

## Rôle du Facteur Contact (Facteur Hageman) dans la Fibrinolyse

S. Niewiarowski\*) et O. Prou-Wartelle

Plusieurs auteurs ont déjà envisagé les relations qui pouvaient exister entre le processus de la coagulation et celui de la fibrinolyse: Nolf (11); Kowarszyk et coll. (4, 4a); Niewiarowski (7); Ratnoff (17); Kowalski et coll. (3). Mais jusqu'ici aucune expérience n'avait permis d'établir un rapport précis entre ces deux phénomènes.

En 1955, Ratnoff et Colopy (13) ont décrit chez un sujet n'ayant aucune tendance hémorragique une anomalie de la coagulation "in vitro" (Hageman-trait) liée à un déficit en un facteur qui s'est révélé indispensable à l'initiation de la coagulation par les surfaces (6, 13, 14, 15, 18).

L'action de différentes surfaces sur l'initiation de la coagulation venant de faire l'objet d'une étude détaillée de J. P. Soulier et O. Prou-Wartelle (16), nous avons comparé l'accélération de la coagulation et l'activation de la fibrinolyse de divers plasmas en utilisant ces mêmes substances activantes.

### Technique

#### Réactifs

Le sang prélevé en matériel siliconé est recueilli sur citrate trisodique à 3,8% (1 partie pour 9 parties de sang) et centrifugé à + 4° à 4000 tours/min. pendant 10 minutes. Le plasma est centrifugé une seconde fois pour soustraire les plaquettes.

Un plasma n'ayant jamais été en contact avec une surface mouillable est appelé "*plasma intact*".

Un "*plasma contact*" est obtenu par agitation d'un plasma intact en verrerie siliconée pendant 10 minutes à température ordinaire avec une surface activante: célite (Filter-cel, Johns Manville, New York), ballotini (perles de verre de 0,1 mm de diamètre), kaolin léger (Prolabo), et bentonite (Prolabo). Ces substances sont utilisées à des doses qui n'adsorbent ni les facteurs de coagulation ni les facteurs de lyse.

\*) Boursier du Gouvernement Français.

Adresse permanente: Laboratoire de Biochimie Clinique, Institut d'Hématologie, Varsovie (Pologne).

Plasma "épuisé": c'est un plasma normal privé artificiellement de 3ème facteur prothromboplastique (facteur Hageman activé + PTA) préparé d'après la technique de Waaler (18): le plasma normal intact est activé à température ordinaire en verrerie siliconée par 30 mg/cm<sup>3</sup> de célite. Après deux centrifugations à haute vitesse, pour éliminer la célite, le plasma est amené à pH 7 par HCl N/10. Après acidification (destinée à préserver facteurs V et VIII) le plasma est conservé à 37° pendant 5 heures en verrerie siliconée afin d'inactiver le 3ème facteur thromboplastique.

Le plasma normal chauffé est obtenu en laissant à 37° pendant 24 heures en verrerie siliconée du plasma normal intact. Ce plasma conserve un taux normal de facteurs Hageman et PTA alors que les taux de facteurs V (proaccéléline) et VIII (facteur anti-hémophilique A) sont très diminués.

### Méthodes

*Temps de recalcification:* à 0,2 cm<sup>3</sup> de plasma "intact" ou "contact" on ajoute 0,05 cm<sup>3</sup> de CaCl<sub>2</sub> M/10.

*Temps de fibrinolyse:*

a) *dans le plasma* — Au plasma dilué 1/10e avec du tampon véronal acétate à pH 7,35, on ajoute une quantité égale de CaCl<sub>2</sub> M/40. On observe la fibrinolyse à 37° et on note le temps nécessaire à la disparition totale du caillot.

b) *dans les euglobulines* — (technique modifiée de Kowarzyk et Buluk [4]) — La précipitation des euglobulines est faite à partir du plasma dilué au 1/20e en H<sub>2</sub>O distillée à pH 5,3 à 0°, pendant 18 heures.

Après centrifugation, le précipité d'euglobulines est dissous dans un volume de tampon borate à pH 7,6 égal à celui du plasma d'origine. On ajoute à 0,2 cm<sup>3</sup> d'euglobulines 0,1 cm<sup>3</sup> de solution de thrombine calcique (1 partie solution de thrombine à 20 u./cm<sup>3</sup> et 1 partie CaCl<sub>2</sub> M/40). La coagulation est rapide et on note le temps nécessaire à la disparition totale du caillot.

