

T.P. 5. DETERMINATION DU FIBRINOGENE DANS LE PLASMA

La cascade de coagulation

La coagulation sanguine est un processus complexe aboutissant à la formation de caillots sanguins. C'est une partie importante de l'hémostase où la paroi endommagée d'un vaisseau sanguin est couverte d'un caillot de fibrine pour arrêter l'hémorragie. Les troubles de la coagulation qui mènent à des risques de saignements plus importants sont appelés hémophilie. D'autres troubles de la coagulation peuvent mener à un plus grand risque de thrombose.

La coagulation est remarquablement préservée d'une espèce à l'autre : chez tous les mammifères, la coagulation repose sur la formation d'un clou plaquettaire et sur une composante protéique de coagulation (ce sont les facteurs de coagulation).

La coagulation débute presque instantanément après une brèche au niveau de la paroi endothéliale des vaisseaux sanguins. L'exposition du sang au facteur tissulaire initie des changements au niveau des plaquettes et du fibrinogène. Les plaquettes forment immédiatement un clou pour bloquer le saignement : c'est **l'hémostase primaire**. **L'hémostase secondaire** débute au même moment : des protéines plasmatiques appelées « facteurs de coagulation » réagissent dans une cascade complexe pour former des fibres de fibrine, qui renforcent le clou plaquettaire.

L'hémostase est l'ensemble des mécanismes permettant d'interrompre un saignement pour éviter l'hémorragie :

- la vasoconstriction diminue le calibre du vaisseau lésé ;
- l'hémostase primaire correspond à l'adhésion des plaquettes au vaisseau lésé et entre elles (agrégation plaquettaire) ;
- l'hémostase secondaire correspond à la coagulation proprement dite ;
- le caillot attire et stimule la croissance de fibroblastes et de cellules de muscle lisse au sein de la paroi vasculaire et entame le processus de réparation qui résultera finalement en la dissolution du caillot (fibrinolyse).

La formation du clou plaquettaire (ou hémostase primaire)

Lorsque l'endothélium est endommagé, le collagène de l'espace interstitiel, normalement isolé, est exposé aux plaquettes en circulation. Celles-ci se fixent directement au collagène avec des récepteurs glycoprotéiques Ia/IIa spécifiques au collagène. Cette adhésion est fortifiée par le facteur de von Willebrand (vWF), qui est relâché par les cellules endothéliales et les plaquettes. Le facteur de Von Willebrand forme des liens additionnels entre les fibres de collagène et les glycoprotéines Ib/IX/V des plaquettes. Ces adhésions activent les plaquettes.

Les plaquettes activées relâchent le contenu de leurs granules dans le plasma. Ces granules contiennent de l'ADP, de la sérotonine, le facteur d'activation plaquettaire, le facteur de Von Willebrand, le facteur plaquettaire 4 et le thromboxane A₂, qui active des plaquettes additionnelles. Le contenu des granules active une cascade de récepteurs couplés aux protéines G, résultant en une concentration plus élevée de calcium dans le cytosol des plaquettes. Le calcium active la protéine kinase C, qui active à son tour la

phospholipase A2. La phospholipase A2 modifie l'intégrine glycoprotéique IIb/IIIa, augmentant son affinité pour le fibrinogène. Les plaquettes activées changent de forme : de sphériques, elles deviennent stellaires, et le fibrinogène entrecroisant les glycoprotéines IIb/IIIa promeut l'agrégation des plaquettes adjacentes (ce qui complète l'hémostase primaire).

La cascade de coagulation (ou hémostase secondaire)

La cascade de coagulation est constituée de deux voies qui mènent à la formation de fibrine. Ces deux voies sont la **voie extrinsèque** (dépendante du facteur tissulaire) et la **voie intrinsèque**. On croyait auparavant que ces deux voies étaient d'importance égale dans la cascade de coagulation. On sait à présent que la voie la plus importante dans l'initiation de la coagulation est la voie extrinsèque. Les deux voies sont des séries de réactions dans lesquelles un zymogène de sérine protéase et son cofacteur glycoprotéique sont activés pour ensuite catalyser la prochaine réaction. Les facteurs de coagulation sont normalement identifiés par des chiffres romains, avec un *a* minuscule pour indiquer la forme active.

