

# JPC

Journal des

# Plaies et Cicatrisations

## Effets de deux pansements sur les fonctions des plaquettes humaines

I. Elalamy, C. Lecrubier

# JPC

Journal des

# Plaies et Cicatrisations

#### REVUE GENERALE

Soins et surveillance des oborés digestifs  
pour l'alimentation entérale chez l'adulte en hospitalisation et à domicile  
RECOMMANDATIONS PROFESSIONNELLES POUR LES PRATIQUES DE SOINS - ANAES

#### ACTUALITES

La plaie domestique par l'eau  
J.P. CAMBIERE

Risque infectieux dans le pied diabétique,  
évaluation et traitement  
I. GOI

Effets de deux pansements sur les fonctions  
des plaquettes humaines  
I. ELALAMY, C. LECRUBIER

#### QUESTION DU MOIS

Quelle est la conduite à tenir devant un Bricker  
(urétérostomie cutanée transistomiale) plat et rétracté ?

N° 24

**GUIDE COMPLET  
de la 3<sup>e</sup> Conférence  
Nationale des Plaies  
et Cicatrisations  
14-15-16 Janvier 2001  
Salon des Congrès - Porte Maillot - PARIS**



Journal des Plaies et Cicatrisations - Thématique N° 24 - Septembre 2000 - 10000 F - 1017

Journal de la Société Française et Francophone des Plaies et Cicatrisations

## ACTUALITES

# EVALUATION THERAPEUTIQUE

### EFFETS DE DEUX PANSEMENTS SUR LES FONCTIONS DES PLAQUETTES HUMAINES

I. ELALAMY, C. LECRUBIER.

Service d'Hématologie Biologique. Hôtel-Dieu - 1 Place du Parvis Notre-Dame 75181 Paris

## Introduction

Le processus d'hémostase responsable de l'arrêt d'un saignement provoqué ou spontané est un phénomène complexe impliquant des acteurs cellulaires et plasmiques (1). Les plaquettes, véritable clé de voûte de l'hémostase primaire, assurent la formation d'un thrombus blanc colmatant la brèche vasculaire (1). Leur intégrité fonctionnelle et leur activation secondaire à divers stimuli sont les conditions indispensables à la réalisation du clou plaquettaire, support de la coagulation plasmatisque proprement dite (1). Reconnus depuis plus d'un demi-siècle pour leurs propriétés hémostatiques, les alginates, polysaccharides naturels extraits d'algues brunes issues des mers d'Europe du nord, sont largement utilisés en chirurgie potentiellement hémorragique, en thérapie locale des pertes de substances exsudatives, aiguës ou chroniques, au saignement facile ou dans le traitement des sites donneurs de greffe (2,3,9).

Ces propriétés sont effectivement rapportées en clinique mais leur mécanisme reste encore mal connu. Leur potentiel hémostatique serait essentiellement secondaire à des échanges sodium-calcium entre la plaie et le pansement entraînant une véritable gélification des fibres d'alginate. Il a alors été suggéré que ces échanges ioniques étaient responsables d'une activation plaquettaire et même de celle de certains facteurs de la coagulation plasmatisque (4,5). Les données de la littérature restent en fait limitées sur l'influence réelle des alginates sur l'hémostase

primaire (6,7). Il s'agit essentiellement de données historiques d'expérimentations in vitro ou ex vivo avec une évaluation indirecte de la réponse cellulaire ou plasmatisque (8,9).

Nous avons étudié, par méthode agrégométrique, les effets in vitro de deux pansements contenant de l'alginate seul ou associé à de la carboxyméthylcellulose (CMC) sur la réponse fonctionnelle de plaquettes humaines normales. Le but de cette étude préliminaire est de déterminer leur capacité proagrégeante éventuelle.

## Matériel et protocole expérimental

### • MATERIEL

- Deux pansements sont ainsi étudiés : Algostéri® (compresses d'alginate de calcium 100%, Laboratoires BROTHIER, Nanterre, France) et Urgosorb® (composé d'alginate de calcium et carboxyméthyl-cellulose, Laboratoires URGO, Dijon, France).

