

La 3D pour mieux comprendre l'agrégation plaquettaire

| par Jean-Paul VANKEERBERGHEN, journaliste scientifique

La microscopie holographique digitale permet d'obtenir une description précise des mécanismes d'adhérence et d'agrégation plaquettaires. Un projet de recherche fondamentale riche de nombreuses potentialités pour la santé publique.

Un microscope holographique pour analyser les mécanismes de l'agrégation plaquettaire dans le système sanguin. Tel est l'instrument mis au point pour soutenir le projet dans lequel se sont lancées, il y a quelques années déjà, les équipes du Pr Karim Zouaoui Boudjeltia, directeur du Laboratoire de médecine expérimentale (Unité ULB 222), au sein de la Faculté de médecine de l'ULB, installée au CHU de Charleroi, hôpital André Vésale, et du Pr Frank Dubois, directeur du Microgravity Research Center (MRC), de la Faculté polytechnique de l'ULB.

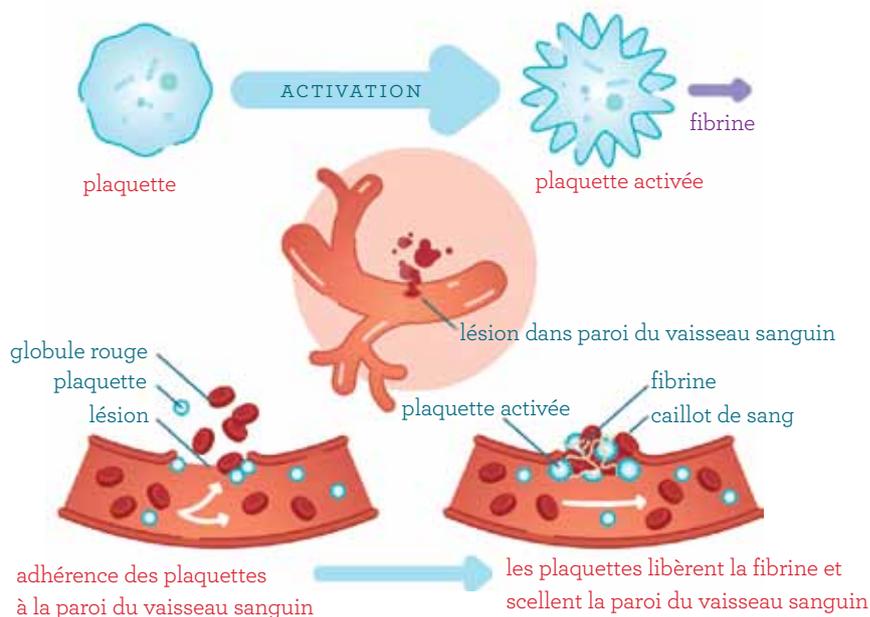
« Notre point de départ, explique Karim Zouaoui Boudjeltia, fut le constat que les tests biologiques classiques ne peuvent intégrer la réalité biologique qui détermine les mécanismes d'agrégation plaquettaire, lesquels interviennent dans un contexte de flux sanguin. Il nous fallait donc trouver le moyen d'étudier les processus d'adhérence et d'agrégation des plaquettes sur les cellules endothéliales dans des conditions de flux. Nos premiers travaux nous ont permis de démontrer

que les formes agrégées peuvent être mesurées avec précision en trois dimensions grâce à la microscopie holographique digitale. Nous avons ensuite pu fournir une description physique de l'adhérence et de l'agrégation des plaquettes et extraire des données pertinentes sur leurs conditions d'adhérence et d'agrégation, sans cellules endothéliales dans un premier temps. Actuellement, nous sommes dans une phase d'analyse et de traitement des mesures et résultats obtenus, notamment en fonction des pathologies. Notre but est de mieux appréhender la fonction plaquettaire chez les patients et l'efficacité des traitements antiagrégants. »

Au centre de la coagulation

Les plaquettes (ou thrombocytes) sont des petits fragments de cellules qui jouent un rôle fondamental dans la coagulation sanguine. Quand un vaisseau sanguin subit une lésion et qu'un saignement débute, des plaquettes adhèrent à l'endroit de la lésion, mais aussi en partie sur les cellules endothéliales avoisinantes de la paroi interne du vaisseau, et s'agrègent, se fixent les unes aux

LES PLAQUETTES SANGUINES
(ou thrombocytes)



Les plaquettes jouent un rôle important dans la physiologie de la coagulation sanguine comme dans le mécanisme de formation d'un thrombus, cause d'embolie pulmonaire ou d'accident vasculaire cérébral.

autres pour former un bouchon. Les facteurs de coagulation du plasma, de manière concomitante, forment un réseau de brins de fibrine qui assurent la stabilité du caillot.

Les mécanismes d'agrégation plaquettaire interviennent aussi dans des situations pathologiques, en particulier dans la formation d'un thrombus (caillot) dans un vaisseau sanguin, avec pour conséquence une occlusion du vaisseau (thrombose veineuse ou ischémie artérielle, voire infarctus). Si ce thrombus se détache, il peut migrer vers d'autres organes et provoquer une embolie, notamment une embolie pulmonaire ou un accident vasculaire cérébral.

