



méthylées), il est clair que c'est une modification beaucoup moins dynamique que l'acétylation ou la phosphorylation. C'est une des raisons qui laissent penser que la méthylation des histones serait un moyen pour la cellule de « marquer » des domaines étendus de chromatine. En accord avec cette idée, l'hétérochromatine centromérique, qui est « marquée » par la méthylation de la lysine 9 de l'histone H3, se conserve au cours du cycle mitotique de manière indépendante de la séquence primaire d'ADN [3]. La méthylation de la lysine 9 correspondrait ainsi à des zones silencieuses, alors que, au contraire, la méthylation de la lysine 4 définirait des régions permissives à la transcription. Cette hypothèse a été confirmée dans le cas du locus de type sexuel dans *S. pombe* [9] (Figure 1) ou du locus de la β -globine chez le poulet [6]. Le rôle moléculaire des éléments barrières ou des isolateurs (*insulators*) qui fonctionnent comme frontières entre deux zones, serait d'empêcher la propagation de la méthylation de la lysine 9 [6,9] (Figure 1).

Des études récentes indiquent cependant que la méthylation des histones pourrait être également impliquée dans la régulation de promoteurs spécifiques [10,11]. Dans ce cas-là, la modi-

fication ne concerne pas un domaine étendu, mais seulement un nombre limité de nucléosomes [11]. Ces résultats impliquent l'existence de mécanismes, encore inconnus, empêchant l'extension de la « marque » à tout le domaine chromatinien. Si ces résultats sont confirmés, alors la méthylation des histones pourrait, tout comme l'acétylation, être un intervenant majeur dans la régulation transcriptionnelle de promoteurs spécifiques.

Quoi qu'il en soit, le consensus actuel confère à la méthylation des histones un rôle de « marque » de larges domaines chromatinien. Cette conclusion appelle un certain nombre de questions : que marquent les méthylation de la K20 de l'histone H4 et de la K27 de l'histone H3 ? Quelles sont les relations fonctionnelles entre la méthylation des histones et les autres marques de la chromatine, comme l'acétylation

des histones ou la méthylation de l'ADN ? ♦

Histone methylation: delineate chromatin domains ?

1. Nicolas E, Vandel L, Trouche D. Quand la méthylation des histones entre en scène... *Med Sci* 2001; 17: 476-9.
2. Zhang Y, Reinberg D. Transcription regulation by histone methylation: interplay between different covalent modifications of the core histone tails. *Genes Dev* 2001; 15: 2343-60.
3. Jenuwein T. Re-SET-ting heterochromatin by histone methyltransferases. *Trends Cell Biol* 2001; 11: 266-73.
4. Nakayama J, Rice JC, Strahl BD, Allis CD, Grewal SI. Role of histone H3 lysine 9 methylation in epigenetic control of heterochromatin assembly. *Science* 2001; 292: 110-3.
5. Jacobs SA, Taverna SD, Zhang Y, et al. Specificity of the HP1 chromo domain for the methylated N-terminus of histone H3. *EMBO J* 2001; 20: 5232-41.
6. Litt MD, Simpson M, Gaszner M, Allis CD, Felsenfeld G. Correlation between histone lysine methylation and developmental changes at the chicken beta-globin locus. *Science* 2001; 293: 2453-5.
7. Strahl BD, Allis CD. The language of covalent histone modifications. *Nature* 2000; 403: 41-5.
8. Vandel L, Trouche D. Physical association between the histone acetyl transferase CBP and a histone methyl transferase. *EMBO Reports* 2001; 2: 21-26.
9. Noma K, Allis CD, Grewal SI. Transitions in distinct histone H3 methylation patterns at the heterochromatin domain boundaries. *Science* 2001; 293: 1150-5.
10. Vandel L, Nicolas E, Vaute O, et al. Transcriptional repression by the retinoblastoma protein through the recruitment of a histone methyltransferase. *Mol Cell Biol* 2001; 21: 6484-94.
11. Nielsen SJ, Schneider R, Bauer UM, et al. Rb targets histone H3 methylation and HP1 to promoters. *Nature* 2001; 412: 561-5.

