



Université de Montréal

**Nouveaux paramètres d'exploration de la fonction  
plaquettaire en clinique : thrombose tardive, profilage micro-  
membranaire et détection de sous-populations cellulaires**

par

Benoît Labarthe

Département de Sciences Biomédicales  
Faculté des Etudes supérieures

Thèse présentée à la Faculté des études supérieures  
en vue de l'obtention du grade de Docteur  
en sciences biomédicales

15 octobre 2008

© Benoît Labarthe, 2008

Université de Montréal  
Faculté des études supérieures

Cette thèse intitulée :  
Nouveaux paramètres d'exploration de la fonction plaquettaire en clinique :  
thrombose tardive, profilage micro-membranaire et détection de sous-  
populations cellulaires

Présentée par :

Benoît Labarthe

a été évaluée par un jury composé des personnes suivantes :

Pr Eric Thorin

président-rapporteur

Pr. Pierre Théroix

directeur de recherche

Dr. Arnaud Bonnefoy

codirecteur

Pr. François Marceau

membre du jury

Pr. Marc Hoylaerts

examineur externe

Pr. Martin Sirois

représentant du doyen de la FES

## Résumé

---

Les plaquettes sanguines sont les principaux acteurs de l'hémostase primaire et de la thrombose, deux éléments majeurs de la physiopathologie vasculaire. Plusieurs médicaments régulent les fonctions plaquettaires mais peu de tests sont validés pour suivre leur efficacité en fonction de l'évolution clinique des patients. Mon doctorat a eu pour but de développer de nouvelles approches d'évaluation de la fonction plaquettaire.

Deux essais cliniques réalisés sur des patients atteints de syndrome coronarien stable ont constitué la première partie de mon doctorat. La première étude met en évidence la nécessité d'une standardisation des tests biologiques pour la détection de patients répondant moins au clopidogrel, un inhibiteur du récepteur plaquettaire de l'ADP P2Y<sub>12</sub>. L'étude suivante montre le potentiel thérapeutique, chez ces patients, de l'inhibition conjointe de P2Y<sub>12</sub> et du second récepteur plaquettaire de l'ADP P2Y<sub>1</sub>, sur la fonction plaquettaire. De plus, le suivi en temps réel par vidéomicroscopie a permis de distinguer des effets précoces et tardifs des antiplaquettaires sur la formation du thrombus en chambre de perfusion.

La seconde partie de mon doctorat concerne les microdomaines membranaires de type « *lipid rafts* » qui tiennent une place fondamentale dans les fonctions cellulaires et plaquettaires. Ainsi plusieurs récepteurs dépendent de ces microdomaines, régulant la fonction plaquettaire et les effets des médicaments antiplaquettaires. Cependant, les techniques d'étude de ces microdomaines sont complexes et peu adaptées aux études cliniques. Profitant de nouvelles sondes fluorescentes sensibles au niveau d'ordre liquide membranaire (OLM), nous avons développé une méthode de mesure de l'OLM par cytométrie de flux spectrale. Grâce à cette approche, nous avons montré que l'activation plaquettaire diminue l'OLM alors qu'il est augmenté chez des patients traités par un inhibiteur de la synthèse du cholestérol ou par le

clopidogrel. Nous avons également mis en évidence, en condition de forces de cisaillement élevées correspondant à celles retrouvées au niveau de sténoses artérielles, une sous-population plaquettaire présentant un OLM plus bas.

Le passage dans le domaine clinique de ces approches fondamentales qui privilégient l'étude dynamique des plaquettes pourrait permettre d'améliorer le diagnostique et le suivi de traitement de pathologies cardiovasculaires

**Mots clés :** P2Y<sub>12</sub>, P2Y<sub>1</sub>, clopidogrel, microdomaine, plaquettes, thrombose, syndrome coronarien, cytométrie, cholestérol, membrane

## Abstract

---

Blood platelets play a central role in primary hemostasis and thrombosis, two major elements of vascular physiopathology. Although a number of drugs regulate platelet functions, there are no validated tests that monitor their efficacy on the basis of the patients' clinical course. This doctorate, therefore, aims to develop novel approaches to evaluate platelet function.

The first part of my work consisted of two clinical trials involving patients with stable coronary syndrome. The first study demonstrated the need for standardized biological tests to screen for patients who respond less well to clopidogrel, an ADP P2Y<sub>12</sub> receptor antagonist. The second study showed the therapeutic potential of the joint inhibition of P2Y<sub>12</sub> and P2Y<sub>1</sub> receptors on platelet adhesion, activation, and aggregation for these patients. Furthermore, a video microscopy model using perfusion chambers made it possible to monitor the course of thrombosis in real time, and enabled us to dissociate the early and late effects of the antiplatelet drugs.

Lipid raft membrane microdomains play a pivotal role in many cell functions. At the platelet level, many receptors depend on these microdomains and thus modulate the function as well as the drug sensitivity of platelets. However, current techniques for the study of these microdomains are complex and limit their clinical applications. By taking advantage of new fluorescent probes that are sensitive to the level of the membrane order, we developed a method of measuring the membrane order using spectral flow cytometry. Through this approach we showed that platelet activation reduced the lipid order of the membranes, whereas it was increased in patients treated with a cholesterol synthesis inhibitor or clopidogrel. It was also possible for us to demonstrate the appearance, under shear stress similar to that of stenotic arteries, of a platelet sub-population with a very low membrane order.

These approaches which privilege the dynamic study of thrombi and platelets could be applied to the clinical practice and thus widen the fields of clinical studies.

**Keywords:** P2Y<sub>12</sub>, P2Y<sub>1</sub>, clopidogrel, microdomain, platelets, thrombosis, coronary syndrome, cytometry, cholesterol, membrane

## Table des matières

---

|  |           |
|--|-----------|
| RESUME.....  | IV        |
| ABSTRACT.....  | VI        |
| TABLE DES MATIÈRES.....  | VIII      |
| Liste des tableaux.....  | X         |
| Liste des figures.....   | XI        |
| Liste des abréviations.....  | XIII      |
| <b>1. INTRODUCTION.....</b>  | <b>9</b>  |
| 1.1. LA MALADIE CORONARIENNE.....  | 10        |
| 1.2. LES PLAQUETTES.....   | 11        |
| 1.2.1. <i>Thrombopoïèse</i> .....  | 12        |
| 1.2.2. <i>Morphologie</i> .....  | 12        |
| 1.2.3. <i>Physiopathologie</i> .....   | 15        |
| 1.2.3.1. Adhésion plaquettaire.....  | 15        |
| 1.2.3.2. Agrégation plaquettaire.....  | 16        |
| 1.2.3.3. Plaquettes et coagulation.....  | 18        |
| 1.2.4. <i>Activation plaquettaire/ thrombose dans la maladie coronarienne et les régulations thérapeutiques : exemple des récepteurs de l'Adénosine di-phosphate (ADP)</i> ..... | 18        |
| 1.2.4.1. Rôles des récepteurs purinergiques plaquettaires.....   | 18        |
| 1.2.4.2. Les récepteurs purinergiques en thérapeutique : efficacité et résistances.....  | 20        |
| 1.2.5. <i>Les sous-populations plaquettaires (COAT et SCIPs)</i> .....   | 24        |
| 1.2.5.1. Les plaquettes COAT (Collagen And Thrombin activated platelets).....  | 24        |
| 1.2.5.2. Les plaquettes SCIPs (Sustained Calcium-Induced Platelet morphology).....   | 27        |
| 1.2.6. <i>Les microparticules de plaquettes</i> .....  | 29        |
| 1.3. MEMBRANE CELLULAIRE ET MICRODOMAINES MEMBRANAIRES.....  | 31        |
| 1.3.1. <i>La membrane plasmique</i> .....  | 31        |
| 1.3.1.1. Les lipides.....  | 32        |
| 1.3.1.2. Le cholestérol.....   | 34        |
| 1.3.1.3. Les protéines.....  | 36        |
| 1.3.2. <i>Notions biophysiques</i> .....   | 36        |
| 1.3.3. <i>Les microdomaines membranaires</i> .....   | 37        |
| 1.3.4. <i>Définition formelle des microdomaines membranaires (« lipid rafts »)</i> .....   | 38        |
| 1.3.5. <i>Définition biochimique et fonctionnelle des microdomaines</i> .....  | 39        |
| 1.3.6. <i>Les outils pour l'étude des microdomaines</i> .....  | 41        |
| 1.3.6.1. Isolement des microdomaines membranaires.....   | 41        |
| 1.3.6.1.1. Méthodes utilisant des détergents : les DRM.....  | 41        |
| 1.3.6.1.2. Méthodes sans détergent.....  | 43        |
| 1.3.6.2. Les altérations de la composition lipidique des membranes.....  | 44        |
| 1.3.6.3. Microscopie optique.....  | 45        |
| 1.3.6.3.1. Les marqueurs fluorescents.....   | 47        |
| 1.3.6.3.2. Les senseurs fluorescents.....  | 48        |
| 1.3.6.4. Spectroscopie par corrélation de fluorescence (FCS).....  | 55        |
| 1.3.6.5. Microscopie électronique.....   | 55        |
| 1.3.6.6. Microscopie à force atomique.....   | 56        |
| 1.3.7. <i>La controverse autour des microdomaines membranaires</i> .....   | 56        |
| 1.3.7.1. La notion d'existence des microdomaines dans les cellules.....  | 56        |
| 1.3.7.2. Formation des microdomaines : vers un modèle dynamique.....   | 58        |
| 1.4. RÔLE DES MICRODOMAINES DANS LA PHYSIOLOGIE PLAQUETTAIRE.....  | 61        |
| 1.4.1. <i>Récepteurs de la thrombine</i> .....   | 62        |
| 1.4.2. <i>Récepteurs de l'ADP et à l'ATP</i> .....   | 62        |
| 1.4.3. <i>Récepteurs au collagène</i> .....  | 63        |
| <b>2. RESULTATS.....</b>   | <b>66</b> |
| 2.1. PRÉSENTATION DE L'ARTICLE 1.....  | 68        |

|  |            |
|--|------------|
| MATCHING THE EVALUATION OF THE CLINICAL EFFICACY OF CLOPIDOGREL TO PLATELET FUNCTION TESTS RELEVANT TO THE BIOLOGICAL PROPERTIES OF THE DRUG .....   | 69         |
| 2.1.1. <i>Abstract</i> .....   | 70         |
| 2.1.2. <i>Introduction</i> .....   | 73         |
| 2.1.3. <i>Methods</i> .....  | 74         |
| 2.1.4. <i>Results</i> .....  | 77         |
| 2.1.5. <i>Discussion</i> .....   | 81         |
| 2.2. PRÉSENTATION DE L'ARTICLE 2 .....   | 94         |
| COMPARATIVE EFFECTS OF SINGLE OR COMBINED INHIBITION OF THE P2Y <sub>1</sub> AND P2Y <sub>12</sub> PURINERGIC RECEPTORS ON PLATELET ADHESION, ACTIVATION, SECRETION, AND AGGREGATION .....                 | 96         |
| 2.2.1. <i>Abstract</i> .....   | 98         |
| 2.2.2. <i>Introduction</i> .....   | 100        |
| 2.2.3. <i>Methods</i> .....  | 101        |
| 2.2.4. <i>Results</i> .....  | 104        |
| 2.2.5. <i>Discussion</i> .....   | 106        |
| 2.3. PRÉSENTATION DE L'ARTICLE 3 .....   | 123        |
| A NOVEL FLOW CYTOMETRIC APPROACH TO QUANTIFY LIPID MEMBRANE MICRODOMAINS IN LIVING HUMAN PLATELETS. APPLICATIONS TO THE STUDY OF THE <i>IN VIVO</i> PLATELET EFFECTS OF ATORVASTATIN AND CLOPIDOGREL ..... | 126        |
| 2.3.1. <i>Introduction</i> .....   | 127        |
| 2.3.2. <i>Matériel et méthodes</i> .....   | 130        |
| 2.3.3. <i>Résultats</i> .....  | 140        |
| 2.3.4. <i>Discussion</i> .....   | 160        |
| 2.3.5. <i>Conclusion</i> .....   | 170        |
| <b>3. DISCUSSION ET PERSPECTIVES.....</b>  | <b>171</b> |
| 3.1. DISCUSSION ET PERSPECTIVES.....   | 173        |
| 3.1.1. <i>Evaluation de l'efficacité du clopidogrel et des inhibiteurs de P2Y<sub>1</sub></i> .....  | 173        |
| 3.1.2. <i>Développement d'une méthode de mesure de l'OLM</i> .....   | 179        |
| 3.2. APPLICATIONS ET VALORISATION DE LA MÉTHODE DE QUANTIFICATION DE L'OLM.....  | 184        |
| 3.2.1. <i>Domaines d'application en médecine</i> .....   | 190        |
| 3.2.1.1. <i>Immunologie : la synapse immunologique, une plateforme de microdomaines</i> .....  | 191        |
| 3.2.1.2. <i>Maladies infectieuses</i> .....  | 191        |
| 3.2.2. <i>Les microdomaines comme cible de médicaments</i> .....   | 193        |
| <b>4. BIBLIOGRAPHIE.....</b>   | <b>196</b> |
| <b>5. ANNEXES .....</b>  | <b>I</b>   |
| 5.1. ANNEXE 1 : RÉSUMÉ DE LA PRÉSENTATION DU DR ANGE MAGUY AU CONGRÈS DE LA BIOPHYSICAL SOCIETY 2-6 FÉVRIER 2008, LONG BEACH CA .....  | II         |
| 5.2. ANNEXE 2 : LE DI-4-ANEPPDHQ, UN NOUVEAU MARQUEUR LIPIDIQUE POUR LE COMPTE DES MICROPARTICULES CELLULAIRES .....   | III        |
| 5.3. ANNEXE 3 : MESURE DE L'APOPTOSE PAR MESURE DE L'OLM .....   | VII        |

## Liste des tableaux

---

|  |     |
|--|-----|
| TABLEAU 1: COMPOSANTS SECRETES DES GRANULES ET LYSOSOMES PLAQUETTAIRES .....   | 14  |
| TABLEAU 2: MARQUEURS ET SENSEURS FLUORESCENTS POUR LA VISUALISATION DES LIPIDES ET<br>MICRODOMAINES PAR MICROSCOPIE OPTIQUE..... | 53  |
| TABLEAU 3: PRINCIPAUX RÉCEPTEURS PLAQUETTAIRES ET LOCALISATION DANS LES DRM.....   | 65  |
| TABLEAU 4: EFFETS DU TRAITEMENT PAR STATINE SUR LES PARAMÈTRES LIPIDIQUES DES PATIENTS.....                                      | 154 |
| TABLEAU 5: EFFETS DE L'ATORVASTATINE SUR LES PARAMÈTRES D'ACTIVATION PLAQUETTAIRES ET<br>LEUCOCYTAIRES .....                     | 155 |
| TABLEAU 6: CARACTÉRISTIQUES DES 65 PATIENTS INCLUS DANS LA SOUS-ÉTUDE ANEP-PREPAIR.....  | 157 |
| TABLEAU 7: PRINCIPAUX AGENTS INFECTIEUX DÉPENDANTS DES MICRODOMAINES .....   | 193 |

## Liste des figures

---

|   |     |
|---|-----|
| FIGURE 1: MORPHOLOGIES DE PLAQUETTES NON ACTIVÉES ET ACTIVÉES .....   | 13  |
| FIGURE 2: PRINCIPAUX SYSTÈMES DE RÉCEPTEURS MIS EN JEU DANS L'ADHÉSION, L'ACTIVATION ET L'AGRÉGATION PLAQUETTAIRE.....  | 17  |
| FIGURE 3: RECEPTEURS ET VOIES DE SIGNALISATION DES RECEPTEURS PURINERGIQUES DANS LES PLAQUETTES .....   | 20  |
| FIGURE 4: MORPHOLOGIE DE PLAQUETTES SCIP VISUALISÉES EN MICROSCOPIE PAR CONTRASTE DE PHASE .....  | 28  |
| FIGURE 5: DE LA MOSAÏQUE FLUIDE AUX MICRODOMAINES .....   | 32  |
| FIGURE 6: SCHÉMA RÉCAPITULATIF DES DIFFÉRENTS TRANSPORTEURS DE LIPIDES DANS LA MEMBRANE PLASMIQUE .....   | 33  |
| FIGURE 7: REPARTITION DES DIFFÉRENTS TYPES DES LIPIDES AU NIVEAU DE LA MEMBRANE PLASMIQUE ....  | 34  |
| FIGURE 8: STRUCTURE DE LA MOLÉCULE DE CHOLESTÉROL ET DE SPHINGOLIPIDES ET SCHÉMA DE SON INSERTION DANS LA BICOUCHE LIPIDIQUE.....   | 35  |
| FIGURE 9: SCHÉMA DE L'ORGANISATION MEMBRANAIRE DES MICRODOMAINES MEMBRANAIRES .....   | 41  |
| FIGURE 10: PRINCIPE DE LA MÉTHODE D'ANALYSE DE LA SENSIBILITÉ D'ANTIGÈNES AUX DÉTERGENTS PAR CYTOMÉTRIE DE FLUX.....  | 43  |
| FIGURE 11: REPRÉSENTATION SCHÉMATIQUE DU MÉCANISME DE FLUORESCENCE DU DI-4-ANEPPDHQ....   | 50  |
| FIGURE 12: STRUCTURE MOLÉCULAIRE DES PRINCIPAUX MARQUEURS ET SENSEURS .....   | 54  |
| FIGURE 13: SPECTRE DE FLUORESCENCE DU DI-4-ANEPPDHQ ET DISPOSITION DES FILTRES POUR LA CYTOMÉTRIE SPECTRALE ET LA MICROSCOPIE CONFOCALE.....  | 136 |
| FIGURE 14: DÉTERMINATION DU SPECTRE DE FLUORESCENCE DU DI-4-ANEPPDHQ DANS DES PLAQUETTES ADHÉRENTES PAR MICROSCOPIE CONFOCALE.....  | 141 |
| FIGURE 15: EFFETS DE LA DÉPLÉTION EN CHOLESTÉROL SUR LE RATIO DE FLUORESCENCE Rf .....  | 142 |
| FIGURE 16: EFFETS DE LA DÉPLÉTION EN SPHINGOMYÉLINE SUR L'OLM .....   | 144 |
| FIGURE 17: SPECTRE D'ÉMISSION DU DI-4-ANEPPDHQ MESURÉ PAR CYTOMÉTRIE DE FLUX SPECTRALE DU DI-4-ANEPPDHQ DANS DES PLAQUETTES EN SUSPENSION DÉPLÉTÉES EN CHOLESTÉROL ET/OU SPHINGOMYÉLINE ..... | 145 |
| FIGURE 18: PROFIL DE L'OLM DE LA POPULATION GLOBALE DE PLAQUETTES EN SUSPENSION APRÈS DÉPLÉTION EN CHOLESTÉROL ET/OU EN SPHINGOMYÉLINE .....  | 146 |
| FIGURE 19: EFFETS DE L'ACTIVATION SUR LA PHASE LIQUIDE ORDONNÉE DE PLAQUETTES EN SUSPENSION .....   | 148 |

|   |      |
|---|------|
| FIGURE 20: PROFIL DE L'OLM DE LA POPULATION GLOBALE DE PLAQUETTES APRÈS ACTIVATION.....   | 149  |
| FIGURE 21: ÉTUDE DE LA SOUS-POPULATION DE PLAQUETTES À RF ÉLEVÉ APPARAISSANT EN CONDITIONS DE FORCES DE CISAILLEMENT ÉLEVÉES.....     | 152  |
| FIGURE 22: EFFET DU TRAITEMENT PAR L'ATORVASTATINE SUR L'OLM.....   | 156  |
| FIGURE 23: REPRÉSENTATION DE LA RÉPARTITION DES POPULATIONS PLAQUETTAIRES EN CYTOMÉTRIE DE FLUX SELON LE MARQUAGE DI-4-ANEPPDHQ ..... | 159  |
| FIGURE 24: COMPARAISON DES SPECTRES DE FLUORESCENCE DU DI-4-ANEPPDHQ DE LYMPHOCYTES ET DE PLAQUETTES .....                            | 182  |
| FIGURE 25: EVOLUTION DU NOMBRE DE PUBLICATIONS SUR LES MICRODOMAINES (1997-2007).....   | 186  |
| FIGURE 26: SCHÉMA DU PROCESSUS DÉCRIT DANS LE BREVET CONCERNANT LA MÉTHODE DE MESURE DE L'OLM DE CELLULES OU VIRUS .....              | 187  |
| FIGURE 27: SCHÉMAS DES APPLICATIONS POTENTIELLES DU PROFILAGE DES MEMBRANES CELLULAIRES..   | 189  |
| FIGURE 28: RÉPARTITION DES PUBLICATIONS SUR LES MICRODOMAINES EN FONCTION DES DOMAINES DE RECHERCHE .....                             | 190  |
| FIGURE 29: MESURE DES MICROPARTICULES PLAQUETTAIRES PAR CYTOMÉTRIE DE FLUX APRÈS MARQUAGE PAR LE DI-4-ANEPPDHQ.....                   | IV   |
| FIGURE 30: ANALYSE DES RÉSULTATS DE CYTOMÉTRIE DE FLUX POUR LA MESURE DE L'APOPTOSE DE CELLULES HUVEC .....                           | VIII |
| FIGURE 31: MESURE DE L'OLM DE CELLULES HUVEC AU COURS DE L'APOPTOSE .....   | X    |

## Liste des abréviations

---

|                              |   |
|------------------------------|---|
| <b><i>5-HT</i></b>           | Sérotonine                                    |
| <b><i>ABC</i></b>            | ATP-Binding Cassette                          |
| <b><i>ADP</i></b>            | Adénosine diphosphate                         |
| <b><i>Agg6min</i></b>        | Late aggregation                              |
| <b><i>Aggmax</i></b>         | Peak aggregation                              |
| <b><i>APLT</i></b>           | Aminophospholipide translocase                |
| <b><i>APP</i></b>            | Amyloid Precursor Protein                     |
| <b><i>Ator</i></b>           | Atorvastatine                                 |
| <b><i>ATP</i></b>            | Adénosine triphosphate                        |
| <b><i>AUC</i></b>            | Area under curve ou aire sous la courbe       |
| <b><i>AVC</i></b>            | Accidents Vasculaires Cérébraux               |
| <b><i>CI inh</i></b>         | C1 inhibiteur                                 |
| <b><i>CAD</i></b>            | Coronary Artery Disease                       |
| <b><i>Cav</i></b>            | Cavéoline                                     |
| <b><i>CHUM</i></b>           | Centre Hospitalier Universitaire de Montréal  |
| <b><i>CI</i></b>             | Conversion Interne                            |
| <b><i>CMH</i></b>            | Complexe Majeur d'Histocompatibilité          |
| <b><i>COAT Platelets</i></b> | Collagen And Thrombin activated Platelets     |
| <b><i>CPA</i></b>            | Cellule Présentatrice d'Antigènes             |
| <b><i>CRP</i></b>            | Collagen Related Peptide                      |
| <b><i>CTx</i></b>            | Cholera Toxin                                 |
| <b><i>CVX</i></b>            | Convulxin                                     |
| <b><i>DAP</i></b>            | Point d'Adhésion Discret                      |
| <b><i>DHE</i></b>            | DéHydroErgostérol                             |
| <b><i>Disagg</i></b>         | Disaggregation                                |
| <b><i>DPH</i></b>            | 1,6-diphényl-1,3,5-hexatriène                 |
| <b><i>DRM</i></b>            | Membrane Résistante aux Détergents            |
| <b><i>EDTA</i></b>           | acide Éthylène-Diamine-TétraAcétique          |
| <b><i>FCS</i></b>            | Spectroscopie par Corrélacion de Fluorescence |
| <b><i>FcγR</i></b>           | Récepteur au fragment Fc des immunoglobulines |
| <b><i>FGF-1</i></b>          | Fibroblast Growth Factor-1                    |
| <b><i>FL</i></b>             | Fluorescence                                  |
| <b><i>FLIM</i></b>           | Fluorescence Lifetime Imaging Microscopy      |
| <b><i>FRAP</i></b>           | Fluorescence Recovery After Photobleaching    |
| <b><i>FRET</i></b>           | Fluorescence Resonance Energy Transfer        |

|                   |   |
|-------------------|---|
| <b>FSC</b>        | Forward Scatter   |
| <b>FT</b>         | Facteur Tissulaire  |
| <b>GDP</b>        | Guanine-DiPhosphate   |
| <b>GFP</b>        | Green Fluorescent Protein                                   |
| <b>GMI</b>        | Ganglioside M1  |
| <b>GP</b>         | Generalized Polarization ou Polarisation Généralisée        |
| <b>GPI</b>        | Glycosyl-Phosphatidyl Inositol                              |
| <b>GPIIb/IIIa</b> | Glycoprotéine IIb/IIIa ( $\alpha_{IIb}\beta_3$ ; CD41/CD61) |
| <b>GSU</b>        | Gray Scale Units  |
| <b>GTP</b>        | Guanine triphosphate  |
| <b>HTLV-1</b>     | Human T-lymphotropic virus-1                                |
| <b>HUVEC</b>      | Human Umbilical Venous Endothelial Cells                    |
| <b>ICM</b>        | Institut de Cardiologie de Montréal                         |
| <b>IGF-1</b>      | Insulin Growth Factor-1                                     |
| <b>INSERM</b>     | Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale   |
| <b>ISRS</b>       | Inhibiteur Sélectif de Recapture de la Sérotonine           |
| <b>Ld</b>         | phase Liquide Désordonnée                                   |
| <b>Lo</b>         | phase Liquide Ordonnée ou Liquide Ordered                   |
| <b>LT</b>         | Lymphocyte T  |
| <b>MC</b>         | Maladie Coronarienne  |
| <b>MCD</b>        | Méthyl- $\beta$ -Cyclodextrine                              |
| <b>MCP-1</b>      | Monocytes Chemoattractant Protein-1                         |
| <b>MFI</b>        | Mean Fluorescence Intensity                                 |
| <b>MHI</b>        | Montreal Heart Institute                                    |
| <b>MM</b>         | Microdomaine Membranaire                                    |
| <b>MMP</b>        | Métalloprotéase de la Matrice                               |
| <b>Mono</b>       | Monocyte  |
| <b>MP</b>         | Microparticule  |
| <b>MRS2179</b>    | N6-methyl-2'-deoxyadenosine-3',5'-bisphosphate              |
| <b>NO</b>         | Monoxyde d'azote  |
| <b>OLM</b>        | Ordre Liquide Membranaire                                   |
| <b>PAF</b>        | Platelet Activating Factor                                  |
| <b>PAI-1</b>      | Plasminogen Activator Inhibitor -1                          |
| <b>PAR-1</b>      | Protease Activated Receptor-1                               |
| <b>PC</b>         | PhosphatidylCholine   |
| <b>PDGF</b>       | Platelet Derived Growth Factor                              |
| <b>PE</b>         | Phycoérythrine  |

|  |  |
|--|--|
| <b><i>PECAM</i></b>                    | Platelet Endothelial Cell Adhesion Molecule (CD31)                             |
| <b><i>PF4</i></b>                      | Facteur Plaquettaire 4 (CXCL4)   |
| <b><i>PI</i></b>                       | Iodure de Propidium  |
| <b><i>PI3Kinase</i></b>                | Phosphoinositide 3 Kinase  |
| <b><i>PL</i></b>                       | Phospholipide  |
| <b><i>PLC <math>\gamma</math>2</i></b> | Phospholipase C $\gamma$ 2   |
| <b><i>PLSCR</i></b>                    | Phospholipid Scramblase  |
| <b><i>Plt</i></b>                      | Platelet   |
| <b><i>PMN</i></b>                      | Polymorphonucléaire  |
| <b><i>PMT</i></b>                      | Photomultiplier tube   |
| <b><i>PPACK</i></b>                    | D-Phenylalanyl-Prolyl-ArginineChloromethylKetone                               |
| <b><i>PPP</i></b>                      | Plasma pauvre en plaquettes  |
| <b><i>PRP</i></b>                      | Plasma riche en plaquettes   |
| <b><i>PrP</i></b>                      | Protéine du Prion  |
| <b><i>PS</i></b>                       | Phosphatidylsérine   |
| <b><i>Psel</i></b>                     | P-selectin (CD62-P)  |
| <b><i>PSF</i></b>                      | Point Spread Functions   |
| <b><i>RCPG</i></b>                     | Récepteurs Couplé aux Protéines G  |
| <b><i>Rf</i></b>                       | Rapport de fluorescence FL4 <sub>675 nm</sub> /FL2 <sub>575 nm</sub>           |
| <b><i>SCIP</i></b>                     | Sustained Calcium Induced Platelets  |
| <b><i>SIPA</i></b>                     | Shear Induced Platelet Activation  |
| <b><i>SM</i></b>                       | Sphigomyéline  |
| <b><i>SMase</i></b>                    | Sphingomyélinase   |
| <b><i>SSC</i></b>                      | Side Scatter   |
| <b><i>TCR</i></b>                      | Récepteur des Cellules T   |
| <b><i>TCZ</i></b>                      | Zones de Confinement Transitoires  |
| <b><i>TFPI</i></b>                     | Tissue Factor Pathway Inhibitor ou Inhibiteur de la voie du facteur tissulaire |
| <b><i>TGF-<math>\beta</math></i></b>   | Transforming Growth Factor $\beta$   |
| <b><i>TIRF</i></b>                     | Total Internal Reflection Fluorescence   |
| <b><i>TRAP</i></b>                     | Thrombin Receptor Activating Peptide   |
| <b><i>TSP-1</i></b>                    | Thrombospondine 1  |
| <b><i>VEGF</i></b>                     | Vascular Endothelial Growth Factor   |
| <b><i>VIH</i></b>                      | Virus de l'Immuodéficience Humaine   |
| <b><i>vWF</i></b>                      | Facteur de von Willebrand  |
| <b><i>YFP</i></b>                      | Yellow Fluorescent Protein   |

## Remerciements

---

*Je souhaite remercier en premier lieu mon directeur de thèse le Professeur Pierre Thérout pour m'avoir accueilli au sein de son équipe, pour m'avoir fait confiance et m'avoir accordé toute la liberté pour entreprendre le projet di-4-ANEPPDHQ.*

*J'adresse mes sincères remerciements au Professeur Eric Thorin pour m'avoir fait l'honneur d'être Président rapporteur du jury de cette thèse.*

*Je remercie chaleureusement le Professeur Marc Hoylaerts pour avoir accepté la lourde tâche d'examineur externe.*

*Je tiens à remercier le Professeur François Marceau de me faire l'honneur de participer à ce jury de thèse et d'avoir pris le temps de relire le mémoire en détail.*

*Je tiens à adresser mes très sincères remerciements au Docteur Arnaud Bonnefoy pour le soutien sans faille et son optimisme au long de ces deux années fluorescentes. Les discussions, les encouragements et la confiance placée en moi ont été précieux pendant ces années.*

*Mes remerciements vont aussi au Docteur Ange Maguy, pour m'avoir soutenu dès les premiers balbutiements du projet di-4-ANEPPDHQ et sans qui tout ceci n'aurait pas existé.*

*Je tiens à exprimer ma grande gratitude envers le Docteur Pascal Maurice pour son aide précieuse lors de la rédaction de ce mémoire, pour son temps, sa rigueur et sa tolérance à mes « controverses sous-jacentes » un peu trop nombreuses...*

*Merci à M. Louis Villeneuve pour les longues heures passées dans son « antre », devant le microscope confocal et à guider mes premiers pas entre PSF, dichroïques, subsampling et déconvolution.*

*Je remercie M. Sylvain Gimmig et Mme Laurence Lejeune du service de cytométrie en flux du centre de recherche du CHUM et de l'Association Canadienne de Cytométrie pour leur assistance et leur intérêt pour la cytométrie spectrale et qui ont permis son développement au CHUM.*

*Je tiens aussi à remercier celles qui ont été ma famille du Québec pendant ces années : Mmes Marta Ghitescu et Jacinthe Rivard qui ont toujours répondu présent pour m'aider au laboratoire et en dehors, merci pour votre immense générosité. Merci surtout à Mlle Catherine Martel pour son entrain, son aide, son soutien précieux et sa patience envers moi dans les moments les plus durs tout au long de ces années dans le laboratoire. Merci enfin à Mlle Judith Babin pour sa patience et sa gentillesse.*

*Merci aussi à toute l'équipe des infirmières : Mmes Suzanne « Maman » Bujold, Anne-Marie « Garde » Poitras, Nathalie Gendron et Colette Anctil. Merci pour votre aide, votre sérieux et votre bonne humeur ! Vous êtes indispensables à des études comme celles-ci.*

*Un gros merci à Marie Andrée Seguin et Marie France Bouchard pour votre gentillesse et votre disponibilité tout au long de ce doctorat.*

*Je tiens à remercier ceux sans qui rien n'aurait pu être fait : les volontaires et patients qui ont accepté de participer à nos études.*

*Je remercie aussi les Docteurs Richard Gallo et Philippe L'Allier pour m'avoir permis de mener les premiers essais dans un cadre clinique.*

*Merci à Mme Anna Nozza pour son assistance pour les analyses multivariées des essais cliniques et au Dr Bastian Angermann pour ses analyses de clusters à partir des données de cytométrie spectrale.*

*Je tiens enfin à remercier les deux femmes de ma vie :*

*Sonia qui m'a accompagné dans les moments joyeux et porté dans les moments difficiles,*

*Noémie dont la bonne humeur et les premiers mots ont marqué la rédaction de ce mémoire.*

## Avant propos

---

Ce travail de doctorat a été conduit dans le laboratoire de recherche clinique du Pr Pierre Thérioux avec la volonté de développer de nouvelles approches pour le diagnostic et le suivi de la maladie coronarienne, particulièrement en phase aiguë. Le centre de recherche de l'Institut de Cardiologie de Montréal offre l'opportunité exceptionnelle de regrouper sur un même site des équipes pluridisciplinaires médicales et fondamentales. Cette proximité m'a permis de participer et de concevoir durant mon doctorat des études cliniques indépendantes et des sous-études cliniques au sein d'essais monocentriques ou multicentriques. C'est dans cette démarche de recherche translationnelle que s'inscrit ce doctorat.

Dans un premier temps, mon travail a consisté à étudier les méthodes de suivi de la réponse biologique au clopidogrel, un antiplaquettaire majeur dirigé contre le récepteur de l'adénosine diphosphate (ADP) P2Y<sub>12</sub> et utilisé dans le cadre du traitement des maladies cardiovasculaires. Deux récepteurs plaquettaire sont mis en jeu : le P2Y<sub>1</sub> qui initie le changement de forme et l'agrégation et le P2Y<sub>12</sub> qui stabilise l'agrégation. L'hypothèse de travail a été que la mesure tardive de l'agrégation plaquettaire pourrait refléter plus fidèlement l'activité stabilisatrice du clopidogrel. Les résultats de cette étude composent le premier article de la thèse, publié dans le *Journal of the American College of Cardiology* en 2005 [1]. Ce premier projet a été suivi d'une étude comparant le blocage du récepteur P2Y<sub>12</sub> par le clopidogrel à un inhibiteur du récepteur P2Y<sub>1</sub> et à une double inhibition des récepteurs chez des patients avec maladie coronarienne. Afin de se rapprocher des conditions physiologiques, la double inhibition de P2Y<sub>1</sub> et P2Y<sub>12</sub> a été ensuite transposée dans un modèle de vidéomicroscopie en micro-capillaire permettant des études de perfusion en sang total. Ce modèle permet d'étudier l'adhésion et l'agrégation plaquettaire en temps réel comparativement à des temps fixes avec les méthodes standards. Ce travail est le second article inclus dans cette thèse, accepté pour publication dans la revue

*Thrombosis & Haemostasis* [2] conditionnellement à l'ajout d'expériences complémentaires, actuellement en cours et sera détaillée dans la partie résultats. En parallèle, nous avons effectué une sous-étude dans le cadre de l'essai clinique PREPAIR conduit à l'ICM, par le Dr L'Allier. Cette étude parue dans *Journal of the American College of Cardiology* en 2008 [3] montre que des doses de charge de clopidogrel plus importantes améliorent l'inhibition des fonctions plaquettaires, tant au niveau quantitatif qu'en terme de taux de « résistance » au traitement. Cette augmentation de dose ne majore cependant pas le risque de saignements ou d'effets indésirables.

Ces trois études constituent le volet de pharmacologie clinique de mon travail. Dans la continuité de ce travail, trois éléments ont orienté mon champ d'investigation vers les microdomaines lipidiques. En effet, si le rôle pro-athérogénique des lipides circulants, leur incorporation dans la plaque d'athérome et leur métabolisme sont bien connus comme étant impliqués dans les pathologies cardiovasculaires, l'importance des lipides cellulaires l'est moins et ne fait aujourd'hui l'objet d'aucune application clinique.

Nos études alors en cours présentées ci-dessus utilisaient principalement les marqueurs conventionnels classiquement utilisés dans le cadre d'études cliniques et fondamentales : agrégation plaquettaire, mesure d'activation et de sécrétion plaquettaire. Ces approches ne permettent cependant pas la détection de *sous-type plaquettaire* dont les descriptions commençaient alors à apparaître dans la littérature en premier lieu sous la dénomination de COAT platelets (Collagen And Thrombin activated platelets)[4] puis de SCIPs (Sustained Calcium Influx Platelets)[5]. Les SCIPs possèdent des propriétés pro-inflammatoires alors que les COATs présentent une activité pro-coagulante majeure. Les caractéristiques de ces deux sous-types plaquettaires seront détaillées dans le paragraphe 2.1.5. Ces deux sous-populations semblent posséder, au moins dans certaines conditions, des caractéristiques membranaires différentes de la population générale des plaquettes.

Les *microparticules* faisaient alors partie de nos champs d'intérêt mais les méthodes existantes pour leur quantification étaient limitées. Des observations dans la littérature reliant leur composition lipidique à celle des microdomaines membranaires de type « rafts »[6] nous ont conduit à formuler l'hypothèse que ces microdomaines enrichis en cholestérol pouvaient prendre part à la formation des microparticules devenant ainsi une cible potentielle pouvant expliquer certains effets pléiotropiques des statines.

Enfin, un article de Savi *et coll.* [7] publié en 2006 a pour la première fois tenté d'expliquer le mécanisme d'action moléculaire du clopidogrel en montrant que les récepteurs P2Y<sub>12</sub> sont présents à l'état de dimères ou d'oligomères à la surface des cellules et que ces *oligomères sont préférentiellement localisés dans les microdomaines membranaires*. Les auteurs proposaient que le métabolite du clopidogrel puisse scinder les multimères, favorisant la présence de formes monomériques qui seraient alors délocalisées hors des microdomaines. Ces formes monomériques sont présentées dans cet article comme ayant une affinité réduite pour l'ADP inhibant ainsi la fonction plaquettaire. Il devenait dès lors possible de poser l'hypothèse que des modifications qualitatives ou quantitatives des microdomaines pourraient moduler l'activité du clopidogrel et éventuellement participer à un mécanisme de réponse diminuée au clopidogrel.

Ces trois aspects présentent le point commun d'impliquer des modifications profondes des membranes cellulaires pouvant avoir un retentissement clinique direct, soit comme facteur de risque dans le cas des sous-populations ou des microparticules plaquettaires, soit comme cause de réponse diminuée à certains médicaments comme le clopidogrel. Cependant, les méthodes conventionnelles pour l'étude de ces aspects s'avèrent fort limitées dans le cadre d'applications cliniques pour des questions techniques et scientifiques qui seront détaillés dans l'introduction de cette thèse.

Partant de ce constat, le but de mon travail a alors été de mettre au point une méthode permettant de *détecter et quantifier ces modifications membranaires* afin d'étudier sous un angle nouveau la physiologie des microdomaines membranaires, les sous-populations cellulaires ainsi que les microparticules. Les microdomaines lipidiques et plus généralement l'ordre liquide membranaire (OLM) sont le reflet au niveau de la membrane de nombreux phénomènes cellulaires comme l'activation ou l'apoptose. Nous avons alors choisi de nous concentrer sur l'étude de l'OLM car il constitue un paramètre biophysique intrinsèque fondamental des microdomaines membranaires. Nous avons à notre disposition des outils performants et complémentaires, particulièrement le senseur di-4-ANEPPDHQ, alors utilisé dans le laboratoire du Pr Nattel par le Dr Ange Maguy pour caractériser la structure des microdomaines membranaires des cardiomyocytes par microscopie confocale. De façon originale, nous avons utilisé ce senseur en associant l'approche par cytométrie de flux à la microscopie confocale pour quantifier les microdomaines membranaires sur des cellules vivantes. D'autres investigations préliminaires ont permis de développer cette méthode pour la détection et la quantification de microparticules en circulation ainsi que pour la quantification de l'apoptose cellulaire.

Durant cette mise au point, il est apparu que la méthode développée pourrait faire l'objet d'une démarche de valorisation industrielle et un brevet a été déposé pour explorer les différents aspects de la physiologie membranaire plaquettaire et cellulaire au travers du prisme de cette méthode.

*La première partie de l'introduction* consistera à rappeler la nature et le rôle des plaquettes sanguines, avec un intérêt particulier pour le système de l'ADP et pour le médicament associé, le clopidogrel. Seront ensuite présentées les deux principales sous-populations plaquettaires décrites dans la littérature comme ayant un intérêt particulier pour les modifications de membranes observées. *La seconde partie* consistera à détailler (1) les concepts actuels autour de

la notion de microdomaines membranaires, de rafts et d'OLM, (2) les méthodes d'étude des microdomaines membranaires et (3) l'impact des microdomaines sur la fonction plaquettaire.

La partie *Résultats* présentera les articles réalisés au cours de ce doctorat. Des résultats dont les articles sont en préparation seront de plus présentés afin d'illustrer les différents aspects de la méthode développée.

Enfin la *Discussion* fera la synthèse des résultats obtenus et des développements possibles de cette technique, en relation avec le brevet déposé et ses applications potentielles.

## **1. Introduction**

---

### **1.1. La maladie coronarienne**

---

La maladie coronarienne (MC) est une cause majeure de mortalité dans les pays occidentaux. Aux Etats-Unis, la MC représente 40% de la mortalité totale, soit plus de 520 000 personnes décédées en 1999 alors que plus d'un million d'individus subissent un infarctus du myocarde chaque année. Aux Etats-Unis, le coût de la prise en charge de ces patients se chiffrait en 2002 à 112 milliards de dollars ce qui en fait un enjeu de santé publique majeur.

La MC, pathologie dynamique, est avant tout une maladie de l'endothélium, dont l'évolution complexe implique à la fois des facteurs locaux de la paroi vasculaire artérielle et des facteurs systémiques avec l'activation des cellules circulantes. Dans un premier temps, la dysfonction endothéliale, secondaire à des facteurs exogènes (dont les facteurs de risque traditionnels de la maladie), entraîne l'expression de molécules d'adhésion (P- et E- sélectine, ICAM-1 et VCAM-1) qui permettent l'adhésion des cellules circulantes : plaquettes, neutrophiles et monocytes puis lymphocytes T (LT). L'enrichissement en LDL, la transformation en LDL oxydés et leur phagocytose par les macrophages de la plaque créent des cellules spumeuses et marquent la seconde phase du développement de la plaque d'athérome. Celle-ci est d'abord caractérisée par une intense activité pro-inflammatoire : sécrétion de facteurs chimiotactiques : MCP-1 (Monocytes Chemoattractant Protein -1),  $TNF\alpha$ , IL-1, IL-2...[8], puis destruction de la matrice extracellulaire par les métalloprotéases de la matrice (MMP) et apoptose des macrophages créant des microparticules prothrombotiques riches en facteur tissulaire (FT).

Alors que l'athérosclérose peut rester asymptomatique pendant longtemps, la progression de la maladie est associée à des manifestations cliniques variables pouvant être des symptômes stables ou lentement progressifs, ou instables (syndrome coronarien aigu) incluant l'angine instable, l'infarctus du myocarde et la mort soudaine. Ces manifestations sont en grande partie reliées aux caractéristiques de la plaque athérosclérotique oblitérante. Les plaques stables d'une

part sont relativement peu inflammatoires avec peu de cholestérol dans leur noyau et une coque fibreuse ferme ; elles se calcifient avec le temps, et étant plus fermes et compactes n'ont pas tendance à rompre. Elles sont lentement progressives produisant une ischémie myocardique lorsque les besoins d'oxygène du myocarde sont augmentés sur une plaque occupant 50% ou plus de la lumière. Ceci se traduit cliniquement par une angine à l'effort. D'autre part, il y a la plaque inflammatoire présentant une chape fibreuse mince, un contenu lipidique important. Cette plaque est de plus fortement infiltrée de monocytes/macrophages et de lymphocytes présentant une forte activité apoptotique. Ces plaques sont dites vulnérables et peuvent se rompre sous l'effet du stress hémodynamique entraînant ainsi la formation d'une thrombose endoluminale causant la progression rapide de l'obstruction coronarienne et un syndrome coronarien aigu secondaire. [9, 10]. A ce stade, des premières thromboses superficielles peuvent survenir lors d'une fissure de la couche endothéliale avec exposition à la circulation de la matrice sous endothéliale et de la libération de débris de la plaque. Ces thromboses participent à la réduction de la lumière vasculaire en favorisant un processus de fibrose, une rupture plus profonde de la plaque, une thrombose massive et une occlusion totale de l'artère.

L'angine instable est considérée comme un état intermédiaire précurseur de l'infarctus aigu du myocarde. L'infarctus est une nécrose myocardique secondaire à une ischémie myocardique prolongée ; l'athérosclérose coronarienne en est de loin la cause la plus fréquente [9, 10].

En résumé, la maladie coronarienne est une affection plurifactorielle mettant en jeu des facteurs exogènes et des phénomènes inflammatoires, immunitaires et thrombotiques au niveau des plaques actives avec répercussions systémiques

## **1.2. Les plaquettes**

---

Les plaquettes sont des éléments circulants sanguins anucléés, de petite taille (2-4  $\mu\text{m}$ ) présents au nombre de 150 000 et 400 000 par microlitre ( $\mu\text{L}$ ) de sang et une demi-vie est de 10

jours dans la circulation sanguine. Longtemps considérées comme de simples éléments passifs du sang participant à la formation du caillot, il a été montré qu'elles possèdent des activités régulatrices de nombreuses fonctions fondamentales de l'homéostasie vasculaire : hémostasie, coagulation, inflammation, immunité, angiogenèse, apoptose. Leurs principales caractéristiques structurales et fonctionnelles seront présentées dans cette introduction pour terminer sur leur rôle dans la maladie coronarienne en prenant l'exemple du système de l'ADP.

### **1.2.1. Thrombopoïèse**

L'origine des plaquettes est singulière par rapport aux autres cellules sanguines. Les plaquettes sont en effet produites à partir des mégacaryocytes, cellules géantes multinucléées de la moelle osseuse qui, sous l'impulsion de cytokines, se fragmentent passant ainsi à l'état de mégacaryocyte thrombocytoène. Ce dernier produit alors des proto-plaquettes qui subissent une maturation pour donner les plaquettes sanguines. De cette cellule originelle, les plaquettes gardent les granules, les récepteurs, du pré-ARNm ainsi que la machinerie cellulaire nécessaire à la synthèse protéique [11]. Au cours de la vie plaquettaire cet ARN sera progressivement dégradé, permettant ainsi de le considérer comme un marqueur de plaquettes formées récemment, détectable par cytométrie.

Un déficit de production par atteinte de la moelle osseuse (lymphome, leucémie, toxique) ou une augmentation de la destruction périphérique des plaquettes (souvent d'origine auto-immune) conduit à des thrombopénies dont la manifestation clinique extrême se traduit par des saignements pour des concentrations de moins de 40000 plaquettes/ $\mu$ L de sang.

### **1.2.2. Morphologie**

Une des caractéristiques notables de la plaquette est son activabilité associée à une très grande plasticité se traduisant par des changements de formes rapides et drastiques, par des réorganisations du cytosquelette, de la membrane plasmique et enfin par des processus de sécrétion.

Les plaquettes sont de forme discoïde à l'état non activé et présentent un réseau canaliculaire dense qui pénètre à l'intérieur de la cellule et qui est formé par des invaginations de la membrane plasmique, augmentant très significativement la surface exposée au milieu extérieur. Après activation, le disque plaquettaire adopte une forme sphérique avec l'externalisation du réseau canaliculaire et la sécrétion des granules.



**Figure 1: Morphologies de plaquettes non activées et activées**

Image de microscopie électronique de plaquettes au repos, partiellement activées et totalement activées (de gauche à droite) Tiré de Litvinov et coll [12].© ASBMB.

Le cytoplasme, riche en organelles, contient des lysosomes, des mitochondries et des structures granulaires de deux types : granules alpha et granules denses.

Le

Tableau 1 adapté de Rendu *et coll.* [13] regroupe les principaux constituants de ces granules. Les granules alpha renferment notamment des protéines de liaison (fibrinogène, thrombospondine, facteur de von Willebrand, fibronectine), des cytokines (Platelet Derived Growth Factor, Vascular endothelial growth factor (VEGF)...), des facteurs de la coagulation

(Facteurs V, VII), ainsi que des composants du système immunitaire du complément. La face interne de la membrane granulaire contient des molécules d'adhésion (la P-sélectine (CD62-P), l'intégrine  $\alpha$ IIb $\beta$ 3 (GPIIb/IIIa ou CD41/CD61), la GPIV (CD36), la PECAM (Platelet Endothelial Cell Adhesion Molecule ou CD31), le complexe GPIb-IX-V qui seront externalisés lors de la sécrétion par fusion de la membrane granulaire avec la membrane plasmique. Les granules denses contiennent pour leur part des ions ( $\text{Ca}^{++}$ ,  $\text{Mg}^{++}$ ) et des petites molécules organiques (base puriques (ADP, ATP), amines, (sérotonine (5-HT), histamine) permettant notamment le recrutement de plaquettes circulantes et le développement de la cascade de la coagulation à la surface des plaquettes. Leur membrane contient la GPIIb/IIIa, la GPIb, la P-sélectine (CD62P) et le CD63 [13].

**Tableau 1: Composants sécrétés des granules et lysosomes plaquettaires**

ATP : Adénosine-tri-phosphate; ADP : Adénosine-diphosphate; GTP : Guanine-triphosphate; GDP : Guanine-diphosphate; PDGF: Platelet Derived Growth Factor; TGF-  $\beta$  : Transforming Growth Factor  $\beta$ ; FGF-1: Fibroblast Growth Factor-1; VEGF: Vascular Endothelial Growth Factor; IGF-1: Insulin Growth Factor-1; PAI-1: Plasminogen Activator Inhibitor -1; TFPI: Tissue Factor Pathway Inhibitor; APP Amyloid precursor protein; RANTES: Regulated upon Activation, Normal T-cell Expressed, and Secreted. Adapté de Rendu *et coll.* [13].

| Granules denses  | Granules alpha  | Lysosomes  |
|--|---|--|
| <p><b>Nucléotides</b><br/>Adénine: ATP, ADP<br/>Guanine: GTP, GDP</p> <p><b>Amines</b><br/>Sérotonine (5-HT)<br/>Histamine</p> <p><b>Cations bivalents</b><br/>Calcium<br/>Magnésium<br/>Pyrophosphate</p> | <p><b>Molécules d'adhésion</b><br/>Fibronectine, Vitronectine, facteur de von Willebrand, Thrombospondine, Multimérine</p> <p><b>Facteurs et cofacteurs de la coagulation</b><br/>Fibrinogène, Facteurs V, VII, XI, XIII</p> <p>Protéine S, Plasminogène</p> <p><b>Cytokines</b><br/>PDGF, TGF-<math>\beta</math>, FGF-1, VEGF<br/>IGF-1,</p> <p><b>Chemokines</b><br/>CXCL7, Facteur plaquettaire 4 (PF4 ; CXCL4), RANTES (CCL5), CXCL8, <math>\beta</math>-thromboglobuline (pro-CXCL7)</p> <p><b>Inhibiteurs de protéases</b><br/><math>\alpha</math>2-macroglobulin, <math>\alpha</math> 2-antitrypsin, <math>\alpha</math>2-antiplasmin, PAI-1, TFPI</p> <p><b>Système du complément</b><br/>C1 inhibitor</p> <p><b>Divers</b><br/>Immunoglobulines: IgG, IgA, IgM</p> | <p><b>Protéases acides</b><br/>Cathepsines D, E<br/>Carboxypeptidases (A, B)<br/>Collagénase<br/>Phosphatase acide<br/>Arylsulphatase</p> <p><b>Glycohydrolases:</b><br/>Heparinase<br/><math>\beta</math>-N-acétyl-glucosaminidase,<br/><math>\beta</math>-glucuronidase, <math>\beta</math>-galactosidase,<br/><math>\beta</math>-glycerophosphatase,<br/><math>\alpha</math>-D-glucosidase, <math>\beta</math>-D-glucosidase,<br/><math>\alpha</math>-L-fucosidase, <math>\beta</math>-D-fucosidase,<br/><math>\alpha</math>-L-arabinosidase, <math>\alpha</math>-D-mannosidase</p> |

### 1.2.3. Physiopathologie

L'hémostase primaire est le phénomène permettant l'occlusion physiologique des brèches vasculaires par la formation du clou plaquettaire. Le pendant pathologique est la thrombose vasculaire constituée par une activation exagérée et non régulée des plaquettes qui entraîne la formation d'un thrombus occluant partiellement ou totalement le vaisseau. Ces deux phénomènes constituent les deux facettes de l'interaction entre les plaquettes et le système de la coagulation.

La conception de la thrombose n'est cependant pas limitée à ces deux aspects car de nouvelles données indiquent que des phénomènes inflammatoires [14] et immunitaires [15] et la formation du caillot sont intimement liés. Les plaquettes, par leurs produits de sécrétion, participent par exemple au développement d'un état pro-inflammatoire local, chimiotactique pour les leucocytes. Pour former un thrombus, les plaquettes circulantes doivent d'abord adhérer de façon transitoire puis fermement à la paroi vasculaire pour ensuite recruter d'autres plaquettes au niveau du site d'adhésion primaire et enfin former le thrombus par agrégation.

#### 1.2.3.1. Adhésion plaquettaire

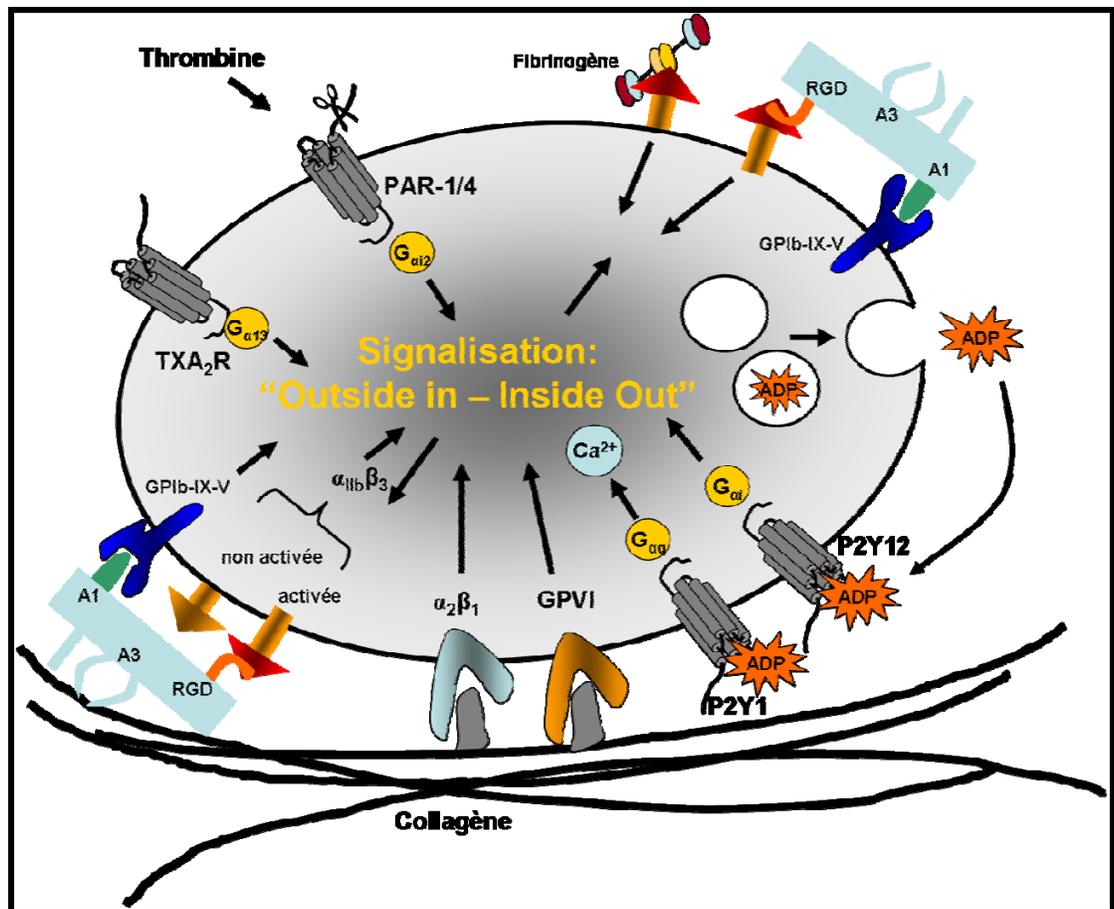
La première phase est largement dépendante du flux sanguin et de la contrainte de cisaillement appliquée sur les cellules. Dans un environnement veineux, à taux de cisaillement faible (inférieur à  $500 \text{ s}^{-1}$ ) l'adhésion est principalement dépendante des récepteurs GPVI, GPIaIIa qui fixent le collagène du sous-endothélium vasculaire et à la fibrine. Dans le cas d'une contrainte de cisaillement supérieure, de type artériel ( $1\ 500 - 3\ 000 \text{ s}^{-1}$ ), la liaison de la GPIb-IX-V au domaine A1 du facteur de von Willebrand (vWF) va permettre l'adhésion transitoire des plaquettes sur la surface thrombogène. Ce ralentissement permet le roulement, l'adhésion des plaquettes au collagène par les récepteurs GPVI et GPIaIIa et au vWF via la GPIIb/IIIa et

l'immobilisation de la plaquette. Il est maintenant reconnu que la liaison du vWF à la GPIb-IX-V lors du roulement et de l'adhésion ferme induit une signalisation de type « inside-out », entraînant l'activation des intégrines GPIIb/IIIa et GPIa/IIa induites par une mobilisation du calcium intracellulaire. Cette vague calcique est permise par l'association au sein de microdomaines riches en glycosphingolipides [16] de GPIb avec la protéine adaptatrice 14-3-3 $\xi$ , la PI-3 Kinase, du cytosquelette et de plusieurs autres protéines qui permettent l'activation de la phospholipase C  $\gamma$ 2 (PLC  $\gamma$ 2) [17]. L'augmentation du calcium intracellulaire induit de plus une sécrétion d'ADP qui, par l'activation paracrine du récepteur P2Y<sub>1</sub> couplé à la protéine Gq, amplifie la vague calcique via la PLC  $\beta$ 2. Le récepteur P2Y<sub>12</sub> intervient dans un second temps pour la formation et la stabilisation des agrégats plaquettaires. GPVI joue un rôle important dans l'activation plaquettaire alors que GPIa/IIa joue principalement un rôle dans l'adhésion ferme au collagène. Dans des conditions de cisaillement extrêmes telles que celles retrouvées dans des artères sténosées ( $> 10\,000\text{ s}^{-1}$ ) l'adhésion plaquettaire est au contraire liée à un mécanisme indépendant de l'activation plaquettaire décrit récemment par Ruggeri *et coll.* [18].

### 1.2.3.2. Agrégation plaquettaire

La phase d'adhésion est suivie par l'activation et le recrutement secondaire des plaquettes circulantes grâce à des mécanismes auto- et para-crines mettant en jeu la sécrétion d'agonistes (ADP, sérotonine), de protéines de liaison (thrombospondine, fibrinogène), de granules puis la synthèse et sécrétion de thromboxane A<sub>2</sub>. Ces ligands servent à leur tour de matrice pour le recrutement de nouvelles plaquettes à la surface du thrombus. Les plaquettes ainsi recrutées sont intégrées dans le thrombus plaquettaire. Il est à noter que dans ce mécanisme, et contrairement à la phase d'adhésion, le P2Y<sub>12</sub> joue un rôle de premier plan. L'ADP sécrété par les plaquettes activées recrutées permet l'activation de P2Y<sub>12</sub>, induit l'augmentation du calcium intracellulaire et permet le maintien de l'activation de la GPIIb/IIIa. Goto *et coll.* ont récemment démontré que la stabilité des plaquettes agrégées dans un thrombus formé sur une matrice de collagène en présence de forces de cisaillement dépend d'une signalisation constante via les récepteurs P2Y<sub>1</sub>

et P2Y<sub>12</sub> [19]. La stabilité des plaquettes directement adhérentes au collagène et donc moins dépendantes de l'intégrine GPIIb/IIIa n'est pas modifiée par l'inhibition des récepteurs de l'ADP. De façon intéressante, les auteurs de cette étude montrent de plus que cette signalisation calcique à l'intérieur du thrombus est cyclique avec environ 1 cycle toutes les 2 secondes, correspondant à des cycles sécrétion d'ADP/influx calcique. Cette étude confirme des résultats obtenus par André *et coll.* montre ainsi une diminution de la stabilité des thrombi formés chez des souris P2Y<sub>12</sub> <sup>-/-</sup> [20].



**Figure 2: Principaux systèmes de récepteurs mis en jeu dans l'adhésion, l'activation et l'agrégation plaquettaire**

L'adhésion via le collagène à de basses forces de cisaillement et le vWF à des forces de cisaillement plus élevées est suivie par l'activation plaquettaire (via une signalisation « outside-in » permettant l'activation de la GPIIb/IIIa, l'activation de la synthèse de Thromboxane A2 (TXA2) et la sécrétion de granules (via une signalisation « Inside-out » Adapté de Ruggeri ZM [21].

### 1.2.3.3. *Plaquettes et coagulation*

Outre leur rôle direct dans la constitution du thrombus, les plaquettes permettent la formation de thrombine, enzyme terminale de la cascade de la coagulation aboutissant à la formation du caillot de fibrine. Lors de l'activation plaquettaire, la phosphatidylsérine, phospholipide anionique présent sur le feuillet interne de la membrane dans les plaquettes non activées, est exprimée à la surface (voir section 1.3.1). La phosphatidylsérine permet la liaison des ions calcium ( $\text{Ca}^{2+}$ ) nécessaires à la fixation des facteurs de la coagulation aux plaquettes. C'est ainsi que les plaquettes activées favorisent la formation de thrombine, enzyme clé de la coagulation et facteur pro-inflammatoire. Les mécanismes mis en jeu lors de la coagulation, non détaillés dans ce mémoire, ont fait l'objet de plusieurs revues récentes [22, 23].

### 1.2.4. **Activation plaquettaire/ thrombose dans la maladie coronarienne et les régulations thérapeutiques : exemple des récepteurs de l'Adénosine diphosphate (ADP)**

Comme nous l'avons vu précédemment, l'activation plaquettaire est un phénomène multifactoriel et multiphasique, où interviennent des acteurs de natures variées (cellulaires, protéiques, ioniques...). Parmi les produits de sécrétion plaquettaire, l'ADP participe largement à l'activation des plaquettes circulantes et à leur recrutement secondaire à la paroi ou dans le thrombus. Les récepteurs purinergiques sont des récepteurs couplés aux protéines G (RCPG) à sept domaines transmembranaires et activés par l'ADP. Parmi cette classe de récepteurs qui compte quatorze représentants, seuls le  $\text{P2Y}_{12}$  et le  $\text{P2Y}_1$  sont exprimés à la surface des plaquettes.

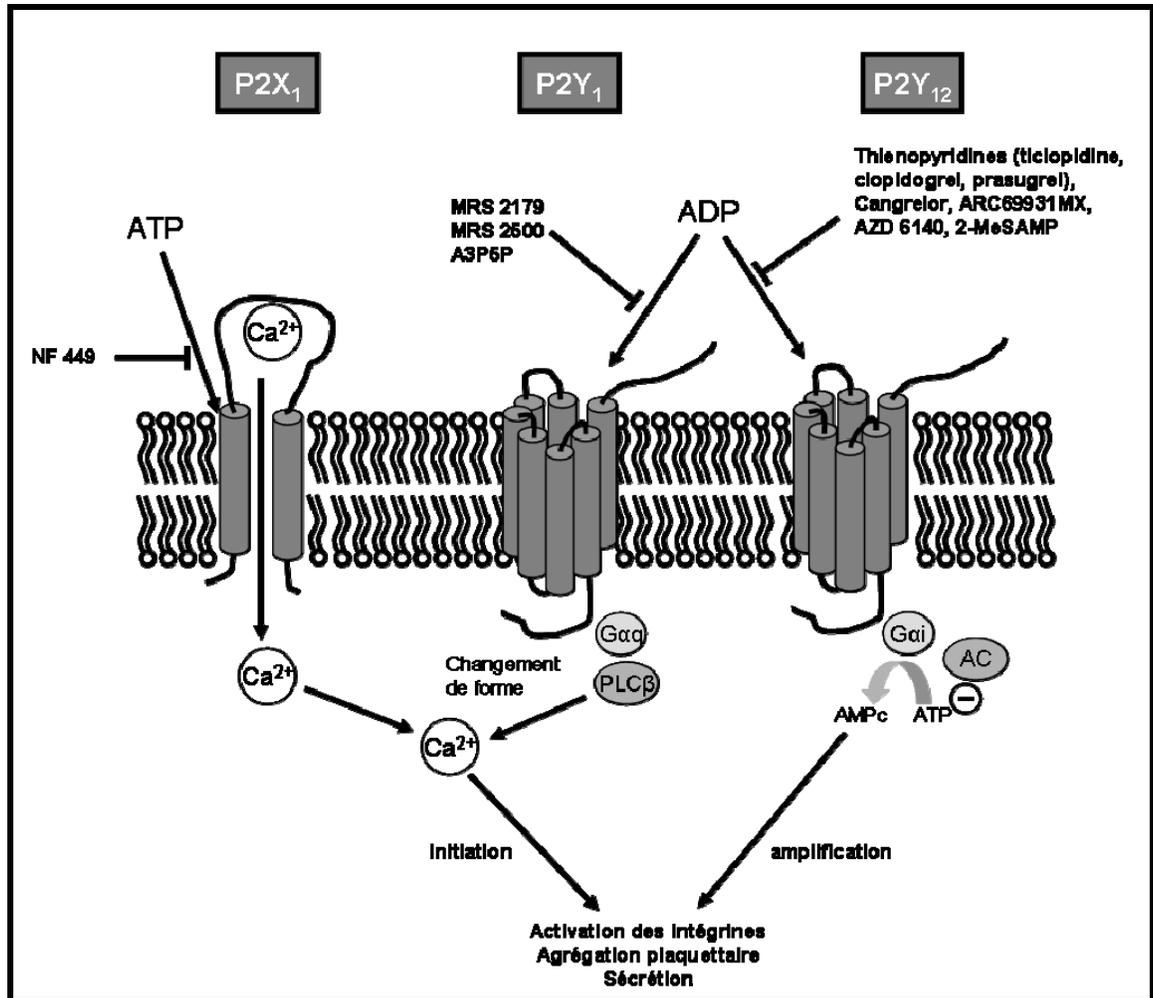
#### 1.2.4.1. *Rôles des récepteurs purinergiques plaquettaires*

Le récepteur  $\text{P2Y}_{12}$  a été le premier récepteur de l'ADP décrit dans les plaquettes. Son rôle est de renforcer l'activation plaquettaire et la stabilisation des agrégats plaquettaires formés. Il est couplé à une protéine  $\text{G}_{\alpha i}$  qui inhibe l'adénylate cyclase, active la phospho-inositide 3 kinase (PI3Kinase) ainsi que le récepteur au fibrinogène, la GPIIbIIIa [24, 25]. Le  $\text{P2Y}_{12}$  est le seul

récepteur de l'ADP impliqué dans l'externalisation de la phosphatidylsérine à la surface des plaquettes et régule donc leur activité procoagulante. *In vitro*, le P2Y<sub>12</sub> est inhibé spécifiquement principalement par l'ARC69931MX et le 2-MESAMP.

