans tout le SNC lors de son développement. Il est estimé qu'au moins la moitié de la population cellulaire initiale est éliminée à la suite de l'apoptose (Oppenheim, 1984 ; Coultas et al., 2007). Le rôle potentiel de l'apoptose au cours du développement neural comprend **l'optimisation des connexions synaptiques, l'élimination des neurones inutiles et la formation des réseaux neuronaux**. Il est suggéré que les chances de survie d'un neurone pendant le développement dépendent directement de l'étendue de ses connexions à une cible postsynaptique, ce qui suggère que les neurones sont d'abord surproduits et ensuite en **compétition pour les facteurs neurotrophiques** (Cowan et al., 1984). Après le retrait des facteurs neurotrophiques, le cytochrome c est libéré par les mitochondries neuronales, ce qui déclenche l'apoptose (Deshmukh et Johnson, 1998 ; Glebova et Ginty 2005 ; Gosh et al., 2011).

L'apoptose lors du vieillissement cérébral

A mesure que les organismes vieillissent, certaines cellules commencent à se détériorer plus rapidement et sont éliminées par apoptose. L'une des théories a été proposée par Harman et collaborateurs en 1992. Ils expliquent que l'apoptose observée au cours du vieillissement serait due au stress oxydatif. Celui-ci jouerait un rôle primordial dans la physiologie de l'apoptose induite par l'âge, par l'accumulation de radicaux libres qui endommagerait l'ADN mitochondrial (Harman, 1992 ; Ozawa, 1995). De plus les

mitochondries provenant de cellules cérébrales prélevées chez des souris vieillissantes présentent une activation importante du pore MPTP, responsable de la libération du cytochrome c (Mather et Rottenberg, 2000).

Il est clair que l'apoptose doit être étroitement régulée car une mort cellulaire trop faible ou trop importante peut entraîner des cas pathologiques d'apoptose, comme par exemple des anomalies du développement, des maladies auto-immunes, une neurodégénérescence ou des cas de cancer.

b) Pathologie

Certaines pathologies se caractérisent par une accumulation de cellules, telles que les maladies auto-immunes. Cette accumulation cellulaire serait due à une prolifération cellulaire et/ou à une diminution de l'apoptose. A l'inverse, d'autres pathologies du type maladie neurodégénérative accidentelle telle que les AVC ou les maladies neurodégénératives chroniques telles que l'AD, sont caractérisées par une augmentation du processus apoptotique.

La sclérose en plaques

La SEP se caractérise par une prolifération lymphocytaire et une mort des oligodendrocytes le tout conduisant à des plaques de démyélinisation.

Il a été montré dans un modèle murin de SEP, le modèle EAE, que l'apoptose des lymphocytes T permettait de réduire l'inflammation cérébrale (Schmied et al., 1993).

En opposition le blocage de l'apoptose des oligodendrocytes permettait une remyélinisation dans l'EAE (Caprariello et al., 2012 ; Akassoglou et al., 1998 ; Valentin-Torres et al., 2018).

Ainsi l'apoptose a été montrée comme un processus bénéfique ou délétère dans des modèles animaux de SEP.

La maladie d'Alzheimer

L'AD se caractérise par une perte étendue de neurones cérébraux qui engendre les déclin cognitifs et la détérioration progressive des fonctions neuronales. Il a été suggéré que l'apoptose pouvait être l'un des principaux types de mort mis en jeu dans la perte étendue de neurones (Cotman et Su, 1996).

Différentes études ont mis en évidence une fragmentation de l'ADN au niveau des cellules du SNC chez des patients AD (Troncoso et al., 1996). Les caractéristiques morphologiques de l'apoptose ont également été documentées telles que les rétrécissements cellulaires, les pycnoses et les corps apoptotiques (Grasl-Kraupp et al., 1995).

Dans un modèle murin d'AD, il a été montré que l'apoptose était impliquée dans la mort neuronale hippocampique chez des souris de 22 mois doubles mutantes pour PS/APP (Chui et al., 1999). Les auteurs ont montré un clivage de la caspase-3, la fragmentation de l'ADN. La morphologie caractéristique de l'apoptose a également été identifiée par microscopie électronique (Yang et al., 2008).

Toutefois l'apoptose est un processus rapide et dispersé *in vivo*, donc difficile à visualiser. Par conséquent les preuves de l'implication de l'apoptose dans les neurodégénérescences observées dans l'AD restent insuffisantes.

Accidents vasculaires cérébraux ischémiques

Les lésions ischémiques cérébrales se développent selon une cascade complexe d'évènements évoluant dans le temps : l'excitotoxicité, l'inflammation et l'apoptose (Dirnagl et al., 1999) (Figure 28).

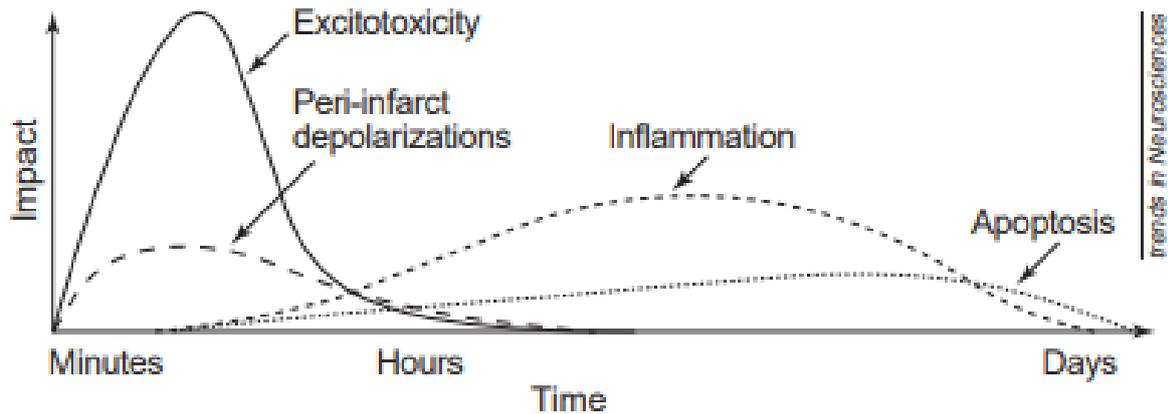


Figure 28 : Evolution temporelle des principaux phénomènes délétères lors de l'ischémie cérébrale (Dirnagl et al., 1999).

L'implication des caspases dans la mort neuronale d'origine ischémique a été mise en évidence par l'utilisation d'inhibiteurs de la caspase-3 en injection intracérébrovasculaire. L'injection a permis de réduire les volumes d'infarctus mais également les déficits neurologiques consécutifs à une ischémie focale transitoire chez le rat et la souris (Fink et al., 1998 ; Endres et al., 1998).

L'activation de la caspase-3 est observée à des temps précoces (dans les premières heures suivant la reperfusion ou l'occlusion) dans un modèle d'ischémie focale transitoire ou permanente (Namura et al., 1998 ; Guegan et Sola, 1999 ; Benchoua et al., 2001).

Par la suite différentes publications se sont intéressées à l'identification de la voie apoptotique (intrinsèque ou extrinsèque) impliquée dans l'ischémie cérébrale. En ce qui concerne la voie intrinsèque, des données ont montré une activation de la caspase-9 lors de l'ischémie cérébrale (Noshita et al., 2001 ; Cao et al., 2002 ; Hagberg et al., 2009). De plus, une augmentation de FasL et caspase-8 suggère également une activation de la voie extrinsèque (Jin et al., 2001 ; Benchoua et al., 2001).

Plus récemment des études ont cherché à développer une stratégie neuroprotectrice des AVC ischémique en ciblant les voies apoptotiques. L'utilisation intranasale d'un inhibiteur hautement spécifique de la caspase-9 a été observée comme neuroprotecteur dans un modèle d'occlusion de l'artère cérébrale moyenne chez le rat (Akpan et al., 2011).

5) Modèles *in vitro* d'apoptose cérébrale

L'apoptose peut être initiée par différents stimuli : absence des facteurs de croissance, agents génotoxiques, ligands des récepteurs de mort. Par la modulation de ces différents paramètres, des modèles *in vitro* d'apoptose ont été décrits.

a) Le modèle murin d'apoptose neuronale *in vitro* par sevrage en sera (SD)

Le modèle murin d'apoptose neuronale *in vitro* par sevrage en sera SD (*Serum Deprivation*) est un modèle mis au point par Liot et collaborateurs en 2004 dans l'équipe Phind U1237 (Liot et al., 2004). Il s'agit du modèle utilisé au cours de cette étude qui consiste à **sevrer en sera les neurones corticaux murins**. Il est subdivisé en plusieurs étapes (**Figure 29**).

1/ L'élaboration d'une culture pure de neurones corticaux murins.

2/ A sept jours *in vitro*, une dilution successive du milieu de culture avec un milieu sans sera permet le sevrage des neurones en facteurs de croissance. Les différents traitements testés sont ajoutés à cette étape du protocole ainsi qu'un inhibiteur du récepteur NMDA (N-Méthyl-D-Aspartate), le MK801. Le MK801, en bloquant le canal du récepteur NMDA, affranchit le modèle de toute possible mort nécrotique.

3/ Après vingt-quatre heures de SD, la mort neuronale est évaluée à l'aide du bleu de trypan. Une analyse protéique peut être également réalisée par immunoempreinte.

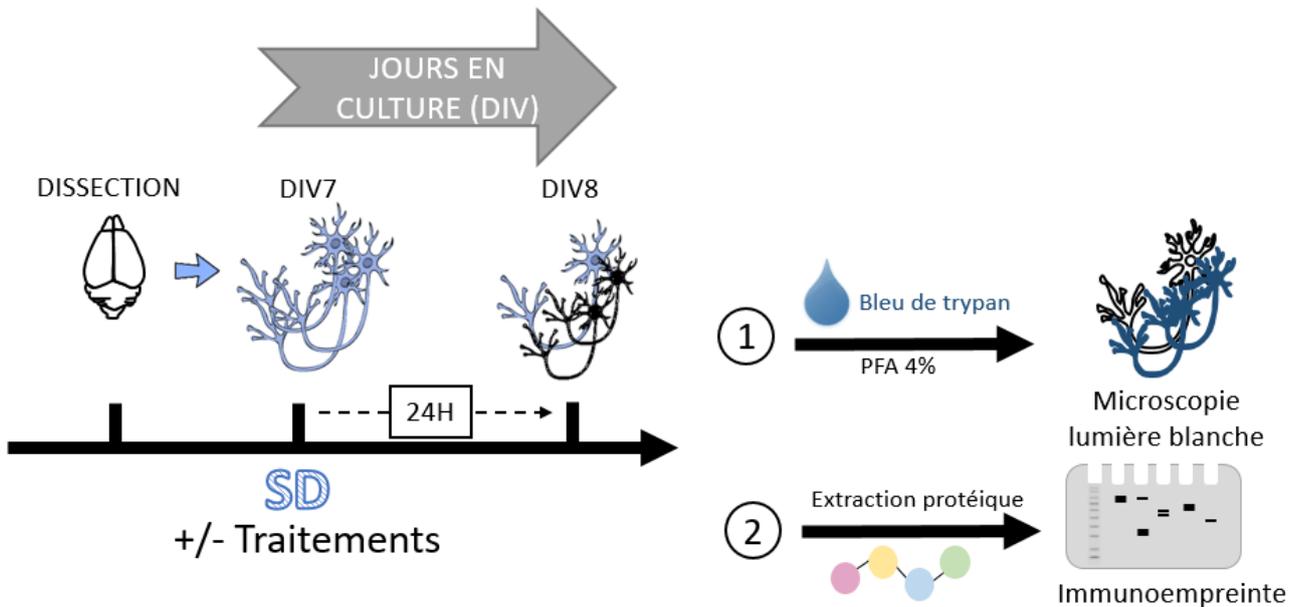


Figure 29 : Schématisation du protocole de sevrage en sera (SD, Serum Deprivation) (Protocole issu de Liot et al., 2006).

La **caractérisation du modèle** a été effectuée grâce à différentes approches (Liot et al., 2004 ; Liot et al., 2006).

- Test de la viabilité cellulaire par le **bleu de trypan**. Le bleu de trypan s'infiltré uniquement dans les cellules dont la membrane plasmique est perméable au colorant. Environ 50% des cellules meurent par apoptose dans le modèle SD. Le nombre de cellules bleues peut être quantifié manuellement à l'aide du logiciel Image J (**Figure 30A**).
- La fragmentation de l'ADN a été visualisée par le **DAPI et par électrophorèse** (**Figure 30B**).
- L'activité des caspases a été évaluée par immunoempreinte. Présence **des caspase-3, -8 et -9 clivées, protéases proapoptotique**, uniquement dans la condition SD sans sera (**Figure 30C**).

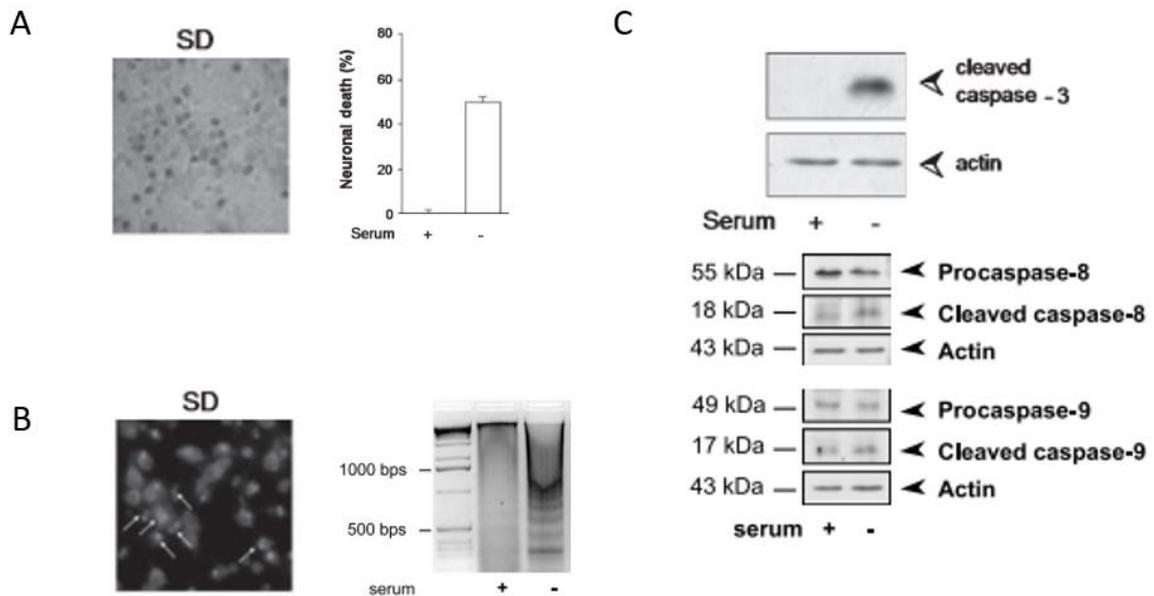


Figure 30 : Caractérisation du modèle de SD (Liot et al., 2004 ; Liot et al., 2006).

A. Photomicrographie de la viabilité cellulaire par bleu de trypan et quantification correspondante de la mort neuronale avec ou sans sevrage des neurones corticaux murins en sera (+/- SD) **B.** Fragmentation de l'ADN visualisée par DAPI (photomicrographie) et électrophorèse **C.** Analyse par immunoempreinte du clivage de la caspase-3 -8 et -9, protéase proapoptotique, sur des neurones corticaux murins sevrés ou non en sera pendant 24H (+/- SD). Comparaison des mêmes échantillons avec la protéine de référence actine.

A la suite de cette caractérisation, Liot et collaborateurs ont conclu que le modèle de SD résultait de l'activation des deux voies d'apoptose.

Une variante de ce modèle, appelée **TFD (Trophic Factor Deprivation)**, consiste à sevrer en facteurs trophiques les progéniteurs d'oligodendrocytes murins. Ce modèle a également été mis au point dans l'équipe Phind U1237 et génère 20% de mort des progéniteurs par la voie intrinsèque de l'apoptose (Correa et al., 2011). La viabilité cellulaire a été évaluée par la mesure d'activité de la **lactate déshydrogénase** dans le milieu, témoin de l'intégrité membranaire. La caractérisation du modèle a été effectuée par la technique de **TUNEL** et l'évaluation de l'expression des protéines de la **famille de Bcl-2** (Correa et al., 2011).

A noter que ces deux modèles utilisent des cellules en développement. Ainsi ces deux modèles peuvent être considérés comme des modèles *in vitro* d'apoptose développementale.

b) Autres modèles

Les cytokines pro-inflammatoires telles que le **TNF- α** et **FasL**, ligands des récepteurs de mort, peuvent initier la voie extrinsèque de l'apoptose (Schütze et al., 1998).

De plus **des agents chimiques** tels que le dexaméthasone, glucocorticoïde de synthèse, peuvent être également utilisés. Initialement utilisé comme anti-inflammatoire et immunosuppresseur, il a été montré comme initiant l'apoptose. Toutefois son mécanisme d'action reste pour l'heure inconnu (Yang et al., 2017).

L'ensemble des modèles *in vitro* dépendent de la durée, de la dose et du type cellulaire.

L' APOPTOSE



L'apoptose ou mort cellulaire programmée, est subdivisée en deux voies
1/ La **voie extrinsèque** initiée par les récepteurs de mort
2/ La **voie intrinsèque**, mitochondriale



Les critères définissant l'apoptose sont nombreux : fragmentation de l'ADN, activation des caspases, perte de l'intégrité de la membrane mitochondriale, exposition des PtdSer... Ces critères sont non-exclusifs et doivent donc être recoupés pour définir l'apoptose.



L'apoptose au niveau du système nerveux central intervient au cours du **développement** et **vieillissement** mais également au cours de certaines pathologies telles que la **maladie d'Alzheimer**, les **AVC** et la **SEP**.



Il a été mis au point un modèle d'apoptose neuronale dans le laboratoire Phind, **modèle SD** (*Serum Deprivation*) (Liot et al., 2004). Il permet d'initier l'apoptose en sevrant en sera les neurones corticaux murins.



OBJECTIFS

OBJECTIFS DE L'ETUDE

L'équipe Phind U1237 a caractérisé le rôle du tPA dans l'apoptose cérébrale. Le tPA joue un rôle anti-apoptotique dans un modèle murin d'apoptose neuronale et oligodendrocytaire (Liot et al., 2006 ; Correa et al., 2011). De plus, Correa et collaborateurs ont montré que cet effet anti-apoptotique était la résultante de la fixation du domaine *EGF-like* du tPA sur le récepteur EGF à la surface des neurones et des progéniteurs d'oligodendrocytes.

Le tPA présente 40% d'homologie structurale avec le FXII. Cette homologie concerne surtout les domaines *EGF-like* qu'ils ont en commun. Ainsi nous pouvons nous poser la question, **le FXII, comme le tPA, module-t-il l'apoptose cérébrale ?**

A l'heure actuelle, seuls les rôles du FXII dépendant de son domaine catalytique et de son domaine fibronectine de type 2 sont établis. L'expression du FXII dans le SNC reste peu claire. Göbel et collaborateurs ont montré une expression du FXII au niveau de la moelle épinière chez la souris. Toutefois l'immunohistochimie réalisée ne précise pas le type cellulaire impliqué (Göbel et al., 2016). Ainsi, nous pouvons nous poser la question, **le FXII est-il exprimé dans le cerveau ?**

Etude 1 : Rôle du Facteur XII sur l'apoptose neuronale

Cette première étude vise à étudier le rôle du FXII dans l'apoptose neuronale en répondant aux questions suivantes :

- La forme simple chaîne FXII joue-elle un rôle sur l'apoptose neuronale ?
- Les autres formes du FXII, la forme double chaîne α FXIIa et la forme tronquée β FXIIa, ont-elles un rôle sur l'apoptose neuronale ?
- Quel mécanisme est impliqué dans ces potentiels effets ?

Etude 2 : Expression du Facteur XII dans le système nerveux central

Cette seconde étude permet de répondre aux questions suivantes :

- Le FXII est-il exprimé dans le SNC ?
 - Quel(s) type(s) cellulaire(s) cérébral(aux) exprime(nt) le FXII ?
 - L'expression du FXII est-elle modulée au cours du développement et du vieillissement cérébral?
-
-

RESULTATS

ETUDE 1 : Rôle du Facteur XII dans l'apoptose neuronale

1) Avant-propos

a) Contexte de l'étude

L'activité catalytique de l' α FXIIa présente divers effets dans la circulation, allant de l'activation de la voie intrinsèque de coagulation à des rôles pro-inflammatoires par la production de BK (Cochrane et al., 1973). Le domaine Fibronectine de type 2 du FXII a été montré comme permettant son interaction avec le récepteur à l'uPA et ainsi promeut l'angiogénèse (Larusch et al., 2010). Suite à ces observations, les activités des domaines catalytiques et fibronectine de type 2 du FXII ont été établies comme délétères dans des pathologies du SNC. Le FXII augmente le volume de lésions suite à un modèle murin d'ischémie cérébrale (Kleinschnitz et al., 2006). Il stimule la génération de lymphocytes TH17 dans un modèle murin de SEP (Göbel et al., 2016). Il participe également au déclin cognitif dans un modèle murin d'AD (Chen et al., 2017). Néanmoins le rôle des autres domaines du FXII et notamment le rôle des domaines EGF-like du FXII n'a pas encore été identifié.

Le FXII est une sérine protéase présentant des homologies structurelles avec d'autres comme le tPA et notamment au niveau des domaines EGF-like qu'ils ont en commun (Stavrou et Schmaier, 2010). Contrairement au FXII, une expression et des rôles du tPA ont déjà été décrits dans le cerveau. Le tPA est exprimé par les neurones corticaux et promeut *in vitro* leur survie en diminuant leur apoptose *via* la fixation de son domaine EGF-like sur le récepteur EGF (Louessard et al., 2016 ; Correa et al., 2011).

b) Question posée

Le FXII, comme le tPA, influence-t-il l'apoptose neuronale ?

c) Méthodes

Le laboratoire Phind U1237 dispose d'un modèle d'apoptose neuronale. Il consiste à sevrer les neurones corticaux murins en développement. Dans ce travail nous avons étudié, dans ce modèle d'apoptose, l'influence du FXII et de sa forme active α FXIIa. Différentes approches pharmacologiques ont permis d'explorer la survie neuronale, l'expression protéique et les interactions protéine-protéine.

d) Principaux résultats

Cette étude a permis de mettre en évidence un rôle anti-apoptotique du FXII et de l' α FXIIa et le mécanisme impliqué.

- Le FXII et sa forme active α FXIIa se fixent et activent le récepteur EGF
- Le domaine catalytique actif de l' α FXIIa permet un clivage du pro-HGF et une activation du récepteur MET par l'HGF néoformé.
- La coopération EGFR/MET phosphoryle les protéines signalétiques Erk 1 et 2 (MAPK), ce qui entraîne une diminution de la protéine pro-apoptotique Bax et une augmentation de la protéine anti-apoptotique Bcl-2

- 2) Article Etude 1 – Coagulation Factor XII protects neurons from apoptosis by direct and indirect growth factor activity

Coagulation Factor XII protects neurons from apoptosis by a crosstalk between proteolytic and growth factor activities

Short title: Factor XII protects neurons from apoptosis

Eugénie Garnier¹, Carine Ali¹, Yannick Hommet¹, Tiziana Crepaldi^{2,3}, Paolo Comoglio², Denis Vivien^{1,4}, Sara Martinez de Lizarrondo^{1*} & Fabian Docagne^{1*#}

1. Normandie Univ, Unicaen, Inserm, Physiopathology and imaging of neurological disorders (PhIND), Caen, France.
2. Candiolo Cancer Institute FPO-IRCCS, Candiolo, Italy.
3. Department of Oncology, University of Torino Medical School, Candiolo, Italy
4. CHU Caen, Department of Clinical Research, CHU Caen Côte de Nacre, 14000 Caen, France.

* Sara Martinez de Lizarrondo and Fabian Docagne have contributed equally to this work.

Correspondence to Fabian Docagne, PhD. Inserm U1237, "Physiopathology and Imaging for Neurological Disorders (PhIND)". Centre Cyceron. BP5229. 14074 Caen Cedex, France. docagne@cyceron.fr, Phone: 0033.231.47.01.02, Fax: 33.231.47.02.22

This manuscript includes **4900 words** (including **179 words** in the **abstract**), **6 figures**, **3 supplementary figures** and **23 references**.

Key points:

1. Single and double-chain forms of FXII protect cultured neurons from apoptosis.
2. This anti-apoptotic effect of FXII is mediated by a crosstalk between its proteolytic and growth factor activities.

Abstract

Coagulation Factor XII (FXII) is a serine protease that participates in the intrinsic coagulation pathway. Several studies have shown a deleterious role for plasmatic FXII in cerebral ischemia and traumatic brain injury by promoting thrombo-inflammation. Nevertheless, the direct impact of FXII on neuronal cell fate remains unknown. Here, we found that single-chain FXII protects cultured neurons from apoptosis through a growth factor-like effect. This mechanism was triggered by direct interaction with epidermal growth factor (EGF) receptor, activation of this receptor and engagement of anti-apoptotic intracellular pathways. Interestingly, the “proteolytically” active and two-chain form of FXII, α FXIIa, exerted additional protective effects by converting the pro-form of hepatocyte growth factor (HGF) into its mature form, which in turn activated HGF receptor (HGFR/c-Met) pathway. Lastly, the use of non-proteolytic FXII (α FXIIa-PPACK) unveiled an alternative EGFR and HGFR co-activation pathway, through co-receptor transphosphorylation. This study describes novel mechanisms of action of FXII and discloses neurons as target cells for the protective effects of single and double-chain forms of FXII. Overall, it contributes to underline the interrelations between growth factors and blood serine proteases.

Introduction

Factor XII (FXII), also known as Hageman Factor, is a 80 kDa serine protease (EC 3.4.21.38) with various effects in the circulation, ranging from activation of the phase contact (“intrinsic”) coagulation pathway to pro-inflammatory actions [1]. FXII is primarily produced as a single-chain enzyme (“zymogen”), secondarily activated to its two-chain form α FXIIa by plasma Kallikrein or by auto-activation when bound to some biological or artificial surfaces [2]. Although most of the reported actions of FXII are due to the proteolytic activity of its active form α FXIIa, proteolytic and non-proteolytic actions of the zymogen FXII have also been reported [3,4,5]. Several receptors, including uPAR and Epidermal Growth Factor (EGF) receptor (EGFR) [3,4,6] have been suggested to mediate these non-proteolytic effects.

Chymotrypsin-like serine proteases form a family of multi-domain proteins with mosaic structures. In addition to similarities in their trypsin like protease domains, these proteins share non-proteolytic domains such as Kringle or EGF-like domains. These structural similarities suggest that, beyond their common protease activity, serine proteases can share similarities in their non-proteolytic actions. In particular, the domain composition of the serine protease tissue-type plasminogen activator (tPA), is very similar to that of FXII: tPA displays two kringle domains and one EGF-like domain, while FXII displays one Kringle domain and two EGF-like domains. In earlier studies, we have shown that tPA, by the virtue of its EGF-like domain, induces anti-apoptotic effects in oligodendrocytes and neurons by binding to EGF receptor (EGFR) [7,8]. In light of the foregoing, we hypothesized that Factor XII could promote anti-apoptotic effects in neurons by non-proteolytic actions.

Apoptosis of neurons is considered to play a significant role in several neurovascular disorders including stroke, Alzheimer's disease, Parkinson's disease, Huntington's disease, or amyotrophic lateral sclerosis [9,10,11]. In those pathological conditions,

apoptosis can result from oxidative stress, exposure to pro-apoptotic factors such as apoptosis stimulating fragment (Fas) or tumor necrosis factor (TNF), or starvation from trophic factors [7]. This latter condition can be mimicked *in vitro* by removing trophic support from cultured neurons in a classical paradigm termed serum deprivation (SD) [8].

Here, we report that FXII rescues cultured neurons from apoptosis by non-protease actions involving the direct binding to EGFR and subsequent activation of the Erk1/2 intracellular pathway. Pharmacological inhibition of Erk 1/2 phosphorylation quenches the FXII-mediated protection. In addition, we observe that α FXIIa also promotes indirect trophic effects: it converts the pro-form of hepatocyte growth factor (HGF) to its mature form, which in turn protects neurons from apoptosis. Together, these data indicate that both forms of FXII promote survival of neurons by a crosstalk between its proteolytic and non-proteolytic effects.

Materials and methods

Materials

FXII, α FXIIa and Corn trypsin inhibitor (CTI) were obtained from Enzyme Research Laboratories. EGF receptor kinase inhibitor (AG1478) and NMDA inhibitor (MK801) were obtained from Tocris Bioscience. FXII chromogenic substrate (S-2302) was obtained from Werfen. Rabbit anti-pErk1/2 (#9102), anti-Erk1/2 (#9101) and anti-EGFR (#4267) antibodies were purchased from Cell Signaling. Anti-HGF (SBF5) antibody and recombinant mature HGF (PHG0254) were obtained from Invitrogen. Blocking anti-HGF (sc1356) and Anti-pMET (sc101736) antibodies were obtained from Santacruz. Anti-Actin (A2066), Anti-Bax (sc7480) and anti-Bcl-2 (sc7382) antibodies were purchased from Sigma. PPACK (H-D-Pro-Phe-Arg-Chloromethylketone trifluoroacetate salt) was obtained from Bachem. The biotinylation kit, EZ-link® Sulfo-NHS-LC-Biotinylation kit was purchased from Thermo Scientific. Anti-uPAR (MAB531) antibody was obtained from R&D Systems. Erk Inhibitor (SCH772984) was obtained from Selleckchem. Recombinant human HGF Propeptide (proHGF, 7057-HG-010) and anti-MET total antibody (AF527) were obtained from R&D Systems. JNJ-38877605 was kindly provided by Janssen Pharmaceutica..

