

## SUR UN NOUVEL ANTICOAGULANT EXTRAIT DU TISSU MUSCULAIRE DE LAPIN

par

JEAN-CLAUDE DREYFUS

*Department of Biological Chemistry, Washington University, School of Medicine,  
Saint-Louis, Mo. (U.S.A.)\**

### INTRODUCTION

Les observations qui sont à la base de ce travail ont été faites au cours de l'étude d'un enzyme musculaire. Celui-ci possède la propriété de transformer la phosphorylase *a* du muscle en phosphorylase *b*, qui n'est plus active en l'absence d'acide adénylique. On suppose que cette transformation consiste en la disparition d'un groupement prosthétique, d'où le nom donné à l'enzyme de "PR enzyme" (Prosthetic removing)<sup>1</sup>. La transformation de la phosphorylase *a* en *b* est également provoquée par la trypsine cristallisée; c'est la raison pour laquelle une étude comparative des propriétés des deux enzymes a été entreprise. On sait que la trypsine accélère la coagulation<sup>2</sup>; on pouvait donc s'attendre à un effet analogue de la part de l'enzyme PR. Les premiers essais montrèrent au contraire une inhibition extrêmement marquée de la coagulation du plasma. Une étude plus détaillée s'est alors efforcée de confirmer et d'interpréter cette propriété.

### PRÉPARATION DU FACTEUR ACTIF

Les muscles d'un lapin sont broyés dans un broyeur à viande, extraits deux fois par un volume d'eau distillée, puis passés sur gaze. Les extraits combinés sont filtrés sur coton puis sur papier Whatman No 1. L'extrait est amené à pH 5.7 à l'aide d'un tampon acétate 0.15 *M*, pH 4.6, et centrifugé aussitôt à 10,000 tours-minute pendant 15 minutes. Le précipité est redissous dans la plus faible quantité possible de soude 0.02 *N* (habituellement 15 ml par 500 g de muscle) en maintenant le pH entre 7 et 9. La solution obtenue est trouble et peut être clarifiée par centrifugation, à 10,000 tours-minute pendant 15 minutes. Cette solution (solution 1) est ensuite fractionnée par le sulfate d'ammonium à pH 7 et la fraction qui précipite entre 45 et 70 % de la saturation est utilisée. On la redissout dans une faible quantité d'eau (solution 2) et on la garde congelée. Avant utilisation, on la dialyse contre du NaCl à 9‰ pour se débarrasser du sulfate d'ammonium et assurer l'isotonie. Une purification plus poussée peut être obtenue en adsorbant la solution 1 sur 0.20 volume d'alumine Cγ. On utilise pour l'éluat 0.50 volume d'une solution contenant du sulfate d'ammonium (30 % de la saturation) et du phosphate disodique 0.10 *M*. L'éluat est ensuite fractionné par le sulfate d'ammonium comme décrit ci-dessus. Le rendement est d'environ 20 mg de matériel très actif pour 500 g de muscle; le rendement est faible mais cette fraction est complètement dépourvue d'accélérateurs de la coagulation, alors que la solution 1 non adsorbée en contient parfois. La préparation est entièrement conduite en chambre froide.

\* Boursier du Gouvernement Français et de la Smith-Mundt Fundation.

Adresse actuelle: Laboratoire de Recherches de Biochimie Médicale, Hôpital des Enfants Malades, 149, rue de Sèvres; Paris 15e (France).

*Bibliographie p. 336.*

## TECHNIQUES ET RÉSULTATS\*

Nous désignerons, par convention, notre facteur par les initiales A.M. (anticoagulant musculaire).

A. *Temps de coagulation plasmatique*

On utilise du plasma citraté humain avec la technique suivante:

0.1 ml plasma citraté (0.20 ml de citrate à 5 % par ml de sang)

0.1 ml solution test ou sérum physiologique

0.1 ml  $\text{CaCl}_2$  0.05 M

Différentes fractions précipitées à des concentrations en sulfate d'ammonium croissantes ont fourni les résultats résumés dans le Tableau I.

TABLEAU I

	mg. par ml	Temps de coagulation
Témoin	0	300 secondes
a. 0-30 % saturation	0.3	70 secondes
b. 33-50 % saturation	0.4	650 secondes
c. 50-75 % saturation	0.3	> 24 heures

La fraction a. est accélératrice et contient vraisemblablement de la thromboplastine.

La fraction b. a un effet inhibiteur faible et contient probablement encore une faible quantité d'accélérateur en même temps que l'inhibiteur.

