

*UFR de Medecine Paris 7 - Denis Diderot*

**P2 - Hématologie**

**Physiologie et exploration  
de l'Hémostase**

**Annie BEZEAUD**

**- 2011 -**

## Plan

<b>HEMOSTASE : PHYSIOLOGIE</b>	2
<b>Hémostase primaire</b>	3
I - Les intervenants	3
II - Les différentes étapes	5
<b>Coagulation plasmatique</b>	14
I - Les protéines plasmatiques	14
II - Le rôle de la vitamine K dans la synthèse des protéines de la coagulation	15
III - Initiation par le facteur tissulaire	17
IV - Le rôle des cofacteurs protéiques de la coagulation	20
V - Phase contact	21
VI - Formation du caillot de fibrine	22
VII - Résumé des étapes	24
<b>La fibrinolyse</b>	26
<b>Inhibiteurs physiologiques</b>	30
I - Contrôle de l'activation des plaquettes	30
II - Contrôle de la coagulation plasmatique	31
<b>HEMOSTASE : EXPLORATION</b>	38
I - Hémostase primaire	38
II - Coagulation plasmatique	39
III - La fibrinolyse	42
<b>INTERROGATOIRE ET EXAMEN DU PATIENT PRESENTANT UN SYNDROME HEMORRAGIQUE</b>	44

**Références :** Hématologie et transfusion, *Connaissances et pratique*, J.P. Lévy, B. Varet, J.P. Clauvel, F. Lefrère, A. Bezeaud, M.C. Guillin, Masson, Paris, 2008, Chapitre 23 et 24.

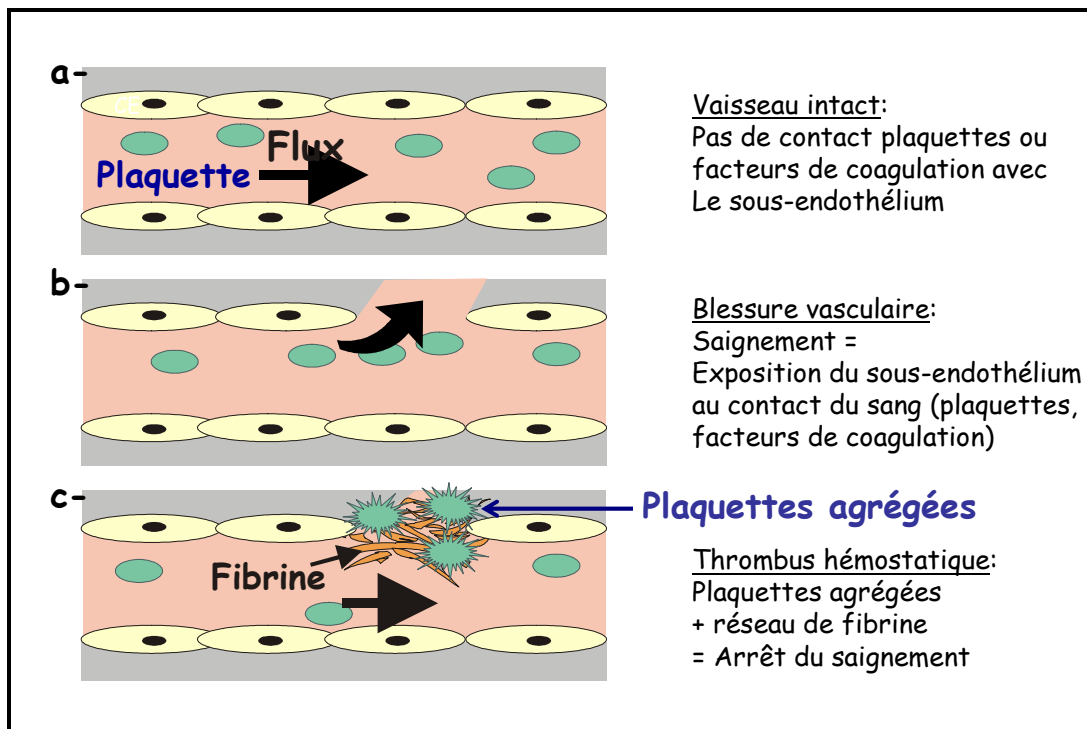
**Plan de cours 2011**

Site web: <http://www.hemostasep2.geht.org>

## HEMOSTASE : PHYSIOLOGIE

### DEFINITION

L'hémostase est un processus physiologique qui regroupe l'ensemble des phénomènes déclenchés par une lésion vasculaire et destinés à limiter les pertes sanguines au niveau de la brèche vasculaire.



a) Dans un vaisseau intact, le sang reste fluide. Les plaquettes ne sont pas activées par l'endothélium et il n'y a pas de contact des facteurs de coagulation avec le sous-endothélium.

b) Un traumatisme crée une brèche vasculaire qui rompt la continuité de la mono-couche de cellules endothéliales et expose les structures sous endothéliales au contact du sang.

c) Ce contact avec le sous-endothélium entraîne l'**adhésion** et l'**activation** des plaquettes au site de la lésion ainsi que l'activation de la coagulation conduisant à la formation de fibrine : le thrombus fait de **plaquettes agrégées et de fibrine** comble la brèche vasculaire et arrête le saignement, et permet la cicatrisation. Le processus de **fibrinolyse** permettra la redissolution du caillot et la reperméabilisation du vaisseau.

## Les principales caractéristiques de la coagulation du sang

- Un événement **provoqué** (lésion vasculaire)
- **Localisé** à la brèche vasculaire
- Le thrombus hémostatique (plaquettes + fibrine) résulte d'une **succession de réactions enzymatiques** se déroulant sur une **surface phospholipidique** (plaquettes activées)
- Ces réactions enzymatiques sont des **protéolyses limitées** qui convertissent des pro-enzymes en enzymes
- Important processus **d'auto-amplification** (rapidité = efficacité)
- **Contrôle négatif** limitant la diffusion à distance de la brèche
- Le thrombus hémostatique permet la **cicatrisation**
- La fibrine est ensuite dissoute (**fibrinolyse**)

Schématiquement on distingue :

- hémostase primaire (adhésion/activation/agrégation des plaquettes) et
- activation de la coagulation plasmatique, mais les 2 phénomènes sont **simultanés et interdépendants**.

## Hémostase primaire

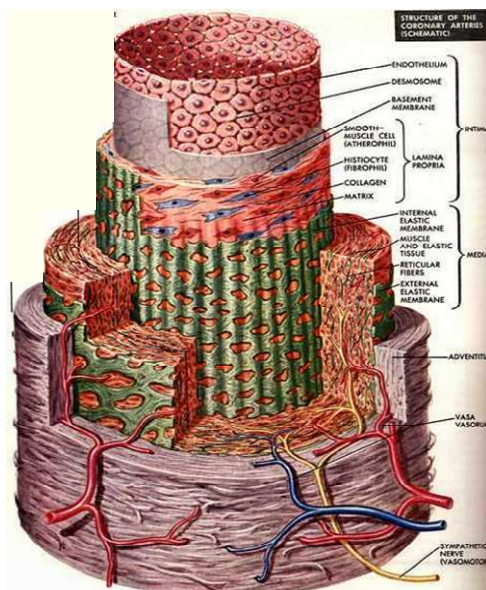
### I - LES INTERVENANTS

Une surface catalytique = les plaquettes activées.

- Succession d'évènements aboutissant à la formation d'un **agrégat de plaquettes** sur la brèche vasculaire
- Fait intervenir :
  - Le vaisseau
  - Les plaquettes et des récepteurs
  - Le facteur Willebrand (circule lié au F.VIII)
  - Le Fibrinogène

#### 1) Le vaisseau

### Structure schématique d'un vaisseau

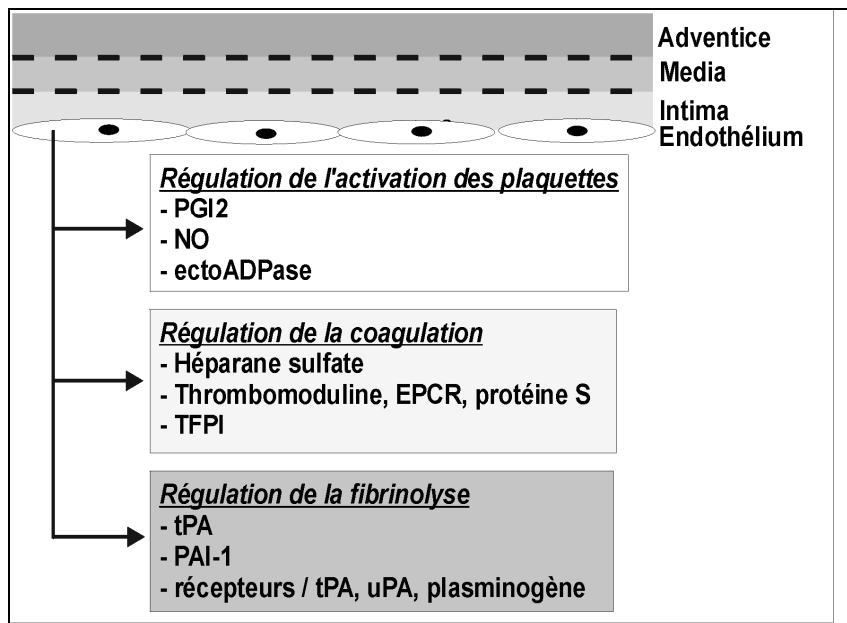


La paroi du vaisseau comporte 3 tuniques concentriques. A partir de la lumière vasculaire se trouvent l'intima, la média puis l'adventice.

L'**intima** (la tunique la plus interne) est formée de l'endothélium et du sous-endothélium.

L'**endothélium** est constitué d'une monocouche de cellules endothéliales qui empêche le sang d'entrer en contact avec le **sous-endothélium** thrombogène.

La cellule endothéliale est **non thrombogène** : elle **protège de l'activation des plaquettes**, elle **régule négativement la coagulation** et synthétise des protéines du **système fibrinolytique**.



Le sous-endothélium est **thrombogène** : il va permettre l'adhésion des plaquettes et l'activation de la coagulation. Il est composé de macromolécules synthétisées par la cellule endothéliale sus-jacente : collagènes, microfibrilles, fibronectine, thrombospondine, facteur Willebrand, glycosaminoglycanes.

## 2) Les plaquettes

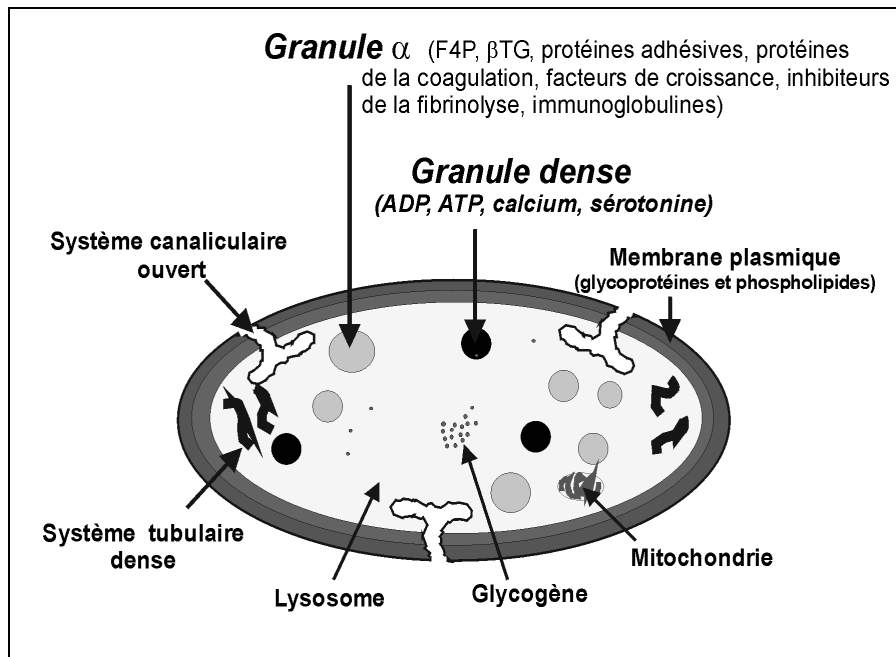
Formées dans la moëlle osseuse à partir du mégacaryocyte, ce sont des structures discoïdes, anucléées (150 à 400 G/l). Leur durée de vie est de 8 à 10 jours. Après leur mort, elles sont phagocytées par les macrophages essentiellement de la rate, du foie, de la moëlle osseuse.

Des **granules** sont présents dans le cytoplasme des plaquettes :

- les **granules  $\alpha$**  contiennent des protéines. Certaines sont spécifiques de la plaquette (facteur 4 plaquettaire,  $\beta$  thromboglobuline) ou non (fibronectine, thrombospondine, fibrinogène, facteur Willebrand et autres facteurs de la coagulation, des facteurs de croissance, des inhibiteurs de la fibrinolyse, des immunoglobulines).
- les **granules denses** contiennent de l'ADP, du calcium et de la sérotonine.

Le contenu des granules sera sécrété via le système canaliculaire ouvert lors de l'activation.

La **membrane** des plaquettes est formée d'une bicouche de phospholipides dans laquelle sont insérés des **récepteurs** pour un certain nombre de molécules (ADP, collagène, thrombine ...). Certains de ces récepteurs deviennent fonctionnels uniquement après activation des plaquettes (ex : GPIIb-IIIa).



### 3) Le facteur Willebrand (vWF)

Sécrété par la cellule endothéliale, Il est libéré a la fois dans le sous endothélium et le plasma. Le vWF du sang circulant n'a pas la conformation requise pour se fixer à la plaquette, il circule lié au facteur VIII qu'il stabilise. Le vWF est également présent dans les granules alpha des plaquettes. Le degré de polymérisation du vWF est fonction de sa localisation: les multimères de grande taille sont présents dans le sous endothélium où ils ont la conformation nécessaire à leur fixation sur la plaquette, le vWF des plaquettes qui est aussi sous forme de multimères n'intervient qu'après l'activation plaquettaire

### 4) Le fibrinogène

Synthétisé par le foie, il est présent dans le plasma et les granules  $\alpha$  des plaquettes. Il est à la fois indispensable pour l'hémostase primaire où il conditionne **l'agrégation des plaquettes**, et pour la **coagulation** où la thrombine, enzyme produite lors de l'activation de la coagulation, le transforme de protéine soluble en un réseau insoluble.

## II - LES DIFFERENTES ETAPES

Dès l'exposition du sous-endothélium par la lésion vasculaire et la mise en contact du sang avec des protéines du sous-endothélium, les plaquettes vont s'arrêter pour boucher le trou.

### 1) Adhésion

Elle se fait grâce au **facteur Willebrand (vWF)** ancré dans le sous-endothélium. La fixation du vWF à la matrice sous-endothéliale induit un changement de conformation permettant sa fixation à la plaquette. Le vWF sert de COLLE entre le sous-endothélium et la plaquette à laquelle il se fixe par l'intermédiaire d'une glycoprotéine membranaire : la **Glycoprotéine Ib (GPIb)**. (Un déficit en GPIb ou en vWF entraînera un défaut d'adhésion des plaquettes donc un saignement.)

Les plaquettes peuvent également se fixer directement au **collagène** du sous-endothélium par l'intermédiaire de récepteurs spécifiques : l'intégrine  $\alpha 2\beta 1$ , GPVI ...

Le plasma contient une protéine de la famille des métalloprotéase : **ADAMTS 13** (A disintegrin and metalloprotease with thrombospondin type 1 repeats), a pour fonction de limiter la taille (et donc le pouvoir adhésif vis-à-vis des plaquettes) des multimères du vWF.

## 2) Activation

L'adhésion des plaquettes au sous-endothélium déclenche des signaux intra-cellulaires qui aboutissent à une série de réponses :

**2.1.** Les plaquettes changent de forme. Elles deviennent sphériques et forment des pseudopodes. Les granules se regroupent et leurs membranes fusionnent avec celle du système canaliculaire ouvert.

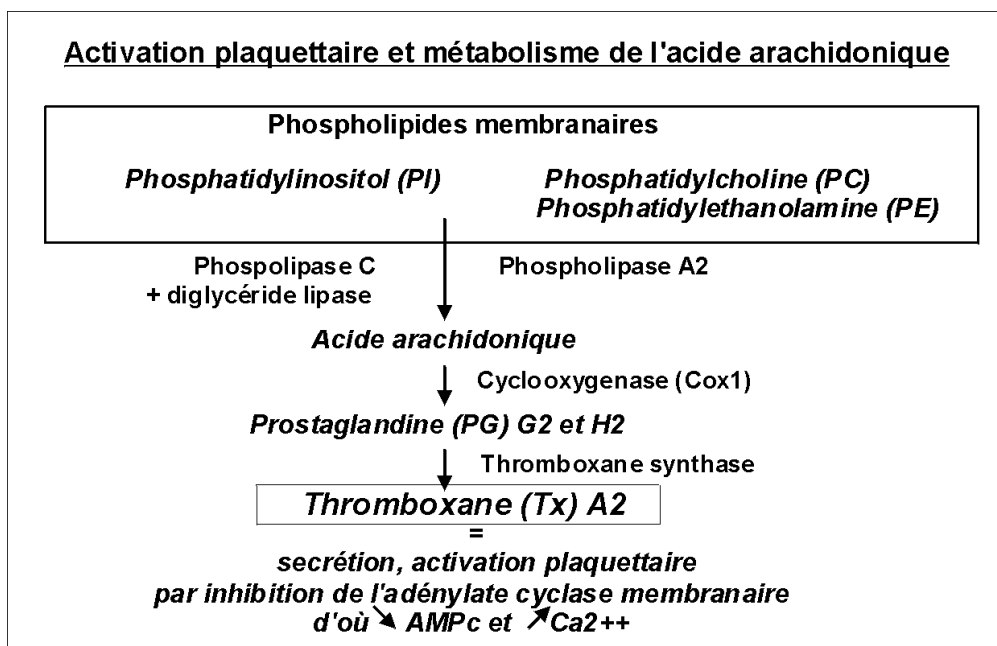
**2.2.** Cette fusion permet la **sécrétion** rapide du contenu des granules :

- Les **granules denses** libèrent leur **ADP**, puissant agent pro-agrégant, et la **sérotonine**, agent proagrégant et vasoconstricteur.