*Dosages de plasminogène et d'antiplasmine:* techniques décrites ailleurs (8, 9).

### Résultats

#### 1° Etude comparée du plasma normal et du plasma de Hageman-trait.

Le tableau 1 montre l'influence de surfaces activant la coagulation sur la fibrinolyse. En activant un plasma intact normal par kaolin (1 mg/cm<sup>3</sup>), bentonite (1 mg/cm<sup>3</sup>), célite (1 mg/cm<sup>3</sup>), ballotini (20 mg/cm<sup>3</sup>), on écourte considérablement le temps de recalcification lorsque la poudre est maintenue en suspension; l'activation est modérée lorsque la substance activante est éliminée par centrifugation avant la recalcification.

Ces différentes substances activantes modifient à peine la vitesse de coagulation (temps de recalcification) du plasma de Hageman-trait, alors que le plasma normal coagule beaucoup plus vite. Ceci confirme ce que nous avons constaté par ailleurs (15, 16).

Les temps de fibrinolyse du plasma et des euglobulines normales sont beaucoup plus courts que ceux du plasma et des euglobulines de Hageman-trait.

Les temps de fibrinolyse du plasma et surtout des euglobulines normales sont considérablement écourtés lorsque le plasma intact a été traité par kaolin ou célite. On observe également une action activante (bien qu'inférieure) de la

bentonite et des ballotini. Lorsque les euglobulines proviennent d'un plasma contenant la substance activante en suspension le raccourcissement est encore plus prononcé.

Plasma utilisé	Temps de recalcification (sec.)		Temps de fibrinolyse du plasma (heures)		Temps de fibrinolyse des euglobulines (min.)	
	En présence surface activante	Surface activante éliminée	En présence surface activante	Surface activante éliminée	En présence surface activante	Surface activante éliminée
<i>Témoin</i>						
+ kaolin 1 mg/cm <sup>3</sup>	70	120	44	72	7	180
+ bentonite 1 mg/cm <sup>3</sup>	70	120	72	50	37	23
+ célite 1 mg/cm <sup>3</sup>	120	165	72	72	7	36
+ ballotini 20 mg/cm <sup>3</sup>	145	165	96	72	54	160
Témoin intact	345		84		200	
<i>Hageman</i>						
+ kaolin 1 mg/cm <sup>3</sup>	+ 1080	+ 1080	+ 168	+ 168	180	440
+ bentonite 1 mg/cm <sup>3</sup>	680	+ 1080	+ 168	+ 168	220	275
+ célite 1 mg/cm <sup>3</sup>	720	+ 1080	+ 168	+ 168	180	295
+ ballotini 20 mg/cm <sup>3</sup>	720	+ 1080	+ 168	+ 168	260	400
Hageman intact	+ 1080		+ 168		415	

Tableau 1: Influence des surfaces activant la coagulation sur la fibrinolyse.

Au contraire, la fibrinolyse du plasma ou des euglobulines de Hageman-trait n'est que très discrètement influencée par le traitement avec les surfaces activantes, qu'elles soient ou non en suspension.

### 2° Etude de divers plasmas pathologiques.

Il était important de préciser si le retard de la fibrinolyse dans le plasma de Hageman-trait n'était pas dû au retard de la coagulation. Aussi avons-nous étudié d'autres plasmas pathologiques caractérisés par un retard de thromboplastino-formation se rapprochant de celui du plasma de Hageman-trait.

Nous avons activé par la célite ou le kaolin: plasma d'hémophile A, plasma d'hémophile B, plasma d'hypoconvertinémie (bien que ce facteur n'intervienne pas dans la thromboplastino-formation endogène), plasma dicoumarolé (temps de Quick 20<sup>0</sup>/o, pauvre en facteur Stuart, proconvertine et facteur anti-hémo-

philique B) plasma déficitaire en PTA, en même temps qu'un plasma de Hageman-trait et qu'un plasma normal.