Le récepteur P2Y<sub>1</sub> (1 000 à 2 000 récepteurs par plaquette) est le premier récepteur cloné impliqué dans l'activation et l'agrégation plaquettaire. Il est couplé à une protéine Gα<sub>q</sub>. Il est responsable de la mobilisation calcique, du changement de forme des plaquettes suite à leur activation par l'ADP et d'une agrégation transitoire en réponse à l'ADP. Pour obtenir une agrégation maximale à l'ADP, la co-activation de P2Y<sub>1</sub> avec P2Y<sub>12</sub> est nécessaire. P2Y<sub>1</sub> active également la phospholipase C et PKC. Les inhibiteurs pharmacologiques sont des analogues de l'ADP (A2P5P, A3P5P) ou des composés de la famille des MRS (MRS2179, MRS2500).

Le troisième récepteur purinergique présent sur la plaquette est le canal ionique P2X<sub>1</sub>, non couplé aux protéines G et dont l'agoniste spécifique est l'adénosine triphosphate (ATP). Incapable d'initier à lui seul l'activation et l'agrégation plaquettaire en condition statique, il agit en tant que co-activateur en condition de flux pour l'activation des plaquettes sur matrice de collagène et lors de l'agrégation induite par le cisaillement (SIPA). A l'heure actuelle, seul un antagoniste est connu, le NF449 [25].



**Figure 3: Récepteurs et voies de signalisation des récepteurs purinergiques dans les plaquettes**

ADP : Adénosine diphosphate, ATP : Adénosine triphosphate, Ca<sup>2+</sup> ion calcium, Gαq : protéine G αq, Gαi : protéine G αi, AC Adénylate cyclase, PLC-β, AMPc : Adénosine monophosphate cyclique. Adapté de Gachet *et coll.* [25].

#### 1.2.4.2. Les récepteurs purinergiques en thérapeutique : efficacité et résistances

Le récepteur P2Y<sub>12</sub> est la cible de plusieurs médicaments, en premier lieu les dérivés de type thiényridine (ticlopidine, clopidogrel et prasugrel, actuellement en développement clinique), les analogues de l'ATP (cangrelor) et enfin les molécules non thienopyridine (AZD6140 et PRT060128). Le clopidogrel est actuellement un des principaux médicaments prescrits en traitement et en prévention secondaire des syndromes coronariens aigus et événements thrombotiques aigus.

Le clopidogrel a cependant fait l'objet d'une controverse concernant l'existence de patients « résistants » ou « moins répondeurs » au traitement. Cette notion qui apparaît dans la littérature au début des années 2000, notamment avec l'article de Gurbel *et coll.* [26], semble principalement basée sur des paramètres biologiques car aucune étude clinique ne vient soutenir l'hypothèse d'un lien entre une mauvaise inhibition de l'agrégation plaquettaire et un mauvais pronostic. Depuis, plusieurs facteurs ont été proposés pour expliquer la variabilité des réponses des patients au clopidogrel : des interactions médicamenteuses, notamment avec les statines [27, 28], des mutations du cytochrome P450 2C19 métabolisant le clopidogrel [29], la consommation de tabac [30] et une différence pré-existante de fonctions plaquettaires [31]. Cependant, si ces différences sont détectables au niveau des tests d'agrégation plaquettaire, leur significativité clinique n'est pas encore prouvée.

La méthodologie adoptée pour mesurer les fonctions plaquettaires est un des points de la controverse : celle-ci varie selon les laboratoires et ne fait pas encore l'objet de consensus. La méthode standard reste l'agrégation plaquettaire selon la méthode de Born, cependant d'autres méthodologies ont été proposées et sont en cours de validation (l'index de phosphorylation de VASP ou Vasodilator Stimulated Phosphoprotein, PFA-100, dosage du clopidogrel et de son métabolite...). Ces techniques donnent des résultats variables et jusqu'à maintenant aucune étude ne montre de corrélation entre les résultats et une éventuelle résistance clinique. Au cours de mon doctorat j'ai montré que (1) les effets du clopidogrel mesurés en agrégation optique semblent différer selon l'anticoagulant utilisé (antithrombine ou citrate de sodium et (2) que dans ces conditions, la mesure de l'agrégation plaquettaire 6 minutes après l'ajout de l'ADP pourrait mieux représenter l'activité inhibitrice de la stabilisation des agrégats par le clopidogrel que la mesure au pic d'agrégation qui dépend en grande partie de P2Y<sub>1</sub> [1].

La principale difficulté du débat sur la significativité des tests biologiques, réside dans le fait que le phénotype d'agrégation n'a pas été relié au devenir clinique du patient dans une étude randomisée. Plusieurs études ont fait évoluer le concept de résistance au clopidogrel.

Une récente étude de Michelson *et coll.* a montré que les niveaux d'agrégation avant et après clopidogrel sont corrélés chez des donneurs sains. Cette étude montre de plus que la variabilité de la réponse à une agrégation à l'ADP est identique chez 600 patients traités ou non par du clopidogrel, suggérant que la réponse au clopidogrel est en partie due à la variabilité intrinsèque de la réponse à l'ADP chez les patients [31].

Les taux circulants du clopidogrel et de son métabolite seraient aussi des facteurs majeurs de l'inhibition de l'activité plaquettaire. Des études de polymorphisme montrent que les patients présentant une mutation ponctuelle sur le cytochrome P450 2C19 ne métabolisent que partiellement le clopidogrel et présentent une activité plaquettaire résiduelle plus élevée. Chez les patients dont l'activité plaquettaire est la moins diminuée, le taux d'évènements à un an est augmenté par rapport au groupe sans mutation [29, 32]. Par contre l'inhibition par les statines d'une autre isoforme cytochrome P450, le CYP3A4, ne semble pas reliée avec une augmentation des évènements cliniques [33, 34]. Les cytochromes CYP3A5 et le CYP2C9 sont aussi impliqués dans le métabolisme du clopidogrel mais n'ont pas fait l'objet d'étude dans le cadre de mécanisme de résistance au clopidogrel. Dans une étude faite chez le lapin, Wong *et coll.* montrent que l'agrégation plaquettaire ne reflète que partiellement l'activité antithrombotique *in vivo*, qui par contre est reliée au taux d'occupation des récepteurs P2Y<sub>12</sub> par le clopidogrel [35].

Au niveau clinique, une des principales causes d'échec de traitement de prévention secondaire chez des patients non hospitalisés (pseudo-résistances au clopidogrel) serait le défaut d'observance au traitement, diminuant ainsi les niveaux sanguins du clopidogrel et de son métabolite actif [36]. Ceci est d'ailleurs relié à la notion de rebond à l'arrêt du clopidogrel, apparue récemment dans la littérature mais qui était depuis longtemps suspecté par les cliniciens. Un arrêt du traitement est en effet associé à une augmentation significative des évènements dans les 90 jours suivant l'arrêt [37]. Enfin, une étude récente a montré que, chez les patients présentant un infarctus du myocarde avec élévation de l'onde ST (STEMI), le clopidogrel est moins bien absorbé au niveau intestinal, entraînant un pic de concentration sanguine plus tardif

(T<sub>max</sub> allongé) et une concentration maximale circulante plus faible du clopidogrel ou de son métabolite. Dans ces conditions, les patients STEMI ont une imprégnation par le clopidogrel moins intense et retardée, entraînant une moindre inhibition de l'agrégation plaquettaire, même 24h après la prise de clopidogrel [38].

En conclusion, le terme de « résistants » au clopidogrel semble excessif face aux données disponibles et devrait être remplacé par le terme « mauvais répondeurs ». Les deux principaux déterminants du niveau de fonction plaquettaire sous clopidogrel semblent être : la fonction plaquettaire de base et la concentration circulante du clopidogrel ou de son métabolite. Se posent alors deux questions : (1) une augmentation des doses de clopidogrel permet-elle d'améliorer la réponse des patients présentant une activité plus élevée ? (2) le traitement par clopidogrel nécessite-t-il un suivi thérapeutique par le dosage du clopidogrel et de son métabolite circulants ? La première question a reçu un élément de réponse avec l'étude de dose randomisée menée par le Dr Philippe l'Allier sur 150 patients avec maladie coronarienne à laquelle nous avons participé [3]. Cette étude montre qu'un schéma d'administration du clopidogrel allant jusqu'à 1 200 mg en 24h permet de diminuer le nombre de patients répondant moins bien au clopidogrel, sans augmenter les effets indésirables. La réponse à la seconde question est pour l'instant négative car le lien entre les concentrations de clopidogrel d'une part et la réduction du nombre d'évènements cliniques d'autre part est probable mais non démontré. Ainsi la mise en place de ces tests (dosage du métabolite du clopidogrel ou tests d'agrégation plaquettaire) dépend d'une décision de santé publique qui ne peut être prise sans bénéfice prouvé sur la détection des patients à risque.

Aucune molécule ciblant le P2Y<sub>1</sub> ou le P2X<sub>1</sub> n'est actuellement autorisée ou en développement clinique. L'inhibition de la voie P2Y<sub>1</sub> est cependant une voie de recherche active avec notamment le développement des molécules comme le MRS2179 ou le MRS2500 qui a montré une activité et une stabilité améliorée par rapport au MRS2179 après administration chez

la souris [39]. Le P2Y<sub>1</sub> participe à l'adhésion et à l'agrégation plaquettaire et à son inhibition. Nous avons de plus montré que l'association des deux types d'inhibiteurs P2Y<sub>1</sub> et P2Y<sub>12</sub> agissait de manière synergique sur la fonction plaquettaire de patients avec maladie coronarienne stable. Dans un modèle de perfusion de sang total de volontaires sains avec une mesure de l'adhésion et de la thrombose en temps réel sur 9 minutes, l'inhibition des deux types de récepteurs P2Y<sub>1</sub> et P2Y<sub>12</sub> présente des profils d'efficacité différents et synergiques [2]. L'utilisation d'inhibiteurs de P2Y<sub>1</sub> en thérapeutique est donc une voie prometteuse pour l'inhibition de la fonction plaquettaire [40, 41].

### **1.2.5. Les sous-populations plaquettaires (COAT et SCIPs)**

#### *1.2.5.1. Les plaquettes COAT (Collagen And Thrombin activated platelets)*

Les plaquettes de type COAT (ou Coated-platelets) ont été pour la première fois décrites par le laboratoire du Dr Dale en 2000 après activation simultanée par la thrombine et un agoniste direct de GPVI, la convulxine. Ceci a été formalisé dans un article paru dans *Nature* en 2002 [42]. Par la suite cette même équipe a montré la production de plaquettes de types COAT avec d'autres combinaisons d'agonistes (A23187/thrombine, collagène/thrombine) [43]. Kempton *et coll.* ont montré qu'une sous-population plaquettaire, correspondant probablement aux plaquettes COAT, exprime plus fortement les facteurs V, VIII, IX et X après une double activation convulxine/thrombine [44]. Biochimiquement ces plaquettes se caractérisent par une expression à la membrane de phosphatidylsérine et de protéines alpha-granulaires tels que le facteur V fonctionnel, le fibrinogène, le facteur de von Willebrand, la thrombospondine, la fibronectine, et l'alpha-2-antiplasmine [42, 45]. Une des particularités des plaquettes COAT serait que la sérotonine participe à la liaison de ces protéines sur la membrane, comme le montrent des études *in vitro* mais aussi *in vivo* chez des patients traités par des inhibiteurs sélectifs de recapture de la sérotonine (ISRS). Cette fixation serait effectuée par transglutamination, la sérotonine permettant la formation de ponts entre protéines [45, 46]. Une

expression de l'inhibiteur de la voie du facteur tissulaire (TFPI) a également été montrée à leur surface alors que celui-ci n'est pas retrouvé dans les granules alpha, ni exprimé dans les plaquettes : ceci suggère une synthèse à partir des ARNm. De façon surprenante, ce TFPI qui est une protéine liée à la membrane par une ancre GPI (glycosylphosphatidylinositol), qui est généralement retrouvée dans les microdomaines, et relativement protégée de la dégradation dans les plaquettes COAT par rapport aux cellules endothéliales. Ceci suggère une interaction possible entre les phénomènes de transglutamination et les microdomaines [47]. D'autres arguments tendent à renforcer ce lien, comme le fait que le peptide précurseur de la substance amyloïde (APP), protéine liée GPI et connu pour être présent en quantités importantes dans les microdomaines lipidiques, est retrouvé à la surface des plaquettes COAT. Il est à noter que le nombre de plaquettes COAT et l'évolution de la maladie d'Alzheimer sont corrélées [48, 49]. D'autres modifications des lipides ont été mises en évidence : des chiens présentant un syndrome de Scott canin ont une production de plaquettes COAT réduite. Le syndrome de Scott est une maladie autosomale récessive causée par un défaut d'externalisation de la phosphatidylsérine. Ceci entraîne lors de l'activation plaquettaire, une hypocoagulabilité causée par une diminution de la liaison des facteurs Va et IXa et une diminution de la production de microparticules. Les causes de ce syndrome les plus souvent évoquées sont un défaut de la phospholipide scramblase (PLSCR1) ou le défaut de localisation à la membrane du transporteur du cholestérol, l'ATP-Binding Cassette-A1 (ABC-A1)[50]. L'identité précise du ou des transporteurs en cause est cependant encore incertaine [51]. Il est intéressant de remarquer que le phénotype du syndrome de Scott de ces chiens est différent de celui des patients (par exemple ceux présentant une expression déficiente de la PLSCR1 mais normale du transporteur ABC-A1) [52]. Toutes ces données semblent indiquer que la formation de cette sous-population plaquettaire s'accompagne de modifications profondes de la membrane plasmique et que la composition lipidique de cette membrane est un élément déterminant de la formation de COAT-plaquettes.

Outre les IRSS, d'autres médicaments modulent la formation des plaquettes COAT : l'aspirine diminue leur formation, les antagonistes de GPIIbIIIa l'augmentent [53] alors que les statines ne la modifient pas [46].

Indétectables à l'état non activées, ces plaquettes représentent environ 40% de la population plaquettaire après une activation conjointe par la convulxine et la thrombine ; ce pourcentage est reproductible sur une période d'au moins 6 semaines [4]. Deux études ont tenté de relier la production de plaquettes COAT à une pathologie. La première montre que la production de plaquettes COAT est plus faible chez des patients à un stade avancé de la maladie d'Alzheimer que les patients à un stade précoce [48]. Le lien même entre la maladie d'Alzheimer et la membrane plaquettaire n'est cependant pas encore certain. En effet plusieurs études portant sur la fluidité membranaire des plaquettes de patients atteints ou à risque de la maladie d'Alzheimer ont donné des résultats contradictoires [54-57]. Dans la seconde étude, cette sous-population a été mesurée chez des patients présentant des accidents vasculaires cérébraux (AVC) ischémiques lacunaires (thrombose d'une artère profonde) ou corticaux (thrombose d'une artère périphérique du cortex). De façon surprenante, la production de plaquettes COAT était inférieure dans les cas d'AVC lacunaires, par rapport aux contrôles sans AVC qui était elle-même inférieure à la production lors d'un AVC cortical. Il n'existe donc à ce jour aucun lien causal évident entre une pathologie et la production de plaquettes COAT.

Un point important est à souligner après la description de ces données : les plaquettes COAT n'ont encore jamais été retrouvées circulantes chez des patients. Le raisonnement concernant les plaquettes COAT est délicat, car basé sur l'hypothèse sous-jacente qu'une sous-population de plaquettes aurait de façon pré-déterminée un phénotype COAT qui serait exprimé seulement dans certaines conditions d'activation conjointe par la thrombine et le collagène. Cette théorie est séduisante car une lésion vasculaire potentiellement riche en collagène de la paroi et de thrombine formée par la coagulation, permettrait ainsi au phénotype de s'exprimer localement. Ce serait un moyen de cibler l'expression de ces plaquettes pro-coagulantes. Cependant, il n'y a

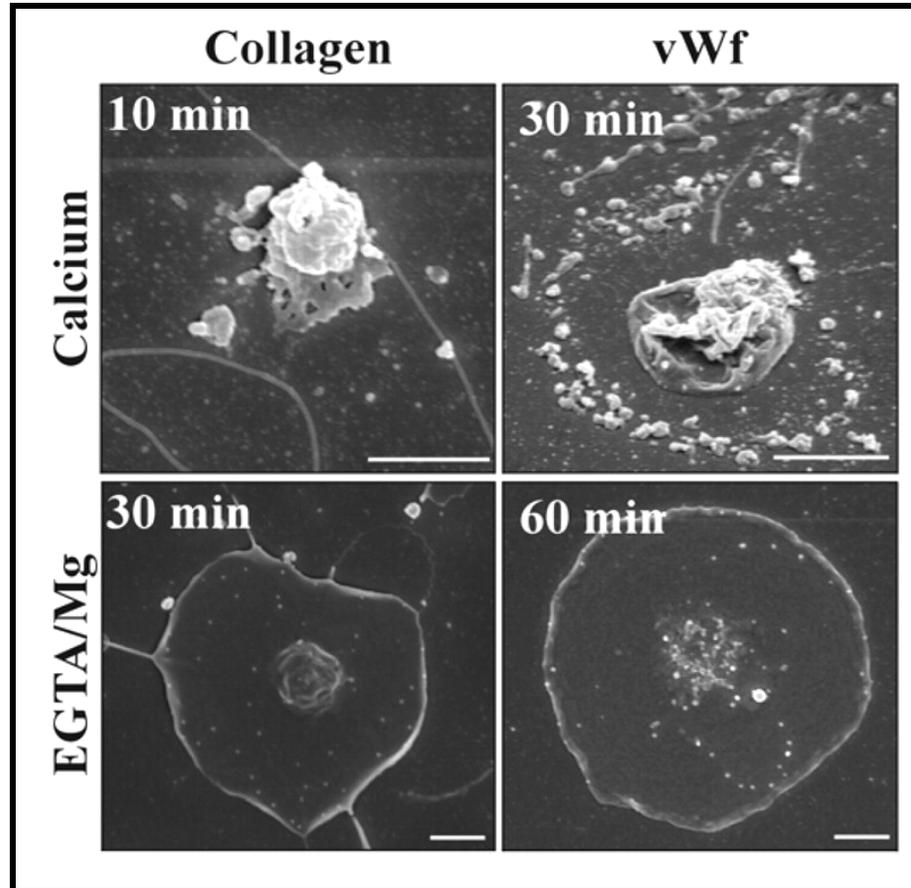
pour l'instant aucune preuve que ces plaquettes existent dans la circulation et les premiers essais cliniques semblent montrer des résultats non univoques.

C'est en partant de ce constat et aussi de l'idée que la formation des plaquettes COAT nécessite d'importants réarrangements membranaires après activation ou préexistants, que nous avons cherché à savoir si une sous-population était détectable par quantification de l'OLM.

#### 1.2.5.2. *Les plaquettes SCIPs (Sustained Calcium-Induced Platelet morphology)*

Le terme SCIP pour "Sustained Calcium-Induced Platelet morphology" a été introduit par Kulkarni *et coll.* en 2004 [58]. A la différence des COAT qui sont formées en présence d'agonistes solubles, les SCIPs ont été étudiées à partir d'un essai d'adhésion sur collagène, vWF et verre en présence de calcium dans des conditions statiques ou en flux. Elles ont été définies dans un premier temps comme ayant une morphologie particulière : une structure centrale ronde (2-5µm) entourée de nombreux petits fragments (voir Figure 4). Au niveau biochimique ces plaquettes expriment fortement la phosphatidylsérine, conséquence de l'influx calcique prolongé leur conférant ce nom. Au point de vue fonctionnel, la formation de ces plaquettes est dépendante de la calpaïne, du facteur XIII de la coagulation, de certaines molécules d'adhésion (GPVI, GPIIb/IIIa). Comme pour les COAT, la fonction transglutaminase portée ici par le facteur XIII semble tenir une place importante dans la formation de ces plaquettes ; une inhibition de l'activité transglutaminase réduit de moitié la quantité de SCIPs. La principale modulation fonctionnelle mise en évidence est l'inhibition de la fonction de la GPIIb/IIIa chez les SCIPs. Ceci suggère que ces plaquettes sont pro-coagulantes, qu'elles produisent des microparticules mais sont anti-aggrégantes. Une possible conséquence en serait la régulation négative par les plaquettes elles-mêmes de la formation des thrombi [58]. L'étude suivante de Kulkarni *et coll.* a montré que ces plaquettes avaient une affinité augmentée pour les neutrophiles avec notamment une production du facteur chimiotactique PAF (Platelet Activating

Factor) permettant possiblement de privilégier l'adhésion des leucocytes à la surface du thrombus [5].



**Figure 4: Morphologie de plaquettes SCIP visualisées en microscopie par contraste de phase**

Morphologie de plaquettes adhérentes sur collagène ou vWF. En présence de 1 mM de  $\text{CaCl}_2$  les plaquettes adoptent une morphologie de type SCIP sur les deux substrats avec production à la périphérie de fragments cellulaires. En l'absence de calcium (EGTA/Mg), l'étalement est régulier. Tiré de Kulkarni *et coll.* 2004 [58] ( barre = 10  $\mu\text{m}$ ) © ASBMB.

En conclusion, ces deux sous-populations de plaquettes, malgré la différence des méthodes d'études, montrent des similitudes de formation et de fonction. Toutes deux présentent une expression augmentée de phosphatidylsérine à la membrane, nécessitent une activité transglutaminase, ont des morphologies rondes, avec émission de microparticules et leur formation est dépendante de récepteurs d'adhésion, notamment GPVI. La formation des deux

sous-populations est favorisée par une co-activation en présence d'un agoniste soluble. Ces sous-populations montrent une modification de l'affinité de la GPIIbIIIa mise en évidence par l'augmentation de la production de COAT par les petits inhibiteurs de GPIIbIIIa (tirofiban, eptifibatide) et le défaut d'adhésion plaquettes-plaquettes des SCIPs. Il est intéressant de noter que les SCIPs présentent une liaison réduite de l'anticorps PAC-1 qui lie le site de liaison du fibrinogène sur la GPIIbIIIa. Ce défaut de liaison pourrait s'expliquer par une inhibition de l'activation, mais aussi par l'occupation des sites de liaison par du fibrinogène lié à la membrane de manière comparable aux COAT, bloquant ainsi la liaison du PAC-1. Il est donc fortement possible que ces deux sous-populations ne soient que deux expressions d'une même sous-famille de plaquettes activées. Ces plaquettes pourraient localement détourner une partie de la population plaquettaire pro-agrégante vers des phénotypes pro-coagulants et pro-inflammatoires pour réguler la croissance du thrombus vasculaire et induire un recrutement leucocytaire.

#### **1.2.6. Les microparticules de plaquettes**

Les microparticules (MP) sont des éléments circulants dérivant de cellules activées ou en apoptose, de petite taille, pro-coagulants et pro-inflammatoires. Leur nombre est notamment augmenté en circulation au cours des syndromes coronariens aigus ou des thrombopathies périphériques [59]. Plus généralement il est possible de retrouver dans la circulation des microparticules de tous les types cellulaires vasculaires : cellules endothéliales, lymphocytes, monocytes par exemple [59]

Lors de l'activation plaquettaire, des MP formées de fragments de membrane plasmique, organisées en sphères, peuvent se détacher par bourgeonnement de la membrane plasmique en emportant les protéines de cette membrane pour aller diffuser dans la circulation. Garcia *et coll.* ont effectué une analyse du protéome des MP plaquettaires produites après activation par 10  $\mu$ M d'ADP et détecté 578 protéines par séparation en SDS PAGE 1 dimension et détection en chromatographie liquide couplée à un spectromètre de masse [60]. Les auteurs ont retrouvé les

glycoprotéines participant aux récepteurs majeurs de la plaquette : les GP Ib, IIb, IIIa, V et IX composant la GPIIbIIIa, récepteur du fibrinogène, du vWF et de la thrombospondine 1 (TSP-1) et la GPIb-IX-V récepteur du facteur de vWF notamment. Logiquement des protéines du système de la coagulation sont aussi retrouvées : les facteurs V et XIII de la coagulation, le fibrinogène, le VWF et la TSP. Certaines cytokines déjà décrites dans les plaquettes sont aussi retrouvées dans ces MP : le RANTES (CCL5), le facteur plaquettaire 4 (PF4 ; CXCL4) et le CXCL7. De façon surprenante, plus de 380 protéines retrouvées en spectrométrie de masse n'avaient pas été retrouvées dans les plaquettes (la phosphomévalonate, une kinase de la chaîne de synthèse du cholestérol par exemple). Pour compléter, Yin *et coll.* ont récemment retrouvé des protéines du système du complément à la surface de MP produites après action du A23187 [15]. Ces protéines sont principalement des régulateurs du système du complément comme le C1 inhibiteur (C1Inh), le CD55 et le CD59. Le récepteur du C1 gC1qR est aussi détecté ainsi que le fragment C3b, le facteur C4 et le complexe lytique C5b-9, signe d'une activation du complément lors de l'action du A23187 [15].

Le mécanisme de formation des MP n'est pas encore précisément indentifié. Biro *et coll.* ont montré d'une part que la composition lipidique des MP est intermédiaire entre celle de la membrane plasmique et celle des membranes résistantes aux détergents (DRM) mais aussi que les MP présentent une concentration en cholestérol élevée, comparable à celle des DRM [6]. Ces éléments rejoignent l'hypothèse soulevée par Del Conde *et coll.* de formation des MP à partir des microdomaines membranaires [61]. Les microparticules plaquettaires sont formées lors de l'activation par les principaux agonistes solubles mais aussi en condition de forces de cisaillement comme ceci a été montré par Dopheide *et coll.* [62] et Reiningger *et coll.* [63]. Sur une matrice constituée par le domaine A1 du vWF et dans des conditions de cisaillement supérieures à  $6\ 000\text{s}^{-1}$ , les plaquettes se déforment à partir de zones nommées Points d'Adhésion Discrets ou DAP, riches en GPIb, qui se lient au domaine A1 du vWF. Ces déformations, dans des conditions de cisaillement très élevé ( $> 30\ 000\text{s}^{-1}$ ) donnent naissance à des filaments

membranaires pouvant atteindre 30 $\mu$ m (soit la taille de 6 plaquettes non activées ou 3 plaquettes adhérentes) puis se fragmenter pour donner des MP d'une taille approximative de 1 $\mu$ m.

Le principal écueil auquel se heurtent les études sur les microparticules est la difficulté de les détecter et de les caractériser. En effet leur taille se situe à la limite des capacités de détection de la plupart des cytomètres en flux. De plus, le dogme établi qui les définissait comme des particules positives à un marquage par l'annexineV est en train de tomber au profit d'une définition plus large. Un article de comparaison des méthodes employées par les principales équipes travaillant sur les MP soulignait les différences d'analyses entre laboratoire et la nécessité d'une standardisation à opérer dans ce domaine [64]. Une étude visant à standardiser la méthode de dosage des microparticules est présentée en annexe de cette thèse par marquage des membranes par le di-4-ANEPPDHQ. (Annexe 2)

### **1.3. Membrane cellulaire et microdomaines membranaires**

Les microdomaines sont des zones particulières de membrane lipidique présentes dans toutes les cellules et qui remplissent des fonctions particulières.

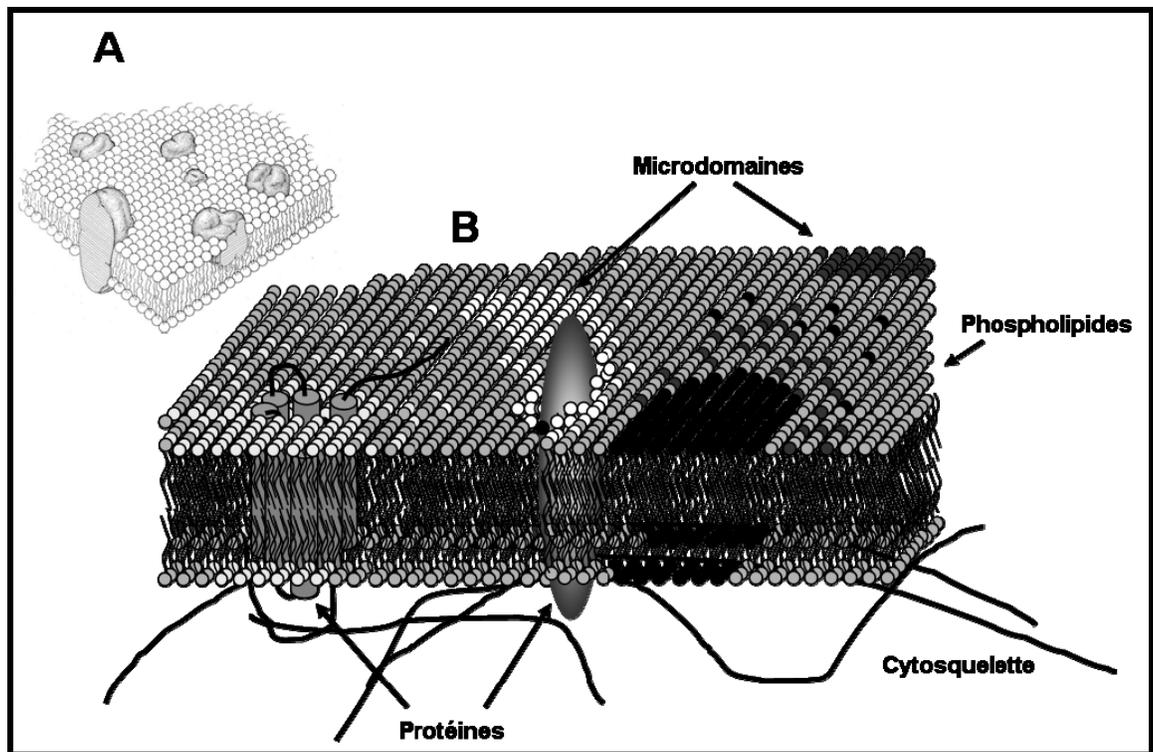
Nous rappellerons dans un premier temps les principales caractéristiques de la membrane plasmique cellulaire, puis nous introduirons le concept de rafts (microdomaines lipidique) en insistant sur les méthodes d'études actuellement à notre disposition.

#### **1.3.1. La membrane plasmique**

La membrane plasmique a été longtemps considérée selon le modèle dit de la « mosaïque fluide » décrit par Singer et Nicolson en 1972 [65] dans lequel les éléments protéiques ou lipidiques constitutifs de la membrane peuvent librement diffuser dans celle-ci. Ce modèle a depuis évolué avec la mise en évidence des microdomaines dont la nature, les méthodes d'étude et les fonctions seront détaillées à partir du paragraphe 1.3.3.

Il existe dans la membrane cellulaire plus de 2 000 types de lipides disposés en un double feuillet qui peuvent s'associer ou se dissocier selon leurs affinités réciproques. Il est possible de

répartir ces lipides en trois classes, les phospholipides (présents en quantité variables : phosphatidylcholine (50%), phosphatidyléthanolamine (10%), phosphatidylsérine (10%)), les glycolipides (sphingolipides (10%)) et les stérols (cholestérol (10%)) [66]. Ces lipides sont répartis de manière asymétrique sur les deux faces de la bicouche, orientant les acides gras hydrophobes vers l'intérieur de la bicouche et les têtes polaires (choline, éthanolamine, sphingosine...) vers l'extérieur de la membrane. Il est maintenant connu que les protéines ne diffusent pas librement, car elles sont le plus souvent incluses dans des complexes multiprotéiques mettant en jeu notamment le cytosquelette cellulaire [67, 68].



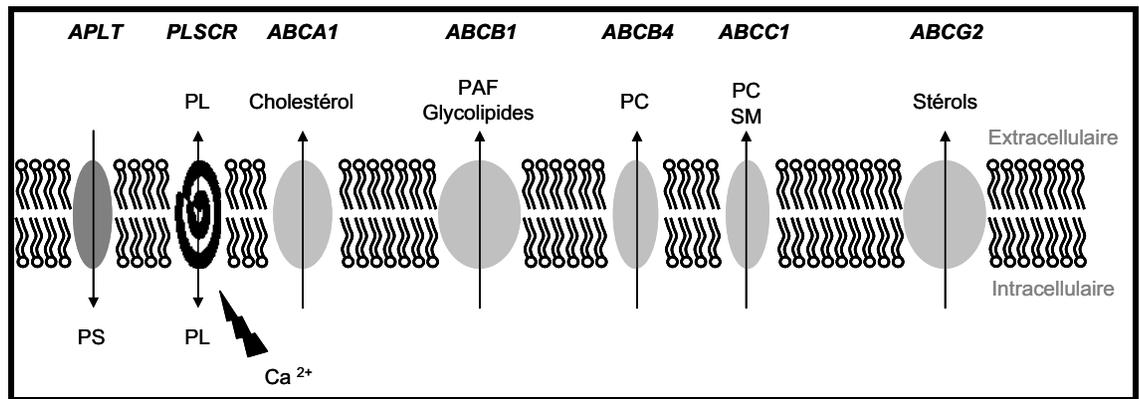
**Figure 5: De la mosaïque fluide aux microdomaines**

(A) Modèle de mosaïque fluide de Singer et Nicholson [65] : les phospholipides sont répartis de façon homogène sur la membrane et les protéines dérivent librement dans la membrane. (B) Conception actuelle des microdomaines de membranes : plusieurs types de microdomaines membranaires sont présents à la surface qui sont formés de lipides ayant des affinités communes. Chaque type de microdomaine inclue des protéines différentes, reliées ou non au cytosquelette qui offre une armature à la membrane.

### 1.3.1.1. Les lipides

Il existe le phénomène naturel et spontané de passage des lipides d'une couche à l'autre de la membrane (flip-flop), tendant à égaliser les concentrations de chaque lipide de part et d'autre de

la bicouche. Cependant des enzymes spécialisées nommées flippases maintiennent un gradient pour créer une asymétrie de membrane. Ces pompes, qui permettent un transfert actif des lipides d'une face à l'autre de la membrane, appartiennent à la famille des ATP-binding cassette (ABC) de type A (ex ABCA1 pour le cholestérol), de type B (ex ABCB1 et 4), de type C (ex ABCC1) et de type G (ex ABCG2) [69]. Le gradient de phosphatidylsérine est maintenu activement par l'Aminophospholipid translocase (APLT) (Figure 6).

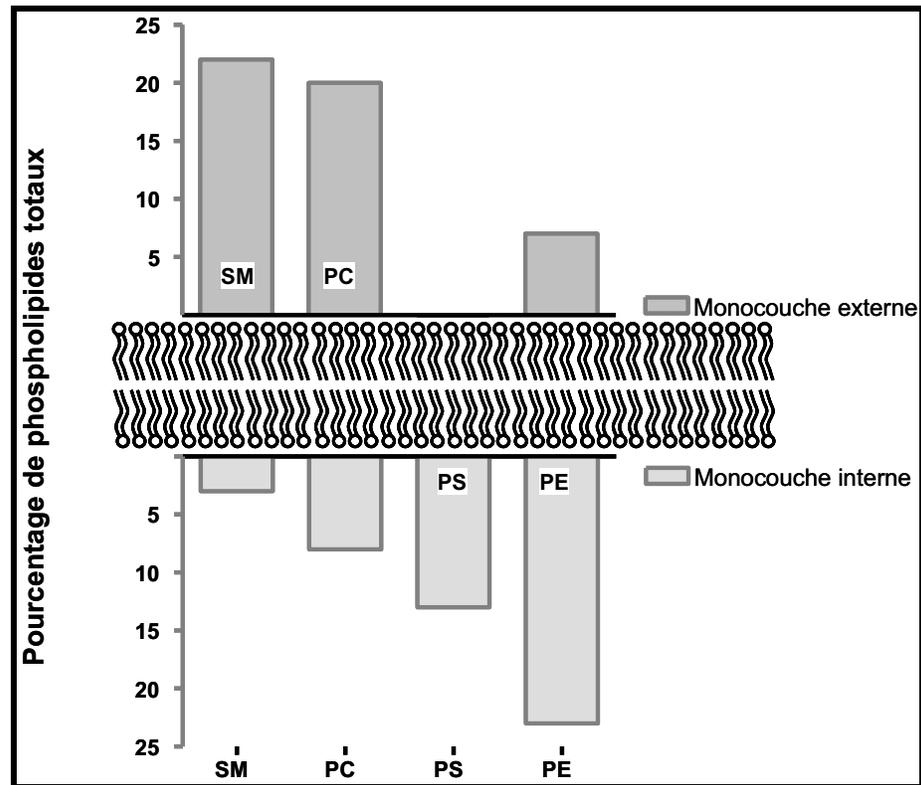


**Figure 6: Schéma récapitulatif des différents transporteurs de lipides dans la membrane plasmique**

APLT : aminophospholipide translocase; PLSCR : Phospholipid scramblase; ABC: ATP Binding Cassette (ABC); PS : phosphatidylsérine; PL : Phospholipide; PAF : Platelet activating factor; PC : phosphatidylcholine; SM : sphingomyéline. Figure adaptée de Daleke D.L [69].

Lors de l'apoptose ou d'une activation cellulaire, ces transports actifs sont arrêtés et la phospholipide scramblase (PLSCR) transfère de façon active et aléatoire les lipides d'une face à l'autre de la membrane, annulant ainsi tous les gradients. Cette activité est mise en évidence notamment par l'apparition de phosphatidylsérine à la membrane extracellulaire lors de l'apoptose [69]. La Figure 7 adaptée de la revue de Hanshaw *et coll.* [70] représente les différences de répartition entre les principaux types de lipides de part et d'autre de la membrane plasmique à l'état basal. La face cytoplasmique de la bicouche est enrichie en

phosphatidylethanolamine (PE) et en phosphatidylsérine (PS) alors que la couche extracellulaire contient la majeure partie de la sphingomyéline (SM) et de la phosphatidylcholine (PC).

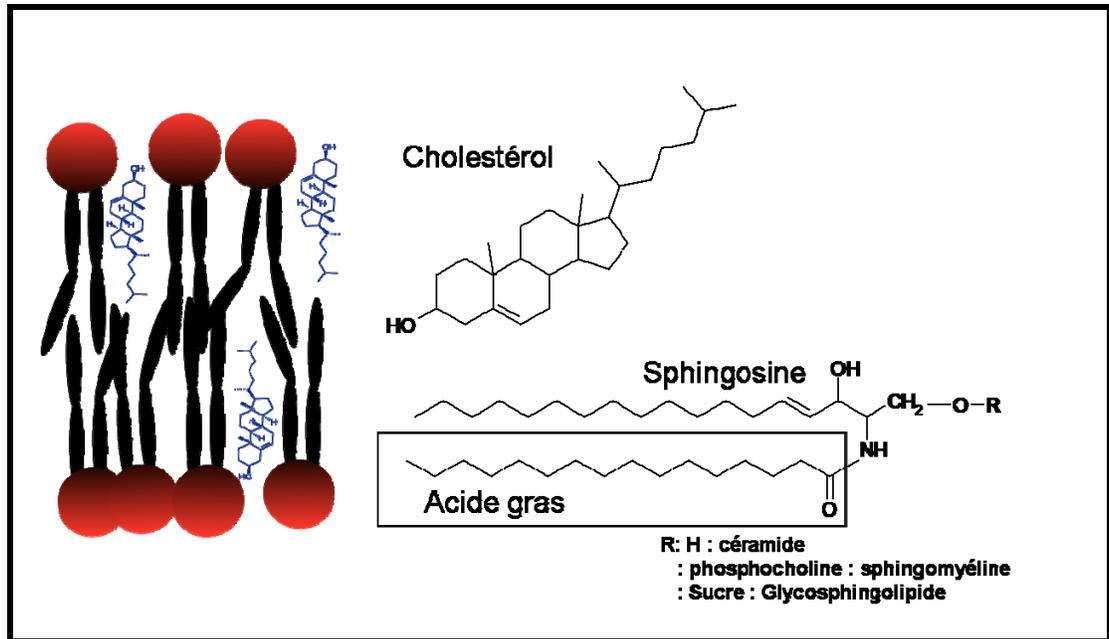


**Figure 7: Répartition des différents types des lipides au niveau de la membrane plasmique**

Phosphatidylcholine (PC), sphingomyéline (SM), phosphatidylethanolamine (PE), and phosphatidylsérine (PS). (B) Figure adaptée de Hanshaw *et coll.* [70].

#### 1.3.1.2. Le cholestérol

Le cholestérol est une molécule composée de quatre cycles carbonés possédant une partie hydrophile et une partie hydrophobe, lui permettant de s'orienter dans la bicouche de la même manière que les lipides (Figure 8).



**Figure 8: Structure de la molécule de cholestérol et de sphingolipides et schéma de son insertion dans la bicouche lipidique**

Le cholestérol est présenté comme pouvant rigidifier la membrane tout en conférant une certaine fluidité des éléments au sein de cette membrane avec la conservation de la mobilité latérale des lipides et protéines. Le cholestérol cellulaire et certains de ses précurseurs, synthétisés au niveau du réticulum endoplasmique sont ensuite transférés directement ou via le trans-Golgi vers la membrane plasmique ou des organelles cytoplasmiques. Le transfert direct est indépendant des vésicules alors que la seconde voie s'effectue par des vésicules permettant de cibler ce cholestérol vers des compartiments membranaires intracellulaires. Ces mécanismes diminuent donc le cholestérol endoplasmique qui représente moins de 1% du cholestérol cellulaire. La majeure partie du cholestérol est contenue dans la membrane plasmique et dans une moindre mesure dans les membranes des organelles. Cependant le cholestérol endoplasmique peut être rapidement mobilisable lors de modification de sa concentration membranaire pour maintenir son homéostasie [71]. Un recyclage du cholestérol membranaire peut s'effectuer par les endosomes. Le cholestérol peut de plus provenir des lipoparticules

circulantes : les LDL en particulier sont endocytées puis métabolisées dans les endosomes pour transférer le cholestérol à la cellule [72].

Le cholestérol tient donc un rôle de premier plan dans le maintien de la fluidité de la membrane et la formation des microdomaines : ceci sera détaillé dans la section 1.3.5.

### 1.3.1.3. Les protéines

Outre les lipides, la membrane plasmique contient une grande quantité de protéines (récepteurs, protéines de signalisation) présentes sur l'une ou l'autre des couches lipidiques ou au niveau transmembranaire. Les protéines peuvent aussi être liées de façon covalente à des ancres glycosylphosphatidylinositol (GPI) qui sont incluses dans le feuillet externe de la membrane. Ces ancres permettent aussi un ciblage des protéines vers des zones particulières de la membrane telles que les microdomaines qui en sont particulièrement enrichis.

Il est à noter que le ratio de masse protéines/lipides est égal à 1 dans la plupart des membranes : ainsi une protéine contient dans son environnement immédiat l'équivalent de sa masse en lipides [66].

## 1.3.2. Notions biophysiques

Fluidité membranaire : la fluidité membranaire est définie comme la mobilité latérale ou en rotation des lipides dans le plan de la membrane cellulaire. La fluidité est dépendante de la composition lipidique, notamment des longueurs des chaînes des acides gras des phospholipides [73].

Ordre liquide membranaire (OLM) : il représente la conformation des lipides et notamment de l'arrangement des chaînes acyl des lipides au niveau de la membrane. Cet arrangement est dépendant de la composition en lipides (longueur et saturation des chaînes acyl...), en protéines (charge, conformation...), en sucres (glycation des protéines...). Il est aussi dépendant de facteurs biophysiques comme l'incurvation de la membrane, la température ou encore la pression [73].

Par extension, le terme **OLM** désignera aussi dans cette thèse la mesure par cytométrie de flux de l'Ordre Liquide Membranaire, soit la résultante des mesures d'ordre de tous les compartiments cellulaires sans distinction.

Le tassement lipidique : (« Lipid packing ») il est défini comme dépendant de la distance entre deux lipides [73].

### **1.3.3. Les microdomaines membranaires**

La notion de « radeaux lipidiques » (lipid rafts) ou « microdomaines lipidiques » est un concept récent développé à partir de 1988 [74] et formalisé par Simons et Ikonen en 1997 [75]. Les auteurs présentent alors un modèle de microdomaines lipidiques enrichis en sphingolipides et en cholestérol. Ils montrent de plus que ces domaines sont enrichis en protéines liées aux GPI et attribuent un rôle à ces microdomaines dans l'adressage et le transport des protéines.

Depuis la présentation de ces travaux, l'existence et la fonction des microdomaines lipidiques a donné lieu à des controverses centrées sur la difficulté de définir précisément la nature des microdomaines.

Quatre points sont généralement abordés dans la littérature :

- la composition protéique et lipidique des microdomaines,
- la taille des microdomaines,
- la durée de vie de ces domaines : elle varie selon les modèles d'une centaine de nanosecondes à plus d'une seconde. Ce point est indirectement lié aux deux premiers,
- la signification physiologique et fonctionnelle des microdomaines lipidiques au sein des cellules.

La controverse autour des microdomaines réside principalement autour du fait que, depuis leur découverte, tous les moyens d'étude introduisent par leur méthodologie même (extractions avec détergents, déplétions en cholestérol) des artéfacts ou présentent des limites (microscopie optique) qui ne permettent pas d'atteindre une définition claire.

Dans un premier temps nous poserons une définition des radeaux lipidiques et examinerons les principaux points caractérisant les microdomaines, leur possible implication dans les voies fonctionnelles et les pathologies. Nous aborderons ensuite les méthodes d'étude actuelles des microdomaines, leur importance dans la controverse, et les éléments en faveur de l'existence de tels domaines dans les cellules par rapport aux trois premiers points énumérés précédemment.

#### **1.3.4. Définition formelle des microdomaines membranaires (« lipid rafts »)**

La première définition de consensus des radeaux lipidiques a été donnée lors du Keystone Symposium on Lipid Rafts and Cell Function organisé par Linda J Pike en mars 2006 [76] : *« Les radeaux membranaires sont des domaines de petite taille (10-200 nm), hétérogènes, très dynamiques, enrichis en stérols et en sphingolipides qui compartimentent des processus cellulaires. Des petits radeaux peuvent parfois être stabilisés pour former des plateformes de grandes tailles par des interactions protéines-protéines ou protéines-lipides ».*

Le premier point à noter est le changement du terme « lipid rafts » pour celui de « membrane raft » marquant le passage d'une conception purement lipidique des microdomaines à une conception plus globale intégrant notamment les protéines qui jouent dans certaines structures un rôle majeur. C'est donc une hétérogénéité tant lipidique que protéique qui est incluse dans la définition de LJ Pike. Le second point clé est la taille qui doit être comprise entre 10 et 200 nm, excluant ainsi les « lipid shells » ou « nanoclusters » de taille inférieure et les regroupements de microdomaines et autres complexes de grande taille comme la synapse immunologique. Le troisième point est le haut degré de plasticité présenté par les microdomaines qui ont une structure très dynamique et dépendante d'interactions ou de changements de configuration protéique et lipidique. Le dernier point à relever est la condition de fonctionnalité par leur

participation à des processus cellulaires. Les termes souvent rencontrés dans la littérature de « Detergent Resistant Membrane » (DRM) et de « Liquid Ordered Membrane » (Lo) n'ont pas été retenus. Le terme DRM n'a pas été retenu car les méthodes d'extraction des microdomaines basées sur la résistance aux détergents sont très variables selon les techniques et les laboratoires et forment des artéfacts membranaires non physiologiques qui ne reflètent pas la réalité de la membrane. De même, le terme Lo n'est pas utilisé car l'état de phase Liquide Ordonnée par opposition aux phases Liquides Désordonnés de la membrane plasmique est un état largement fondé sur des modèles artificiels et pas encore totalement accepté dans un contexte cellulaire.

Depuis la parution de cette définition, plusieurs revues de la littérature concernant les microdomaines sont parues et ne remettent en cause ni l'existence des microdomaines ni cette définition [77-80]. Cependant chacune d'elles insiste sur le fait que la notion de « radeau » disparaît au profit de structures extrêmement dynamiques à l'état basal, composées de lipides et de protéines et qui peuvent se réarranger pour former des structures plus stables [78]. Il semble par contre acquis pour tous les auteurs que les microdomaines ont un rôle physiologique.

### **1.3.5. Définition biochimique et fonctionnelle des microdomaines**

- *Les microdomaines sont des domaines riches en cholestérol et en sphingolipides*

Les études concernant les microdomaines dans la littérature les considèrent majoritairement comme des domaines enrichis en sphingolipides et en cholestérol (représentant à lui seul environ 50% des lipides) (Figure 9). Ils sont retrouvés sur tous les types cellulaires ainsi que dans les organelles intracytoplasmiques. L'interaction entre le cholestérol et les sphingolipides en particulier comme la sphingomyéline est un élément important de la formation des microdomaines membranaires. Les études sur des modèles de membrane montrent que l'interaction entre les deux molécules se fait par une liaison hydrogène entre le cholestérol et une des deux chaînes acyl des lipides [81].

- *Les microdomaines sont des domaines de petite taille*

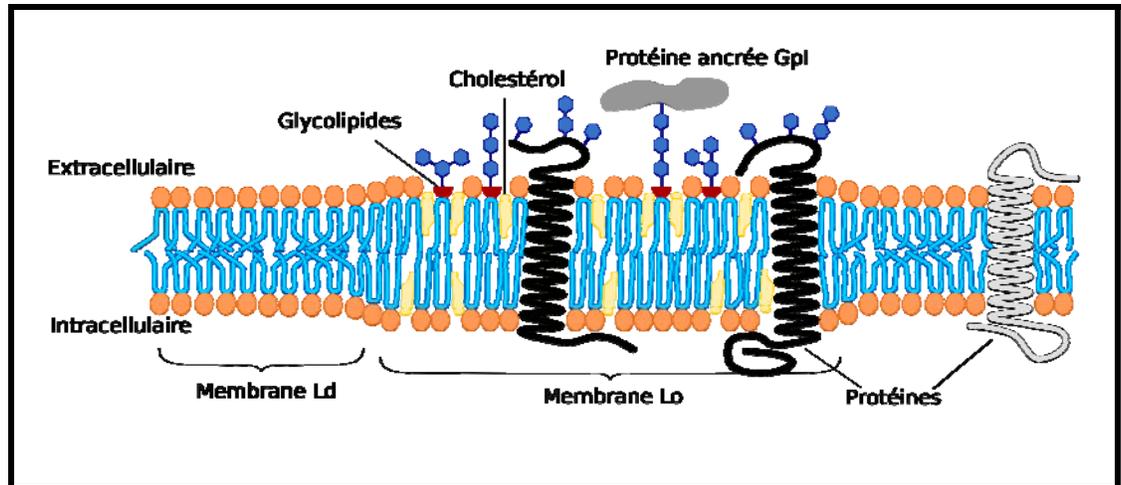
La taille des microdomaines des cellules « activées » tels que décrits classiquement, a été évaluée principalement par des techniques de microscopie (électronique ou confocale à fluorescence) [79, 82, 83]. On estime qu'elle varie entre moins de 100 nm et plusieurs microns [84].

- *Les microdomaines sont des entités fonctionnelles*

La seule notion largement acceptée est celle que les microdomaines constituent des zones particulières d'interaction, de signalisation et de fonction cellulaire. Plusieurs récepteurs sont dépendants des microdomaines : les récepteurs tyrosine Kinase (insuline, EGF), les RCPG (béta 1, béta 2 adrénergiques, P<sub>2</sub>Y<sub>12</sub>...) [84], les récepteurs aux Fc des immunoglobulines (FcγRII) [85] et des canaux ioniques [86]. De très nombreuses protéines sont co-précipitées avec les microdomaines lors d'études protéomiques [87, 88] ouvrant la voie vers de nouvelles interactions possibles.

- *Le cas particulier des cavéoles*

Les cavéoles sont une catégorie particulière de microdomaines qui contiennent sur la face intracellulaire de la membrane un squelette d'une protéine nommée cavéoline. Trois isoformes (Cav 1-3) ont été décrites (18-24 kDa), la forme majoritaire étant Cav-1, excepté dans les muscles (Cav-3). Elles forment une structure rigide sur la face interne de la bicouche lipidique au niveau d'un domaine enrichi en cholestérol, provoquant une invagination de la membrane plasmique. Les cavéolines lient le cholestérol et les protéines cytosoliques et membranaires, jouant ainsi un rôle dans la fonction cellulaire de regroupement de partenaires protéiques [89]. Elles sont particulièrement impliquées dans la formation du NO endothélial et dans la fonction des protéines G [89]. Il faut noter que pendant longtemps, microdomaines et cavéoles ont été confondus car la cavéoline était la seule protéine marquant les microdomaines. Si les cavéoles sont des microdomaines, tous les microdomaines ne sont pas des cavéoles.



**Figure 9: Schéma de l'organisation membranaire des microdomaines membranaires**  
 GPI : Glycosyl-Phosphatidyl Inositol; Ld : phase liquide désordonnée, Lo : phase liquide ordonnée

### 1.3.6. Les outils pour l'étude des microdomaines

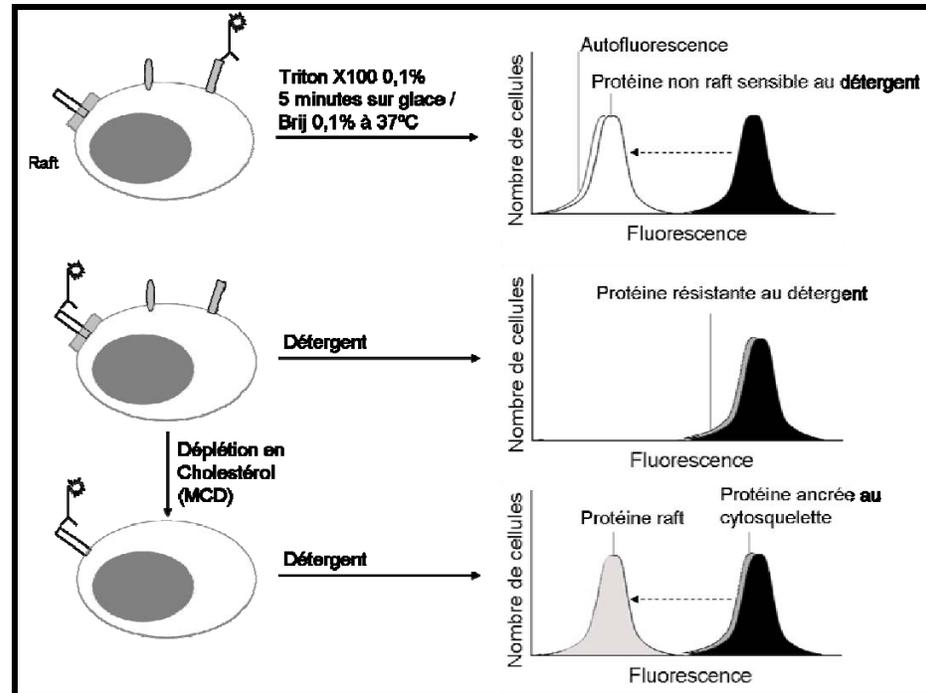
Historiquement, l'étude des microdomaines s'est effectuée en les identifiant à des zones de membrane résistante aux détergents (Detergent Resistant Membranes ou DRM). C'est donc cette méthodologie qui est la plus largement répandue et qui a fourni le plus grand nombre de résultats. Cependant le caractère stringent de ces méthodes vis-à-vis de structures très dynamiques a encouragé le développement d'approches d'imagerie. Celles-ci ne font plus appel à l'usage de détergents mais nécessitent le plus souvent la fixation des cellules rompant ainsi la dynamique membranaire. Le développement de nouvelles approches est donc nécessaire tel que suggéré dans plusieurs revues de synthèses [76, 79] : c'est dans cette optique qu'a été réalisé mon travail de doctorat.

#### 1.3.6.1. Isolement des microdomaines membranaires

##### 1.3.6.1.1. Méthodes utilisant des détergents : les DRM

L'extraction par les détergents est la méthode la plus employée pour démontrer la localisation d'une protéine dans les microdomaines. C'est la méthode historique initiale de séparation des microdomaines, qui a donné la dénomination de Detergent Resistant Membrane (DRM). Il serait

fastidieux de décrire tous les protocoles qui ont été utilisés dans la littérature, tant ils sont variés. La méthode la plus fréquente consiste en une extraction par du Triton X100 1% à 4°C, les fractions étant ensuite séparées par ultracentrifugation sur un gradient de densité de sucrose. D'autres détergents et conditions de température ont été testés [90-92]. Schuck *et coll.* ont ainsi montré que des extractions de DRM par des détergents différents amènent à des variations quantitatives mais aussi qualitatives des DRM [92]. De plus certaines études ont suggéré une fusion des microdomaines ou une redistribution des protéines GPI lors de l'action de détergents [93]. Cette technique-clé de l'étude actuelle des microdomaines recèle ainsi un des problèmes majeurs de la description biochimique des microdomaines. Il apparaît de plus en plus clair qu'il est nécessaire de tenir compte des artéfacts possibles créés par les détergents et qu'il faut éviter d'identifier les DRM aux microdomaines sans prendre davantage de précaution. Le Pr Kai Simons en particulier pose ce constat en préambule de son article récent publié dans *Nature Protocols* décrivant la méthode d'extraction des DRM [94]. Ce défaut des méthodologies a des conséquences au niveau de la conception des microdomaines ainsi que l'indique Pike [95]. Il est à noter qu'une méthode d'étude de la localisation de protéines d'intérêt dans les DRM par cytométrie de flux a récemment été décrite (Figure 6). Cette méthode présente l'avantage de permettre l'étude de cellules individuelles mais l'inconvénient d'être toujours basée sur une action de type détergent sur les cellules [96].



**Figure 10: Principe de la méthode d'analyse de la sensibilité d'antigènes aux détergents par cytométrie de flux**

Cette méthode permet de déterminer la sensibilité des protéines à la déplétion en cholestérol ou aux détergents. Panneau du haut : une protéine non liée aux DRM est extraite par l'action d'un détergent, elle n'est plus détectable par un anticorps spécifique. Panneau du milieu : une protéine résistante aux détergents peut être soit présente dans les DRM, soit liée au cytosquelette. Dans ce dernier cas cette protéine est insensible à l'action de la MCD (Panneau du bas). Adapté de Wolf *et coll.* [96] et de Kiss *et coll.* [97].

#### 1.3.6.1.2. Méthodes sans détergent

Afin d'utiliser des méthodes d'extraction moins stringentes plusieurs techniques ont été proposées.

La première repose sur l'utilisation de carbonate de sodium en milieu basique. Cependant cette méthode ne semble pas permettre une séparation de microdomaines identiques aux DRM (contenu protéique différent) et a donc été écartée [98].

La seconde technique consiste à séparer les membranes cellulaires à l'aide de billes de résine cationique, puis à purifier les membranes des billes par sonication et enfin à séparer les microdomaines des autres membranes par passage sur un gradient de densité. Cette approche est

techniquement lourde et ne sépare que le centième de la cavéoline séparée avec les techniques avec détergents. Les fractions sont de plus enrichies en protéines du reticulum endoplasmique.

La dernière méthode proposée par Mac Donald et Pike utilise des gradients pour séparer les microdomaines des lysats préparés par ultrasons [98, 99]. Cette méthode reste donc très stringente. Il apparaît de plus que le cytosquelette n'est parfois pas séparé totalement des protéines. Ceci induit l'apparition de densités intermédiaires dans le gradient, qui correspondent à un mélange de protéines d'intérêt, d'actine, de protéines du réticulum endoplasmique et de mitochondries [98, 99]. L'artéfact induit par l'utilisation des détergents est donc remplacé par celui introduit par un fractionnement aléatoire de la cellule par ultrasons [100].

Il convient cependant de garder un œil critique sur ces techniques car toutes ces comparaisons sont effectuées par rapport aux fractions isolées par les détergents, qui sont elles mêmes des techniques induisant des artefacts de préparation.

#### *1.3.6.2. Les altérations de la composition lipidique des membranes*

La déplétion en cholestérol est la technique principale pour démontrer qu'une protéine est présente dans les microdomaines par la déstabilisation de ces derniers. L'agent le plus utilisé est la méthyl- $\beta$ -cyclodextrine (MCD) qui chélate le cholestérol (jusqu'à 50 - 90% de la quantité initiale selon les conditions expérimentales) [101]. La spécificité d'action de la MCD tenue pour acquise dans la majorité des articles n'est cependant pas absolue : en effet une faible partie des phospholipides et sphingolipides peut être chélatée par la MCD dans les cellules [102]. Cette méthode pourrait cependant causer des modifications significatives du cytosquelette d'actine [103], des modifications de l'endocytose dépendante de la clathrine [104] et de la diffusion latérale des lipides [105]. Il est de plus maintenant montré que la modification de la concentration du cholestérol des membranes plasmiques n'atteint pas que les microdomaines enrichis en cholestérol [106] et que cette déplétion modifie aussi secondairement tout le contenu en cholestérol des organelles intracellulaires [102]. Quelques études ont utilisé un inhibiteur de la HMGCoA reductase cellulaire (statine) pour inhiber la chaîne de synthèse du cholestérol,

induisant cependant une déplétion plus partielle [105]. Il est à noter cependant qu'il n'y a pas de consensus sur l'effet d'un traitement par une statine sur la conformation de la membrane (fluidité, diffusion des protéines...) [107, 108]. D'autres méthodes de déstabilisation ou de déplétion des microdomaines utilisant la filipine, la progestérone ou un inhibiteur de la synthèse de cholestérol ont aussi été utilisées [109].

Ces deux approches biochimiques complémentaires, qui sont la base des études portant sur les microdomaines, sont donc au cœur des questions entourant leur définition biochimique et leur analogie avec les DRM. Il est d'ailleurs à noter que la notion de DRM n'est pas incluse dans la définition de LJ Pike [76].

### 1.3.6.3. *Microscopie optique*

La microscopie tend à devenir la méthode de référence pour l'étude des microdomaines afin de confirmer les données des DRM. Une des limites de cette technique est qu'elle présente une résolution théorique maximale de 0,2  $\mu\text{m}$ , soit la limite de diffraction de la lumière. Plusieurs approches permettent d'améliorer la résolution des images :

- *la déconvolution* permet de corriger les artéfacts dus au système optique et d'améliorer la résolution et ainsi d'augmenter la précision des calculs de colocalisation sur des acquisitions de microscopie confocale [110]. La déconvolution est un traitement mathématique permettant de tenir compte des aberrations optiques entraînées par le circuit optique du microscope (objectifs, lentilles, filtres...). Ces modifications peuvent être négligeables lors de l'acquisition d'images de structures cellulaires de tailles importantes mais sont rhéidibitoires pour l'analyse d'objets de taille réduites comme les microdomaines ou pour la quantification précise de colocalisation de fluorescences. Ces aberrations constituent la « convolution » qui, typiquement, transforme un objet sphérique (billes de 200 nm) en une image en forme de pyramide inversée ou en forme de X. Lors du traitement de l'image, la calibration d'un système est effectué à l'aide de billes ces billes de 200 nm afin de déterminer des PSF (Point Spread Function) qui permettront de reconstituer

mathématiquement la forme sphérique. Le traitement mathématique défini (PSF) est ensuite appliqué aux séries images confocales en Z (Z-stack). Les facteurs critiques de cette reconstitution sont le facteur matériel (configuration optique, milieu de montage, fluorochrome...) et l'algorithme de traitement (Maximum Likelihood Estimation, Nearest Neighbour...) Dans le cadre de l'étude des microdomaines, il est nécessaire de pouvoir exploiter de façon optimale les acquisitions en microscopie : la déconvolution en est l'étape essentielle.

- le *TIRF (Total Internal Reflection Fluorescence)* permet d'augmenter la résolution à 100 nm environ dans un échantillon posé sur la lamelle de microscopie. Cette méthode tire partie de la diffraction de la lumière du laser lorsqu'il frappe la lamelle sous un angle déterminé. La lumière qui pénètre alors l'échantillon (onde évanescente) jusqu'à une profondeur inférieure à 0,2  $\mu\text{m}$  permet de n'acquérir l'image que sur cette épaisseur limite, inférieure à la résolution de la lumière.
- le *FLIM (Fluorescence Lifetime Imaging Microscopy)* permet de diminuer largement le bruit de fond de l'acquisition améliorant ainsi l'image en mesurant le temps nécessaire au fluorochrome pour retourner à l'état basal. Longtemps réservé à des laboratoires spécialisés, les premiers microscopes FLIM sont maintenant commercialisés [83].
- le *FRAP (Fluorescence Recovery After Photobleaching)* mesure la diffusion de marqueurs fluorescents dans la membrane après le photoblanchiment d'une portion de membrane (bleaching) par une exposition à un laser très énergétique. Le FRAP a aussi été utilisé pour déterminer des sous-domaines membranaires qui ont des caractéristiques distinctes en termes de fluidité.
- le *FRET (Fluorescence Resonance Energy Transfer)* est une approche permettant de détecter l'association entre deux protéines ou entre un lipide et une protéine. Chaque membre du couple étudié est fluorescent et l'association des deux à une distance inférieure à 10 nm (rayon de Förster) permet le transfert de l'énergie de fluorescence de l'un à l'autre,

modifiant ainsi le signal émis par le couple. Cette technique a été utilisée pour détecter des associations de protéines ou de lipides au sein des microdomaines [83].

- *la microscopie 2-photons* a été aussi utilisée pour l'imagerie des microdomaines [111] bien que peu répandue, hormis en immunologie. Cette technologie qui n'est pas considérée comme de la microscopie confocale mais qui s'en approche, permet de faire des acquisitions à l'intérieur des tissus ou sur des profondeurs plus importantes en évitant de sur-irradier l'échantillon pour diminuer le photoblanchiment dû au laser.

Ces développements récents en microscopie ne permettent cependant pas de descendre de façon aisée en dessous de la limite optique et donc ne permettent pas d'acquérir des images de microdomaines (10 - 200 nm selon la définition). Ce problème méthodologique allié à la nécessité dans la plupart des cas de fixer les cellules et ainsi de modifier profondément la dynamique membranaire a également été à la source de nombreuses controverses.

Dans les paragraphes suivants seront décrits les principaux marqueurs et senseurs fluorescents utilisés en microscopie.