Primary murine neuronal cortical cultures

Murine neuronal cultures were prepared as previously described in Liot et al [8]. Neuronal cortical cultures were obtained from fetal mice at E15–E16. Cortices were dissociated and plated on 24-well plates coated with poly-D-lysine (0.1 mg/mL) and laminin (0.02 mg/mL). Cells were cultured in DMEM supplemented with 2 mM glutamine, 5% horse serum and 5% fetal bovine serum. Cultures were maintained at 37°C in a humidified 5% CO₂ atmosphere. Cytosine β -D-arabinoside (10 μ M) was

added after 3 days *in vitro* (DIV) to inhibit non-neuronal proliferation. All experiments were performed at DIV7.

Serum deprivation-induced apoptosis model

Serum deprivation (SD) was induced by the exposure of neuronal cultures (DIV7) to a serum-free DMEM and characterized as previously described[9]. Controls were maintained in serum-containing medium. MK801 (1 μ M) was added to prevent secondary NMDA receptor activation. Cells were treated with FXII, α FXIIa or α FXIIa-PPACK. Inhibitors were added simultaneously to treatment (unless otherwise stated in the text). Before fixation on 4% paraformaldehyde, cells were stained with 0.4% trypan blue for 15 min after 24 h of SD. Neuronal cell injury was quantified by counting trypan blue positive cells in four random fields per well. The percentage of neuronal death was determined as the number of trypan blue positive neurons after SD compared with the total neuron number. The mean values of trypan blue positive neurons in sham washed control conditions were subtracted from experimental values to yield the specific effect of the tested conditions.

Western Blot

After solubilization in a lysis buffer (50 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, 0.5% Triton X-100) containing protease and phosphatase inhibitor cocktails (1/100), cell lysates were centrifuged for 20 min at 12 000 g and supernatants were harvested. Protein concentrations were calculated by using the BCA Protein Assay Reagent (#23225 Pierce, Rockford, IL, USA). Protein samples (20 μ g) were separated by using a sodium dodecyl sulfate–polyacrylamide gel electrophoresis and transferred into a polyvinylidene difluoride membrane. Membranes were blocked for 2h in Tween 20-Tris Base

Solution with 1% BSA and incubated overnight at 4°C with the specific primary antibody at the following concentrations: for anti-Bax and anti-Bcl-2 at a dilution of 1/200; anti- α EGFR, anti-pErk, anti-Erk total and anti-Actin at 1/1000; anti-MET total and anti- α HGF at 1/500; anti-pMET at 1/250. After washes and 1h of incubation with the corresponding peroxidase secondary antibody, proteins were revealed with a chemiluminescence ECL select immunoblotting detection system (GE).

EGFR crossed Immunoprecipitation assays

Biotinylated FXII and α FXIIa (Biot-FXII and Biot- α FXIIa respectively) were produced following manufacture's kit (EZ-link® Sulfo-NHS-LC-Biotinylation). After treatment during 24h with 125nM of Biot-FXII and Biot- α FXIIa, lysed cultured cortical neurons (DIV 7) (100 μ g of total protein) were incubated overnight at 4 °C with an antibody anti-EGFR (6 μ g, Cell Signaling, #4267) and then coupled to protein G–Sepharose. Then, immunoprecipitated proteins were separated by 7.5% SDS-PAGE, and immunoblots were revealed with Extravidin peroxidase (1/2000) [7].

α FXIIa-PPACK generation

To inhibit completely α FXIIa proteolytic's activity, 250 nM of α FXIIa was incubated with PPACK (H-D-phe-pro-arg-chloromethylketone; 1000 nM) for 30 minutes at room temperature in HEPES-buffer (25 mM HEPES, pH=7.4, 150 mM NaCl, 1 mg/ml BSA). After incubation, free PPACK was extensively dialyzed. We then used FXII chromogenic substrate s-2302 to confirm the complete blockade of α FXIIa-PPACK proteolytic activity.

FXII auto-activation at the surface of neurons

Serum deprivation (SD) was induced in a time dependent-manner (1h, 3h, 6h and 24h) with 125 nM of single-chain FXII. Then, the supernatants were collected. The conversion of FXII into the two-chain form was determined using FXII chromogenic substrate s-2302.

Statistical analysis

All results are expressed as mean \pm SEM. For *in vitro* experiments, the n value corresponds to n different well pools derived from independent dissections. For group comparison, Kruskal-Wallis tests were used followed by Mann–Whitney U-tests as post-hoc tests.

Results

FXII induced anti-apoptotic effects on neurons by activating EGFR and subsequent signaling pathways

Our first approach was to test the effect of single-chain FXII in cortical neurons subjected to serum deprivation (SD), a paradigm that has been classically used to model apoptosis. We observed that FXII exerted a dose-dependent anti-apoptotic effect on cortical neurons (**Figure 1**). Our hypothesis to explain this effect was that FXII, as previously reported for tPA [7,8], could act, at least in part, via binding to EGFR and activating this receptor. To address this question, we treated cortical neurons with biotinylated FXII, extracted the proteins and subjected them to immunoprecipitation (IP) using an anti-EGFR antibody (**Figure 2A**). We detected biotinylated FXII among the EGFR-immunoprecipitated proteins as a ~80kDa band revealed by peroxidase-coupled avidin (**Figure 2A**), at the same molecular weight as biotinylated FXII ran in parallel. This protein was absent in untreated cells (control). In parallel, the above immunoprecipitated material showed a band at approximately 175 kDa corresponding to EGFR, when revealed with anti-EGFR antibodies (**Figure 2A**). These data show that FXII and EGFR are part of a same protein complex in FXII-treated neurons.

Then, we asked whether the interaction of FXII with EGFR, and the subsequent activation of this receptor could be responsible for the anti-apoptotic effect of FXII on neurons. In line with this hypothesis, the inhibitor of EGF receptor kinase, AG1478 (5 μ M), reversed the effect of FXII on neurons during SD in a dose-dependent manner, while it showed no effect when applied alone (**Figure 2B**).

EGFR activation can trigger several signaling cascades, including mitogen-activated protein kinase/extracellular regulated kinase (MAPK/Erk). Moreover, Tyr1068 in EGFR, the residue phosphorylated upon FXII treatment, is involved in the transduction

of EGF signal through Erk pathway [12]. Here, we observed that single-chain FXII (125 nM) induced the rapid (within 5 minutes) and transient (<1h) phosphorylation of Erk1/2 (**Figure 3A**). In accordance with these results, the pre-treatment with MEK/Erk ½ inhibitor (SCH7772984, 5 µM) reversed the anti-apoptotic effect of FXII (**Figure 3B**). Together, these data show that the activation of EGFR by FXII triggers Erk activation, and that this pathway actively participates in the anti-apoptotic effects of FXII in neurons.

Apoptosis is regulated by a balance between pro- and anti-apoptotic factors that control downstream protease activity of effector caspases and subsequent cell death. Here, we studied whether the pro-apoptotic factor Bax and the anti-apoptotic factor Bcl-2 are regulated by FXII during SD. We observed that after 24h of SD, as compared to 1h, treatment with FXII (125 nM) significantly decreased Bax expression, while it induced the up-regulation of Bcl-2 (**Figure 3C**), thus reducing the ratio between pro- and anti-apoptotic factors. These data show that single-chain FXII triggers anti-apoptotic pathways in neurons subjected to SD.

FXII promotes HGF maturation, leading to HGFR-mediated anti-apoptotic effects

FXII can be activated from a single-chain form (FXII) to a more proteolytically active two-chain form (α FXIIa) [5] (**Figure 4a**). Our next step was to investigate if α FXIIa showed the same anti-apoptotic effects than its single chain form, FXII. When applied to cortical neurons during SD, α FXIIa exerted an anti-apoptotic effect, although at slightly higher doses than FXII (**Figure 4B**). Noteworthy, in contrast to what observed for FXII, the anti-apoptotic effect of α FXIIa was not completely reversed by the inhibitor of EGFR activation alone, AG1478 at 5 nM (**Figure 4C**). Moreover, we observed that proteolytically inactive α FXIIa (α FXIIa-PPACK) still retain an antiapoptotic capacity

(Supplemental Figure 1A). Thus, we wanted to study if α FXIIa also acts via binding to EGFR. We repeated the immunoprecipitation studies with biotinylated α FXIIa, confirming that we detected biotinylated α FXIIa among the EGFR-immunoprecipitated proteins as a ~50kDa band revealed by peroxidase-coupled avidin **(Figure 4D)**, at the same molecular weight as biotinylated α FXIIa ran in parallel. These data show that α FXIIa and EGFR are part of a same protein complex in α FXIIa-treated neurons. Interestingly, the blockade of EGFR alone by AG1478 is not sufficient to block α FXIIa. Because α FXIIa differs from FXII by its proteolytic activity, we wondered whether this activity could be involved in its anti-apoptotic function. To address this question, we co-treated neurons subjected to SD with α FXIIa and Corn Trypsin Inhibitor (CTI) an inhibitor of its proteolytic activity. CTI reversed the antiapoptotic effect of α FXIIa when applied at the dose of 10 μ M, but not at 4 μ M **(Figure 4E)**. Interestingly, although neither AG1478 nor CTI (4 μ M) interfered with the anti-apoptotic action of α FXIIa when added alone, the combination of both partially reverted the protection by α FXIIa **(Figure 4F)**. Together, these results suggest that α FXIIa exerts anti-apoptotic effects on neurons by a combination of proteolytic and non-proteolytic (“growth factor-like”) effects.

The proteolytic activity of α FXIIa is known, among other actions, to induce the activation of hepatocyte growth factor (HGF) from its pro-form to its active form [13], which in turn can activate its receptor, HGFR (also known as c-Met). We thus hypothesized that the effect of α FXIIa could be mediated by the proteolytic activation of HGF and a subsequent stimulation of HGFR. When we co-treated neurons subjected to SD with α FXIIa and sc1356, a blocking antibody of HGF [14], the anti-apoptotic effect of α FXIIa was completely reversed **(Figure 5A)**. The same result was obtained when using JNJ, an inhibitor of HGFR phosphorylation **(Figure 5B)**. These

data show that α FXIIa triggers the activation of HGF, which in turn acts on HGFR to provide anti-apoptotic effects in neurons.

FXII activation into α FXIIa can occur either by the action of proteases [1], or by surface-mediated auto-activation in certain conditions [1,2]. Thus, we wanted to study whether FXII could be auto-activated at the surface of neurons. By the use of a chromogenic substrate specific for α FXIIa activity, we observed that FXII underwent activation into its two-chain form at the surface of neurons (**Figure 6A**) and not in the absence of cells. Considering the protective effect of α FXIIa described above (**Figure 5**), we hypothesized that protease-mediated mechanisms could also be involved in FXII anti-apoptotic effects. Indeed, the anti-apoptotic effect of FXII was also reversed by CTI (**Figure 6B**). Furthermore, in purified conditions, incubation of proHGF with either FXII or α FXIIa led to an increase in the amount of mature HGF (**Supplemental Figure 2**). That may account in our conditions for an increased activation of pro-HGF in mature HGF by the protease activity which comes up from the activation of FXII into its protease-active form (**Figure 6A**). As previously observed with α FXIIa, FXII effects were also reversed by JNJ (**Figure 6C**) and sc1356 (**Figure 6D**). Finally, incubation of neurons with FXII led to phosphorylation of HGFR (**Figure 6F**), which reflects its activation. These data indicate that FXII can protect from apoptosis by protease-mediated, HGF-mediated effects, in addition to its protease-independent, EGFR mediated effects (**Figure 2-3**). In accordance with this, we observed that proteolytically-inactive PPACK- α FXIIa showed a residual, protease-independent, anti-apoptotic effect (**Supplemental Figure 1A**) reversed by AG1478 (**Supplemental Figure 1B**). Interestingly enough, this anti-apoptotic effect was also blocked by JNJ, showing that HGFR pathway is activated (**Supplemental Figure 1C**). We hypothesized that EGFR and HGFR could be active via a co-receptor crosstalk. To

test if EGFR could transphosphorylate and activate HGFR independently of mature HGF generation, as reported previously, we added sc1356 at 100 mg/mL to block a putative interaction between HGFR and an extracellular ligand. The EGFR-dependent anti-apoptotic effect of α FXIIa-PPACK was not reversed when blocking the binding of HGF to HGFR (**Supplemental Figure 1D**), whereas – as described above - it was reversed when the phosphorylation of HGFR was blocked using JNJ. These results support the transphosphorylation of HGFR by the activation of EGFR by FXII. Finally, since it has been shown FXII activates EGFR signaling through uPAR [4] we also tested this hypothesis using a uPAR blocking antibody. Nevertheless, FXII antiapoptotic effect seems independent of uPAR activation in this context (**Supplemental Figure 3**).

Discussion

This study describes the anti-apoptotic effects of FXII against SD-induced apoptosis in neurons. We report that this effect is due to a combination of direct “growth factor-like” effects via the EGFR and proteolytic effects via the activation of the HGF/HGFR pathway. Interestingly enough, we also observed a crosstalk between EGFR and HGFR in the absence of HGF maturation.

We propose a model in which FXII can induce part of its effects via the direct binding to EGFR, the subsequent activation of this receptor, the triggering of Erk pathways and the modulation of Bcl-2/Bax balance towards anti-apoptotic effects in neurons. In parallel, FXII can be activated to its two-chain, proteolytically active form α FXIIa which in turn activates proHGF into mature HGF. Mature HGF can then activate its receptor HGFR to induce additional anti-apoptotic effects.

This is the first description that FXII, in addition to its largely described effects in thrombosis and inflammation, can induce anti-apoptotic effects on neurons. It

complements the previous reports on anti-apoptotic effects of the structurally related serine protease tPA on neurons [8] and oligodendrocytes [7]. While non-proteolytic, growth factor-like effects were reported before for tPA in neurons [15], the present work is the first one to show such effects for FXII in neurons. The presence of EGF-like domains in both proteins (one in tPA, two in FXII) could explain why both proteins can induce these similar trophic effects by directly binding to EGFR and activating it.

We report here that FXII activates MAPK/Erk pathway in neurons by a growth-factor like effect, which corroborates previous studies in endothelial cells [4] and aortic smooth muscle cells [16]. In line with this, tPA, via EGFR activation, activates Bcl2 and inhibits Bax [7], similarly to what reported here for FXII. Together, these studies seem to indicate that growth factor-like activity of serine proteases such as FXII and tPA trigger in neurons the same anti-apoptotic pathways than genuine growth factors.

In addition to this direct growth factor-like effect due to binding to EGFR, we report that FXII, in its proteolytic form α FXIIa, induces additional indirect growth-factor like effects by promoting the maturation of HGF, which in turn activates its receptor, HGFR. HGF is linked to the blood coagulation and fibrinolytic system not only structurally but also functionally. In fact HGF is similar to plasminogen, contains four kringle domains and a serine protease homology domain that lacks proteolytic activity [17]. It stimulates migration and survival of endothelial cells to repair blood vessels [18]. Thus, It is rational that blood coagulation system triggers activation of a growth factor that promotes angiogenesis. Here, we provide fresh knowledge on proteolytic action of FXII on HGF/HGFR leading to neuroprotection against cell death. Similar indirect trophic effects were reported before for tPA, although in a different context: by activating plasmin, tPA can convert heparin-bound EGF into free EGF, leading to subsequent EGF signaling.

Surprisingly, we observe that even in the absence of HGF maturation, HGFR pathway can be activated by EGFR transphosphorylation. This crosstalk between EGFR and HGFR has been reported previously in cancer cell survival pathways. However, is the first time to our knowledge to be addressed in neurons under apoptotic conditions [19,20].

Overall, these aforementioned works suggest that serine proteases with growth factor-like domains could in specific conditions substitute trophic molecules such as cytokines or growth factors to promote survival of brain cells. In addition to tPA and FXII, several other serine proteases contain growth-factor like domain, such as urokinase or HGF activator (HGFA) [21]. The conservation of these domains in several of these mosaic proteins is intriguing on an evolutionary point of view. Some of the functions of these proteases are redundant, while others are specific, which may explain their maintenance over evolution. Strikingly, these different studies point out the fact that serine protease such as tPA or FXII, and growth factors such as EGF or HGF are redundant and pleiotropic actors which take part in interrelated networks, in which serine proteases can facilitate growth factor maturation and activate their receptors to induce trophic effects.

FXII has been referred to as a “mysterious” protease, and the question of the real function of FXII has even been asked [22]. In addition to the two major physiological functions attributed to FXII -maintenance of thrombus stability and regulation of vascular permeability- its anti-apoptotic action should emerge as an important function and may help explaining the evolutionary maintenance of this protease.

The present study should inspire further works concerning the effects of FXII on neuronal death in *in vivo* models of brain injury. First of all, a thorough description of FXII expression in brain cells is still lacking and should be the purpose of further studies

using appropriate and reliable tools. Considering that it exerts common mechanisms of action with tPA, FXII may induce protective effects in models where tPA has already been shown to do so. Indeed, the growth factor-like effects of tPA (produced by brain cells or exogenously administered) have been shown to induce protection to brain cells in several *in vivo* animal models of brain injury [7,15,23,24] independently of its effect in the circulation. Several studies in animal models of brain diseases have reported deleterious effects of FXII [25,26,27,28]. Noteworthy, these deleterious effects are attributed to pro-thrombotic or pro-inflammatory effects of FXII. The protective effects of FXII described here may have been masked in those conditions. Nevertheless, is important to note that the doses used in this study are well below the plasma concentrations of FXII (12.5 nM to 125 nM in the present study, versus 375 nM in plasma) [29]. Thus, in case of blood brain barrier leakage, the deleterious effects of FXII observed in different brain models could be modulated by its beneficial effects. Besides, the FXII benefits may be unveiled in models where the impact of apoptosis is superior to those of thrombosis or inflammation. These studies should thus help further understanding how FXII acts in brain diseases as a unique serine-protease at the interface of thrombosis, inflammation and cell survival.

Acknowledgments: We authors thank Elodie Hedou for her help in pro-HGF conversion experiments.

Funding: This work was supported by the "Institut National de la Santé Et de la Recherche Médicale" (INSERM) and the "Etablissement Français du Sang" (EFS). T.C. and P.C were supported by FISM Onlus-"Fondazione Italiana Sclerosi Multipla".

Authorship contributions: E.G. performed experiments, analyzed the data and participated in manuscript redaction, C.A, Y.H., T.C, P.C. and D.V. participated in data acquisition, provided reagents and critically reviewed the manuscript, D.V and F.D secured funding of the study, S.M.D.L. and F.D. designed the study, analyzed the data and wrote the manuscript.

Conflict of Interest Disclosures: The authors have nothing to disclose.

Figure and Figure Legends

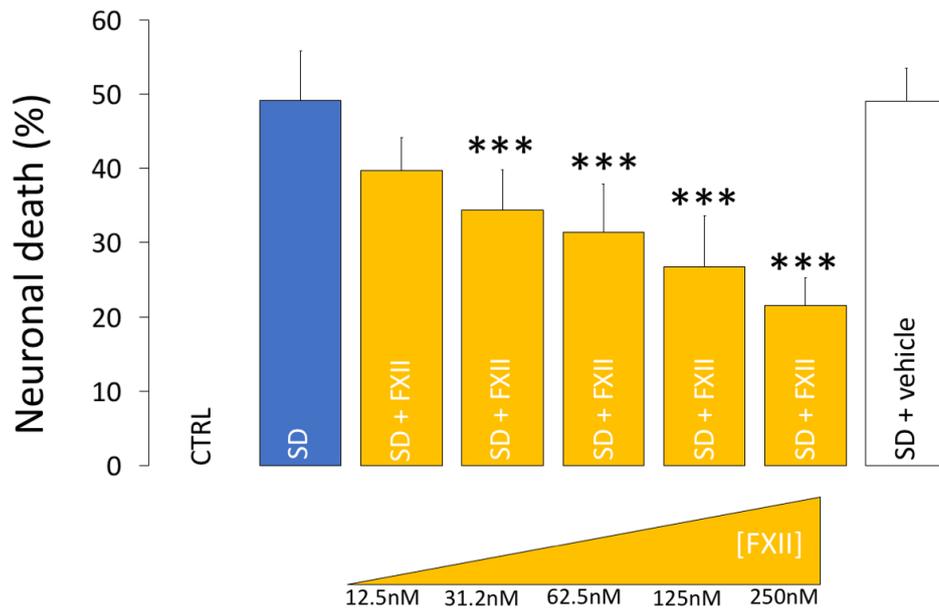


Figure 1. Factor XII (FXII) rescues neurons from serum deprivation-induced apoptosis. Quantification of neuronal death following 24h of serum deprivation (SD) alone or in the presence of recombinant FXII (12,5–250 nM). Error bars represent the mean \pm SEM. Symbols indicate significantly different from serum deprivation by Mann Whitney (*** $p < 0.001$, $n = 28$ from 7 different experiments). CTRL: control.

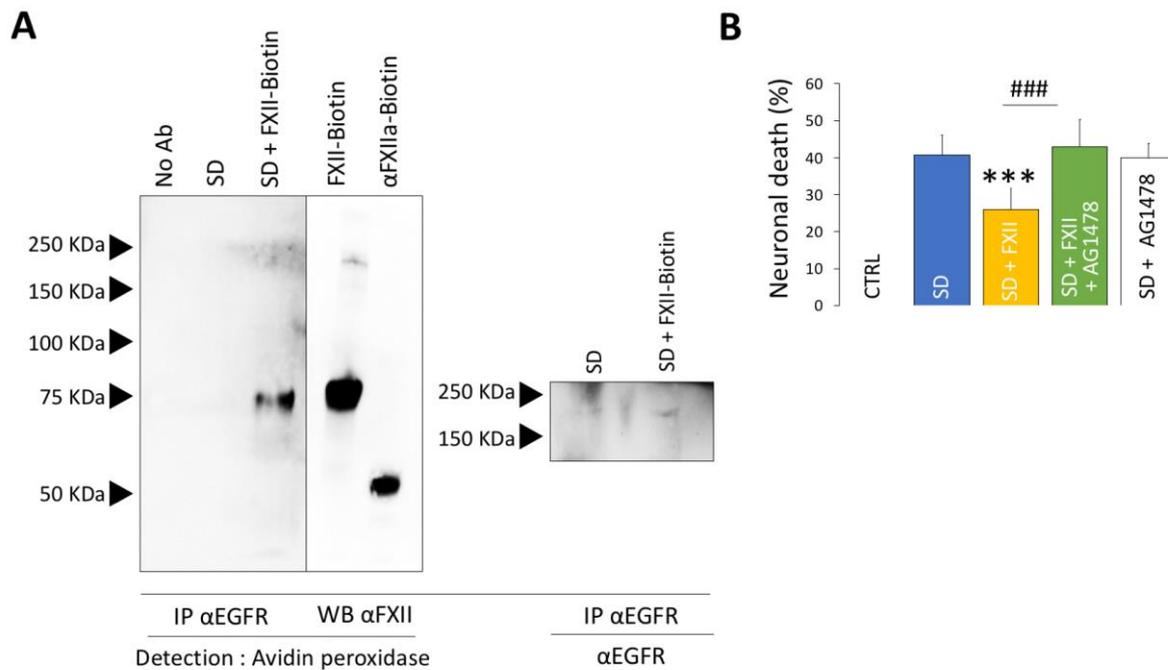


Figure 2. FXII interacts with and activates Epithelial Growth Factor Receptor (EGFR) to mediate its antiapoptotic effects in neurons. (A) 100 μ g of total proteins from lysates of untreated (SD) or biotinylated FXII (Biotin-FXII)-treated mouse neurons (125nM) or purified Biotin-FXII were subjected to immunoprecipitation (IP) using α -EGFR antibody followed by detection with either peroxidase-coupled avidin or with α -EGFR. As a control, the same procedure was performed by omitting the α -EGFR (No Ab). Factor XII and alpha-Factor XIIa are indicated as FXII or α FXIIa, respectively. Representative images of immunoblots from three individual experiments are presented. Numbers indicate molecular mass of standard proteins in kilodaltons (KDa). (B) Quantification of neuronal death following 24h of either SD alone (blue) or SD in the presence of 125 nM FXII (yellow) with or without 5 μ M of the EGFR kinase inhibitor, AG1487 (green; mean \pm SEM; n = 16 in 4 different experiments). *** and ###, p < 0.001 significantly different from SD and FXII respectively. CTRL: control.

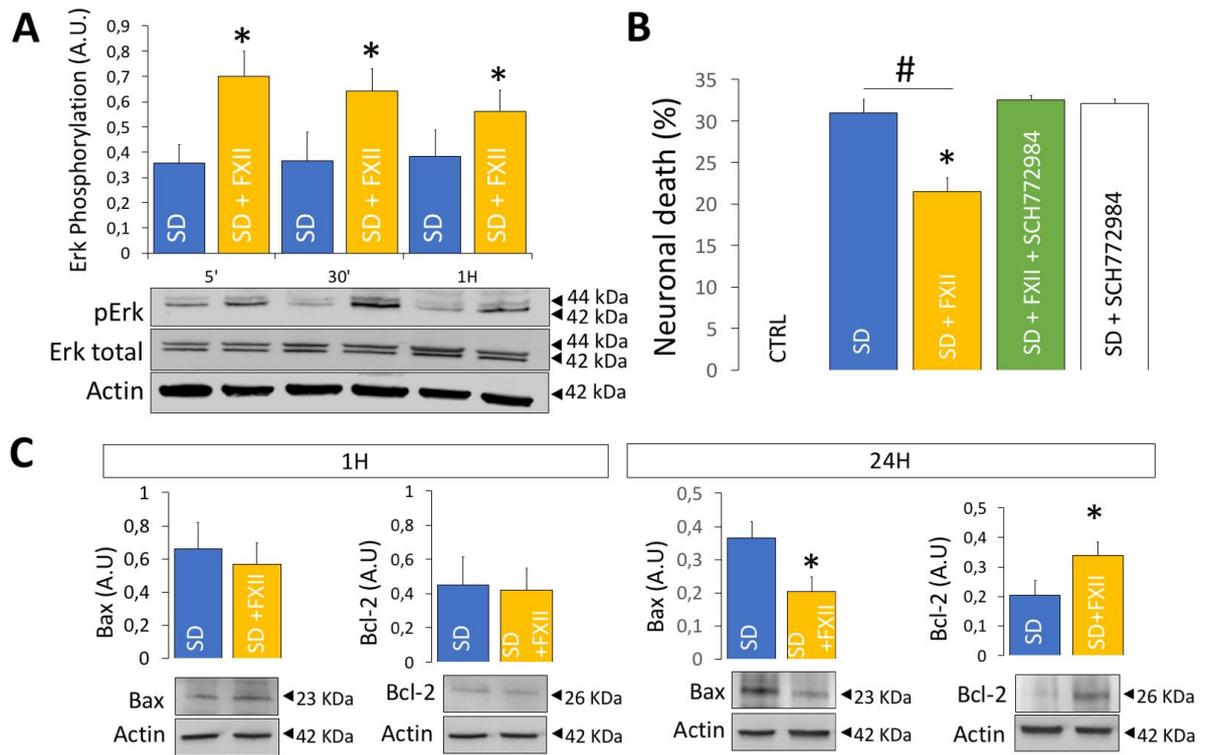


Figure 3. Antiapoptotic effect of FXII implicates activation of Erk1/2 intracellular pathway and targets antiapoptotic pathways. (A) Immunodetection of total and phosphorylated Erk1/2 forms (denoted with a prefix, tot and p respectively) in 20 μ g of total proteins from lysates of neurons subjected to SD in the presence of 125 nM FXII after 5', 30' and 1h of incubation. Actin was used as a loading control. Total forms of Erk1/2 was used as a control. Representative images of four independent experiments are presented. *, $p < 0,05$ significantly different from corresponding SD. (B) Quantification of neuronal death following 24 h of either SD alone or SD in the presence of 125 nM FXII (yellow) with or without 5 μ M Erk1/2 inhibitor, SCH772984 (green; mean \pm SEM; $n = 16$ in 4 different experiments). *, $p < 0,05$ and #, $p < 0,05$ significantly different from SD. (C) Immunodetection of Bax and Bcl-2 in 20 μ g of total proteins from lysates of neurons subjected to SD in the presence of 125 nM FXII at different times (1h and 24h). Representative images from three individual experiments are presented. Actin was used as loading control.

