

ATMOSPHERE PLAQUETTAIRE - ETUDE DES FACTEURS II ET VII -
MODIFICATIONS APPORTEES PAR LES RAYONS X

Sommaire. - Après la détermination quantitative des facteurs II et VII adsorbée à la surface des plaquettes, les auteurs étudient le comportement de ces facteurs vis-à-vis :

- 1 - d'un nombre élevé de lavages,
- 2 - d'une irradiation de 0 à 70 000 R.

Il apparaît que ces facteurs ne sont pas solidement fixés à la plaquette puisque :

- 1 - 10 lavages suffisent pour éliminer toute trace de chacun de ces deux facteurs,
- 2 - que 1500 R détruisent le facteur VII,
- 3 - qu'il faille atteindre 40 000 R pour supprimer le F II.

1966

10 p.

Commissariat à l'Energie Atomique - France

CEA-R 2953 - HOLLARD Daniel, DARNAULT Jean, RAMBAUD Françoise,
SUSCILLON Michel, MARCILLE Geneviève

PLATTLET ATMOSPHERE - STUDY OF FACTORS II AND VII -
MODIFICATIONS BROUGHT ABOUT BY X-RAYS

Summary. - After a quantitative measure of factor II and VII adsorbed at the plattlet surface, the authors study the comportment of these factors opposite to :

- 1 - unnumerous washes,
- 2 - irradiations of 0 to 70 000 R.

It appears that these factors are not solidly fixed at the plattlet as :

- 1 - 10 washes are sufficient to get rid of each of the 2 factors,
- 2 - 1500 R overthrow factor VII,
- 3 - 40 000 R are necessary to suppress F II.

1966

10 p.

Commissariat à l'Energie Atomique - France

MODIFICATIONS APPORTÉES PAR LES RAYONS X

Sommaire. - Après la détermination quantitative des facteurs II et VII adsorbés à la surface des plaquettes, les auteurs étudient le comportement de ces facteurs vis-à-vis :

- 1 - d'un nombre élevé de lavages,
- 2 - d'une irradiation de 0 à 70 000 R.

Il apparaît que ces facteurs ne sont pas solidement fixés à la plaquette puisque :

- 1 - 10 lavages suffisent pour éliminer toute trace de chacun de ces deux facteurs,
- 2 - que 1500 R détruisent le facteur VII,
- 3 - qu'il faille attendre 40 000 R pour supprimer le F II.

1966

16 p.

Commissariat à l'Énergie Atomique - France

CEA-R 1966 - HOLLARD Daniel, DANAULT Jean, RASSEUD Françoise,
SUCHELON Michel, MARCHELLE Genevieve

PLAQUETTES AS MOFFERE - STUDY OF FACTORS II AND VII - MODIFICATIONS BROUGHT ABOUT BY X-RAYS

Summary. - After a quantitative measure of factor II and VII adsorbed at the platelet surface, the authors study the comportment of these factors opposite to :

- 1 - numerous washes,
- 2 - irradiation of 0 to 70 000 R.

It appears that these factors are not solidly fixed at the platelet so

- 1 - 10 washes are sufficient to get rid of each of the F factors,
- 2 - 1500 R destroys factor VII,
- 3 - 40 000 R are necessary to suppress F II.

t

**ATMOSPHERE PLAQUETTAIRE
ETUDE DES FACTEURS II ET VII
MODIFICATIONS APPORTEES
PAR LES RAYONS X**

par

Daniel HOLLARD, Jean DARNAULT, Françoise RAMBAUD,
Michel SUSCILLON, Geneviève MARCILLE

Rapport CEA - R 2953

Centre d'Etudes Nucléaires de Grenoble

ATMOSPHERE PLAQUETTAIRE - ETUDE DES FACTEURS II et VII -
MODIFICATIONS APPORTEES PAR LES RAYONS X

par

Daniel HOLLARD, Jean DARNAULT, Françoise RAMBAUD
Michel SUSCILLON, Geneviève MARCILLE

Les rapports du COMMISSARIAT A L'ENERGIE ATOMIQUE sont, à partir du n° 2200, en vente à la Documentation Française, Secrétariat Général du Gouvernement, Direction de la Documentation, 16, rue Lord Byron, PARIS VIIIème.