Deux types de molécules sont utilisés pour l'acquisition d'images de microdomaines : (1) des molécules possédant le plus souvent une spécificité de liaison pour une protéine ou un lipide et si nécessaire couplées à un fluorochrome seront nommées ici « marqueurs fluorescents » et (2) des molécules s'insérant dans la membrane de façon non spécifique et dont l'émission varie en fonction de l'environnement dans lequel elle est insérée ; ces molécules seront nommées « senseurs fluorescents »

#### 1.3.6.3.1. Les marqueurs fluorescents

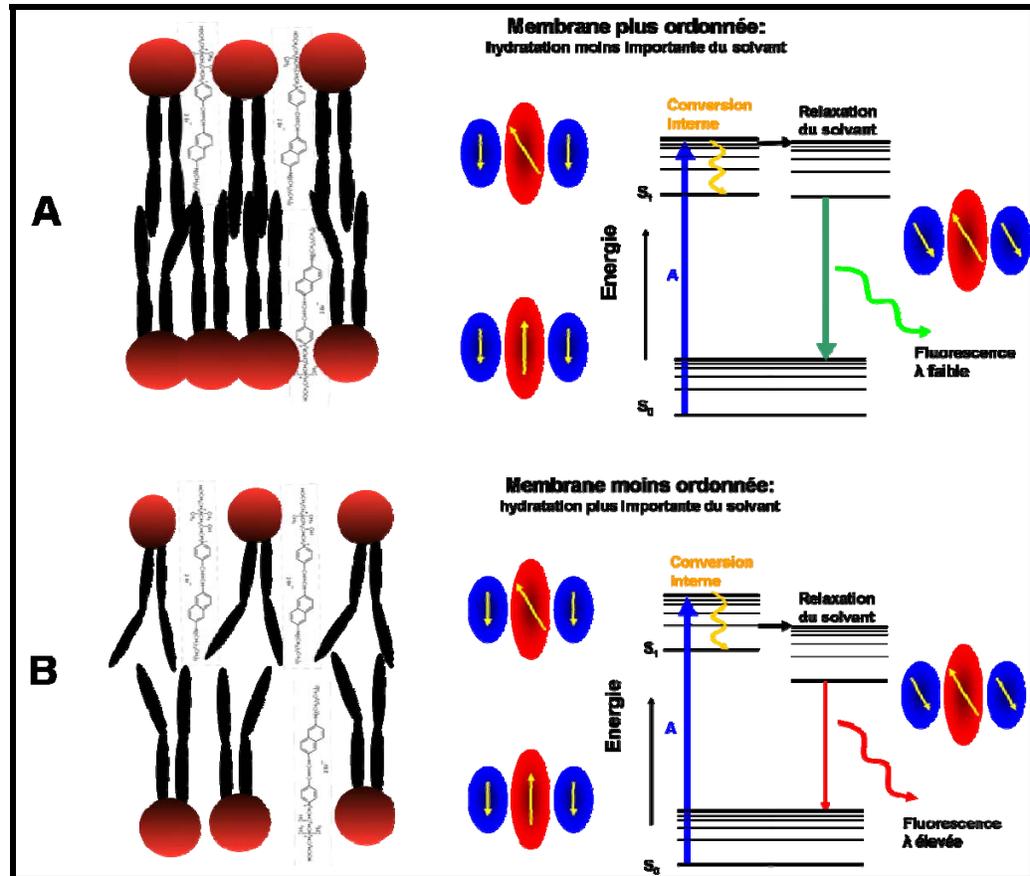
Les marqueurs fluorescents ont été les plus employés jusqu'à maintenant, ciblant principalement des molécules (lipides ou protéines) qui ont été retrouvées dans les DRM ou dont la présence à la membrane cellulaire est sensible à des déplétions en cholestérol (Tableau 2). En

grande majorité, les expériences mettant en jeu ces marqueurs ont été effectuées sur des cellules fixées supprimant ainsi les phénomènes dynamiques membranaires. Les principaux marqueurs utilisés sont (1) la sous-unité beta de la cholera toxine (CTx), directement conjuguée à un fluorochrome ou détectée avec un anticorps secondaire pouvant former des clusters, (2) les analogues du cholestérol et en particulier le déhydroergostérol et enfin (3) les protéines taguées avec la Green Fluorescent Protein (GFP) ou la Yellow Fluorescent Protein (YFP), en particulier la cavéoline permettant des colocalisations de récepteurs ou protéines d'intérêt dans les cavéoles.

#### 1.3.6.3.2. Les senseurs fluorescents

Les senseurs fluorescents présentent pour leur part des propriétés optiques qui dépendent de l'état du micro-environnement membranaire dans lequel ils s'insèrent de manière plus ou moins aspécifique (cette propriété est souvent difficilement cernable), tel que la fluidité ou le tassement des lipides. Le laurdan et le prodan sont les premiers senseurs fluorescents de l'ordre liquide membranaire à avoir été décrits. L'ordre liquide membranaire est le paramètre biophysique associé le plus étroitement à la notion de microdomaine membranaire. Cependant, leur solubilité limitée dans l'eau et le fait qu'ils ne soient excitables qu'en UV, handicapent leur utilisation sur des cellules vivantes. A l'inverse, le di-4-ANEPPDHQ qui a été très récemment décrit [112, 113] est soluble dans l'eau et excitable à 488 nm. La raison de l'utilisation de senseurs repose sur le fait que pour une excitation fixe, ces composés vont émettre à des longueurs d'onde différentes selon leur présence dans une phase liquide plus ou moins ordonnée. Il apparaît maintenant clairement que les variations des spectres des composés de type laurdan et prodan sont dépendantes de la présence d'un solvant polaire par l'effet de relaxation du solvant (Figure 11). Brièvement, après absorption par une molécule à l'état énergétique de base  $S_0$  d'un photon d'une énergie définie, la molécule fluorescente est portée à un niveau énergétique plus élevé mais instable ( $S_n$ ). Pour retourner au niveau énergétique de base, l'énergie doit être émise sous deux principales formes : sous forme de vibration (ou Conversion Interne : CI) et/ou sous forme

de fluorescence à une longueur d'onde plus grande que la longueur d'onde d'excitation, car une part d'énergie est perdue en vibration et en relaxation du solvant. La relaxation du solvant correspond à l'alignement de la polarité des molécules de solvant (le plus souvent l'eau) sur l'axe de polarité du fluorochrome qui transfère ainsi de l'énergie au solvant et contribue au retour à l'état d'énergie basal. Pour les molécules du type du laurdan et du di-4-ANEPPDHQ, la vibration dépend indirectement de l'OLM qui environne la molécule de senseur. En effet, si l'ordre est élevé, le solvant polaire environnant pénètre moins la membrane plasmique, et l'énergie dissipée par la molécule fluorescente vers le solvant sera moindre. Ceci va entraîner l'émission d'une fluorescence plus énergétique, donc à des longueurs d'onde plus faibles. Inversement, un milieu moins ordonné permettra la pénétration du solvant polaire au sein de la membrane plasmique et induira l'émission d'une longueur d'onde plus élevée [73, 114]. Cette propriété est aussi mise à profit par des techniques de microscopie comme le FLIM (Fluorescence Lifetime Imaging Microscopy) qui mesure le délai induit par la relaxation du solvant. Plusieurs facteurs susceptibles d'influer sur la fluorescence du laurdan et, possiblement du di-4-ANEPPDHQ sont décrits dans la littérature : l'ordre liquide membranaire, le niveau d'insertion du senseur dans la bicouche lipidique l'incurvation de la membrane ou encore la pression extérieure. Le décalage du spectre du di-4-ANEPPDHQ étant sous la double dépendance de l'ordre membranaire et de la concentration de cholestérol (bloquant aussi la pénétration du solvant), cela suggère que le mécanisme de fluorescence pourrait être comparable au laurdan [113].



**Figure 11: Représentation schématique du mécanisme de fluorescence du di-4-ANEPPDHQ**

Représentation schématique de l'insertion du di-4-ANEPPDHQ dans des membranes plus (A) ou moins (B) ordonnées. Les figures ovales rouges représentent les molécules de fluorochrome dont l'axe de polarisation est indiqué par la flèche jaune. Par homologie à des aimants, les molécules de solvant avoisinantes (ovales bleus) sont orientées en sens inverse du dipôle du fluorochrome. L'excitation lumineuse permet un changement de l'axe de polarisation du fluorochrome qui se transmet par la suite aux molécules du solvant en perdant une énergie dépendante du milieu. Dans un milieu plus ordonné, (Panneau A) la pénétration de l'eau est limitée par les lipides et le di-4-ANEPPDHQ se trouve ainsi dans un environnement majoritairement apolaire : la relaxation du solvant est donc minimale. Dans un milieu moins ordonné (Panneau B), la présence d'eau augmente la polarité de l'environnement de la sonde, la relaxation du solvant nécessite donc plus d'énergie : ceci diminue l'énergie restante pour la fluorescence qui est émise à une longueur d'onde plus importante. Figure adaptée de : <http://www.olympusconfocal.com/applications/flimintro.html>

Il est à noter que le laurdan peut être un senseur de la fluidité membranaire mais aussi de l'OLM [114]. En effet la mesure de la fluidité peut être effectuée par la mesure de l'anisotropie du laurdan dans la membrane, c'est-à-dire la capacité du laurdan, selon son insertion dans la membrane à modifier la polarisation d'un rayon lumineux. Le paramètre mesuré, nommé  $r$ , diminue lorsque la fluidité de la membrane augmente. La mesure de l'OLM par le laurdan est

effectuée en calculant l'index de polarisation généralisée (Generalized Polarization : GP) qui représente le décalage de longueur d'onde d'émission du laurdan dans les membranes : il augmente avec l'OLM [114]. La valeur du GP est dépendante de l'exposition du laurdan à des molécules de solvants polaires (le plus souvent l'eau). Elle varie de 1 (pas d'effet du solvant ; membrane très ordonnée) à -1 (molécule complètement exposée à l'eau). Cette exposition à l'eau est dépendante de l'ordre liquide au sein de la membrane. Une membrane moins ordonnée autorise l'entrée dans la membrane d'un nombre plus important de molécules d'eau, modifiant ainsi la fluorescence du laurdan. Il est important de noter qu'il est possible dans des modèles de membranes de mettre en évidence le découplage entre la fluidité et l'OLM [114 , 115], ces deux paramètres ne sont donc pas équivalents.

Le di-4-ANEPPDHQ et le laurdan ont de plus une particularité qui est de présenter au sein d'une zone désordonnée la capacité de générer une onde de type seconde harmonique plus élevée que dans la phase ordonnée [113]. La seconde harmonique est un phénomène qui correspond à l'émission par un fluorochrome d'un photon d'énergie double à celle des photons d'excitation [116]. Le spectre de fluorescence du di-4-ANEPPDHQ est donc la résultante des variations d'OLM mais aussi des variations des structures environnantes [112] C'est cette information complexe qu'il est maintenant nécessaire de décoder.

Des approches fluorescentes innovantes ont été progressivement mises en place dans le cadre de l'étude de la dynamique membranaire et des microdomaines avec en particulier le « Single Particle Tracking », dérivé du TIRF et qui permet l'étude de la dynamique d'une seule molécule dans la membrane. Cette approche a notamment été mise en œuvre par le laboratoire du Dr Akihiro Kusumi qui a contribué à renforcer la notion de participation des complexes protéiques sous-membranaires à la formation des microdomaines et la migration des protéines sur la membrane [117].



**Tableau 2: Marqueurs et senseurs fluorescents pour la visualisation des lipides et microdomaines par microscopie optique**

| Marqueurs  | Spécificité   | Avantages   | Inconvénients   | Réf            |
|--|---|---|---|----------------|
| <b>Déhydroergostérol (DHE) et NBD-cholestérol et analogues du cholestérol</b><br>Analogues fluorescents du cholestérol | Insertion dans la membrane par échange avec le cholestérol  | <ul style="list-style-type: none"> <li>Analogue du cholestérol</li> </ul>   | <ul style="list-style-type: none"> <li>Activité sur les microdomaines n'est pas décrite</li> <li>Action de la MCD pour l'insérer</li> </ul>                 | [118, 119]     |
| <b>Filipine</b><br>Antibiotique macrolide  | Liaison au cholestérol pour former des clusters   | <ul style="list-style-type: none"> <li>Marque sélectivement le cholestérol</li> </ul>   | <ul style="list-style-type: none"> <li>Déstabilisant les microdomaines selon la concentration</li> <li>Excitation UV</li> </ul>                             | [120]          |
| <b>Perfringolysin O (BCtheta)</b><br>Hémolysine de Clostridium perfringens   | Liaison au cholestérol de la membrane   | <ul style="list-style-type: none"> <li>Marque sélectivement le cholestérol</li> </ul>   | <ul style="list-style-type: none"> <li>Spécifique du cholestérol et non des microdomaines</li> </ul>  | [121, 122]     |
| <b>F2N12S</b><br>Hydroxyflavone  | Charge négative de la membrane (phosphatidylsérine, polarité membranaire et hydratation de la membrane) | <ul style="list-style-type: none"> <li>Approche ratiométrique</li> <li>Excitation à 488 nm</li> <li>Rapide</li> </ul>   | <ul style="list-style-type: none"> <li>Spécifique de la phosphatidylsérine et polarité membranaire</li> <li>Spectre large</li> </ul>                        | [123]          |
| <b>MC540 / merocyanine</b><br>Molécule organique   | Densité lipidique au sein de la membrane & phosphatidylsérine   | <ul style="list-style-type: none"> <li>Variation d'intensité en fonction du tassement des lipides</li> </ul>  | <ul style="list-style-type: none"> <li>Semi-quantitatif seulement</li> </ul>  | [73, 124]      |
| <b>PSS-380</b><br>Molécule organique   | Phosphatidylsérine  | <ul style="list-style-type: none"> <li>Non dépendant du calcium</li> </ul>  | <ul style="list-style-type: none"> <li>Spécifique de la phosphatidylsérine et non des microdomaines</li> </ul>  | [125]          |
| <b>Lipides fluorescents (NBD-PC; NBD-PS, NBD-SM)</b>   | Insertion non spécifique à la membrane  | <ul style="list-style-type: none"> <li>Possibilité de FRET avec des protéines fluorescentes</li> </ul>  | <ul style="list-style-type: none"> <li>Modification de la composition de la membrane</li> </ul>   | [126]          |
| <b>Annexine V</b><br>Protéine  | Phosphatidylsérine  | <ul style="list-style-type: none"> <li>Bien connue</li> <li>Fluorochromes multiples</li> </ul>  | <ul style="list-style-type: none"> <li>Spécifique phosphatidylsérine non des microdomaines</li> <li>Liaison dépendante du calcium</li> </ul>                | [125]          |
| <b>Protéines fluorescentes transfectées</b>  | protéine –GFP ou –YFP... (cavéoline...)   | <ul style="list-style-type: none"> <li>Peu de bruit de fond</li> <li>Spécifique</li> </ul>  | <ul style="list-style-type: none"> <li>Cellules de culture transfectées seulement</li> <li>Spécifique de cette protéine et non des microdomaines</li> </ul> | [127]          |
| <b>Sous unité B de la toxine cholérique (CTx)</b><br>Toxine protéique  | Ganglioside M1 (GM1)  | <ul style="list-style-type: none"> <li>Possibilité de former des clusters de microdomaines par utilisation d'anticorps anti-toxine</li> </ul>                                   | <ul style="list-style-type: none"> <li>Mal caractérisée</li> <li>Spécifique du GM1 et non des microdomaines</li> </ul>                                      | [128]          |
| <b>Anticorps anti-cholestérol</b>  | Cholestérol   | <ul style="list-style-type: none"> <li>Spécificité</li> </ul>   | <ul style="list-style-type: none"> <li>Non commercial</li> <li>Epitope masqué par des protéines,</li> </ul>   | [97, 129]      |
| Senseurs   | Spécificité   | Avantages   | Inconvénients   | Réf            |
| <b>Bis-pyrene</b><br>Molécule organique  | Insertion non spécifique à la membrane  | <ul style="list-style-type: none"> <li>Mesure du tassement des lipides</li> <li>Possibilité d'anisotropie</li> </ul>  |   | [73]           |
| <b>dilC18</b>  | Insertion non spécifique à la membrane  | <ul style="list-style-type: none"> <li>Peut être utilisé comme marqueur d'anisotropie (fluidité membranaire)</li> </ul>   | Exclusion des zones riches en sphingomyéline  | [97]           |
| <b>CL2</b><br>Dérivé naphthalène   | Insertion non spécifique à la membrane  | <ul style="list-style-type: none"> <li>Cellule vivante,</li> <li>Hydrosoluble</li> <li>Utilisation en 2 photons</li> </ul>  |   | [111]          |
| <b>DPH (1,6-diphenyl-1,3,5-hexatriène)</b><br>Molécule organique   | Insertion non spécifique à la membrane  | <ul style="list-style-type: none"> <li>Mesure de la fluidité membranaire par anisotropie</li> </ul>   | <ul style="list-style-type: none"> <li>Appareillage de mesure spécialisé et peu répandu</li> </ul>  | [130, 131]     |
| <b>Laurdan - Prodan</b><br>Dérivés naphthalènes  | Insertion non spécifique à la membrane  | <ul style="list-style-type: none"> <li>Mesure de l'ordre (GP) et de la fluidité (r) membranaire</li> <li>Approche ratiométrique (GP)</li> </ul>                                 | <ul style="list-style-type: none"> <li>Excitation UV ou 405 nm</li> <li>Non hydrosoluble</li> </ul>   | [73, 132, 133] |
| <b>Di-4-ANEPPDHQ</b><br>Colorant de la famille des styryls, sensible au potentiel                                      | Insertion non spécifique à la membrane  | <ul style="list-style-type: none"> <li>Approche ratiométrique</li> <li>Excitation à 488 nm</li> <li>Appareillage commun</li> <li>Hydrosoluble</li> <li>FLIM possible</li> </ul> | <ul style="list-style-type: none"> <li>Spectre d'émission large</li> </ul>  | [83, 112, 113] |

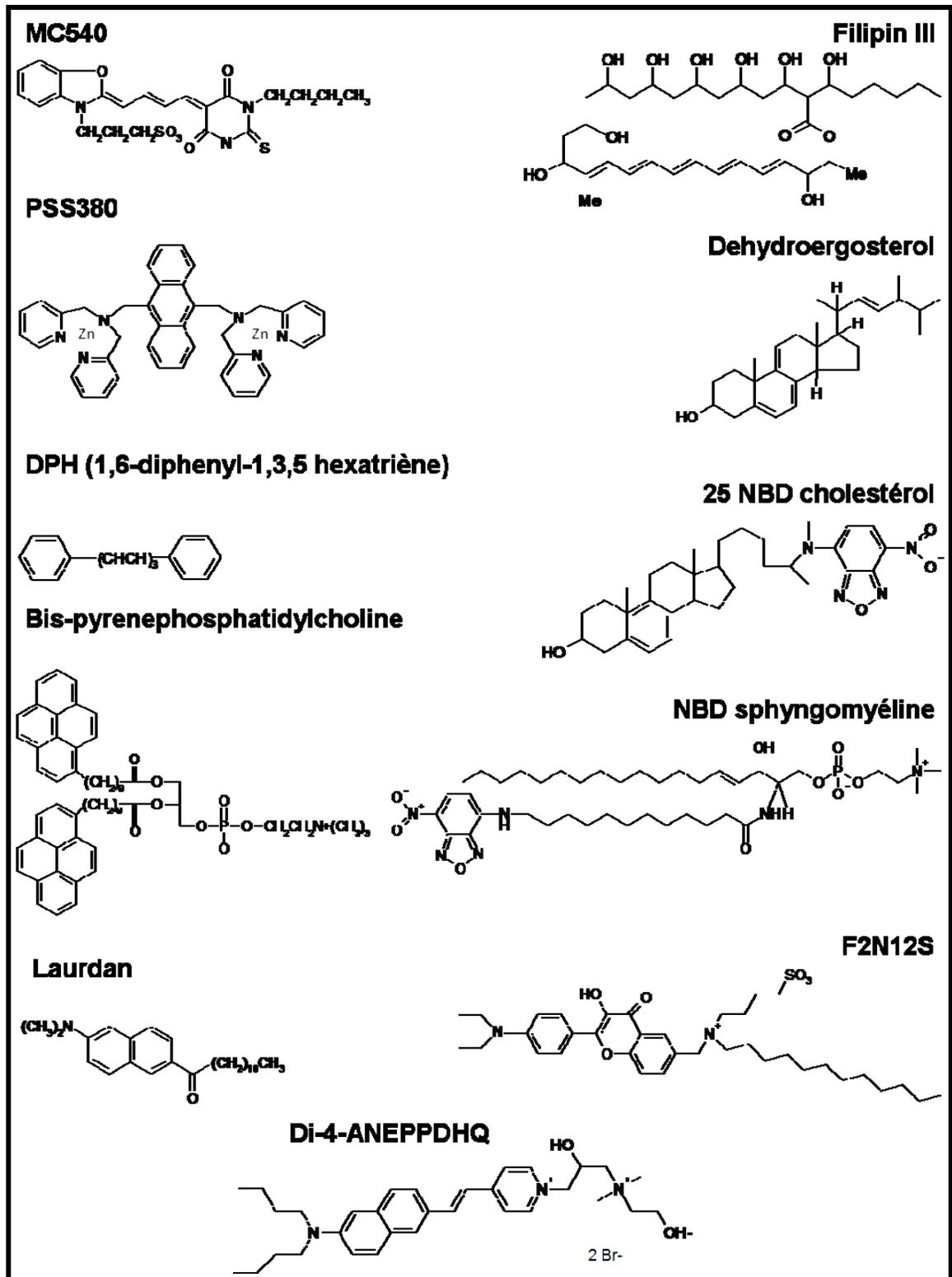


Figure 12: Structure moléculaire des principaux marqueurs et senseurs

En conclusion, les qualités essentielles d'un fluorochrome idéal pour l'étude des microdomaines sont :

- Est utilisable avec des cellules en **conditions natives** sans autre traitement nécessaire (fixation ou préparation de DRM) et en induisant le moins de dommage cellulaire possible (phototoxicité...)
- Permet d'analyser des **cellules en suspension** comme les cellules sanguines circulantes
- Apporte une information directement reliée à la **définition biophysique** des microdomaines et suffisante pour identifier des microdomaines
- Permet l'obtention de données **qualitatives** mais aussi **quantitatives**
- Est compatible avec les **fluides organiques**

#### 1.3.6.4. *Spectroscopie par corrélation de fluorescence (FCS)*

Cette technique est basée sur l'étude de la diffusion de molécules fluorescentes à travers un petit volume défini par un laser d'excitation [83]. Il est ainsi possible de mesurer la migration de protéines et de lipides dans la membrane plasmique. Ainsi Hebbar *et coll.* ont montré que la diffusion d'un peptide dérivé de la substance amyloïde ciblant les sphingolipides des microdomaines diffuse de façon similaire au ganglioside M1 (GM1) [128].

#### 1.3.6.5. *Microscopie électronique*

La microscopie électronique qui offre une excellente résolution a été utilisée assez tôt dans l'étude des microdomaines pour pallier les limites de microscopie optique [83]. Cependant, la préparation des échantillons nécessitant des fixations et inclusions de cellules dans des résines fait qu'elle n'est plus adaptée à l'aspect très dynamique de la conception actuelle des microdomaines. Elle n'est donc plus une méthode de choix.

#### 1.3.6.6. *Microscopie à force atomique*

La microscopie à force atomique est une technique basée sur le balayage de l'échantillon par une sonde en silicone sensible à la structure des membranes et permet des résolutions de l'ordre du nanomètre. Elle a principalement été utilisée pour des études de conformation de phases dans des vésicules lipidiques [126]. Cette technique nécessitant un équipement important n'a été que peu utilisée sur des cellules et nécessite de fixer les échantillons, ce qui ne convient pas à l'étude dynamique des microdomaines [134].

Les techniques actuelles de microscopies sont encore largement imparfaites au regard du défi que pose l'imagerie des microdomaines lipidiques ou microdomaines. Certaines techniques comme la mesure d'anisotropie sont cependant porteuses de promesses pour l'imagerie de microdomaines en cellules vivantes [131]. L'évolution des marqueurs, senseurs et appareillage tend cependant à repousser les limites de la microscopie optique. D'autres méthodologies qui ne seront pas détaillées dans ce mémoire participeront également aux futures avancées dans l'étude des microdomaines dont certains modèles mathématiques ou biophysiques[79].

### **1.3.7. La controverse autour des microdomaines membranaires**

La controverse autour de l'existence et de la conception de microdomaines membranaires prend sa source dans la difficulté à définir la nature exacte des microdomaines, à les visualiser et à les isoler.

#### 1.3.7.1. *La notion d'existence des microdomaines dans les cellules*

L'hypothèse initiale était celle de l'association de lipides entre eux par des forces d'interaction faibles (électrostatiques, van der Waals) permettant l'intégration de protéines et notamment les protéines à ancre GPI [75]. Ces microdomaines seraient donc préexistants à toute activation et regrouperaient des protéines définies comme ayant une affinité pour ces zones. La question sous-jacente est de savoir si, dans une membrane plasmique, les milliers de types de lipides

composant la membrane ont la possibilité de se regrouper spontanément pour former un ensemble uniforme ordonné.

Les modèles expérimentaux de mélanges ternaires (sphingolipides [Sph] - phosphatidylcholine [PC] - Cholestérol [Chol]) permettent la création d'un mélange de deux phases liquides. La première est dite Liquide ordonnée (Lo) (enrichie en Sph et Chol, dans laquelle les lipides à longues chaînes sont comprimés avec du cholestérol) et la seconde est dite Liquide désordonnée (Ld). Le cholestérol favorise la formation de la phase Lo co-existant par rapport à la phase Ld. La partition de protéines dites présentes dans les microdomaines est vérifiée dans ces modèles et la taille de ces phases peut varier de quelques nanomètres à plusieurs microns. La notion d'OLM est donc une notion complexe lorsqu'elle est appliquée à la biologie cellulaire. Cependant l'existence de phases Lo et Ld dans les cellules n'est plus remise en cause même si les modèles de formation en vésicules lipidiques sont loin d'approcher la complexité d'une membrane cellulaire. La formation et la répartition en terme de surface de ces zones est cependant encore discutée : certains auteurs posent même l'hypothèse inverse de celle des « lipid rafts », avec une membrane plasmique globalement Lo avec des microdomaines de type Ld [135]. Il est à noter qu'en l'absence de cholestérol, les bicouches lipidiques sont, selon leur composition et/ou la température, sous forme Ld ou en phase gel. Le cholestérol permet donc d'obtenir l'équilibre nécessaire à la fonction de la membrane [136].

Alors que de multiples études étaient entreprises pour analyser le rôle des microdomaines sur la physiologie cellulaire (expériences d'extraction, de déplétion et parfois de microscopie), les adversaires de cette hypothèse notaient qu'il était impossible de distinguer des microdomaines sur des cellules au repos par microscopie optique, dont la limite de diffraction se situe autour de 200 nm. Cette discordance entre les modèles et la réalité visualisée au niveau cellulaire a pesé sur la conception de la notion de microdomaine.

Cependant, l'existence des microdomaines est clairement mise en évidence, par plusieurs points :

D'abord, deux séries d'expériences dans des modèles membranaires montrent que ces DRM ne sont retrouvés qu'en présence de phase Lo préexistante dans la membrane [137] et que la solubilisation de la phase Ld par les solvants ne modifie pas le rapport entre les phases Lo et Ld [132].

Les DRM sont le plus souvent le produit insoluble de l'action du Triton X100 1% sur les membranes. Ces DRM sont cependant, selon les détergents utilisés, différents en composition et fonction. Ceci suggère une spécificité de l'action de ces détergents et donc la notion d'hétérogénéité des microdomaines [95]. Pour illustrer ce cas, la protéine du prion (PrP) qui est ancrée GPI est totalement retrouvée dans les DRM après extraction par 0,5% de Brij96 alors qu'elle est répartie de façon égale entre les fractions microdomaines et non microdomaines après extraction par 0,5% de Triton X100. De même, Thy-1, une protéine liée GPI est extraite par les détergents précédents alors que dans le même type cellulaire, NCAM-120, qui est aussi ancrée GPI n'est pas extraite [95].

Plusieurs études de microscopie ont montré la dépendance au cholestérol de clusters de récepteurs [79].

Ces études, en parallèle des multiples études de fonction après déplétion en cholestérol, forment une base solide pour envisager l'existence des microdomaines. Cette existence fonctionnelle n'est maintenant plus remise en question. Il est désormais accepté par tous les auteurs que les microdomaines existent mais aussi que ce ne sont pas des structures stables préexistantes, les amenant ainsi à définir plusieurs modèles de microdomaines [76-80, 138].

#### 1.3.7.2. *Formation des microdomaines : vers un modèle dynamique*

De nombreuses publications ont observé et décrit l'apparition de microdomaines dans des cellules activées [79], après action d'un réactif créant des regroupements protéiques (anticorps), d'une sonde permettant le regroupement de molécules des microdomaines [139], ou de basses

températures qui permettent une coalescence des microdomaines [140]. Dans la suite du paragraphe, il ne sera question que des modèles de formation à l'état cellulaire de base, sans coalescence exogène des microdomaines.

Depuis les premières publications, différents modèles ont été présentés pour expliquer la présence et la formation des microdomaines dans les cellules au repos. Le premier modèle de Simons et Ikonen [75] de domaines lipidiques préexistants et stables n'est plus d'actualité et ne sera donc pas détaillé.

En premier lieu, le modèle d'Anderson et Jacobson introduit la notion de « bouclier lipidique », aussi appelée par certains auteurs la « lipidation » des protéines [79, 141]. Il propose que certaines protéines telles les protéines-GPI soient entourées d'une coque lipidique qui favoriserait leur intégration dans des complexes condensés de lipides et cholestérol. Ces regroupements seraient néanmoins dynamiques et régulés. Cette théorie est cohérente avec le fait que l'adressage des protéines au niveau du réseau trans-Golgi constitue aussi le lieu de stockage du cholestérol cellulaire. Les protéines constitueraient donc leur bouclier lipidique dans le Trans-Golgi avant d'être adressées à la membrane plasmique.

Le second modèle est celui de la « mosaïque de domaines » présentée par Maxfield [142]. Il présente une membrane plasmique composée de multiples microdomaines possédant des caractéristiques lipidiques différentes et incluant les protéines adaptées à cet environnement lipidique. Ces domaines à l'état stable ne seraient pas visibles en microscopie optique mais une activation provoquerait leur regroupement grâce à des interactions protéines-protéines ou protéines-lipides, formant ainsi de larges plateformes détectable par microscopie optique. Ce dernier type de conception semble privilégié par plusieurs auteurs qui en ont proposé des variantes [78, 109].

Pike met en avant la notion d'hétérogénéité des microdomaines à la surface membranaire tout en proposant un modèle nommé « Induced-Fit » de formation dynamique des microdomaines à

partir de proto-microdomaines d'une ou plusieurs protéines entourées de lipides. Le changement constant de contenu protéique au cours du temps crée ainsi différents types de microdomaines coexistant dans la membrane [95]. Cette évolution serait due à une balance entre stabilisation/déstabilisation du microdomaine au cours de l'inclusion de nouvelles protéines ou de nouveaux lipides.

Le modèle proposé par Hancock se rapproche de cette conception. Cependant, il ne fait intervenir, dans un premier temps, que la relation entre une protéine GPI et des lipides avec un ratio constant. Une coalescence de plusieurs domaines protéine-lipide permettrait une stabilisation de la phase Lo. Plus la phase Lo est grande plus le microdomaine est stable. Le phénomène d'endocytose intervient dans ce modèle pour le recyclage des lipides [78]. Hancock suggère que les microdomaines ayant atteint leur taille maximale et après un stimulus non déterminé seraient endocytés. Les protéines seraient alors adressées de nouveau à la membrane.

Le dernier modèle prend en compte un élément généralement ignoré des autres modèles et qui en fait son originalité : le cytosquelette. Kusumi a montré dans un modèle de suivi de particules à la surface (Single Particle Tracking) des cellules que les protéines ne diffusent pas librement dans la membrane et que celles-ci sont « contenues » dans un filet de cytosquelette qui délimite des compartiments qu'il nomme des Zones de Confinement Transitoires (TCZ) [140]. Kusumi présente ces zones comme des compartiments de 30 à 250 nm délimités par une structure d'actine qu'il nomme la « clôture » ainsi que des protéines transmembranaires : les « piquets ». Ces structures délimitent une zone qui confine temporairement les lipides et les protéines. Les molécules à l'intérieur de la « clôture » peuvent diffuser d'un compartiment à l'autre par une diffusion qu'il nomme « hop ». La quantification se fait par la fréquence des hop (1 saut toutes les 1 à 25 ms) et par la modélisation informatique des déplacements. Dietrich *et coll.* ont montré que ces TCZ sont dépendantes du cholestérol car leur nombre diminue après déplétion par la MCD [143]. Les auteurs montrent de plus que le facteur Thy-1 diffuse plus lentement dans une zone de confinement, ce qui est cohérent avec l'hypothèse de la phase Lo. Dans ce modèle,

Kusumi propose que dans une cellule au repos, les protéines associées au microdomaine (GPI) sont localisées dans des microdomaines dits de réserve, de très petite taille (quelques molécules, moins de 10 nm) et de durée de vie très limitée par leur instabilité [140]. Il différencie ces microdomaines de réserve des microdomaines stabilisés après cluster par les protéines ou par des phénomènes physiques (froid). Ceux-ci ont des tailles entre 10 et 200 nm (selon la définition) mais ces plateformes pouvant atteindre plusieurs microns ne sont plus considérées comme des microdomaines de par leur complexité (synapse immunologique, apex des cellules épithéliales). Dans ce cas, la durée de vie des microdomaines peut atteindre plusieurs secondes.

En conclusion pour cette partie, les multiples modèles de formation des microdomaines dans la cellule au repos ne sont pas encore unifiés. Un premier pas a été accompli par l'unanimité autour du fait que les microdomaines sont des structures très petites, dynamiques, dépendant selon les modèles des protéines et/ou des lipides. Les méthodes de visualisation (Single Tracking Particule), le FRET ou les autres méthodes permettront peut-être dans le futur de définir la nature précise d'un microdomaine dans la cellule au repos et de choisir le modèle le plus adapté. Il est à noter que des modèles mathématiques et informatiques de diffusion de protéines dans les microdomaines sont en cours de développement [79, 144, 145]. Ceux-ci permettront peut-être d'approfondir la connaissance de la structure biophysique des microdomaines.

#### **1.4. Rôle des microdomaines dans la physiologie plaquettaire**

Les microdomaines sont impliqués directement ou indirectement dans de nombreuses fonctions physiologiques et dans le développement de certaines pathologies. Dans le domaine cardiovasculaire, l'intérêt plus tardif accordé aux rôles des microdomaines membranaires en physiologie ou en pathologie entraîne une relative rareté des données bibliographiques disponibles sur ce sujet. Les données disponibles sur les principaux récepteurs plaquettaires présents dans les DRM sont résumées dans le tableau 3. Nous allons dans les lignes qui suivent,

particulièrement détailler les caractéristiques de trois des principaux systèmes d'activation des plaquettes : celui de la thrombine, de l'ADP/ATP et enfin du collagène.

#### **1.4.1. Récepteurs de la thrombine**

L'hypothèse de la localisation des récepteurs clivables de la thrombine PAR-1 et PAR-4 dans les radeaux plaquettaires n'a pas été étudiée. Les données disponibles concernant le PAR-1, principal récepteur de ce système ont été acquises sur les cellules endothéliales. Dans ce modèle, le PAR-1 est présent dans les DRM et cette localisation module la susceptibilité du récepteur de la protéine C activée ou à la thrombine [146, 147]. Il est intéressant de noter que les protéines de la signalisation du PAR-1 sont aussi présentes dans les DRM (Gq $\alpha$ , G12 $\alpha$  et RhoA) [148]. Il n'y a actuellement aucune donnée concernant le PAR-4.

#### **1.4.2. Récepteurs de l'ADP et à l'ATP**

Une étude récente de Savi *et coll.* suggère que le récepteur P2Y<sub>12</sub> est retrouvé dans les DRM sous forme d'oligomères et qu'un de ses inhibiteurs spécifiques contribue à dissocier ces complexes en monomères provoquant ainsi leur sortie des DRM [7]. C'est à présent la seule étude montrant une telle localisation. Aucune donnée fiable n'est disponible sur le P2Y<sub>1</sub>, faute d'anticorps assez spécifique pour le détecter sur les plaquettes. Cependant deux études de Quinton *et coll.* et de Vial *et coll.* montrent respectivement qu'une déplétion en cholestérol ne modifie ni le changement de forme initiale ni la concentration intracellulaire de calcium après activation de plaquettes à l'ADP. Ceci suggère que le récepteur P2Y<sub>1</sub> ne se trouve pas dans les microdomaines membranaires [149, 150]. Dans cette dernière étude, Vial *et coll.* montrent de plus que le P2X<sub>1</sub> n'est que partiellement localisé dans les DRM mais qu'une déplétion en cholestérol par la MCD permet une diminution de l'influx calcique après activation par un analogue stable de l'ATP l' $\alpha\beta$ me-ATP [150]. Les données concernant les récepteurs purinergiques sont encore largement fragmentaires et ne permettent pas de véritablement tirer de conclusion sur le rôle des microdomaines dans le système d'activation des plaquettes par l'ADP.

### 1.4.3. Récepteurs au collagène

Le rôle potentiel des microdomaines sur la fonction associée au collagène a été exploré plus précocément mais reste mal connue. L'intégrine  $\alpha 2\beta 1$  (GPIaIIa), récepteur au collagène permettant l'adhésion ferme au collagène n'a pas été retrouvée dans les DRM plaquettaire alors qu'elle a été retrouvée dans les cavéoles d'autres types cellulaires [151]. Au contraire le récepteur GPVI, associé dans un complexe avec le récepteur au fragment Fc des immunoglobulines (Fc $\gamma$ R) est retrouvé dans les DRM et sa fonctionnalité est modifiée par une déplétion en cholestérol. La liaison au Fc $\gamma$ R semble indispensable car un mutant de GPVI qui ne peut lier le Fc $\gamma$ R n'est plus retrouvé dans les DRM [152]. Cependant la régulation de la fonction de GPVI par les microdomaines étudiés par les déplétions en cholestérol n'est pas univoque : alors que l'action de la MCD ne fait pas varier la signalisation induite par un agoniste direct de GPVI la convulxine, l'activation par des Collagen Related Peptide (CRP) est inhibée de façon concentration dépendante par l'incubation avec la MCD [153]. Les effets de la liaison du collagène à la GPVI et leur dépendance aux microdomaines sont moins bien définis. Quinter *et coll.* montrent que la déplétion en cholestérol ne modifie pas significativement la phosphorylation de protéines de signalisation en aval de GPVI : Syk, LAT et PLC $\gamma$ 2 mais qu'il y a augmentation, lors d'une déplétion poussée du cholestérol membranaire, de la réponse calcique et de l'adhésion au collagène. La différence entre la réponse au CRP et au collagène est intrigante et est attribuée par les auteurs à la diminution de densité de GPVI après déplétion. Cette diminution ne permettrait pas la signalisation efficace après activation par les CRP alors que la double liaison du collagène au GPVI et au GPIaIIa autoriserait cette signalisation. De leur côté, Van Lier *et coll.* ont montré un enrichissement des DRM en GPVI après adhésion au collagène [122].

Outre ces trois principaux systèmes d'activation plaquettaire, d'autres récepteurs centraux dans la physiologie plaquettaire ont été mis en évidence dans les DRM, notamment le CD42b et le CD36. Le CD42b (GPIb) est le récepteur pour le facteur de von Willebrand (vWF), primordial

pour l'adhésion des plaquettes à des taux de cisaillement élevés. Il est à noter que son recrutement dans les DRM augmente après liaison au vWF mais pas après activation par l'ADP [122, 154]. Le CD36 est un récepteur liant un grand nombre de protéines (thrombospondine, collagène...) et de particules (LDL oxydées...) ; il est classiquement retrouvé dans les DRM plaquettaires [155, 156].

Il est à noter que le GPIIb/IIIa n'a pas été retrouvé dans les DRM [156]. De façon surprenante aucune donnée n'est disponible sur la localisation de la P-sélectine (CD62-P) après sécrétion.

**Tableau 3: Principaux récepteurs plaquettaires et localisation dans les DRM**

Les récepteurs peuvent être constitutionnellement présents (+) ou absents (-), recrutés dans les microdomaines lors de l'activation (+Act). Les crochets indiquent que les données correspondent à d'autres types cellulaires que les plaquettes, faute de données plaquettaires disponibles.

| Systèmes/<br>Ligands  | Protéine/<br>Récepteur     | Présence dans<br>microdomaines<br>/ DRM | Remarques  | Réf             |
|-----------------------|----------------------------|---|--|-----------------|
| Thrombine             | PAR-1                      | [+]                                     | <ul style="list-style-type: none"> <li>PAR-1 est présent dans les microdomaines des cellules endothéliales et module la susceptibilité du clivage du PAR1 par la protéine C activée ou par la thrombine</li> <li>PAR-1 est présent ainsi que les Proteines Gqalpha, G12 et RhoA</li> </ul>   | [146-148]       |
|                       | PAR-4                      | ND                                      | <ul style="list-style-type: none"> <li>ND</li> </ul>   |                 |
| ADP                   | P2Y <sub>1</sub>           | [+]                                     | <ul style="list-style-type: none"> <li>Pas de sensibilité à la déplétion en cholestérol mais problème de spécificité des anticorps</li> <li>Pas de sensibilité à la déplétion sur le changement de forme après activation par l'ADP</li> <li>Présent dans les microdomaines des cellules musculaires lisses et endothéliales</li> </ul>  | [149, 150, 157] |
|                       | P2Y <sub>12</sub>          | +                                       | <ul style="list-style-type: none"> <li>P2Y12 dans les microdomaines sous forme de multimères</li> <li>Microdomaines indispensable à la signalisation via la protéine Gai</li> </ul>  | [7, 149]        |
|                       | P2X <sub>1</sub>           | ±                                       | <ul style="list-style-type: none"> <li>Partiellement localisé dans les microdomaines</li> </ul>  | [150]           |
| Collagène             | GPVI-FcgammaR              | +                                       | <ul style="list-style-type: none"> <li>Associé aux radeaux dans les plaquettes au repos et activées. Mais sensibilité variable des différents agonistes entre activation par les Peptides Dérivés du Collagène (CRP), Cvx et collagène. L'activation par CRP est sensible à la déplétion.</li> <li>Localisation dans les microdomaines dépendante de la liaison au FcgammaR</li> </ul> | [122, 153, 158] |
|                       | alphaIIbbeta1 (GPIIb/IIIa) | -                                       | <ul style="list-style-type: none"> <li>Présence non démontrée dans les plaquettes contrairement à d'autres types cellulaires</li> </ul>  | [151]           |
| vWF                   | GPIb-IX-V                  | + Act                                   | <ul style="list-style-type: none"> <li>Présence de GPIb dans des microdomaines riches en glycosphingolipides</li> <li>Signalisation et adhésion dépendante de ces microdomaines</li> </ul>   | [16, 154]       |
| Système du complément | CD55                       | -                                       | <ul style="list-style-type: none"> <li>Retrouvé dans toutes les fractions cellulaires et expression insensible à la déplétion en cholestérol</li> </ul>  | [156]           |
|                       | CD59                       | +                                       | <ul style="list-style-type: none"> <li>DRM enrichis en CD59, dans la protéine adaptatrice LAT et dans les Src kinases Fyn and Lyn.</li> </ul>  | [159]           |
|                       | gC1qR/p33                  | ND                                      |  |                 |
|                       | MAC (C5B9)                 | ND                                      |  |                 |
| Thrombospondine       | CD36                       | +                                       | <ul style="list-style-type: none"> <li>Enrichissement des microdomaines en CD36 et est sensible à la déplétion en cholestérol</li> </ul>   | [155, 156]      |
| Immunoglobulines      | CD32 (Fcgamma RII)         | + Act                                   | <ul style="list-style-type: none"> <li>Relocalisé dans les DRM après activation plaquettaire par la thrombine</li> </ul>   | [160]           |
| vWF / Thrombine       | CD42                       | +                                       | <ul style="list-style-type: none"> <li>CD42 est localisé dans les DRM et sa quantité augmente après activation par le vWF mais pas par ADP</li> <li>Dans les SCIPs, regroupés en clusters dans les Points d'Adhésion Discrets (DAP) en condition de cisaillement élevé</li> </ul>  | [122, 154]      |
| Fibrinogène / vWF     | GPIIb/IIIa                 | -                                       | <ul style="list-style-type: none"> <li>Non localisé dans les DRM</li> </ul>  | [156]           |
| Divers                | CD40                       | [+ Act]                                 | <ul style="list-style-type: none"> <li>Pas de données sur les plaquettes</li> <li>Relocalisation dans les DRM lors de la liaison du CD40L dans les lymphocytes</li> </ul>  | [161]           |
|                       | CD40L (CD154)              | ND                                      |  |                 |
|                       | CD47                       | [+ Act]                                 | <ul style="list-style-type: none"> <li>Pas de données sur les plaquettes</li> <li>Localisation du CD47 dans les radeaux des LT lors de la signalisation par le TCR pour permettre une synthèse d'IL2</li> </ul>  | [162]           |
|                       | MMPs                       | [+]                                     | <ul style="list-style-type: none"> <li>Pas de données sur les plaquettes</li> <li>Présent dans les DRM de cellules tumorales</li> </ul>  |                 |
|                       | CD62P Psel                 | ND                                      | <ul style="list-style-type: none"> <li>Pas de données sur les plaquettes</li> </ul>  |                 |

## **2. Resultats**

---

Les objectifs de mon travail de thèse ont été de faire le lien entre des tests classiques d'étude des fonctions plaquettaires et des approches plus innovantes avec en particulier l'introduction de la mesure de l'OLM dans un cadre clinique.

Cet objectif audacieux ouvre un champ d'investigation à la fois vaste et restreint. Vaste, car de multiples systèmes biologiques sont impliqués dans la maladie coronarienne : l'inflammation, l'immunité, la thrombose, représentés par de multiples cytokines, facteurs humoraux ou cellulaires. Autant de directions qui n'ont pas forcément abouti. Restreint également car les contraintes pratiques de la recherche clinique en terme d'échantillons, de temps et d'application en routine sont des limites qui s'imposent assez rapidement à tout essai biologique et avec lesquelles il est nécessaire de compter. Ce travail s'inscrit en permanence dans le compromis entre ces deux dimensions.

Les articles présentés dans cette thèse suivent donc cette démarche. Le premier article concernant la « résistance au clopidogrel » est un travail d'introduction suivi de façon logique par le second qui élargit le champ d'étude et ajoute un aspect dynamique, absent de la plupart des tests cliniques d'exploration de l'activité du clopidogrel. Le troisième article, actuellement en préparation constitue l'aboutissement de mes travaux prenant leur source à la fois dans la physiologie plaquettaire et dans le contexte pro-inflammatoire de la maladie coronarienne aiguë.

Une partie de mon travail ainsi que le brevet qui en est issu ne concernent pas directement les plaquettes, mais son liés à la démarche de mon doctorat. Ils seront brièvement exposés dans la dernière section de cette thèse ainsi que dans les annexes.

## **2.1. Présentation de l'article 1**

---

Le premier article est un travail introductif dans la continuité des études en cours dans le laboratoire du Pr Théroux. Il concerne la notion de « résistance » au clopidogrel telle qu'elle est abordée dans les études cliniques. La principale mesure de l'action du clopidogrel sur les plaquettes, l'agrégation plaquettaire dépend du récepteur P2Y<sub>12</sub>, cible du médicament et du récepteur P2Y<sub>1</sub> non inhibé par le clopidogrel. Cet article pose donc la question : Est-il possible de modifier les tests d'agrégation pour le suivi d'un traitement par clopidogrel ?

Cette étude a permis de :

- *montrer dans deux études cliniques différentes que des facteurs comme l'anticoagulant utilisé ou la méthode de mesure de l'agrégation plaquettaire peuvent influencer sur le nombre de patients considérés comme mauvais répondeurs ou non répondeurs au traitement par le clopidogrel.*
- *mettre en évidence la nécessité d'une standardisation des tests existants afin d'avoir un reflet fiable de l'efficacité clinique du clopidogrel.*

Cette conclusion a été reprise dans un éditorial accompagnant cet article par les docteurs A.L. Frelinger et A.D Michelson [163].

B.L. : Analyse des données, rédaction de l'article

P.T. : Conception de l'étude, supervision de l'étude

M.A. : Conception de l'étude

M.G. : Réalisation de l'étude

**Matching the evaluation of the clinical efficacy of clopidogrel to platelet function tests relevant to the biological properties of the drug.**

---

Benoît Labarthe\*, PharmD; Pierre Thérooux\*, MD, FACC; Michaël Angioi†, MD, PhD; Marta Ghitescu\*.

Journal of the American College of Cardiology 2005; 46:638-45

Short Title: Evaluation of Clopidogrel Responsiveness

From

\*Department of Medicine, Montreal Heart Institute and Université de Montréal, Montreal Quebec, Canada

†Département de Cardiologie, Hôpitaux de Brabois, Centre Hospitalier Universitaire de Nancy

Correspondence to Pierre Thérooux, MD

Address: Montreal Heart Institute, 5000 Belanger E, Montreal (Quebec), Canada H1T 1C8

Tel: (514) 376-3330 ext 3616

Fax: (514) 376-1076

E-mail: [pierre.theroux@ICM-MHI.org](mailto:pierre.theroux@ICM-MHI.org)

There exist no conflicts of interest with any of the authors in this manuscript.

Word count: 4931

### 2.1.1. Abstract

**Objectives.** To explore platelet function tests relevant to the biological effects of clopidogrel that could help the clinical monitoring of drug efficacy.

**Background.** Clopidogrel selectively inhibit the P2Y<sub>12</sub> receptor which major role is stabilization of aggregation, whereas initiation of aggregation depends on activity of both P2Y<sub>1</sub> and P2Y<sub>12</sub> receptors.

**Methods.** Tests used were Aggmax, and Agg6min and disaggregation, relating to P2Y<sub>1</sub> and P2Y<sub>12</sub> activity respectively; and PAC-1 and P-selectin, measuring activation and secretion. A first study compared hirudin/PPACK to citrate as blood anticoagulant (16 patients), and a second control study the effects of clopidogrel, aspirin, or both (20 normal controls).

**Results.** Clopidogrel similarly inhibited ADP-induced Aggmax with either anticoagulant, but significantly more Agg6min (75% vs. 31%), P-selectin (72% vs. 53%) and PAC-1 (62% vs. 24%) in hirudin/PPACK. In the control study, it inhibited Aggmax by 22%, and Agg6min, P-selectin, PAC-1, by 69%, 66% and 55%, respectively (all p<0.05). Disaggregation at 6min reached 62% with clopidogrel, while virtually absent with placebo and aspirin. Non-responsiveness as evaluated by inhibition of Aggmax in citrate was diagnosed in 35% of patients, in half this rate by Agg6min, P-selectin and PAC-1, and in 6%-12% with the latter tests performed in hirudin/PPACK.

**Conclusions.** The evaluation of clopidogrel responsiveness by platelet function tests is largely influenced by the choice of blood preservative and functional tests. Measures of aggregation stabilization, and of consequent secretion and activation, identified most patients as responders, contrasting with measures of peak aggregation, by likely reflecting better the interactions clopidogrel and the P2Y<sub>12</sub> receptor.

**Keywords:** platelets; clopidogrel; ADP receptors; drug response; platelet tests

**Condensed abstract**

This study examines mechanistic and conceptual issues relevant to meaningful clinical assessment of platelet response to clopidogrel. Greater inhibition rates were observed when aggregates stabilization measured by late aggregation and disaggregation, and GPIIb/IIIa receptor activation and P-selectin expression were studied than initial peak aggregation, and when tests were performed in blood preserved in hirudin/PPACK rather than citrate. Disaggregation, which relates to inhibition of the P2Y<sub>12</sub> receptor, with consequent inhibition of secretion and activation were found drug-specific effects. Non-responsiveness determined by inadequate inhibition of peak aggregation in citrate was present in 35% of individuals and by inadequate inhibition of late aggregation in hirudin/PPACK in 6%.

**Abbreviations**

ASA; Acetylsalicylic acid

Agg<sub>max</sub>: Peak aggregation

Agg<sub>6min</sub>: Late aggregation

ADP: Adenosine 5'-diphosphate

GPIIb/IIIa: glycoprotein IIb/IIIa receptors

CAD: coronary artery disease

Hirudin/PPACK: r-hirudin and D-phenylalanyl-prolyl-arginine chloromethyl ketone

PAC-1: monoclonal antibody binding activated GPIIb/IIIa receptors

TRAP: thrombin receptor agonist peptide

### 2.1.2. Introduction

Clopidogrel is a thienopyridine that specifically inhibits the purinergic P2Y<sub>12</sub> receptors. The drug is recommended as alternative therapy to aspirin in the secondary prevention of cardiovascular events and in combination with aspirin for patients with an acute coronary syndrome or undergoing stent implantation. It is currently investigated as adjunct therapy to fibrinolysis in acute myocardial infarction, and in the prevention of thromboembolic events in high-risk patients. Despite its growing use, a high-degree of inter-individual variability is described in response to clopidogrel, with non-response in a substantial number of patients (1-3). Considering the potentially serious consequences of such poor response, many have expressed a need for a platelet function tests that could permit reliable evaluation of clinical efficacy (4). This need is reinforced by the results of a few small studies that described a higher risk of events in poor-responding patients (5-7). These results, however, and the risk gradient associated with a poor response, remain to be validated in larger datasets and prospective studies. Most studies to date have defined clopidogrel resistance as an inadequate inhibition of peak ADP-induced *ex vivo* platelet aggregation in blood sampled in sodium citrate (2,5,6,8,9). These methods, although measuring the activity of platelet purinergic receptors, may have drawbacks as clopidogrel, and other thienopyridines as well, blocks the purinergic P2Y<sub>12</sub> receptor but not the P2Y<sub>1</sub> receptor; the former is mainly involved in stabilization of aggregates (10), and the latter in initiation of platelet shape changes and of platelet aggregation. On the other hand, although ADP is considered a weak platelet agonist, a number of direct or indirect pharmacodynamic effects have been described with clopidogrel that could be useful to the clinical monitoring of drug responsiveness (11,12).

This study explored issues related to the *ex vivo* evaluation of clopidogrel efficacy and various platelet function tests with the goal of identifying a test that could eventually be clinically useful. Tests related to platelet aggregation, activation, secretion, and disaggregation following initial

aggregation, the latter reflecting better the activity of the P2Y<sub>12</sub> receptor than that of the P2Y<sub>1</sub> receptor, were compared in blood preserved with either citrate or antithrombins.

### **2.1.3. Methods**

#### **Study populations and designs**

Two separate studies were performed after being approved by the Montreal Heart Institute Internal Ethics Committee and were carried out in compliance with the Declaration of Helsinki's recommendations. All participants signed an informed consent form before inclusion. Individuals with a contraindication to antiplatelet therapy or using a drug other than aspirin that interferes with platelet function or coagulation were excluded.

The first study was designed to characterize the influence on platelet function tests of using antithrombins as an anticoagulant in place of sodium citrate. This study was open labeled and included 16 patients with stable angina already using aspirin 80 mg daily and scheduled for an angioplasty on an outpatient basis. Clopidogrel at a daily maintenance dose of 75 mg was initiated 7 days before the planned procedure. The first blood sample was obtained immediately before the initiation of clopidogrel, and the second before the angioplasty procedure.

The goal of the second study was to describe the effects of clopidogrel on different platelet function tests; a randomized, double blind and placebo-controlled design was used. The study included 20 patients partitioned in one of three parallel groups (Fig 1). Blood samplings were obtained 24-hours apart in a fasting state on three consecutive days. The research nurse administered the study drugs immediately after the baseline sampling on day one, and after the second sampling on day two. The loading dose of clopidogrel was 300 mg and the maintenance dose was 75 mg, and those of aspirin were 300 mg and 80 mg, respectively. Subjects in the first group received the loading dose of clopidogrel and placebo-aspirin on the first day, and a maintenance dose of clopidogrel and the loading dose of aspirin on the second day. In the second group, they received on day one placebo-clopidogrel and the loading dose of aspirin, and on day

two the loading dose of clopidogrel and the maintenance dose of aspirin. In the third group, placebo-clopidogrel and placebo-aspirin were used on both the first and second day (Fig 1).

### **Platelet aggregation studies**

For the first study, blood was collected from a forearm vein and withdrawn into two tubes, one containing sodium citrate 3.8% (Becton Dickinson, Mississauga, Ontario), and the second hirudin 2 U/mL and PPACK 40  $\mu\text{mol/L}$  (Calbiochem, La Jolla, Ca.). Based on results from the first study, only hirudin/PPACK tube was used in the second randomized study.

The same instrumentation and methodology was otherwise used for the two studies, except for different concentrations of the two agonists used. In the first study, adenosine 5'diphosphate (ADP) and a thrombin receptor activating peptide-6 (TRAP-6, Sigma Chemical Co) were used each at a higher concentration of 10  $\mu\text{mol/L}$  to better differentiate the effects of citrate and of the antithrombins; in the second study the agonists were used at lower concentrations of 2.5  $\mu\text{mol/L}$  to more selectively study the effects on ADP on dependent receptors and pathways.

Platelet aggregation was measured by light transmission (Chronolog Corp, model 570VS with AggroLink Software package, Havertown, PA) in stirred (1000 rpm) platelet-rich plasma (PRP). The PRP was prepared by the centrifugation from whole blood at 130 g for 10 minutes and platelet-poor plasma (PPP) by the centrifugation of the remaining blood at 1800 g for 15 minutes. The platelet count was adjusted to 250,000 platelets/ $\mu\text{L}$  with PPP. PRP and PPP were used to set the light transmission to 0% and 100%, respectively. Aggregation was measured at peak ( $\text{Agg}_{\text{max}}$ ), which is seen approximately 1 min after the addition of the agonists, and at the end of the test after 6 minutes ( $\text{Agg}_{6\text{min}}$ ). Inhibition of aggregation was calculated as the percent decrease in aggregation values obtained at baseline and on treatment. A percentage of disaggregation (D) between  $\text{Agg}_{\text{max}}$  values and  $\text{Agg}_{6\text{min}}$  was calculated as:  $D(\%) = 100 * (1 -$

$Agg_{6min}/Agg_{max}$ ). Figure 2 illustrates a series of aggregation curves obtained on three different days in one normal individual from Group 1 of the randomised study.

### **Platelets secretion and activation**

Platelet membrane expression of P-selectin, secreted from the  $\alpha$ -granules, and of PAC-1, a monoclonal antibody that selectively binds the GPIIb/IIIa receptor when activated, was quantified in whole blood by flowcytometry. They serve as measures of platelet secretion and activation, respectively. The hirudin/PPACK blood was diluted in a 1:5 ratio within 15 minutes of being drawn with a modified Tyrode's buffer solution (Tyrode buffer containing NaCl 137 mM, KCl 2.8 mM, MgCl<sub>2</sub> 6H<sub>2</sub>O 1 mM, NaHCO<sub>3</sub> 12 mM, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0.4 mM, bovine serum albumin 0.35%, HEPES 10 mM and glucose 5.5 mM, pH 7.4); 13  $\mu$ L of diluted blood was divided and poured into Eppendorf tubes containing saturating concentrations of antibodies and 12  $\mu$ L of ADP 100  $\mu$ M (Sigma Chemical Co) dissolved in Tyrode's buffer solution to a final concentration of 10  $\mu$ M. The samples were incubated with the antibodies without stirring for 30 minutes at room temperature, and adding 500  $\mu$ L of formaldehyde 1% stopped further reaction. The antibodies used were PAC-1, a FITC-conjugated IgM polyclonal antibody which specifically binds the activated GPIIb/IIIa receptors, and anti-CD 62P, a phycoerythrine-conjugated (PE) murine monoclonal antibody IgG<sub>1</sub> directed against platelet membrane P-selectin (Becton Dickinson). Flowcytometer readings were done within one hour of blood sampling on a total of 5,000 platelets per sample. Forward scatter identified the platelet population for cell size, and side scatter for cell granularity. The percentage of fluorescence positive platelets was obtained in duplicate from the instrument computer system (Beckman Coulter Epics XL).

### **Statistical analysis**

Since most data were non-normally distributed, non-parametric methods were used and data are expressed as median and interquartile range; 5<sup>th</sup> and 95<sup>th</sup> percentiles are also shown in figures. Statistical analyses were performed with the SPSS 10.0 for Windows statistical software

(Chicago, IL). Paired comparisons of aggregation, and P-selectin expression and PAC-1 binding values were done with Wilcoxon paired test, and unpaired comparisons with the Mann-Whitney and Kruskal-Wallis tests. Correlations were evaluated using Spearman's non-parametric rho coefficients. The response to clopidogrel was assessed using Chi-square tests by referring to the criteria published by Lau *et al.*, i.e. <10% relative inhibition being non-response, 10 - 30%, poor response, and > 30%, good response (8). These criteria were also applied to quantify P-selectin expression and PAC-1 binding. The level of significance for two-sided hypothesis tests was set at a p-value less than 0.05; no correction factors were introduced for multiple analyses.

#### **2.1.4. Results**

##### *Study populations and platelet parameters*

Sixteen patients (1 woman, 15 men; median age 70 years, range 59-75) were enrolled in the first study, and 20 normal volunteers (9 women, 11 men, 42 years, 36-46) in the randomized study. No significant differences in clinical characteristics emerged between the three groups in the latter study. Basal whole blood platelet counts were similar in patients and controls, as were counts in the serial samples obtained throughout the course of the two studies. Results of platelet function tests were in general little influenced by the ADP concentration of 10  $\mu$ M used in the first study and of 2.5  $\mu$ M in the second study: peak aggregations were 65% and 70%; percent inhibitions by clopidogrel 31%, and 22%; PAC-1 binding, 62% and 65%; P-selectin expression, 42%, and 42%; and disaggregation rates, 4% and 1.4%. No controls and no patients showed a second aggregation wave.

The responses to ADP and TRAP at baseline were also the same in the 3 parallel groups of the randomized study, and highly reproducible on the three consecutive days sample among individuals who were only administered the placebo.

##### *Influence of hirudin/PPACK and of citrate*

In the basal state, the usage of either hirudin/PPACK or citrate as blood preservative did not significantly influence measurements of the agonist effects of ADP and of TRAP on aggregation and disaggregation rates and on P-selectin expression. However, PAC-1 binding was reduced in response to ADP (NS) and to TRAP ( $p < 0.01$ ) in hirudin/PPACK.

With clopidogrel, the inhibition of peak aggregation was similar in antithrombins and in citrate, but the inhibition of late aggregation, P-selectin expression and PAC-1 binding in response to ADP was significantly higher in antithrombins. Figure 3 illustrates the distribution of the individual data points. Thus, a modest 20% inhibition (-6-38%) in peak ADP-induced aggregation was observed in citrate, while an important 75% (54-94%) inhibition of late aggregation occurred in hirudin/PPACK plasma. Similarly, the inhibition of TRAP-induced late aggregation and PAC-1 binding was slightly, although non-significantly, greater in hirudin/PPACK than in citrate (Fig 3). Moreover, although no difference was measured at baseline (1% vs. 4%;  $p = 0.6$ ), disaggregation of ADP aggregated platelets by clopidogrel was greatly enhanced in analyses performed in hirudin/PPACK, compared with citrate (66% vs 29%;  $p = 0.001$ ).

#### *Effects of aspirin in healthy donors (randomized study)*

Aspirin administered alone or with clopidogrel had no detectable effects on peak and late aggregation to ADP and TRAP-6. Aspirin increased ADP- and TRAP-induced P-selectin expression by 3% ( $p = 0.03$ ) and 5% ( $p = 0.04$ ) respectively, and TRAP-induced PAC-1 binding by 8% ( $p = 0.01$ ). These activations, however, were prevented with the pre-administration of clopidogrel.

#### *Effects of clopidogrel*

Clopidogrel inhibited ADP-induced peak aggregation by a median of 22% ( $p = 0.01$ ) and TRAP-induced aggregation by 7% (NS). By contrast, as seen in Table 1, late aggregations to ADP and TRAP were markedly more reduced with clopidogrel by 69% ( $p < 0.001$ ) and 29% ( $p = 0.001$ ), respectively, due to rates of disaggregation from peak to 6 minutes of 62% (36-98%;

p=0.01) for ADP and of 11% (10-41%; p=0.01) for TRAP. Disaggregation was virtually absent with the placebo, 1% (0-9%; p=0.7) and 0% (0-1%; p=0.3) respectively, and with aspirin, 2% (0-9%; p=0.5) and 0% (0-8%; p=0.6). Figure 2 illustrates the aggregation curves of a representative case, and Figure 4 the data in each normal individual.

P-selectin expression with ADP and TRAP was reduced by 66% (p=0.01) and 22% (p=0.04) respectively, and PAC-1 binding by 55% (p<0.001) and 54% (p<0.001). The magnitudes of all these inhibition rates were similar regardless of whether aspirin was administered after (Group 1) or before (Group 2) clopidogrel (Table 1).

While on clopidogrel, strong correlations existed between inhibition of aggregation at 6 minutes and both P-selectin expression (r=0.7, p=0.001) and PAC- binding (r=0.6, p=0.02), and also between the latter two (r=0.8, p<0.001).

#### *Clopidogrel resistance*

The application of the conventional criteria of responsiveness to clopidogrel based on inhibition of peak aggregation measured in PRP prepared in citrate divided our population of stable patients into approximately one-third responders, one-third poor-responders, and one-third non-responders (Table 2). When peak aggregation was measured in blood with the antithrombins, twice as many patients were responders and 3-times fewer patients were non-responders. Similar shifts in distribution were observed, on the one hand, with late aggregation, P-selectin and PAC-1 measured in hirudin/PPACK compared with citrate and, on the other hand, in late aggregation compared with peak aggregation, both being measured in hirudin/PPACK. Thus, measurements of late aggregation, P-selectin and PAC-1 in hirudin/PPACK identified 94%, 82%, and 77% of patients respectively as responders, and 6%, 6%, and 12% as non-responders. Furthermore, the demarcation between responders and non-responders was also more clearly delineated, with fewer patients being borderline poor-responders (Table 2).

Similar response rates were observed in the randomized study of normal volunteers where only hirudin/PPACK was used as an anticoagulant. With the loading dose of 300 mg

clopidogrel, measurements of peak aggregation, late aggregation, P-selectin and PAC-1 resulted in non-response rates of 25%, 6%, 0% and 6% respectively.

### 2.1.5. Discussion

The study shows high degrees of inter-individual variability in the response to clopidogrel and high rates of non-response, comparable to those reported in the literature, when using the conventional approach of measuring inhibition of ADP-induced peak aggregation in citrated platelet-rich-plasma. Based on such results, a concept of clopidogrel resistance was elaborated (2,5,13,14). Our results, however, challenge the significance of such a concept based on a simple test of aggregation that is influenced by activity of both the P2Y<sub>1</sub> and P2Y<sub>12</sub> purinergic receptors, whereas clopidogrel blocks only the latter. Indeed, a much lower rate of variability was found by looking at stabilization of aggregation, measured by disaggregation and late aggregation, which is mainly driven by the activity of P2Y<sub>12</sub> receptor, and at markers of platelet secretion and activation. The variability was further reduced when these tests were performed in blood preserved with antithrombins rather than citrate. Combining these approaches, the non-response rate was reduced from 35% to 6%.

#### *Hirudin/PPACK versus sodium citrate*

Contrasting with other antiplatelet drugs, no studies to our knowledge have directly compared the use of an antithrombin versus citrate in measuring the effects of clopidogrel (15). Hirudin/PPACK in this study provided better detection of the inhibitory effects of clopidogrel on disaggregation, late aggregation, P-selectin expression and GPIIb-IIIa activation. Interestingly peak aggregation measurements were not influenced by the selection of the preservative. Although widely used as an anticoagulant when studying *ex vivo* platelet functions, sodium citrate possess shortcomings as it promotes P-selectin expression (16) and micro aggregate formation likely in relation with platelet activation signaled by the binding of fibrinogen to GPIIb/IIIa receptors (17,18).