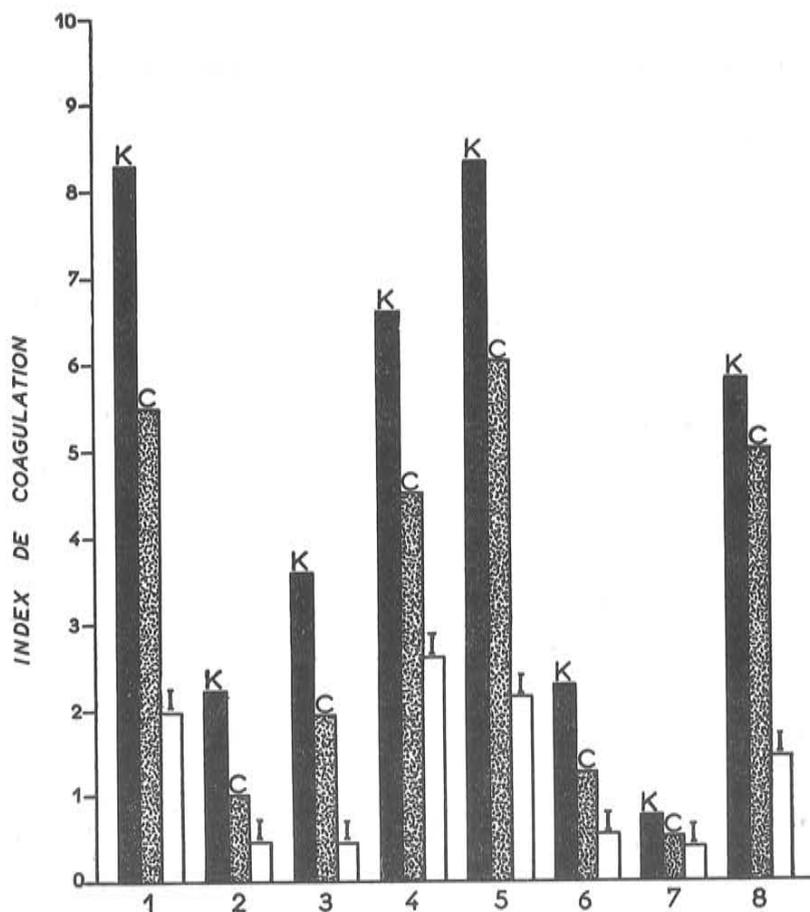


Fig. 1: Activation de la coagulation par kaolin ou celit de divers plasma: 1. plasma normal; 2. plasma hémophile A; 3. plasma hémophile B; 4. plasma d'hypoconvertinémie; 5. plasma dicoumarine; 6. plasma déficit en PTA; 7. plasma Hageman trait; 8. mélange à parties égales du plasma témoin et Hageman trait.  
I = plasma intact; C = plasma agité avec celit 1 mg/cm<sup>3</sup>; K = plasma agité avec kaolin 1 mg/cm<sup>3</sup>.

Nous avons étudié la coagulation globale (temps de recalcification) et le temps de fibrinolyse dans les euglobulines préparées à partir des plasmas contenant la substance activante en suspension. Nous avons exprimé les résultats sous forme d' "index de coagulation" calculé par la formule

$$\frac{1000}{\text{temps de recalcification en sec.}}$$
 et d' "index de fibrinolyse" calculé par la formule

$\frac{1000}{\text{temps de fibrinolyse en min.}}$

Cette notation a l'intérêt de minimiser les écarts de

temps de recalcification et de lyse très longs et reflète mieux la quantité de plasmine ou de thrombine formées qui est directement proportionnelle à la réciproque du temps de fibrinolyse ou du temps de coagulation.

L'*index de coagulation* des plasmas contacts (Fig. 1) est plus élevé que celui des mêmes plasmas intacts, en particulier lorsqu'on utilise le kaolin ( $1 \text{ mg/cm}^3$ ). Seul le plasma de Hageman-trait ne s'active pas (colonne 7).