- Les **granules  $\alpha$**  libèrent des protéines qui vont participer à l'agrégation des plaquettes (ex : fibrinogène), ou à l'activation de la coagulation (ex : Facteur V).

**2.3. Les phospholipides membranaires libèrent l'acide arachidonique qui est transformé en thromboxane A2 (TxA2).**

Deux voies permettent la libération d'acide arachidonique et l'activation de la voie des prostaglandines : elles mettent en jeu, selon l'inducteur (collagène, ADP, thrombine ...), la phospholipase C ou la phospholipase A2. La cyclooxygénase (Cox) et la thromboxane synthase transforment l'acide arachidonique en thromboxane A2 (**TxA2**), puissant agent pro-agrégant et vasoconstricteur.



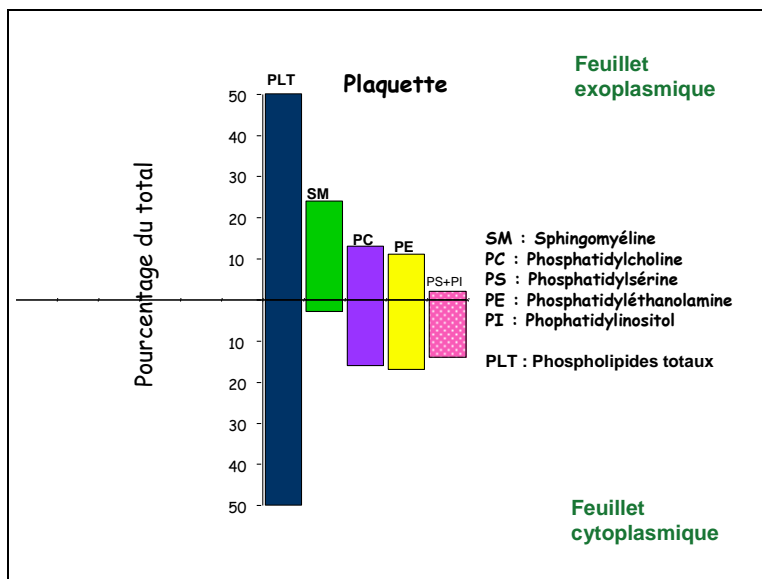
## POUR EN SAVOIR PLUS

**L'aspirine** est un inhibiteur de la cyclooxygénase (Cox1) qui inhibe l'activation des plaquettes en **bloquant la production de TxA2** : c'est un antiagrégant plaquettaire.

Dans la **cellule endothéliale**, la thromboxane synthase n'existe pas et est remplacée par une PGI2 synthase : l'activation conduit à la formation, non pas de TxA2, mais de prostacycline (PGI2), un puissant anti-agrégant. L'aspirine peut bloquer la Cox de la cellule endothéliale et diminuer la production de PGI2, ce qui limite son effet antithrombotique, mais seulement à dose élevée : c'est pourquoi l'aspirine est utilisée **à faible dose** pour la prévention des accidents thrombotiques.

**2.4.** Les phospholipides de la membrane plaquettaire subissent des remaniements, avec **exposition en surface de phospholipides acides** (phosphatidylserine par exemple), essentiels au processus de coagulation.

### Pourquoi l'activation des plaquettes crée une surface procoagulante ?



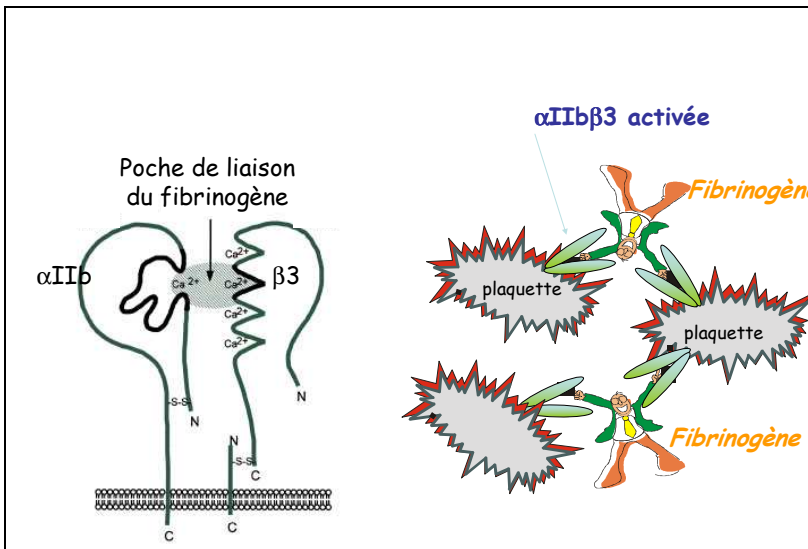
Dans toutes les cellules au repos (y compris les plaquettes), les phospholipides membranaires sont répartis de façon **asymétrique** dans les 2 feuillets de la membrane. La **phosphatidylsérine (PS)** et la phosphatidyléthanolamine (PE), deux aminophospholipides, sont séquestrés dans le feuillet interne, alors que le feuillet externe est constitué presque exclusivement de phosphatidylcholine (PC) et de sphingomyéline.

La membrane joue un rôle essentiel dans la **communication** entre la cellule et son environnement et certains événements cellulaires sont associés à une **modification** de l'asymétrie membranaire avec exposition en surface des aminophospholipides : c'est ce qui s'observe lors de l'activation des plaquettes ou lors du déclenchement du signal de reconnaissance des cellules apoptotiques par les macrophages.





#### 4) Agrégation des plaquettes

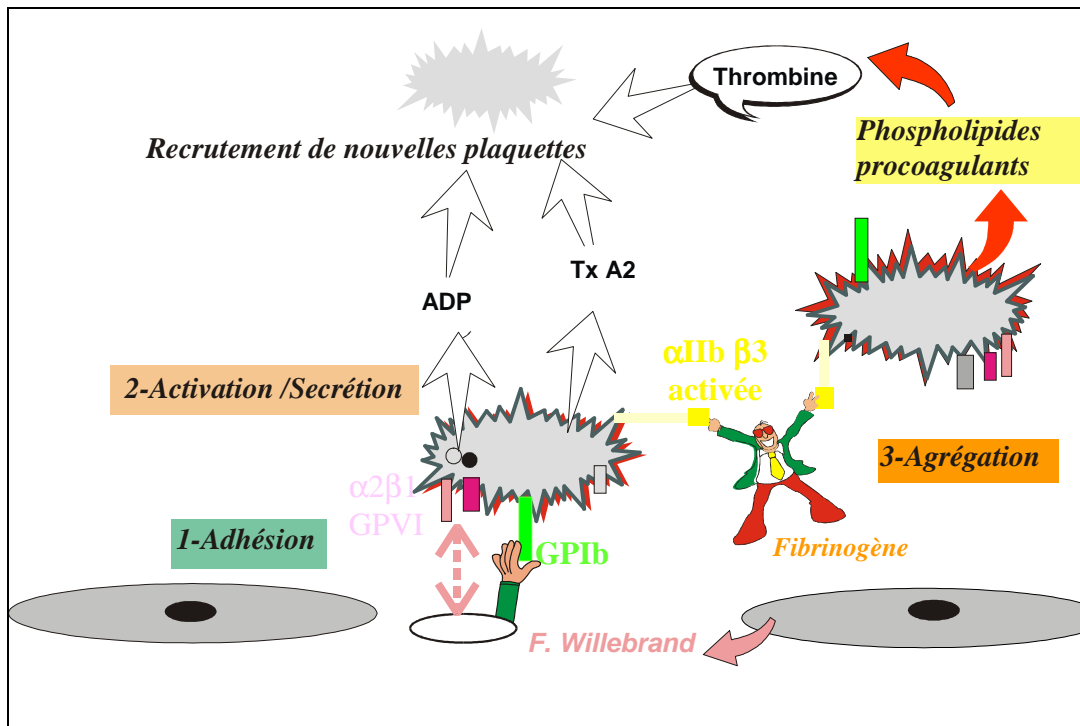


Elle se fait par l'intermédiaire du **fibrinogène** qui se fixe sur une glycoprotéine de la membrane plaquettaire, l'intégrine  **$\alpha$ IIb $\beta$ 3** (ou **GPIIb-IIIa**).

Lorsque les plaquettes sont activées, cette glycoprotéine adopte une conformation qui lui permet de reconnaître et de fixer le fibrinogène. Le fibrinogène est une protéine dimérique, qui possède plusieurs sites de reconnaissance pour **GPIIbIIIa activée**.

Ces interactions vont permettre d'accrocher les plaquettes les unes aux autres pour former un agrégat de plaquettes.

(Un déficit en GPIIb-IIIa se traduira par un défaut d'agrégation des plaquettes).

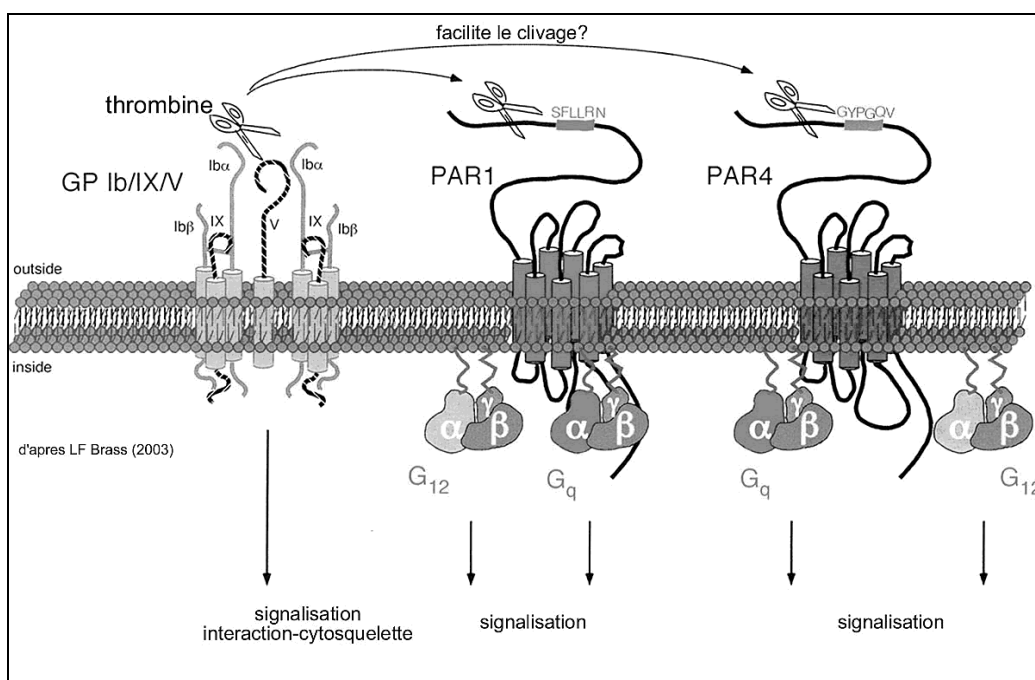


## POUR EN SAVOIR PLUS : Plaquettes et récepteurs

**1** - L'adhésion des plaquettes au vaisseau lésé fait intervenir des **protéines adhésives**, qui sont essentiellement le vWF et le collagène. Ces protéines ont leurs récepteurs spécifiques.

Le **vWF** du sous-endothélium se fixe sur la glycoprotéine Ib (GPIb) au sein du **complexe GPIb-V-IX** formé de glycoprotéines riches en leucines. La liaison du vWF à la GPIb permet de ralentir le mouvement des plaquettes à la surface de la lésion vasculaire et déclenche l'activation des plaquettes, et entre autres, de l'intégrine  $\alpha$ Ib $\beta$ 3 (ou GPIIb/IIIa). L'intégrine  $\alpha$ Ib $\beta$ 3 activée permet à son tour la liaison irréversible du vWF aux plaquettes.

L'interaction des plaquettes avec le **collagène** fait intervenir plusieurs récepteurs membranaires, parmi lesquels l'intégrine  $\alpha$ 2 $\beta$ 1 (ou GPIa/IIa) et une protéine de la superfamille des immunoglobulines, **GPVI**.



**2** - L'activation des plaquettes par des agonistes solubles fait intervenir essentiellement des **récepteurs couplés aux protéines G**, composés de 7 domaines transmembranaires.

- **La thrombine** active **PAR1**, le prototype des membres de la famille des récepteurs activés par protéolyse (PARs pour Protease Activated Receptors). Elle se lie à PAR1 et clive l'extrémité N terminale du récepteur. La nouvelle extrémité N terminale qui est démasquée se lie au récepteur et induit la signalisation. Elle active aussi PAR3 et PAR4.

- **Le TxA2** formé lors de l'activation des plaquettes va recruter de nouvelles plaquettes et les activer. Il exerce son action en se fixant sur des récepteurs plaquettaires (TP) qui sont couplés aux protéines.

- **L'ADP** qui est libéré des granules denses va aussi activer d'autres plaquettes et induire leur agrégation en se fixant sur plusieurs récepteurs : on en connaît au moins 2 actuellement : P2Y1 et P2Y12 qui sont des récepteurs couplés aux protéines G.

**3** - L'intégrine  $\alpha$ Ib $\beta$ 3 a la particularité de devoir être activée avant de lier le **fibrinogène**. Les signaux intracellulaires (inside/out) permettent un changement de conformation de l'intégrine, qui reconnaît alors des séquences complémentaires (en particulier une séquence Arg-Gly-Asp

ou RGD) sur le fibrinogène. La liaison du fibrinogène à  $\alpha\text{IIb}\beta\text{3}$  activée déclenche à son tour des signaux intracellulaires (outside/in).

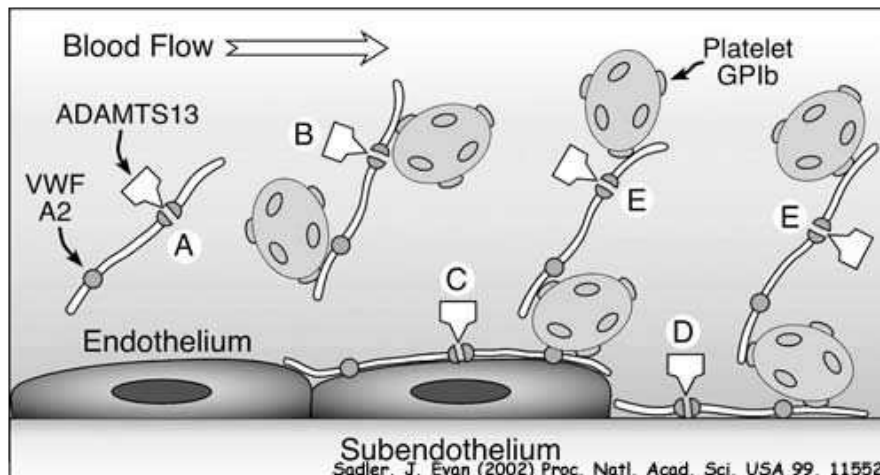
4 - Dans tous les cas, la liaison des ligands à leurs récepteurs déclenche un processus de signalisation intraplaquettaire.

5 - L'identification des récepteurs et de leurs mécanismes d'action, a permis de proposer des **médicaments antiagrégants** qui ont différentes cibles :

- **Aspirine** (inhibiteur de la cyclooxygénase)
- **Clopidogre, Prasugrel** (inhibiteurs de l'activation par l'ADP)
- **Anticorps anti  $\alpha\text{IIb}\beta\text{3}$**  : Abciximab ou ReoPro (inhibiteur de la liaison du fibrinogène à  $\alpha\text{IIb}\beta\text{3}$ )

### POUR EN SAVOIR PLUS : ADAMTS13

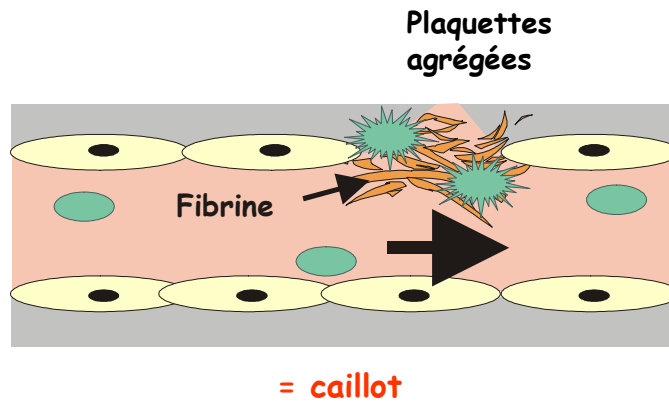
Physiologiquement, la métalloprotéase, ADAMTS 13, (A Disintegrin And Metalloprotease with ThromboSpondin type 1 repeats), a pour fonction de limiter la taille (et donc le pouvoir adhésif vis-à-vis des plaquettes) des multimères du facteur von Willebrand (vWF), une protéine de l'hémostase indispensable à l'agrégation plaquettaire dans la microcirculation.



