

Agglutination précoce des Plaquettes au cours de la Formation du Clou hémostatique

Centre liégeois pour l'étude de l'hémostase spontanée et des problèmes connexes^{)}*

J e a n H u g u e s

Le "clou hémostatique" assure l'hémostase au niveau des artérioles et des veinules dont il coiffe l'extrémité sectionnée. Il est constitué de plaquettes sanguines.

Dans le premier stade de la formation du clou hémostatique, des thrombocytes extravasés se fixent aux parois du vaisseau traumatisé. Dans un second stade, de nouvelles plaquettes charriées par le courant sanguin s'agglutinent aux premières, constituant une masse extravasculaire de volume croissant. Enfin, après 2 ou 3 minutes, cet amas devient imperméable et arrête l'hémorragie.

Les mécanismes, identiques ou non, de l'accolement des plaquettes aux parois vasculaires et de leur agglutination réciproque ne sont pas encore entièrement élucidés.

Dès nos premiers travaux, nous avons été frappé de la rapidité avec laquelle des la section du vaisseau, les thrombocytes extravasés adhèrent à brèche vasculaire.

Il nous a paru indispensable de préciser l'aspect cinétique de ce phénomène avant de vouloir déterminer son mécanisme.

Techniques

Nos expériences sont réalisées au niveau des vaisseaux microscopiques du mésentère du lapin selon une technique inspirée de celle de Chambers et Zweifach (7). Les calibres des vaisseaux, artérioles ou veinules, sont compris entre 30 et 50 microns.

^{*)} Travail réalisé grâce aux subsides accordés par le Fond de la Recherche scientifique médicale. Institut de Clinique et de Pathologie médicales. Direct. Professeur J. Roskam, Université de Liège.

1°) Deux expérimentateurs réalisent les expériences: l'un observe, l'autre chronomètre. L'observateur donne 3 signaux: le premier au moment de la section, le second dès qu'il a obtenu une vue nette de l'hémorragie et de la brèche vasculaire. Il existe, dans nos conditions expérimentales un court délai (quelques fractions de seconde à quelques secondes) entre ces deux signaux, la pression du scalpel sur le vaisseau mésentérique modifiant la mise au point. Le troisième signal est émis dès que l'on aperçoit les premières plaquettes fixées à la tranche de section. Dans la plupart des cas, le deuxième et le troisième signal coïncident tant l'agglutination des thrombocytes est rapide.

2°) Les anticoagulants en solution dans le liquide laveur et par voie i.v., les injections i.v. lentes de thrombine ont été utilisées dans le but d'inhiber l'accolement précoce des plaquettes aux plaies vasculaires.

3°) Afin de préciser la rapidité de l'agglutination intravasculaire des thrombocytes aux endothélia, certains vaisseaux ont été mécaniquement traumatisés mais non sectionnés. Le nombre d'expériences est ici réduit (6), car les difficultés techniques sont considérables. Le plus souvent en effet le traumatisme est soit trop léger et sans effet, soit trop brutal, ouvrant une brèche latérale dans la paroi du vaisseau.

Résultats

1°) Les résultats de nos observations sont consignés dans le tableau. Répétons que le plus souvent la première vision nette de la brèche vasculaire permet déjà d'y observer des plaquettes adhérentes. Dans quelques expériences cependant (chiffres soulignés), l'accolement des thrombocytes survient après la mise au point de la préparation. Dans ces cas, le délai qui sépare la section de cet accolement est donc mesuré avec exactitude.

Segments*) vasculaires	Nombre de vaisseaux où le délai d'accolement des premières plaquettes est						supérieur à 10"
	inférieur ou égal à						
	1"	2"	3"	4"	5"	6"	
A p	6	7	<u>1</u>		1		
A d	8	2	<u>2</u>				(10"), (12"), (63")
V d	6	4	<u>3</u>	1		1	
V p	7	4	<u>1</u>	3			
Total (60 sections)	27	17	7	4	1	1	3

*) A: Artériole, V: veinule, p: segment proximal, d: segment distal.

