

Une histoire d'arroseur arrosé : dans la cascade, c'est la thrombine qui module la thrombomoduline

Si l'existence de la thrombine avait été pressentie il y a plus d'un siècle, il a fallu attendre la découverte du récepteur plaquettaire de la thrombine, à la fin des années 1980, pour (vraisemblablement) achever l'inventaire des acteurs moléculaires essentiels de la cascade de la coagulation. Le XX^e siècle s'est terminé avec la détermination de la structure tridimensionnelle de la plupart des protéases impliquées dans ce système. Une dernière inconnue était le mécanisme par lequel la liaison d'un cofacteur peut transformer une protéase essentiellement inactive en un complexe 1 000, voire 100 000 fois plus performant. De ce point de vue, la décennie semble très bien partie avec la publication quasi simultanée de deux études sur la structure du complexe que forme la thrombine avec la thrombomoduline : la première, publiée dans l'hebdomadaire *Nature*, est une analyse par diffraction des rayons X [1], l'autre, parue dans le mensuel *Nature Structural Biology*, est une étude par résonance magnétique nucléaire [2]. Ces travaux mettent probablement un terme à une vive controverse sur le mécanisme de la thrombo-modulation de l'hémostase. La thrombine joue un rôle central dans la cascade de la coagulation. Elle est directement responsable de l'élaboration du clou plaquettaire et du caillot de fibrine en activant les plaquettes et en clivant le fibrinogène. Elle est aussi à l'origine de l'accélération intrinsèque du système en activant les deux cofacteurs clef que sont les facteurs V et VIII, ainsi qu'en déclenchant la boucle du facteur XI, qui n'est autre que la voie anciennement appelée « intrinsèque » de la coagulation [3]. En fait, il serait plus juste de parler de l'« ava-

lanche », voire de la réaction « bio-nucléaire » de la coagulation, tant la cascade se caractérise par son amplification intrinsèque (figure 1). Fort heureusement, grâce à l'action concertée de trois mécanismes qui confinent le caillot au niveau des brèches vasculaires, la réaction ne se propage pas et s'arrête sans entraîner

de thrombose vasculaire. Le premier mécanisme régulateur a pour origine l'ancrage sur des membranes phospholipidiques de la plupart des composants de la réaction, en particulier le facteur tissulaire, celui qui, par son exposition accidentelle, déclenche la cascade. Localement, les activations sont certes massives et incontrôlables