NOUVELLE

La thrombine et ses récepteurs: implications dans l'hémostase et le développement embryonnaire

Martine Jandrot-Perrus

> La thrombine est le produit d'une cascade finement réglée d'activation de zymogènes déclenchée par la rencontre des facteurs plasmatiques de la coagulation et du facteur tissulaire exposé au

niveau d'une lésion vasculaire. La thrombine clive le fibrinogène soluble en monomères qui forment par polymérisation le réseau de fibrine insoluble. Ce processus associé à l'activation de pla-

E9907 Inserm,
Faculté Xavier Bichat, BP
416, 16, rue Henri Huchard,
75870 Paris Cedex 18, France.
mjandrot@bichat.inserm.fr

quettes au contact de la matrice sous-endothéliale aboutit à la formation du caillot assurant l'hémostase. La produc-

tion inappropriée de thrombine et /ou l'activation intempestive des plaquettes sont le fondement des événements thrombo-emboliques. La régulation de l'activité de la thrombine et de sa formation est donc cruciale. La thrombine a la capacité de contrôler positivement et négativement sa propre formation en activant d'une part les cofacteurs V et VIII et d'autre part la protéine C, elle-même responsable de l'inactivation de ces cofacteurs. Parmi les enzymes de la coagulation, la thrombine se caractérise par une activité cellulaire importante. En effet, elle est un puissant activateur des plaquettes et de multiples études ont montré qu'elle induit des signaux dans la plupart des cellules étudiées *in vitro*.

Après un quart de siècle de recherches infructueuses, un récepteur de la thrombine a été simultanément identifié et son gène cloné par différents groupes [1, 2]. Ce récepteur appartient à la superfamille des récepteurs à sept domaines transmembranaires couplés aux protéines G mais possède un mécanisme d'action particulier. La thrombine se lie au récepteur par un site spécifique et le clive, démasquant une nouvelle extrémité N-terminale qui agit comme peptide agoniste interne (Figure 1). Du fait de son clivage, ce récepteur appelé PAR1 (*protease activated receptor-1*) est à usage unique. PAR1 est le premier d'une famille de quatre comportant PAR3 et PAR4 également récepteurs de la thrombine [3], PAR2 n'étant en revanche pas activé par la thrombine. La distribution tissulaire et cellulaire large de PAR1 rend compte des effets multiples de la thrombine observés *in vitro*.

Cependant, *in vivo*, le rôle de la thrombine au niveau cellulaire n'est pas clair

mais l'obtention de souris déficientes en protéines impliquées dans la formation de la thrombine ou de son récepteur apporte de nouveaux éléments.

L'invalidation du gène de PAR1 [4] a révélé deux notions importantes : d'une part, l'activation des plaquettes par la thrombine implique d'autres récepteurs que PAR1, et d'autre part le rôle physiologique de la thrombine et de l'activation de son récepteur dépasse le strict cadre de l'hémostase, puisqu'il contribue au développement embryonnaire. Shaun Coughlin et son groupe ont très largement contribué à l'identification des récepteurs de la thrombine et leurs deux derniers articles [5, 6] vont plus loin dans la description de leur rôle tant au plan de l'hémostase que de l'embryogenèse.

Rôle des récepteurs de la thrombine dans l'hémostase et la thrombose

L'activation des plaquettes par la thrombine fait intervenir au moins deux PAR (Figure 1) de manière sensiblement différente chez l'homme et la souris.

plaquettes humaines expriment PAR1 et PAR4, les deux récepteurs étant activables indépendamment l'un de l'autre. PAR1 est activé par la thrombine à faible concentration alors que, en raison de sa plus faible affinité pour l'enzyme, PAR4 est activé à plus forte concentration [3]. En revanche, les plaquettes de souris expriment PAR3 et PAR4, tous les deux nécessaires à l'activation des plaquettes. L'invalidation des gènes de PAR3 [7] et de PAR4 [6] a montré que PAR3 est insuffisant pour induire l'activation des plaquettes mais que en liant la thrombine, il se comporte comme cofacteur de l'activation de PAR4.