#### *Effects of ASA*

Aspirin had no detectable effect on tests used in this study regardless of the presence of clopidogrel, consistent with published data that described no effects of aspirin on ADP-induced

aggregation (19-21) CD62P, CD63 expression and PAC-1 binding, and platelet-leukocytes conjugate formation (11). On the other hand, ASA can potentiate the effects of clopidogrel on less specific function tests such as bleeding time (22) and aggregation induced by Type 1 collagen or TRAP 15  $\mu\text{M}$  (19). ASA also inhibits the second phase of ADP-induced aggregation by preventing thromboxane  $\text{A}_2$  production. No second wave of aggregation was seen in this study since the 10 $\mu\text{M}$  concentration was used in patients pretreated with ASA, and the sub-threshold concentration of 2.5 $\mu\text{M}$  used controls. In the two instances, however, clopidogrel clearly prevented sustained aggregation as it consistently promoted disaggregation. TRAP effects were not influenced either by ASA, as previously documented (20,23).

#### *Effects of clopidogrel*

Clopidogrel produced a profound and predictable inhibition of late aggregation in relation with rapid disaggregation of emerging aggregates, contrasting with the modest and variable inhibition of peak aggregation observed in this and other studies (1,2,6,14). Only one previous study reported on late aggregation without, however, referring to variability in response (21).

The TRAP data extend to disaggregation our previous observation on the inhibitory effects of clopidogrel on peak aggregation, P-selectin, PAC-1, and platelet-monocyte conjugates formation (12). Although less pronounced than for ADP, the disaggregation following TRAP was of greater magnitude than the inhibition of  $\text{Agg}_{\text{max}}$ . These data are consistent with the known influence of purinergic receptors on the activity of Protease Activated Receptor-1 (PAR-1) (24). The physiological importance of the observations may be debatable as TRAP may release calcium through mechanisms different than that of thrombin that involve PAR-4 delayed signalling (24,25). The inhibitions of PAC-1 and on P-selectin by clopidogrel were predictable as they relate to ADP agonists effects on platelet activation.

#### *Resistance to clopidogrel*

Previously reported prevalence rates of clopidogrel resistance, measured as absolute difference to baseline aggregation, were within the range of 24% to 40% (1,2,9,26). Using more

restrictive definitions of <10% relative inhibition, Muller *et al.* (6) and Lau *et al.* (8) could reduce these rates to 5% and 22% of patients, respectively. The non-response rates of 35% observed through using peak aggregation in this study could be reduced to 12% when the analyses were performed in hirudin/PPACK blood rather than in citrate, and further down to 6% when late aggregation was studied instead of peak aggregation. Disaggregation was always present with clopidogrel and absent without clopidogrel. Similar low non-response rates of 6% were seen with both P-selectin expression and PAC-1 binding when assessed in hirudin/PPACK, compared to rates of 12.5% and 29%, respectively, in sodium citrate.

*Study limitations and Clinical implication*

The low non-response rates observed herewith are unlikely related to the concentrations of agonists (4) as they were observed at both low and high concentrations of ADP and of TRAP, and at concentrations similar to that used in most studies that showed these high rates. Although, other factors related to individuals studied or to methodological aspects could have influenced the results, they were unlikely of importance since results were consistent in two different populations, with two different agonists, two different concentrations of ADP, and different tests of platelet function examining platelet secretion, activation, and aggregation and disaggregation.

Though reproducible, the findings of the study are not a direct documentation of clinical relevance. For this purpose, large clinical trials matching clinical efficacy to biological effects will be required.

Nonetheless, the results of the study, along with the conclusive efficacy data derived from clinical trials and the known selective blocking effect of clopidogrel on the P2Y<sub>12</sub>, strongly support a measure of late aggregation or disaggregation as a more appropriate assay to measure clopidogrel efficacy than aggregation. These mechanistic and conceptual issues are relevant to the evaluation of clopidogrel efficacy while carrying implications for patients' treatment and development of new generations of ADP receptors blockers.

## Bibliography

1. Gurbel PA, Bliden KP. Interpretation of platelet inhibition by clopidogrel and the effect of non-responders. *J Thromb Haemost* 2003;1:1318-9.
2. Gurbel PA, Bliden KP, Hiatt BL, O'Connor CM. Clopidogrel for coronary stenting: response variability, drug resistance, and the effect of pretreatment platelet reactivity. *Circulation* 2003;107:2908-13.
3. Serebruany VL, Steinhubl SR, Berger PB, Malinin AI, Bhatt DL, Topol EJ. Variability in platelet responsiveness to clopidogrel among 544 individuals. *J Am Coll Cardiol* 2005;45:246-51.
4. Wiviott SD, Antman EM. Clopidogrel resistance: a new chapter in a fast-moving story. *Circulation* 2004;109:3064-7.
5. Matetzky S, Shenkman B, Guetta V, *et al.* Clopidogrel Resistance Is Associated With Increased Risk of Recurrent Atherothrombotic Events in Patients With Acute Myocardial Infarction. *Circulation* 2004.
6. Muller I, Besta F, Schulz C, Massberg S, Schonig A, Gawaz M. Prevalence of clopidogrel non-responders among patients with stable angina pectoris scheduled for elective coronary stent placement. *Thromb Haemost* 2003;89:783-7.
7. Gurbel PA, Samara WM, Bliden KP. Failure of clopidogrel to reduce platelet reactivity and activation following standard dosing in elective stenting: implications for thrombotic events and restenosis. *Platelets* 2004;15:95-9.
8. Lau WC, Gurbel PA, Watkins PB, *et al.* Contribution of hepatic cytochrome P450 3A4 metabolic activity to the phenomenon of clopidogrel resistance. *Circulation* 2004;109:166-71.
9. Lepantalo A, Virtanen KS, Heikkila J, Wartiovaara U, Lassila R. Limited early antiplatelet effect of 300 mg clopidogrel in patients with aspirin therapy undergoing percutaneous coronary interventions. *Eur Heart J* 2004;25:476-83.

10. Gachet C. ADP receptors of platelets and their inhibition. *Thromb Haemost* 2001;86:222-32.
11. Storey RF, Judge HM, Wilcox RG, Heptinstall S. Inhibition of ADP-induced P-selectin expression and platelet-leukocyte conjugate formation by clopidogrel and the P2Y<sub>12</sub> receptor antagonist AR-C69931MX but not aspirin. *Thromb Haemost* 2002;88:488-94.
12. Xiao Z, Theroux P. Clopidogrel inhibits platelet-leukocyte interactions and thrombin receptor agonist peptide-induced platelet activation in patients with an acute coronary syndrome. *J Am Coll Cardiol* 2004;43:1982-8.
13. Jaremo P, Lindahl TL, Fransson SG, Richter A. Individual variations of platelet inhibition after loading doses of clopidogrel. *J Intern Med* 2002;252:233-8.
14. Moussa I, Oetgen M, Roubin G, *et al.* Effectiveness of clopidogrel and aspirin versus ticlopidine and aspirin in preventing stent thrombosis after coronary stent implantation. *Circulation* 1999;99:2364-6.
15. Mousa SA, Bozarth JM, Forsythe MS, Slee A. Differential antiplatelet efficacy for various GPIIb/IIIa antagonists: role of plasma calcium levels. *Cardiovasc Res* 2000;47:819-26.
16. Schneider DJ, Tracy PB, Mann KG, Sobel BE. Differential effects of anticoagulants on the activation of platelets *ex vivo*. *Circulation* 1997;96:2877-83.
17. McBane RD, 2nd, Karnicki K, Tahirkheli N, Miller RS, Owen WG. Platelet characteristics associated with coronary artery disease. *J Thromb Haemost* 2003;1:1296-303.
18. McBane RD, 2nd, Karnicki K, Miller RS, Owen WG. The impact of peripheral arterial disease on circulating platelets. *Thromb Res* 2004;113:137-45.
19. Moshfegh K, Redondo M, Julmy F, *et al.* Antiplatelet effects of clopidogrel compared with aspirin after myocardial infarction: enhanced inhibitory effects of combination therapy. *J Am Coll Cardiol* 2000;36:699-705.
20. Farrell TP, Hayes KB, Sobel BE, Schneider DJ. The lack of augmentation by aspirin of inhibition of platelet reactivity by ticlopidine. *Am J Cardiol* 1999;83:770-4.

21. Dorr G, Schmidt G, Grafe M, Regitz-Zagrosek V, Fleck E. Effects of combined therapy with clopidogrel and acetylsalicylic acid on platelet glycoprotein expression and aggregation. *J Cardiovasc Pharmacol* 2002;39:523-32.
22. Payne DA, Hayes PD, Jones CI, Belham P, Naylor AR, Goodall AH. Combined therapy with clopidogrel and aspirin significantly increases the bleeding time through a synergistic antiplatelet action. *J Vasc Surg* 2002;35:1204-9.
23. Muller TH, Schmidt S, Schunter F, Reil GH. Platelet aggregation in response to collagen and thrombin reliably detects the ingestion of low-dose aspirin. *Beitr Infusionsther Transfusionsmed* 1997;34:105-9.
24. Aoki T, Tomiyama Y, Honda S, *et al.* Difference of  $(Ca^{2+})_i$  movements in platelets stimulated by thrombin and TRAP: the involvement of  $\alpha(IIb)\beta3$ -mediated TXA<sub>2</sub> synthesis. *Thromb Haemost* 1998;79:1184-90.
25. Covic L, Gresser AL, Kuliopulos A. Biphasic kinetics of activation and signaling for PAR1 and PAR4 thrombin receptors in platelets. *Biochemistry* 2000;39:5458-67.
26. Gurbel PA, Bliden KP. Durability of platelet inhibition by clopidogrel. *Am J Cardiol* 2003;91:1123-5.

### Legends to Figures

**Figure 1.** Design of the double-blind placebo-controlled randomized study performed in normal volunteers (Study 2).

**Figure 2.** Illustrative example of aggregation curves from a normal individual, obtained following the addition of ADP 2.5  $\mu$ M and TRAP 2.5  $\mu$ M in platelet-rich-plasma at baseline (left panel); 24 hours following a loading dose of clopidogrel (middle panel); and 24 hours later, after a dose of clopidogrel 75 mg and aspirin 300 mg (right panel). Disaggregation is minimal at baseline and nearly complete following clopidogrel in the presence of ADP and significant in the presence of TRAP. Aspirin added no additional disaggregation.

**Figure 3.** Inhibition of platelet functions in PRP prepared in sodium citrate (white boxes) versus hirudin/PPACK (gray boxes) (\* $p < 0.05$ ). (a) Peak aggregation, (b) Late aggregation, (c) P-selectin expression, (d) GPIIb/IIIa activation by PAC-1 binding measure following agonist stimulation with either a thrombin receptor activating peptide- 6 (TRAP, left-hand panels) or adenosine 5'diphosphate (ADP, right-hand panels). Lines are medians and boxes the interquartile range, whiskers the 5<sup>th</sup> and 95<sup>th</sup> percentiles; p values obtained using the Wilcoxon signed-rank test; \* $p < 0.05$ .

**Figure 4.** Percent disaggregation from peak aggregation to 6 minutes after the addition of ADP (top) and TRAP (bottom) in healthy volunteers, at baseline on Day 1, 24 h after the first drug administration on Day 2 and 24 h after the last drug administration on Day 3. Open boxes are either at baseline or after placebo, light shaded boxes are after aspirin, dark boxes are after clopidogrel (doses shown in Figure 1, and an actual tracing in Figure 2). The lines are medians and the boxes the interquartile range, whiskers the 5<sup>th</sup> and 95<sup>th</sup> percentiles, p-values obtained by the Wilcoxon signed-rank test; \*  $p < 0.05$ .

**Table 1:** Platelet function tests in PRP before and after clopidogrel and/or ASA

| Agonist | Treatment       | Baseline           |                     |         |         |                    |         | 24 h post first dosing |                     |         |         |                    |         | 48h post second dosing |                     |     |      |  |  |
|---------|-----------------|--------------------|---------------------|---------|---------|--------------------|---------|------------------------|---------------------|---------|---------|--------------------|---------|------------------------|---------------------|-----|------|--|--|
|         |                 | Agg <sub>max</sub> | Agg <sub>6min</sub> | PAC     | PSeI    | Agg <sub>max</sub> | PSeI    | Agg <sub>max</sub>     | Agg <sub>6min</sub> | PAC     | PSeI    | Agg <sub>max</sub> | PSeI    | Agg <sub>max</sub>     | Agg <sub>6min</sub> | PAC | PSeI |  |  |
| ADP     | <b>CLOP-ASA</b> | 68                 | 66                  | 56      | 36      | 54†                | 22*†    | 23†                    | 7†                  | 51      | 16*†    | 20†                | 9†      |                        |                     |     |      |  |  |
|         | (n=8)           | (64-75)            | (60-75)             | (49-68) | (25-55) | (50-60)            | (1-34)  | (13-31)                | (3-24)              | (35-61) | (0-33)  | (12-32)            | (3-24)  |                        |                     |     |      |  |  |
|         | <b>ASA-CLOP</b> | 70                 | 69*                 | 73      | 45      | 70                 | 70*     | 68                     | 48†                 | 54‡     | 21*†    | 33‡                | 22‡     |                        |                     |     |      |  |  |
|         | (n=8)           | (64-80)            | (57-78)             | (46-82) | (37-49) | (66-72)            | (62-70) | (59-80)                | (45-61)             | (43-68) | (1-60)  | (14-58)            | (6-35)  |                        |                     |     |      |  |  |
|         | <b>PLACEBO</b>  | 76                 | 74                  | 75      | 46      | 74                 | 71      | 72                     | 48                  | 74      | 72      | 78                 | 45      |                        |                     |     |      |  |  |
|         | (n=4)           | (70- 77)           | (66-77)             | (69-83) | (28-72) | (68-80)            | (65-78) | (67-81)                | (33-70)             | (69-79) | (65-79) | (69-81)            | (31-73) |                        |                     |     |      |  |  |
| TRAP    | <b>CLOP-ASA</b> | 76                 | 76                  | 50      | 63      | 69                 | 61*†    | 28†                    | 53                  | 69      | 56*†    | 26                 | 57      |                        |                     |     |      |  |  |
|         | (n=8)           | (70-81)            | (67-81)             | (37-79) | (44-88) | (61-73)            | (36-67) | (5-37)                 | (20-74)             | (59-74) | (31-68) | (7-41)             | (26-76) |                        |                     |     |      |  |  |
|         | <b>ASA-CLOP</b> | 84                 | 80*                 | 55      | 71      | 74                 | 73      | 63†                    | 76†                 | 71      | 56*†    | 35‡                | 52‡     |                        |                     |     |      |  |  |
|         | (n=8)           | (70-81)            | (72-87)             | (42-59) | (56-76) | (70-80)            | (64-80) | (55-68)                | (66-86)             | (61-78) | (35-73) | (8-45)             | (40-70) |                        |                     |     |      |  |  |
|         | <b>PLACEBO</b>  | 81                 | 81                  | 77      | 86      | 81                 | 81      | 76                     | 87                  | 86      | 86      | 76                 | 87      |                        |                     |     |      |  |  |
|         | (n=4)           | (75-87)            | (75-87)             | (74-81) | (78-89) | (76-86)            | (76-85) | (69-79)                | (82-91)             | (80-90) | (78-90) | (73-80)            | (82-91) |                        |                     |     |      |  |  |

Randomized study in normal volunteers with design is summarized in Fig 1. Agg<sub>max</sub>: Peak aggregation; Agg<sub>6min</sub>: late aggregation;

PAC-1: monoclonal antibody labelling the activate GPIIb/IIIa receptor; Psel: membrane P-selectin expression measured with an

antiCD62-P monoclonal antibody. Values are median and 25<sup>th</sup> and 75<sup>th</sup> percentiles; p-values assessed by Wilcoxon test. \* p<0,05 Vs

Agg<sub>max</sub>, † p<0,05 Vs baseline; ‡ p<0,05 Vs 24h.

**Table 2.** Responsiveness to clopidogrel by blood preservative and tests of platelet function used

|                            | Sodium citrate |         |     |      | Hirudin/PPACK |         |     |      |
|----------------------------|----------------|---------|-----|------|---------------|---------|-----|------|
|                            | Aggmax         | Agg6min | PAC | Psel | Aggmax        | Agg6min | PAC | Psel |
| <b>Good responders (%)</b> | 29             | 59      | 41  | 75   | 53            | 94      | 77  | 82   |
| <b>Low responders (%)</b>  | 35             | 24      | 30  | 12.5 | 35            | 0       | 11  | 12   |
| <b>Non-responders (%)</b>  | 35             | 18      | 29  | 12.5 | 12            | 6       | 12  | 6    |

Study performed in patients with stable coronary artery disease. See text for definition of good, low and non-responders and legend to

Table 1 for meaning of abbreviations.

Figure 1

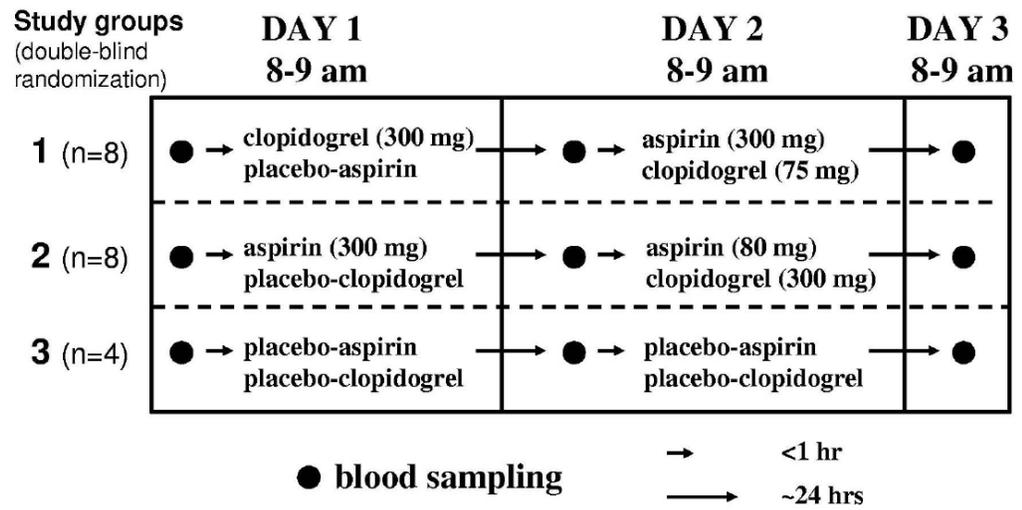


Figure 2

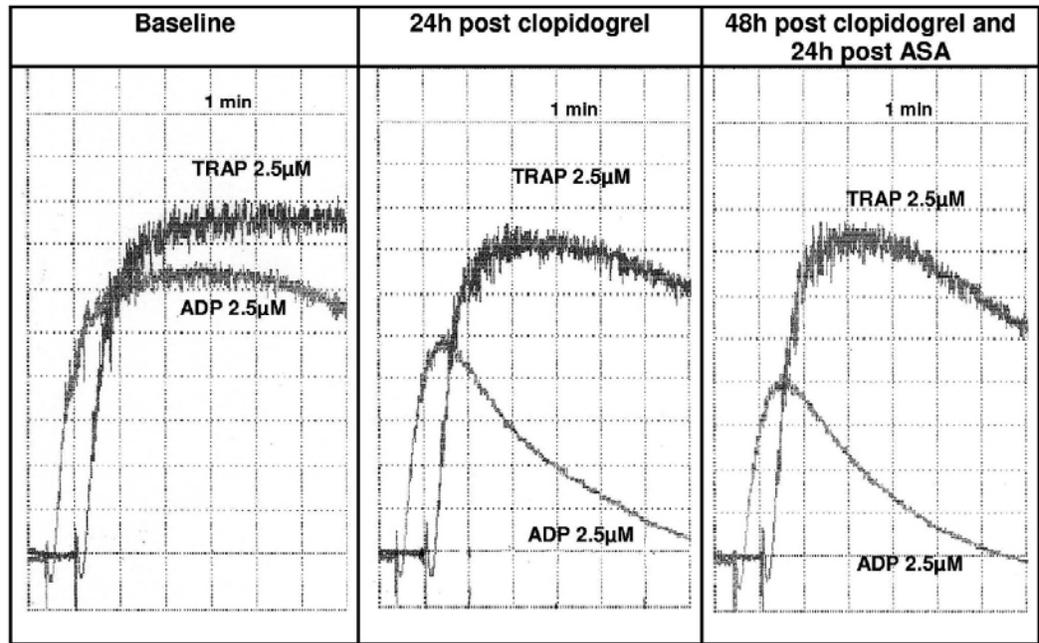


Figure 3

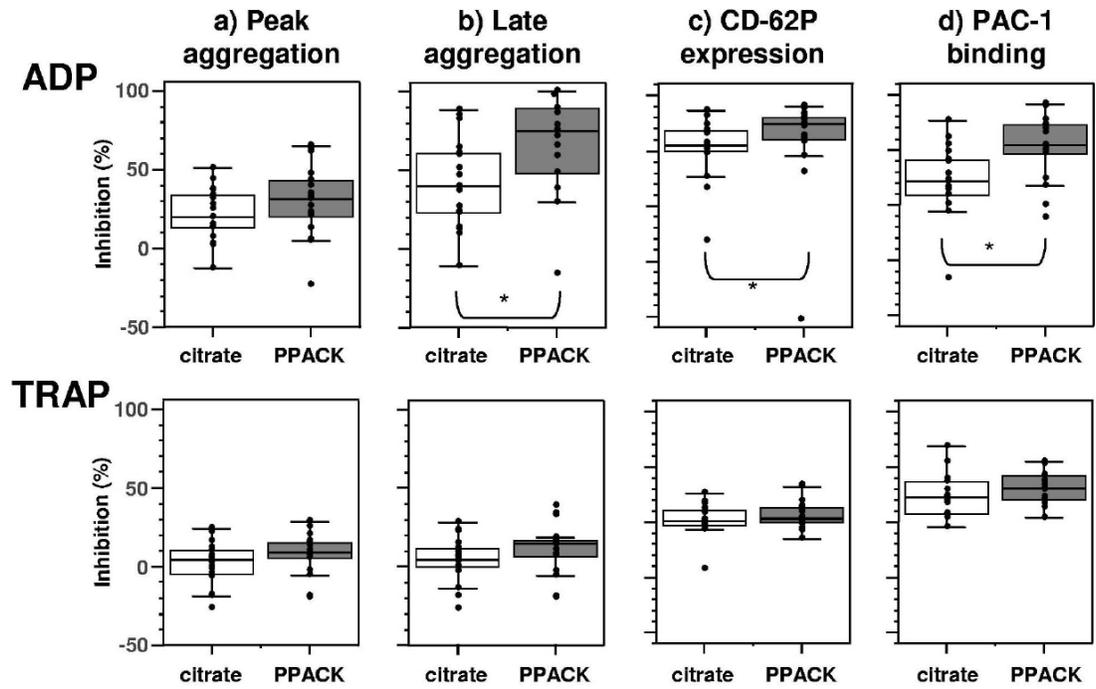
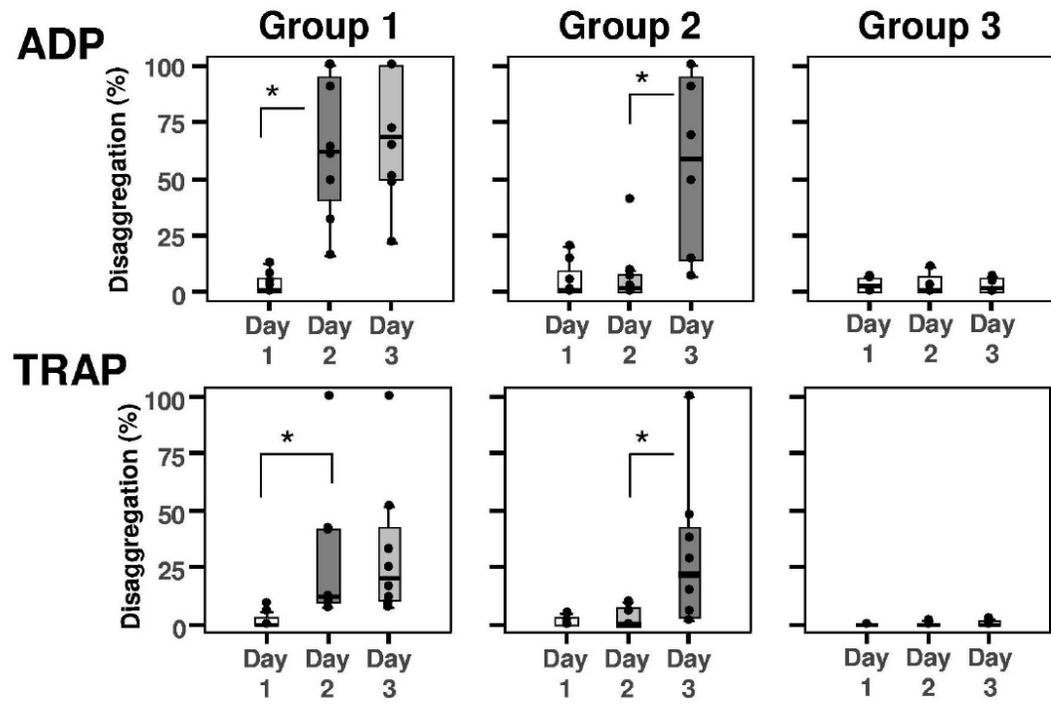


Figure 4



## 2.2. Présentation de l'article 2

---

Ce second article s'inscrit dans la lignée du premier, en étudiant l'effet chez les patients avec maladie coronarienne de la double inhibition des récepteurs P2Y<sub>1</sub> et P2Y<sub>12</sub> des plaquettes sur l'agrégation plaquettaire et sur des paramètres d'activation et de sécrétion plaquettaires. Ces données ont complétées par l'étude de ces deux inhibiteurs sur du sang de donneurs sains dans un modèle de chambre de flux en microcapillaire avec une mesure en temps réel sur 9 minutes de l'adhésion et de l'agrégation plaquettaire sur collagène de type I. Ce système nous a permis d'étudier la cinétique d'adhésion et de formation du thrombus sur un temps nettement supérieur aux autres études de la littérature (généralement 3 minutes).

Nous avons réalisé au moment où le concept d'inhibition conjointe des deux récepteurs en thérapeutique commençait à apparaître, en particulier avec le développement de la notion de mauvais répondeurs au clopidogrel. Il n'existe encore aucun médicament ciblant le P2Y<sub>1</sub> en développement clinique mais de nouvelles molécules, stables en circulation ont été récemment mises au point.

De plus, dans le compte-rendu d'une récente réunion du sous-comité biorhéologie de la Société Internationale sur la Thrombose et l'Hémostase, Zwaginga *et coll.* insistent sur le besoin de développer des tests standardisés d'adhésion et d'agrégation en condition de cisaillement élevé afin d'évaluer de la façon la plus adéquate possible l'action des médicaments chez le patient [164].

Cette étude a permis de :

- *mettre en évidence la synergie entre le clopidogrel et l'inhibiteur de P2Y<sub>1</sub> sur les paramètres d'activation et d'agrégation et de confirmer l'impact de l'anticoagulant sur certains de ces tests.*

- *confirmer la synergie dans un modèle de flux en sang total entre les deux inhibiteurs de P2Y<sub>1</sub> et P2Y<sub>12</sub>.*
- *mettre en évidence des effets précoces et tardifs des inhibiteurs sur un temps de 9 minutes. Ces effets n'auraient pas pu être mis en évidence sur les temps d'analyse habituellement utilisés.*

Cet article est en voie d'acceptation dans Thrombosis and Haemostasis sous condition que l'étude de flux soit effectuée sur des patients coronariens avec une dose de charge de clopidogrel. Ce travail complémentaire est en cours de réalisation.

B.L. : Conception des études, réalisation des expériences de cytométrie, validation des méthodes de flux, analyse des résultats, rédaction de l'article

J.B. : Réalisation des méthodes de flux, analyse des résultats

A.B. : Supervision des expériences de flux, analyse des résultats, rédaction de l'article

P.T. : Supervision, rédaction de l'article

**Comparative effects of single or combined inhibition of the P2Y<sub>1</sub> and P2Y<sub>12</sub> purinergic receptors on platelet adhesion, activation, secretion, and aggregation**

---

Benoît Labarthe,\* Judith Babin,\* Arnaud Bonnefoy\*†, Pierre Théroux\*

En révision Thrombosis and Haemostasis

Short Title: P2Y<sub>1</sub> and P2Y<sub>12</sub> inhibition

From

\* Department of Medicine, Montreal Heart Institute and Université de Montréal,  
Montreal, Quebec, Canada, H1T1C8.

† INSERM U743, Université de Montréal, Quebec, Canada, H2X1P1.

Correspondence to Pierre Théroux, MD

Address: Montreal Heart Institute, 5000 Bélanger E, Montreal, QC (Quebec), Canada H1T  
1C8

Tel: (514) 376-3330 ext 3616

Fax: (514) 376-1076

E-mail: [pierre.theroux@ICM-MHI.org](mailto:pierre.theroux@ICM-MHI.org)

There exist no conflicts of interest with any of the authors in this manuscript.

Word count: 4669

| What is known on this topic  | What this paper adds   |
|--|--|
| <p>I. <i>In vitro</i> P2Y<sub>1</sub> and P2Y<sub>12</sub> inhibitors synergistically decrease the platelet aggregation</p> <p>II. The combined purinergic inhibition decreases thrombus formation at arterial shear rate measured after 1 minute.</p> | <p>III. In patients with coronary artery disease, the combined inhibition of P2Y<sub>12</sub> and P2Y<sub>1</sub> receptors by a high loading dose of the P2Y<sub>12</sub> inhibitor clopidogrel and the <i>in vitro</i> addition of a P2Y<sub>1</sub> inhibitor synergistically decreases platelet aggregation and activation parameters.</p> <p>IV. The real-time analysis of collagen-induced platelet adhesion (by measuring the surface coverage) and of thrombus growth (by thrombus density) at arterial shear rate during a longer 9 minutes time allows to distinguish between early and late antiplatelet effects.</p> <p>V. Knowledge of the differential effects of both P2Y<sub>1</sub> and P2Y<sub>12</sub> inhibitions in flow could help to develop strategies to prevent thrombosis in high-arterial shear situations such as in severely obstructed coronary arteries or ruptured plaques.</p> |

### 2.2.1. Abstract

*Introduction:* P2Y<sub>1</sub> and P2Y<sub>12</sub> receptors are the two main platelet receptors for ADP. Although blocking P2Y<sub>12</sub> is a highly effective antithrombotic strategy, P2Y<sub>1</sub> is not yet a therapeutic target. This study compared the effects of inhibiting each receptor individually or both concomitantly on a panel of platelet function tests in human blood.

*Materials and Methods:* 1. PPACK-anticoagulated blood from healthy volunteers was treated with selective P2Y<sub>12</sub> (2-MeSAMP) and/or P2Y<sub>1</sub> (MRS2179) inhibitors, perfused in a flow chamber at 1500s<sup>-1</sup> and analysed in real-time for platelet adhesion and thrombus growth; 2. Platelet-rich plasma (PRP) from patients with stable angina harvested on citrate or hirudin/PPACK before and 24 hours after a loading dose of clopidogrel (450 mg) was supplemented *ex vivo* with MRS2179 (100 μM) and tested for platelet aggregation to ADP and TRAP, P-selectin expression, PAC-1 binding and platelet-leukocyte conjugates.

*Results:* 1. MRS2179 halved thrombus formation in flow with no effect on platelet adhesion, whereas 2-MeSAMP transiently inhibited thrombus growth. Dual blockade inhibited adhesion by 63% and abolished thrombus formation. 2. MRS2179 added in patients' blood near completely abrogated ADP effects. TRAP effects were better inhibited by clopidogrel alone or combined with MRS2179 than with MRS2179 alone. Dual receptor inhibition reduced ADP-induced P-selectin expression by 93%, GPIIb/IIIa activation by 98%, and platelet-monocyte and platelet-neutrophil conjugates by 97% and 80% respectively.

*Conclusions:* The results provide a wide perspective on the potential benefit of P2Y<sub>1</sub> alone compared with P2Y<sub>12</sub> and of dual receptor blockade.

**Keywords:** platelets, P2Y<sub>1</sub>, P2Y<sub>12</sub>, clopidogrel, MRS2179

**Abbreviation list:**

Aggmax: Peak aggregation

Agg6min: Late aggregation

ADP: Adenosine 5'-diphosphate

GPIIb/IIIa: glycoprotein IIb/IIIa receptors

CAD: coronary artery disease

GSU: Gray Scale Units

PPACK: D-phenylalanyl-prolyl-arginine chloromethylketone

MRS2179: N6-methyl-2'-deoxyadenosine-3',5'-bisphosphate

PAC-1: monoclonal antibody binding activated GPIIb/IIIa receptors

plt-PMN: platelet-polymorphonuclear cell conjugates

plt-mono: platelet-monocyte conjugates

TRAP: Thrombin Receptor Agonist Peptide

### 2.2.2. Introduction

The G protein-coupled P2Y<sub>1</sub> and P2Y<sub>12</sub> receptors mediate the platelet response to ADP. Full platelet aggregation requires their concomitant activation. P2Y<sub>1</sub> activates phospholipase C and triggers shape change and initiation of aggregation while P2Y<sub>12</sub> reduces adenylylcyclase activity by coupling with Gi, stabilizes platelet aggregates, and activates GPIIb/IIIa [1, 2]. P2Y<sub>1</sub><sup>-/-</sup> mice show defective platelet aggregation and increased resistance to thromboembolism [3, 4].

Adenosine 5' diphosphate (ADP) is released from endothelial cells and erythrocytes; it is secreted by activated platelets self-amplifying its effects, and also those of other platelet agonists such as thrombin and collagen. The crucial role of ADP in modulating thrombosis and haemostasis in human has been well illustrated by the success of thienopyridines ticlopidine and clopidogrel to prevent acute thrombotic events in patients with cardiovascular disease and patients undergoing stent implantation. These benefits prompted the development of a number of new ADP inhibitors. All those approved or under clinical investigation selectively target P2Y<sub>12</sub>: the thienopyridines ticlopidine, clopidogrel, and prasugrel, the ATP analogue cangrelor, and the non-thienopyridines AZD6140 and PRT060128 [1].

Various blockers of the P2Y<sub>1</sub> receptors have been identified, including urea antagonists, amino-benzazoles and analogues, and a family of MRS2179 (N6-methyl-2'-deoxyadenosine-3',5'-bisphosphate) derivatives.

The objectives of the study were to compare the effects of blocking P2Y<sub>1</sub>, P2Y<sub>12</sub>, or both receptors concomitantly on platelet adhesion activation, secretion and aggregation in both static and flow conditions. In a first set of experiments, the blood from healthy donors was perfused at an arterial shear rate in collagen-coated glass capillaries. The effects of the P2Y<sub>12</sub> antagonist 2-MeSAMP, combined or not with the P2Y<sub>1</sub> antagonist MRS2179 pretreatment were analysed via real-time measurement of platelet adhesion and thrombus formation during nine minutes. In a second set of experiments the blood from patients with stable angina receiving a loading dose of clopidogrel (450 mg) was treated *ex vivo* with MRS2179 and analysed for platelet aggregation

and activation markers following stimulation by ADP or a thrombin agonist peptide (TRAP). The results give a broad overview of the differential platelet responses to mono or dual ADP-receptor blockade in a clinical context.

### **2.2.3. Methods**

#### **Study populations and design**

Perfusion experiments from the first study were done with 50 mL of blood drawn into 40  $\mu$ M D-phenylalanyl-L-prolyl-L-argininechloromethylketone (PPACK) (Calbiochem, La Jolla, Ca.) from normal donors using no drugs and with no known diseases. Blood for the second part of the study was obtained from ten patients with stable angina, all on aspirin 80 mg daily but on no other drugs interfering with platelet function or coagulation, and with no contraindications to clopidogrel. These patients had two atraumatic venipunctures from a forearm vein in a fasting state, one before the administration of clopidogrel and, the second, 24 hours later. A loading dose of clopidogrel 450 mg was administered under the direct supervision of the research nurse immediately after the first sampling. This blood was distributed between two series of tubes, one containing sodium citrate 0.38% final concentration, the other a mix of Hirudin 2 U/mL and of PPACK 40  $\mu$ mol/L. MRS2179 was solubilized in Tyrode's buffer [5] and added into one tube of each series immediately before the blood sampling to a final concentration of 100  $\mu$ M. Adenosine 5'diphosphate (ADP) and the thrombin receptor activating peptide-6 (TRAP-6, Sigma Chemical Co, St-Louis, Mo) were used as agonists at concentrations of 2.5  $\mu$ mol/L. The study was approved by the Montreal Heart Institute Internal Ethics Committee and carried out in compliance with the Declaration of Helsinki's recommendations after having obtained a signed informed consent from all participants.

### ***Study parameters***

*Real-time perfusion studies.* The PPACK-anticoagulated blood from healthy donors was pre-treated with 2-MeSAMP, MRS2179, or 2-MeSAMP plus MRS2179. Ten  $\mu\text{g/mL}$  rhodamine 6G (EMD Biosciences, Gibbstown, USA) were added in blood samples for 15 minutes at  $37^\circ\text{C}$  before perfusing glass capillaries (Vitrocom Hollow Rectangle Capillaries, Fiber Optic Center, New Bedford, USA) pre-coated overnight at  $4^\circ\text{C}$  with  $250 \mu\text{g/mL}$  of fibrillar equine type 1 collagen (Chronolog, Havertown, USA) at a wall-shear rate of  $1500 \text{ s}^{-1}$  and constant volume output using a syringe pump (Fisher Scientific, Ottawa, Canada) as described by Kauskot *et al.* [6]. The recruitment of rhodamine 6G-labelled platelets was monitored in a continuous motion (1 frame captured every 3 seconds) for 9 minutes by videomicroscopy using a CCD digital Camera (1308C Scion Corp., Frederick, USA) connected to a Nikon Diaphot 200 epifluorescence microscope. The platelet surface coverage and the mean grey level intensity of the surface covered by platelets were measured every 3 seconds as indicators of platelet adhesion and of thrombus mass respectively. Surface coverage was expressed as the percentage of the microscope field covered by platelets and the thrombus mass is in gray scale units (GSU). All quantifications were done with the ImageJ software and batch processing add-ons (Rasband, W.S., ImageJ, U. S. National Institutes of Health, Bethesda, Maryland, USA, <http://rsb.info.nih.gov/ij/>, 1997-2007.)

*Platelet aggregation* was evaluated by the Born method, by light transmission in stirred (1000 rpm) platelet-rich plasma (PRP) (Chronolog Corp, model 570VS with AggroLink Software package, Havertown, PA). Aggregation was measured at peak (Aggmax) that occurs approximately 1 min after the addition of agonists, and after 6 minutes (Agg6min) accounting then dissolution of the large aggregates. A percentage of disaggregation was calculated as  $100 \times (1 - \text{Aggmax}/\text{Agg6min})$  [5].

*Platelet secretion and platelet activation* were assessed by flow cytometry measurements of membrane P-selectin and activated GPIIb/IIIa expression using a phycoerythrine-conjugated

(PE) anti-CD62-P murine monoclonal antibody IgG1, and the FITC-conjugated murine IgM monoclonal antibody PAC-1 (Becton Dickinson, Mississauga, ON), respectively. The percentage of positive platelets was measured by flow cytometry (Beckman Coulter Epics XL, Florida) [5].

*Plt-mono and plt-PMN co-aggregate* formation was measured in whole blood after a 30-minute incubation period without stirring at room temperature, with the agonists and saturating concentrations of antibodies directed against CD14 (CD14-PE; Beckman Coulter) and CD42 (CD42-FITC; Becton Dickinson). Monocytes and neutrophils were differentiated according to their granularity and CD14 level of expression; the percentage of cells with bound platelet was measured by flow cytometry identification of CD42 positive cells [5].

### **Statistical analysis**

Points of measures in the study were changes in the various platelets function tests comparing baseline values with those obtained on clopidogrel (or 2-MeSAMP), MRS2179 and both. Based on previous studies with clopidogrel and preliminary work with MRS2179 in our laboratory, it was estimated that 10 experiments from different patients in the clopidogrel study would provide 90% power to detect an effect size of 2.0 to an alpha of 5% to detect a higher efficacy of MRS2179 to inhibit ADP-induced platelet function differently than placebo and clopidogrel (primary measure). Other measurements were effects of each drug and of the combination on TRAP-induced activations, and comparisons of the various results in blood preserved blood in hirudin/PPACK versus citrate. Adhesion and aggregation kinetics expressed as mean  $\pm$  SEM were analyzed using parametric paired t-tests. The measurements of interactions between clopidogrel-MRS2179 were non-normally distributed and therefore analyzed with non-parametric statistics and expressed as medians and interquartile ranges. Friedman non parametric ANOVAs were first performed; when statistically significant, the differences were located with Wilcoxon paired tests. The level of significance for two-sided hypothesis tests was set at a p-value less than 0.05; no correction factors were introduced for the multiplicity of analyses. The

SPSS 10.0 (Chicago, IL) was used for all analyses and graphs were designed with the Prism-4 software (GraphPad Software, USA).

## **2.2.4. Results**

### ***Study population***

Valid data were obtained from all perfusion and activation studies. The healthy volunteers received no medications; all 10 patients (1 woman and 9 men) were on aspirin 80 mg daily and a statin therapy; their median age was 62 years (range 53-75) and median BMI 30.0 (26-35).

### ***Platelet recruitment in perfusion chambers***

As can be seen in Fig 1A and 1B, MRS2179 in perfusion studies had no effect on platelet surface coverage throughout the 9-minute perfusion period, but halved thrombus growth ( $p=0.05$ ). Inhibition of P2Y<sub>12</sub> with 2-MeSAMP on the other hand, increased platelet surface coverage starting in the first few minutes of perfusion to reach statistical significance after 8 min ( $p=0.04$ , Fig 1A and 1C), and transiently attenuated thrombus growth for 2 minutes ( $p=0.03$  at 0.5 minutes and  $p=0.02$  at 1.5 minutes), effects subsequently lost resulting in non net changes after 3 minutes and 8 minutes (Fig 1C). Dual receptor inhibition drastically inhibited surface coverage, (Fig 1A and, 1B)) and abolished thrombus formation (Fig 1A and 1C).

In the same experimental conditions, aspirin alone or in combination with MRS2172 or with 2-MeSAMP had no detectable effect on platelet adhesion and on thrombus growth (data not shown).

### ***Platelet activation and aggregation***

Figure 2 shows a representative example of the effects of P2Y<sub>1</sub>, P2Y<sub>12</sub> and joint receptors inhibition on ADP-induced platelet aggregation (Figure 2A), and on flow cytometry CD62P expression and GPIIb/IIIa activation (PAC-1 binding) (Fig 2B and C). Table 1 provided the individual results and medians and interquartiles ranges for each parameter in response to ADP and TRAP

### ***Effects of clopidogrel***

Clopidogrel reduced peak and late aggregation to ADP by 30% (p=0.005) and 67% (p=0.005) respectively, and to TRAP by 19% (p=0.03) and 31% (p=0.01). The greater effect on late aggregation is explained by a marked disaggregation with clopidogrel that reached 85% in ADP studies and 32% in TRAP studies compared with spontaneous disaggregation of 43% and 10% respectively in the basal state (p=0.005). The inhibition of ADP effects on P-selectin, PAC-1 binding, and platelet-leukocytes were all statistically significant and within the range described in previous studies [5] (Table 2). Clopidogrel also inhibited more modestly but significantly TRAP effects on all these parameters.

### ***Effects of MRS2179***

MRS2179 alone inhibited by more than 90% ADP-induced peak and late aggregation and P-selectin expression (Figure 2 and 3), by 54% PAC-1 binding, 84% plt-mono and 69% plt-PMN conjugates formation. Minor changes only were observed with TRAP as agonist.

### ***Effects of clopidogrel-MRS2179***

The combination added little to the already maximal inhibition of peak and late aggregation achieved with MRS2179 alone, but completed the partial inhibition achieved with clopidogrel alone. It added over clopidogrel to inhibit P-selectin and plt-mono conjugates, and to each drug alone in reducing PAC-1 binding and plt-PMN conjugates.

With TRAP as an agonist, the combination amplified the effects of each drug alone in inhibiting peak and late aggregation and promoting disaggregation, but had no additional effects in inhibiting P-selectin expression, PAC-1 binding, plt-mono and plt-PMN conjugates formation.

### ***Influence of citrate vs. antithrombins on results***

The comparative data are shown in Table 2. Peak aggregation to ADP in the basal state reached 67% in antithrombin and was one third less in citrate. Percent inhibition of peak aggregation was 30% in antithrombin and 28% in citrate, and of late aggregation 80% and 53%

respectively. With the combination of MRS2179 and clopidogrel, both peak and late aggregation in antithrombin were reduced by 95% compared with 32% and 52% respectively in citrate.

### **2.2.5. Discussion**

An original finding of this study was the effects of selective blocking of the P2Y<sub>1</sub> and P2Y<sub>12</sub> receptors and of both receptors on a broad spectrum of platelet function tests in human blood obtained from normal volunteers and from patients with stable coronary artery disease. It provides a perspective on the potential benefit of P2Y<sub>1</sub> blockade alone compared or with concomitant P2Y<sub>12</sub> blockade. The efficacy of the latter approach, more specifically of clopidogrel and prasugrel, in preventing thrombotic events have highlighted the critical role of ADP in platelets activation in cardiovascular diseases. Yet, these drugs are targeting specifically P2Y<sub>12</sub>, leaving untouched P2Y<sub>1</sub>.

#### ***Thrombus formation in flow***

Although studies in PRP account for many platelet functions, they do not inform on shear-dependent platelet thrombus formation, which role is important role in blood hemostasis and in the pathogenesis of arterial thrombosis. Red cells, extracellular Ca<sup>2+</sup>, platelet membrane glycoproteins Ib/IX and IIb/IIIa, von Willebrand factor (vWF), and ADP are all involved in this function. Thrombus formation in arterial shear in this study was studied by a model of whole blood thrombus formation on fibrillar collagen in arterial flow conditions that mimicks the major steps of primary haemostasis i.e. platelet adhesion, activation and aggregation on a thrombogenic surface. While Turner et al. studied platelet deposition after a 60-second period of shear, [7] real-time monitoring over a long period of time in this study allows to describe time-dependant differences that are likely important in human pathophysiology; to our knowledge, such an approach has not yet been used, Thus, studies at a fixed one-minute perfusion would not have allowed detection of effects on surface coverage; in real-time analyses, directionally different changes were associated with P2Y<sub>1</sub> and P2Y<sub>12</sub> receptor blockade. Second, this method showed a reduced thrombus size with each receptor inhibition; the reduction was not sustained,

however, with P2Y12 blockade while it was amplified with P2Y1 blockage and strikingly potentiated with dual receptor inhibition (Figure 1). These results indicated that platelet recruitment onto thrombogenic surfaces monitored during short periods of time should be carefully interpreted. .

Previous reports in on arterial shear model described no sustained effects of P2Y12 inhibition with 2-MeSAMP or of cyclooxygenase 1 inhibition with aspirin [8]. The combination of aspirin and 2-MeSAMP was not either more effective. In contrast, MRS2179 in this study had no or little effects on adhesion assessed by surface coverage but halved thrombus formation, consistent with a weak effect of P2Y1 blockade on adhesion and strong effect on aggregation. The potentiation observed with dual blockade of P2Y1 and P2Y12 to partially decrease platelet coverage and totally inhibit thrombus formation– consistent with the aggregation studies – reveals a biological cross talk between the two-receptor types on ADP-induced adhesion and thrombus growth on a collagen surface. Knowledge of these interactions can help develop strategies to prevent thrombosis in high-arterial shear situations such as in severely obstructed coronary arteries or ruptured plaques. In these situations, primary adhesion of circulating platelets is mainly mediated through binding of von Willebrand factor and a secondary platelet recruitment resulting in thrombus formation promoted by platelet secreted products, largely ADP. A recent study demonstrated that continuous P2Y12 signaling was required to maintain GPIIb/IIIa activation and thrombi stable in the circulation [9]. Such was not the case in our model as P2Y12 blockade over a 9-minute period did not significantly destabilize the thrombi as measured by the grey scale intensity.

#### ***ADP-induced platelet activation***

To date, only few studies looked at the effects of dual blockage of P2Y1 and PY12. Leon et al. [4] and Fabre et al. [3] previously showed that P2Y1<sup>-/-</sup> mice were viable and had decreased platelet aggregation and increased bleeding time. Adding a P2Y12 inhibitor to these mice led to further platelet inhibition [10]. Consistently, MRS2500, a potent inhibitor of P2Y1 was

subsequently found active in mice in vivo to prolong bleeding time and inhibit thromboembolism formation with collagen and adrenaline [11]. In another study, selective blockage of P2Y<sub>12</sub> with the reversible agonist AR-C69931MX prevented thrombin-induced generation of tissue factor in PRP while P2Y<sub>1</sub> blockade with MRS2179 had no such effects however both drug combined inhibited P-selectin-induced platelet-leukocyte interactions and tissue factor exposure by leukocytes [12]. A synergistic effect to prevent GPIIb/IIIa receptors activation was described in isolated healthy human platelets following agonist stimulation with ADP 10  $\mu$ M; but no other parameters of platelet function were however examined in the study [13]. Our study extend these observations to characterize the effects of selective and dual receptor blockage to parameters of platelet function including activation, secretion and aggregation in blood of patients with coronary artery disease before and after oral treatment with clopidogrel, and with or without MRS2179 added ex vivo.

MRS2179 near completely prevented platelet aggregation; disaggregation, therefore, could not occur, and clopidogrel acting mainly on disaggregation had therefore no additional inhibitory effects. The combination, however, decreased platelet secretion by 66% and GPIIb/IIIa activation 93% ( $p=0.002$ ), and platelet binding to monocytes and to polymorphonuclear cells more effectively than each drug alone. Altogether, these data suggest that P2Y<sub>1</sub> is the main driver to the agonist effects of ADP, at least at the low concentration of 2.5  $\mu$ M of ADP used in this study. The data obtained with TRAP are consistent with these hypotheses.

#### ***TRAP-induced platelet activation***

The ADP secreted by activated platelets acts as a secondary agonist in recruiting circulating platelets into the thrombus and facilitating the effects of other agonists such as collagen and thrombin [14]. Consistently, clopidogrel in this study significantly inhibited TRAP-induced peak aggregation by 12%; disaggregation was also promoted resulting in more than three-fold decrease in late aggregation. The drug also partially inhibited P-selectin expression, PAC-1

binding, and formation of plt-mono and plt-PMN conjugates, as previously reported by our group [15].

These effects of clopidogrel exceeded those of MRS2179 particularly on disaggregation, late aggregation and P-selectin and PAC-1 expression. The combination of the 2 drugs strikingly magnified the inhibition of aggregation, most notably late aggregation indicating reduction of the stability of the platelet aggregates induced by TRAP. Notwithstanding this effect on aggregation, the addition of MRS2179 to clopidogrel added little on other parameters. More specifically, the combination had no additional effects on P-selectin, PAC-1, and on plt-mono and plt-PMN conjugate formation. The small effect on PAC-1 has been already described, [16] and another study using a higher concentration of TRAP reported greater inhibition of conjugates [12]. All together, these results support a significant contribution of P2Y<sub>12</sub> in the ADP dependant pathway to PAR-1 activation and aggregation as already suggested by Nylander *et al.* [16]. Studies have generally suggested that in shear stress conditions, P-selectin is essential to initiate platelet-leukocyte conjugates formation while integrin-mediated bridging contribute to the stability of these heterotypic aggregates.

#### ***Citrate versus anti-thombin***

Studies conducted in citrate compared with antithrombin underestimated the inhibition of P-selectin expression and PAC-1 binding. The percentages of plt-mono and plt-PMN conjugates were 3-5-fold higher in antithrombin in the basal state allowing detection of amount of inhibition in the range of 60% to 80%, twice as much as for citrate.

Such differences were not as pronounced in another study that made a similar comparison; higher concentrations of ADP 20 M were used in the study, possibly attenuating the differences [17]. Although the differential results observed between anticoagulants are more quantitative than qualitative and unlikely to influence such diagnoses as biological non-responsiveness [18], our results clearly show that measurements of platelet functions in sodium

citrate and antithrombins are not equivalent at least at low ADP concentrations. They also suggest that the impact of anticoagulants should be integrated in the evaluation of new antiplatelet drugs as was previously highlighted in studies with P2Y<sub>12</sub> inhibitors [8, 19, 20] and with GPIIb-IIIa antagonists [21].

### ***Perspectives***

The present study documents the differential effects of blocking platelet P2Y<sub>1</sub> or P2Y<sub>12</sub>, and the additive effects of blocking both purinergic receptor types, It originally used numerous methodologies yielding different perspectives on platelet functions in blood of normal volunteers and of patients with coronary artery disease, and on the effects that could be expected in a clinical setting.

***Acknowledgment: We thank Dr Marijke Bryckaert and Dr Frederic Adam for their expert technical assistance in the glass capillary perfusion mode, and M. Ghitescu and J. Rivard for their technical assistance.***

## Bibliography

- [1] Cattaneo M. Platelet P2 receptors: old and new targets for antithrombotic drugs. Expert review of cardiovascular therapy. 2007 Jan;5(1):45-55.
- [2] Gachet C. The platelet P2 receptors as molecular targets for old and new antiplatelet drugs. Pharmacol Ther. 2005 Nov;108(2):180-92.
- [3] Fabre JE, Nguyen M, Latour A, Keifer JA, Audoly LP, Coffman TM, *et al.* Decreased platelet aggregation, increased bleeding time and resistance to thromboembolism in P2Y1-deficient mice. Nat Med. 1999 Oct;5(10):1199-202.
- [4] Leon C, Hechler B, Freund M, Eckly A, Vial C, Ohlmann P, *et al.* Defective platelet aggregation and increased resistance to thrombosis in purinergic P2Y(1) receptor-null mice. J Clin Invest. 1999 Dec;104(12):1731-7.
- [5] Labarthe B, Theroux P, Angioi M, Ghitescu M. Matching the evaluation of the clinical efficacy of clopidogrel to platelet function tests relevant to the biological properties of the drug. J Am Coll Cardiol. 2005 Aug 16;46(4):638-45.
- [6] Kauskot A, Adam F, Mazharian A, Ajzenberg N, Berrou E, Bonnefoy A, *et al.* Involvement of the mitogen-activated protein kinase c-Jun NH2-terminal kinase 1 in thrombus formation. J Biol Chem. 2007 Nov 2;282(44):31990-9.
- [7] Turner NA, Moake JL, McIntire LV. Blockade of adenosine diphosphate receptors P2Y(12) and P2Y(1) is required to inhibit platelet aggregation in whole blood under flow. Blood. 2001 Dec 1;98(12):3340-5.
- [8] Andre P, LaRocca T, Delaney SM, Lin PH, Vincent D, Sinha U, *et al.* Anticoagulants (thrombin inhibitors) and aspirin synergize with P2Y12 receptor antagonism in thrombosis. Circulation. 2003 Nov 25;108(21):2697-703.

- [9] Cosemans JM, Munnix IC, Wetzker R, Heller R, Jackson SP, Heemskerk JW. Continuous signaling via PI3K isoforms beta and gamma is required for platelet ADP receptor function in dynamic thrombus stabilization. *Blood*. 2006 Nov 1;108(9):3045-52.
- [10] Lenain N, Freund M, Leon C, Cazenave JP, Gachet C. Inhibition of localized thrombosis in P2Y1-deficient mice and rodents treated with MRS2179, a P2Y1 receptor antagonist. *J Thromb Haemost*. 2003 Jun;1(6):1144-9.
- [11] Hechler B, Nonne C, Roh EJ, Cattaneo M, Cazenave JP, Lanza F, *et al*. MRS2500 [2-iodo-N6-methyl-(N)-methanocarpa-2'-deoxyadenosine-3',5'-bisphosphate], a potent, selective, and stable antagonist of the platelet P2Y1 receptor with strong antithrombotic activity in mice. *J Pharmacol Exp Ther*. 2006 Feb;316(2):556-63.
- [12] Leon C, Ravanat C, Freund M, Cazenave JP, Gachet C. Differential involvement of the P2Y1 and P2Y12 receptors in platelet procoagulant activity. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2003 Oct 1;23(10):1941-7.
- [13] Nylander S, Mattsson C, Ramstrom S, Lindahl TL. Synergistic action between inhibition of P2Y12/P2Y1 and P2Y12/thrombin in ADP- and thrombin-induced human platelet activation. *Br J Pharmacol*. 2004 Aug;142(8):1325-31.
- [14] Dorsam RT, Kunapuli SP. Central role of the P2Y12 receptor in platelet activation. *J Clin Invest*. 2004 Feb;113(3):340-5.
- [15] Xiao Z, Theroux P. Clopidogrel inhibits platelet-leukocyte interactions and thrombin receptor agonist peptide-induced platelet activation in patients with an acute coronary syndrome. *J Am Coll Cardiol*. 2004 Jun 2;43(11):1982-8.
- [16] Nylander S, Mattsson C, Ramstrom S, Lindahl TL. The relative importance of the ADP receptors, P2Y12 and P2Y1, in thrombin-induced platelet activation. *Thromb Res*. 2003;111(1-2):65-73.

[17] Tantry U, Bliden K, Etherington A, Gurbel P. Is the assessment of clopidogrel responsiveness affected by the anticoagulant or measurement of maximum platelet aggregation or final platelet aggregation? (Abstr). *J Thromb Haemost.* 2007;5(suppl 2).

[18] Gurbel PA, Bliden KP, Etherington A, Tantry US. Assessment of clopidogrel responsiveness: Measurements of maximum platelet aggregation, final platelet aggregation and their correlation with vasodilator-stimulated phosphoprotein in resistant patients. *Thromb Res.* 2007 Mar 30.

[19] Frelinger AL, 3rd, Jakubowski JA, Li Y, Barnard MR, Fox ML, Linden MD, *et al.* The active metabolite of prasugrel inhibits ADP-stimulated thrombo-inflammatory markers of platelet activation: Influence of other blood cells, calcium, and aspirin. *Thromb Haemost.* 2007 Jul;98(1):192-200.

[20] Patel P, Gonzalez R, Dokainish H, Lakkis N. Impact of adenosine diphosphate and calcium chelation on platelet aggregation testing in patients receiving clopidogrel therapy. *J Am Coll Cardiol.* 2006 Jan 17;47(2):464-5.

[21] Marciniak SJ, Jr., Jordan RE, Mascelli MA. Effect of Ca<sup>2+</sup> chelation on the platelet inhibitory ability of the GPIIb/IIIa antagonists abciximab, eptifibatide and tirofiban. *Thromb Haemost.* 2001 Mar;85(3):539-43.

**Legends to figures:**

**Figure 1:** (A) Synergistic effects of MRS2179 (100  $\mu$ M) and 2-MeSAMP (200  $\mu$ M) on the dynamic platelet recruitment onto collagen in flow. PPACK-anticoagulated whole blood labeled with rhodamine 6G was circulated for 540 seconds at an arterial shear rate (1500 s<sup>-1</sup>) in rectangular glass capillaries coated with fibrillar collagen. Real-time deposition of fluorescent platelets was measured (B) as the percent of surface coverage (platelet adhesion) and (C) as fluorescence intensity as an indicator of thrombus growth as described in the material and methods.

**Figure 2:** Representative tracings of platelet aggregation curves obtained in PRP containing an anti-thrombin (A), and of platelet membrane P-selectin expression and PAC-1 binding studied in whole blood by flow cytometry (B). The agonist is ADP 2.5  $\mu$ M. Tracings are obtained at baseline before (baseline) and after the addition of MRS2179 (MRS2179); this sequence is again repeated 24h after a loading dose of 450 mg of clopidogrel (clopidogrel and clopidogrel plus MRS2179). Platelet aggregation is partially inhibited by clopidogrel and completely abrogated by MRS2179. P-selectin expression and of GPIIb/IIIa activation are increasingly inhibited with clopidogrel, MRS2179, and clopidogrel plus MRS2179).

**Figure 3:** Inhibition of platelet ADP- and TRAP-induced aggregation, secretion, activation, and platelet-monocyte (Plt-Mono) and platelet-neutrophil (Plt-PMN) conjugates formation by clopidogrel, MRS2179 and the combination. Medians are shown and at the bottom, p-values: \* =  $p < 0.05$ .

**Legends to tables**

**Table 1:** Platelet parameters in response to MRS2179, clopidogrel, and the combination.

Values are medians and 25th and 75th percentiles; \* $p < 0.05$  vs. baseline ; †  $p < 0.05$  vs. Clop;  $\zeta$   $p < 0.05$  vs. MRS2179.

HP: Hirudin/PPACK; Aggmax: Peak aggregation; Agg6min: late aggregation; Disagg: Platelet disaggregation between peak and 6 min; Psel: membrane P-selectin expression; PAC-1: activated GPIIb/IIIa receptors; Plt-Mono: Percentage monocytes co-aggregated with platelets; Plt-PMN: Percentage of neutrophils co-aggregated with platelets.

**Table 2:** Platelet responsiveness assessed in anti-thrombin and in citrate.

Values are medians and 25th and 75th percentiles; †  $p \leq 0.01$ ; \*  $p \leq 0.05$  vs. citrate.

Abbreviations as in Table 1.

Figure 1

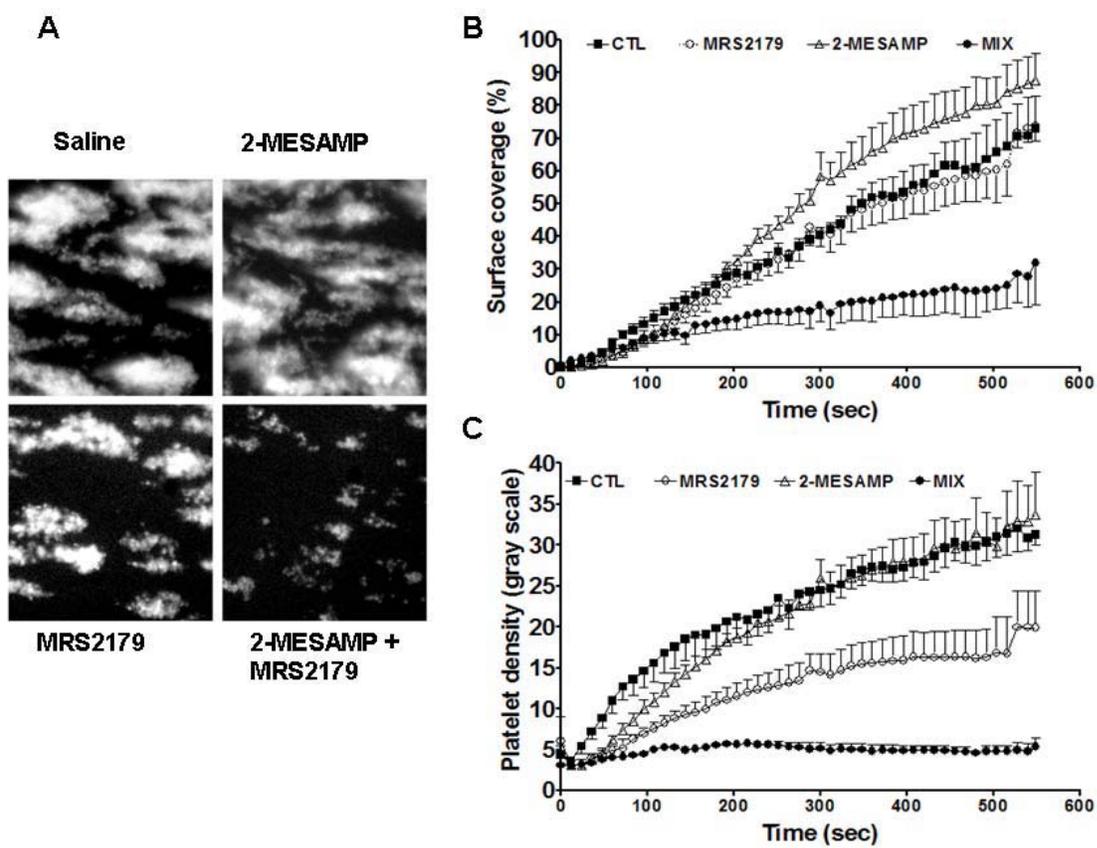


Figure 2

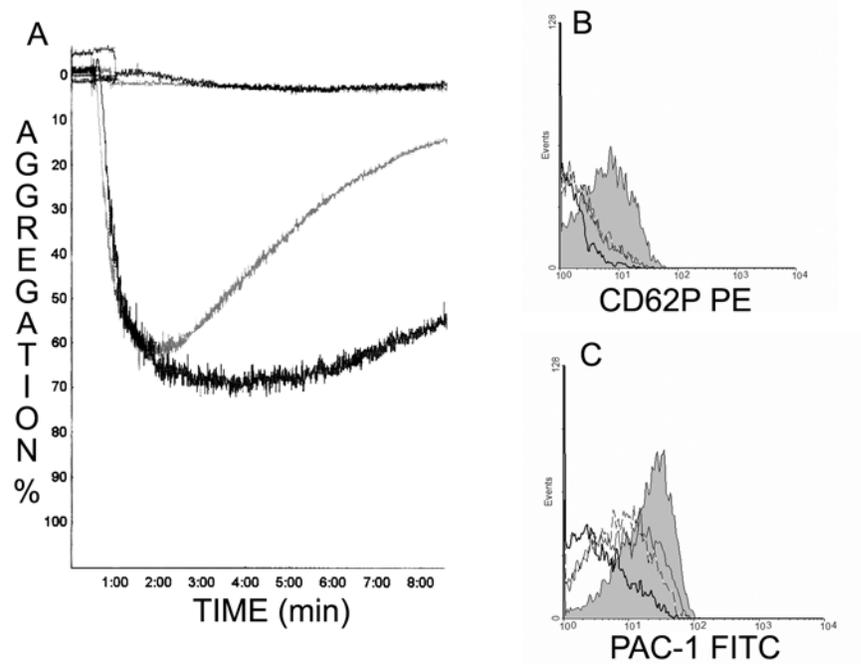
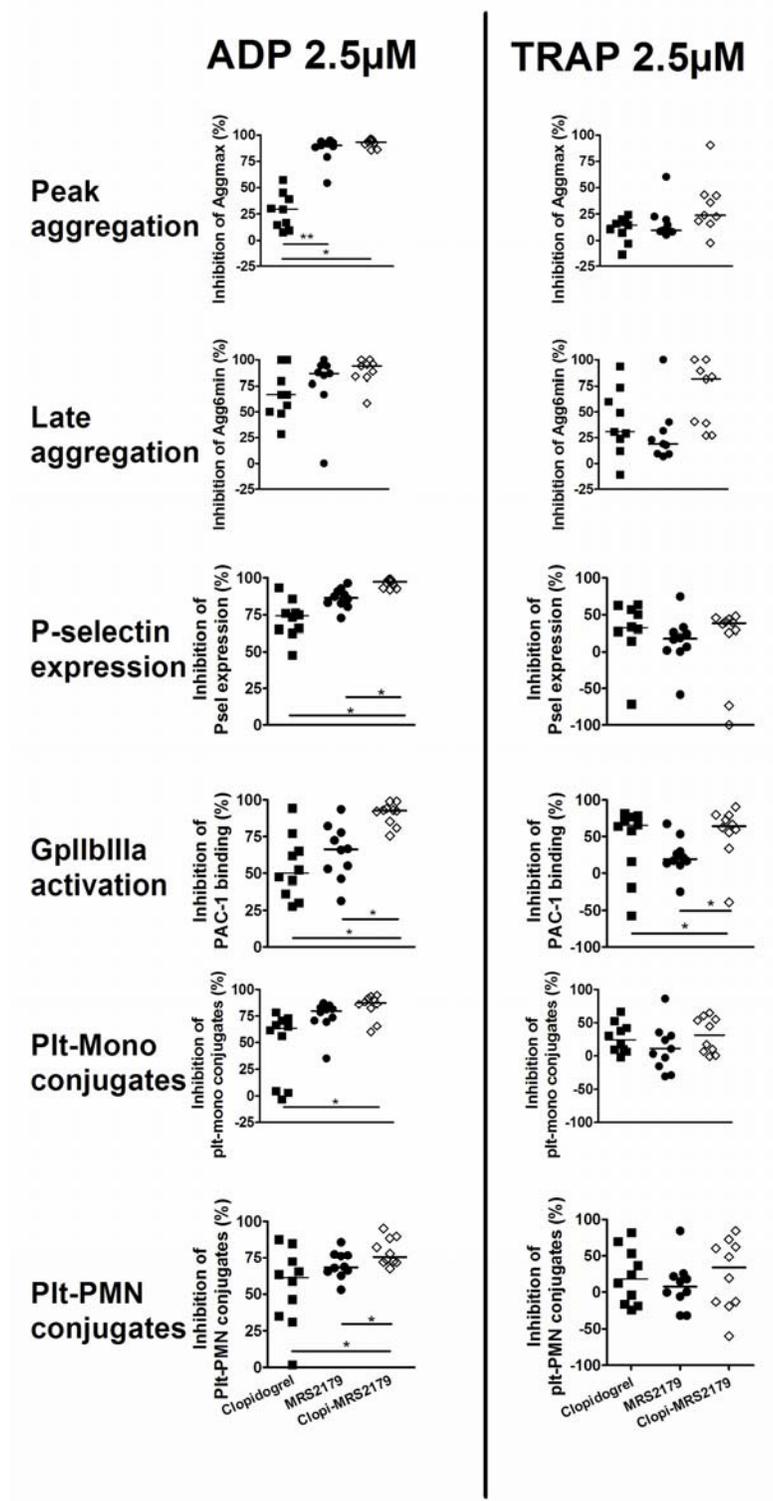


Figure 3



**Table 1: Platelet parameters in response to MRS2179, clopidogrel, and the combination in Hirudin-PPACK**

|                 | ADP 2.5 $\mu$ M     |                              |                             |                               | TRAP-6 2.5 $\mu$ M  |                              |                             |                                |
|-----------------|---------------------|------------------------------|-----------------------------|-------------------------------|---------------------|------------------------------|-----------------------------|--------------------------------|
|                 | <i>Baseline</i>     |                              | <i>24h post clopidogrel</i> |                               | <i>Baseline</i>     |                              | <i>24h post clopidogrel</i> |                                |
|                 | <i>TBS</i>          | <i>MRS2179</i>               | <i>TBS</i>                  | <i>MRS2179</i>                | <i>TBS</i>          | <i>MRS2179</i>               | <i>TBS</i>                  | <i>MRS2179</i>                 |
| <b>Aggmax</b>   | 67.0<br>(54.0-74.8) | <b>4.5*†</b><br>(4.0- 8.0)   | <b>47.5*</b><br>(38.5-56.3) | <b>4*†</b><br>(2.8- 6.3)      | 81.5<br>(74- 84.5)  | <b>69.5*</b><br>(57.3- 76)   | <b>71*</b><br>(66.5-75.3)   | <b>53.5*†</b><br>(47.5- 66)    |
| <b>Agg6min</b>  | 39.5<br>(7.3-65.3)  | <b>4*</b><br>(3.0- 6.5)      | <b>8*</b><br>(0- 25.8)      | <b>3*†</b><br>(1.5- 5.3)      | 74.0<br>(60.8-78.3) | <b>55.5*</b><br>(30.5- 65.5) | <b>46*</b><br>(21.5-61.0)   | <b>12.5*† ζ</b><br>(0- 45.5)   |
| <b>Disagg</b>   | 43.4<br>(13.0-87.5) | <b>0*†</b><br>(0- 35.0)      | <b>84.6*</b><br>(50.8-100)  | <b>0*†</b><br>(0-34.3)        | 9.6<br>(8.3-18.1)   | <b>20.7*</b><br>(17.0- 47.3) | <b>31.8*</b><br>(16.5-69.0) | <b>53.7* ζ</b><br>(25.7- 100)  |
| <b>P-sel</b>    | 29.9<br>(26.7-42.9) | <b>3*†</b><br>(2.9- 7.2)     | <b>8.2*</b><br>(4.4- 15.6)  | <b>0.69*† ζ</b><br>(0.3- 3.0) | 62.2<br>(39.7-67.6) | <b>49.8*</b><br>(30.7- 61.2) | 32.8<br>(24.3-48.4)         | <b>38.9</b><br>(29.2- 51)      |
| <b>PAC-1</b>    | 78.2<br>(49.8-81.8) | <b>24.7*</b><br>(12.8- 38.3) | <b>39.4*</b><br>(13.6-51.7) | <b>5.9*† ζ</b><br>(2.4- 12.1) | 60.5<br>(31.1-86.1) | <b>42.2*</b><br>(18.6- 72.5) | <b>27.8*</b><br>(14- 50.7)  | <b>21.8* ζ</b><br>(14.1- 32.3) |
| <b>Plt-mono</b> | 21.6<br>(12.3-34.3) | <b>3.5*</b><br>(2.7- 6.4)    | <b>7.7*</b><br>(6.1- 16.9)  | <b>2.5*† ζ</b><br>(2.4- 3.0)  | 37.4<br>(30.1-52.8) | 36.9<br>(23.8- 43.3)         | <b>31.2*</b><br>(23.3- 33)  | <b>28.3*</b><br>(19.1- 30.5)   |
| <b>Plt-PMN</b>  | 6.2<br>(4.1-11.2)   | <b>1.6*</b><br>(1.3- 2.8)    | <b>2.7*</b><br>(1.3- 5.5)   | <b>1.3*† ζ</b><br>(1.1- 1.6)  | 17.9<br>(13.1-24.1) | 17.2<br>(12.6- 22.2)         | 14.7<br>(10.3-18.6)         | 10.1<br>(9- 18.3)              |

Values are medians and 25<sup>th</sup> and 75<sup>th</sup> percentiles; p values were assessed by Wilcoxon test.