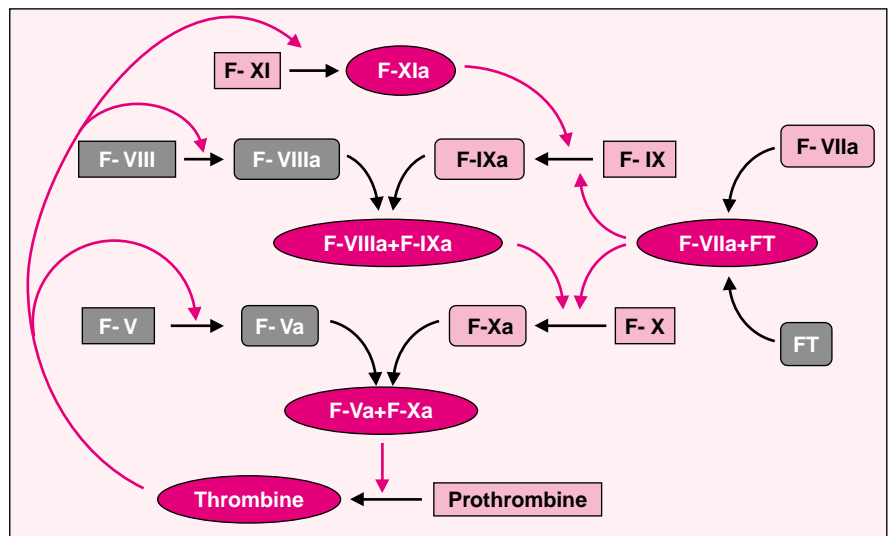


Figure 1. **Schéma simplifié de la cascade de la coagulation.** Seules les entités en rouge sont des catalyseurs effectifs de réactions enzymatiques. Les entités en gris correspondent à des cofacteurs, celles en rose à des enzymes ou à leurs précurseurs ; toutes sont dépourvues d'activité catalytique : la plupart des enzymes doivent se lier à un cofacteur pour acquérir leur activité catalytique. Deux des cofacteurs doivent eux-mêmes subir une « activation » pour être fonctionnels : les facteurs V et VIII (F-V et F-VIII). La cascade est déclenchée par la liaison du facteur VIIa (F-VIIa) à son cofacteur : le facteur tissulaire (FT). Sans son cofacteur, le F-VIIa est essentiellement inactif, le FT n'est exposé que du fait de la brèche vasculaire. Une fois lancée, la cascade est amplifiée verticalement et circulairement. Verticalement parce que chaque complexe de facteur IX activé, associé à son cofacteur activé (F-IXa, F-VIIIa), catalyse l'activation de nombreuses molécules de facteur X (F-X), et que, en s'associant avec le facteur V activé (F-Va), chaque molécule de facteur X activé (F-Xa) catalyse l'activation de nombreuses molécules de prothrombine. L'amplification cyclique résulte de l'activation, par le produit ultime de la cascade (la thrombine), du facteur XI (F-XI) et des deux cofacteurs-clefs du système (F-V et F-VIII).

mais limitées par l'épuisement rapide des composants. Le second mécanisme fait intervenir une batterie d'inhibiteurs plus ou moins spécifiques; si ces inhibiteurs sont débordés ou trop lents pour intervenir dans la zone « explosive », ils sont suffisamment puissants pour limiter la diffusion des facteurs activés, dès lors que leur concentration baisse du fait de leur dilution dans le plasma. Le troisième mécanisme correspond à l'étape ultime de la cascade qui déclenche la voie anticoagulante de la protéine C. Activée par le complexe thrombine-thrombomoduline, la protéine C « assèche » la cascade en détruisant les deux cofacteurs Va et VIIIa, ceux-là mêmes que la thrombine a préalablement activés.

La thrombomoduline fut découverte par une expérience fort élégante qui est restée célèbre [4]. La mécanique de l'activation de la protéine C est en effet restée mystérieuse jusqu'à ce que Esmon et Owen aient l'idée de perfuser un cœur de lapin isolé. La protéine C n'est activée *in vitro* que très lentement par la thrombine, et n'est pas activée si on la perfuse seule au travers d'un cœur lavé par une solution physiologique. En revanche, la perfusion conjointe de thrombine et de protéine C induit une activation très rapide du zymogène: il devenait évident qu'un cofacteur membranaire détenait la clef du système. La thrombomoduline fut dès lors promptement purifiée, clonée, exprimée sous forme recombinante, et fut l'objet de 1500 études en une vingtaine d'années. Très vite, il apparut aussi que la liaison de la thrombine à la thrombomoduline induisait un changement radical de sa spécificité. En l'absence du cofacteur, la thrombine est strictement procoagulante, tandis que, liée à la thrombomoduline, elle devient anticoagulante: la plupart de ses fonctions d'enzyme libre sont abolies, cependant que le complexe catalyse l'activation de la seule protéase connue pour interrompre la cascade de la coagulation. Un changement aussi radical de spécificité ne pouvait qu'attirer la curiosité des chercheurs, décidés à en décrypter le mécanisme moléculaire, et la découverte de la thrombomoduline allait presque

simultanément déclencher un âpre débat. Allaient s'affronter les partisans de la thrombo-modulation pure, défendant un modèle exclusivement allostérique, et ceux (moins nombreux et souvent réduits au silence) partisans d'un modèle que l'on pourrait qualifier de matriciel, dans lequel le rôle du cofacteur (la thrombomoduline) est d'édifier un site de liaison adéquat pour le substrat (la protéine C). Les adeptes de l'allostérie soutenaient que le cofacteur devait induire un changement de conformation de la thrombine responsable du profond changement de la spécificité de l'enzyme [5]. Les partisans du modèle matriciel invoquaient l'encombrement stérique pour expliquer l'anéantissement des fonctions procoagulantes, et ne concédaient pour tout changement de conformation qu'une subtile torsion du substrat, rendue possible par une assise incomparablement meilleure au sein du moule que lui aurait procuré le complexe thrombine-thrombomoduline [6]. Ni l'un ni l'autre de ces modèles n'étaient