La fraction c. possède un effet inhibiteur puissant.

Les résultats fournis par l'extrait purifié par adsorption sont représentés dans les Fig. 1a et 1b. A l'échelle logarithmique, on obtient une droite en portant en abscisse la concentration en facteur A.M. et en ordonnée le temps de coagulation. Il n'y a donc apparemment pas de contamination par une impureté accélératrice de la coagulation.

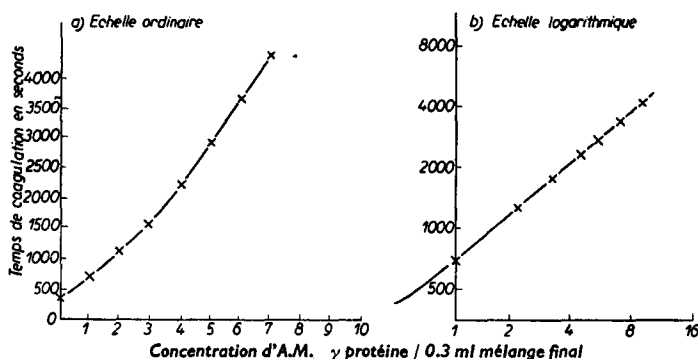


Fig. 1. Temps de coagulation du plasma en fonction de la concentration d'A.M.

L'activité du facteur étudié est très élevée. Une solution contenant 1 mg de protéine par ml empêche complètement la coagulation du plasma. Un effet notable s'observe

\* Nous remercions M. le Docteur W. J. HARRINGTON pour les conseils qu'il a bien voulu nous donner dans la mise au point des techniques.

encore lorsque la même solution est diluée 200 fois (concentration finale dans le système testé 0.00017%).

### B. Temps de coagulation du sang total

On utilise la même technique avec du sang humain citraté. La solution qui empêche complètement la coagulation du plasma donne pour le sang total un T.C. de 40 minutes. L'effet sur le sang total est approximativement 20 fois plus faible que sur le plasma.

### C. Temps de prothrombine

Nous avons employé la méthode en un temps, en utilisant du plasma tel quel ou dilué 5 fois, cette dernière technique permettant de déceler des modifications plus faibles de l'activité de la prothrombine.

La thromboplastine a été préparée à partir du cerveau humain par la méthode de QUICK<sup>17</sup>.

#### 1. Méthode au plasma total

Les résultats sont résumés dans le Tableau II.

TABLEAU II

No <sup>o</sup> des tubes	Plasma	A.M. 2 mg/ml	NaCl 9 <sup>o</sup> /100	Thrombo- plastine	CaCl <sub>2</sub> 0.05 M	T.C. (secondes)
1	0.2	0	0.1	0.2	0.1	15
2	0.2	0.001	0.09	0.2	0.1	16
3	0.2	0.02	0.08	0.2	0.1	19
4	0.2	0.05	0.05	0.2	0.1	23
5	0.2	0.1	0	0.2	0.1	28

L'A.M. prolonge donc le temps de prothrombine, mais de cette seule constatation on ne peut déduire si son action s'exerce sur la prothrombine ou sur la thromboplastine.

Des expériences destinées à tester l'action antagoniste du facteur vis-à-vis de la prothrombine et de la thromboplastine ont été effectuées avec une solution d'A.M. diluée 10 fois (0.2 mg par ml). Le temps de coagulation en présence de thromboplastine concentrée s'est montré le même, que l'A.M. soit présent ou non. Des dilutions croissantes de thromboplastine ont fourni les résultats résumés dans le Tableau III et la Fig. 2 qui montrent une action antagoniste de l'A.M. vis-à-vis de la thromboplastine.

TABLEAU III

No. des tubes	Dilution thromboplastine	T.C. (secondes)	
		Témoin	A.M.
1	1	16	16
2	2	19	22
3	5	21	26
4	10	24	34
5	20	27	42
6	35	30	55
7	50	32	65

2. Des essais similaires ont été pratiqués en utilisant la *méthode au plasma dilué*. Du plasma oxalaté (le plasma citraté ne peut être correctement déprothrombiné) est traité par du phosphate tricalcique.

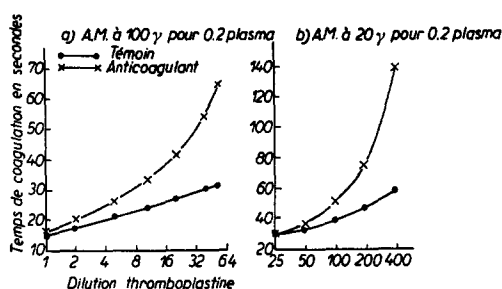


Fig. 2. Relation entre la dilution de la thromboplastine et le temps de coagulation.

