



Référence document : Phyl

Rédigé par : Professeur Jean-François  
ABGRALL


Indice  
0

Page 1 de 1

Titre du document : **Physiologie de la coagulation**


# PHYSIOLOGIE DE LA COAGULATION

Professeur Jean-François ABGRALL


	Référence document : Phyl	Rédigé par : Professeur Jean-François ABGRALL	Indice 0	Page 2 de 2
Titre du document : Physiologie de la coagulation				

## TABLE DES MATIERES


<b>1. INTRODUCTION</b>	<b>5</b>
<b>2. DESCRIPTION DE L'HEMOSTASE PRIMAIRE ET DE LA COAGULATION</b>	<b>5</b>
<b>3. INITIATION DE LA COAGULATION</b>	<b>6</b>
3.1. Premier objectif : élève infirmière	6
3.2. Deuxième objectif : étudiants en Médecine D1 et D3	6
3.2.1. voie extrinsèque	6
3.2.2. voie intrinsèque	7
<b>4. ACTIVATION DU FACTEUR X PAR LE FACTEUR VIIA</b>	<b>7</b>
<b>5. FACTEUR TISSULAIRE</b>	<b>7</b>
<b>6. FACTEUR VII, PROCONVERTINE</b>	<b>8</b>
6.1. Présentation	8
6.2. Activation du VII	8
6.3. Inactivation du VIIa	9
6.4. Actions du VIIa	9
6.5. Inhibition du VIIa :	10
<b>7. FACTEUR X, STUART</b>	<b>10</b>
7.1. Présentation	10
7.2. Activation du X :	10
7.3. Actions de Xa	11
7.4. Inactivation de Xa	11
<b>8. FORMATION DES COMPLEXES TENASE</b>	<b>12</b>
<b>9. FACTEUR VIII, ANTI-HEMOPHILIQUE A</b>	<b>12</b>
9.1. présentation	12
9.2. Rôle de l'interaction VIII-vWF	13
9.3. Activation	13
9.4. Action	13
9.5. Inhibition	13
<b>10. FACTEUR IX, ANTI-HEMOPHILIQUE B</b>	<b>13</b>
10.1. Activation :	14
10.1.1. Le IX est clivé par le XIa :	14
10.1.2. Le IX est clivé par le VIIa :	14
10.1.3. Le IX peut être activé par :	14
10.2. Inhibition	14
<b>11. COMPLEXE PROTHROMBINASE</b>	<b>15</b>
<b>12. FACTEUR V, PROACCELERINE</b>	<b>15</b>
12.1. Structure	15
12.2. Activation du V	16
12.3. Action du V	16
12.4. Inactivation du V	16
<b>13. FORMATION DE LA THROMBINE (THROMBINOFORMATION)</b>	<b>17</b>
<b>14. PROTHROMBINE, FACTEUR II</b>	<b>17</b>

	Référence document : Phyl	Rédigé par : Professeur Jean-François ABGRALL	Indice 0	Page 3 de 3
Titre du document : Physiologie de la coagulation				

14.1.	Présentation	17
14.2.	Activation	17
<b>15.</b>	<b>THROMBINE : FACTEUR IIA</b>	<b>17</b>
15.1.	Action de la Thrombine	18
15.2.	Inactivation de la thrombine	18
<b>16.</b>	<b>FORMATION DE LA FIBRINE</b>	<b>18</b>
<b>17.</b>	<b>FIBRINOGENE</b>	<b>19</b>
17.1.	Gène	19
17.2.	Concentration	19
17.3.	Structure	19
17.4.	Formation de la fibrine	20
17.5.	Fonctions du fibrinogène	20
<b>18.</b>	<b>FIBRINE : FACTEUR IA</b>	<b>21</b>
18.1.	Formation de la fibrine :	21
18.2.	Stabilisation de la fibrine	21
<b>19.</b>	<b>FACTEUR XIII : FACTEUR STABILISANT DE LA FIBRINE</b>	<b>21</b>
19.1.	Gène	21
19.2.	Concentration plasmatique	22
19.3.	Structure	22
19.4.	Activation	22
19.5.	Action	22
19.6.	Inhibition	23
<b>20.</b>	<b>FACTEUR XI, PLASMA THROMBOPLASTIN ANTECEDENT</b>	<b>23</b>
20.1.	XI plaquettaire	23
20.2.	Activation	23
20.3.	Activation du XI sur la cellule endothéliale	24
20.4.	Action	24
20.5.	Inhibition	24
<b>21.</b>	<b>PROTEASE-NEXINE 2</b>	<b>25</b>
<b>22.</b>	<b>PROTEASE-NEXINE 1</b>	<b>25</b>
<b>23.</b>	<b>PHASE CONTACT</b>	<b>26</b>
23.1.	Les acteurs de la phase contact	26
23.2.	Activation de la phase contact	26
23.3.	Actions	27
23.4.	Inhibition de la phase contact	27
<b>24.</b>	<b>FACTEUR XII : FACTEUR HAGEMAN</b>	<b>27</b>
24.1.	Activation	27
24.2.	Action	27
24.3.	Inhibition	27
<b>25.</b>	<b>PREKALLICREINE : FACTEUR FLETCHER</b>	<b>27</b>
25.1.	Activation :	27
25.2.	Actions	28
25.3.	Inhibition	28
<b>26.</b>	<b>KININOGENE DE HAUT POIDS MOLECULAIRE : FACTEUR FITZGERALD, FLAUJEAC OU WILLIAMS</b>	<b>28</b>

	Référence document : Phyl	Rédigé par : Professeur Jean-François ABGRALL	Indice 0	Page 4 de 4
Titre du document : <b>Physiologie de la coagulation</b>				

26.1.	<b>Activation :</b>	<b>28</b>
26.2.	<b>Actions :</b>	<b>28</b>
26.3.	<b>Actions associées à l'activation de la prékallicroïne sur la cellule endothéliale :</b>	<b>28</b>
26.4.	<b>Inhibition :</b>	<b>28</b>
<b>27.</b>	<b>INHIBITEURS DE LA COAGULATION</b>	<b>29</b>
27.1.	<b>Introduction :</b>	<b>29</b>
27.2.	<b>Antithrombine</b>	<b>29</b>
27.2.1.	Action :	29
27.3.	<b>Protéine C</b>	<b>30</b>
27.3.1.	Structure	30
27.3.2.	Activation de PC	30
27.3.3.	Action de la protéine C activée	31
27.3.4.	Inactivation de PCa :	31
27.4.	<b>Thrombomoduline</b>	<b>31</b>
27.4.1.	Régulation de l'expression de TM	32
27.4.2.	Actions de TM :	32
27.4.3.	Rôle du facteur V dans l'activation de PC	32
27.5.	<b>EPCR</b>	<b>32</b>
27.5.1.	Gène	32
27.5.2.	Structure	32
27.5.3.	Rôle du facteur V dans l'activation de PC	33
27.6.	<b>Proteine C inhibiteur (PCI)</b>	<b>33</b>
27.7.	<b>Protéine S</b>	<b>33</b>
27.7.1.	Structure	34
27.7.2.	Liaison à la C4bBP	34
27.7.3.	Action de la PS :	34
27.7.4.	Inactivation de PS	35
27.8.	<b>C4bBP : C4b- binding protein</b>	<b>35</b>
27.9.	<b>TFPI : Tissue Factor Pathway Inhibitor</b>	<b>35</b>
27.9.1.	Concentration plasmatique et distribution intravasculaire	36
27.9.2.	Action du TFPI	36
27.9.3.	Inactivation du TFPI	36
27.10.	<b>Deuxième cofacteur de l'héparine : HCF2</b>	<b>37</b>
27.11.	<b>alpha2-macroglobuline</b>	<b>37</b>
27.11.1.	Structure	37
27.11.2.	Action	38
27.11.3.	Inhibition :	38
27.12.	<b>Inhibiteur du C1</b>	<b>38</b>
27.12.1.	Action	39
27.12.2.	Inactivation	39
27.13.	<b>alpha1-proteinase inhibitor</b>	<b>39</b>
27.13.1.	Action	40
27.13.2.	Inhibition :	40
27.14.	<b>Annexines</b>	<b>40</b>
27.14.1.	Structure	40
27.14.2.	Concentration plasmatique	40
27.14.3.	Action	41

	Référence document : Phyl	Rédigé par : Professeur Jean-François ABGRALL	Indice 0	Page 5 de 5
Titre du document : <b>Physiologie de la coagulation</b>				

## 1. Introduction

La coagulation plasmatique est l'ensemble des réactions biologiques conduisant à transformer un liquide (le plasma) en un gel constitué de fibrine. La fibrine provient du clivage enzymatique du fibrinogène par la thrombine, qui est l'enzyme-clé de la coagulation. La coagulation se déroule en plusieurs étapes consécutives : initiation de la coagulation, formation des complexes ténase, formation des complexes prothrombinase, formation de la fibrine, et stabilisation de la fibrine.

La conception classique de la coagulation décrit deux voies différentes pour aboutir à la production de thrombine : la voie intrinsèque et la voie extrinsèque.

En fait ces deux voies sont imbriquées puisque des passages existent entre elles. Les phénomènes de coagulation ont lieu soit dans la circulation, soit sur une surface cellulaire. L'efficacité des enzymes impliqués dans la coagulation est beaucoup plus grande sur une surface cellulaire que dans le plasma, amenant à concevoir la coagulation comme un phénomène cellulaire.

Récemment, cette conception cellulaire de la coagulation a conduit Maureen Hoffmann à proposer une vue nouvelle de la coagulation qui se déroulerait en trois phases : initiation, amplification, propagation.

## 2. Description de l'hémostase primaire et de la coagulation

Lorsqu'une lésion vasculaire survient, cette brèche doit être rapidement obstruée pour arrêter le saignement et permettre au vaisseau de se réparer.

La lésion vasculaire a détruit un certain nombre de cellules endothéliales, laissant apparaître les constituants du sous-endothélium.

Le sous-endothélium est constitué de cellules et de protéines.


Parmi les cellules il y a les fibroblastes qui portent à leur surface de façon constitutive le facteur tissulaire qui va initier la coagulation plasmatique par liaison du facteur VII. Il y a aussi des fibres musculaires lisses et d'autres types cellulaires qui n'ont pas un rôle déterminant dans l'hémostase, mais qui sont impliquées dans les processus d'athérome.

Parmi les protéines du sous-endothélium, un certain nombre ont une activité sur **l'hémostase primaire** en ce sens qu'elles permettent l'adhésion des plaquettes puis leur activation et la formation d'un caillot plaquettaire qui arrêtera le saignement.

Ce caillot est fragile et sera rapidement renforcé par la production de fibrine à la surface du caillot, le rendant solide et imperméable. Les phénomènes conduisant à la formation de fibrine représentent la **coagulation plasmatique**.

La coagulation est déclenchée par la voie extrinsèque (la plus importante physiologiquement) ou par la voie intrinsèque in vitro. L'**initiation** de la coagulation débute par la liaison du facteur VII et des traces de facteur VIIa sur le facteur tissulaire (TF). Les premières molécules de VIIa activent d'une part le facteur X en Xa ; et d'autre part le facteur IX en IXa. Le facteur Xa et le facteur IXa vont se fixer sur les plaquettes les plus proches qui viennent d'être activées après contact avec le sous-endothélium. Le facteur Xa se lie au facteur Va sur la surface plaquettaire, ce qui conduit à la formation d'un complexe enzymatique à la surface des plaquettes ou des microparticules cellulaires, appelé prothrombinase, comportant le facteur Xa qui est le zymogène, le facteur Va qui est le cofacteur, les phospholipides membranaires et le calcium.

Le Xa transforme ensuite la prothrombine en thrombine. Les premières molécules de thrombine ne sont pas suffisantes pour cliver le fibrinogène, mais vont activer les facteurs V, VIII, IX et XI, ce qui va amplifier la génération de thrombine (**amplification**)(Roberts HR and M. Hofman, Haemophilia 1998 ; 4 : 331-334).

	Référence document : Phyl	Rédigé par : Professeur Jean-François ABGRALL	Indice 0	Page 6 de 6
Titre du document : <b>Physiologie de la coagulation</b>				

La thrombine ainsi générée va agir à plusieurs niveaux :

- elle active les plaquettes
- elle transforme le fibrinogène en fibrine
- elle rétroactive sa propre formation par activation du V, VIII, IX, XI
- elle inhibe la coagulation par activation de la protéine C à la surface des cellules endothéliales
- elle inhibe la fibrinolyse par activation du TAFI. La **propagation** survient lorsque les complexes enzymatiques sont activés sur la surface des plaquettes activées, ce qui conduit à une augmentation explosive de génération de thrombine.

La thrombine clive deux peptides sur le fibrinogène, les fibrinopeptides A et B, le transformant en monomère de fibrine. Les monomères de fibrine polymérisent spontanément pour former des fibres dont les liaisons seront renforcées par la création de liaisons fortes entre les monomères grâce au facteur XIII. Les inhibiteurs physiologiques de la coagulation entrent en jeu pour limiter quantitativement la génération de thrombine et la localiser au site de la lésion vasculaire.

Lorsque le caillot a permis de reconstituer un endothélium intact, le caillot doit être détruit : c'est la **fibrinolyse**. La fibrinolyse représente l'ensemble des phénomènes conduisant à la destruction enzymatique de la fibrine par la plasmine.

### 3. Initiation de la coagulation

#### 3.1. Premier objectif : élève infirmière

Lorsqu'une brèche vasculaire survient, le sous-endothélium est mis à nu et laisse apparaître ses différents composants dont les fibroblastes qui expriment de façon constitutive le facteur tissulaire (TF) à leur surface. Le facteur VII et les traces de facteur VII activé (VIIa) circulants (0,7 à 1 %) se lient au TF pour former un complexe TF-VII et TF-VIIa. Le complexe TF-VIIa active le VII, le IX, et le X, ce qui débute la coagulation. Ce complexe TF-VIIa est rapidement inhibé par le TFPI, ce qui limite la coagulation.