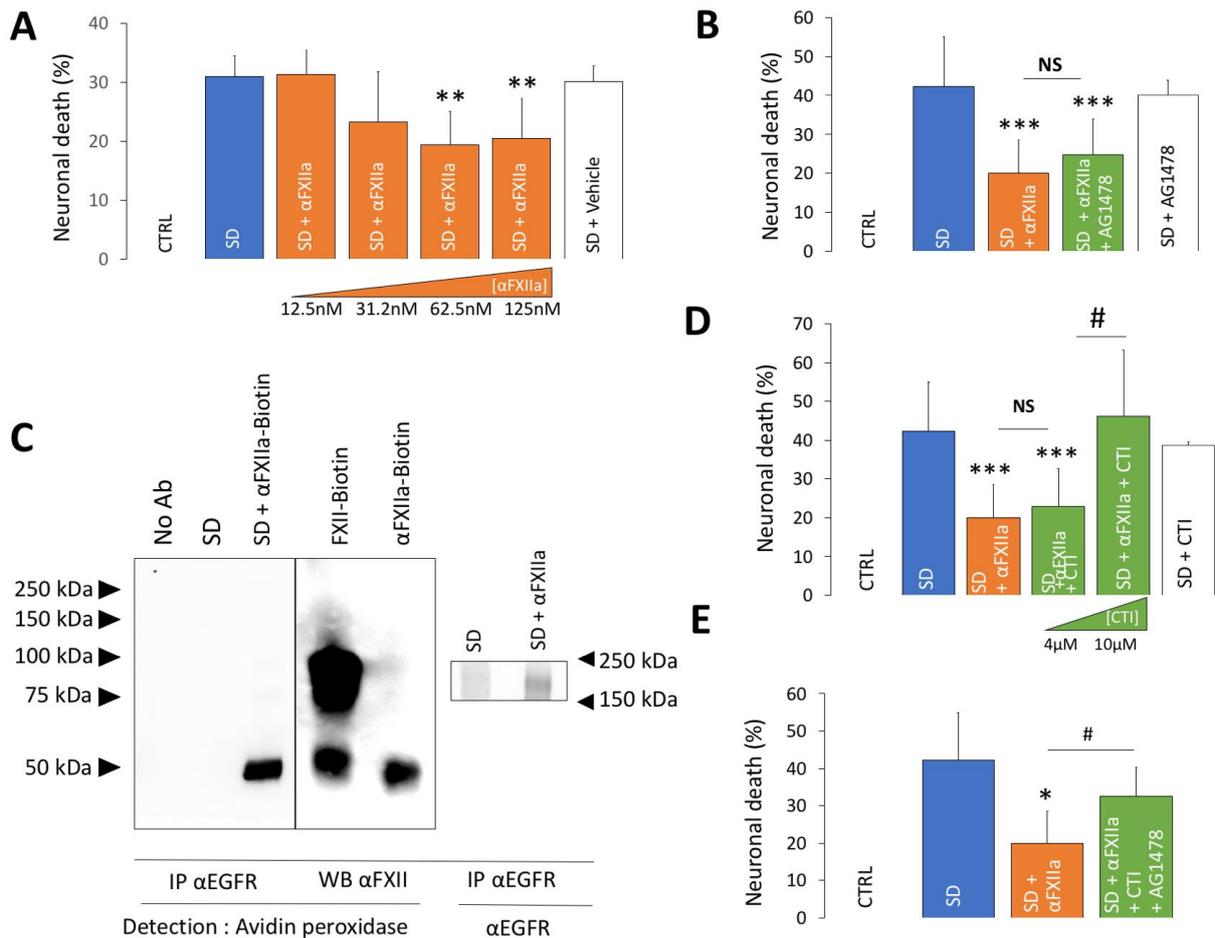


Figure 4. Active alpha-Factor XII (α FXIIa) rescues neurons from serum deprivation-induced apoptosis, but the mechanism is only partially dependent on EGFR activation. (A) Quantification of neuronal death following 24h of either SD alone or SD in the presence of recombinant α FXIIa (12,5–125 nM). Error bars represent the mean \pm SEM. Symbols indicate significantly different from SD by Mann Whitney (** $p < 0.01$, $n = 16$ in 4 different experiments). (B) Quantification of neuronal death following 24h of either SD alone or SD in the presence of 125 nM α FXIIa (orange) with or without 5 μ M EGFR kinase inhibitor, AG1478 (green; mean + SEM; $n = 16$ in 4 different experiments). ***, $p < 0,001$ and no significantly different from SD and α FXIIa respectively. (C) 100 μ g of total proteins from lysates of untreated (SD) or biotinylated α FXIIa (Biot- α FXIIa)-treated mouse neurons (125nM) or purified Biot- α FXIIa were subjected to immunoprecipitation (IP) using α -EGFR antibody followed by detection with either peroxidase-coupled avidin or with α EGFR. As a control, the same procedure was performed by omitting the α -EGFR (No Ab). Factor XII and alpha-Factor XII are indicated as FXII or α -FXIIa, respectively. Representative images of immunoblots from three individual experiments are presented. Numbers indicate molecular mass of standard

proteins in kilodaltons. (D) Quantification of neuronal death following 24h of either SD alone or SD in the presence of 125 nM α FXIIa (orange) with or without 4 or 10 μ M FXIIa inhibitor, Corn trypsin inhibitor, CTI (green; mean + SEM; n = 16 in 4 different experiments). ***, p < 0,001 and #, p < 0.05 significantly different from SD and α FXIIa respectively. (E) Quantification of neuronal death following 24h of either SD alone or SD in the presence of 125 nM α FXIIa (orange) with or without 4 μ M CTI and 5 μ M AG1478 (green; mean + SEM; n = 16 in 4 different experiments). *, p < 0,05 and #, p < 0.05 significantly different from SD and α FXIIa respectively. CTRL: Control.

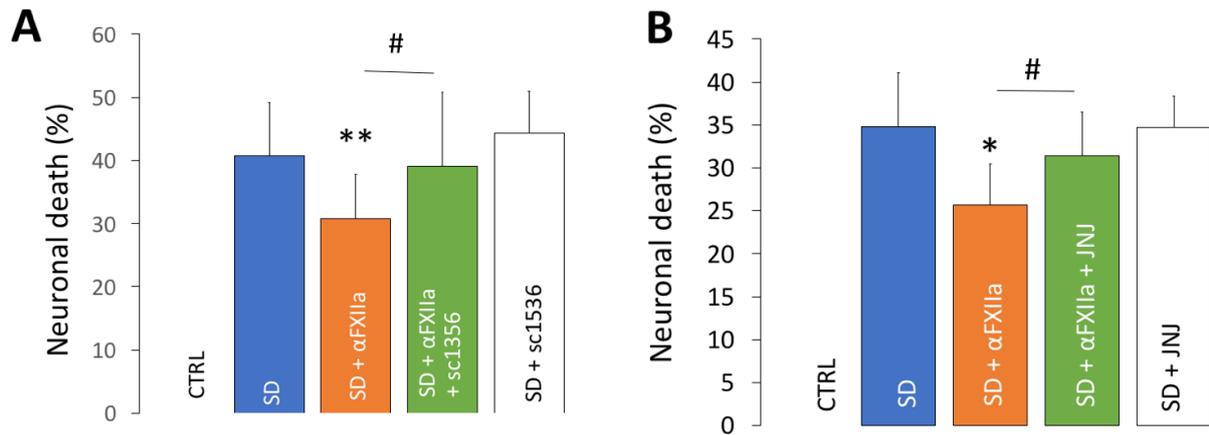


Figure 5. The antiapoptotic effect of α FXIIa is also dependent on HGF conversion and HGFR/c-MET activation. (A) Quantification of neuronal death following 24h of either SD alone or SD in the presence of 125 nM α FXIIa (orange) with or without a blocking antibody of HGF (green; mean + SEM; n = 16 in 4 different experiments). **, p < 0,01 and #, p < 0,05 significantly different from SD and α FXIIa respectively. (B) Quantification of neuronal death following 24h of either SD alone or SD in the presence of 125 nM α FXIIa (orange) with or without 500 nM JNJ, an inhibitor of MET phosphorylation (green; mean + SEM; n = 16 in 4 different experiments). *, p < 0,05 and #, p < 0,05 significantly different from SD and α FXIIa respectively.

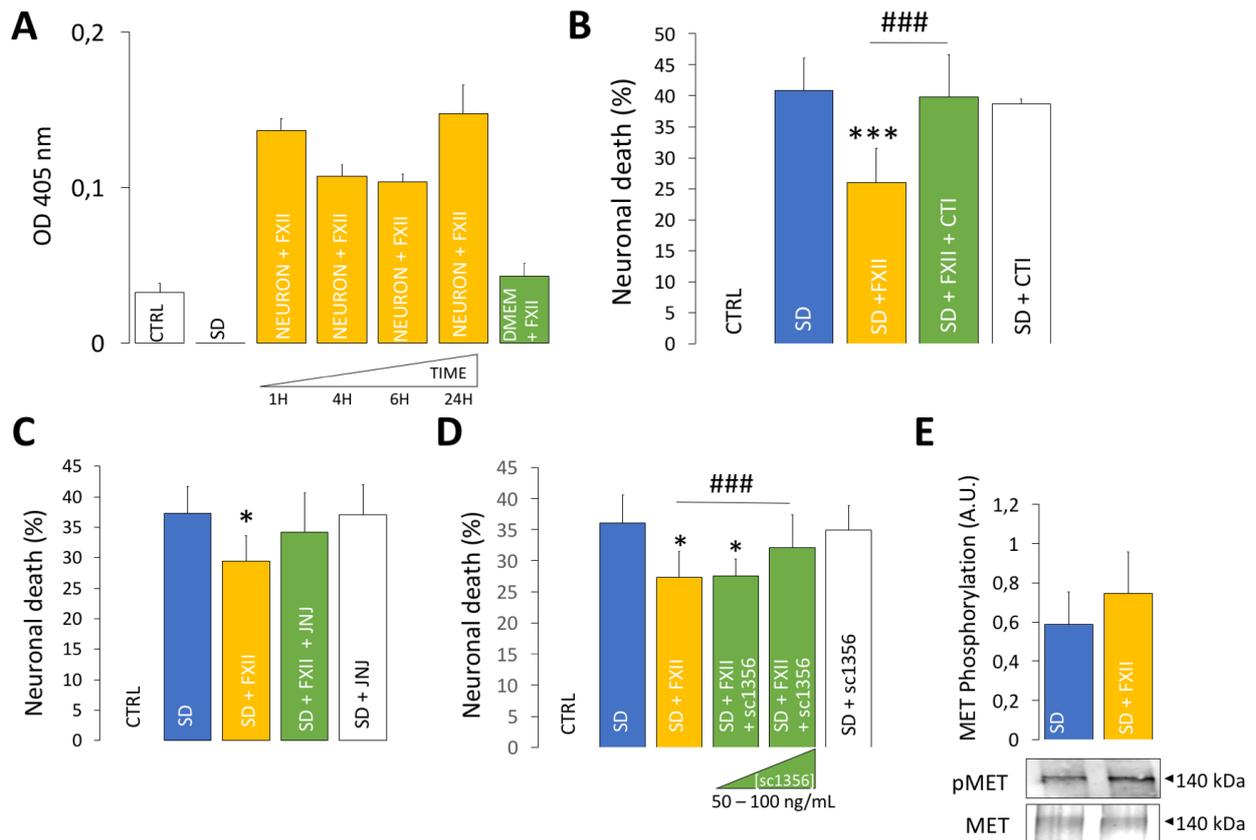


Figure 6. FXII auto-activation during SD triggers HGF maturation and resultant mature HGF interacts with HGFR/c-MET to mediate its antiapoptotic effects in neurons. (A) Supernatants of neurons subjected to SD in the presence or not of 125 nM FXII during 1h to 24 h were incubated with 800 μ M chromogenic substrate S-2302 (yellow; conditions with neuron). In control 125 nM FXII in DMEM was incubated during 1h to 24h at 37°C (green; condition without neurons). Changes in OD 405 nm were continuously monitored on a microplate reader. (B) Quantification of neuronal death following 24h of either SD alone or SD in the presence of 125 nM FXII (yellow) cotreatment with or without 4 μ M α FXIIa inhibitor, corn trypsin inhibitor, CTI (green; mean \pm SEM; n = 16 in 4 different experiments). *** and ###, $p < 0.001$ significantly different from SD and FXII respectively. (C) Quantification of neuronal death following 24h of either SD alone or SD in the presence of 125 nM FXII (yellow) with or without 500 nM JNJ, an inhibitor of MET phosphorylation (green; mean \pm SEM; n = 16 in 4 different experiments). *, $p < 0,05$ and no significantly different from SD and FXII respectively. (D) Quantification of neuronal death following 24h of either SD alone or SD in the presence of 125 nM FXII (yellow) with or without 50-100 ng/mL sc1356, a blocking antibody of HGF (green;

mean + SEM; n = 16 in 4 different experiments). *, p < 0,05 and ###, p < 0.001 significantly different from SD and FXII. (E) The phosphorylated form of MET was immunodetected in 20 µg of total proteins 20 µg of total proteins from lysates of neurons subjected to SD in the presence of 125 nM FXII. Total MET was used as a control. Representative images from four individual experiments are presented and the relative quantification. *, p < 0,05 different from SD and FXII.

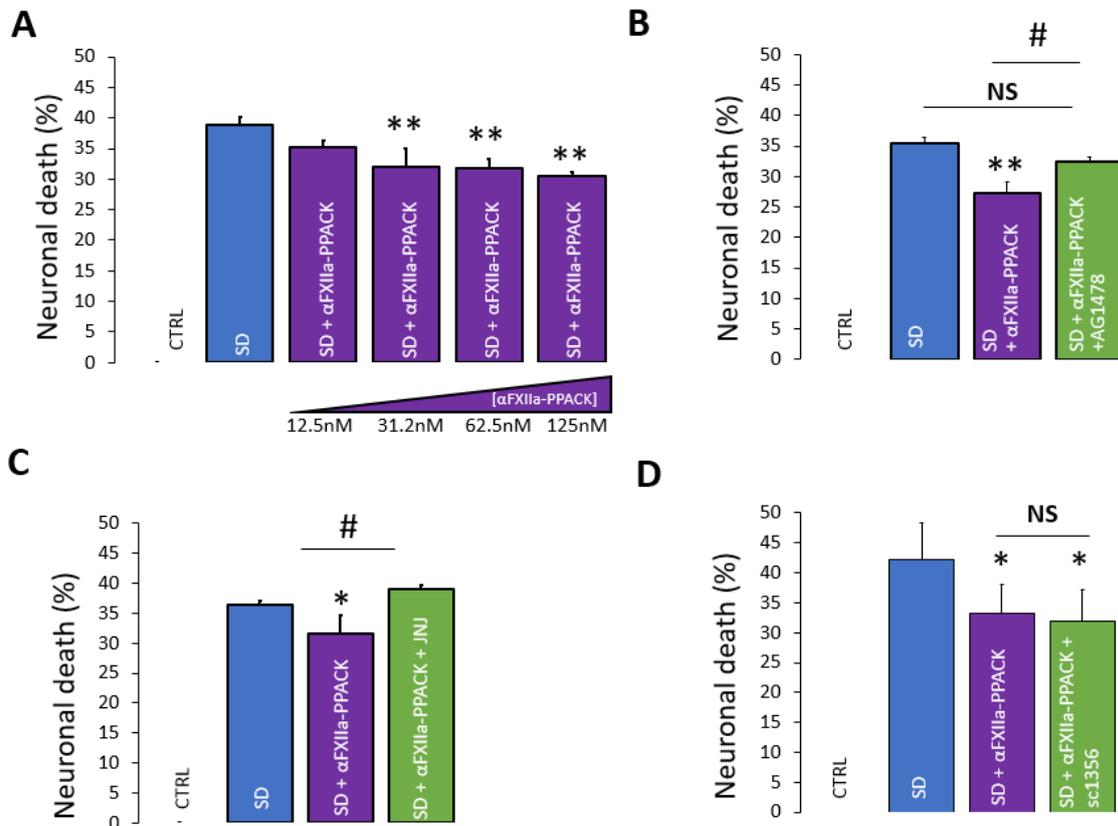
References

1. Maas C, Renné T. Coagulation factor XII in thrombosis and inflammation. *Blood*. 2018;131:1903-1909.
2. Samuel M, Pixley RA, Villanueva MA, Colman RW, Villanueva GB. Human factor XII (Hageman factor) autoactivation by dextran sulfate. Circular dichroism, fluorescence, and ultraviolet difference spectroscopic studies. *J Biol Chem*. 1992;267:19691–7.
3. Stavrou EX, Fang C, Bane KL, Long AT, Naudin C, Kucukal E, et al. Factor XII and uPAR upregulate neutrophil functions to influence wound healing. *J Clin Invest*. 2018;
4. LaRusch GA, Mahdi F, Shariat-Madar Z, Adams G, Sitrin RG, Zhang WM, et al. Factor XII stimulates ERK1/2 and Akt through uPAR, integrins, and the EGFR to initiate angiogenesis. *Blood*. 2010;115:5111–20.
5. Ivanov I, Matafonov A, Sun MF, Cheng Q, Dickeson SK, Verhamme IM, Emsley J, Gailani D. Proteolytic properties of single-chain factor XII: a mechanism for triggering contact activation. *Blood*. 2017;129:1527-1537.
6. Mahdi F, Madar ZS, Figueroa CD, Schmaier AH. Factor XII interacts with the multiprotein assembly of urokinase plasminogen activator receptor, gC1qR, and cytokeratin 1 on endothelial cell membranes. *Blood*. 2002;99:3585–96.
7. Correa F, Gauberti M, Parcq J, Macrez R, Hommet Y, Obiang P, et al. Tissue plasminogen activator prevents white matter damage following stroke. *J Exp Med*. 2011;208:1229–42.
8. Liot G, Roussel BD, Lebeurrier N, Benchenane K, López-Atalaya JP, Vivien D, et al. Tissue-type plasminogen activator rescues neurones from serum deprivation-induced apoptosis through a mechanism independent of its proteolytic activity. *J Neurochem*. 2006;98:1458–64.
9. Radi E, Formichi P, Battisti C, Federico A. Apoptosis and oxidative stress in neurodegenerative diseases. *J Alzheimers Dis*. 2014;42 Suppl 3:S125-152.
10. Radak D, Katsiki N, Resanovic I, Jovanovic A, Sudar-Milovanovic E, Zafirovic S, et al. Apoptosis and Acute Brain Ischemia in Ischemic Stroke. *Curr Vasc Pharmacol*. 2017;15:115–22.
11. Behrens MI, Koh JY, Muller MC, Choi DW. NADPH diaphorase-containing striatal or cortical neurons are resistant to apoptosis. *Neurobiol Dis*. 1996;3:72–5.

12. Rojas M, Yao S, Lin YZ. Controlling epidermal growth factor (EGF)-stimulated Ras activation in intact cells by a cell-permeable peptide mimicking phosphorylated EGF receptor. *J Biol Chem.* 1996;271:27456-61.
13. Shimomura T, Miyazawa K, Komiyama Y, Hiraoka H, Naka D, Morimoto Y, Kitamura N. Activation of hepatocyte growth factor by two homologous proteases, blood-coagulation factor XIIIa and hepatocyte growth factor activator. *Eur J Biochem.* 1995;229:257-61.
14. Nayeri F, Nayeri T, Aili D, Brudin L, Liedberg B. Clinical impact of real-time evaluation of the biological activity and degradation of hepatocyte growth factor. *Growth Factors.* 2008;26:163-71.
15. Vivien D, Gauberti M, Montagne A, Defer G, Touzé E. Impact of tissue plasminogen activator on the neurovascular unit: from clinical data to experimental evidence. *J Cereb Blood Flow Metab.* 2011;31:2119-34.
16. Gordon EM, Venkatesan N, Salazar R, Tang H, Schmeidler-Sapiro K, Buckley S, Warburton D, Hall FL. Factor XII-induced mitogenesis is mediated via a distinct signal transduction pathway that activates a mitogen-activated protein kinase. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1996;93:2174-9.
17. Trusolino L, Bertotti A, Comoglio PM. MET signalling: principles and functions in development, organ regeneration and cancer. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2010;11:834-48.
18. Bussolino F, Di Renzo MF, Ziche M, Bocchietto E, Olivero M, Naldini L, Gaudino G, Tamagnone L, Coffe A, Comoglio PM. Hepatocyte growth factor is a potent angiogenic factor which stimulates endothelial cell motility and growth. *J Cell Biol.* 1992;119:629-41.
19. Breindel JL, Haskins JW, Cowell EP, Zhao M, Nguyen DX, Stern DF. EGF receptor activates MET through MAPK to enhance non-small cell lung carcinoma invasion and brain metastasis. *Cancer Res.* 2013;73:5053-65.
20. Reznik TE, Sang Y, Ma Y, Abounader R, Rosen EM, Xia S, Laterra J. Transcription-dependent epidermal growth factor receptor activation by hepatocyte growth factor. *Mol Cancer Res.* 2008;6:139-50.
21. Shia S, Stamos J, Kirchhofer D, Fan B, Wu J, Corpuz RT, Santell L, Lazarus RA, Eigenbrot C. Conformational lability in serine protease active sites: structures of hepatocyte growth factor activator (HGFA) alone and with the inhibitory domain from HGFA inhibitor-1B. *J Mol Biol.* 2005;346:1335-49.

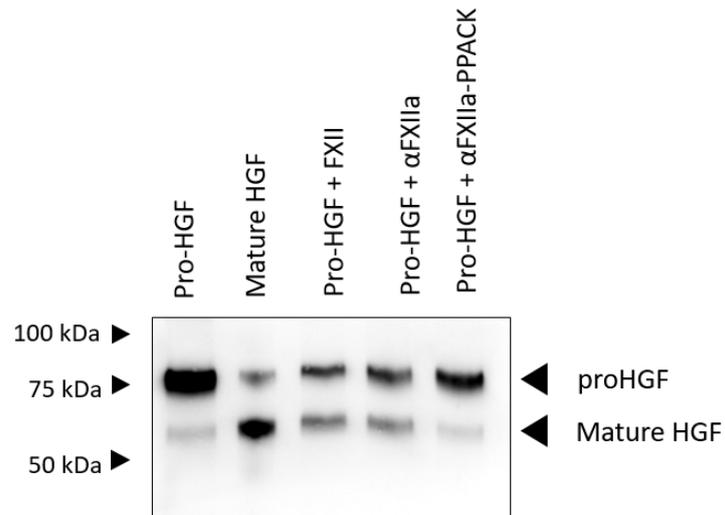
22. de Maat S, Maas C. Factor XII: form determines function. *J Thromb Haemost.* 2016;14:1498-506.
23. Lemarchand E, Maubert E, Haelewyn B, Ali C, Rubio M, Vivien D. Stressed neurons protect themselves by a tissue-type plasminogen activator-mediated EGFR-dependent mechanism. *Cell Death Differ.* 2016;23:123-31.
24. Fredriksson L, Lawrence DA, Medcalf RL. tPA Modulation of the Blood-Brain Barrier: A Unifying Explanation for the Pleiotropic Effects of tPA in the CNS. *Semin Thromb Hemost.* 2017;43:154-168.
25. Zamolodchikov D, Chen ZL, Conti BA, Renné T, Strickland S. Activation of the factor XII-driven contact system in Alzheimer's disease patient and mouse model plasma. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2015;112:4068-73.
26. Chen ZL, Revenko AS, Singh P, MacLeod AR, Norris EH, Strickland S. Depletion of coagulation factor XII ameliorates brain pathology and cognitive impairment in Alzheimer disease mice. *Blood.* 2017;129:2547-2556.
27. Hopp S, Albert-Weissenberger C, Mencl S, Bieber M, Schuhmann MK, Stetter C, Nieswandt B, Schmidt PM, Monoranu CM, Alafuzoff I, Marklund N, Nolte MW, Sirén AL, Kleinschnitz C. Targeting coagulation factor XII as a novel therapeutic option in brain trauma. *Ann Neurol.* 2016;79:970-82.
28. Kleinschnitz C, Stoll G, Bendszus M, Schuh K, Pauer HU, Burfeind P, Renné C, Gailani D, Nieswandt B, Renné T. Targeting coagulation factor XII provides protection from pathological thrombosis in cerebral ischemia without interfering with hemostasis. *J Exp Med.* 2006;203:513-8.
29. Stavrou E, Schmaier AH. Factor XII: what does it contribute to our understanding of the physiology and pathophysiology of hemostasis & thrombosis. *Thromb Res.* 2010;125:210-5.

Supplemental figures

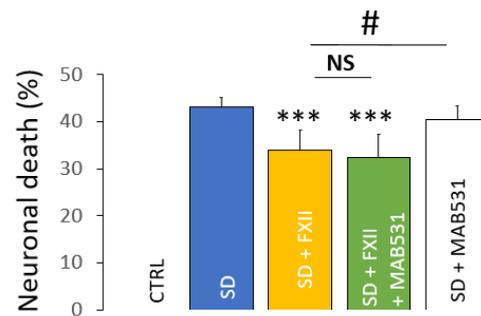


Supplemental Figure 1. Proteolytically inactive alpha-Factor XII (α FXIIa-PPACK) retains an antiapoptotic capacity dependent on EGFR activation and HGFR(c-MET) activation by transphosphorylation. (A) Quantification of neuronal death following 24h of either SD alone or SD in the presence of recombinant α FXIIa-PPACK (12,5–125 nM). Error bars represent the mean \pm SEM. Symbols indicate significantly different from SD by Mann Whitney (** $p < 0.01$, $n = 16$ in 4 different experiments). (B) Quantification of neuronal death following 24 h of either SD alone or SD in the presence of 125 nM α FXIIa-PPACK (purple) with or without 5 μ M EGFR kinase inhibitor, AG1478 (green; mean + SEM; $n = 16$ in 4 different experiments). **, $p < 0,01$; #, $p < 0.05$ and no significantly different from SD and α FXIIa respectively. (C) Quantification of neuronal death following 24 h of either SD alone or SD in the presence of 125 nM α FXIIa-PPACK (purple) with 500 nM JNJ, an inhibitor of c-MET phosphorylation (green; mean \pm SEM; $n = 16$ in 4 different experiments). *, $p < 0,05$ and #, $p < 0.05$ significantly different from SD and FXII respectively. (D) Quantification of neuronal death following 24 h of either SD alone

or SD in the presence of 125 nM α FXIIa-PPACK (purple) with 50 ng/mL sc1356, a blocking antibody of HGF (green; mean \pm SEM; n = 16 in 4 different experiments). *, p < 0,05 significantly different from SD .



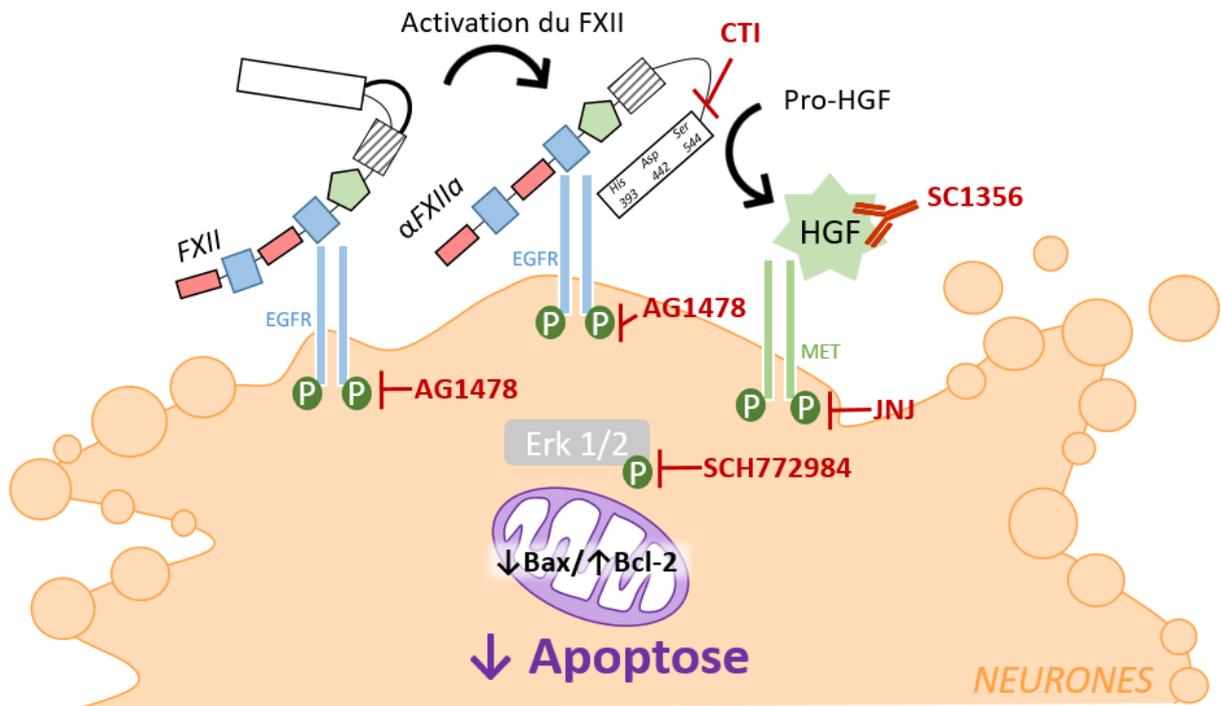
Supplemental Figure 2. FXII, α FXIIa convert ProHGF in mature HGF in purified conditions. Pro-HGF (52 nM) was incubated at 37°C for 4 h without proteases (lane 1) or with 5,2 nM FXII, α FXIIa, and α FXIIa-PPACK. Immunodetection of α HGF after incubation. Representative images of four independent experiments are presented.



Supplemental Figure 3. Blocking antibody of uPAR MAB531 does not reverse anti-apoptotic effect of FXII. Quantification of neuronal death following 24 h of either SD alone or SD in the presence of 125 nM FXII (yellow) with or without 25 μ g/mL uPAR blocking antibody, MAB531 (green ; mean + SEM; n = 16 in 4 different experiments). *** and #, p < 0.05 significantly different from SD and FXII respectively. CTRL: control; NS: non significant

3) Conclusion Etude 1

Etude 1 – Rôle du FXII dans l'apoptose neuronale



Cette étude a permis de démontrer un rôle antiapoptotique du FXII *in vitro* sur les neurones corticaux murins. Toutefois est-ce un rôle du FXII traversant la BHE ou un rôle du FXII parenchymateux ? Cette seconde étude vise à déterminer si le FXII est exprimé dans le SNC.