On peut donc conclure que dans 45% des cas, les premières plaquettes se fixent à la brèche vasculaire au cours de la première seconde; dans 73% des cas, des deux premières secondes; dans 85% des cas, des trois premières secondes.

Inversement, le délai de l'accolement précoce ne dépasse 6 secondes que dans 5% des cas. Notons que ces accolements tardifs sont observés au niveau des extrémités distales des artérioles.

2°) Le temps de saignement a été noté au cours de chaque expérience. Nous avons constaté, ainsi que nous l'avions déjà remarqué auparavant (7), que certaines hémorragies se prolongent anormalement (au delà de 10') par suite de malformations du clou hémostatique.

L'incidence de ces perturbations est identique à celle relevée précédemment (11.6% des cas contre 11%).

3°) On observe souvent au cours des hémorragies microscopiques, la présence de formations en "gerbe" entourant la plaie vasculaire. Ce sont des structures filamenteuses très fines, réfringentes, longues de 100 à 200 microns, chargées de nombreuses plaquettes. Elles sont fixées par une de leurs extrémités à la tranche de la membrane mésentérique au niveau de l'insertion du clou hémostatique. L'autre extrémité est généralement libre et flotte dans le liquide laveur. Parfois cependant, quand la boutonnière découpée par l'incision du mésentère est étroite, ces fibres se présentent comme un pont réunissant les deux bords de la membrane. On ne peut les en détacher sans les rompre.

Ces formations filamenteuses ou fibrillaires sont remarquables a) par leur présence parfois très précoce au cours du saignement (on peut les observer au cours de la première seconde), b) par leurs propriétés agglutinantes, qui leur permettent de fixer très tôt les plaquettes extravasées.

4°) Répétant parfois d'anciennes expériences (7) nous nous sommes efforcé d'entraver l'accolement précoce des plaquettes aux brèches vasculaires en utilisant certains anticoagulants à forte dose, des enzymes fibrinolytiques (Varidase Léderlé) ou la thrombine par voie i.v.

a) Additionné au liquide laveur, qui irrigue continuellement les plaies vasculaires, le citrate de soude (concentration 10%) retarde l'hémostase par l'entrave, qu'il apporte à la constitution du clou hémostatique. Dans environ 50% des cas (21 expériences), cette entrave consiste en une inhibition complète de tout accolement plaquettaire à la paroi du vaisseau.

b) L'héparine par voie i.v., à forte dose (2500 à 12 500 U/kg) n'inhibe pas complètement l'agglutination des plaquettes au vaisseau sectionné (11 expériences). Un amas thrombocytaire se forme. Il demeure perméable au courant sanguin, puis se désagrège progressivement. La plaie est finalement dénudée de tout thrombocyte. Notons que de pareils troubles, malgré leur importance, peuvent être corrigés, partiellement ou totalement par la protamine i.v., de nouvelles plaquettes se fixant alors à la brèche et reconstituant un clou hémostatique.

L'action locale de l'héparine additionnée au liquide laveur est plus manifeste pour autant que la concentration soit suffisante (2.5% à 5% de Liquémine Roche

en poudre). Dans 75% des cas, aucun thrombocyte ne se fixe au vaisseau (12 expériences).

c) La Varidase Léderlé par voie i.v. (37 500 U/kg) ou en application locale (500 U/cc) n'empêche pas l'agglutination des plaquettes. Les clous hémostatiques sont volumineux, mais perméables. Ils se désagrègent par la suite (8 expériences).

d) Après infusion lente i.v. d'une solution de thrombine (2 ctgr de Topostasine Roche dans 60 cc de liquide physiologique en 2 heures), on observe quasi constamment (8 fois sur 10) une absence totale d'accolement plaquettaire aux lèvres du vaisseau sectionné, pour autant que le traumatisme soit réalisé dans un délai déterminé après la fin de l'infusion (de 20 à 40').

5°) Une agression mécanique contre la paroi vasculaire déclenche, si elle est bien dosée, la formation locale d'un thrombus intra-vasculaire. 6 expériences ont été réalisées dans de bonnes conditions malgré leur difficulté technique. 5 fois, on a pu observer des plaquettes déjà adhérentes à l'endothélium au cours de la 1^{ère} seconde après le traumatisme.