\*p<0.05 vs. Base ; † p<0.05 vs. Clop; ζ p<0.05 vs. MRS2179.

Aggmax: Peak aggregation; Agg6min: late aggregation; Disagg: Platelet disaggregation between peak and 6 min; P-sel: membrane P-selectin expression measured with an anti CD62-P monoclonal antibody. PAC-1: monoclonal antibody labeling activated GPIIb/IIIa receptors; Plt-Mono: Percentage of monocytes co-aggregated with platelets; Plt-PMN: Percentage of neutrophils co-aggregated with platelets.

Table 2: Platelet responsiveness assessed in anti-thrombin and in citrate

|                      |                      | Aggmax   | Agg6min                 | Disagg                     | P-sel                       | PAC-1                        | Plt-mono                     | Plt-PMN                      |                              |                              |
|----------------------|----------------------|----------|-------------------------|----------------------------|-----------------------------|------------------------------|------------------------------|------------------------------|------------------------------|------------------------------|
| TBS                  | Baseline             | HP       | <b>3*</b><br>(1.5- 4.5) | <b>1.5*</b><br>(0- 3)      | NA<br>NA                    | <b>0.04*</b><br>(0.02- 0.07) | <b>0.05*</b><br>(0.02- 0.13) | 2.25<br>(1.77- 3)            | 0.94<br>(0.75- 1.31)         |                              |
|                      |                      | Citrate  | 5.5<br>(4- 8.5)         | 5.5<br>(3.5- 8)            | NA<br>NA                    | 0.1<br>(0.1- 0.2)            | 0.2<br>(0.1- 0.5)            | 2.0<br>(1.6- 2.8)            | 1<br>(0.5- 1.4)              |                              |
|                      | MRS2179              | HP       | <b>3*</b><br>(1.5- 4)   | <b>2*</b><br>(0- 3.5)      | NA<br>NA                    | 0.07<br>(0- 0.12)            | 0.11<br>(0.04- 0.18)         | 2.46<br>(1.98- 3.09)         | 1.47<br>(0.71- 1.89)         |                              |
|                      |                      | Citrate  | 7<br>(4- 12)            | 7<br>(4- 11)               | NA<br>NA                    | 0.1<br>(0- 0.2)              | 0.3<br>(0.1- 0.4)            | 2.4<br>(1.8- 2.6)            | 1.1<br>(0.7- 1.5)            |                              |
|                      | 24h post clopidogrel | HP       | <b>3*</b><br>1- 4       | <b>3*</b><br>1- 4          | NA<br>NA                    | 0.06<br>(0.02- 0.08)         | <b>0.08*</b><br>(0.04- 0.14) | 2.57<br>(1.96- 3.33)         | 1.08<br>(0.87- 1.32)         |                              |
|                      |                      | Citrate  | 6.5<br>(4.5- 14)        | 6.5<br>(4- 8.5)            | NA<br>NA                    | 0.1<br>(0- 0.1)              | 0.2<br>(0.1- 0.4)            | 2.3<br>(1.5- 2.9)            | 1<br>(0.6- 1.7)              |                              |
|                      | 24h post clopidogrel | HP       | <b>3*</b><br>(2- 4.5)   | <b>2.5*</b><br>(2- 4)      | NA<br>NA                    | 0.06<br>(0.04- 0.11)         | 0.1<br>(0.06- 0.15)          | 2.79<br>(2.09- 3.62)         | 1.21<br>(0.91- 1.32)         |                              |
|                      |                      | Citrate  | 8<br>(6.0- 11)          | 6.5<br>(5.5- 10)           | NA<br>NA                    | 0.1<br>(0- 0.7)              | 0.2<br>(0.1- 0.3)            | 2.6<br>(1.6- 3.4)            | 1.3<br>(1.1- 2.8)            |                              |
|                      | ADP 2.5µM            | Baseline | HP                      | <b>67†</b><br>(54.0- 74.8) | 39.5<br>(7.3- 65.3)         | 43.4<br>(13.0- 87.5)         | 29.9<br>(26.7- 42.9)         | <b>78.2*</b><br>(49.8- 81.8) | <b>21.6†</b><br>(12.3- 34.3) | <b>6.2†</b><br>(4.1- 11.2)   |
|                      |                      |          | Citrate                 | 43<br>(34.8- 57.5)         | 29<br>(22.5- 41.8)          | 29.5<br>(22.3- 40.6)         | 30.9<br>(22.9- 52.6)         | 82.7<br>(70.2- 87.1)         | 5.4<br>(3.0- 9.3)            | 2.1<br>(1.3- 4.6)            |
|                      |                      | MRS2179  | HP                      | <b>4.5*</b><br>(4- 8)      | <b>4*</b><br>(3- 6.5)       | 0<br>(0- 35.0)               | <b>3.8*</b><br>(2.9- 7.16)   | <b>24.7†</b><br>(12.8- 38.3) | <b>3.5†</b><br>(2.7- 6.4)    | <b>1.6*</b><br>(1.3- 2.8)    |
|                      |                      |          | Citrate                 | 27<br>(17- 35)             | 25<br>(17.5- 34)            | 0<br>(0- 7.5)                | 7.1<br>(2.7- 11)             | 44<br>(27.9- 61.8)           | 2.8<br>(2.25- 3)             | 1.1<br>(0.8- 1.6)            |
| 24h post clopidogrel |                      | HP       | 47.5<br>(36.5- 56.3)    | 8<br>(0- 25.8)             | <b>84.6*</b><br>(50.8- 100) | <b>8.2*</b><br>(4.4- 15.6)   | <b>39.4*</b><br>(13.6- 51.7) | <b>7.7†</b><br>(6.1- 16.9)   | <b>2.7*</b><br>(1.3- 5.5)    |                              |
|                      |                      | Citrate  | 31.0<br>(27.5- 39.8)    | 12.5<br>(7.5- 22.3)        | 59.1<br>(32.0- 81.0)        | 14.8<br>(6.5- 21.5)          | 58.2<br>(16.3- 69.7)         | 3.5<br>(3- 5.4)              | 1.2<br>(0.9- 1.9)            |                              |
| 24h post clopidogrel |                      | HP       | <b>5†</b><br>(2.8- 6.3) | <b>3*</b><br>(1.5- 5.3)    | 0<br>(0-34.3)               | <b>0.69†</b><br>(0.28- 3.0)  | <b>5.9†</b><br>(2.4- 12.1)   | 2.5<br>(2.39- 3.0)           | 1.3<br>(1.1- 1.6)            |                              |
|                      |                      | Citrate  | 14.0<br>(7.3- 18.3)     | 14<br>(7- 17.5)            | 0<br>(0- 11.7)              | 2.96<br>(1.46- 5.16)         | 22.5<br>(15.4- 33.1)         | 2.9<br>(1.8- 5.9)            | 1.2<br>(1.1- 10.8)           |                              |
| TRAP 2.5µM           |                      | Baseline | HP                      | <b>81.5†</b><br>73- 85     | 74.5<br>60- 78.5            | 9.3<br>7.45- 17.35           | 62.2<br>(39.7- 67.6)         | 60.5<br>(31.1- 86.1)         | <b>37.4†</b><br>(30.1- 52.8) | <b>17.9†</b><br>(13.1- 24.1) |
|                      |                      |          | Citrate                 | 68<br>60- 81               | 63<br>51.5- 76              | 11.3<br>5.15- 17.7           | 62<br>(36.9- 66.8)           | 79<br>(54.3- 84)             | 15.7<br>(9.2- 19.8)          | 7.2<br>(5.3- 11.6)           |
|                      |                      | MRS2179  | HP                      | 69.5<br>56.5- 76           | 58<br>22- 66                | 0<br>0- 75                   | <b>49.8†</b><br>(30.7- 61.2) | <b>42.2†</b><br>(18.6- 72.5) | <b>36.9†</b><br>(23.8- 43.3) | <b>17.2*</b><br>(12.6- 22.2) |
|                      |                      |          | Citrate                 | 62<br>59.5- 67.5           | 55<br>46.5- 61.5            | 12.9<br>9- 21.8              | 60.7<br>(37.9- 66.1)         | 59.8<br>(33- 78.3)           | 18.0<br>(10.9- 30.9)         | 7.0<br>(4.9- 18.2)           |
|                      | 24h post clopidogrel | HP       | 71<br>66- 75.5          | 47<br>22.5- 62.5           | 81.9<br>49.55- 100          | 32.8<br>(24.3- 48.4)         | <b>27.8*</b><br>(14- 50.7)   | <b>31.2*</b><br>(23.3- 33)   | 14.7<br>(10.3- 18.6)         |                              |
|                      |                      | Citrate  | 62.5<br>47- 72.5        | 42<br>18.5- 62             | 34.3<br>10.4- 62.45         | 46.3<br>(23.9- 57.7)         | 53.8<br>(21.6- 66)           | 14.1<br>(12.2- 22.5)         | 6.8<br>(4.4- 12.7)           |                              |
|                      | 24h post clopidogrel | HP       | 53.5<br>47- 67          | 12.5<br>0- 47              | 14.3<br>0- 100              | 38.9<br>(29.2- 51)           | <b>21.8*</b><br>(14.1- 32.3) | <b>28.3*</b><br>(19.1- 30.5) | 10.1<br>(9- 18.3)            |                              |
|                      |                      | Citrate  | 54.5<br>37.5- 63.5      | 35<br>10- 47.5             | 34.55<br>20.3- 70.5         | 48.5<br>(30.9- 50.5)         | 37.1<br>(14- 54.8)           | 15.9<br>(9.5- 24.4)          | 7<br>(4.9- 13.6)             |                              |

Values are medians and 25<sup>th</sup> and 75<sup>th</sup> percentiles; p values were assessed by Wilcoxon test. † p ≤0.01; \* p ≤0.05 vs. citrate. HP: Hirudin/PPACK, TBS: Tyrode buffer solution added as control, all other abbreviations are as for Table 1.

### **2.3. Présentation de l'article 3**

---

*Pourquoi mesurer le degré d'Ordre Liquide Membranaire ?* L'OLM est un paramètre biophysique représentant l'état des membranes composées de lipides. Cependant cette mesure est partiellement dépendante de facteurs biochimiques (composition lipidique...), cellulaires (cytosquelette), physiques (incurvations de la membrane, contraintes extérieures). Il est possible de définir dans des modèles de vésicules des phases liquides ordonnées (Lo) et désordonnées (Ld). Bien que ces notions ne soient pas directement transposables en biologie cellulaire à cause de l'extrême complexité et du dynamisme des membranes cellulaires, il apparaît maintenant que différents niveaux d'OLM co-existent au sein des membranes. Ces niveaux forment des microdomaines distincts et il est probable que certains jouent des rôles différents selon leur structure. La mesure de l'OLM constitue donc potentiellement un paramètre très riche en information sur la cellule.

Comme cela a été mentionné précédemment, les fluorochromes disponibles avant la description du di-4-ANEPPDHQ en 2006 ne permettaient pas de travailler sur des cellules vivantes et à des longueurs d'onde peu toxiques pour les cellules. La nécessité de fixer les cellules retirait l'aspect dynamique fondamental à l'étude des membranes. L'arrivée du di-4-ANEPPDHQ a modifié la situation en permettant l'utilisation de cellules vivantes. Jin *et coll.* [113] ont fait la première description de l'utilisation de ce fluorochrome sur des cellules vivantes en microscopie et ceci a été repris début 2006 par le Dr Maguy de l'ICM. C'est en partant de ces travaux que j'ai développé la méthode de mesure relative de l'OLM des cellules par cytométrie de flux. Contrairement à l'approche par microscopie, la mesure en cytométrie de flux ne permet pas une distinction topographique des sous-domaines membranaires dans chaque membrane mais offre l'avantage de pouvoir quantifier l'OLM global des microdomaines. Ceci peut donc

refléter à la fois des changements de la membrane plasmiques mais aussi des changements intracellulaires (phénomènes de sécrétions granulaires par exemple).

Pour effectuer la quantification de l'OLM et des microdomaines, nous nous sommes orientés vers la cytométrie en flux. Cette technique possède plusieurs avantages précieux pour notre approche : (1) la quantification de la fluorescence simultanée sur plusieurs canaux, (2) l'étude de cellules non adhérentes comme la plupart des cellules circulantes au repos, (3) l'analyse de populations importantes de cellules (de 20 000 à 1 million de cellules par mesure).

Cette mesure repose sur le calcul pour chaque cellule d'un ou des rapports d'intensités de fluorescence mesurées entre différentes bandes passantes du spectre d'émission du di-4-ANEPPDHQ. Nous avons posé l'hypothèse que chaque bande passante correspondait à un état d'OLM plus ou moins élevé. Dans leur article, Jin *et coll.* ont décrit deux zones : l'une correspondant à la phase plus ordonnée située sur la bande passante entre 500 et 550 nm et l'autre qui correspond à la phase moins ordonnée entre 650 et 710 nm [113]. Nous avons dans un premier temps adapté cette méthode à la cytométrie de flux puis l'avons perfectionné pour finalement permettre la mesure de six canaux de fluorescence correspondant potentiellement à six états d'ordre distincts.

La première partie du travail a consisté en la validation de la méthode de quantification de l'OLM par différentes expériences de modifications des membranes plaquettaires puis en l'association de ces modifications à un aspect fonctionnel plaquettaire. Outre cette approche deux autres champs d'application ont été explorés : (1) l'apoptose cellulaire et (2) la mesure des microparticules plaquettaires. L'article présenté ne concernera que la validation et l'application de cette méthode pour le phénotypage cellulaire. Les données concernant l'apoptose et les microparticules seront exposées en annexe.

Cette étude a permis de :

- *Décrire une nouvelle méthode de mesure de la quantité relative des zones membranaires liquide-ordonnées de type « Lipid Rafts» dans des cellules vivantes par cytométrie de flux.*
- *Mettre en évidence une diminution de l'OLM lors de l'activation plaquettaire.*
- *Mettre en évidence l'apparition d'une sous-population plaquettaire distincte en condition de forces de cisaillement élevées.*
- *Mettre en évidence une augmentation de l'OLM plaquettaire après six semaines de traitement par l'atorvastatine, un inhibiteur de la synthèse du cholestérol.*
- *Mettre en évidence une augmentation de l'OLM plaquettaire après un traitement par le clopidogrel.*

B.L. : Elaboration du concept à étudier, conception des études, validation des méthodes, analyse des résultats, rédaction de l'article

A.M. : Elaboration du concept à étudier

P.T. : Supervision, rédaction de l'article

A.B. : Supervision, élaboration du concept à étudier, analyse des résultats, rédaction de l'article

Deux résumés touchant certains de ces aspects ont récemment été soumis pour présentation au congrès scientifique annuel de l'American Society of Hematology (ASH)

**A novel flow cytometric approach to quantify lipid membrane microdomains in living human platelets. Applications to the study of the *in vivo* platelet effects of atorvastatin and clopidogrel**

---

Benoît Labarthe,\* Ange Maguy,\* Pierre Thérooux \*, Arnaud Bonnefoy\*†

**Article en préparation**

From

\* Department of Medicine, Montreal Heart Institute and University of Montreal,  
Montreal, Quebec, Canada, H1T1C8.

† INSERM U743, University of Montreal, Quebec, Canada, H2X1P1.

Correspondence to Pierre Thérooux, MD

Address: Montreal Heart Institute, 5000 Belanger E, Montreal, QC (Quebec), Canada H1T  
1C8

Tel: (514) 376-3330 ext 3616

Fax: (514) 376-1076

E-mail: [pierre.theroux@ICM-MHI.org](mailto:pierre.theroux@ICM-MHI.org)

There exist no conflicts of interest with any of the authors in this manuscript.

### 2.3.1. Introduction

Les « lipid rafts » sont des microdomaines membranaires (MM) formés au sein d'une membrane lipidique et présents sur toutes les cellules de l'organisme. La membrane plasmique, longtemps considérée comme une bicouche lipidique fluide et homogène, a été décrite par le terme de « mosaïque fluide » pour la première fois par Singer et Nicholson en 1972 [65]. Cette conception a évolué, notamment avec l'introduction de la notion de « Lipid Rafts » par Simons et Ikonen [75]. Les auteurs présentent alors un modèle de microdomaines membranaires, enrichis en cholestérol et en sphingolipides qui participent à la transmission de signaux. Une définition mise à jour, proposée par le Pr Linda Pike en 2006 insiste sur le fait que les radeaux membranaires « *sont des domaines de petite taille (10-200 nm), hétérogènes, très dynamiques, enrichis en stérols et en sphingolipides qui compartimentent des processus cellulaires* » [76]. Les MM contiennent aussi des protéines, dont la présence est favorisée par la fixation à des ancras glycosyl-phosphatidyl inositol (GPI) et par des réactions d'acylation avec des acides gras saturés comme le palmitate et le myristate.

Il est maintenant connu que ces MM participent à de nombreuses fonctions cellulaires physiologiques ou pathologiques comme la formation des synapses immunologiques entre les lymphocytes T et les cellules présentatrices d'antigènes, la fonction plaquettaire, l'invasion de cellules par des virus. Ils sont nécessaires à la fonction de nombreux récepteurs. Au niveau plaquettaire, ces MM participent à la signalisation induite par le récepteur P2Y<sub>12</sub> de l'ADP, à la fonction et la signalisation du récepteur GPVI aux collagènes et à la fonction du récepteur GP Ib-IX-V du facteur de von Willebrand [149, 165]. Des études suggèrent de plus que les microdomaines de la membrane plasmique pourraient participer à la formation des microparticules plaquettaires comme cela a déjà été montré pour les monocytes [61].

La plupart des techniques d'étude actuelles des MM basées sur l'étude des « Detergent Resistant Membranes » induisent des artéfacts dus aux conditions expérimentales (détergents, température...) qui ne permettent pas d'étudier sans les modifier des structures aussi

dynamiques. La controverse née autour du concept de MM et de ces techniques de séparation soulignent la nécessité de la mise au point de nouvelles méthodes d'étude [79, 94].

De nombreux marqueurs fluorescents ont été utilisés pour tenter de visualiser les MM [97] dont les plus connus sont la sous-unité  $\beta$  de la toxine cholérique qui reconnaît le ganglioside GM1 considéré comme un marqueur des « lipid rafts » et les analogues du cholestérol comme le déhydroergostérol. Une autre approche a été introduite avec l'utilisation de dérivés sensibles au degré d'OLM. La correspondance entre les microdomaines membranaires cellulaires comprenant des milliers de types de lipides et les zones de membrane lipidiques ordonnées (Lo) formées de 2 ou 3 lipides différents n'est pas encore totalement acceptée par manque d'outils d'analyse [79]. Cependant les études de Gombos *et coll.* [166], de Gaus *et coll.* [133] et de Jin *et coll.* [113] ont démontré que l'analyse de l'OLM permet de caractériser les MM cellulaires par microscopie optique. Ces trois études s'appuient sur l'utilisation de senseurs fluorescents pour lesquels une variation de l'OLM de la membrane fait varier soit la polarisation de la fluorescence émise par le dilC18 [166], soit la longueur d'onde d'émission pour le laurdan [133] ou le di-4-ANEPPDHQ [113]. Le dilC18 et le laurdan ont cependant des limites dans leur utilisation : le dilC18 est relativement exclu des phases riches en sphingomyéline, alors que la faible solubilité et l'excitation en ultraviolet du laurdan limitent son utilisation pour les cellules vivantes. L'utilisation du di-4-ANEPPDHQ [113], du fait de son hydrosolubilité et la possibilité d'utiliser un laser à 488nm entraînant moins de lésions cellulaires, est compatible avec des analyses sur cellules vivantes. Cependant ces analyses restent peu ou pas adaptées à un contexte clinique et limitent considérablement l'étude des MM dans le cadre de pathologies.

Dans cette étude nous présentons une méthode d'analyse ratiométrique de l'OLM global des plaquettes sanguines par cytométrie en flux après marquage par le di-4-ANEPPDHQ. Cette quantification permet de détecter des modifications de l'OLM provoquées par des modifications de la composition en cholestérol et en sphingomyéline de la membrane, mais aussi par activation

plaquettaire induite par différents agonistes solubles ou par le cisaillement, tout en introduisant un minimum d'actéfacts expérimentaux. L'analyse en cytométrie spectrale de la fluorescence du di-4-ANEPPDHQ permet de plus de déterminer des profils distincts d'ordres de membrane. Ceux-ci sont notamment modifiés chez des patients hyperlipidémiques après 6 semaines de traitement par l'atorvastatine ou encore par le clopidogrel chez des patients avec maladie coronarienne.

### 2.3.2. Matériel et méthodes

#### Prélèvements de donneurs sains et des patients traités

Tous les prélèvements ont été effectués après avoir obtenu le consentement éclairé des donneurs, dans le cadre de protocoles approuvés par le comité d'éthique de l'Institut de Cardiologie de Montréal et en accord avec les recommandations de la Déclaration d'Helsinki.

Les donneurs sains ne présentent pas de maladie cardiovasculaire ni de dyslipidémie connues et n'ont pas pris de médicaments pouvant interférer avec la fonction plaquettaire, la coagulation ou le métabolisme des lipides au moment de l'étude.

- *Patients de l'étude ANEP-statine*

L'étude ANEP-statine regroupe 20 patients hyperlipidémiques (LDL > 3,5 mM) sans antécédents de maladie cardiovasculaire, non traités, mais chez qui un traitement par statine est indiqué. Outre les paramètres plaquettaires, les taux plasmatiques de HDL, LDL, triglycérides, de l'apolipoprotéine (Apo) A1, de l'ApoB, de la lipoprotéine a (Lpa) ont été mesurés avant et après 90 jours de traitement quotidien par 40 mg d'atorvastatine. Tous les prélèvements sont effectués le matin à jeun.

- *Patients de la sous-étude ANEP-PREPAIR*

Parmi les 150 patients inclus dans l'étude PREPAIR [3], 65 ont été inclus dans la sous-étude ANEP. Ces patients, avec une maladie coronarienne documentée ou suspectée et non traités par clopidogrel ont été admis à l'ICM pour une angiographie coronaire et inclus dans l'étude randomisée PREPAIR. Les caractéristiques précises des patients et schémas thérapeutique sont décrits dans l'article de L'Allier *et coll.* (en annexe de ce mémoire) [3]. Brièvement, lors de cette étude, les patients ont été randomisés dans trois groupes de traitements : le groupe A recevait 300 mg de clopidogrel le jour avant ( $\geq 15$ h) +75 mg le matin de l'intervention ; le groupe B recevait 600 mg de clopidogrel le matin de l'intervention ( $\geq 2$ h avant) ; et le groupe C recevait

600 mg de clopidogrel la veille ( $\geq 15$ h) et 600 mg de clopidogrel le matin de l'intervention ( $\geq 2$ h avant). Les prélèvements ont été effectués avant la première dose du protocole d'administration puis immédiatement avant la coronarographie (effectuée au minimum 2h après la dernière dose du protocole). Pour les patients ayant subi une dilatation, un prélèvement est effectué après l'opération. Toutes les analyses ont été effectuées en aveugle, sans connaissance des traitements et sans contact avec le patient.

### **Préparation des plaquettes lavées**

Le sang est prélevé sur citrate de sodium 3,2% (Vacutainer, Becton Dickinson, Mississauga, ON) et les plaquettes lavées sont préparées immédiatement. Après une première centrifugation (120g 15min) pour préparer le Plasma Riche en Plaquettes (PRP), les plaquettes sont lavées deux fois avec du tampon de lavage (citrate de sodium 13 mM, glucose 30 mM, NaCl 120 mM) avec 28  $\mu$ g/mL de PGE1 (Sigma Chemical Co., Oakville, Ontario, Canada). Les plaquettes sont finalement resuspendues dans du tampon Tyrode Modifié contenant NaCl 137 mM, KCl 2,8 mM, MgCl<sub>2</sub> 6H<sub>2</sub>O 1 mM, NaHCO<sub>3</sub> 12 mM, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0.4 mM, albumine bovine 0,35%, HEPES 10 mM, glucose 5,5 mM, pH 7.4. Pour les expériences d'activation, les plaquettes sont resuspendues dans du tampon Tyrode supplémenté en calcium (2 mM) et sans albumine (Tampon Tyrode Calcium).

### **Modifications biochimiques de la membrane plaquettaire**

La déplétion en cholestérol est adaptée de Jennings LK *et coll.* [167]. La méthyl-beta-cyclodextrine (MCD) (Sigma Chemical Co.), le complexe MCD-cholestérol (Sigma Chemical Co.), la cholestérol oxydase (Sigma Chemical Co.), la filipine (Sigma Chemical Co.) et la sphingomyélinase (Sigma Chemical Co.) ont été ajoutées aux concentrations indiquées à une

suspension de plaquettes à  $1.10^6$  plaquettes/ $\mu\text{L}$ . La suspension est ensuite incubée 30 min à  $37^\circ\text{C}$ . A l'issue de cette incubation les plaquettes sont lavées une fois, comme indiqué précédemment, et resuspendues à une concentration de 200 000/ $\mu\text{L}$  en tampon Tyrode. Pour les expériences de cinétiques de déplétion, les plaquettes sont resuspendues à une concentration de  $1.10^6$  plaquettes/ $\mu\text{L}$ , incubées en présence de 10 mM de MCD ou du solvant puis des aliquots sont prélevés sur 120 min, dilués en PBS (137 mM NaCl, 2.7 mM KCl et 10 mM phosphate, pH 7,4). Les échantillons sont ensuite analysés en cytométrie de flux pour mettre en évidence les variations de l'OLM au cours de la déplétion en cholestérol. Dans ces conditions, l'analyse des paramètres de taille (FSC) et de granularité (SSC) par cytométrie de flux ainsi que la visualisation par microscopie montre la présence d'une population homogène de plaquettes individuelles. Les quelques micro-agrégats potentiellement formés sont de plus éliminés de l'analyse en cytométrie de flux par la sélection d'une zone FSC/SSC correspondant aux plaquettes individuelles. Cette expérience a été effectuée à température ambiante pour diminuer l'activation plaquettaire et le risque de formation d'agréats sur cette longue période.

#### **Agrégations et activation plaquettaire**

- *Mesure de la modification de l'OLM en fonction de l'activation plaquettaire*

Les plaquettes resuspendues à 200 000/ $\mu\text{l}$  en tampon Tyrode Calcium sont diluées à une concentration finale de 20 000/ $\mu\text{L}$  pour éviter la formation d'agréats pendant l'activation. Ces plaquettes sont incubées 30 min à  $37^\circ\text{C}$  en présence de 100  $\mu\text{M}$  d'ADP (Sigma-Aldrich), de 20  $\mu\text{M}$  de TRAP-6 (Bachem, Torrance, CA), de 0,5U/mL de thrombine (Sigma Chemical Co.), du mélange thrombine/convulxine (Centerchem Inc, Norwalk, CT) à 0,5 U/mL et 500 ng/mL final respectivement ou de 10  $\mu\text{M}$  du ionophore calcique A23187. Après incubation, les plaquettes sont resuspendues en tampon Tyrode additionné d'un volume d'ACD (93 mM acide citrique, 7 mM citrate de sodium, 0.14 M dextrose, pH 6,5) pour 20 volumes de suspension en présence de 28  $\mu\text{g/mL}$  de PGE1. Les plaquettes sont ensuite centrifugées (1800 g, 10 min) et resuspendues en tampon Tyrode à 200 000/ $\mu\text{L}$ . La mesure de l'expression de la P-sélectine

s'effectue par marquage par un anticorps anti-CD62P (Becton Dickinson) sur un aliquot de plaquettes activées puis fixées en formaldéhyde 1% pendant 15 min à température ambiante avant mesure en cytométrie de flux.

- *Mesures de l'activation plaquettaire et leucocytaire en sang total pour le protocole ANEP-statine*

*L'activation plaquettaire et la sécrétion plaquettaire* ont été déterminées par la quantification du pourcentage de plaquettes exprimant d'une part la GPIIb/IIIa activée sur laquelle se lie l'anticorps PAC-1-FITC (Becton Dickinson) et d'autre part la P-sélectine à leur surface, détectées par la liaison d'un anticorps anti-CD62-P-PE (Becton Dickinson).

*La formation des co-agrégats plaquettes monocytes (Plt-mono) et Plaquettes-neutrophiles (Plt-PMN)* a été mesurée en sang total après incubation 30 min à température ambiante sans agitation avec les agonistes et les anticorps dirigés contre le CD14 (CD14-PC5; Beckman-Coulter, Mississauga, ON) et le CD42 (CD42-FITC; Becton Dickinson). L'activation de MAC-1 (CD11b/Cd18) sur les monocytes et les polynucléaires neutrophiles et l'expression de facteur tissulaire sur les monocytes ont été mesurées dans les mêmes conditions par un double marquage avec le CD14-PC5 et l'anticorps dirigé contre le complexe CD11b/CD18 activé (Mo1-FITC, Beckman-Coulter) ou le facteur tissulaire (CD142-PE, Becton Dickinson). Après incubation, les échantillons sont dilués et les globules rouges lysés par ajout de solution de lyse (BD FACS Lysing solution; Becton Dickinson).

*Les analyses en cytométrie de flux* ont été effectuées sur un cytomètre EPICS-XL (Beckman-Coulter). Les pourcentages de cellules positives pour CD62-P et PAC-1 sont mesurés. Les monocytes et neutrophiles sont différenciés selon leur granularité et leur niveau d'expression de CD14. Les pourcentages de cellules ayant lié des plaquettes sont mesurés par le compte des cellules positives en CD42 FITC. Les activations du complexe CD11b-CD18 et du facteur tissulaire sont exprimées en Médianes d'Intensités de Fluorescence (MFI).

- *Activation plaquettaire par le cisaillement (Shear Induced Platelet Activation : SIPA)*

Les expériences de SIPA ont été menées dans un viscosimètre rotatif permettant l'obtention d'un flux laminaire constant de type Couette [168]. Ce viscosimètre est thermostaté à 37°C et permet le prélèvement d'échantillons pendant l'expérience pour une analyse en cytométrie de flux.

Les plaquettes resuspendues en tampon Tyrode calcium à une concentration finale de 200 000/ $\mu$ L sont incubées 15 minutes à 37°C en présence de facteur de von Willebrand (10  $\mu$ g/mL), d'inhibiteurs ou de tampon. Le di-4-ANEPPDHQ (10  $\mu$ M, Invitrogen, Burlington, ON) est ajouté pendant les 5 dernières minutes. La suspension plaquettaire est alors injectée dans le viscosimètre. Des échantillons de 50 $\mu$ L sont prélevés avant la mise en marche du moteur et 30, 60, 120, 180, 270 et 300 secondes après. La fixation des plaquettes par la paraformaldéhyde modifiant drastiquement l'ordre de la membrane (résultats non montrés), les échantillons sont alors immédiatement dilués dans 250 $\mu$ L de PBS et analysés en cytométrie de flux. Le compte des événements acquis pendant 30 secondes dans la zone de taille des plaquettes permet la mesure de leur disparition, reflet direct de l'agrégation par rapport à l'échantillon prélevé avant la mise en marche du viscosimètre. Le temps entre le prélèvement et la fin de l'analyse ne dépasse donc pas une minute. La mesure des fluorescences associées au di-4-ANEPPDHQ est faite lors de cette même acquisition.

La dépendance à la liaison vWF-GPIb du SIPA a été vérifiée par l'utilisation d'un anticorps monoclonal anti-GPIb bloquant (SZ2, 20  $\mu$ g/mL, Beckman-Coulter) ou de GPG-290 (40  $\mu$ g/mL, Wyeth, Pharmaceuticals, Madison, NJ), un analogue recombinant soluble du domaine de liaison de la GPIb au facteur de von Willebrand. Des inhibiteurs des MAP-kinases ERK1/2 (U0126, 10  $\mu$ M, EMD chemicals San Digo, CA), de p38 (SB203580, 10  $\mu$ M, EMD chemicals) et de JNK (SP60125, 10  $\mu$ M, EMD chemicals) ont de plus été utilisés pour caractériser la signalisation mise en jeu dans ce modèle.

### Analyse de l'OLM par cytométrie de flux

- *Cytométrie de flux 2 couleurs et définition du rapport de fluorescence Rf*

L'acquisition en cytométrie deux couleurs a été effectuée à l'aide d'un cytomètre en flux EPICS-XL (Beckman-Coulter). Après excitation par un laser à 488 nm, les émissions correspondant aux phases plus ordonnées et moins ordonnées sont respectivement quantifiées au niveau des bandes passantes [565-585 nm] (canal FL2) et [665-685 nm] (canal FL4). Ces bandes passantes ont été choisies pour correspondre aux longueurs d'onde données comme références par Jin *et coll.* [113]. Les valeurs des voltages des photomultiplicateurs des deux canaux FL2 et FL4 ont été déterminées pour atteindre un rapport FL4/FL2 approchant 10 en conditions de base. Chaque détecteur étant indépendant, ce rapport est fixé de façon arbitraire, mais ce paramètre doit rester identique tout au long des expériences. Des contrôles de qualité (billes Flow Check et Flowset, Beckman Coulter) sont passés quotidiennement pour vérifier la stabilité des paramètres d'analyse du cytomètre. Le marquage di-4-ANEPPDHQ est effectué sans fixation par incubation des plaquettes à une concentration de 20 000/μL en présence de 10 μM de di-4-ANEPPDHQ, après 5 minutes d'incubation à température ambiante. Après incubation, la suspension plaquettaire est diluée par 250μL de PBS et analysée immédiatement.

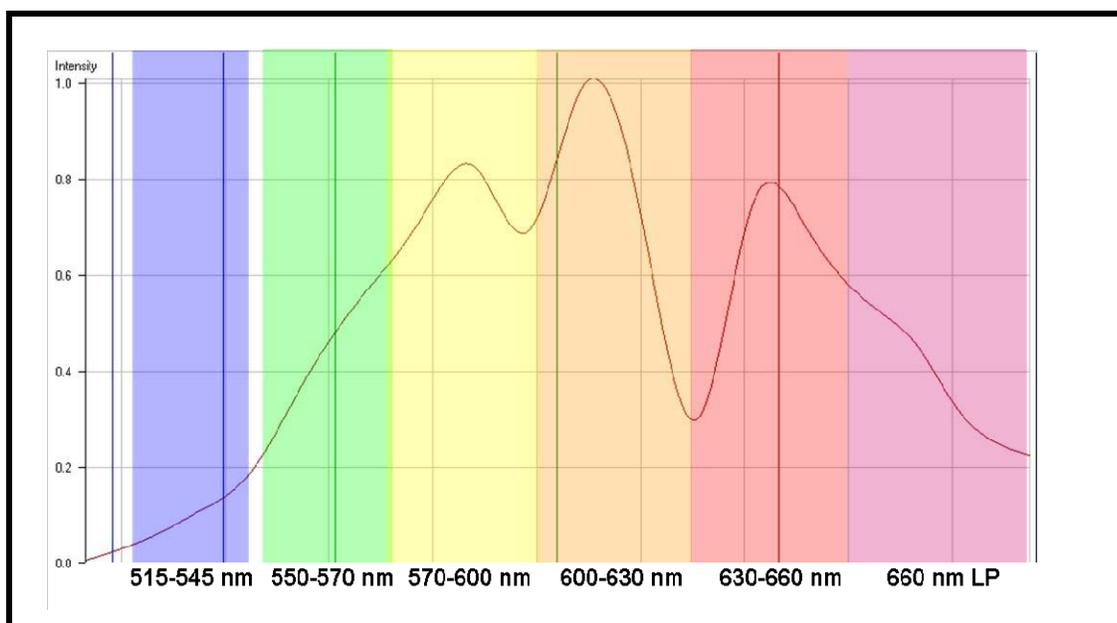
Le calcul du rapport de fluorescence Rf est basé sur les intensités de fluorescence des canaux FL2 et FL4 en calculant le rapport pour chaque cellule analysée (Equation 1). Ceci permet donc prendre en compte le Rf comme un paramètre de l'analyse de cytométrie et ainsi de définir des populations de Rf variables. Le ratio est donc d'autant plus élevé que l'OLM est bas. L'analyse des données est effectuée sur le logiciel FlowJo 7.5 (Treestar, Asland, OR).

**Équation 1: Rapport de Fluorescence (Rf) mesuré en cytométrie de flux deux couleurs où  $I_{675/20\text{ nm}}$  et  $I_{575/20\text{ nm}}$  sont les intensités de fluorescence mesurées à  $675 \pm 10\text{ nm}$  et  $575 \pm 10\text{ nm}$  respectivement pour chaque évènement analysé.**

$$Rf = \frac{I_{675/20nm}}{I_{575/20nm}}$$

- *Cytométrie de flux six couleurs et détermination des spectres de fluorescence*

Les spectres et profils de fluorescence du di-4-ANEPPDHQ sont déterminés pour chaque particule analysée à l'aide d'un cytomètre LSRII (Becton Dickinson) équipé de filtres fabriqués spécialement pour l'expérience (Omega Labs, Brattleboro, VT). La valeur centrale de chacune des bandes passantes correspond aux différents pics de fluorescence du spectre d'émission du di-4-ANEPPDHQ : [515-545 nm] ; [550-570 nm] ; [570-600 nm] ; [600-630 nm] ; [630-660 nm] ; 660 nm LP. Les valeurs des voltages des photomultiplicateurs du cytomètre sont établies pour obtenir des valeurs de MFI semblables. Ceci permet d'avoir des rapports entre chaque fluorescence égaux et arbitrairement fixés à 1 à l'état de base. (Figure 13)



**Figure 13: Spectre de fluorescence du di-4-ANEPPDHQ et disposition des filtres pour la cytométrie spectrale et la microscopie confocale.**

Spectre de fluorescence du di-4-ANEPPDHQ acquis par microscopie confocale (Zeiss META) sur des plaquettes adhérentes sur poly-L-lysine marquées par 10  $\mu\text{M}$  de di-4-ANEPPDHQ. Les bandes passantes étudiées ont été définies par rapport à ce spectre : [515-545 nm] ; [550-570 nm] ; [570-600 nm] ; [600-630 nm] ; [630-660 nm] ; 660 nm LP

Les spectres de fluorescence pour une population cellulaire globale sont calculés à partir des intensités de fluorescence (MFI : Mean Fluorescence Intensities) mesurées pour chaque canal, normalisées par rapport à l'aire sous la courbe de l'ensemble du spectre mesuré. Cette aire est considérée comme étant la somme des produits de la MFI par la largeur de la bande passante de

chaque filtre (Equation 2). Nous avons considéré que la fluorescence après 700 nm est négligeable : le filtre 660Lp est donc considéré comme ayant une largeur de 50 nm. Pour cette même raison, le centre de la bande passante est positionné à 680 nm sur les graphes représentant les spectres de fluorescence acquis en cytométrie.

**Équation 2: Calcul de l'intensité normalisée par la fluorescence totale ( $I_{norm}$ ).  $I_{cyto}$  est l'intensité mesuré (MFI), BP est la largeur de la bande passante**

$$I_{norm} = \frac{I_{cyto} \times BP}{\sum_{530}^{660} (I_{cyto} \times BP)} \times 100$$

Par un calcul analogue, il est possible de déterminer le spectre de fluorescence de chaque particule analysée. Les données brutes de cytométrie pour chaque cellule sont extraites par le logiciel FlowJo (Treestar Inc) puis importées et traitées à l'aide du logiciel de statistique SPSS 14 (SPSS Inc., Chicago, IL). Il est alors possible (1) d'analyser chaque cellule détectée par le cytomètre ou (2) de représenter le profil moyen d'une population de plaquette avant et après stimulation par un agoniste.

À partir des valeurs de fluorescence par population, des profils de fluorescence sont ensuite construits. Pour ceci, les rapports de fluorescence (Rf) sont générés pour les 36 (6X6) combinaisons possibles de bandes passantes. Ces données sont ensuite traitées par le logiciel de statistiques S-Plus (Insightful Corp., Seattle, WA) pour construire les profils d'OLM. L'échelle de couleur est centrée sur 1, s'étend de 0 (vert) à 2 (rouge) avec 30 niveaux de couleurs et représente les rapports de fluorescence ; abscisse et ordonnée représentent les longueurs d'onde des bandes passantes.

### Microscopie confocale

- *Détermination du spectre de fluorescence du di-4-ANEPPDHQ de plaquettes adhérees*

Les plaquettes resuspendues en tampon tyrode sont incubées 30 minutes dans une boîte de Petri dont le fond est constitué d'une lamelle de verre (0.17 mm d'épaisseur) recouverte de Poly-D-Lysine (Poly-D-lysine coated glass-bottom Petri dish, MatTek Corp., Ashland, MA). Après deux lavages en PBS les plaquettes adhérentes sont incubées en présence de 10  $\mu\text{M}$  de di-4-ANEPPDHQ en tampon tyrode puis lavées une fois avant analyse. Les images ont été acquises par un module confocal LSM 510 META Confocor (Carl Zeiss Inc, Thornwood, NY) monté sur un Axiovert 200M. Le module META de ce microscope permet l'acquisition de la fluorescence émise entre 521 nm et 703 nm par intervalle de 10 nm, couvrant ainsi le spectre du di-4-ANEPPDHQ. Le di-4-ANEPPDHQ est excité par un laser argon à 488 nm et la fluorescence est collectée par un objectif à immersion plan-Apochromat 63 1.4 DIC.

Le Rf en microscopie META est estimé par le rapport des fluorescences entre 534 et 599 nm correspondant à la phase liquide ordonnée et entre 650 et 684 nm pour la phase liquide désordonnée en accord avec les caractérisations de spectres de Jin *et coll.* [113]. Les fluorescences sont les aires sous la courbe calculées à partir des intensités normalisées par rapport au maximum d'émission dans ces intervalles. Le Rf calculé par microscopie confocale est donc défini comme le rapport des aires sous la courbe mesurées entre les deux bandes passantes (Equation 3).

**Équation 3: Rapport de Fluorescence ( $Rf_{META}$ ) mesuré en microscopie confocale META où  $AUC_{534-599\text{ nm}}$  et  $AUC_{650-684\text{ nm}}$  sont les aires sous la courbe de la fluorescence entre les bornes indiquées.**

$$Rf_{META} = \frac{AUC_{534-599nm}}{AUC_{650-684nm}}$$

- *Microscopie confocale six couleurs*

Le marquage au di-4-ANEPPDHQ des plaquettes a également été analysé sur une station confocale à disque rotatif (Intelligent Imaging innovation, Denver, CO) comportant un statif Zeiss Observer Z1, une caméra CCD Cascade QuantEM 512SC (Roper Scientific, Friedland, Allemagne) montée sur une tête confocale Yokogawa CSU-X1. Cette tête confocale permet

l'utilisation des mêmes six filtres utilisés pour la cytométrie spectrale sur le cytomètre LSRII. L'émission de fluorescence du di-4-ANEPPDHQ après excitation par un laser solide à 473 nm est collectée par un objectif PLAN APOCHROMAT 63X/1.4 DIC. Les acquisitions sont ensuite déconvoluées par le module d'itération contrainte du logiciel SlideBook (Intelligent Imaging Innovation, Denver, CO) en utilisant des fonctions d'étalement de point (point spread functions, PSF) calculées à partir d'acquisitions de billes pour PSF (Invitrogen) pour toutes les longueurs d'onde sauf 660 nm/LP pour laquelle la PSF théorique fournie par le manufacturier (Intelligent Imaging innovation, Denver, CO) a été utilisée. Ce système optique est optimisé pour permettre des acquisitions confocales en trois dimensions en induisant un minimum de lésion de la cellule par le laser. ±

#### **Exploitation des données et statistiques**

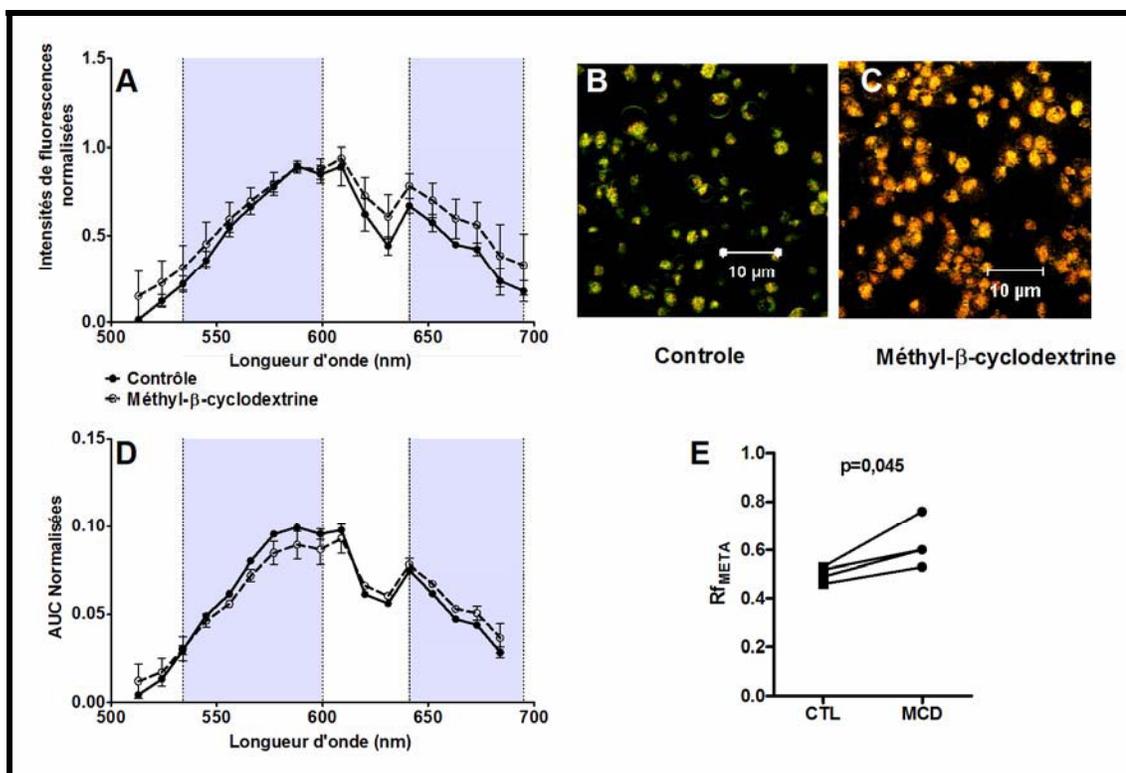
Les comparaisons de données deux à deux sont effectuées en utilisant le test de t apparié si la population est considérée comme répartie selon une loi normale et le test de Wilcoxon dans le cas inverse. Toutes les analyses statistiques ont été effectuées sur les logiciels PRISM 5 (Graphpad, La Jolla, CA), SPSS (SPSS Inc) ou SAS (SAS Institute Inc, Cary, NC). Lors de l'analyse multivariée des valeurs de Rf, trois facteurs ont été rentrés dans le modèle : le facteur temps (base, avant coronarographie et après angioplastie), le facteur groupe de traitement (A, B et C) et le facteur sévérité de la maladie (peu sévère si le nombre de aucun tronc artériel n'est atteint et sévère si 1, 2 ou 3 troncs présentent une sténose supérieure à 50%).

Sauf mention contraire, les résultats sont exprimés comme des moyennes ± erreur standard à la moyenne (SEM).

### 2.3.3. Résultats

#### Détermination du spectre en microscopie confocale

Le spectre d'émission de fluorescence du di-4ANEPPDHQ après excitation à 488 nm a été déterminé par microscopie confocale sur des plaquettes adhérentes déplétées ou non en cholestérol par action de 10 mM de MCD. La Figure 14-A montre le spectre de fluorescence normalisé par rapport à l'intensité maximale. Le pic d'intensité est mesuré dans toutes les expériences entre 600 et 610 nm. Ce spectre est caractérisé par un aspect en double cloche à partir duquel il est possible d'identifier six pics ou épaulements aux longueurs d'onde 530, 560, 585, 615, 645 et 660 nm. Le traitement des plaquettes par la MCD tend à augmenter les intensités de fluorescences sur tout le spectre et de façon plus marquée à des longueurs d'onde supérieures à 600 nm. En microscopie ceci est directement observable, que ce soit au niveau de la membrane plasmique ou au niveau des organelles intracellulaires (Figure 14 B et C). Afin de tenir compte de cette variation de fluorescence globale lors de la déplétion, les intensités de fluorescence sont exprimées en aire sous la courbe (AUC) et normalisées par rapport à l'AUC totale du spectre entre 500 et 700 nm (Figure 14-D). Après traitement par la MCD, il est possible de mettre en évidence une diminution de la fluorescence associée à la phase membranaire plus ordonnée mesurée entre 534 et 599 nm. En parallèle, la fluorescence détectée entre 650 et 700 nm augmente, indiquant une augmentation de la phase membranaire moins ordonnée. Il est alors directement possible de calculer le rapport  $R_{f_{META}}$  qui reflète les quantités relatives de chaque type de phase dans les deux conditions. Ce rapport est significativement augmenté après un traitement par la MCD 10 mM ( $0,63 \pm 0,1$  vs.  $0,50 \pm 0,03$  ;  $p=0,045$  ; Figure 14-E)



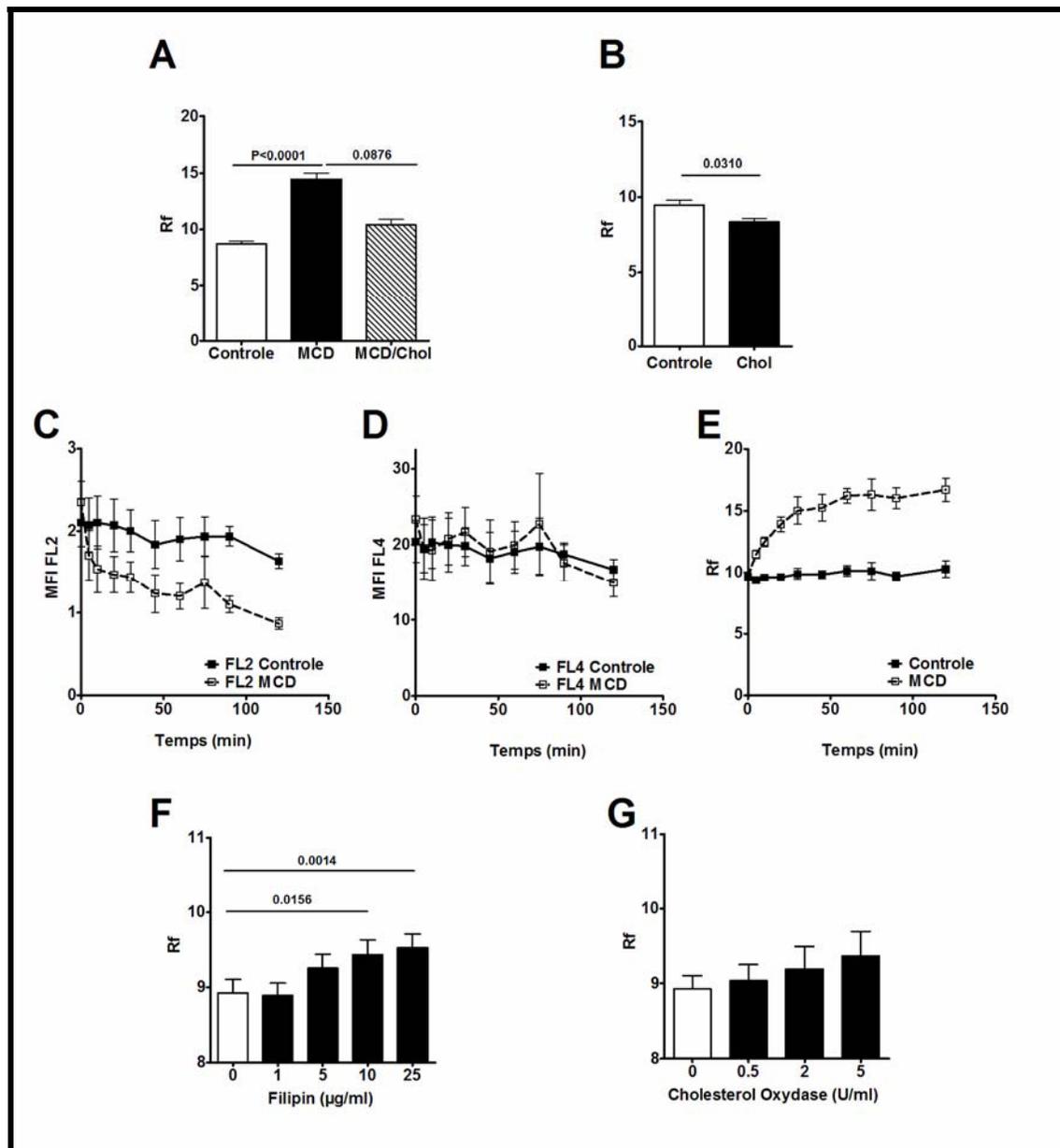
**Figure 14: Détermination du spectre de fluorescence du di-4-ANEPPDHQ dans des plaquettes adhérentes par microscopie confocale**

Spectres des intensités de fluorescence normalisées par rapport à l'intensité maximale du di-4-ANEPPDHQ de plaquettes traitées ou non avec la MCD 10 mM puis adhérentes sur un substrat de poly-D-lysine. Mesures effectuées par microscopie confocale META (A). Images représentatives de la variation de fluorescence entre des plaquettes contrôles (B) et des plaquettes traitées par la MCD (C). Les AUC de chaque bande passante, normalisées par rapport à l'AUC totale du spectre du di-4-ANEPPDHQ sont diminuées après traitement par la MCD entre 530 et 600 nm et augmentées entre 645 et 700 nm (D). Ceci est retrouvé par le calcul du  $Rf_{META}$ , significativement augmenté après traitement par la MCD (E). (N=4)

#### Modifications du contenu en cholestérol des membranes et effets sur le Rf

Le cholestérol membranaire est un déterminant majeur du niveau d'OLM. En effet les concentrations en cholestérol sont particulièrement élevées dans les MM de type « lipid rafts ». Après incubation des plaquettes en présence de 10 mM de MCD à 37°C pendant 30 minutes, le rapport Rf augmente de plus de 50%, marquant une déstabilisation des phases liquides ordonnées vers un état moins ordonné. L'incubation en présence de 2 mM de cholestérol, solubilisé dans un complexe MCD-cholestérol permet le transfert de cholestérol dans la membrane et rétablit presque totalement le niveau d'OLM initial (Figure 15-A). L'incubation de plaquettes non déplétées en présence de MCD-cholestérol diminue le Rf, marquant au contraire

l'enrichissement relatif de la membrane en cholestérol et le déplacement de l'équilibre de phases moins ordonnées vers des phases plus ordonnées (Figure 15-B).



**Figure 15: Effets de la déplétion en cholestérol sur le ratio de fluorescence Rf**

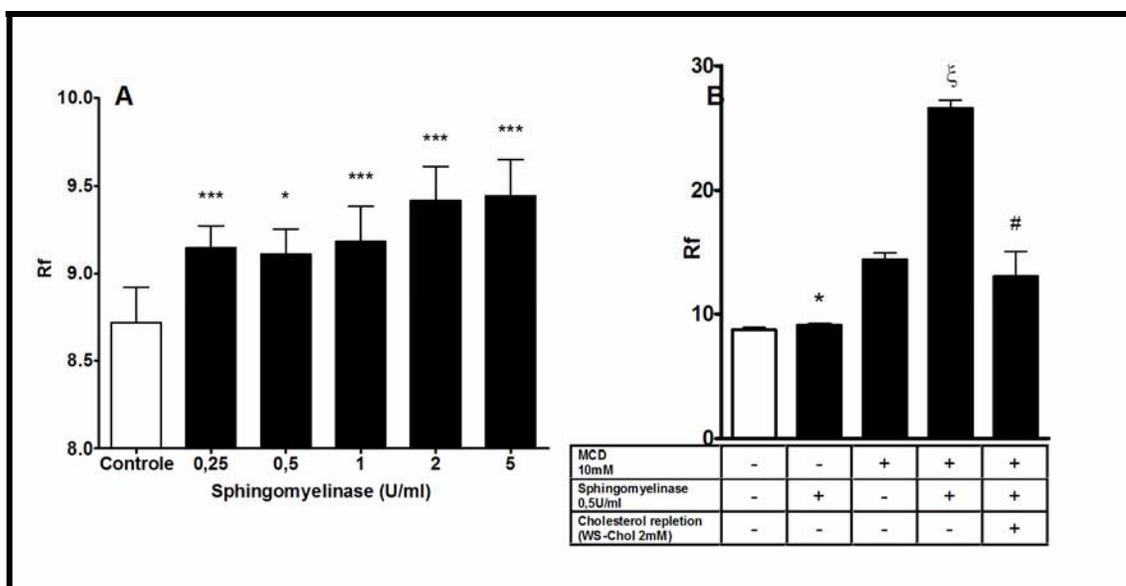
Effets sur le Rf d'une déplétion en cholestérol par 10 mM de MCD suivie par une réplétion en présence de 2 mM du complexe MCD-cholestérol (N=7) (A) ou d'un enrichissement en cholestérol (N=3) (B) par rapport au contrôle (N=3 à 7). L'incubation de plaquettes lavées en suspension en présence de 10 mM de MCD (ligne continue, carrés blancs) ou du véhicule (ligne continue, carrés noirs) pendant 120 minutes à température ambiante montre la diminution progressive de la fluorescence FL2 (C), l'augmentation de la fluorescence FL4 (D) qui, combinés, entraînent une augmentation progressive du Rf. (N=3); Effet sur l'ordre des membranes plaquettaires de la formation des agrégats de cholestérol par des concentrations croissantes de filipine (A) ou de cholestérol oxydase (B) après incubation 30 min à 37°C. (N=5)

Afin d'analyser les variations relatives de chaque fluorescence au cours du temps, des mesures ont été effectuées sur des plaquettes traitées avec 10 mM de MCD pendant 120 min à température ambiante. Cette cinétique de déplétion, montre qu'au cours du temps la fluorescence FL2 [565-585 nm] correspondant à la fluorescence du di-4-ANEPPDHQ dans des phases plus ordonnées diminue progressivement en présence de MCD. De manière opposée, la fluorescence des zones moins ordonnées (FL4 [665-685 nm]) en présence de MCD n'est pas significativement différente de la condition contrôle et reste stable. Ces deux variations sont combinées dans le rapport de fluorescence Rf qui augmente régulièrement au cours du temps en présence de MCD mais reste stable dans les plaquettes non déplétées (Figure 15-C, -D et -E). Il est important de noter la diminution importante de la variabilité apportée par l'approche ratiométrique lors de la détermination du Rf.

La déplétion en cholestérol par la MCD est une méthode stringente, déplaçant le cholestérol membranaire mais aussi indirectement celui des membranes des organelles intracellulaires. Deux autres approches moins drastiques ciblant le cholestérol ont été menées. Dans une première expérience, les plaquettes ont été traitées par la filipine, un antibiotique multivalent qui se fixe et regroupe les molécules de cholestérol [169]. Ceci provoque la formation d'agrégats de cholestérol qui ne jouent ainsi plus de rôle dans le maintien de l'ordre cellulaire. Des concentrations croissantes de filipine augmentent progressivement le Rf mesuré sur les plaquettes (Figure 15-F). Dans une seconde expérience, le cholestérol des plaquettes est dégradé en cholesténone par la cholestérol oxydase. La formation de ce composé inactif sur le maintien de l'OLM, au dépend du cholestérol, tend à augmenter non significativement le Rf des plaquettes (Figure 15G). Il est à noter que dans les deux cas, ces variations de Rf sont de beaucoup plus faible amplitude que celles induites par la déplétion du cholestérol par la MCD.

### Déplétion en sphingomyéline

La sphingomyéline appartient à la famille des sphingolipides présente en forte quantité dans les MM. Le Rf du di-4-ANEPPDHQ mesuré sur des plaquettes incubées avec des doses croissantes de sphingomyélinase (SMase) est légèrement augmenté dès la concentration de 0,25 U/mL (Figure 16-A). De façon notable, une concentration de 0,5U/mL SMase agit de façon synergique avec la MCD sur l'effet de la déplétion en cholestérol sur l'OLM. En effet, comme indiqué dans la (Figure 16-B) le Rf est presque doublé par l'ajout de SMase à la MCD par rapport au Rf de plaquettes incubées avec la MCD seule ( $14,4 \pm 0,5$  vs.  $26,6 \pm 0,7$ ;  $p < 0,0001$ ). Cette déplétion n'est que partiellement compensée par la réplétion avec 2 mM de cholestérol ( $26,6 \pm 0,7$  vs.  $13,1 \pm 2,0$ ;  $p = 0,025$ ).



