

# Thrombinoscopy : a method for the determination of prothrombinase activity in plasma, its application to the study of different types of heparin

## Citation for published version (APA):

Béguin, S. (1987). Thrombinoscopy : a method for the determination of prothrombinase activity in plasma, its application to the study of different types of heparin. Maastricht: Rijksuniversiteit Limburg.

## Document status and date:

Published: 01/01/1987

## Document Version:

Publisher's PDF, also known as Version of record

## Please check the document version of this publication:

- A submitted manuscript is the version of the article upon submission and before peer-review. There can be important differences between the submitted version and the official published version of record. People interested in the research are advised to contact the author for the final version of the publication, or visit the DOI to the publisher's website.
- The final author version and the galley proof are versions of the publication after peer review.
- The final published version features the final layout of the paper including the volume, issue and page numbers.

[Link to publication](#)

## General rights

Copyright and moral rights for the publications made accessible in the public portal are retained by the authors and/or other copyright owners and it is a condition of accessing publications that users recognise and abide by the legal requirements associated with these rights.

- Users may download and print one copy of any publication from the public portal for the purpose of private study or research.
- You may not further distribute the material or use it for any profit-making activity or commercial gain
- You may freely distribute the URL identifying the publication in the public portal.

If the publication is distributed under the terms of Article 25fa of the Dutch Copyright Act, indicated by the "Taverne" license above, please follow below link for the End User Agreement:

[www.umlib.nl/taverne-license](http://www.umlib.nl/taverne-license)

## Take down policy

If you believe that this document breaches copyright please contact us at:

[repository@maastrichtuniversity.nl](mailto:repository@maastrichtuniversity.nl)

providing details and we will investigate your claim.

Download date: 04 Dec. 2019

## SUMMARY AND CONCLUSIONS

In this thesis we want to contribute to the understanding of the mechanisms that underly thrombin generation in plasma and of the ways in which these mechanisms can be interfered with by drugs of the heparin family.

We first developed a method to determine the course of thrombin formation and disappearance under conditions as near as possible to the physiological situation and with enough precision to allow calculation of the course of prothrombinase activity. The method can be applied to defibrinated or non defibrinated platelet poor- as well as platelet rich plasma.

In essence this method is the time honoured thrombin generation test. Thrombin concentrations were estimated spectrophotometrically by their amidolytic action on a chromogenic substrate. At any moment during such a test the velocity of thrombin generation is the resultant of the activation of prothrombin by prothrombinase and the inactivation of thrombin by antithrombins. We determined the velocity of prothrombin activation (prothrombinase activity) by adding the calculated breakdown velocity of thrombin to the experimentally assessed rate of thrombin formation or disappearance. The breakdown velocity was computed by multiplication of the free thrombin concentration by the pseudo first order rate constant of decay. This constant was determined by measuring the rate of thrombin disappearance after blocking prothrombinase activity. It is the sum of the rate constants of each of the individual antithrombins. Of these the inactivation by  $\alpha 2$  Macroglobulin ( $\alpha 2M$ ) requires separate determination because the thrombin- $\alpha 2M$  complex has a residual amidolytic activity. We called the rate constant of the non  $\alpha 2M$  antithrombins (mainly antithrombin III (AT III))  $k_1$  and that of  $\alpha 2M$ .  $k_2$ . The ratio of  $k_1$  to  $k_2$  could be obtained from the ratio of the amounts of AT III bound thrombin to  $\alpha 2M$  bound thrombin at the end of the experiment. It could be shown that  $k_1$  and  $k_2$  can be regarded as constant during in the course of the experiment.

Once  $k_1$  and  $k_2$  are known it is possible to calculate the breakdown velocity of thrombin and the velocity of the formation of  $\alpha 2M$ -thrombin at any sampling moment. Hence the prothrombin conversion rate can be calculated at any moment and the time course of prothrombinase activity can be

obtained. A computer program was written to carry out these calculations.

The method was validated in two different ways. First we determined experimentally the time course of the concentrations of prothrombin, thrombin and  $\alpha 2M$  bound thrombin in plasma after triggering with thromboplastin. Then we calculated the time course of prothrombin and  $\alpha 2M$ -thrombin from the thrombin activities. A close similarity between the experimental and the calculated values was observed.

Secondly, we made plasma deficient in AT III, and/or  $\alpha 2M$  by immunoadsorption. The time course of prothrombinase obtained in the absence of an antithrombin was shown to be indistinguishable from that in its presence if in the calculations the corresponding decay constants were put to zero. These experiments allowed us to calculate the relative importance of the different antithrombins for the decay of thrombin in plasma. We found that AT III,  $\alpha 2M$ , and non AT III - non  $\alpha 2M$  (probably mainly  $\alpha_1$  antitrypsin) contributed respectively 64%, 23% and 14% to the velocity of thrombin decay.

Although apparently sophisticated, our technique can be easily applied in any laboratory provided with a spectrophotometer and a personal computer. The computer showed to be a valuable aid in these experiments not only for the above mentioned calculations but also because it was used for the automatic registration of sampling times and of incubation times with the chromogenic substrate. This allowed us to sample at 3-4 seconds intervals if necessary. In this way we could reliably determine half-life times of endogenous thrombin as short as 6 sec, such as they are seen when heparin is added to plasma in therapeutic concentrations.

As far as we know our experiments are the first to approach the time course of prothrombinase in plasma. They allowed us to confirm the important role of traces of thrombin in the initial phase of coagulation postulated by A. Hurllet - Birk Jensen, F. Jossen and ourselves in 1976 and to obtain a better insight in the mode of action of heparins.

Contrary to the generally accepted view it appeared to us that classical unfractionated heparin (UFH) has hardly any influence on prothrombinase formation triggered via the extrinsic pathway i.e. by recalcification in the presence of thromboplastin. Its role is essentially that of a catalyst of AT III dependent thrombin inactivation only.

When prothrombinase activity is triggered via the intrinsic system

When prothrombinase activity is triggered via the intrinsic system (recalcification in the presence of phospholipids and kaolin), heparin does influence prothrombinase formation because, in that case, the decrease of available thrombin slows down the thrombin dependent feedback activation of factor VIII. This results in a prolongation of the lag time as well as in a decrease of the amount of prothrombinase formed. The latter phenomenon can be explained by the rapid AT III- and heparin dependent inactivation of free factor IX<sub>a</sub> that we observed. If the generation of factor VIII<sub>a</sub> is slow, factor IX<sub>a</sub> cannot be protected from this inactivation and is partly consumed before adequate factor VIII<sub>a</sub> levels are available. This activation of factor VIII by thrombin thus is of prime importance for the formation of the factor X activating complex (tenase) and therefore for the formation of prothrombinase via the intrinsic pathway. Indeed, if tenase is added ready made to the system, heparin will not inhibit the prothrombinase formed.