Les plaquettes jouent donc un rôle important, aussi bien dans la physiologie de la coagulation sanguine que dans des situations pathologiques.

Les plaquettes forment un bouchon par un mécanisme progressif. Tout d'abord, des plaquettes en circulation sont recrutées sur le site de la lésion. L'adhérence des plaquettes à la surface endothéliale peut, dans certaines circonstances, déclencher le recrutement et l'agrégation de nouvelles plaquettes. Quand

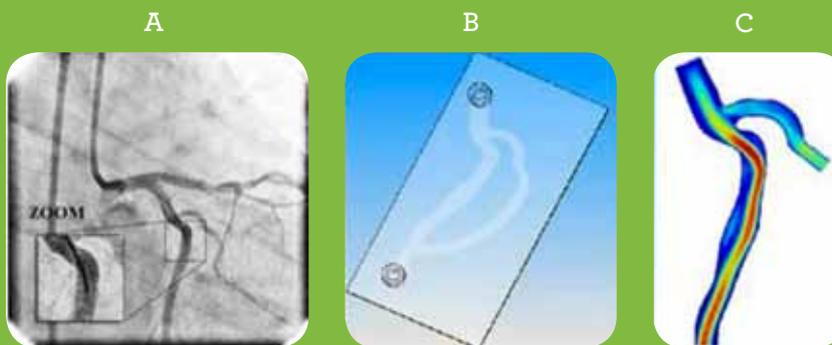
elles adhèrent, les récepteurs à leur surface sont activés. Grâce à ces récepteurs, les plaquettes s'agrègent en interaction avec des facteurs tels que le fibrinogène ou le facteur de Von Willebrand.

L'activation déclenche des modifications morphologiques des plaquettes. Après adhérence, elles perdent leur forme ronde et s'aplatissent sur la surface ; elles émettent également, dans certaines conditions, des filaments (filopodes) qui s'entremêlent et enserrant l'agrégat plaquettaire.

Processus plus complexe que prévu

« Depuis plus de quatre décennies, les facteurs induisant l'agrégation plaquettaire semblaient connus ; un modèle unifié simple d'agrégation plaquettaire avait été élaboré, note Karim Zouaoui Boudjeltia. Cependant, les dernières avancées techniques, permettant l'analyse en dynamique de l'agrégation plaquettaire in vitro et chez l'animal, ont montré des processus beaucoup plus complexes que prévu. En particulier, les mécanismes par lesquels les conditions hémodynamiques mènent à l'adhérence et à l'agrégation des plaquettes étaient encore mal compris. »

A: angiographie coronarienne réalisée chez un patient
 B: reproduction in-vitro d'une bifurcation coronarienne
 C: simulation numérique des flux



L'objectif est d'étudier le comportement des plaquettes en conditions dynamiques pour être le plus proche possible des morphologies des patients.

La microscopie classique rencontre là des limitations techniques : sa profondeur de champ est limitée et elle éprouve des difficultés à mesurer des objets transparents tels que les plaquettes.

La microscopie holographique digitale (MHD), technologie adoptée par Karim Zouaoui Boudjeltia et Frank Dubois dans ce projet, permet de surmonter ces obstacles. « L'holographie crée une interférence par la structure même du microscope. Quand on met un échantillon dans l'interféromètre, l'objet étudié va induire une modification de l'interférence, laquelle donne des informations sur l'objet en trois dimensions. »

Au départ d'une seule image fournie par la MHD, il est possible de remettre au net des objets enregistrés flous et de mesurer l'épaisseur optique d'objets transparents comme des globules rouges ou des plaquettes, avec une précision nanométrique. Dans ce cadre, cette équipe a développé une nouvelle méthode qui permet de mesurer avec précision les caractéristiques des agrégats, notamment leur surface, leur hauteur et leur volume. L'équipe y ajoute une quatrième dimension, le temps, en utilisant les capacités d'imagerie à

haute vitesse du système pour suivre chaque plaquette et observer, depuis son étape initiale, son adhérence et sa fixation aux plaquettes précédemment agrégées.

Dans les mois qui viennent, en combinant MHD et microscopie à fluorescence, le rôle des principaux récepteurs sera aussi évalué. Le modèle de récepteur sera précisé dans les agrégats ainsi que leur évolution au cours du temps. Cette étude mettra en évidence l'importance des récepteurs au cours des différentes phases d'agrégation (adhérence, fixation et agrégation des plaquettes).

.....
La recherche fondamentale du Professeur Zouaoui doit contribuer, à terme, à une meilleure compréhension du phénomène d'agrégation des plaquettes. Elle a reçu le soutien financier du Fonds pour la Chirurgie Cardiaque.