L'invalidation du gène de PAR4 a pour conséquence un allongement très important du temps de saignement confirmant que l'activation des plaquettes par la thrombine est nécessaire pour assurer l'hémostase. Par ailleurs, dans un modèle *in vivo* de thrombose mésentérique, le temps d'occlusion artériolaire et le nombre d'artéριοles occluses sont réduits dans le cas des souris déficientes en PAR4 indiquant que

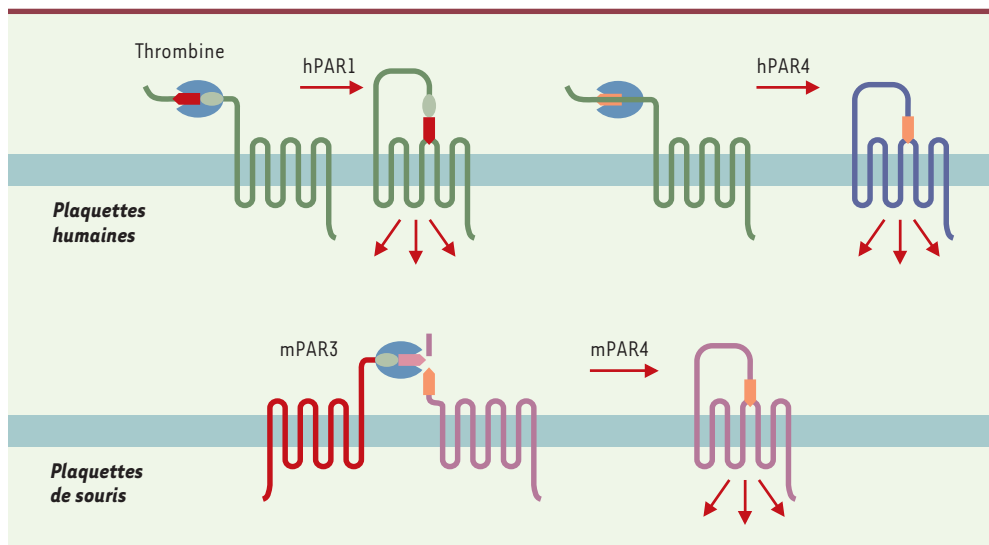


Figure 1. Les PAR des plaquettes humaines et de souris. Les plaquettes humaines expriment PAR1 et PAR4 qui peuvent être indépendamment activés par la thrombine (en bleu). La liaison de la thrombine à PAR1 au niveau d'un site complémentaire permet le clivage du site peptidique cible, la nouvelle extrémité N-terminale démasquée agissant en tant que peptide agoniste interne. PAR4 ne possédant pas de site complémentaire de liaison de la thrombine, n'est activé qu'à forte concentration d'enzyme. Les plaquettes de souris expriment PAR3 et PAR4. PAR3 est incapable d'induire des signaux par lui-même, mais présente un site de liaison de la thrombine et agit comme cofacteur du clivage et de l'activation de PAR4.

l'activation des plaquettes par la thrombine joue un rôle crucial dans ce modèle de thrombose.

L'observation que l'ablation de la signalisation induite par la thrombine dans la plaquette de souris protège contre la thrombose et que des anticorps anti-PAR réduisent l'occlusion cyclique des vaisseaux dans un autre modèle animal de thrombose, suggère que l'inhibition des signaux plaquettaire induits par la thrombine pourrait constituer une stratégie de prévention et de traitement des thromboses. Cependant quelques réserves peuvent être émises quant à la faisabilité et à l'innocuité d'une telle approche. En effet, en raison du mécanisme spécifique d'activation des plaquettes humaines par la thrombine, il serait nécessaire de bloquer simultanément l'activation de PAR1 et de PAR4 pour être efficace. Il n'est de plus pas formellement exclu que d'autres récepteurs, en particulier le complexe des glycoprotéines Ib-IX-V, soient également impliqués dans l'activation des plaquettes par la thrombine [8]. De plus, le

temps de saignement très prolongé des souris *PAR4*^{-/-} ferait craindre un risque hémorragique élevé.