We conclude that AT III-heparin in plasma does not act at the level of factor X<sub>a</sub>. Our observations corroborate the conclusions of Marciniack (1973) and of Josso and Béguin reported in 1981 on the protection of factor X<sub>a</sub> from the action of AT III and heparin by factor V<sub>a</sub> and phospholipid. Moreover, they allow us to conclude that this protection must be virtually complete. Not only is factor X<sub>a</sub> protected in prothrombinase but also factor IX<sub>a</sub> in tenase.

These results justify an interest in new pharmaceuticals of the heparin family that may be able to inhibit at the level of factor X<sub>a</sub>. In the last 5 years there has been a rapidly growing body of knowledge on the mode of action of fragments and fractions of heparin. The consensus is that low molecular weight heparins (LMWH) have a decreased activity against thrombin but remain active against factor X<sub>a</sub>.

This conclusion stems from observations in which (partially) purified factors have been used. The mode of action of LMWH on the endogenously activated factors of clotting plasma is still unknown. Since in the case of unfractionated heparin there are appreciable differences between the action of heparin on endogenous factor II<sub>a</sub>, IX<sub>a</sub> on X<sub>a</sub> and on free factors, we also tested the effect of a series of LMWH on prothrombinase formation in plasma

It appeared that two classes of LMWH can be distinguished. One class that we called S type after its prototype Standard heparin, does induce a dose dependent increase of the inactivation of endogenous thrombin. The

other class, the P type, of which the Choay Pentasaccharide (CY 234) is the prototype, has no influence whatsoever on thrombin decay. The S type heparins do not or hardly inhibit prothrombinase activity whereas the P type heparins do. Apart from standard unfractionated heparin CY 216 (Fraxiparine<sup>R</sup>) and CY 222 belong to the S class. The P class comprises the pentasaccharide, EMT 966 and EMT 967. PK 10169 (Enoxaparine) is a mixed type, possibly a mixture of a P and an S type heparin.

The recognition of two types of heparins has important consequences for the standardization of heparin preparations. On the one hand every S type heparin can now be easily compared to a standard unfractionated heparin. The AT III dependent decay of endogenous thrombin, the only primary effect of these heparins in plasma, should be used as a yardstick. On the other hand heparins of the P type as well as the mixed type heparins have a mechanism of action that is fundamentally different from classical heparin. Therefore, no rational comparison with a standard unfractionated heparin is possible.

The same holds mutatis mutandis for the clinical situation. If indeed unfractionated heparin exerts its action via the inhibition of thrombin then the S type heparins will act like UFH, be it with different and probably much more favourable pharmacokinetic properties. P type heparins on the contrary are of a completely different type and should be considered new drugs with unknown effects on thrombosis and haemostasis.

We also investigated the semisynthetic heparin-like drug pentosane polysulphate (PPS, Hémoclar<sup>R</sup>). Like heparin it causes a dose dependent increase of the decay of thrombin, 1 µg PPS having the effect of 0.045 µg UFH. This effect is completely dependent upon plasma cofactors. About 35% of the cofactor activity can not be attributed to AT III. Probably heparin cofactor II is the responsible cofactor for that part.

The inhibition of factor VIII activation by PPS, demonstrated by Wagenvoord et al. with purified factors, also seems to occur in whole plasma. The inhibition could be shown not to be due to an action on factor IX<sub>a</sub>, contrary to the conclusion of Fischer et al.

We tried to use PPS as a means to demonstrate the existence of the Josso loop, i.e. a thromboplastin induced factor VIII and IX dependent pathway of factor X activation. This pathway is thought to become important if there is not enough thromboplastin to ensure the direct rapid activation

of factor X by factor VII and thromboplastin. Indeed it was observed that the inhibition by PPS of the extrinsic prothrombinase generation is dependent upon the potency of the thromboplastin used. With thromboplastin concentrations up to 1 : 10 there is no inhibition to speak of. If the dilution is 1 : 40 or higher, inhibition approaches 20%, independent of the PPS concentration between 1 and 10  $\mu\text{g/ml}$ .

A second indication for the existence of the Josso loop is the fact that in haemophilia A or B plasma, contrary to normal plasma, PPS does not inhibit thromboplastin induced prothrombinase generation. Surprisingly, in haemophilia plasma, PPS induced an increase of prothrombinase activity. Heparin has the same effect. We were unable to find an explanation for this phenomenon. There are indications that it also occurs in normal plasma. If PPS shows both an inhibiting and an activating action in normal plasma than the inhibition of prothrombinase observed ( $\sim 20\%$ ) cannot be used to quantify the contribution of the Josso Loop but must be regarded as its lower limit.

In an attempt to further approach physiological conditions we also studied platelet-rich plasma. This involved the solution of technical difficulties caused by the presence of fibrinogen and the instability of the platelets. We adapted our technique so that it was possible to measure the course of thrombin formation in plasma containing a fixed number of platelets ( $300.000/\mu\text{l}$ ) within two hours after venipuncture. A spontaneous burst of thrombin generation is seen in platelet rich plasma after a lag time of 8 - 10 min. In platelet poor plasma this is not seen. We were surprised to find that neither stirring nor the presence of collagen influenced the lag time or the amount of thrombin formed. Thromboplastin in a dilution so high as not to influence thrombin generation during 20 min in a sample of platelet poor plasma decreases the lag time in platelet rich plasma by 3-5 min.

This cooperative effect of platelet and tissue factor to our knowledge has not been described before. We could show that it was mediated by trace amounts of thrombin, as it was inhibited by low concentrations of hirudin (0.2 - 2U/ml) and simulated by low amounts of thrombin (0.5 - 5 nM). The effect could not be obtained by the addition of factor V or factor  $V_a$ . Procoagulant phospholipids, however, did cause a shortening of the lag time. It seems probable that the production of procoagulant phospholipids

by platelets, triggered by trace amounts of thrombin formed during the lag time, supplies the rate limiting reactant necessary for the explosive formation of thrombin. This idea is supported by the fact that 5  $\mu\text{M}$  of the  $\text{Ca}^{++}$  ionophore, known to induce the appearance of procoagulant phospholipids, shortens to 2 min the lag time of thrombin formation in platelet rich plasma.

We demonstrated that heparin in concentrations that almost completely inhibit thrombin generation in platelet poor plasma (0.1 - 0.3 U/ml) will postpone the generation of thrombin in platelet rich plasma but will hardly influence the amount of thrombin formed. This can be explained by the release of platelet factor 4 from the activated platelets. It was found that in the supernatant of platelet rich plasma, in which the platelets were activated by  $\text{Ca}^{++}$  ionophore (5  $\mu\text{M}$ ) or were destructed by sonication, up to 0.5 U/ml of heparin can be neutralized.