#### 3.2. Deuxième objectif : étudiants en Médecine D1 et D3


##### 3.2.1. voie extrinsèque

Lorsqu'une brèche vasculaire survient, le sous-endothélium est mis à nu et laisse apparaître ses différents composants dont les fibroblastes qui expriment de façon constitutive le facteur tissulaire (TF) à leur surface. Le facteur VII et les traces de facteur VII activé (VIIa) circulants (0,7 à 1 %) se lient au TF pour former un complexe TF-VII et TF-VIIa. Le complexe TF-VIIa active le VII, le IX, et le X. La coagulation est alors initiée, et les premières molécules de Xa et de IXa peuvent :

- soit rester liées au complexe TF-VIIa pour générer de la thrombine à ce niveau ;
- soit diffuser dans le plasma et se lier aux plaquettes activées environnantes, ce qui va amplifier le phénomène de coagulation par la production de thrombine.

Le TF lie le VII et du calcium, ce qui entraîne la protéolyse de Arg152-Ile (l'enzyme qui fait ce clivage n'est pas connue : Xa ou IXa ou FSAP?), activant le VII en VIIa.

#### Fonction du complexe TF-VIIa

	Référence document : Phyl	Rédigé par : Professeur Jean-François ABGRALL	Indice 0	Page 7 de 7
Titre du document : <b>Physiologie de la coagulation</b>				

TF-VIIa active VII : il y a auto-activation du VII (feed-back positif).

TF-VIIa active IX et X : fonction dépendante de la concentration en TF :

- si TF élevée : active le X (chaîne lourde Arg 52-Ile libère un peptide de 52 aa
- si TF basse : active le IX libère un peptide de 35 aa (" Josso loop " Thromb diath haemorr 1965 ;suppl 17 :35-44. ; Osterud B, PNAS 1977 ;74 :5260-4. ; Zur M et Nemerson Y JBC 1980 ;255 :5703-7.)

puis le IXa se lie au VIIIa sur plaquette activée (phospholipides) .

Maureen Hoffman Blood 1995 : VIIa se lie à TF --> TF-VIIa qui active le Xa, lequel initie l'activation plaquettaire via la génération de thrombine (10 fois plus puissante que IXa) VIIa-TF active aussi IXa : ce qui promeut l'explosion de génération de thrombine.

Les premières molécules de thrombine activent les plaquettes qui expriment alors le récepteur du facteur V. Le V est transformé en Va par la thrombine, ce qui permet au Xa de se lier au Va (le X ne se lie pas au Va). Le Xa qui se lie au Va provient de l'activation du IX par le XIa.

La formation de thrombine par la voie extrinsèque est transitoire et est insuffisante pour permettre une hémostase normale (Broze, Biochemistry 1990). Par contre, cette quantité de thrombine est suffisante pour activer le XI (pas besoin des protéines de la phase contact) (Walsh 1999).

### 3.2.2. voie intrinsèque

La coagulation plasmatique peut aussi, dans certaines conditions (infection, inflammation, activation de la cellule endothéliale) être activée sur une surface chargée négativement, les plaquettes et les cellules endothéliales. Ce système d'activation est appelé " phase contact " qui met en jeu plusieurs protéines (facteurs XII, XI, kininogène, prékallikréine) est en relation avec les protéines de l'inflammation.

## 4. Activation du facteur X par le facteur VIIa

Dès que le facteur VII est activé après liaison au facteur tissulaire (TF), le VIIa active le facteur X, le IX et rétroactive le VII.

- Lorsque le taux de TF est bas, la voie préférentielle est l'activation du IX.
- Lorsque le taux de TF est élevé, la voie préférentielle est l'activation du X.

Le facteur X ainsi activé va se lier à la surface de la plaquette pour former le complexe prothrombinase.


## 5. Facteur Tissulaire

FT ou TF = thromboplastine = CD 142

- **structure :**

glycoprotéine à simple chaîne, de 261 ou 263 aa, de PM : 29593 et de 45 kD pour la protéine glycosylée.

C'est une protéine intégrée dans la membrane : la partie extracellulaire est formée de deux domaines de type III fibronectine

	Référence document : Phyl	Rédigé par : Professeur Jean-François ABGRALL	Indice 0	Page 8 de 8
Titre du document : <b>Physiologie de la coagulation</b>				

Le facteur tissulaire soluble (sTF) est une molécule allongée où les deux domaines fibronectine forment un angle de 120°.

- **Conformation : ISTH 2001 Morrissey, cf Schéma**

concentration plasmatique : à l'état normal, TF n'est pas exprimé par les cellules circulantes ni les cellules endothéliales. TF ne circule pas dans le plasma.

Seule protéine de la coagulation qui n'est ni activée ni inactivée par protéolyse, TF est sous forme de **dimère** à la surface des cellules non perturbées (RR Bach, Blood 1997).

Un flux calcique déclenche un processus dépendant de la calmoduline qui entraîne la dissociation du dimère de TF, ce qui modifie la structure quaternaire de TF et expose un site de liaison macromoléculaire sur le TF monomérique (cryptic dimer model of TF activation).

TF est présent dans le thrombus, sur les microparticules détachées des leucocytes (Nemerson 2000) : le TF des microparticules est transféré aux plaquettes : ce transfert dépend de CD 15-CD 62 P (P-sélectine) (Nemerson Blood juillet 2000).

## 6. Facteur VII, proconvertine

### 6.1. Présentation

- **Structure :**

glycoprotéine plasmatique faite d'une seule chaîne, PM 50 kd, 406 aa.

Le VII est synthétisé par le foie et circule dans le plasma.

Le VII comporte un domaine GLA, une partie hydrophobe, deux domaines EGF-like, un domaine sérine protéase homologue de celui de la trypsine.

La structure et l'organisation des gènes est la même que celles du IX, du X, de la PC.

- **Concentration plasmatique :**

VII : 500 ng/ml (10 nM/l) = 0,35-0,60 mg/l

VIIa : 10-100 picomole (concentration minimale maintenue par le IXa) = 0,7 % du total de VII (Morrissey ISTH 2001)


- **Demi-vie : 4-6 h**

### 6.2. Activation du VII

Tf lie VII et Ca<sup>++</sup> et produit le VIIa par clivage entre Arg 152-Ile153 : VIIa a deux chaînes. L'enzyme qui clive VII n'est pas connue (Xa ? IXa). Il n'y a pas de largage de peptide d'activation.

VII est activé par :



	Référence document : Phyl	Rédigé par : Professeur Jean-François ABGRALL	Indice 0	Page 9 de 9
Titre du document : <b>Physiologie de la coagulation</b>				

- Xa
- IXa
- XIIa
- Thrombine
- Hepsine

Le complexe TF-VIIa active le VII --> **auto-activation**

Activation du VII (Dennis MS, Nature 404 : 465-470 ; 30 mars 2000)

Le clivage du VII crée un résidu N-terminal qui peut, éventuellement, être "enfoui" sous la boucle "140 s". Ce clivage, et d'autres réarrangements associés, est insuffisant pour former un enzyme catalytiquement compétent. L'activité totale du VIIa ne survient qu'après association à son cofacteur, le TF.

Le VIIa est aussi activé par une nouvelle protéase : la FVII and single chain plasminogen activator-activating protéase (FSAP) ou plasma hyaluronan binding protein (PHBP) (Chio-Miura, JBC 1996 ; 119 : 1157-1165 ; et Roemish Blood Coag Fibrinol 1999 ; 10 : 471-479), dont la concentration plasmatique est 12 mg/l. L'activité est augmentée en présence de calcium et de glycosaminoglycans.

### 6.3. Inactivation du VIIa


- VIIa est inactivé par Xa, qui clive le site actif
- IXa et XIIa n'inactivent pas le VIIa.
- Le facteur VII (non activé) inhibe la génération de thrombine par compétition avec le VIIa pour la liaison avec le TF (van't Veer C, Blood 2000 ;95 :1330-5.).

### 6.4. Actions du VIIa

TF-VIIa active le IX (si concentration de TF basse, largue un peptide 35 aa) et le TF-VIIa active le X (si concentration élevée, largue un peptide 52 aa).

Activation du IX bovin :

	Km	Vmax
Par TF-VII	17.3 nM	0.12 nM/min

	Référence document : Phyl	Rédigé par : Professeur Jean-François ABGRALL	Indice 0	Page 10 de 10
Titre du document : <b>Physiologie de la coagulation</b>				

Par TF-VIIa	53.3 nM	4.2 nM/min
-------------	---------	------------

### 6.5. Inhibition du VIIa :

le complexe TF-VIIa est inhibé par :

- complexe TFPI-Xa, qui entraîne la stabilisation du complexe TFPI-Xa-TF-VIIa
- annexine V
- AT : L'AT se lie au complexe TF-VIIa et entraîne la dissociation du complexe. Il en résulte la formation d'un complexe AT-VIIa libre incapable de se lier au TF lié à une membrane cellulaire (réaction très lente en l'absence d'héparine) Rao LV, Blood 1995 ;85 :121-9.)
- PF4
- Sphingosine
- 

## 7. Facteur X, Stuart

### 7.1. Présentation

#### o Structure :

Le FX est une sérine protéase vitamine K-dépendante, synthétisée dans le foie sous forme d'un précurseur de 488 aa. Avant la sécrétion, 40 aa sont enlevés (-40 à -1), les 11 premiers acides glutamiques sont carboxylés. Il en résulte un zymogène à deux chaînes : chaîne légère de 139 aa et chaîne lourde de 306 aa reliées par un pont disulfure en C132-C302. La molécule est constituée de :

- chaîne légère :11 GLA résidus, une courte hélice stack, deux domaines EGF
- chaîne lourde : peptide d'activation de 52 aa en n-terminal, le domaine protéase qui contient la triade catalytique H236,D282,S379.

Le gène, situé en 13q34, contient 9 exons.

PM : 59 kDa

#### o Concentration plasmatique :

7-17 mg/l


#### o Demi-vie :

36-48 h

### 7.2. Activation du X :

Le VIIa clive X en Arg52-Ile53 largue un peptide d'activation détaché de la chaîne lourde : 52 aa, 8000-10 000 dalton, qui contient 75 % des carbohydrates du X.

le X peut être activé par IXa entraîne la génération explosive de thrombine à la surface des plaquettes.

	Référence document : Phyl	Rédigé par : Professeur Jean-François ABGRALL	Indice 0	Page 11 de 11
Titre du document : <b>Physiologie de la coagulation</b>				

le X peut être activé par VIIa entraîne petite quantité de thrombine qui active les plaquettes (Maureen Hoffman blood 1995)

200-300 sites de fixation de Xa sur plaquettes (Miletich 1977)

2300 molécules de Va et de Xa par plaquette, dont 900 sont activées.

les récepteurs du Xa sont exprimés uniquement après activation plaquettaire par la thrombine ou par venin de vipère Russell qui active le V en Va (Miletich 1978) Après activation, Xa garde ses GLA et **reste lié à la surface phospholipidique**.

le X se lie à Va **après** son activation : seul Xa se lie à Va (Rezaie JBC 1995)

Les GLA domaines de Xa ne sont pas nécessaires pour :

- interactions entre Xa et Va
- activité protéolytique de Xa

### Récepteur EPR-1 pour le Xa

effector cell protease receptor-1 (Altieri et edgington 1990)

glycoprotéine 337 aa, PM : 62-74 000 dalton

nombreux sites de clivage pour les protéases exprimées sur :

- polynucléaires neutrophiles
- monocytes
- lymphocytes NK
- 5-10 % des lymphocytes T non activés
- cellule endothéliale

fixent le Xa ; Kd = 10-15 nM

Va est indispensable pour générer de la thrombine sur les monocytes (Worfolk, blood 1992).

### 7.3. Actions de Xa

l'alpha Xa est transformé beta Xa (**par clivage par alpha Xa**)


Alpha Xa contient des carbohydrates, betaXa n'en contient pas.

- Xa coupe prothrombine entre préthrombine 2 et F1+2 et coupe dans préthrombine 2 pour former la thrombine ; et thrombine coupe entre F1 et F2 --> feed-back
- Xa active le V et le VIII
- Xa active le VII
- Xa inactive le VIIa
- Xa active la PC

### 7.4. Inactivation de Xa

par AT3 :

- très rapide en solution, très lentement en présence de lipides (Barton 1970) ; encore plus lentement quand le Va est présent (Marciniak 1973)
- **Xa lié à plaquette est totalement protégé contre action de AT3** (Miletich 1978) ; et AT3 inhibe Xa qui se détache des plaquettes

	Référence document : Phyl	Rédigé par : Professeur Jean-François ABGRALL	Indice 0	Page 12 de 12
Titre du document : <b>Physiologie de la coagulation</b>				

- Pour Han (PNAS 1998), AT3 peut inhiber Xa lié aux plaquettes

Par TFPI :

- le complexe TFPI-Xa se lie au complexe TF-VIIa
- nécessite liaison de Xa aux phospholipides (Kazama T&H 1997)
- l'assemblage de Xa dans le complexe prothrombinase augmente la réactivité avec le TFPI (Huang JBC 1993)

## 8. Formation des complexes ténase

### Présentation :

Le complexe ténase (de ten, dix) ou dixase, est un complexe membranaire enzymatique dont la fonction est d'activer le facteur X. Il est composé de VIIIa, IXa, phospholipides, Ca<sup>++</sup>.

Le fait de réunir ces deux facteurs sur une membrane, accélère les capacités enzymatiques du IXa de 100 000.