ETUDE 2 : Expression du Facteur XII dans le système nerveux central

1) Avant-propos

a) Contexte de l'étude

Le FXII, également connu sous le nom de Facteur Hageman, est une sérine protéase de 80 kDa (Stavrou et Schmaier, 2018). La forme simple chaîne FXII est produite et sécrétée par le foie. Une fois activé dans la circulation sanguine, le FXII initie la phase contact, lui conférant des effets pro-coagulants et pro-inflammatoires (Renné et al., 2012).

De récentes études ont montré une expression du FXII par la moelle épinière de souris, les neutrophiles humains et les fibroblastes pulmonaires humains (Göbel et al., 2016 ; Stavrou et al., 2018 ; Jablonska et al., 2010). Ces études constituent les seules montrant une expression du FXII en dehors du foie.

Au vu des résultats de notre première étude nous avons trouvé pertinent d'étudier plus en détail l'expression du FXII par le système nerveux central.

b) Question posée

Le FXII est-il exprimé dans le SNC ?

c) Méthodes

Afin de répondre à la question posée, des analyses protéiques et transcriptionnelles ont été réalisées permettant la caractérisation de l'expression du FXII par les différentes régions cérébrales chez la souris adulte, en développement et vieillissante. Les techniques de qPCR et d'immunohistochimie ont donc été utilisées.

d) Principaux résultats

- Les analyses protéiques ont révélé une expression du FXII par les neurones corticaux, hippocampaux et striataux.
- Les analyses transcriptionnelles ont révélé :
 - *In vitro*, une expression des ARNm du FXII par les neurones et les astrocytes.
 - *In vivo*, une expression des ARNm du FXII dans les différentes régions cérébrales étudiées (cortex, striatum, cervelet et hippocampe).
 - Une augmentation de l'expression des ARNm du FXII au cours du développement dans le cervelet, le striatum et le cortex.
 - Une augmentation de l'expression des ARNm du FXII au cours du vieillissement dans le cervelet.

2) Introduction

Le facteur XII (FXII) est une sérine protéase de 80 kDa, produite et sécrétée par le foie. Il est dérivé du gène F12, situé sur le chromosome 13, composé de 13 introns et de 14 exons (Citarella et al., 1988). Sa concentration plasmatique est très élevée, 30 µg / mL ou 375 nM. (Citarella et al., 1988). Le FXII présente divers effets dans la circulation, allant de l'activation de la coagulation à des rôles pro-inflammatoires via la production de Bradykinine (Cochrane et al., 1973). Plus récemment, des études ont identifié des rôles du FXII dans le système nerveux central (SNC). En effet, le FXII a été décrit comme augmentant le volume de lésion suite à un modèle murin d'ischémie cérébrale (Kleinshmith et al., 2006), que le FXII stimulait la génération de lymphocytes TH17 dans un modèle murin de sclérose en plaques (Göbel et al., 2014) et enfin que le FXII contribuait au déclin cognitif dans un modèle murin de la maladie d'Alzheimer (Chen et al., 2017). Ainsi le FXII semble délétère dans des pathologies affectant le SNC.

Outre dans le foie, son expression reste peu étudiée. Une étude a montré une expression du FXII dans la moelle épinière de souris et que cette expression augmentait lors d'un modèle murin de sclérose en plaques (Göbel et al., 2014). Cependant, l'immunohistochimie réalisée n'indique par le type cellulaire impliqué (Göbel et al., 2014). Les neutrophiles circulants ont également été décrits comme exprimant le FXII aussi bien à leur surface qu'en intracellulaire (Stavrou et al., 2018).

Compte tenu de son rôle potentiel dans le SNC et des faibles informations concernant son expression en dehors du foie, cette seconde étude a eu pour but d'étudier l'expression du FXII dans le SNC. Des analyses protéiques et transcriptionnelles ont été effectuées pour caractériser l'expression de FXII par les différentes régions du cerveau chez la souris adulte. Par la suite, il a également été étudié ses variations d'expression transcriptionnelle au cours du développement et du vieillissement de la souris.

3) Matériels et Méthodes

Animaux

Notre étude a été réalisée sur des souris mâles C57BL/6 d'âges différents et approuvées par les autorités locales (loi n ° 87-848 du ministère de l'Agriculture et de la Forêt) et européenne (directives du Conseil des Communautés européennes du 24 novembre 1986, 86/609 / EEC). Les souris C57BL/6 ont une durée de vie d'environ 26 mois. Quatre groupes de souris âgées ont été conçus: 8 semaines, 7 mois, 17 mois et 22 mois, avec cinq souris par groupe. Cinq groupes des souris en développement ont été conçus : souris au jour embryonnaire 14 (E14), jour embryonnaire 16 (E16), jour embryonnaire 18 (E18), jour postnatal 0 (P0) et jour postnatal 5 (P5), avec cinq animaux par groupe. Les animaux ont été hébergés dans une pièce à température contrôlée sur un cycle de 12 heures de lumière / 12 heures sans lumière, avec de la nourriture et de l'eau à volonté.

Immunohistochimie

Les souris ont été anesthésiées et perfusées transcordiaquement avec 0,9% de NaCl hépariné, suivi d'un mélange de 2% de paraformaldéhyde et de 0,2% d'acide picrique dans du tampon phosphate de sodium 0,1 M, pH 7,4 (150 ou 400 ml, respectivement). Les cerveaux ont été retirés, lavés dans un tampon contenant 20% de saccharose et congelés dans Tissue-Tek (Miles Scientific). Des coupes coronales (8-10 μ m) ont été réalisées par cryostat, recueillies sur des lames de poly-D-lysine et stockées à -80 ° C. Les sections ont été incubées pendant une nuit à température ambiante avec un anticorps primaire ou un cocktail d'anticorps primaires dilués dans un tampon contenant 0,25% de Triton x 100. Trois rinçages ont été effectués dans un tampon à température ambiante. Tous les anticorps secondaires ont été dilués (1: 800) dans un tampon contenant 0,25% de Triton x 100. L'incubation a été effectuée à température ambiante pendant 1h30. Les sections lavées ont été recouvertes d'un milieu de montage contenant du DAPI. Pour chaque série d'immunocoloration, les contrôles suivants ont été effectués systématiquement sur les coupes adjacentes: L'omission d'anticorps primaires ou secondaires dans des expériences d'immunomarquage n'a donné lieu à aucun marquage spécifique. De plus, l'absence de réactivité croisée entre les anticorps lors d'expériences d'immunomarquage multiple a été démontrée par l'omission d'un des anticorps

primaires et, par conséquent, par l'absence de détection de signal pertinent avec le cocktail d'anticorps secondaires.

Les images ont été capturées numériquement à l'aide d'une caméra coolsnap couplée au microscope Leica DM6000B (ORCA Flash 4-LT; Hamamatsu), visualisées avec le logiciel Metamorph 5.0 (Molecular Devices) et traitées à l'aide du logiciel Image J.

L'anticorps anti-FXII NBP1-94203 a été obtenu auprès de Novus Biologicals.

Les anticorps anti-NeuN MAB377 et anti-Olig2 MABn50A4 ont été obtenus auprès de Millipore.

Cultures primaires de neurones corticaux murins

Les cultures neuronales ont été préparées comme décrit précédemment dans Liot et collaborateurs (Liot et al., 2006). Des cultures corticales neuronales ont été préparées à partir de souris aux jours embryonnaires 15 et 16, E15-E16. Les cortex ont été dissociés et les neurones ont étéensemencés sur des plaques 24 puits recouvertes de poly-D-lysine (0,1 mg / ml) et de laminine (0,02 mg / ml). Les cellules ont été cultivées dans du DMEM supplémenté de 2 mM de glutamine, 5% de sérum de cheval et 5% de sérum de veau foetal. Les cultures ont été maintenues à 37 ° C dans une atmosphère humidifiée à 5% de CO₂. De la cytosine β-D-arabinoside (10 μM) a été ajoutée après 3 jours *in vitro* (DIV) pour inhiber la prolifération non neuronale. Toutes les expériences ont été effectuées après DIV7.

Cultures primaires d'astrocytes murins

Des cultures d'astrocytes corticaux ont été préparées comme décrit précédemment dans Briens et collaborateurs, à partir de souris de 0 à 2 jours postnatales (Briens et al., 2017). Les cortex cérébraux ont été disséqués et dissociés dans le DMEM. Ensuite, les cellules ont été étalées dans du DMEM supplémenté avec 10% de sérum de veau foetal, 10% de sérum de cheval et 2 mM de glutamine sur des plaques revêtues de collagène (0,05 mg / ml). Le milieu a été changé deux fois par semaine. Les expériences ont été réalisées lorsque les cellules ont atteint la confluence, après 7 à 9 jours *in vitro*.

Cultures primaires d'oligodendrocytes de rat (OPC)

Les cultures OPC ont été préparées comme décrit précédemment dans Leonetti et al. (Leonetti et al., 2017). Les hémisphères des rats Wistar nouveau-nés ou du premier jour postnatal ont été dissociés mécaniquement et remis en suspension dans du DMEM (D5671, Sigma-Aldrich) contenant 10% de sérum de veau foetal, 10% de sérum de cheval, 2 mM de glutamine (25030024, Thermo Fisher Scientific), 0,5% de pénicilline/streptomycine (15140122, Thermo Fisher Scientific). Les cellules ont étéensemencées en flasques revêtues de poly-D-lysine (0,1 mg / ml) (P6407, Sigma-Aldrich) (Nunc, Wiesbaden, Allemagne). Après 10 jours de culture, les flasques ont été agitées à 210 tr / min à 37 ° C pendant 3 h pour éliminer les microglies faiblement adhérentes. Les OPC restants présents au sommet de la monocouche confluyente d'astrocytes ont été délogés en agitant pendant une nuit à 270 tr / min. La suspension de cellules a été filtrée à travers un tamis de nylon de 40 µm et ensuite pré-plaquée sur des boîtes de Petri de qualité bactérienne pendant 1 heure. Les OPC non adhérents qui sont restés en suspension ont été récupérés, filtrés à travers un tamis de nylon de 40 µm et étalés à nouveau sur des boîtes de Petri de qualité bactérienne pendant 30 minutes. La suspension cellulaire d'OPC enrichie résultante a été comptée etensemencée conformément au dosage effectué.

Extraction et Quantification des ARN totaux

Les ARN totaux ont été extraits à partir de structures cérébrales avec le *TRI reagent* (Sigma; Lyon, France) selon le protocole du fabricant. En bref, les tissus ont été dissociés dans le TRI et les ARN ont été isolés par addition de chloroforme. L'ARN total a été lavé avec de l'éthanol et traité avec de la TURBO DNase (Ambion; Saint Aubin, France) pour éviter la contamination par l'ADN. Les ARN totaux ont été quantifiés par spectrophotométrie (NanoDrop Technologies; Wilmington, USA).

Transcription inverse

Nous avons effectué la transcription inverse à partir de 1 µg d'ARN total et du kit iScript (kit de synthèse d'ADNc iScript Select, Bio-Rad; Marnes-la-Coquette, France) dans un volume total de 20 µL avec les conditions de cycle suivantes: 42 ° C (90 min); 85 ° C (5min). Les produits d'ADNc ont ensuite été stockés à -20 ° C jusqu'à leur utilisation.

Quantitative PCR (qPCR)

La PCR quantitative a été préparée comme décrit précédemment dans Bruckert et collaborateurs (Bruckert et al., 2016). Des qPCR ont été effectuées à partir de 1 µL d'ADNc dilué à 1:20 dans 15 µL au total d'une solution 1X de iQ SYBR Green Supermix (Bio-Rad; Marnes-la-Coquette, France) contenant 200 nM de chaque amorce. Sur la base des séquences codantes de l'ARNm (www.ensembl.org), des amorces spécifiques à la souris et au rat ont été conçues à l'aide du logiciel Primer3Plus (<http://www.bioinformatics.nl/cgi-bin/primer3plus/primer3plus.cgi>). Les dosages ont été effectués en triplicat sur le thermocycleur c1000 du système temps réel CFX96 (Bio-Rad; Marnes-la-Coquette, France), avec les conditions de cycle suivantes: 95 ° C (3 min); [95 ° C (2 s), 60 ° C (20 s)] × 39; 70 ° C (30 s). Chaque plaque contient les échantillons entiers (en triple des 5 souris par groupe) pour un gène et une structure cérébrale et les valeurs de Cq ont été obtenues à partir du logiciel Bio-Rad CFX Manager (Bio -Rad; Marnes-la-Coquette, France). Les valeurs relatives de l'expression des gènes (quantité initiale) ont été calculées avec le logiciel Bio-Rad CFX Manager puis corrigées avec chaque efficacité, déduites des séries de dilutions standard (1/5^{ème}) via le logiciel qbase+.

Les amorces pour le FXII sont : sens 5' AGAACATCAGCTCACCTGC 3' ; antisens 5' GCATGCCACATTCATCGTCC 3'

Tableau 3 : Liste des neuf gènes de référence utilisés et leurs séquences d'amorces sens et antisens (Bruckert et al., 2016).

Name	Forward	Reverse
<i>Actb</i>	gcagctccttcgtgccggt	tacagcccgaggagcaicgt
<i>Polr2a</i>	gaaggtttgcgctgtgct	tggccaggatgcttaatc
<i>Sdha</i>	icacgggtgtgctgtgtg	cactccccatffccaicag
<i>Ppox</i>	ggcaaagagcctgatgaaac	gcaaatactcctcggcaaag
<i>Hprt</i>	ctttgctgacctgctggatt	tatgcccccggtgactgat
<i>Rpl13a</i>	tacgctgtgaaggcaicaac	gggaggggftggfaticatc
<i>Hmbs</i>	gaaatcattgctatgtccacca	gcgtttctagctccttggtaa
<i>Ppib</i>	cagcaagttcaicgtgca	gatgctcttctcctgtgc
<i>GAPDH</i>	tcgacttcaacagcaactc	atgtaggcaatgagggtccac

Analyses statistiques

Tous les résultats sont exprimés en moyenne \pm SEM. Pour les expériences *in vitro*, la valeur n correspond à n pools de puits différents issus de dissections indépendantes. Pour la comparaison de groupe, les tests de Kruskal-Wallis ont été utilisés, suivis par les tests U de Mann-Whitney en tant que tests post hoc.

4) Résultats

Expression de la protéine FXII dans le cerveau de souris adultes

La présence de FXII dans les différents types de cellules du SNC a été étudiée par immunohistochimie sur des tissus cérébraux perfusés provenant de souris adultes (**Figure 31, 32, 33**). Les immunomarquages des sections hippocampiques, striatales et corticales ont confirmé la présence de FXII. L'immunoréactivité du FXII a été observée dans les neurones (coréactivité avec NeuN) mais pas dans les oligodendrocytes (aucune réactivité avec Olig2). De plus, nous pouvons observer un marquage FXII autour des vaisseaux et des ventricules latéraux suggérant une expression potentielle de FXII par les cellules endothéliales et les épendymocytes.

Les neurones corticaux FXII apparaissent situés près du corps calleux, peut-être la couche six du cortex, la couche la plus profonde (**Figure 33**). Les neurones de l'hippocampe FXII apparaissent localisés dans la région CA1 (**Figure 32**). Et enfin les neurones striataux FXII apparaissent situés près du ventricule latéral (**Figure 31**).

Des contrôles sans anticorps primaire ont été effectués et n'ont révélé aucun marquage ce qui reflète la spécificité de l'anticorps.

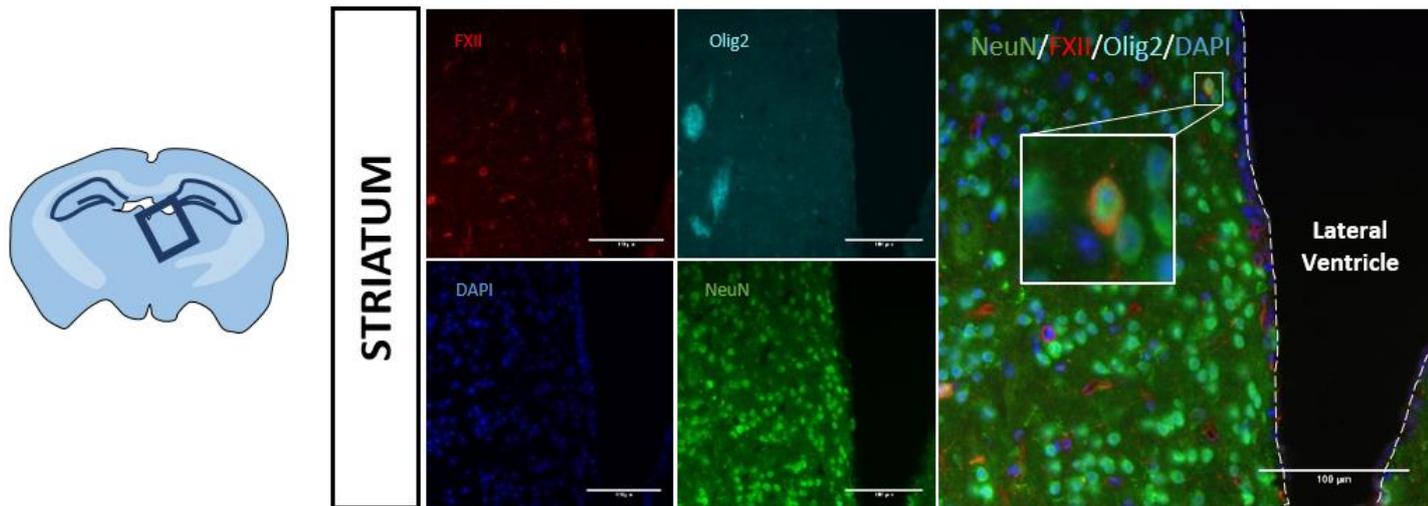


Figure 31 : Expression de FXII par les neurones striataux chez la souris adulte.

Photomicrographies de coupes de cerveau des images représentatives de trois souris. Représentation du FXII (rouge), de Olig2 (cyan), de NeuN (vert) et du DAPI (bleu) dans le cerveau de souris de type sauvage âgées de huit semaines. Barres d'échelle: 100 μm

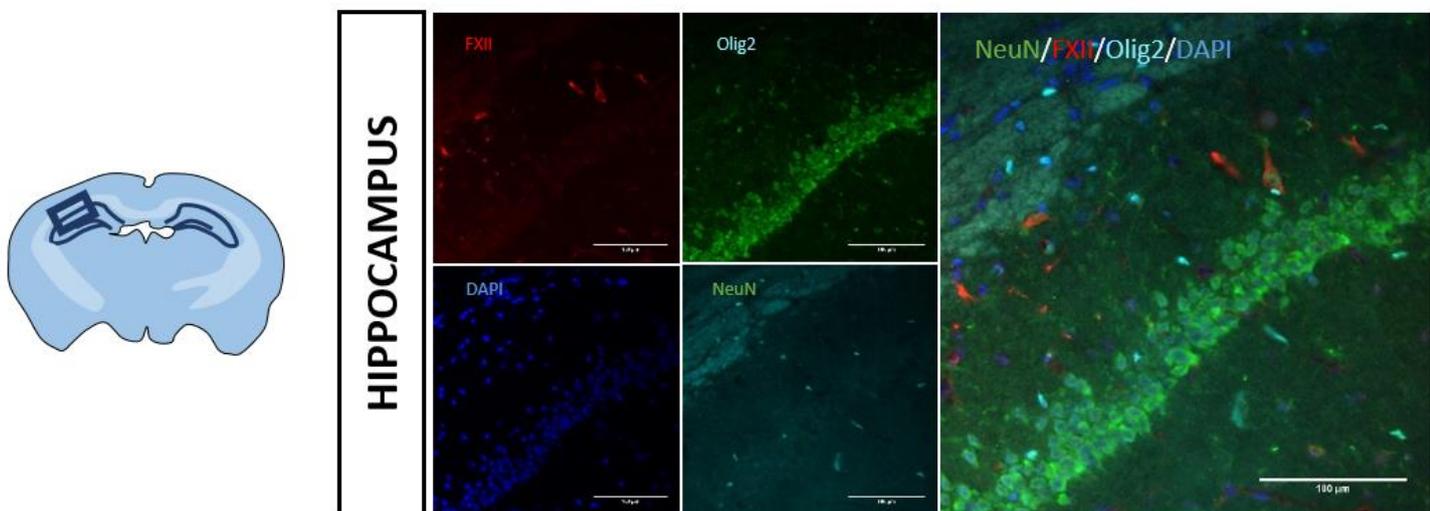
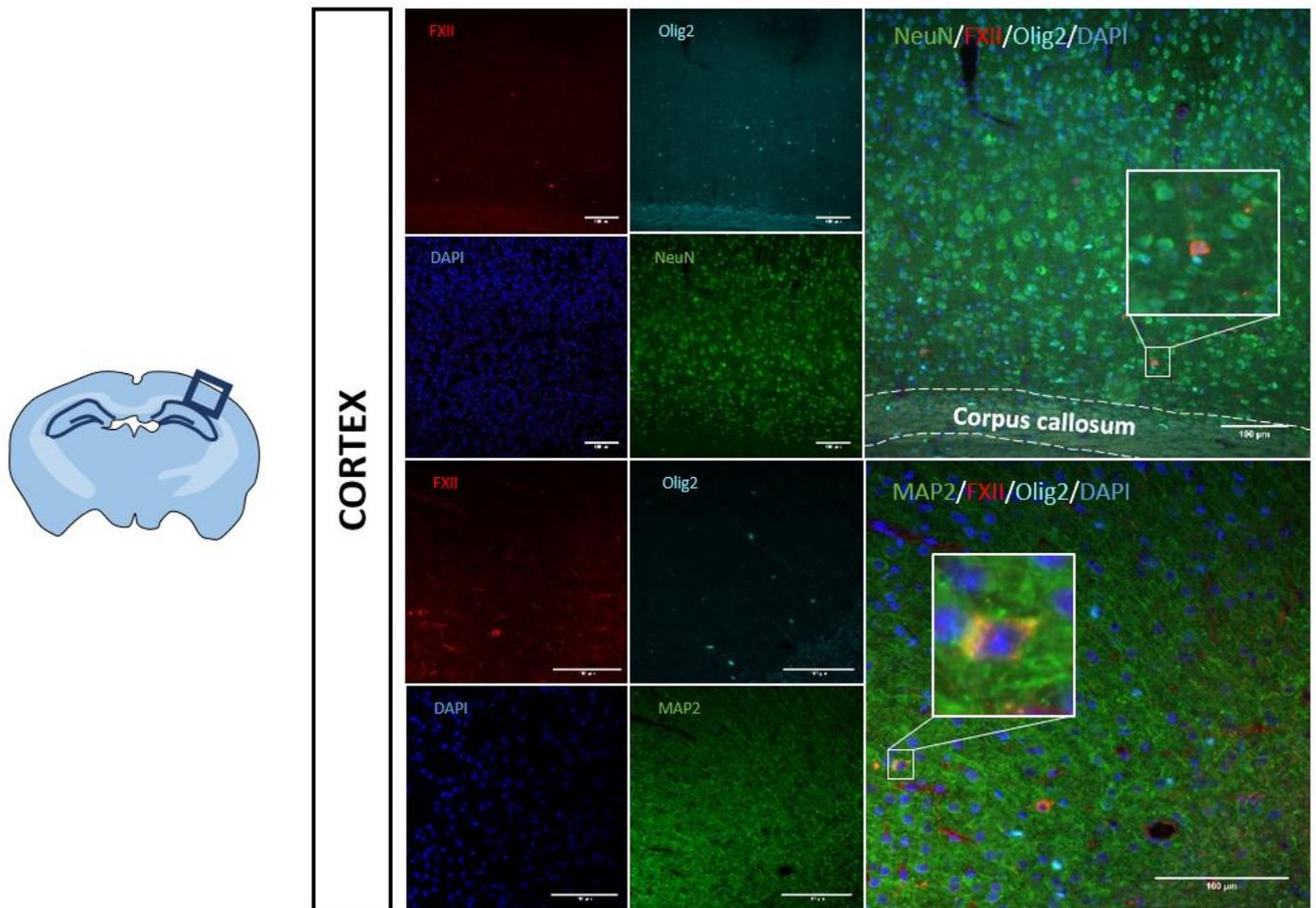


Figure 32 : Expression de FXII par les neurones hippocampiques chez la souris adulte.

Photomicrographies de coupes de cerveau des images représentatives de trois souris. Représentation du FXII (rouge), de Olig2 (cyan), de NeuN (vert) et du DAPI (bleu) dans le cerveau de souris de type sauvage âgées de huit semaines. Barres d'échelle: 100 μm



Variations de l'expression transcriptionnelle du FXII au cours du développement cérébral de la

Figure 33 : Expression de FXII par les neurones corticaux chez la souris adulte.

Photomicrographies de coupes de cerveau des images représentatives de trois souris. Représentation du FXII (rouge), de Olig2 (cyan), de NeuN ou MAP2 (vert) et du DAPI (bleu) dans le cerveau de souris de type sauvage âgées de huit semaines. Barres d'échelle: 100 μm

souris

Nous avons étudié les effets du développement cérébral sur l'expression de l'ARNm de FXII. Au cours du développement, nous observons une augmentation significative de l'expression du FXII dans le cervelet, le cortex et le striatum. Toutefois, ces variations d'expression diffèrent dans le temps suivant ces trois régions. Si l'expression augmente autour de la naissance pour le cervelet, c'est après la naissance qu'elle est augmentée dans le cortex et le striatum. De façon intéressante, aucun changement associé au développement n'a été observé dans l'hippocampe (**Figure 34**).

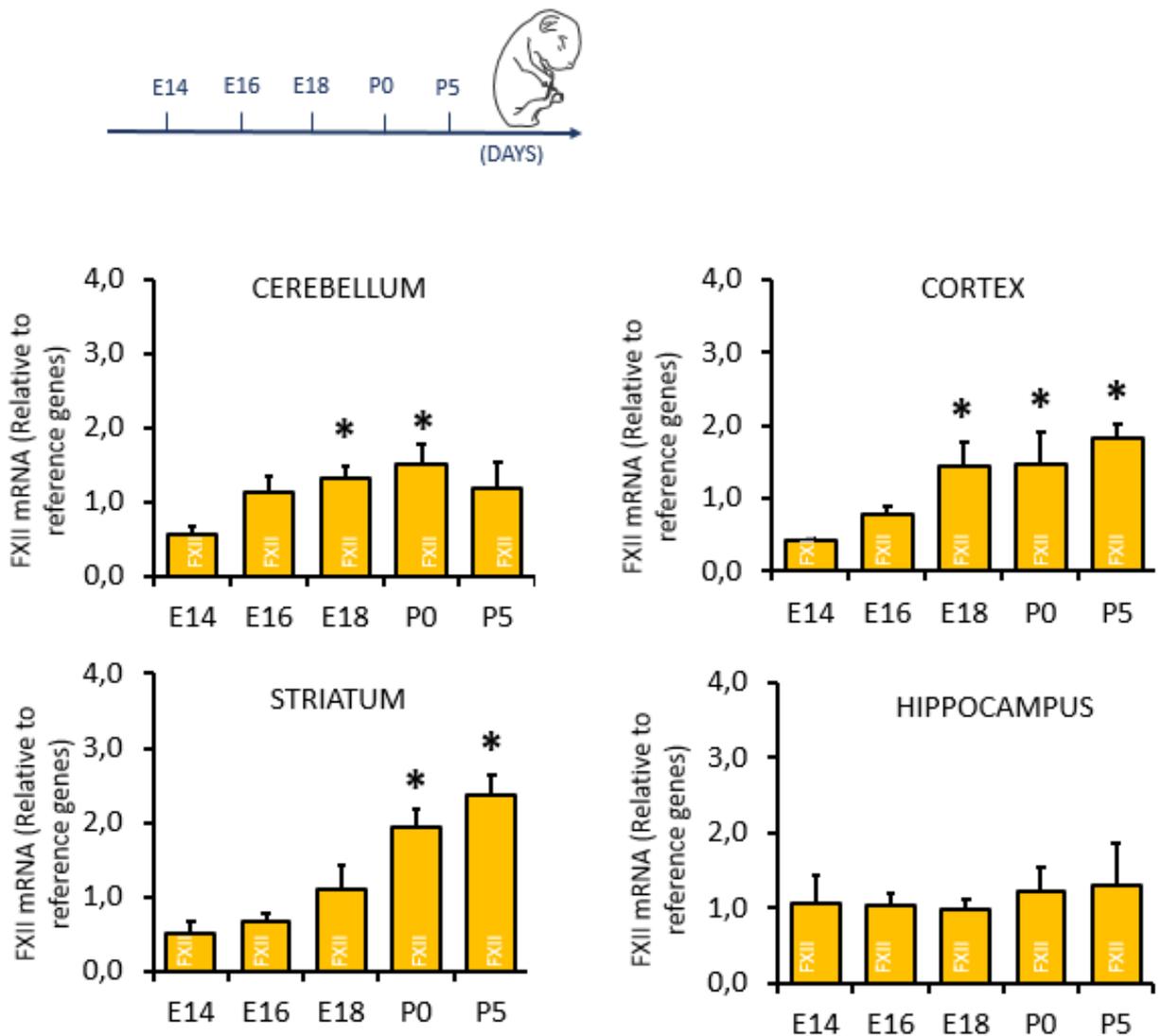


Figure 34 : Effet du développement cérébral sur la transcription de FXII dans le SNC.

La transcription de FXII a été étudiée dans cinq groupes E14, E16, E18, P0 et P5 dans les quatre régions du SNC, le cortex, le striatum, le cervelet et l'hippocampe. Les qPCR ont été analysées avec deux logiciels Bio-Rad CFX Manager et qbase (moyenne \pm SEM; n = 5; * p < 0,05; test U de Mann-Whitney).