Une agrégation variable

Les travaux de l'équipe de Karim Zouaoui Boudjeltia ont également mis en évidence un phénomène inattendu :

la limitation du dépôt de plaquettes par un mécanisme non identifié. Durant les 60 premières secondes, on a observé une augmentation rapide du nombre d'agrégats mais, après 5 minutes, alors qu'il restait un grand nombre de plaquettes en suspension, on n'observait plus de formation de nouveaux agrégats, et leur surface ne s'accroissait plus.

Une première: l'équipe a étudié par MHD le développement de l'épaisseur des agrégats, mais la nature tridimensionnelle de l'agrégat était insuffisante pour expliquer cette saturation. De nouveaux essais ont finalement montré que l'albumine sanguine était le facteur principal de limitation de l'adhérence et de l'agrégation des plaquettes in vitro.

L'hypothèse est donc la suivante : des plaquettes activées adhèrent à la paroi du vaisseau, formant la racine d'un nouvel agrégat ; d'autres plaquettes peuvent alors se fixer à la périphérie ou au sommet de l'agrégat existant, ce qui fait croître ce dernier ; enfin, l'albumine se dépose aussi à la surface, réduisant ainsi localement le taux d'adhérence et d'agrégation plaquettaire.

→ Nouveaux outils de diagnostic, nouveaux médicaments, traitements cardiovasculaires spécifiques, les potentialités pour la santé publique de cette recherche fondamentale sont nombreuses.

Nouvelles perspectives cliniques

Ces descriptions plus précises des mécanismes de l'activité plaquettaire restent un projet de recherche fondamentale, mais elles sont riches de grandes potentialités pour la santé publique, souligne Karim Zouaoui Boudjeltia : développement de nouveaux outils de diagnostic, essais de nouveaux médicaments et mise en place de traitements cardiovasculaires spécifiques.

« La mauvaise compréhension de ce processus est à l'origine de conséquences qui peuvent être graves pour les patients en cours de traitement. Par exemple, des patients souffrant d'un syndrome coronarien aigu, traités par une bithérapie antiplaquettaire, peuvent faire de nouvelles thromboses alors que le traitement lui-même peut être responsable d'hémorragies majeures. C'est pourquoi nos travaux se fondent sur des tests expérimentaux intensifs sur du sang provenant aussi bien de volontaires sains que de patients. »

Ces tests sont réalisés *in vitro*, y compris dans un cadre reproduisant la véritable géométrie des vaisseaux du patient, avec des flux constants ou pulsatiles.

Des plaquettes sont aussi prétraitées avec des inhibiteurs connus de l'activation et de l'adhérence plaquettaires et ajoutées avant ou pendant la formation d'agrégats, dans le but de surveiller l'évolution des agrégats et les modifications qu'ils subissent.

Karim Zouaoui Boudjeltia et son équipe ambitionnent donc de fournir une description quantitative des mécanismes d'adhérence et d'agrégation plaquettaires, incluant tous les éléments pertinents présents dans des conditions réelles, comme le rôle des globules rouges dans le phénomène de marginalisation des plaquettes.

« Les traitements médicaux nécessitent une compréhension complète des phénomènes impliqués dans la physiologie et la pathologie, souligne-t-il. Une description physique précise permettra de peser le rôle de différentes molécules et

permettra aux scientifiques d'identifier de nouvelles cibles thérapeutiques, non seulement sur l'adhérence et l'agrégation, mais également sur l'étalement (spreading) des plaquettes, beaucoup moins connu en pratique clinique. En effet, la visualisation de ce processus est mal documentée à ce jour et plutôt difficile. »

« Des études récentes, dit-il encore, montrent que les tests cliniques existants pour détecter les maladies cardio- et cérébrovasculaires ne sont pas satisfaisants car ils ne tiennent pas compte ni des différentes étapes de l'activation plaquettaire, ni de la dynamique moléculaire impliquée dans les interactions plaquettaires. »

Cependant, une approche individuelle est rendue possible par des méthodes mathématiques et statistiques avancées qui permettent d'explorer automatiquement l'espace des paramètres d'un modèle numérique simulant le dépôt de plaquettes dans un contexte de flux. Cette technique peut être appliquée patient par patient, de manière systématique, sans le biais d'un opérateur humain. Elle est suffisamment rapide sur le plan informatique pour fournir des résultats dans un délai permettant de contribuer à un nouveau diagnostic médical, en fournissant des informations cliniques qu'aucune autre méthode connue ne pouvait fournir.

La pertinence clinique de cette approche doit encore être établie et validée. Ce travail est en cours. Il y a quelques semaines, Karim Zouaoui Boudjeltia a transmis à ses collègues physiciens mathématiciens, à Genève (Pr Bastien Chopard, UNIGE), les résultats obtenus en fonction des pathologies, pour leur traitement et modélisation par cette équipe suisse. Il faut aussi souligner le fait que ce travail de recherche a une dimension multidisciplinaire importante. Outre des médecins et des biologistes, ce travail associe des ingénieurs, des physiciens et des mathématiciens actifs dans des laboratoires universitaires de l'ULB, de France, de Suisse, d'Italie, des Pays-Bas et de Russie. ■