Pour ces pansements, qui se présentent sous forme solide en fibres, la concentration finale effective au lieu d'application ne peut être précisée. Ils sont donc utilisés à une concentration finale de 10 mg/ml compatible avec les performances de détection de la cellule photoélectrique de l'agrégomètre. La cellule photoélectrique doit pouvoir enregistrer les variations de transmission lumineuse

(TL) du milieu réactionnel à partir d'une turbidité maximale (TL = 0) jusqu'à un éclaircissement complet du milieu dans la cuve (TL = 100%).

- Les plaquettes témoin proviennent du sang citraté (1v/9v) de 3 sujets sains exempts de toute médication pouvant interférer avec l'intégrité des fonctions plaquettaires. Le plasma riche en plaquettes (PRP) est obtenu après centrifugation à 150 G, et ajusté entre 250 000 et 300 000 plaquettes/ $\mu$ l. Le plasma déplaqueté (PDP) est obtenu après une nouvelle centrifugation à 1500 G du culot globulaire restant. Pour une étude comparative rigoureuse des produits entre eux, un même témoin a été utilisé pour les tester simultanément.

- L'agrégomètre utilisé est un automate informatisé à 4 voies. (Régulest, ZI Sainte Agathe, 57192 FLORANGE).

### • PROTOCOLE EXPERIMENTAL

Dans une cuve d'agrégomètre sont introduits 3 mg de produit à étudier puis 300  $\mu$ l de PRP auquel de l'hirudine (5 mg/ml) a été ajoutée afin d'inhiber la coagulation du milieu. La réaction s'effectue dans l'agrégomètre à 37°C sous agitation à 1100 tours/min. L'enregistrement est réalisé sur 10 à 25 minutes. La survenue de la coagulation entraîne une opacification du milieu qui perturbe l'interprétation des résultats d'agréga-tion plaquettaire. Il est donc indispensable d'anticiper les PRP et PDP en ajoutant de l'hirudine afin d'inhiber la coagulation

du milieu et de pouvoir analyser isolément le comportement des plaquettes.

Ce test est réalisé comparativement à la mixture de 3 mg de produit à étudier dans 300 µl de PDP contenant aussi de l'hirudine. Cet essai témoin permet de visualiser la dissolution éventuelle du produit et l'éclaircissement qui en résulte devra être pris en compte comme référence dans l'interprétation de la réaction obtenue en PRP.

Le profil d'agrégation est observé sur une durée maximale de 25 minutes. Les réactions d'activation plaquettaire se traduisent par des courbes dont le paramètre relevé est la variation de transmission lumineuse (TL) exprimée en %. L'allure des courbes est évocatrice des phénomènes se déroulant dans la cuve : survenue ou non de l'agrégation plaquettaire dans le PRP, dissolution éventuelle du produit dans le PDP autologue, survenue ou non de la coagulation dans les deux milieux.

Les numérations plaquettaires ont été réalisées sur le compteur automatique de cellules STKD (Beckman Coulter ; 95580 Mergency).

## Résultats

### 1) - DISSOLUTION DES PRODUITS AU CONTACT DU PLASMA

Elle est visualisée dans la cuve d'agrégomètre par l'éclaircissement rapide du plasma contenant le pansement étudié.

Elle est étudiée dans le PDP, milieu limpide, et nous avons noté que la turbidité de la mixture "produit + PDP" (TL = 0%) disparaît dès la première minute (TL > 80%) (figure 1, A). Après ce phénomène, il est alors établi une nouvelle ligne de base autorisant l'étude de la variation de la TL liée à l'agrégation plaquettaire proprement dite en PRP.

### 2) - EFFETS DES PRODUITS SUR LA COAGULATION

Nous avons observé macroscopiquement la capacité de ces produits à provoquer la génération d'un coagulum (réseau de fibrine) traduisant la formation de thrombine par activation de la coagulation plasmatique. A la concentration finale de 10 mg/ml, ces deux produits entraînent une coagulation 3 à 5 minutes après leur contact avec le plasma (PRP ou PDP) dans la cuve d'agrégomètre. En PRP uniquement citraté, l'activité pro-

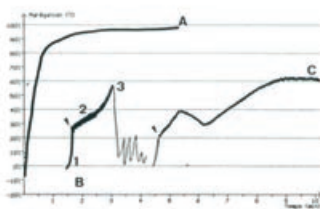


Figure 1. Types de courbes obtenus en agrégométrie après l'effet des pansements hémostatiques sur du plasma riche en plaquettes.