toutefois satisfaisants. L'hypothèse allostérique reposait sur trois observations: (1) la liaison du cofacteur induit une modification conformationnelle détectable de la thrombine, (2) la séquence d'activation de la protéine C est très défavorable pour son clivage par la thrombine, et (3) la protéine C n'a pas d'affinité pour la thrombomoduline [7, 8]. Les deux premiers arguments étaient cependant battus en brèche par la constatation qu'un peptide synthétique correspondant à la séquence d'activation de la protéine C n'est guère mieux clivé par la thrombine liée à la thrombomoduline qu'en l'absence du cofacteur [9]. Lorsque fut localisé, à la surface de la thrombine, le site de liaison de la thrombomoduline [10], il devint indéniable que l'extinction des propriétés procoagulantes résultait au moins en partie de l'obstruction de ce site. En effet, ce site, qui est distant du site actif, recouvre l'exosite 1 de la thrombine, lui-même critique pour l'interaction avec la plupart de ses substrats procoagulants. La compétition pour ce

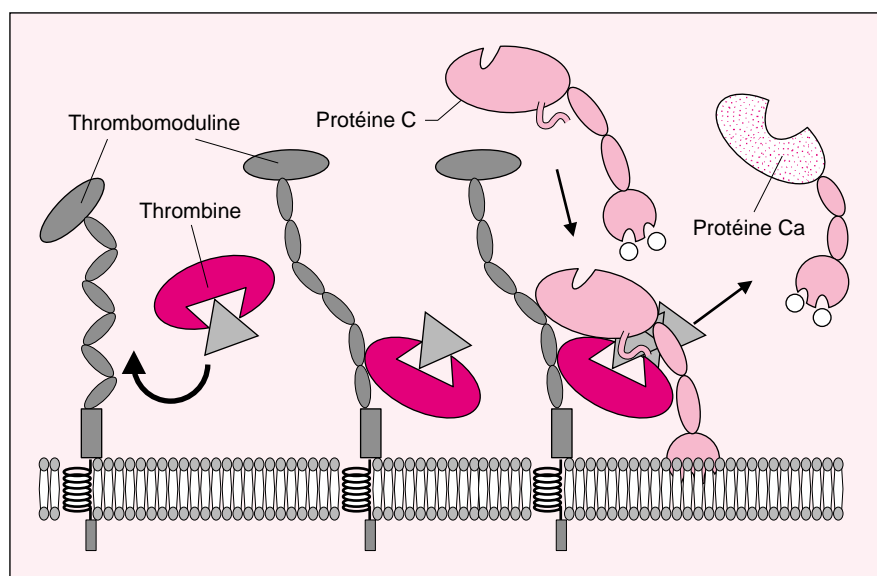


Figure 2. **Mécanisme d'action de la thrombomodulation.** La thrombomoduline (en gris) est une protéine membranaire des cellules endothéliales. La thrombine (en rouge) a une forte affinité pour la thrombomoduline, contrairement à la protéine C (en rose). La thrombine en solution n'active que très lentement la protéine C. La liaison de la thrombine à la thrombomoduline induit une très importante modification de la conformation du cofacteur. Cette transformation, en dévoilant un site de liaison cryptique pour la protéine C, permet à la thrombine d'activer très rapidement la protéine C en protéine Ca (en pointillé rose).