Le VIIIa, activé par la thrombine, multiplie le Kcat par 200 000.

**Schéma Blood 1997.**

## 9. Facteur VIII, anti-hémophilique A

### 9.1. présentation

**Gène** : partie distale du bras long du chromosome X, 26 exons, code pour une chaîne polypeptidique de 2351 aa : un peptide signal de 19 aa et la protéine mature de 2332 aa.

PM : 330 000 Da

Concentration plasmatique : 0,1-0,2 mg/l ; circule sous forme monocaténaire et sous forme de fragments de 200-80 kDa

Demi-vie : 10-12 h

Le facteur VIII est synthétisé par les hépatocytes

Structure : PJ Lenting Blood 1998 ;92 :3983-3994.

Glycoprotéine de structure : A1-a1-A2-B-a2-a3-A3-C1-C2 (Wood WI ; Vehar GA ; Toole JJ, Nature 1984 ;312 : 330.et Nature 1984 ;312 :337 et Nature 1984 ;312 :342.)


N-A1-A2-----A3-C1-C2-COOH

330 aa 150 aa

la partie centrale est fortement glycosylée

Le facteur VIII est protéolysé dans l'hépatocyte en Arg1313-Arg1648, produisant le facteur VIII bicaténaire (chaîne lourde A1-a1-A2-a2-B et chaîne légère a3-A3-C1-C2) qui circule dans le plasma sous forme hétérodimérique. Une molécule de cuivre est présente par molécule de VIII, jouant un rôle dans la liaison A1-A3.

Immédiatement après sa sécrétion dans le plasma, le facteur VIII se lie au facteur Willebrand, formant un complexe non-covalent solide. Chaque monomère de vWF est capable de lier une molécule de VIII avec une forte affinité (kd <

	Référence document : Phyl	Rédigé par : Professeur Jean-François ABGRALL	Indice 0	Page 13 de 13
Titre du document : <b>Physiologie de la coagulation</b>				

0.5 nMol/l). In vivo, le nombre de molécules de VIII limite le ratio à 1/50 par rapport au vWF. La liaison se fait en 2 régions du VIII : une en amino-terminal sur la chaîne légère et une en carboxy-terminal en 2303-2332.

### 9.2. Rôle de l'interaction VIII-vWF

- Empêcher la liaison prématurée du VIII sur les composants du complexe activateur du X (par exemple le IX) (affinité du VIII pour vWF est 100 fois plus grande que celle du VIII pour le IXa).
- Empêcher la protéolyse du VIII par Pca ou Xa, ce qui requiert la fixation sur une membrane, ce que le vWF empêche
- Le vWF ne protège pas le VIII du clivage par la thrombine : le VIII clivé par IIa se détache du vWF et prend sa conformation de VIII actif.
- Le vWF stabilise la structure hétérodimérique du VIII

### 9.3. Activation

Le VIII est clivé par le Xa et la thrombine en 3 sites entre Arg et Ser, dont deux sont communs :

- la thrombine clive en Arg 1689 de chaîne légère et en Arg372 et Arg740 de chaîne lourde.
- le Xa clive le VIII en Arg 336, Arg372 et Arg740.

Ce clivage détache la partie centrale de 170 kDa.

Le VIII clivé par le Xa aurait une activité moindre que le VIII clivé par la thrombine.

Les clivages en Arg372 et Arg1689 sont indispensables pour que le VIII exerce complètement son activité cofacteur.

### 9.4. Action

Le VIII est cofacteur : se lie à IXa, aux phospholipides, et au X. (Mertens K, T&H, 1999 ; 82 : 209-217). **VOIR SCHEMA**  
Le VIII et le VIIIa se lient à la surface des plaquettes ; le nombre de sites de liaison du VIII est de  $484 \pm 59$  récepteurs par plaquette, et le nombre de récepteurs du VIIIa est de 800-1000 (Ahmad SS, JBC 2000).

### 9.5. Inhibition

Le VIIIa est inhibé par le complexe (PCa-S-V).

Le VIIIa est inactivé rapidement par la plasmine.

## 10. Facteur IX, anti-hémophilique B


Le IX est une enzyme (sérine-protéase) qui forme un complexe enzymatique (ténase) à la surface des plaquettes par association à son cofacteur le VIIIa et au calcium, qui a pour rôle d'activer le facteur X.

#### a. Gène :

Le gène du IX est situé sur le chromosome X en xq26-q27, occupe 33,5 kb et comporte 8 exons (Yoshitake 1985).

#### b. Structure : voir NEJM Juin 2001

Le IX est une sérine-protéase, vitamine K dépendante, de PM : 57 kDa, comportant 415 aa. Le IX est constitué d'un domaine GLA, de 2 domaines EGF, d'un domaine d'activation et du domaine sérine protéase. Le pré-pro-peptide est clivé avant la sécrétion, puis il y a des modifications post-transcriptionnelles :

	Référence document : Phyl	Rédigé par : Professeur Jean-François ABGRALL	Indice 0	Page 14 de 14
Titre du document : <b>Physiologie de la coagulation</b>				

- gamma-carboxylation des 12 premiers glutamates,
- O-glycosylation sur Ser53, Ser61, Thr159 et Thr169,
- N-glycosylation sur Asn157 et 167
- $\beta$ -hydroxylation en Asp64.  
Contient hexose, hexosamine, acide sialique.

c. **Concentration plasmatique** : 3-5 mg/l

d. **Demi-vie** : 24 h

## 10.1. Activation :

### 10.1.1. Le IX est clivé par le XIa :

- premier clivage : Arg145-Ala146, ce qui sépare EGF2 du peptide d'activation --> IX inactif à 2 chaînes
- deuxième clivage : Arg180-Val181 --> IXa beta et libération du peptide d'activation de 11 000 da du N-terminal, qui contient 50 % des carbohydrates du IX. Ce clivage enlève un peptide entre résidus 146 et 180 (Tuddenham, 1994 Oxford university press).

Le IXa est une molécule à 2 chaînes réunie par des ponts disulfures : la chaîne légère est composée de GLA-EGF1-EGF2, et la chaîne lourde du site protéase. Cette activation du IX par le XI se fait sur la surface des plaquettes. XIa peut aussi cliver directement Arg180-Val181 --> IXa alpha. RVV (venin de vipère Russell) clive le IX en Arg180-Val181 --> IXa alpha.

### 10.1.2. Le IX est clivé par le VIIa :

ce qui génère les mêmes produits qu'un clivage par IXa.

### 10.1.3. Le IX peut être activé par :

- kallicréine (Osterud 1975)
- Xa (Kalousek 1975) : 20 % par rapport à activation par le XIa à confirmer

Le IX est en compétition avec le X pour le site actif du VIIa ( $K_i$  (app) = 154 nM)

L'activation du IX par VIIa dépend de la concentration en thromboplastine :  $K_m$  87-243 nM ;  $K_{cat}$  = 0,4 S<sup>-1</sup>


Activation du X par VIIa :  $K_m$  = 88-433 nM ;  $K_{cat}$  : 5,2 S<sup>-1</sup>

Le IXa se lie à la phosphatidylsérine par les GLA, avec une affinité de  $K_d$  = 15 nM.

## 10.2. Inhibition

Le IXa est inhibé par AT, et forme un complexe 1 :1 (AT3 est fortement attachée à la chaîne lourde).

**La transformation de IX en IXa est inhibée par la protéase nexine II (PN2) (Walsh ISTH 2001 p 77).**

	Référence document : Phyl	Rédigé par : Professeur Jean-François ABGRALL	Indice 0	Page 15 de 15
Titre du document : Physiologie de la coagulation				

## 11. Complexe Prothrombinase

Le complexe prothrombinase est un complexe enzymatique formé à la surface des plaquettes, et composé d'une enzyme, le facteur Xa ; d'un cofacteur, le Va ; de phospholipides, le Xa et le Va étant reliés aux phospholipides par le calcium Ca<sup>++</sup>.

Ce complexe est 100 000 fois plus actif que l'enzyme (Xa) seul.

### Caractéristiques du complexe :

- Par rapport à Xa seul, diminution du Km de 100 fois, et du Kcat de 3000 fois --> activation x 100 000
- Si présence de Va au lieu de V : Kcat x 700
- Prothrombinase : 2700 sites par plaquette activée
- La concentration de prothrombinase est limitée par la concentration de Xa, et non par :
  - déplétion du substrat
  - inactivation du Va
  - nombre de sites par plaquette
- La fin de l'activité de la prothrombinase est due à l'inactivation du Xa

## 12. Facteur V, proaccélélerine

- PM : 330 000 kDa
- Deux formes circulantes : forme monocaténaire de PM : 330 000 ; et une forme plus petite 200-280 000 dont la partie centrale a été excisée (entre A2 et A3)
- Demi-vie : 12-36 h

### 12.1. Structure

- Contient 3 domaines A (330 aa) ; 2 domaines C (150 aa)  
N-A1-A2-----A3-C1-C2--COOH
- Concentration plasmatique : 5-10 mg/l = 21 nM

Le V est présent dans le plasma et dans les granules alpha des plaquettes. Le V est fortement glycosylé en N- et O- : 13-25 % de la masse ; il contient 37 sites potentiels de N-glycosylation dont 25 sont situés dans le domaine B. La chaîne lourde a 9 sites et la chaîne légère 3 sites. La chaîne carbohydre latérale en Asn2181 diminue l'interaction entre le V et la membrane phospholipidique.

Le V existe sous 2 formes : V1 et V2

V1 est un peu plus long que V2

Le ratio V1/V2 est de 3/7 = 0.37


L'hétérogénéité réside dans la chaîne légère .

En SDS il y a un doublet : V1a = 74 Kda et V2a = 71 Kda

Va1 : 3 chaînes carbohydrates N-linkées ; Va2 : 2 chaînes carbohydrates

Ces 2 formes diffèrent par leurs fonctions :

- liaison aux phospholipides : Va1 se lie moins bien aux phospholipides négatifs que Va2

	Référence document : Phyl	Rédigé par : Professeur Jean-François ABGRALL	Indice 0	Page 16 de 16
Titre du document : <b>Physiologie de la coagulation</b>				

- cofacteur de Pca : V1 est moins efficace que V2

Va1 produit plus de thrombine que Va2.

- **Structure :**

chaîne lourde 105 000

Chaîne légère 71-74 000

Carbohydrates : 20 % de la masse

Se lie à phospholipides par chaîne légère

## 12.2. Activation du V

**Activé initialement par Xa** Arg710-Ser et Arg1545-Ser Activé par faibles concentrations de thrombine

- à la surface des plaquettes il y a 2300 molécules de Va et de Xa dont seulement 900 sont actives
- le V des granules alpha n'occupe que 200 sites sur la plaquette et permet la liaison de 200 molécules de Xa (sur plaquette stimulée par la thrombine)

## 12.3. Action du V

- **action procoagulante :**

Complexe prothrombinase

Va se lie à la prothrombine (Luckow EA Biochemistry 1989)

Va clivé par PCa ne peut plus lier la prothrombine (Luckow 1989)

Le V ne se lie pas à la prothrombine ni au Xa (Bloom p 152 et MC Guillin 1977) ; mais Va se lie à prothrombine et à Xa.

V et Va se lient tous deux aux phospholipides chargés négativement (phosphatidylsérine, ph-inositol, cardiolipine, Ph-glycérol, acide phosphatidique (Bloom p 152).

Le V doit être activé par la thrombine pour que le complexe Xa-Va-phospholipide-calcium se forme. La thrombine doit donc être initialement formée par le Xa **sans Va**. Ceci permet une régulation : **la thrombine est formée par le Xa lié uniquement au phospholipide, et peut être inhibée par AT3 ou un autre inhibiteur AVANT l'activation du V en Va.**

Est le récepteur du Xa, quand V est activé (Va)

- **action anticoagulante :**

le V se lie à Protéine S et est un cofacteur synergique de l'inhibition du VIIIa par la protéine C activée (Dahlback 1994)

## 12.4. Inactivation du V


Le facteur Va est inhibé par la protéine C activée PCa.

La PCa clive le Va en deux sites : Arg306 et Arg506--> QS ? ? ? ? ? ?

Le facteur V est clivé en Arg306 (chaîne lourde). Ce clivage dépend des phospholipides (Kalafatis JBC 1994 ;269 :31869.)

//////NCI/////



	Référence document : Phyl	Rédigé par : Professeur Jean-François ABGRALL	Indice 0	Page 17 de 17
Titre du document : <b>Physiologie de la coagulation</b>				

### 13. Formation de la thrombine (Thrombinoformation)

La thrombine est l'enzyme-clé de la coagulation car c'est elle qui transforme un liquide (le plasma contenant le fibrinogène) en un gel (les polymères de fibrine).

La thrombine provient du clivage de la prothrombine effectué par le facteur Xa.

### 14. Prothrombine, facteur II

#### 14.1. Présentation

- Poids moléculaire : 72 kDa
- Concentration plasmatique : 100-150 mg/l
- Demi-vie : 50-120 h
- **Structure** moléculaire :
  - La prothrombine est formée de 3 kringles ou boucle due à la présence de 3 ponts disulfure (Magnusson)


#### 14.2. Activation

- Liaison du fragment 1 sur phospholipide via Ca<sup>++</sup>, x 50 activation par Xa
- Activation : par Xa, libère peptide F1+2 par clivage en Arg274-Thr275 et Arg323-Ile324
- Prothrombine --> 274 préthrombine 2 (une seule chaîne) -->323 --> thrombine
- Prothrombine -->323 meizothrombine (2 chaînes)-->274--> thrombine
- Fragment 2 :
- 1 site de fixation sur Va (fixation x 350fois la formation de thrombine par Xa)
- 2 fragment 1+2 : lié de façon non covalente à préthrombine 2 après 1er clivage par Xa --> génération rapide de thrombine par Xa lié à Va.