- A : dans le PDP rendu incoagulable par l'hirudine, dissolution d'alginate de calcium.
- B : en l'absence d'hirudine, après dissolution des fibres (1), l'agrégation plaquettaire (2) est suivie par la coagulation (3) ; profil observé en présence d'alginate seul ou associé au CMC → : nouvelle ligne de base.
- C : en présence d'hirudine, après dissolution des fibres, cinétique de l'agrégation plaquettaire : profil observé en présence d'alginate seul ou associé au CMC

coagulante des plaquettes peut accélérer aussi le processus; le phénomène se traduit par une opacification rapide, en 20 à 60 secondes, qui fait chuter la TL, interfère avec une éventuelle réaction d'agrégation en cours et aboutit à une coagulation bien individualisée (figure 1, courbe B).

L'hirudine (5 µg/ml), antithrombine directe et puissante, prévient ce phénomène et la coagulation de la suspension plaquettaire est alors abolie.

### 3) - EFFETS DES PRODUITS SUR L'AGRÉGATION

L'agrégation est étudiée en PRP en présence de chaque pansement, et visualisée dans la cuve d'agrégomètre par l'éclaircissement progressif du milieu, après que la dissolution plasmatique ait eu lieu (figure 1, courbe C).

Cinétique d'une réaction : initialement, la turbidité de la mixture "produit + PRP" montre une TL = 0% puis la TL augmente immédiatement en raison de la dissolution du produit, ce qui "cale" la nouvelle ligne de base à une TL = 25±5% ; puis cette TL va augmenter progressivement avec une cinétique évoquant la formation d'agrégats dans le PRP (figure 1, courbe C).

Le tableau I expose les variations de TL des produits étudiés.

### Tableau I. Agrégation plaquettaire induite par les pansements

(exprimée en variations de TL en %) sur 3 lots de plaquettes de sujets témoins.

Produit	Témoin 1	Témoin 2	Témoin 3
Alginate	40	25	12
Alginate-CMC	50	15	28

### 4) - ESSAIS COMPLÉMENTAIRES PAR NUMÉRATIONS DES PLAQUETTES

Les tests ont été effectués sur le PRP d'un autre témoin activé par l'alginate de calcium et l'alginate de calcium-CMC, en raison de leur effet constaté sur les plaquettes des 3 témoins précédents. Il a été possible de mettre en évidence l'agrégation survenue à 2 différents temps de réactions en effectuant des numérations plaquettaires de la suspension contenue dans les cuves à la 1ère min.30 s et à la 10ème minute, les TL étant respectivement 15 % et 35 % (TL maximale de fin de courbe). Seules les plaquettes libres (non impliquées dans le processus d'agrégation) sont comptées. L'intensité de la réaction est évaluée en pourcentage de plaquettes agrégées par rapport à la numération initiale.

Temps	alginate de calcium		alginate de calcium-CMC	
	Num. u/l	% plaqu. agrégées	Num. plaqu.	% agrégées
0	268 000	0	268 000	0
1 min.30	183 000	32	192 000	29
10 min.	23 000	92	20 000	93

## Discussion et conclusion

Les résultats de cette étude *in vitro* montrent que les produits, alginate de calcium et alginate de calcium-CMC, sont capables d'induire directement une activation plaquettaire. Ils ont, par ailleurs, un effet superposable sur la réponse fonctionnelle des plaquettes humaines normales, explorée par deux méthodes différentes. La génération de fibrine observée lors de la dissolution des fibres dans le plasma citraté et liée aux échanges ioniques calcium-sodium est inhibée par l'hirudine, un puissant anticoagu-

lant. Le contrôle de cette coagulation plasmatique, probablement en raison d'une libération importante de calcium et qui échappe *in vitro* à la simple chélation par le citrate, permet ainsi d'étudier l'impact potentiel de ces produits sur l'hémostase primaire proprement dite.