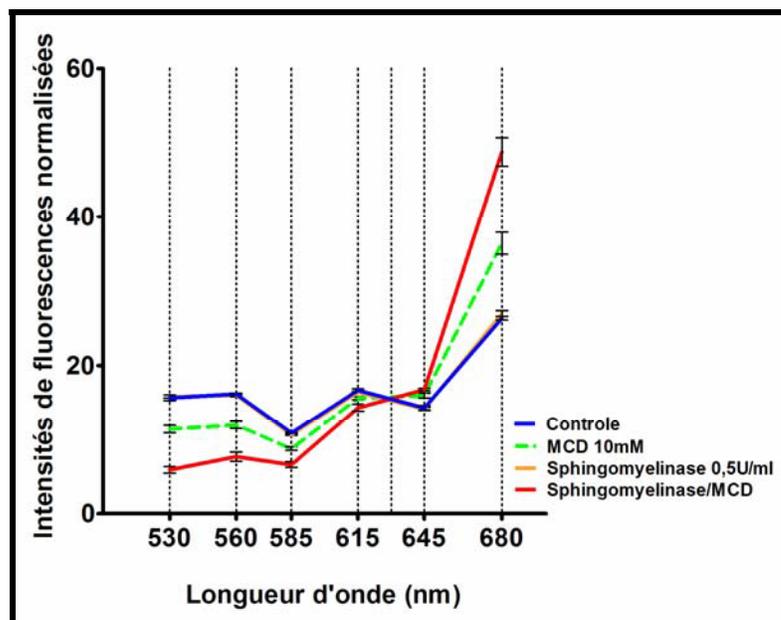
### **Figure 16: Effets de la déplétion en sphingomyéline sur l'OLM**

(A) Effet sur le marquage au di-4-ANEPPDHQ de la dégradation de la sphingomyéline en sphingosine dans la membrane plaquettaire par des concentrations croissantes de sphingomyélinase après incubation pendant 30 min à 37°C. (B) Co-traitement par la sphingomyélinase (0,5U/mL) et la MCD pendant 30 min à 37°C (N=3 à 7). \*  $p < 0,05$  et \*\*\*  $p < 0,001$  vs. contrôle;  $\xi$   $p < 0,05$  vs. MCD seul; #  $p < 0,05$  vs. SM-MCD

### Modifications du profil d'ordre de membrane lors de modifications biochimiques de la paroi

L'étude en cytométrie spectrale des effets des déplétions sur les populations de cellules permet de détecter les modifications associées à chaque zone du spectre. L'action de la SMase n'est

délectable dans cette expérience qu'au niveau de la bande passante [600-630 nm] ( $16,7 \pm 0,2$  vs.  $16,4 \pm 0,1$  ;  $p=0,034$ ) : aucune autre variation n'est significative. Au contraire, la MCD diminue fortement et significativement les valeurs des intensités de fluorescences des filtres de 530 nm ( $15,6 \pm 0,4$  vs.  $11,4 \pm 0,5$  ;  $p=0,01$ ) à 615 nm ( $16,7 \pm 0,2$  vs.  $15,6 \pm 0,2$  ;  $p=0,005$ ) alors que les intensités des bandes centrées sur 645 nm et 660 nm sont significativement augmentées. De même que précédemment, la combinaison de 10 mM de MCD et de 0,5U/mL de SMase déplace fortement l'équilibre des fluorescences vers les longueurs d'onde élevées (Figure 17).

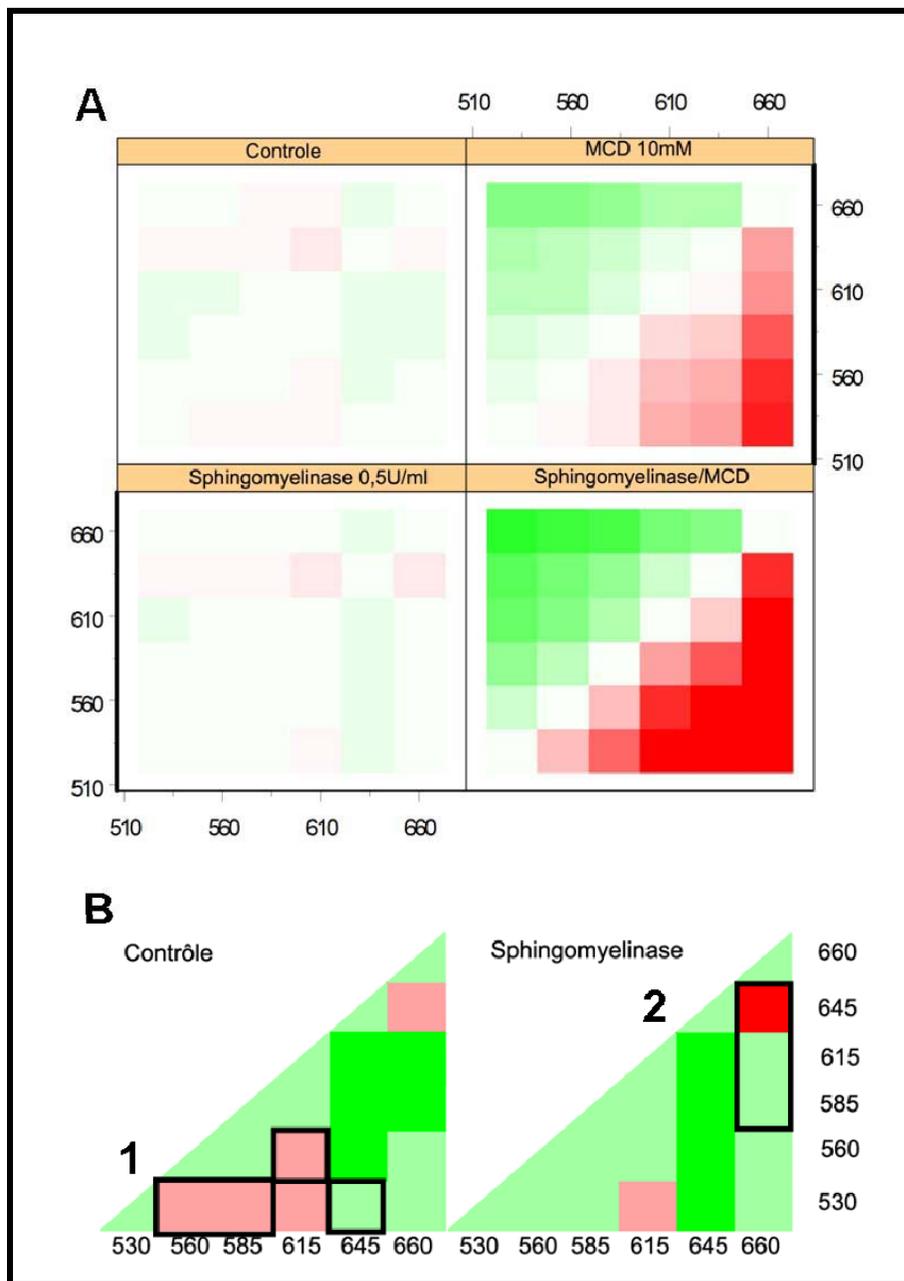


**Figure 17: Spectre d'émission du di-4-ANEPPDHQ mesuré par cytométrie de flux spectrale du di-4-ANEPPDHQ dans des plaquettes en suspension déplétées en cholestérol et/ou sphingomyéline**

Les plaquettes sont déplétées en cholestérol (MCD 10 mM, ligne pointillée verte), en sphingomyéline (SMase 0,5U/mL; ligne continue orange) et par les deux simultanément (MCD 10 mM/SMase 0,5U/mL; ligne continue rouge) et sont comparées au contrôle (ligne continue bleue) La moyenne des intensités de fluorescence est mesurée pour chaque pic puis normalisée par rapport à la largeur de la bande passante des filtres et par rapport à l'aire sous la courbe totale. (N=4)

La représentation en matrice (*profil*) permet de visualiser dans un mode ratiométrique les variations observées sur le spectre lors d'une modification de la membrane cellulaire. Les rapports supérieurs à 1 apparaissent en rouge et les rapports inférieurs en vert. La déplétion par la MCD montre une modification drastique des rapports signant une désorganisation de la membrane plaquettaire. Ceci est encore plus marqué pour la double déplétion en sphingomyéline

et cholestérol. Un traitement par la SMase ne modifie que légèrement le spectre (Figure 17). Cependant il est possible de visualiser des changements induits par la SMase sur le *profil* ratiométrique (Figure 18-A et -B)



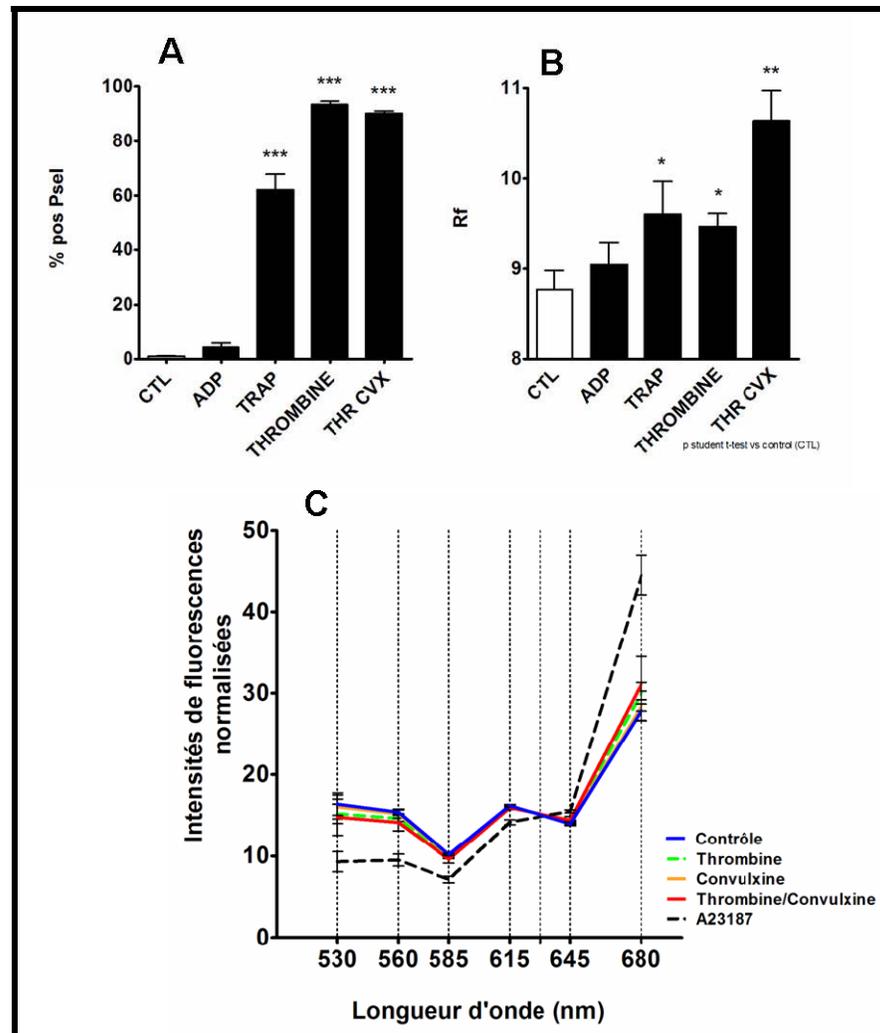
**Figure 18: Profil de l'OLM de la population globale de plaquettes en suspension après déplétion en cholestérol et/ou en sphingomyéline**

Profils d'OLMs représentant les rapports des fluorescences normalisées par rapport aux aires sous la courbe. Chaque carré correspond à la valeur du rapport X/Y l'échelle de couleur est centrée sur 1 et s'étend de 0 (vert) à 2 (rouge). Le panneau (A) représente les profils de plaquettes traitées par 10 mM de MCD et/ou 0,5U/mL de SMase. Le panneau (B) est un détail des profils précédents pour les conditions contrôle et SMase. Les carrés étant symétriques par rapport à la diagonale ascendante. La représentation

en triangle permet de simplifier la lecture en supprimant la partie supérieure du carré. Les cadres 1 et 2 mettent en évidence de façon semi-quantitative les rapports respectivement diminuant ou augmentant lors d'un traitement par la sphingomyélinase. Chaque profil représente les rapports moyens de quatre expériences.

### **L'activation plaquettaire diminue l'OLM plaquettaire**

L'effet du di-4-ANEPPDHQ sur les plaquettes a tout d'abord été étudié par Western Blot à l'aide d'un anticorps anti-phosphotyrosine (résultats non présentés). Aucune variation significative du profil de phosphorylation à l'état basal n'a été observée jusqu'à 15  $\mu\text{M}$  DI-4-ANEPPDHQ, et après incubation des plaquettes à température ambiante ou à 37°C (5, 20 mn) avec 10  $\mu\text{M}$  DI-4-ANEPPDHQ. De plus une concentration de 10  $\mu\text{M}$  de di-4-ANEPPDHQ ne modifie ni les paramètres de taille et granularité des plaquettes tels que mesurés par cytométrie en flux, ni l'agrégation plaquettaire mesurée par turbidométrie, suggérant une absence d'effet artéfactuel du di-4-ANEPPDHQ sur l'activation plaquettaire dans nos conditions expérimentales. Un marquage de la sécrétion plaquettaire par mesure de la P-sélectine exprimée à la membrane est d'abord effectué comme contrôle de l'activation et sécrétion plaquettaire (Figure 19-A). La mesure des modifications d'OLM est effectuée après incubation des plaquettes en présence d'ADP, de TRAP, de thrombine ou de la combinaison thrombine/convulxine (Figure 19-B). Là encore, aucun effet significatif du di-4-ANEPPDHQ sur les profils de phosphorylation sur résidus tyrosine induits par ces différents agonistes n'a été observé (résultats non présentés). La mesure de l'OLM effectuée par un marquage par le di-4-ANEPPDHQ montre dans tous les cas une diminution de la phase liquide ordonnée, significative pour certains agonistes : TRAP, Thrombine et Thrombine/CVX. Pour un niveau de sécrétion légèrement inférieur à celui induit par la thrombine ( $90,2 \pm 0,9$  vs.  $93,5 \pm 1,2$ ;  $p=0,08$ ), c'est la combinaison Thrombine/CVX qui présente le Rf le plus élevé ( $10,6 \pm 0,3$  vs.  $9,5 \pm 0,1$  ;  $p=0,002$ ).

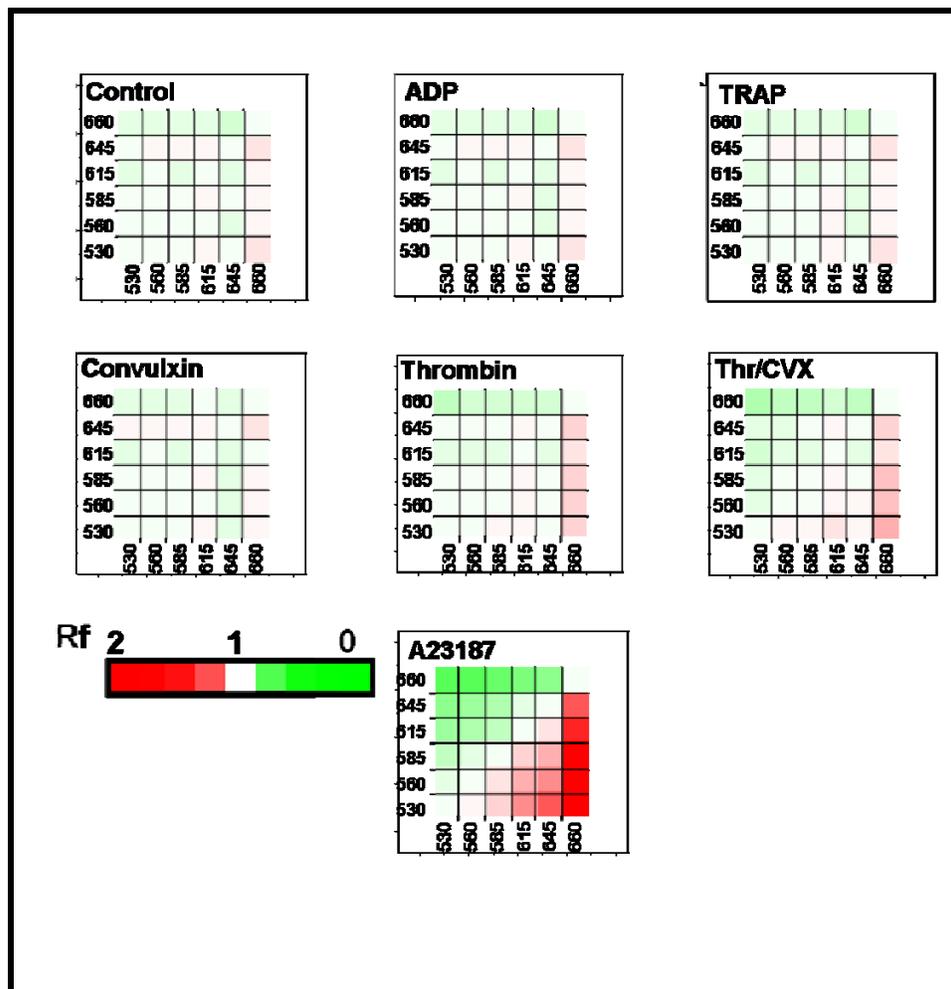


**Figure 19: Effets de l'activation sur la phase liquide ordonnée de plaquettes en suspension**

Mesure de l'expression membranaire de la P-sélectine en pourcentage de plaquettes positives (A) et du Rf (B) après activation des plaquettes lavées dans des conditions statiques pendant 30 minutes à 37°C par l'ADP 100 µM, le TRAP 20 µM, la thrombine 0,5U/mL et le mélange thrombine 0,5U/mL/convulxine 500ng/mL. (N=6) (C) Spectre d'émission mesuré par cytométrie de flux du di-4-ANEPPDHQ de plaquettes activées 30 minutes à 37°C, en condition statique par la thrombine 0,5U/mL (trait continu bleu), par la convulxine 500ng/mL (trait continu orange) par le mélange thrombine 0,5U/mL/convulxine 500ng/mL (trait continu rouge) et par le ionophore calcique A23187 (trait pointillé noir) par rapport au contrôle (trait continu bleu). Les intensités sont mesurées pour chaque pic puis sont normalisées par rapport à la largeur de la bande passante de chaque filtre et par rapport à l'aire sous la courbe totale. (N=3)

L'analyse en cytométrie spectrale permet de mettre en évidence les modifications du spectre de fluorescence du di-4-ANEPPDHQ induites par les agonistes (Figure 19-C). Afin de simplifier la représentation graphique, les spectres acquis pour l'ADP et le TRAP, superposés au contrôle ne sont pas représentés. Seules les variations induites par l'activation par la thrombine et

l'ionophore calcique A23187 sont significatives. Par rapport au contrôle non activé, la thrombine diminue significativement les intensités entre 530 et 585 nm et augmente significativement l'émission captée après 660 nm. Comparativement, l'A23187 diminue les fluorescences captées entre 530 et 615 nm puis augmente celles se situant entre 645 et 660 nm. Il est à noter que comme pour les résultats précédents, le point de croisement des cinq courbes se situe au niveau de la longueur d'onde 630 nm (Figure 19-C).



**Figure 20: Profil de l'OLM de la population globale de plaquettes après activation**

Profils d'OLMs représentant les rapports des fluorescences normalisées par rapport aux aires sous la courbe. Chaque carré correspond à la valeur du rapport X/Y, l'échelle de couleur est centrée sur 1 et s'étend de 0 (vert) à 2 (rouge). Chaque matrice représente une condition d'activation : l'ADP 100  $\mu$ M, le TRAP 20  $\mu$ M, la thrombine 0,5U/mL, la convulxine 500ng/mL, le mélange thrombine 0,5U/mL/convulxine 500ng/mL et l'ionophore calcique A23187. Chaque profil représente les rapports moyens de 4 expériences.

La construction des profils d'OLM (représentations en matrices de rapports de fluorescence) à partir des intensités mesurées sur l'ensemble des populations plaquettaires activées permet de détecter des différences entre ces agonistes (Figure 20). Les profils de membrane des plaquettes activées par 100  $\mu\text{M}$  d'ADP ou par 20  $\mu\text{M}$  de TRAP ne présentent pas de différence par rapport au profil de la population contrôle. Tel qu'il a été montré précédemment aucune variation du spectre de fluorescence n'est détectable après activation par 500ng/mL de convulxine, cependant le profil permet de constater une modification de l'état liquide ordonné des membranes par cet agoniste, notamment au niveau des rapports mettant en jeu les bandes passantes à 645 et 660 nm. Des modifications induites par la thrombine et l'association thrombine/convulxine sont quant à elles nettement plus visibles, et ce toujours au niveau des colonnes des longueurs d'onde 645 et 660 nm. L'action du ionophore calcique A23187 provoque une déstabilisation massive de la membrane avec une augmentation très importante du désordre membranaire, signifiée par la saturation du rouge au niveau du rapport 660/530 nm. Cette évaluation ratiométrique semi-quantitative donne des indications sur l'intensité des variations de membrane induites par chaque agoniste.

### **SIPA et sous-population**

- *Apparition d'une population plaquettaire distincte de Rf élevé dépendante du facteur de l'interaction GPIb/vWF en conditions de cisaillement élevé*

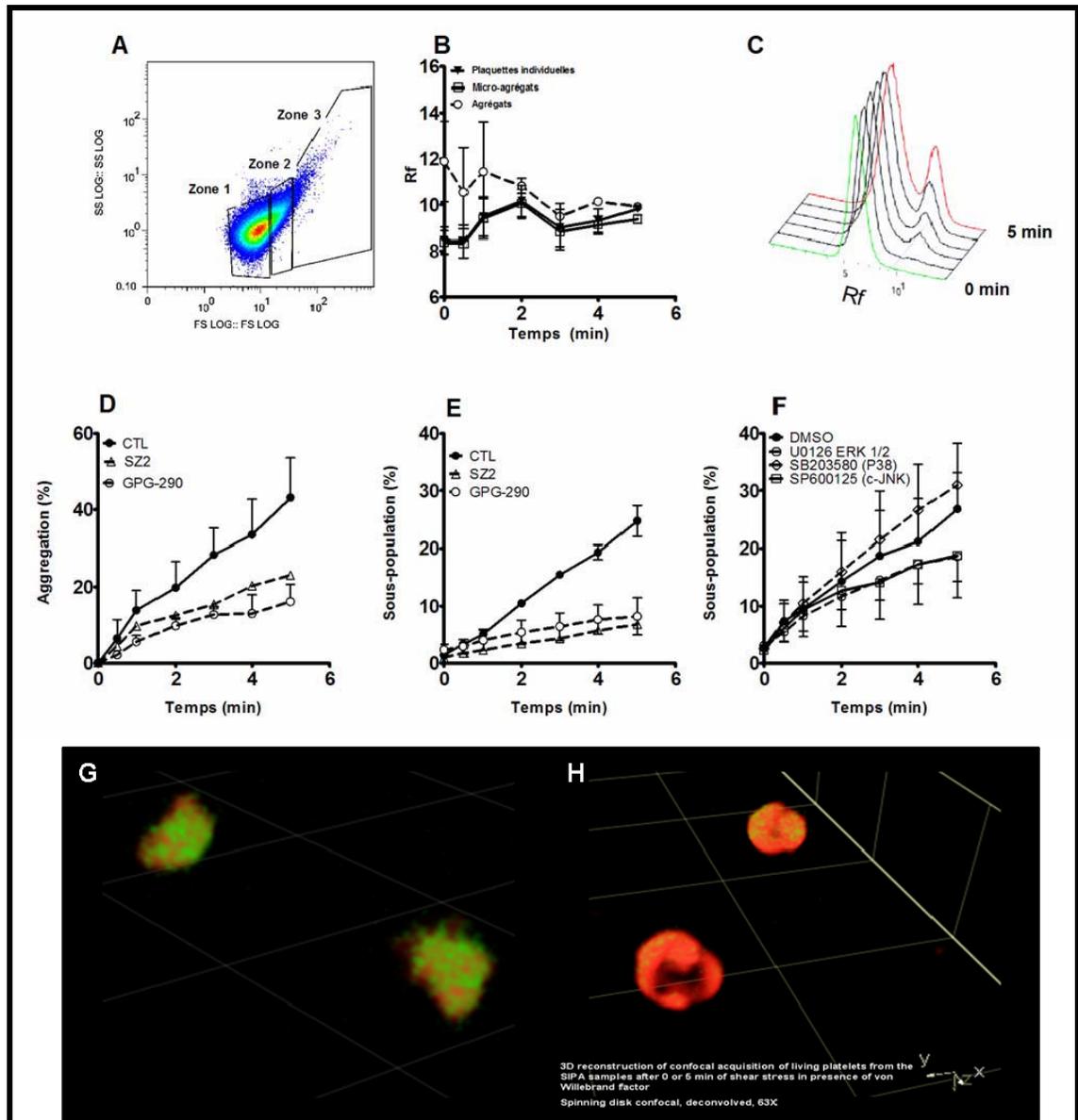
Le modèle de viscosimètre permet l'obtention de forces de cisaillement laminaires homogènes constantes dans tout le volume de l'échantillon. En présence de 10  $\mu\text{g/mL}$  de vWF, 2,5 mM de calcium et de 10 mM de di-4-ANEPPDHQ, les plaquettes lavées sont activées et agrègent au cours du cisaillement à 6 000s<sup>-1</sup>. L'analyse des paramètres de taille et de granularité (FSC/SSC) d'une population de plaquettes non activées permet de localiser la zone des plaquettes non agrégées et de définir trois zones correspondant à des plaquettes individuelles (zone 1), des

microagrégats de quelques plaquettes (zone 2) et des agrégats plaquettaires de plus grande dimension (zone 3) (Figure 21-A). Les échantillons prélevés dans le viscosimètre permettent donc la mesure par cytométrie de flux de l'agrégation plaquettaire ainsi que la mesure des intensités de fluorescence du di-4-ANEPPDHQ. Le calcul du Rf au cours du temps révèle l'apparition progressive d'une population présentant un Rf plus élevé (Rf+) ( $15.9 \pm 1.2$  vs.  $8.6 \pm 0.7$ ;  $p=0.008$ ) parmi les plaquettes non agrégées (zone 1) (Figure 21-B). Après cinq minutes, cette population représente près du quart des plaquettes non agrégées ( $24.7 \pm 2.6\%$ ). Le calcul du Rf des particules analysées dans les trois zones montrent que les plaquettes et les micro-agrégats ont des Rf similaires tout au long de l'expérience alors que les agrégats de taille plus importante tendent à avoir un rapport supérieur (ANOVA entre les zones de tailles  $p=0,08$ ).

L'inhibition de la liaison du vWF par compétition du GPG-290 avec la GPIb-IX-V diminue l'agrégation plaquettaire ( $44,6 \pm 6,3\%$  vs.  $16,1 \pm 7,7\%$ ;  $p=0,02$ ) et inhibe significativement la formation de la sous-population au Rf élevé ( $24,7 \pm 2,7\%$  vs.  $8,2 \pm 3,2\%$ ;  $p=0,02$ ). Des résultats comparables ont été obtenus avec un anticorps dirigé contre la GPIb dans deux expériences identiques (Figure 21-D et -E). L'inhibition des MAP kinases ERK, JNK et p38, impliquées dans la signalisation du GPIb-IX-V semble avoir des effets contrastés sur la formation de la sous-population de Rf élevé dans nos conditions (résultats non significatifs à relativiser compte tenu du petit échantillon) (Figure 21-F).

La présence de cette sous-population est confirmée par microscopie confocale (à disque rotatif) sur les mêmes échantillons que ceux analysés au cytomètre. L'acquisition de deux fluorescences ([499-537 nm] et [580,5-653,5 nm]) montre qu'une plaquette au repos a une morphologie homogène, avec une membrane présentant des zones distinctes plus ou moins ordonnées (Figure 21-G). Au contraire, une partie des plaquettes analysées après cisaillement, présentent une forme ronde, très polarisée et avec une coloration plus rouge indiquant une perte de l'OLM. Cette couleur rouge marquant une augmentation de la fluorescence détectée à [580,5-

653,5 nm] est cohérente avec l'augmentation du Rf observée en cytométrie de flux pour la sous-population plaquettaire.



**Figure 21: Étude de la sous-population de plaquettes à Rf élevé apparaissant en conditions de forces de cisaillement élevées**

(A) A un taux de cisaillement de  $6\,000\text{ sec}^{-1}$  et en présence de vWF, les plaquettes sont activées et peuvent agréger. La figure A est un exemple représentatif d'un tracé de cytométrie représentant la taille (FSC) et la granularité (SSC) d'une population plaquettaire avec des plaquettes seules (Zone 1), des microagrégats (Zone 2) et des agrégats (Zone 3). (B) Mesure du Rf des événements de chaque zone de taille au cours du temps. (C) Apparition progressive d'une sous-population de plaquettes non agrégées présentant un Rf plus élevé (Rf+). Cinétique d'agrégation (D) et du pourcentage de plaquettes Rf+ (E) de plaquettes lavées activées par le cisaillement en présence ou non de  $20\ \mu\text{g/mL}$  de l'anticorps anti-GPIb SZ2 ou de  $40\ \mu\text{g/mL}$  de GPG-290. (F) Cinétiques de formation de la population Rf+ en présence de  $10\ \mu\text{M}$  de U0126, de  $10\ \mu\text{M}$  de SB203580 et de  $10\ \mu\text{M}$  de SP60125 (N=3). Représentation 3D d'acquisitions confocales de plaquettes des deux populations à Rf bas (G) et Rf haut (H). La bande passante  $528 \pm 19\text{ nm}$  est représentée en vert et la bande passante  $617 \pm 36.5$  est représenté en rouge.



**Application clinique : Effet de l'atorvastatine sur l'OLM de plaquettes de patients hyperlipidémiques (Etude ANEP-statine)**

▪ *Description de la population*

La population de l'étude se compose de 21 patients hyperlipidémiques dont 3 femmes. La moyenne d'âge est de  $55 \pm 2$  ans. Parmi ces patients, aucun n'a d'antécédents de maladies cardiovasculaires et ne prend de médicaments pouvant modifier le métabolisme lipidique ou les fonctions plaquettaires. Deux patients ont présenté des douleurs musculaires : l'un a dû diminuer la dose d'atorvastatine à 20 mg et l'autre a arrêté l'étude.

▪ *Amélioration des paramètres lipidiques par le traitement*

Après un traitement de 6 semaines par atorvastatine, les paramètres lipidiques ont été normalisés comme indiqué dans le Tableau 4. Le cholestérol total a diminué de 30% et le cholestérol LDL de 50%. confirmant dans cette étude l'efficacité du traitement sur les paramètres lipidiques.

**Tableau 4: Effets du traitement par statine sur les paramètres lipidiques des patients**

|                               | Base                       | 6 semaines                  | p              |
|-------------------------------|----------------------------|-----------------------------|----------------|
| <b>Cholestérol total (mM)</b> | 6.17<br><i>5.77 - 6.85</i> | 4.0<br><i>3.67 - 4.76</i>   | < <b>0.001</b> |
| <b>HDL (mM)</b>               | 1.38<br><i>1.25 - 1.61</i> | 1.32<br><i>1.14 - 1.43</i>  | 0.17           |
| <b>LDL (mM)</b>               | 4.08<br><i>3.86 - 4.71</i> | 2.17<br><i>1.89 - 2.60</i>  | < <b>0.001</b> |
| <b>TG (mM)</b>                | 1.45<br><i>0.94 - 1.82</i> | 1.01<br><i>0.90 - 1.40</i>  | <b>0.01</b>    |
| <b>CHOL/HDL</b>               | 4.5<br><i>4.12 - 5.17</i>  | 3.05<br><i>2.84 - 3.53</i>  | < <b>0.001</b> |
| <b>ApoA1 (g/L)</b>            | 1.62<br><i>1.47 - 1.69</i> | 1.59<br><i>1.42 - 1.67</i>  | 0.365          |
| <b>ApoB (g/L)</b>             | 1.22<br><i>1.16 - 1.43</i> | 0.78<br><i>0.74 - 0.89</i>  | < <b>0.001</b> |
| <b>ApoA1/ApoB</b>             | 1.29<br><i>1.14 - 1.39</i> | 1.975<br><i>1.61 - 2.13</i> | < <b>0.001</b> |
| <b>Lpa (g/L)</b>              | 0.24<br><i>0.09 - 0.46</i> | 0.23<br><i>0.05 - 0.78</i>  | 0.675          |

▪ *Effet de l'atorvastatine sur les paramètres d'activation plaquettaire et leucocytaires (Tableau 5).*

Les effets mesurés du traitement par l'atorvastatine pendant 6 semaines sur les paramètres d'activation plaquettaires et leucocytaires sont très limités. Les mesures d'activation, de

sécrétion et d'agrégation plaquettaires, avec ou sans activation exogène ne sont pas modifiées par le traitement. L'activation du complexe CD11b/Cd18 des leucocytes, marqué par la liaison de l'anticorps Mo-1 et l'expression de facteur tissulaire à la surface des leucocytes ne sont pas significativement modifiées. Seule la liaison de Mo1 sur les neutrophiles en condition non activée et l'expression du facteur tissulaire sur les monocytes sont significativement diminuées (Tableau 5).

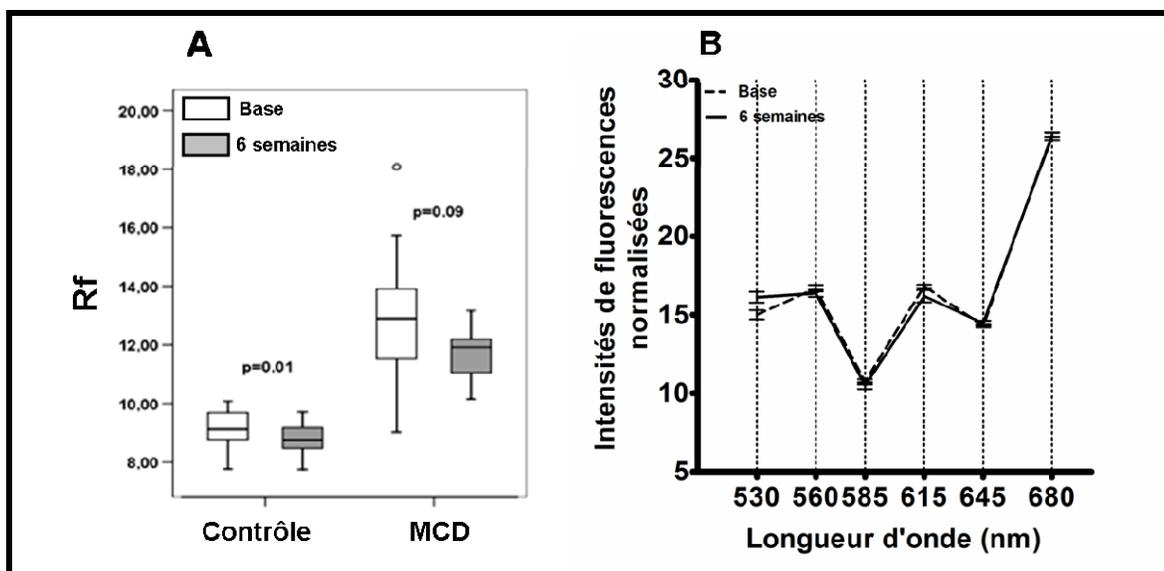
**Tableau 5: Effets de l'atorvastatine sur les paramètres d'activation plaquettaires et leucocytaires**

L'agrégation plaquettaire en plasma riche en plaquettes est mesurée à son maximum (Aggmax) après activation par l'ADP 5 µM, le TRAP 10 µM, et l'A23187b 10 µM. Le pourcentage de plaquettes exprimant la P-sélectine, ayant GPIIb/IIIa activée (liaison de PAC-1) est mesuré après activation en sang total. Le pourcentage de monocytes (Pit-mono) et de PMN (Pit-PMN) ayant fixé des plaquettes ainsi que la fixation de l'anticorps Mo-1 et l'expression de facteur tissulaire aux monocytes et PMN et l'expression de facteur tissulaire sont mesurés en sang total après activation et fixation avec 1% de formaldéhyde. (MFI : Median Fluorescence Intensity, Ator : Atorvastatin treatment). Les données sont présentées sous forme de médianes et de quartiles (25-75<sup>e</sup> percentiles). (N=20)

|                             | Contrôle               |                                | ADP                    |                        | TRAP                   |                                | A23187                |                       |
|-----------------------------|------------------------|--------------------------------|------------------------|------------------------|------------------------|--------------------------------|-----------------------|-----------------------|
|                             | Base                   | Ator                           | Base                   | Ator                   | Base                   | Ator                           | Base                  | Ator                  |
| <b>Aggmax (%)</b>           | ND                     | ND                             | 74<br>(61,8 - 81)      | 77,25<br>(68,3 - 81,4) | 77,25<br>(70,9 - 85,4) | 78<br>(57,4 - 88,34)           | 58<br>(12,1 - 72,75)  | 60,75<br>(11,6 - 73)  |
| <b>P-selectin (%)</b>       | 0,2<br>(0,1 - 0,4)     | <b>0,3 *</b><br>(0,2 - 0,6)    | 60,1<br>(41,3 - 73,5)  | 55,5<br>(45 - 70,4)    | 67,6<br>(8,9 - 80,1)   | 74,4<br>(65,1 - 85,3)          | 74,5<br>(11,8 - 87,7) | 78,3<br>(59,3 - 83,7) |
| <b>PAC-1 (%)</b>            | 0,5<br>(0,1 - 0,7)     | 0,4<br>(0,1 - 1,8)             | 88,2<br>(77 - 92,5)    | 87<br>(81 - 89,7)      | 86,6<br>(65 - 90,9)    | 82,4<br>(75,2 - 87,3)          | 84,3<br>(54,8 - 92,9) | 86,8<br>(80,3 - 90,3) |
| <b>Pit-Mono (%)</b>         | 17<br>(12,5 - 23,1)    | 19,4<br>(8,8 - 22,4)           | 51,8<br>(45,7 - 65,7)  | 47,6<br>(43,1 - 61,2)  | 77<br>(70,7 - 88,7)    | 79,7<br>(68,8 - 85)            | 59,6<br>(37,4 - 83,3) | 55,2<br>(43 - 69,2)   |
| <b>Pit-PMN (%)</b>          | 10,2<br>(9,4 - 12,5)   | 10,7<br>(6,3 - 13,3)           | 22,1<br>(18,7 - 29,2)  | 23<br>(15,1 - 36,2)    | 54,2<br>(40,2 - 59,7)  | 52,7<br>(42 - 63,4)            | 26<br>(17,4 - 41,5)   | 33,6<br>(19,5 - 42,1) |
| <b>Mo-1 Monocytes (MFI)</b> | 3,08<br>(2,7 - 5,29)   | 5,1<br>(2,5 - 6,79)            | 3,72<br>(3,28 - 5,79)  | 3,61<br>(2,9 - 5,03)   | 3,86<br>(3,44 - 5,45)  | 3,69<br>(3,06 - 4,54)          | 4,3<br>(4,06 - 5,67)  | 4,2<br>(4,04 - 4,72)  |
| <b>Mo-1 PMN (MFI)</b>       | 9,58<br>(8,61 - 11,88) | <b>7,22 *</b><br>(6,39 - 9,15) | 7,89<br>(5,47 - 10,74) | 7,34<br>(6,63 - 11,72) | 5,94<br>(4,91 - 8,11)  | 5,64<br>(5,21 - 7,25)          | 7,03<br>(5,59 - 9,58) | 6,47<br>(5,4 - 8)     |
| <b>TF Monocytes (MFI)</b>   | 2,43<br>(1,96 - 2,6)   | 1,44<br>(1,27 - 1,75)          | 2,95<br>(2,66 - 4,01)  | 2,45<br>(1,77 - 3,48)  | 3,58<br>(3,36 - 4,35)  | <b>3,02 *</b><br>(2,29 - 4,22) | 3,48<br>(2,87 - 4,5)  | 2,79<br>(2,38 - 4,07) |
| <b>TF PMN (MFI)</b>         | 0,49<br>(0,46 - 0,52)  | 0,49<br>(0,45 - 0,59)          | 0,68<br>(0,62 - 0,82)  | 0,68<br>(0,58 - 0,74)  | 0,95<br>(0,84 - 1,09)  | 0,88<br>(0,79 - 1,02)          | 0,79<br>(0,65 - 0,96) | 0,8<br>(0,63 - 0,87)  |

- *L'atorvastatine tend à augmenter l'OLM plaquettaire*

Au contraire des paramètres d'activation plaquettaire, l'OLM avant et après le traitement par atorvastatine est significativement diminué (médiane [quartiles] ; 9,2 [8,8 – 9,7] vs. 8,7 [8,3 – 9,2] ; p=0,01). De la même manière, le rapport après traitement par la MCD 10 mM pendant 30 min à température ambiante tend à être diminué sans toutefois atteindre la significativité (12,3 [11,5 – 14,0] vs. 11,7 [11,0 – 12,3] ; p=0,09) (Figure 22).



**Figure 22: Effet du traitement par l'atorvastatine sur l'OLM**

(A) L'acquisition en cytométrie deux couleurs de la fluorescence du di-4-ANEPPDHQ avant (boîtes blanches) et après (boîtes grises) traitement par 40 mg d'atorvastatine et en présence ou non de 10 mM de MCD à température ambiante permet de mettre en évidence une augmentation de l'OLM par l'atorvastatine (N=20) (B) Spectre d'émission mesuré par cytométrie de flux du di-4-ANEPPDHQ avant (ligne pointillée) et après (ligne continue) traitement de patients hyperlipidémiques par 40 mg d'atorvastatine pendant 90 jours. (N=5)

De façon intéressante, l'analyse en cytométrie spectrale des échantillons de cinq des vingt patients avant et après le traitement par l'atorvastatine confirment la tendance observée à une diminution du rapport Rf. Cette analyse permet de préciser les niveaux d'OLM qui varient préférentiellement. La bande [515-545 nm] tend à être spécifiquement augmentée ( $14,8 \pm 0,3$  vs.  $16,1 \pm 0,3$ ;  $p=0,12$ ), alors que celle à [600-630 nm] tend à être spécifiquement diminuée ( $16,9 \pm 0,3$  vs.  $16,2 \pm 0,3$ ;  $p=0,18$ ). Le nombre de patients analysés ne permet cependant pas d'avoir la puissance nécessaire pour mettre en évidence un effet significatif (Figure 22).

**Effet du clopidogrel sur l'OLM de plaquettes de patients avec un syndrome coronarien : sous-étude à l'essai PREPAIR**

▪ *Description de la population*

La population de patients inclus dans la sous-étude de l'essai PREPAIR comprend des patients avec syndrome coronarien à l'arrivée à l'hôpital et éligibles pour une angiographie. Les principales caractéristiques des patients sont indiquées dans le Tableau 6. Il est à noter que près de 80% présentent une dyslipidémie et sont traités par une statine.

**Tableau 6: Caractéristiques des 65 patients inclus dans la sous-étude ANEP-PREPAIR**

| Poids en kg, moyenne (SD)             | 62 (9,3)    | <b>Nombre de tronc artériels atteints (occlusion &gt; 50%), n (%)</b> |            |
|---------------------------------------|-------------|---|------------|
| Homme, n (%)                          | 52 (78,0%)  | Nbre de tronc =0  | 21 (32,3%) |
| IMC moyenne (SD)                      | 29,5 (4,6%) | Nbre de tronc =1  | 12 (18,5%) |
| <b>Facteurs de risques, n (%)</b>     |             | Nbre de tronc =2  | 16 (24,6%) |
| Diabète                               | 19 (28,4%)  | Nbre de tronc =3  | 16 (24,6%) |
| Hypertension artérielle               | 51 (76,1%)  | <b>Dilatation, n (%)</b>  | 17 (25,4%) |
| Tabagisme                             | 15 (22,4%)  | <b>Médicaments, n (%)</b>   |            |
| Dyslipidémie                          | 53 (79,1%)  | Aspirine  | 64 (95,5%) |
| Antécédents familiaux                 | 49 (73,1%)  | Inhibiteurs calciques   | 23 (34,3%) |
| Antécédents d'infarctus du myocarde   | 15 (22,4%)  | Statine   | 52 (77,6%) |
| Antécédent d'angioplastie primaire    | 16 (23,9%)  | Beta_bloqueur   | 41 (61,2%) |
| Antécédent de pontage aortocoronarien | 4 (6,0%)    | IECA & ARA  | 34 (50,7%) |

IMC : Indice de Masse Corporelle ; IECA : Inhibiteurs de l'Enzyme de Conversion de l'Angiotensine; ARA : Antagoniste des Récepteurs de l'Angiotensine II

▪ *Résumé des résultats de l'essai PREPAIR [3]*

L'étude PREPAIR visait à déterminer le bénéfice de doses plus fortes de clopidogrel en considérant l'agrégation plaquettaire comme marqueur de la fonction plaquettaire et comme tests de détection de patients « mauvais répondeurs » au clopidogrel. Les doses s'échelonnaient entre 375 mg (Groupe A) et 1 200 mg (Groupe C) en 24h. Les résultats de cette étude montraient une inhibition marquée et significative dans le groupe C de l'agrégation plaquettaire respectivement de 49,5% et 59,8% après activation par 5 et 20 µM d'ADP. Le taux de mauvais répondeurs biologiques est diminué par les doses croissantes de clopidogrel : le taux de patients totalement non répondeurs (diminution de moins de 10% de l'agrégation) est nul dans le groupe C. De

façon importante, il n'y a eu aucun épisode de saignement majeur dans les trois groupes de traitement et le taux de saignements mineurs est équivalent dans tous les groupes. L'augmentation des doses améliore donc l'inhibition plaquettaire et n'a pas fait l'objet dans cette étude d'une augmentation des effets indésirables [3].

▪ *Résultats de la sous-étude ANEP-PREPAIR*

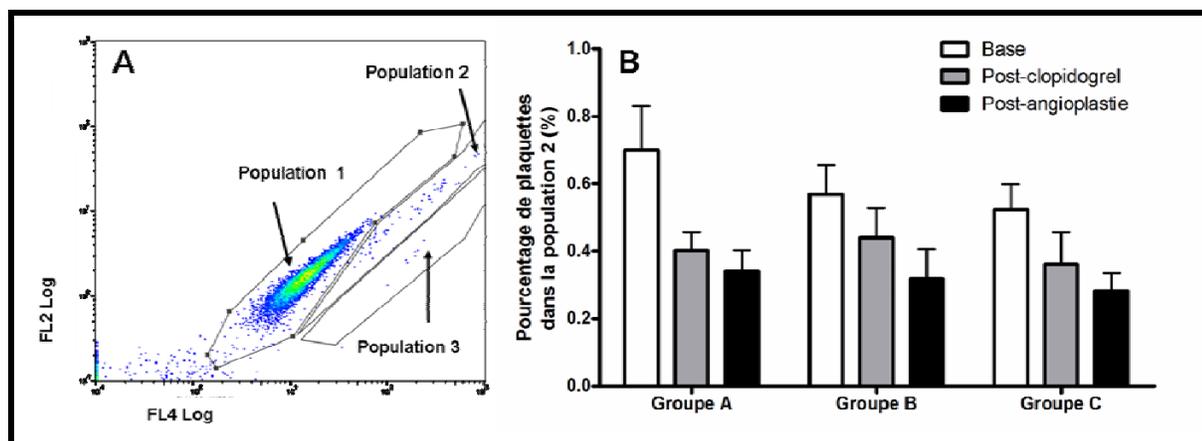
Aucune corrélation significative n'a été retrouvée entre le degré d'OLM et les données démographiques, incluant les facteurs de risque, les paramètres cliniques ou la médication prise.

Au contraire, la mesure du degré d'OLM par le marquage avec le di-4-ANEPPDHQ est significativement corrélée avec l'agrégation maximale ( $r^2=0,29$  ;  $p=0,026$ ), avec l'agrégation tardive six minutes après l'ajout de l'agoniste ( $r^2=0,37$  ;  $p=0,004$ ) et avec la désagrégation ( $r^2=-0,31$  ;  $p=0,02$ ) après activation par 20  $\mu\text{M}$  d'ADP. Cependant, après activation par 5  $\mu\text{M}$  d'ADP, seule l'agrégation tardive tend à être corrélée au Rf ( $r^2=0,26$  ;  $p=0,053$ ) alors que ni l'agrégation maximale ( $r^2=0,11$  ;  $p=0,40$ ) ni la désagrégation le sont ( $r^2=-0,18$  ;  $p=0,17$ ). Il est à noter que les agrégations maximales et tardives induites par 20  $\mu\text{M}$  d'ADP sont significativement plus élevées que celles induites par seulement 5  $\mu\text{M}$  d'ADP (respectivement  $68,8 \pm 0,90$  vs.  $58,3 \pm 1,9$  ;  $p < 0,0001$  et  $67,4 \pm 1,1$  vs.  $50,5 \pm 1,6$  ;  $p < 0,0001$  ;  $N=64$ )

L'analyse multivariée des résultats ne montre pas d'influence de la sévérité de la maladie mais trouve une interaction significative entre les facteurs temps et groupes de traitement. Ainsi, après administration de clopidogrel le Rf est significativement diminué par l'administration de clopidogrel dans les groupes de traitement A (Moyenne  $\pm$  SD :  $8,80 \pm 0,2$  vs.  $8,68 \pm 0,22$  ;  $p < 0,001$ ) et B ( $8,90 \pm 0,24$  vs.  $8,77 \pm 0,27$  ;  $p=0,006$ ) mais non significativement dans le groupe C ( $8,69 \pm 0,29$  vs.  $8,69 \pm 0,21$  ;  $p=0,88$ ). Il est à noter cependant que le groupe C présente une fonction plaquettaire significativement plus faible que les groupes A et B à la base (données non montrées). Le Rf avant traitement des plaquettes des patients du groupe C est inférieur à celui du groupe B ( $8,80 \pm 0,2$  vs.  $8,69 \pm 0,29$  ;  $p=0,01$ ).

▪ *Modulation des sous-populations*

Nous détectons chez ces patients, en l'absence de tout agoniste, au moins une sous-population présentant un Rf supérieur à la population majoritaire de plaquettes (Population 1, voir Figure 23) ( $16,9 \pm 0,09$  vs.  $8,8 \pm 0,03$  ;  $p < 0,0001$ ). Lors du prélèvement initial, elle représente 0,46% ; [0,25-0,87%] (médiane ; [25-75<sup>e</sup> percentiles]) des plaquettes non agrégées définies par leur taille et granularité (FSC/SSC). Une seconde sous-population présentant un Rf encore plus élevé ( $27,5 \pm 0,25$  ;  $p < 0,0001$  vs contrôle) est détectable, cependant les acquisitions de 20 000 plaquettes seulement ne permettent pas une quantification précise de cette sous-population très faiblement représentée. Le nombre de plaquettes présentant ce phénotype est réduit après l'administration de clopidogrel dans les trois groupes de traitement. Cette diminution est maintenue après l'angioplastie. Une analyse multivariée ne montre pas d'influence du facteur groupe ( $p=0,35$ ) alors que le temps ( $p=0,0009$ ) et la sévérité de la maladie ( $p=0,024$ ) ont un effet significatif sur le pourcentage de cellules dans la population 2. Il n'y a pas d'interaction entre le groupe et le temps ( $p=0,21$ ).



**Figure 23: Représentation de la répartition des populations plaquettaires en cytométrie de flux selon le marquage di-4-ANEPDHDQ**

(A) Tracé de cytométrie FL4 (675/20 nm) vs. FL2 (575/20 nm) représentatif présentant les différentes populations de Rf croissants. (B) Pourcentage de plaquettes dans la population 2 en fonction du groupe de traitement et du temps. Voir le texte pour détail de l'analyse multivariée.

### 2.3.4. Discussion

Jusqu'à présent les études portant sur l'OLM des MM ont principalement été menées sur des vésicules lipidiques composées de deux à trois types de lipides alors qu'une cellule en possède plusieurs milliers, qui présentent des affinités différentes entre eux. De plus ces modèles ne tiennent pas compte de la composition protéique des différentes phases ni du rôle du cytosquelette dans le maintien de ces structures membranaires. Ceci a d'ailleurs mené à de nombreuses controverses sur la nature, le rôle et la validité des moyens d'études des microdomaines lipidiques [76, 78-80, 170]. L'utilisation de l'imagerie cellulaire et l'arrivée de nouveaux fluorochromes ont permis d'étudier en microscopie confocale par fluorescence des microdomaines lipidiques [97] dans des cellules vivantes. De plus Kusumi *et coll.* ont mis en évidence l'importance du cytosquelette dans les phénomènes de translation latérale des protéines et dans la formation des MM [117, 140]. Cependant aucune de ces techniques ne permet une évaluation quantitative et en temps réel des réorganisations membranaires ayant lieu au niveau de chaque cellule, suite à leur stimulation par différents agonistes ou lors de traitement particulier.

Dans cette étude, nous présentons une nouvelle approche permettant la mesure par cytométrie de flux de l'ordre liquide membranaire, cellule par cellule, de populations et sous-populations cellulaires. Cette approche élargit l'éventail des méthodes disponibles pour l'étude des MM et ouvre une nouvelle dimension pour l'analyse des MM ou « lipid rafts ». Cette technique introduit pour la première fois la notion de quantification de l'ordre liquide des membranes et permet d'éviter deux des principaux écueils auxquels se heurte l'étude des MM qui sont : (1) l'utilisation de procédures induisant des lésions de la membrane (fixateurs, détergents...) et (2) la taille très réduite des microdomaines par rapport aux limites optiques de la microscopie. Avec cette méthode, l'OLM peut être défini de manière globale pour une population cellulaire mais

aussi de manière individuelle pour chaque cellule analysée. Dès lors, la détection de cellules appartenant à des sous-populations est possible. Ceci a été notamment mis en évidence en condition de cisaillement avec l'identification d'une population distincte en termes de forme et de ratio de fluorescence Rf du di-4-ANEPPDHQ.

Dans cette étude, nous avons également montré pour la première fois que l'activation des plaquettes induite par les forces de cisaillement (SIPA) entraîne des modifications drastiques de l'OLM, se traduisant par la formation de sous-populations plaquettaires. Cette sous-population de plaquettes de forme sphérique après activation est inhibée par le blocage de la liaison du facteur de von Willebrand à la GPIb-IX-V. Enfin, nous avons appliqué cette approche à la clinique et étudié les effets d'un traitement par atorvastatine ou clopidogrel sur l'OLM plaquettaire ce qui a permis de mettre en évidence des modifications de l'OLM induites par ces deux médicaments.

**Approche ratiométrique en microscopie confocale :** L'analyse par le module de décomposition spectrale (Zeiss META) nous a permis d'obtenir un spectre de fluorescence du di-4-ANEPPDHQ différent de ceux obtenus avec la même méthode sur des neutrophiles par Jin *et coll.* [113] et en spectrofluorimétrie sur des cellules végétales par Roche *et coll.* [171]. Ceci est probablement lié à des différences de calibration des détecteurs. Il faut cependant être prudent lors de l'interprétation des pics d'émission observés, car chaque détecteur (PMT) du module de décomposition spectrale est réglé de manière indépendante des autres, ce qui peut induire des variations de valeurs absolues entre appareils. Malgré cette différence de forme, il est possible de mettre en évidence un décalage du spectre d'émission du di-4-ANEPPDHQ après une déplétion en cholestérol, marquant une diminution de la phase lipidique ordonnée. Un tel décalage a précédemment été observé par Jin *et coll.* [113], et Roche *et coll.* [171].

**Approche ratiométrique en cytométrie de flux :** L'analyse de fluorochromes par décomposition de leur spectre d'émission par cytométrie de flux permet l'étude de l'ensemble des modifications des bandes passantes étudiées pour chaque cellule analysée. Cette technique récente a été rendue possible par le développement de cytomètres possédant jusqu'à dix-huit détecteurs répartis sur trois lasers. Notre étude sur le di-4-ANEPPDHQ utilise six filtres de bandes passantes complémentaires réparties sur l'ensemble de son spectre d'émission et montre qu'il est ainsi possible d'analyser l'émission de plusieurs dizaines ou centaines de milliers de cellules individuelles. Il est important de noter que contrairement à la spectrofluorimétrie ou à la décomposition spectrale en microscopie, les différents détecteurs ne sont pas calibrés dans notre étude pour reproduire le spectre, mais leurs intensifications sont réglées par rapport à un standard (cellules contrôles) afin d'avoir des médianes de fluorescence (MFI) comparables. Lors de la normalisation des intensités, ces MFI sont pondérées par la largeur de leur bande passante par rapport à l'ensemble du spectre d'émission de fluorescence. Les spectres sont donc des illustrations des variations par rapport à un spectre de référence. Cette approche connue sous le nom de cytométrie hyperspectrale a été proposée pour la première fois en 2004 [172] avec un appareillage comparable mais avec un nombre de détecteurs plus élevé et a été depuis développée pour intégrer un spectromètre à la place des détecteurs. Ceci augmente la sensibilité de la technique et permet une analyse directe du spectre d'émission des cellules [173].

A notre connaissance, la grande majorité des travaux portant sur les plaquettes sanguines ont utilisé la spectrofluorimétrie pour étudier la fluidité membranaire par mesure de l'anisotropie du DPH (1,6-diphényl-1,3,5-hexatriène) [174 , 175]. Malgré certaines difficultés dues à la mesure en cuve [175] ces travaux ont apporté la majorité des données sur la fluidité membranaire ( paramètre distinct de l'OLM [73]) au cours de pathologies telles que les accidents vasculaires cérébraux [176]. Seule l'étude de McCarthy *et coll.* présente une technique de cytométrie en flux basée sur l'utilisation de la merocyanine 540 (MC540) [177]. L'intensité et dans une moindre mesure la longueur d'onde d'émission du MC540 sont sensibles au tassement lipidique et au

potentiel transmembranaire. Ainsi, si cette méthode est particulièrement sensible à la perte de l'asymétrie membranaire lors de l'activation ou de l'apoptose cellulaire, elle n'est pas comparable en terme de sensibilité aux modifications de l'OLM par rapport à celles basées sur des dérivés de type laurdan et di-4-ANEPPDHQ. Enfin l'approche ratiométrique adoptée avec le Rf du di-4-ANEPPDHQ ou de son équivalent (Polarisation Généralisée ou GP) pour le laurdan permet de quantifier chaque niveau d'OLM en diminuant largement la variabilité due à la taille ou à la forme des cellules. Au contraire, l'étude des plaquettes par l'utilisation du MC540 quantifie les variations en termes d'intensité exprimée en pourcentage du nombre de cellules présentant une fluorescence élevée.

L'analyse en cytométrie de flux spectrale sur six bandes passantes permet de caractériser la fluorescence du di-4-ANEPPDHQ pour chaque cellule analysée. Il est intéressant de noter que toutes les courbes se coupent au même endroit, quel que soit le traitement, soit à la longueur d'onde 630 nm. Il est donc probable que cette longueur d'onde corresponde à une zone pivot de la fluorescence du di-4-ANEPPDHQ dans les membranes cellulaires. Ainsi, chaque partie du spectre correspond à des degrés d'ordre différents et la décomposition du spectre de fluorescence permet d'accéder à des MM de niveaux d'ordre différents. L'hypothèse de l'existence d'une certaine hétérogénéité des MM basée sur la composition lipidique et protéique est largement acceptée et est incluse dans la définition de consensus des MM [76]. Il a notamment été montré que des variations de composition en cholestérol, en phospholipides, en certaines protéines adaptatrices ou protéines du cytosquelette, induisent des variations d'OLM dans le cas de la synapse immunologique des lymphocytes T [178]. La mesure pour chaque cellule des différentes bandes passantes du spectre pourrait permettre de quantifier différents niveaux d'OLM et ainsi de pouvoir suivre l'impact d'évènements cellulaires sur l'organisation des membranes.

**Validation biologique :** L'insertion du cholestérol, principal acteur de la formation des microdomaines lipidiques, dans les feuillettes de la bicouche lipidique, permet une rigidification

de la membrane et une augmentation de l'OLM. Il tient ainsi le principal rôle dans la formation des microdomaines lipidiques [75]. L'analyse par cytométrie en flux deux couleurs de plaquettes dont le contenu en cholestérol a été modifié par des déplétions, montre que le spectre du di-4-ANEPPDHQ est sensible à ces altérations de membrane et valide ainsi la sensibilité de notre méthode. Cependant les études de Jin *et coll.* montrent que le di-4-ANEPPDHQ est non seulement sensible à l'OLM mais que, pour un ordre constant il est également sensible à la concentration de cholestérol : une concentration de cholestérol élevée augmente la fluorescence à de faibles longueurs d'onde [113]. Dans nos conditions expérimentales, la température et la pression étant constantes, la déplétion en cholestérol par la MCD agit ainsi sur les deux paramètres, en diminuant la concentration en cholestérol de la membrane et en déstabilisant ainsi les MM. En mesurant les changements d'ordre liquide par formation de complexes de cholestérol en présence de filipine, nous avons pu isoler l'influence de la dissociation des zones liquides ordonnées sur la fluorescence du di-4-ANEPPDHQ dans des conditions où le cholestérol reste théoriquement constant. Ceci nous montre que le di-4-ANEPPDHQ est sensible à ces modifications de l'ordre des microdomaines. De la même manière, la dégradation de la sphingomyéline, lipide dont les microdomaines sont enrichis, est marquée par une augmentation du Rf, indiquant une disparition des phases plus ordonnées au profit des moins ordonnées. L'effet de ces déplétions est confirmé en cytométrie spectrale par la diminution des fluorescences associées aux phases ordonnées et entraînant une augmentation des phases lipidiques moins ordonnées. Il est intéressant de noter l'effet synergique de la double déplétion en sphingomyéline et cholestérol. Les interactions entre sphingolipides et cholestérol sont connues même si le type de liaison n'est pas encore clair (probablement une liaison hydrogène entre le groupement hydroxyl du cholestérol et la fonction amide de la sphingomyéline) [81]. Cette interaction diminue la sensibilité du cholestérol à l'oxydation [81] et pourrait possiblement limiter aussi la déplétion en cholestérol par la MCD. Il a de plus été montré que l'action de 0,1U/mL de sphingomyélinase sur des fibroblastes provoque le transfert de cholestérol de la

membrane plasmique vers le réticulum endoplasmique [179]. Ces deux phénomènes pourraient ainsi contribuer à la déstabilisation majeure des phases les plus ordonnées observée lors de nos expériences. Il est aussi intéressant de noter que nos résultats démontrent que l'action de la sphingomyélinase seule, par son action directe sur la sphingomyéline ou indirecte sur le cholestérol, ne permet pas une déstabilisation majeure des microdomaines et ce, même à des concentrations très élevées. Ceci confirme le rôle prépondérant du cholestérol dans la constitution des MM.

L'ensemble de ces données suggère donc qu'il est possible d'effectuer une quantification relative des différentes phases lipidiques selon leur OLM par marquage au di-4-ANEPPDHQ, la quantification du Rf ou par cytométrie de flux spectrale.

**Activation plaquettaire et Ordre Liquide Membranaire :** Il n'existe pas à notre connaissance d'autre étude portant sur l'OLM plaquettaire lors de l'activation plaquettaire. Jin *et coll.* [113] montrent avec le di-4-ANEPPDHQ que l'extrémité mobile d'un neutrophile en migration présente une membrane avec un OLM plus élevé. En parallèle, il est notable que la fluidité membranaire, autre paramètre biophysique de la membrane mais indépendant de l'OLM, est augmentée lors de l'activation plaquettaire. Ceci a été démontré *in vitro* par Feijge *et coll.* [175] par mesure de l'anisotropie du 1,6-diphényl-1,3,5-hexatriène (DPH), par McCarthy *et coll.* par marquage par la merocyanine 540 (MC540) [177] mais aussi *in vivo* par l'étude de Christov *et coll.* sur des plaquettes de patients avec maladie coronarienne aiguë après angioplastie [180]. Ces modifications de la fluidité membranaire confirment que la morphologie de la membrane plasmique plaquettaire mais aussi ses caractéristiques biophysiques sont modifiées lors de l'activation. Ceci concorde avec nos résultats montrant une augmentation du Rf des membranes plaquettaires après activation par différents agonistes. Ces résultats sont à mettre en parallèle avec les réarrangements des membranes plasmiques et intracellulaires lors de l'activation plaquettaire. En effet, contrairement aux données de Jin *et coll.* [113] nous avons montré que le

di-4-ANEPPDHQ à une concentration de 10  $\mu\text{M}$  pénètre totalement dans la plaquette et permet ainsi d'avoir un reflet de l'ensemble des membranes lipidiques de la cellule, et notamment celles des granules de sécrétions. Les modifications des spectres sont concordantes avec les mesures du Rf et de même type que celles obtenues lors d'une déplétion en cholestérol ; c'est-à-dire une déstabilisation des phases ordonnées. La déstabilisation la plus importante est produite par l'ionophore calcique A23187. Ces effets de l'A23187 sur l'OLM sont en opposition avec ceux précédemment mesurés par Best *et coll.* et Vest *et coll.* sur des membranes d'érythrocytes en utilisant le laurdan [181 , 182]. Ces travaux montrent que l'augmentation des concentrations intracellulaires de cations divalents comme le calcium ou le magnésium par l'action de l'ionophore calcique A23187 augmente l'OLM de globules rouges. Le mécanisme proposé par ces études serait la fixation directe du calcium aux lipides du feuillet intracellulaire aboutissant à la diminution de la fluidité membranaire. Ce type d'action est d'ailleurs retrouvé avec une intensité notablement supérieure pour d'autres cations présents dans la circulation comme le magnésium, le nickel et le manganèse [182]. Ce type d'étude a été mené sur des plaquettes par Sheu *et coll.* sans cependant permettre de tirer de conclusion valide [183]. Nos résultats montrent que l'OLM est très diminué sous l'action de l'A23187 en présence de calcium. Cependant l'activation plaquettaire est un phénomène qui entraîne aussi une augmentation du calcium intracellulaire et qui diminue l'OLM. Il est donc probable que l'activation et la fixation du calcium intracellulaire soient très largement confondus dans ces modifications membranaires et que ce soit l'effet activateur qui prime chez les plaquettes, contrairement à ce qui se produit dans les érythrocytes.

**Sous-populations plaquettaires :** La cytométrie en flux présente l'avantage par rapport au spectrofluorimètre de permettre un calcul du Rf ou une détermination de spectre pour chaque particule analysée. Ceci a permis de mettre en évidence l'apparition d'une population sous l'effet de forces de cisaillement laminaires avec un Rf très élevé (Rf+) par rapport à la population de

base, indiquant un état de désordre des lipides membranaires particulièrement élevé. Ces plaquettes sont de forme ronde et présentent une structure très polarisée. A notre connaissance la seule sous-population créée en condition de cisaillement sont les SCIPs (Sustained Calcium Induced Platelets) [58]. Ces plaquettes qui ont été décrites lors d'expériences d'adhésion plaquettaire en flux sur substrat de collagène, de vWF et de verre, présentent un profil pro-inflammatoire mais sont relativement anti-agrégantes. Nos résultats montrent que la proportion des plaquettes avec un Rf élevé tend à augmenter lors de l'agrégation en viscosimètre, suggérant que ces plaquettes n'ont pas le même comportement en termes d'agrégabilité dans des conditions de forces de cisaillement que les plaquettes avec Rf bas. Jusqu'à présent il ne nous a pas été possible de détecter cette sous-population de plaquettes après stimulation en condition statique par des agonistes solubles comme le TRAP, la thrombine ou la double activation thrombine/convulxine. Ce phénomène semble être propre à l'activation plaquettaire induite par des forces de cisaillement élevées. La caractérisation biochimique et fonctionnelle de cette sous-population est en cours. Notre approche a donc permis de montrer, pour la première fois, l'existence de sous-populations cellulaires pouvant être distinguées par leurs caractéristiques d'OLM.

La relevance clinique de cette population reste à établir. Il est cependant envisageable que les conditions de cisaillement atteinte au niveau de sténoses artérielles ( $> 6\ 000\ \text{sec}^{-1}$ ) permettent l'apparition de ce type de plaquettes. Nous avons d'ailleurs mis en évidence la présence d'une sous population plaquettaire présentant un Rf plus élevé que la population majoritaire et dont la proportion est significativement réduite par l'administration de clopidogrel. Ces patients présentent à l'inclusion une maladie coronarienne suspectée ou documentée ainsi que plusieurs facteurs de risques d'athérosclérose et donc de rétrécissement d'une lumière artérielle. Il est possible de rapprocher cette sous-population de celle détectée en condition expérimentale de cisaillement

### Applications cliniques :

**Etude ANEP-Statine :** Les statines sont des inhibiteurs de l'enzyme l'HMGCo-A reductase, enzyme intervenant dans la chaîne de synthèse du cholestérol. Il est maintenant reconnu que les statines possèdent des effets anti-inflammatoires, immunomodulateurs dits pléiotropiques car ne dépendant pas de la diminution de la synthèse de cholestérol [184].