Contrary to unfractionated heparin, the low molecular weight heparins investigated did inhibit thrombin generation in platelet rich plasma, probably because they are less effectively neutralized by platelet factor 4. The different LMW heparins tested show different inhibition patterns, probably because of differences in their interaction with AT III, prothrombinase and platelet factor 4. Further studies will be necessary to define these effects more precisely.

We also did a series of preliminary experiments on the effect of drugs with a recognized or supposed antithrombotic action on the cooperation between thromboplastin and platelets. Oral anticoagulation, as could be expected, had an inhibitory effect. More surprisingly Aspirin also appeared to cause a slight inhibition. The stable prostacyclin analogue ZK 36374 did increase the lag time but PGE<sub>1</sub>, in concentrations that completely inhibited aggregation, did not. The vascular anticoagulant protein described by Reutelingsperger et al. also caused inhibition of the cooperative effect.

In summary, by taking up again the old tool of coagulation that is the thrombin generation test and adapting it to modern requirements of precision and sampling frequency we were able to do a detailed study of thrombin generation in platelet poor and platelet rich plasma and of the influence of heparins and heparin like drugs thereon. The availability of highly purified human clotting factors made it possible to gain more insight in the mechanisms involved, We were able to demonstrate the importance in

clotting plasma of three amplifying mechanisms: The Josso loop, the feedback activation of factor VIII by thrombin and the activation of platelets by thrombin. The main effect of the latter seems to be the exposure of procoagulant phospholipids and, for clotting in the presence of heparin; the release of platelet factor 4.

We observed a cooperative effect of low concentrations of thromboplastin and platelets that may important in vivo if thrombin is generated as a result of by limited tissue damage. We demonstrated that classical heparin in plasma acts primarily on the decay of thrombin and that decay of factor  $X_a$  and  $IX_a$  virtually completely prevented by the presence of phospholipids and factor  $V_a$  and  $VIII_a$ . The action of heparin-AT III on thrombin entails inhibition of the feedback activations of factor VIII and platelets. We were able to show that one class of low molecular weight heparins (the S type heparins) acts essentially like classical heparin does, whereas others, the P type heparins, do inhibit prothrombinase and have no action on thrombin.

We hope to have demonstrated that experiments in whole plasma, with or without platelets, are a necessary link between biochemical studies on purified factors and in vivo experiments on the physiology and pharmacology of haemostasis and thrombosis.

Many ideas in this thesis originated from my long cooperation with Francois Josso. I am grateful that I had the opportunity to pursue them in his spirit.



## SAMENVATTING EN CONCLUSIES

Dit proefschrift wil een bijdrage leveren tot de kennis van het mechanisme van de vorming van trombine in plasma en van de remming daarvan door heparine en heparineachtige stoffen.

Eerst ontwikkelden wij een methode om het verloop van de trombine activiteit in plasma te meten onder omstandigheden die de fysiologisch situatie dicht benaderen. De nauwkeurigheid en de frequentie van bemonstering maakten het mogelijk om uit de trombineconcentraties de protrombinase activiteit te berekenen. De methode kan worden toegepast op al dan niet gedefibrineerd, plaatjesarm of plaatjesrijk plasma.

In wezen gaat het om de vanouds bekende trombine generatie test waarbij de trombine concentraties spectrofotometrisch bepaald worden m.b.v. een chromogeen substraat. Op ieder tijdstip gedurende zo'n proef is de gemeten trombinevormingssnelheid de resultante van de prothrombinase activiteit en de snelheid van inactivering t.g.v. antitrombines. Wij verkregen de afbraaksnelheid van trombine door deze te berekenen uit de trombineconcentratie en de pseudo eerste order afbraak constante van trombine. Deze afbraak constante werd bepaald door de trombine verdwijning te meten na het blokkeren van de prothrombinase activiteit. De zo gevonden constante is de som van de individuele constantes de verschillende antitrombines in het plasma. De constante van  $\alpha$ -2 macroglobuline ( $\alpha$ 2M) moet apart bepaald worden omdat het trombine  $\alpha$ -2M complex een amidolytische activiteit heeft.

$k_1$  noemden wij de snelheidsconstante van de niet  $\alpha$ 2M afhankelijke afbraakconstante (d.i. voornamelijk t.g.v. antitrombine III (AT III)), de  $\alpha$ 2M afhankelijke afbraakconstante werd  $k_2$  genoemd. De verhouding van  $k_1$  en  $k_2$  kan bepaald worden door de verhouding te meten van de hoeveelheden trombine die na afloop van de proef aan AT III en aan  $\alpha$ 2M gebonden zijn. Wij toonden aan dat  $k_1$  en  $k_2$  constant zijn gedurende de loop van het experiment. Bij bekende  $k_1$  en  $k_2$  kan men op ieder tijdstip waarop een monster getrokken is de vormingssnelheid van At III- trombine en  $\alpha$ 2M-trombine berekenen.

De protrombine omzettingssnelheid kan dan op ieder moment berekend worden door de experimenteel gemeten snelheid en de afbraaksnelheden op te tellen. Er werd een computerprogramma geschreven om deze berekeningen uit te voeren.

De juistheid van de procedure werd op twee verschillende manieren getoetst. In de eerste plaats bepaalden wij experimenteel het verloop van de concentraties van protrombine, trombine en  $\alpha$ 2M-trombine in het plasma nadat de trombinevorming in gang gezet was door recalcificatie in aanwezigheid van tromboplastine. Vanuit de gevonden waarden voor trombine werden daarna het verloop van de protrombine en de  $\alpha$ 2M-trombine concentraties berekend en vergeleken met de experimenteel verkregen waarden. Er bleek een nauwe overeenstemming te bestaan. Ten tweede maakten wij plasma deficient in  $\alpha$ 2M en AT III of beide door immuunadsorptie. Het bleek dat de berekende protrombinase activiteiten in deficiënte plasmas goed overeenkomen met die verkregen uit normaal plasma als de constante(s) behorende bij de afwezige remmer(s) gelijk gesteld werden aan nul. Met deze experimenten konden wij ook de relative invloed van de verschillende trombine remmers in plasma bepalen. Wij vonden dat AT III,  $\alpha$ 2M en de restactiviteit (waarschijnlijk  $\alpha_1$ -antitrypsine) respectievelijk 64%, 23% en 14% aan de snelheid van trombine inactivering bijdroegen.

Ofschoon ogenschijnlijk ingewikkeld, kan onze techniek gemakkelijk worden toegepast in ieder laboratorium waar een spectrofotometer en een huiscomputer aanwezig zijn. De computer is niet alleen nodig voor de berekeningen, maar ook voor de automatische registratie van monster- en incubatietijden via van drukcontacten voorziene pipetten. Hiermee konden monsterfrequenties van eens per 3 à 4 seconden bereikt worden, zodat trombine-halfwaardetijden van 6 seconden en hoger, zoals die bij therapeutische heparineconcentraties voorkomen, met voldoende nauwkeurigheid gemeten konden worden.

