

L'Accolement des plaquettes à une surface étrangère

Institut de Clinique et de Pathologie médicale, Université de Liège

(Directeur: Prof. J. Roskam)

Y. B O U N A M E A U X

L'importance du mécanisme de l'accolement des plaquettes à une surface étrangère n'échappe à aucun de ceux qui se penchent sur les problèmes de la thrombose vasculaire et de l'hémostase. Cependant, les études systématiques concernant cette question ne sont pas nombreuses, et les arguments qu'on peut tirer d'études fragmentaires ne sont pas convaincants. C'est à l'instigation de R o s k a m que nous avons entrepris depuis plusieurs années des recherches dans ce domaine, et nous pensons que leur aboutissement partiel nous autorise à dégager quelques conclusions.

Rappelons sommairement qu'en 1923, R o s k a m (14) étudiant l'accolement des plaquettes à certaines surfaces (levures, bactéries), constata notamment, après G o v a e r t s (7), qu'il n'est possible que si ces surfaces sont modifiées au préalable par du plasma ou du sérum. A cause de son analogie avec la phagocytose, il proposa d'appeler cette modification préalable „opsonisation“, et établit que celle-ci est empêchée par tous les anticoagulants, y compris l'héparine (14, 15, 16, 17). Il en découle que l'opsonisation et la coagulation pourraient être „très probablement déterminées — en partie tout au moins — par des modifications semblables de complexes analogues sinon identiques“.

C'est contre cette interprétation que se sont élevés divers auteurs. H o u l i h a n (8) observe que des plaquettes lavées s'accolent à des bactéries avec une égale intensité, en présence de plasma ou de sérum. La prothrombine ne jouerait donc aucun rôle dans ce phénomène. J u r g e n s (11) fait remarquer qu'on ne peut mettre en évidence de fibrine au niveau des plaquettes accolées au verre. Dans des expériences inédites, L e c o m t e constate que le magnésium peut rendre son pouvoir opsonisant à un plasma hypercitraté, que la thrombine est dépourvue de la propriété d'opsoniser, qu'un plasma privé par adsorption de son pouvoir opsonisant se coagule parfaitement (13).

Recherches personnelles

1. L'accolement des plaquettes au verre

Dans une première série de travaux dont certains sont encore inédits (3, 4, 5, 6), nous avons tenté de préciser les facteurs nécessaires à l'accolement des plaquettes du rat dans le *rotator* de H. P. W r i g h t (18). C'est ainsi que suc-

cessivement, nous avons montré le rôle de l'ion calcique auquel ne peut en ce cas se substituer le magnésium, l'intervention de la prothrombine, l'inactivité de la thrombine tout au moins dans des conditions expérimentales strictement définies. Nous avons confirmé l'existence de facteurs plasmatiques adsorbés sur les plaquettes comme l'avait établi antérieurement R o s k a m (14), et avons montré leur importance dans le phénomène considéré.

Après avoir constaté que la métamorphose visqueuse des plaquettes humaines est produite par l'interaction de la thrombine et de diverses substances comportant le groupement phosphate ou carbonate (5), nous avons observé que l'accolement des plaquettes dans le *rotator* de H. P. W r i g h t nécessite l'intervention de la thrombine, du calcium et de cofacteurs identiques à ceux qui déterminent la métamorphose visqueuse des plaquettes humaines (6). L'optimum calcique se situe à $M/320$, des concentrations supérieures ou inférieures entraînant un accolement nettement moindre. Il existe une relation directe entre le pourcentage de plaquettes accolées et le logarithme de la concentration de thrombine, et entre ce même pourcentage et le logarithme de la concentration des cofacteurs (6).

Voici donc qu'avec une technique fort différente de celle de R o s k a m, nous établissons que l'accolement des plaquettes au verre tel qu'étudié par le *rotator* de H. P. W r i g h t est étroitement dépendant de la coagulation sanguine. L'hypoadhésivité observée dans l'hémophilie (20) ou chez le lapin traité par dicoumarol (19) confirme cette manière de voir.