Expression transcriptionnelle du FXII dans le cerveau de souris adulte

L'expression de l'ARNm du FXII a été étudiée par qPCR (**Figure 35**). Nous avons d'abord comparé l'expression de l'ARNm du FXII entre le foie et le cerveau. Nous pouvons observer que le foie et le cerveau expriment le FXII, mais que l'expression hépatique est mille fois plus importante que l'expression cérébrale (Expression relative du FXII dans le foie/Expression relative du FXII dans le cerveau) (**Figure 35A**). Ensuite, nous avons observé l'expression de l'ARNm du FXII dans les cultures primaires d'astrocytes et de neurones murins. De façon intéressante, la culture primaire d'oligodendrocytes de rats ne semble pas exprimer le FXII. En effet, l'ARNm de FXII n'est pas détecté dans les oligodendrocytes (**Figure 35B**). Enfin, nous comparons l'expression de l'expression d'ARNm de FXII dans les différentes régions du SNC. Toutes les régions expriment l'ARNm de FXII. De plus, nous n'avons pas observé de variations d'expression entre le cervelet, l'hippocampe, le cortex et le striatum (**Figure 35C**).

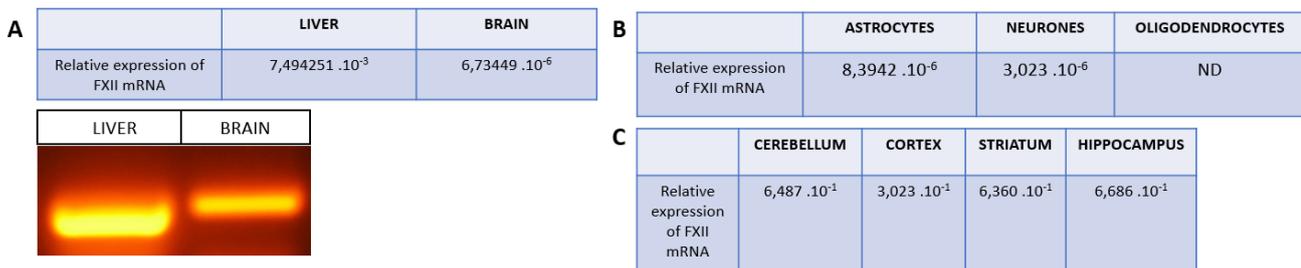


Figure 35 : Expression de l'ARNm du FXII par le cerveau de souris adulte et par la cultures primaires de cellules cérébrales.

A. Expression différentielle de l'ARNm du FXII entre le foie et le cerveau **B.** Expression de l'ARNm du FXII in vitro dans les cultures d'astrocytes, de neurones et d'oligodendrocytes **C.** Expression in vivo de l'ARNm du FXII dans le cortex, le cervelet, le striatum et l'hippocampe.

(n=5/groupe)

Variations de l'expression transcriptionnelle du FXII au cours du vieillissement cérébral chez la souris

Nous avons étudié les effets du vieillissement cérébral sur l'expression de l'ARNm du FXII chez la souris. Au cours du vieillissement cérébral, il y avait une augmentation significative de l'expression dans le cervelet à partir du 17^{ème} mois. En revanche, nous n'avons observé aucun changement associé à l'âge dans le striatum, le cortex et l'hippocampe (**Figure 36**).

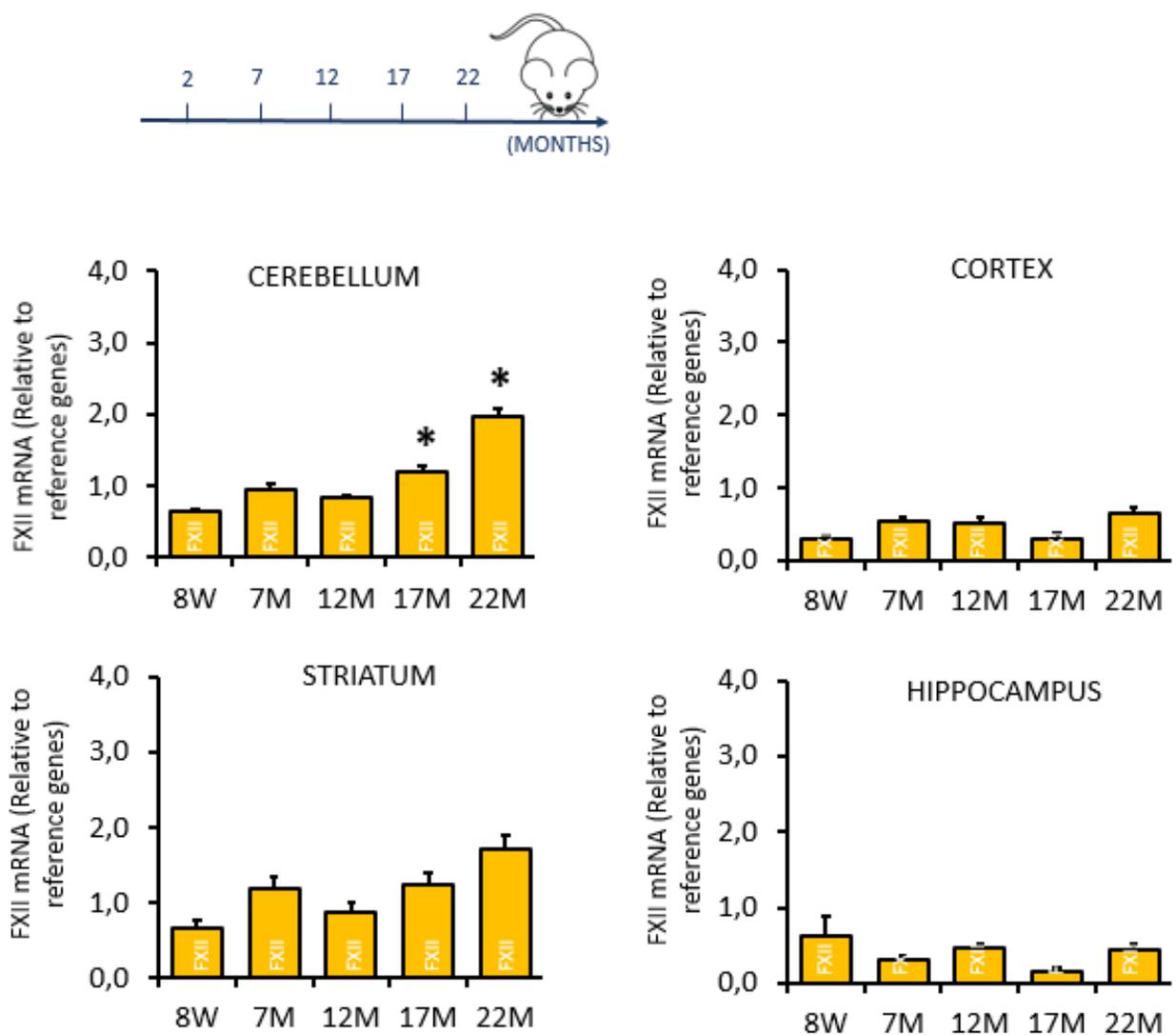
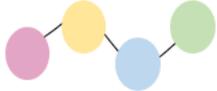


Figure 36 : Effet du vieillissement cérébral sur la transcription de FXII dans le SNC.

La transcription de FXII a été étudiée dans quatre groupes 8W, 7M, 12M, 17M et 22M dans les quatre régions du SNC, le cortex, le cervelet, le striatum et l'hippocampe. Les qPCR ont été analysées avec deux logiciels : Bio-Rad CFX Manager et qbase+ (moyenne \pm SEM; n = 5; * p < 0,05; test U de Mann-Whitney).

5) Conclusion de l'étude 2

Etude 2- Expression du FXII dans le SNC



Expression du FXII par les **neurones du cortex, du striatum et de l'hippocampe**

Expression de l'ARNm du FXII dans le cerveau

- *In vitro* par les **neurones et les astrocytes**
- *In vivo* par les **différentes régions cérébrales**



↑ des ARNm du FXII au cours du **développement cérébral** au niveau du **cervelet, du cortex et du striatum**

↑ des ARNm du FXII au cours du **vieillissement cérébral** au niveau du **cervelet**

DISCUSSION

DISCUSSION

Ainsi cette thèse nous a permis d'identifier un rôle du FXII dans l'apoptose neuronale, et le mécanisme impliqué. De plus nous avons pu identifier une expression du FXII dans le SNC.

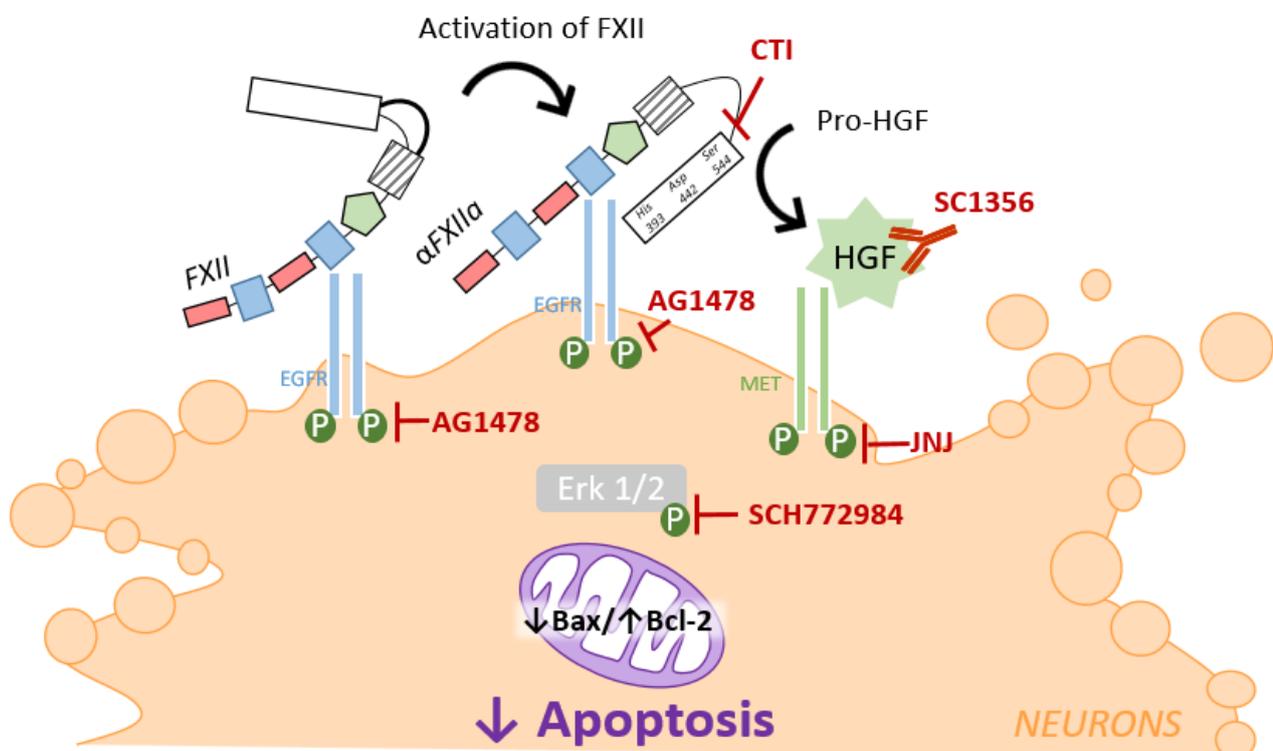
Au cours de la première étude, nous avons pu observer que le FXII induit, d'une part, l'activation du récepteur EGFR par sa liaison directe, puis, d'autre part, la conversion du Pro-HGF en HGF mature par son activité catalytique à la surface des neurones.

Les effets du FXII sur la survie neuronale sont bloqués lors de l'utilisation d'un inhibiteur de la phosphorylation du récepteur EGF (AG1478). L'activation du FXII en α FXIIa permet au FXII d'activer la voie HGF/MET. Ces effets sont réversés par l'utilisation d'un anticorps bloquant l'HGF présent dans le milieu de culture (sc1356) et d'un inhibiteur de l'activité catalytique du FXII le CTI. C'est l'HGF néoformé qui, par sa fixation sur son récepteur privilégié MET, déclenche l'activation de celui-ci. L'inhibition de la phosphorylation du récepteur MET par le JNJ réverse l'effet bénéfique du FXII sur la survie neuronale. L'activation directe du récepteur EGFR et indirecte du récepteur MET permet la phosphorylation des protéines signalétiques Erk 1 et 2, induisant ainsi une diminution de l'expression de la protéine pro-apoptotique Bax et une augmentation de l'expression de la protéine anti-apoptotique Bcl-2. Cette coopération entre EGFR et MET peut être empêchée par un inhibiteur des MAPK Erk, le SCH772984. L'ensemble de ces processus confère au FXII un rôle anti-apoptotique sur les neurones corticaux de souris (**Figure 37 ; Tableau 4**).

Au cours de la seconde étude, nous avons pu visualiser l'expression protéique et transcriptionnelle du FXII dans le SNC. Chez l'adulte, la transcription du FXII a été observée dans l'ensemble des régions cérébrales étudiées. Elle est augmentée au cours du développement et du vieillissement. De plus, chez l'adulte, ce sont les neurones corticaux et striataux qui expriment la protéine FXII (**Etude 2**).

Tableau 4 : Récapitulatif des différents traitements pharmacologiques utilisés dans l'étude 1 et leurs effets.

Traitements	SD + FXII	SD + α FXIIa	SD + β FXIIa (voir Figure 38 ci-après)	SD + α FXIIa-PPACK
Effets antiapoptotiques	Oui	Oui	Non	Oui
Fixation EGFR	Oui	Oui	Non-testé	Non-testé
Inhibition AG1478	Oui	Non	Non-testé	Oui
Erk Phosphorylation	Oui	Non-testé	Non-testé	Non-testé
\downarrow Bax \uparrow Bcl-2	Oui	Non-testé	Non-testé	Non-testé
Activité catalytique	Oui	Oui	Non-testé	Non
Inhibition CTI	Oui	Oui	Non-testé	Non-testé
Inhibition Sc1356	Non	Oui	Non-testé	Non
Inhibition JNJ	Oui	Oui	Non-testé	Oui
Conversion Pro-HGF	Non	Oui	Oui	Non
Phosphorylation MET	Oui	Non-testé	Non-testé	Non-testé

**Figure 37 : Rôle anti-apoptotique du FXII sur les neurones corticaux murins.**

1) Rôle anti-apoptotique des différentes formes de Facteur XII

Les formes FXII et α FXIIa présentent toutes deux un effet anti-apoptotique sur les neurones corticaux murins. Elles réduisent la mort neuronale de façon dose-dépendant (**Etude 1, Figure 1 et 4**). En revanche la forme tronquée β FXIIa, ne présentant qu'une partie de la région riche en proline et un domaine catalytique actif, n'a pas cet effet (**Figure 38**). L'effet anti-apoptotique du FXII et de l' α FXIIa ne nécessite pas uniquement la présence du domaine catalytique, un ou plusieurs autres domaines semblent nécessaires.

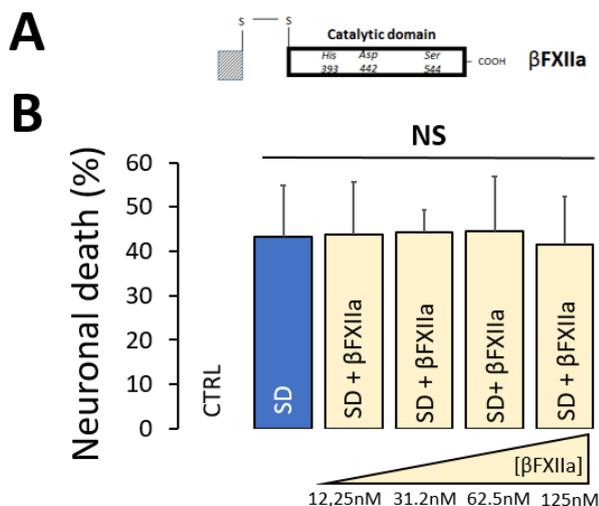


Figure 38 : Beta-Facteur XII (β FXIIa) n'a pas d'impact sur la mort neuronale.

A. Schématisation de la structure du β FXIIa. **B.** Quantification de la mort neuronale après 24h de SD seule ou en présence de la protéine recombinante β FXIIa (12,5-125 nM). Moyenne \pm SEM. NS = aucune différence significative n'a été observée, $n = 12$ dans trois différentes expériences.

Il a déjà été montré par le passé des différences d'action entre les formes de FXII. Le β FXIIa présente la même capacité enzymatique que l' α FXIIa et ainsi présente par exemple, comme l' α FXIIa, une activité pro-inflammatoire par génération de BK (Pathak et al., 2015). Toutefois le β FXIIa ne possède aucun site « *surface binding site* ». Ce site s'est avéré essentiel pour le clivage du Facteur XI par l' α FXIIa (Citarella et al., 1998). Le β FXIIa est donc incapable de promouvoir la coagulation contrairement à l' α FXIIa. Le mécanisme identifié lors de l'étude 1 semble donc nécessiter un « *surface binding site* » pour permettre au FXII et à l' α FXIIa un effet anti-apoptotique. Nous nous sommes donc intéressés par la suite à l'identification de « la surface » permettant la fixation du FXII.

Le FXII simple chaîne et sa forme double chaîne α FXIIa sont initialement décrits comme initiant la voie intrinsèque de la coagulation, induisant la fibrinolyse, mais également décrit comme activant le système kallikréine-kinine (Van der Meijden et al., 2009 ; Cochrane et al., 1973 ; Konings et al., 2015). Si notre étude est la première identifiant un rôle du FXII dans l'apoptose, les acteurs du système Kallikréine-kinine et d'autres sérines protéases de l'hémostase ont déjà

été montrés comme jouant un rôle dans la survie cellulaire. En effet la thrombine, protéase de la voie commune de la coagulation, la sérine protéase fibrinolytique tPA mais également des acteurs du système kallikréine-kinine, se sont déjà avérés antiapoptotiques (Zain et al., 2000 ; Liot et al., 2006 ; Correa et al., 2011 ; Yin et al., 2005).

Des concentrations élevées de thrombine altèrent l'apoptose des cellules tumorales par la diminution des caspases *via* l'activation de son récepteur PAR-1. Cet effet anti-apoptotique de la thrombine n'a toutefois été visualisé que sur les cellules tumorales surexprimant le récepteur PAR-1 (Zain et al., 2000). Nous avons voulu tester l'effet de la thrombine sur l'apoptose neuronale et son mécanisme d'action.

Nos résultats « en cours » (2 plaques indépendantes) montrent un effet anti-apoptotique de la thrombine (Figure 39).

Toutefois, le mécanisme résultant ne semble pas être le même que pour les cellules tumorales. Dans le modèle SD, l'effet anti-apoptotique de la thrombine semble être dépendant de son activité catalytique mais

indépendant de l'activation du récepteur PAR-1. Ainsi les effets anti-apoptotiques médiés par la thrombine sur les neurones ne semblent pas être, dans ce modèle, dépendant de PAR-1.

Le système kallikréine-kinine a également été identifié comme protecteur dans l'apoptose suite à un infarctus du myocarde chez le rat (Yin et al., 2005). Ainsi l' α -Kallikréine ou le HK, acteur du système kallikréine-kinine initié par le FXII, ont été décrits comme protecteurs de l'apoptose des cardiomyocytes, cellules contractiles composant le muscle cardiaque. Il serait donc intéressant de tester les effets de ces deux protéases dans le modèle SD d'apoptose neuronale.

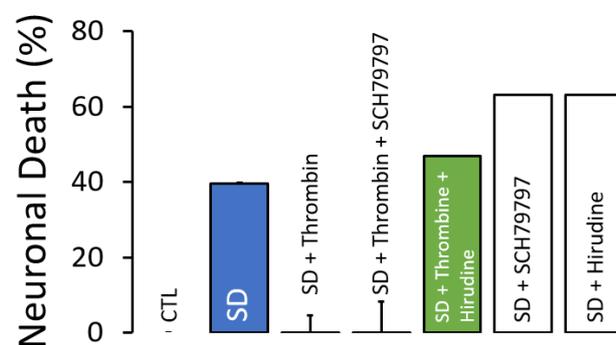


Figure 39 : Effet de la Thrombine, d'un inhibiteur de PAR-1 (SCH-79797) et d'un inhibiteur de la Thrombine (Hirudine) sur l'apoptose neuronale.

Quantification de la mort neuronale après 24H de SD seul ou SD en présence de 5 U/mL de Thrombine cotraité avec ou sans 2,5 μ M de SCH79797 ou 2 μ M d'Hirudine ($n = 8$ sur deux plaques différentes).

Nous avons montré au cours de notre étude un rôle direct du FXII sur l'apoptose neuronale. Toutefois les rôles anti-apoptotiques de la thrombine et des acteurs du système kallikréine-kinine pourraient constituer cette fois-ci un mécanisme indirect du FXII sur l'apoptose neuronale.

Enfin il a déjà été établi dans le laboratoire Phind U1237 qu'une autre sérine protéase de l'hémostase, le tPA, avait un effet anti-apoptotique dans le même modèle d'apoptose neuronale. Le laboratoire a déterminé que cet effet était dû à la fixation directe du tPA sur le récepteur EGF *via* son domaine EGF (Correa et al., 2011 ; Bertrand et al., 2015). Or le tPA et le FXII contiennent 40% d'homologie structurelle. Cette homologie se situe particulièrement au niveau des domaines EGF-like qu'ils ont en commun (Stavrou et Schmaier, 2010). C'est en se basant sur les études effectuées sur le tPA que le récepteur EGFR nous a semblé être une bonne cible pour le FXII.

2) Interaction du FXII avec le récepteur EGFR

Le FXII se fixe sur le récepteur EGFR et l'active à la surface des neurones en SD et de façon indépendante de son activité catalytique (**Etude 1, Figure 2**). En effet la forme inactivée α FXIIa-PPACK présente une activité anti-apoptotique, dépendante de l'activation du récepteur EGF et indépendante donc de l'activité du domaine protéolytique (**Etude 1, suppl 1**). Une activation indirecte du récepteur EGF par le FXII avait déjà été proposée en 2010 (Larusch et al., 2010). En effet, Larusch et collaborateurs avaient montré que le FXII était capable d'activer le récepteur à l'uPA. Cette activation permet l'activation du récepteur EGF *via* le recrutement d'intégrines, ce qui provoquait l'angiogénèse des cellules endothéliales par la FXII (Larusch et al., 2010).

Ici l'activation du récepteur EGFR est directe et indépendante de la fixation du FXII sur le récepteur à l'uPA (**Etude 1, suppl 3**). Il serait intéressant d'étudier le domaine du FXII impliqué dans cette liaison. La création de mutant FXII pourrait être envisagée.

A noter qu'en 2013, l'étude cristallographique du FXII avait comparé les structures des domaines EGF-like du FXII avec l'EGF, substrat classique de EGFR (Beringer et Kroon-Batenburg, 2013). Cette étude suggèrait que s'il existait une interaction directe du domaine

EGF-like du FXII avec le récepteur EGF, celle-ci ne concernerait selon eux que le second domaine EGF-like (Beringer et Kroon-Batenburg, 2013). En effet, le second domaine EGF-like du FXII présente la conservation d'un résidu arginine nécessaire à l'interaction de EGF avec EGFR (Beringer et Kroon-Batenburg, 2013). Ce résidu est remplacé par une phénylalanine dans le premier domaine EGF-like du FXII (Beringer et Kroon-Batenburg, 2013).

La forme inactive α FXIIa-PPACK présente une activité anti-apoptotique résultante de l'activation du récepteur EGF (Etude 1, suppl 1A et 1B). En revanche la forme tronquée β FXIIa, ne possédant que le domaine catalytique, ne présente aucun effet anti-apoptotique. Ainsi le rôle du FXII sur l'apoptose neuronale *via* EGFR semble indépendant du domaine catalytique du FXII et semble nécessaire puisqu'une inhibition de EGFR empêche l'effet. Pour vérifier cette hypothèse il serait intéressant d'étudier les effets du FXII sur la mort neuronale apoptotique chez des neurones déplétés en récepteur EGF. La transfection de culture primaire des neurones corticaux murins avec des siRNA ciblant le récepteur EGF pourrait être utilisée. Toutefois pour l'heure nous ne savons pas si ce type de culture est viable.

La forme double chaîne du FXII, l' α FXIIa, se fixe également au récepteur EGFR. Cependant l'activation de EGFR par l' α FXII nécessite l'activité de son domaine catalytique. En effet l'inhibition seule du récepteur EGFR par l'AG1478 n'est pas suffisante pour bloquer les effets de l' α FXIIa. La réversion des effets de la forme double chaîne du FXII nécessite le cotraitement de l'AG1478 avec un inhibiteur du domaine catalytique, le CTI (Etude 1, Figure 4 et 6).

3) Rôle du FXII dans la voie anti-apoptotique HGF/MET

Comme prouvé en 1995 par Shimomura et collaborateurs mais également dans notre étude, l' α FXIIa et le β FXIIa permettent, *via* un clivage protéolytique, la conversion du Pro-HGF en HGF mature double chaîne (Shimomura et al., 1995) (Etude 1, Suppl 2). Cette conversion est présente pour le FXII (Etude 1, Suppl 2). Nous avons également pu remarquer que les effets anti-apoptotiques du FXII sont réversés par un inhibiteur de son activité catalytique, le CTI et nous observons une augmentation de l'activité du FXII en présence des neurones (Etude 1, Figure 6A). Ces différents résultats suggèrent une activation du FXII à la surface des neurones.

L'activité catalytique du FXII est peu claire. Depuis les années 80, la communauté scientifique considère que le FXII n'est pas protéolytiquement actif. Agissant comme un zymogène, le FXII ne gagne son activité que par conversion. L'activité observée pour le FXII serait due à des impuretés de la source (Silverberg et al., 1980 ; Tans et al., 1983). Toutefois une étude récente remet en cause cette hypothèse. Les auteurs ont montré par différentes mutations du domaine catalytique du FXII que le FXII simple chaîne présente également une activité catalytique (Ivanov et al., 2017). Même si nous observons une augmentation d'activité du FXII en présence des neurones, une réversion par le CTI et un léger clivage protéolytique du Pro-HGF par le FXII, une immunoempreinte a révélé que notre source de FXII était déjà en parti convertie (**Etude 1, Figure 6A ; Figure 40**). Ainsi l'étude 1 ne permet pas de répondre complètement sur le mécanisme d'activation du FXII dans notre modèle, ni de déterminer si le FXII a réellement un pouvoir de conversion du Pro-HGF, ni si le FXII se sert vraiment des neurones comme surface d'activation.

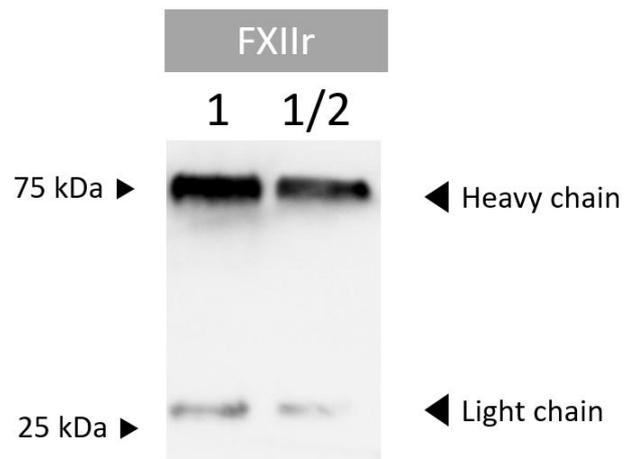


Figure 40 : Activation en α FXIIa de la source FXII (Enzyme Research Laboratory).

Immunoempreinte anti-FXII d'un aliquot de FXII. 1.25 – 0.625 nM FXII. Visualisation de la chaîne lourde et de la chaîne légère ($n = 1$).

Le récepteur privilégié de l'HGF mature est MET. Diverses études ont observé un effet anti-apoptotique de la voie HGF/MET, notamment une étude *in vitro* a établi que l'HGF diminuait la mort apoptotique des neurones corticaux (He et al., 2008). Nous avons montré ici que sa forme active α FXIIa provoque l'activation de la voie HGF/MET, ce qui aboutit à une phosphorylation du récepteur (**Etude 1, Figure 5 et Suppl 2**).

Même si le β FXIIa est capable de cliver le Pro-HGF en HGF mature en tube, le β FXIIa n'a pas de rôle anti-apoptotique. Ainsi la présence du domaine catalytique mais également d'un ou plusieurs autres domaines est nécessaire pour permettre l'effet du FXII et de l' α FXIIa. De plus l'activation du récepteur EGF semble nécessaire dans les mécanismes du FXII et de l' α FXIIa, puisque l'inhibition de celui-ci empêche la totalité des effets du FXII.

Enfin nous pouvons observer que même si le FXII et l' α FXIIa-PPACK ne permettent peut-être pas la conversion de l'HGF, ils permettent tout de même la phosphorylation du récepteur MET (**Etude 1, Figure 6C et 6E, Suppl. 1C**). Ainsi la phosphorylation du récepteur MET semble dépendante ou indépendante de la fixation de son ligand.

4) Coopération EGFR/MET dans l'apoptose neuronale médiée par le FXII

Le FXII nécessite la phosphorylation du récepteur EGFR et provoque la phosphorylation du récepteur MET. L'activité tyrosine kinase de ces récepteurs aboutit à une phosphorylation des protéines signalétiques MAPK Erk 1 et 2, une diminution de la protéine pro-apoptotique Bax et une augmentation de la protéine anti-apoptotique Bcl-2 (**Etude 1, Figure 3**).

