

Physiologie et exploration de l'hémostase

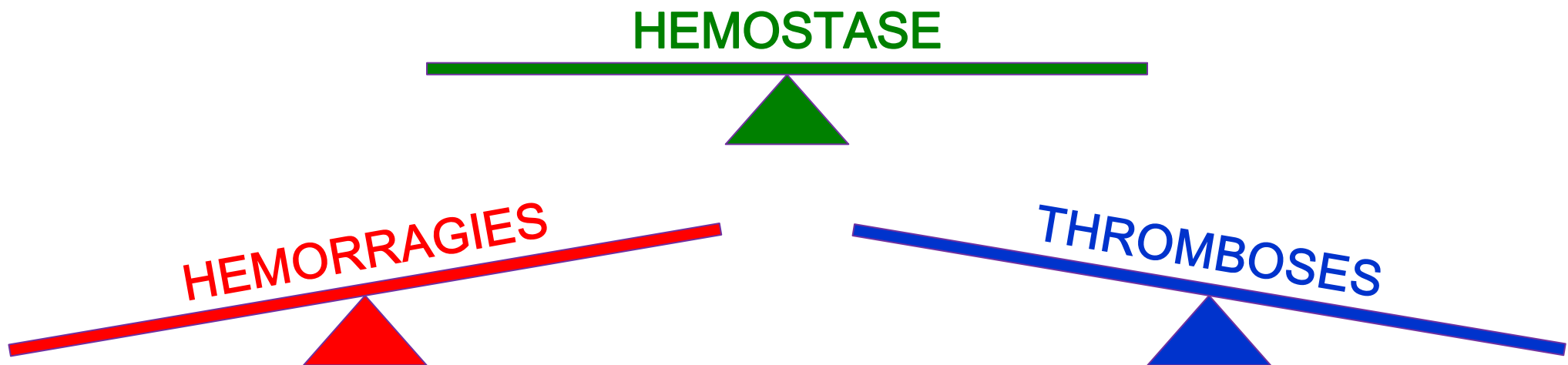
02/10/2017 L2

Dr Dorothee Faille, MCU-PH
Faculté de Médecine, Université D. Diderot - Paris 7
dorothee.faille@aphp.fr

Polycopié: Pr Annie Bezeaud, sept 2013

Hémostase

- Processus physiologique
- Ensemble des phénomènes déclenchés par une **lésion vasculaire** et destinés à limiter les pertes sanguines au niveau de la brèche vasculaire

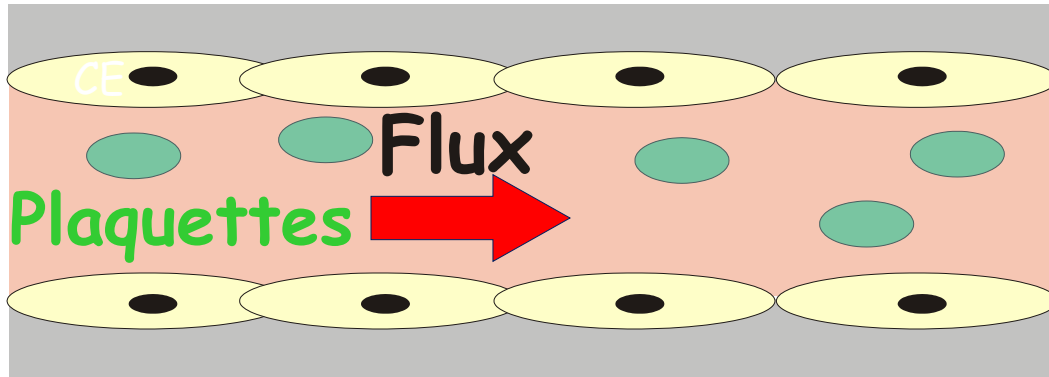


L'hémostase dans la vie d'un médecin...

Hémorragie	Thrombose
<p>Cutanéomuqueux: hémostase primaire</p> <p>Constitutionnels: Willebrand, thrombopénies, thrombopathies</p> <p>Acquis: antiagrégants, AINS, insuffisance hépatique, insuffisance rénale, sténose aortique...</p>	<p>Artérielle</p> <p>Infarctus</p> <p>AVC</p> <p>Traitement = antiagrégants plaquettaires: aspirine, clopidogrel...</p>
<p>Profonds: coagulation</p> <p>Constitutionnels: hémophilie, déficits rares en facteurs</p> <p>Acquis: anticoagulants, insuffisance hépatocellulaire, CIVD</p>	<p>Veineuse</p> <p>Phlébite</p> <p>Embolie pulmonaire</p> <p>Traitement = anticoagulants: AVK, héparines, anti-Xa, anti-IIa</p>

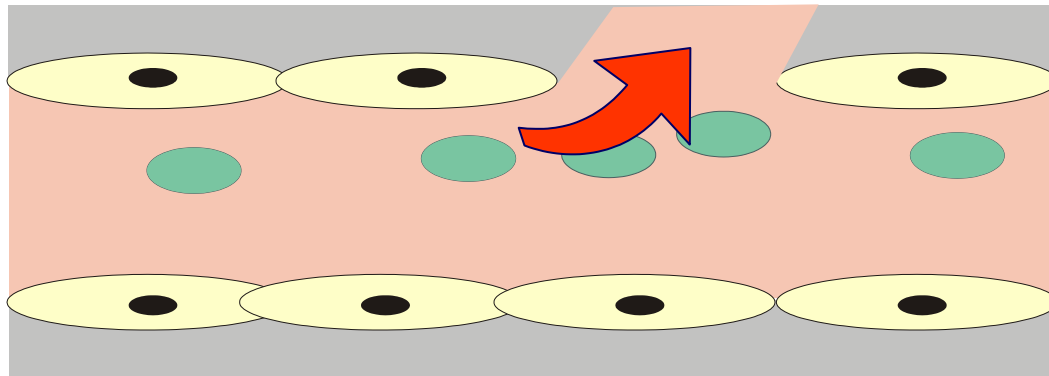
Principales caractéristiques de l'hémostase

- **Provoqué** (lésion vasculaire)
- **Localisé** à la brèche vasculaire
- **Cascade** de réactions enzymatiques
- **A la surface** des plaquettes activées
- **Thrombus** (plaquettes + fibrine)
- **Auto-amplification** (rapide + efficace)
- **Contrôle négatif** limitant la diffusion
- **Fibrinolyse**: dissolution de la fibrine



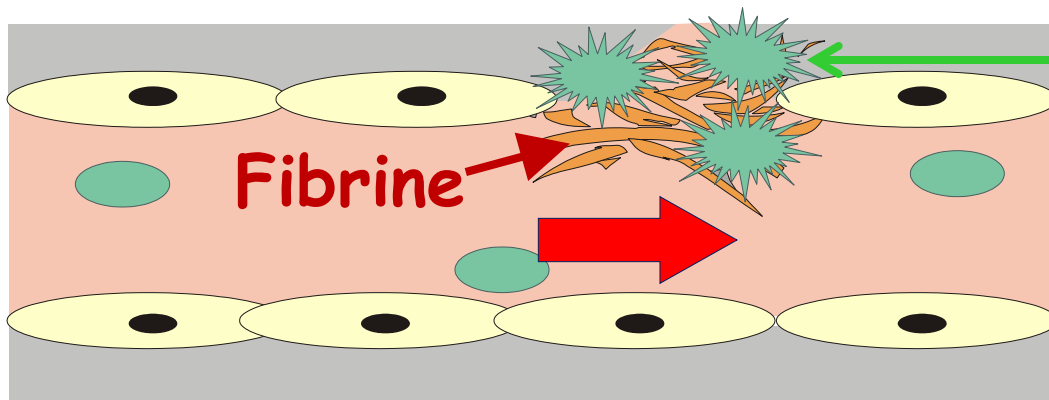
Vaisseau intact:

Pas de contact des plaquettes ni des facteurs de coagulation avec le sous endothélium



Lésion vasculaire:

Saignement => exposition du sous-endothélium et contact du sang (plaquettes, facteurs de coagulation)



Plaquettes agrégées

Thrombus:

Plaquettes agrégées + réseau de fibrine => Arrêt du saignement

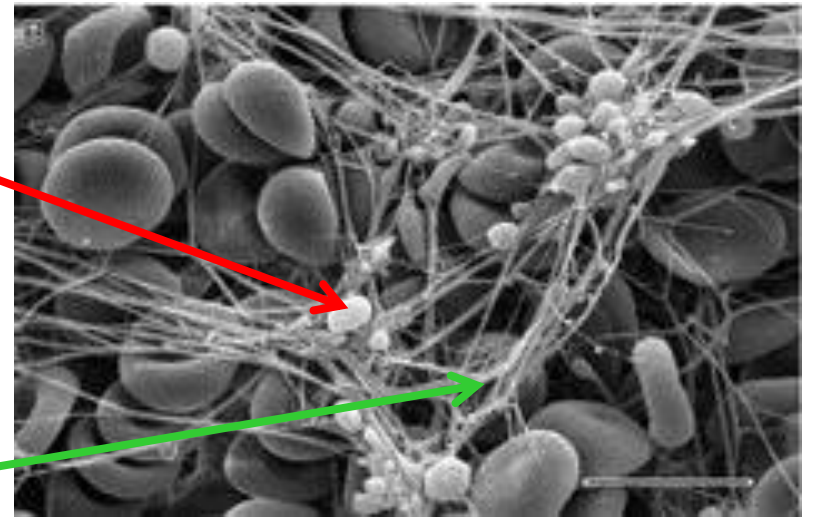
2 phénomènes simultanés et complémentaires

- Hémostase primaire

=> agrégat de **plaquettes**

- Coagulation plasmatique

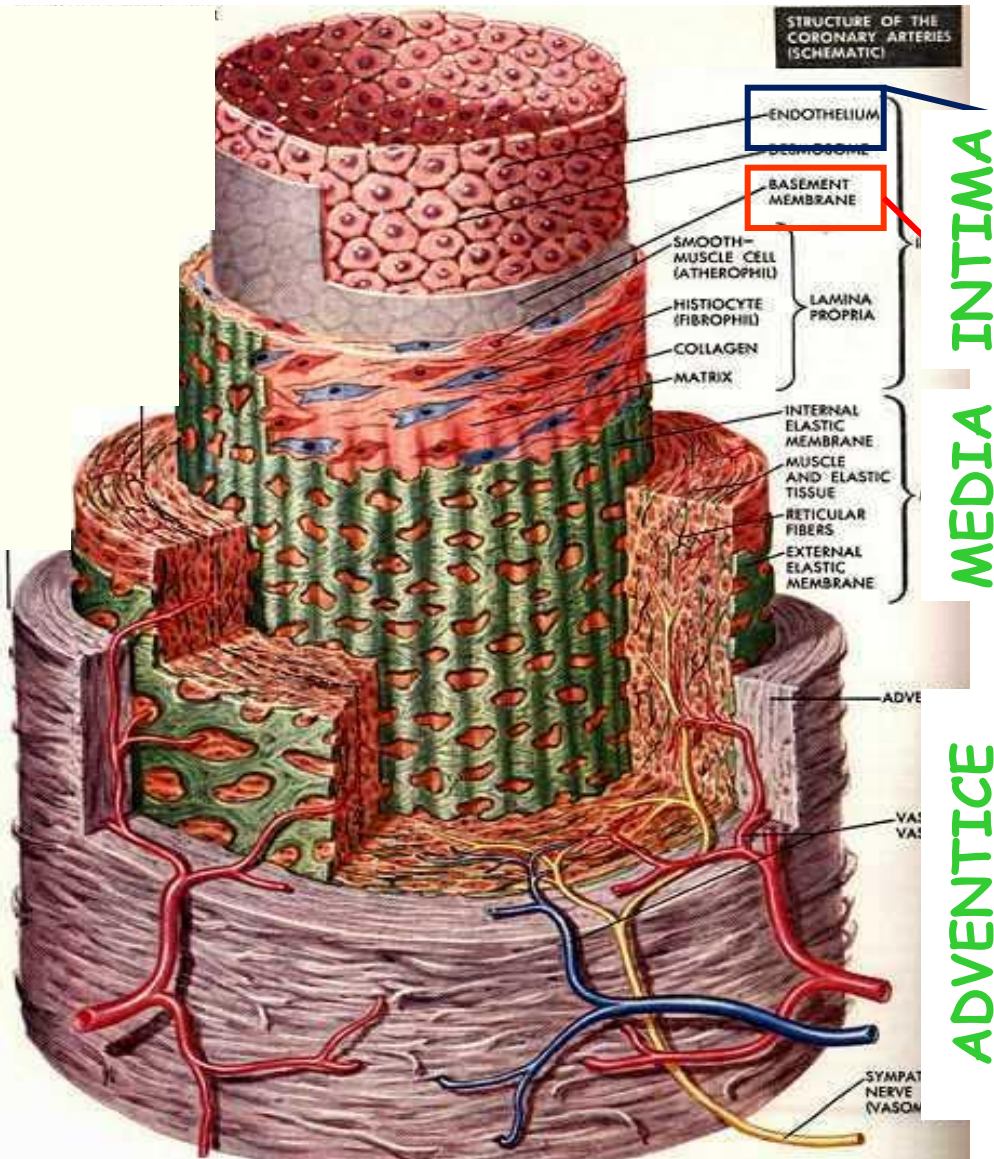
=> caillot de **fibrine**



Hémostase primaire

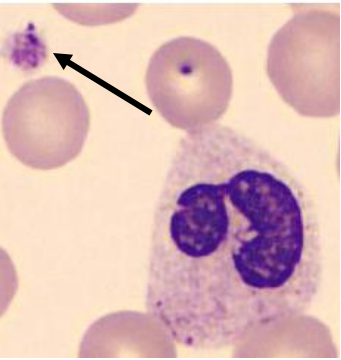
- Principaux protagonistes:
 - Vaisseau: protéines du sous-endothélium (collagène)
 - Plaquettes
 - Facteur von Willebrand (circule lié au FVIII)
 - Fibrinogène

Structure d'un vaisseau sain



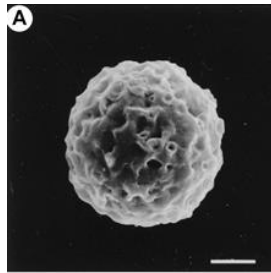
Endothélium non thrombogène = monocouche de cellules endothéliales

Sous-endothélium thrombogène = protéines sécrétées (collagène, von Willebrand, fibronectine, thrombospondine)

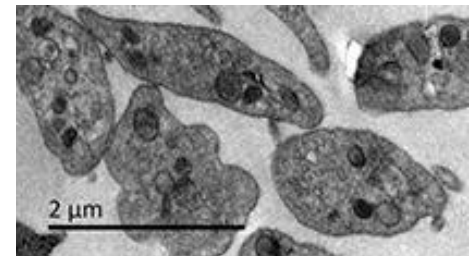
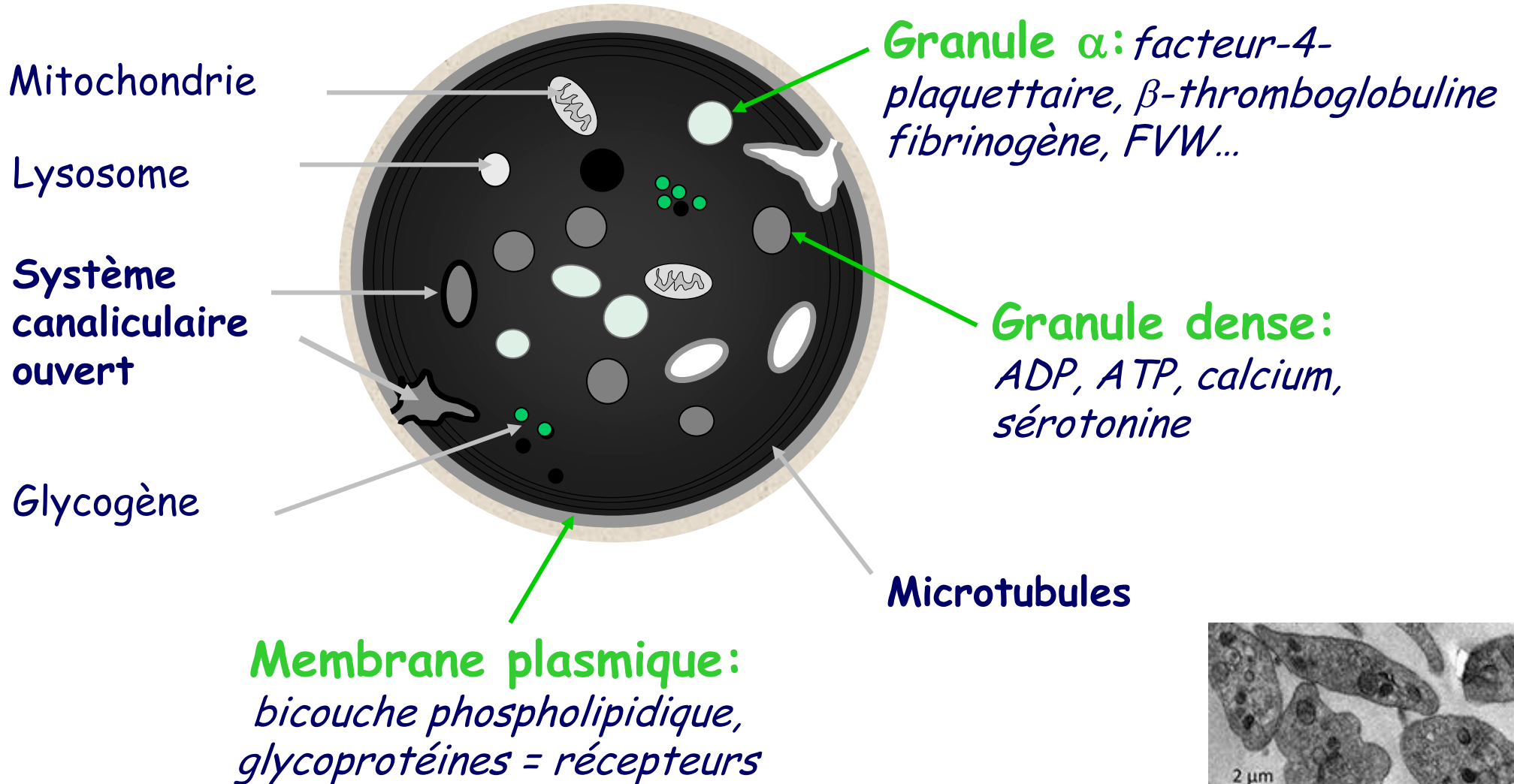


