

can be readily assessed by connecting each cell to a counter which is programmed to print total jumps at 15 min intervals.

In general, the antagonist-induced abstinence syndrome is followed over 1 h. The automated system is particularly advantageous when monitoring the gradual onset of withdrawal in mice after abrupt termination of drug treatment or in cases where the influence of neuro-humoral modulators are being investigated on the development of the syndrome.

Résumé. On décrit un dispositif simple et automatique enregistrant photoélectriquement le syndrome d'abstinence caractéristique, le 'stereotyped jumping', chez des lots de douze souris dépendant des opioïdes.

A. COWAN and P. COWAN

*Pharmaceutical Research Laboratories,
Pharmaceutical Division, Reckitt and Colman Ltd.,
Hull HU 8 7DS (England), 21 February 1972.*

Etude de l'agrégation plaquettaire par le Thrombofax®¹

On a décrit de nombreuses substances capables de déclencher l'agrégation des plaquettes dans des conditions expérimentales bien établies^{2,3}; toutefois, seulement peu d'entre elles sont employées couramment; il s'agit notamment de l'adénosine-5'-diphosphate (ADP), du collagène, de l'adrénaline et de la thrombine. Chacune de ces substances, cependant, présente quelques désavantages qui rendent parfois difficile l'interprétation des résultats: l'ADP est instable, même à de basses températures et provoque deux vagues distinctes d'agrégation seulement à des concentrations critiques, variables d'un sujet à l'autre⁴. Les méthodes de préparation du «collagène» varient tellement entre différents laboratoires que le même terme de «collagène» indique en réalité des substances très différentes les unes des autres et difficilement comparables entre elles⁵. L'adrénaline est disponible commercialement sous forme standardisée, mais elle est très instable, une fois que l'ampoule qui la contient a été ouverte; en outre la morphologie des agrégations par adrénaline est extrêmement variable d'un sujet à l'autre, aussi bien que chez le même sujet, de façon que seulement une évaluation qualitative (deuxième vague présente ou absente) peut être établie⁶. La thrombine est aussi disponible en commerce sous forme standardisée pour les testes d'agrégation; il faut en choisir une concentration telle qu'elle soit active sur les plaquettes mais pas sur la transformation du fibrinogène plasmatique en fibrine; il est cependant difficile d'éviter l'apparition (souvent précoce) de fibrine qui rend la lecture des résultats pratiquement impossible. Dans cette note préliminaire nous désirons présenter l'activité agrégante d'une thromboplastine partielle (Thrombofax, Ortho) qui nous a paru digne d'intérêt; en effet, pour l'étude de l'agrégation, il est possible d'utiliser ce réactif tel qu'il est disponible commercialement, sans aucune manipulation ultérieure de la part du biologiste; en outre, la stabilité du Thrombofax et la reproductibilité de son action agrégante, étudiées depuis 3 ans, ont été excellentes.

L'adjonction de 0.2 ml de Thrombofax (non dilué) à 0.8 ml de plasma humain, citraté, riche en plaquettes (PRP, 300.000 plaquettes/ μ l) dans l'agrégomètre de BORN⁷, sans effet sur la transmission initiale de la lumière, provoque une agrégation plaquettaire, si le système est sous agitation continue. Cette agrégation est toujours précédée d'une période de latence (Figure). Dans quelques PRP (environ 10%) l'agrégation par Thrombofax est constituée de 2 vagues distinctes (rappelant l'agrégation par adrénaline): une première vague petite et réversible suivie d'une deuxième beaucoup plus évidente et irréversible. Des courbes obtenues par enregistrement automatique des variations de transmission de la lumière, il est possible de calculer au moins 3 paramètres: la période de latence peut être mesurée en schématisant la courbe comme indiqué dans la Figure (droite a). La vitesse maxi-

male d'agrégation est mesurée comme indiqué par la droite b de la Figure; b exprime en unités, la variation maximale de la transmission extrapolée sur 1 min, le plasma pauvre en plaquettes ayant, par définition, une transmission de 100 unités et le PRP possédant en général une transmission variant entre 10 et 20 unités. L'amplitude maximale, exprimée en unités de transmission, est calculée (Figure, droite c) comme la différence entre la valeur initiale et la valeur finale de transmission; cette dernière est obtenue comme indiqué dans la Figure.

Les résultats acquis dans 50 sujets normaux sont regroupés dans le Tableau I. Ces testes ont été effectués avec un intervalle de 17 jours entre le premier et le dernier, en employant au total 7 échantillons différents de Thrombofax, provenant de 2 lots (2 J 89 et 1 J 88).