### 15. Thrombine : Facteur IIa

La thrombine est formée de deux chaînes, chaîne légère de 36 aa et chaîne lourde de 259 aa. La thrombine alpha a une forme globulaire et a un profond canyon (Stubbs MT, Thromb.Res 1993 ;69 :1-58.) contenant le site réactif Ser195-His57-asp102. Ce site actif est donc peu accessible aux substrats macromoléculaires. Le site actif est fermé au nord par la boucle Tyr60A-Pro60B-Pro60C-Trp60D (YPPW) qui est unique à la thrombine, et est conservée dans les 11 thrombines connues dans le monde animal. Ceci joue un rôle dans la restriction de l'approche de plusieurs protéines. Au sud, la boucle trp148 s'oppose à YPPW et joue un rôle dans la coagulation : elle est clivée par la cathepsine G, l'élastase, et par autocatalyse.

Après activation, thrombine se détache du phospholipide (par perte ses GLA-résidus du fragment 1). Sur la membrane, prothrombine se lie au complexe prothrombinase.

	Référence document : Phyl	Rédigé par : Professeur Jean-François ABGRALL	Indice 0	Page 18 de 18
Titre du document : <b>Physiologie de la coagulation</b>				

## 15.1. Action de la Thrombine

### o **Activités procoagulantes :**

Ila active prothombine, V, VIII, XI, XIII, agrégation plaquettaire, clive le fibrinogène In vitro : formation de thrombine débute quelques secondes après le prélèvement, mais il faut environ 20 mn pour avoir suffisamment de thrombine pour observer la formation de fibrine (Shuman et Majerus 1976)

### o **Activités anticoagulantes :**

La thrombine (IIa) active PC en PCa, augmente production de tPA, augmente production par cellule endothéliale de : xxxxxxxx

### o **Activités pro-aggrégantes :**

Il y a des récepteurs de thrombine sur :

- sur plaquettes :
- sur cellules endothéliale
- sur PN
- sur monocytes
- sur lymphocytes

Thrombine : 500 sites de haute affinité sur plaquettes, 50 000 sites de faible affinité sur plaquettes.

Il y a 5 récepteurs de la thrombine sur les plaquettes :

- PAR-1
- PAR-4
- Glycoprotéine Ib
- Glycoprotéine V
- " site de liaison de haute affinité "

L'interaction thrombine /plaquette a lieu par l'intermédiaire de résidus critiques K248 et R245

**Schéma (Hall SW, JBC 1999 ;274 :25510.)**


## 15.2. Inactivation de la thrombine

La Thrombine est inactivée par : alpha2 macro, AT3, HC II, ...

Lorsque la thrombine alpha est liée à la fibrine polymérisée, le site actif de la thrombine est modifié, et l'AT3 inhibe plus facilement la thrombine liée que la thrombine circulante (respectivement  $4,2 \times 10^4$  M-1s-1 vs  $1,5 \times 10^4$  M-1s-1) Naski MC J Biol Chem 1990 ;265(3) :1401-7.

## 16. Formation de la fibrine

La fibrine est formée par clivage du fibrinogène par la thrombine.

	Référence document : Phyl	Rédigé par : Professeur Jean-François ABGRALL	Indice 0	Page 19 de 19
Titre du document : <b>Physiologie de la coagulation</b>				

La thrombine détache les fibrinopeptides a puis b des chaînes du fibrinogène, pour former les monomères de fibrine. Les monomères de fibrine se polymérisent spontanément pour former des fibres de fibrine. Le facteur XIII entre ensuite en jeu pour renforcer les liaisons entre les monomères et stabiliser la fibrine.

## 17. Fibrinogène

Fibrinogène : Facteur I

La coagulation est la transformation d'un liquide (le plasma) en gel. La molécule responsable de cette transformation est le fibrinogène, qui circule dans le plasma, et qui gélifie sous l'action de la thrombine qui le transforme en fibrine.

### 17.1. Gène

Le fibrinogène est synthétisé dans le foie.

Chacune des 3 chaînes est codée par un gène différent : FGA, FGB, FGG tous situés sur le chromosome 4q26-qter (Humphries, 1984).

FGA : 5 exons ; un sixième exon est responsable de la chaîne  $\alpha E$  du Fg 420 (Fu, 1992)

FGB : 8 exons, orienté dans le sens contraire de la transcription des FGA et FGG.

FGG : 10 exons

### 17.2. Concentration

La concentration plasmatique est de 2-4 g/l. le fg est une protéine de phase aigue, l'expression du gène est contrôlée par un élément répondant à l'IL-6.

Les plaquettes contiennent un pool de Fg dans leurs granules  $\alpha$ .


La demi-vie du Fg est de 3-4,5 jours.

Les fragments D et E du Fg obtenus par la plasmaine, ont un rôle sur les cellules de Kuppfer les conduisant à produire de l'IL-6 qui stimule les hépatocytes.

### 17.3. Structure

Le fibrinogène est une protéine hexamère faite de 3 chaînes différentes reliées entre-elles :  $A\alpha$ ,  $B\beta$ ,  $\gamma$  (Bloom p174). La forme principale de fg a un PM de 340 kDa (fibrinogène 340), une concentration plasmatique de 2-4 g/l. En microscopie électronique, la molécule de fg apparaît comme formée de deux sous-unités identiques reliées par des ponts disulfures, donnant à la molécule une forme de fibre comportant 3 globules : un central (domaine E) et deux distaux (domaines D) . La molécule entière contient 2964 aa : 610 aa pour la chaîne  $\alpha$ , 461 aa pour la chaîne  $\beta$ , , et 411 aa pour la chaîne  $\gamma$ . Le fg contient 4 chaînes polysaccharidiques.

Fibrinogène 420 : Dans le plasma normal, il existe une autre forme que le fibrinogène normal (fibrinogène 340) : le Fg 420 qui représente 1 % du total plasmatique dont le PM est 420. Les chaînes  $\alpha$  sont ici remplacées par des chaînes  $\alpha$

	Référence document : Phyl	Rédigé par : Professeur Jean-François ABGRALL	Indice 0	Page 20 de 20
Titre du document : <b>Physiologie de la coagulation</b>				

plus longues de 236 aa, appelées  $\alpha E$  (Fu Y, Biochemistry ;1995 ;30 :71-76 ; and Grieninger G, Ann NY Acad Sci, 2001 ;936 :44-64).

#### 17.4. Formation de la fibrine

La thrombine clive la partie amino-terminale des chaînes  $A\alpha$  et  $B\beta$ , libérant les fibrinopeptides A et B (d'abord le A puis le B) dans le nodule central E pour former un monomère de fibrine (Blombäck B, Nature, 1978 ;275 :501-505). Dès que les monomères sont formés, ils polymérisent spontanément, formant des protofibrilles.

La nouvelle chaîne amino-terminale formée (site de polymérisation A = séquence Gly-Pro-Arg) du nodule central d'une molécule de fibrine se lie au site " a " de la partie carboxy-terminale de la chaîne  $\gamma$  ( nodule externe) d'une autre molécule de fibrine (Medved LV, FEBS Lett.1993 ;320 :239-242).

L'interaction A-a aligne les monomères de fibrine en double ligne (half molecule-staggered, double stranded protofibrils) : *les protofibrilles*. Il y a donc aboutement de deux domaines D de deux monomères adjacents intéressant Arg275, Tyr280 et Ser300 des deux chaînes  $\gamma$  à la surface des deux domaines D. La région C-terminale des chaînes  $\alpha$  ne sont pas liées, et interagissent avec leurs homologues sur d'autres protofibrilles pour former des fibres épaisses (Matsuda M, Ann NY Acad Sci, 2001 ;936 :65-88). Puis les fibrilles s'accroissent en largeur pour former des *fibres* : ceci concerne l'interaction entre le site B de polymérisation d'une chaîne  $\beta$  avec le site " b " dont la localisation n'est pas encore précise. Cette polymérisation sera très tôt renforcée (au stade de fibrilles) par le XIIIa qui va créer des liaisons fortes entre les monomères : rapidement entre les chaînes  $\gamma$ , et plus lentement entre les chaînes  $\alpha$  (Francis CW, Clin Invest, 1987 ;80 :1459-1465).

Le rôle exact du Fg420 est en cours d'étude.

Le fibrinogène se lie sur l'exosite de la thrombine : par les résidus 27-50 de la chaîne  $A\alpha$ , 15-42 de la chaîne  $B\beta$  et 8-23 de la chaîne  $\gamma$  (Binnie, 1993).

#### 17.5. Fonctions du fibrinogène

- conversion du Fg en fibrine (voir plus loin)
- interaction avec le XIII

Le XIIIa crée des ponts entre lysine et glutamine de chaînes  $A\alpha$  et  $\gamma$ , rendant le caillot plus solide et résistant à l'action de la plasmine.

- interaction avec la fibronectine


Le XIIIa lie la fibronectine aux chaînes  $A\alpha$  dans le plasma.

- interaction avec le système fibrinolytique

l'activation du plasminogène par le tPA est dépendant de la fixation de ces deux molécules sur la fibrine.

- interaction avec les plaquettes

Les plaquettes activées lient le Fg de manière spécifique. Le récepteur est le complexe des GP IIb/IIIa qui lie une séquence de la chaîne  $\gamma$ . La chaîne  $A\alpha$  contient une séquence RGDF 95-98 et RGDS 572-575 qui se lient à GP IIb/IIIa. Ceci joue un rôle dans la stabilité du caillot et dans la rétraction du caillot.

	Référence document : Phyl	Rédigé par : Professeur Jean-François ABGRALL	Indice 0	Page 21 de 21
Titre du document : <b>Physiologie de la coagulation</b>				

- interaction avec la thrombospondine :

A la surface des plaquettes, le Fg se lie à la thrombospondine (TSP) relarguée des granules  $\alpha$ , qui vient ainsi renforcer la liaison du Fg au complexe GP IIb/IIIa. La liaison se fait avec la chaîne A $\alpha$  en 113-126 et la chaîne B $\beta$  en 243-252.

## 18. Fibrine : Facteur la

La fibrine est une molécule de fibrinogène d'où ont été clivés, par la thrombine, d'abord les fibrinopeptides a puis les fibrinopeptides b. Il se forme ainsi un monomère de fibrine. Les monomères de fibrine se lient entre eux de manière anti-parallèle et bout à bout pour former des polymères de fibrine.

### 18.1. Formation de la fibrine :

La thrombine clive la partie amino-terminale des chaînes A $\alpha$  et B $\beta$ , libérant les fibrinopeptides A et B (d'abord le A puis le B) dans le nodule central E pour former un monomère de fibrine (Blombäck B, Nature, 1978 ;275 :501-505). Dès que les monomères sont formés, ils polymérisent spontanément, formant des protofibrilles. La nouvelle chaîne amino-terminale formée (site de polymérisation A = séquence Gly-Pro-Arg) du nodule central d'une molécule de fibrine se lie au site "a" de la partie carboxy-terminale de la chaîne  $\gamma$  (nodule externe) d'une autre molécule de fibrine (Medved LV, FEBS Lett.1993 ;320 :239-242). L'interaction A-a aligne les monomères de fibrine en double ligne (**half molecule-staggered, double stranded protofibrils**) : les protofibrilles. Il y a donc aboutement de deux domaines D de deux monomères adjacents intéressant Arg275, Tyr280 et Ser300 des deux chaînes  $\gamma$  à la surface des deux domaines D. La région C-terminale des chaînes  $\alpha$  ne sont pas liées, et interagissent avec leurs homologues sur d'autres protofibrilles pour former des fibres épaisses (Matsuda M, Ann NY Acad Sci, 2001 ;936 :65-88). Puis les fibrilles s'accroissent en largeur pour former des fibres : ceci concerne l'interaction entre le site B de polymérisation d'une chaîne  $\beta$  avec le site "b" dont la localisation n'est pas encore précise. Cette polymérisation sera très tôt renforcée (au stade de fibrilles) par le XIIIa qui va créer des liaisons fortes entre les monomères : rapidement entre les chaînes  $\gamma$ , et plus lentement entre les chaînes  $\alpha$  (Francis CW, Clin Invest, 1987 ;80 :1459-1465).

Le rôle exact du Fg420 est en cours d'étude.

Le fibrinogène se lie sur l'exosite de la thrombine : par les résidus 27-50 de la chaîne A $\alpha$ , 15-42 de la chaîne B $\beta$  et 8-23 de la chaîne  $\gamma$  (Binnie, 1993).

### 18.2. Stabilisation de la fibrine

Les polymères de fibrine, formés spontanément, ne sont pas très solides. Le facteur XIII va renforcer les liaisons entre monomères en créant de liaisons covalentes : il stabilise la fibrine.


## 19. Facteur XIII : facteur stabilisant de la fibrine

Le facteur XIII est une transglutaminase qui agit sur les polymères de fibrine pour y apporter des liaisons covalentes fortes afin de le renforcer et de la stabiliser, le rendant plus résistant à l'action de la plasmine.

### 19.1. Gène

Le gène de la sous-unité a est situé sur le chromosome 6p24-25 et comporte 15 exons.

Le gène de la sous-unité b est situé sur le chromosome 1q32-q32.1 et comporte 12 exons.

	Référence document : Phyl	Rédigé par : Professeur Jean-François ABGRALL	Indice 0	Page 22 de 22
Titre du document : Physiologie de la coagulation				

## 19.2. Concentration plasmatique

70 nM/l

La concentration plasmatique de XIIIa augmente avec l'âge, le genre féminin, le tabac.

## 19.3. Structure

Le XIII est une glycoprotéine de 320 kDa, circulant sous forme d'un tétramère constitué de deux sous-unités A et deux sous-unités B : A<sub>2</sub>B<sub>2</sub> (Ichinose A, T&H 2001 ;86 :57-65).