Les plaquettes

- Fabriquées dans la moelle osseuse à partir du mégacaryocyte
- Discoïdes, anucléées, $\approx 4\mu\text{m}$
- Numération normale: 150 à 450 G/l
- Durée de vie: 8 à 10 jours (éliminées dans le foie et la rate)



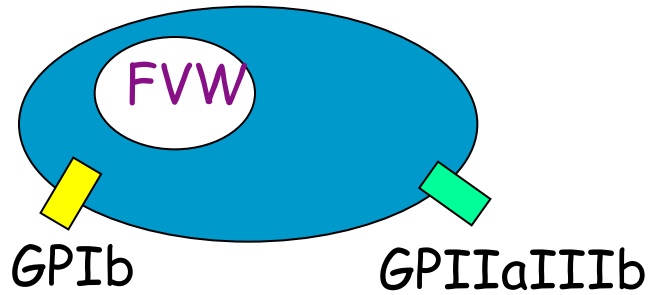
Contenu des plaquettes



Le facteur von Willebrand (FVW)

- Multimère de très haut poids moléculaire
- Synthétisé par la cellule endothéliale et le mégacaryocyte

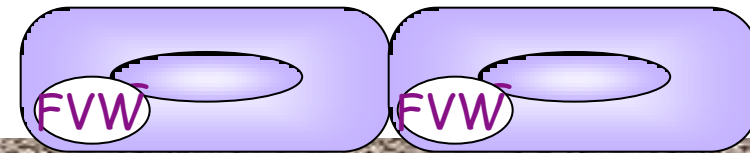
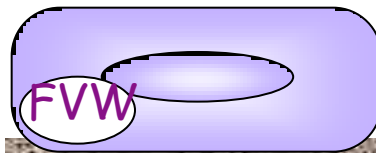
PLAQUETTE
(granules alpha)



PLASMA

FVW -FVIII

ENDOTHELIUM
(granules de Weibel Palade)



SOUS-ENDOTHELIUM

FVW COLLAGENE



Étapes de l'hémostase primaire

- Adhésion
- Activation / Recrutement & amplification
- Agrégation

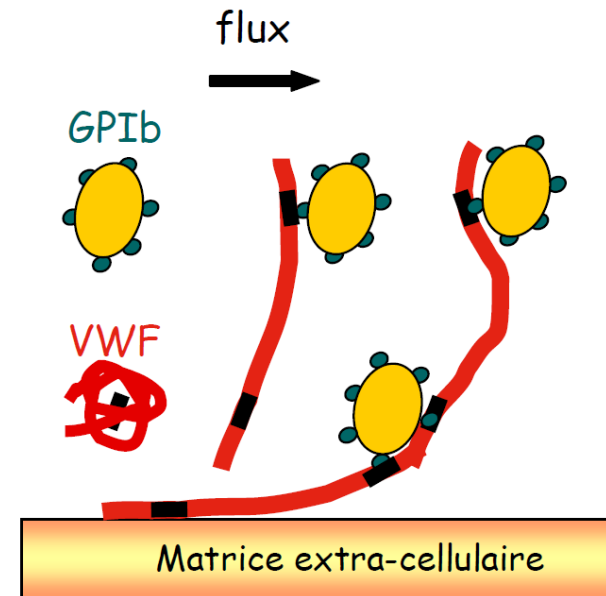
=> agrégat de plaquettes

Adhésion des plaquettes au sous-endothélium

- Liaison **directe** au **collagène** par leurs récepteurs spécifiques: intégrine $\alpha 2\beta 1$, GPVI...

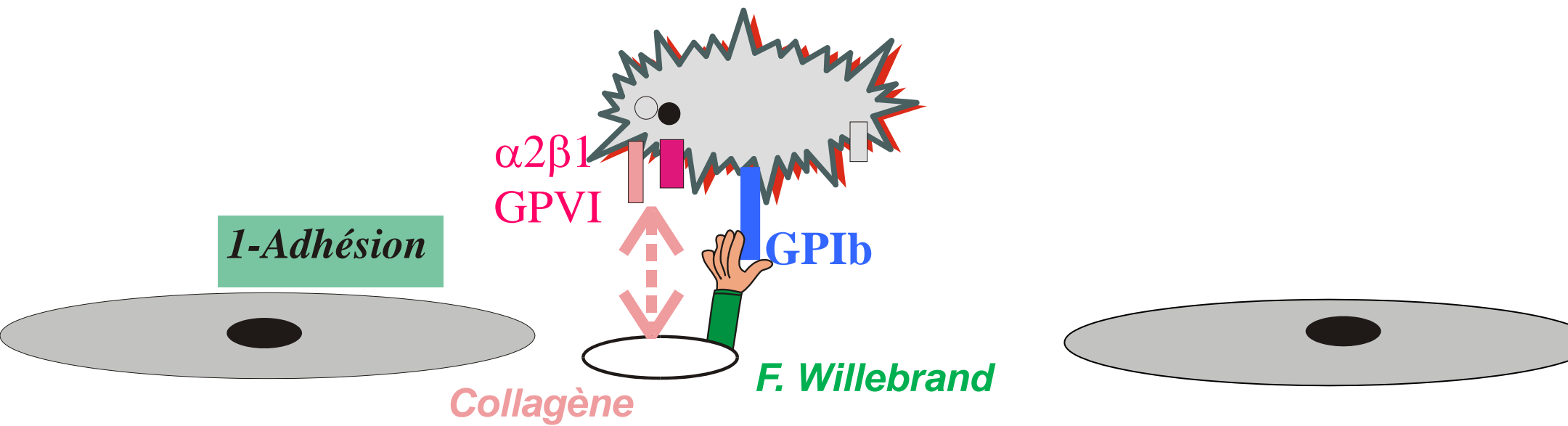
- Liaison **indirecte** au collagène par l'intermédiaire du facteur **von Willebrand** (FVW): la perturbation du flux sanguin au niveau de la lésion entraîne un changement de conformation de FVW qui peut alors se lier à la plaquette via la Glycoprotéine Ib (GPIb)

=> signaux intra-cellulaires

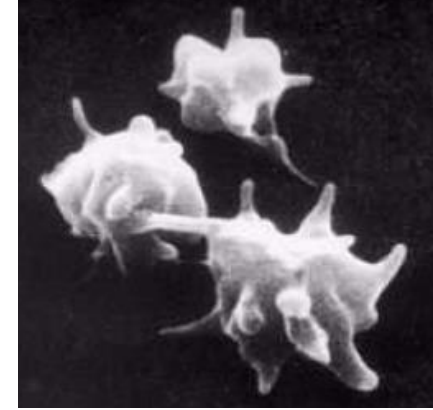


« string » de FVW recouverte de plaquettes





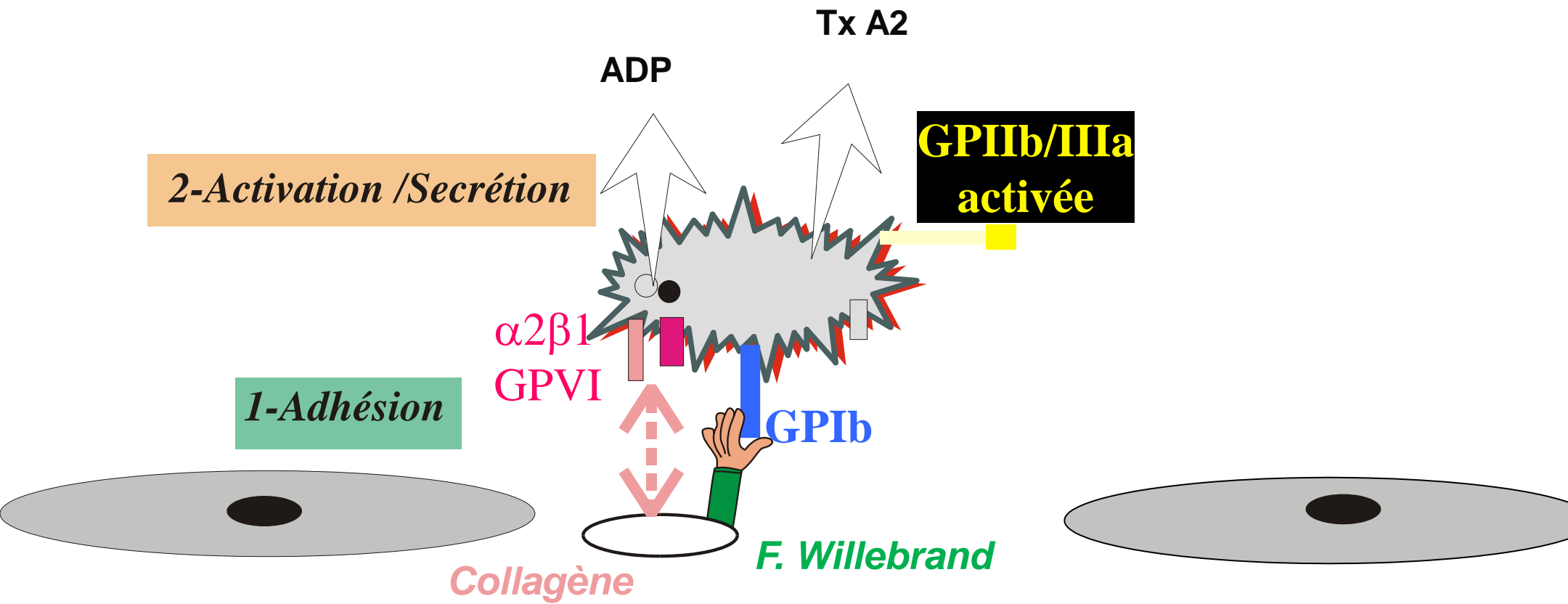
Activation plaquettaire (1)



- Changement de forme (contraction, pseudopodes)
- **Sécrétion**: fusion des **granules** avec système canaliculaire ouvert et libération de leur contenu
 - granules denses: ADP pro-agrégant, sérotonine pro-agrégant et vasoconstrictrice
 - granules α : fibrinogène, facteur V

Activation plaquettaire (2)

- Changement de conformation du récepteur au fibrinogène (**GPIIb/IIIa**) qui devient fonctionnel
- Transformation de l'acide arachidonique issu des phospholipides membranaires en thromboxane A2 pro-agrégant via la cyclo-oxygénase (COX)-1
- « **Flip-flop** » => exposition à la surface externe de la membrane des phospholipides anioniques (ancrage des facteurs de la coagulation)



Métabolisme de l'acide arachidonique

Phospholipides membranaires

Phospholipase C

Phospholipase A2

Acide arachidonique

aspirine



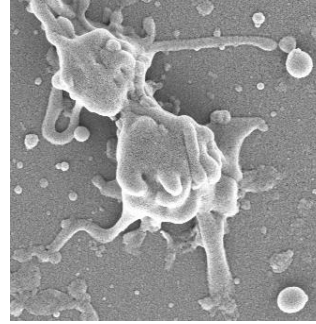
Cyclooxygenase (Cox1)

Prostaglandines

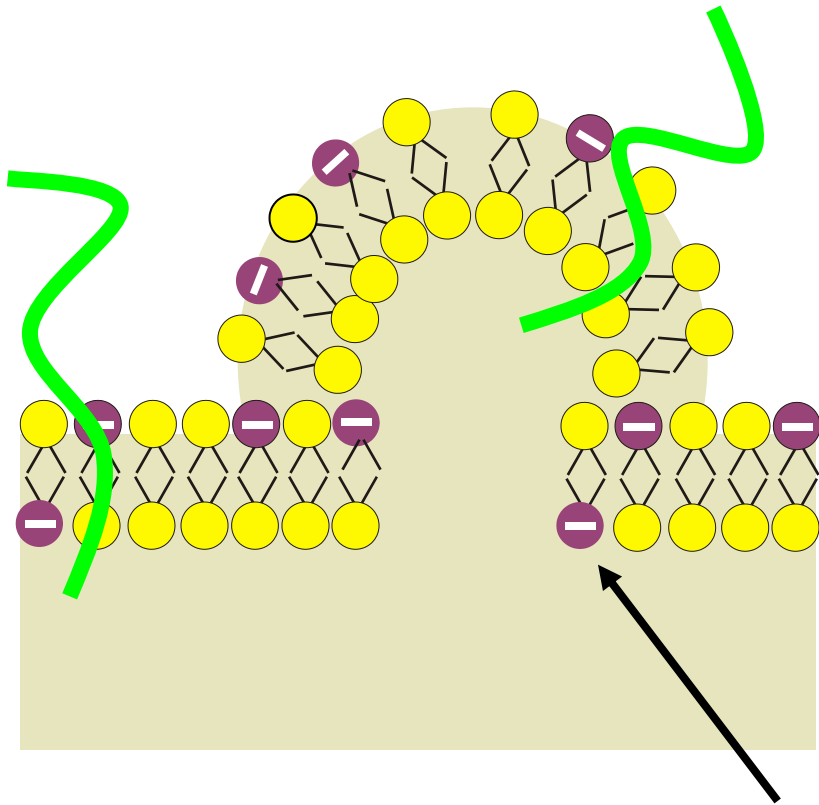
Thromboxane synthase

Thromboxane (TxA2) pro-agrégant plaquettaire

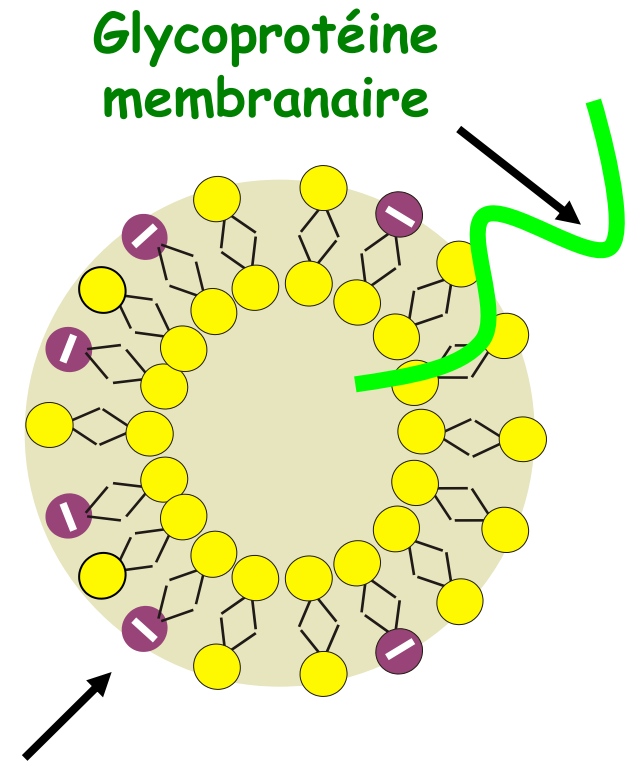
Flip-flop et vésiculisation



1- Formation de « bulles »



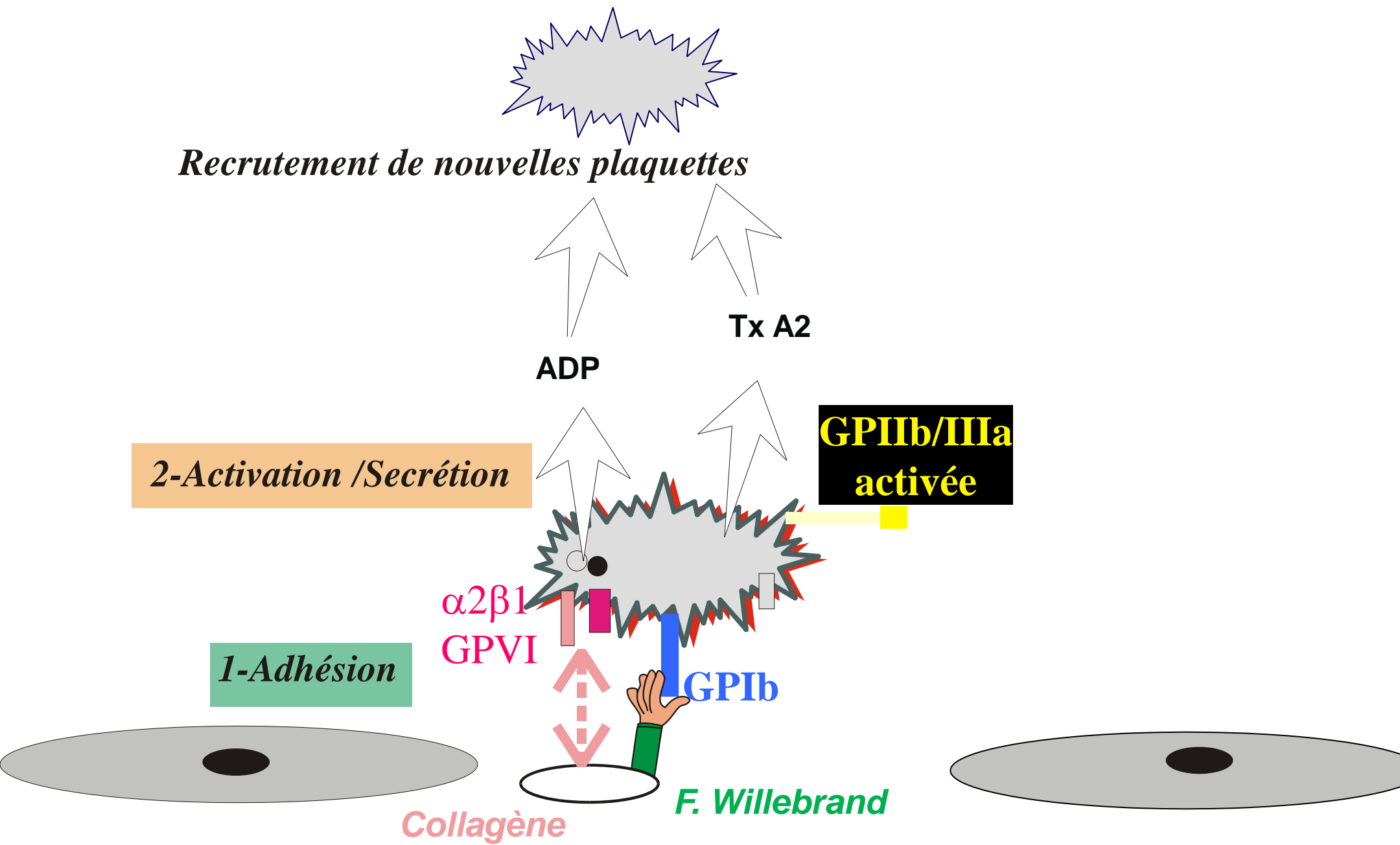
2- Emission de microparticules



Phospholipides anioniques (phosphatidylsérine) externalisés
= Support pour les facteurs de la coagulation