Le facteur Willebrand libéré par la cellule endothéliale (CE), diffuse dans la circulation ou adhère à la CE, ADAMTS13 clive le FVW, transformant ainsi les multimères de très grandes tailles en produits de taille inférieure, moins actifs.

Les déficits en ADAMTS13 sont le plus souvent acquis, dus à la présence d'auto anticorps inhibant sa fonction ou plus rarement congénitaux par mutation du gène d'ADAMTS13, ils s'accompagnent d'un **purpura thrombotique thrombocytopénique (PTT)** qui est une microangiopathie thrombotique définie par la formation spontanée dans la microcirculation sanguine de thrombi plaquettaires responsables d'une anémie hémolytique mécanique, d'une thrombopénie de consommation et de signes d'ischémie multiviscérale touchant principalement le rein et le cerveau.

à la fin de l'hémostase primaire:



**A RETENIR :**

**Les intervenants : hémostase primaire**

- **3 étapes** : adhésion, activation, agrégation
- Liaison de GpIb-IX-V au **facteur Von Willebrand**
- Changement de forme des plaquettes
- Sécrétion du contenu des granules (ADP, fibrinogène)
- Production de métabolites: Thromboxane A2 (**TxA2**)
- Activation de GPIIbIIIa: liaison du **fibrinogène**
- Flip-flop des phospholipides membranaires cad externalisation de phosphatidylsérine ; PS chargé (-) qui a la capacité de **fixer des protéines de la coagulation à la surface DONC Prérequis indispensable.**

## A RETENIR : HEMOSTASE PRIMAIRE

### 3 étapes : adhésion, activation, agrégation

- Adhésion au sous endothélium :

- Liaison de GpIb-IX-V au **facteur Von Willebrand**.
- Liaison au **collagène** par l'intermédiaire de **GPVI** et de l'intégrine  $\alpha 2\beta 1$ .

**L'adhésion est responsable de l'activation des plaquettes.**

- Activation :

- Changement de forme des plaquettes.
- Sécrétion du contenu des granules (**ADP**, fibrinogène).
- Production de métabolites : **Thromboxane A2 (TxA2)** : agent proagrégant à partir de l'acide arachidonique de la membrane.
- Activation de l'intégrine **GPIIb/IIIa** exposée à la surface des plaquettes qui permet la liaison au fibrinogène.
- Flip-flop des phospholipides membranaires cad externalisation de **phosphatidylsérine** chargé (-) qui a la capacité de **fixer des protéines de la coagulation à la surface** donc **prérequis indispensable à l'étape de coagulation plasmatique.**

- Agrégation :

Les plaquettes s'agrègent les unes aux autres grâce à **GPIIb/IIIa** activé qui lie le **fibrinogène** et relie les plaquettes les unes aux autres.

Aboutissant à la formation d'un agrégat de plaquettes.

## Coagulation plasmatique

- Succession de réactions enzymatiques
- Aboutit à la formation d'un **réseau de Fibrine**
- Ce réseau enserre l'amas de plaquettes fixé sur la brèche vasculaire
- Fait intervenir des **facteurs de coagulation**, des **inhibiteurs** et une protéine membranaire: le **facteur tissulaire**
- Coagulation plasmatique et hémostase primaire: phénomènes simultanés et complémentaires

### I - LES PROTEINES PLASMATIQUES

#### 1) Les facteurs de la coagulation

Ce sont des protéines plasmatiques, qui sont plus souvent désignées par des chiffres romains. Ex : prothrombine = Facteur II. Une fois activés, ils portent leur nom suivi du suffixe "a" : ex : Facteur Xa (F.Xa) désigne le facteur X activé.

#### 1.1. Fibrinogène

- Dimère symétrique de 3 paires de chaînes  $A\alpha_2 / B\beta_2 / \gamma_2$  de 340 kDa
- Protéine soluble, synthétisée dans le foie, présente dans le plasma et dans les granules  $\alpha$  des plaquettes

#### 1.2. Zymogènes de sérine protéases (enzymes protéolytiques)

Facteurs II, VII, IX, X :

- Synthétisés dans le foie
- Présents dans le plasma
- liaison calcium-dépendante aux phospholipides (-) déterminée par les résidus Gla (modification post-traductionnelle, vitK-dépendante)
- Sites de liaison aux protéines (enzymes, co-facteurs)

#### 1.3. Facteur XI (FXII, prékallikréine)

- Synthétisés dans le foie, non vitamine K-dépendants, présents dans le plasma
- Domaines de liaison aux phospholipides (ex: domaine Apple A3 du FXI) et aux protéines (ex: domaines A2, A3 du FXI et FIX)

#### 1.4. Zymogène d'une transglutaminase : FXIII

- Tétramère : 2 sous-unités A (83 kDa), 2 sous-unités B (79.7 kDa) assemblées de façon non covalente dans le plasma.

. Sous-unité A : synthétisée dans le foie, les monocytes, les mégacaryocytes, porte le site actif trans-glutaminase, seule présente dans les plaquettes (dimère A2), secrétée dans le plasma où elle s'associe à la sous-unité B.

. Sous-unité B : synthétisée dans le foie, transporte la sous-unité A dans le plasma.

- Le FXIII a une affinité très importante pour le fibrinogène et la fibrine.

#### 1.5. Les co-facteurs

- FV : . Synthétisé par les hépatocytes
  - . Présent dans le plasma (80%) et les granules  $\alpha$  des plaquettes (20%)

- FVIII : . Synthèse: foie (hépatocyte, CE sinusoidale), poumon, rein, rate, cerveau
  - . Présent dans le plasma sous forme d'une série d'hétérodimères (protéolyse du domaine B)
  - . Lié au facteur Willebrand

**1.6. Les facteurs du contact** (Facteur XI, XII, Prékallikréine et Kininogène de haut poids moléculaire) sont synthétisés dans le foie.

## 2) Les inhibiteurs plasmatiques

### 2.1. Antithrombine (AT)

C'est une serpine (inhibiteurs des sérine protéases) synthétisée par le foie, « activée » par la liaison aux glycosaminoglycanes de la paroi vasculaire ou à l'héparine.

Les autres serpins : cofacteur II de l'héparine,  $\alpha$ 1 anti-trypsine.

### 2.2. Système de la Protéine C

. **Protéine C** zymogène produit par l'hépatocyte.

. **Protéine S** cofacteur produit par l'hépatocyte et la cellule endothéliale.

. 2 récepteurs: **Thrombomoduline** et EPCR (endothelial protein C receptor).

. **TFPI** (tissue factor pathway inhibitor) est produit par différents types cellulaires (cellule endothéliale, mégacaryocyte ...). Il appartient à la famille des inhibiteurs de type Kunitz (se comporte comme un faux substrat vis-à-vis de l'enzyme).

-  $\alpha$ 2 macroglobuline,  $\alpha$ 1 antitrypsine.

## **A RETENIR :**

### **I - Les protéines plasmatiques**

#### **Facteurs de coagulation**

- Fibrinogène = protéine soluble, dimérique, capable de se transformer en un réseau de fibres (caillot). C'est le substrat final de la coagulation
- Pro-enzymes de la coagulation =
  - 5 zymogènes de sérine protéases (FII, VII, IX, X, XI), dont 4 (FII, VII, IX, X) dépendent de la vitamine K pour leur synthèse et ont une affinité élevée pour les phospholipides (-).
  - 1 zymogène de transglutaminase, affinité élevée pour le fibrinogène.
- Co-facteurs V et VIII = affinité élevée pour les PL, affinité sélective pour une enzyme et son substrat.

*Les pro-enzymes et co-facteurs doivent subir une protéolyse pour acquérir leur activité biologique.*

#### **Inhibiteurs de la coagulation**

- 3 familles : antithrombine, système de la PC et TFPI.

## **II – LE RÔLE DE LA VITAMINE K DANS LA SYNTHÈSE DES PROTÉINES DE LA COAGULATION**

### **1) Vitamine K et fonction des zymogènes**

#### **1.1. Rôle de la vitamine K et du $Ca^{2+}$**

Les protéines vitamine K dépendantes subissent dans l'hépatocyte les modifications post-traductionnelles qui sont indispensables à leur activité fonctionnelle. Elles contiennent à leur



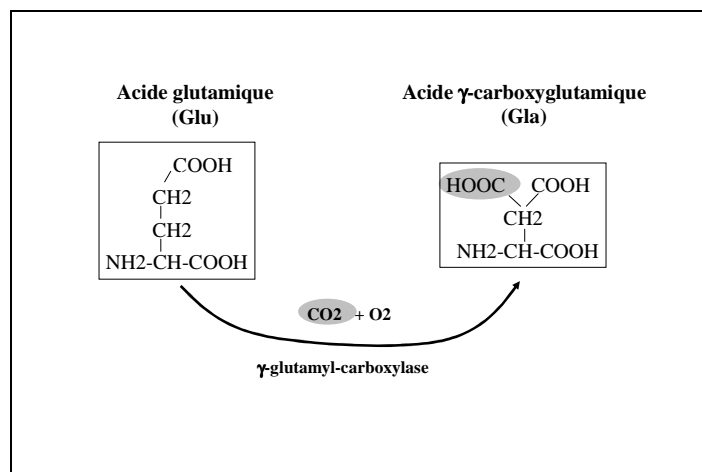
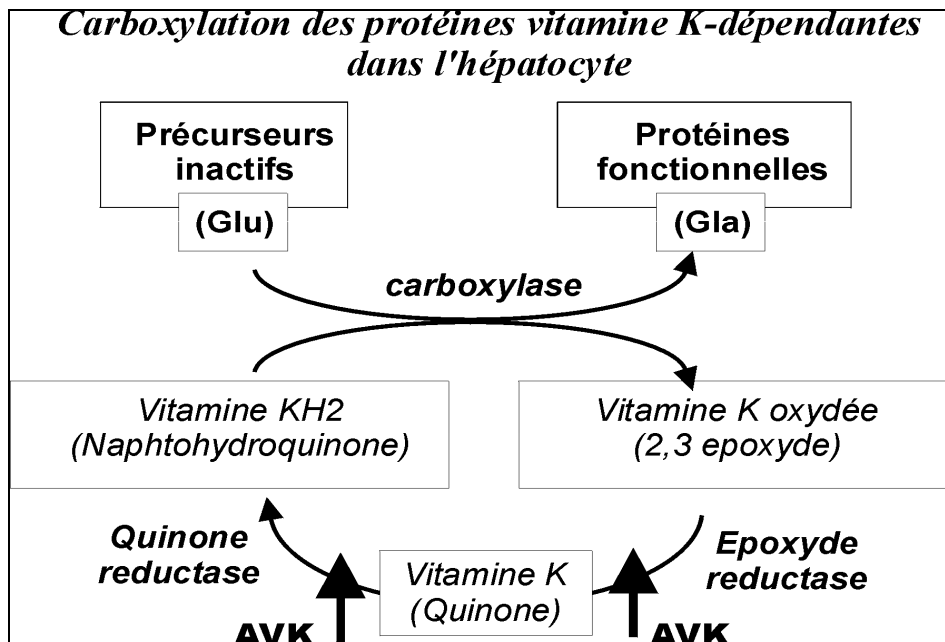
extrémité N terminale 9 à 12 **résidus  $\gamma$  carboxyglutamique (Gla)**. Ces Gla permettent la fixation de ces protéines aux phospholipides acides en présence de  $Ca^{2+}$ .

**Protéines vitamine K-dépendantes :**

- Facteurs de coagulation : FII, VII, IX, X
- Inhibiteurs de la coagulation : protéines C, S, Z
- Protéines des tissus minéralisés : Matrix Gla-protéine (prévention de la calcification des artères et des cartilages), ostéocalcine (formation de l'os)

La carboxylation des acides glutamiques (Glu) se fait dans l'hépatocyte. La carboxylase hépatocytaire utilise la **vitamine K réduite** comme cofacteur, la réduction se fait grâce à des réductases sensibles au traitement par les antagonistes de la vitamine K (AVK).

En l'absence de vitamine K, la carboxylation ne se fait pas et les protéines vitamine K-dépendantes ne se lient pas aux phospholipides membranaires. Les traitements par les AVK qui inhibent la carboxylation des Glu, ralentissent la coagulation : les facteurs vitamine K-dépendants ne se fixent plus aux phospholipides membranaires et donc ne sont plus fonctionnels.



**A RETENIR :**

**II – Le rôle de la vitamine K dans la synthèse des protéines de la coagulation**

- Modification post-traductionnelle : Glu → Gla.
- Régulée par des enzymes membranaires (RE de l'hépatocyte).
- Les Gla permettent la liaison au Ca<sup>++</sup> et par cet intermédiaire (pontage + changement de conformation) la liaison des protéines (enzyme et substrat) aux phospholipides anioniques (phosphatidylsérine).
- Concentration de l'enzyme et de son substrat sur une surface solide.
- Augmentent l'efficacité catalytique (affinité).

**1.2. Principes de l'activation des zymogènes**

Fixé à la surface des plaquettes activées, un zymogène dépourvu d'activité catalytique sera clivé par une enzyme avec libération d'un peptide inactif et démasquage du **site catalytique**. C'est ainsi que dans l'étape finale de la coagulation plasmatique le F. Xa (enzyme) scinde la prothrombine (zymogène) en thrombine (enzyme) et fragment 1+2 (peptide d'activation inactif).

L'activation des zymogènes se fait en cascade.

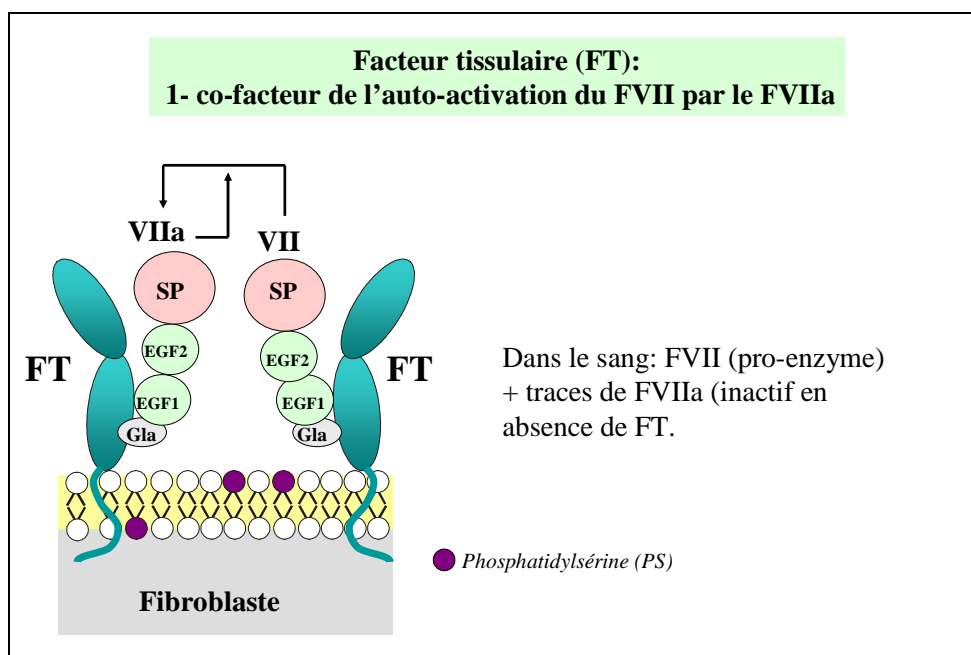
Ces réactions enzyme-substrat sont lentes en solution ; elles deviennent très rapides si l'enzyme et le substrat sont fixés sur une surface phospholipidique et en présence d'un cofacteur.