- La sous-unité A a une forme de globule, un PM de 75 kDa, 731 aa.

La sous-unité A est composée de 5 domaines : un peptide d'activation, un  $\beta$ -sandwich, un core central et deux régions "barrel"

- La sous-unité B a une forme de filament, un PM de 80 kDa, contient 641 aa dont 10 tandem repeats de 60 aa ou domaines sushi (ou SCR, short consensus repeat ; ou GP-I, motifs de glycoprotéine de type 1).

Un domaine sushi comporte 4 cystéines formant 2 ponts disulfures entre Cys 1 et Cys 3 et entre Cys 2 et Cys 4. Les sushi sont essentiels pour la liaison d'un ligand à son récepteur (Bottenus RE, Biochemistry 1990 ;29 :11195-209). Le XIII, les chaînes  $\beta$  de la C4bBP et la  $\beta$ -2-glycoprotéine 1 sont les seules protéines de la coagulation à avoir des sushis.

Le XIIIb est synthétisé par le foie, le XIIIa est synthétisé par le placenta, les macrophages et les mégacaryocytes. XIIIa est présente dans les plaquettes.

La demi-vie est de 52-55 heures.

Le site actif est porté par la sous-unité A.

## 19.4. Activation

Le XIII est activé par la thrombine :


- la thrombine clive d'abord un peptide de PM 4000 sur la sous-unité a en Arg-Gly de la partie n-terminale : a<sub>2</sub>b<sub>2</sub> -->a'<sub>2</sub>b<sub>2</sub>
- activation calcium-dépendante : en présence de calcium, il y a d'abord une dissociation du complexe a'<sub>2</sub>b<sub>2</sub> -->a'<sub>2</sub> + b<sub>2</sub> ; puis le résidu cystéine essentiel est démasqué dans le site réactif , XIIIa
- le Fg promeut l'activation du XIII : dissociation de la sous-unité b

## 19.5. Action

Le XIII est une transglutaminase qui crée des ponts  $\epsilon$ -( $\gamma$ -glutamyl)lysine, qui est une liaison covalente, conduisant au "cross-linking". Le XIII fait des liaisons covalentes entre les monomères de fibrine, et cross-link la fibrine avec d'autres protéines : fibronectine, alpha2-antiplasmine, collagène.

Le XIII joue un rôle dans l'hémostase, la cicatrisation, le maintien de la grossesse.

- stabilisation du fg à la destruction mécanique par les ponts glutaminyl-lysyl
- résistance à la lyse

	Référence document : Phyl	Rédigé par : Professeur Jean-François ABGRALL	Indice 0	Page 23 de 23
Titre du document : <b>Physiologie de la coagulation</b>				

## 19.6. Inhibition

## 20. Facteur XI, plasma thromboplastin antecedent

PM : 160 kDa ; 607 aa

Concentration plasmatique : 3-6 mg/l

Demi-vie : 40-80 h

Structure : Le XI est une glycoprotéine formée de deux chaînes de 80 Kda chacune, reliées par des ponts disulfures.

????????????????????

Le XI a 4 domaines "apple" A1 à A4.

Le XI est présent dans la membrane plaquettaire.

Gène : le gène du XI est porté par le chromosome 4 en 4q35.

Le XI circule dans le plasma sous forme d'un homodimère de PM 143 kDa ; le XI est sous forme d'un complexe avec le kininogène de haut PM, ce qui facilite la liaison aux surfaces négatives et l'activation du XI par le XIIa.

### 20.1. XI plaquettaire

Le XI plaquettaire représente 0,5 % de l'activité totale du XI sanguin.

Il est normal dans les déficits en XI. Il se substitue au XI plasmatique dans l'hémostase.

PM : **220 kDa, donc différent du**

**XI plasmatique** (produit de l'épissage alternatif du gène du XI o— manque l'exon V. l'ARNm du XI existe dans les mégacaryocytes et dans les plaquettes.

### 20.2. Activation

Le XI est activé par :

- o la thrombine
- o le XIa en addition avec le XIIa (Walsh PN, T&H 1999 ;82 (2) :234-242.)

Le XI subit une protéolyse limitée par le XIIa, clivant le XI en XIa qui a deux chaînes lourdes et deux chaînes légères (qui portent le site réactif).


Le XI est activé par la thrombine, lorsque la thrombine est liée au caillot de fibrine, ce qui accélère la cascade intrinsèque.

Le clivage a lieu en Arg369-Ile370, conduisant ... une protéine avec une chaîne lourde de 269 aa et une chaîne légère de 238 aa qui porte le site actif.

Le XI se fixe sur les plaquettes et y est activé par la thrombine (Oliver 1999).

Le XI se dimérise, et l'apple 4 est critique pour la dimérisation (ISTH # 2760).

Liaison aux plaquettes : kd= 20 nM. **Schéma : #2760**

	Référence document : Phyl	Rédigé par : Professeur Jean-François ABGRALL	Indice 0	Page 24 de 24
Titre du document : <b>Physiologie de la coagulation</b>				

Après activation, le Xla reste lié ... la surface et clive le IX. Le domaine app1 lie HMWK et thrombine, et K2 de prothrombine.

A2 et A3 : interaction avec son substrat le IX.

A3 se lie ... la plaquette et ... l'héparine( les plaquettes activées expriment des sites de haute affinité pour le XI, qui requièrent la présence de HK et Zn<sup>++</sup>, ou prothrombine et Ca<sup>++</sup>).

A4 médie la formation de l'homodimère (pont disulfure entre les 2 cys321).

Le Xla clive le IX et le XI (Walsh 1999).

La protéase nexine II se lie au site catalytique et utilise l'héparine pour assembler le complexe PNII/Xla. La surface physiologique sur laquelle le XI est activé est la surface de la plaquette activée. L'activation plaquettaire entraîne la génération de sites de liaison de haute affinité (Kd = 10 nM) pour le Xla ... raison de 1500 sites par plaquette, en présence de HK et de Zn<sup>++</sup>. HK se lie ... A1 du XI, modifie la conformation du XI et expose dans A3 un site de liaison aux plaquettes qui se lie directement ... la membrane plaquettaire. La prothrombine avec le calcium peut se substituer ... HK+Zn comme cofacteur de liaison du XI aux plaquettes (Baglia, Biochemistry 1998). Ceci entraîne l'activation du XI par des traces de thrombine (Walsh)

La plaquette activée a aussi des sites de haute affinité pour le IX : il y a donc activation du IX sur les plaquettes activées.

### 20.3. Activation du XI sur la cellule endothéliale

Le XI est structurellement très semblable à la prékallicréine (PK) (qui s'active sur la cellule endothéliale (Schmaier T&H août 1999). Le XI a besoin de HK pour se lier ... la cellule endothéliale (CE). L'activation de XI sur CE requiert HK et une concentration optimale de Zn<sup>++</sup> (7-10microM). Le XI ne s'auto-active pas sur CE. L'enzyme qui active le XI est une antipain-sensitive cystéine-protéase. Ceci est un nouveau mécanisme d'activation du XI sur CE, indépendant de alpha-thrombine et de XIIa.

### 20.4. Action

Le Xla active le IX, le XII, le plasminogène.

Le Xla peut quitter la surface et activer le IX dans la phase fluide ou sur des micelles phospholipidiques.

Le Xla active le IX à la surface des plaquettes.


Le IX se fixe sur l'app1 3.

### 20.5. Inhibition

Le Xla plasmatique est inhibé par : l'AT3, l'1protéase inhibiteur, le Ci inhibiteur, l'2-antiplasmaine, le PAI-1 et le PCI (inhibiteur de la Protéine C).

Dans l'environnement des plaquettes et des cellules endothéliales, le Xia est inactivé par des inhibiteurs sécrétés par



	Référence document : Phyl	Rédigé par : Professeur Jean-François ABGRALL	Indice 0	Page 25 de 25
Titre du document : <b>Physiologie de la coagulation</b>				

les plaquettes : protéase-nexine 2 (PN2 inhibe XIa,  $K_i = 2,9-4,5 \times 10^{-10}$  M). Cette inhibition est augmentée par l'héparine.

Le XIa lié aux plaquettes est protégé de l'inhibition par PN2 et ?PI.

XIa est inhibé en solution ou sur la cellule endothéliale qui porte des GAGs héparane-sulfates.

**Schema du XI in Walsh T&H 1999**

## 21. Protéase-nexine 2

Le gène de APP (amyloid beta protein precursor) ou PN2 est localisé sur le chromosome 21 et code pour au moins 3 ARNm différents par épissage alternatif. PN2 contient un domaine homologue aux inhibiteurs de protéases de type Kunitz (KPI) (Ponte P, 1988 Nature ;331 :525-527.). Elle est aussi le précurseur de la beta-protéine amyloïde APP.

PM : 120 kDa

La PN2 est présente dans les granules  $\alpha$  des plaquettes, son PM est de 94 kDa, sa concentration est de 1 nM sécrété par 108 plaquettes.

- PN2 inhibe le XIa (Smith, 1990 Science, 248 ;1126-1128.), avec un  $K_i=250-400$  pM.

Cette inhibition est réversible.

La capacité de PN2 à inhiber le XIa est 71 fois plus puissante que celle de l'AT3. HK (HMWK) protège XIa de l'inactivation par PN2 tandis que  $Zn^{2+}$  augmente l'inhibition du XIa par PN2 (Scandura JM, Biochemistry 1997 ;36 :412-420.). en présence de plaquettes activées, c'est l'effet protecteur de HK qui prédomine, avec prolongation de la demi-vie du XIa. Bien que réversible, l'inhibition de XIa par PN2 est plus efficace que l'inhibition par d'autres serpinés (van Nostrand, JBC 1990 ;265 :9591-9594 abstract). PN2, très abondante dans les plaquettes, apparaît comme le premier inhibiteur physiologique du XIa dans le plasma (van Nostrand, Science ;248 :745-748.).

Le XIa clive PN2 dans la séquence RHDS, à faible concentration de Xia (nanoM), ce qui abolit l'activité adhésive cellulaire de PN2.

- PN2 inhibe aussi le IXa (Schmaier, 1993 JCI ;92 :2540-2545.).
- PN2 inhibe le Xa ( $K_d=10^{-8}$  M) aussi bien le Xa libre que le Xa dans le complexe prothrombinase, avec la même efficacité que l'AT en présence d'héparine (Mahdi F, JBC 1995 ;270 :23468-23474.). PN2 et Xa forment un complexe 1 :1, et Xa clive PN2.


PN2 est donc un puissant inhibiteur d'enzymes sur les membranes.

- Le KPI de PN2 est inhibiteur de TF-VIIa (Dennis, 1994, JBC 269 :22129-22136 abstract). PN2 et son KPI inhibent VIIa et TF-VIIa ( $K_i$  10-7M) (Mahdi F, Thromb Res 2000, 99 :267-76.)

En présence d'héparine, AT3 est l'inhibiteur naturel de Xa, et en l'absence d'héparine, l'inhibiteur naturel du Xa est PN2 (Mahdi).

## 22. Protéase-nexine 1

PN1 est une protéine des granules  $\alpha$  plaquettaires, qui est exprimée à la surface des plaquettes (Gronke, JBC 1987 ;262 :3030-3036.). PN1 n'est pas aussi abondante que PN2 dans les plaquettes.

	Référence document : Phyl	Rédigé par : Professeur Jean-François ABGRALL	Indice 0	Page 26 de 26
Titre du document : <b>Physiologie de la coagulation</b>				

PN1 inhibe XIa dans le plasma (Knauer DJ, JBC 2000 ;275 :37340-6.)

L'inhibition de XIa par PN1 est 10 fois plus rapide que l'inhibition par C1 Inhibiteur (Knauer 2000).

## 23. Phase contact

### 23.1. Les acteurs de la phase contact

La phase contact est l'ensemble des événements survenant depuis le contact avec une surface chargée négativement (verre, kaolin, silice, plaquettes, cellules endothéliales).

La phase contact met en jeu : le facteur XII, la prékallicroïne et la kallicroïne, le kininogène de haut poids moléculaire (HMWK).

### 23.2. Activation de la phase contact

- **Colman RW, T&H 1999 ;82 :1568-1577.**

In vitro (dans TCA et sur surfaces artificielles): XII est auto-activé en XIIa, et XIIa clive PK par protéolyse limitée pour obtenir kallicroïne.

In vivo : HK se lie à cellule endothéliale, ○— il est associé à PK sous forme de complexe non-covalent. PK est activée par une cystéine protéase de la cellule endothéliale en kallicroïne qui clive la pro-urokinase en urokinase et le facteur XII en XIIa.

- **Schmaier AH, T&H août 1999 washington**

HK (HMWK) se lie à CK1 (cytokératine 1), glycoprotéine de la membrane de la cellule endothéliale de PM 54 kDA, seulement en présence de Zn<sup>++</sup>.

CK1 est aussi présent dans la membrane de PN et des plaquettes. HK se lie à u-PAR : u-PAR est présent sur PN et cellule endothéliale, mais pas sur plaquettes.

GC1qR est une protéine mitochondriale qui lie le XII.

HK interagit en plus avec deux protéines sur la plaquette : PAR-1 et GP Ib-IX-V. La kallicroïne se lie à PAR-1 et **empêche la thrombine de se lier sur la plaquette** et la cellule endothéliale.


La majorité de PK et de XI circule dans le plasma, complexé à HK.