Rôle des récepteurs de la thrombine dans le développement

L'analyse croisée des résultats de différentes invalidations de gènes touchant soit les facteurs de la coagulation soit les PAR indique clairement l'implication de la cascade de la coagulation et des PAR dans le développement vasculaire chez l'embryon.

Le nombre de souriceaux *PAR4*^{-/-} et *PAR3*^{-/-} obtenus par croisement de souris hétérozygotes pour le déficit respecte la fréquence mendélienne et ces souris se développent normalement [6, 7]. En revanche, 50% des embryons *PAR1*^{-/-} meurent prématurément d'hémorragie et d'insuffisance cardiovasculaire [4, 5]. Des hémorragies microscopiques sont observées dès J8,5 et à J9,5 les hémorragies sont macroscopiques avec présence de sang dans les cavités péricardique, amniotique et péritonéale [5].

Différents arguments indiquent que ces

hémorragies ne sont pas dues à un défaut de l'hémostase : les plaquettes ne sont pas encore produites à ce stade du développement et lorsqu'elles sont produites, elles sont normalement activées par la thrombine *via* PAR3/PAR4. En revanche des anomalies vasculaires seraient à l'origine des hémorragies. Un retard de développement vasculaire, des brèches dans la paroi du sinus veineux et des anomalies des vaisseaux du sac vitellin sont observés. En raison de l'expression endothéliale de PAR1, les auteurs [5] ont émis l'hypothèse que la perte des signaux couplés à PAR1 dans les cellules endothéliales et de l'endocarde serait à l'origine des anomalies vasculaires. De fait, dans les animaux *PAR1*^{-/-}, la réintroduction de PAR-1 dans les cellules endothéliales par un transgène dont l'expression est sous le contrôle du promoteur/enhancer Tie-2 qui cible spécifiquement les cellules endothéliales, réduit de trois à quatre fois la mortalité embryonnaire.