Discussion

Un fait essentiel se dégage de nos expériences: la rapidité remarquable avec laquelle les plaquettes extravasées se fixent aux lèvres du vaisseau. Ce fait demande quelques commentaires:

1°) Les facteurs hémodynamiques locaux (vitesse et débit) présentent, au début de l'hémorragie, des valeurs très différentes selon les segments vasculaires intéressés (7). Ainsi par exemple, au niveau des extrémités proximales des artérioles, la vitesse dépasse le plus souvent 50 mm/seconde, le débit 0.05 mm³/seconde (quantité approximative de plaquettes extravasées au cours de la 1^{ère} seconde: 20 000). Inversement la vitesse n'atteint habituellement pas 10 mm/seconde et le débit 0.02 mm³/seconde (quantité approximative de plaquettes extravasées pendant la 1^{ère} seconde: 8000) au niveau des segments veineux périphériques.

Cependant, malgré ces différences, l'accolement des plaquettes paraît également rapide aux extrémités des différents segments vasculaires. Quelques accolements tardifs sont cependant notés aux brèches des segments artériolaires périphériques.

Faut-il conclure de la confrontation de ces données, que les facteurs hémodynamiques locaux ne jouent aucun rôle dans l'accolement précoce des plaquettes? Nous ne le pensons pas. Nous suggérons plutôt l'existence d'un équilibre entre les influences exercées par les variations de chacun des facteurs hémodynamiques.

dynamiques sur l'agglutination des thrombocytes. Ainsi au niveau des segments artériolaires proximaux, l'entrave apportée par la forte accélération sanguine serait neutralisée par l'augmentation du débit avec son nombre accru de plaquettes susceptibles de se fixer aux parois.

Les retards à l'accolement relevés au niveau de 3 vaisseaux artériolaires périphériques témoignent d'ailleurs de l'influence des facteurs hémodynamiques locaux. Nous avons observé au niveau de ces vaisseaux, plus sujets que d'autres segments vasculaires à de fortes sténoses post-traumatiques (7), une vasoconstriction particulièrement intense. L'accolement plaquettaire à leur niveau n'a débuté qu'avec le relâchement de cette sténose locale. Nous pouvons semble-t-il en déduire que la réduction considérable du débit sanguin liée à la vasoconstriction (souvent moins de $0.0005 \text{ mm}^3/\text{seconde}$) retarde l'accolement précoce des thrombocytes extravasés en en réduisant le nombre (environ 200 dans la 1^{ère} seconde).

L'influence des facteurs hémodynamiques locaux sur la fixation des plaquettes aux brèches vasculaires et l'aspect statistique du phénomène méritent des recherches complémentaires.

2°) Les hémostases tardives (temps de saignement supérieur à 10' dans 11.6% des cas) ne sont pas nécessairement en rapport avec un trouble de l'accolement précoce des plaquettes. En effet, 4 fois sur 7, ces hémorragies prolongées s'observent après une fixation particulièrement rapide des thrombocytes aux parois (au cours de la 1^{ère} seconde). Il faut donc admettre que les anomalies de la fonction hémostatique intéressent, dans ce dernier cas, des stades ultérieurs de la formation du bouchon plaquettaire.

3°) L'extravasation des plaquettes n'est pas un facteur essentiel de leur accolement aux endothélia lésés car la cinétique du phénomène paraît identique en cas de formation de thrombus intra-vasculaire.

4°) Les structures filamenteuses en "gerbes" décrites au voisinage de la blessure, sont remarquables d'une part par leur présence parfois très précoce, d'autre part par leur faculté de fixer rapidement les thrombocytes extravasés.

Quelle est l'origine de ces structures fibrillaires?