Les résultats sont résumés dans le Tableau IV.

TABLEAU IV

No. des tubes	Plasma déprothrombiné	Thromboplastine	A.M.	NaCl 9 <sup>0</sup> /100	CaCl <sub>2</sub> 0.05 M	Plasma normal	T.C. (secondes)
1	0.16	0.2	0	0.1	0.1	0.04	20
2	0.16	0.2	0.1	0	0.1	0.04	20

La dilution de la prothrombine ne modifie pas les résultats obtenus avec du plasma pur. Ces résultats semblent éliminer une action directe contre la prothrombine et confirment les précédents.

#### D. Facteur labile

Nous avons testé l'action éventuelle de l'A.M. contre le facteur labile de QUICK. Celui-ci est considéré comme identique à l'Ac. globuline<sup>27</sup> et au facteur V d'OWREN<sup>18</sup>. D'après QUICK ET STEFANINI<sup>19</sup> du plasma vieilli a perdu son facteur labile mais conserve un taux de prothrombine normal. Le temps de prothrombine d'un tel plasma âgé est d'environ 40 secondes contre 12 pour le même plasma frais. Dans l'exécution du test, le facteur labile est fourni par du plasma frais déprothrombiné par du phosphate tricalcique. Avec du plasma humain, 1 partie de plasma frais ajouté à 9 parties de plasma âgé donne un temps de prothrombine de 20 secondes. Nous avons utilisé une technique dérivée de<sup>19</sup>. Nous avons employé une solution d'A.M. à 0.1 mg par ml, donnant avec du plasma normal (sans addition de thromboplastine) un temps de coagulation de 30 minutes. En présence de thromboplastine, le T.C. était le même que celui du témoin. Il y avait donc un excès de thromboplastine et le facteur labile devenait le facteur limitant de la coagulation si l'on employait du plasma âgé. Une action antagoniste de l'A.M. vis-à-vis du facteur labile devait se manifester dans ces conditions par un retard de la coagulation. Ce retard serait supprimé en augmentant la concentration en facteur labile. Les résultats de cette expérience effectuée avec du plasma oxalaté sont exprimés par le Tableau V. Des dilutions convenables du plasma frais ont été faites afin de maintenir le volume total du plasma à 0.2 ml. Aucune différence n'a pu être constatée entre

les tubes contenant ou non de l'A.M. Il n'y a donc pas d'action antagoniste entre l'A.M. et le facteur labile de QUICK.

TABLEAU V

No. des tubes	Thrombo- plastine	A.M. 0.1 mg/ml	NaCl 9°/100	Plasma âgé	Plasma frais	CaCl <sub>2</sub> 0.10 M	T.C. (secondes)
1	0.2	0	0.1	0.20	0	0.1	35
2	0.2	0.1	0	0.20	0	0.1	36
3	0.2	0	0.1	0.20	0.005	0.1	29
4	0.2	0.1	0	0.20	0.005	0.1	29
5	0.2	0	0.1	0.19	0.01	0.1	28
6	0.2	0.1	0	0.19	0.01	0.1	28
7	0.2	0	0.1	0.18	0.02	0.1	24
8	0.2	0.1	0	0.18	0.02	0.1	23
9	0.2	0	0.1	0.15	0.05	0.1	21
10	0.2	0.1	0	0.15	0.05	0.1	21

#### E. Test de consommation de la prothrombine

A 1 ml de plasma oxalaté on ajoute 0.1 ml d'A.M. à 0.1 mg par ml et 0.2 ml CaCl<sub>2</sub> 0.20 M. Après la coagulation, les tubes sont maintenus à 37° pendant 24 heures. Nous avons suivi la technique de QUICK au plasma oxalaté déprothrombinisé, qui est identique à celle du temps de prothrombine (méthode au plasma dilué), le sérum remplaçant ici le plasma oxalaté testé<sup>18</sup>.

TABLEAU VI

	T.C. (secondes)
Plasma normal	20
Témoin coagulé sans A.M.	47
Coagulé en présence d'A.M.	24

Les résultats représentés dans le Tableau VI montrent que la consommation de la prothrombine est fortement diminuée par l'A.M. à des concentrations qui seraient sans influence sur le temps de prothrombine. Il y a là un argument de plus en faveur de l'inhibition de la thromboplastine et non de la prothrombine.