Contrairement à des études précédentes [185, 186], et malgré une normalisation des paramètres lipidiques, nous ne montrons pas de diminution significative de la fonction plaquettaire après six semaines de traitement par l'atorvastatine. Cependant les effets antiplaquettaire décrits dans certaines études ne sont pas observés de façon reproductible et n'ont probablement que peu d'impact clinique.

L'atorvastatine a tout de même entraîné une augmentation du niveau d'OLM illustrée par une diminution du Rf. Ceci suggère une modification spécifique des certaines régions du spectre du di-4-ANEPPDHQ par l'atorvastatine. L'analyse spectrale effectuée sur cinq patients avant et après le traitement par l'atorvastatine suggère de plus que la diminution du Rf est principalement due à l'augmentation spécifique de l'intensité de la bande passante à [515-545 nm].

A notre connaissance, aucune étude n'a été faite sur les effets des statines sur l'OLM. Les seules données existantes portent sur les modifications de la composition lipidiques ou la fluidité membranaire autre paramètre biophysique des membranes [187]. Des études ont précédemment montré une diminution de la fluidité membranaire élevée des plaquettes chez des patients hypercholestérolémiques après traitement par la lovastatine [188] mais pas dans des érythrocytes après vingt semaines de traitement [189]. La fluidité membranaire est aussi augmentée dans les plaquettes par la plupart des hyperlipoprotéïnémies et notamment l'hypertriglycémie [190, 191]. Shvartsman *et coll.* ont montré qu'un traitement de fibroblastes (Rat-1) et de cellules d'ovaires de hamster chinois (COS-7) par la mévastatine augmente la mobilité latérale des protéines (Ras et hémagglutinine) alors que la MCD qui extrait le cholestérol membranaire la diminue [108]. Ceci suggère que les modifications induites par les statines dépassent la simple

diminution de cholestérol induite par la MCD avec possiblement des modifications des protéines membranaires par exemple par des modifications de leur adressage à la membrane [192, 193]. Il n'y a donc pas de consensus clair concernant les effets des statines, ni sur la fluidité membranaire, ni sur l'OLM. Nous reportons ici une augmentation de l'OLM global des plaquettes. Il est notable que l'action de l'atorvastatine diminue l'effet de la MCD lors d'une déplétion à température ambiante, signe probable d'une moins grande accessibilité générale au cholestérol.

**Etude ANEP-PREPAIR :** L'étude ANEP-PREPAIR est la première étude clinique permettant d'analyser le lien entre le Rf et la fonction plaquettaire sur un grand nombre de patients avec maladie coronarienne. Les mesures effectuées sur les plaquettes des patients de la sous-étude ANEP-PREPAIR montrent que le Rf est significativement corrélé avec les tous les paramètres d'agrégations par 20  $\mu\text{M}$  mais non par 5  $\mu\text{M}$  d'ADP, seule l'agrégation tardive étant presque significative pour cette concentration. La sécrétion et l'agrégation plaquettaires sont deux phénomènes dépendant largement des membranes et intimement liés en condition d'agrégation de part la sécrétion d'agonistes recrutant des plaquettes qui vont induire des signalisations outside-in lors de l'agrégation, renforçant ainsi l'activation plaquettaire. Il est donc probable que le Rf mesuré en cytométrie de flux représente la résultante des différents niveaux d'OLM des membranes plaquettaires en relation avec leur capacité à soutenir la sécrétion et l'agrégation.

De façon intéressante, le clopidogrel augmente significativement l'OLM des plaquettes des patients (Rf diminué), excepté dans le groupe C dont l'activité plaquettaire et le Rf sont dès le prélèvement de base plus faible que ceux des deux autres groupes. L'effet du métabolite actif du clopidogrel sur l'OLM reste à caractériser, cependant il est possible que celui-ci puisse, par la dissociation des oligomères de récepteurs P2Y<sub>12</sub>, modifier la composition protéique des microdomaines membranaires, et ainsi changer le niveau d'OLM de la membrane [7]. Il semble

possible d'écarter l'hypothèse que le clopidogrel diminue une activation plaquettaire induite par la préparation des plaquettes car aucun effet des inhibiteurs de P2Y1 (MRS2179), de P2Y12 (2-MesAMP) et de leur association n'a été détecté sur des plaquettes de donneurs sains (résultats non montrés).

De façon suprenante, il est possible chez ces patients de détecter une sous-population présentant un rapport plus élevé et qui est significativement diminuée après administration du clopidogrel. Cette population est comparable à celle apparaissant en condition de forces de cisaillement élevées, ce qui suggère qu'elle dépend des sténoses artérielles engendrées par l'athérosclérose.

### **2.3.5. Conclusion**

Les « lipid rafts » sont devenus au cours des dernières années un des points clés d'interactions cellule-cellule et protéine-protéine. Leur nature a longtemps été limitée à une définition biochimique, celle de Membranes Résistantes aux Détergents (DRM) mais ils sont maintenant considérés d'un point de vue également biophysique comme des zones liquides ordonnées (Lo). Peu d'outils existent et aucun n'est adapté à une approche clinique des MM.

Nous proposons ici une méthode de mesure de l'OLM par cytométrie de flux permettant d'introduire une nouvelle dimension dans les études cliniques. Nos premiers résultats chez des patients traités par l'atorvastatine ou par le clopidogrel indiquent que cette approche pourrait permettre de mettre en évidence des modifications cellulaires non encore appréhendables par d'autres techniques et qui pourraient permettre de différencier différentes sous-populations cellulaires.

### **3. Discussion et perspectives**

---

Au cours de cette section, je ferai le point sur les différents résultats obtenus pendant mon doctorat et les mettrai en perspectives avec les études parues ultérieurement. Cette discussion sera dans une première partie consacrée au travail mené autour de l'évaluation de la fonction plaquettaire chez des patients traités par des antiplaquettaires, notamment le clopidogrel. La seconde partie sera ensuite consacrée à la notion de microdomaines membranaires et à la méthode de mesure des zones lipidiques ordonnées dans les cellules.

Dans un dernier temps je m'attacherai à élargir le champ d'application de la notion de mesure de l'OLM pour décrire les applications potentielles en dehors du champ de la thrombose vasculaire, qui ont motivé la démarche de valorisation de la propriété intellectuelle liée à cette méthode.

### 3.1. Discussion et perspectives

---

#### 3.1.1. Evaluation de l'efficacité du clopidogrel et des inhibiteurs de P2Y<sub>1</sub>

Le médicament antiplaquettaire clopidogrel est au centre des deux premières études effectuées au cours de mon doctorat. C'est un des traitements majeurs de la maladie coronarienne en prévention secondaire après un infarctus ou un accident vasculaire cérébral et lors d'un syndrome coronarien aigu ou d'un infarctus sans élévation du segment ST. Le clopidogrel est globalement très bien toléré par les patients. Le clopidogrel (Plavix<sup>®</sup>) a été, selon la firme IMS Health, le second médicament le plus prescrit au monde durant l'année 2007 derrière le Lipitor<sup>®</sup> (Atorvastatine) [194]. Etant donné l'utilisation massive de ce médicament, un risque de résistance, même faible pourrait concerner un nombre très important de patients. C'est pour cette raison que lorsque la notion de résistance au clopidogrel est apparue à partir de l'observation de la variabilité inter-individuelle importante de l'inhibition de l'activité plaquettaire [26], la recherche s'est orientée vers la possibilité de déterminer le degré d'inhibition de la fonction plaquettaire du patient dans le but final d'adapter la dose administrée.

Le test standard pour la mesure du clopidogrel est l'agrégation plaquettaire en plasma riche en plaquettes préparé à partir de sang anticoagulé sur citrate de sodium. L'activation est effectuée principalement avec 5  $\mu$ M d'ADP. Des concentrations variant entre 1 et 20  $\mu$ M ont été rapportées dans la littérature [195]. De plus, à l'époque de cette étude, la notion de résistance au clopidogrel était encore floue. Selon les études, le mode de calcul de cette résistance est variable, et le recours à des variations absolues ou relatives (inhibitions) de l'agrégation, mène à des taux de « résistances » entre 5% et 40%. Dans le même temps, les thromboses vasculaires ne surviennent que chez 5 à 10% des patients sous traitement [41]. Les défis se situaient donc dans un premier temps dans l'uniformisation des méthodes et des modes de calculs, mais aussi dans l'établissement du lien entre les mesures d'agrégation *in vitro* et la réalité clinique. Notre étude s'inscrit dans la première problématique et montre que les conditions d'anticoagulation peuvent

modifier les résultats d'agrégation, changeant le taux de mauvais répondeurs. Notre étude suggère également que la mesure tardive de l'agrégation, dépendante principalement du récepteur P2Y<sub>12</sub>, pourrait être un meilleur reflet de l'activité antiplaquettaire du clopidogrel. Deux récepteurs sont impliqués lors de l'agrégation des plaquettes induite par l'ADP, P2Y<sub>1</sub> et P2Y<sub>12</sub>. Alors que P2Y<sub>1</sub> est impliqué dans le changement de forme des plaquettes et l'initiation de leur agrégation, P2Y<sub>12</sub> intervient plus tardivement, dans la stabilisation de l'agrégation. La synergie entre ces deux récepteurs de l'ADP est bien caractérisée depuis plusieurs années et l'intervention de chaque récepteur dans la dynamique d'agrégation est elle-même bien définie [41]. Dès lors, il semblait logique de proposer un test moins sensible à l'activité du P2Y<sub>1</sub> en mesurant l'agrégation tardive et/ou la désagrégation induite par le clopidogrel. Lors de sa parution, cet article a servi de base à un éditorial réalisé par les Drs Michelson et Frelinger insistant sur la nécessité d'obtenir une standardisation des tests appliqués au suivi du clopidogrel. Par la suite ce paramètre d'agrégation tardive a été repris dans plusieurs autres études concernant des plus larges populations de patients [196, 197, 198]. Ces études ont montré que la mesure de l'agrégation tardive et le calcul de la désagrégation sont des paramètres plus sensibles à l'inhibition du P2Y<sub>12</sub> en clinique. Cependant, une étude de Gurbel *et coll.* [198] comparant ces deux méthodes sur cent patients, montre que ces paramètres sont affectés de la même manière chez des patients « mauvais répondeurs ». Le paramètre d'agrégation tardive, bien que plus sensible n'apporterait donc pas d'amélioration pour la détection des patients « non répondeurs » au clopidogrel.

La méthode de suivi de l'activité biologique du clopidogrel la plus consensuelle d'après la revue récente rédigée par Gurbel et les principales éminences du domaine, reste donc pour l'heure actuelle la mesure du maximum d'agrégation après activation par 5 µM d'ADP [195]. Un patient « non répondeur » est alors défini comme ayant une différence absolue d'agrégation inférieure à 10% après traitement par rapport au niveau de base. Il faut néanmoins noter que cette méthode de calcul nécessite d'avoir une agrégation à la base (sans traitement) ce qui n'est

pas possible dans la plupart des cas en dehors du cadre d'essais cliniques ou de suivis systématiques. Tout au long de ce doctorat, au sein du laboratoire clinique du Pr Théroux, nous avons été plusieurs fois confrontés à des prélèvements de patients traités par clopidogrel et hospitalisés pour des thromboses aiguës. Un prélèvement n'est alors pas suffisant pour détecter une réponse faible au traitement sans contrôle (non traité). Ce type de contrôle est cependant difficilement envisageable avec des patients à haut risque. Des tests comme la désagrégation pourraient alors être une alternative envisageable. D'autres investigations en cours visent à établir un abaque permettant une estimation du risque d'évènements en fonction des résultats d'agrégation [195].

L'agrégation plaquettaire est-elle la seule solution pour suivre l'activité antiplaquettaire du clopidogrel ?

En pratique et à l'heure actuelle, la réponse à cette question est positive. De multiples tests sont disponibles et en concurrence pour la mesure de l'activité plaquettaire comme le VerifyNow [195] qui mesure la co-agrégation plaquettes/billes recouvertes de fibrinogène, le modèle de viscosimètre de type Cone-and-plate IMPACT [195], la cytométrie de flux pour la mesure de l'activation et de la sécrétion plaquettaire ou pour la mesure de la phosphorylation de la Vasodilatator-stimulated phosphoprotein (VASP). Si certains de ces tests comme la mesure de la phosphorylation de VASP pourraient probablement répondre au problème posé par les patients dans les épisodes aigus comme envisagé précédemment, aucun pour l'instant ne bénéficie du marquage CE en Europe, d'autorisation de la *Food and Drug Administration* ou de Santé Canada pour son utilisation clinique. De plus, ce test bénéficie d'un recul d'utilisation beaucoup moins important que celui de l'agrégation plaquettaire par turbidimétrie après activation par l'ADP.

D'un point de vue clinique, il faut noter que la valeur d'agrégation à 5  $\mu$ M d'ADP chez des patients traités par clopidogrel suit comme beaucoup d'autres variables biologiques une répartition gaussienne. Ceci suggère que la « non réponse » au médicament relève plus de la

variabilité naturelle à une intervention médicamenteuse qu'à la présence de patients réellement résistants [199]. Cette « mauvaise réponse » semble principalement dépendre de la concentration circulante de métabolite actif du clopidogrel d'une part, et de l'activité plaquettaire d'autre part. Les dernières recommandations de l'*American College of Cardiology* et de l'*American Heart Association* évoquent cette réponse diminuée au clopidogrel mais ne recommandent cependant pas le suivi ou le dépistage de patients à risques tant que les méthodes ne sont pas validées [200].

Alors que les différents laboratoires sont dans une phase de standardisation, les premiers essais cliniques testant des concentrations plus élevées de clopidogrel montrent une diminution du nombre de patients « non répondeurs » comme dans l'étude PREPAIR du Dr L'Allier [3]. De plus le développement clinique des nouveaux inhibiteurs de P2Y<sub>12</sub>, plus efficaces et ne nécessitant pas d'être métabolisés pour être actifs, devraient fournir de nouvelles options thérapeutiques.

Ceci amène au point soulevé dans le premier article et approfondi dans le second qui est le bénéfice potentiel de l'association d'un inhibiteur de P2Y<sub>1</sub> au clopidogrel afin d'agir conjointement sur les deux principaux récepteurs purinergiques de la plaquette. Lors du lancement de cette étude, plusieurs publications rapportaient les effets différentiels des deux récepteurs P2Y<sub>12</sub> et P2Y<sub>1</sub> et de leurs inhibiteurs dans des expériences *in vitro* au niveau de l'adhésion [201], de l'agrégation [201, 202] et de l'activité procoagulante des plaquettes [203]. Seule une étude avait été effectuée avec le clopidogrel par Contreres *et coll.* [204]. Cette étude visait à caractériser les profils de phosphorylation de plaquettes de donneurs sains traités par 75 mg de clopidogrel pendant 8 jours, après activation par un analogue stable de l'ADP, le 2MesADP et en présence ou non d'antagonistes de P2Y<sub>1</sub> l'A3P5P ou de l'intégrine GPIIbIIIa, ajoutés *in vitro*. Notre étude est donc la première à étudier sur des plaquettes de patients avec maladie coronarienne l'interaction entre le clopidogrel et un inhibiteur du récepteur P2Y<sub>1</sub>, le MRS2179 sur des paramètres accessibles en clinique. L'idéal aurait été d'utiliser un antagoniste

de P2Y<sub>1</sub> administrable chez l'homme. Cependant, les dérivés de ce type sont actuellement en développement et aucun n'a encore été approuvé. Nous avons cependant confirmé la synergie existante entre ces deux inhibiteurs sur des paramètres classiques d'agrégation et d'activation après activation par l'ADP ou le TRAP (Thrombin Receptor Activating Peptide) chez des patients avec maladie coronarienne.

Nous avons, à la suite de ces résultats, effectué les mêmes mesures sur du sang de donneur sains dans un modèle de flux en microcapillaire à  $1\ 500\text{s}^{-1}$ , soit un cisaillement de type artériel. Ces expériences, pour lesquelles les deux inhibiteurs de P2Y<sub>1</sub> et P2Y<sub>12</sub> ont été ajoutés in vitro au sang, montrent que le MRS2179 n'a qu'un effet très limité sur l'adhésion plaquettaire à la matrice de collagène mais diminue de moitié le recrutement plaquettaire participant à la croissance du thrombus. Au contraire et de façon surprenante, l'inhibiteur de P2Y<sub>12</sub> ne semble n'avoir qu'un effet très limité, mais agit de façon synergique avec l'inhibiteur de P2Y<sub>1</sub> pour inhiber presque totalement l'adhésion et l'agrégation plaquettaire. Ces résultats confirment ceux acquis par André *et coll.* [205] et ceux de Remijn *et coll.* [201] dans des conditions comparables. L'étude de Remjin *et coll.* confirme la faible inhibition de l'adhésion en présence d'un inhibiteur de P2Y<sub>12</sub> ou chez un patient déficient en P2Y<sub>12</sub>. Par contre au contraire de cette étude nous montrons une inhibition presque totale de la formation de thrombus versus partielle pour les auteurs. Cependant l'originalité de cette étude réside dans le fait que les cinétiques d'adhésion et de formation du thrombus sont mesurées en vidéomicroscopie sur un temps deux à trois fois plus long que les études précédentes [202, 205]. Notre étude a également permis de mettre en évidence des effets tardifs des antiplaquettaires utilisés. Notamment, l'inhibiteur de P2Y<sub>12</sub> semble diminuer la vitesse de croissance du thrombus dans les premiers temps, mais cette inhibition n'est pas vérifiée à la fin de la perfusion après neuf minutes de flux. Des expériences similaires sont en cours chez des patients avec maladie coronarienne stable avant et après traitement par clopidogrel, afin de pouvoir compléter adéquatement les expériences précédentes.

Il est à noter que cette étude est encore la seule à avoir été menée dans la principale population cible, c'est-à-dire chez des patients avec maladie coronarienne.

Ce type d'étude doit être renouvelé car plusieurs études chez les souris montrent une meilleure résistance à la thrombose lors d'une double inhibition des récepteurs P2Y<sub>1</sub> et P2Y<sub>12</sub> avec une absence de saignement chez des souris n'exprimant pas P2Y<sub>1</sub> [39, 206]. Ces données, tant chez l'homme que chez la souris, bien que préliminaires, sont porteuses de promesses quant à l'utilisation en thérapeutique d'inhibiteurs de P2Y<sub>1</sub> seuls ou en combinaison avec des inhibiteurs de P2Y<sub>12</sub> [41, 207].

Concernant l'approche technique, le système de flux en micro-capillaires permet d'accéder à des conditions plus proches des conditions vasculaires en recréant *in vitro* des forces de cisaillement. D'autres modèles permettent l'obtention de forces de cisaillement. Les plus répandus sont le PFA-100 (ou Platelet Function Analyser-100, dont les cartouches induisent l'activation plaquettaire par l'association d'un cisaillement correspondant à celui d'une artère sténosée soit 5 000s<sup>-1</sup> et de différentes combinaisons d'agonistes) et le modèle de « cone-and-plate » (IMPACT-R<sup>®</sup>) dans lequel l'adhésion sur plastique peut se faire à des cisaillements très élevés (> 10 000s<sup>-1</sup>). D'autres modèles, principalement des viscosimètres ou des chambres de perfusion, existent également. A l'exception du PFA-100, aucun de ces appareillages n'est encore validé pour des études cliniques. Les premières études cliniques utilisant le PFA-100 ont montré des résultats positifs en termes de suivi de l'effet du clopidogrel sur les plaquettes. Cependant, la méthode nécessite d'être standardisée. En effet, le PFA-100 souffre du fait que l'activation mixte avec des agonistes solubles et en condition de cisaillement en fait un modèle biologiquement complexe. Bien qu'il nécessite un volume d'échantillon supérieur aux autres (de l'ordre de 12 mL pour 9-10 mn de cisaillement à 1 500s<sup>-1</sup>), le modèle de capillaires permet, à l'instar de l'agrégation plaquettaire turbidimétrique une mesure en temps réel de la thrombose et de l'adhésion plaquettaire. Un système automatisé de microcapillaires est actuellement en cours

de développement pour une application en clinique au chevet du patient ce qui permettra l'accès facile à ces paramètres.

### **3.1.2. Développement d'une méthode de mesure de l'OLM**

De nombreuses fonctions et récepteurs non seulement plaquettaires mais plus généralement cellulaires sont dépendants des microdomaines membranaires comme par exemple la signalisation du récepteur au collagène plaquettaire GPVI [153] ou la formation de la synapse immunologique des lymphocytes T [208]. De plus, les microdomaines membranaires pourraient participer à la formation des microparticules [6], être altérés par les statines qui modifient la composition lipidique des membranes plaquettaire [209] et finalement être impliqués dans le mode d'action du clopidogrel tel que suggéré par l'étude de Savi *et coll.* [7]. Toutes ces données qui participent à des mécanismes clés de la maladie coronarienne et de son traitement m'ont amené naturellement à rechercher une méthode pour étudier les microdomaines membranaires. La mesure de l'OLM des cellules, m'en a fourni l'occasion : par son approche ratiométrique, elle permet de quantifier les zones les plus ordonnées, considérées, d'après la littérature [86] comme des microdomaines membranaires de type « lipid rafts ». Comme ceci sera détaillé dans la partie perspective, le rôle critique des microdomaines n'est pas limité aux plaquettes mais est retrouvé dans une multitude de pathologies ou de fonctions vitales.

L'hypothèse sous-tendant mon travail a été que *toute perturbation de la quantité ou de la répartition des microdomaines membranaires pourrait participer au déséquilibre de l'état de base de la membrane et ainsi être la cause ou au moins le reflet de pathologies, de dysfonctions ou de modifications de la physiologie cellulaire mais aussi de l'efficacité de traitements.*

Le but de mon travail a alors été de mettre au point une méthode transposable à la clinique permettant de détecter ces modifications de membrane, en travaillant en premier lieu sur les

plaquettes qui sont des cellules très plastiques, activables et qui de plus étaient au centre de nos études précédentes.

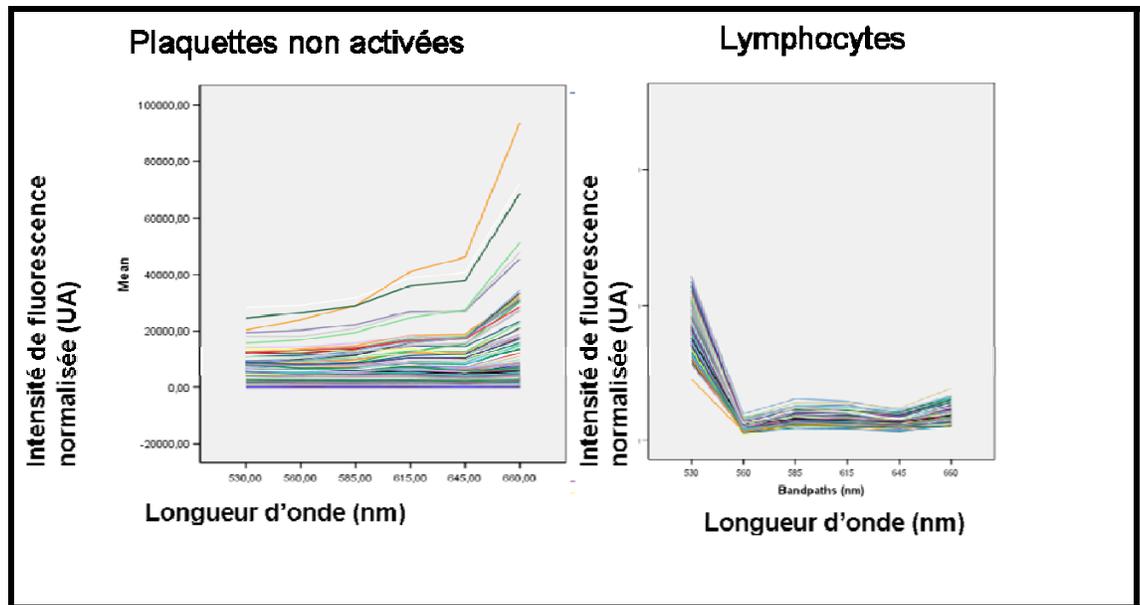
Les résultats des études de mesure de l'OLM suggèrent que cette méthode peut effectivement permettre de mesurer des modifications de l'OLM par cytométrie de flux dans des cellules vivantes. Les principaux avantages de cette technique par rapport à celles existantes sont de permettre une analyse quantitative mais aussi qualitative des modifications membranaires par la détermination des spectres de fluorescence du di-4-ANEPPDHQ ou la recherche de sous-populations basée sur l'analyse individuelle de chaque cellule.

Deux études utilisant une approche similaire ont été rapportées dans la littérature. La première méthode ratiométrique par cytométrie de flux a été publiée en 2007 par Shynkar *et coll.* [123]. La mesure est basée sur un nouveau composé, le F2N12S dont la longueur d'onde d'émission est sensible à la composition lipidique et particulièrement à la dépolarisation de la membrane induite par l'externalisation de la phosphatidylsérine. Les auteurs de cette étude ont d'ailleurs employé cette méthode dans le but de mesurer l'apoptose en combinaison avec l'iodure de propidium. La seconde méthode publiée en 2008 utilise la mérocyanine 540 (MC540), un fluorochrome ayant une affinité supérieure pour les domaines denses en lipides et présentant dans le même temps un léger décalage de spectre de 7 nm [177]. Cette méthode est seulement semi-quantitative car le paramètre utilisé est l'augmentation de fluorescence. Les auteurs définissent ainsi des cellules avec des intensités de fluorescence faibles ou fortes en MC540. Par comparaison, le di-4-ANEPPDH permet d'utiliser une approche ratiométrique et de quantifier directement l'OLM des lipides permettant ainsi de mesurer des augmentations ou des diminutions des phases ordonnées, associées aux « lipid rafts ».

*Il est important de noter que les trois techniques décrites précédemment visent un but commun: disposer d'outils d'étude des modifications de structures des membranes, non*

*dépendants d'un marqueur protéique ou lipidique et applicables dans un large contexte de recherche.*

La première perspective intéressante de l'approche utilisant le di-4-ANEPPDHQ est la notion de profilage de membranes et de typage cellulaire. Cette notion repose sur le travail fait en collaboration avec le Dr Ange Maguy à l'Institut de Cardiologie de Montréal. Ce travail, présenté pour la première fois au congrès de la Société Américaine de Biophysique en février 2008 (voir Annexe 1), décrit la présence de cinq zones distinctes dans le spectre de l'ANEP correspondant, à des microdomaines membranaires distincts. Ce travail suggère donc l'existence de plusieurs types de microdomaines, détectables selon leur niveau d'ordre. Basé sur ces observations, nous avons mis en place la méthode de cytométrie spectrale permettant de quantifier, sur des cellules en suspension, les intensités de fluorescence du di-4-ANEPPDHQ au niveau des six différentes bandes passantes précédemment décrites. Cette méthode nous a notamment permis de décrire des différences de sensibilité entre les bandes passantes selon les traitements (MCD, statine, agonistes plaquettaire). Nous avons également, dans des expériences préliminaires, mesuré des différences de spectre de fluorescence significatives entre type cellulaire. Il semble ainsi que les lymphocytes présentent une plus grande proportion de membrane très ordonnée (bande passante de 530/30 nm) que les plaquettes alors que les zones désordonnées sont beaucoup plus importantes sur la membrane plaquettaire. Ces travaux ont été effectués en collaboration avec Sylvain Gimmig puis Laurence Lejeune, responsables de la plateforme de cytométrie du centre de recherche du Centre Hospitalier Universitaire de Montréal.



**Figure 24: Comparaison des spectres de fluorescence du di-4-ANEPPDHQ de lymphocytes et de plaquettes**

Cette notion de profilage de cellules est directement liée à la recherche de sous-populations cellulaires. La première indication suggérant qu’il serait possible d’utiliser le marquage par le di-4-ANEPPDHQ pour détecter des sous-populations cellulaires, vient de l’apparition, en conditions de forces de cisaillement, d’une population présentant un OLM très bas (Rf élevé). Comme cela a été décrit précédemment, il y a principalement deux sous-populations actuellement décrites dans la littérature : les plaquettes de types COAT [4] et SCIPs [58]. Ces deux populations ont été décrites à partir d’activations induites par des agonistes solubles ou par l’adhésion de plaquettes à des matrices de collagène, de facteur de von Willebrand ou même directement sur du verre. La population que nous décrivons est donc la seule à notre connaissance à avoir été décrite dans un modèle de SIPA en présence de facteur de von Willebrand. Les premières données montrent que l’apparition de cette population est dépendante de l’interaction du vWF avec la GPIb-IX-V. La caractérisation *in vitro* de cette population se déroulera selon trois axes. (1) Le premier axe concerne une caractérisation fonctionnelle en complétant les données acquises en viscosimètre avec les inhibiteurs de la fonction du vWF, des

Mitogen Activated Protein kinases (MAPkinases), de l'intégrine GPIIbIIIa etc... (2) La seconde approche consistera à déterminer les éventuelles modifications de localisation des principaux récepteurs par rapport aux microdomaines définis par le marquage di-4-ANEPPDHQ dans la sous-population plaquettaire. Cette étape sera effectuée par des études de colocalisation des récepteurs avec la fluorescence associée à chaque bande passante en microscopie confocale. (3) Une dernière étape de caractérisation protéomique devra aussi être menée afin de déterminer les modifications de membranes menant à ce phénotype. Ceci peut être effectué par tri des plaquettes suivi par des analyses protéomiques et lipidiques des DRM.

Outre ces caractérisations, le principal objectif sera de déterminer pour quelles pathologies il est possible de détecter et d'établir la pertinence clinique de ces sous-populations plaquettaires. Les résultats de la sous-étude ANEP PREPAIR semblent suggérer que chez des patients présentant des facteurs de risque d'athérosclérose et éligibles pour une coronarographie, il est possible de détecter de la même manière une population à Rf élevé. Il est possible que cette sous-population soit donc le signe d'une sténose artérielle augmentant significativement le cisaillement. De façon intéressante, le clopidogrel diminue significativement cette population suggérant que l'apparition de ce phénotype est dépendante de l'activation plaquettaire par l'ADP, notamment mise en jeu lors de l'activation plaquettaire par les forces de cisaillement. Si la correspondance entre les deux types de sous-populations se confirme, il serait alors possible d'évaluer l'impact du cisaillement artériel au niveau de la plaque d'athérosclérose par la mesure de cette sous-population de cellules.

De manière plus générale nous allons explorer la possibilité de détecter des modifications spécifiques de microdomaines membranaires, soit par des modifications de la population cellulaire entière, soit par la présence ou l'apparition de sous-populations cellulaires chez des patients malades. Des expériences préliminaires menées en collaboration avec le Dr Fabien Agenes (Centre de Recherche du CHUM – INSERM U753) ont d'ailleurs été menées en vue de détecter et quantifier la formation de synapses immunologiques entre des lymphocytes CD8 et

des cellules présentatrices d'antigènes (CPA). Bien que ce premier protocole pilote ne garantisse pas la spécificité des interactions CD8/APC, il a été possible de détecter des modifications du spectre des doublets de CD8 par rapport aux cellules seules. Ces expériences suggèrent de plus que les différentes cellules circulantes présentent des profils de membranes différents ; des expériences sont actuellement en cours afin de déterminer les profils de chaque type cellulaire circulant.

Dans ce contexte, nous avons débuté une collaboration avec le Dr Bastian Angermann (Centre de Recherche du CHUM) en vue de développer un algorithme de traitement des données visant à effectuer une détection statistique des populations variantes par analyse par clusters. Les premiers résultats semblent indiquer qu'il est effectivement possible de séparer deux populations à partir des fluorescences acquises en cytométrie spectrale.

Comme cela a été évoqué précédemment, le champ d'application de la méthode présentée dans cette thèse est plus large que l'étude des plaquettes et peut être appliquée à toute cellule en suspension. L'utilisation du di-4-ANEPPDHQ a de plus été élargie à la mesure de l'apoptose et au dosage des microparticules cellulaires comme ceci sera évoqué dans les annexes 2 et 3.

### **3.2. Applications et valorisation de la méthode de quantification de l'OLM**

---

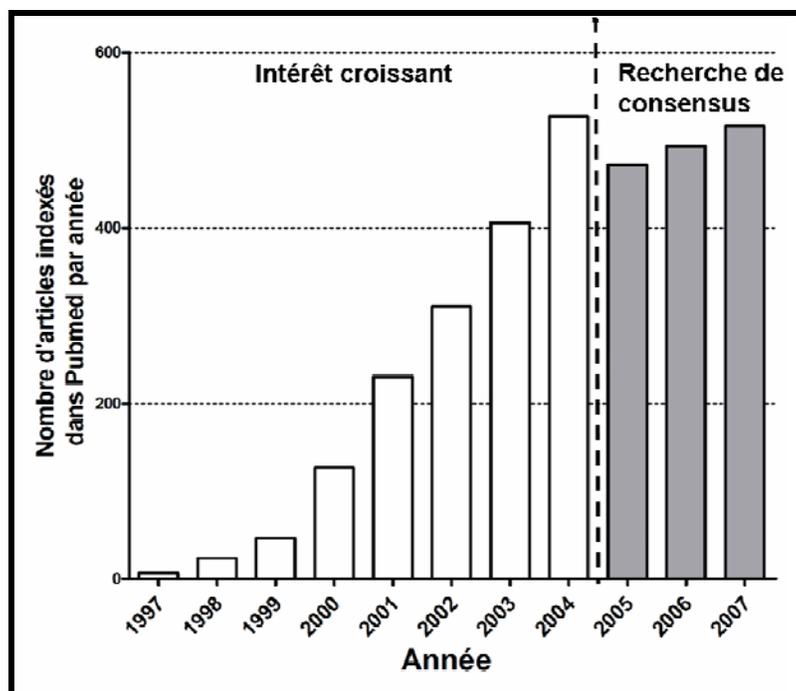
Comme l'illustre la Figure 25, l'évolution des publications indexées dans la base de donnée bibliographique Pubmed pour les mots clés « membrane rafts OR lipid rafts » marque un plateau depuis les années 2005-2006 correspondant aux premières publications remettant en cause les méthodes d'études des microdomaines [76, 78, 80, 210, 211]. Le développement de nouvelles techniques est à l'heure actuelle un facteur limitant pour l'étude des microdomaines membranaires, tel que l'écrivait Ken Jacobson en 2007 dans *Nature Cell Biology* [79]:

*“ The lipid raft field is now at a technical impasse because the physical tools to study biological membranes as a liquid that is ordered in space and time are still being developed (...) Further application of existing tools and the development of new tools are needed to understand the dynamic heterogeneity of biological membranes ”*

Plus pertinente encore est la phrase de Daniel Lingwood et de Kai Simons, découvreur des « lipid rafts » en introduction de la méthode de préparation des Membrane Résistantes aux Détergents (DRM) dans *Nature Protocols* [94]:

*DRM “ ... quickly became the ruling method for assigning lipid and protein raft affinity. However, it was clear from the start that DRMs do not reflect membrane organization at steady state and therefore cannot be directly equated with lipid rafts”.*

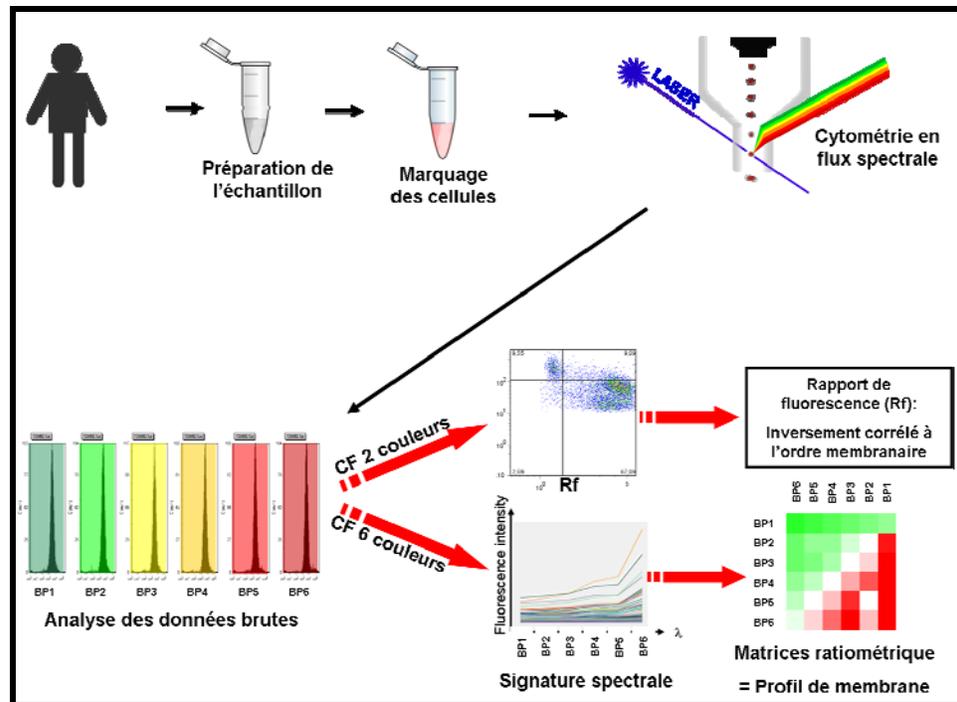
Cette phrase rend clairement compte du flou existant entre les DRM et les microdomaines membranaires.



**Figure 25: Evolution du nombre de publications sur les microdomaines (1997-2007)**

Nombre d'articles publiés entre 1997, date de découverte des « lipid rafts » et 2007 pour les mots clés « membrane rafts OR lipid rafts »

C'est dans ce contexte de recherche active de nouvelles méthodes que s'est inscrit mon doctorat. La technique que j'ai développée ne prétend pas résoudre tous les problèmes liés à l'étude des microdomaines membranaires mais peut participer au développement d'un volet s'attachant à des aspects plus quantitatifs dans le domaine des « lipid rafts ». Cette technique étant originale et applicable à de nombreux domaines de la pathologie, nous avons décidé de débiter une démarche de valorisation de cette technique, qui a abouti au dépôt d'une demande de brevet aux Etats-Unis en septembre 2007 [212]. Ce brevet est basé sur la méthode de marquage, d'analyse et de traitement des données après marquage des cellules par le di-4-ANEPPDHQ. La Figure 26 décrit le processus complet de la méthode.



**Figure 26: Schéma du processus décrit dans le brevet concernant la méthode de mesure de l'OLM de cellules ou virus**

Les applications envisagées sont de trois types :

- *l'étude de modifications induites par des traitements, dans une optique de « screening » de molécules actives* (Figure 27-A) Cette application est la plus directe car elle utilise directement les propriétés du di-4-ANEPPDHQ afin de détecter des modifications globales de la membrane cellulaire. Elle pourrait être rapprochée de la technique de spectroscopie diélectrique qui est utilisée en « screening » haut débit pour détecter des modifications cellulaires en réponse à des agonistes et/ou inhibiteurs en mesurant l'impédance cellulaire lors de l'application d'une tension électrique. Ainsi un test mesurant une modification biophysique générale peut appréhender une modification cellulaire induite par une molécule exogène. C'est dans cette logique que pourrait s'inscrire un tel test.
- *la détection de sous-population de cellules présentant un profil variant, marquant une pathologie active ou en développement (cellules métastatiques, cellules infectées ou*

*activées*) (Figure 27-B) Ceci se rapproche de la détection des populations plaquettaires induites par le cisaillement. Il a été montré que des cellules infectées ou métastatiques peuvent présenter des modifications de membrane. Il serait donc possiblement envisageable de les détecter dans la circulation.

- *la détection de patients présentant des cellules avec un profil membranaire variant, signe d'une susceptibilité à une maladie* (Figure 27-C). Le meilleur exemple de pathologie pour laquelle la disparition d'une zone membranaire de type rafts est impliquée est le défaut de capacitation des spermatozoïdes. Ceci se caractérise par l'absence de remodelage de l'acrosome, zone membranaire de type rafts. Le défaut de cette zone entraîne donc une mauvaise pénétration des spermatozoïdes dans l'ovaire. Ceci est un exemple parmi d'autres qui pourraient être étudiés par le test développé.

Il est à noter que les différentes études cliniques effectuées lors de cette thèse ont montré la faisabilité des mesures d'OLM dans un contexte clinique.

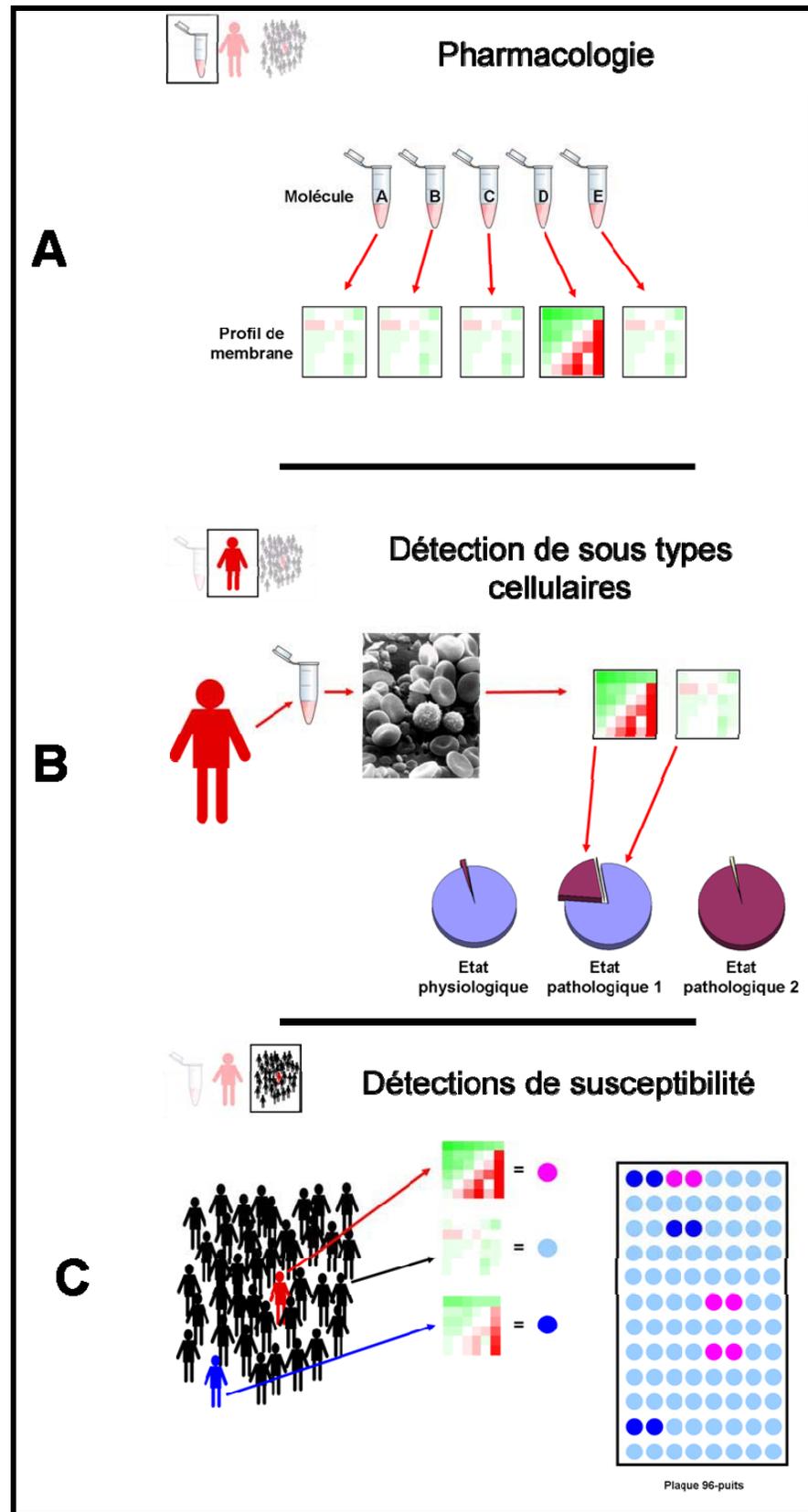
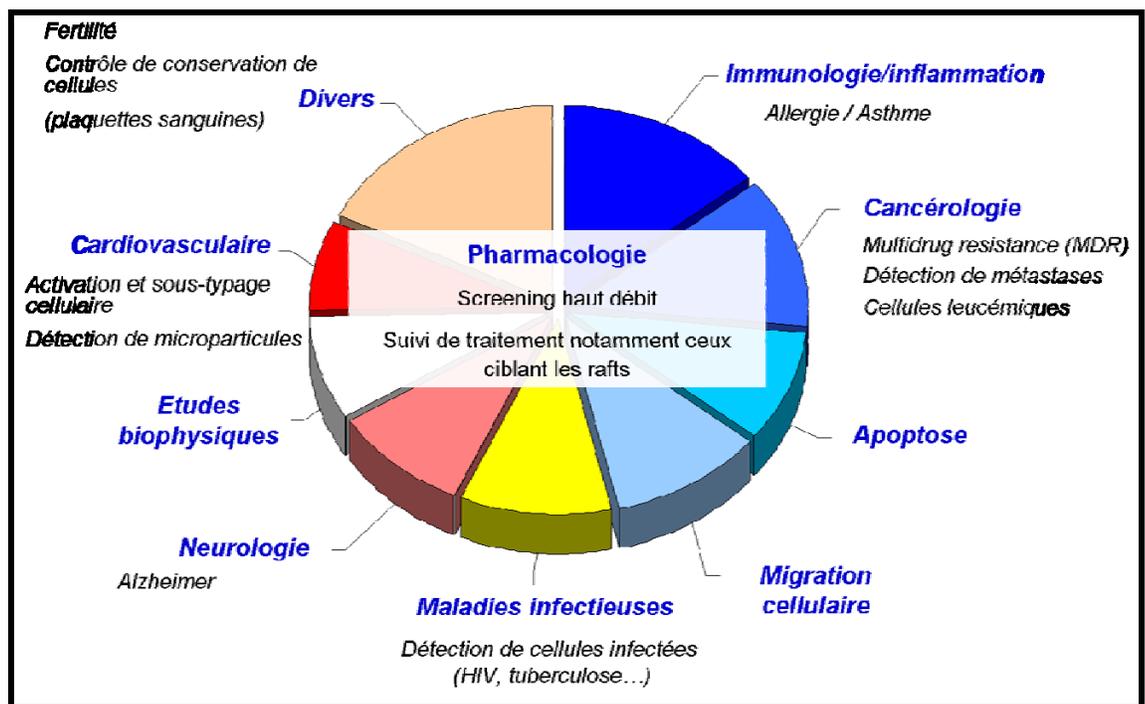


Figure 27: Schémas des applications potentielles du profilage des membranes cellulaires

### 3.2.1. Domaines d'application en médecine

La Figure 28 représente la répartition des différentes publications indexées dans Pubmed selon les thèmes de recherche impliquant les microdomaines et selon le nombre publications publiées entre 1997, date de l'article princeps de Simons et Ikonen[75] et juin 2008. Les principaux champs d'investigation sont centrés sur l'immunologie, la cancérologie et l'inflammation puis l'infectiologie et la neurologie. Les autres domaines de la médecine sont encore peu représentés. Notamment, la recherche sur les microdomaines en cardiologie est principalement dédiée à l'électrophysiologie alors que la biologie vasculaire fait ses premiers pas depuis 2003. Deux de ces thèmes de recherche seront brièvement décrits : l'immunologie et l'infectiologie.



**Figure 28: Répartition des publications sur les microdomaines en fonction des domaines de recherche**

Chaque secteur correspond à la répartition par sujet des articles publiés pour les mots clés « membrane rafts OR lipid rafts » Mise à jour : juin 2008

### 3.2.1.1. *Immunologie : la synapse immunologique, une plateforme de microdomaines*

Comme le montre la Figure 28, les immunologistes ont été rapidement sensibilisés à l'importance des microdomaines, en effet c'est une structure proche des microdomaines qui constitue un des éléments centraux de la transmission de l'immunité cellulaire. Elle est centrée autour du Récepteur des Cellules T (TCR) dont le rôle est de détecter les peptides présentés au niveau du Complexe Majeur d'Histocompatibilité (CMH) par les cellules présentatrices d'antigènes (CPA) (cellules dendritiques, macrophages) pour initier l'activation des Lymphocytes T (LT) et la formation de la synapse immunologique [208, 213]. La structure et le rôle de la synapse immunologique ont souvent forcé la comparaison avec les « plateformes de rafts ». Celles-ci ont fait l'objet de nombreuses études qui n'ont pas d'équivalent dans d'autres domaines et préfigurent possiblement des approches qui y seront adoptées. L'intérêt de ces études dépasse donc largement le domaine de l'immunologie comme le montre la démonstration par Douglass *et coll.* [214] de la dépendance de certaines structures de type microdomaines à des interactions protéiques plutôt que lipidiques, enrichissant ainsi la notion de microdomaines.

### 3.2.1.2. *Maladies infectieuses*

Le cycle de vie de tout pathogène inclut une étape de liaison et de parasitisme d'une cellule de son hôte. Il est intéressant de noter que de nombreux agents infectieux utilisent les microdomaines pour se lier aux cellules à infecter ou pour se répliquer. Ces hypothèses ont été posées relativement tôt après la découverte des microdomaines. Dès 2001 deux articles font le lien entre les microdomaines et le mécanisme infectieux des *Chlamydia trachomatis* [215] et du *Plasmodium falciparum* [216], agents respectivement de maladie sexuellement transmissible et du paludisme. Le

Tableau 7, adapté de la revue de Manes *et coll.* donne une liste des principaux pathogènes dont le mécanisme infectieux est dépendant des microdomaines membranaires [217]. Dans la classe des bactéries, les principaux mécanismes mis en jeu concernent d'une part l'entrée des bactéries intracellulaires et leur survie (*Chlamydia trachomatis*, *Salmonella paratyphi*, *Mycobacterium spp...*) et d'autre part le ciblage et l'action des toxines produites par des bactéries (*Helicobacter pylori*, *Listeria monocytogenes*, *Clostridium perfringens...*). Cette dépendance de certains parasites aux microdomaines pour leur entrée et leur survie dans la cellule a probablement induit un phénomène adaptatif au cours de l'évolution qui est mis en évidence pour l'infection des macrophages par *Legionella pneumophila* ; en effet, les vacuoles enrichies en microdomaines et en bactéries sont sélectivement éliminées par autophagie, transformant ainsi les microdomaines en un moyen de concentrer les pathogènes pour les détruire [218]. De manière opposée, les bactéries peuvent induire la formation de microdomaines : Lapaque *et coll.* ont récemment montré dans une étude très complète mettant en jeu plusieurs approches tant biochimiques que biophysiques, que le lipopolysaccharide de la bactérie *Brucella* est capable d'induire la formation de larges structures possédant toutes les caractéristiques de microdomaines [131].

De leur côté les virus utilisent d'abord les microdomaines pour adhérer puis pénétrer à l'intérieur de la cellule puis, après l'étape de réplication intracellulaire pour former les nouvelles particules virales par bourgeonnement à partir des microdomaines.

**Tableau 7: Principaux agents infectieux dépendants des microdomaines**  
Tableau adapté de Manes *et coll.* [217], mis à jour lorsque les références sont indiquées

| Bactéries   | Pathologies associées  | Fonction associée aux microdomaines  | Réf   |
|---|--|--|-------|
| <b>Legionella pneumophila</b>                       | Legionellose, pneumopathie   | Entrée et survie intracellulaire dans des vacuoles, néanmoins les vacuoles riches en microdomaines et bactéries sont sélectivement éliminées par les cellules infectées (autophagie) | [218] |
| <b>Pseudomonas aeruginosa (bacille pyocyanique)</b> | Infections nosocomiales chez patients immunodéprimés, et avec fibrose kystique | Réponse de l'hôte, activation cellulaire (kinase Lyn)<br>Entrée de la bactérie par le canal chlore CFTR dépendant des microdomaines  | [219] |
| <b>Salmonella typhimurium</b>                       | Salmonellose, toxi-infection alimentaire                                       | Entrée et survie cellulaire  |       |
| <b>Chlamydia spp.</b>                               | Maladie sexuellement transmissible   | Entrée et survie cellulaire  |       |
| <b>Mycobacterium spp.</b>                           | Pneumopathie, affections cutanées  | Entrée et survie cellulaire<br>la formation de radicaux libres et une réaction pro-inflammatoire   | [220] |
| <b>Vibrio cholerae</b>                              | Toxi-infection alimentaire   | Liaison de la toxine (au GM1) et oligomérisation   |       |
| <b>Helicobacter pilory</b>                          | Ulcères gastriques   | Ciblage par la toxine VacA de Helicobacter de la sphingomyéline des microdomaines  |       |
| <b>Listeria monocytogenes</b>                       | Méningites   | Ciblage des microdomaines par la listeriolysine O, oligomérisation (toxine formant des pores) et induction de l'agrégation de microdomaines via le GM1                               | [221] |
| Virus   | Pathologies associées  | Fonction associée aux microdomaines  | Réf   |
| <b>Human T-lymphotropic virus-1 (HTLV-1)</b>        | Infection asymptomatique avec évolution possible en leucémie                   | Entrée et dissémination  |       |
| <b>Virus de l'Immunodéficience Humaine (VIH)</b>    | SIDA, immunodéficience, infections opportunistes létales                       | Liaison du virus à des glycosphingolipides enrichis dans les microdomaines pour pénétrer la cellule<br>Bourgeonnement des nouvelles particules virales à partir des microdomaines    | [222] |
| Protozoaires  | Pathologie associée  | Fonction associée aux microdomaines  | Réf   |
| <b>Plasmodium falciparum</b>                        | Paludisme  | Entrée et survie intracellulaire au niveau d'un sous-type de microdomaines définis par les études de DRM   | [223] |

### 3.2.2. Les microdomaines comme cible de médicaments

Afin d'illustrer le potentiel des méthodes ciblant les microdomaines membranaires, j'ai choisi de présenter ce qui peut aussi être une nouvelle voie thérapeutique dans de nombreuses maladies.

Récemment un article du Pr Kai Simons, co-découvreur des microdomaines, a fait passer un nouveau cap à l'étude des microdomaines en les faisant entrer dans le domaine des cibles thérapeutiques [224]. Dans un article de la revue *Science*, Rajendran *et coll.* décrivent un nouvel

inhibiteur de la  $\beta$ -sécrétase, une des deux enzymes avec l' $\alpha$ -sécrétase qui métabolisent le précurseur de la substance  $\beta$ -amyloïde (APP). La  $\beta$ -sécrétase étant présente en fortes concentrations dans les microdomaines, l'hypothèse de cette étude a été de cibler un inhibiteur spécifique de l'enzyme en lui couplant une ancre constitué d'un sterol. Le greffage de cette ancre sterol cible préférentiellement non seulement la membrane plasmique mais les microdomaines en particulier. Des ancres constitués d'acyl (Oleyl, Palmitoyl ou Myristyl) ne sont pas spécifiques des microdomaines. Les auteurs démontrent dans cet article des modèles *in vitro* et murins dans lesquels le ciblage de l'inhibiteur vers les microdomaines augmente notablement son efficacité par rapport à l'inhibiteur simple en favorisant la liaison de l'inhibiteur à l'enzyme. Cette publication est la première à faire la preuve que le ciblage des microdomaines et leur modulation peut avoir un retentissement thérapeutique.

Pour aller plus loin il est nécessaire de citer les projets de la compagnie JADO technologies fondée par le Pr Simons. L'information donnée sur son site internet (<http://www.jado-tech.com/>) montre que le ciblage d'inhibiteurs par des composés « raftophiles » n'est qu'une des deux approches envisagées par cette compagnie. Une seconde classe de molécule est en développement de la classe des « Disrafters ». Ces molécules auraient pour rôle de moduler la formation des microdomaines. Les applications ciblées sont en rapport direct avec la partie précédente dans le traitement de l'urticaire chronique et de maladies infectieuses.

- L'urticaire chronique, dépendant de la dégranulation des mastocytes sous l'action des IgE provoque la libération d'histamine, responsable des réactions immédiates de l'allergie et notamment du bronchospasme. Le but du traitement envisagé est de bloquer la phase précoce de l'activation mastocytaire afin de bloquer la réaction allergique. Une étude clinique de phase II vient d'être lancée par la compagnie pour étudier l'effet du TF002, une formulation spéciale de miltefosil ciblant les microdomaines, sur l'urticaire résistant aux antihistaminiques et la dermatite atopique.

- Dans le deuxième cas, des composés « disrafters » seraient utilisés pour déstabiliser les microdomaines et ainsi empêcher la liaison des pathogènes ou empêcher leur dissémination à partir de la cellule hôte. Ce type d'approche pourrait être notamment applicable au virus de l'immunodéficience humaine (VIH) dont les microdomaines servent à la production de particules infectieuses et lors de l'infection cellulaire.

Le développement de nouveaux médicaments basé sur une logique de ciblage ou de modulation des microdomaines membranaires pourrait être applicable à de nombreux domaines de la thérapeutique et ouvrir de nouvelles avenues de recherche.

## **4. Bibliographie**

---

- [1] Labarthe B, Theroux P, Angioi M, Ghitescu M. Matching the evaluation of the clinical efficacy of clopidogrel to platelet function tests relevant to the biological properties of the drug. *Journal of the American College of Cardiology*. 2005 Aug 16;46(4):638-45.
- [2] Labarthe B, Babin J, Bonnefoy A, Theroux P. Comparative effects of single or combined inhibition of the P2Y1 and P2Y12 purinergic receptors on platelet adhesion, activation, secretion, and aggregation soumis *Thromb Haemost*. 2008.
- [3] L'Allier PL, Ducrocq G, Pranno N, Noble S, Ibrahim R, Gregoire JC, et al. Clopidogrel 600-mg double loading dose achieves stronger platelet inhibition than conventional regimens: results from the PREPAIR randomized study. *Journal of the American College of Cardiology*. 2008 Mar 18;51(11):1066-72.
- [4] Dale GL. Coated-platelets: an emerging component of the procoagulant response. *J Thromb Haemost*. 2005 Oct;3(10):2185-92.
- [5] Kulkarni S, Woollard KJ, Thomas S, Oxley D, Jackson SP. Conversion of platelets from a proaggregatory to a proinflammatory adhesive phenotype: role of PAF in spatially regulating neutrophil adhesion and spreading. *Blood*. 2007 Sep 15;110(6):1879-86.
- [6] Biro E, Akkerman JW, Hoek FJ, Gorter G, Pronk LM, Sturk A, et al. The phospholipid composition and cholesterol content of platelet-derived microparticles: a comparison with platelet membrane fractions. *J Thromb Haemost*. 2005 Dec;3(12):2754-63.
- [7] Savi P, Zacharyus JL, Delesque-Touchard N, Labouret C, Herve C, Uzabiaga MF, et al. The active metabolite of Clopidogrel disrupts P2Y12 receptor oligomers and partitions them out of lipid rafts. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2006 Jul 18;103(29):11069-74.
- [8] Corti R, Hutter R, Badimon JJ, Fuster V. Evolving concepts in the triad of atherosclerosis, inflammation and thrombosis. *J Thromb Thrombolysis*. 2004 Feb;17(1):35-44.
- [9] Fuster V, Moreno PR, Fayad ZA, Corti R, Badimon JJ. Atherothrombosis and high-risk plaque: part I: evolving concepts. *Journal of the American College of Cardiology*. 2005 Sep 20;46(6):937-54.
- [10] Libby P, Theroux P. Pathophysiology of coronary artery disease. *Circulation*. 2005 Jun 28;111(25):3481-8.

- [11] Zimmerman GA, Weyrich AS. Signal-dependent protein synthesis by activated platelets: new pathways to altered phenotype and function. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*. 2008 Mar;28(3):s17-24.
- [12] Litvinov RI, Vilaire G, Shuman H, Bennett JS, Weisel JW. Quantitative analysis of platelet alpha v beta 3 binding to osteopontin using laser tweezers. *J Biol Chem*. 2003 Dec 19;278(51):51285-90.
- [13] Rendu F, Brohard-Bohn B. The platelet release reaction: granules' constituents, secretion and functions. *Platelets*. 2001 Aug;12(5):261-73.
- [14] Croce K, Libby P. Intertwining of thrombosis and inflammation in atherosclerosis. *Curr Opin Hematol*. 2007 Jan;14(1):55-61.
- [15] Yin W, Ghebrehiwet B, Peerschke EI. Expression of complement components and inhibitors on platelet microparticles. *Platelets*. 2008 May;19(3):225-33.
- [16] Jin W, Inoue O, Tamura N, Suzuki-Inoue K, Satoh K, Berndt MC, et al. A role for glycosphingolipid-enriched microdomains in platelet glycoprotein Ib-mediated platelet activation. *J Thromb Haemost*. 2007 May;5(5):1034-40.
- [17] Ozaki Y, Asazuma N, Suzuki-Inoue K, Berndt MC. Platelet GPIb-IX-V-dependent signaling. *J Thromb Haemost*. 2005 Aug;3(8):1745-51.
- [18] Ruggeri ZM, Orje JN, Habermann R, Federici AB, Reininger AJ. Activation-independent platelet adhesion and aggregation under elevated shear stress. *Blood*. 2006 Sep 15;108(6):1903-10.
- [19] Goto S, Tamura N, Ishida H, Ruggeri ZM. Dependence of platelet thrombus stability on sustained glycoprotein IIb/IIIa activation through adenosine 5'-diphosphate receptor stimulation and cyclic calcium signaling. *Journal of the American College of Cardiology*. 2006 Jan 3;47(1):155-62.
- [20] Andre P, Delaney SM, LaRocca T, Vincent D, DeGuzman F, Jurek M, et al. P2Y12 regulates platelet adhesion/activation, thrombus growth, and thrombus stability in injured arteries. *The Journal of clinical investigation*. 2003 Aug;112(3):398-406.
- [21] Ruggeri ZM. Platelets in atherothrombosis. *Nat Med*. 2002 Nov;8(11):1227-34.
- [22] Viles-Gonzalez JF, Fuster V, Badimon JJ. Thrombin/inflammation paradigms: a closer look at arterial and venous thrombosis. *Am Heart J*. 2005 Jan;149(1 Suppl):S19-31.
- [23] Esmon CT. Inflammation and thrombosis. *J Thromb Haemost*. 2003 Jul;1(7):1343-8.

- [24] Dorsam RT, Kunapuli SP. Central role of the P2Y12 receptor in platelet activation. *The Journal of clinical investigation*. 2004 Feb;113(3):340-5.
- [25] Gachet C. The platelet P2 receptors as molecular targets for old and new antiplatelet drugs. *Pharmacology & therapeutics*. 2005 Nov;108(2):180-92.
- [26] Gurbel PA, Bliden KP, Hiatt BL, O'Connor CM. Clopidogrel for coronary stenting: response variability, drug resistance, and the effect of pretreatment platelet reactivity. *Circulation*. 2003 Jun 17;107(23):2908-13.
- [27] Lau WC, Carville DG, Bates ER. Clinical significance of the atorvastatin-clopidogrel drug-drug interaction. *Circulation*. 2004 Aug 10;110(6):e66-7; author reply e-7.
- [28] Wenaweser P, Windecker S, Billinger M, Cook S, Togni M, Meier B, et al. Effect of atorvastatin and pravastatin on platelet inhibition by aspirin and clopidogrel treatment in patients with coronary stent thrombosis. *The American journal of cardiology*. 2007 Feb 1;99(3):353-6.
- [29] Trenk D, Hochholzer W, Fromm MF, Chialda LE, Pahl A, Valina CM, et al. Cytochrome P450 2C19 681G>A polymorphism and high on-clopidogrel platelet reactivity associated with adverse 1-year clinical outcome of elective percutaneous coronary intervention with drug-eluting or bare-metal stents. *Journal of the American College of Cardiology*. 2008 May 20;51(20):1925-34.
- [30] Bliden KP, Dichiaro J, Lawal L, Singla A, Antonino MJ, Baker BA, et al. The association of cigarette smoking with enhanced platelet inhibition by clopidogrel. *Journal of the American College of Cardiology*. 2008 Aug 12;52(7):531-3.
- [31] Michelson AD, Linden MD, Furman MI, Li Y, Barnard MR, Fox ML, et al. Evidence that pre-existent variability in platelet response to ADP accounts for 'clopidogrel resistance'. *J Thromb Haemost*. 2007 Jan;5(1):75-81.
- [32] Frere C, Cuisset T, Morange PE, Quilici J, Camoin-Jau L, Saut N, et al. Effect of cytochrome p450 polymorphisms on platelet reactivity after treatment with clopidogrel in acute coronary syndrome. *The American journal of cardiology*. 2008 Apr 15;101(8):1088-93.
- [33] Lotfi A, Schweiger MJ, Giugliano GR, Murphy SA, Cannon CP. High-dose atorvastatin does not negatively influence clinical outcomes among clopidogrel treated acute coronary syndrome patients--a Pravastatin or Atorvastatin Evaluation and Infection Therapy-Thrombolysis in Myocardial Infarction 22 (PROVE IT-TIMI 22) analysis. *Am Heart J*. 2008 May;155(5):954-8.
- [34] Trenk D, Hochholzer W, Frundi D, Stratz C, Valina CM, Bestehorn HP, et al. Impact of cytochrome P450 3A4-metabolized statins on the antiplatelet effect of a 600-

mg loading dose clopidogrel and on clinical outcome in patients undergoing elective coronary stent placement. *Thromb Haemost.* 2008 Jan;99(1):174-81.

[35] Wong PC, Crain EJ, Watson CA, Jiang X, Hua J, Bostwick JS, et al. Platelet aggregometry and receptor binding to predict the magnitude of antithrombotic and bleeding time effects of clopidogrel in rabbits. *J Cardiovasc Pharmacol.* 2007 May;49(5):316-24.

[36] Serebruany VL. The "clopidogrel resistance" trap. *The American journal of cardiology.* 2007 Sep 15;100(6):1044-6.

[37] Ho PM, Peterson ED, Wang L, Magid DJ, Fihn SD, Larsen GC, et al. Incidence of death and acute myocardial infarction associated with stopping clopidogrel after acute coronary syndrome. *Jama.* 2008 Feb 6;299(5):532-9.

[38] Heestermans AA, van Werkum JW, Taubert D, Seesing TH, von Beckerath N, Hackeng CM, et al. Impaired bioavailability of clopidogrel in patients with a ST-segment elevation myocardial infarction. *Thrombosis research.* 2008 Apr 30.

[39] Hechler B, Nonne C, Roh EJ, Cattaneo M, Cazenave JP, Lanza F, et al. MRS2500 [2-iodo-N6-methyl-(N)-methanocarba-2'-deoxyadenosine-3',5'-bisphosphate], a potent, selective, and stable antagonist of the platelet P2Y1 receptor with strong antithrombotic activity in mice. *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics.* 2006 Feb;316(2):556-63.

[40] Braun OO, Amisten S, Wihlborg AK, Hunting K, Nilsson D, Erlinge D. Residual platelet ADP reactivity after clopidogrel treatment is dependent on activation of both the unblocked P2Y(1) and the P2Y (12) receptor and is correlated with protein expression of P2Y (12). *Purinergic signalling.* 2007 Jun;3(3):195-201.

[41] Gachet C. P2 receptors, platelet function and pharmacological implications. *Thromb Haemost.* 2008 Mar;99(3):466-72.

[42] Dale GL, Friese P, Batar P, Hamilton SF, Reed GL, Jackson KW, et al. Stimulated platelets use serotonin to enhance their retention of procoagulant proteins on the cell surface. *Nature.* 2002 Jan 10;415(6868):175-9.