site expliquait très simplement que le cofacteur soit un puissant inhibiteur des fonctions procoagulantes de l'enzyme. En dehors de cette action amplement démontrée d'inhibiteur stérique de la thrombine et de son rôle dans l'activation de la protéine C, la thrombomoduline n'influence de façon spectaculaire que l'activation d'une carboxypeptidase impliquée dans le système de la fibrinolyse [11]. Si la liaison du cofacteur induit bien quelques modifications (mineures) de la catalyse de la thrombine, des modifications très similaires peuvent être obtenues par la liaison d'autres ligands de l'exosite 1, par ailleurs incapables d'augmenter la vitesse d'activation de la protéine C [12]. Ce changement de spécificité très restreint, dû à un changement de conformation apparemment très restreint, s'avérait insuffisant pour expliquer l'augmentation de plus de 1 000 fois de la vitesse d'activation de la protéine C par le complexe. D'où l'idée que le cofacteur pourrait agir en substituant un site de liaison secondaire incapable de lier la protéine C (l'exosite 1 de la thrombine) par une matrice hautement favorable à l'interaction. Cependant, l'argument selon lequel la protéine C n'a pas d'affinité pour la thrombomoduline (non complexée à la thrombine) mettait le modèle matriciel en difficulté. La structure du complexe qui vient d'être publiée permet de proposer une alternative qui est compatible avec toutes les données disponibles:

si le modèle purement allostérique est caduque, le modèle matriciel ne survit... que grâce à un changement de conformation du cofacteur !

La thrombomoduline semble utiliser un mécanisme qu'aucun auteur n'avait proposé. La surprise est venue du fait que, si la liaison du cofacteur n'induit qu'un changement minime de conformation de l'enzyme, l'association produit en revanche une altération très importante de la conformation du cofacteur (figure 2). C'est ce remaniement de la thrombomoduline qui dévoile le site de liaison manquant pour la protéine C. Que la liaison du cofacteur lui permette d'exposer un site secondaire cryptique explique très bien pourquoi le substrat n'a pas d'affinité pour la thrombomoduline non complexée à la thrombine.

1. Fuentes-Prior P, Iwanaga Y, Huber R, *et al.* Structural basis for the anticoagulant activity of the thrombin-thrombomodulin complex. *Nature* 2000; 404: 518-25.
2. Wood MJ, Sampoli Benitez BA, Komives EA. Solution structure of the smallest cofactor-active fragment of thrombomodulin. *Nat Struct Biol* 2000; 7: 200-4.
3. Davie EW, Fujikawa K, Kisiel W. The coagulation cascade: initiation, maintenance, and regulation. *Biochemistry* 1991; 30: 10363-70.
4. Esmo CT, Owen WG. Identification of an endothelial cell cofactor for thrombin-catalyzed activation of protein C. *Proc Natl Acad Sci USA* 1981; 78: 2249-52.
5. Esmo CT. The regulation of natural anticoagulant pathways. *Science* 1987; 235: 1348-52.
6. Jakubowski HV, Kline MD, Owen WG. The effect of bovine thrombomodulin on the specificity of bovine thrombin. *J Biol Chem* 1986; 261: 3876-82.

7. Esmo CT. The role of protein C and thrombomodulin in the regulation of blood coagulation. *J Biol Chem* 1989; 264: 4743-6.

8. Ye J, Esmo NL, Esmo CT, Johnson, AE. The active site of thrombin is altered upon binding to thrombomodulin. *J Biol Chem* 1991; 266: 23016-21.

9. Le Bonniec BF, MacGillivray RTA, Esmo CT. Thrombin Glu-39 restricts the P'3 specificity to nonacidic residues. *J Biol Chem* 1991; 266: 13796-803.

10. Tsiang M, Lentz SR, Dittman WA, Wen D, Scarpati EM, Sadler JE. Equilibrium binding of thrombin to recombinant human thrombomodulin: effect of hirudin, fibrinogen, factor Va and peptide analogues. *Biochemistry* 1990; 29: 10602-12.

11. Bajzar L, Morser J, Nesheim M. TAFI, or plasma procarboxypeptidase B, couples the coagulation and fibrinolytic cascades through the thrombin-thrombomodulin complex. *J Biol Chem* 1996; 271: 16603-8.

12. Marque P-E, Spuntarelli R, Juliano L, Aiach M, Le Bonniec BF. The role of Glu¹⁹² in the allosteric control of the S2' and S3' subsites of thrombin. *J Biol Chem* 2000; 275: 809-16.

Bernard Le Bonniec
Pierre-Emmanuel Marque

Inserm U. 428, Faculté de pharmacie, 4, avenue de l'Observatoire, 75270 Paris Cedex 6, France.