Certains faits cependant donnaient à penser que les phénomènes observés pourraient ne pas être étendus sans plus à l'accolement des plaquettes à d'autres surfaces. C'est ainsi que des essais d'opsonisation préalable de la surface de verre ne nous ont pas donné de résultats convaincants. Aussi avons-nous poursuivi notre expérimentation en nous adressant comme R o s k a m à des levures ou à des particules inertes.

2. Recherches sur l'opsonisation

Définissons l'opsonisation par les conditions techniques réalisées pour son étude. Il s'agit d'une modification de la surface qui la rend apte à permettre l'accolement à son niveau de plaquettes en suspension dans un plasma citraté à 2%. En l'absence de cette modification, il ne se produit aucun emplaquettement.

Technique. Les recherches sont poursuivies chez le lapin. Le sang est prélevé par ponction intracardiaque ou par saignée à la carotide.

Des levures de boulanger sont mises en suspension dans du NaCl aq. à 0,9% (liquide physiologique ou L. P.), à la concentration habituelle de 300 000/mm³. Un cc. de cette suspension est centrifugé et le culot cellulaire est à nouveau mis en suspension dans 1 cc. du milieu dont on recherche le pouvoir opsonisant. Après un séjour de 30 minutes à 37° C, la suspension est à nouveau centrifugée, le culot est mis en suspension dans 5 cc. de L. P., puis après une nouvelle centrifugation, dans 1 cc. de plasma citraté à 2% riche en plaquettes. Immédiatement on assiste,

s'il y a eu opsonisation, à la formation d'agglutinats macroscopiques. Après 10 minutes d'une agitation standardisée, nous pratiquons une dilution de la suspension dans une pipette à leucocytes à l'aide de citrate à 3,8%, et sur plaque de *Burker-Turck*, en microscopie de contraste de phase, numérons les thrombocytes non accolés aux levures, et par rapport au témoin pratiqué simultanément avec des cellules non opsonisées, nous exprimons en % le nombre de plaquettes accolées. Simultanément, nous pouvons vérifier, par l'observation d'agglutinats mixtes, que le nombre de plaquettes libres a bien diminué grâce à l'accolement d'une partie de celles-ci à des levures.

Dans certains essais, nous avons utilisé des grains d'amidon de maïs à la concentration de 10%.

A. Cinétique de l'opsonisation. En ajoutant à intervalles de temps variables 0,2 cc. de citrate à 20%, à 0,8 cc. d'une suspension de levures en plasma ou en sérum, nous bloquons le phénomène de l'opsonisation. Les levures, après un lavage en citrate à 3,8%, sont alors mises au contact d'un plasma hypercitraté riche en plaquettes. Nous avons ainsi pu constater que le sérum permet l'opsonisation totale des levures en une minute. Dès après 15 secondes, l'opsonisation est manifeste, quoique peu importante; en 30 secondes, elle approche déjà du maximum. En plasma au contraire, ce n'est qu'après des temps variant entre 2 et 5 minutes que nous observons une opsonisation maximum. Il s'agit donc d'un phénomène extrêmement rapide.

B. Comparaison du pouvoir opsonisant du plasma oxalaté, de ce plasma adsorbé par BaSO₄ et du sérum. Nous avons opsonisé des levures à l'aide des différents réactifs énumérés ci-dessus et avons constaté que le plasma oxalaté (M/100) est moins actif que le sérum, lequel est quantitativement comparable au plasma adsorbé par BaSO₄ (2 adsorptions successives par 100 mgrs de BaSO₄ par cc., le temps de *Quick* de ce plasma devenant supérieur à 3 minutes). Dans ces expériences, les réactifs comparés entre eux proviennent toujours d'un même animal.

C. Thermolabilité des facteurs jouant un rôle dans l'opsonisation. Un sérum chauffé 5 minutes à 56° C. a déjà perdu une partie notable de son pouvoir opsonisant. Après 10 minutes à cette température, il devient totalement inactif. Même à 50° C., on observe en 30 minutes une légère diminution du pouvoir opsonisant du sérum. Ces observations confirment celles de *Roskam*, qui a en outre établi que les levures opsonisées peuvent être chauffées à 56° C., sans qu'elles perdent la propriété de permettre l'accolement des plaquettes à leur surface (14).