Les signaux couplés à PAR1 semblent donc cruciaux pour le dévelop-

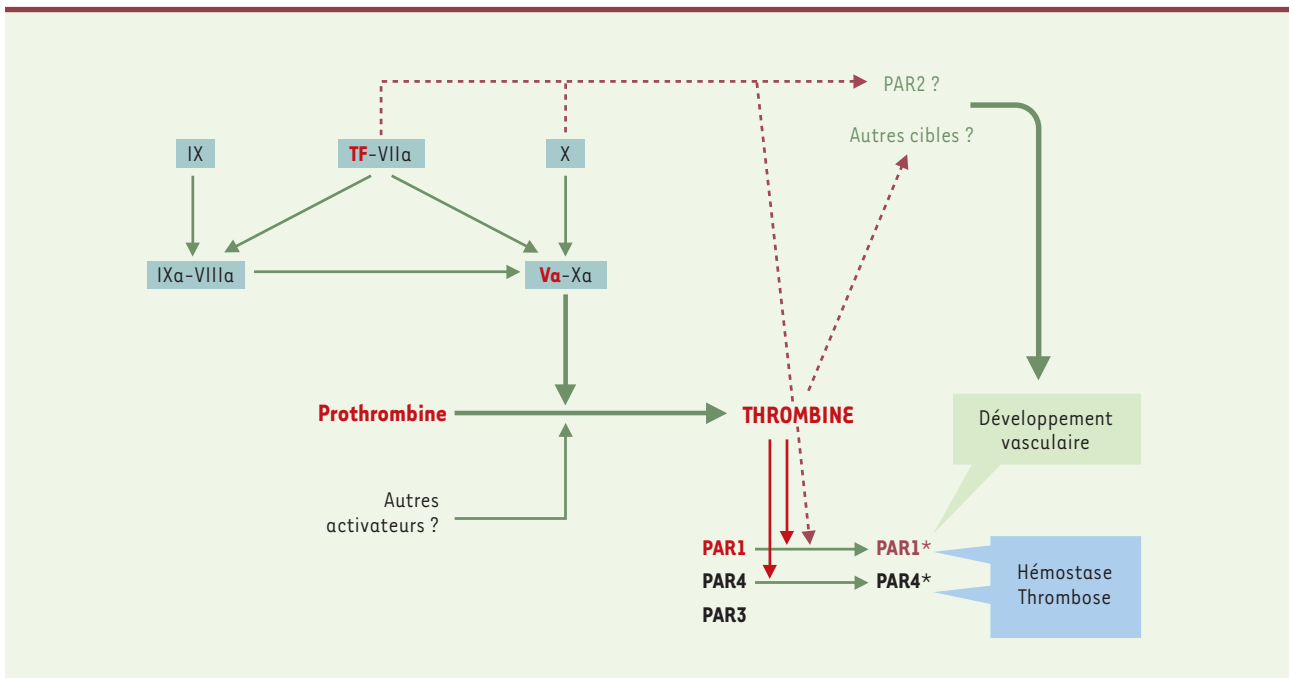


Figure 2. Modèle d'action de la thrombine, de ses récepteurs et des protéines de coagulation d'amont dans l'hémostase et le développement. La voie classique d'activation de la prothrombine est représentée. Les protéines dont le déficit est associé à des anomalies du développement vasculaire sont indiquées en rouge.

pement vasculaire. Mais la thrombine est-elle alors l'activateur endogène de PAR1 et dans quelle mesure les protéines de la coagulation agissant en amont de la thrombine sont-elles impliquées dans ce processus (Figure 2) ? Le phénotype des souris déficientes en prothrombine (ou facteur II) (*FII*^{-/-}) est proche de celui de souris *PAR1*^{-/-} avec une vague de mortalité précoce entre J9,5 et J11,5 [9] et des hémorragies [9]. De même, le déficit en Facteur V (FV), cofacteur de l'activation de la prothrombine par le Facteur Xa (FXa) résulte dans le décès prématuré (J9,5-J10,5) de ~50% des embryons [10]. Ces observations sont en faveur d'un rôle précoce de la thrombine dans le développement vasculaire. Il est à noter que les premiers signes d'anomalie du développement vasculaire des souris *FII*^{-/-} et *PAR1*^{-/-} précèdent la formation du bourgeon hépatique (J10,5), lieu de synthèse de la prothrombine, suggérant une expression embryonnaire extra-hépatique. Concernant les autres facteurs de la coagulation en amont de l'activation de la prothrombine, le déficit en FX résulte aussi en une létalité embryonnaire partielle et plus tardive (J12,5), liée à des hémorragies sans modifications vasculaires [11] alors que le déficit en facteur VII n'a pas de conséquences sur le développement embryonnaire [12]. En revanche l'inactivation du gène du facteur tissulaire (FT)¹ est létale, avec mort de tous les embryons *FT*^{-/-} entre J9,5 et J11,5 par fuite des globules rouges hors des vaisseaux embryonnaires et extra-embryonnaires [13], indiquant que le FT est indispensable pour l'établissement et/ou le maintien de l'intégrité vasculaire au cours du développement embryonnaire. Griffin *et al.* [5] ont observé un phénotype et un degré de mortalité similaire pour les embryons *PAR1*^{-/-}*FV*^{-/-}. La comparaison du phénotype de ces doubles *knock-out* (100% de mortalité) et du phénotype qu'entraîne l'inactivation d'un seul gène (50% de mortalité) suggère que PAR1 peut être activé en l'absence de FV, soit par les

traces de thrombine qui peuvent être produites par le FXa, en l'absence de FVa, soit par d'autres protéases. Il a ainsi été récemment montré que PAR1 pouvait être efficacement activé par le complexe FT-FVIIa-FX [14]. Par ailleurs, d'autres PAR que PAR1 peuvent être impliqués dans le développement vasculaire. En effet, les cellules endothéliales expriment PAR2 qui peut lui-même être activé par le FXa couplé à son récepteur *εPR-1* (*effector-protease receptor-1*) et le déficit en PAR2 s'accompagne d'une surmortalité pré- et postnatale [15].