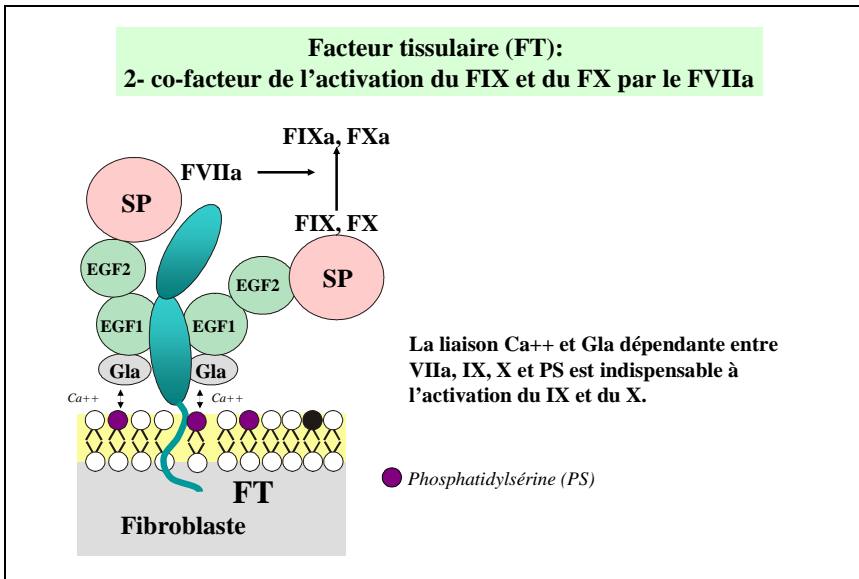
**III - INITIATION PAR LE FACTEUR TISSULAIRE**

L'évènement initial majeur est l'exposition du facteur tissulaire qui permet l'activation du F. VII et le déclenchement de ce qui est appelé « voie exogène » de la coagulation.

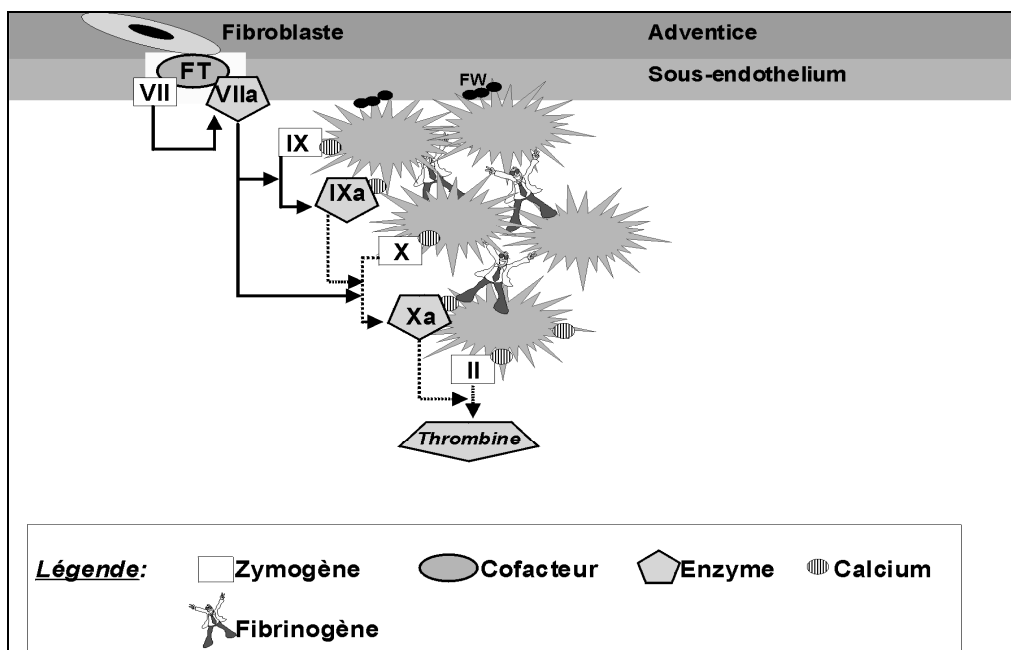
Le facteur tissulaire (FT) est une protéine membranaire synthétisée par les fibroblastes présents dans la tunique externe (adventice) des vaisseaux. Il est distribué de façon très particulière formant une enveloppe autour du vaisseau, séparé du sang par l'endothélium mais prêt à intervenir en cas de lésion vasculaire. Il est inséré dans la bicouche lipidique des membranes des cellules qui l'expriment. Lors d'une lésion vasculaire, le F. VII présent dans le plasma se fixe sur le FT qui se comporte comme un récepteur.

**1) Activation du F. VII (complexe : FT.VIIa)**





Le complexe FT.VIIa active ensuite le facteur IX et le X, fixés sur les surfaces membranaires, initiant ainsi la voie exogène. Le facteur Xa active la prothrombine (F.II) et produit la thrombine.



**A RETENIR :**

**III – Initiation de la coagulation**

- La coagulation est initiée lorsqu'une protéine membranaire, le **facteur tissulaire** (adventice, epithelium) vient au contact du sang (blessure vasculaire).
- Inséré dans la bicouche de phospholipides membranaires, il interagit avec le VII/VIIa =
  - auto-activation du VII,
  - activation du IX et du X par le VIIa.
- Pathologie : l'expression du FT peut être induite par les médiateurs de l'inflammation dans des cellules circulantes (monocytes) ou vasculaires (cellules endothéliales, cellules musculaires lisses).



- Elle a aussi un rôle inhibiteur de la coagulation en **activant la protéine C** (voir chapitre « inhibiteurs »).

#### IV - LE ROLE DES COFACTEURS PROTEIQUES DE LA COAGULATION

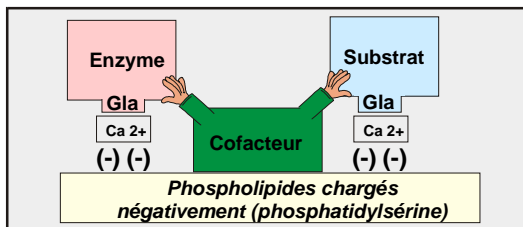
Pour que l'activation des zymogènes se fasse de façon efficace, il faut que la cohésion des complexes (enzyme-substrat) soit assurée par les cofacteurs Va et VIIIa.

Les facteurs V et VIII, dont la structure est très proche, sont présents dans le sang sous forme inactive. Pour jouer leur rôle, ils devront être activés par la thrombine (ou plus accessoirement par le F. Xa).

Le F. Va et le F. VIIIa se lient étroitement aux phospholipides, mais aussi à l'enzyme et au substrat de la réaction enzymatique dans laquelle ils interviennent. Le F. VIIIa est le cofacteur de l'activation du F. X par le F. IXa et le F. Va est le cofacteur de l'activation de la prothrombine (II) par le F. Xa.

*(Le F. VIII est complexé au vWF qui le stabilise en le protégeant de la dégradation in vivo. L'hémophilie A est caractérisée par un déficit en F. VIII : les sujets saignent La maladie de Willebrand est caractérisée par un déficit en vWF, qui a pour conséquence un déficit en FVIII : les sujets saignent.)*

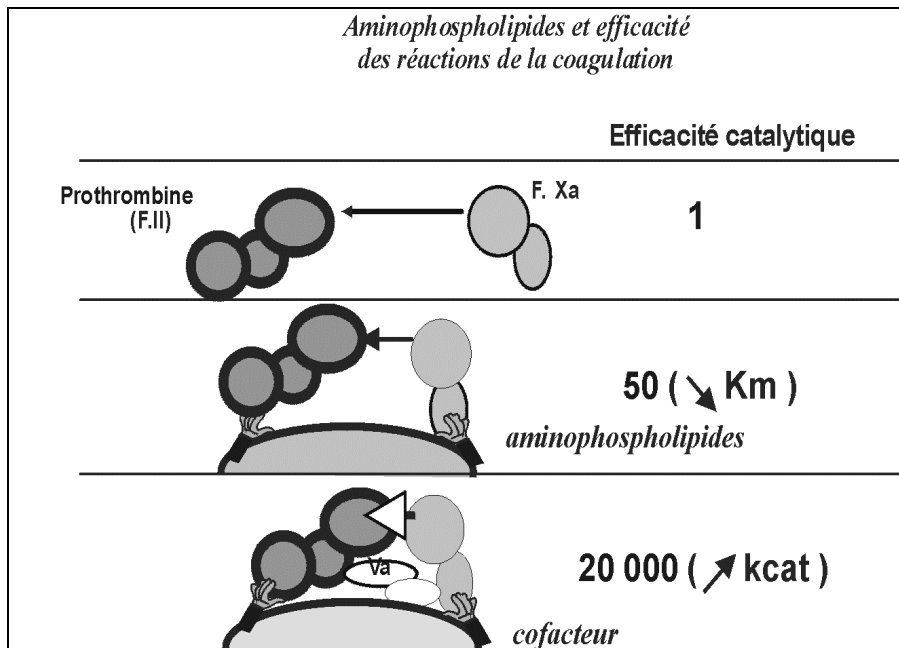
#### L'assemblage des complexes enzymatiques de la coagulation



- une surface membranaire (plaquettes activées)
- une sérine protéase et son substrat, concentrés sur cette surface
- un co-facteur protéique qui interagit avec la surface phospholipidique et directement avec l'enzyme et son substrat

Dans le sang circulant, une molécule d'enzyme a peu de chance de rencontrer son substrat, alors que lorsque les intervenants sont amarrés à une surface ils vont se rencontrer ; **les cofacteurs se fixent à la fois aux phospholipides, à l'enzyme et au substrat**, ce qui va encore faciliter la réaction.

Dans le complexe d'activation formé par l'enzyme, le substrat, le cofacteur et les phospholipides acides, **les phospholipides augmentent l'affinité** de l'enzyme pour le substrat (diminution du Km), tandis que **les cofacteurs accélèrent** considérablement (> 1 000 fois) **la réaction**. La présence des deux éléments (phospholipides et cofacteurs) augmente considérablement l'efficacité catalytique de la réaction.



**A RETENIR :**

**IV - Le rôle des co-facteurs protéiques de la coagulation**

- Liaison aux phospholipides **et** aux protéines (enzyme **et** substrat).
- Positionnent le site catalytique de l'enzyme en position favorable vis à vis de la liaison peptidique cible du substrat.
- Augmentation +++ de la vitesse de clivage.

La phosphatidylsérine et les co-facteurs protéiques augmentent ~ 20 000 à 300 000 fois l'efficacité catalytique des réactions enzymatiques de la coagulation.

**POUR EN SAVOIR PLUS**

*La vitesse d'une réaction enzymatique (V) augmente quand la concentration de substrat (S) s'élève jusqu'à une valeur maximale (Vmax). A ce stade tous les sites de fixation du substrat sur l'enzyme sont occupés et la vitesse de la réaction est limitée. Pour la plupart des substrats, la concentration du substrat formé à 1/2 de Vmax représente l'affinité de l'enzyme pour le substrat, c'est le Km ; plus il est bas, plus la liaison est de forte affinité.*

*Exemples de représentations graphiques :*

- Equation de Michaelis Menten :  $v = (Vmax \cdot S) / (Km + S)$

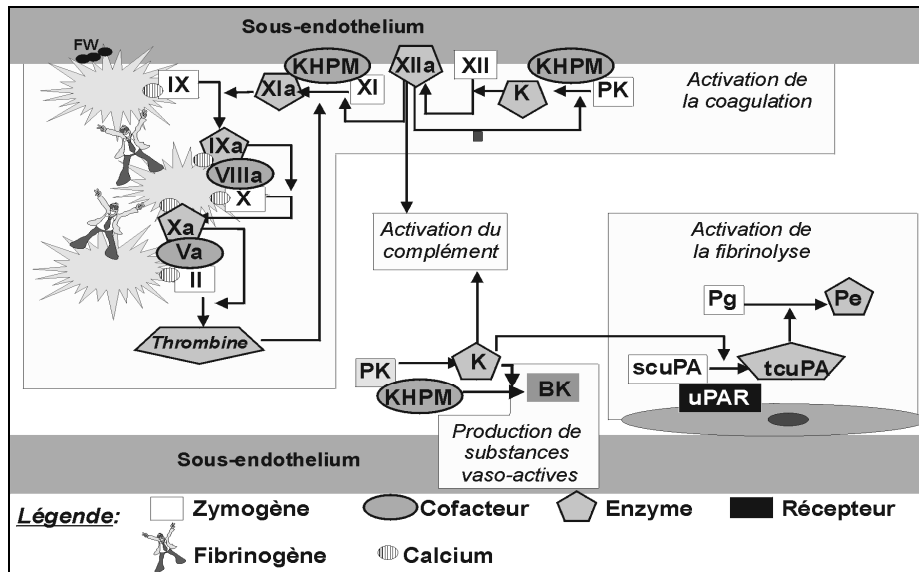
- Lineweaver-Burk (double inverse)  
 $1/v = (Km / Vmax) \cdot 1/S + 1/Vmax$

**V - PHASE CONTACT**

Il existe une autre voie d'initiation de la coagulation dont l'importance est mineure comparée à l'initiation par le facteur tissulaire. Elle est la conséquence du contact de protéines plasmatiques avec le sous-endothélium, faisant intervenir 4 protéines : **les facteurs XII et XI, la prékallikréine (PK)** qui sont des zymogènes et le **kininogène de haut poids moléculaire (KHPM)** qui joue le rôle de cofacteur.

Le KHPM et le F. XI circulent dans le sang, liés à la PK. En cas de lésion de l'endothélium, ces complexes se fixent au sous-endothélium. La PK est transformée en **kallikréine (K)** par une protéase de la paroi vasculaire. La K active à son tour le F. XII qui lui-même active le F. XI. Le

F. XIIa amplifie le processus en activant de façon rétroactive la PK. **Le rôle de cette voie d'activation dans la coagulation est mineur**, l'activation rétroactive du F. XI par la **thrombine** étant beaucoup plus importante.



En revanche, la K active efficacement 3 autres systèmes :

- Elle clive le KHPM libérant un peptide vasoactif puissant : la **bradykinine** qui entraîne hypotension, bronchoconstriction et augmentation de la perméabilité vasculaire.
- Elle active la **pro-urokinase** (scuPA) fixée sur son récepteur (uPAR), produisant l'urokinase (tcuPA) qui transforme le plasminogène (Pg) en plasmine (Pe), une enzyme fibrinolytique.
- Elle active le **système du complément**, activé également par le F. XIIa.

## VI - FORMATION DU CAILLOT DE FIBRINE

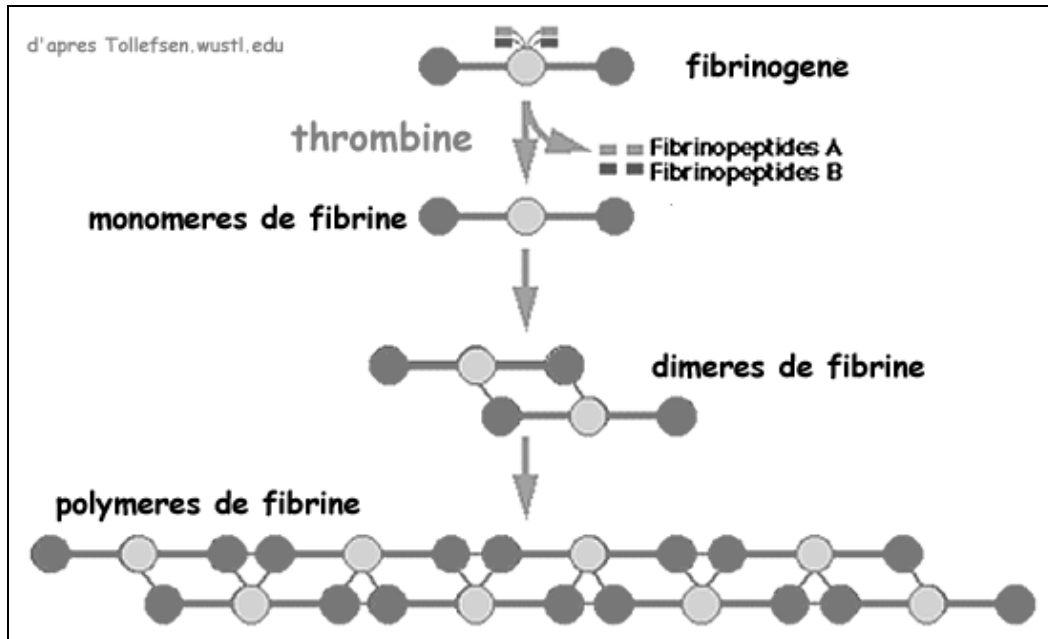
La thrombine va convertir le fibrinogène soluble en **fibrine** insoluble. La fibrine forme une solide enveloppe autour de l'agrégat de plaquettes pour réaliser le caillot.

### 1) Protéolyse du fibrinogène par la thrombine

Le fibrinogène est constitué de 3 paires de chaînes A $\alpha$ , B $\beta$  et  $\gamma$ . La thrombine clive l'extrémité NH<sub>2</sub> terminale des chaînes A $\alpha$  et B $\beta$  et sépare ainsi **les fibrinopeptides A et B** des monomères de fibrine.

### 2) Polymérisation de la fibrine

La libération des fibrinopeptides donne naissance à de nouvelles séquences N terminales : Gly-Pro-Arg sur les chaînes  $\alpha$  et Gly His Arg sur les chaînes  $\beta$  des monomères de fibrine. Ces séquences s'apparient avec des séquences complémentaires sur les chaînes  $\gamma$  et  $\beta$  d'un monomère voisin ce qui entraîne la formation d'un **polymère de fibrine**.