Les facteurs de coagulation sont généralement des sérine protéases (enzymes). Il y a quelques exceptions. Par exemple, le facteur VIII et le facteur V sont des glycoprotéines, et le facteur XIII est une transglutaminase. Les sérine-protéases fonctionnent en clivant d'autres protéines à des résidus spécifiques de sérine. Les facteurs de coagulation circulent sous formes de zymogènes inactifs. La cascade de coagulation est classiquement divisée en trois voies : la voie extrinsèque et la voie intrinsèque activent tous les deux la voie commune finale du facteur X, de la thrombine et de la fibrine.

Voie extrinsèque

Le rôle principal de la voie extrinsèque est de générer très rapidement une grande quantité de thrombine. Le facteur VIIa circule dans des quantités plus importantes que tout autre facteur de coagulation activé.

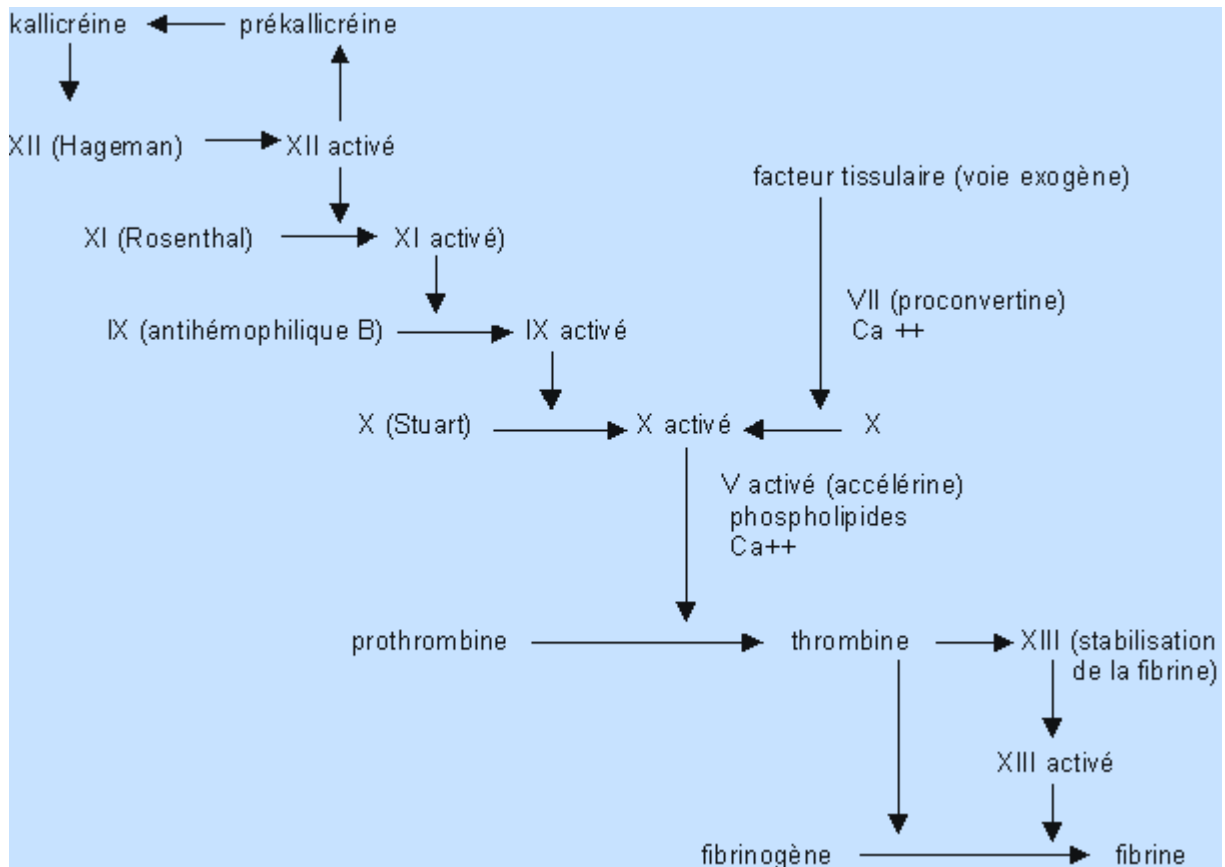
- L'intégrité de la paroi des vaisseaux sanguins compromise, le facteur VII quitte la circulation et entre en contact avec le facteur tissulaire exprimé par les fibroblastes du stroma et par les leucocytes. Il y a formation du complexe activé TF-FVIIa.
- Le TF-FVIIa active le facteur IX et le facteur X.
- Le facteur VII est lui-même activé par la thrombine, par le facteur XIa, XII et Xa.
- L'activation du facteur X par le complexe TF-FVIIa est inhibée par l'inhibiteur de la voie du facteur tissulaire (TFPI).
- Le facteur Xa et son cofacteur Va forment le complexe prothrombinase, qui active la prothrombine en thrombine.
- La thrombine active alors d'autres facteurs de la cascade, dont le facteur V le facteur VIII et le facteur XI.
- Le facteur VIIIa est le cofacteur du facteur IXa, et leur complexe (appelé tenase) active le facteur X, puis le cycle recommence.