Recrutement et amplification

- Présence à la surface des plaquettes de récepteurs spécifiques à:
 - l'**ADP** et au **TxA2** sécrétés par les plaquettes lors de leur activation
 - la **thrombine** produite au terme de la coagulation
- => recrutement de nouvelles plaquettes et amplification de l'activation
- => accroissement du thrombus plaquettaire



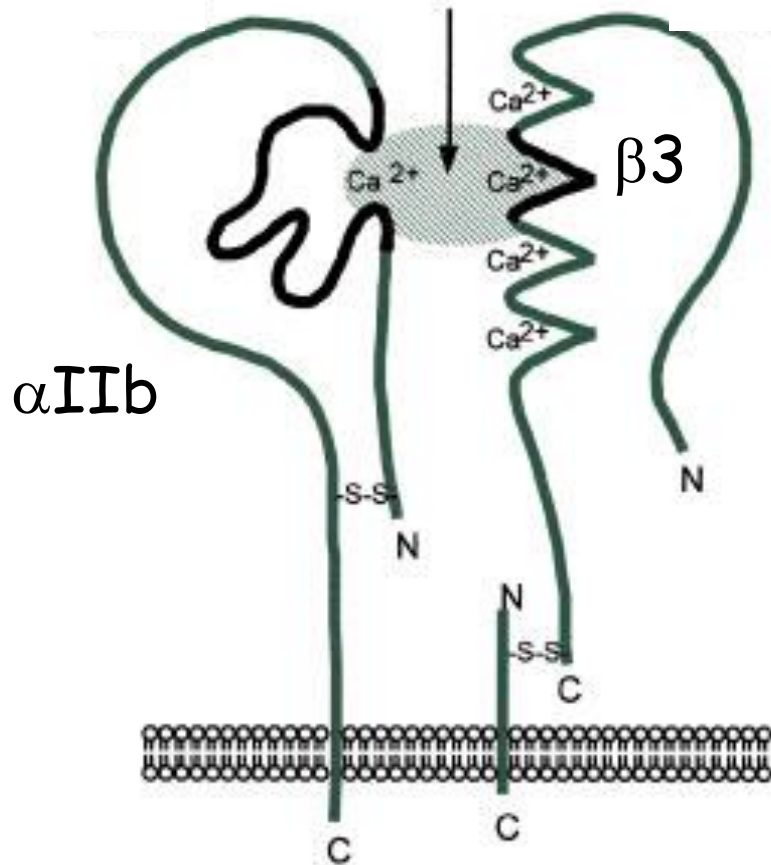
Agrégation plaquettaire

- Le **fibrinogène** se fixe à son récepteur plaquettaire: la **GPIIb/IIIa** dans sa conformation active
- Le fibrinogène est une protéine dimérique, qui possède plusieurs sites de reconnaissance pour la **GPIIb/IIIa** activée

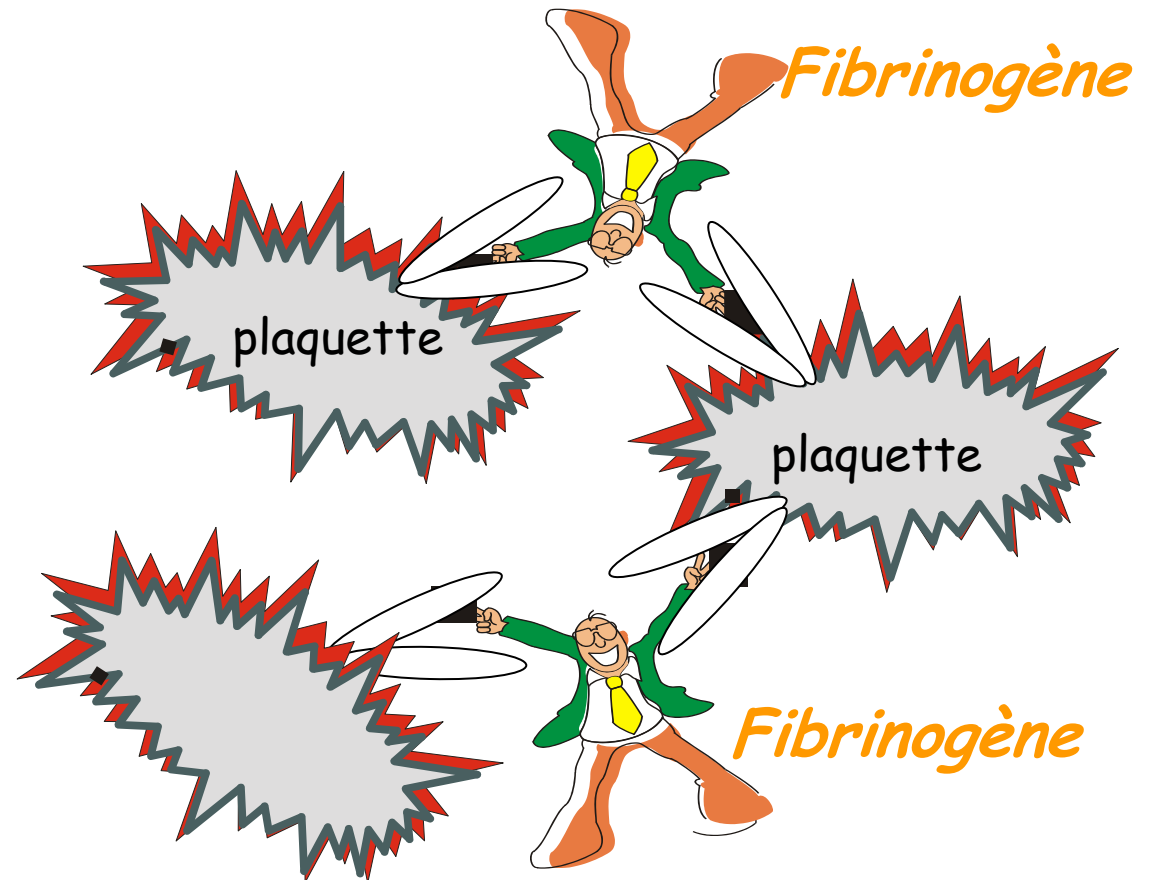
Agrégation plaquettaire

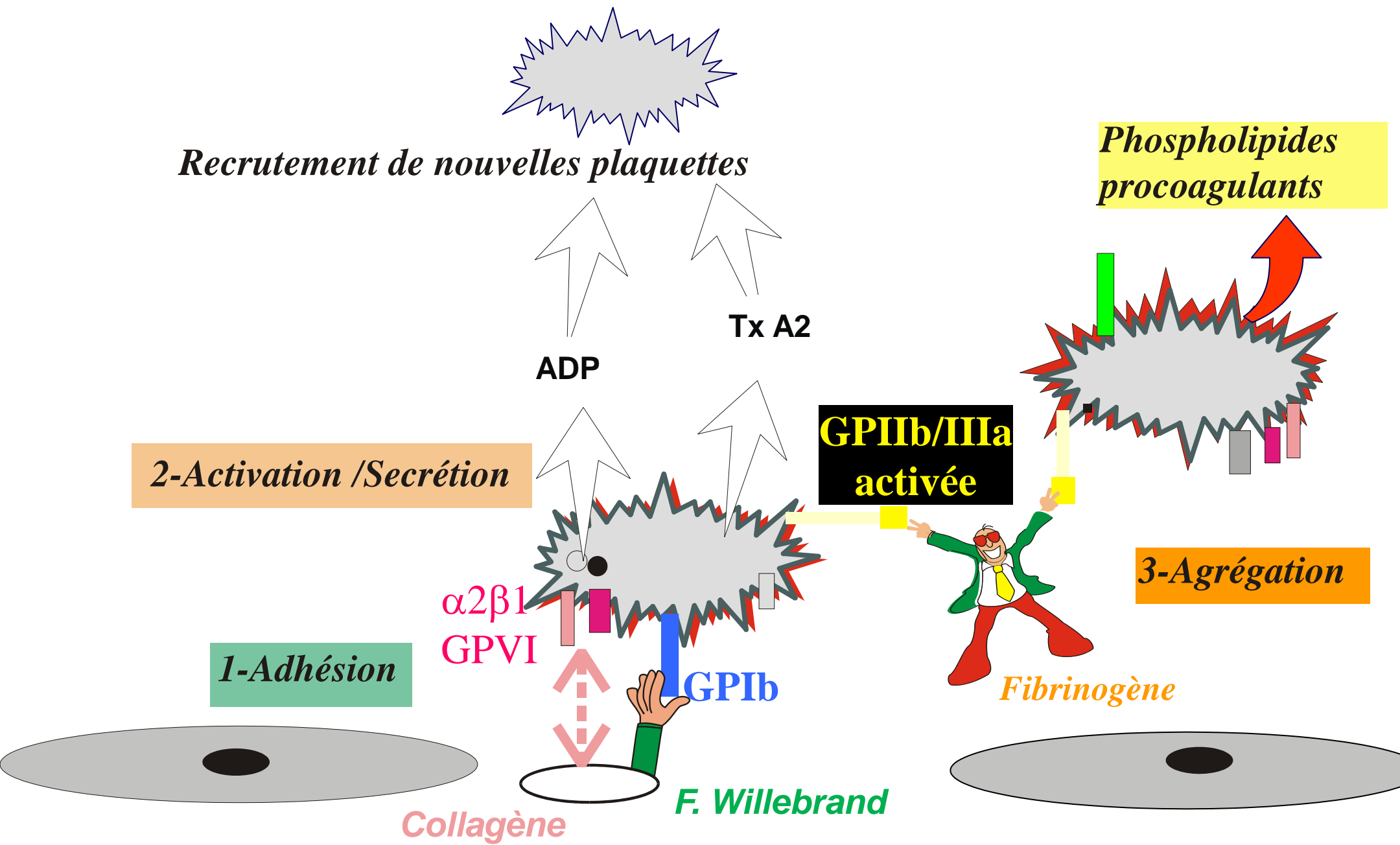
GPIIb/IIIa au repos

Poche de liaison
du fibrinogène



GPIIb/IIIa activée





Recrutement de nouvelles plaquettes

Phospholipides procoagulants

Tx A2

ADP

2-Activation / Secrétion

GPIIb/IIIa activée

3-Agrégation

1-Adhésion

$\alpha_2\beta_1$
GPVI

GPIb

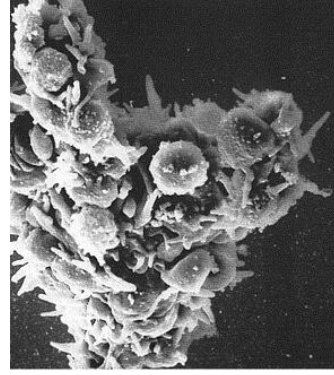


Fibrinogène

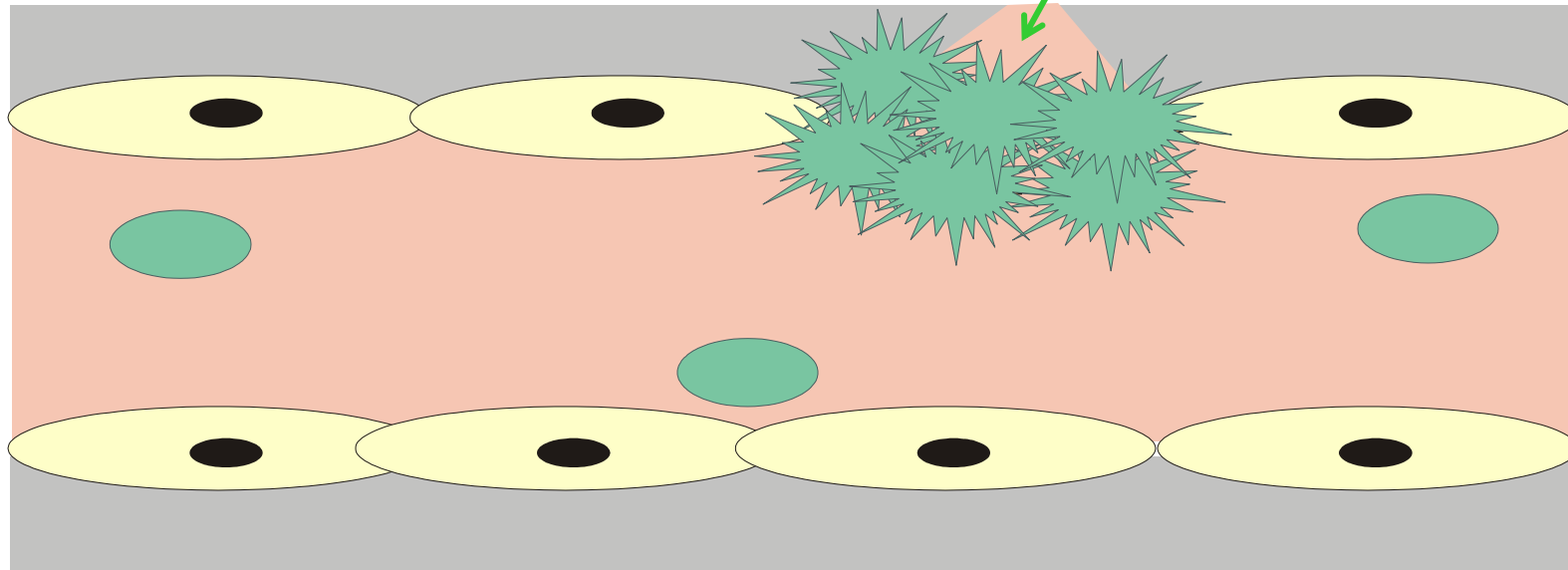
Collagène

F. Willebrand

A la fin de l'hémostase primaire



Agrégat plaquettaire
(thrombus blanc)



A retenir: l'hémostase primaire

- Aboutit à un **agrégat plaquettaire**
- 3 étapes:
 - **Adhésion**: liaison au collagène directe ou via le facteur von Willebrand
 - **Activation**: sécrétion du contenu des granules (ADP, fibrinogène) et production de métabolites (TxA2) => recrutement et amplification
 - **Agrégation**: liaison de la GPIIbIIIa activée au fibrinogène
- **Flip-flop** des phospholipides membranaires indispensable pour fixer des protéines de la coagulation

Coagulation plasmatique

- Succession de réactions enzymatiques
- Aboutit à la formation d'un **réseau de fibrine** « ciment » de l'agrégat de plaquettes

Coagulation plasmatique

- Principaux protagonistes
 - Protéine membranaire: **facteur tissulaire**
 - **Facteurs de la coagulation**
 - fibrinogène,
 - pro-enzymes (zymogènes),
 - co-facteurs
 - **Inhibiteurs de la coagulation**

Le facteur tissulaire (FT)

- Protéine membranaire
- **Initiateur** de la coagulation
- Exprimé constitutivement par les fibroblastes, cellules épithéliales
- Exprimé par les cellules endothéliales, leucocytes activés
- **Normalement, le FT n'est pas au contact du sang**

Facteurs de la coagulation

- Protéines plasmatiques
- Souvent désignés par des chiffres romains
Ex : facteur II = prothrombine
- Une fois activés, ils portent leur nom suivi du suffixe "a"
Ex: facteur IIa = thrombine
- Présents dans le plasma (pas dans le sérum!)