**HK est le récepteur cellulaire du XI sur la plaquette et la cellule endothéliale.**

Sur la cellule endothéliale, il existe un mécanisme indépendant du XII qui active PK en K : c'est dû à une cystéine protéase qui requiert Zn<sup>++</sup>. L'activation de PK survient quand PK se lie à HK sur les cellules. Il n'y a pas d'auto-activation du XII sur la cellule endothéliale : il y a d'abord activation de PK puis du XII (sur les surfaces artificielles il y a d'abord activation du XII puis du système).

--> l'activation de PK est la 1ère étape critique pour l'activation physiologique du système kallicroïne/kinine à la surface de la cellule endothéliale. Sur la cellule endothéliale, le XII est activé en 18 mn (l'auto-activation se fait en 120 mn).

Le XII se lie fortement sur les surfaces (**à préciser**).

	Référence document : Phyl	Rédigé par : Professeur Jean-François ABGRALL	Indice 0	Page 27 de 27
Titre du document : <b>Physiologie de la coagulation</b>				

La kallikréine s'associe au HMWK et se place très près du XII ce qui entraîne la génération de  $\alpha$ XIIa qui active la prékallikréine (PK) et le XI (qui sont apportés par la protéine porteuse : HMWK). Il y a activation réciproque de XII et PK.

PK génère  $\beta$ XIIa à partir du  $\alpha$ XIIa :  $\beta$ XIIa quitte la surface et **active PK dans la phase fluide**. Une partie des molécules de kallikréine quitte la surface pour aller activer le XII lié à d'autres surfaces. Il existe une auto-activation du XII, qui est lente et nécessite la présence de traces de XIIa.

### 23.3. Actions

Le XIIa active le XI en XIa.

### 23.4. Inhibition de la phase contact

## 24. Facteur XII : facteur Hageman

PM : 80 kDa,  
 Concentration plasmatique : 30-40 mg/l  
 Demi-vie : 50-70 h  
 Structure : une chaîne glycoprotéique

### 24.1. Activation

Le XII est clivé par PK en  $\alpha$ XIIa, puis survient un deuxième clivage par la kallikréine pour former le  $\beta$ XIIa (28 kDa). La chaîne lourde se lie à la surface, la chaîne légère contient le site actif.

### 24.2. Action

Le XII active le XI et la prékallikréine.


### 24.3. Inhibition

## 25. Prékallikréine : Facteur Fletcher

PM : 80 kDa,  
 Concentration plasmatique : 25-50 mg/l  
 Demi-vie : 35 h  
 Structure : simple chaîne

### 25.1. Activation :

Activée par  $\alpha$ XIIa et  $\beta$ XIIa pour donner la kallikréine à deux chaînes.

	Référence document : Phyl	Rédigé par : Professeur Jean-François ABGRALL	Indice 0	Page 28 de 28
Titre du document : <b>Physiologie de la coagulation</b>				

### 25.2. Actions

Circule dans le plasma, liée à HMWK par la chaîne lourde, la chaîne légère porte le site actif.

La kallibréine active le XII en  $\alpha$ XIIa et  $\beta$ XIIa.

La kallibréine active faiblement le IX.

### 25.3. Inhibition

## 26. Kininogène de haut poids moléculaire : Facteur Fitzgerald, Flaujeac ou Williams

PM : 110 kDa,

Concentration plasmatique : 60-90 mg/l

Demi-vie : 150 h

### 26.1. Activation :

HMWK est clivé par PK, ce qui libère la bradykinine (nonapeptide) et la molécule à deux chaînes.

Le XI est lié à la chaîne légère de HMWK.

HMWK est clivé par  $\alpha$ XIIa : clivage lent

### 26.2. Actions :

Le HMWK doit être clivé pour exprimer son activité cofacteur.

### 26.3. Actions associées à l'activation de la prékallibréine sur la cellule endothéliale :


- fourniture de bradykinine (BK) :

BK est un puissant stimulant de la synthèse de prostacycline par la CE, formation de superoxyde, de tPA, de NO, de facteur d'hyperpolarisation des cellules musculaires lisses. BK est le stimulant physiologique le plus puissant de tPA in vivo.

- fibrinolyse : La kallibréine plasmatique est un activateur de "pro-UK" in vitro : activation de pro-UK après assemblage de HK et PK sur CE, après addition de XII. Il existe aussi une action indépendante de XIIa : assemblage de HK+PK+plasminogène+pro-UK --> formation de plasmine sur CE.
- Inhibition de thrombine : les kininogènes inhibent l'activation plaquettaire ; la bradykinine augmente la prostacycline plasmatique qui inhibe les fonctions plaquettaires ; HK et LMWK inhibent la fixation de  $\alpha$ -thrombine sur les plaquettes et les cellules endothéliales. RPPGF, peptide du domaine 4 du kininogène, interfère avec l'activation plaquettaire par la thrombine : il interagit avec le site actif de la thrombine ( $K_i=1,67$  mM) ; il se lie à PAR-1 pour empêcher le clivage par  $\alpha$ -thrombine (affinité 100 fois plus forte).

### 26.4. Inhibition :

HMWK est inactivé par XIa qui clive la chaîne légère.

	Référence document : Phyl	Rédigé par : Professeur Jean-François ABGRALL	Indice 0	Page 29 de 29
Titre du document : <b>Physiologie de la coagulation</b>				

## 27. Inhibiteurs de la coagulation

### 27.1. Introduction :

L'organisme produit en permanence de petites quantité de thrombine. La production de thrombine est contrôlée par trois systèmes inhibiteurs : l'antithrombine 3 (AT3), le système protéine C-protéine S, le TFPI (Tissue Factor Pathway Inhibitor), le deuxième cofacteur de l'héparine. A côté de ces principaux systèmes, il existe des systèmes inhibiteurs secondaires : deuxième cofacteur de l'héparine,  $\alpha$ 2macroglobuline, inhibiteur du C1.

### 27.2. Antithrombine

(auparavant nommée antithrombine III)

AT fait partie de la famille des inhibiteurs des sérines protéases ou serpinines

simple chaîne de PM : 58-65 kDa, et comporte 432 aa (après clivage des 32 aa de la séquence leader) (Petersen 1979)

Concentration plasmatique : 180-300 mg/l

Demi-vie : 50-70 h

Gène de AT :

Le gène est porté par le chromosome 1q, entre q23 et q25 (Bock, 1985), comporte 7 exons (Prochownik, 1985). Les glucocorticoïdes stimulent l'expression du gène tandis que les oestrogènes la réduisent (Thaler 1981).

AT est synthétisée par le foie

Structure : AT est une glycoprotéine qui contient 9 hélices  $\alpha$  et 3  $\beta$ -sheets. Il y a 6 cystéines participant aux ponts disulfure.

Il existe deux isoformes circulantes d'AT : AT $\alpha$  et AT $\beta$  qui diffèrent par le nombre de chaînes oligosaccharidiques :


- AT $\alpha$  a 4 chaînes sur Asn 96,135,155 et 192
- AT $\beta$  n'a que 3 chaînes : manque la chaîne en Asn135

L' AT $\beta$  a une affinité plus forte pour l'héparine et les héparanes sulfates, se lie plus facilement aux cellules endothéliales, et a une activité inhibitrice plus forte que l'AT $\alpha$ (Brennan 1987).

L'AT existe en circulation sous une troisième forme : l'**AT latente** (Mottonen 1992) qui est le résultat de l'incorporation de la boucle dans la feuille A. cette forme latente est très stable, a une faible affinité pour l'héparine, et n'est pas un inhibiteur ni un substrat pour la thrombine. L'AT latente s'associe dans le plasma avec l'AT active pour former un dimère inactif. La formation de ce dimère inactif dépend de la température : à 37°C environ 10 % est sous forme de dimère ; à 41°C 100 % de l'AT est sous forme de dimère inactif (ce qui explique les thromboses pendant les infections graves) (Carrell ISTH juillet 2001 : Thromb Haemost 2001 ;86 :14-22.). L'AT "latente" se lie préférentiellement à AT $\beta$ .

#### 27.2.1. Action :

- AT inhibe 77 % de la thrombine :

	Référence document : Phyl	Rédigé par : Professeur Jean-François ABGRALL	Indice 0	Page 30 de 30
Titre du document : <b>Physiologie de la coagulation</b>				

L'AT est un substrat inhibiteur : l'enzyme clive la boucle réactive de AT et cette boucle va se refermer sur l'enzyme, le tenant "prisonnier" comme dans un piège à souris, inhibant de façon irréversible l'enzyme (Carrell Thromb Haemost 2001 ;86 :14-22.).

AT inhibe plusieurs enzymes de la coagulation : la thrombine, le facteur Xa, le IXa, le XIa.

$\alpha$ 2M inhibe 14 % de la thrombine

les inhibiteurs mineurs inhibent 9 % de la thrombine.

- AT inhibe le complexe VIIa-TF :

AT se lie aussi au facteur VIIa et dissocie le complexe TF-VIIa (Rao LV, Blood 1995). Il se forme alors un complexe AT-VIIa qui ne peut plus se lier au TF membranaire.

AT n'inhibe pas le VIIa en solution dans le plasma.

AT forme avec VIIa un complexe de stoechiométrie 1 :1 (Lawson JH, JBC 1993 ;268 :767-70.)

### 27.3. Protéine C

La protéine C (PC) est une sérine-protéase vitamine K dépendante de PM : 62 kDa qui agit comme un anticoagulant naturel en inactivant les facteurs Va et VIIIa.

La PC circule sous forme inactive dans le plasma, à la concentration plasmatique de 2,7-6 mg/l (moyenne 4 mg/l), et est activée par la thrombine à la surface des cellules endothéliales, lorsque la thrombine est liée à la thrombomoduline. La PC activée nécessite la présence d'un cofacteur : la protéine S (PS).

Demi-vie : 6-10 h

#### 27.3.1. Structure


La PC est synthétisée par le foie sous forme d'une pré-pro-protéine C qui est clivée (-1 à -42) par une protéase. Puis le peptide signal est clivé par une signal-peptidase. Avant la sécrétion, le dipeptide Lys-Arg qui connecte Leu155 et Asp158 est enlevé.

La PC circule principalement sous forme de dimère (Stenflo, 1976), et 10-15 % est sous forme de simple chaîne où le dipeptide Arg-Lys interne n'a pas été enlevé. Le dimère provient de la protéolyse du précurseur à chaîne simple : la chaîne légère contient le GLA domaine, un domaine EGF ; la chaîne lourde contient le peptide d'activation et le domaine catalytique His211-Asp257-Ser360. La région du peptide d'activation contient le dipeptide Lys156-Arg157 détaché tardivement lors de la modification de PC, et le peptide Arg169-Leu170 qui est clivé par la thrombine lors de l'activation. Les 2 chaînes sont reliées par un seul pont disulfure entre Cys141 et Cys277.

Le GLA domaine est formé de 9 résidus acide glutamique, et permet l'interaction avec les phospholipides (Mann, 1990). La PC est glycosylée (23 % du poids) en Asn97,248,313 et 329.

#### 27.3.2. Activation de PC

La protéine C s'active sur la surface de la cellule endothéliale : la thrombine s'est liée à la thrombomoduline de la surface de la cellule endothéliale, elle devient ainsi capable de cliver la PC en sa forme active la PCa. Pour ce faire, la

	Référence document : Phyl	Rédigé par : Professeur Jean-François ABGRALL	Indice 0	Page 31 de 31
Titre du document : <b>Physiologie de la coagulation</b>				

PC est venue se lier à un récepteur spécifique de la membrane des cellules endothéliales , EPCR ; formant un complexe : TM-Thrombine-EPCR-PC.

Une fois activée, PCa se détache de la surface, se lie à PS, et devient capable d'inhiber le Va et le VIIIa à la surface des plaquettes.

La PC est convertie en PCa par clivage de Arg169-Leu170, larguant un dodécapeptide.

PC est clivée par :

- la thrombine
- le Xa peut aussi activer la PC au même site que la thrombine (Freysinet, 1989).

### 27.3.3. Action de la protéine C activée

La PCa clive le facteur Va et VIIIa et les inhibe.

- PCa clive V lié à une membrane en 4 sites : Arg306, Arg506, Arg679 et Lys994. En l'absence de membrane, il n'y a pas de clivage du Va. La PCa clive le Va lié à une membrane en 3 sites : Arg306, Arg506 et Arg679 (Kalafatis 1994). Le clivage en Arg506 précède et est nécessaire pour les clivages suivants en 306 et 679. En l'absence de membrane, PCa clive chaîne lourde de V en 506 et 679. Le site de fixation de PCa sur Va est situé en 1865-1874. Le facteur Xa réduit l'inactivation du Va par PCa (Nesheim, 1982).
- PCa clive le VIIIa en Arg336, Arg562 et probablement en Arg740 dans la chaîne lourde. Le site de fixation de PCa au VIIIa est situé en 2009-2018. La liaison du VIIIa sur vWF ou sur IXa réduit l'inactivation du VIIIa par PCa (Bertina, 1984).
- La PS accélère l'inactivation du Va par PCa.

PCa augmente la fibrinolyse en limitant la production de thrombine et donc l'activation du TAFI (Bajzar, 1996). Le TAFI diminuant la fibrinolyse en clivant les lysines sur la fibrine.

Environ 200 molécules de PCa se fixent sur les plaquettes (Harris et Esmon, 1985, JBC ;260 :2007-2010.)

### 27.3.4. Inactivation de PCa :


PCa est inhibée par :

- PCI : protéine C inhibiteur
- $\alpha$ 1-protéinase inhibiteur

## 27.4. Thrombomoduline

glycoprotéine membranaire de la cellule endothéliale sur laquelle se fixe la thrombine, rendant la thrombine anticoagulante. TM augmente les capacités de la thrombine à activer la PC x 20 000 fois (Esmon 1980)  
Chaque cellule endothéliale a 50-100 000 molécules de TM à sa surface.

La TM est 1000 fois plus abondante dans les vaisseaux capillaires que dans les vaisseaux de plus gros calibre.

