

Héparine et fibrinolyse¹

Les rapports de la littérature concernant l'influence de l'héparine sur la fibrinolyse sont contradictoires. Tandis qu'un nombre de chercheurs croit que l'héparine accélère la fibrinolyse²⁻⁵, d'autres auteurs ont décrit une action inhibitrice de l'héparine sur la fibrinolyse humaine activée par la streptokinase^{6,7}, ou sur l'action fibrinolytique d'euglobulines canines⁸. VON KAULLA a publié des résultats démontrant que l'héparine en haute concentration retarde la fibrinolyse d'un film de plasma humain coagulé ou de fibrine bovine par l'urokinase, et que l'héparine en faible concentration augmente occasionnellement l'activité fibrinolytique de l'urokinase⁹.

Le problème de l'action de l'héparine sur la dissolution d'un caillot n'est pas seulement d'un intérêt académique mais peut avoir de sérieuses répercussions sur le traitement de la maladie thrombo-embolique par cet anticoagulant. En effet, si l'héparine possédait les qualités fibrinolytiques que certains chercheurs l'ont attribuées, la présente tendance à trouver un agent thrombolytique deviendrait largement superflue.

Nous avons repris l'étude de l'influence de l'héparine sur la fibrinolyse. Deux techniques ont été employées: (1) Étude de la lyse d'un caillot de plasma humain. Dix-neuf volumes de plasma citraté frais, pauvre en plaquettes sanguines, sont mélangés avec un volume de fibrinogène bovin marqué au iode radioactif 131, selon la méthode de CLEMENT et McNICOL¹⁰. Des caillots standards sont obtenus par l'addition de 0,1 ml de solution de thrombine (Bovine Thrombin Topical, Parke Davis & Cie., Detroit, U.S.A.), 50 unités N.I.H., dissoute dans du chlorure calcique, 0,1 M, à 0,4 ml du mélange plasma-fibrinogène. La diminution de la radioactivité d'un caillot, après incubation avec la solution fibrinolytique étudiée, est exprimée en pourcentage de la radioactivité initiale et constitue la mesure de la lyse obtenue. L'erreur expérimentale de cette méthode est moins que $\pm 2\%$ de la radioactivité initiale. (2) La méthode de plaques de fibrine décrite par ASTRUP et MÜLLERTZ¹¹. On dépose sur la surface du film de fibrine bovine 0,03 ml de la solution investiguée et la zone de lyse, présente après 20 h d'incubation à 37°C, est mesurée en mm² (produit de deux diamètres perpendiculaires).

Successivement, nous avons investigué l'influence de différentes quantités d'héparine sur la fibrinolyse spontanée d'un caillot plasmatique, et sur la lyse de fibrine bovine ou de caillots plasmatiques par la streptokinase (Behringwerke, Marburg/Lahn, Allemagne), l'urokinase (Leo Pharmaceuticals, Ballerup, Danemark), la plasmine bovine activée par le chloroforme (Parke Davis & Cie., Detroit, U.S.A.) et par une protéase isolée de cultures liquides d'*Aspergillus Oryzae* (Aspergillin O, Connaught Laboratories, Toronto, Canada). Deux marques d'héparine commerciale ont été employées: héparine sodique respectivement de la firme Lederle (Pearl River, N.Y., U.S.A.) et de la firme Upjohn (Kalamazoo, U.S.A.). Les résultats obtenus avec les deux préparations étaient identiques. Une unité d'héparine est considérée équivalente à 10 µg d'héparine. L'héparine et les enzymes investiguées ont été dissoutes dans de la solution tampon selon OWREN¹². Les euglobulines étaient isolées à partir de plasma humain frais, citraté, selon la méthode décrite par MILSTONE¹³ et redissoutes dans de la solution tampon.

I. Influence de l'héparine sur la fibrinolyse de caillots plasmatiques. L'incubation de caillots plasmatiques avec des solutions d'héparine de concentrations finales, allant de 0,1 µg jusqu'à 10 000 µg par ml, n'a pas altéré la dissolution spontanée de caillots plasmatiques (Courbe 1, Figure 1).

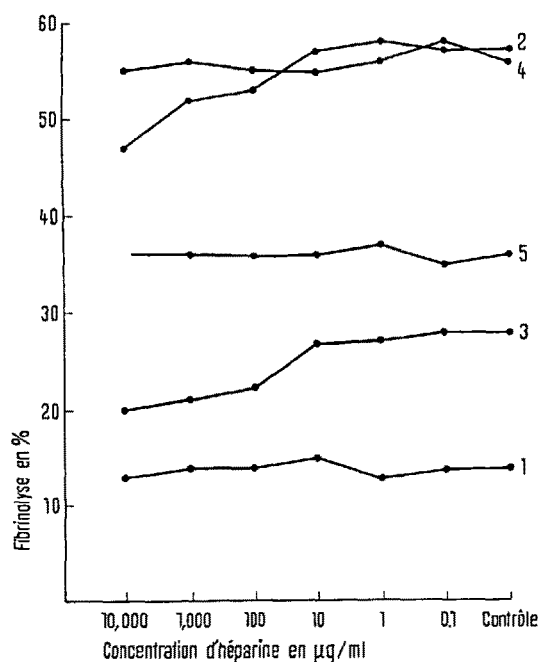


Fig. 1. Influence de l'héparine sur la lyse de caillots plasmatiques. Ordonnée: Fibrinolyse en %; abscisse: Concentration finale d'héparine dans le surnageant (solution d'incubation). Chaque résultat est la moyenne arithmétique de trois déterminations.