D. De l'action des facteurs de coagulation sur l'opsonisation. Par précipitation d'un plasma dilué dans de l'eau distillée à pH 5,4 et à 4° C., on peut isoler une fraction insoluble, les euglobulines, contenant tous les facteurs de coagulation. Après remise en solution de ce précipité en L. P., sa recalcification entraîne la formation de thrombine, laquelle peut être purifiée de façon plus poussée par précipitation dans l'acétone (1). Ni la solution d'euglobulines, ni la thrombine brute ou purifiée ne sont capables d'opsoniser les levures. Elles ne

possèdent pas davantage cette propriété si on leur associe du calcium, du magnésium, ces deux ions simultanément ou du dialysat de sérum.

De même, les diverses fractions du plasma ou du sérum obtenues par précipitation à 33%, entre 33 et 50% et entre 50 et 70% de saturation de sulfate ammonique, isolées ou combinées, associées ou non au dialysat de sérum ou au calcium sont dépourvues de propriétés opsonisantes. Ces divers mélanges sont pourtant parfaitement coagulables s'ils sont préparés à partir de plasma.

E. L'épuisement du plasma ou du sérum en facteurs opsonisants. Un sérum mis au contact de levures perd son pouvoir opsonisant. Si la concentration des cellules est de 300 000/mm³, c'est en règle générale dès la deuxième adsorption qu'apparaît le phénomène d'épuisement. Cette perte du pouvoir opsonisant n'est pas spécifique. Un sérum adsorbé par des levures n'est plus opsonisant ni pour les levures ni pour l'amidon. Il en est de même pour un sérum adsorbé par amidon.

L'épuisement du plasma oxalaté est toutefois plus difficile à réaliser, et dans certaines expériences, le pouvoir opsonisant restait notable même après 6 adsorptions successives.

Enfin, un sérum épuisé ne récupère pas sa capacité d'opsonisation si on l'additionne de sérum chauffé 30 minutes à 56° C., à la différence de ce que K o u r i l s k y et coll. ont observé dans l'étude de l'immuno-adhérence (12).

F. Isolement des fractions sériques douées du pouvoir opsonisant. Après tous les essais négatifs que nous venons de rapporter, nous avons cependant pu réaliser une combinaison de diverses fractions sériques douées du pouvoir d'opsonisation. Nous dialysons 15 cc. de sérum de lapin à 4° C. contre 4 litres d'eau distillée à pH 5,4. Le précipité formé (euglobulines) est centrifugé à froid, et le surnageant est ramené à isotonicité et à pH 7,4 à l'aide de NaCl à 10% et de NaOH N/10. Isolée, cette fraction surnageante est dépourvue de toute capacité opsonisante. Il en va de même du précipité d'euglobulines et de la combinaison de ces deux fractions. Mais le mélange d'un sérum chauffé 10 minutes à 56° C. et du surnageant permet une opsonisation notable.

3. L'accolement des plaquettes à des particules minérales

R o s k a m (14) a montré que des plaquettes peuvent voir s'accoler à leur surface des particules d'encre de Chine. Ce fait a été confirmé par B l o o m et al. (2). Nous avons recherché dans quelles conditions les plaquettes peuvent s'accoler à diverses particules inorganiques, et nous avons constaté que des particules de BaSO₄ ou de kaolin (environ 2 à 5 μ de diamètre) forment immédiatement avec des plaquettes des agglutinats mixtes, que celles-ci soient en suspension en L. P. après avoir subi 4 lavages, ou qu'elles se trouvent en plasma oxalaté à M/100 ou citraté à 0,38% ou encore à 2%. On ne retrouve

donc pas, en ce qui concerne ces surfaces la notion de l'opsonisation préalable indispensable à un accolement immédiat, bien établie pour les levures et certains microbes. En effet les plaquettes s'y accolent quasi instantanément, en milieu opsonisant ou non opsonisant. D'autre part, nous n'avons observé aucun accolement de plaquettes à des particules de quartz pilé (environ 15 à 20 μ de diamètre), que ces recherches soient faites en plasma faiblement ou fortement citraté, ou que les thrombocytes soient en suspension en L. P. après avoir subi 4 lavages. Le traitement préalable de ces particules par du sérum ou par un plasma faiblement oxalaté ne modifie pas leur surface, comme on l'observe lorsqu'il s'agit de levures ou de grains d'amidon. Pour ce qui est de ces particules minérales, on ne peut donc mettre en évidence aucun phénomène d'opsonisation, au sens où R o s k a m emploie ce terme.