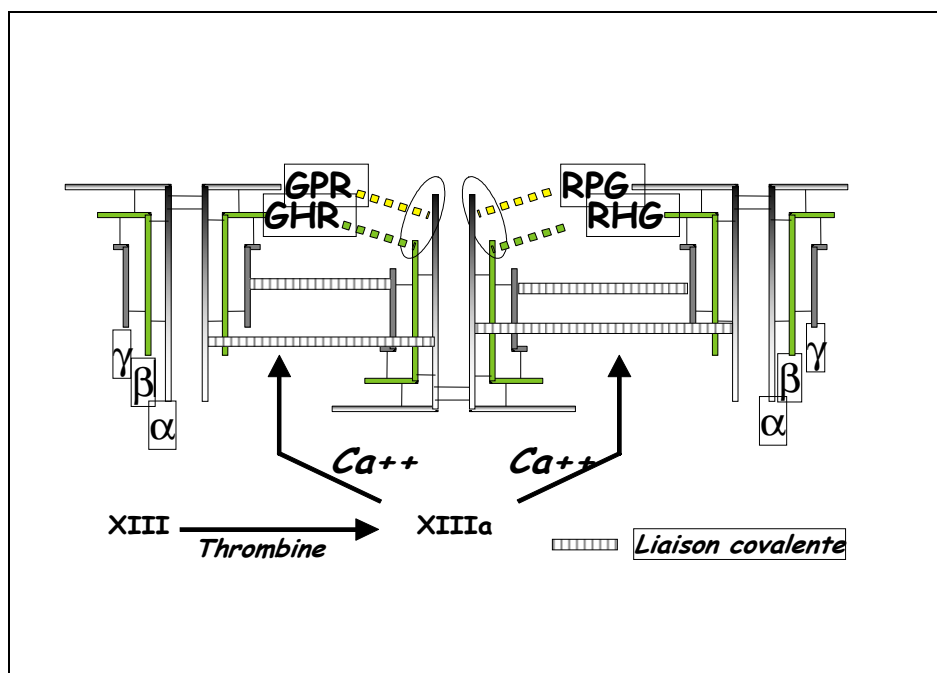


### 3) Stabilisation

Le **polymère de fibrine** instable doit être stabilisé par le **facteur XIIIa**. La formation du caillot de fibrine accélère l'activation du F. XIII par la **thrombine**. Cette activation est régulée par la présence de  $Ca^{2+}$  et de fibrine qui sert de cofacteur.

Le **F. XIIIa** est une transglutaminase. Il **stabilise le caillot** en créant des liaisons covalentes  $\gamma$  glutamine-lysine entre les monomères adjacents. Cette liaison conduit à la formation d'un **caillot de fibrine très solide**.

Le F. XIIIa pourrait intervenir aussi en amarrant le caillot de fibrine à des protéines du sous-endothélium comme la fibronectine et pourrait aussi en liant l' $\alpha_2$  antiplasmine à la fibrine retarder la destruction du caillot jusqu'à réparation des tissus.





**A RETENIR :**

**Conversion du fibrinogène en fibrine**

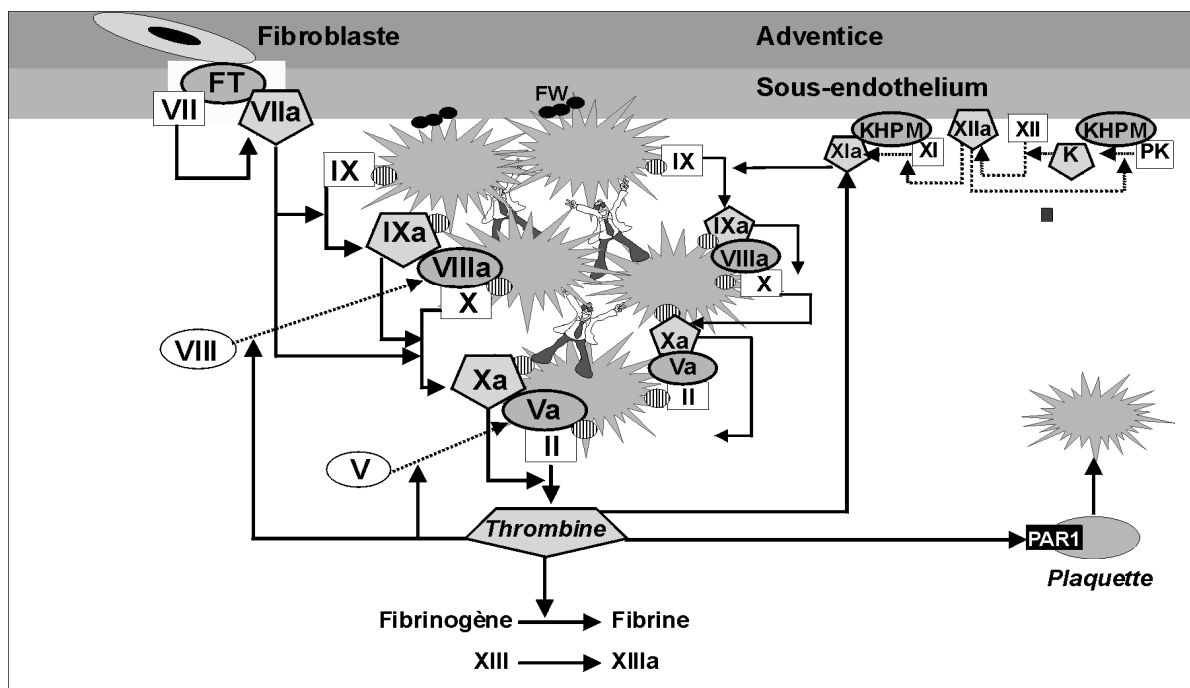
- La thrombine scinde 2 FpA et 2 FpB des chaînes Aa et Bb respectivement, convertissant le fibrinogène en monomère de fibrine soluble.
- Le clivage des Fp démasque des sites de polymérisation qui permettent d'établir des liaisons hydrogène entre monomères : polymère de fibrine solide mais instable.
- Association de monomères bout à bout (longitudinale) puis latérale : épaissement des fibres.
- Parallèlement, la thrombine active le FXIII par protéolyse des sous-unités a. Le démasquage du site actif du XIIIa nécessite le Ca<sup>2+</sup> et la fibrine. fixé à l'extrémité C-ter des chaînes a, le XIIIa établit des liaisons covalentes entre une Gln (donneur) et une Lys (accepteur) des chaînes a et des chaînes g: polymère de fibrine solide et stable.

*Fp: fibrinopeptide (A:18 aa, B:16aa)*

**VII - RESUME DES ETAPES**

L'évènement initial est l'exposition du **facteur tissulaire** qui se lie au facteur VII, lui faisant acquérir une activité catalytique.

- Le facteur **VIIa active le F. IX et le F. X.**
- Le F. Xa active la prothrombine (F.II) produisant d'abord des **traces de thrombine.**
- La thrombine formée **amplifie** considérablement la réaction en recrutant de nouvelles **plaquettes**, et surtout en activant les **cofacteurs VIII et V.**
- Le F. IXa se lie au F.VIIIa et active le F. X. Le F. Xa se lie au F.Va et active la prothrombine générant ainsi des quantités importantes de thrombine.
- L'activation du F. XI par la thrombine vient encore renforcer la production de thrombine, qui **coagule le fibrinogène** pour former le caillot de fibrine.



**Légende:** □ Zymogène    ○ Cofacteur    ⬡ Enzyme    ⊕ Calcium

 Fibrinogène

## A RETENIR : COAGULATION PLASMATIQUE

### I - Les facteurs de coagulation

- 5 zymogènes de sérine protéases : (F.II, VII, IX, X, XI), dont 4 (F.II, VII, IX, X) sont vitamine K dépendents.
- 1 zymogène de transglutaminase, F.XIII.
- 2 Cofacteurs : F.V et F.VIII.
- **Fibrinogène** : substrat final de la coagulation.

Les pro-enzymes et co-facteurs doivent subir une protéolyse pour acquérir leur activité biologique.

### II - Rôle de la vitamine K

Modification post-traductionnelle des protéines vitamine K dépendentes : Glu → Gla.  
Permet la liaison au Ca<sup>++</sup> et aux phospholipides (-) (phosphatidylsérine).

### III - Le facteur tissulaire (FT)

Protéine membranaire.

Synthétisée par les fibroblastes présents dans la tunique externe des vaisseaux.

#### Brèche vasculaire = Exposition du FT

- Activation du F.VII et déclenchement de la coagulation.

L'activation des zymogènes se fait en cascade à la surface des plaquettes activées.

- **Le complexe (FT.VIIa) active le facteur IX et le X.**
- **F.Xa active la prothrombine (F.II) et produit la thrombine.**

### IV - La coagulation se propage et s'amplifie

Les premières traces de **thrombine** :

- Activent les cofacteurs (F.V et F.VIII).
- Recrutent et activent de nouvelles plaquettes, donc formation de surfaces de phospholipides.
- Activent le F.XI et amplifient la coagulation (car **le F.IX active le F.IX**).

Les cofacteurs Va et VIIIa se lient aux phospholipides, à l'enzyme et au substrat de la réaction enzymatique dans laquelle ils interviennent.

- **F.IXa (+ F.VIIIa) active le F.X et produit du F.Xa.**
  - **F.Xa (+ F.Va) active le F.II et produit la thrombine en grande quantité.**
- Augmentation +++ de la production de thrombine

### V - La thrombine clive le fibrinogène et le transforme en fibrine.

- **Le F.XIII activé** par la thrombine stabilise la fibrine pour former un caillot solide.

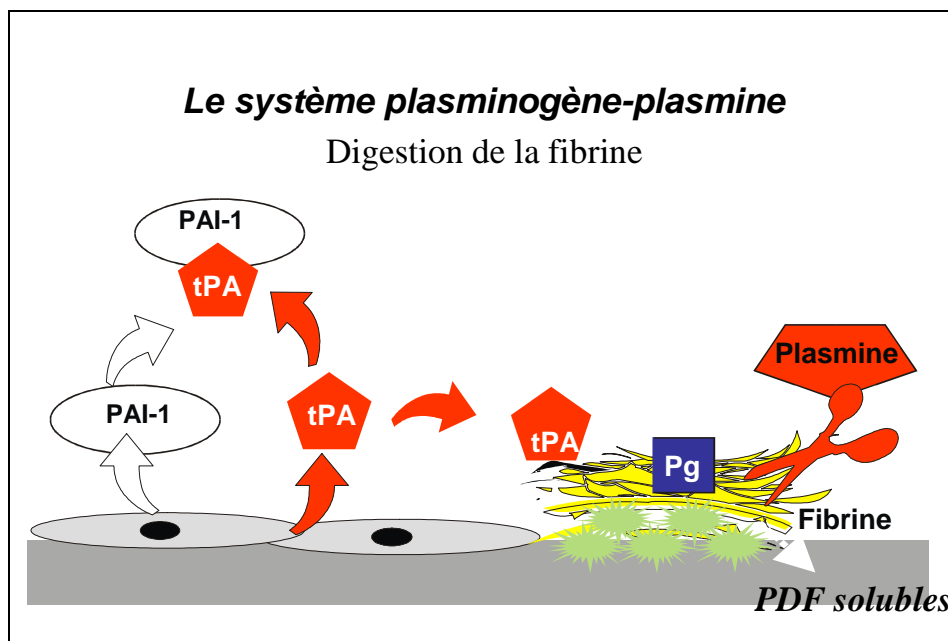
## La fibrinolyse

La fibrinolyse est le processus qui entraîne la dissolution progressive de la fibrine formée au niveau de la brèche vasculaire. Ce processus fait intervenir le **plasminogène**, synthétisé dans le foie. Le plasminogène est un zymogène, synthétisé dans le foie, qui contient un domaine de forte affinité pour la lysine (LBS), ces LBS permettent sa fixation à fibrine. Sous l'influence d'**activateurs** (t-PA, u-PA), le plasminogène se transforme en une sérine protéase : **la plasmine**. La plasmine protéolyse la fibrine produisant des produits de dégradation solubles.

1) Les cellules endothéliales synthétisent l'activateur tissulaire du plasminogène (**t-PA**) et son inhibiteur le **PAI-1** (plasminogen activator inhibitor de type 1).

Le t-PA n'est pas efficace en circulation car il est immédiatement complexé au PAI-1. En revanche, il a une affinité très importante pour la fibrine et donc, quand le caillot est formé, il peut se fixer sur la fibrine et échapper à l'inhibition par le PAI-1 ; le plasminogène, dont l'affinité pour la fibrine est aussi très élevée, se fixe également sur la fibrine. Le t-PA au sein de ce complexe peut transformer le plasminogène en plasmine de façon efficace. **Ceci permet donc de localiser la fibrinolyse là où elle est nécessaire : sur le caillot de fibrine.**

### Schéma de la fibrinolyse



2) Il existe un deuxième système d'activation du plasminogène : l'urokinase (**u-PA**), présente essentiellement dans la paroi vasculaire, son rôle est important dans la matrice extracellulaire. Le rôle principal de l'u-PA est la dégradation des protéines associées aux mouvements cellulaires (migration cellulaire, remodelage tissulaire, invasion cellulaire)

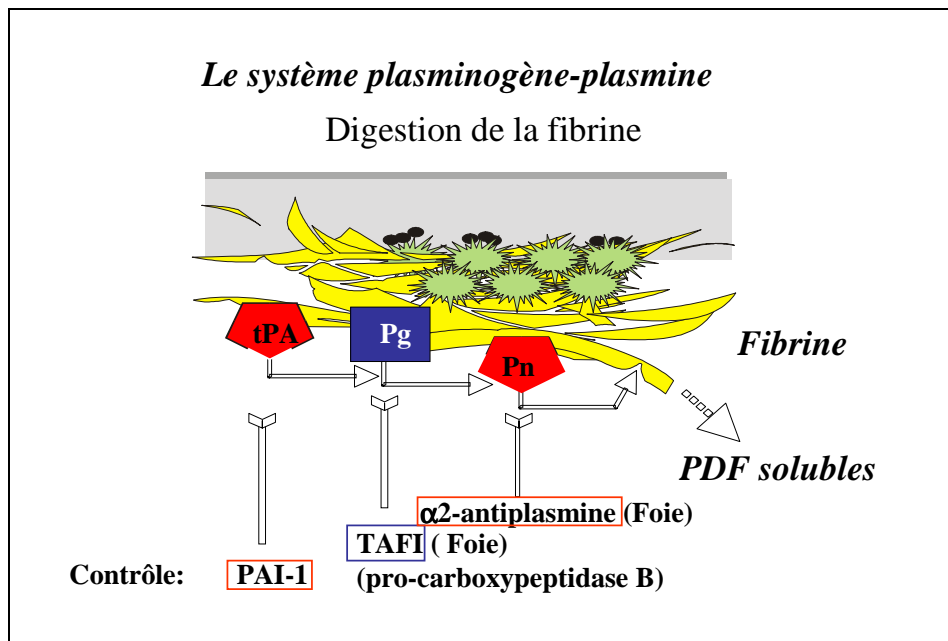
L'urokinase se lie à un récepteur spécifique : l'u-PAR qui est présent sur plusieurs cellules : endothéliales, monocytes, fibroblastes et qui a pour fonction la fixation de l'urokinase sur la membrane cellulaire. L'activation du plasminogène par l'urokinase liée à son récepteur permet le développement d'une activité protéolytique importante focalisée à la membrane cellulaire. La

plasmin intervient dans les processus de dégradation de la matrice extracellulaire en activant des métalloprotéases (rôle par exemple dans l'invasion tumorale).

Le F. XII activé (XIIa), en présence de kininogène de haut poids moléculaire, agit sur la prékallikréine pour la transformer en kallikréine ; cette dernière est capable à son tour d'activer la pro urokinase (scu-PA) en urokinase (tcu-PA).

- L'activation du plasminogène par le t-PA dans le sang permet la fibrinolyse.
- L'activation du plasminogène par l'u-PA dans la paroi vasculaire permet le remodelage vasculaire.

3) Ce système est régulé :



**3.1.** D'une part, par le **PAI-1** qui est une serpine produite par les cellules endothéliales, mais aussi par les hépatocytes, les mégacaryocytes et les monocytes. Son expression est stimulée par les cytokines pro inflammatoires et les hormones. Son rôle est de prévenir toute activation du système de la fibrinolyse.

**3.2.** D'autre part, par des **inhibiteurs de la plasmine** : le principal inhibiteur est l' $\alpha$ 2 antiplasmine, une serpine synthétisée par le foie, qui inhibe très rapidement la plasmine en circulation.

**3.3.** Le TAFI (thrombin activatable fibrinolysis inhibitor) ou procarboxypeptidase B a un rôle ralentisseur de la fibrinolyse. Son rôle est de ralentir la fibrinolyse en éliminant les sites lysines et arginine en position carboxy terminale de la fibrine en cours de dégradation, ce qui entraîne une diminution de la fixation du plasminogène à la fibrine.

**A RETENIR :**

**Système plasminogène-plasmine**

- **Le plasminogène (Pg)** et son activateur plasmatique (**tPA**) se fixent sur la fibrine. Cette fixation protège le tPA de son inhibiteur (PAI-1) = le tPA active le Pg et la **plasmine** produite solubilise la fibrine (fibrinolyse).
- Dans la paroi du vaisseau, le Pg et ses activateurs (uPA et tPA) se fixent sur des récepteurs cellulaires (cellule endothéliale, cellule musculaire lisse). Cette fixation protège l'uPA et le tPA de leurs inhibiteurs (PAI-1, PN-1) = le Pg est transformé en **plasmine** qui active des métalloprotéases et des facteurs de croissance (remodelage vasculaire).
- Le système est régulé négativement par le **PAI-1 et l'a2- antiplasmine** qui forment des complexes irréversibles inactifs avec le tPA ou uPA, et la plasmine, respectivement, lorsque les enzymes diffusent à distance de la fibrine. Le **TAFI**, activé par la thrombine empêche le plasminogène de se fixer à la fibrine.