Voorzover wij weten zijn onze proeven de eerste die het verloop van de protrombinase activiteit in plasma weergeven. Zij stelden ons in staat om de belangrijke rol te bevestigen van sporen trombine in de voorfase van de stolling en om nadere informatie te krijgen over de werkingswijze van heparines.

In tegenstelling tot wat algemeen wordt aangenomen bleek dat het klassieke ongefractioneerde heparine (UFH) nauwelijks invloed heeft op de activiteit en de vorming van protrombinase, dus van factor  $X_a$ . De rol van het heparine lijkt beperkt tot die van katalysator van AT III-afhankelijke trombineinactivering. In het extrinsieke systeem (d.w.z. recalcificatie in aanwezigheid van tromboplastine) blijft de hoeveelheid protrombinase on-

gewijzigd in aanwezigheid van hoeveelheden heparine die de trombinevorming sterk ( $\sim 85\%$ ) remmen. Als de protrombinase activiteit in gang wordt gezet via het intrinsieke systeem (recalcificatie in aanwezigheid van phospholipide en kaoline) beïnvloedt heparine haar wel, zij het indirect. De verminderde hoeveelheid vrij trombine brengt in dat geval een vertraagde activitering van factor VIII met zich mee, zodat de factor  $IX_a$ , die via het contact activeringssysteem gevormd is, zijn activiteit niet tot uitdrukking kan brengen. Dit veroorzaakt een verlenging van de latentietijd voorafgaande aan de explosieve trombinevorming maar ook een vermindering van de protrombinase activiteit. Dit laatste kan verklaard worden doordat vrij factor  $IX_a$  dat niet met factor  $VIII_a$  aan phospholipide gebonden wordt snel o.i.v. heparine en AT III wordt geïnactiveerd. De activering van factor VIII door trombine is dus van groot belang voor de vorming van het factor X activerende complex ("tenase") via de intrinsieke weg. Als de reactie door uit zuivere factoren samengesteld tenase gestart wordt, remt heparine de protrombinase ontwikkeling niet. Onze waarnemingen bevestigen de conclusies van Marciniak (1973) en Josso en Bèguin (1980) over de beschermende werking van phospholipide en factor  $V_{(a)}$  op factor  $X_a$  tegen AT III en heparine. Bovendien mogen wij concluderen dat deze bescherming praktisch volledig is en dat er een analoge bescherming van factor  $IX_a$  door factor  $VIII_a$  en phospholipide bestaat.

In de laatste jaren is er veel onderzoek gedaan naar fracties en derivaten van heparine met een laag moleculair gewicht. Men is het er algemeen over eens dat laag moleculair gewicht heparines (LMWH) een verhoudingsgewijs geringere activiteit hebben tegenover trombine dan tegenover factor  $X_a$ . Dit berust op waarnemingen waarbij de werking van heparines op (gedeeltelijk) gezuiverde geactiveerde factoren werd onderzocht. De werking van LMWH op geactiveerde factoren die gedurende het stollingsproces in het plasma ontstaan (endogene factoren) is nog onbekend.

Daar wij hebben kunnen aantonen dat er in het geval van UFH belangrijke verschillen bestaan tussen de werking op de endogene geactiveerde factoren  $II_a$ ,  $IX_a$  en  $X_a$  en op dezelfde factoren als zij van buitenaf aan het plasma worden toegevoegd, lag het in de rede na te gaan wat het effect van LMWH op de protrombinaseactiviteit is. Het bleek dat er twee klassen van heparines bestaan. De eerste, die wij het S type noemden (naar Standaard heparine) bevat heparines die niet wezenlijk van UFH verschillen. Deze heparines

(CY 216, CY 222) versnellen de inactivering van trombine door AT III maar hebben geen directe werking op het protrombinase. De tweede klasse, het P type, vernoemd naar Choays Pentasaccharide (CY 234) heeft geen werking op de AT III -trombine interactie, maar remt het protrombinase wel. Tot deze groep behoren naast het pentasaccharide de stoffen EMT 966 en EMT 967. PK 10169 is van een gemengd type, mogelijk inderdaad een mengsel van twee of meer heparines.

Het onderkennen van twee klassen heparine heeft belangrijke gevolgen voor de standaardisering van heparinepreparaten. Enerzijds kan men de heparines van het S type ongedwongen met een standaardheparine vergelijken. De enige parameter die in plasma door toevoeging van deze heparines verandert, nl. de afbraak constante van endogeen trombine, moet daarbij de maatstaf zijn. Anderzijds kunnen heparines van het P type niet met die van het S type worden vergeleken omdat zij een geheel verschillend werkingsmechanisme hebben. Iedere vergelijking zal van het meetsysteem afhankelijk en dus arbitrair blijven. Hetzelfde geldt mutatis mutandis voor de therapeutische situatie. Indien UFH werkt via de remming van trombine, dan zullen S type heparines net zo werken, zij het dat ze andere - en waarschijnlijk gunstiger - farmacodynamische eigenschappen bezitten. Heparines van het P type daarentegen moeten beschouwd worden als nieuwe geneesmiddelen met onbekende werking.

Wij onderzochten ook het semisynthetische heparinoïde pentosan polysulfaat (PPS, Hémoclar<sup>R</sup>). Evenals heparine veroorzaakt het een dosisafhankelijke toename van de trombine inactivering in plasma. 1 µg PPS heeft hetzelfde effect als 0.045 µg UFH. Het effect is volledig afhankelijk van de cofactoren in het plasma. Ongeveer 2/3 van de cofactor activiteit wordt uitgeoefend door AT III, de rest door één of meer andere cofactoren. Hoogstwaarschijnlijk betreft het hier heparine cofactor II.

Wagenvoord e.a. hebben aangetoond dat PPS de activering van factor VIII door trombine remt in een cofactor onafhankelijk proces. Wij konden aantonen dat PPS de extrinsieke en intrinsieke protrombinase activiteit (c.q. de vorming daarvan) remt en dat deze remming, i.t.t. de conclusie van Fischer e.a. niet berust op remming van factor IX<sub>a</sub>. Wij namen waar dat de remming in het extrinsieke systeem toeneemt bij afnemende concentratie tromboplastine. Bij tromboplastineverduunningen van 1:40 of hoger bereikt de remming een plafond van 20% onafhankelijk van de PPS concentratie tussen

1 en 10  $\mu\text{g/ml}$ . Dit gedrag is te verwachten indien er een tromboplastine- en factor VIII afhankelijke reactieweg bestaat voor de activering van factor  $X_a$ , d.w.z. als de tromboplastineafhankelijke factor IX activering bijdraagt aan de extrinsieke protrombinase vorming m.a.w. als de Josso lus in werking treedt. Onze resultaten doen vermoeden dat dit bij tromboplastine verdunningen tussen 1:10 en 1:40 het geval is. Bij hogere verdunningen stijgt de remming door PPS niet boven 20% en lijkt de bijdragen van het cofactor VIII afhankelijke proces niet toe te nemen.