Discussion

De cet exposé sommaire, nous voudrions dégager certains faits essentiels.

Comme nous l'avons établi, l'accrolement des plaquettes dans le *rotator* de H. P. W r i g h t dépend de la formation de thrombine agissant en présence de cofacteurs. Le mécanisme de cet accrolement est donc apparenté à celui de la coagulation sanguine.

Pareil rapprochement ne peut être fait en ce qui concerne l'opsonisation de surfaces telles que celles de levures ou de grains d'amidon. En effet, le plasma oxalaté, le plasma adsorbé par BaSO₄ et le sérum sont en l'espèce également actifs. D'autre part, des milieux contenant tous les facteurs de coagulation sont dépourvus de tout pouvoir opsonisant. Ceci nous interdit d'identifier coagulation et opsonisation. Nous ne voulons cependant pas aller plus loin dans nos conclusions, et ne prétendons pas que l'accrolement des plaquettes à une surface opsonisée soit indépendant de la coagulation. Notre expérimentation n'a pas encore abordé cette face du phénomène. Mais la modification préalable, indispensable à l'accrolement des plaquettes au niveau des levures, dépend apparemment d'un système différent. Des recherches tendant à préciser l'intervention éventuelle du complément et de la properdine dans sa genèse sont actuellement en cours.

Enfin, il existe des surfaces d'une nature telle qu'elles permettent l'accrolement des plaquettes à leur niveau dans des conditions où tout phénomène d'opsonisation ou de coagulation paraît bien exclu.

Cette distinction étant faite, nous poserons une question qui, sur le plan de l'hémostase et de la thrombose, nous paraît primordiale: à quel type de surface appartient l'endothélium lésé? Quel est le mécanisme de l'accrolement des plaquettes à son niveau?

Il ne nous semble pas qu'il y ait actuellement suffisamment de faits accumulés pour répondre de façon indiscutable à cette question.

Envisageons la constitution d'un clou hémostatique. Les travaux de H u g u e s (9, 10) ont montré que dès le coup de scalpel sectionnant un vaisseau du mésentère du lapin, il se produit un accolement des plaquettes à la surface. L'instantanéité du phénomène nous paraît capitale dans la discussion des faits. Les premières plaquettes accolées, des éléments de plus en plus nombreux viennent s'y joindre, et on assiste à la formation d'un amas volumineux, d'abord perméable au courant sanguin, puis formant un barrage efficace.

Quel mécanisme règle l'accolement instantané des plaquettes? La formation de thrombine? Cette hypothèse nous paraît peu vraisemblable, car *in vitro*, dans des conditions optimum, en présence de thromboplastine tissulaire, c'est un délai de 10 à 13 secondes qui est nécessaire pour l'apparition du ferment dans le sang. On peut certes arguer qu'il en est autrement *in vivo*, mais nous ferons de suite remarquer que le sang étudié *in vitro* a déjà été activé par son contact avec le verre, si bien qu'à priori, la coagulation pourrait même être plus lente *in vivo*.

L'opsonisation d'une surface étrangère, nous l'avons montré, peut déjà être observée après 15 secondes, et il est certain qu'avant qu'on ne puisse la mettre en évidence quantitativement, elle s'est produite dans de plus faibles proportions susceptibles d'échapper à l'observateur. D'autre part, l'accolement des plaquettes à la surface opsonisée est immédiat. Nous pensons donc qu'ici l'argument chronologique est de moindre valeur que dans le cas de la thrombine. Si par ailleurs, l'accolement des plaquettes à certaines surfaces, telles celle de particules de sulfate de baryum, est instantané, il n'est pas possible d'assimiler ce phénomène à l'accolement des plaquettes à un vaisseau lésé. En effet, dans ce dernier cas, les anticoagulants à forte concentration ont une action inhibitrice qu'ils ne possèdent pas dans le premier.