Composition de la solution d'incubation: Courbe 1: Solution tampon et héparine. Temps d'incubation: 15 h. Courbe 2: Solution tampon contenant de la streptokinase, 2500 unités Christensen par ml, et de l'héparine. Temps d'incubation: 5 h. Courbe 3: Solution tampon contenant de l'urokinase, 100 unités Ploug par ml, et de l'héparine. Temps d'incubation: 17 h. Courbe 4: Solution tampon contenant de la plasmine, 100 unités Loomis par ml, et de l'héparine. Temps d'incubation: 7.30 h. Courbe 5: Solution tampon contenant de la protéase d'*Aspergillus*, 1 mg/ml, et de l'héparine.

Dans l'expérience de contrôle, l'héparine est remplacée par de la solution tampon. Le volume total de la solution d'incubation est de 2 ml dans chaque expérience.

Une concentration de 100 µg par ml ou plus d'héparine dans le mélange d'incubation, diminuait l'activité fibrinolytique de la streptokinase (Courbe 2, Figure 1), ou de l'urokinase (Courbe 3, Figure 1). Par contre, l'héparine, même dans une concentration de 10 000 µg par ml, n'avait pas d'effet sur l'activité fibrinolytique de la plasmine ou de la protéase d'*Aspergillus* (Courbes 4 et 5, Figure 1). L'héparine et l'agent fibrinolytique, dissous dans du sérum normal, donnaient des résultats similaires.

¹ Travail réalisé avec l'aide financière de l'U.S. National Institute of Health (Grant H-5698).

² T. HALSE, Arch. int. Pharmacodyn. 86, 168 (1951).

³ M. SCHMIDHAUSER-KOPP et E. EICHENBERGER, Exper. 8, 354 (1952).

⁴ H. VINAZZER, Wien. Z. inn. Med. 32, 167 (1951).

⁵ K. BULUK et J. JANUSZKO, Patol. Pol. 8, 107 (1957).

⁶ T. ASTRUP, J. CROOKSTON et A. MACINTYRE, Acta physiol. scand. 21, 238 (1950).

⁷ T. ASTRUP et N. ALKJAERSIG, Nature 169, 314 (1952).

⁸ S. N. PALY et D. L. KLINE, Yale J. Biol. Med. 26, 486 (1953-1954).

⁹ K. N. VON KAULLA et T. S. McDONALD, Blood 13, 811 (1958).

¹⁰ W. CLEMENT et G. R. McNICOL, J. clin. Path. 12, 544 (1959).

¹¹ T. ASTRUP et S. MÜLLERTZ, Arch. Biochem. 40, 346 (1952).

¹² P. A. OWREN, Acta med. scand., Suppl. 194, 1 (1947).

¹³ H. A. MILSTONE, J. Immunol. 42, 109 (1941).

II. Influence de l'héparine sur la fibrinolyse de fibrine bovine. Dans une première série d'expériences, nous avons étudié l'influence de l'addition de quantités croissantes d'héparine à une solution d'urokinase, de plasmine bovine ou de protéase d'*Aspergillus*. L'activité fibrinolytique produite par ces réactifs n'en était pas modifiée. Par contre, quand du plasma normal était ajouté au mélange fibrinolytique, l'héparine exerçait une influence inhibitrice sur l'activité de l'urokinase (Courbe 2, Figure 2); une expérience similaire où la streptokinase remplaçait l'urokinase donnait des résultats analogues (Courbe 1, Figure 2). L'activité fibrinolytique de l'urokinase et de la streptokinase était inhibée à partir d'une concentration finale d'héparine de 33 μg par ml dans la solution étudiée. Quand, dans cette expérience, le plasma était remplacé par une solution d'euglobulines humaines, l'effet in-

hibiteur de l'héparine était absent. L'addition d'héparine à des mélanges de plasma normal avec de la plasmine ou de la protéase d'*Aspergillus*, n'avait pas d'effet sur l'activité fibrinolytique de ces enzymes (Courbes 3 et 4, Figure 2).