Le FXII permet donc une coopération des récepteurs MET/EGFR dans l'apoptose neuronale. La coopération entre ces deux récepteurs est déjà établie dans la littérature dans d'autres contextes. En cancérologie, l'inhibition du récepteur EGFR est palliée par la surexpression d'HGF et par conséquent la suractivation du récepteur MET (Yano et al., 2008 ; Mueller et al., 2008). En revanche dans notre étude nous observons que l'inhibition de l'un des deux récepteurs n'est pas compensée par l'activation de l'autre. En effet l'activation du récepteur EGFR semble nécessaire puisque le β FXIIa ne présente pas d'effet mais une inhibition de la phosphorylation du récepteur MET empêche également l'effet. Notre étude montre qu'en plus de coopérer, les récepteurs EGFR et MET travaillent en synergie et sont nécessaires l'un à l'autre.

L'ancrage du FXII sur le récepteur EGF pourrait permettre une diaphonie des récepteurs EGFR/MET. Yamamoto et collaborateurs ont observé que la phosphorylation du récepteur MET pouvait se faire par l'une des tyrosine kinases du récepteur EGFR, il s'agirait ici d'une activation directe du récepteur MET par le récepteur EGF (Yamamoto et al., 2006). Mais plus récemment, Breindel et collaborateurs ont montré que les protéines signalétiques MAPK activées par le récepteur EGFR augmentaient le recrutement de MET à la membrane et activaient sa phosphorylation (Breindel et al., 2013). Il s'agirait donc dans cette étude d'une activation indirecte du récepteur MET par le récepteur EGFR (Breindel et al., 2013). Nous

avons observé dans notre étude que l'inhibition des MAPK Erk par le SCH772984, bloque le rôle du FXII dans la survie neuronale (**Etude 1, Figure 3**). Ainsi nos résultats amènent à se demander si les protéines partenaires MAPK Erk 1 et 2 ne permettent pas le recrutement du récepteur MET par EGFR. Il serait donc intéressant de tester cette hypothèse en regardant la proximité des récepteurs MET et EGFR dans nos cultures par la technique de PLA (*Proximity ligation assay*) (Bertrand et al., 2015).

De plus l'activité protéase de l'HGF semble également nécessaire à l'effet anti-apoptotique de l' α FXIIa puisque le blocage du domaine catalytique de l'HGF par l'anticorps sc1356 empêche l'effet anti-apoptotique de l' α FXIIa (**Etude 1, Figure 5A**). Il a été montré *in vitro* que l'HGF était l'un des ligands du récepteur EGFR et permettait son activation et le recrutement à la membrane des récepteurs MET et EGFR (Reznik et al., 2008). Ainsi dans notre modèle, l'HGF présent dans le milieu de culture pourrait permettre l'activation en simultanée des récepteurs MET et EGFR, le recrutement du récepteur EGFR à la membrane, avec une affinité toutefois plus élevée pour le récepteur MET.

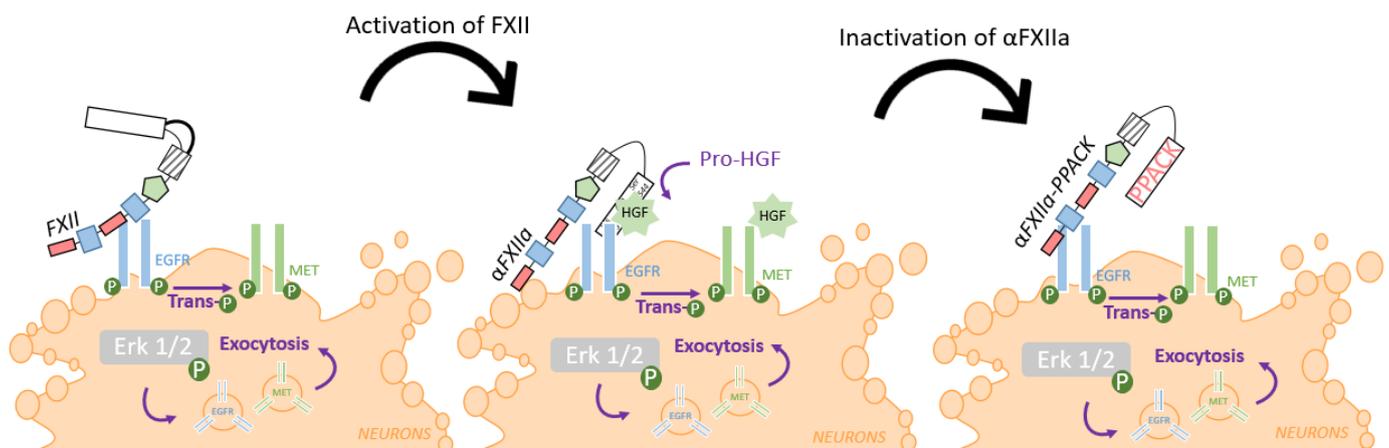


Figure 41 : Hypothèse de l'action du FXII simple chaîne, de la forme active α FXIIa et de la forme inactivée α FXIIa-PPACK, sur la coopération EGFR/MET.

5) Limites de cette étude *in vitro*

Si ce modèle *in vitro* est particulièrement intéressant pour étudier l'apoptose neuronale et identifier les mécanismes d'action du FXII, il néglige toutefois les autres types de mort neuronale tels que l'excitotoxicité, type de mort nécrotique. Or en physiologie il existe un chevauchement entre ces différentes morts, appelé « continuum apoptose-nécrose » (Raffray

and Cohen, 1997 ; Fujikawa, 2015). Nous avons donc voulu regarder les effets du FXII sur l'excitotoxicité et la nécrose neuronale.

Un excès de glutamate, principal neurotransmetteur excitateur du cerveau chez les vertébrés, est à l'origine d'une mort neuronale dite « excitotoxique ». Ce type de mort peut être rencontré dans les mêmes pathologies que l'apoptose telles que les AVC, et la SEP (Mehta et al., 2012). L'équipe Phind U1237 a identifié que le tPA interagissait avec le récepteur NMDA, récepteur glutamatergique, *via* son domaine kringle 2 et son domaine catalytique, (Nicole et al., 2001). Le tPA s'est donc révélé excitotoxique par l'augmentation de l'influx calcique des neurones. Le tPA apparaît donc à la fois excitotoxique et antiapoptotique *in vitro* (Correa et al., 2011 ; Benchenane et al., 2005).

L'un des modèles de mort neuronale excitotoxique couramment utilisé dans le laboratoire Phind U1237 est le modèle OGD (*Oxygen Glucose Deprivation*). Ce modèle consiste en le sevrage en oxygène et en glucose des neurones. Ce modèle peut être aussi bien utilisé sur cultures primaires que sur tranche de cerveau (Louessard et al., 2017 ; Lemarchand et al., 2016).

Les études de l'effet du FXII en OGD sont « en cours ». Nous avons sevré deux plaques de neurones corticaux murins matures d'oxygène et de glucose (OGD) et nous les avons traités avec des doses croissantes de FXII. Il semble que le FXII augmente la mort neuronale en OGD. Il serait intéressant de poursuivre cette étude afin d'infirmier ou confirmer ce résultat (Figure 42).

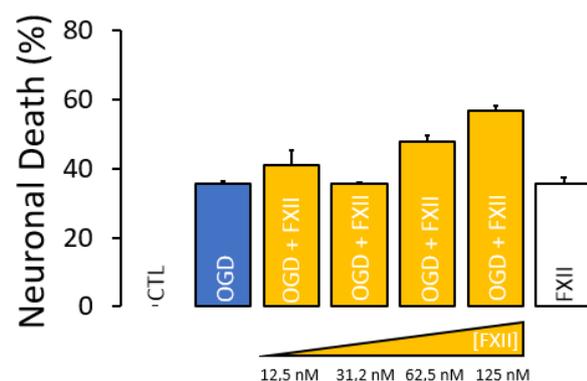


Figure 42 : Effet du FXII lors d'un modèle de nécrose neuronale (OGD).

Quantification de la mort neuronale 2H30 après réoxygénation en OGD en présence de 12.5 – 31.2 – 62.5 – 125 nM de FXII (n = 2).

6) Pertinence *in vivo* des mécanismes décrits

Nous avons pu identifier un rôle anti-apoptotique du FXII dans un modèle *in vitro* d'apoptose neuronale. L'apoptose s'opère *in vivo* aussi bien dans un contexte physiologique (développement par exemple) que pathologique (au cours des atteintes du SNC). Dans un contexte physiologique, la balance apoptose/mitose est finement régulée afin de maintenir l'homéostasie chez l'adulte (Renehan et al., 2001). Toutefois l'apoptose cérébrale physiologique peut être augmentée au cours du développement. D'autre part, l'apoptose neuronale se révèle également augmentée lors de pathologies du SNC telles que l'AD, les AVC et la SEP.

a) Pertinence du mécanisme anti-apoptotique du FXII en physiologie

Une étude a identifié une expression du FXII au niveau de la moelle épinière de souris (Göbel et al., 2014). Toutefois l'immunohistochimie réalisée n'indique pas le type cellulaire impliqué (Göbel et al., 2014). Notre seconde étude a permis d'identifier une expression du FXII dans les différentes régions cérébrales notamment au niveau des neurones corticaux (Etude 2, Figure 32). Le FXII est clivé protéolytiquement par l' α -Kallikréine ou le HK (Kaplan et Silverberg, 1987). Ces deux sérines

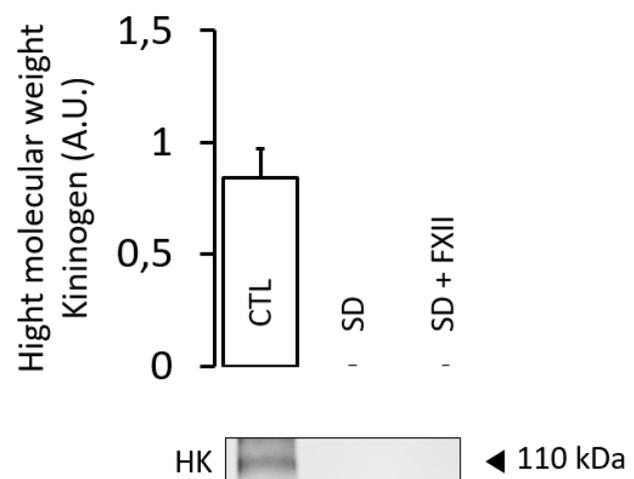


Figure 43 : Immunoempreinte du Kininogène de haut poids moléculaire (HK).

20 μ L de surnageant en condition contrôle avec sera, condition SD et condition SD + 125 nM de FXII (n = 3).

protéases sont déjà décrites comme exprimées dans le SNC, notamment au niveau des neurones corticaux chez le rat (Kizuki et al., 1993 ; Raidoo et al., 1996 ; Takano et al., 1999). Ainsi les différentes formes de FXII : la forme simple chaîne, la forme double chaîne α FXIIa et la forme tronquée β FXIIa pourraient être présentes au sein du SNC. Dans le modèle SD d'apoptose neuronale, l'expression du HK n'a pas été observée (Figure 43). Ainsi il serait

intéressant d'étudier l'expression de l' α -Kallikréine et il pourrait être envisagé un cotraitement du FXII avec ses différents activateurs pour voir leurs effets conjoints sur l'apoptose.

L'expression du FXII est augmentée au cours du développement au niveau du cortex, du cervelet et du striatum (**Etude 2, Figure 35**). De plus l'étude 1 a permis d'établir *in vitro* un rôle antiapoptotique de la voie FXII/EGFR/MET sur les neurones en développement. Les souris déplétées en EGFR ne sont pas viables, elles développent une neurodégénérescence d'étiologie inconnue affectant exclusivement le cortex frontal et les bulbes olfactifs (**Sibilia et al., 1998**). La voie FXII/EGFR pourrait être impliquée dans le développement des neurones corticaux. Il serait donc intéressant d'étudier le rôle du FXII cérébral lors de la corticogénèse. Une déplétion de l'EGFR au niveau des astrocytes corticaux entraîne leur apoptose ce qui conduit à une mort neuronale corticale (**Wagner et al., 2006**). Il serait donc intéressant de tester l'effet du FXII sur l'apoptose des astrocytes corticaux.

La signalisation HGF/MET a été montrée comme bénéfique lors du développement des neuroblastes, cellules nerveuses embryonnaires (**Maina et al., 1998**). Cette voie permet de diminuer la mort apoptotique des neurones en développement. Ainsi le mécanisme anti-apoptotique du FXII passant par la voie HGF/MET pourrait être impliqué dans la survie des neuroblastes.

Toutefois l'apoptose développementale au niveau du SNC est surtout décrite pour l'optimisation des connexions synaptiques, l'élimination des neurones inutiles et par conséquent la formation des réseaux neuronaux (**Glebova et Ginty, 2005**). Ainsi l'apoptose au cours du développement cérébral apparaît comme bénéfique. Le mécanisme anti-apoptotique de la voie FXII/EGFR/MET décrit pourrait donc s'avérer délétère au développement cérébral.

a) Pertinence du mécanisme anti-apoptotique du FXII en pathologie

Les modèles animaux d'AVC ischémique, d'AD et de SEP présentent une rupture de la BHE (**Sweeney et al., 2018 ; Fournier et al., 2017 ; Haley et Lawrence, 2017**). Ainsi nous pouvons

considérer dans ces trois modèles de pathologies cérébrales que le FXII circulant comme le FXII cérébral peuvent être présents dans le parenchyme et entrer en contact avec les neurones, et ceci au même titre que ses activateurs.

Les domaines catalytique et fibronectine de type 2 du FXII ont été identifiés comme délétères dans des pathologies touchant le SNC. Ses activités pro-coagulante et pro-inflammatoire, médiées par son activité catalytique, ont été montrées comme favorisant une neuroinflammation et une neurodégénération, conduisant à un déclin cognitif chez des souris doubles mutantes PS/APP, modèle murin de l'AD (Chen et al., 2017). La génération de Fibrine par le FXII mais également le système Kallikréine-Kinine augmentent le volume de lésion après l'occlusion de l'artère cérébrale moyenne chez la souris (Kleinschnitz et al., 2006 ; Langhauser et al., 2012). Enfin l'interaction du domaine fibronectine de type 2 du FXII avec le récepteur à l'uPA présent à la surface des cellules dendritiques a été établie comme stimulant la génération de lymphocytes TH17 dans un modèle murin de SEP (Göbel et al., 2016). Ces effets sont associés à une augmentation d'expression du FXII au niveau plasmatique chez l'homme, dans le cas de l'AD et de la SEP (Zamolodchikov et al., 2015 ; Ziolotto et al., 2018). Les auteurs de ces différents papiers en ont conclu que l'inhibition du FXII pourrait être bénéfique dans ces différentes pathologies cérébrales.

L'apoptose est également décrite comme impliquée dans ces mêmes pathologies cérébrales. En effet l'apoptose des lymphocytes circulants est bénéfique lors de la SEP, elle permet leur élimination et ainsi réduit l'inflammation cérébrale (Schmied et al., 1993). En opposition, l'apoptose cérébrale semble délétère dans la SEP car le blocage de l'apoptose des oligodendrocytes permettrait une remyélinisation dans l'EAE (Caprariello et al., 2012 ; Akassoglou et al., 1998 ; Valentin-Torres et al., 2018).

Si jusqu'alors l'expression du FXII autre qu'hépatique a été peu étudiée et notamment au niveau du SNC, elle a été seulement suggérée dans la moelle épinière de souris (Göbel et al., 2016), notre seconde étude a permis d'identifier son expression transcriptionnelle et protéique dans le parenchyme cérébral (Etude 2, Figure 31, 32, 33, 34). Nous pouvons donc différencier le FXII circulant et le FXII parenchymateux. Ainsi la voie anti-apoptotique FXII/EGFR/MET sur les neurones corticaux pourrait être bénéfique dans ces différentes pathologies cérébrales. Il serait donc intéressant d'étudier la délétion du FXII uniquement au

niveau du foie, maintenant ainsi le FXII parenchymateux, et d'observer les effets sur l'apoptose dans l'EAE, modèle murin de SEP. Le modèle d'EAE pourrait donc être réalisé non pas chez les souris déficientes en FXII (F12^{-/-}) comme dans l'étude de Göbel et collaborateurs, mais chez des souris siRNA pour le FXII hépatique comme dans l'étude de Chen et collaborateurs (Göbel et al., 2016 ; Chen et al., 2017).

De plus l'apoptose s'est avérée néfaste dans l'AD. Elle entraîne une mort apoptotique des neurones et ainsi contribue à la neurodégénérescence (Nikolaev et al., 2009 ; Yang et al., 2008). L'étude de Strickland a montré que la délétion du FXII hépatique était bénéfique dans l'AD en empêchant la génération de BK. Ils en ont donc conclu que la délétion en FXII serait bénéfique (Ivanov et al., 2017). Toutefois notre étude suggère que le FXII pourrait diminuer la mort apoptotique décrite dans l'AD. Ainsi il serait intéressant d'une part d'étudier le rôle du FXII sur l'apoptose dans des modèles d'AD et d'autre part d'inhiber uniquement la BK et empêcher ainsi l'ouverture de la BHE et l'entrée de BK et fibrine dans le parenchyme.

Enfin l'apoptose neuronale est également nocive dans les AVC ischémiques en contribuant à la mort neuronale tardive (Dirnagl et al., 1999). Toutefois les études précliniques ne sont pas en adéquation avec les études cliniques. Si les études précliniques, réalisées en utilisant les modèles d'occlusion de l'artère cérébrale moyenne par filament, montrent un rôle délétère du FXII dans les AVC ischémiques, l'étude des niveaux plasmatiques de FXII montre une corrélation entre le taux de FXII circulant et les AVC hémorragiques et non pas les AVC ischémiques (Kleinschnitz et al., 2006 ; Johansson et al., 2017). Il serait donc intéressant de réétudier l'impact du FXII circulant en faisant varier les types de modèles animaux d'AVC ischémiques. Le laboratoire Phind U1237 a notamment mis au point un modèle d'occlusion de l'artère cérébrale moyenne par l'injection de thrombine, mimant ainsi une activation pathologique de la voie commune de la coagulation (Orset et al., 2007). Ce modèle pourrait permettre l'étude de l'activation pathologique de la voie intrinsèque de la coagulation par le FXII.

7) Perspectives de l'étude

Ces études ont permis pour la toute première fois d'observer une expression du FXII par les neurones et de visualiser un rôle du FXII sur l'apoptose des neurones corticaux murins. Ces recherches sur le FXII amènent à se poser la question d'un potentiel rôle du FXII cérébral au cours de la corticogénèse. De plus, jusqu'à présent la communauté scientifique considère que l'inhibition du FXII dans les pathologies cérébrales telles que l'AD, la SEP et les AVC serait bénéfique. Mais ces travaux amènent à différencier les rôles du FXII circulant et du FXII cérébral. En effet, ils ne présentent pas les mêmes conséquences : si le FXII circulant apparaît plutôt délétère, le FXII cérébral, en inhibant l'apoptose neuronale, apparaîtrait comme bénéfique dans ces pathologies.

BIBLIOGRAPHIE

BIBLIOGRAPHIE

A

Akassoglou K., Bauer J., Pasparakis M., Lassmann H., Kollias G. and Probert L., 'Oligodendrocyte Apoptosis and Primary Demyelination Induced by Local TNF / p55TNF Receptor Signaling in the Central Nervous System of Transgenic Mice Models for Multiple Sclerosis with Primary', *American Journal of Pathology* 153(1998), 801–813

Akpan A., Serrano-saiz E., Zacharia B., Otten M., Snipas S., Liu W., Velloza J., Cohen G., Sosunov S., Frey II W., Salvesen G., Connolly S. and Troy C, 'Intranasal delivery of caspase-9 inhibitor reduces caspase-6dependent axon/neuron loss and improves neurological function after stroke', *Journal of Neurosciences* 31(2011), 8894–8904

Asano K., Miwa M/ ; Miwa K., Hanayam E., Nagase H., Nagata S. and Tanaka M., 'Masking of Phosphatidylserine Inhibits Apoptotic Cell Engulfment and Induces Autoantibody Production in Mice' *The Journal of Experimental Medicine* 200(2004), 459-467

B

Baeriswyl V., Calzavarini S., Gerschheimer S., Diderich P., Angelillo-scherrer A. and Heinis C., 'Development of a Selective Peptide Macrocyclic Inhibitor of Coagulation Factor XII toward the Generation of a Safe Antithrombotic Therapy', *Journal of medicinal chemistry* 56(2013), 3742-3746

Banno E., Togashi Y., Kobayashi Y., Hayashi H., Mitsudomi T. and Nishio K., 'Afatinib Is Especially Effective Against Non-Small Cell Lung Cancer Carrying an EGFR Exon 19 Deletion', *Anticancer research* 35(2015), 2005–2008

Bartus R., Elliott P., Hayward N., Dean R., McEwen E., and Fisher S., 'Permeability of the Blood Brain Barrier by the Bradykinin Agonist, RMP-7: Evidence for a Sensitive, Auto-Regulated, Receptor-Mediated System', *Immunopharmacology* 33(1996), 270–278

Basanez G., Nechushtan A., Chanturiya A., Choe E., Tutt S., Wood A., Hsu Y., Zimmerberg J. and Youle R., 'Bax, but not Bcl-xL, decreases the lifetime of planar phospholipid bilayer membranes at subnanomolar concentrations', *Proceedings of the National Academy of Sciences* 96(1999), 5492–5497

Benchenane K., Berezowski V., Fernandez-Monreal M., Brillault J., Valable S., Dehouck M., Cecchelli R., Vivien D., Touzani O., and Ali C., '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(2005), 1059-1064

Benchoua A., Gue C., Hosseini H., Sampai N., Morin D. and Onténiente B., 'Specific Caspase Pathways Are Activated in the Two Stages of Cerebral Infarction', *The journal of Neuroscience* 21(2001), 7127–7134

Beringer D., et Kroon-Batenburg L., 'The structure of the F₁-EGF-like tandem domain of coagulation Factor XII solved using SIRAS', *Acta Crystallographica* 69(2013), 94-102

Bertrand T., Lesept F., Chevilly A., Lenoir S., Aimable M., Briens A., Hommet Y., Bardou I., Parcq J. and Vivien D., 'Conformations of Tissue Plasminogen Activator (tPA) Orchestrate Neuronal Survival by a Crosstalk between EGFR and NMDAR', *Cell death and disease* 6(2015), 1–9

Borner C. and Monney L., 'Apoptosis without Caspases : An Inefficient Molecular Guillotine ?', *Cell death and differentiation* 6(1999), 497–507

Bradford H., Pixley R., and Colman R., 'Human Factor XII Binding to the Glycoprotein Ib-IX-V Complex Inhibits Thrombin-Induced Platelet Aggregation', *The journal of biological chemistry* 275(2000), 22756–22763

Breindel J., Haskins J., Cowell E., Zhao M., Nguyen D., and Stern D., 'EGF Receptor activates MET through MAP kinases to enhance non-small cell lung carcinoma invasion and brain metastasis', *Cancer research* 73(2013), 5053–5065

Brenner S., 'The Genetics of *Caenorhabditis Elegans*', *Genetics* 77(1974), 71–94

Briens A., Bardou I., Lebas H., Miles L., Parmer R., Vivien D., and Docagne F., 'Astrocytes Regulate the Balance between Plasminogen Activation and Plasmin Clearance via Cell-Surface Actin', *Cell Discovery* 3(2017), 1–18

C

Cao G., Luo Y., Nagayama T., Pei W., Stetler A., Graham S., and Chen J., 'Cloning and Characterization of Rat Caspase-9 : Implications for a Role in Mediating Caspase-3 Activation and Hippocampal Cell Death After Transient Cerebral Ischemia', *Journal of cerebral Blood flow and metabolism* 22(2002), 534–546

Caprariello A., Mangla S., Miller R., and Selkirk S., 'Apoptosis of oligodendrocytes in the CNS results un rapid focal demyelination', *Annals of Neurology* 72(2012), 395-405

Cassé F., Bardou I., Danglot L., Briens A., Montagne A., Parcq J., Alahari A., Glli T., Vivien D., et Docagne F., 'Glutamate Controls tPA Recycling by Astrocytes, Which in Turn Influences Glutamatergic Signals', *The Journal of Neuroscience* 32(2012), 5186-5199

Cecconi F., Alvarez-bolado g., Meyer B., Roth K. and Gruss P. 'Apaf1 (CED-4 Homolog) Regulates Programmed Cell Death in Mammalian Development', *Cell* 94(1998), 727–737

Chen Z., Revenko A., Singh P., Macleod R., Norris E. and Strickland S., 'Depletion of Coagulation Factor XII Ameliorates Brain Pathology and Cognitive Impairment in Alzheimer Disease Mice', *Blood* 129(2017), 2547–2556

Chien P., Pixley R., Stumpo L., Colman R. and Schreiber A., 'Modulation of the Human Monocyte Binding Site for Monomeric Immunoglobulin G by Activated Hageman Factor', *Journal of Clinical Investigation* 82(1988), 1554–1559

Citarella F., Fedele G., Roem D., Fantoni A. and Hack E., 'The Second Exon-Encoded Factor XII Region Is Involved in the Interaction of Factor XII With Factor XI and Does Not Contribute to the Binding Site for Negatively Charged Surfaces', *Blood* 92(1998), 4198–4206

Citarella F., Ravon D., Pascucci B., Felici A., Fantoni A. and Hack E., 'Structure / Function Analysis of Human Factor XI1 Using Recombinant Deletion Mutants Evidence for an Additional Region Involved in the Binding to Negatively Charged Surfaces', *European Journal of Biochemistry* 238(1996), 240–249

Cochrane C., Revak D., Wuepper K., 'Activation Of Hageman Factor In Solid And Fluid Phases', *Thr journal of experimental medecine* 138(1973), 1564-1583

Collen D., Lijnen H., 'Basic and Clinical Aspects of Fibrinolysis and Thrombolysis', *Blood* 78(1991), 3114–3124

Colman R. 'Activation of plasminogen by human plasma kallikrein', *Biochemical and biophysical research communications* 35(1969), 273–279

Compston A., and Coles A., 'Multiple Sclerosis', *Lancet* 372(2008), 1502-1517

Cool DE., Edgell CJ., Louie GV., Zoller MJ., Brayer GD., and MacGillivray RT., 'Characterization of human blood coagulation factor XII cDNA. Prediction of the primary

structure of factor XII and the tertiary structure of beta-factor XIIa' *The Journal of Biological Chemistry* 260(1985), 13666-13676

Correa F., Gauberti M., Parcq J., Macrez R., Hommet Y., Obiang P., and Hernangomez M., Montagne A., Liot G., Guaza C., Maubert E., Ali C., Vivien D. and Docagne F., 'Tissue Plasminogen Activator Prevents White Matter Damage Following Stroke.', *The Journal of Experimental Medicine* 208(2011), 1229–1242

Cossarizza A., Kalashnikova G., Grassilli E., Chiappelli F., Salvioli S., Capri M., Barbieri D., Troiano L., Monti D. and Franceschi C., *Experimental cell research* 214(1994), 323-330
Cotman C. and Su J., 'Mechanisms of Neuronal Death in Alzheimer's Disease', *Brain pathology* 506(1996), 493–506

Cotman C. and Sur J., 'Mechanisms of Neuronal Death in Alzheimer's Disease' *Brain Pathology* 6(1996), 493-506

Coultas L., Terzano S., Thomas T., Voss A., Reid K., Stanley E., Scott C., Bouillet P., Bartlett P., Ham J., Admas J. and Strasser A., 'Hrk/DP5 contributes to the apoptosis of select neuronal populations but is dispensable for haematopoietic cell apoptosis', *Journal of Cell Science* 120(2007), 2044–2052

Cowan M., Fawcett J., Leary D. and Stanfield b., 'Regressive Events in Neurogenesis', *Science* 225(1984), 1258-1265

Czabotar P., Lessene G., Strasser A. and Adams J., 'Control of Apoptosis by the BCL-2 Protein Family : Implications for Physiology and Therapy', *Cell death and autophagy* 15(2014), 49–63

D

Davie E., and Ratnoff O., 'Waterfall Sequence for Intrinsic Blood Clotting', *Science* 145(1964), 1310-1312

Davis A., Lu F., and Mejia P., 'C1 inhibitor, a multi-functional serine protease inhibitor', *Thrombosis and Haemostasis* 104(2010), 886-893

DeCathelineau A., and Henson P., 'The final step in programmed cell death : phagocytes carry apoptotic cells to the grave', *The biochemical Society* 39(2003), 105-117

Deckwerth T., Elliott J., Knudson M., Johnson E., Snider W. and Korsmeyer S., 'BAX Is Required for Neuronal Death after Trophic Factor Deprivation and during Development', *The Biochemical Society* 39(2003), 105-117

Deckwerth T., Elliott J., Knudson M., Johnson E., Snider W. and Korsmeyer S., ' BAX is required for neuronal death after trophic factor deprivation and during development', *Neuron* 17(1996), 401-411

Decrem Y., Rath G., Blasioli V., Cauchie P., Robert S., Beaufays J., Frère J., Feron O., Dogné J., Dessy C., Vanhamme L. and Godfroid E., 'Ir-CPI, a Coagulation Contact Phase Inhibitor from the Tick *Ixodes Ricinus*, Inhibits Thrombus Formation without Impairing Hemostasis', *The journal of experimental medicine* 206(2009), 2381-2395

Dendrou C., Fugger L. and Friese M., 'Immunopathology of Multiple Sclerosis', *Nature review Immunology* 15(2015), 545–558

Deshmukh M. and Johnson E., 'Evidence of a Novel Event during Neuronal Death : Development of Competence-to-Die in Response to Cytoplasmic Cytochrome c', *Neuron* 21(1998), 695–705