La reproductibilité de l'agrégation par Thrombofax a été étudiée au moyen des expériences rapportées dans les Tableaux II et III.

Du Tableau II on peut voir que l'erreur technique du test est variable pour les différents paramètres mesurés mais assez petit (de l'ordre de 5 à 10%).

Une fois ouvert le flacon, le Thrombofax garde son activité pratiquement inchangée pendant au moins 20 jours, si le réactif est soigneusement gardé entre 4° et 8°C.

Le Tableau III montre que la variabilité de la réponse au Thrombofax d'un même sujet, étudiée à différents intervalles, est minime et rentre dans les limites de l'erreur technique. L'ensemble de ces résultats indique que la reproductibilité de la méthode est excellente et que les

Tableau I. Moyennes et déviations standard (D.S.) de 3 paramètres de l'agrégation plaquettaire par Thrombofax étudiée sur 50 sujets normaux

| | Moyenne | D.S. | D.S. de la moyenne (%) |
|--|---------|------|------------------------|
| a) Période de latence (sec) | 65,3 | 24,6 | 37,7 |
| b) Vitesse maximale (unités de transmission/min) | 36,6 | 8,0 | 21,8 |
| c) Amplitude maximale (unités de transmission) | 44,9 | 7,1 | 15,8 |

¹ Recherches effectuées avec l'appui financier du Fonds voor Wetenschappelijk Geneeskundig Onderzoek, Brussel (contrat No. 1216).

² J. F. MUSTARD et M. A. PACKHAM, *Pharmac. Rev.* 22, 97 (1970).

³ G. DE GAETANO, J. VERMYLEN et M. VERSTRAETE, *Nouv. Rev. fr. Hémat.* 17, 339 (1971).

⁴ R. M. HARDISTY, R. A. HUTTON, D. MONTGOMERY, S. RICKARD et H. TREBILCOCK, *Br. J. Haemat.* 19, 307 (1970).

⁵ G. BAELE, P. VANDEN BOGAERT et F. BARBIER, *Acta med. scand., suppl.* 525, 131 (1971).

⁶ J. R. O'BRIEN, *Nature, Lond.* 202, 1188 (1964).

⁷ G. V. R. BORN, *Nature, Lond.* 194, 927 (1962).

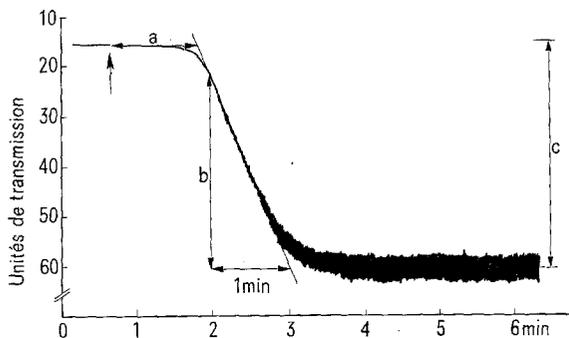
Tableau II. Paramètres de l'agrégation plaquettaire obtenue par 8 échantillons différents provenant de 2 lots de Thrombofax sur le même PRP

| Lot No. | Echantillon n | Période de latence (sec) | Vitesse maximale (unités de transmission/min) | Amplitude maximale (unités de transmission) |
|------------------------|------------------|-----------------------------|--|--|
| 2J89 | 1 | 66 | 36,5 | 42,0 |
| 2J89 | 1 | 66 | 35,0 | 43,5 |
| 2J89 | 1 | 60 | 30,0 | 44,0 |
| 2J89 | 1 | 64 | 35,0 | 44,0 |
| 2J89 | 1 | 60 | 29,0 | 44,0 |
| 2J89 | 2 | 64 | 37,0 | 42,0 |
| 2J89 | 3 | 56 | 35,0 | 38,5 |
| 2J89 | 4 | 69 | 41,0 | 43,0 |
| 2J89 | 5 | 60 | 37,0 | 45,0 |
| 2J88 | 6 | 64 | 35,0 | 40,5 |
| 2J88 | 7 | 50 | 40,0 | 46,0 |
| 2J88 | 8 | 59 | 36,5 | 42,0 |
| Moyenne | | 61,5 | 35,5 | 42,8 |
| D. S. ± | | 5,1 | 3,4 | 2,1 |
| D.S. de la moyenne (%) | | 8,2 | 9,5 | 4,9 |

L'intervalle entre un test et l'autre fut de 15 min.

différences observées sur 50 sujets normaux (surtout au niveau de la période de latence) sont essentiellement dues à la variabilité individuelle.