#### F. Essai de la globuline antihémophilique

On considère la globuline antihémophilique comme nécessaire à l'action de la thromboplastine. Elle est contenue dans la fraction I. Nous avons utilisé une fraction I humaine de COHN à 1% et l'A.M. à 0.020 mg/ml. Le Tableau VII schématise les résultats obtenus.

TABLEAU VII

No. des tubes	Plasma citraté	NaCl 9°/100	Fraction I	A.M.	CaCl <sub>2</sub> 0.10 M	T.C. (secondes)
1	0.2	0.2	0	0	0.1	370
2	0.2	0.1	0.1	0	0.1	410
3	0.2	0.1	0	0.1	0.1	1290
4	0.2	0	0.1	0.1	0.1	1350

La globuline antihémophilique n'a pas d'action contre une solution très diluée d'A.M.

### G. Action sur le second temps de la coagulation et comparaison avec l'héparine

Nous venons de voir que la fraction I est sans action vis-à-vis de l'A.M. Cette fraction contient le fibrinogène qui est donc inactif.

#### 1. Activité antithrombine<sup>15</sup>

Le test a été effectué au tampon imidazole isotonique à pH 7.3. Dans 1 ml de tampon, on a dissous 1 unité de thrombine. On ajoute successivement:

0.1 ml A.M. ou tampon, puis, après incubation à 37° pendant 2 ou 10 minutes, 0.5 ml de fibrinogène à 1%. Souvent la coagulation reste incomplète et on note le temps d'apparition de filaments de fibrine. Les résultats sont représentés dans le Tableau VIII.

TABLEAU VIII

No. des tubes		T.C. (secondes)
1	Témoin	16
2	A.M. (2 mg/ml) Incubation 2 min	16
3	— dg — Incubation 10 min	16

Une concentration d'A.M. suffisante pour empêcher complètement la coagulation du plasma ne modifie par la réaction thrombine-fibrinogène.

#### 2. Action héparinique

Nous avons comparé l'action de l'héparine et celle de l'A.M. sur la thrombine en utilisant le plasma comme source de fibrinogène et de cofacteur de l'héparine.

A 0.1 de plasma citraté, on ajoute 0.1 d'héparine, A.M. ou ClNa 9<sup>0</sup>/<sub>100</sub>. 5 minutes d'incubation à 37°. Puis on ajoute 1 unité de thrombine (dans 0.1 ml).

Comme le montre le Tableau IX, l'A.M. est dépourvu d'action sur la thrombine même en présence du cofacteur de l'héparine et est donc distinct de celle-ci.

TABLEAU IX

No. des tubes	Plasma	NaCl	Héparine	A.M.	Thrombine	T.C. (secondes)
1	0.1	0.1	0	0	0.1	50
2	0.1	0	0.1	0	0.1	180
3	0.1	0	0	0.1	0.1	50

#### 3. Cofacteur de l'héparine

On mélange une unité de thrombine avec de l'héparine, de l'A.M. ou les deux. Après 10 minutes d'incubation, on ajoute du fibrinogène à 0.5%. Les résultats sont figurés dans le Tableau X.

L'héparine en présence de thrombine et de fibrinogène purs devrait être sans action sur le temps de coagulation. Du cofacteur de l'héparine contamine probablement la

TABLEAU X

No. des tubes	Thrombine	NaCl	Héparine	A.M. (2 mg/ml)	Fibrinogène	T.C. (secondes)
1	0.1	0.2	0	0	0.4	35
2	0.1	0.1	0.1	0	0.4	150
3	0.1	0.1	0	0.1	0.4	33
4	0.1	0	0.1	0.1	0.4	42

fraction I utilisée comme source de fibrinogène. L'A.M. n'a pas d'action par lui-même et diminue celle de l'héparine, probablement en provoquant sa précipitation. Un précipité assez abondant s'observe en effet dans le tube 4. L'A.M. diffère donc du cofacteur de l'héparine.

#### H. Action du sulfate de protamine

On sait que le sulfate de protamine inhibe l'action de l'héparine<sup>5</sup> et d'un certain nombre d'autres anticoagulants. Nous l'avons testé à des concentrations allant de 0.0025 mg/ml à celles qui empêchent la coagulation par leur action propre. La solution d'A.M. a été diluée à 20  $\gamma$ /ml, de façon à obtenir un temps de coagulation plasmatique de 18 min. La protamine n'a modifié en rien l'action de l'A.M.