On peut évidemment envisager qu'un mécanisme, purement physique modification de charge électrique, variation locale de la pression intravasculaire, par exemple puisse déterminer l'accolement des plaquettes. Il existe cependant plusieurs arguments contre cette thèse, et nous les trouverons encore dans les travaux de H u g u e s (9, 10). Cet auteur a observé que dans un certain pourcentage de cas, il ne se produit aucun accolement des plaquettes après section d'un vaisseau. Ce fait paraît difficilement imputable à un simple mécanisme physique. D'autre part, si l'animal a été hépariné, la formation du clou hémostatique ne s'amorce pas, mais, même si l'hémorragie a duré une heure, la neutralisation de l'anticoagulant par une dose adéquate de protamine permet de façon immédiate l'élaboration d'un clou hémostatique efficace. Il nous paraît évident que les conditions locales de pression intravasculaire ne peuvent expliquer ces observations.

Il importe toutefois de considérer que tous les arguments que nous venons de développer comportent une part spéculative dans leur interprétation. Même rigoureux, le raisonnement conduit parfois à des conclusions totalement erronées,

car on peut au départ ignorer certains faits que l'expérimentation révèle dans l'avenir. Aussi est-ce avec prudence que nous dirons qu'à nos yeux, il ne semble pas possible d'expliquer l'accolement immédiat des plaquettes aux lèvres d'un vaisseau sectionné en faisant intervenir exclusivement des phénomènes physiques ou une formation locale de thrombine. Par contre, nous n'avons pas d'argument qui nous permette de rejeter la thèse d'une opsonisation préalable des parois vasculaires lésées. C'est pourquoi il nous paraît intéressant de poursuivre des recherches dans cette direction.

Insistons sur le fait que nous avons uniquement envisagé dans cet article le mécanisme de l'accolement immédiat des thrombocytes. L'enchaînement des phénomènes qui aboutit à la constitution d'un clou hémostatique efficace, c'est-à-dire imperméable au courant sanguin, nous paraît plus aisément explicable. En effet, les objections chronologiques que nous soulevions tout-à-l'heure, ne valent plus en l'occurrence, puisqu'on sait que très généralement c'est en plus d'une minute qu'une hémorragie s'arrête. Il est dès lors possible d'admettre l'intervention de la thrombine et de ses cofacteurs, et l'on conçoit parfaitement qu'un même mécanisme règle la transformation *in vitro* des plaquettes en un amas amorphe et adhérent (métamorphose visqueuse) et l'imperméabilisation *in vivo* au courant sanguin d'un amas de thrombocytes.

Résumé

1. L'accolement des plaquettes dans le *rotator* de H. P. Wright dépend de la formation de thrombine agissant en présence de cofacteurs.
2. Les plaquettes ne s'accrochent à des levures que si celles-ci ont été "opsonisées". Cette opsonisation ne fait apparemment intervenir aucun des facteurs de coagulation.
3. Les plaquettes adhèrent instantanément à certaines surfaces, telles celles de grains de BaSO₄ ou de kaolin.
4. L'auteur discute l'importance de ces constatations et des conclusions qu'on en peut tirer quant à l'accolement des plaquettes au niveau de l'endothélium lésé.

Summary

1. Platelet agglutination in the rotator of H. P. Wright depends on thrombin formation in the presence of cofactors.
2. Platelets stick to yeast cells only when „opsonized“; opsonization does not appear related to bloodclotting factors.
3. The immediate adhesiveness of platelets is noted on certain surfaces such as BaSO₄ particles or kaolin.
4. The author discusses the importance of these findings and the conclusions to be drawn in regard to platelet agglutination on damaged endothelium.

