

L'IMAGE DU MOIS

Le processus thrombotique sous la loupe (microscopie intravitale)

C. OURY (1), A. HEGO (2), P. LANCELLOTTI (3)

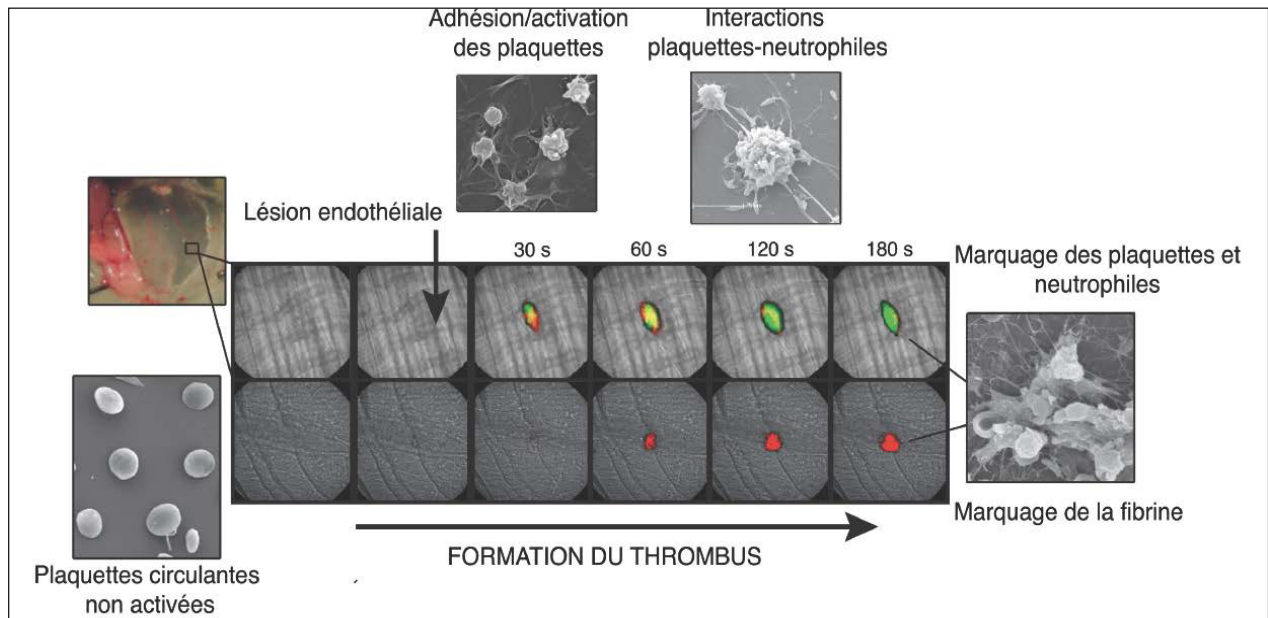


Figure 1. Exemple d'image de formation du thrombus dans les artérioles du crémaster murin obtenue par microscopie intravitale. Les plaquettes, les neutrophiles et la fibrine sont marqués spécifiquement suite à l'injection intraveineuse d'anticorps fluorescents. Les images de microscopie électronique à balayage comparent la morphologie de plaquettes circulantes au repos à celle de plaquettes activées adhérentes sur l'endothélium lésé. L'interaction plaquette-neutrophile est aussi illustrée, de même que le thrombus consolidé par le réseau de fibrine.

INTRODUCTION

L'hémostase est le processus qui permet de préserver l'intégrité des vaisseaux sanguins après une lésion vasculaire. Cette lésion et l'ex-travasation sanguine qui en résulte induisent des événements rapides dans la paroi des vaisseaux et dans le sang qui aboutissent à l'arrêt du saignement. Les plaquettes circulantes sont recrutées et activées au site de lésion, où elles deviennent un composant majeur du thrombus en formation; la coagulation, initiée par le facteur tissulaire, conduit à la génération de thrombine et de fibrine. Dans les conditions normales, des mécanismes régulateurs contiennent la formation du thrombus dans le temps et dans l'espace (1, 2). Lorsque des processus patholo-

giques surpassent ces mécanismes de l'hémostase, des quantités excessives de thrombine sont formées, initiant le processus de thrombose. La thrombose artérielle est à l'origine d'événements cardiovasculaires majeurs tels que l'infarctus du myocarde et les accidents vasculaires cérébraux, causes d'un taux élevé de morbidité et de mortalité dans les pays industrialisés.