#### I. Effet de la chaleur

Lorsqu'on chauffe à 65–70° pendant 15 min, l'activité est complètement détruite. L'effet de la chaleur a été vérifié pour chaque nouvelle préparation pour éviter un effet de sel possible dans la préparation malgré la dialyse.

#### J. Essai d'action inhibitrice sur la trypsine

Quand on mélange trypsine et trypsine-inhibiteur à des concentrations molaires égales, l'activité protéolytique de la trypsine est complètement supprimée. La trypsine<sup>9</sup> accélère et l'inhibiteur retarde légèrement<sup>8, 10, 22</sup> la coagulation. Nous avons utilisé la technique décrite par NORTHROP, KUNITZ ET HERRIOTT<sup>13</sup> en ajoutant un excès d'A.M. A 1 ml de solution contenant 0.2 mg de trypsine cristallisée, on ajoute 2 mg d'A.M. On garde à 6° pendant 30 min. Puis on pratique le test avec l'azocaséine comme substrat de la façon suivante:

1.0 ml azocaséine à 1% pH 7.4

0.6 ml solution à tester

Laisser 30 min à 37°.

Ajouter 4 ml d'acide trichloracétique à 5%. Filtrer au bout de 5 minutes.

A 2 ml de filtrat, ajouter 3 ml de soude 0.5 N et lire au photomètre avec un écran vert.

Les lectures photométriques obtenues sont représentées par le Tableau XI.

L'A.M. ne possède donc aucune action inhibitrice sur la trypsine.

TABLEAU XI

Témoin	20
A.M. seul	21
Trypsine seule	80
Trypsine + A.M.	80

### K. Tentatives de séparation d'une fraction lipidique active

Plusieurs anticoagulants ont été déjà extraits de tissus de mammifères. A l'exception du trypsine-inhibiteur et de l'héparine, ils se sont révélés être des lipides. Nous avons appliqué à notre anticoagulant les méthodes décrites par TOCANTINS et par de SUTO-NAGY pour extraire leurs composés actifs respectifs. Ces extractions ont été faites sur des préparations dialysées au préalable contre NaCl isotonique.

#### 1. Méthode de TOCANTINS

Nous avons suivi la technique décrite pour l'extraction de l'"antithromboplastine lipidique" du plasma<sup>23</sup>. A 10 ml d'une solution d'A.M., à 5 mg/ml, on ajoute, en chambre froide, 90 ml d'alcool méthylique absolu. On laisse 5 jours en agitant de temps en temps. Le mélange est ensuite distillé sous vide à 40°. Le résidu aqueux est repris par l'éther absolu et abandonné 24 heures. La couche aqueuse est alors rejetée et l'éther évaporé. Le résidu, très peu abondant, est homogénéisé dans 2 ml de NaCl isotonique. La suspension est dépourvue de tout effet sur la coagulation.

#### 2. Méthode de DE SUTO-NAGY<sup>20, 21</sup>

Pour extraire son inhibiteur sphingomyélinique DE SUTO-NAGY a décrit deux méthodes. Nous avons suivi sa modification de la technique HARDY-GARDINER qui extrait le lipide et laisse dans son cas les protéines non dénaturées mais inactives.

7 ml d'une solution d'A.M. à 1% sont ajoutés lentement sous agitation à un mélange éthanol-chloroforme (7:3) à -15°. Après 5 heures, on réchauffe le mélange à +3° en chambre froide. On recueille le précipité par centrifugation, on le lave 4 fois à l'éther froid pour éliminer l'alcool et on le conserve au dessiccateur. Le liquide est filtré et évaporé sous vide. Le résidu aqueux est agité avec du chloroforme et la couche chloroformique est évaporée. Le résidu, très peu abondant, est resuspendu dans 2 ml de NaCl isotonique. La suspension n'exerce aucun effet sur la coagulation.

Les protéines desséchées sont traitées par 3 ml de NaCl isotonique. On obtient une redissolution partielle. La solution possède un pouvoir anticoagulant. Elle possède également un pouvoir PR (transformation de phosphorylase *a* en *b*). Les résultats de nos essais d'extraction sont résumés dans le Tableau XII.