## A RETENIR : FIBRINOLYSE

### I - La fibrinolyse

Entraîne la dissolution progressive de la fibrine formée au niveau de la brèche vasculaire par la plasmine.

### II - Intervenants

- Un zymogène : le **plasminogène**, lieu de synthèse : foie.

- **Des activateurs** :
  - **t-PA** (Tissue plasminogen activator), lieu de synthèse : cellule endothéliale.
  - **u-PA** (Urokinase Plasminogen Activator).
- **Des inhibiteurs de l'activation** :
  - **PAI-1** (plasminogen activator inhibitor de type 1), lieu de synthèse : cellule endothéliale, hépatocytes, les mégacaryocytes ...
  - **TAFI** (thrombin activatable fibrinolysis inhibitor) : activé par le complexe Thrombine-Thrombomoduline.
  - **$\alpha$ 2 antiplasmine** : serpine, lieu de synthèse : foie.

### III - Mode d'action

Le t-PA en circulation est complexé au PAI-1. Il a une affinité très importante pour la fibrine du caillot, il se fixe sur la fibrine et échappe à l'inhibition par le PAI-1 ; le plasminogène, dont l'affinité pour la fibrine est aussi très élevée, se fixe également sur la fibrine par ses LBS. Le t-PA au sein de ce complexe transforme le plasminogène en plasmine qui dissout le caillot de fibrine. **Ceci permet donc de localiser la fibrinolyse là où elle est nécessaire : sur le caillot de fibrine.**

L'activation du plasminogène par l'u-PA dans la paroi vasculaire permet le remodelage vasculaire.

### IV - Régulation

**PAI-1 : empêche l'activation du plasminogène.**

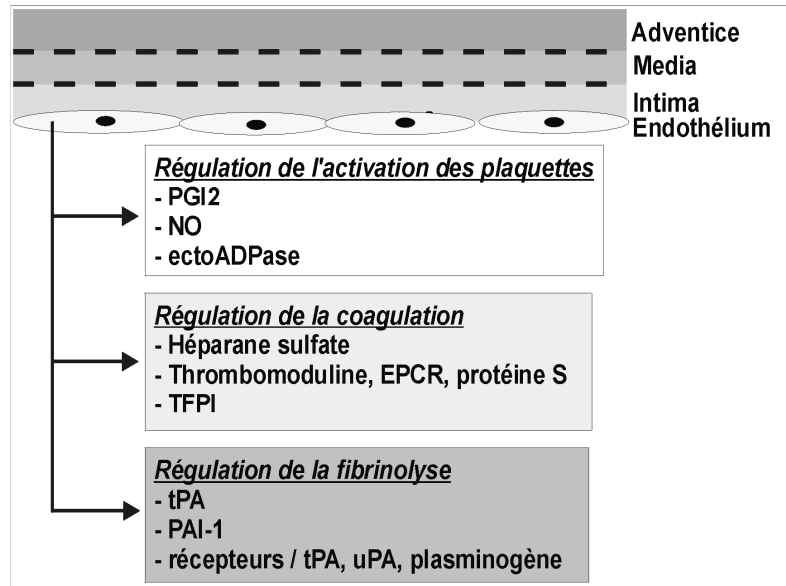
**L' $\alpha$ 2 antiplasmine**, inhibe très rapidement la plasmine en circulation.

**Le TAFI** ou procarboxypeptidase B a un rôle ralentisseur de la fibrinolyse : élimine les sites lysines et arginine en position C-terminale de la fibrine en cours de dégradation, donc diminue la fixation du plasminogène par ses LBS à la fibrine.

## Inhibiteurs physiologiques

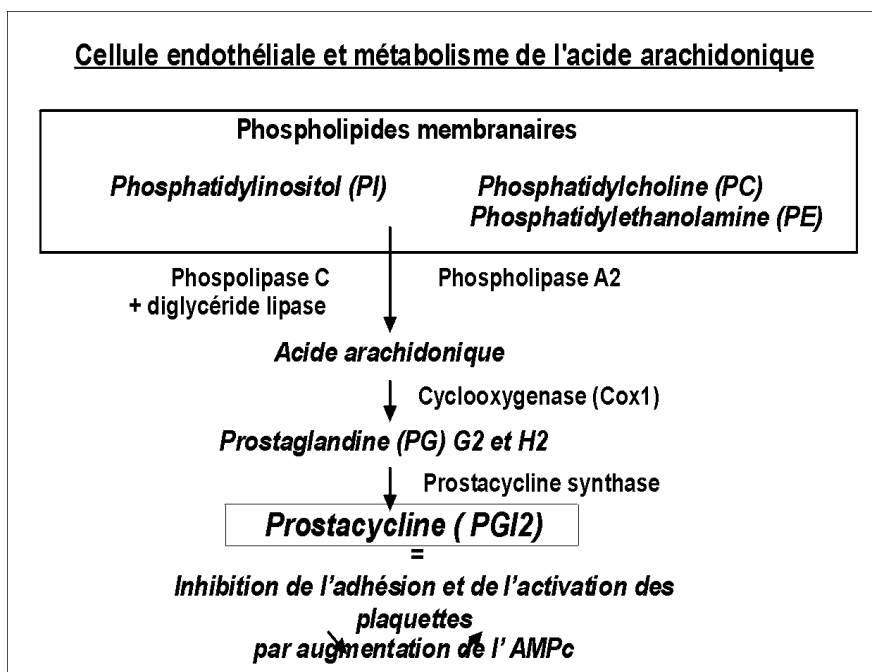
La coagulation est sous le contrôle de l'endothélium.

L'extension des réactions de l'hémostase (activation des plaquettes et de la coagulation) à distance de la brèche vasculaire est limitée par différents systèmes physiologiques, qui sont tous sous le contrôle de la cellule endothéliale.



### I - CONTROLE DE L'ACTIVATION DES PLAQUETTES

La **prostacycline** (PGI<sub>2</sub>) est produite par la cellule endothéliale. Sa production augmente lorsque la cellule est stimulée.



Le **monoxyde d'azote** (NO) est synthétisé à partir de la L-Arginine sous l'action de la NO synthase (NOS) présente dans la cellule endothéliale. La PGI2 et le NO diffusent dans la lumière vasculaire où ils inhibent l'adhésion, l'activation et l'agrégation des plaquettes, ainsi que l'adhésion des leucocytes aux cellules endothéliales.

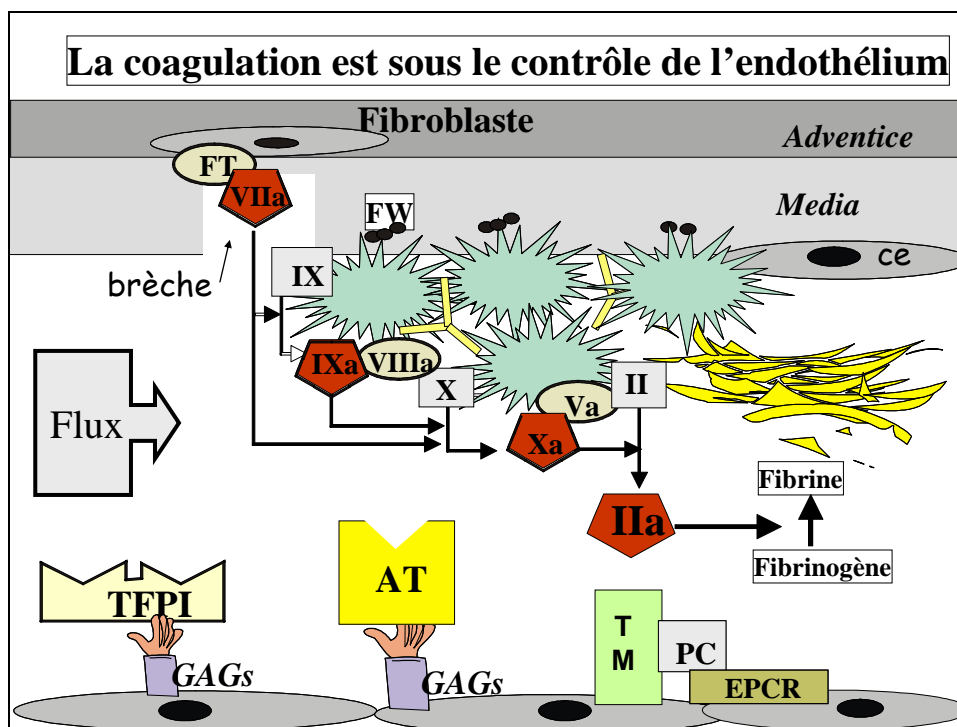
Une **ecto-ADPase** présente à la surface des cellules endothéliales dégrade l'ADP en AMP, limitant le recrutement de plaquettes.

## II - CONTROLE DE LA COAGULATION PLASMATIQUE

### 1) L'antithrombine (AT)

C'est une **serpine** qui comporte d'une part un site réactif dans sa partie C-terminale qui va se lier aux sérine protéases et, d'autre part, dans sa région N-terminale un site de liaison aux héparane sulfates du vaisseau. La liaison aux héparane sulfates entraîne un **changement de conformation** de l'AT lui permettant ainsi d'inhiber rapidement : **thrombine, Xa, IXa, XIa, XIIa**. L'AT n'inhibe pas le VIIa de façon efficace.

L'AT qui est en circulation se lie, à la fois à l'héparane sulfate à la surface de la cellule endothéliale et aux enzymes cibles : il se forme un complexe **ternaire** (enzyme-AT-héparane sulfate).



Les mécanismes d'inhibition de la thrombine et du facteur Xa sont un peu différents selon l'enzyme cible : dans le cas de la thrombine (T), l'héparane sulfate (HS) se lie à la fois à l'AT et à la T, alors que dans le cas du F. Xa, il n'y a pas d'interaction directe F. Xa-HS et, seule l'interaction AT-HS conditionne l'inhibition du F. Xa.



Le complexe enzyme-AT est covalent, donc très stable : l'inhibition est **irréversible**.

Le complexe se détache de l'héparane sulfate et va se fixer sur un récepteur de l'hépatocyte pour être internalisé. (Cette internalisation induit probablement la synthèse d'AT). L'héparane sulfate est alors à nouveau disponible.

Cette propriété de l'AT de se lier aux héparane sulfates pour inhiber de façon immédiate les sérine protéases est la base du traitement anticoagulant par un analogue : l'héparine.

### **POUR EN SAVOIR PLUS : AT, héparine et HBPM**

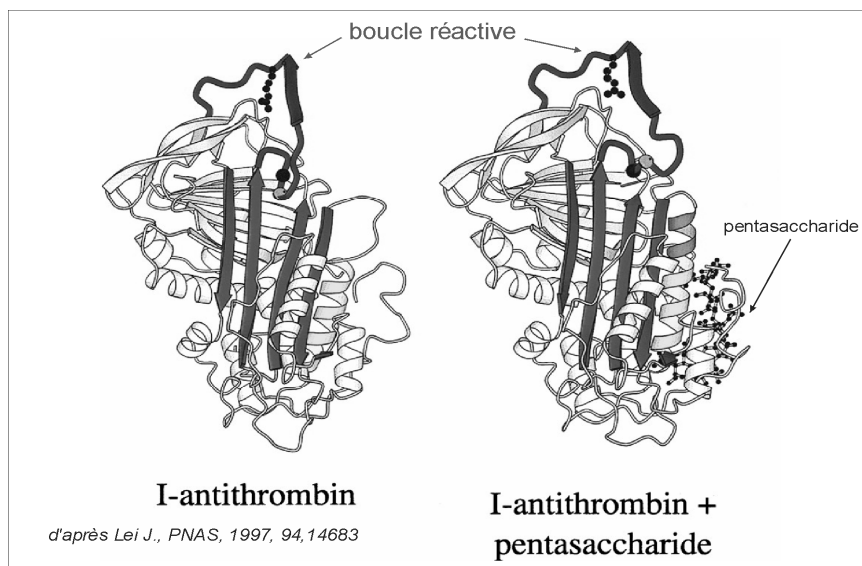
*L'héparine est un glycosaminoglycane acide, composé d'une famille de chaînes polysaccharidiques de tailles et de structures différentes.*

*Les héparane sulfates (HS) qui sont des composants de la paroi vasculaire, et les héparines accélèrent l'inhibition des sérines protéases (F. Xa, thrombine) en induisant un **changement de conformation de l'antithrombine (AT)**.*

*Lorsque l'AT entre en contact avec l'héparine ou l'HS, elle change de conformation, et forme rapidement un complexe AT-protéase. L'AT adopte ensuite un état de "faible affinité" pour l'héparine, ce qui lui permet de se libérer de l'héparine ou des HS.*

*Le changement de conformation de l'AT est dû à la liaison d'un motif particulier (5 résidus = **pentasaccharide**) de l'héparine ou de l'HS qui se lie à des domaines spécifiques de l'AT en hélice, présents dans la région N terminale.*

*Cette liaison entraîne **l'exposition de la boucle** réactive de l'AT. Cette boucle qui contient une Arginine sera reconnue par les enzymes cibles (F. Xa, thrombine ...) qui vont cliver le pont Arg 393-Ser394 (P1-P'1).*

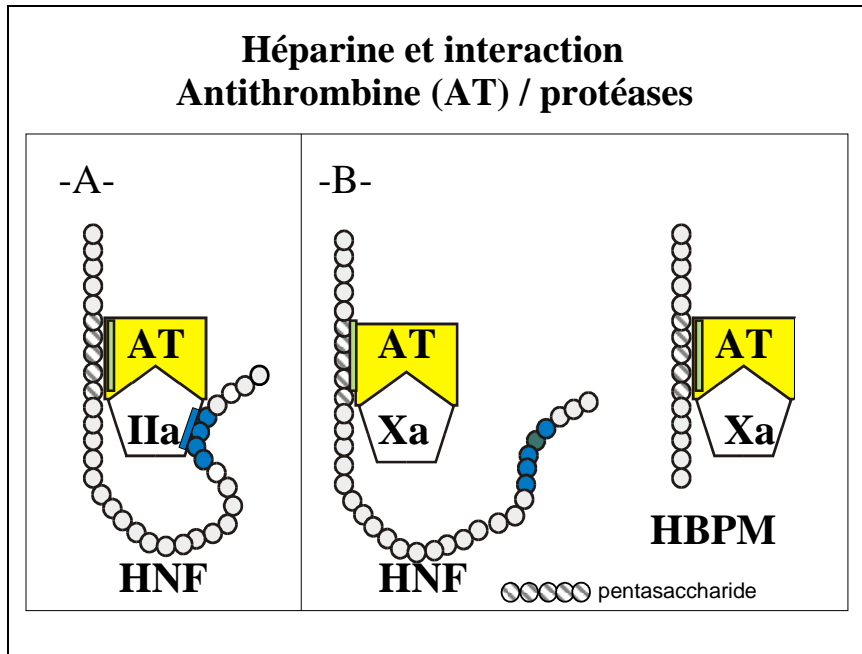


*Après clivage, la boucle s'insère à l'intérieur de l'AT où elle vient former le 6<sup>e</sup> brin d'une **structure en feuillet**  $\beta$  (feuillet A). De cette façon l'enzyme qui reste liée à son pseudo substrat : l'AT est inhibée de façon irréversible.*

*L'inactivation de la thrombine et du F. Xa se fait par des mécanismes un peu différents. L'héparine se lie à la thrombine en se fixant sur un domaine comportant des résidus basiques : **l'exosite 2**, et se lie aussi à l'AT (bridging mechanism). En revanche, l'héparine ne se lie pas au F. Xa et l'accélération de l'inhibition est due au changement de conformation de l'AT.*

**De cette façon l'inhibition de la thrombine et du F. Xa par l'AT est accélérée au moins 1 000 fois.**

Pour réduire certains effets secondaires dus à l'utilisation des héparines à longue chaîne (héparine standard), on utilise des héparines à courtes chaînes (héparine de bas poids moléculaire ou **HBPM**), comportant le pentasaccharide, catalysant l'interaction AT-F.Xa, mais qui ne se lie pas à la thrombine ou même le pentasaccharide lui-même.



OOOOO pentasaccharide

Les enzymes de la coagulation échappent au contrôle de l'AT tant qu'elles sont liées aux phospholipides de la membrane plaquettaire mais sont accessibles quand elles diffusent vers la phase liquide.

## 2) Le second cofacteur de l'héparine (HCII)

Le second cofacteur de l'héparine qui est aussi une serpine, est capable d'inhiber la thrombine. Son action est potentialisée par un autre glycosaminoglycane : le **dermatane sulfate**, présent dans les matrices extracellulaires.