Voie intrinsèque

L'initiation de cette voie se fait par contact du sang avec les structures sous-endothéliales. Cette étape, appelée phase contact, fait intervenir le kininogène de haut poids moléculaire (KHPM), la prékallicréine et le facteur XII. Ce dernier activé, va lui-même activer le facteur IX en présence d'ions Ca^{2+} . En présence du XIa, le facteur IX est à son tour activé en IXa. Il se forme alors un premier complexe à la surface de la membrane plaquettaire capable d'activer le X en Xa. Ce complexe fait intervenir le IXa, le Ca^{2+} , le facteur 3 plaquettaire et le cofacteur VIII activé par les premières traces de thrombine.

Voie commune

Le facteur Xa adsorbé à la surface des phospholipides d'origine tissulaire et plaquettaire va, en présence du facteur Va, constituer la prothrombinase. Le Va provient du V activé par la thrombine. La prothrombinase est donc un complexe enzymatique faisant intervenir le Xa, le Va, le Ca^{2+} et des phospholipides. Il existe donc une similitude avec le complexe activateur du X. La prothrombinase permet la formation de thrombine (IIa) à partir de prothrombine (II).



Régulation de la coagulation

Différents mécanismes interviennent pour freiner et pour inverser la coagulation lorsque le caillot n'est plus nécessaire :

Inhibiteurs de la coagulation

Inhibiteurs de la coagulation	
Nom	Fonction
Antithrombine	inhibe IIa, Xa
Protéine C	inactive Va et VIIIa
Protéine S	cofacteur de la protéine C
Inhibiteur tissulaire de la voie (TFPI)	inhibe le complexe facteur tissulaire – facteur VIIa et Xa.
Inhibiteur dépendant de la protéine Z (ZPI)	inhibe X et XI.
Protéine Z	cofacteur de ZPI
Héparine cofacteur II	inhibe IIa

Fibrinolyse

La fibrinolyse est le processus par lequel la fibrine est dégradée par la plasmine et est dissoute. La plasmine est activée au départ du plasminogène par l'urokinase et le tissu plasminogène activateur.

Des troubles à ce niveau engendrent une hypercoagulabilité responsable d'un risque de thrombose.