Les plaquettes représentent une cible pharmacologique privilégiée, à la fois pour la prévention et le traitement des thromboses (3-5). Des études cliniques à large échelle ont démontré les effets bénéfiques, d'abord de l'acide acétylsalicylique (aspirine), puis des thiénopyridines (clopidogrel et prasugrel), du ticagrélor et du cangrélor, ciblant le récepteur plaquettaire P2Y12 (6-10). Les antagonistes de P2Y12, le plus souvent combinés à l'aspirine, représentent les médicaments antiplaquettes les plus utilisés actuellement. Malgré leur bénéfice incontestable, ces médicaments ont pour principal inconvénient d'entraîner des saignements, ce qui limite considérablement leur utilisation. De plus, d'autres limitations sont progressivement apparues, exprimées, en pharmacologie,

(1) Maître de recherche FRS-FNRS, Université de Liège, GIGA-Sciences Cardiovasculaires.

(2) Université de Liège, GIGA-Sciences Cardiovasculaires.

(3) Professeur d'Imagerie Fonctionnelle en Echocardiographie, GIGA-Sciences Cardiovasculaires, Clinique des Valvulopathies, Université de Liège, Responsable du Service des Soins Intensifs Cardiologiques, Service de Cardiologie, CHU de Liège.

par le vocable «résistance» et, en clinique, par la survenue de complications thrombotiques (11). Les médicaments antiplaquettaires ne préviennent actuellement que 25 % des événements cardiovasculaires.

Une meilleure compréhension des mécanismes moléculaires de l'activation des plaquettes est donc essentielle pour identifier de nouvelles cibles thérapeutiques, développer de nouveaux agents antiplaquettaires plus efficaces et améliorer la prévention et le traitement des maladies thrombotiques. Ainsi, le marché des médicaments antiplaquettaires est actuellement l'un des plus dynamiques, et l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS) estime qu'il atteindra plus de 11 milliards d'euros à l'horizon 2020.

L'évaluation des propriétés anti-thrombotiques de nouvelles molécules dépend de la mise à disposition de modèles précliniques animaux représentatifs des événements thrombotiques humains. A ce titre, la vidéo microscopie intravitale représente un outil très intéressant puisqu'elle permet de visualiser, en temps réel, la formation des thrombi dans les vaisseaux et la microcirculation de l'animal vivant anesthésié (12, 13).

MODÈLE PRÉCLINIQUE DE THROMBOSE : MICROSCOPIE INTRAVITALE

Le système est composé d'un microscope à fluorescence motorisé, une caméra EMCCD («Electron Multiplying Charge Coupled Device») alliant haute résolution, bruit de fond minimal et vitesse d'acquisition d'image maximale (acquisition de 30 images par seconde), idéale pour l'imagerie dynamique du vivant, un amplificateur de signal, et un micromanipulateur permettant des mouvements de 60 nm, le tout contrôlé par un logiciel performant (Slidebook 6.0.6, 3i). Ce système comprend également un laser (532 nm) produisant des impulsions courtes (environ 5 nsec) de haute énergie (70 mJ à 100 Hz) au travers de l'objectif du microscope sur une surface d'environ 1 µm. L'utilisation de ce laser crée une lésion très localisée de la paroi des microvaisseaux, provoquant ainsi la formation d'un caillot riche en plaquettes et fibrine endéans deux minutes (Fig. 1).

La morphologie des vaisseaux est visualisée en lumière blanche, tandis que les cellules et molécules d'intérêt sont marquées de manière différentielle à l'aide de molécules fluores-

centes. Ainsi, l'injection intraveineuse d'anticorps couplés à un fluorophore avant la création de la lésion endothéliale permet de visualiser, en temps réel, les mouvements et interactions cellulaires ainsi que la génération locale de fibrine au cours de la formation du thrombus.

APPLICATION : MÉCANISMES DE THROMBO-INFLAMMATION

Plusieurs études démontrent l'existence d'un lien étroit entre les affections cardiovasculaires et un état inflammatoire. Il apparaît évident que l'inflammation favorise la survenue d'événements thrombotiques. De façon intéressante, la microscopie intravitale a révélé que les neutrophiles, cellules clé du système immunitaire inné, joueraient un rôle essentiel pour initier la formation des thrombi et activer la coagulation aux sites d'inflammation (14). Grâce à l'utilisation de souris chez qui le gène codant pour le récepteur P2X1 a été invalidé, notre équipe a montré que le récepteur P2X1 présent sur les plaquettes et les neutrophiles occupe une position centrale dans ce processus (15). Le récepteur P2X1 représente, dès lors, une cible d'intérêt pour une approche anti-thrombotique innovante dont le mode d'action serait à la fois anti-agrégant et anti-inflammatoire.