Nous suggérons de distinguer parmi ces formations deux types d'origine différente: a) les unes apparaissent assez tardivement (après 10 à 20 secondes environ) au cours de l'élaboration du clou hémostatique. Ce délai nous autorise peut être à les assimiler à des filaments de fibrine; mais, à l'heure actuelle, aucun argument ne démontre la validité de cette hypothèse. b) Les autres sont très précocement observées au cours du saignement (au cours, parfois, de la 1^{ère} seconde). Il est difficile de prétendre que ces structures se forment en un si bref délai. Il paraît plus logique de penser que, préexistantes au traumatisme, ces fibres fassent partie intégrante du tissu mésentérique périvasculaire et qu'elles

soient libérées par dilacération de ce tissu au moment de la section. Cette interprétation paraît confirmée par 1°) certaines images déjà mentionnées montrant des éléments filamenteux jetés comme un pont au dessus de la boutonnière découpée dans le mésentère, mésentère dont il est par ailleurs impossible de les détacher; 2°) les résultats d'expériences encore inédites de B o u n a m e a u x , à savoir: après la mise en contact d'une suspension de plaquettes avec des fragments dilacérés d'aorte, il se produit une agglutination très rapide de thrombocytes avec des structures fibrillaires sous-endothéliales (2).

La nature des formations filamenteuses que nous avons observées nous est inconnue.

S'agit-il de filaments de fibrine normalement présents dans le tissu mésentérique? Rappelons à ce sujet que le recours à l'anticorps fluorescent spécifique a permis de démontrer que 50% environ du fibrinogène était extravasculaire. Injecté chez des afibrinogénémiques, le fibrinogène disparaît rapidement du sang; il se dépose dans les tissus, localisé plutôt entre les fibres collagènes qu'à l'intérieur de ces fibres (6). D'autres recherches ont mis en évidence l'existence de filaments de fibrine sur certains endothélia vasculaires (12, 15).

On peut aussi imaginer, encore faudrait-il le prouver, que, libérées par dilacération du tissu mésentérique, des fibres collagènes seraient susceptibles d'agglutiner des thrombocytes et constitueraient l'armature de ces formations en "gerbes".

Il n'est pas inutile de rappeler à ce propos que des théories anciennes, défendues jusqu'en 1934, notamment par N a g e o t t e et G r e y o u (14), affirmaient que le fibrinogène était un précurseur du collagène. Si les travaux plus récents (4) ne confirment pas ces théories, on admet cependant que des filaments de fibrine peuvent constituer un support aux fibres du collagène pendant leur formation. On sait aussi qu'en microscopie électronique, les images de filaments de fibrine et de collagène présentent parfois une certaine analogie, notamment par la périodicité assez comparable de leur striation transversale (230 Å contre 210 Å).

Le prélèvement, malaisé, et l'examen au microscope électronique des structures filamenteuses observées au cours de nos expériences fourniraient certes d'utiles renseignements sur leur nature.

5°) Nos expériences nous fournissent-elles des indications concernant le mécanisme de l'accolement précoce des plaquettes aux brèches vasculaires?

Nous avons pu entraver ce phénomène par l'action locale du citrate de soude ou de l'héparine, à fortes concentrations, par l'injection i.v. lente préalable de thrombine. Ce dernier agent nous a paru le plus régulièrement actif.

Des expériences antérieures nous avaient appris que maintes autres modifica-

tions du liquide laveur n'inhibent pas l'accolement *rapide* des thrombocytes aux *endothélia* lésés. Citons notamment les variations du pH, de la température, de la force ionique de ce liquide laveur, la réduction de sa teneur en calcium, l'addition d'anticoagulants à faible dose, de certaines substances "thiolooprives", de produits réducteurs, oxydants (7) ou encore doués d'activité antihistaminique (8). Sans action également sur l'accolement précoce des plaquettes, l'irradiation de l'animal (1000 r) associée à l'injection i.v. d'héparine (2500 U/kg) (7).

L'action inhibitrice des anticoagulants à forte dose et de la thrombine i.v. (responsable d'une hypofibrinogénémie, d'une chute des facteurs coagulatifs V et VII associée à une thrombopénie modérée) (16) suggèrent, pour autant que ces facteurs n'aient pas d'autre action commune, l'intervention de phénomènes coagulatifs dans l'accolement précoce des premières plaquettes extravasées à la plaie vasculaire. Cependant, la rapidité du phénomène (au cours de la première seconde) n'infirmes-t-elle pas pareille hypothèse?