## 3) Le système de la protéine C

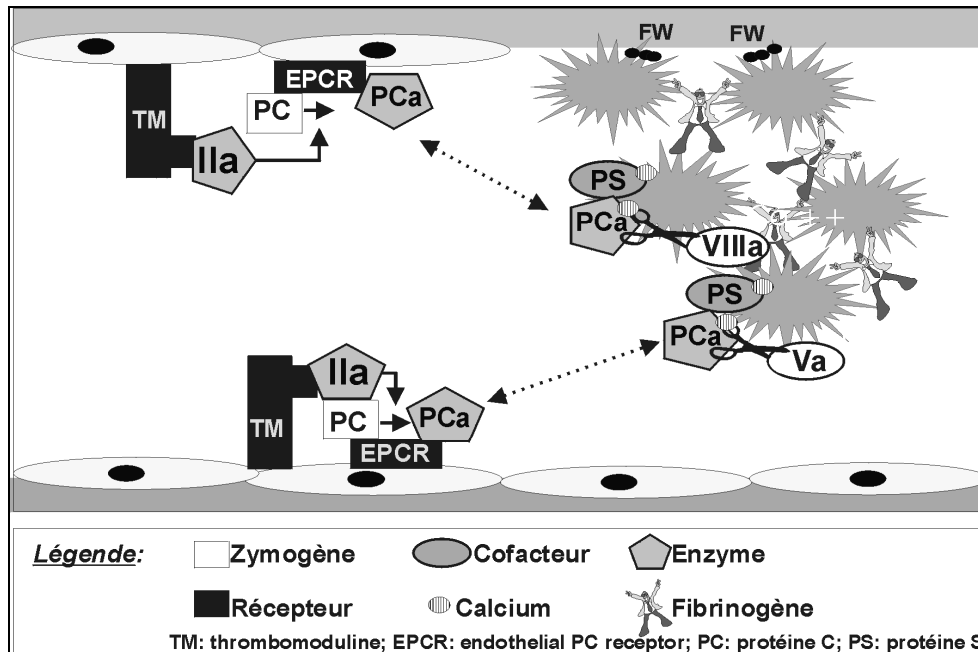
La protéine C (PC) est une protéine plasmatique dont l'activation est régulée par un récepteur membranaire de la cellule endothéliale : la **thrombomoduline** (TM). La TM est présente en grande quantité dans la **microcirculation**. Elle fixe la thrombine (T) et modifie sa spécificité enzymatique en la transformant en activateur de la protéine C et en la rendant incapable de coaguler le fibrinogène et d'activer les cofacteurs V et VIII ou les plaquettes.

**La thrombine en se fixant à la thrombomoduline perd ses propriétés procoagulantes et acquiert des propriétés anticoagulantes.**

Il existe un deuxième récepteur (**EPCR**, pour *endothelial protein C receptor*) dont la densité est très élevée dans les gros vaisseaux (aorte). Ce récepteur est capable de fixer la PC et d'accélérer son activation par le complexe T-TM. Son rôle pourrait être de concentrer la PC sur des sites où la TM est peu présente (gros vaisseaux).

**La protéine C activée (PCa)** est une sérine protéase vitamine K-dépendante, elle a besoin pour agir d'un cofacteur, la **protéine S (PS)**. La PS n'a pas d'activité enzymatique. Elle circule dans le sang liée en partie à une protéine du système du complément, la C4bBinding protein (C4bBp). Seule la protéine S libre, (soit environ 40 % de la protéine S totale) a une activité cofacteur.

La PCa à l'aide de son cofacteur la PS, fixée sur les phospholipides membranaires exerce son effet anticoagulant en **inactivant par protéolyse le F.Va et le F.VIIIa**.



Les complexes d'activation de la prothrombine et du facteur X ne peuvent plus se former efficacement puisque les cofacteurs Va et VIIIa ne sont plus actifs, et la cinétique de production de la thrombine devient très lente. (*Le déficit constitutionnel en AT, protéine C et protéine S est une cause de thrombose du sujet jeune.*)

Une anomalie génétique du facteur V : « **facteur V Leiden** » est caractérisée par une mutation Arg 506-Gln qui empêche le clivage, donc l'inactivation du facteur Va par la PCa, elle se traduit par un **risque accru de thrombose**.

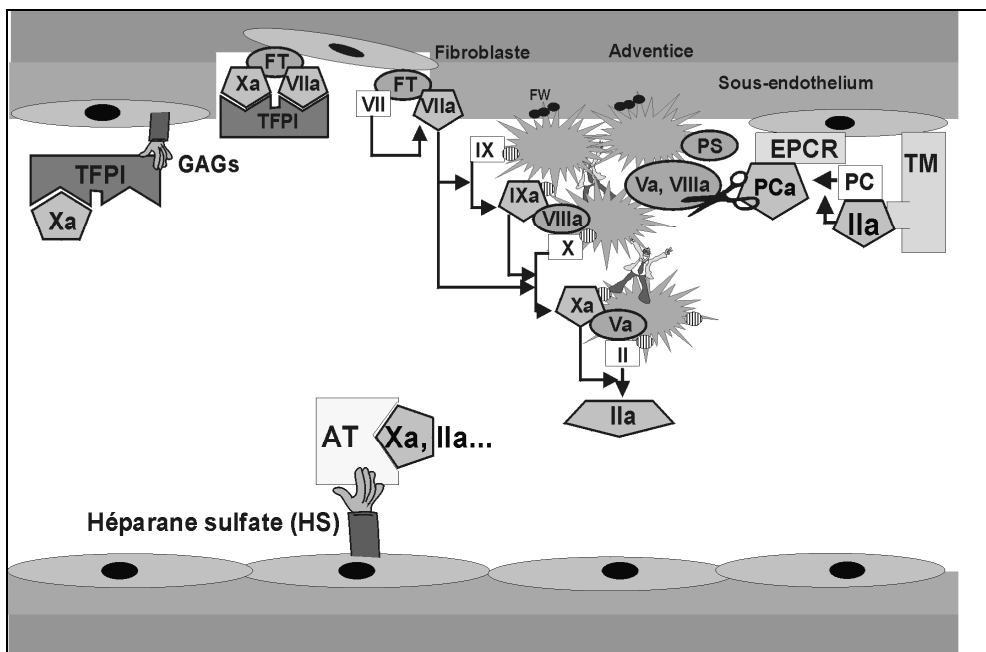
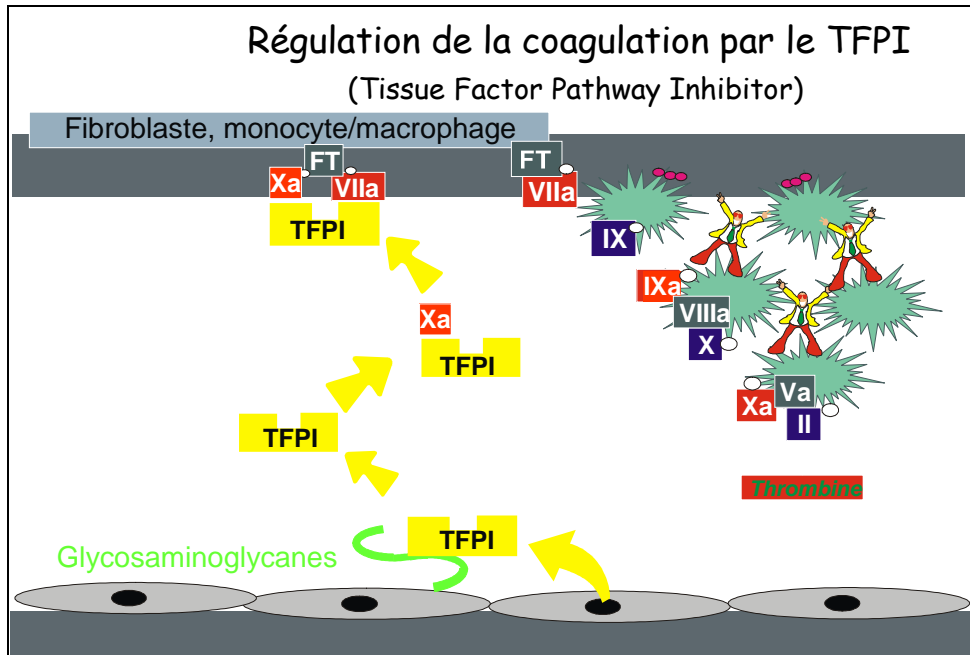
Le système de la PC est lui-même régulé ; on connaît deux inhibiteurs de la PCa : la PCI pour **Protein C Inhibitor** qui est une serpine très efficace, de concentration faible et l' $\alpha$ 1 antitrypsine moins efficace mais présente à une concentration élevée.

#### 4) Inhibition de la voie exogène : le TFPI (Tissue Factor Pathway Inhibitor)

La voie exogène est régulée par un inhibiteur plasmatique produit par la cellule endothéliale, le TFPI. Cet inhibiteur comporte 3 domaines de **type Kunitz**. Le domaine 2 se lie au F. Xa, le domaine 1 se lie au complexe FT.VIIIa et le domaine 3 se lie aux lipoprotéines et aux glycosaminoglycans (GAGs).

Le TFPI est présent à la fois dans le sang et fixé sur les **GAGs** de la paroi vasculaire. Cette fraction est probablement la plus importante.

Le rôle du TFPI devient important après la génération de faibles quantités de F.Xa sur lequel se fixe le TFPI. Il se forme ensuite un **complexe quaternaire** F. Xa-TFPI-VIIa-FT. Le complexe VIIa-FT est inhibé bloquant ainsi la production de F.Xa et de F.IXa.



**A RETENIR :**

**Régulation négative de la coagulation**

- **L'antithrombine** est une serpine (inhibiteur de sérine protéases) dont l'activité est potentialisée par l'héparane sulfate des parois vasculaires. Elle forme des complexes irréversibles inactifs avec la thrombine, le FXa, les FIXa et XIa, lorsque ceux-ci ne sont pas fixés sur les surfaces membranaires.
- **Système de la protéine C** : 2 protéines membranaires endothéliales (thrombomoduline et EPCR) potentialisent l'activation de la protéine C par la thrombine. La protéine C activée (avec son co-facteur la protéine S) dégrade les co-facteurs Va et VIIIa, et ralentit la production de thrombine.
- **Le TFPI**, fixé sur les glycosaminoglycanes de la paroi vasculaire, forme un complexe avec le FXa. Le complexe FXa-TFPI se fixe sur le complexe FT-FVIIa et bloque l'initiation de la coagulation par le facteur tissulaire (FT).

## A RETENIR : INHIBITEURS DE LA COAGULATION

### I - Finalité

La coagulation est sous le contrôle de l'endothélium. L'extension des réactions de l'hémostase (activation des plaquettes et de la coagulation) à distance de la brèche vasculaire est limitée par différents systèmes physiologiques, qui sont tous sous le contrôle de la cellule endothéliale.

Le flux : faire de l'exercice, bouger.

### II - Contrôle de l'activation des plaquettes

**Prostacycline** (PGI<sub>2</sub>) à partir de l'acide arachidonique de la cellule endothéliale.

**Monoxyde d'azote** (NO).

### III - Contrôle de la coagulation plasmatique

#### Antithrombine

- Serpine synthétisée par le foie.
- Se lie, à la fois à l'héparane sulfate à la surface de la cellule endothéliale et aux enzymes cibles : forme un complexe **ternaire** (enzyme-AT-héparane sulfate).
- L'héparane sulfate (HS) se lie à la fois à l'AT et à la Thrombine alors que seule l'interaction AT-HS conditionne l'inhibition du F.Xa. (voir mécanisme d'action des HBPM).
- Inhibe rapidement : **thrombine, Xa, IXa, XIa**, non fixés aux surfaces membranaires.

#### Le système de la protéine C

- 2 protéines membranaires endothéliales (thrombomoduline et EPCR (endothelial protein C receptor)) potentialisent l'activation de la protéine C par la thrombine. La protéine C activée avec son co-facteur la protéine S dégrade les co-facteurs Va et VIIIa et ralentit la production de thrombine.

#### Le TFPI

- Fixé sur les glycosaminoglycanes de la paroi vasculaire, forme un complexe avec le F.Xa.
- Le complexe F.Xa-TFPI se fixe sur le complexe FT-F.VIIa et bloque l'initiation de la coagulation par le facteur tissulaire (FT).

## HEMOSTASE : EXPLORATION

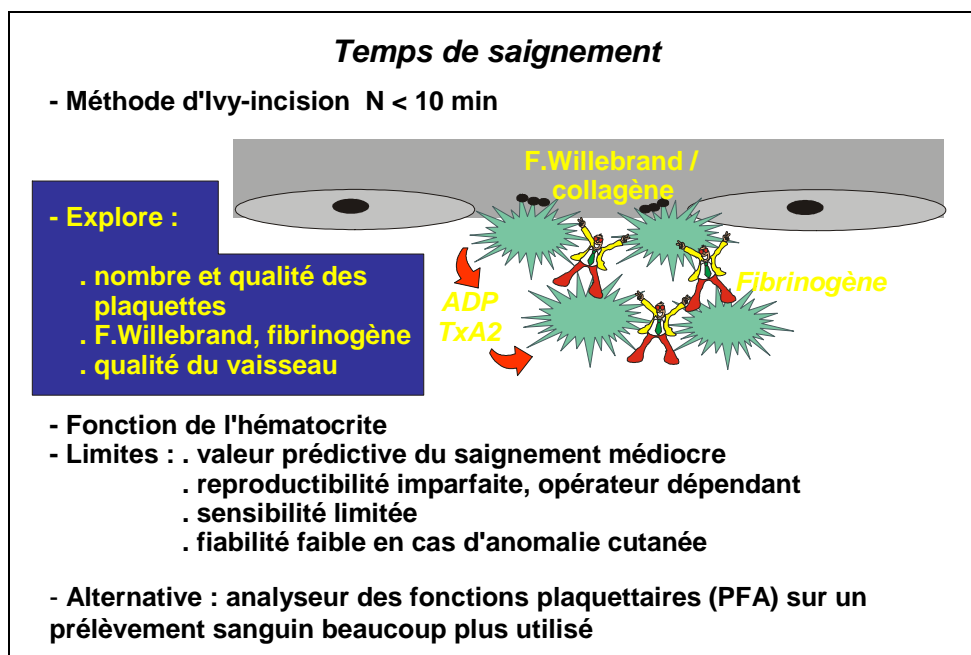
### I - HEMOSTASE PRIMAIRE

#### 1) Numération des plaquettes

Elle se fait à l'aide de compteurs globulaires automatiques. Le nombre normal est de 150 à 400 Giga/litre (G/l)

#### 2) Temps de saignement : méthodes et valeurs normales

Le temps de saignement (TS) permet une exploration globale de l'hémostase primaire *in vivo*. Il correspond au temps qui s'écoule entre la réalisation d'une petite plaie cutanée superficielle et le moment où le saignement provoqué s'arrête. Il explore les différentes phases de l'hémostase primaire, c'est-à-dire l'**adhésion** des plaquettes au sous-endothélium en présence de facteur Willebrand, l'**activation** des plaquettes par leurs agonistes physiologiques et la **sécrétion** du contenu de leurs granules et, enfin, leur **agrégation** en présence de fibrinogène.



**Il est donc fonction à la fois de la qualité de la paroi vasculaire, du nombre et de la qualité des plaquettes, et de la concentration plasmatique de facteur Willebrand et de fibrinogène.**

#### Méthode d'Ivy-incision (normale < 10 minutes)

Une incision horizontale est faite à la face antérieure du tiers supérieur de l'avant-bras, sous une pression de 4 cm Hg maintenue à l'aide d'un brassard manométrique. Un dispositif standardisé à usage unique, réalisant une incision de 5 mm de longueur et 1 mm de profondeur, est utilisé pour améliorer la reproductibilité.

Cette technique très sensible, raisonnablement reproductible, constitue la méthode de référence. Elle n'est plus beaucoup utilisée.

### 3) Etude des fonctions plaquettaires

L'étude des fonctions plaquettaires peut aussi être réalisée *in vitro* sur un tube de sang à l'aide d'un appareil, le **PFA-100**<sup>®</sup> (platelet function analyzer). Le test consiste à mesurer le temps d'adhésion et d'agrégation des plaquettes sur une membrane recouverte de collagène (en présence d'adrénaline ou d'ADP) dans des conditions de flux standardisées. Ce test est inutilisable en cas de thrombopénie.



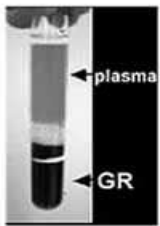
Chacune des fonctions des plaquettes peut être étudiée *in vitro* si le TS ou le temps d'occlusion du PFA sont anormaux, en l'absence de thrombopénie ou de prise de médicaments anti-agrégants.

### 4) Les anomalies

- Un allongement du TS avec nombre de plaquettes normal et allongement du TCA s'observe en cas de déficit en vWF (**maladie de Willebrand**).
- Un allongement du TS avec nombre de plaquettes normal et TCA normal se voit au cours des **thrombopathies**, c'est-à-dire d'anomalie fonctionnelle des plaquettes. Il faut d'abord avoir éliminé une **prise médicamenteuse** : antiagrégant plaquettaire de type **Aspirine, Clopidogrel**.
- Un allongement isolé du TS avec fonctions plaquettaires normales peut se voir dans des **anomalies de la paroi vasculaire**.