L'accélération de la coagulation par activation du facteur Hageman des plasmas d'hémophiles A, B et déficit en PTA est appréciable, mais le temps

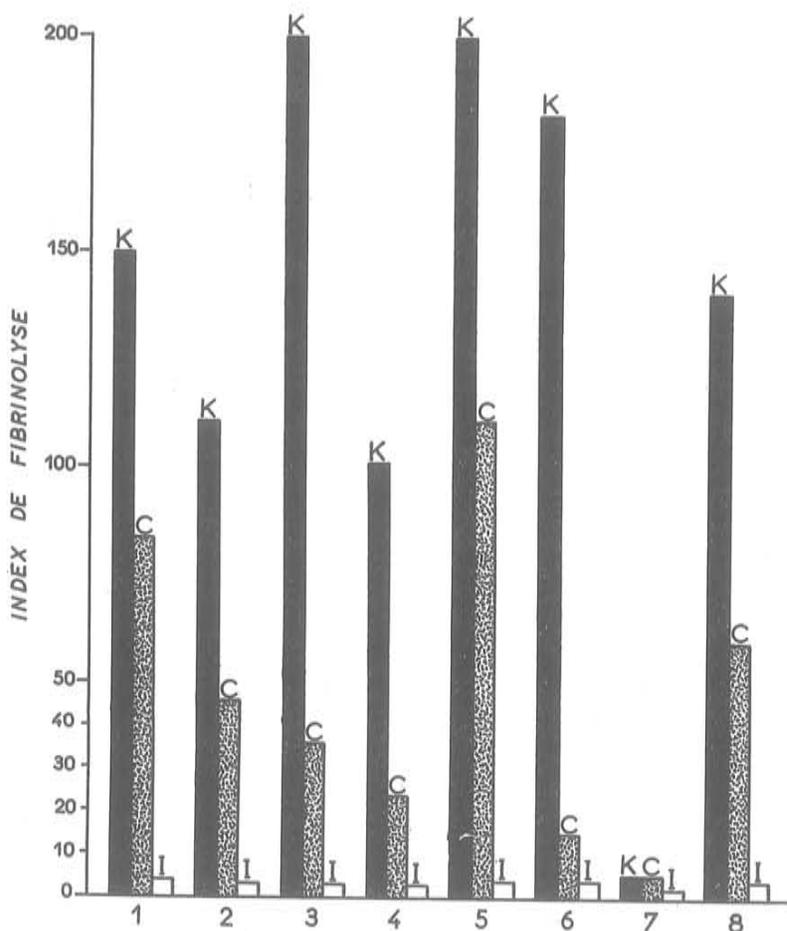


Fig. 2 : Activation de la fibrinolyse par différentes surfaces (explications, voir Fig. 1).

de recalcification ne peut être ramené à la normale du fait du déficit en d'autres facteurs prothromboplastiques.

L'*index de fibrinolyse* est très élevé dans les euglobulines de tous les plasmas pathologiques étudiés sauf dans les euglobulines provenant du plasma de Hageman-trait (Fig. 2, colonne 7).

En étudiant le temps de recalcification et le temps de fibrinolyse d'un mélange à parties égales de plasma normal intact et de plasma de Hageman-trait intact activés par célite ou kaolin, nous avons constaté que le plasma de Hageman-trait n'inhibait pas l'activation de la coagulation et de la fibrinolyse du plasma normal (Fig. 1 et 2, colonne 8).

### 3° Plasminogène et antiplasmine dans le plasma de Hageman-trait.

Les résultats des dosages du plasminogène (activable par streptokinase) et de l'antiplasmine sont transcrits sur le tableau 2. On peut constater que le taux en ces facteurs est normal dans le plasma de Hageman-trait.

Dilutions du plasma	Temps de fibrinolyse en min.			
	Plasminogène		Antiplasmine	
	Plasma normal	Plasma Hageman	Plasma normal	Plasma Hageman
1/2	7'	5'	6'	8'
1/4	18'	14'	5'	5'
1/8	—	—	4'	4'
Tampon	+ 24 h.	+ 24 h.	3'	3'

Tableau 2 : Dosage du plasminogène et de l'antiplasmine dans le plasma de Hageman-trait et le plasma normal.