Rappelons quelques données bien établies sur la cinétique des réactions intervenant dans la coagulation sanguine, en faisant remarquer 1°) que les vitesses de réactions mentionnées sont mesurées *in vitro*; 2°) que le terme de ces réactions est la précipitation *macroscopique* de fibrine.

La coagulation "extrinsèque" (en présence de thromboplastine tissulaire) est particulièrement rapide chez le lapin grâce à sa richesse en facteur V. Le temps de Quick peut s'abaisser jusque 6 secondes. Aussi court soit-il, ce délai est encore 6 fois supérieur à celui qui généralement suffit à l'accolement des premières plaquettes. Quant à la coagulation "intrinsèque" (formation de thromboplastine sanguine), elle est moins rapide encore par suite de la durée de sa prophase. Par contre la réaction ultime du cycle coagulatif, transformation du fibrinogène en fibrine en présence de thrombine, ne demande que 2 à 3 secondes jusqu'à la formation d'un caillot macroscopique.

Que conclure de ces chiffres?

1°) Si un cycle coagulatif complet de type "intrinsèque" (prophase, 1^{re} et 2^{me} phase), voire même "extrinsèque" (1^{re} et 2^{me} phase) intervient dans la fixation des premières plaquettes extravasées, cette coagulation locale *in vivo* doit être soumise à une cinétique différente de celle décrite *in vitro*. A moins cependant que des quantités minimales d'une substance produite par une des réactions coagulatives (la thrombine par exemple) ne suffisent à l'accolement des thrombocytes et que l'élaboration de ces traces de substance active ne se réalise dans des délais plus courts que ceux nécessaires à la formation d'un coagulum macroscopique.

2°) Reprenant une ancienne hypothèse de N o l f, certains travaux récents suggèrent l'existence d'une coagulation physiologique continue à la surface des

endothélie vasculaires. Il se formerait ainsi un dépôt de fibrine responsable de l'imperméabilité normale des conduits sanguins.

Les arguments en faveur de cette hypothèse sont souvent indirects et basés sur la consommation souvent plus rapide *in vivo* qu'*in vitro* de maints facteurs coagulatifs (1, 5, 6, 10, 11, 13) ou sur l'action capillorhagique de ferments fibrinolytiques (3), fait que nous n'avons d'ailleurs pas pu confirmer (9). Des preuves plus directes de l'existence d'une coagulation intravasculaire continue ont cependant été fournies par la démonstration de la présence de fibrine sur certains endothélie (12, 15).

Remarquons ici que cette théorie explique mal l'absence de purpura spontané chez les hémophiles (à moins que cette coagulation continue ne soit de type extrinsèque) et chez afibrinogénémiques.

Quoiqu'il en soit, si on admet l'existence d'une coagulation continue, on peut penser qu'au moment de la section vasculaire, les plaquettes trouvent sur place un des chaînons du cycle coagulatif (thrombine ou fibrine) nécessaire à leur accolement immédiat.

L'action inhibitrice de la thrombine i.v., agent de défibrination, pourrait confirmer cette théorie. Il n'en est cependant pas de même de l'entrave apportés par les liquides laveurs chargés d'anticoagulants, dont l'action doit être surtout extravasculaire. Rappelons aussi que la Varidase i.v. ne retarde pas l'accrolement précoce des thrombocytes.

Nous croyons pouvoir conclure que, malgré l'action des anticoagulants, l'intervention de processus coagulatifs dans la fixation des premières plaquettes extravasées aux brèches vasculaires, n'est pas démontrée. Préciser les mécanismes d'action des infusions lentes de thrombine nous paraît la meilleure voie pour élucider le déterminisme de ce phénomène.

Résumé

Après section d'un vaisseau microscopique, il se produit un accolement remarquablement rapide de plaquettes à la brèche vasculaire. Cet accolement est visible dans 45% des cas on cours la 1^{ère} seconde, dans 73% des cas on cours des deux premières secondes.

Les hémorragies prolongées (au delà de 10 minutes) ne sont pas nécessairement liées à un trouble de l'accrolement précoce des thrombocytes.

L'action de nombreux facteurs sur la formation du clou hémostatique a été étudiée. Seuls les anticoagulants à forte dose et mieux encore les injections I.V. lentes de thrombine, entravant la fixation rapide des plaquettes.