Ainsi, une étude par thromboélastographie en sang total réalisée par une équipe anglaise avait démontré *in vitro* la capacité hémostatique des alginates (8). Le raccourcissement significatif du temps de formation du caillot était certainement lié à plusieurs mécanismes intriqués. L'activation plaquettaire soulignée par les auteurs pouvait être certes due à l'activation plaquettaire directe par l'alginate mais aussi être la conséquence de la génération de thrombine *via* l'activation de la cascade de la coagulation plasmatique. Cette capacité procoagulante des alginates en sang total citraté avec la provocation d'une génération accrue de thrombine a d'ailleurs été confirmée par d'autres travaux cliniques et biologiques (8,9).

Une autre étude anglaise plus récente, réalisée également en sang total, a montré un retentissement significatif des alginates sur la réponse fonctionnelle plaquettaire humaine *in vitro* (10). Nous avons choisi d'analyser les effets de ces produits en plasma riche en plaquettes afin de mieux individualiser la part plaquettaire de leur action *in vitro*. En effet, en sang total, par leur présence les hématies constituent un obstacle plus ou moins important gênant le dépôt plaquettaire sur l'électrode d'enregistrement. En raison de cet artefact, l'évaluation de la participation plaquettaire effective dans ce phénomène est sous-estimée. D'ailleurs, les auteurs de cette étude *in vitro* relatent un temps de latence supé-

rieur à 5 minutes avant d'observer une variation d'impédance évocatrice d'une réponse plaquettaire en sang total citraté et hépariné (10). Nous avons, en revanche, noté une variation de turbidité du milieu dès 90 secondes objectivant le potentiel activateur plaquettaire de ces produits aboutissant à un effet maximal en une dizaine de minutes. Ceci est d'ailleurs bien confirmé par la modification de la proportion de plaquettes restées libres évaluée par numérations successives.

Dans cette étude préliminaire, nous avons démontré que, lors du contact plaquettes-alginate de calcium, ce dernier se comporte comme un authentique activateur cellulaire, aboutissant à la formation d'agrégats contribuant certainement à optimiser l'hémostase primaire locale au niveau d'une plaie. La stimulation des fonctions plaquettaires déclenchée par l'alginate de calcium-CMC apparaît dans cette étude comme équivalente à celle provoquée par l'alginate de calcium seul. Il faut toutefois noter la variabilité inter-individuelle des réponses plaquettaires observées.

Ces résultats nécessitent une confirmation par une étude complémentaire, les mécanismes responsables de cette activation plaquettaire restant par ailleurs à élucider (récepteurs, voies de signalisations, modifications du cytosquelette...).

Il serait enfin intéressant de connaître le comportement plaquettaire local en présence de ces pansements en cas de prise de médicaments antiagrégants (aspirine) ou d'anti-inflammatoires altérant classiquement la réponse fonctionnelle des plaquettes et perturbant ainsi l'hémostase primaire systémique.

## RÉFÉRENCES

- (1) Elalamy I, Lecrubier C, MM Samama. Physiologie de l'hémostase. *EMC Angiologie*, 2000, sous presse.
- (2) Piacquadro D, Nelson DB. Alginates a new dressing alternative. *J Dermatol Surg Oncol*, 1992, 18,990-995
- (3) Barrois B, Granjot-Vieillard F, Maignault P et al. *Alginates et escarres. Les escarres*, Masson 1998,213-218.
- (4) Blair SD, Jarvis P, Salmon M et al. Clinical trials of calcium alginate haemostatic swabs. *Br J Surg*, 1990, 77, 568-570.
- (5) Blaine G. A comparative evaluation of absorbable haemostatics. *Postgrad Med J*, 1951, 5, 613-620
- (6) Blane G Experimental observations on absorbable alginate products in surgery. *Ann Surg* 1947, 125, 102-114.
- (7) Meaume S, Perez J. Les alginates. *J Plaies Cicatrisation*, 1999, 16, 24-29
- (8) Jarvis PM, Galvin AJ, Blair SD et al. How does alginate achieve haemostasis in surgery. *Thromb Haemost*, 1987, 58, 108.
- (9) Groves AR, Lawrence JC. Alginate dressing as a donor site haemostat. *Ann R Coll Surg Engl*, 1986, 68, 27-28.
- (10) Segal HC, Hunt BJ. The effects of alginate and non-alginate wound dressings on blood coagulation and platelet activation. *J Biomat Appl*, 1998, 12, 249-257.