	Référence document : Phyl	Rédigé par : Professeur Jean-François ABGRALL	Indice 0	Page 32 de 32
Titre du document : <b>Physiologie de la coagulation</b>				

La TM existe aussi dans le plasma à une concentration de 20 mg/l, soit 50-80 nM (Ishii, 1985) TM a un PM de 75 kDa, comporte 575 aa, contient une partie intracytoplasmique, un domaine transmembranaire, un site d'attachement aux Gags, 6 domaines EGF, une région hydrophobe et un domaine lectin-like. TM est glycosylée.

Le gène de TM est situé sur le chromosome 20p12, ne contient pas d'introns. Dans la région 3' non codante du mARN, il y a une séquence observée dans les protéines de l'inflammation (Tazawa, 1994).

Deux molécules de thrombine peuvent se lier simultanément à TM (Ye, 1993).

La demi-vie du complexe TM-Thrombine sur la surface cellulaire est de 15 secondes (Esmon, 1987), ce complexe étant internalisé (horvat 1993), la thrombine est détachée dans les lysosomes puis la thrombomoduline retourne à la surface.

La thrombine se lie à TM avec une forte affinité :  $k_d=0.5$  nM, et perd ses capacités procoagulantes pour devenir anticoagulante.

Une fois activée, la PCa est détachée du complexe TM-Thrombine -PC-EPCR (Mann, 1990).

#### **27.4.1. Régulation de l'expression de TM**

- TNF, PMA promeuvent l'endocytose de TM et augmentent l'expression de TF
- Acide rétinoïque augmente l'expression de TM et diminue TF
- Contraceptifs oraux diminue TM circulante.

#### **27.4.2. Actions de TM :**

- fixe Thrombine et la transforme en anticoagulant
- stimule l'inactivation de thrombine par AT
- bloque la capacité de thrombine à activer les plaquettes
- inhibe l'activation de la prothrombine médiée par le Xa

#### **27.4.3. Rôle du facteur V dans l'activation de PC**

Le Va à faible concentration (< 50 nM/l) ou sa chaîne légère isolée stimule l'activation de PC (x 50 fois) à la surface. Par contre, à concentration plus forte (> 50 nM/l), *Va ou sa chaîne légère inhibe l'activation de PC* (Salem, 1993).

### **27.5. EPCR**

EPCR est le récepteur de PC à la surface des cellules endothéliales (Esmon CT, Thromb Haemost 2000 ;83 :639-43.). PC se lie à EPCR, puis ce complexe se meut latéralement sur la surface pour venir au contact du complexe TM-Thrombine où PC sera activée.


#### **27.5.1. Gène**

Le gène de EPCR est situé sur le chromosome 20q11.2. son expression est induite par activation de l'endothélium par la thrombine.

#### **27.5.2. Structure**

EPCR est une protéine transmembranaire de type 1 homologue des molécules MHC de classe 1. EPCR a 2 domaines extracellulaires ?, un domaine transmembranaire et une partie intracytoplasmique. Le domaine transmembranaire est



	Référence document : Phyl	Rédigé par : Professeur Jean-François ABGRALL	Indice 0	Page 33 de 33
Titre du document : <b>Physiologie de la coagulation</b>				

inhabituel car il contient 6 ou 7 résidus Gly. EPCR est surtout présent dans les grands vaisseaux. Une forme soluble de EPCR existe, qui a la même affinité pour PC et PCa que la forme membranaire. EPCR est détaché de la membrane (in vitro) par les médiateurs de l'inflammation (IL-1?, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, PMA), par une metalloprotéinase et par la thrombine. In vivo, le largage de EPCR dépend de la génération de thrombine. L'EPCR soluble se lie aux polynucléaires activés, sur la protéinase 3 membranaire. EPCR soluble se lie au site actif de PCa, inhibant la fonction de PCa (K<sub>d</sub> = 27 nM), inhibe la liaison de PCa sur les phospholipides, inhibe l'activation de PC.

### 27.5.3. Rôle du facteur V dans l'activation de PC

Le Va à faible concentration (< 50 nM/l) ou sa chaîne légère isolée stimule l'activation de PC (x 50 fois) à la surface. Par contre, à concentration plus forte (> 50 nM/l), *Va ou sa chaîne légère inhibe l'activation de PC* (Salem, 1993).

### 27.6. Protéine C inhibiteur (PCI)

Décrit pour la première fois par Marlar en 1980.

387 aa, et signal peptide de 19 aa (Suzuki, 1987. Thromb haemost 1989 ;61 :337-42.)

Le gène est situé sur le chromosome 14 et contient 5 exons.

Synthétisé par le foie, glycoprotéine simple chaîne de 57 kDa

**Concentration plasmatique** : 5 mg/l

PCI inhibe PCa avec un K<sub>i</sub> de 5.8x10<sup>-8</sup>M : il forme un complexe 1 :1 avec PCa et est clivé au site réactif (Arg354Ser355) pour relarguer un peptide en C-terminal. Cette réaction est augmentée in vitro par héparine et dextran sulfate.

Inhibe aussi le complexe thrombine :thrombomoduline (Rezaie 1995, JBC ;270 :25336-25339.)


PCa est aussi inhibée par :

- alpha1-protéinase inhibitor (Meijers 1988 Blood ;72 :1401-1406, Heeb Blood 1989 ;73 :446-451.)
- alpha2-macroglobuline (Heeb 1991, jbc ;266 :17606-17612.)
- alpha2-antiplasmine (Heeb 1991) ; les inhibiteurs les plus importants sont PCI et alpha1-antitrypsine, alpha2-M et alpha2-AP étant des inhibiteurs auxiliaires.

### 27.7. Protéine S

La PS est une glycoprotéine à simple chaîne, vitamine K dépendante, de PM : 70 kDa, 635 aa, complexée à 60 % dans le plasma avec la C4BP. La PS est présente dans les granules ? plaquettaires d'où elle est sécrétée après activation par la thrombine. Chaque plaquette a 400 sites de liaison de la PS.

**Le gène** de la PS (PROS) est porté par le chromosome 3p11.1-11.2, et comporte 15 exons. Il existe un pseudogène qui a 97 % d'homologie avec le PROS gène, lui aussi localisé sur le chromosome 3.

	Référence document : Phyl	Rédigé par : Professeur Jean-François ABGRALL	Indice 0	Page 34 de 34
Titre du document : <b>Physiologie de la coagulation</b>				

### 27.7.1. Structure

PS est synthétisée et sécrétée par les cellules endothéliales (Fair, 1986), et se lie à la surface de ces cellules. Les 36 premiers résidus en N-terminal correspondent au GLA domaine, puis il y a une courte hélice amphipatique (37-46), puis une boucle unique à la PS de 24 résidus entre Cys47 et Cys72 très sensible à la thrombine ; puis 4 domaines EGF-like ; puis un domaine de 389 résidus unique à la PS, homologue à la Sex hormone binding globulin SHBG qui est impliqué dans la liaison à la C4bBP.

PS contient 7,8 % de carbohydrates sur 3 sites de glycosylation (Asn458, 468, 489).

**Concentration plasmatique :** 25 mg/l, 0,3 mM/l.

**Demi-vie plasmatique :**

### 27.7.2. Liaison à la C4bBP

La PS liée à C4bBP (50-60 %) est inactive.

La liaison se fait par le domaine SHBG.

### 27.7.3. Action de la PS :

La PS est un cofacteur de la PC, est donc un anticoagulant qui a 3 fonctions :

- cofacteur de l'inactivation du Va et du VIIIa
- inhibe l'activité de la prothrombinase par interaction avec Va et Xa
- inhibe l'activation du X par interaction avec le VIII.

PS augmente la liaison de PCa sur les plaquettes.

Un rôle de la PS serait de rendre Va et VIIIa vulnérable à l'inactivation par PCa.


PS se lie à Xa (Kd=19 nM) et l'inhibe en l'absence de PCa.

PS se lie à Va (Kd=33 nM)

La liaison de PS à la surface de cellule endothéliale est essentielle pour son activité cofacteur de PCa. Récemment il a été montré que la C4bBP joue un rôle régulateur important dans l'activité de la PS (Van de Poel, T&H 2001 ;85 :761-5). La liaison de PS à la C4bBP n'annule pas l'activité de PS comme cofacteur de l'inhibition du VIIIa par la PCa. Par contre l'effet synergique de la liaison PS/V sur l'inactivation du VIIIa est inhibée par complexation entre PS et C4bBP.

Les réactions impliquant la PS peuvent s'écrire ainsi :

- $PCa + PS + Va \rightarrow PCa + PS + Vi$  (inactif)
- $PCa + [PS + C4bBP] + Va \rightarrow Va + PCa + [C4bBP + PS]$
- $PCa + PS + VIIIa \rightarrow PCa + PS + VIIIi$  (60 % du VIIIa inhibé) + 40 % VIIIa
- $PCa + [PS+C4bBP] + VIIIa + V \rightarrow 40\% VIIIa + [PS+C4bBP] + V + VIIIi$  (60 %)
- $PCa + PS + V + VIIIa \rightarrow PCa + V + VIIIi$  (90 %) + 10 % VIIIa
- $PS + C4bBP \rightarrow [PS+C4bBP]$  complexe inactif
- C4bBP inhibe la liaison de PS sur le V

	Référence document : Phyl	Rédigé par : Professeur Jean-François ABGRALL	Indice 0	Page 35 de 35
Titre du document : <b>Physiologie de la coagulation</b>				

- C4bBP n'inhibe pas la liaison de PS sur le VIII

#### 27.7.4. Inactivation de PS

La thrombine clive PS entre Cys47 et Cys72, conduisant à une PS à 2 chaînes qui est inactive : elle perd toute sa capacité cofacteur de PCa.

La PS contient 3 sites de clivage par la thrombine : Arg49, Arg60 et Arg70.

#### 27.8. C4bBP : C4b- binding protein

La C4bBP est une protéine du système du complément qui lie et clive le C4. La PS est liée dans le plasma.

*Concentration* : 280-460 mg/l

*PM* : 570 kD

Le C4 a un PM de 240 kD et une concentration de 200-600 mg/l.

*Compétition entre PS et C4 ?*

Découverte par Lambin en 1982 (Biochimie 1982 ;64 :1065-71.) qui montre que C4BP est formée de 8 sous-unités de PM  $63 \pm 3$  kD chacune. En 1985, Villiers (Eur J Immunol 1985 ;15 :941-5.) a montré que C4BP est un décimère formé de 5 dimères, chaque dimère étant constitué de 2 monomères reliés par des ponts disulfure. La structure est en toile d'araignée, avec 7 branches de PM 70 kDa correspondant aux chaînes alpha, entourées par 8 chaînes beta. La chaîne alpha contient 549 aa organisés en 8 domaines sushi. Chaque chaîne alpha a un site de liaison à C4b. Il y a 5 sites de glycosylation.

Les gènes des sous-unités alpha et beta sont sur le chromosome 1q32 : C4BPA qui a 12 exons et C4BPB qui contient 8 exons.

La biosynthèse de C4BP comprend l'assemblage de 6 ou 7 chaînes alpha et une ou aucune chaîne beta (Dahlbäck, 1991).


PS est liée à C4BP de façon non covalente sous forme d'un complexe 1 :1, à un site différent du site de liaison du C4b, vraisemblablement sur la chaîne beta, sur un ou plusieurs sushi. En présence de calcium, le Kd de l'association de PS à C4BP est de  $5 \times 10^{-10}$ M.

C4BP est une protéine de phase aigüe qui peut atteindre 400 % (Barnum et Dahlbäck, 1990). La capacité de PS comme cofacteur de Pca est perdue par la liaison à C4BP.

#### 27.9. TFPI : Tissue Factor Pathway Inhibitor

Le TFPI, tissue factor pathway inhibitor, est un inhibiteur plasmatique qui inhibe le Xa et le complexe TF-VIIa. Il agit d'abord en se complexant au Xa, puis le complexe Xa-TFPI se lie au complexe membranaire TF-VIIa pour former un complexe quadrimoléculaire qui neutralise le VIIa.

L'extrémité C-terminale a un site de haute affinité pour l'héparine : l'héparine augmente l'activité du TFPI in vitro, par

	Référence document : Phyl	Rédigé par : Professeur Jean-François ABGRALL	Indice 0	Page 36 de 36
Titre du document : <b>Physiologie de la coagulation</b>				

augmentation de l'affinité pour le Xa. L'héparine déplace le TFPI de son site de fixation endothélial, probablement les GAGs.

Le gène du TFPI est situé sur le chromosome 2 et comporte 9 exons.

TFPI a un PM de 42 kDa, est composée de 276 aa, comporte 3 domaines inhibiteurs de protéases de type Kunitz, et une extrémité C-terminale chargée positivement.

### 27.9.1. Concentration plasmatique et distribution intravasculaire

Le TFPI est réparti en 4 pools intravasculaires :

- lié à la surface des cellules endothéliales : 50-80 % du TFPI est lié aux cellules endothéliales.
- Associé aux lipoprotéines : 80 % du TFPI circule lié aux LDL.
- Libre dans le plasma : 0,1 mg/l = 2,25 nMol/l. Le TFPI plasmatique représente 10-50 % du TFPI total.
- Séquestré dans les plaquettes : Le TFPI est présent dans les plaquettes : 8 % du total plasmatique (0,2 nMol/l). Les plaquettes relarguent leur TFPI après stimulation par la thrombine (Novotny WF, Blood, 1988 ;72 :2020-2025.)

	TFPI (nMol/l)	TFPI (% du total intravasc)
Plasma	2,25	10-50
Plaquettes	4,5-22,5	8
Cellules endothéliales	11-18	50-80

*Demi-vie* : 1 mn chez le rat, 2 mn chez le lapin.