Zusammenfassung

1. Die Plättchenagglutination im Wrightschen Rotator erfolgt in Anwesenheit entsprechender Cofaktoren abhängig von Thrombinbildung.
2. Nur „opsonisierte“ Plättchen haften an Hefezellen; es besteht hier keine Abhängigkeit von Gerinnungsfaktoren.
3. An bestimmten Oberflächen (Bariumsulfat- oder Kaolinpartikel) kommt es sofort zur Plättchenadhäsion.
4. Die Wichtigkeit dieser Befunde und Schlüsse, die sie im Hinblick auf die Plättchenagglutination im Bereich von Endothelläsionen zulassen, werden diskutiert.

Bibliographie

- (1) Biggs, R. and Macfarlane, R. G.: Human Blood Coagulation and its disorders Blackwell. Scient. Publ. Oxford 406 p. (1953).
- (2) Bloom, G., Gustavson, K. H. and Swenson, A.: On the reaction of blood platelets to submicroscopic particles in vitro. Acta haemat. (Basel) 13: 57 (1955).
- (3) Bounameaux, Y.: Cinétique de l'adhérence des plaquettes in vitro. C. R. Soc. Biol. (Paris) 149: 603 (1955); Du rôle du calcium dans l'adhésivité des plaquettes in vitro. C. R. Soc. Biol. (Paris) 149: 817 (1955); Adhésivité des plaquettes in vitro. Du rôle de divers éléments plasmatiques dont la prothrombine. C. R. Soc. Biol. (Paris) 149: 1059 (1955); Action de la thromboplastine sur l'adhésivité des plaquettes in vitro. C. R. Soc. Biol. (Paris) 149: 1285 (1955).
- (4) Bounameaux, Y., I. Symposium de la Fondation Valentino Baldacci, Madrid 1955, Ed. Omnia Medica, Pisa, 190 p., 1956.
- (5) Bounameaux, Y.: Recherches sur le mécanisme de la rétraction du caillot et de la métamorphose visqueuse des plaquettes. Rev. Hémat. 12: 16 (1957).
- (6) Bounameaux, Y.: Expériences inédites.
- (7) Govaerts, P.: La fonction antixénique des plaquettes sanguines. Arch. internat. Physiol. 16: 1 (1921).
- (8) Houlihan, R. B.: Studies on the adhesion of human blood platelets and bacteria. Blood 1: 142 (1947).
- (9) Hugues, J.: Contribution à l'étude des facteurs vasculaires et sanguins dans l'hémostase spontanée. Arch. int. Physiol. 61: 565 (1953).
- (10) Hugues, J.: I. Symposium de la Fondation Valentino Baldacci, Madrid 1955. Omnia med (Pisa) 190 p., 1956.
- (11) Jurgens, R.: Die Blutplättchen und ihre Bedeutung für Blutungsneigung und Thrombusbildung. Dtsch. med. Wschr. 77: 1265 (1952).
- (12) Kourilsky, R., Robineaux, R. et Pieron, R.: Recherches sur le mécanisme de l'immunoadhérence. Sem. Hôp. Path. et Biol. 32: B. 413/P. (1956).
- (13) Lecomte, J.: Expériences inédites.
- (14) Roskam, J.: Contribution à l'étude de la physiologie normale et pathologique du globulin (plaquette de Bizzozero). Arch. int. Physiol. 20: 241 (1923).
- (15) Roskam, J.: Mécanisme de la prévention et du traitement des thromboses par l'héparine. Arch. int. Pharmacodyn. 68: 66 (1942).
- (16) Roskam, J.: I. Symposium de la Fondation Valentino Baldacci, Madrid, 1955; Omnia med. (Pisa) 190 p., 1956.
- (17) Roskam, J.: L'hémostase spontanée. Masson et Cie. Edit. Paris, 188 p., 1951.
- (18) Wright, H. P.: The adhesiveness of blood platelets in normal subjects with varying concentrations of anticoagulants. J. Path. Bact. 53: 255 (1941).
- (19) Wright, H. P.: Adhesiveness of blood platelets in rabbits treated with dicumarol. J. Path. Bact. 57: 382 (1945).
- (20) Wright, H. P.: Adhesiveness of blood platelets in Haemophilia. Lancet, 306 (1946).