### 4° Activation de la fibrinolyse dans le plasma normal privé artificiellement de facteur contact (tableau 3).

Le plasma privé de facteur contact (plasma "épuisé" dont la préparation a été décrite à la partie technique) activé par kaolin ou célite (1 mg/cm<sup>3</sup>) ne montre pas d'activation de son système lytique, bien que le temps de recalcification ait été légèrement raccourci après l'activation. D'autre part, nous avons étudié dans les mêmes conditions un plasma normal intact chauffé à 37° C pendant 24 heures. Ce plasma a perdu une grande partie de sa proaccéléline (V) et du facteur anti-hémophilique A (VIII). Le temps de recalcification est, de ce fait, très allongé. Lorsqu'on traite ce plasma par 1 mg/cm<sup>3</sup> de célite ou de kaolin, on observe un raccourcissement très important des temps de recalcification et de fibrinolyse. L'activation du système fibrinolytique est identique à

celle d'un plasma normal alors que le raccourcissement du temps de recalcification est moindre en raison des déficits en proaccélélerine et facteur A.

Echantillon examiné	Traitement du plasma					
	Intact		Kaolin 1 mg/cm <sup>3</sup>		Célite 1 mg/cm <sup>3</sup>	
	Temps de recalcification, sec.	Temps de fibrinolyse min.	Temps de recalcification, sec.	Temps de fibrinolyse min.	Temps de recalcification, sec.	Temps de fibrinolyse min.
Plasma témoin	600	125	210	9	210	20
Plasma témoin chauffé (37° C, 24 h.)	+ 2700	210	300	10	480	25
Plasma "épuisé" (privé du facteur contact)	1050	320	540	335	765	345
Mélange à parties égales: plasma témoin + plasma "épuisé"	—	—	210	9	210	37

Tableau 3: Activation de la coagulation et de la fibrinolyse dans un plasma normal privé artificiellement de facteur contact (plasma "épuisé") et dans un plasma témoin.

Ces résultats montrent que l'accélération de la lyse nécessite la présence du facteur Hageman dont le taux est normal dans ce plasma chauffé.

### Discussion

Les résultats obtenus, qui ont pu être répétés de façon très constante, montrent que l'agitation d'un plasma intact en présence de surfaces activant le facteur Hageman (bentonite, célite, kaolin, ballotini) accélère la fibrinolyse du plasma et surtout des euglobulines à condition que le taux de facteur Hageman soit normal dans les plasmas étudiés. En effet, de tous les plasmas examinés dans ce travail, seuls le plasma de Hageman-trait et le plasma normal artificiellement privé de facteur Hageman (plasma "épuisé") n'ont aucune activation de leur système fibrinolytique après traitement par les surfaces activantes. Notons qu'aux faibles concentrations utilisées (1 mg/cm<sup>3</sup>), le kaolin est un activateur plus puissant de la coagulation et de la fibrinolyse que la célite à quantité égale.

La très faible activation des temps de recalcification et de fibrinolyse du plasma de Hageman-trait est sans doute due à la présence de traces de facteur Hageman dans le plasma étudié.

Les facteurs prothromboplastiques autres que le facteur Hageman n'interviennent pas dans l'activation de la fibrinolyse. Ceci confirme les résultats de N i e w i a r o w s k i et L a t a l l o (10) qui ont montré que les thromboplastines tissulaires ou plasmatiques ajoutées aux euglobulines n'accéléraient pas la fibrinolyse.

Ces constatations permettent de considérer que le contact joue un rôle dans la fibrinolyse en exerçant sans doute son action comme pour la coagulation) par l'intermédiaire du facteur Hageman.

Signalons, toutefois, qu'en étudiant des éluats de facteur contact (de cébite, kaolin, ballotini) obtenus à partir de plasma normal, nous avons noté une dissociation entre le pouvoir activant de ces éluats sur la fibrinolyse qui était faible et le pouvoir activant très marqué sur le temps de recalcification du plasma intact. Ces expériences avec des éluats demandent à être répétées.

Les rapports entre coagulation et fibrinolyse demeurent obscurs. Un équilibre dynamique, *in vivo*, entre coagulation et fibrinolyse est postulé chez le sujet normal par plusieurs auteurs (1, 2, 5) qui supposent que les films de fibrine déposés à la surface des endothélium sont continuellement lysés par les enzymes fibrinolytiques. Dans la plupart des diathèses hémorragiques, la coagulation est défectueuse alors que le processus de fibrinolyse est normal. Dans le Hageman-trait, observations montrent que le processus de coagulation et de fibrinolyse sont *in vitro* considérablement retardés. *In vivo*, l'absence de fibrinolyse physiologique pourrait pallier au trouble de la coagulation et peut-être expliquer l'absence d'hémorragies.