### 27.9.2. Action du TFPI

Dans un premier temps, le kunitz II se lie au Xa et l'inhibe, puis le complexe TFPI-Xa se lie au complexe TF-VIIa par interaction entre le Kunitz I et le VIIa (Girard TJ, Nature. 1989 ;338 :518).


L'action du TFPI est très rapide, dès la formation des premières traces de Xa, et l'inhibition du VIIa est très rapide : la voie extrinsèque ne sert qu'à lancer la coagulation.

Le Xa doit être lié aux phospholipides pour que l'inhibition du [TFPI-Xa] sur le [TF-VIIa] ait lieu (Kazama Y, T&H 1997). Le TFPI-1 se lie aux récepteurs protéoglycanes : ryndocan/syndecan 4 et glypican 3, ce qui donne un complexe quaternaire où TFPI-1 est lié par ancrage GPI : il n'y a pas internalisation du complexe mais lente dissociation (Ott, ATVB 2000).

### 27.9.3. Inactivation du TFPI

TFPI est inhibé par deux voies :

- liaison aux récepteurs des LDL (LRP) et internalisation

	Référence document : Phyl	Rédigé par : Professeur Jean-François ABGRALL	Indice 0	Page 37 de 37
Titre du document : <b>Physiologie de la coagulation</b>				

- fixation sur la fibrine et destruction par la thrombine

### 27.10. Deuxième cofacteur de l'héparine : HCF2

Le deuxième cofacteur de l'héparine (HCF2) est un inhibiteur de la thrombine stimulé par l'héparine, comme l'AT. décrit pour la première fois par Briginshaw en 1974 (Arch Biochem Biophys, 1974 ; 161 : 683-690.).

HCF2 est une serpine synthétisée par le foie, spécifiquement sensible au dermatan sulfate qui augmente 1000 fois son activité (Tollefsen, 1983). HCF2 a un effet anticoagulant in vivo par son interaction avec les protéoglycans de la paroi vasculaire (Liu L, Thromb Haemost 1995 ; 73 : 405-412).

Le dermatan sulfate (DS) fait partie de l'intima et de la media des gros vaisseaux

#### **Gène :**

Le gène de HCF2 est porté par le chromosome 22p-q11.2 (Herzog, 1991), contient 5 exons.

#### **Structure :**

HCF2 est une glycoprotéine à simple chaîne, de PM : 65 kDa, contient 480 aa. Il y a 3 sites de glycosylation en Asn30, 169 et 368 ; et HCF2 contient 10 % de carbohydrates.

HCF2 a 30 % d'homologie avec AT3 ; la partie N-terminale a un domaine acide chargé négativement (semblable à celui de l'hirudine) qui se lie à l'exosite I de la thrombine.

**Concentration plasmatique :** 60-110 mg/l = 1,2 mM/l, soit la moitié de la concentration molaire de AT3.

**Demi-vie :** 60 h

#### **Action :**

HCF2 exerce une action inhibitrice "progressive" sur la thrombine, qui est accélérée par le DS. La liaison de DS sur HCF2 accélère la formation des complexes HCF2-Thrombine (Sheehan, 1994).

#### **Inactivation :**

Une fois le complexe formé, HCF2 se détache de la thrombine, et est clivée en Leu444-Ser445 (P1-P1').


### 27.11. alpha2-macroglobuline

alphaM est une estérase présente dans le plasma qui inhibe la thrombine, la kallikréine et la plasmine. Elle représente 25 % de la capacité inhibitrice du plasma vis-à-vis de la thrombine (75 % pour l'AT) (Abilgaard, 1967).

La concentration plasmatique est de 1,3-3,3 g/l, en moyenne 2 g/l. les contraceptifs oraux augmentent le taux plasmatique (Tans G, T&H 2000, 84 : 1-3.). La concentration de alphaM est significativement plus élevée (+ 20 %) chez les sujets déficitaires en AT (Tripodi A, Thromb res, 2000 ; 98 : 117-22.).

#### 27.11.1. Structure

alphaM est une estérase, glycoprotéine de PM 725 Kda. Elle est formée de 4 sous-unités de 185 kDa. Les carbohydrates représentent 8 % de la masse, et sont répartis sur 4 chaînes.

	Référence document : Phyl	Rédigé par : Professeur Jean-François ABGRALL	Indice 0	Page 38 de 38
Titre du document : <b>Physiologie de la coagulation</b>				

L'alphaM est synthétisée par la cellule endothéliale, et reste liée à la surface (Becker, 1976)

### 27.11.2.Action

L'alphaM se lie à la thrombine qui devient incapable de cliver le fibrinogène, mais reste capable de cliver les petits peptides (Prasa, T&H 1997).

La liaison de alphaM avec un e enzyme entraîne d'abord un clivage, puis une modification structurale et une liaison irréversible avec l'enzyme. En fait, wang a montré que le complexe entre alphaM et thrombine peut se dissocier, et l'inhibiteur reste intact (wang, Arch Biochem Biophys, 1983; 222:117-22.).

Il se forme un complexe 1 :1 avec la thrombine.

L' alphaM n'inhibe pas le Xa ni XIIa.

L'action de alphaM ne serait pas assez rapide dans le plasma pour empêcher la formation de thrombine par feed-back (Cvirn G, Thromb. Res. 2001 ;101 :183-191.).

Il y a compétition entre AT et alphaM pour inhiber la thrombine (Fischer AM, Thromb Haemost 1981 ;45 :51-54.). Le complexe [alphaM-Thrombine] est capable de cliver le VIII, même lié au vWF (Switzer ME, Biochemistry 1983 ;22 :1437-44.).

alphaM est inhibiteur faible de PCa, magnésium dépendant (Heeb MJ, JBC 1991 ;266 :17606-12.).

### 27.11.3.Inhibition :

L'alphaM est clivée par la thrombine en fragments de 85 kDa.

### 27.12. Inhibiteur du C1

Voir revue dans : Caliezi C, Pharmacol Rev, 2000 ;52 :91-112)


C1-Inh est une SERPINE (inhibiteur de sérine-protéase) de PM : 104 kD, constituée de 478 aa, comportant dont la fonction est d'inhiber le système du complément ( C1s et C1r) et le système contact : le XIa, le XIIa, la plasmine et la kallicroïne (Harpel,1976).

**Concentration** : 180-240 mg/l = 2,3 microM/l

**Demi-vie** : 28 h

#### **Structure :**

La partie protéique a une masse correspondant à 51 % du total. Les carbohydrates sont au nombre de 13 groupes. C1-inh est synthétisé par les hépatocytes, les fibroblastes, les monocytes, les cellules endothéliales. Les plaquettes contiennent du C1-inh dans leurs granules ???qui est synthétisé par les mégacaryocytes, et est exprimé par la membrane des plaquettes activées (Schmaier, 1993).

	Référence document : Phyl	Rédigé par : Professeur Jean-François ABGRALL	Indice 0	Page 39 de 39
Titre du document : <b>Physiologie de la coagulation</b>				

C1-inh est une protéine de phase aigüe dont le taux peut être x 2,5.

**Gène :**

Le gène est porté par le chromosome 11, consiste en 8 exons, et fait 17 kb (Davis, 1986).

### 27.12.1.Action

Comme les serpinés, C1-inh forme un complexe avec les sérine-protéases, est clivé, et emprisonne l'enzyme (substrat-suicide) (Patston PA, Biochemistry 1991 ;30 :8876-82.). le complexe est inactif et est clearé de la circulation par les récepteurs spécifiques de clearance des serpinés : LDL-LRP sur les hépatocytes et les fibroblastes (Pizzo, 1988). Les Pn et les monocytes expriment un récepteur des complexes serpine-enzyme, qui se lient, sont internalisés et dégradés : alpha1-AT, AT, C1-inh (Perlmutter, 1990).

C1-inh est le principal inhibiteur du Xlla.

C1-inh est aussi le principal inhibiteur du Xla (Chan, 1977) et de la kallibréine.

Inhibition du Xla (Wuillemin, Blood, 1995 ;85 :1517-1526) :

- o 47 % par C1-inh
- o 24,5 M par alpha2-Antiplasmine
- o 23,5 % par alpha1-Antitrypsine
- o 5 % par Antithrombine

Ces résultats ont été confirmé in vivo chez le chimpanzé où 68 % du Xla est complexé au C1-inh, 13 % à alpha2-AP, 10 % à alpha1-AT, et 9 % à AT (Wuillemin, T&H 1996 ;76 :549-555.).

C1-inh inhibe peu la plasmine, et inactive lentement le tPA (Huisman, 1995). L'action de C1-inh est potentialisée par GAGs : l'inhibition du Xla est multipliée par 117 en présence de GAGs (Wuillemin, , jbc 1996,271 :12913-12918.) ; l'héparine de bas PM augment l'inhibition du Xla par le C1-inh de 39 fois, 90 % du Xla étant inhibé par le C1-inh (Mauron, 1998).

C1-inh se lie au facteur XIII, ce qui le lie à la fibrine et à autres molécules de la matrice extracellulaire, apportant une régulation locale aux processus enzymatiques controlés par le Xla (Hauert J, JBC 2000 ;275 :14558-62.).


### 27.12.2.Inactivation

C1-inh est inactivé par l'élastase, la protéinase 3 des PN, la thrombine, la plasmine.

### 27.13. alpha1-proteinase inhibitor

= alpha1-antitrypsine

alpha1-PI inhibe 35-40 % de l'activité du Xa dans le plasma, et inhibe aussi le Xla (Scott, 1982).

	Référence document : Phyl	Rédigé par : Professeur Jean-François ABGRALL	Indice 0	Page 40 de 40
Titre du document : <b>Physiologie de la coagulation</b>				

C'est une sérine-protéase de PM 54 kDa dont la concentration plasmatique est de 2400 à 3300 mg/l.

### **27.13.1.Action**

alpha1-PI inhibe Xa, XIa et PCa (Chandra 1983 Biochemistry ;22 :5055-5060.).

alpha1-PI inhibe cathepsine G des polynucléaires (Rehault S, JBC, 1999 ;274 :13810-7.), qui est un puissant agoniste plaquettaire, aussi puissant que la thrombine. La cathépsine G active le V, et le Va ainsi produit va se lier à la membrane des monocytes pour générer des complexes prothrombinases (Allen DH, JBC,1995 ;270 :1408-15.). alpha1-PI fonctionne indépendamment des héparan sulfates et des GAGs

Dans le plasma normal l'inhibition du Xa est du à :

- 53 % par AT3
- 35 % par alpha1-PI
- 2 % par alpha2-M

### **27.13.2.Inhibition :**

alpha1-PI est clivée et inhibée par la gélatinase B/MMP9 (Liu Z, Cell 2000 ;102 :647-655.).

## **27.14. Annexines**

Les annexines font partie d'une super-famille de protéines qui se lient aux phospholipides. Elles sont caractérisées par l'existence d'une boucle endonexine qui médie la liaison aux phospholipides et au calcium (Geisow MJ, Biosci Rep, 1987 ;7 :289-98).

### **27.14.1.Structure**

Les annexines sont considérées comme des protéines intracellulaires car elles n'ont pas de séquence signal. Leur partie N-terminale est unique à chaque annexine, mais la partie c-terminale comporte de 4 à 8 domaines ayant chacun une boucle endonexine. La molécule a une face convexe et une face concave : la courbure annexine.


En hémostase, l'annexine A5 a un rôle important.

L'annexine A5 (auparavant nommée endonexine II, VAC vascular anticoagulant, lipocortine V) a un PM de 35936 Da, contient 320 aa

### **27.14.2.Concentration plasmatique**

Le plasma contient les annexines A1, A2,A5 et A6 (Römisch J, Blood Coag fibrinolysis, 1992 ;3 :11-7).



	Référence document : Phyl	Rédigé par : Professeur Jean-François ABGRALL	Indice 0	Page 41 de 41
Titre du document : <b>Physiologie de la coagulation</b>				

La concentration d'annexine A5 est de 1,1-2,3 mg /l (Kaneko N, Clin Chim Acta, 1996 ;251 :65-80). Elle est significativement augmentée dans l'infarctus du myocarde (Kaneko, 1996).

### **27.14.3.Action**

Les annexines se lie aux phospholipides par l'intermédiaire du calcium, avec une affinité plus élevée que les facteurs vitamine K-dépendants :  $K_d = 10^{-10}$  M (Ravanat C, Biochem J, 1992 ;282 :7-13). L'annexine A5 forme un trimère à la surface phospholipidique (phosphatidylsérine) où elle se lie par sa face convexe. Cette trimérisation se fait en l'espace de millisecondes après la fixation sur la membrane. La liaison à la phosphatidylsérine est réversible, et se fait par 3 sites de fixation du calcium. L'annexine A5 se lie à l'actine du cytosquelette plaquettaire (Exp Cell res, 1999 ;251 :185-193). L'annexine A inhibe la fixation du VIIIa sur la plaquette activée (Ahmad SS, JBC,2000 ;275 :13071-78). Les annexines sont externalisées, sans que le mécanisme n'en soit éclairci.

L'annexine A2 est un récepteur pour le plasminogène/tPA et régule la génération de plasmine à la surface cellulaire.

L'annexine A5 inhibe la coagulation et la formation de thrombus intravasculaire (Vanheerde T&H, 1995 ;73 :172-9 ; Römisch J, Thromb Res, 1991 ;61 :93-104). L'annexine A5 agirait en se liant à la phosphatidylsérine, formerait un bouclier empêchant les facteurs de la coagulation de se fixer sur la membrane.

Durant l'apoptose, la phosphatidylsérine (PS) est exprimée à la surface des cellules : l'annexine A5 se lie à la PS, et la cellule est phagocytée par les macrophages.