The C.E.A. reports starting with n° 2200 are available at the Documentation Française, Secrétariat Général du Gouvernement, Direction de la Documentation, 16, rue Lord Byron, PARIS VIIIème.

ATMOSPHERE PLAQUETTAIRE - ETUDE DES FACTEURS II ET VII MODIFICATIONS APORTEES PAR LES RAYONS X

Nous nous proposons d'étudier les facteurs II et VII de l'atmosphère plasmatique des plaquettes. Après une évaluation quantitative des produits adsorbés sur des plaquettes normales, nous déterminons l'effet des lavages, puis de l'irradiation à des doses variant de 500 R à 70 000 R.

MATERIEL et METHODE

1° - Matériel : l'ensemble des opérations s'effectue dans un matériel siliconé. Il est nécessaire de procéder au resiliconage après 2 ou 3 emplois, car de là provient en partie la plus ou moins grande quantité de plaquettes finales ; ceci est dû au phénomène de surface et à l'adhésivité des plaquettes sur tout corps non mouillable. Nous utilisons, après avoir soigneusement lavé la verrerie au RBS dans un appareil à ultra-sons, rincé et séché, un bain d'une solution à 1% de siliclad CLAY-ADAMS dans lequel nous laissons la verrerie une dizaine de minutes, temps au bout duquel elle est rincée, puis séchée à l'étuve à 70° environ. Afin d'obtenir le plus grand nombre de plaquettes possible, nous utilisons du sang de veau, plus riche en thrombocytes, pour des raisons physiologiques, que celui du boeuf. Ce sang est recueilli dans un flacon siliconé sur complexon tamponné à pH 7,2, dans la proportion de 1 volume d'anticoagulant pour 10 volumes de sang, par l'inspecteur de l'abattoir de Grenoble, immédiatement après que la tête de l'animal soit tranchée. Il est utilisé le jour même, l'expérience a montré que si l'on attend 24 h, les quantités de facteurs adsorbés étaient très inférieures.

2° - Préparation des plaquettes : Les centrifugations ont toutes lieu dans une centrifugeuse réfrigérée à + 4°. La première permet de séparer le plasma riche en plaquettes (PRP), elle est de 800 t/mn pendant 20 minutes ; les globules rouges sont éliminés, le PRP isolé est centrifugé une deuxième fois à 3 000 t/mn pendant 15 minutes. Le plasma surnageant ou plasma déplaqueté (PDP) est éliminé et nous procédons alors à 3 lavages successifs avec des réactifs tamponnés à un pH voisin de 7,2. Le premier après mise en suspension du culot, dans le complexon et centrifugation à 3 000 t/mn. Les 2èmes et 3èmes sont effectués de la même manière dans du sérum physiologique. Le culot plaquettaire est alors mis en suspension dans du tampon de Owren-Koller ;

une dernière centrifugation à 800 t/mn pendant 10 minutes, est parfois nécessaire pour éliminer les globules rouges restants. Nous avons remarqué que le pH a une importance en ce qui concerne la stabilité de la suspension de plaquettes utilisées par la suite (nous avons effectué l'expérience avec des solutions non ramenées à ce pH de 7,2 et les plaquettes ont régulièrement floculé).

Ce procédé permet suivant les animaux, suivant que le matériel est plus ou moins récemment siliconé d'obtenir 3 à 4 cc d'une suspension de 1 million à 3 millions de plaquettes par mm³, nombre que l'on détermine par comptage à l'aide d'une cellule de Malessez selon les procédés habituels.

3° - Détermination quantitative des facteurs II et VII [1] et [2]

Nous opérons sur une suspension de 1 million de plaquettes par mm³. La méthode repose sur le principe suivant : on ajoute à la suspension de plaquettes à doser un plasma réactif qui apporte en excès tous les facteurs que l'on ne veut pas doser. La variation du temps de coagulation ne dépend plus alors que du facteur que l'on cherche à déterminer.

- Dosage du facteur II : à 0,1 cc de suspension de plaquettes, on ajoute 0,1 cc d'un mélange à parties égales de PSB (plasma adsorbé par le sulfate de baryum qui apporte F. V., VIII, X, XII, I) et STO (sérum thromboplastine oxalaté qui apporte F. VII, X, IX, XI, XII et f. plaquettaire). On laisse incubé 1 à 2 minutes au bain marie à 37° et on ajoute 0,2 cc de sinplastine diluée au 1/2 dans Cl₂Ca M/40. A ce moment on déclenche le chronomètre et on note le temps dès qu'apparaissent les premiers filaments de fibrine.