## II - COAGULATION PLASMATIQUE

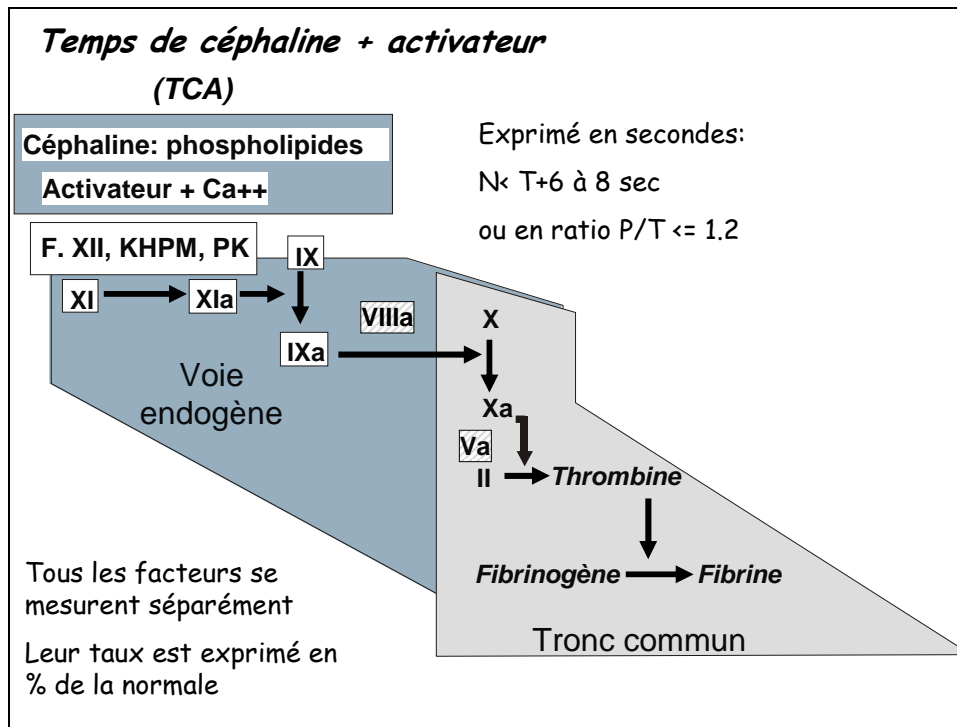
Les tests se pratiquent sur un tube de sang, prélevé sur un anticoagulant (chélateur du  $\text{Ca}^{2+}$ , par exemple), le sang est centrifugé pour séparer le plasma des cellules (GR, GB et plaquettes) et les études sont réalisées sur le plasma. Le plasma ne contient ni plaquettes (source de phospholipides), ni calcium, donc **tous les tests de coagulation devront nécessiter l'apport de phospholipides et de calcium en plus des réactifs spécifiques**.

<p>1</p> 	<p>Le sang est prélevé Sur un chélateur du calcium (citrates par exemple) Afin de bloquer la coagulation</p>	<p>2</p> 
<p>3</p> 	<p>Le plasma est conservé pour réaliser les tests; il ne contient ni plaquettes, ni phospholipides et le <math>\text{Ca}^{2+}</math> est bloqué</p>	<p>4</p> <p><b>Pour initier la coagulation, il faudra ajouter</b></p> <ul style="list-style-type: none"><li>- du <math>\text{Ca}^{2+}</math>, et des phospholipides</li><li>- Puis - soit du FT ( TQ) pour activer le F.VIIa</li><li>- soit « un contact (TCA)-kaolin, silice etc...</li></ul>



Il existe des tests globaux (TCA et temps de Quick). Lorsqu'ils sont anormaux, chacun des facteurs de coagulation peut être dosé de façon spécifique, en fonction de ces premiers résultats et du contexte clinique.

### 1) Le temps de céphaline + activateur (TCA)



#### 1.1. Méthodes et valeurs normales

Le TCA mesure le temps de coagulation à 37° C d'un plasma en présence de **phospholipides** (céphaline), d'un **activateur de la phase contact** (kaolin, acide ellagique, célite ou autre) et de **calcium**.

**Il explore la voie de la coagulation déclenchée par le contact (voie dite « endogène »), et il est donc fonction de la concentration plasmatique de chacun des facteurs de coagulation impliqués : facteurs de la phase contact (facteurs XII, kininogène de haut poids moléculaire, prékallikréine), facteurs XI, IX, VIII, X, V, II et fibrinogène.**

**Il n'explore pas le facteur VII ni les plaquettes.**

Le temps obtenu est exprimé par rapport au temps du plasma témoin, dont la valeur moyenne varie entre 30 et 40 secondes selon les réactifs utilisés. Le résultat est rendu sous forme de ratio M/T, **ratio normal = 1,2**.

Le TCA est **allongé lorsqu'il dépasse de 6 à 8 secondes le temps du témoin**, mais la frontière n'est pas stricte. Un ratio > 1,2 est anormal.

#### 1.2. Les anomalies

**Un allongement isolé du TCA** s'observe dans les cas suivants :

- Déficit isolé en **facteur VIII** (hémophilie A), **facteur IX** (hémophilie B) ou facteur XI. Ces déficits s'accompagnent de manifestations hémorragiques.

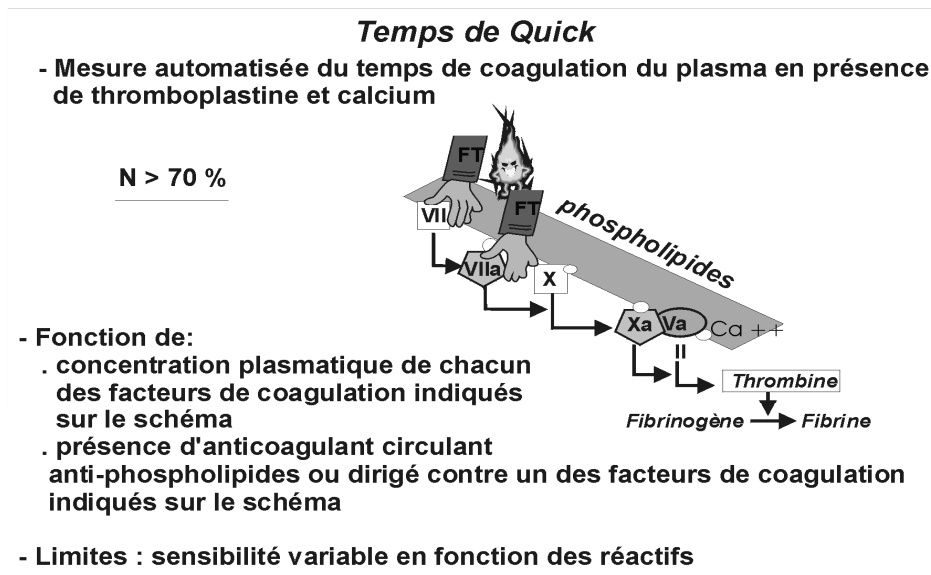
- Déficit en facteurs de la **phase contact**. Ces déficits exceptionnels n'entraînent jamais d'incidents hémorragiques, même lorsqu'ils sont sévères.

- **Anticoagulant circulant (ACC) :**

La mise en évidence repose sur un test de correction : l'examen est répété sur un mélange à parties égales de plasma du malade et du plasma normal. Si l'anomalie est due à un déficit, l'apport de 50 % de plasma normal suffit à corriger le TCA. S'il s'agit d'un ACC, celui-ci inhibe la coagulation et dans ce cas le TCA du mélange reste anormalement long.

Les **anticorps anti-facteur VIII ou anti-facteur IX** exposent à un **risque hémorragique majeur** contrairement aux anticoagulants de type anti-phospholipides.

**2) Le temps de quick (TQ)**



**2.1. Méthodes et valeurs normales**

Le temps de Quick est le temps de coagulation à 37° C d'un plasma en présence d'un mélange de facteur tissulaire et de phospholipides (thromboplastine) et de calcium.

Le temps de coagulation du plasma du patient est comparé à celui d'un témoin, voisin de 12 secondes pour la plupart des réactifs. Le résultat est exprimé en France en **pourcentage d'activité**, en désignant ce pourcentage sous le nom de taux de prothrombine (TP), terme incorrect. Le pourcentage est calculé en utilisant un plasma témoin qui, par définition correspond à 100 % de la normale (**normale = > 70 %**).

Les valeurs inférieures à 70 % sont considérées comme pathologiques. Un autre mode d'expression est **exclusivement réservé à la surveillance des traitements anticoagulants** par les antagonistes de la vitamine K : l'**INR** (International Normalized Ratio) correspond au rapport du temps de Quick du patient sur celui du témoin, élevé à la puissance ISI, cet index (International Sensitivity Index) définissant la sensibilité du réactif utilisé.

**Le temps de Quick explore de façon globale les facteurs de coagulation de la voie exogène de la coagulation (facteurs VII, X, V, II et fibrinogène).**

**Dans les conditions de concentration de facteur tissulaire utilisées, le complexe FT-VIIa active exclusivement le F. X : les F. IX et VIII ne sont donc pas explorés par le TQ.**

**2.2. Les anomalies**

- Un temps de Quick allongé avec TCA normal indique un **déficit isolé en facteur VII**.

- Un allongement associé du TCA et du temps de Quick s’observe dans :
  - . **Hypovitaminose K** : facteur II, VII et X diminués, **facteur V normal**.
  - . **Insuffisance hépatocellulaire** : facteur II, VII, X et V diminués.
  - . **CIVD** (coagulation intravasculaire disséminée) : elle associe une thrombopénie, une diminution du taux de fibrinogène et des autres facteurs de coagulation (en particulier F.II et F.V) consommés au cours du processus de coagulation ; ces anomalies sont associées à la présence de produits de dégradation de la fibrine (D-dimères).
  - . Anticoagulants circulants, le plus souvent de type **antiphospholipides**.
  - . Déficits **isolés** en fibrinogène, facteur II, V ou X.
  - . Tous les facteurs de coagulation peuvent être mesurés individuellement : dosage de F.VII par exemple

### III - LA FIBRINOLYSE

#### 1) Tests globaux

- Temps de lyse d'un caillot de sang total : test peu utilisé car peu sensible.

#### - Temps de lyse des euglobulines :

Ce test plus sensible que le précédent, consiste à évaluer l'activité fibrinolytique d'un plasma déplété en inhibiteurs par précipitation en milieu acide (pH 5,9). Le précipité d'euglobulines (facteurs de coagulation, plasminogène, plasmine, t-PA, u-PA) est recalcifé et le temps de lyse du caillot formé est ensuite mesuré.

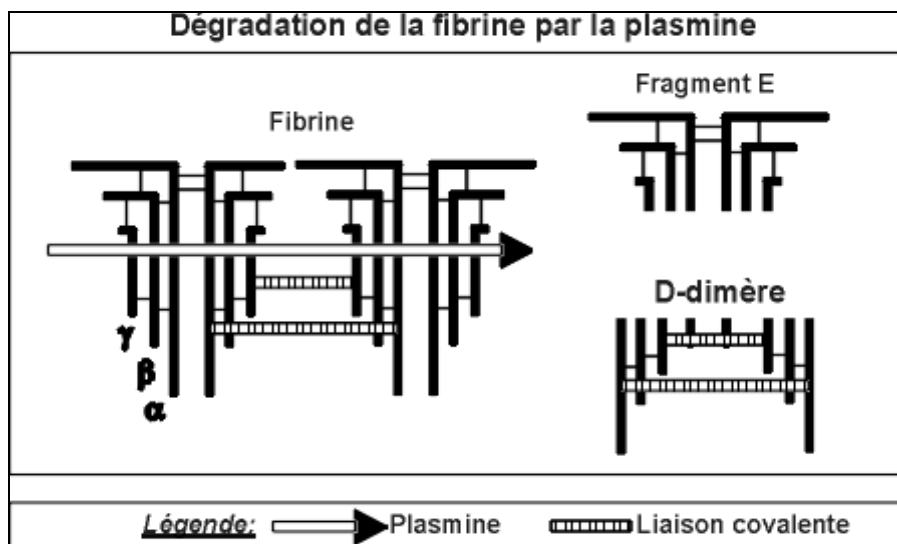
**Valeurs normales > 3 h.**

Le temps de lyse est accéléré lorsque la quantité de tPA circulant augmente.

#### 2) Tests analytiques

- Les dosages du plasminogène, du t-PA, de l’ $\alpha_2$  antiplasmine, du PAI-1 et des autres inhibiteurs sont possibles.

- Dosage des produits de dégradation de la fibrine : les **D-dimères** proviennent de la dégradation de la fibrine par la fibrinolyse physiologique et, sont donc le témoin de la formation de fibrine. Le dosage des D-dimères a une excellente valeur prédictive négative (VPN) : lorsque leur concentration plasmatique est basse, la probabilité d'une thrombose veineuse profonde est très faible. En revanche, la valeur prédictive positive est mauvaise (**taux augmenté dans de nombreuses situations pathologiques : inflammation, traumatisme, et aussi l'âge**).



## A RETENIR : EXPLORATION

### I - Hémostase primaire

- Numération des plaquettes (150-400 G/L).
- Temps de saignement (TS) : méthode d'Ivy, utilisé si TO impossible, (**normale < 10 minutes**).
- **Etude des fonctions plaquettaires (TO)** : mesure le temps d'adhésion et d'agrégation des plaquettes sur une membrane recouverte de collagène (en présence d'adrénaline ou d'ADP) dans des conditions de flux standardisées.

**Anormal si** : déficit en facteur Willebrand.

- Thrombopathie :
  - . Constitutionnelle : anomalie de Gp1b par exemple.
  - . Acquisée : prise d'antiagrégants plaquettaire : aspirine.
- Thrombopénie.

### II - Coagulation plasmatique

Le sang est prélevé sur anticoagulant (chélateur du  $Ca^{2+}$ ) et centrifugé éliminant toutes les cellules (donc les plaquettes source de phospholipides).

**Donc tous les tests se font sur du plasma sans  $Ca^{2+}$  et sans phospholipides.**

Pour étudier la coagulation, il faudra rajouter du  $Ca^{2+}$  et des phospholipides **ET** selon la voie étudiée :

- soit un activateur de la voie du contact (silice, kaolin etc ...), ex : TC.
- soit du facteur tissulaire (FT), ex : TQ.

#### 1 - Temps de céphaline + activateur (TCA)

Test global, exprimé en secondes et en ratio, comparé à un témoin, et en ratio : temps patient/temps témoin, **anormal si ratio > 1,2 (temps allongé : coagulation ralentie)**.

**Explore tous les facteurs sauf le F.VII.**

- Anormal** :
- Déficit en facteur VIII et IX (hémophilie A et B), ou déficit en F.XI, (TQ normal).
  - Présence d'anticoagulant circulant.

#### 2 - Temps de Quick (TQ ou TP)

Exprimé en secondes et comparé à un témoin, ou en **pourcentage d'activité**, normale 100 +/- 30 %, l'INR étant réservé au suivi de traitement AVK.

**Anormal si < 70 %.**

Explore la voie exogène (voie du FT).

Explore les **F.II, V, VII, X** et le **Fibrinogène (Fg)**, n'explore pas le F.IX (bypass de la voie du FIX).

- Anormal** :
- Déficit en vitamine K (diminution des F.II, VII et X) - TCA anormal.
  - Insuffisance de synthèse hépatique : (diminution des F.II, VII, X, Fg et du F.V) - TCA anormal.

**TQ anormal et TCA normal : déficit en F.VII.**

**3 - Chaque facteur peut être dosé individuellement (dosage fonctionnel ou Ag).**

## COMMENT EXAMINER ET INTERROGER UN PATIENT QUI PRESENTE UN SYNDROME HEMORRAGIQUE

### 1) EXAMEN CLINIQUE

- Préciser le contexte :
  - . Infectieux, septicémie, fièvre,
  - . Hémopathie associée,
  - . Maladie hépatique, rénale ou auto-immune associée,
  - . Prise de médicaments anti-coagulants,
  - . Ou hémorragie isolée.
  
- Préciser le type de l'hémorragie :
  - . Cutanée : purpura (ponctuations pourpre en tête d'épingle), ecchymoses (placards bleus évoluant vers le jaune).
  - . Muqueuse (épistaxis, gingivorragie, hématémèse, méno-métrorragie).
  - . Hématomes (intra-musculaires).
  - . Hémarthroses (intra-articulaires).
  
- Apprécier la gravité : purpura limité ou généralisé ? Anémie ? En cas de thrombopénie sévère, il faut réaliser un fond d'œil (FO) à la recherche d'une hémorragie rétinienne, témoin du risque d'hémorragie intra-crânienne.

### 2) INTERROGATOIRE

- Eliminer les principales pathologies responsables de manifestations hémorragiques citées ci-dessus.
  
- Préciser le caractère spontané ou provoqué, la date des premières manifestations.
  
- Rechercher la prise de médicaments, et faire une liste ; en particulier les antiagrégants plaquettaire (Aspirine).
  
- Demander au patient s'il a subi des interventions chirurgicales ou des extractions dentaires, si elles ont été accompagnées de saignement. Recherche si le patient a du être transfusé à cette occasion.
  
- Rechercher des manifestations familiales, faire un arbre généalogique.