Facteurs de la coagulation

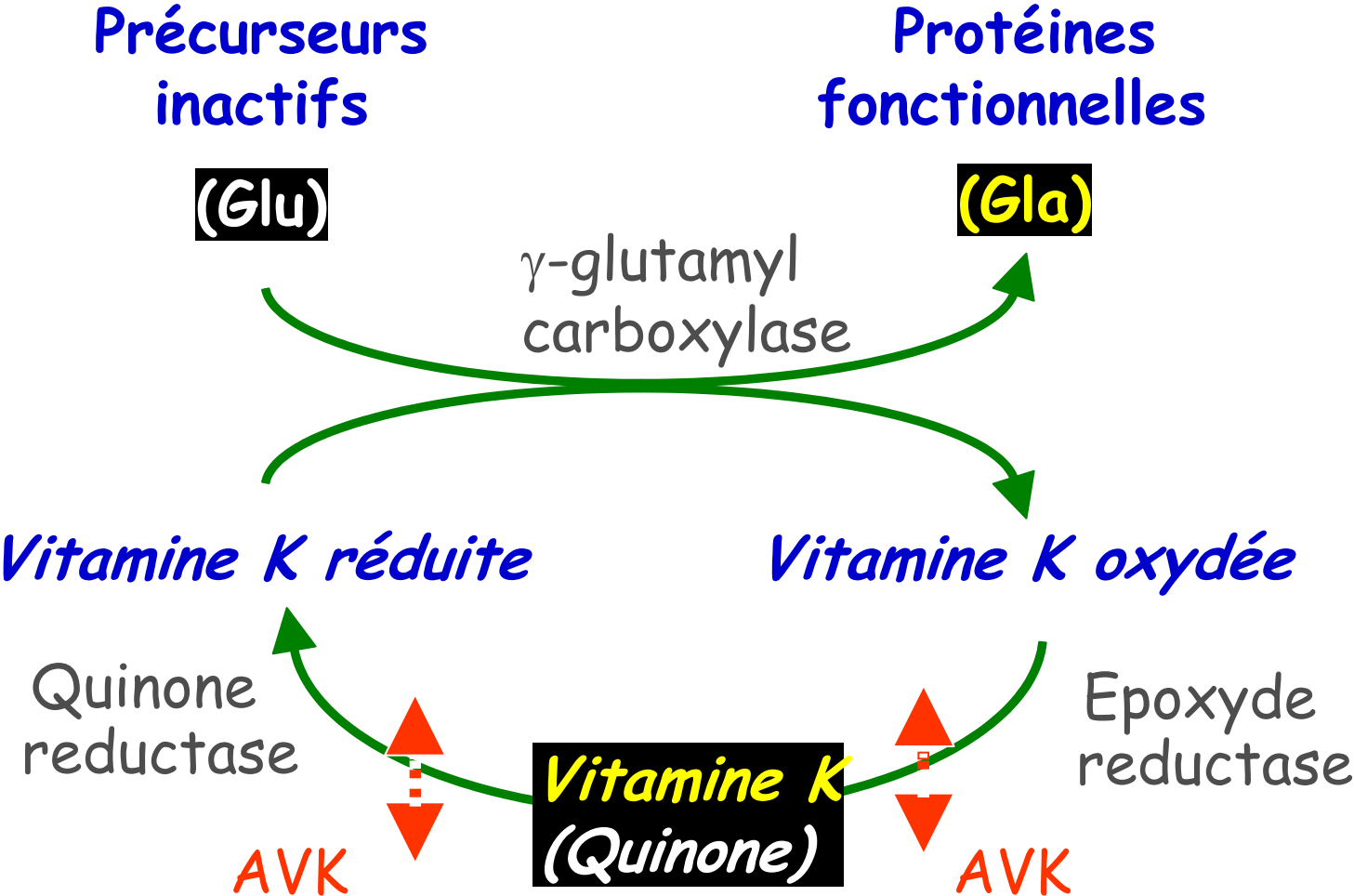
Propriétés		Nom	Lieu de synthèse
Substrat		Fibrinogène	Foie
Zymogènes	Sérine protéases Facteurs vitamine K dépendants	II (thrombine), VII, IX, X	Foie
	Sérine protéases Facteurs contacts	XI, XII, prékallikréine	Foie
	Transglutaminase: liaisons covalentes amines-glutamines	XIII	Foie, MK
Co-facteurs		V	Foie
		VIII (lié au VWF)	Endothélium

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

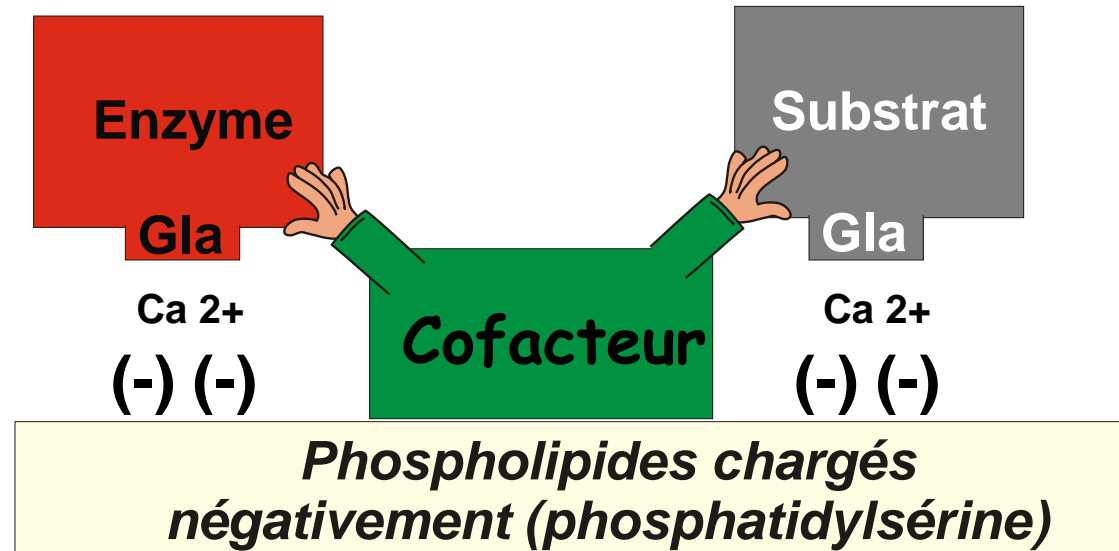
Protéines vitamine K-dépendantes

- Facteurs de coagulation: **FII, VII, IX, X**
 - Inhibiteurs: **protéines C et S**
 - Modification post-traductionnelle dans l'hépatocyte
 - Carboxylation des acides glutamiques (Glu) en acides γ -carboxyglutamiques (Gla)
 - Co-facteur = vitamine K réduite (réductase cible des traitements **AVK**)
- => liaison calcium-dépendante aux phospholipides**

Protéines vitamine K-dépendantes



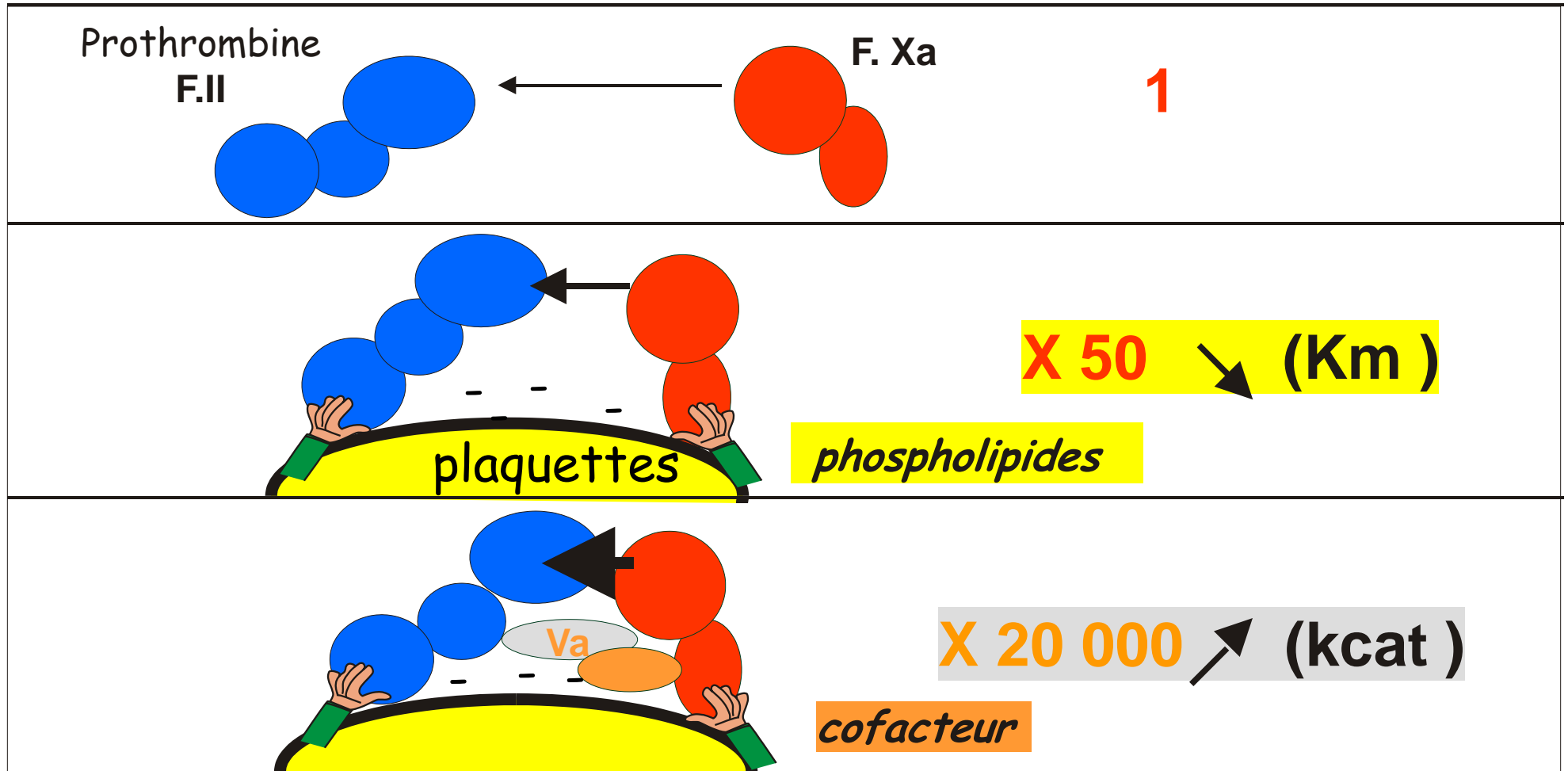
Liaison aux phospholipides membranaires



- => Concentration de l'enzyme et de son substrat sur une surface membranaire solide (plaquettes activées)
- => Augmentation de l'efficacité catalytique

Phospholipides, cofacteurs et efficacité des réactions de la coagulation

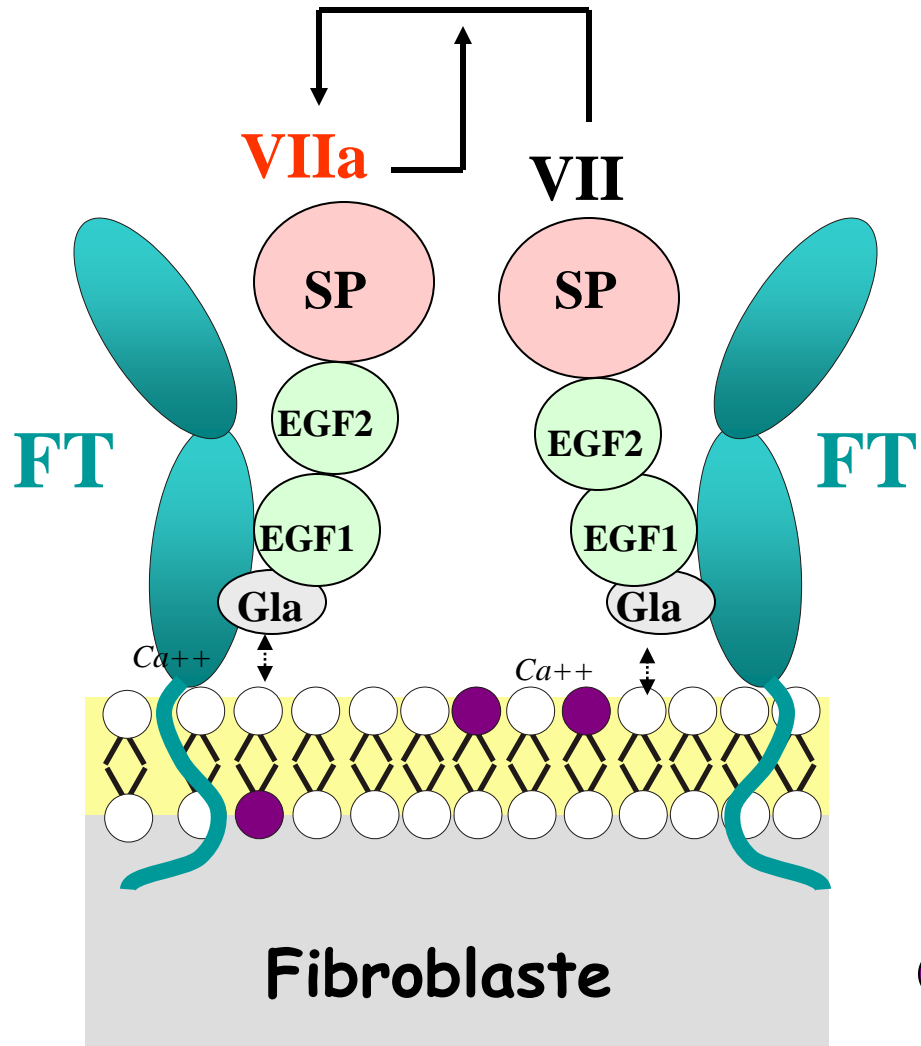
Efficacité catalytique



Coagulation plasmatique

- Initiation par le facteur tissulaire (FT) = **voie exogène**
- => 1ères traces de thrombine (FIIa)
- Boucle d'amplification
- Système contact = **voie endogène**

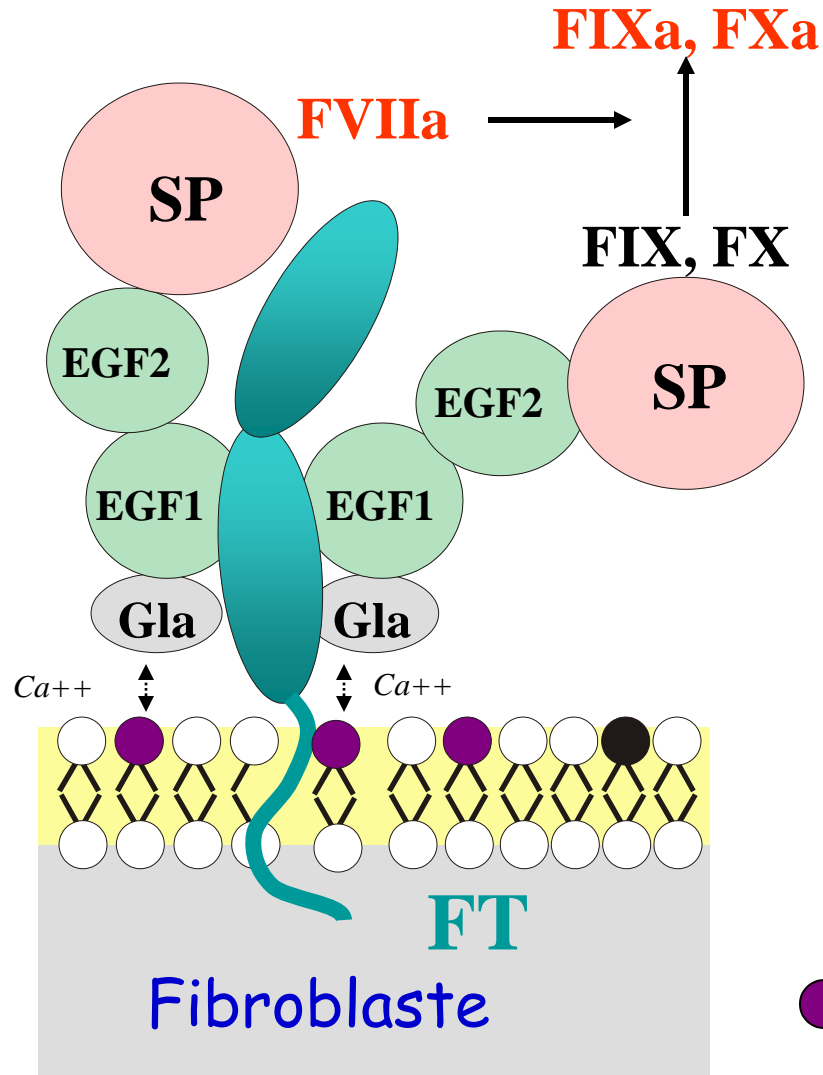
Initiation de la coagulation plasmatique



- Déclenchée par le FT
- Dans le sang: FVII + traces de FVIIa (inactif en absence de FT)
- FT co-facteur de l'activation du FVII par le VIIa

● *Phosphatidylsérine (PS)*

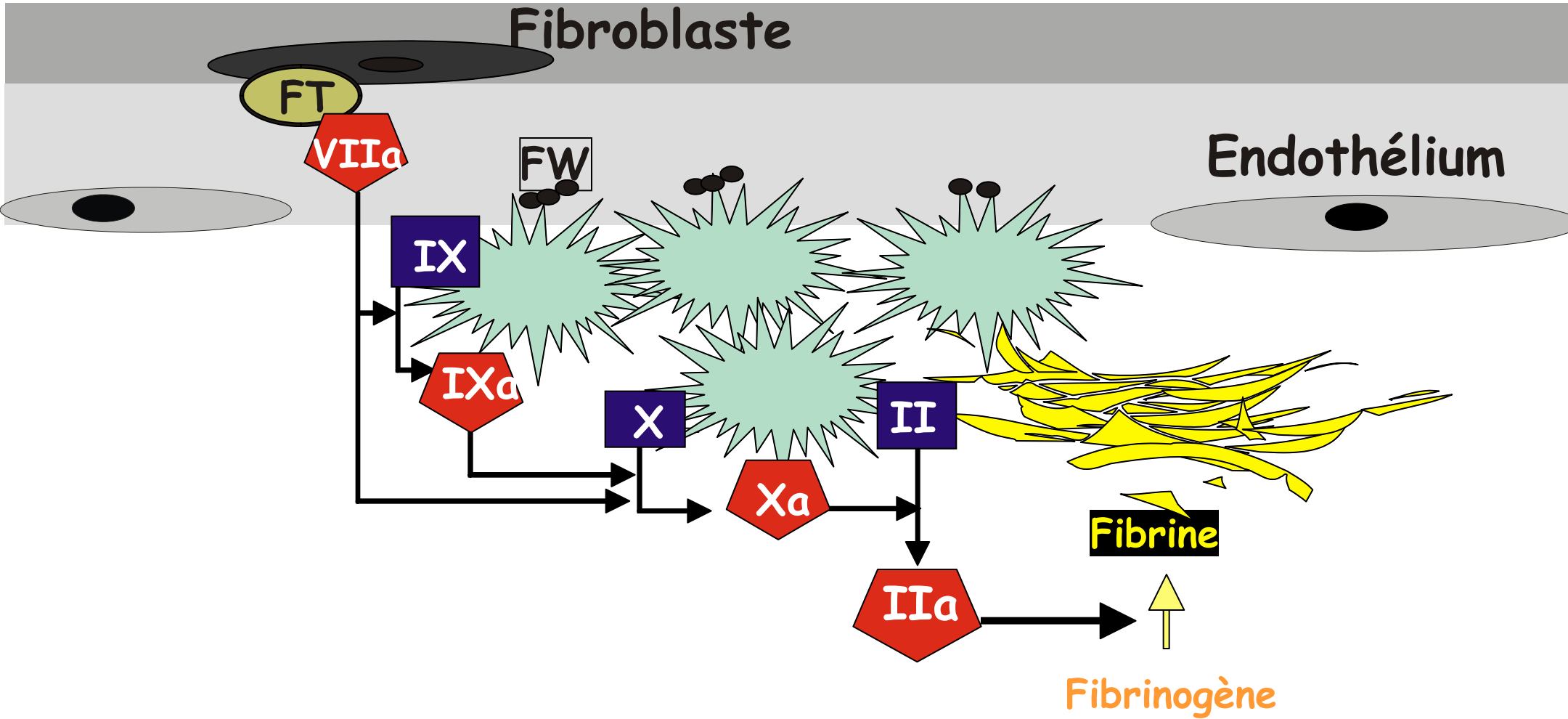
Initiation de la coagulation plasmatique