- Dosage du facteur VII : On opère de la même façon que précédemment après avoir ajouté à la suspension de plaquettes 0,1 cc de BF (Plasma de boeuf filtré qui apporte F. II, V, VIII, XI, XII, I).

- Résultats : Nous effectuons une série de dosages des facteurs II et VII sur des plasmas témoins de veau, dilués au 1/10 - 1/20 1/1000 et traçons pour chaque série, une courbe de la concentration (en %) en fonction du temps de coagulation obtenu. Nous obtenons des droites, différentes pour chaque facteur, qui nous servent de référence.

(Courbe 1). Si l'on considère que la concentration 100 % est donnée pour un plasma dilué au 1/10, connaissant le temps de coagulation de la suspension de plaquettes, il est alors facile, en se reportant à la droite correspondante de déterminer la quantité des facteurs adsorbés. Nous obtenons les résultats suivants :

- 0,75 % < FII < 1,9 %		FII : 1,3 %
- 2,8 % < FVII < 6 %	moyenne	FVII : 4 %

Notons que :

1 - ces résultats sont relativement variables ce qui peut s'expliquer par la diversité des échantillons de sang (âges différents des animaux, espèces différentes) et par les lots différents de réactifs utilisés.

2 - qu'ils sont du même ordre cependant que ceux trouvés par BOUNAMEAUX [3].

4° - Importance du nombre des lavages.

Nous faisons subir à ces plaquettes 10 à 12 lavages et pratiquons alors un dosage des facteurs II et VII (après ces lavages). Parallèlement, nous effectuons sur une solution de tampon d'Owren-Koller qui ne contient ni F. II ni F. VII, les mêmes tests et obtenons les résultats moyens suivants :

	F. II	F. VII
tampon	92 \pm 10	116 \pm 11
Pl. 3 lav.	67 \pm 11	100 \pm 10
Pl. 12 lav.	98 \pm 12	120 \pm 11

Il apparaît que 12 lavages éliminent les facteurs adsorbés sur les plaquettes. Les facteurs II et VII ne semblent donc pas être "solidement adsorbés" à la surface de la plaquette alors que dans les mêmes conditions de traitement, le fibrinogène, par exemple, persiste [4].

5° - Action de l'irradiation

- L'irradiateur : On soumet à un flux de rayons X, 2 ml de suspension contenant 1 million de plaquettes par mm³. Ces rayons X sont fournis par un générateur émettant par un rayonnement très intense, des photons de faible énergie (Baltographe OEG 60 - 5. 50 KV 35 mA) ; le tube possède une ouverture axiale munie d'une fente de 3 mm de Beryllium. L'appareil émet un faisceau de 60 d'ouverture dont l'axe fait avec celui du tube, un angle de 7°30. Un dispositif correcteur, que nous avons fait réaliser, permet de placer la coupelle exactement au centre du faisceau à la distance désirée de l'anticathode soit 6,75 cm lors de notre expérimentation.

L'irradiation :