Dirnagl U., Iadecola C. and Moskowitz M., 'Pathobiology of Ischaemic Stroke : An Integrated View', *Trends in Neurosciences* 22(1999), 391–396

Dulak A., Gubish C., Stabile L., Henry C., and Siegfried J., 'HGF-independent Potentiation of EGFR Action by c-MET', *Oncogene* 30(2011), 3625-3635

Dunn J., Silverberg M., and Kaplan A., 'The Cleavage and Formation of Activated Human Hageman Factor by Autodigestion and by Kallikrein', *The journal of biological chemistry* 257(1982), 1779–1784

E

Ellis R., Yuan J., and Horvitz R., 'Mechanisms and Functions of Cell Death', *Annual Review of Cell and Developmental Biology* 7(1991), 663-698

Enari M., Sakahira H., Yokoyama H., Okawa K., Iwamatsu A. and Nagata S., 'A Caspase-Activated DNase That Degrades DNA during Apoptosis', *Nature* 393(1998), 43-50

Endres M., Namura S., Shimizu-sasamata M., Waeber C., Zhang L., Gomez-izla T., Hyman B. and Moskowitz M., 'Attenuation of Delayed Neuronal Death After Mild Focal Ischemia in Mice by Inhibition of the Caspase Family', *Journal of cerebral blood flow and metabolism* 18(1998), 238–247

Esnouf P., Burgess A., Dodds A., Sarphie A., and Miller G., 'A Monoclonal Antibody Raised against Human β -factor XIIIa which also Recognizes α -factor XIIIa but not Factor XII or Complexes of Factor XIIIa with C1 Esterase Inhibitor', *Thrombosis and Haemostasis* 83(2000), 874-881

F

Farber J. and Mofty S., 'The biochemical Pathology of Liver Cell Necrosis', *American Journal of Pathology* 81(1975), 237-250

Fadok V., Bralton D., Rose D., Pearson A., Ezekewitz A., and Henson P., 'A Receptor for Phosphatidylserine Clearance of Apoptotic Cells', *Nature* 405(2000), 85–90

Fadok V., DeCathelineau A., Daleke D., Henson P. and Bratton D., 'Loss of Phospholipid Asymmetry and Surface Exposure of Phosphatidylserine Is Required for Phagocytosis of Apoptotic Cells by Macrophages and Fibroblasts', *The journal of biological chemistry* 276(2001), 1071–1077

Fadok V., Voelker D., Campbell P., Cohen J., Bratton D., and Henson P., 'Exposure of phosphatidylserine on the surface of apoptotic lymphocytes triggers specific recognition and removal by macrophages', *The Journal of Immunology* 148(1992), 2207-2216

Farber J. and El-mofty S., 'The Biochemical Pathology of Liver Cell Necrosis', *Am J Pathol* 81(1975), 237–50

Fernandez-Monreal M., Lopez-Atalaya J., Benchenane K., Leveillé F., Cacquevel M., Plawinski L., MacKenzie E., Bu G., Buisson A., and Vivien D., 'Is Tissue-Type Plasminogen Activator a Neuromodulator ?', *Molecular and Cellular Neuroscience* 25(2004), 594–601

Fink K., Zhu J., Namura S., Shimizu-sasamata M., Endres M., Ma J., Dalkara T., Yuan J. and Moskowitz A., 'Prolonged Therapeutic Window for Ischemic Brain Damage Caused by Delayed Caspase Activation', *Journal of cerebral blood flow and metabolism* 24(1998), 1071–1076

Formichi P., Tripodi B., Tosi P., and Federico A., 'Apoptotic response and cell cycle transition in ataxia telangiectasia cells exposed to oxidative stress', *Life sciences* 66(2000), 1893–1903

Fournier A., Quenault A., Martinez de Lizarrondo S., Gauberti M., Defer G., Vivien D., Docagne F., and Macrez R., 'Prediction of disease activity in models of multiple sclerosis by molecular resonance imaging of P-selectin' *Proceedings of the National Academy of Sciences* 114(2017), 6116-6121

Fowler B., Mackman N., Parmer R. and Miles L., 'Binding of Human Single Chain Urokinase to Chinese Hamster Ovary Cells and Cloning of Hamster u-PAR', *Thrombosis and Haemostasis* 80(1998), 148-154

Fujikawa D., 'The Role of Excitotoxic Programmed Necrosis in Acute Brain Injury', *Computational and Structural Biotechnology Journal* 13(2015), 212–221

Furie B., 'Pathogenesis of Thrombosis', *Hematology* 2009, 255-258

Furie B., and Furie C., 'In Vivo Thrombus Formation', *Journal of thrombosis and haemostasis* 5(2007), 12–17

G

Gak E., Taylor W., Chan A., and Rubin J., 'Processing of hepatocyte growth factor to the heterodimeric form is required for biological activity', *The Federation of European Biochemical Societies* 311(1992), 17-21

Gervais FG1, Xu D, Robertson GS, Vaillancourt JP, Zhu Y, Huang J, LeBlanc A, Smith D, Rigby M, Shearman MS, Clarke EE, Zheng H, Van Der Ploeg LH, Ruffolo SC, Thornberry NA,

Xanthoudakis S, Zamboni RJ, Roy S, Nicholson DW., 'Involvement of Caspases in Proteolytic Cleavage of Alzheimer's Amyloid- β Precursor Protein and Amyloidogenic A β Peptide Formation', *Cell* 97(1999), 395–406

Gherardi E., Birchmeier W., Birchmeier C., and Woude G., 'Targeting MET in cancer : rationale and progress', *Nature reviews Cancer* 12(2012), 89-103

Ghosh A. Cape J., Klocke B. and Roth K., 'Deficiency of Pro-Apoptotic Hrk Attenuates Programmed Cell Death in the Developing Murine Nervous System but Does Not Affect Bcl-X Deficiency-Induced Neuron Apoptosis', *Journal of Histochemistry and cytometry* 59(2011), 976-983

Glebova N., and Ginty D., 'Growth and Survival Signals Controlling Sympathetic Nervous System Development', *Annual Review of Neuroscience* 28(2005), 191-222

Göbel K., Pankratz S., Asaridou C., Herrmann A., Bittner S., Merker M., Ruck T., Glumm S., Langhauser F., Kraft P., Krug T., Breuer J., Herold M., Gross C., Beckmann D., Korb-Pap A., Schuhmann M., Kuerten S., Mitroulis I., Ruppert C., Nolte M., Panousis C., Klotz L., Kehrel B., Korn T., Langer H., Pap T., Nieswandt B., Wiendl H., Chavakis T., Kleinschnitz C., and Meutha S., 'Blood coagulation factor XII drives adaptive immunity during neuroinflammation via CD87-mediated modulation of dendritic cells', *Nature communications* 7(2016)

Gordon E., Venkatesan N., Salazar R, Tang H., Schmeidler-Sapiro K., Buckley S. Waburton D. and Hall F., 'Factor XII-Induced Mitogenesis Is Mediated via a Distinct Signal Transduction Pathway That Activates a Mitogen-Activated Protein Kinase.', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 93(1996), 2174–2179

Gould T., Vu T., Swystun L., Dwivedi D., Mai S., Weitz J., and Liaw P., 'Platelet-Independent Mechanisms', *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology* 34(2014), 1977-1984

Grasl-Kraupp B., Ruttkay-Nedecky B., Koudelka H., Bukowska K., Bursch W. and Schulte-Hermann R. 'In situ Detection of Fragmented DNA (TUNEL Assay) Fails to Discriminate Among Apoptosis, Necrosis, and Autolytic Cell Death : A Cautionary Note', *Hepatology* 1995, 1465-1468

Griffin J., 'Role of Surface in Surface-Dependent Activation of Hageman Factor (Blood Coagulation Factor XII)', *Proceedings of the National Academy of Sciences* 75(1978), 1998–2002

Guegan C., and Sola B., 'Early and Sequential Recruitment of Apoptotic Effectors after Focal Permanent Ischemia in Mice', *Brain Research* 856(2000), 93–100

Gurtu V, Kain S., and Zhang G., 'Fluorometric and Colorimetric Detection of Caspase Activity Associated with Apoptosis', *Analytical biochemistry* 251(1997), 98–102

H

Hagberg H., Mallard C., Rousset C., and Wang X., 'Apoptotic Mechanisms in the Immature Brain : Involvement of Mitochondria', *Journal of Child Neurology* 24(2009), 1141-1146

Hagedorn I., Schmidbauer S., Pleines I., Kleinschnitz C., Kronthaler U., Stoll G., Dickneite G., and Nieswandt B., 'Factor XIIa Inhibitor Recombinant Human Albumin Infestin-4 Abolishes Occlusive Arterial Thrombus Formation Without Affecting Bleeding', *Circulation* 121(2010), 1510-1517

Haley M., and Lawrence C, 'The blood-brain barrier after stroke : Structural studies and the role of transcytotic vesicles' *Journal of Cerebral Blood Flow and Metabolism* 37(2017), 456-470

Ham J., Towers E., Gilley J., Terzano S., and Randall R., 'BH3-Only Proteins : Key Regulators of Neuronal Apoptosis', *Cell death and differentiation* 12(2005), 1015–1020

Hangen E., Blomgren K., Be P., and Modjtahedi N., 'Life with or without AIF', *Trends in Biochemical Sciences* 35(2010), 278–287

Harman D., 'Free Radical Theory of Aging', *Mutation research* 275(1992), 257–66

Hayashi K., Morishita R., Nakagami H., Yoshimura S., Hara A., Matsumoto K., Nakamura T., Ogihara T., Kaneda Y. and Sakai N., 'Gene Therapy for Preventing Neuronal Death Using Hepatocyte Growth Factor: In Vivo Gene Transfer of HGF to Subarachnoid Space Prevents Delayed Neuronal Death in Gerbil Hippocampal CA1 Neurons', *Gene therapy* 8(2001), 1167–1173

He F., Wu L., Shu K., Liu F., Yang L., and Zhou X., 'HGF Protects Cultured Cortical Neurons against Hypoxia / Reoxygenation Induced Cell Injury via ERK1 / 2 and PI-3K / Akt Pathways', *Biointerfaces* 61(2008), 290–297

Heemskerk J., Bevers E., and Lindhout T., 'Platelet Activation and Blood Coagulation', *Thrombosis and Haemostasis* 88(2002), 186–194

Hingorani R., Deng J., Elia J., McIntyre C., and Mittar D., 'Detection of Apoptosis Using the BD Annexin V FITC Assay on the BD FACSVerser™ System', *BD Biosciences* 2011

Hirata H., Takahashi A., Kobayashi S., Yonehara S., Sawai H., Okazaki T., Yamamoto K., and Sasada M., 'Caspases Are Activated in a Branched Protease Cascade and Control Distinct Downstream Processes in Fas-Induced Apoptosis', *Journal of Experimental Medicine* 187(1998), 587-600

Hojima Y., Pierce J. and Pisano J., 'Hageman Factor Fragment Inhibitor In Corn Seeds Purification And Characterization', *Thrombosis Research* 20(1980), 149-162

Holmström K., Marina N., Baev A., Wood N., Gourine A., and Abramov A., 'Signalling Properties of Inorganic Polyphosphate in the Mammalian Brain.', *Nature Communications* 4 : 1362 (2013)

Hoylaerts M., Rijken D., Lijnen H., and Collen D., 'Kinetics of the Activation of Plasminogen by Human Tissue Plasminogen Activator', *The Journal of biological chemistry* 257(1982), 2912–2919



Ientile R., Macaione V., Teletta M., Pedale S., Torre V., and Macaione S., 'Apoptosis and Necrosis Occurring in Excitotoxic Cell Death in Isolated Chick Embryo Retina', *Journal of Neurochemistry* 79(2001), 71–78

International Multiple Sclerosis Genetics Consortium (IMSGC)¹, Beecham AH, Patsopoulos NA, Xifara DK, Davis MF, Kempainen A, Cotsapas C, Shah TS, Spencer C, Booth D, Goris A, Oturai A, Saarela J, Fontaine B, Hemmer B, Martin C, Zipp F, D'Alfonso S, Martinelli-Boneschi F, Taylor B, Harbo HF, Kockum I, Hillert J, Olsson T, Ban M, Oksenberg JR, Hintzen R, Barcellos LF; Wellcome Trust Case Control Consortium 2 (WTCCC2); International IBD Genetics Consortium (IIBDGC), Agliardi C, Alfredsson L, Alizadeh M, Anderson C, Andrews R, Søndergaard HB, Baker A, Band G, Baranzini SE, Barizzone N, Barrett J, Bellenguez C, Bergamaschi L, Bernardinelli L, Berthele A, Biberacher V, Binder TM, Blackburn H, Bomfim IL, Brambilla P, Broadley S, Brochet B, Brundin L, Buck D, Butzkueven H, Caillier SJ, Camu W, Carpentier W, Cavalla P, Celius EG, Coman I, Comi G, Corrado L, Cosemans L, Cournu-Rebeix I, Cree BA, Cusi D, Damotte V, Defer G, Delgado SR, Deloukas P, di Sapia A, Dilthey AT, Donnelly P, Dubois B, Duddy M, Edkins S, Elovaara I, Esposito F, Evangelou N, Fiddes B, Field J, Franke A, Freeman C, Frohlich IY, Galimberti D, Gieger C, Gourraud PA, Graetz C, Graham A, Grummel V, Guaschino C, Hadjixenofontos A, Hakonarson H, Halfpenny C, Hall G, Hall P, Hamsten A, Harley J, Harrower T, Hawkins C, Hellenthal G, Hillier C, Hobart J, Hoshi M, Hunt SE, Jagodic M, Jelčić I, Jochim A, Kendall B, Kermode A, Kilpatrick T, Koivisto K, Konidari I, Korn T, Kronsbein H, Langford C, Larsson M, Lathrop M, Lebrun-Frenay C, Lechner-Scott J, Lee MH, Leone MA,

Leppä V, Liberatore G, Lie BA, Lill CM, Lindén M, Link J, Luessi F, Lycke J, Macchiardi F, Männistö S, Manrique CP, Martin R, Martinelli V, Mason D, Mazibrada G, McCabe C, Mero IL, Mescheriakova J, Moutsianas L, Myhr KM, Nagels G, Nicholas R, Nilsson P, Piehl F, Pirinen M, Price SE, Quach H, Reunanen M, Robberecht W, Robertson NP, Rodegher M, Rog D, Salvetti M, Schnetz-Boutaud NC, Sellebjerg F, Selter RC, Schaefer C, Shaunak S, Shen L, Shields S, Siffrin V, Slee M, Sorensen PS, Sorosina M, Sospedra M, Spurkland A, Strange A, Sundqvist E, Thijs V, Thorpe J, Ticca A, Tienari P, van Duijn C, Visser EM, Vucic S, Westerlind H, Wiley JS, Wilkins A, Wilson JF, Winkelmann J, Zajicek J, Zindler E, Haines JL, Pericak-Vance MA, Ivinson AJ, Stewart G, Hafler D, Hauser SL, Compston A, McVean G, De Jager P, Sawcer SJ, McCauley JL., 'Analysis of immune-related loci identifies 48 new susceptibility variants for multiple sclerosis.', *Nat Genet* 45(2013), 1353–1360

Ishimaru Y., Gomez E., Zhang F., Martini-robles L., Iwata H., Sakurai T., Katakura K., Hashiguchi Y., and Kato H., 'Dimiconin, a Novel Coagulation Inhibitor from the Kissing Bug, *Triatoma Dimidiata*, a Vector of Chagas Disease', *The Journal of Experimental Biology* 215(2012), 3597–3602

Ito Y., and Otsuki Y., 'Localization of Apoptotic Cells in the Human Epidermis by an In Situ DNA Nick End-Labeling Method Using Confocal Reflectant Laser Microscopy', *The journal of histochemistry and cytochemistry* 46(1998), 783–786

Ivanov I., Matafonov A., Sun M., Cheng Q, Dickeson S., Verhamme I., Emsley J., and Gailani D., 'Proteolytic Properties of Single-Chain Factor XII : A Mechanism for Triggering Contact Activation', *Blood* 129(2017), 1527–1537

J

Jablonska E., Markart P., Zakrzewicz D., Preissner K., and Wygrecka M., 'Transforming Growth Factor- β 1 Induces Expression of Human Coagulation Factor XII via Smad3 and JNK

Signaling Pathways in Human Lung Fibroblasts', *The journal of biological chemistry* 285(2010), 11638–11651

Jackson S., Nesbitt W., and Westein E., 'Dynamics of Platelet Thrombus Formation', *Journal of thrombosis and haemostasis* 7(2009), 17–20

Jennings L., 'Role of Platelets in Atherothrombosis', *American Journal of Cardiology* 103(2009), 4A–10A

Jin K., Graham S., Mao X., Nagayama T., Simon R., and Greenberg D., 'Fas (CD95) May Mediate Delayed Cell Death in Hippocampal CA1 Sector After Global Cerebral Ischemia', *Journal of cerebral blood flow and metabolism* 21(2001), 1411–1421

Johansson K., Jansson J., Johansson L., Bylesjö I., Nilsson T., Eliasson M., Söderberg S., and Lind M., 'Factor XII as a Risk Marker for Hemorrhagic Stroke : A Prospective Cohort Study', *Cerebrovascular Diseases* 7(2017), 84–94

Ju L., and Zhou C., 'Association of Integrin beta1 and c-MET in Mediating EGFR TKI Gefitinib Resistance in Non-Small Cell Lung Cancer Association of Integrin beta1 and c-MET in Mediating EGFR TKI Gefitinib Resistance in Non-Small Cell Lung Cancer', *Cancer Cell international* 13(2013), 13-15

Jürgensmeier J., Xie Z., Deveraux Q., Ellerby L., Bredesen D. and Reed J., 'Bax Directly Induces Release of Cytochrome c from Isolated Mitochondria', *Proceedings of the National Academy of Sciences* 95(1998), 4997–5002

K

Kaplan P., and Silverberg M., 'The Coagulation-Kinin Pathway of Human Plasma', *Blood* 70(1987), 1-15

Kenne E. and Renné T., 'Factor XII : a drug target for safe interference with thrombosis and inflammation', *Drug Discovery Today* 19(2014), 1459-1464

Kerr J., Wyllie A., and Currie A., 'Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics', *Br J Cancer* 4(1972), 239-57

Kitamura Y., Shimohama S., Kamoshima W., Ota T., and Matsuoka Y., 'Alteration of Proteins Regulating Apoptosis, Bcl-2, Bcl-X, Bax, Bak, Bad, ICH-1 and CPP32, in Alzheimer's Disease', *Brain Research* 780(1998), 260–269

Kizuki K., Suzuki T., Kudo M., and Noguchi T., 'Immunohistochemical Demonstration of Tissue Kallikrein in the Neurons of Rat Brain', *Brain Res.* 634(1994), 305–309

Kleinschnitz C., Stoll G., Bendszus M., Schuh K., Pauer H., Burfeind P., Renné C., Gailani D., Nieswandt B., and Renné T., 'Targeting Coagulation Factor XII Provides Protection from Pathological Thrombosis in Cerebral Ischemia without Interfering with Hemostasis', *The Journal of Experimental Medicine* 203(2006), 513–518

Kluck R., Bossy-wetzels E., Green., and Newmeyer D., 'The Release of Cytochrome c from Mitochondria : A Primary Site for Bcl-2 Regulation of Apoptosis', *Science* 275(1997), 1132-1136

Konings J., Hoving L., Ariëns R., Hethershaw E., Ninivaggi M., Hardy L., Laat B., Ten Cate H., Philippou H., and Govers-Riemslog J., 'The Role of Activated Coagulation Factor XII in Overall Clot Stability and Fibrinolysis', *Thrombosis Research* 136(2015), 474–480

Kraft P., Schwarz T., Pochet L., Stoll G., and Kleinschnitz C., 'COU254, a Specific 3-Carboxamide-Coumarin Inhibitor of Coagulation Factor XII, Does Not Protect Mice from Acute Ischemic Stroke', *Experimental and Translational Stroke medicine* 2010, 2–6

Krahling S., Callahan M., Williamson P., and Schlegel R., 'Exposure of Phosphatidylserine Is a General Feature in the Phagocytosis of Apoptotic Lymphocytes by Macrophages', *Cell death and differentiation* 6(1999), 183–189

Kroemer G., Galluzzi L., Vandenabeele P., Abrams J., Alnemri E., Baehrecke E., Blagosklonny M., El-Deiry W., Golstein P., Green D., Hengartner M., Knight R., Kumar S., Lipton S., Malorni W., Nunez G., Peter M., Tschopp J., Yuan J., Piacentini M., Zhivotovsky B., and Melino G., 'Classification of cell Death', *Cell death and differentiation* 16(2009), 3-11

Krupka J., May F., Weimer T., Pragst I., Kleinschnitz C., Stoll G., Panousis C., Dickneite G., and Nolte M., 'The Coagulation Factor XIIa Inhibitor rHA- Infestin-4 Improves Outcome after Cerebral Ischemia / Reperfusion Injury in Rats', *Plos one* 2016, 1–15

Kurosaka K., Takahashi M., Watanabe N., Kobayashi Y., and Alerts E., 'Silent Cleanup of Very Early Apoptotic Cells by Macrophages', *The journal of immunology* 2003, 4672-4679

L

Langhauser L., Göb E., Kraft P., Geis C., Schmitt J., Brede M., Göbel K., Helluy X., Pham M., Bendszus M., Jakob P., Stoll G., Meuth S., Nieswandt B., McCrae K. and Kleinschnitz C. 'Kininogen Deficiency Protects from Ischemic Neurodegeneration in Mice by Reducing Thrombosis, Blood-Brain-Barrier Damage and Inflammation', *Blood* 120(2012), 4082–4093

Larsson M., Rayzman V., Nolte M., Nickel K., Björkqvist J., Jämsä A., Hardy M., Fries M., Schmidbauer S., Hedenqvist P., Broomé M., Pragst I., Dickneite G., Wilson M., Nash A., Panousis C., and Renné T., 'A Factor XIIa Inhibitory Antibody Provides Thromboprotection in Extracorporeal Circulation Without Increasing Bleeding Risk', *Science Translational medicine* 6(2014), 1-13

Larusch G., Mahdi F., Shariat-madar Z., Adams G., Sitrin R., Zhang W., McCrae K., and Schmaier A., 'Factor XII Stimulates ERK1 / 2 and Akt through uPAR, Integrins, and the EGFR to Initiate Angiogenesis', *Blood* 115(2010), 5111–5121

Leeb-Lundberg F., Marceau F., Müller-Esteri W., Pettibone D., and Zuraw B., 'International Union of Pharmacology. XLV. Classification of the Kinin Receptor Family: from Molecular Mechanisms to Pathophysiological Consequences', *Pharmacological Reviews* 57(2005), 27–77

Lemarchand E., Maubert E., Haelewyn B., Ali C., Rubio M., Vivien D., 'Stressed neurons protect themselves by a tissue-type plasminogen activator-mediated EGFR-dependent mechanism', *Cell Death and Differentiation* 23(2016), 123-131

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., and Docagne F., 'Tissue-Type Plasminogen Activator Exerts EGF-like Chemokinetic Effects on Oligodendrocytes in White Matter (Re)Myelination', *Molecular Neurodegeneration* 12(2017), 1–16

Li L., Luo X., and Wang X., 'Endonuclease G Is an Apoptotic DNase When Released from Mitochondria', *Nature* 412(2001), 95-99

Lieven C., Vrabec J., and Levin L., 'The Effects of Oxidative Stress on Mitochondrial Transmembrane Potential in Retinal Ganglion Cells', *Antioxidants et redox signaling* 5(2003), 641-646

Liot G., Gabriel C., Cacqueval M., Ali C., MacKenzie E., Buisson A and Vivien D., 'Neurotrophin-3-Induced PI-3 Kinase / Akt Signaling Rescues Cortical Neurons from Apoptosis', *Experimental neurology* 187(2004), 38–46

Liot G., Roussel B., Lebeurrier N., Benchenane K., Lopez-Atalaya J., Vivien D., and Ali C., 'Tissue-Type Plasminogen Activator Rescues Neurones from Serum Deprivation-Induced

Apoptosis through a Mechanism Independent of Its Proteolytic Activity', *Journal of neurochemistry* 98(2006), 1458–1464

Lochner J., Honigman L., Grant W., Gessford S., Hansen A., Silverman M., and Scalettar B., 'Activity-Dependent Release of Tissue Plasminogen Activator from the Dendritic Spines of Hippocampal Neurons Revealed by Live-Cell Imaging', *Journal of Neurobiology* 2006, 564–577

Loeffler M., Dugas E., Susin S., Zamzami N., and Kroemer G., 'Dominant Cell Death Induction by Extramitochondrially Targeted Apoptosis-Inducing Factor', *The FASEB Journal* 3(2001), 758-767

Lokker N., Mark M., Luis E., Bennett G., Robbins K., Baker J., and Godowski J., 'Structure-function analysis of hepatocyte growth factor : identification of variants that lack mitogenic activity yet retain high affinity receptor binding', *The EMBO Journal* 11(1992), 2503-2510

Louessard M., Barodu I., Lemarchand E., Thiebaut A., Parcq J., Leprince J., Terrisse A., Carraro V., Farfournoux P., Bruhat A., Orset C., Vivien D., Ali C., and Roussel B., 'Activation of cell surface GRP78 decreases endoplasmic reticulum stress and neuronal death', *Cell Death and Differentiation* 24(2017), 1518-1529

Louessard M., Lacroix A., Martineau M., Mondielli G., Montagne A., Lesept F., Lambolez B., Cauli B., Mothet J., Vivien D., and Maubert E., 'Tissue Plasminogen Activator Expression Is Restricted to Subsets of Excitatory Pyramidal Glutamatergic Neurons', *Molecular Neurobiology*, *Molecular Neurobiol* 53(2016), 5000–5012

M

MacRae B., Kennedy M., Tan L., Dal Canto M., Picha K., and Miller S., 'Induction of Active and Adoptive Relapsing Experimental Autoimmune Encephalomyelitis (EAE) Using an

Encephalitogenic Epitope of Proteolipid Protein', *Journal Of Neuroimmunology* 38(1992), 229–240

Mahdi F., Shariat Madar Z., Figueroa C., and Schmaier A., 'Factor XII Interacts with the Multiprotein Assembly of Urokinase Plasminogen Activator Receptor, gC1qR, and Cytokeratin 1 on Endothelial Cell Membranes', *Blood* 99(2002), 3585–3597

Maina F., and Klein R., 'Hepatocyte Growth Factor, a Versatile Signal for Developing', *Nature neuroscience* 2(1999), 213–217

Maina F., Hilton M., Andres R., and Wyatt S., 'Multiple Roles for Hepatocyte Growth Factor in Sympathetic Neuron Development', *Neuron* 20(1998), 835–846

Mandle R., and Kaplan A., 'Hageman Factor Dependent Fibrinolysis : Generation of Fibrinolytic Activity by the Interaction of Human Activated Factor XI and Plasminogen', *Blood* 54(1979), 850-862

Margolius A., and Ratnoff O., 'Observations on the Hereditary Nature of Hageman Trait', *Blood* 11(1956), 565-569

Mars W., Zarnegar R., and Michalopoulos G., 'Activation of Hepatocyte Growth Factor by the Plasminogen Activators uPA and tPA', *American Journal of Pathology* 143(1993), 949–958

Martin D., Siegel R., Zheng L., and Lenardo M., 'Membrane Oligomerization and Cleavage Activates the Caspase-8 (FLICE/MACH α 1) Death Signal', *The journal of biological chemistry* 273(1998), 4345–4349

Martin S., Reutelingsperger C., McGahon A., Rader J., van Schie R., LaFace D., and Green D., 'Early Redistribution of Plasma Membrane Phosphatidylserine Is a General Feature of Apoptosis Regardless of the Initiating Stimulus : Inhibition by Overexpression of Bcl-2 and Abl', *The Journal of Experimental Medicine* 182(1995), 1545-1556

Masato E., Sakahira H., Yokoyama H., Okawa K., Iwamatsu A., and Nagata S., 'A caspase-activated DNase that degrades DNA during apoptosis, and its inhibitor ICAD', *Nature* 391(1998), 43-50

Matafonov A., Leung P., Gailani A., Grach S., Puy C., Cheng Q., Sun M., McCarty O., Tucker E., Kataoka H., Renné T., Morissey J., Gruber A., and Gailani D., 'Factor XII Inhibition Reduces Thrombus Formation in a Primate Thrombosis Model', *Blood* 123(2014), 1739–1747

Mather M., and Rottenberg H., 'Aging Enhances the Activation of the Permeability Transition Pore in Mitochondria', *Biochemical and Biophysical Research Communications* 273(2000), 603–608

May F., Krupka J., Fries M., Thielmann I., Pragst I., Weimer T., Panousis C., Nieswandt B., Stoll G., Diskneite G., Schute S., and Nolte M., 'FXIIa Inhibitor rHA-Infestin-4 : Safe Thromboprotection in Experimental Venous, Arterial and Foreign Surface-Induced Thrombosis', *British journal of haematology* 173(2016), 769-778

Medved L., and Nieuwenhulzen W., 'Molecular Mechanisms of Initiation of Fibrinolysis by Fibrin', *Thrombosis and Haemostasis* 89(2003), 409–419

Mehta A., Prabhakar M., Kumar P., Deshmukh R., and Sharma P., 'Excitotoxicity : Bridge to Various Triggers in Neurodegenerative Disorders', *European Journal of Pharmacology* 698(2013), 6–18