Een duidelijke aanwijzing van het bestaan van de Josso lus vindt men in het feit, dat de extrinsieke protrombinase vorming in hemofiel plasma (A en B) in tegenstelling tot die in normaal plasma, niet wordt geremd. Het is verleidelijk om de 20% remming door PPS van het extrinsieke systeem met verdund tromboplastine te zien als de maximale bijdrage van de factor VIII en IX afhankelijke factor X activering. Het is echter eerder een ondergrens, want PPS blijkt in hemofiel plasma een stimulerende invloed op het protrombinase te hebben. Er zijn aanwijzingen dat dit proces, waarvan wij de oorzaak niet kennen, ook in normaal plasma voorkomt. In dat geval is de waargenomen remming de som van een remming en een activatie zodat de echte remming groter dan 20% moet zijn. De bijdrage van de Josso lus zou dan eveneens meer dan 20% bedragen.

In een poging om de fysiologische situatie dichter te benaderen, bestudeerden we naast plaatjesarm plasma ook plaatjesrijk plasma. Dit bracht praktische problemen met zich mee vanwege de onmogelijkheid om de monsters te defibrineren en door de onstabieliteit van de plaatjes. Om onderling vergelijkbare resultaten te verkrijgen moesten de trombinegeneratiecurves parallel worden uitgevoerd binnen twee uur na venepunctie. Indien geen tromboplastine werd toegevoegd werd een trombine explosie gezien na een latentie fase van 10-12 minuten. In plaatjesarm plasma duurde het langer dan 20 minuten voordat de eerste, lage concentraties van trombine waarneembaar waren. Noch roeren, noch de aanwezigheid van collageen beïnvloedde de latentietijd of de hoogte van de trombinepiek. Tromboplastine toegevoegd in zo grote verdunning (1:400) dat de trombinevorming in plaatjesarm plasma niet noemenswaard wordt verhoogd veroorzaakt een verkorting van de latentietijd van de trombinevorming in het plaatjesrijke plasma van 3 à 5 minuten. Dit cooperatieve effect van plaatjes en weefselfactor is voor zover wij weten nog niet eerder beschreven. Wij konden aantonen dat het

wordt bewerkstelligd door sporen van trombine. Het wordt nl. geremd door hirudine (0.2 - 2 U/ml) en nagebootst door kleine hoeveelheden trombine (0.5 - 5 nM). Toevoeging van factor V of factor V<sub>a</sub>, in concentraties zoals die door geactiveerde plaatjes worden vrijgegeven, beïnvloedt de latentietijd niet significant. Procoagulante phospholipiden daarentegen veroorzaken een sterke verkorting van de latentietijd.

Het lijkt niet onwaarschijnlijk dat het beschikbaar komen van procoagulante phospholipiden uit bloedplaatjes de reactie is die de trombine-explosie veroorzaakt. De bloedplaatjes reactie zou dan worden geïnduceerd door sporen trombine die gedurende de latentietijd worden gevormd. Deze gedachte wordt ondersteund door het feit dat 5  $\mu\text{M}$  Ca<sup>++</sup> ionofoor, waarvan bekend is dat het de flip-flop reactie in plaatjes teweeg brengt, de latentietijd van de trombinevorming in plaatjesrijk plasma tot 2 minuten terugbrengt.

Wij konden aantonen dat heparine, in concentraties die de trombine vorming in plaatjesarm plasma praktisch geheel uitdoven (0.1 - 0.3 U/ml) de trombinevorming in plaatjesrijk plasma wel uitstellen maar niet remmen. Dit kan verklaard worden door het vrijkomen van de heparine bindende plaatjesfactor 4 uit geactiveerde bloedplaatjes. Wij vonden het in supernatant van plaatjesrijk plasma waaraan Ca<sup>++</sup> ionofoor (5  $\mu\text{M}$ ) als activator was toegevoegd, voldoende plaatjesfactor 4 aanwezig was om tot 0.5 U/ml heparine te neutraliseren. Sonicatie had hetzelfde effect als toevoegen van Ca<sup>++</sup> ionofoor.

In tegenstelling tot UFH remmen LMWH de trombine vorming in plaatjesrijk plasma wel, waarschijnlijk omdat ze minder effectief door plaatjesfactor 4 worden geneutraliseerd. De verschillende soorten LMWH tonen verschillende remmingspatronen waarschijnlijk afhankelijk van hun interactie met AT III, protrombinase en plaatjesfactor 4. Verdere experimenten zijn noodzakelijk om deze patronen te ontrafelen.

Wij deden ook een aantal voorbereidende proeven over het effect van andere antitrombotische farmaca op de trombinevorming in plaatjesrijk plasma.

Orale antistolling remt het cooperatieve effect van tromboplastine en plaatjes. Verrassenderwijs werd ook met aspirin een zekere remming bereikt. Het stabiele prostacyclineanalooq ZK 36374 verlengde de latentietijd maar prostaglandine E1 deed dit niet, ook niet in concentraties die de aggre-

gatie volledig remden. Het vasculair anticoagulans beschreven door Reutelingsperger et al. remde de trombine vorming in plaatjesarm plasma en ook het cooperatieve effect van bloedplaatjes en tromboplastine.

Wij kunnen onze resultaten a.h.v. samenvatten: Wij hebben een experimentele methode ontwikkeld die het mogelijk maakt de protrombinase activiteit in plasma te vervolgen. Wij hebben deze gebruikt voor een gedetailleerde bestudering van de trombine vorming in plaatjesarm en plaatjesrijk plasma en van de invloed van heparine en heparineachtige stoffen daarop. De beschikbaarheid van zuivere preparaten van menselijke stollingsfactoren maakte het mogelijk de daarbij betrokken mechanismen gedetailleerd te bestuderen. Wij konden laten zien dat drie versterkingsmechanismen in stollend plasma van groot belang zijn: De Josso lus en de activering door trombine van factor VIII en van bloedplaatjes. Dit laatste effect is vooral te danken aan het beschikbaar komen van stollingsbevorderende phospholipiden. Als er heparine aanwezig is, heeft ook het vrijkomen van plaatjesfactor 4 uit geactiveerde trombocyten een belangrijk effect op de trombinevorming. Wij vonden een cooperatief effect van lage concentraties tromboplastine en bloedplaatjes dat van belang kan zijn als de trombinevorming in vivo door beperkte weefselschade wordt opgewekt.