TABLEAU XII

	<i>T.C. du plasma (secondes)</i>
Témoin	270
Extrait par méthanol	260
Extrait par alcool-CHCl <sub>3</sub>	270
Résidu protéique	1900

#### DISCUSSION

On sait que des extraits salins ou aqueux de tissus contiennent à la fois des activateurs et des inhibiteurs de la coagulation. Dans les extraits bruts, l'action des activateurs prédomine. Le principal accélérateur tissulaire est la thromboplastine, dont la partie active a été décrite par HOWELL comme étant une céphaline<sup>11</sup>. La thrombo-



plastine précipite avec les globulines par les sels neutres. Une lipoprotéine inhibitrice a été décrite par DE SUTO-NAGY dans des extraits de rate de porc<sup>20, 21</sup>. Elle précipite avec les albumines mais sa partie active est une sphingomyéline. Des inhibiteurs lipidiques ont été décrits également par CHARGAFF<sup>2, 3, 4</sup>, TOCANTINS ET CARROLL<sup>23, 26</sup>, OVERMAN<sup>14</sup>. L'anticoagulant décrit par ces deux derniers groupes semble être le même. Enfin, mentionnons que le trypsine-inhibiteur du pancréas<sup>8, 10</sup> et du soja<sup>22</sup> retardent la coagulation.

Dans ce travail, nous décrivons l'existence d'un nouveau facteur anticoagulant qui paraît être une protéine. Il apparaît dans un extrait aqueux de muscle. Il précipite en milieu privé de sels à pH 5.6 et ce caractère est à la base de son isolement. Cette propriété serait en faveur d'une nature globulinique. Mais après redissolution à la neutralité, il précipite à des concentrations en sulfate d'ammonium de 40 à 70% de la saturation. Peut-être commence-t-il à précipiter à des concentrations inférieures, mais la présence de thromboplastine dans ces précipités empêche de détecter sa présence. Aucune fraction lipidique n'a pu être extraite de l'A.M., alors que le résidu protéique gardait une certaine activité. Il semble donc qu'il s'agisse d'une protéine et non d'une lipoprotéine.

La nature exacte de l'A.M. ne peut encore être précisée. Nous n'avons pu séparer complètement activité coagulante et activité PR. Certaines préparations possédaient une activité PR et n'inhibaient pas la coagulation ou même l'accéléraient, mais elles étaient obtenues à de faibles concentrations en sulfate d'ammonium et contenaient de la thromboplastine. Toutes les préparations inhibitrices de la coagulation étaient actives sur la phosphorylase. Il ne paraît pas probable toutefois que les deux protéines soient identiques. L'enzyme est inactif en l'absence de cystéine; or la cystéine, aux concentrations tout au moins qui n'entravent pas par elles-mêmes la coagulation<sup>7</sup>, n'augmente pas l'action de l'A.M. Par ailleurs, l'acide adénylique qui inhibe fortement la PR est inactif sur l'action anticoagulante. Ceci semble éliminer également le rôle possible de l'acide adénylique désaminase, toujours présente dans nos préparations.

Le *mode d'action* de l'A.M. a été étudié. Il est actif sur le sang total, mais moins que sur le plasma. Son activité est très élevée. Une dose de 0.5  $\gamma$  retarde de façon significative la coagulation de 0.1 ml de plasma. 1.5 mg retarderait celle de 300 ml tandis que la même quantité d'héparine agit sur 1 litre de plasma. L'activité de notre facteur, qui n'a certainement pas été obtenu à l'état pur, n'est donc que 3 fois inférieure à celle de l'héparine vis-à-vis du plasma. L'A.M. prolonge le temps de prothrombine et diminue la consommation de la prothrombine (Tableaux II et VI). Il agit donc sur le premier temps de la coagulation. On peut mettre en évidence son action antagoniste vis-à-vis de la thromboplastine alors qu'il n'agit pas sur la prothrombine, le facteur labile ou Ac. globuline et la globuline antihémophilique (Tableaux III, IV, V et VII).

Il semble donc que l'A.M. agisse comme agent antithromboplastine. Il ne possède pas d'action sur le second temps de la coagulation: il n'a pas d'activité directe antithrombine; contrairement à l'héparine il n'inactive pas la thrombine quand on le met à incuber avec du cofacteur de l'héparine avant d'ajouter la thrombine. Il est différent du cofacteur de l'héparine, aussi bien que de l'héparine.

Il diffère en effet de l'héparine par trois caractères:

- a. il n'a pas d'action sur le second temps de la coagulation,
- b. il est détruit à 70°,
- c. la protamine ne l'inhibe pas.