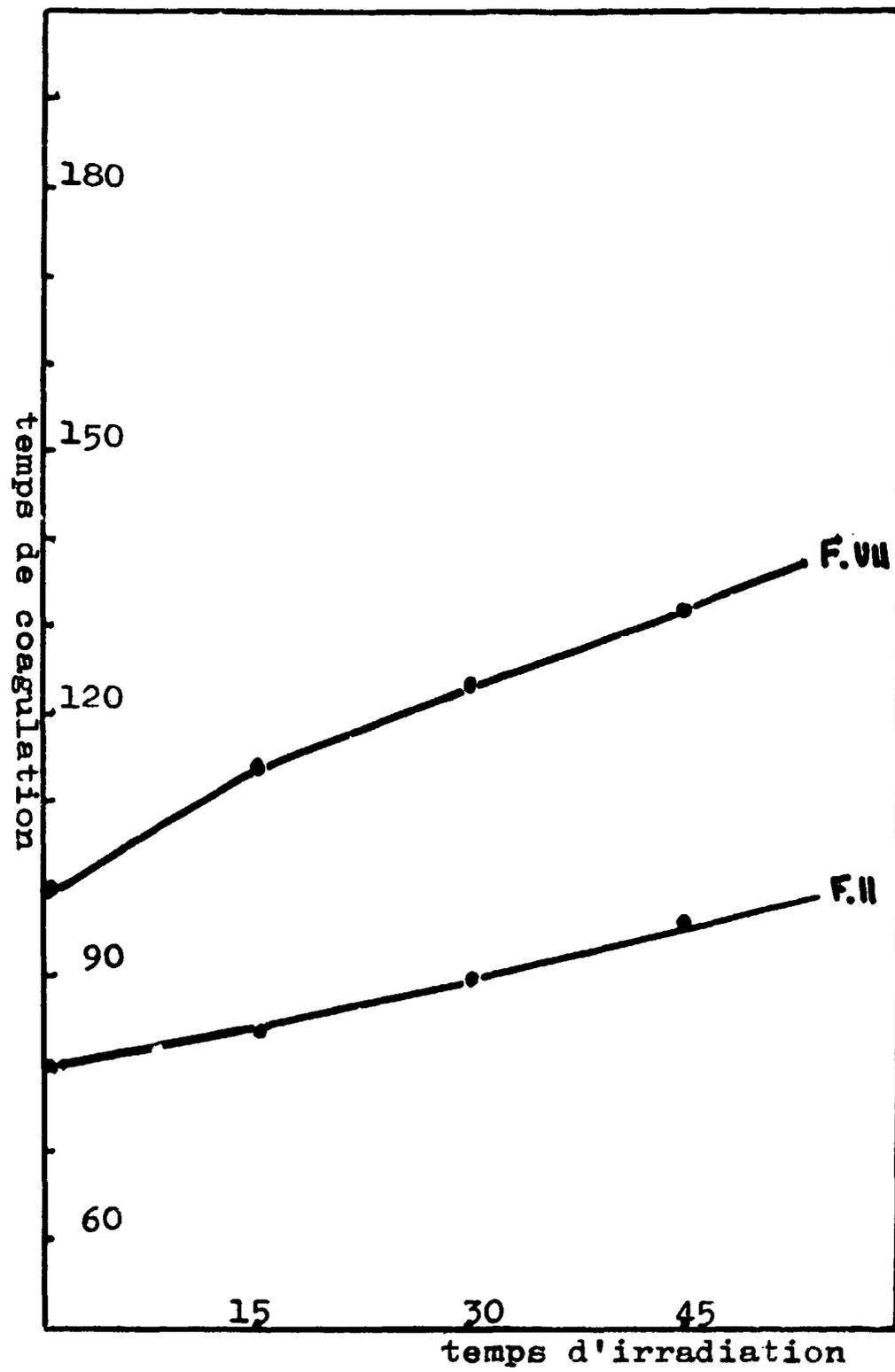
a) sous 10 KV et 10 mA, le débit est de 2 000 R/mn, nous irradiions 15, 30, 45s ce qui correspond à des doses de 500 R, 1 000 R, 1500 R ; les résultats varient suivant qu'il s'agit des facteurs II ou VII.

b) Sous 43 KV et 30 mA, le débit est de 90 000 R/mn, nous irradiions 15, 30, 45s ce qui correspond à des doses de 22 500, 45 000, 67 500 R.

RESULTATS

1° - Facteur II

Nous avons effectué les irradiations en 2 séries : séparés par quelques mois, nous utilisons donc des lots de réactifs différents (BF - STO - PSB) ce qui explique les temps différents pour les témoins eux-mêmes. Nos résultats sont donc présentés séparément pour chacune de ces séries.



Courbe n° 2 - Moyenne des variations du temps de coagulation d'une suspension de IM de plaquettes par mm³ en fonction de l'irradiation sous 10 KV et 10 mA et pour les facteurs II et VII.