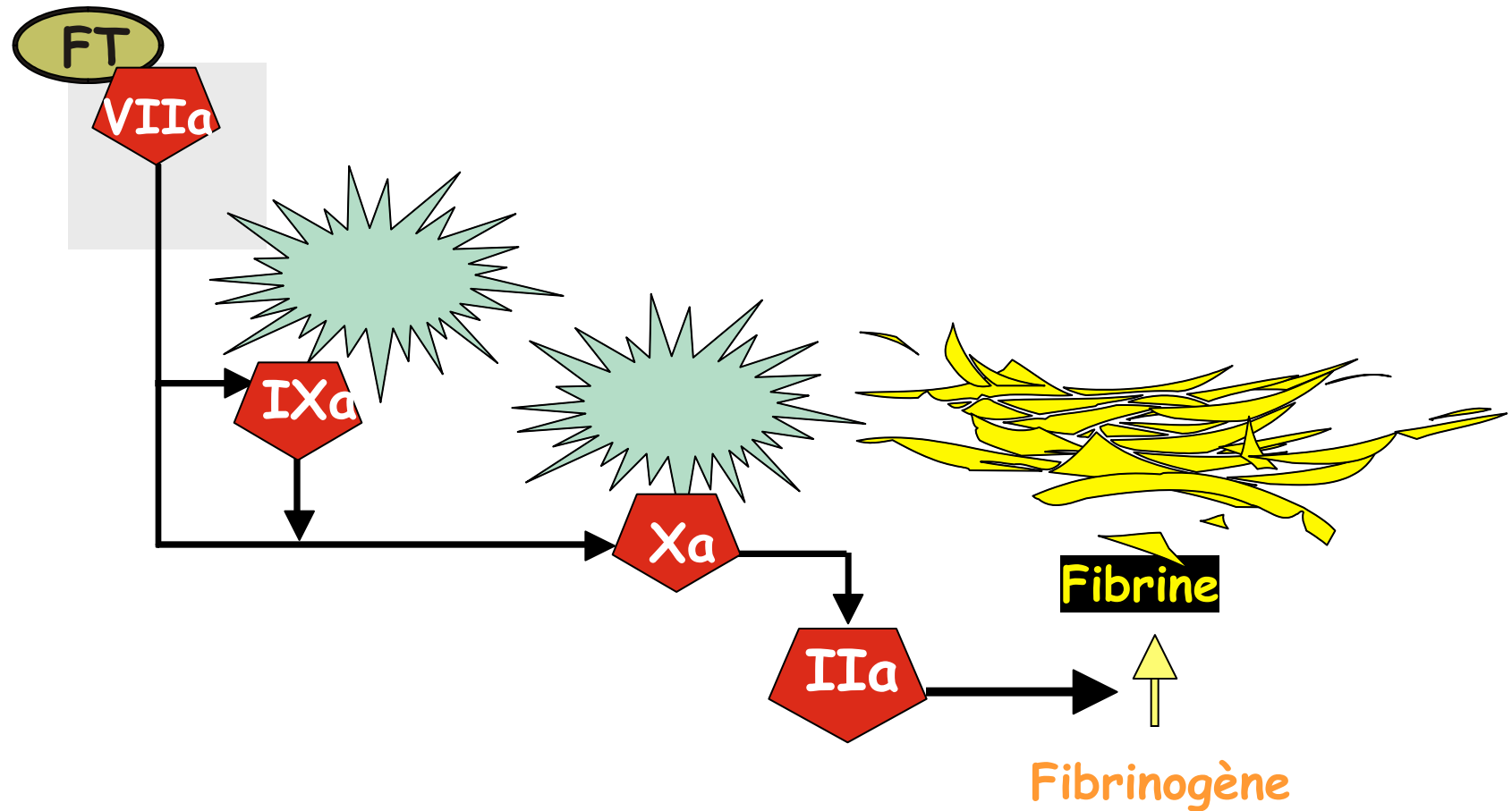
- Le complexe FT/VIIa active les facteurs IX et X
- Le facteur Xa active la prothrombine (F.II) et produit les lères traces de thrombine (F.IIa)
- Liaison Ca^{++} et Gla dépendante entre VIIa, IX, X, II et phospholipides anioniques indispensable

● *Phosphatidylsérine (PS)*

Initiation de la coagulation plasmatique



Initiation de la coagulation en simplifié...



A retenir: initiation de la coagulation

- La coagulation est initiée lorsque le **facteur tissulaire** (membranaire) vient au contact du sang (blessure vasculaire)
- Le FT interagit avec le VII/VIIa
 - auto-activation du VII
 - activation du IX et du X
- Pathologie: l'expression du FT peut être induite par les médiateurs de l'inflammation dans des cellules circulantes (monocytes) ou vasculaires (cellules endothéliales)

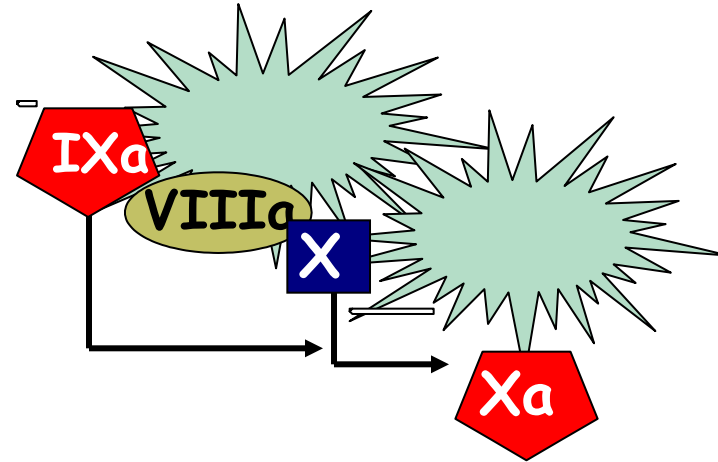
Amplification de la coagulation

- Les très traces de thrombine:
 - activent les co-facteurs (FV et FVIII)
 - => formation des complexes tenase et prothrombinase
 - recrutent et activent de nouvelles plaquettes
 - activent le FXI

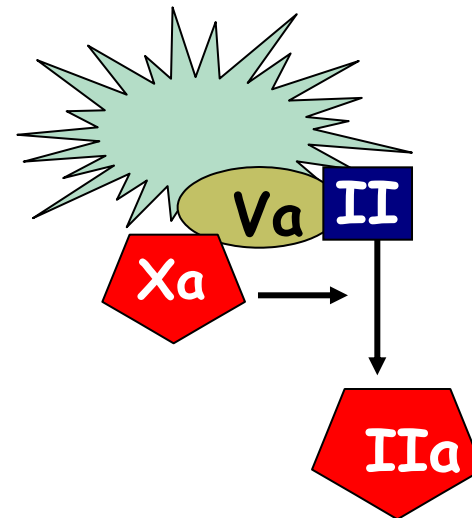
La thrombine amplifie sa propre formation

Amplification de la coagulation plasmatique

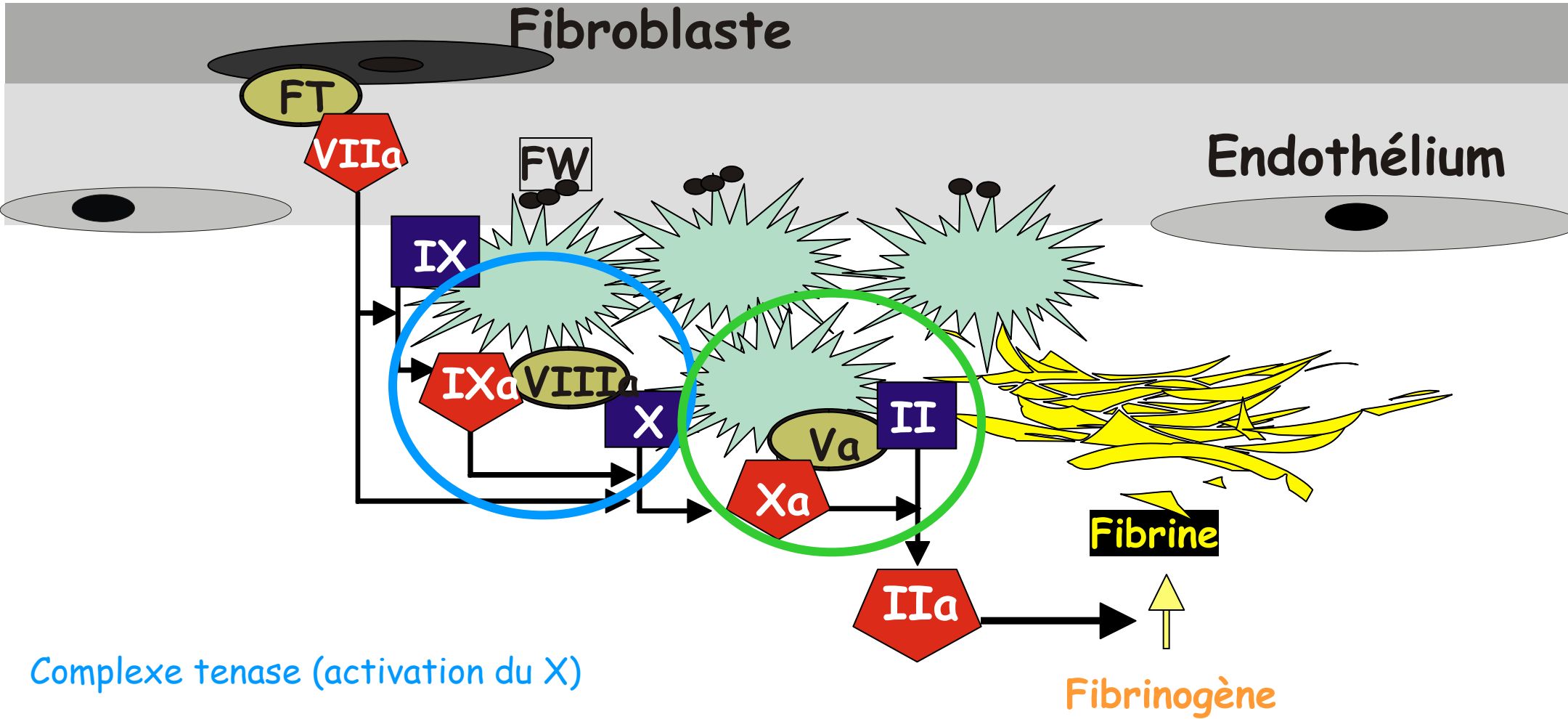
Complexe tenase



Complexe prothrombinase



Amplification de la coagulation plasmatique



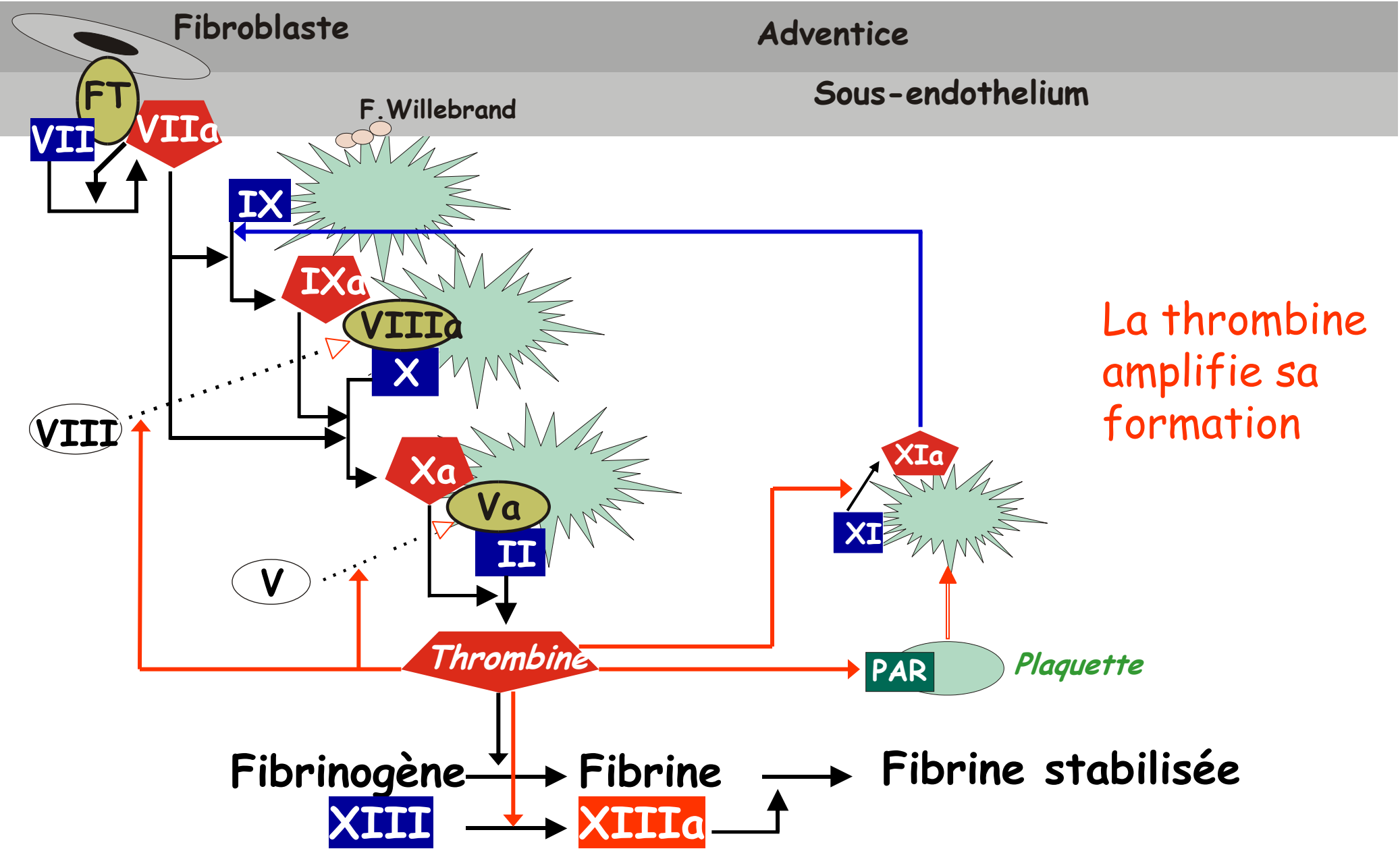
Complex tenase (activation du X)

Complex prothrombinase (activation du II)

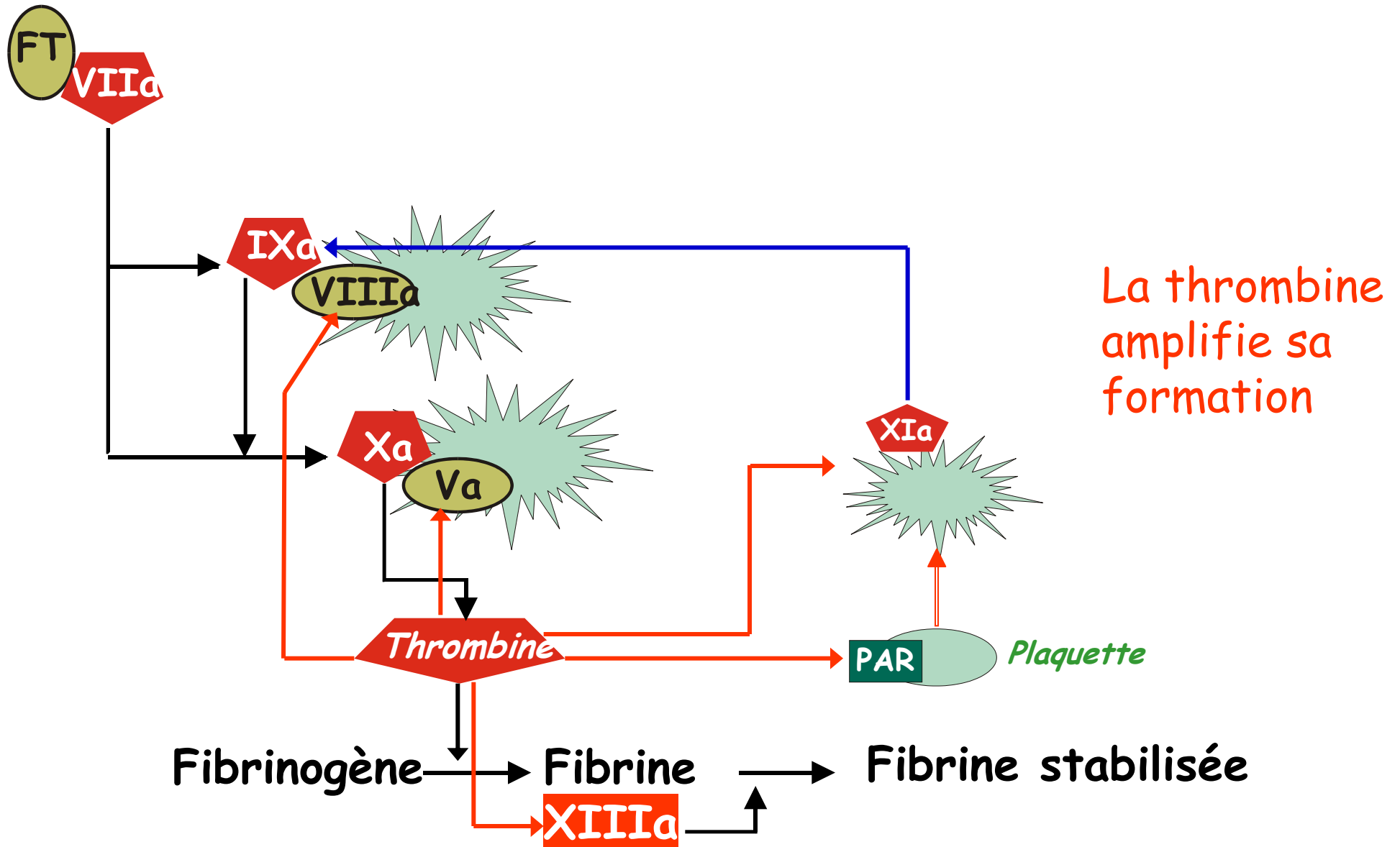
Fibrinogène

Fibrine

Amplification de la coagulation plasmatique



Amplification de la coagulation en simplifié...