Wij konden aantonen dat het klassieke heparine in plasma voornamelijk werkt via op de inactivering van trombine en dat de inactivering van factor  $X_a$  en factor  $IX_a$  praktisch geheel wordt voorkomen door de aanwezigheid van fosfolipide en factor Va en factor  $VIII_a$ . Wel brengt de werking van heparine - AT III op trombine remming van de product-activatie via factor VIII en bloedplaatjes met zich mee. De laagmoleculairgewicht heparines blijken voor te komen in twee verschillende soorten, de type-S heparines die niet wezenlijk anders werken dan het klassieke heparine en de type-P heparines die niet op trombine werken maar wel het protrombinase remmen.

Wij hopen te hebben laten zien dat experimenten op ongefractioneerd plasma, met of zonder bloedplaatjes een noodzakelijke schakel vormen tussen biochemische studies met zuivere factoren enerzijds en in vivo experimenten op het gebied van pathofysiologie en farmacologie van haemostase en trombose anderzijds.

Vele van de ideeën in dit proefschrift vonden hun oorsprong in mijn jarenlange samenwerking met François Josso. Ik ben dankbaar een proefschrift te mogen afsluiten waaruit zijn geest nog duidelijk spreekt.

## RESUME ET CONCLUSIONS

Les études présentées dans ce mémoire ont eu pour objectif d'apporter notre contribution à la compréhension des mécanismes qui, dans le plasma procèdent à la formation de la thrombine ainsi qu'à la compréhension des processus d'inhibition induits par certaines substances telles que l'héparine, ses dérivés et le polysulfate de pentosane. Pour ce faire, nous avons en premier lieu mis au point une méthode permettant d'observer avec une grande précision, au cours de la coagulation plasmatique la formation de la thrombine et l'activité de la prothrombinase dans un système se rapprochant le plus possible de la situation physiologique. Cette technique peut aussi bien s'appliquer au plasma dépourvu de plaquettes, défibriné ou non, qu'au plasma riche en plaquettes.

Le principe de la méthode étant celui du test de génération de thrombine, la quantité de thrombine observée est la résultante de deux vitesses: vitesse d'activation de la prothrombine par la prothrombinase et vitesse d'inactivation de la thrombine par les antiprotéases. Une méthode a été développée pour mesurer les constantes de dégradation de la thrombine par l' $\alpha_2$  macroglobuline ( $k_2$ ) et par l'antithrombine III ( $k_1$ ). La détermination de ces constantes, à différents moments de la génération de thrombine nous a démontré que leurs valeurs sont invariables pour un plasma donné.

Connaissant ces constantes, il est possible par un procédé mathématique (présenté en annexe du chapitre II) de calculer pour chaque point de la courbe la vitesse réelle de la formation de la thrombine, de même que sa vitesse de disparition. La somme de ces deux vitesses représente la vitesse d'activation de la prothrombine ce qui correspond à l'activité de la prothrombinase. Pour affirmer la validité de cette méthode nous avons comparé les valeurs théoriques obtenues mathématiquement, aux valeurs trouvées expérimentalement. Cette vérification a été effectuée de deux manières différentes: d'une part en déterminant expérimentalement l'activité amidolytique globale en même temps que le taux d' $\alpha_2$ M-II<sub>a</sub>, ou la quantité de prothrombine convertie en thrombine, d'autre part en comparant les vitesses expérimentales et calculées dans le plasma sélectivement dépourvu d' $\alpha_2$  macroglobuline ou d'antithrombine III par immunoadsorption. Les courbes obtenues à l'aide des valeurs expérimentales d'une part et des valeurs



théoriques d'autre part, sont étroitement superposables. Ce résultat prouve la validité de notre méthode.

Bien qu'apparemment "sophistiquée" cette technique peut être utilisée facilement aussi bien dans les laboratoires de recherche clinique que dans les laboratoires de recherche fondamentale, équipés seulement d'un spectrophotomètre et d'un ordinateur personnel pourvu des programmes correspondants. L'ordinateur s'est révélé un outil précieux, non seulement pour le traitement informatique des données mais aussi comme enregistreur des temps de prélèvement des échantillons tout au long du test de génération de thrombine et des temps d'incubation de la thrombine avec le substrat chromogène, nous permettant de multiplier les prélèvements et les mesures. Nous avons ainsi pu effectuer des prélèvements espacés de deux à quatre secondes et estimer des demi-vies de la thrombine de l'ordre de six secondes dans des plasmas contenant des concentrations thérapeutiques d'héparine.

La grande précision obtenue grâce à ce programme et à l'utilisation des substrats chromogènes nous a permis d'étudier la formation des premières traces de thrombine. Nous avons pu en particulier "matérialiser" le rôle primordial de la thrombine dans la phase initiale de la coagulation et par là-même confirmer les observations de A. Hurlet-Birk Jensen, F. Josso et nous-même en 1976. La détermination rigoureuse des constantes d'inhibition des antiprotéases majeures telles que l'antithrombine III et l' $\alpha_2$  macroglobuline a permis d'évaluer pour la première fois l'activité de la prothrombinase en milieu plasmatique. L'estimation précise de l'activité prothrombinase nous a conduit à une meilleure compréhension du mode d'action de certains inhibiteurs thérapeutiques de la coagulation.

Contrairement à ce que l'on pensait jusqu'à présent, il nous est apparu que l'héparine classique quelle qu'en soit l'origine n'a presque pas d'action sur la prothrombinase formée dans le plasma recalifié en présence de facteur tissulaire c'est à dire dans le système extrinsèque de la coagulation. Son rôle se limite alors essentiellement à celui de catalyseur de l'antithrombine III dans ses fonctions inhibitrices de la thrombine. Cependant l'activité inhibitrice du complexe AT III-Héparine à l'égard de la prothrombinase se manifeste clairement lorsque que la coagulation est déclenchée par le système intrinsèque (phospholipides, activateur du contact: kaolin), et que le facteur VIII ne peut être activé par les

premières traces de thrombine éliminées par le complexe AT III-Héparine. Ceci se traduit par un allongement du temps de latence pour la formation du pic de thrombine et par une diminution de l'activité prothrombinase. L'activation du facteur VIII est donc primordiale pour la formation du complexe activateur du facteur X ("tenase") et par conséquent de la prothrombinase. En effet, si la tenase est formée extemporanément en dehors du système, puis ajoutée au plasma hépariné, la formation de la prothrombinase est normale. Ces observations corroborent les conclusions des travaux de Marciniak ainsi que les résultats obtenus en milieu purifié par Josso et Béguin, et rapportés au Congrès de Toronto en 1981. De plus, elles nous permettent d'apprécier le degré de protection des facteurs IX<sub>a</sub> et X<sub>a</sub>, au sein de leurs complexes respectifs: tenase et prothrombinase. En effet, ces facteurs semblent être entièrement protégés de l'action inhibitrice de l'antithrombine III, en présence de concentrations d'héparine pouvant inhiber jusqu'à 80% de la quantité de thrombine formée.