Le rôle éventuel de processus coagulatifs dans ce phénomène est discuté.

Summary

After microscopic section of a blood vessel, a platelet plug is observed within the first second in 45% and within the first two seconds in 73% of the cases studied. Prolonged bleeding (over 10 minutes) is not necessarily associated with an anomaly in the agglutination of platelets. The influence of numerous factors on the formation of the hemostatic plug has been studied. Only high doses of anticoagulants or the slow I. V. infusion of thrombin solutions prevent the early platelet fixation. The possible influence of clotting processes on this phenomenon is discussed.

Zusammenfassung

Nach Einschnitten eines mikroskopischen Blutgefäßes lagern sich Thrombozyten auffallend schnell an die Verletzungsstelle an. Diese Anlagerung ist bei 45% der Fälle innerhalb der ersten Sekunde und bei 73% innerhalb der beiden ersten Sekunden sichtbar.

Verlängerte Blutungen (bis über 10 min.) sind nicht notwendigerweise mit einer Störung der Anlagerung der Thrombozyten verbunden.

Die Wirkung zahlreicher Faktoren auf die Bildung des verschließenden Gerinnsels wurde untersucht. Nur die Antikoagulantien in hohen Dosen und in geringerem Ausmaß Thrombin bei langsamer intravenöser Injektion interferieren mit der schnellen Anlagerung der Plättchen.

Die mögliche Rolle der Gerinnung bei diesem Phänomen wurde diskutiert.

Bibliographie

- (1) Alexander, B.: Coagulation, Hemorrhage and Thrombosis, New Engl. J. Med. 252: 432 (1955).
- (2) Bounameaux, Y.: Communication personnelle.
- (3) Copley, A. L.: Effet capillorragique de la fibrinolyse et de l'antifibrinolyse sur la membrane nictitante du lapin normal et exposé aux rayons X. Arch. int. Pharmacodyn. 99: 426 (1954).
- (4) Fitton Jackson, S.: Nature and Structure of Collagen, p. 140, Butterworths Scientific Publ., London (1953).
- (5) Gitlin, D. et Borges, W. H.: Studies on the Metabolism of fibrinogen in two patients with congenital afibrinogenemia. Blood 8: 679 (1953).
- (6) Gitlin, D., Landing, B. A. et Whipple, A.: The localization of homologous plasma proteins in the tissues of human beings as demonstrated with fluorescent antibodies. J. exp. Med. 97: 163 (1953).
- (7) Hugues, J.: Contribution à l'étude des facteurs vasculaires et sanguins dans l'hémostase spontanée. Thèse d'Agrégation. Vaillant-Carmanne éd., Liège (1953).

- (8) Hugues, J.: Métamorphose visqueuse des plaquettes et formation du clou hémostatique. *Thromb. Diath. haem.* sous presse.
- (9) Hugues, J. et Lecomte, J.: Action de la varidase sur les réactions anaphylactiques du lapin. *Arch. internat. Physiol.* 66: 445 (1958).
- (10) Laki, K.: The clotting of fibrinogen. *Blood* 8: 845 (1953).
- (11) Lasch, H. G. et Roka, L.: Über den Bildungs-Mechanismus der Gerinnungsfaktoren Prothrombin und Faktor VII. *Klin. Wschr.* 32: 460 (1954).
- (12) Levene, C. I.: The electron microscopy of Atheroma. *Lancet* 2: 1216 (1955).
- (13) Madden, R. E. et Gould, R. G.: Turnover Rate of Plasma Fibrinogen. *Fed. Proc.* 11: 252 (1952).
- (14) Nageotte, J. et Guyon, L.: Les propriétés physico-chimique du collagène et leurs conséquences morphologiques. *C. R. Ass. Anat.* 29: 408 (1934).
- (15) Roos, J.: Blood coagulation as a continuous Process. *Thromb. Diath. haem.* 1: 471 (1957).
- (16) Witte, S.: Die Steigerung der Kapillarpermeabilität durch Blutgerinnungsstörungen. *Thromb. Diath. haem.* 2: 146 (1958).