Enfin, il semble y avoir, dans la préparation d'A.M., un composé qui précipite avec

l'héparine en supprimant l'action de celle-ci. Ses caractères diffèrent également de ceux des autres agents inhibiteurs décrits. L'anticoagulant lipidique de CHARGAFF est sensible à la protamine. La lipoprotéine de DE SUTO-NAGY, à une concentration de 1.65 %, n'agit pas sur le temps de prothrombine; elle a une action antithrombine alors que l'A.M. en est dépourvu. Le facteur lipidique de TOCANTINS et d'OVERMAN est très actif sur le temps de prothrombine, mais a été utilisé à des concentrations très élevées (10 %). Ces auteurs le considèrent comme étant une anti-thromboplastine<sup>23</sup>; toutefois, COON lui a décrit *in vivo* une action sur l'activité de la prothrombine et de l'Ac. globuline<sup>6</sup>. Le facteur que nous décrivons semble donc bien différent de ceux qui ont été précédemment extraits, par sa nature chimique comme par ses propriétés.

Le Tableau XIII résume les caractères principaux de différents anticoagulants biologiques (emprunté en partie à <sup>26</sup>).

TABLEAU XIII

<i>Anticoagulant</i>	<i>Héparine (Toronto)</i>	<i>CHARGAFF 1937<sup>2, 3</sup></i>	<i>DE SUTO-NAGY 1944<sup>20, 21</sup></i>	<i>TOCANTINS CARROLL, McBRIDE 1948<sup>26</sup></i>	<i>DREYFUS 1951</i>
Source	Poumon de boeuf	Cerveau de porc et mouton	Rate de porc	Cerveau humain	Muscle de lapin
Nature chimique	Ester d'acide sulfurique	Lipide	Lipoprotéine	Lipide	Protéine
Mode d'action:					
Antithromboplastine	+		+	+	+
Antithrombine	+		+	—	—
Antifibrinogène	—		—	—	—
Inhib. par protamine	+	+	—	—	—
Extraction par solvants organiques:					
Ethanol-chloroforme			+		—
Méthanol				+	—
Concentration utilisée	0.005 %	1 % env.	1.65 %	10 %	0.10 %
Temps de coagulation:					
Plasma + CaCl <sub>2</sub>	250–350 sec	120 sec	348 sec	250–350 sec	250–350 sec
Plasma + anticoagulant + CaCl <sub>2</sub>	> 24 h	4920 sec	> 1800 sec	> 24 h	> 24 h
Plasma + thromboplastine + CaCl <sub>2</sub>	12 sec		9 sec	12 sec	15 sec
Plasma + thromboplastine + anticoagulant + CaCl <sub>2</sub>	81 sec		9 sec	280 sec	28 sec
Source de plasma	Homme	Homme	Chien	Homme	Homme

Nous remercions le Professeur C. F. CORI pour l'intérêt qu'il a bien voulu nous témoigner au cours de la réalisation de ce travail.

### RÉSUMÉ

Un nouvel anticoagulant biologique a été extrait et purifié à partir d'extraits de muscle de lapin. Il retarde la coagulation du plasma à des taux de 1 γ pour 0.2 ml de plasma. Il inhibe la conversion de la prothrombine en thrombine et agit donc sur le premier temps du processus de la coagulation. Il prolonge le temps de prothrombine mesuré par la méthode en un temps. Il exerce une action antagoniste sur la thromboplastine et est considéré comme un agent antithromboplastine, mais ne paraît pas agir sur la prothrombine elle-même. Il est inactif sur le deuxième temps de la coagulation. Ses effets ne sont pas inhibés par la protamine.

*Bibliographie p. 336.*

L'anticoagulant musculaire est thermolabile et paraît être une protéine. Aucun composé lipidique actif n'a pu en être séparé et il semble être différent des inhibiteurs tissulaires décrits précédemment.

#### SUMMARY

A new anticoagulant has been extracted and purified from aqueous extracts of rabbit muscle. It is active in delaying plasma coagulation in amounts as low as 1  $\gamma$ g per 0.2 ml plasma; it inhibits conversion of prothrombin into thrombin and acts, therefore, on the first stage of the clotting process; it is able to prolong the prothrombin time by the one-stage procedure; it exerts an antagonistic action towards thromboplastin and is believed to be an antithromboplastin agent, but it does not seem to act upon prothrombin itself. No action is found upon the second stage of coagulation. The activity is not inhibited by protamine.

The muscle anticoagulant is heat labile and appears to be a protein. No active lipid component could be separated from it and it seems to be different from the previously described tissue inhibitors.