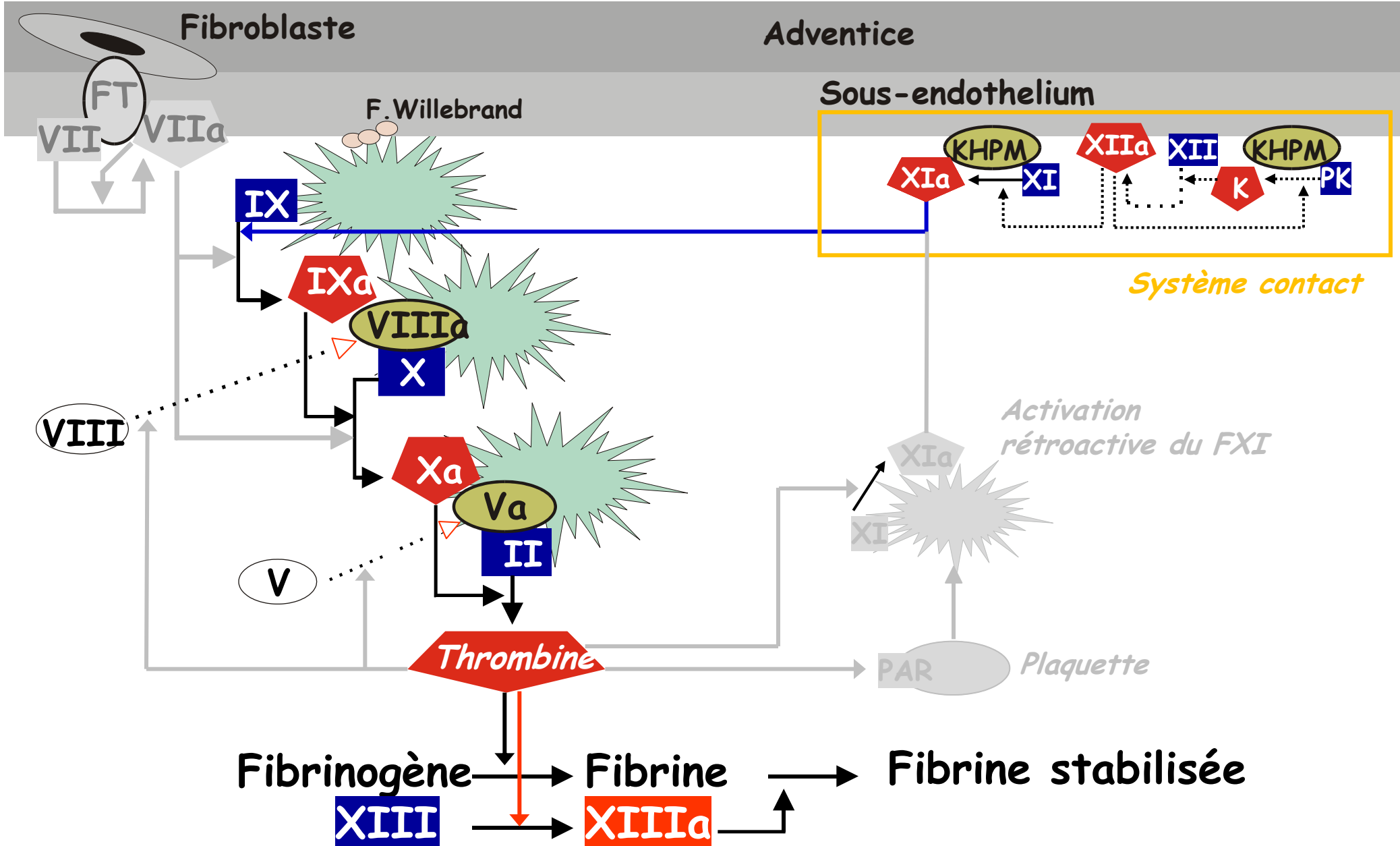
Les multiples fonctions de la thrombine

- **Auto-amplification** de sa production par activation des co-facteurs (FV, FVIII) et du FXI
- Conversion du fibrinogène en fibrine
- Activation cellulaire (plaquettes)
- Rôle dans la **régulation** de la coagulation (activation de la protéine C par le complexe thrombine -thrombomoduline)

Le système contact

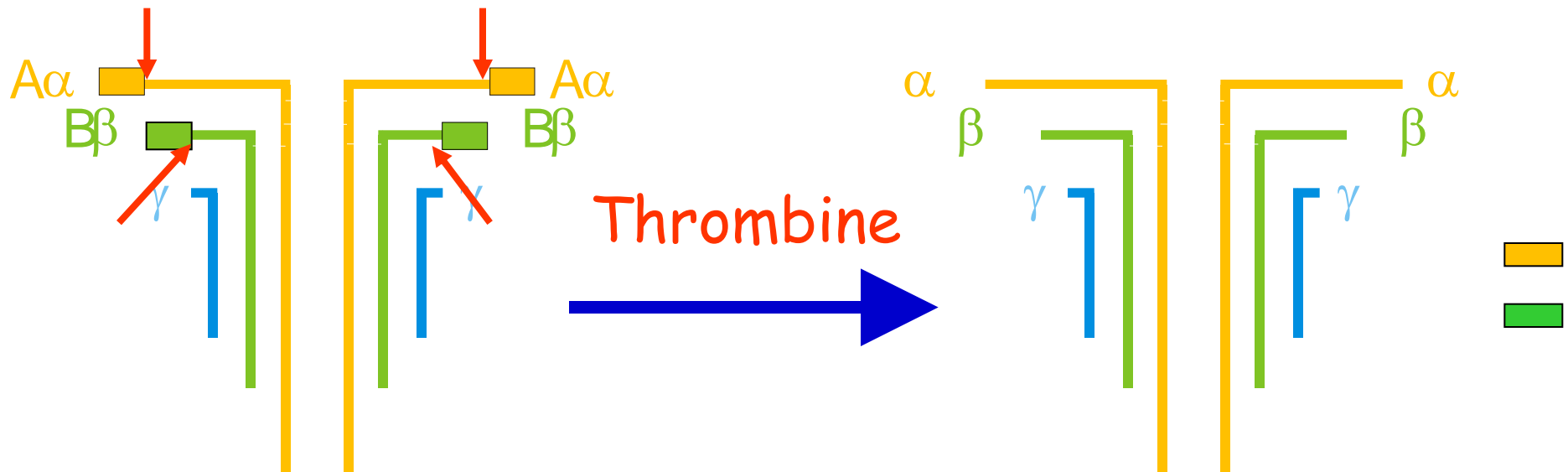
- Rôle mineur comparé à la voie du facteur tissulaire (en physiologie)
- Résulte du contact du sous-endothélium avec 4 protéines plasmatiques en cas de lésion:
 - Zymogènes: prékallikréine (PK), FXII et FXI
 - Cofacteur: kininogène de haut poids moléculaire (KHPM)

Le système contact



Fibrinoformation = Conversion du fibrinogène soluble en fibrine insoluble

1. Protéolyse du fibrinogène par la thrombine



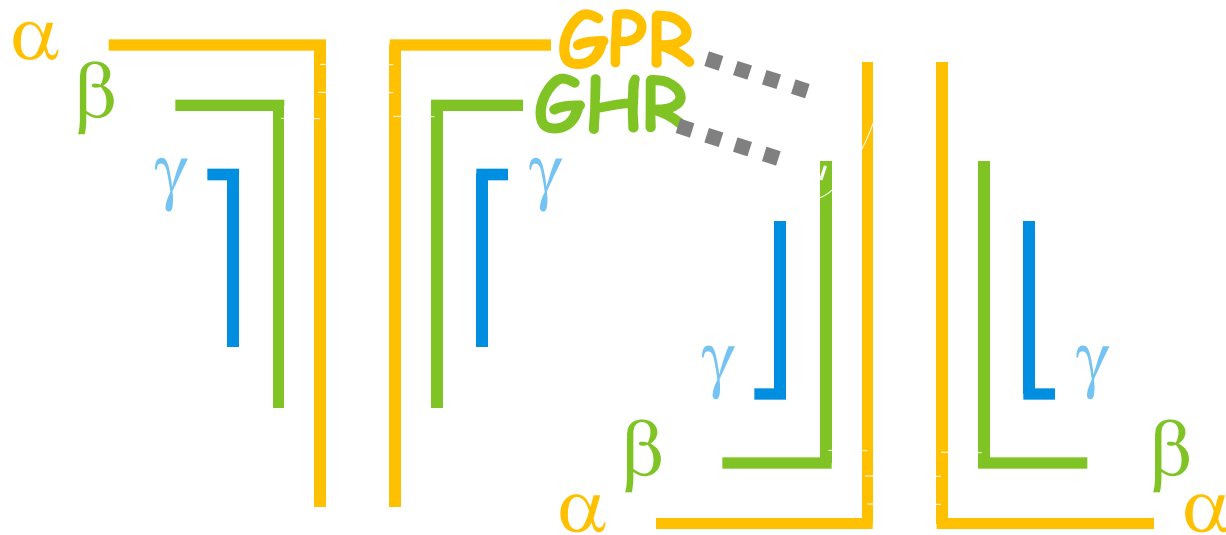
Fibrinogène soluble
6 chaînes polypeptidiques

Monomère de
fibrine soluble

+ fibrinopeptides A et B

Fibrinoformation

2. Polymérisation des monomères de fibrine

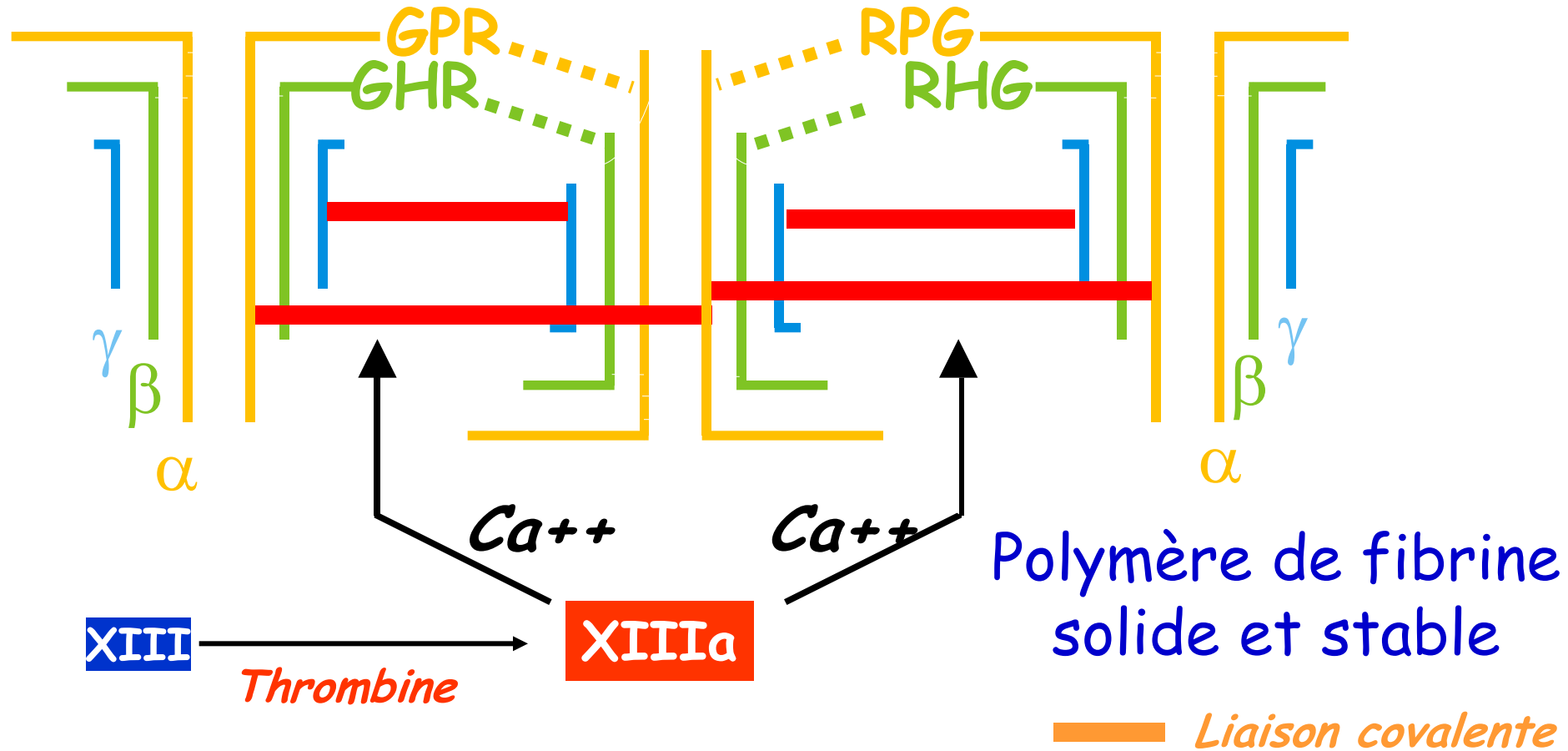


Polymère de
fibrine solide
mais instable

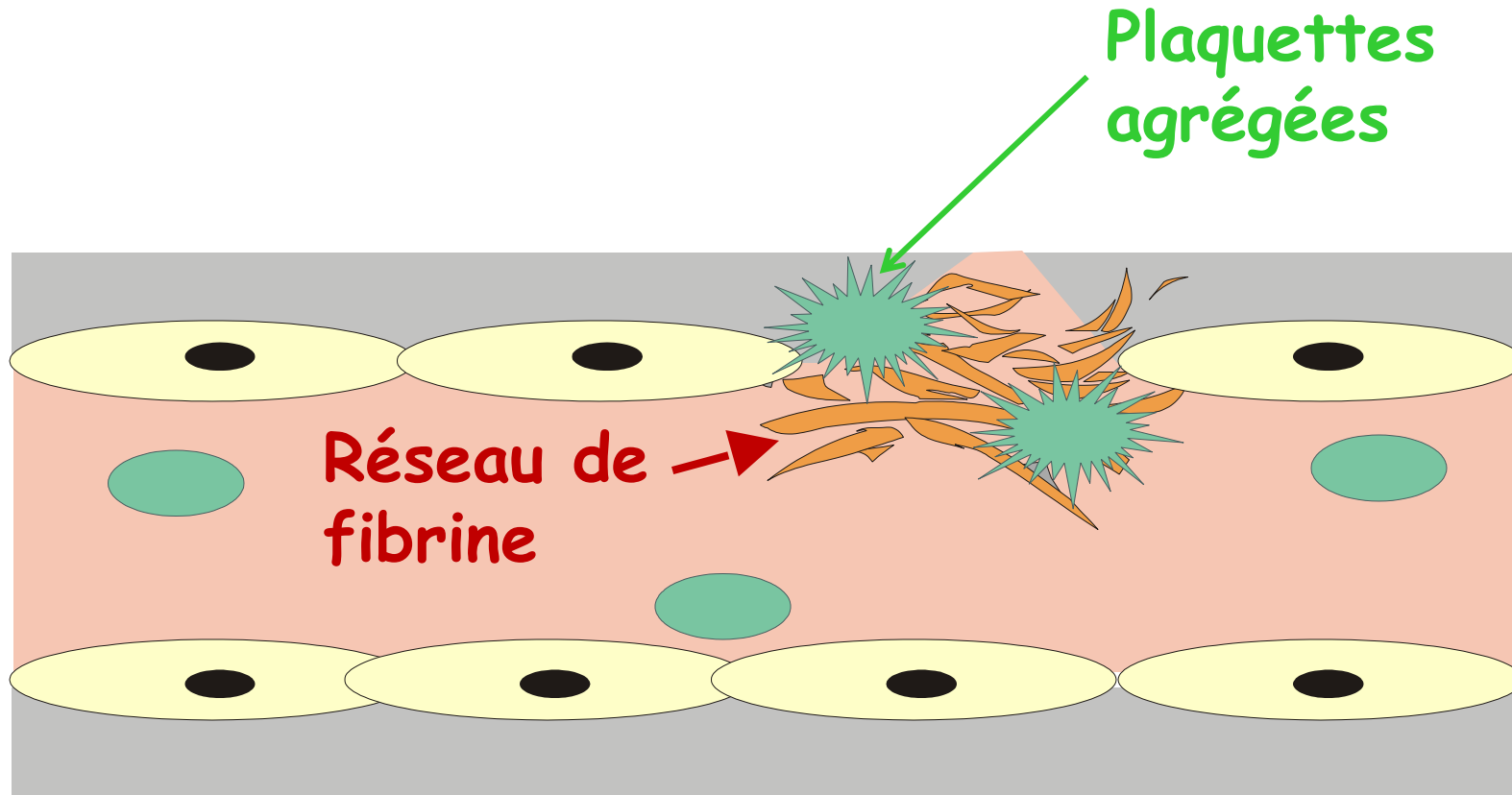
..... *Liaison hydrogène*

Fibrinoformation

3. Stabilisation de la fibrine



A la fin de l'hémostase primaire et de la coagulation



A retenir : la coagulation

- Succession de réactions enzymatiques à la **surface des plaquettes activées** (liaison **Ca⁺⁺** dépendante des facteurs de la coagulation aux **phospholipides anioniques**)
- Aboutit à la formation d'un réseau de **fibrine**
- **Voie exogène** déclenchée par le FT
- Amplification par les très traces de **thrombine**
- **Voie endogène** (système contact)