Une agrégation irréversible a été observée chez tous les 50 sujets normaux étudiés par le Thrombofax, mais seulement chez 43 et 41 sujets respectivement quand l'ADP ($2 \times 10^{-6}M$, concentration finale) et l'adrénaline (5 µg/ml, concentration finale) ont été employés. Les plaquettes de quelques patients atteints de déficit en facteur V, VII ou VIII ont réagi normalement au Thrombofax, tandis que les plaquettes de 2 patients avec afibrinogénémie congénitale ont été refractaires à l'action du Thrombofax (ainsi qu'à celle d'autres agents agrégants)⁸. L'agrégation plaquettaire a été aussi fortement réduite sans le plasma de sujets ayant reçu des médicaments anti-inflammatoires^{9, 10}.



Agrégation plaquettaire par Thrombofax. Paramètres étudiés: droite a, période de latence; droite b, vitesse maximale; droite c, amplitude maximale.

Tableau III. Paramètres de l'agrégation plaquettaire obtenue par le même échantillon de Thrombofax (lot 1J88) sur le PRP du même sujet testé en 3 jours différents

| Jour | Période de latence (sec) | Vitesse maximale (unités de transmission/min) | Amplitude maximale (unités de transmission) |
|------|-----------------------------|--|--|
| 1 | 88 | 31,5 | 36,0 |
| 3 | 92 | 30,0 | 36,0 |
| 6 | 82 | 33,0 | 37,0 |

Le mécanisme d'action de l'agrégation plaquettaire par Thrombofax sera discuté en détail ailleurs¹¹. L'observation que la première vague n'est modifiée par aucun inhibiteur de l'agrégation plaquettaire, tandis que un nombre d'inhibiteurs (adénosine, EDTA, acide acétylsalicylique, indométhacine, le système enzymatique pyruvate kinase-phosphoenolpyruvate et les inhibiteurs de la glycolyse et de la phosphorylation oxydative) inhibent la deuxième vague, suggère que celle-ci est dépendante de la libération d'ADP endoplaquettaire, tandis que la première est due à un effet direct du Thrombofax sur la surface plaquettaire. L'étude de la libération de ¹⁴C-serotonine et du «facteur plaquettaire 4» par le Thrombofax indique que ce réactif provoque une véritable «release reaction»^{11, 12}.

Les expériences référées dans cette note ont été effectuées à 37 °C; à température de la chambre, la période de latence a été plus prolongée et l'agrégation plus faible; à 4 °C aucune agrégation n'a été enregistrée, ni des agrégats ont été observés en microscopie de phase.

En considérant les lacunes des différents agents agrégants mentionnés dans l'introduction, la possibilité d'utiliser un réactif standardisé, reproductible, de grande diffusion et ne nécessitant pas de manipulations préparatives, nous semble très avantageuse dans l'étude de l'hémostase.

Summary. Thrombofax Ortho is a stable, reproducible, ready-to-use reagent for the evaluation of the platelet release reaction.

G. DE GAETANO¹³, ANNIE VANDENBUSSCHE et J. VERMYLEN

Laboratoire de Coagulation et Département de Médecine Interne, Academisch Ziekenhuis St. Rafaël de l'Université, Kapucijnenvoer 35, B-3000 Leuven (Belgique), 29 mars 1972.

⁸ J. VERMYLEN, M. B. DONATI et G. DE GAETANO, *Acta med. scand.*, suppl. 525, 19 (1971).

⁹ G. DE GAETANO, M. B. DONATI et J. VERMYLEN, *Int. J. clin. Pharmac.* 5, 196 (1971).

¹⁰ G. DE GAETANO, M. CASTEELS-VAN DAELE, J. H. CLAES et R. ECKELS, *Helv. paediat. Acta* 26, 423 (1971).

¹¹ G. DE GAETANO, J. VERMYLEN et M. VERSTRAETE, en préparation.

¹² M. B. DONATI, M. PALESTER-CHLEBOWCZYK, G. DE GAETANO et J. VERMYLEN, in *Methods in Atherosclerosis Research: Hyperlipoproteinemias and Platelet Function in Thrombosis* (Ed. P. M. MANNUCCI, Plenum Press Publishing Corporation, New York 1972), sous presse.

¹³ Boursier de la Katholieke Universiteit Leuven, 1972.