- de 0 à 1500 R : Les résultats obtenus exprimés en temps de coagulation sont les suivants :

tampon	: 105s <u>+</u> 10	
témoin	: 80s <u>+</u> 10	
500 R	: 84s <u>+</u> 12	(courbe 2)
1000 R	: 90s <u>-</u> 13	
1500 R	: 97s <u>+</u> 13	

- de 22 500 à 67 500 R : Les résultats sont résumés ici :

tampon	: 93 <u>+</u> 10
témoin	: 67 <u>+</u> 11
27 500 R	: 84 <u>+</u> 7
43 000 R	: 95 <u>+</u> 8
67 500 R	: 113 <u>+</u> 19

DISCUSSION

Il apparaît que les faibles irradiations ne détruisent pas complètement le F II mais l'altèrent de façon progressive au fur et à mesure de l'augmentation des doses de radiations, pour être complètement détruit aux environs de 40 000 R. On a pu remarquer toutefois que pour des irradiations supérieures allant jusqu'à 5 400 000 R (dose que n'avons cependant pas dépassée) le temps de coagulation continue à croître. Ce temps, quoique difficile à déterminer avec précision, car trop long (de l'ordre de 3 mn) est cependant mesurable puisque l'on voit nettement l'apparition de filaments de fibrine.

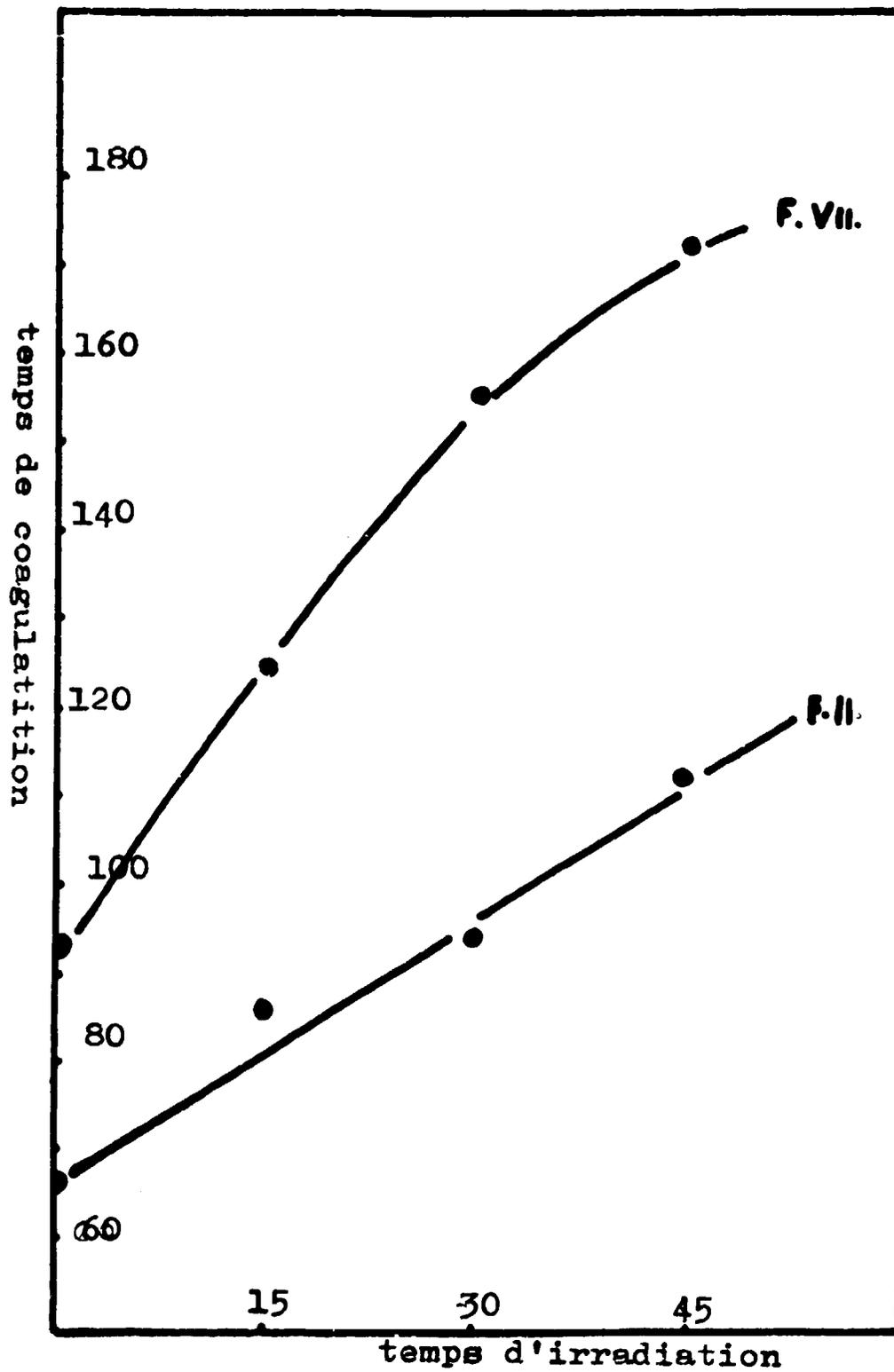
Un problème ici se pose. Si nous avons détruit complètement le facteur à doser, les temps de coagulation de la solution substrat (solution irradiée) à laquelle on ajoute en excès tous les autres facteurs, devraient être de l'ordre de grandeur de ce même temps lorsque l'on utilise comme substrat du tampon dépourvu de facteur à doser. Or, les temps de coagulation de solution irradiée sont 2 ou 3 fois plus longs que le temps de référence (tampon Owren-Koller).