Ces résultats peuvent justifier l'intérêt croissant des laboratoires pharmaceutiques à l'égard des fragments de faible masse moléculaire provenant de l'héparine. Si l'on commence à bien connaître le comportement de ces inhibiteurs en système purifié et leurs rôles respectifs vis à vis de chacune des protéines de la coagulation, la connaissance de leur mode d'action dans les systèmes globaux en plasma total est assez floue. Aussi après avoir démontré (par notre méthode) que l'effet anti X<sub>a</sub> du complexe AT-III Héparine classique avait peu de retentissement sur la prothrombinase, avons nous entrepris d'étudier certains fragments d'héparine de faible masse moléculaire afin de déterminer si leur activité anti X<sub>a</sub> abondamment décrite dans la littérature avait ou non une influence sur la prothrombinase.

La discrimination possible entre activité thrombine et activité prothrombinase a fait apparaître la possibilité de classer les fragments en deux grandes catégories: l'une que nous avons appelée S par référence à l'héparine Standard et l'autre, P, selon le modèle type fourni par le Pentasaccharide (CY 234). Ainsi, dans la catégorie S ont été classés les produits CY 216 (Fraxiparine) et CY 222 présentant les mêmes caractéristiques biologiques que celles de l'héparine standard c'est-à-dire: inhibition de la thrombine ( $k_1$  modifié) sans activité significative sur la prothrombinase. Dans la catégorie P ont été classés les produits EMT 966 et

EMT 967 par analogie avec le Pentasaccharide qui présente une activité antithrombique nulle ( $k_1$  constant) et une activité inhibitrice à l'égard de la prothrombinase (en raison de son effet anti  $X_a$ ).

En raison du caractère mixte de ses propriétés le PK 10169 (Enoxaparine), n'a pu être classé que dans une catégorie intermédiaire, ne pouvant appartenir préférentiellement ni à l'une ni à l'autre des deux classes.

La mise en évidence de deux catégories d'héparines soulève le problème du choix d'un standard de comparaison. En effet, s'il est logique actuellement de comparer les fragments d'héparine de type S à l'héparine standard international, voire même d'établir à partir de notre méthode une équivalence par la relation concentration/k, il serait irrationnel de comparer à ce même standard les héparines de type P, en raison de leurs mécanismes d'action fondamentalement différents. Le Pentasaccharide (CY 234) chimiquement bien défini pourrait constituer un modèle de référence pour la seconde catégorie.

Ces données d'ordre général obtenues par notre méthode seraient bien évidemment incomplètes, sans les données fondamentales fournies par les biochimistes; néanmoins, pour le clinicien elles peuvent constituer un complément précieux d'information pour l'usage thérapeutique des produits qui lui sont proposés, en se rapprochant le plus possible des problèmes auxquels il se trouve confronté quotidiennement en raison des nombreuses réactions croisées qui interfèrent in vivo.

Nous avons également étudié le rôle d'un héparinoïde, le polysulfate de pentosane (Hémoclar<sup>R</sup>, P.P.S). Nous avons pu démontrer que dans le plasma ce produit comme l'héparine exerce sur la thrombine générée in situ une activité antithrombique non négligeable (1  $\mu\text{g}$  d'Hémoclar<sup>R</sup> équivaut à 0.045  $\mu\text{g}$  d'héparine).

Cette activité antithrombique disparaît lorsque la thrombine est générée dans les euglobulines plasmatiques en présence d'Hémoclar<sup>R</sup>. Ceci implique que l'effet antithrombique est entièrement dépendant de cofacteurs plasmatiques, à savoir: l'antithrombine III (pour les 2/3) et très vraisemblablement le 2e cofacteur de l'héparine (1/3). Cependant, si l'Hémoclar<sup>R</sup> s'apparente à l'héparine par son activité antithrombique plasmatique, il en diffère par une activité antiprothrombinase supplémentaire dépendante de la vitesse de formation de la thrombine. En effet, pour le polysulfate

de pentosane nous avons observé que si pour une faible dilution de la thromboplastine (1/10) l'inhibition de la prothrombinase est négligeable, il apparaît pour une dilution de thromboplastine égale ou supérieure au 1/40, une inhibition modérée (voisine de 20%) et constante quelle que soit la concentration du produit. (au delà de 1 µg/ml).

Cette inhibition ne semble pas liée à l'inhibition du facteur IX<sub>a</sub>, observée par Fischer et col. en milieu purifié. En effet, lorsque dans le plasma en l'absence d'activation par le contact, la coagulation a été déclenchée par le facteur IX<sub>a</sub> ajouté extemporanément en présence de calcium et de phospholipides, 4 µg d'Hémoclar<sup>R</sup> n'ont pas modifié la prothrombinase, alors que la concentration équivalente d'héparine (0.03 U/ml) a inhibé presque entièrement la thrombinoformation. Cet effet inhibiteur de l'Hémoclar<sup>R</sup> sur la prothrombinase peut être attribué à l'inhibition de l'activation du facteur VIII par la thrombine, démontré en système purifié par Wagenvoort et al.

Ces observations nous ont conduit à utiliser le polysulfate de pentosane en tant qu'inhibiteur d'activation du facteur VIII, pour étudier le rôle des facteurs VIII et IX dans la voie extrinsèque (boucle Josso). En l'absence de facteur VIII ou IX (plasma d'hémophiles) il n'y a pas d'inhibition de la génération de prothrombinase par 4 µg d'Hémoclar<sup>R</sup>, contrairement aux expériences réalisées dans le plasma normal. Cependant l'interprétation de nos résultats s'est révélée compliquée par une augmentation d'activité de la prothrombinase dans le plasma d'hémophile, lors de l'addition d'hémoclar. Ce même phénomène également observé dans le plasma normal en présence d'héparine dans le système extrinsèque reste mystérieux. Ainsi, l'Hémoclar<sup>R</sup> nous a permis de faire apparaître l'existence de la boucle Josso sans toutefois nous permettre de la quantifier.

Selon notre objectif initial de nous rapprocher le plus possible des conditions physiologiques, nous rapportons dans le dernier chapitre de ce travail les résultats concernant l'étude de la formation de la thrombine dans le plasma riche en plaquettes. Confronté à de nouveaux problèmes principalement liés à la présence du fibrinogène et à l'instabilité des plaquettes nous avons été amené à modifier notre technique pour pouvoir effectuer simultanément (contrôle inclus) des expériences comparatives, dans le plasma non défibriné contenant 300000 plaquettes/µl moins de deux heures après le prélèvement sanguin.