On peut rapprocher également les constatations faites par Niewiarowski et L a t a l l o (9) qui ont remarqué l'absence de fibrinolyse chez les oiseaux et celle de W a r t e l l e (19), R a t n o f f et R o s e n b l u m (14) et V r o m a n (17) qui ont noté l'absence de facteur Hageman dans le plasma de la poule et du canard.

### Résumé

L'agitation d'un plasma intact en présence de surfaces activant le facteur Hageman: kaolin (1 mg/cm<sup>3</sup>), cébite (1 mg/cm<sup>3</sup>), ballotini (20 mg/cm<sup>3</sup>), bentonite (1 mg/cm<sup>3</sup>), accélère la fibrinolyse à condition que le taux de facteur Hageman soit normal dans les plasmas étudiés.

L'activation du système fibrinolytique d'un plasma intact agité avec kaolin ou cébite est très importante avec plasma normal, le plasma d'hémophile A, le plasma d'hémophile B, le plasma d'hypoconvertinémie, le plasma dicoumarolé et le plasma de déficit en PTA.

Le système fibrinolytique du plasma de Hageman-trait n'est pas activable dans les mêmes conditions, bien que le taux de plasminogène et d'antiplasmine soit normal et que ce plasma n'inhibe pas l'activation de la fibrinolyse d'un plasma normal. Les mêmes constatations sont faites en utilisant un plasma privé artificiellement du facteur contact ("plasma épuisé").

Ces résultats sont discutés, et les auteurs se demandent si l'absence de fibrinolyse physiologique chez les sujets porteurs de Hageman-trait ne pourrait pallier au trouble de la coagulation et peut-être expliquer l'absence d'hémorragie.

### *Remerciements*

Nous tenons à exprimer notre grande reconnaissance au Docteur J. P. Soulier qui nous a permis d'effectuer ce travail dans son laboratoire et nous a fait bénéficier de ses conseils.

Nous remercions le Docteur J. Caen qui a bien voulu nous procurer l'échantillon de plasma de déficit en PTA que nous avons utilisé au cours de nos expériences.

(Travail du Centre National de Transfusion Sanguine, Paris, France, Directeur: Dr. J. P. Soulier.)

### **Summary**

Contact of an intact plasma with surfaces activating the Hageman factor such as: kaolin (1 mg/ml), celit 1 mg/ml), ballotini (20 mg/ml), bentonite (1 mg/ml) accelerates the fibrinolysis as long as Hageman factor is normal in the studied plasmas.

The activation of the fibrinolytic system of an intact plasma activated by contact with a foreign surface in normal plasma, in haemophilia A and haemophilia B plasmas, in proconvertin or PTA deficient plasma and in the plasma of patients treated with dicumarol is very important.

In Hageman trait the fibrinolytic system cannot be activated in the same conditions although the plasminogen and plasmin are normal, and although this plasma does not inhibit the activation of fibrinolysis in normal plasma. The same results are obtained with a plasma artificially deprived of Hageman factor ("exhausted plasma").

These results are discussed. In the opinion of the authors the absence of physiological fibrinolysis in Hageman trait could compensate the abnormality of the clotting system and explain the lack of haemorrhages.

### **Zusammenfassung**

Das Rühren eines intakten Plasmas in Gegenwart von Oberflächen die den Hageman-Faktor aktivieren, wie Kaolin (1 mg/cm<sup>3</sup>), Celit (1 mg/cm<sup>3</sup>), Ballo-

tini (20 mg/cm<sup>3</sup>), Bentonit (1 mg/cm<sup>3</sup>), beschleunigt die Fibrinolyse unter der Bedingung, daß der Hageman-Faktor-Spiegel in den untersuchten Plasmen normal ist. Die Aktivierung des fibrinolytischen Systems in einem mit Kaolin oder Celit gerührten intakten Plasma ist sehr erheblich bei Hämophilie-A-Plasma, Hämophilie-B-Plasma, Hypoconvertinämie-Plasma, Dicumarol-Plasma und PTA-Mangel-Plasma.