Merry D., Veis D., Hickey W., and Korsmeyer S., 'Bcl-2 Protein Expression Is Widespread in the Developing Nervous System and Retained in the Adult PNS', *Development* 120(1994), 301–311

Miles L., Greengard J., and Griffin J., 'A COMPARISON OF THE ABILITIES OF PLASMA KALLIKREIN , B-FACTOR XIIa , FACTOR XIa AND UROKINASE TO ACTIVATE PLASMINOGEN', *Thrombosis research* 29(1983), 407-417

Miossec P., 'Interleukine 17 et L ' Inflammation Chronique : De La Découverte Au Ciblage Thérapeutique', Bulletin l'académie nationale de médecine 200(2016), 933–942

Miyazawa T., Matsumoto K., Ohmichi H., Katoh H., Yamashima T., and Nakamura T., 'Protection of hippocampal neurons from ischemia-induced delayed neuronal death by hepatocyte growth factor : a novel neurotrophic factor', Journal of cerebral blood flow and metabolism 18(1998), 345-348

Motoyama N., Wang F., Roth K., Sawa H., Nakayama K., Nakayama K., Negishi I., Senju S., Zhang Q., Fuji S., and Loh D., 'Massive Cell Death of Immature Hematopoietic Cells and Neurons in Bcl-X-Deficient Mice', Science 267(1995), 1506-1510

Mueller K., Hunter L., Ethier S., and Boerner J., 'Met and c-Src Cooperation to Compensate for Loss of Epidermal Growth Factor Receptor Kinase Activity in Breast Cancer Cells' Cancer Research 68(2008), 1-19

Müller F., Mutch N., Schenk W., Smith S., Spronk H., Schmidbauer S., Gahl W., Morrissey J., and Renné T., 'Platelet polyphosphates are proinflammatory and procoagulant mediators in vivo', Cell, 139(2009), 1143–1156

Muzio M., Stockwell B., Stennicke H., Salvesen G., and Dixit V., 'An Induced Proximity Model for Caspase-8 Activation *', The journal of biological chemistry 273(1998), 2926–2930

N

Naldini L., Weidner M., Vigna E., Gaudino G., Bardelli A., Ponzetto C., Narshimhan R., Haartmann G., Zarnegar R., Michalopoulos G., Birchmeier W., and Comoglio P., 'Scatter factor and hepatocyte growth factor are indistinguishable ligands for the MET receptor', The EMBO Journal 10(1991), 2867-2878

Namura S., Zhu J., Fink K., Endres M., Srinivasan A., Tomaselli K., Yuan J., and Moskowitz M., 'Activation and Cleavage of Caspase-3 in Apoptosis Induced by Experimental Cerebral Ischemia', *The journal of neuroscience* 18(1998), 3659–3668

Nicole O., Docagne F., Ali C., Margail I., Carmeliet P., MacKenzie A., Vivien D., Buisson A. 'The Proteolytic Activity of Tissue-Plasminogen Activator Enhances NMDA Receptor-Mediated Signaling', *Nature medicine* 7(2001), 59–64

Nicoletti I., Migliorati G., Papiacci M., Grignani F., and Riccardi C., 'A Rapid and Simple Method for Measuring Thymocyte Apoptosis by Propidium Iodide Staining and Flow Cytometry', *Journal of immunological methods* 139(1991), 271–279

Nieswandt B., Brakebusch C., Bergmeier B., Schulte V., Mokhtari-nejad R., Bouvard D., Lindhout T., Heemskerk J., Zirngibl H. and Fässler R., 'Glycoprotein VI but Not a 2 B 1 Integrin Is Essential for Platelet Interaction with Collagen', *The EMBO journal* 20(2001), 2120-2130

Nikolaev A., McLaughlin T., O'Leary D., and Tessier-lavigne M., 'N-APP binds DR6 to cause axon pruning and neuron death via distinct caspases', *Nature* 457(2009), 981-989

Noshita N., Lewén A., Sugawara T., and Chan P., 'Evidence of Phosphorylation of Akt and Neuronal Survival After Transient Focal Cerebral Ischemia in Mice', *Journal of cerebral blood flow and metabolism* 21(2001), 1442–1450

O

Oda K., Matsuoka Y., and Funahashi A., 'A Comprehensive Pathway Map of Epidermal Growth Factor Receptor Signaling', *Molecular Systems Biology* 1(2005), 1-17

Op den Kamp J. 'Lipid Asymmetry in Membranes', *Annual Review of Biochemistry* 48(1979), 47–71

Oppenheim R., 'Cell Death of Motoneurons in the chick embryo cord', *Developmental Biology* 101(1984), 35-39

Orset C., Macrez R., Young A., Panthou D., Angles-Cano E., Maubert E., Agin V., et Vivien D., 'Mouse Model of In Situ Thromboembolic Stroke and Reperfusion', *Stroke* 38(2007), 2771-2778

Ozawa T., 'Mechanism Of Somatic Mitochondrial DNA Mutations Associated With Age And Diseases', *Biochimica et Biophysica Acta* 1271(1995), 177–189

P

Pathak M., Wilmann P., Awford J., Li C., Hamad B., Fischer P., Dreveny I., Dekker L., and Emsley J., 'Coagulation Factor XII Protease Domain Crystal Structure', *Journal of Thrombosis and Haemostasis* 13(2015), 580–591

Paumelle R., Tulashe D., Kherrouche Z., Plaza S., Leroy C., Reveneau S., Vandebunder B., and Fafeur V., 'Hepatocyte growth factor/scatter factor activates the ETS1 transcription factor by a RAS-RAF-MEK-ERK signaling pathway', *Oncogene* 21(2002), 2309-2319

Pines G., Köstler W., and Yarden Y., 'Oncogenic mutant forms of EGFR : lessons in signal transduction and targets for cancer therapy', *FEBS letters* 584(2010), 2699-2706

Pixley R., Cadena R., Page J., Kaufman N., Wyshock E., Chang A., Taylor F., and Colman R., 'The Contact System Contributes to Hypotension but Not Disseminated Intravascular Coagulation in Lethal Bacteremia', *Journal of Clinical Investigation* 91(1993), 61–68

Pixley R., Stumpo L., Birkmeyerl K., Silver L., and Colman R., 'A Monoclonal Antibody Recognizing an Icosapeptide Sequence in the Heavy Chain of Human Factor XII Inhibits Surface-Catalyzed Activation', *The journal of biological chemistry* 262(1987), 10140–10145

Proskuryakov S., Konoplyannikov A., and Gabai V., 'Necrosis : A Specific Form of Programmed Cell Death ?', *Experimental cell research* 283(2003), 1–16

Puddu P., Puddu G., Cravero E., Muscari S., Muscari A., and Muscari A., 'The Involvement of Circulating Microparticles in Inflammation, Coagulation and Cardiovascular Diseases', *Canadian Journal of Cardiology* 26(2010), e140–e145

R

Raffray M., and Cohen G., 'Apoptosis and Necrosis in Toxicology : A Continuum or Distinct Modes of Cell Death ?', *Pharmacology & Therapeutics* 75(1997), 153–177

Raidoo D., Ramsaroop R., Naidoo S., Bhoola K., 'Regional Distribution of Tissue Kallikrein in the Human Brain', *Immunopharmacology* 32(1996), 39-47

Rajapakse N., Jung W., Mendis E., Moon S., and Kim S., 'A Novel Anticoagulant Purified from Fish Protein Hydrolysate Inhibits Factor XIIIa and Platelet Aggregation', *Life Sciences* 76(2005), 2607–2619

Ratnoff O., and Colopy J., 'A familial hemorrhagic trait associated with a deficiency of a clot-promoting fraction of plasma', *Journal of Clinical Investigation* 34(1955), 602-613

Reed J., 'Mechanisms of Apoptosis', *The American Journal of Pathology* 157(2000), 1415–1430

Ren R., Tu H., Kim H., Wang G., Bean G., Jeffers J., Zambetti G., Hsieh J., and Cheng E., 'BID, BIM, and PUMA Are Essential for Activation of the BAX- and BAK-Dependent Cell Death Program', *Science* 330(2010), 1390–1393

Renehan A., Booth C., and Potten C., 'What Is Apoptosis, and Why Is It Important?', *Emergency Medicine Journal* 322(2001), 1536–1538

Renne T., Schmaier A., Nickel K., and Blomba M., 'In Vivo Roles of Factor XII', *Blood* 120(2012), 4296–4303

Reubold T., and Eschenburg S., 'A Molecular View on Signal Transduction by the Apoptosome', *Cellular Signalling* 24(2012), 1420–1425

Revenko A., Gao D., Crosby J., Bhattacharjee G., Zhao C., May C., Gailani D., Monia B., and MacLeod R., 'Selective Depletion of Plasma Prekallikrein or Coagulation Factor XII Inhibits Thrombosis in Mice without Increased Risk of Bleeding', *Blood* 118(2011), 5302–5311

Reznik T., Sang Y., Ma Y., Abounader R., Rosen E., Xia S., and Laterra J., 'Transcription-Dependent Epidermal Growth Factor Receptor Activation by Hepatocyte Growth Factor', *Molecular Cancer Research* 6(2008), 139–150

Rodrigues G., and Park M., 'Dimerization mediated through a leucine zipper activates the oncogenic potential of the met receptor tyrosine kinase', *Molecular and cellular biology* 13(1993), 6711-6722

S

Saito H., Hamilton S., Tavill A., Goodnough L., Louis L., and Angell A., 'Synthesis and release of Hageman Factor (Factor XII) by the isolated perfused rat liver', *Journal of clinical investigation* 72(1983), 948-954

Saito H., Ishikara T., Suzuki H., and Watanabe T., 'Production and Characterization of a Murine Monoclonal Antibody Against a Heavy Chain of Hageman Factor (Factor XII)', *Blood* 65(1985), 1263-1268

Sappino A., Madani R., Huarte J., Belin D., Kiss J., Wohlwend A., and Vassalli J., 'Extracellular Proteolysis in the Adult Murine Brain', *Journal of Clinical Investigation* 92(1993), 679–685

Savill J., and Fadok V., 'Corpse Clearance Defines the Meaning of Cell Death', *Nature* 407(2000), 784-788

Schmeidler-sapiro K., Ratnofft O., and Gordon E., 'Mitogenic effects of coagulation factor XII and factor XIIa on HepG2 cells', *Proceedings of the National Academy of Sciences* 88(1991), 4382–4385

Schmied M., Breitschopf H., Gold R., Zischler H., Rothe G., Wekerle H., and Lassmann H., 'Apoptosis of T Lymphocytes in Experimental Autoimmune Encephalomyelitis', *American journal of pathology* 143(1993), 446–452

Schütze S., Machleidt T., Adam D., Schwandner R., Wiegmann K., Kruse M., Heinrich M., Wickel M., and Krönke M., 'Inhibition of Receptor Internalization by Monodansylcadaverine Selectively Blocks p55 Tumor Necrosis Factor Receptor Death Domain Signaling', *The journal of biological chemistry* 274(1999), 10203–10212

Segawa K., Kurata S., and Nagata S., 'Human Type IV P-Type ATPases That Work as Plasma Membrane Phospholipid Flippases and Their Regulation by Caspase and Calcium', *The Journal of Biological Chemistry* 291(2016), 762–772

Segawa K., Kurata S., Yanagihashi Y., Brummelkamp T., Matsuda F., and Nagata S., 'Caspase-Mediated Cleavage of Phospholipid Flippase for Apoptotic Phosphatidylserine Exposure', *Science* 344(2014), 1164-1168

Servais H., Jossin Y., Van Bambeke F., Tulkens P., and Mingeot-Leclercq M., 'Gentamicin Causes Apoptosis at Low Concentrations in Renal LLC-PK 1 Cells Subjected to Electroporation', *Antimicrobial agents and chemotherapy* 50(2006), 1213–1221

Shibayama Y., Brunee T., Kaplan A., and Reddigari S., 'Activation of human Hageman factor (factor XII) in the presence of zinc and phosphate ions', *Braz J Med Biol Res* 27(1994), 1817-1728

Shimizu S., Narita m., and Tsujimoto Y., 'Bcl-2 Family Proteins Regulate the Release of Apoptogenic Cytochrome c by the Mitochondrial Channel VDAC', *Nature* 399(1999), 483-487

Shimomura T., Miyazawa K., Komiyama Y., Hiraoka H., and Naka D., 'Activation of Hepatocyte Growth Factor by Two Homologous Proteases, Blood-Coagulation Factor XIIa and Hepatocyte Growth Factor Activator', *European Journal of Biochemistry* 229(1995), 257–261

Sibilia M., Steinbach J., Stingl L., Aguzzi A., and Wagner E., 'A Strain-Independent Postnatal Neurodegeneration in Mice Lacking the EGF Receptor', *The EMBO Journal* 17(1998), 719–731

Sierra F., Fey G., and Guigoz Y., 'T-Kininogen Gene Expression Is Induced during Aging', *Molecular and cellular biology* 9(1989), 5610–5616

Silverberg M., Dum J., Garen L., and Kaplan A., 'Autoactivation of Human Hageman Factor', *The journal of biological chemistry* 255(1980), 7281-7286

Singh B., Carpenter G., and Coffey R., 'EGF Receptor Ligands : Recent Advances' *F1000Research* 5(2016), 1–11 Small, J., and P Tracy, 'Of', 65 (2018), 1–11

Small E., Katzmann J., Tracy R., Ratnoff O., Goldsmith G., and Everson B., 'A monoclonal Antibody That Inhibits Activation of Human Hageman Factor (Factor XII)', *Blood* 65(1985), 202-210

Stamos J., Lazarus R., Yao X., Kirchlofer D., and Wiesmann C., 'Crystal structure of the HGF- β -chain in complex with the sema domain of the MET receptor', *The EMBO Journal* 23(2004), 2325-2335

Stavrou E. and Schmaier A., 'Factor XII: What Does It Contribute To Our Understanding Of The Physiology and Pathophysiology of Hemostasis & Thrombosis', *Thrombosis Research* 125(2010), 210–215

Stavrou E., Fang C., Bane K., Long A., Naudin C., Kucukal E., Gandhi A., Brett-Morris A., Mumaw M., Izadmehr S., Merkulova A., Reynolds C., Alhalabi O., Nayak A., Yu W., Qu C., Meyerson H., Dubyak G., Gurkan U., Nieman M., Sen Gupta A., Renné T., and Schmaier A., 'Factor XII and uPAR Upregulate Neutrophil Functions to Influence Wound Healing Find the Latest Version : Factor XII and uPAR Upregulate Neutrophil Functions to Influence Wound Healing', *The journal of clinical investigation* 128(2018), 944–959

Stennicke H., Ju J., Shin H., Deveraux Q., Wolf B., Yang X., Zhou Q., Ellerby M., Ellerby L., Bredesen D., Green D., Reed J., Froelich C., and Salvesen G., 'Pro-Caspase-3 Is a Major Physiologic Target of Caspase-8', *The journal of biological chemistry* 273(1998), 27084–27090

Stotz S., Scott L., Drummond-main C., Avchalumov Y., Giroto F., Davidsen J., Gomez-Garcia m., Rho J., Pavlov E., and Colicos M., 'Inorganic Polyphosphate Regulates Neuronal Excitability through Modulation of Voltage-Gated Channels', *Molecular Brain* 7(2014), 1–9

Sweeney M., Sagare A., and Zlokovic B., 'Blood-brain barrier breakdown in Alzheimer Disease and other neurodegenerative disorders', *Nature reviews* 14(2018), 133-150

Sulston J., and Horvitz H., 'Post-Embryonic Cell Lineages of the Nematode, *Caenorhabditis Elegans*', *Developmental biology* 56(1977), 110–156

T

Takano M., Horie M., Narahara M., and Miyake M., 'Expression of Kininogen mRNAs and Plasma Kallikrein mRNA by Cultured Neurons, Astrocytes and Meningeal Cells in the Rat Brain', *Immunopharmacology* 45(1999), 121–126

Tanaka A., Suzuki Y., Sugihara K., Kanayama N., and Urano T., 'Inactivation of Plasminogen Activator Inhibitor Type 1 by Activated Factor XII Plays a Role in the Enhancement of Fibrinolysis by Contact Factors in-Vitro', *Life Sciences* 85(2009), 220–225

Tankersley D., and Alving M., 'Activation of FXII by Dextran Sulfate : The basis for an Assay of FXII', *Blood* 62(1983), 448–456

Tans G., Rosing J. and Griffin J., 'Sulfatide-Dependent Autoactivation of Human Blood Coagulation Factor XII (Hageman Factor)', *The Journal of biological chemistry* 258(1983), 8215–8222

Telford W., King L., and Fraker P., 'Evaluation of Glucocorticoid-Induced DNA Fragmentation in Mouse Thymocytes by Flow Cytometry', *Cell Proliferation* 24(1991), 447–459

Triplett D., 'Coagulation and Bleeding Disorders : Review and Update', *Clinical chemistry* 46(2000), 1260–1269

Troncoso J., Sukhov R., Kawas C., and Koliatsos V., 'In situ labeling of dying cortical neurons in normal aging and in Alzheimer's disease: correlations with senile plaques and disease progression' *Journal of Neuropathology & Experimental Neurology* 11(1996), 1134-1142

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

Tsujimoto Y., Finger L., Yunis J., Nowell P., and Croce C., 'Cloning of the Chromosome Breakpoint of Neoplastic', *Science* 226(1983), 1097–1099

V

Valentin-torres A., Savarin C., Barnett J., and Bergmann C., 'Blockade of Sustained Tumor Necrosis Factor in a Transgenic Model of Progressive Autoimmune Encephalomyelitis Limits Oligodendrocyte Apoptosis and Promotes Oligodendrocyte Maturation', *Journal of Neuroinflammation* 15(2018), 1–16

Van Engeland M., Ramaekers FC., Schutte B., and Reutelingsperger CP. 'A novel assay to measure loss of plasma membrane asymmetry during apoptosis of adherent cells in culture' *Cytometry* 24(1996), 131-139

Van der Meijden P., Munnix I., Auger J., Cosemans J., Kuijpers M., Spronk H., Watson S., Renné T., and Heemskerk J., 'Dual Role of Collagen in Factor XII – Dependent Thrombus Formation', *Blood* 114(2009), 881–891

Vekrellis K., Mccarthy m., WatsonA., Whitfield J., Rubin L., and Ham J., 'Bax Promotes Neuronal Cell Death and Is Downregulated during the Development of the Nervous System', *Development* 124(1997), 1239–1249

Vela L., Gonzalo O., Naval J., and Marzo I., 'Direct Interaction of Bax and Bak Proteins with Bcl-2 Homology Domain 3 (BH3)-Only Proteins in Living Cells Revealed by Fluorescence Complementation', *The journal of biological chemistry* 288(2013), 4935–4946

Velayuthaprabhu S., Matsubayashi H., Sugi T., and Nakamura M., 'A Unique Preliminary Study on Placental Apoptosis in Mice with Passive Immunization of Anti-Phosphatidylethanolamine Antibodies and Anti-Factor XII Antibodies', *American journal of reproductive immunology* 66(2011), 373–384

Vieira M., Fernandes J., Carreto L., Anuncibay-soto B., Santos M., Han J., and Fernandez-Lopez A., 'Ischemic Insults Induce Necroptotic Cell Death in Hippocampal Neurons through the up-Regulation of Endogenous RIP3', *Neurobiology of Disease*, 68(2014), 26–36

Vincenza Carriero M., Franco P., Vocca I., Alfano D., Votta G., Longanesi-Cattani I., Bifulco K., Mancini A., Caputi M., and Stoppelli M., 'Structure, function and antoagonists of urokinase-type plasminogen activator', *Frontiers in Bioscience* 14(2009), 3782-3794

W

Wagner B., Natarajan A., Kroismayr R., Wagner E., and Sibilica M., 'Neuronal Survival Depends on EGFR Signaling in Cortical but Not Midbrain Astrocytes', *The EMBO Journal* 25(2006), 752–762

Wang L., Zoppé M., Hackeng T., Griffin J., Lee K., et Verma I., 'A Factor IX-deficient mouse model for hemophilia B gene therapy', *Proceedings of the National Academy of Sciences* 94(1997), 11563-11566

Weidemann A., Paliga K., Durrwang U., Reinhard F., Schuckert O., and Masters C., 'Proteolytic Processing of the Alzheimer's Disease Amyloid Precursor Protein within Its Cytoplasmic Domain by Caspase-like Proteases', *The journal of biological chemistry* 274(1999), 5823–5829

Wright KM., Vaughn AE and Deshmukh M., ' Apoptosome dependent caspase-3 activation pathway is non-redundant and necessary for apoptosis in synthetic neurons', *Cell Death and Differentiation* 14(2007), 625-633

Wieduwilt M., and Moasser M., 'The epiderma growth factor receptor family : biology driving targeted therapeutics', *Cellular and Molecular Life Sciences* 65(2008), 1566-1584

Wilcox J., Smith K., Schwartz S., and Gordont D., 'Localization of tissue factor in the normal vessel wall and in the atherosclerotic plaque', *Proceedings of the National Academy of Sciences* 86(1989), 2839–2843

Wolberg A., and Campbell R., 'Thrombin Generation, Fibrin Clot Formation and Hemostasis', *Transfusion and Apheresis Science* 38(2008), 15–23

Woodruff R., Xu Y., Layzer J., Wu W., Ogletree M., and Sullenger B., 'Inhibiting the intrinsic pathway of coagulation with a FXII-targeting RNA Aptamer' *Journal of Thrombosis and Haemostasis* 11(2013), 1364-1373

Wright K, Vaughn A., and Deshmukh M., 'Apoptosome Dependent Caspase-3 Activation Pathway Is Non-Redundant and Necessary for Apoptosis in Sympathetic Neurons', *Cell death and differentiation* 14(2007), 625–633

Wyllie A., 'Glucocorticoid-induced thymocyte apoptosis is associated with endogenous endonuclease activation', *Nature* 284(1980), 555-556



Xiao G., Jeffers M., Bellacosa A., Mitsuuchi Y., Vande Woude G., and Testa J., 'Anti-apoptotic signaling by hepatocyte growth factor/Met via the phosphatidylinositol 3-kinase/Akt and mitogen-activated protein kinase pathways', *Proceedings of the National Academy of Sciences* 98(2001), 247-252

Xu Y., Cai T., Castriota G., Zhou Y., Hoos L., Jochowitz N., Loewrigkeit C., Cook J., Wickham A., Metzger J., Ogletree M., Seiffert D., and Chen Z., 'Factor XIIIa inhibition by Infestin-4: in vitro mode of action and in vivo antithrombotic benefit', *Thromb Haemost* 111(2014), 694-704

Y

Yamamoto N., Mammadova G., Song R., Fukami Y., and Sato K., 'Tyrosine Phosphorylation of p145 Met Mediated by EGFR and Src Is Required for Serum-Independent Survival of Human Bladder Carcinoma Cells', *Journal of cell science* 119(2006), 4623-4633

Yang A., Chen F., He C., Zhou J., Lu Y., Dai J., Birge R., and Wu Y., 'The Procoagulant Activity of Apoptotic Cells Is Mediated by Interaction with Factor XII', *Frontiers immunology* 8(2017)

Yang D., Kumar A., Stavrides P., Peterson J., Peterhoff C., Pawlik M., Levy E., Cataldo A., and Nixon R., 'Neuronal Apoptosis and Autophagy Cross Talk in Aging PS / APP Mice, a Model of Alzheimer's Disease', *The american journal of pathology* 173(2008), 665-681

Yano S., Wang W., Li Q., Matsumoto K., Sakurama H., Nakamura T., Ogino H., Kakiuchi S., Hanibuchi M., Nishioka Y., Uehara H., Mitsudomi T., Yatabe Y., Nakamura T., and Sone S., 'Hepatocyte Growth Factor Induces Gefitinib Resistance of Lung Adenocarcinoma with Epidermal Growth Factor Receptor – Activating Mutations', *Cancer Research* 68(2008), 9479-9488

Yau J., Stafford A., Liao P., Fredenburgh J., Roberts R., Brash J., and Weitz J., 'Acta Biomaterialia Corn Trypsin Inhibitor Coating Attenuates the Prothrombotic Properties of Catheters in Vitro and in Vivo', *Acta Biomaterialia* 8(2012), 4092-4100

Yin H., Chao L., and Chao J., 'Kallikrein / Kinin Protects against Myocardial Apoptosis after Ischemia / Reperfusion via Akt-Glycogen Synthase Kinase-3 and Akt-Bad 14-3-3 Signaling', *The Journal of biological chemistry* 280(2005), 8022–8030

Yoshida H., Kong Y., Yoshida R., Elia A., Hakem A., Hakem R., Penninger J. and Mak T., 'Apaf1 Is Required for Mitochondrial Pathways of Apoptosis and Brain Development', *Cell* 94(1998), 739–750

Z

Zain J., Huang Y., Feng X., Nierodzik M., Li J., and Karpatkin S., 'Concentration-Dependent Dual Effect of Thrombin on Impaired Growth / Apoptosis or Mitogenesis in Tumor Cells', *Blood* 95(2000), 3133–3138

Zamolodchikov D., Chen Z., Conti B., Renné T., and Strickland S., 'Activation of the Factor XII-Driven Contact System in Alzheimer ' S Disease Patient and Mouse Model Plasma', *Proceedings of the National Academy of Sciences* 112(2015), 4068-4073

Zamolodchikov D., Renné T., and Strickland S., 'The Alzheimer's disease peptide A β promotes thrombin generation through activation of coagulation factor XII', *Journal of Thrombosis and Haemostasis* 14(2016), 995–1007

Ziliotto N., Baroni M., Straudi S., Manfredini F., Mari R., Menegatti E., Voltan R., Secchiero P., Basaglia N., Marchetti and Bernardi F., 'Coagulation Factor XII Levels and Intrinsic Thrombin Generation in Multiple Sclerosis', *Frontiers in Neurology* 9(2018), 1–8

Zou H., Henzel W., Liu X., Lutschg A., and Wang X., 'Apaf-1, a Human Protein Homologous to C. Elegans CED-4, Participates in Cytochrome c – Dependent Activation of Caspase-3', *Cell* 90(1997), 405–413

Zou H., Li Y., Liu X., and Wang X., 'An APAF-1 Cytochrome c Multimeric Complex Is a Functional Apoptosome That Activates Procaspase-9', *The journal of biological chemistry* 274(1999), 11549–11556

Résumé — Expression du Facteur XII dans le système nerveux central et son rôle dans l'apoptose neuronale

Le facteur XII (FXII) est une sérine protéase de 80 kDa produite et sécrétée par le foie qui initie la voie intrinsèque de la coagulation. Diverses études ont montré un rôle délétère du FXII dans des pathologies cérébrales telles que l'accident vasculaire cérébral, la maladie d'Alzheimer et la sclérose en plaques. Néanmoins, l'impact direct du FXII sur le devenir des cellules neuronales reste inconnu. De plus, l'expression du FXII dans le système nerveux central (SNC) n'a pas encore été étudiée. Le premier objectif de nos travaux a été d'étudier le rôle du FXII dans l'apoptose neuronale puis dans un second temps d'étudier l'expression du FXII dans le SNC.

Dans notre étude, nous avons constaté que le FXII protège les neurones en culture de la mort apoptotique. Les effets bénéfiques du FXII résultent de l'interaction directe du FXII avec le récepteur du facteur de croissance épidermique (EGFR). L'activation de l'EGFR par le FXII déclenche les voies signalétiques antiapoptotiques MAPK. Il est intéressant de noter que la forme double chaîne du FXII, α FXIIa, exerce des effets protecteurs complémentaires en convertissant le précurseur du facteur de croissance hépatocytaire en sa forme mature, ce qui active à son tour le récepteur MET. Enfin, dans notre étude, nous avons observé que le FXII était exprimé dans le SNC (à la fois l'ARNm et la protéine). Cette expression est notamment retrouvée au niveau des neurones corticaux. Ce travail décrit un nouveau mécanisme d'action du FXII et décrit les neurones en tant que cellules cibles pour les effets facteur de croissance du FXII. Dans l'ensemble, ces travaux devraient donc aider à mieux comprendre comment le FXII agit dans les pathologies cérébrales en tant que sérine-protéase unique à l'interface de la thrombose, de l'inflammation et de la survie cellulaire.

Mots clés : Facteur XII, EGFR, MET, apoptose, neurones

Abstract — Expression of Factor XII in the central nervous system and its role in neuronal apoptosis

Factor XII (FXII) is an 80 kDa serine protease produced and secreted by the liver that participates in the intrinsic coagulation pathway. Various studies have shown a deleterious role of FXII in cerebral pathologies like stroke, Alzheimer disease and multiple sclerosis. Nevertheless, the direct impact of FXII on neuronal cell fate remains unknown. In addition, the expression of FXII in the central nervous system (CNS) has not been investigated yet. The first objective of our work was to study the role of FXII in neuronal apoptosis and then to study the expression of FXII in the CNS.

In our work, we found that FXII protects cultured neurons from apoptotic death by a growth factor-like effect. The beneficial effects of FXII result from the direct interaction with the epidermal growth factor receptor (EGFR). Activation of EGFR by FXII triggers antiapoptotic signaling MAPK pathways. Interestingly, the two chain form of FXII, α FXIIa, exerts complementary protective effects by converting the hepatocyte growth factor (HGF) precursor into its mature form, which in turn activates MET receptor. Finally in our work we observed FXII expression in the CNS (both mRNA and protein). This expression is particularly found in cortical neurons. This work describes a novel mechanism of action of FXII and discloses neurons as target cells for growth factor effects of FXII. Overall, these works should thus help further understanding how FXII acts in brain diseases as a unique serine-protease at the interface of thrombosis, inflammation and cell survival.

Key words : Factor XII, EGFR, MET, apoptosis, neurons