Facteurs de coagulation

Facteurs de coagulation et substances apparentées		
N°	Nom	Fonction
I	Fibrinogène	forme des caillots (fibrine)
II	Prothrombine	active I, V, VIII, XI, XIII, protéine C, plaquettes. Vitamine K dépendant
III	Thromboplastine	cofacteur VIIa
IV	Calcium	
V	Proaccélélerine	cofacteur X.
VI	(accélélerine, ancien nom du Facteur Va)	
VII	Proconvertine	active IX, X. Vitamine K dépendant
VIII	Facteur anti-hémophile A	cofacteur IX
IX	Facteur Christmas ou facteur anti-hémophile B	active X. Vitamine K dépendant
X	Facteur Stuart-Prower	active II. Vitamine K dépendant
XI	Facteur Rosenthal, Antécédent de la thromboplastine plasmatique	active XII, IX et prékallikréine
XII	Facteur Hageman	active prékallikréine et fibrinolyse
XIII	Facteur fibrin-stabilizing	crosslinks fibrin
	Facteur de von Willebrand	lie VIII, intermédiaire de l'adhésion des plaquettes
	Prekalikreine ou Facteur Fletcher	active XII et prékallikréine ; scinde HMWK
	Kininogène de haut poids moléculaire (HPMK)	soutient l'activation réciproque de XII, XI, et prékallikréine
	Fibronectine	médiateur adhésion cellulaire

Exploration de la coagulation par les tests de laboratoire

Exploration de l'hémostase primaire

- Temps de saignement
- Numération des plaquettes
- Dosage du facteur de von Willebrand

Exploration de l'hémostase secondaire

- Temps de céphaline activé (APTT, Temps de céphaline kaolin)
- Taux de prothrombine (TP, Temps de Quick, INR)
- Temps de thrombine – Temps de reptilase
- Dosage des facteurs de coagulation

Troubles de l'hémostase

Pathologie de l'hémostase primaire

- Thrombocytopénie
- Thrombopathie
- Maladie de von Willebrand

Pathologie de l'hémostase secondaire

- Hémophilies
- Déficit en vitamine K
- Insuffisance hépato-cellulaire
- les anticorps anti facteurs

Pathologie des inhibiteurs de la coagulation

Détermination du fibrinogène (méthode Unitest)

Principe

Le fibrinogène est une protéine synthétisée dans le foie, ayant un rôle dans le processus de coagulation; dans la partie commune des deux voies de coagulation, la thrombine convertit le fibrinogène en fibrine, et le réseau de fibrine formé favorise l'adhésion plaquettaire.

Dans les cas des processus nécrotiques ou inflammatoires, la fibrine est considérée comme un réactif de phase aiguë.

Le plasma sanguin est traité avec du sulfate de sodium, et la formation d'une turbidité est proportionnelle à la quantité de fibrinogène contenue.

Réactifs

1. Sérum physiologique, solution NaCl 0,9 g/100 ml
2. Réactif de turbidité: 52,5 gramme Na_2SO_4 dissous en 500 ml eau dist.
3. Matériel biologique - plasma, (sang récolté sur citrate)

Mode opératoire

Pipetez dans 2 tubes conformément au tableau :

Réactif, ml	Probe	Témoin
Plasma	0,25	-
Sérum physiologique	-	0,25
Réactif de turbidité	2,5	2,5

Agitez les tubes pour homogénéisation. Maintenez les tubes, à la température de la chambre, pendant 30 minutes. Lisez l'absorbance de la probe, en équilibrant le spectrophotomètre avec le témoin, à $\lambda = 530 \text{ nm}$, en cuvette de 1 cm.

Calcul

Fibrinogène = $E_p \times 11,3 \times 0,8 \text{ g/1000 ml plasma}$

Valeurs normales : Nouveau-née: 125-300 mg/dL;
Adultes : 200-400 mg/dL ou 2-4 g/ L

Signification clinique

Le fibrinogène fait partie des protéines de phase aiguë (protéine C-réactive, albumine, céruloplasmine, etc.).

Valeurs de fibrinogène supérieures à 5 g/1000 ml avertit qu'il pourrait y avoir une inflammation / infection aiguë, grossesse, artériopathies, cancers, maladie de Hodgkin, traumatisme, maladie coronarienne, le tabagisme.

Les valeurs inférieures à 2 g/1000 ml supposent une affection chronique ou leucémie de différentes formes.