Le présent rapport montre que l'influence de l'héparine sur la fibrinolyse diffère selon l'agent fibrinolytique employé. Bien que l'héparine soit sans effet sur l'activité fibrinolytique de la plasmine ou de la protéase d'*Aspergillus*, de hautes concentrations de cet anticoagulant diminuent la lyse d'un caillot plasmatique par la streptokinase ou l'urokinase. L'urokinase est un activateur du plasminogène (profibrinolyse); la streptokinase catalyse la transformation d'un «proactivateur», peut-être identique au plasminogène ou à la plasmine d'origine humaine, en activateur du plasminogène. La plasmine et la protéase d'*Aspergillus*, par contre, sont deux différentes enzymes protéolytiques attaquant directement la fibrine. On peut donc déduire que de hautes doses d'héparine interfèrent avec le processus fibrinolytique dans le sens d'une inhibition de l'activation de la profibrinolyse et probablement aussi d'une inhibition de la transformation de «proactivateur» en activateur du plasminogène. L'activité de la plasmine même n'est pas influencée par l'héparine.

Les expériences, employant la fibrine bovine comme substrat, suggèrent que l'héparine requiert la présence d'un cofacteur présent dans du plasma humain citraté mais absent d'une solution d'euglobulines humaines, pour exercer une influence inhibitrice sur l'activité fibrinolytique de l'urokinase ou de la streptokinase. Cette observation confirme les résultats publiés par VON KAULLA concernant l'effet de l'héparine sur l'activité de l'urokinase.

Nos résultats démontrent qu'aucune influence thrombolytique directe peut être attendue de l'administration d'héparine dans le traitement de la maladie thromboembolique. Dans un dosage de 3 mg ou plus par kg de poids, équivalent à un taux sanguin de 30 $\mu\text{g}/\text{ml}$, l'héparine peut exercer une minime action antifibrinolytique. Ce dosage dépasse largement la quantité usuelle d'héparine employée dans un traitement anticoagulant. Il faut remarquer que nos résultats, obtenus dans des expériences *in vitro*, ne permettent pas d'exclure la possibilité que l'héparine injectée pourrait activer le système fibrinolytique du sang par un mécanisme indirect.

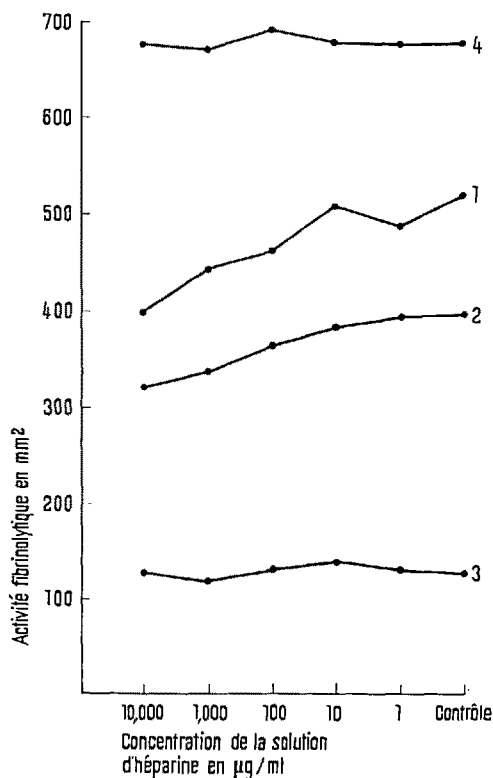


Fig. 2. Influence de l'héparine sur la lyse de fibrine bovine. Méthode des plaques de fibrine selon ASTRUP et MÜLLERTZ¹¹. Ordonnée: Activité fibrinolytique en mm^2 ; abscisse: Concentration de la solution d'héparine ajoutée au mélange étudié. Chaque résultat est la moyenne arithmétique de trois déterminations.

Composition de la solution expérimentale:

- 0,2 ml de plasma humain, citraté
- 0,2 ml de solution d'héparine
- + 0,2 ml d'une solution de streptokinase, 10000 unités Christensen par ml (Courbe 1)
- + 0,2 ml d'une solution d'urokinase, 600 unités Ploug par ml (Courbe 2)
- + 0,2 ml d'une solution de plasmine bovine, 35 unités Loomis par ml (Courbe 3)
- + 0,2 ml d'une solution de protéase d'*Aspergillus*, 3 mg par ml (Courbe 4).

Dans l'expérience de contrôle, l'héparine est remplacée par de la solution tampon.

Summary. *In vitro* study of the influence of heparin on fibrinolysis. Heparin, in high concentration, inhibits plasminogen activation by streptokinase or urokinase. The presence of some plasmatic component is heretofore required. Heparin has no effect on the fibrinolytic activity of bovine plasmin or *Aspergillus* protease. Heparin does not promote fibrinolysis.

R. HOLEMANS, D. ADAMIS et J. F. HORACE

The Joseph Stanton Memorial Laboratories, St. Elizabeth's Hospital et Tufts University Medical School, Boston (Mass., U.S.A.), May 24, 1962.