Après recalcification du plasma riche en plaquettes, nous avons observé de façon constante un temps de latence de 8 à 10 minutes avant l'apparition explosive du pic de thrombine. Nous avons eu la surprise de constater que le collagène indispensable pour l'action procoagulante des plaquettes isolées et "lavées" n'avait aucun effet sur l'activité coagulante de celles-ci en milieu plasmatique, ceci indépendamment de la nature du collagène et des conditions expérimentales (avec ou sans agitation). L'addition de traces de thromboplastine (1/2400, concentration finale) insuffisantes pour influencer la génération de thrombine du plasma pauvre en plaquettes raccourcit de 3 à 5 minutes ce temps de latence. Nous avons démontré que ce phénomène observé pour la première fois, est la conséquence d'un effet coopératif des plaquettes avec le facteur tissulaire, induisant un mécanisme d'accélération par l'apparition de traces de thrombine (5nM). En effet, l'addition au plasma riche en plaquettes, d'un inhibiteur spécifique de la thrombine: l'hirudine, sous forme de traces (insuffisantes pour modifier la quantité de thrombine générée dans le plasma pauvre en plaquettes) conduit à la disparition du phénomène coopératif alors que l'addition de nanomoles de thrombine, en l'absence de thromboplastine, fait apparaître ce même phénomène, c'est-à-dire le raccourcissement du temps de latence. Cet effet coopératif n'est pas lié au facteur V relargué par les plaquettes, car l'addition de facteur V ou  $V_a$ , s'est avérée sans effet sur le temps de latence. Par contre, la génération de thrombine du plasma riche en plaquettes, obtenue après l'addition de phospholipides et en l'absence de thromboplastine s'est montrée similaire à celle réalisée en présence de traces de thromboplastine, révélant ainsi la nature phospholipidique du phénomène, indiquant également que dans le plasma, les phospholipides provenant de l'activation des plaquettes par la thrombine déterminent sa vitesse de formation.

Ainsi, il est possible que les traces de thrombine induites par les traces de facteur tissulaire (thromboplastine), en déclenchant la libération des phospholipides plaquettaires, favorisent la formation de la prothrombinase. Ce phénomène s'apparente-t-il au phénomène de "flip-flop" induit par l'ionophore de calcium qui en exposant les phospholipides plaquettaires les rend immédiatement disponibles? Cela est vraisemblable, car l'addition extemporanée, au plasma riche en plaquettes, de 5  $\mu$ Molaire d'ionophore de calcium a reporté à 2 minutes le temps de latence précédant

l'apparition explosive de la thrombine. Nous avons également démontré dans le dernier chapitre que l'héparine standard qui dans le plasma pauvre en plaquettes, à des concentrations de 0,2 U/ml abaisse très fortement le pic de thrombine, n'a eu pour effet dans le plasma riche en plaquettes que d'allonger le temps de latence du pic de thrombine sans toutefois en modifier la hauteur. Cette dernière constatation peut être expliquée par la présence dans les plaquettes du facteur 4 antihéparinique. En effet, nous avons démontré que lorsque celui est libéré dans le plasma soit par sonication des plaquettes soit par leur activation préalable par 5  $\mu$ M d'ionophore de calcium, et après élimination des cellules par centrifugation, l'action inhibitrice de 0,5 unité d'héparine standard est entièrement neutralisée tandis que l'allongement du temps de latence disparaît également.

Enfin nous nous sommes intéressé aux fragments hépariniques de faible masse moléculaire. A l'encontre de l'héparine, ces fragments, de type P ou de type S, en fonction de leur concentration inhibent à des degrés variables la formation de la thrombine dans le plasma riche en plaquettes. Cependant les EMT 966 et 967 appartenant à la classe P du pentasaccharide, moins inhibiteurs que celui-ci (comparés en poids) ne prolongent que modérément la phase de latence, alors que le pentasaccharide à un degré voisin d'inhibition, allonge d'environ deux fois le temps de latence, ceci étant lié à la faible production de thrombine (en raison du caractère antiprothrombinase du pentasaccharide).

Les CY 216 et 222 appartenant à la classe S, utilisés dans le plasma riche en plaquettes à des concentrations de 5  $\mu$ g/ml, sont essentiellement antithrombotiques, ils allongent la phase de latence. Cependant, en inhibant faiblement la hauteur du pic de thrombine, ils diffèrent des héparines S. Le PK n'appartenant à aucune des deux classes s'est montré une fois encore, différent des autres fragments: il inhibe la quantité de thrombine formée sans modifier le temps de latence.

Bien évidemment ces données concernant les fragments de faible masse moléculaire mériteraient un plus grand développement, aussi n'apparaissent-elles dans ce travail que comme exemples d'application de notre méthode, et en préliminaire d'études plus approfondies qui seront poursuivies ultérieurement dans le plasma riche en plaquettes.

D'autres substances antithrombotiques, plus spécifiques des thrombocytes, mais non anticoagulantes telles que l'aspirine, la prostacycline et

ses dérivés, ont une influence sur l'effet coopératif thromboplastine/plaquettes. Des expériences préliminaires ont démontré que ces drogues retardent la formation explosive de la thrombine. Ce même effet retard a été observé pour l'anticoagulation orale; cependant la diminution de la production maximale de thrombine (liée à la diminution de la synthèse du facteur II) est moins importante en présence de plaquettes qu'en leur absence, cette dernière observation est non négligeable pour l'établissement d'une thérapeutique anticoagulante efficace.

En résumé, en reprenant dans son principe le vieil outil des biologistes: le test de génération de thrombine, mais en l'adaptant aux méthodes actuelles, en nous servant des protéines purifiées nous avons démontré qu'il est possible d'étudier très précisément la formation de la thrombine dans le plasma, de mesurer la prothrombinase. Nous avons fait apparaître l'importance de trois boucles de renforcement dans le plasma: la boucle Josso, la rétroactivation du facteur VIII par la thrombine, l'activation par la thrombine des plaquettes qui libèrent leur facteur 4. L'effet coopératif de la thromboplastine et des plaquettes nous paraît important in vivo pour expliquer la coagulation "extrinsèque" qui peut survenir lors de la libération de facteur tissulaire par des cellules lésées. En démontrant que l'héparine standard est essentiellement "antithrombique" nous avons limité son rôle dans les processus qui aboutissent à la coagulation, à celui d'inhibiteur de la rétroactivation par la thrombine.

Nous avons pu confirmer que dans le plasma, certains fragments de faible masse moléculaire en inhibant la prothrombinase ainsi que sa formation avaient une action fondamentalement différente de l'héparine classique.

D'autre part il nous est apparu que selon le mode expérimental (système purifié ou milieu plasmatique) ces substances pouvaient avoir un comportement différent. Ce point nous semble primordial lors de l'utilisation de ces drogues à des fins thérapeutiques.

Par nos études effectuées en plasma total nous espérons avoir démontré que notre approche constitue un trait d'union entre la biochimie et la pathophysiologie de l'hémostase. Nous sommes heureuse d'avoir pu mener ce travail selon une voie que notre maître François Josso aurait aimé nous voir prendre.