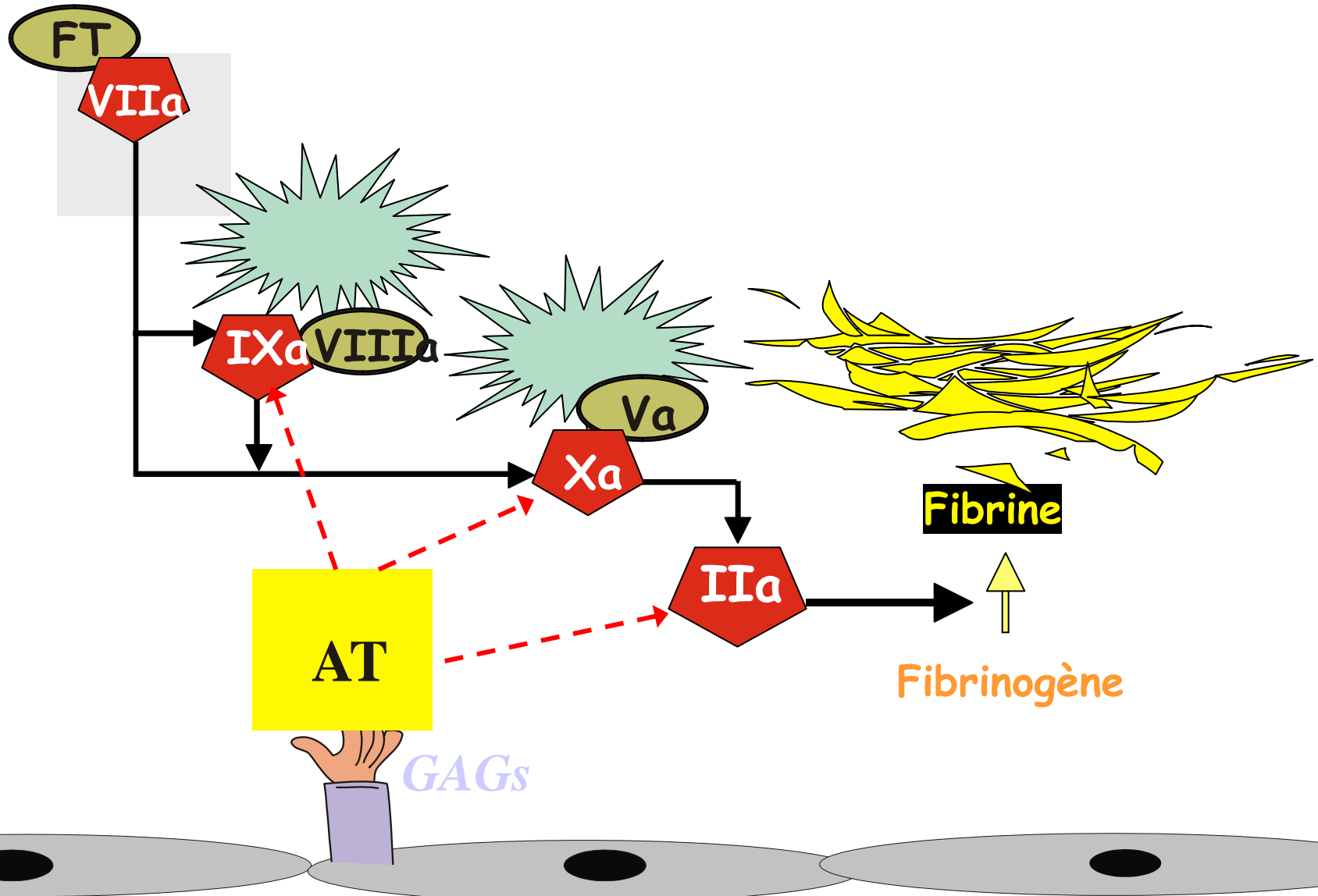
Régulation: les inhibiteurs plasmatiques de la coagulation

- Protéines plasmatiques
 - Serpine: **antithrombine (AT)**
 - Zymogène: **protéines C** (vitamine K-dépendante)
 - Cofacteur: **protéine S** (vitamine K-dépendante)
- Exprimés à la surface des cellules endothéliales
 - **Thrombomoduline (TM)**
 - **Endothelial Protein C Receptor (EPCR)**
 - **Tissue factor pathway inhibitor (TFPI)**

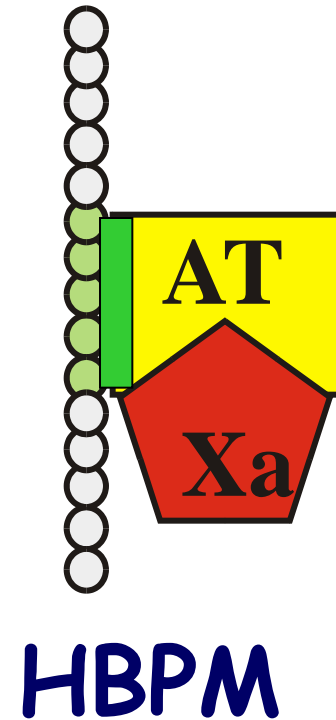
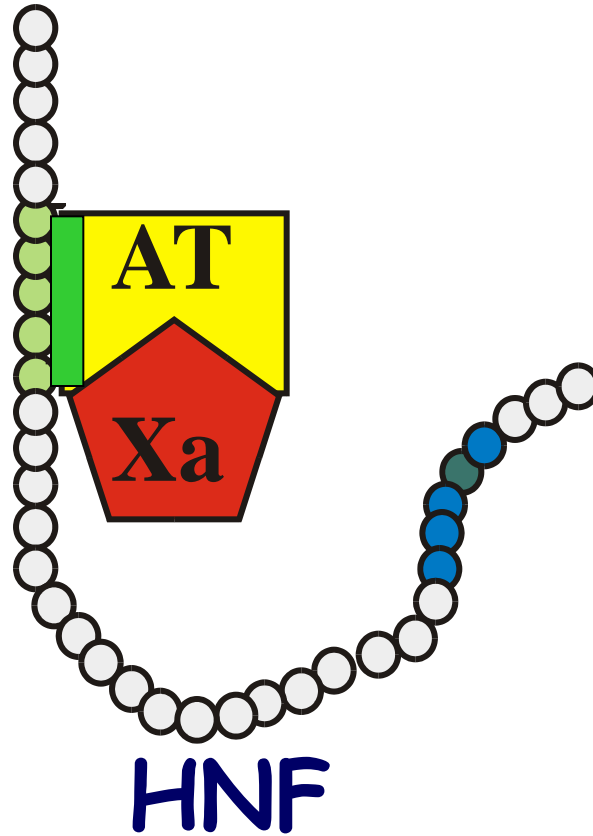
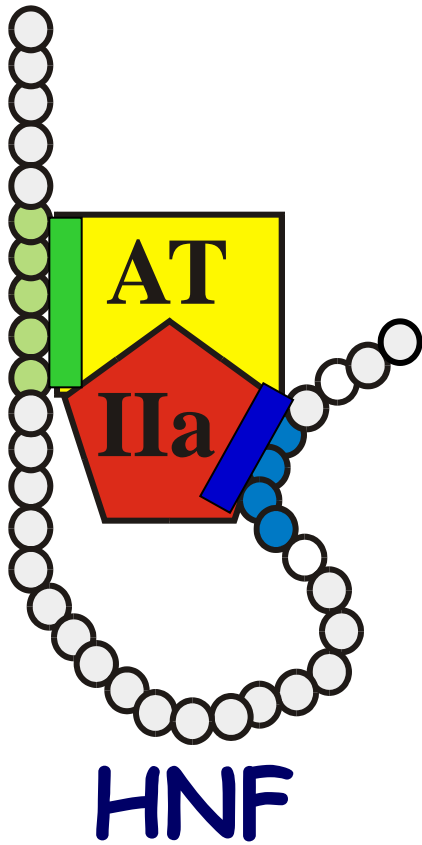
L'antithrombine

- Synthétisée par le foie
- Activité **serpine** (inhibiteur de sérine protéases)
- Inhibe de manière irréversible la thrombine (IIa), les facteurs IXa, Xa et XIa qui s'échappent du caillot
- Action accélérée par l'**héparine** ou par les glycosaminoglycanes de la paroi vasculaire

L'antithrombine



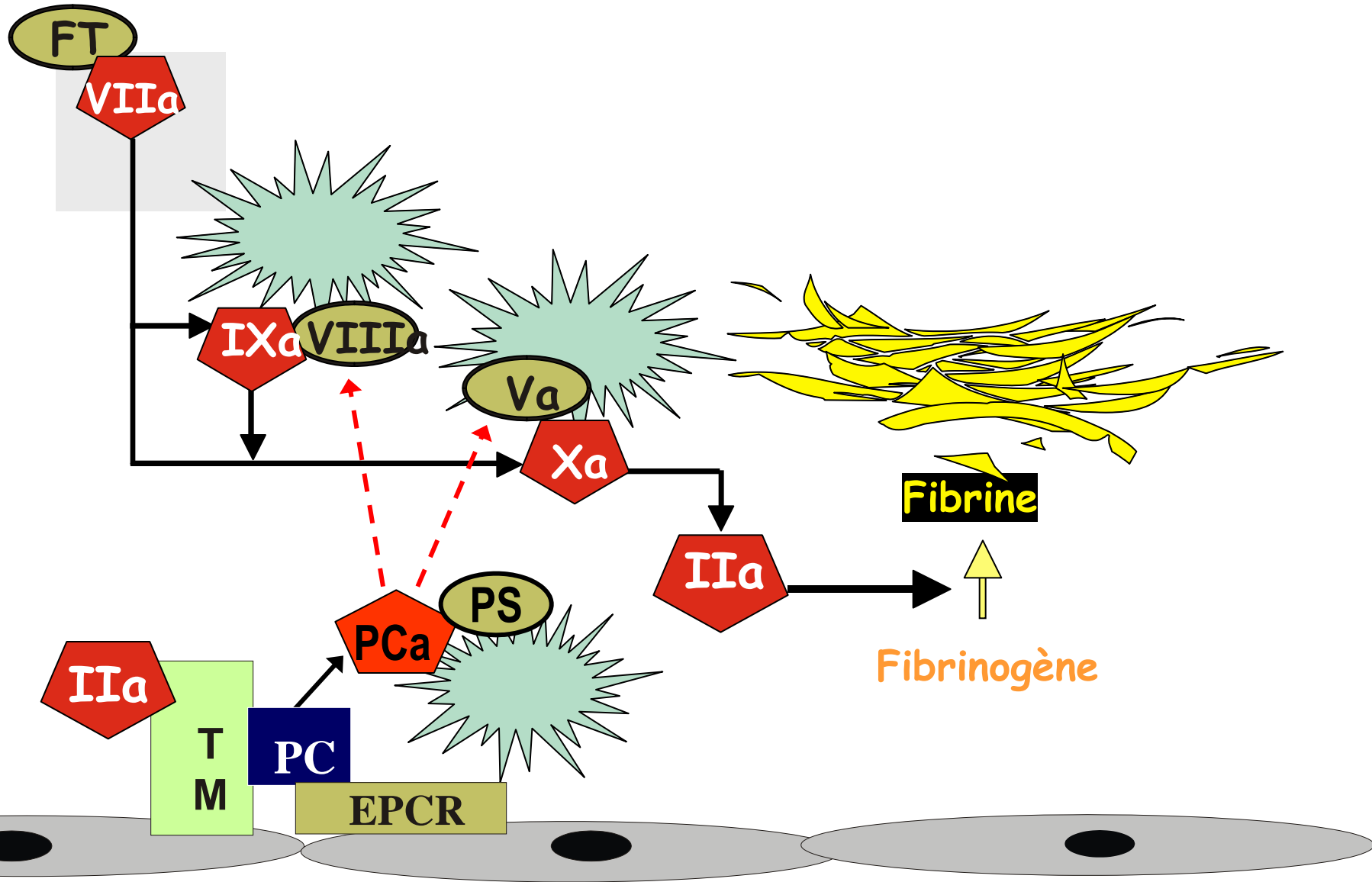
Application: les héparines



Le système de la protéine C

- Liaison de la thrombine à la TM
 - => inhibition de son pouvoir pro-coagulant
 - Le complexe thrombine/TM active la Protéine C
 - La PC activée dégrade les FVa et FVIIIa, en présence de protéine S à la surface des plaquettes activées
- => ralentit la production de thrombine

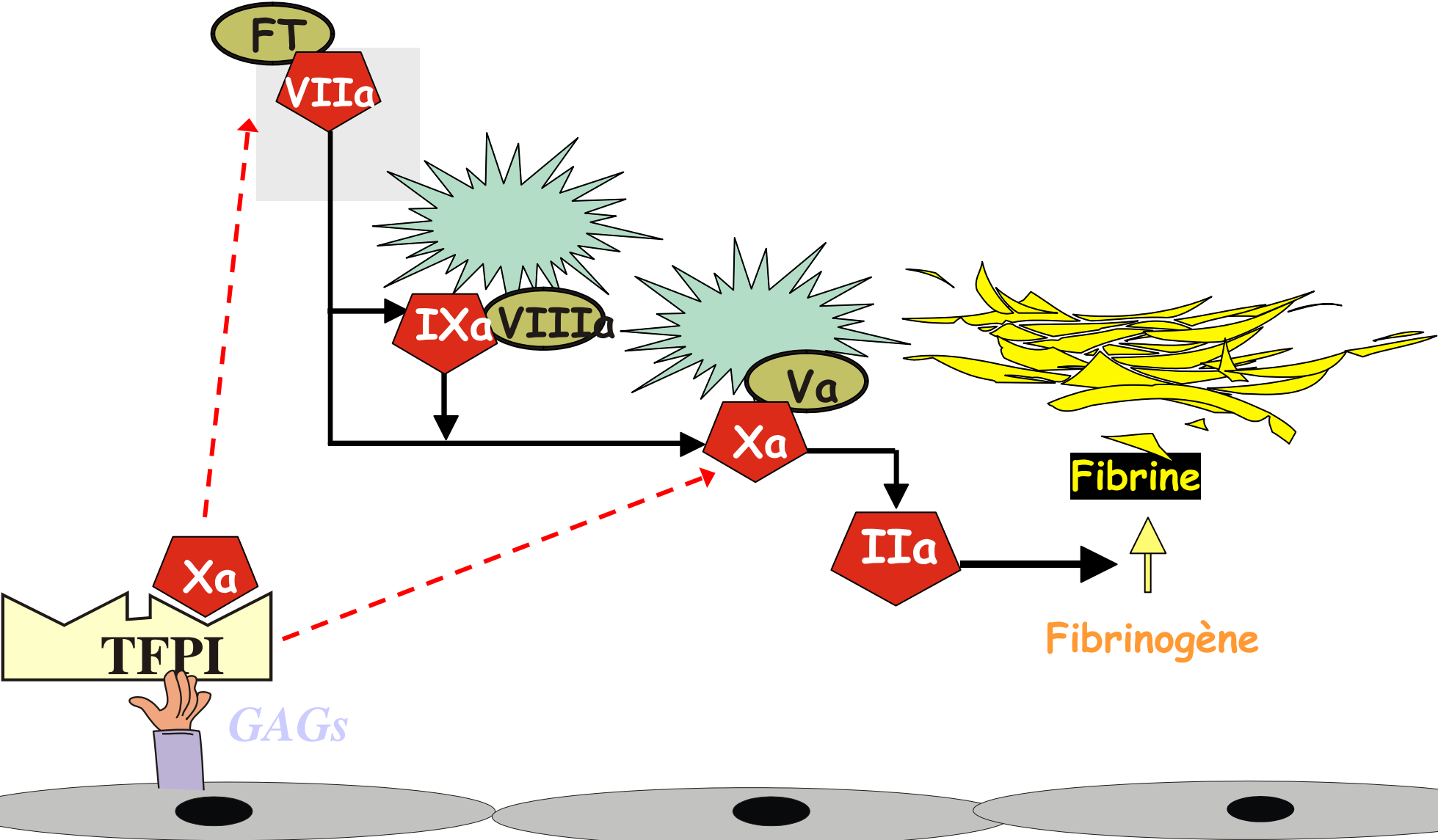
Le système de la protéine C



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)

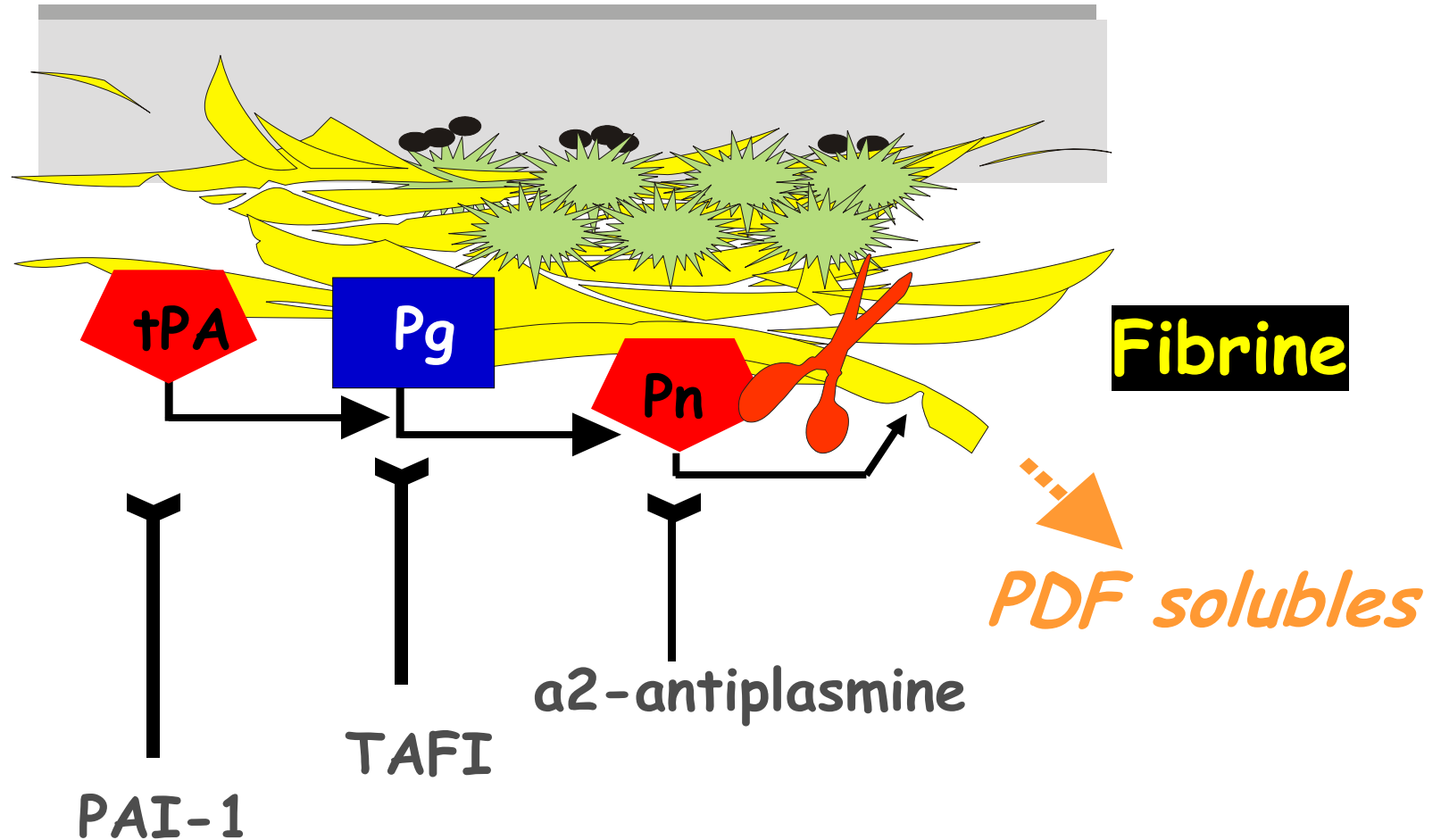
Le TFPI



La fibrinolyse

- Processus qui entraîne la **dissolution progressive du caillot de fibrine**
- => produits de dégradation solubles de la fibrine
- Protagonistes:
 - le **plasminogène** zymogène, synthétisé dans le foie, se transforme en **plasmine** à activité sérine protéase
 - des **activateurs** du plasminogène (t-PA, u-PA)
 - des **inhibiteurs** (PAI-1, α 2 antiplasmine, TAFI ou thrombin activable fibrinolysis inhibitor)
- Induite par la présence de fibrine