ET AU DELÀ...

L'utilité de la microscopie intravitale s'applique à d'autres domaines, tels que l'inflammation, l'immunité et la cancérologie. Elle permet l'analyse des processus de recrutement (roulement, adhésion et transmigration) des leucocytes sur les endothélia des microvaisseaux lors d'une réponse inflammatoire, l'analyse de l'adhésion de bactéries sur les parois vasculaires, ainsi que l'analyse du routage des lymphocytes vers les ganglions lymphatiques. Enfin, en cancérologie, cette technologie permet d'imager, au niveau cellulaire et moléculaire, le microenvironnement tumoral et, ainsi, d'améliorer nos connaissances à propos des mécanismes associés à la progression des cancers.

BIBLIOGRAPHIE

1. Furie B, Furie BC.— Mechanisms of thrombus formation. *N Engl J Med*, 2008, **359**, 938-949.
2. Versteeg HH, Heemskerk JW, Levi M, et al.— New fundamentals in hemostasis. *Physiol Rev*, 2013, **93**, 327-358.

3. Gachet C.— P2 receptors, platelet function and pharmacological implications. *Thromb Haemost*, 2008, **99**, 466-472.
4. Mackman N.— Triggers, targets and treatments for thrombosis. *Nature*, 2008, **451**, 914-918.
5. Kleinschnitz C, Pozgajova M, Pham M, et al.— Targeting platelets in acute experimental stroke: impact of glycoprotein Ib, VI, and IIb/IIIa blockade on infarct size, functional outcome, and intracranial bleeding. *Circulation*, 2007, **115**, 2323-2330.
6. Raju NC, Eikelboom JW, Hirsh J.— Platelet ADP-receptor antagonists for cardiovascular disease : past, present and future. *Nat Clin Pract Cardiovasc Med*, 2008, **5**, 766-780.
7. Wallentin L, Becker RC, Budaj A, et al.— Ticagrelor versus clopidogrel in patients with acute coronary syndromes. *N Engl J Med*, 2009, **361**, 1045-1057.
8. Singh S, Singh M, Grewal N, et al.— Comparative efficacy and safety of Prasugrel, Ticagrelor, and standard-dose and high-dose Clopidogrel in patients undergoing percutaneous coronary intervention : a network meta-analysis. *Am J Ther*, 2015, **66** (15_S) doi:10.1016/j.jacc.2015.08.222.
9. Andell P, James SK, Cannon CP, et al.— Ticagrelor versus Clopidogrel in patients with acute coronary syndromes and chronic obstructive pulmonary disease : an analysis from the platelet inhibition and patient outcomes (PLATO) trial. *J Am Heart Assoc*, 2015, **4**, pii: e002490. doi: 10.1161/JAHA.115.002490
10. Gutierrez JA, Harrington RA, Blankenship JC, et al.— The effect of cangrelor and access site on ischaemic and bleeding events : insights from CHAMPION PHOENIX. *Eur Heart J*, 2015, doi:10.1093/eurheartj/ehv498
11. Franchi F, Angiolillo DJ.— Novel antiplatelet agents in acute coronary syndrome. *Nat Rev Cardiol*, 2015, **12**, 30-47.
12. Taqueti VR, Jaffer FA.— High-resolution molecular imaging via intravital microscopy : illuminating vascular biology *in vivo*. *Integr Biol (Camb)*, 2013, **5**, 278-290.
13. Stalker TJ, Welsh JD, Brass LF.— Shaping the platelet response to vascular injury. *Curr Opin Hematol*, 2014, **21**, 410-417.
14. Darbousset R, Thomas GM, Mezouar S, et al.— Tissue factor-positive neutrophils bind to injured endothelial wall and initiate thrombus formation. *Blood*, 2012, **120**, 2133-2143.
15. Darbousset R, Delierneux C, Mezouar S, et al.— P2X1 expressed on polymorphonuclear neutrophils and platelets is required for thrombosis in mice. *Blood*, 2014, **124**, 2575-2585.

Les demandes de tirés à part doivent être adressées au Prof P. Lancellotti, Université de Liège, Service de Cardiologie, CHU Sart Tilman, 4000 Liège. Email : plancellotti@chu.ulg.ac.be