#### ZUSAMMENFASSUNG

Ein neuer biologischer gerinnungshemmender Stoff wurde aus Kaninchenmuskelextrakten extrahiert und gereinigt. Er verzögert die Plasmakoagulation in einer Menge von 1  $\gamma$  pro 0.2 ml des Plasmas. Er hemmt die Umwandlung des Prothrombins in Thrombin und wirkt so auf die erste Stufe des Koagulationsvorgangs. Er verlängert die nach der Ein-Stufenmethode gemessene Prothrombinzeit. Er übt eine antagonistische Wirkung auf das Thromboplastin aus und wird als ein Antithromboplastinwirkstoff betrachtet, aber er scheint nicht auf das Prothrombin selbst zu wirken. Er ist ohne Wirkung auf die zweite Stufe der Koagulation. Seine Wirkung wird nicht durch Protamin gehemmt.

Der gerinnungshemmende Stoff aus dem Muskel ist thermolabil und scheint ein Protein zu sein. Es konnte keine aktive Lipoidkomponente abgetrennt werden und er scheint von den früher beschriebenen Hemmstoffen aus Geweben verschieden zu sein.

#### BIBLIOGRAPHIE

- <sup>1</sup> G. T. CORI ET C. F. CORI, *J. Biol. Chem.*, 158 (1945) 321.
- <sup>2</sup> E. CHARGAFF, *Science*, 85 (1937) 548.
- <sup>3</sup> E. CHARGAFF, *J. Biol. Chem.*, 121 (1937) 175.
- <sup>4</sup> E. CHARGAFF, *Adv. in Enzymol.*, 5 (1945) 31.
- <sup>5</sup> E. CHARGAFF ET K. B. OLSON, *J. Biol. Chem.*, 122 (1938) 153.
- <sup>6</sup> R. W. COON, *Federation Proc.*, 10 (1951) 352.
- <sup>7</sup> P. FANTL ET M. H. NANCE, *Nature*, 159 (1947) 777.
- <sup>8</sup> J. H. FERGUSON, *Proc. Soc. Exptl. Biol. Med.*, 51 (1942) 373.
- <sup>9</sup> J. H. FERGUSON ET B. N. ERICKSON, *Am. J. Physiol.*, 126 (1942) 661.
- <sup>10</sup> D. GROB, *J. Gen. Physiol.*, 26 (1943) 423.
- <sup>11</sup> W. H. HOWELL, *Am. J. Physiol.*, 31 (1912) 1.
- <sup>12</sup> J. E. JORPES, *Heparin in the treatment of thrombosis*, London, Oxf. Univ. Press, 1946.
- <sup>13</sup> J. NORTHROP, M. KUNITZ ET R. M. HERRIOTT, *Crystalline enzymes*, Columbia Univ. Press. New York 1948, p. 153.
- <sup>14</sup> R. S. OVERMAN, 2nd Josiah Macy Conf., *Blood Clotting and allied Problems*, New York 1949, p. 29.
- <sup>15</sup> C. A. OWEN JR ET J. L. BOLLMAN, *Proc. Soc. Exptl. Biol. Med.*, 67 (1948) 367.
- <sup>16</sup> P. A. OWREN, *Acta Med. Scand.*, (1947), suppl. 124.
- <sup>17</sup> A. J. QUICK, *Science*, 92 (1940) 113.
- <sup>18</sup> A. J. QUICK, *Am. J. Med. Sci.*, 214 (1947) 272.
- <sup>19</sup> A. J. QUICK ET M. STEFANINI, *J. Lab. Clin. Med.*, 33 (1948) 819.
- <sup>20</sup> G. J. DE SUTO-NAGY, *Am. J. Physiol.*, 141 (1944) 338.
- <sup>21</sup> G. J. DE SUTO-NAGY, *J. Biol. Chem.*, 156 (1944) 433.
- <sup>22</sup> H. J. TAGNON ET J. P. SOULIER, *Proc. Soc. Exptl. Biol. Med.*, 61 (1946) 440.
- <sup>23</sup> L. M. TOCANTINS ET R. T. CARROLL, 2nd Josiah Macy Conf., *Blood Clotting and Allied Problems*, New York 1949, p. 11.
- <sup>24</sup> L. M. TOCANTINS ET R. T. CARROLL, *Proc. Soc. Exptl. Biol. Med.*, 69 (1948) 431.
- <sup>25</sup> L. M. TOCANTINS ET R. T. CARROLL, *Federation Proc.*, 9 (1950) 127.
- <sup>26</sup> L. M. TOCANTINS, R. T. CARROL ET T. J. MCBRIDE, *Proc. Soc. Exptl. Biol. Med.*, 68 (1948) 110.
- <sup>27</sup> A. G. WARE ET W. H. SEEGER, *J. Biol. Chem.*, 174 (1948) 565.

Reçu le 6 août 1952