Das fibrinolytische System des Hageman-trait-Plasmas ist unter den gleichen Bedingungen nicht aktivierbar, obwohl der Plasminogen- und Antiplasmin-Spiegel normal sind und dieses Plasma die Aktivierung der Fibrinolyse in einem Normal-Plasma nicht hemmt. Dasselbe wurde beobachtet bei Verwendung eines künstlich seines Kontakt-Faktors beraubten Plasmas („erschöpftes Plasma“).

Es werden diese Resultate diskutiert, und die Autoren fragen sich, ob die physiologische Abwesenheit der Fibrinolyse bei den Trägern des Hageman-trait nicht die Gerinnungsstörung kompensieren und vielleicht das Fehlen der Hämorrhagien erklären könnte.

#### Bibliographie

- (1) Copley, A. L.: Thrombosis and thromboembolization in blood capillaries. I. Intern. Conf. on Thromb. and Embolism. Benno Schwabe, Basel, page 452, 1954.
- (2) Jensen, H.: Dynamic concept of fibrin formation and lysis in relation to hemorrhage (capillary permeability) and to thrombosis. *Exp. Med. Surg.* 14: 189 (1956).
- (3) Kowalski, F., Kopec, M., Niewiarowski, S.: An evaluation of the euglobulin method for the determination of fibrinolysis. *J. Clin. Pathol.* 12: 215 (1959).
- (4) Kowarzyk, H., Buluk, K.: Postepy badan nach krzepnicciem krwi. *Post. Hig. Med. Dosw.*, 2: 1 (1950).
- (4a) Kowarzyk, H., Rechnic, M.: Thrombinogeneza a proteaza trombinowa. *Acta physiol. pol.* 7: 3 (1957).
- (5) Lasch, H. G., Pfisterer, I., Schimpf, K.: Changes in coagulation of factor VII in the circulation of the cat. *Acta haemat. (Basel)* 17: 180 (1957).
- (6) Margolis, J.: Initiation of blood coagulation by glass and related surfaces. *J. Physiol. (Lond.)* 137: 95 (1957).
- (7) Niewiarowski, S.: O aktywacji plazminogenu u krzpnacych euglobulinach. *Acta physiol. pol.* 4: 231 (1953).
- (8) Niewiarowski, S.: L'adsorption des facteurs du système fibrinolytique par la bentonite. A paraître.
- (9) Niewiarowski, S., Latallo, Z.: Comparative studies on the fibrinolytic system of various animal species. *Thromb. Diath. haem.* 3: 404 (1959).
- (10) Niewiarowski, S., Latallo, Z.: Resultats non publiés.
- (11) Nolf, P.: Contribution à l'étude de la coagulation du sang. La fibrinolyse. *Arch. int. Physiol.* 6: 308 (1908).
- (12) Ratnoff, O. D.: The effect of clotting on the spontaneous activation of plasmin. *J. clin. Invest.* 34: 958 (1953).
- (13) Ratnoff, O. D., Colopy, J. E.: A familial hemorrhagic trait associated with a deficiency of a clot promoting fraction of plasma. *J. clin. Invest.* 34: 4 (1955).

- (14) Ratnoff, O. D., Rosenblum, J. M.: The role of Hageman factor in the initiation of clotting by glass. *J. Lab. clin. Med.* 50: 941 (1957).
- (15) Soulier, J. P., Wartelle, O., Menaché, D.: Hageman trait and PTA deficiency. The role of contact of blood with glass. *Brit. J. Haematol.* 5: 121 (1959).
- (16) Soulier, J. P., Prou-Wartelle, O.: New data on Hageman and PTA factors. The role of "contact" in the initial phase of coagulation (sous presse).
- (17) Vroman, L.: Surface contact and thromboplastin formation. Thesis Drukkerij, Elinkwijk, Utrecht (1958).
- (18) Waaler, B. A.: Contact activation in the intrinsic blood clotting system. *Scand. J. clin. Lab. Invest.* 11: suppl. 37, 135 (1959).
- (19) Wartelle, O.: Les facteurs prothromboplastiques du sang de poule et de quelques mammifères. Application à la détermination de l'hémophilie B chez l'homme. Thèse Sciences, Paris (1958).