Chez l'homme le déficit héréditaire en FV ou para-hémophilie est rare (1/10⁶), la survie des patients étant imputée à la production de traces de FV. Un déficit complet en prothrombine et en FX est rarement rencontré. Concernant PAR1 et le FT, il n'a jusqu'à présent été rapporté aucun cas de déficit, suggérant que de tels déficits sont létaux.

L'ensemble de ces investigations permet une meilleure compréhension des mécanismes de l'hémostase et l'ouverture de nouvelles voies dans la prévention et le traitement des thromboses.

Par ailleurs, elles mettent en évidence un rôle original du système de la coagulation dont certaines protéines sont adaptées pour contribuer à la croissance et à la stabilité vasculaire au cours du développement embryonnaire. ♦

Thrombin and its receptors : beyond hemostasis, a role in embryonic development

¹ Le FT est une protéine membranaire qui agit comme cofacteur du facteur VIIa et dont l'expression tissulaire normale est physiquement bien séparée du flux sanguin. L'exposition du FT par une lésion vasculaire est considérée comme élément déclenchant de la coagulation.

1. Vu TK, Hung DT, Wheaton VI, Coughlin SR. Molecular cloning of a functional thrombin receptor reveals a novel proteolytic mechanism of receptor activation. *Cell* 1991 ; 64 : 1057-68.
2. Rasmussen UB, Vouret-Craviari V, Jallat S, *et al.* cDNA cloning and expression of a hamster alpha-thrombin receptor coupled to Ca²⁺ mobilization. *FEBS Lett*, 1991 ; 288 : 123-8.
3. Coughlin SR. Thrombin signalling and protease-activated receptors. *Nature* 2000 ; 407 : 258-64.
4. Connolly AJ, Ishihara H, Kahn ML, Farese RV, Coughlin SR. Role of the thrombin receptor in development and evidence for a second receptor. *Nature* 1996 ; 381 : 516-9.
5. Griffin CT, Srinivasan Y, Zheng YW, Huang W, Coughlin SR. A role for thrombin receptor signaling in endothelial cells during embryonic development. *Science* 2001 ; 293 : 1666-70.
6. Sambrano GR, Weiss EJ, Zheng YW, Huang W, Coughlin SR. Role of thrombin signaling in platelets in haemostasis and thrombosis. *Nature* 2001 ; 413 : 74-8.
7. Kahn ML, Zheng YW, Huang W, *et al.* A dual thrombin receptor system for platelet activation. *Nature* 1998 ; 394 : 690-4.
8. Berndt MC, Shen Y, Doppeide SM, Gardiner EE, Andrews RK. The vascular biology of the glycoprotein Ib-IX-V complex. *Thromb Haemost* 2001 ; 86 : 178-88.
9. Sun WY, Witte DP, Degen JL, *et al.* Prothrombin deficiency results in embryonic and neonatal lethality in mice. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1998 ; 95 : 7597-602.
10. Cui J, *et al.* Fatal haemorrhage and incomplete block to embryogenesis in mice lacking coagulation factor V. *Nature* 1996 ; 384 : 66-8.
11. Dewerchin M, Liang Z, Moons L, *et al.* Blood coagulation factor X deficiency causes partial embryonic lethality and fatal neonatal bleeding in mice. *Thromb Haemost* 2000 ; 83 : 185-90.
12. Rosen ED, Chan JC, Idusogie E, *et al.* Mice lacking factor VII develop normally but suffer fatal perinatal bleeding. *Nature* 1997 ; 390 : 290-4.
13. Bugge TH, Xiao Q, Kombrinck KW, *et al.* Fatal embryonic bleeding events in mice lacking tissue factor, the cell-associated initiator of blood coagulation. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996 ; 93 : 6258-63.
14. Riewald M, Ruf W. Mechanistic coupling of protease signaling and initiation of coagulation by tissue factor. *Proc Natl Acad Sci USA* 2001 ; 98 : 7742-7.
15. Damiano BP, Cheung WM, Santulli RJ, *et al.* Cardiovascular responses mediated by protease-activated receptor-2 (PAR-2) and thrombin receptor (PAR-1) are distinguished in mice deficient in PAR-2 or PAR-1. *J Pharmacol Exp Ther* 1999 ; 288 : 671-8.