Nous pouvons supposer qu'il se produit au cours de l'irradiation :

- soit l'activation d'un inhibiteur
- soit que la radiolyse du tampon produise des radicaux susceptibles d'agir comme un frein sur les facteurs de la coagulation.

1 - S'il s'agit de l'activation d'un inhibiteur, l'incubation à 37° devrait modifier son activité. Or une incubation de 5 à 20 mn ne modifie pas les résultats obtenus, ou les augmente.

2 - Si la richesse en radicaux et groupements dérivés du tampon irradié est susceptible d'inhiber certains facteurs de la coagulation, l'adjonction du tampon irradié à l'ensemble des facteurs de la coagulation devrait nous conduire à un allongement notable du temps d'apparition du caillot. Cette étude a été faite et les résultats sont absolument comparables qu'il s'agisse d'un tampon irradié ou non.



Courbe n° 3 - Moyenne des variations du temps de coagulation d'une suspension de IM de plaquettes / m³ en fonction de l'irradiation sous 43 KV et 30 mA et pour les facteurs II et VII.

2° Facteur VII

Les résultats sont figurés dans le tableau ci-dessous :

Tampon	: 116 <u>+</u> 11
témoin	: 100 <u>+</u> 10
500 R	: 114 <u>+</u> 12
1000 R	: 123 <u>+</u> 10
1500 R	: 132 <u>+</u> 12

(Courbe n° 2)

Discussion

Il paraît net que le F VII est moins résistant que le F II puisque dès environ 1000 R il est complètement absent de la surface plaquettaire. Cependant ici aussi les temps de coagulation augmentent quand l'irradiation est poussée jusqu'à 5 400 000 R (que nous n'avons pas dépassé) avec la différence cependant que les temps de coagulation sont plus longs que précédemment (10 à 15 mn) et la réaction beaucoup moins nette. On peut soulever ici le même problème que pour le facteur II, que dose-t-on après l'irradiation ?

CONCLUSION

Après ce qui concerne l'influence des lavages, nous pouvons dire que les facteur II et VII de "l'atmosphère plasmatique des plaquettes" ne sont pas très adhérents à la plaquette.

L'irradiation a un effet différent suivant qu'il s'agit des facteurs II ou VII. Les irradiations de 1500 R détruisent complètement le facteur VII et ne font qu'altérer le facteur II, alors que pour détruire ce dernier, il faut environ 40 000 R.

Manuscrit reçu le 21 décembre 1965

- BIBLIOGRAPHIE -

- [1] KOLLER F. , LOELIGER A. et DUCKERT F.
Le facteur VII, sa fonction dans la coagulation, son importance clinique.
Rev. Hematol. 1952 - 7 - 156.
- [2] KOLLER F.
Die Physiologie du Blutgerinnung, ihre Bedeutung für die Klinik.
Arch.. Exper. Path. Pharmacol. 1954 - 222 - 89.
- [3] BOUHAMEAUX
Dosage des facteurs de coagulation contenus dans l'atmosphère plasmatique
des plaquettes humaines.
Rev. Fran. Etudes clin. et Biol. 1957 - 11 - 52 - 63.
- [4] HOLLARD D. , SUSCILLON M. , MARCILLE G.
Dosage qualitatif et quantitatif du fibrinogène plaquettaire.
Rev. Hématologie - sous presse -

FIN