La fibrinolyse



Exploration de l'hémostase

- Syndrome hémorragique, enquête familiale (bilan orienté par la **clinique**)
- Bilan préopératoire (non systématique : en cas d'ATCD hémorragique, insuffisance rénale ou hépatique, traitement anticoagulant ou antiagrégant plaquettaire, geste chirurgical/invasif à haut risque hémorragique)
- Bilan de thrombophilie
- Suivi thérapeutique (anticoagulants : 1ère cause de iatrogénie médicamenteuse)

Exploration de l'hémostase primaire

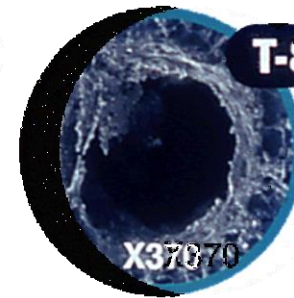
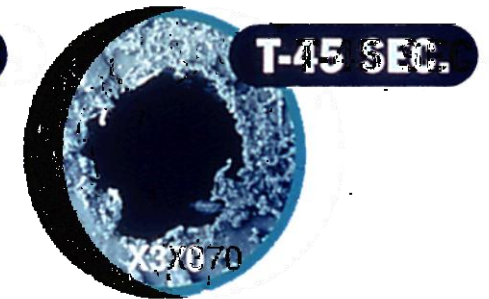
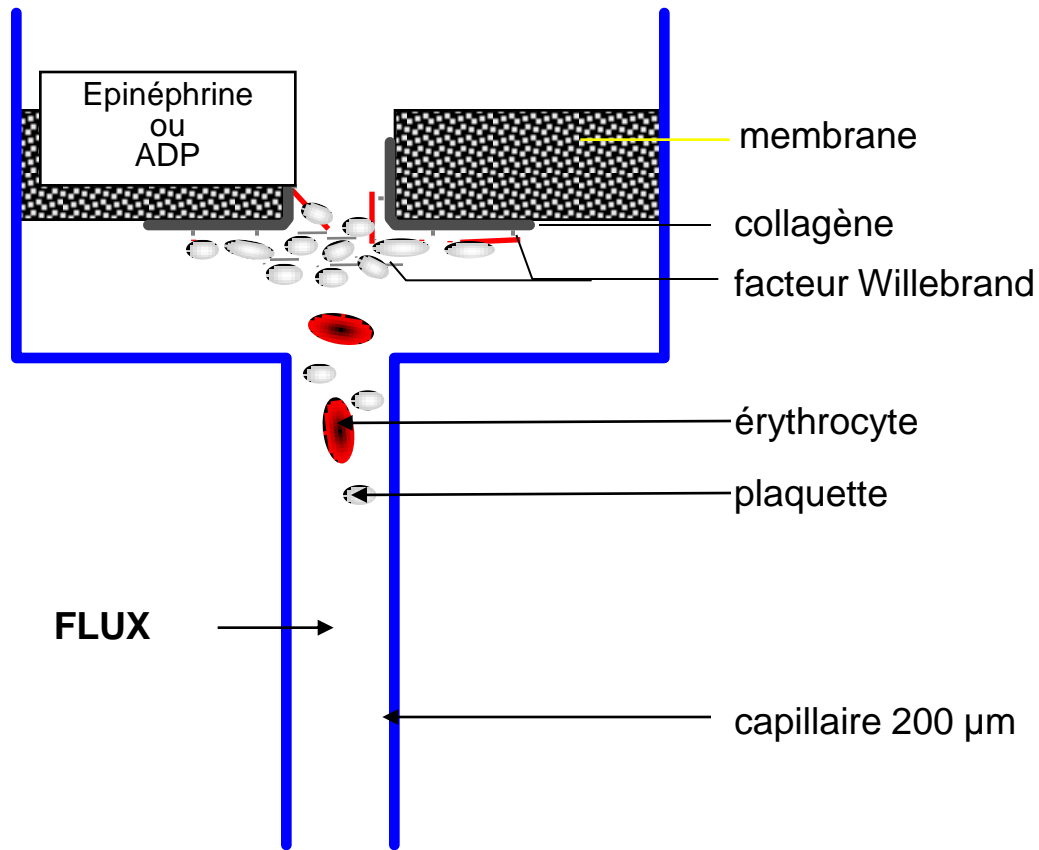
- Tests globaux
 - Temps d'occlusion plaquettaire (PFA-100)
- Tests spécifiques
 - Numération plaquettaire
 - Dosage du facteur von Willebrand (quali et quanti)
 - Fonctions plaquettaires

Temps d'occlusion plaquettaire (PFA-100®)

- Sur sang total citraté
- Membrane de collagène+adrénaline ou collagène+ADP
- => temps d'occlusion en secondes
- Explore:
 - **F von Willebrand** (sensibilité +++)
 - plaquettes (quanti et quali)
- Limites: thrombopénie, hématokrite bas



Temps d'occlusion plaquettaire (PFA-100®)



Exploration de la coagulation

- Tests globaux (chronométriques)
 - Temps de Quick (TQ) => voie exogène
 - Temps de Céphaline+Activateur (TCA) => voie endogène
- Dosages spécifiques (chronométriques, chromogéniques, immunologiques)

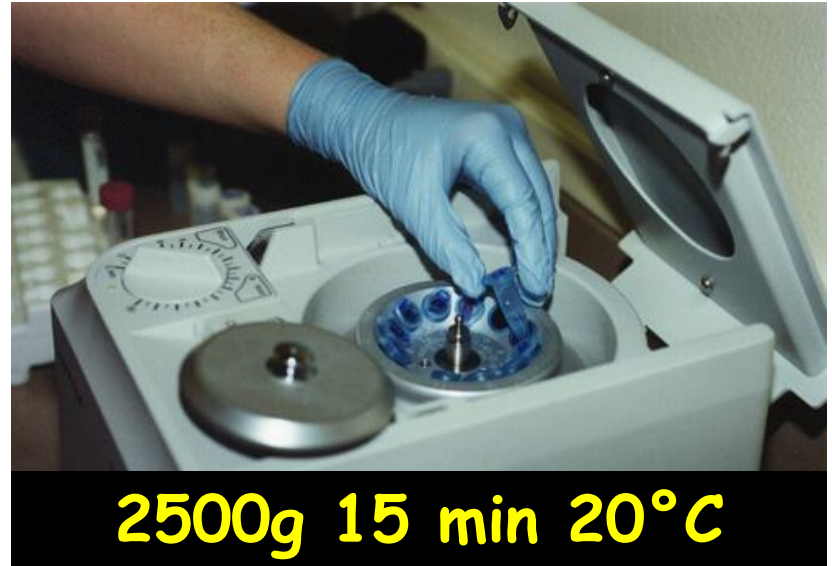
Préanalytique

1



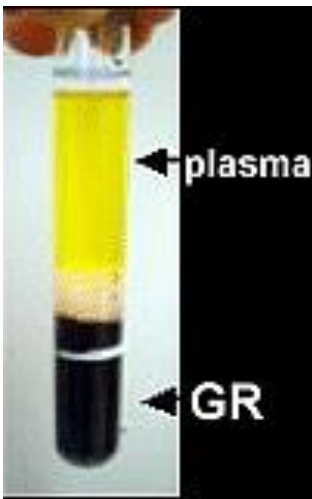
sang prélevé
sur un
chélateur du
Ca⁺⁺
(**citrate**)

2



2500g 15 min 20°C

3



Le **plasma** ne
contient
ni plaquettes, ni
phospholipides et
le Ca⁺⁺ est bloqué

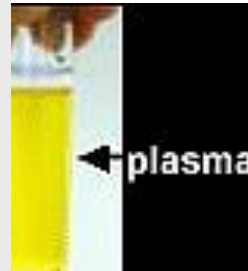


Délai max 4h
Tubes bien **remplis**
Tubes **non coagulés**

Exploration de la coagulation

Pour initier la coagulation:

- du **Ca²⁺**, des **phospholipides**
- Un « déclencheur »
 - **FT** (TQ) => voie exogène
 - kaolin, **silice**... (TCA)=> voie endogène



tube



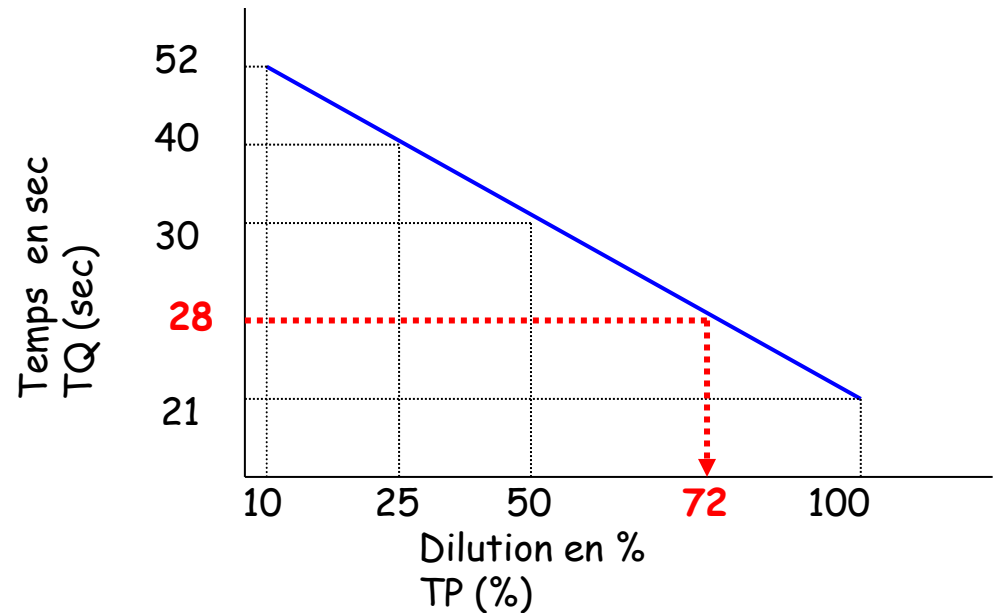
Automate d'hémostase

Temps de Quick (TQ)

- **FT + PL + Ca⁺⁺**
- **Calibration** à partir d'un pool de plasma normal
- Mesure du temps de coagulation pour chaque dilution du pool
 - 50% > TQ du Pool au 1/2
 - 33 % > TQ du Pool au 1/3
 - 25 % > TQ du Pool au 1/4

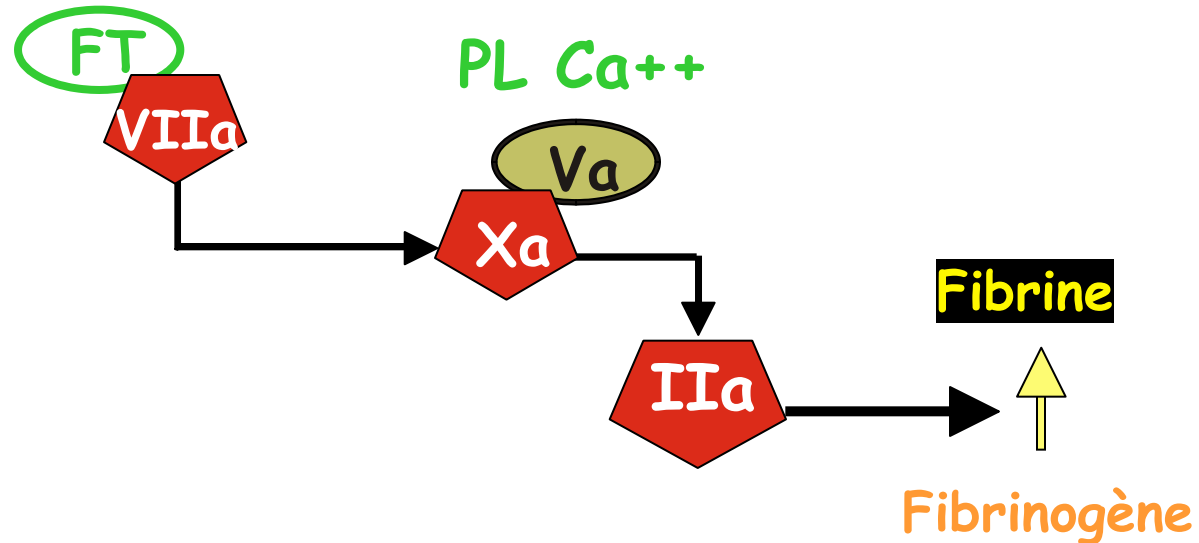
plus le plasma est dilué plus le temps de coagulation est long

- Mesure du **temps de coagulation** de l'échantillon
- => taux de prothrombine (TP) en %
ex: TQ = 28 sec => TP = 72%



Temps de Quick (TQ)

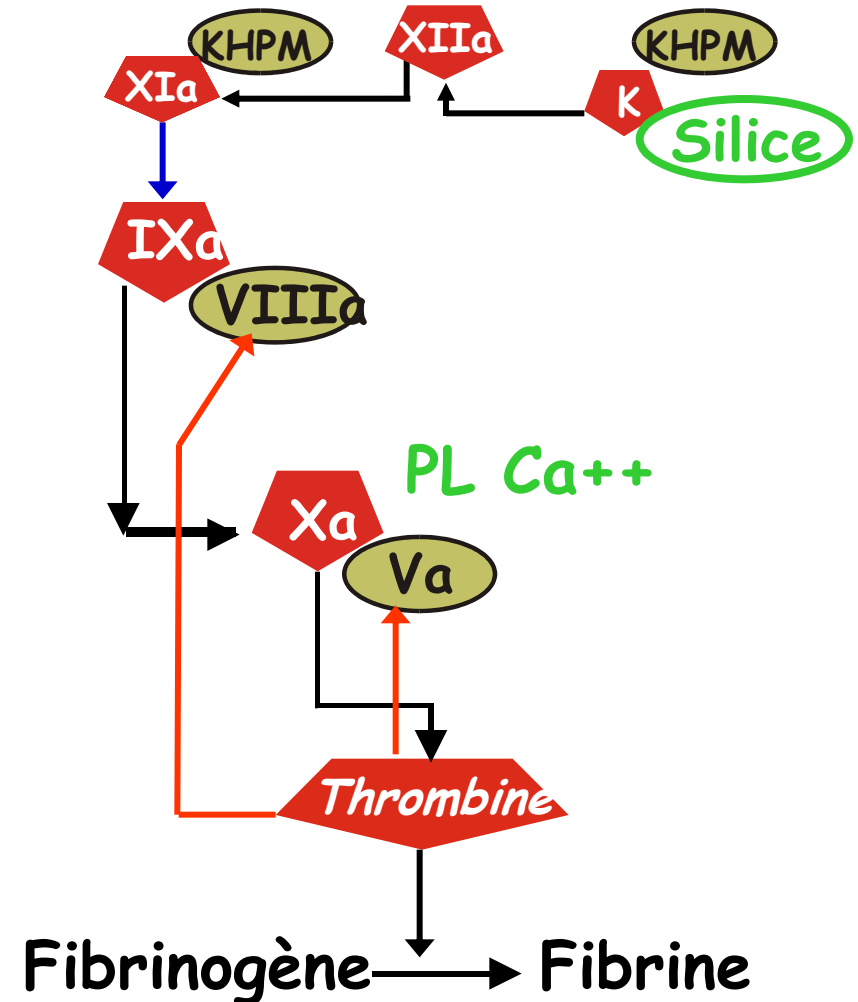
- Normale TP > 70%
- Voie exogène: VII, X, V, II, Fg
- Causes de diminution:
 - Déficit congénital
 - Insuffisance hépatocellulaire
 - Carence en vit K / traitement AVK (INR)
 - Consommation (CIVD)



$$\text{INR} = \left(\frac{\text{TQ malade}}{\text{TQ témoin}} \right)^{\text{ISI}}$$

Temps de céphaline + activateur (TCA)

- **Activateur** du système contact (silice, kaolin) + **PL** + **Ca⁺⁺**
- **Voie endogène**: tous les facteurs sauf le VII
- Rendu en secondes par rapport à un temps témoin
- Normale TCA ratio M/T < 1,20
- Causes d'allongement isolé (TQ N):
 - Déficit congénital en FE
 - Anticoagulant circulant
 - Héparine non fractionnée



Dosages spécifiques

- Dosage des facteurs: plasma du patient dilué dans un **plasma réactif dépourvu du facteur** à doser
- Coagulation déclenchée
 - par un réactif TQ: VII, X, V, II (N>70%)
 - Par un réactif TCA: XII, XI, IX, VIII (N>50%)
- Mesure du temps de coagulation
- Taux est exprimé en % de la normale (droite de calibration)

Dosages spécifiques

- Dosage du **fibrinogène**: méthode chronométrique de Clauss
- Plasma du patient dilué dans un tampon
- Coagulation déclenchée par de la **thrombine** (IIa)
- Mesure du temps de coagulation
- Taux est exprimé en % de la normale (droite de calibration)
- N = 2-4 g/L

Syndromes hémorragiques

- Cutanéomuqueux ou profond ?
- Immédiat ou retardé ?
=> anomalie de l'hémostase primaire ou de la coagulation ?
- Constitutionnel ou acquis ?
- Spontanée ou provoquée ?

Purpura (cutanéomuqueux)

tache hémorragique due à du sang extravasé dans le derme.

- ne s'efface pas à la vitropression.

- **pétéchies** (éléments ponctiformes et lenticulaires) ;

- **ecchymoses** (larges nappes bleues violacées)- les bleus !



Ne pas confondre avec un hématome: saignement plus profond, intra musculaire

Séquelle d'hémarthrose



Hémarthrose = saignement dans une articulation (profond)
Dans un trouble de la coagulation: **hémophilie** (A = déficit en F.VIII; B = déficit en F.IX)