[43] Alberio L, Safa O, Clemetson KJ, Esmon CT, Dale GL. Surface expression and functional characterization of alpha-granule factor V in human platelets: effects of ionophore A23187, thrombin, collagen, and convulxin. *Blood.* 2000 Mar 1;95(5):1694-702.

[44] Kempton CL, Hoffman M, Roberts HR, Monroe DM. Platelet heterogeneity: variation in coagulation complexes on platelet subpopulations. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology.* 2005 Apr;25(4):861-6.

- [45] Szasz R, Dale GL. Thrombospondin and fibrinogen bind serotonin-derivatized proteins on COAT-platelets. *Blood*. 2002 Oct 15;100(8):2827-31.
- [46] Prodan CI, Joseph PM, Vincent AS, Dale GL. Coated-platelet levels are influenced by smoking, aspirin, and selective serotonin reuptake inhibitors. *J Thromb Haemost*. 2007 Oct;5(10):2149-51.
- [47] Maroney SA, Haberichter SL, Friese P, Collins ML, Ferrel JP, Dale GL, et al. Active tissue factor pathway inhibitor is expressed on the surface of coated platelets. *Blood*. 2007 Mar 1;109(5):1931-7.
- [48] Prodan CI, Ross ED, Vincent AS, Dale GL. Coated-platelets correlate with disease progression in Alzheimer disease. *Journal of neurology*. 2007 Apr;254(4):548-9.
- [49] Prodan CI, Szasz R, Vincent AS, Ross ED, Dale GL. Coated-platelets retain amyloid precursor protein on their surface. *Platelets*. 2006 Feb;17(1):56-60.
- [50] Albrecht C, McVey JH, Elliott JI, Sardini A, Kasza I, Mumford AD, et al. A novel missense mutation in ABCA1 results in altered protein trafficking and reduced phosphatidylserine translocation in a patient with Scott syndrome. *Blood*. 2005 Jul 15;106(2):542-9.
- [51] Daleke DL. Regulation of phospholipid asymmetry in the erythrocyte membrane. *Curr Opin Hematol*. 2008 May;15(3):191-5.
- [52] Brooks MB, Catalfamo JL, Friese P, Dale GL. Scott syndrome dogs have impaired coated-platelet formation and calcein-release but normal mitochondrial depolarization. *J Thromb Haemost*. 2007 Sep;5(9):1972-4.
- [53] Hamilton SF, Miller MW, Thompson CA, Dale GL. Glycoprotein IIb/IIIa inhibitors increase COAT-platelet production in vitro. *The Journal of laboratory and clinical medicine*. 2004 May;143(5):320-6.
- [54] Kukull WA, Hinds TR, Schellenberg GD, van Belle G, Larson EB. Increased platelet membrane fluidity as a diagnostic marker for Alzheimer's disease: a test in population-based cases and controls. *Neurology*. 1992 Mar;42(3 Pt 1):607-14.
- [55] Zubenko GS, Teply I, Winwood E, Huff FJ, Moossy J, Sunderland T, et al. Prospective study of increased platelet membrane fluidity as a risk factor for Alzheimer's disease: results at 5 years. *The American journal of psychiatry*. 1996 Mar;153(3):420-3.
- [56] Ortiz GG, Pacheco-Moises F, El Hafidi M, Jimenez-Delgado A, Macias-Islas MA, Corral SA, et al. Detection of membrane fluidity in submitochondrial particles of platelets and erythrocyte membranes from Mexican patients with Alzheimer disease by intramolecular excimer formation of 1,3 dipiryrenylpropane. *Disease markers*. 2008;24(3):151-6.

- [57] Zubenko GS, Kopp U, Seto T, Firestone LL. Platelet membrane fluidity individuals at risk for Alzheimer's disease: a comparison of results from fluorescence spectroscopy and electron spin resonance spectroscopy. *Psychopharmacology*. 1999 Jul;145(2):175-80.
- [58] Kulkarni S, Jackson SP. Platelet factor XIII and calpain negatively regulate integrin  $\alpha$ IIb $\beta$ 3 adhesive function and thrombus growth. *J Biol Chem*. 2004 Jul 16;279(29):30697-706.
- [59] Leroyer AS, Tedgui A, Boulanger CM. Role of microparticles in atherothrombosis. *Journal of internal medicine*. 2008 May;263(5):528-37.
- [60] Garcia BA, Smalley DM, Cho H, Shabanowitz J, Ley K, Hunt DF. The platelet microparticle proteome. *Journal of proteome research*. 2005 Sep-Oct;4(5):1516-21.
- [61] Del Conde I, Shrimpton CN, Thiagarajan P, Lopez JA. Tissue-factor-bearing microvesicles arise from lipid rafts and fuse with activated platelets to initiate coagulation. *Blood*. 2005 Sep 1;106(5):1604-11.
- [62] Dopheide SM, Maxwell MJ, Jackson SP. Shear-dependent tether formation during platelet translocation on von Willebrand factor. *Blood*. 2002 Jan 1;99(1):159-67.
- [63] Reininger AJ, Heijnen HF, Schumann H, Specht HM, Schramm W, Ruggeri ZM. Mechanism of platelet adhesion to von Willebrand factor and microparticle formation under high shear stress. *Blood*. 2006 May 1;107(9):3537-45.
- [64] Jy W, Horstman LL, Jimenez JJ, Ahn YS, Biro E, Nieuwland R, et al. Measuring circulating cell-derived microparticles. *J Thromb Haemost*. 2004 Oct;2(10):1842-51.
- [65] Singer SJ, Nicolson GL. The fluid mosaic model of the structure of cell membranes. *Science*. 1972 Feb 18;175(23):720-31.
- [66] Muller DJ, Wu N, Palczewski K. Vertebrate membrane proteins: structure, function, and insights from biophysical approaches. *Pharmacological reviews*. 2008 Mar;60(1):43-78.
- [67] Kusumi A, Sako Y. Cell surface organization by the membrane skeleton. *Curr Opin Cell Biol*. 1996 Aug;8(4):566-74.
- [68] Kusumi A, Sako Y, Yamamoto M. Confined lateral diffusion of membrane receptors as studied by single particle tracking (nanovid microscopy). Effects of calcium-induced differentiation in cultured epithelial cells. *Biophys J*. 1993 Nov;65(5):2021-40.
- [69] Daleke DL. Phospholipid flippases. *J Biol Chem*. 2007 Jan 12;282(2):821-5.

- [70] Hanshaw RG, Smith BD. New reagents for phosphatidylserine recognition and detection of apoptosis. *Bioorganic & medicinal chemistry*. 2005 Sep 1;13(17):5035-42.
- [71] Lange Y, Ye J, Rigney M, Steck TL. Regulation of endoplasmic reticulum cholesterol by plasma membrane cholesterol. *J Lipid Res*. 1999 Dec;40(12):2264-70.
- [72] Ikonen E. Cellular cholesterol trafficking and compartmentalization. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2008 Feb;9(2):125-38.
- [73] Wilson-Ashworth HA, Bahm Q, Erickson J, Shinkle A, Vu MP, Woodbury D, et al. Differential detection of phospholipid fluidity, order, and spacing by fluorescence spectroscopy of bis-pyrene, prodan, nystatin, and merocyanine 540. *Biophys J*. 2006 Dec 1;91(11):4091-101.
- [74] van Meer G, Simons K. Lipid polarity and sorting in epithelial cells. *J Cell Biochem*. 1988 Jan;36(1):51-8.
- [75] Simons K, Ikonen E. Functional rafts in cell membranes. *Nature*. 1997 Jun 5;387(6633):569-72.
- [76] Pike LJ. Rafts defined: a report on the Keystone Symposium on Lipid Rafts and Cell Function. *J Lipid Res*. 2006 Jul;47(7):1597-8.
- [77] Brown DA. Lipid rafts, detergent-resistant membranes, and raft targeting signals. *Physiology (Bethesda)*. 2006 Dec;21:430-9.
- [78] Hancock JF. Lipid rafts: contentious only from simplistic standpoints. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2006 Jun;7(6):456-62.
- [79] Jacobson K, Mouritsen OG, Anderson RG. Lipid rafts: at a crossroad between cell biology and physics. *Nat Cell Biol*. 2007 Jan;9(1):7-14.
- [80] Shaw AS. Lipid rafts: now you see them, now you don't. *Nat Immunol*. 2006 Nov;7(11):1139-42.
- [81] Ramstedt B, Slotte JP. Sphingolipids and the formation of sterol-enriched ordered membrane domains. *Biochim Biophys Acta*. 2006 Dec;1758(12):1945-56.
- [82] Lagerholm BC, Weinreb GE, Jacobson K, Thompson NL. Detecting microdomains in intact cell membranes. *Annu Rev Phys Chem*. 2005;56:309-36.
- [83] Owen DM, Neil MA, French PM, Magee AI. Optical techniques for imaging membrane lipid microdomains in living cells. *Seminars in cell & developmental biology*. 2007 Oct;18(5):591-8.
- [84] Pike LJ. Lipid rafts: bringing order to chaos. *J Lipid Res*. 2003 Apr;44(4):655-67.

- [85] Bodin S, Viala C, Ragab A, Payrastre B. A critical role of lipid rafts in the organization of a key Fc $\gamma$ R2a-mediated signaling pathway in human platelets. *Thromb Haemost.* 2003 Feb;89(2):318-30.
- [86] Maguy A, Hebert TE, Nattel S. Involvement of lipid rafts and caveolae in cardiac ion channel function. *Cardiovasc Res.* 2006 Mar 1;69(4):798-807.
- [87] Foster LJ, De Hoog CL, Mann M. Unbiased quantitative proteomics of lipid rafts reveals high specificity for signaling factors. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2003 May 13;100(10):5813-8.
- [88] Nebl T, Pestonjamas KN, Leszyk JD, Crowley JL, Oh SW, Luna EJ. Proteomic analysis of a detergent-resistant membrane skeleton from neutrophil plasma membranes. *J Biol Chem.* 2002 Nov 8;277(45):43399-409.
- [89] Gratton JP, Bernatchez P, Sessa WC. Caveolae and caveolins in the cardiovascular system. *Circ Res.* 2004 Jun 11;94(11):1408-17.
- [90] Lichtenberg D, Goni FM, Heerklotz H. Detergent-resistant membranes should not be identified with membrane rafts. *Trends Biochem Sci.* 2005 Aug;30(8):430-6.
- [91] McIntosh TJ, Vidal A, Simon SA. Sorting of lipids and transmembrane peptides between detergent-soluble bilayers and detergent-resistant rafts. *Biophys J.* 2003 Sep;85(3):1656-66.
- [92] Schuck S, Honsho M, Ekroos K, Shevchenko A, Simons K. Resistance of cell membranes to different detergents. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2003 May 13;100(10):5795-800.
- [93] Shogomori H, Brown DA. Use of detergents to study membrane rafts: the good, the bad, and the ugly. *Biol Chem.* 2003 Sep;384(9):1259-63.
- [94] Lingwood D, Simons K. Detergent resistance as a tool in membrane research. *Nature protocols.* 2007;2(9):2159-65.
- [95] Pike LJ. Lipid rafts: heterogeneity on the high seas. *Biochem J.* 2004 Mar 1;378(Pt 2):281-92.
- [96] Wolf Z, Orso E, Werner T, Boettcher A, Schmitz G. A flow cytometric screening test for detergent-resistant surface antigens in monocytes. *Cytometry A.* 2006 Mar;69(3):192-5.
- [97] Kiss E, Nagy P, Balogh A, Szollosi J, Matko J. Cytometry of raft and caveola membrane microdomains: from flow and imaging techniques to high throughput screening assays. *Cytometry A.* 2008 Jul;73(7):599-614.

- [98] Sprenger RR, Horrevoets AJ. The ins and outs of lipid domain proteomics. *Proteomics*. 2007 Aug;7(16):2895-903.
- [99] Macdonald JL, Pike LJ. A simplified method for the preparation of detergent-free lipid rafts. *J Lipid Res*. 2005 May;46(5):1061-7.
- [100] Gallegos AM, Storey SM, Kier AB, Schroeder F, Ball JM. Structure and cholesterol dynamics of caveolae/raft and nonraft plasma membrane domains. *Biochemistry*. 2006 Oct 3;45(39):12100-16.
- [101] Rothblat GH, de la Llera-Moya M, Atger V, Kellner-Weibel G, Williams DL, Phillips MC. Cell cholesterol efflux: integration of old and new observations provides new insights. *J Lipid Res*. 1999 May;40(5):781-96.
- [102] Zidovetzki R, Levitan I. Use of cyclodextrins to manipulate plasma membrane cholesterol content: evidence, misconceptions and control strategies. *Biochim Biophys Acta*. 2007 Jun;1768(6):1311-24.
- [103] Kwik J, Boyle S, Fooksman D, Margolis L, Sheetz MP, Edidin M. Membrane cholesterol, lateral mobility, and the phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate-dependent organization of cell actin. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2003 Nov 25;100(24):13964-9.
- [104] Subtil A, Gaidarov I, Kobylarz K, Lampson MA, Keen JH, McGraw TE. Acute cholesterol depletion inhibits clathrin-coated pit budding. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1999 Jun 8;96(12):6775-80.
- [105] Goodwin JS, Drake KR, Remmert CL, Kenworthy AK. Ras diffusion is sensitive to plasma membrane viscosity. *Biophys J*. 2005 Aug;89(2):1398-410.
- [106] Mahammad S, Parmryd I. Cholesterol homeostasis in T cells. Methyl-beta-cyclodextrin treatment results in equal loss of cholesterol from Triton X-100 soluble and insoluble fractions. *Biochim Biophys Acta*. 2008 May;1778(5):1251-8.
- [107] Coccia R, Spadaccio C, Foppoli C, Perluigi M, Covino E, Lusini M, et al. The effect of simvastatin on erythrocyte membrane fluidity during oxidative stress induced by cardiopulmonary bypass: a randomized controlled study. *Clinical therapeutics*. 2007 Aug;29(8):1706-17.
- [108] Shvartsman DE, Gutman O, Tietz A, Henis YI. Cyclodextrins but not compactin inhibit the lateral diffusion of membrane proteins independent of cholesterol. *Traffic*. 2006 Jul;7(7):917-26.
- [109] Pike LJ. Growth factor receptors, lipid rafts and caveolae: an evolving story. *Biochim Biophys Acta*. 2005 Dec 30;1746(3):260-73.
- [110] Landmann L, Marbet P. Colocalization analysis yields superior results after image restoration. *Microscopy research and technique*. 2004 Jun 1;64(2):103-12.

- [111] Kim HM, Jeong BH, Hyon JY, An MJ, Seo MS, Hong JH, et al. Two-Photon Fluorescent Turn-On Probe for Lipid Rafts in Live Cell and Tissue. *Journal of the American Chemical Society*. 2008 Mar 11.
- [112] Jin L, Millard AC, Wuskell JP, Clark HA, Loew LM. Cholesterol-enriched lipid domains can be visualized by di-4-ANEPPDHQ with linear and nonlinear optics. *Biophys J*. 2005 Jul;89(1):L04-6.
- [113] Jin L, Millard AC, Wuskell JP, Dong X, Wu D, Clark HA, et al. Characterization and application of a new optical probe for membrane lipid domains. *Biophys J*. 2006 Apr 1;90(7):2563-75.
- [114] Harris FM, Best KB, Bell JD. Use of laurdan fluorescence intensity and polarization to distinguish between changes in membrane fluidity and phospholipid order. *Biochim Biophys Acta*. 2002 Sep 20;1565(1):123-8.
- [115] Parasassi T, Di Stefano M, Loiero M, Ravagnan G, Gratton E. Cholesterol modifies water concentration and dynamics in phospholipid bilayers: a fluorescence study using Laurdan probe. *Biophys J*. 1994 Mar;66(3 Pt 1):763-8.
- [116] Campagnola PJ, Loew LM. Second-harmonic imaging microscopy for visualizing biomolecular arrays in cells, tissues and organisms. *Nature biotechnology*. 2003 Nov;21(11):1356-60.
- [117] Ritchie K, Kusumi A. Role of the membrane skeleton in creation of microdomains. *Subcell Biochem*. 2004;37:233-45.
- [118] McIntosh AL, Atshaves BP, Huang H, Gallegos AM, Kier AB, Schroeder F, et al. Multiphoton laser-scanning microscopy and spatial analysis of dehydroergosterol distributions on plasma membrane of living cells. *Methods in molecular biology* (Clifton, NJ. 2007;398:85-105.
- [119] Wustner D. Fluorescent sterols as tools in membrane biophysics and cell biology. *Chem Phys Lipids*. 2007 Mar;146(1):1-25.
- [120] Kenworthy AK, Nichols BJ, Remmert CL, Hendrix GM, Kumar M, Zimmerberg J, et al. Dynamics of putative raft-associated proteins at the cell surface. *J Cell Biol*. 2004 Jun 7;165(5):735-46.
- [121] Waheed AA, Shimada Y, Heijnen HF, Nakamura M, Inomata M, Hayashi M, et al. Selective binding of perfringolysin O derivative to cholesterol-rich membrane microdomains (rafts). *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2001 Apr 24;98(9):4926-31.
- [122] van Lier M, Lee F, Farndale RW, Gorter G, Verhoef S, Ohno-Iwashita Y, et al. Adhesive surface determines raft composition in platelets adhered under flow. *J Thromb Haemost*. 2005 Nov;3(11):2514-25.

- [123] Shynkar VV, Klymchenko AS, Kunzelmann C, Duportail G, Muller CD, Demchenko AP, et al. Fluorescent biomembrane probe for ratiometric detection of apoptosis. *Journal of the American Chemical Society*. 2007 Feb 21;129(7):2187-93.
- [124] Waczulikova I, Rozalski M, Rievaj J, Nagyova K, Bryszewska M, Watala C. Phosphatidylserine content is a more important contributor than transmembrane potential to interactions of merocyanine 540 with lipid bilayers. *Biochim Biophys Acta*. 2002 Dec 23;1567(1-2):176-82.
- [125] Koulov AV, Stucker KA, Lakshmi C, Robinson JP, Smith BD. Detection of apoptotic cells using a synthetic fluorescent sensor for membrane surfaces that contain phosphatidylserine. *Cell death and differentiation*. 2003 Dec;10(12):1357-9.
- [126] Shaw JE, Epand RF, Epand RM, Li Z, Bittman R, Yip CM. Correlated fluorescence-atomic force microscopy of membrane domains: structure of fluorescence probes determines lipid localization. *Biophys J*. 2006 Mar 15;90(6):2170-8.
- [127] Landry YD, Denis M, Nandi S, Bell S, Vaughan AM, Zha X. ATP-binding cassette transporter A1 expression disrupts raft membrane microdomains through its ATPase-related functions. *J Biol Chem*. 2006 Nov 24;281(47):36091-101.
- [128] Hebbar S, Lee E, Manna M, Steinert S, Kumar GS, Wenk M, et al. A fluorescent sphingolipid binding domain peptide probe interacts with sphingolipids and cholesterol-dependent raft domains. *J Lipid Res*. 2008 Feb 8.
- [129] Biro A, Cervenak L, Balogh A, Lorincz A, Uray K, Horvath A, et al. Novel anti-cholesterol monoclonal immunoglobulin G antibodies as probes and potential modulators of membrane raft-dependent immune functions. *J Lipid Res*. 2007 Jan;48(1):19-29.
- [130] Benderitter M, Vincent-Genod L, Berroud A, Voisin P. Simultaneous analysis of radio-induced membrane alteration and cell viability by flow cytometry. *Cytometry*. 2000 Feb 1;39(2):151-7.
- [131] Lapaque N, Forquet F, de Chastellier C, Mishal Z, Jolly G, Moreno E, et al. Characterization of *Brucella abortus* lipopolysaccharide macrodomains as mega rafts. *Cellular microbiology*. 2006 Feb;8(2):197-206.
- [132] Dietrich C, Bagatolli LA, Volovyk ZN, Thompson NL, Levi M, Jacobson K, et al. Lipid rafts reconstituted in model membranes. *Biophys J*. 2001 Mar;80(3):1417-28.
- [133] Gaus K, Zech T, Harder T. Visualizing membrane microdomains by Laurdan 2-photon microscopy. *Mol Membr Biol*. 2006 Jan-Feb;23(1):41-8.

- [134] Poole K, Meder D, Simons K, Muller D. The effect of raft lipid depletion on microvilli formation in MDCK cells, visualized by atomic force microscopy. *FEBS letters*. 2004 May 7;565(1-3):53-8.
- [135] de Almeida RF, Loura LM, Fedorov A, Prieto M. Lipid rafts have different sizes depending on membrane composition: a time-resolved fluorescence resonance energy transfer study. *Journal of molecular biology*. 2005 Mar 4;346(4):1109-20.
- [136] London E. Insights into lipid raft structure and formation from experiments in model membranes. *Current opinion in structural biology*. 2002 Aug;12(4):480-6.
- [137] Ahmed SN, Brown DA, London E. On the origin of sphingolipid/cholesterol-rich detergent-insoluble cell membranes: physiological concentrations of cholesterol and sphingolipid induce formation of a detergent-insoluble, liquid-ordered lipid phase in model membranes. *Biochemistry*. 1997 Sep 9;36(36):10944-53.
- [138] Shaikh SR, Edidin MA. Membranes are not just rafts. *Chem Phys Lipids*. 2006 Oct;144(1):1-3.
- [139] Hammond AT, Heberle FA, Baumgart T, Holowka D, Baird B, Feigenson GW. Crosslinking a lipid raft component triggers liquid ordered-liquid disordered phase separation in model plasma membranes. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2005 May 3;102(18):6320-5.
- [140] Kusumi A, Koyama-Honda I, Suzuki K. Molecular dynamics and interactions for creation of stimulation-induced stabilized rafts from small unstable steady-state rafts. *Traffic*. 2004 Apr;5(4):213-30.
- [141] Anderson RG, Jacobson K. A role for lipid shells in targeting proteins to caveolae, rafts, and other lipid domains. *Science*. 2002 Jun 7;296(5574):1821-5.
- [142] Maxfield FR. Plasma membrane microdomains. *Curr Opin Cell Biol*. 2002 Aug;14(4):483-7.
- [143] Dietrich C, Yang B, Fujiwara T, Kusumi A, Jacobson K. Relationship of lipid rafts to transient confinement zones detected by single particle tracking. *Biophys J*. 2002 Jan;82(1 Pt 1):274-84.
- [144] Hac AE, Seeger HM, Fidorra M, Heimburg T. Diffusion in two-component lipid membranes--a fluorescence correlation spectroscopy and monte carlo simulation study. *Biophys J*. 2005 Jan;88(1):317-33.
- [145] Nicolau Jr DV, Hancock JF, Burrage K. Sources of Anomalous Diffusion on Cell Membranes: A Monte Carlo Study. *Biophys J*. 2006 Dec 22.

- [146] Bae JS, Yang L, Rezaie AR. Lipid raft localization regulates the cleavage specificity of protease activated receptor 1 in endothelial cells. *J Thromb Haemost.* 2008 Feb 12.
- [147] Bae J-S, Yang L, Rezaie AR. Receptors of the protein C activation and activated protein C signaling pathways are colocalized in lipid rafts of endothelial cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences.* 2007 February 20, 2007;104(8):2867-72.
- [148] Carlile-Klusacek M, Rizzo V. Endothelial cytoskeletal reorganization in response to PAR1 stimulation is mediated by membrane rafts but not caveolae. *American journal of physiology.* 2007 Jul;293(1):H366-75.
- [149] Quinton TM, Kim S, Jin J, Kunapuli SP. Lipid rafts are required in Galpha(i) signaling downstream of the P2Y12 receptor during ADP-mediated platelet activation. *J Thromb Haemost.* 2005 May;3(5):1036-41.
- [150] Vial C, Fung CY, Goodall AH, Mahaut-Smith MP, Evans RJ. Differential sensitivity of human platelet P2X1 and P2Y1 receptors to disruption of lipid rafts. *Biochemical and biophysical research communications.* 2006 May 5;343(2):415-9.
- [151] Farndale RW, Slatter DA, Siljander PR, Jarvis GE. Platelet receptor recognition and cross-talk in collagen-induced activation of platelets. *J Thromb Haemost.* 2007 Jul;5 Suppl 1:220-9.
- [152] Locke D, Chen H, Liu Y, Liu C, Kahn ML. Lipid rafts orchestrate signaling by the platelet receptor glycoprotein VI. *J Biol Chem.* 2002 May 24;277(21):18801-9.
- [153] Quinter PG, Dangelmaier CA, Quinton TM, Kunapuli SP, Daniel JL. Glycoprotein VI agonists have distinct dependences on the lipid raft environment. *J Thromb Haemost.* 2007 Feb;5(2):362-8.
- [154] Shrimpton CN, Borthakur G, Larrucea S, Cruz MA, Dong JF, Lopez JA. Localization of the adhesion receptor glycoprotein Ib-IX-V complex to lipid rafts is required for platelet adhesion and activation. *J Exp Med.* 2002 Oct 21;196(8):1057-66.
- [155] Gousset K, Tsvetkova NM, Crowe JH, Tablin F. Important role of raft aggregation in the signaling events of cold-induced platelet activation. *Biochim Biophys Acta.* 2004 Jan 28;1660(1-2):7-15.
- [156] Gousset K, Wolkers WF, Tsvetkova NM, Oliver AE, Field CL, Walker NJ, et al. Evidence for a physiological role for membrane rafts in human platelets. *Journal of cellular physiology.* 2002 Jan;190(1):117-28.
- [157] Norambuena A, Poblete MI, Donoso MV, Espinoza CS, Gonzalez A, Huidobro-Toro JP. P2y1 Receptor Activation Elicits Its Partition out of Membrane Rafts and Its

Rapid Internalization from Human Blood Vessels: Implications for Receptor Signaling. *Molecular pharmacology*. 2008 Sep 17.

[158] Ezumi Y, Kodama K, Uchiyama T, Takayama H. Constitutive and functional association of the platelet collagen receptor glycoprotein VI-Fc receptor gamma-chain complex with membrane rafts. *Blood*. 2002 May 1;99(9):3250-5.

[159] Wonerow P, Obergfell A, Wilde JI, Bobe R, Asazuma N, Brdicka T, et al. Differential role of glycolipid-enriched membrane domains in glycoprotein VI- and integrin-mediated phospholipase Cgamma2 regulation in platelets. *Biochem J*. 2002 Jun 15;364(Pt 3):755-65.

[160] Canobbio I, Stefanini L, Guidetti GF, Balduini C, Torti M. A new role for FcgammaRIIA in the potentiation of human platelet activation induced by weak stimulation. *Cell Signal*. 2006 Jun;18(6):861-70.

[161] Lutgens E, Lievens D, Beckers L, Donners M, Daemen M. CD40 and its ligand in atherosclerosis. *Trends Cardiovasc Med*. 2007 May;17(4):118-23.

[162] Rebres RA, Green JM, Reinhold MI, Ticchioni M, Brown EJ. Membrane raft association of CD47 is necessary for actin polymerization and protein kinase C theta translocation in its synergistic activation of T cells. *J Biol Chem*. 2001 Mar 9;276(10):7672-80.

[163] Frelinger AL, 3rd, Michelson AD. Clopidogrel linking evaluation of platelet response variability to mechanism of action. *Journal of the American College of Cardiology*. 2005 Aug 16;46(4):646-7.

[164] Zwaginga JJ, Nash G, King MR, Heemskerk JW, Frojmovic M, Hoylaerts MF, et al. Flow-based assays for global assessment of hemostasis. Part 1: Biorheologic considerations. *J Thromb Haemost*. 2006 Nov;4(11):2486-7.

[165] Bodin S, Tronchere H, Payrastra B. Lipid rafts are critical membrane domains in blood platelet activation processes. *Biochim Biophys Acta*. 2003 Mar 10;1610(2):247-57.

[166] Gombos I, Steinbach G, Pomozi I, Balogh A, Vamosi G, Gansen A, et al. Some new faces of membrane microdomains: a complex confocal fluorescence, differential polarization, and FCS imaging study on live immune cells. *Cytometry A*. 2008 Mar;73(3):220-9.

[167] Grgurevich S, Krishnan R, White MM, Jennings LK. Role of in vitro cholesterol depletion in mediating human platelet aggregation. *J Thromb Haemost*. 2003 Mar;1(3):576-86.

[168] Frojmovic M, Labarthe B, Legrand C. Inhibition and reversal of platelet aggregation by alphaIIb beta3 antagonists depends on the anticoagulant and flow

conditions: differential effects of Abciximab and Lamifiban. *British journal of haematology*. 2005 Nov;131(3):348-55.

[169] Chichili GR, Rodgers W. Clustering of membrane raft proteins by the actin cytoskeleton. *J Biol Chem*. 2007 Dec 14;282(50):36682-91.

[170] Mishra S, Joshi PG. Lipid raft heterogeneity: an enigma. *Journal of neurochemistry*. 2007 Nov;103 Suppl 1:135-42.

[171] Roche Y, Gerbeau-Pissot P, Buhot B, Thomas D, Bonneau L, Gresti J, et al. Depletion of phytosterols from the plant plasma membrane provides evidence for disruption of lipid rafts. *Faseb J*. 2008 Aug 1.

[172] Robinson JP. Multispectral Cytometry: The Next Generation. *Biophotonics International*. 2004:36-40.

[173] Goddard G, Martin JC, Naivar M, Goodwin PM, Graves SW, Habbersett R, et al. Single particle high resolution spectral analysis flow cytometry. *Cytometry A*. 2006 Aug 1;69(8):842-51.

[174] Srivastava K, Dash D. Altered membrane fluidity and signal transduction in the platelets from patients of thrombotic stroke. *Molecular and cellular biochemistry*. 2001 Aug;224(1-2):143-9.

[175] Feijge MA, Heemskerk JW, Hornstra G. Membrane fluidity of non-activated and activated human blood platelets. *Biochim Biophys Acta*. 1990 Jun 27;1025(2):173-8.

[176] Nanetti L, Vignini A, Raffaelli F, Moroni C, Silvestrini M, Provinciali L, et al. Platelet membrane fluidity and Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup> ATPase activity in acute stroke. *Brain research*. 2008 Apr 18;1205:21-6.

[177] McCarthy DA, Macey MG, Allen PD. A simple, novel, procedure for monitoring membrane scrambling and permeability in microparticles, platelets, and leukocytes in whole blood samples. *Experimental hematology*. 2008 Aug;36(8):909-21.

[178] Harder T, Rentero C, Zech T, Gaus K. Plasma membrane segregation during T cell activation: probing the order of domains. *Curr Opin Immunol*. 2007 Aug;19(4):470-5.

[179] Slotte JP, Bierman EL. Depletion of plasma-membrane sphingomyelin rapidly alters the distribution of cholesterol between plasma membranes and intracellular cholesterol pools in cultured fibroblasts. *Biochem J*. 1988 Mar 15;250(3):653-8.

[180] Christov A, Kostuk WJ, Jablonsky G, Lucas A. Fluorescence spectroscopic analysis of circulating platelet activation during coronary angioplasty. *Lasers in surgery and medicine*. 2001;28(5):414-26.

- [181] Best KB, Ohran AJ, Hawes AC, Hazlett TL, Gratton E, Judd AM, et al. Relationship between erythrocyte membrane phase properties and susceptibility to secretory phospholipase A2. *Biochemistry*. 2002 Nov 26;41(47):13982-8.
- [182] Vest RS, Gonzales LJ, Permann SA, Spencer E, Hansen LD, Judd AM, et al. Divalent cations increase lipid order in erythrocytes and susceptibility to secretory phospholipase A2. *Biophys J*. 2004 Apr;86(4):2251-60.
- [183] Sheu JR, Hsiao G, Shen MY, Fong TH, Chen YW, Lin CH, et al. Mechanisms involved in the antiplatelet activity of magnesium in human platelets. *British journal of haematology*. 2002 Dec;119(4):1033-41.
- [184] Calabro P, Yeh ET. The pleiotropic effects of statins. *Current opinion in cardiology*. 2005 Nov;20(6):541-6.
- [185] Huhle G, Abletshauser C, Mayer N, Weidinger G, Harenberg J, Heene DL. Reduction of platelet activity markers in type II hypercholesterolemic patients by a HMG-CoA-reductase inhibitor. *Thrombosis research*. 1999 Sep 1;95(5):229-34.
- [186] Labios M, Martinez M, Gabriel F, Guiral V, Martinez E, Aznar J. Effect of atorvastatin upon platelet activation in hypercholesterolemia, evaluated by flow cytometry. *Thrombosis research*. 2005;115(4):263-70.
- [187] Osamah H, Mira R, Sorina S, Shlomo K, Michael A. Reduced platelet aggregation after fluvastatin therapy is associated with altered platelet lipid composition and drug binding to the platelets. *British journal of clinical pharmacology*. 1997 Jul;44(1):77-83.
- [188] Hochgraf E, Levy Y, Aviram M, Brook JG, Cogan U. Lovastatin decreases plasma and platelet cholesterol levels and normalizes elevated platelet fluidity and aggregation in hypercholesterolemic patients. *Metabolism: clinical and experimental*. 1994 Jan;43(1):11-7.
- [189] Levy Y, Leibowitz R, Aviram M, Brook JG, Cogan U. Reduction of plasma cholesterol by lovastatin normalizes erythrocyte membrane fluidity in patients with severe hypercholesterolaemia. *British journal of clinical pharmacology*. 1992 Nov;34(5):427-30.
- [190] Malle E, Sattler W, Prenner E, Leis HJ, Karadi I, Knipping G, et al. Platelet membrane fluidity in type IIA, type IIB and type IV hyperlipoproteinemia. *Atherosclerosis*. 1991 Apr;87(2-3):159-67.
- [191] Muller S, Ziegler O, Donner M, Drouin P, Stoltz JF. Rheological properties and membrane fluidity of red blood cells and platelets in primary hyperlipoproteinemia. *Atherosclerosis*. 1990 Aug;83(2-3):231-7.

- [192] Gilch S, Kehler C, Schatzl HM. The prion protein requires cholesterol for cell surface localization. *Molecular and cellular neurosciences*. 2006 Feb;31(2):346-53.
- [193] Pediconi MF, Gallegos CE, De Los Santos EB, Barrantes FJ. Metabolic cholesterol depletion hinders cell-surface trafficking of the nicotinic acetylcholine receptor. *Neuroscience*. 2004;128(2):239-49.
- [194] IMSHealth. Top 10 Global Products, 2007. 2008 [cited; Available from: [http://www.imshealth.com/deployedfiles/imshealth/Global/Content/StaticFile/Top\\_Line\\_Data/Top10GlobalProducts.pdf](http://www.imshealth.com/deployedfiles/imshealth/Global/Content/StaticFile/Top_Line_Data/Top10GlobalProducts.pdf)
- [195] Gurbel PA, Becker RC, Mann KG, Steinhubl SR, Michelson AD. Platelet function monitoring in patients with coronary artery disease. *Journal of the American College of Cardiology*. 2007 Nov 6;50(19):1822-34.
- [196] Husted S, Emanuelsson H, Heptinstall S, Sandset PM, Wickens M, Peters G. Pharmacodynamics, pharmacokinetics, and safety of the oral reversible P2Y12 antagonist AZD6140 with aspirin in patients with atherosclerosis: a double-blind comparison to clopidogrel with aspirin. *Eur Heart J*. 2006 May;27(9):1038-47.
- [197] Angiolillo DJ, Shoemaker SB, Desai B, Yuan H, Charlton RK, Bernardo E, et al. Randomized comparison of a high clopidogrel maintenance dose in patients with diabetes mellitus and coronary artery disease: results of the Optimizing Antiplatelet Therapy in Diabetes Mellitus (OPTIMUS) study. *Circulation*. 2007 Feb 13;115(6):708-16.
- [198] Gurbel PA, Bliden KP, Etherington A, Tantry US. Assessment of clopidogrel responsiveness: measurements of maximum platelet aggregation, final platelet aggregation and their correlation with vasodilator-stimulated phosphoprotein in resistant patients. *Thrombosis research*. 2007;121(1):107-15.
- [199] Cuisset T, Frere C, Quilici J, Morange PE, Nait-Saidi L, Mielot C, et al. High post-treatment platelet reactivity is associated with a high incidence of myonecrosis after stenting for non-ST elevation acute coronary syndromes. *Thromb Haemost*. 2007 Feb;97(2):282-7.
- [200] Anderson JL, Adams CD, Antman EM, Bridges CR, Califf RM, Casey DE, Jr., et al. ACC/AHA 2007 guidelines for the management of patients with unstable angina/non ST-elevation myocardial infarction: a report of the American College of Cardiology/American Heart Association Task Force on Practice Guidelines (Writing Committee to Revise the 2002 Guidelines for the Management of Patients With Unstable Angina/Non ST-Elevation Myocardial Infarction): developed in collaboration with the American College of Emergency Physicians, the Society for Cardiovascular Angiography and Interventions, and the Society of Thoracic Surgeons: endorsed by the American Association of Cardiovascular and Pulmonary Rehabilitation and the Society for Academic Emergency Medicine. *Circulation*. 2007 Aug 14;116(7):e148-304.

- [201] Remijn JA, Wu YP, Jeninga EH, MJ IJ, van Willigen G, de Groot PG, et al. Role of ADP receptor P2Y(12) in platelet adhesion and thrombus formation in flowing blood. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*. 2002 Apr 1;22(4):686-91.
- [202] Turner NA, Moake JL, McIntire LV. Blockade of adenosine diphosphate receptors P2Y(12) and P2Y(1) is required to inhibit platelet aggregation in whole blood under flow. *Blood*. 2001 Dec 1;98(12):3340-5.
- [203] Leon C, Ravanat C, Freund M, Cazenave JP, Gachet C. Differential involvement of the P2Y1 and P2Y12 receptors in platelet procoagulant activity. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*. 2003 Oct 1;23(10):1941-7.
- [204] Contreres JO, Dupuy E, Job B, Habib A, Bryckaert M, Rosa JP, et al. Effect of clopidogrel administration to healthy volunteers on platelet phosphorylation events triggered by ADP. *British journal of haematology*. 2003 Feb;120(4):633-42.
- [205] Andre P, LaRocca T, Delaney SM, Lin PH, Vincent D, Sinha U, et al. Anticoagulants (thrombin inhibitors) and aspirin synergize with P2Y12 receptor antagonism in thrombosis. *Circulation*. 2003 Nov 25;108(21):2697-703.
- [206] Lenain N, Freund M, Leon C, Cazenave JP, Gachet C. Inhibition of localized thrombosis in P2Y1-deficient mice and rodents treated with MRS2179, a P2Y1 receptor antagonist. *J Thromb Haemost*. 2003 Jun;1(6):1144-9.
- [207] Cattaneo M. Platelet P2 receptors: old and new targets for antithrombotic drugs. *Expert review of cardiovascular therapy*. 2007 Jan;5(1):45-55.
- [208] Saito T, Yokosuka T. Immunological synapse and microclusters: the site for recognition and activation of T cells. *Curr Opin Immunol*. 2006 Jun;18(3):305-13.
- [209] Lijnen P, Celis H, Fagard R, Staessen J, Amery A. Influence of cholesterol lowering on plasma membrane lipids and cationic transport systems. *Journal of hypertension*. 1994 Jan;12(1):59-64.
- [210] Mayor S, Viola A, Stan RV, del Pozo MA. Flying kites on slippery slopes at Keystone. *Symposium on Lipid Rafts and Cell Function. EMBO Rep*. 2006 Nov;7(11):1089-93.
- [211] Marguet D, Lenne PF, Rigneault H, He HT. Dynamics in the plasma membrane: how to combine fluidity and order. *Embo J*. 2006 Aug 9;25(15):3446-57.
- [212] Labarthe B, Maguy A, Bonnefoy A, Theroux P, inventors; Quantification of changes in the degree of order of cellular and viral membranes and applications to diagnosis treatment and drug screening. 2007.
- [213] Huppa JB, Davis MM. T-cell-antigen recognition and the immunological synapse. *Nat Rev Immunol*. 2003 Dec;3(12):973-83.

- [214] Douglass AD, Vale RD. Single-molecule microscopy reveals plasma membrane microdomains created by protein-protein networks that exclude or trap signaling molecules in T cells. *Cell*. 2005 Jun 17;121(6):937-50.
- [215] Norkin LC, Wolfrom SA, Stuart ES. Association of caveolin with *Chlamydia trachomatis* inclusions at early and late stages of infection. *Experimental cell research*. 2001 Jun 10;266(2):229-38.
- [216] Samuel BU, Mohandas N, Harrison T, McManus H, Rosse W, Reid M, et al. The role of cholesterol and glycosylphosphatidylinositol-anchored proteins of erythrocyte rafts in regulating raft protein content and malarial infection. *J Biol Chem*. 2001 Aug 3;276(31):29319-29.
- [217] Manes S, del Real G, Martinez AC. Pathogens: raft hijackers. *Nat Rev Immunol*. 2003 Jul;3(7):557-68.
- [218] Amer AO, Byrne BG, Swanson MS. Macrophages rapidly transfer pathogens from lipid raft vacuoles to autophagosomes. *Autophagy*. 2005 Apr;1(1):53-8.
- [219] Kowalski MP, Pier GB. Localization of cystic fibrosis transmembrane conductance regulator to lipid rafts of epithelial cells is required for *Pseudomonas aeruginosa*-induced cellular activation. *J Immunol*. 2004 Jan 1;172(1):418-25.
- [220] Shin DM, Yang CS, Lee JY, Lee SJ, Choi HH, Lee HM, et al. Mycobacterium tuberculosis lipoprotein-induced association of TLR2 with protein kinase C  $\xi$  in lipid rafts contributes to reactive oxygen species-dependent inflammatory signaling in macrophages. *Cellular microbiology*. 2008 May 22.
- [221] Gekara NO, Jacobs T, Chakraborty T, Weiss S. The cholesterol-dependent cytolysin listeriolysin O aggregates rafts via oligomerization. *Cellular microbiology*. 2005 Sep;7(9):1345-56.
- [222] Riethmuller J, Riehle A, Grassme H, Gulbins E. Membrane rafts in host-pathogen interactions. *Biochim Biophys Acta*. 2006 Dec;1758(12):2139-47.
- [223] Murphy SC, Hiller NL, Harrison T, Lomasney JW, Mohandas N, Haldar K. Lipid rafts and malaria parasite infection of erythrocytes. *Mol Membr Biol*. 2006 Jan-Feb;23(1):81-8.
- [224] Rajendran L, Schneider A, Schlechtingen G, Weidlich S, Ries J, Braxmeier T, et al. Efficient inhibition of the Alzheimer's disease beta-secretase by membrane targeting. *Science*. 2008 Apr 25;320(5875):520-3.
- [225] Llorente-Cortes V, Otero-Vinas M, Camino-Lopez S, Llampayas O, Badimon L. Aggregated low-density lipoprotein uptake induces membrane tissue factor procoagulant activity and microparticle release in human vascular smooth muscle cells. *Circulation*. 2004 Jul 27;110(4):452-9.

[226] Valgimigli M, Agnoletti L, Curello S, Comini L, Francolini G, Mastrorilli F, et al. Serum from patients with acute coronary syndromes displays a proapoptotic effect on human endothelial cells: a possible link to pan-coronary syndromes. *Circulation*. 2003 Jan 21;107(2):264-70.

[227] Jessel R, Haertel S, Socaciu C, Tykhonova S, Diehl HA. Kinetics of apoptotic markers in exogeneously induced apoptosis of EL4 cells. *Journal of cellular and molecular medicine*. 2002 Jan-Mar;6(1):82-92.

## **5. Annexes**

---

## **5.1. Annexe 1 : Résumé de la présentation du Dr Ange Maguy au congrès de la Biophysical Society 2-6 Février 2008, Long Beach CA**

---

**Title: Di-4-ANEPPDHQ as a new probe for lipid-rafts imaging in living cardiac cells.**

**Authors:** Ange MAGUY PhD, Philippe COMTOIS PhD, Louis Villeneuve Msc, Roxana ATANASIU PhD, Benoît LABARTHE PharmD, Alvin SHRIER PhD, Stanley NATTEL MD.

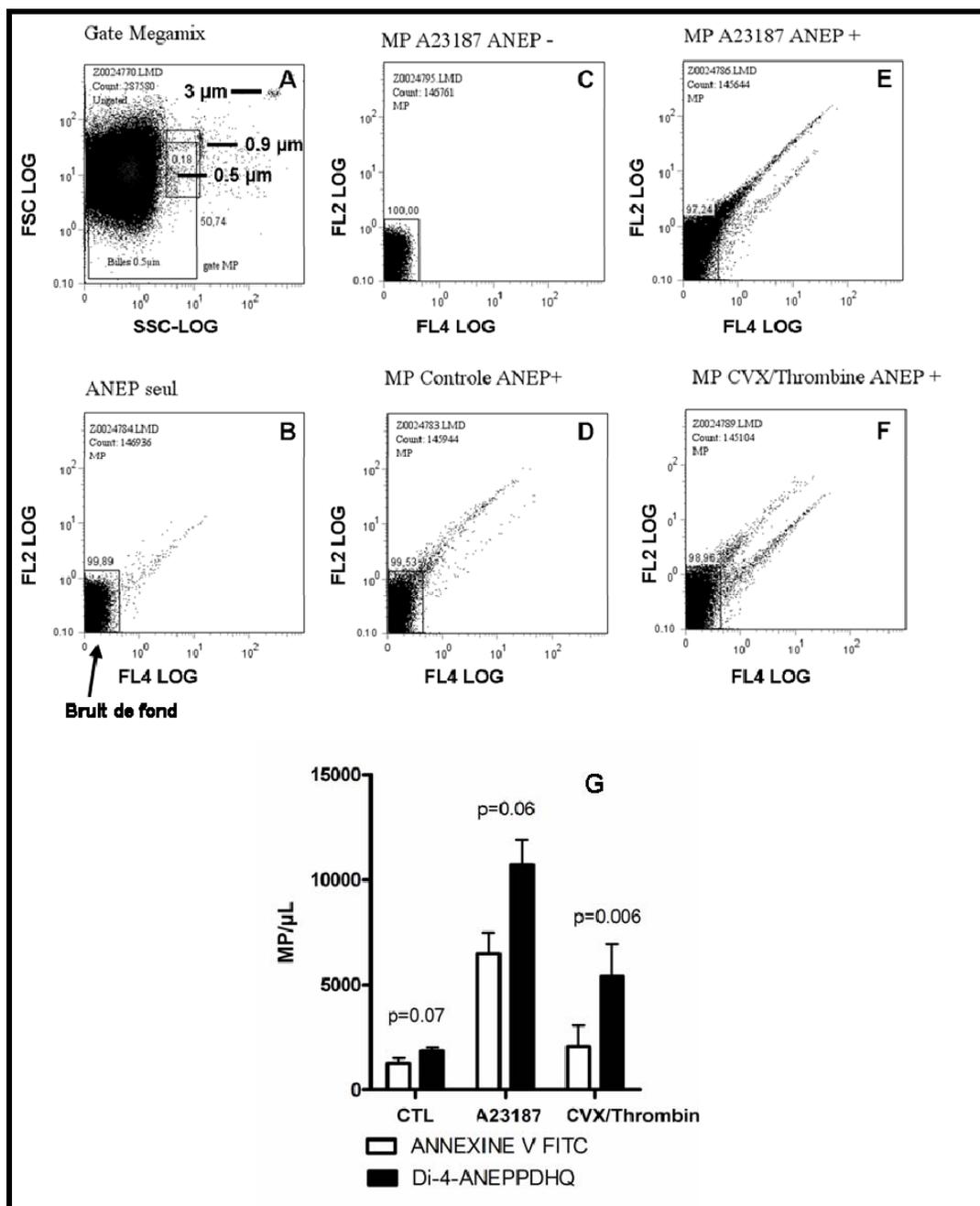
Lipid-rafts are heterogeneous liquid-ordered membrane microdomains playing a critical role in cell signaling. Limited tools are available to image the lipid-raft population in cell membranes. To develop a lipid-raft visualization tool, HL-1 cells were incubated with Di-4-ANEPPDHQ. Emission spectra from a 488 nm excitation wavelength were analyzed. Z-stack acquisitions were obtained and deconvolved. Five discrete emission peaks were identified (wavelengths of [539-571]; [571-593]; [593-625]; [625-657]; [657-689] nm; panel A). Each peak corresponded to distinct 3-D membrane structures (Panel B). Cholesterol depletion with methyl- $\beta$ -cyclodextrin decreased both [539-571] and [571-593] peaks (34.5% and 28.2% respectively; n=13) and increased [625-657] and [657-689] peaks (26.9% and 52.2% respectively; n=13), panel A. Cholesterol enrichment augmented [539-571] and [571-593] peaks (12.7% and 6.24%; n=6) with a reduction of [625-657] and [657-689] peaks (14.4% and 21.4%; n=6). The emission spectra of lipid-raft enriched fractions (sucrose gradient) exhibited more pronounced [539-571] and [571-593] peaks (18.1% and 12.1% increase respectively; n=3). Interestingly, these were found to be more prominent in freshly isolated cardiomyocytes (16.8% and 24.2% respectively; n=10). CONCLUSION: Di-4-ANEPPDHQ differentially stains membrane microdomains in living cardiac cells and may be a useful tool for lipid-microdomain visualization.

## **5.2. Annexe 2 : Le di-4-ANEPPDHQ, un nouveau marqueur lipidique pour le compte des microparticules cellulaires**

---

*Introduction* : Les méthodes actuelles de mesure des microparticules se basent sur la détection de particules fixant l'annexine V et de taille inférieure à 1 $\mu$ m. Ces méthodes ne peuvent détecter les microparticules n'exprimant pas ou peu de phosphatidylsérine, négatives en annexine V. Dans cette étude, nous proposons une nouvelle méthode de quantification des microparticules totales, compatible avec la cytométrie de flux, et basée sur un marquage membranaire par le di-4-ANEPPDHQ.

*Matériels & Méthodes* : Les microparticules ont été obtenues à partir de plaquettes lavées (concentration 100 000/ $\mu$ L) resuspendues dans un tampon contenant Hepes (10 mmol/L), NaCl (137 mmol/L), KCl (5,38 mmol/L), CaCl<sub>2</sub> (5 mmol/L), pH 7,4, après activation pendant 30 mn à 37°C par 10  $\mu$ M d'A23187 ou par un mélange de convulxine/thrombine (500ng/mL / 0,5U/mL). Après centrifugation pendant 5 minutes à 7 200g, le surnageant contenant les microparticules a été récupéré et le marquage effectué avec le di-4-ANEPPDHQ à 10  $\mu$ M (Invitrogen) ou l'annexine V-FITC à 1/20 (v/v) (Becton Dickinson) pendant 15 mn à 25°C. L'échantillon est ensuite dilué six fois et analysé par cytométrie de flux. La calibration du cytomètre a été effectuée en utilisant le kit Megamix (Biocytex, Marseille, France) qui permet de valider les limites de FSC et SSC pour le dosage des microparticules. Ce kit permet la sélection d'une zone de détection des particules inférieures à 0,9 $\mu$ m correspondant aux microparticules (Figure 29-A). Le cytomètre utilisé dans cette étude (EPICS XL, Beckman Coulter) possède une résolution limitée, entraînant l'apparition dans la zone de mesure d'une quantité importante de bruit de fond. Cependant, la différence entre le bruit de fond et les microparticules est effectuée selon la fluorescence, le bruit de fond n'émettant pas de fluorescence. Ceci n'est plus retrouvé sur des cytomètres plus sensibles comme le LSRII (Becton Dickinson). L'analyse est effectuée sur le logiciel FlowJo 7.2.5 (Treestar Inc).



**Figure 29: Mesure des microparticules plaquettaires par cytométrie de flux après marquage par le di-4-ANEPPDHQ**

Tracés représentatifs de : (A) la calibration du cytomètre pour la mesure des microparticules. Quantification des microparticules par cytométrie après marquage par le di-4-ANEPPDHQ. Toutes les évènements apparaissant à l'extérieur de la zone du bruit de fond indiquée sur le graphe (B) sont considérées comme des particules lipidiques marquées. Contrôles avec di-4-ANEPPDHQ seul dans le tampon (B), avec des MP seules (C), la mesure des MP dans le surnageant de plaquettes après activation par 10  $\mu\text{M}$  de A23187 (E), par le mélange convulxine/thrombine (500ng/mL / 0,5U/mL) (F). (G) comparaison des marquages Annexine V FITC et di-4-ANEPPDHQ pour la détection des microparticules. ANEP : di-4-ANEPPDHQ (N=5)

*Résultats* : La détection des microparticules s'effectue en sélectionnant les particules positives de la population incluse dans la zone MP (Figure 29A) dans un graphique représentant les fluorescences FL2 [565-585 nm] et FL4 [665-685 nm]. Le tampon seul incubé avec le di-4-ANEPPDHQ (présente un faible bruit de fond (Figure 29-B) et aucune particule n'est détectable dans ce même tampon en l'absence de di-4-ANEPPDHQ (Figure 29-C). En condition contrôle, non activée, deux nuages distinctes sont observés et pourraient constituer deux populations distinctes de MP (Figure 29-D). Après activation par l'A23187 (Figure 29-E) ou par le mélange convulxine/thrombine (Figure 29-F), la quantité de microparticules de ces deux populations confondues sont significativement augmentées. Le nombre de microparticules de la population ayant le Rf le plus haut (nuage inférieur) varie moins que la population principale pour les deux agonistes utilisés par rapport au contrôle (moyenne  $\pm$  SEM ;  $1777 \pm 298,3$  ( $p < 0,05$ ) et  $1042 \pm 260,2$  ( $p > 0,05$ ) vs.  $845,7 \pm 160,2$  pour les conditions A23187 et CVX/thrombine par rapport au contrôle, ANOVA paramétrique,  $n=5$ ). La comparaison de ce mode d'analyse avec une analyse classique par marquage par l'annexine V-FITC montre que le nombre de MP détectées avec le di-4-ANEPPDHQ est plus important pour les trois conditions, notamment lors d'une activation par le mélange convulxine/thrombine ( $p=0.006$ ) (Figure 29-G).

*Discussion* : Initialement définies comme des particules inférieures à  $1 \mu\text{m}$  et exprimant la phosphatidylsérine à leur surface, plusieurs études ont démontré l'existence de microparticules exprimant plus faiblement la phosphatidylsérine [59, 225]. Nos résultats montrent qu'en marquant les membranes lipidiques par le di-4-ANEPPDHQ, il est possible de détecter un nombre plus important de microparticules dans un échantillon, par rapport à l'annexine V qui ne marque que les microparticules exprimant fortement la phosphatidylsérine à leur surface. De plus, et bien que ceci reste à caractériser, le di-4-ANEPPDHQ permet de distinguer des particules moins ordonnées, dont le nombre varie beaucoup moins lors de l'activation que les microparticules ayant une membrane plus ordonnée.

La principale question entourant ces deux populations est leur pertinence physio-pathologique. Les microparticules sont connues pour être procoagulantes (externalisation de la phosphatidylsérine, expression de facteur tissulaire) et proinflammatoires (RANTES ou CCL5, fractions du système du complément retrouvées dans les microparticules circulantes). Il est donc nécessaire d'effectuer une double caractérisation fonctionnelle et protéomique. Afin de répondre à ces questions, des expériences pilotes de tri de microparticules plaquettaires par cytométrie en flux (Trieur ARIA, Becton Dickinson) ont été entreprises dans le laboratoire par le Dr Pascal Maurice en collaboration avec Laurence Lejeune du service de cytométrie du centre hospitalier universitaire de Montréal (CHUM). Par la suite les microparticules triées seront doublement caractérisées selon leur activité procoagulante et par une analyse protéomique pour laquelle une collaboration a été établie avec la plateforme de l'Université Mc Gill.

En conclusion, cette étude montre que l'analyse par marquage par le di-4-ANEPPDHQ permet, par une approche en fluorescence simple, de détecter un plus grand nombre de microparticules. De plus, l'utilisation d'une approche ratiométrique semble permettre de définir des sous-populations de microparticules, qu'il reste maintenant à caractériser.

### **5.3. Annexe 3 : Mesure de l'apoptose par mesure de l'OLM**

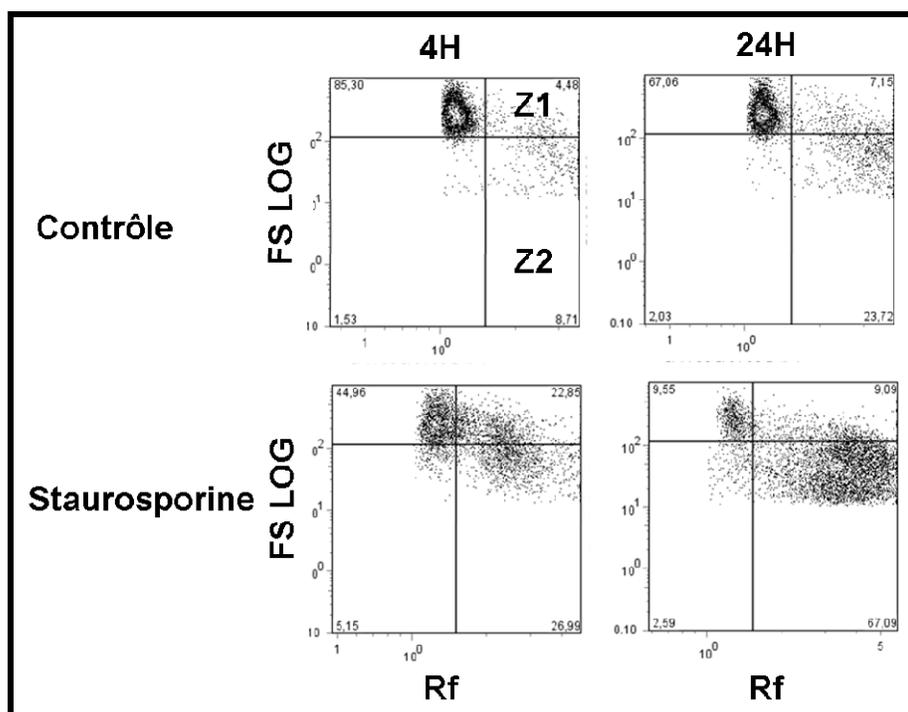
---

*Introduction* : Il est maintenant bien connu que des modifications majeures de la membrane surviennent lors de l'apoptose (perméabilisation, formation de vésicules apoptotiques, ...). Au cours de nos d'expériences préliminaires sur la visualisation de la synapse immunologique des lymphocytes, nous avons pu nous apercevoir que le marquage par le di-4-ANEPPDHQ que les cellules apoptotiques présentent une diminution très importante de l'OLM par rapport à des cellules non apoptotiques. Le but de cette étude a donc été de mesurer les variations d'OLM au cours de l'apoptose, de relier cette mesure aux méthodes de références et enfin de déterminer une méthode permettant la quantification directe de l'apoptose par mesure des modifications d'OLM.

*Matériels & Méthodes* : Les expériences ont été effectuées sur des cellules HUVEC (Human Umbilical Venous Endothelial Cells) cultivées en milieu EBM-2 (EBM-2 bullet kit, Clonetics, CA). Les cinétiques d'apoptose ont été induites par l'addition de 0,1  $\mu\text{M}$  de staurosporine (Sigma Chemicals) et les mesures effectuées avant, puis 15, 30, 60, 120, 240 min et 24h après l'addition de la staurosporine. Les tests de cytotoxicité des sérums de patients avec syndrome coronarien aigu ou infarctus du myocarde ont été effectués après 72h de culture en présence de 20% de sérum de patient. Dans tous les cas, les cellules ont été resuspendues à  $1.10^6$  / mL, incubées avec 10  $\mu\text{M}$  de di-4-ANEPPDHQ pendant 5 minutes à température ambiante et analysées après avoir été diluées 6 fois par du PBS. L'acquisition est effectuée par cytométrie de flux, suivie par une analyse des données sur FlowJo 7.2.5 (Treestar Inc).

*Résultats* : Le pourcentage de cellules avec un Rf élevé est mesuré sur un graphe FSC/Rf (Figure 30) Deux zones particulières sont identifiées : la zone 1 (Z1) correspondant à la zone des cellules dont le Rf a augmenté mais dont la taille en FSC n'est pas modifiée, et la zone 2 (Z2) correspondant à la zone des cellules à Rf élevé et dont la taille a diminué. Après induction de

l'apoptose, la valeur du Rf des cellules endothéliales présentes dans la zone 2 est plus que doublée par rapport aux cellules de la population initiale ( $1,2 \pm 0,02$  vs.  $3,2 \pm 0,2$  ;  $p < 0,001$ ). Les mesures de l'apoptose par le double marquage annexine V-FITC (provenance) / Iodure de propidium (PI) (Becton Dickinson), par le marquage TUNEL (Invitrogen, Burlington, ON) ou par la détection des cellules ayant un contenu réduit en ADN par fixation, perméabilisation et marquage des cellules par l'iodure de propidium sont effectuées selon les recommandations des fabricants ou selon des techniques validées [226].

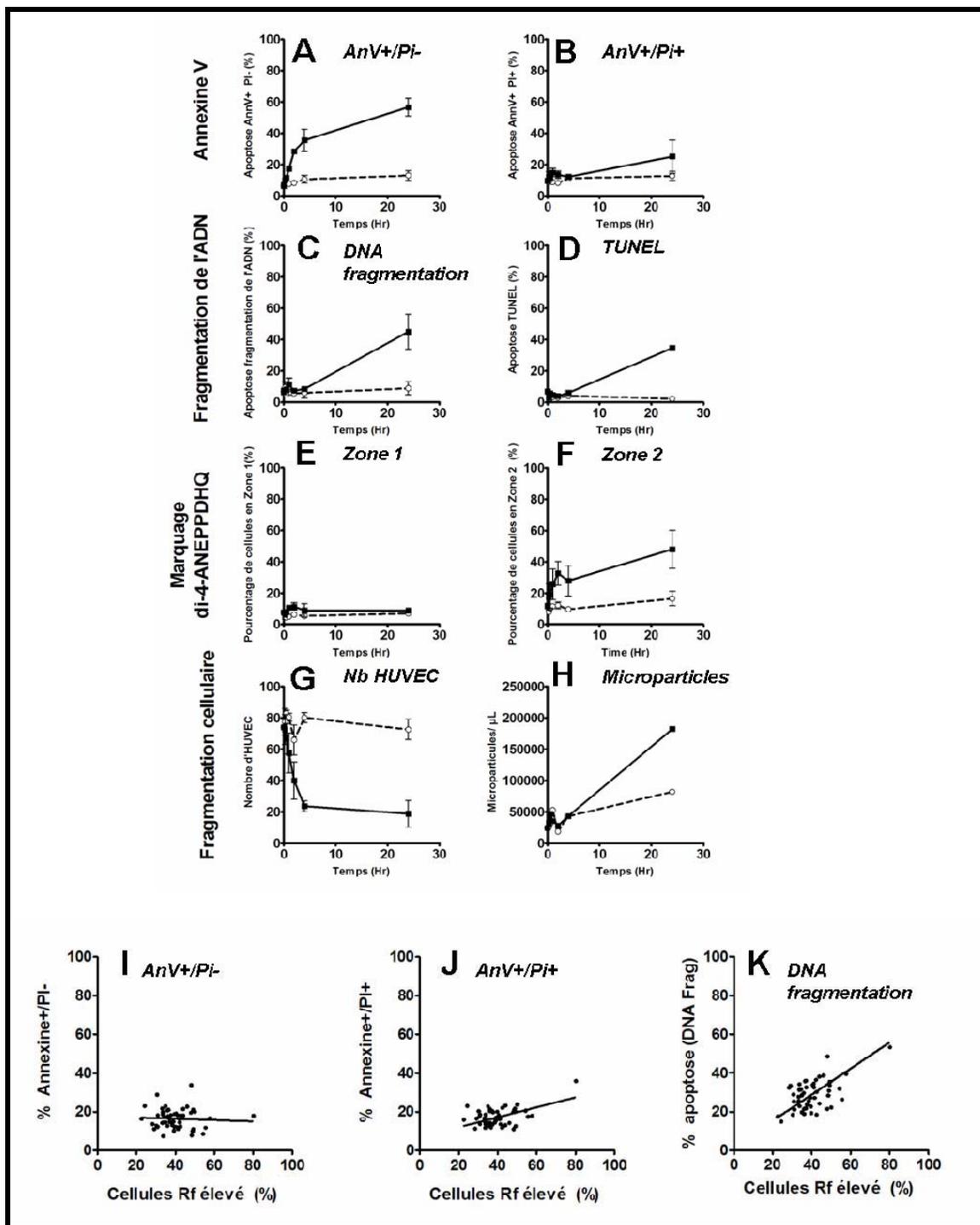


**Figure 30: Analyse des résultats de cytométrie de flux pour la mesure de l'apoptose de cellules HUVEC**

Après acquisition, les données sont retraitées à partir d'un graphe FSC/Rf. Deux zones particulières sont identifiées. Dans la zone 1 (Z1 sur la figure) le Rf a augmenté mais la taille en FSC n'est pas modifiée. Dans la zone 2 (Z2) les cellules ont un Rf élevé et une taille diminuée.

La Figure 31 A-D montre les cinétiques d'apoptose des différentes méthodes de mesure de l'apoptose après l'addition de la staurosporine. Il est possible de différencier les méthodes mesurant l'apoptose « précoce » par mesure du nombre de cellules positives pour l'annexine V et négatives pour le PI, par rapport aux méthodes mesurant l'apoptose « tardive », basées sur la fragmentation de l'ADN ou la perméabilisation des cellules. La proportion de cellules dans la

zone Z1 n'est pas significativement modifiée durant la cinétique. (Figure 31-E) La proportion de cellules ayant un Rf augmenté et une taille diminuée (Zone 2) suit une cinétique comparable à celle de l'apoptose « précoce » avec une augmentation rapide entre 0 et 2h puis une stabilisation relative jusqu'à 24h (Figure 31-F).



**Figure 31: Mesure de l'OLM de cellules HUVEC au cours de l'apoptose**

Cinétique d'apoptose sur 24h induite par 0,1 μM de staurosporine (A-H). Mesure de l'apoptose par mesure du pourcentage de cellules annexineV+/PI- (A), annexineV+/PI+ (B), de la fragmentation de l'ADN (C) et par le marquage TUNEL (D). Pourcentage de cellules avec un Rf élevé dans les zones 1 (E) et 2 (F) après marquage par le di-4-ANEPPDHQ. Pourcentage de cellules intactes (G) et nombre de microparticules (H). Corrélation du pourcentage de cellules ayant un Rf élevé par rapport à la mesure de l'apoptose par le pourcentage de cellules AnnexineV+/PI- (I), AnnexineV+/PI+ (J), et par la mesure de la fragmentation de l'ADN (K) après incubation 72h en présence de 20% de sérum de patients avec syndrome coronarien aigu ou infarctus du myocarde.

Le nombre de cellules intactes diminue régulièrement après induction de l'apoptose (Figure 31-G) alors que la concentration de microparticules est maximale à 24h (Figure 31-H). La mesure de l'OLM des HUVEC incubées 72h en présence de 20% de sérum de patients avec syndrome coronarien aigu ou infarctus du myocarde (N=51) montre que la mesure du pourcentage de cellules avec un Rf élevé (Z1+Z2) n'est pas corrélée à la mesure d'apoptose « précoce » annexine+/PI- (Figure 31-I ;  $r^2=0,02$  ;  $p=0,75$ ) mais est corrélée avec l'apoptose tardive mesurée par le pourcentage de cellules annexine+/PI+ (Figure 31-J ;  $r^2=0,21$  ;  $p=0,001$ ). Egalement, le pourcentage de cellules avec un Rf élevé est significativement corrélé à l'apoptose mesurée par le pourcentage de cellules hypodiploïdes après marquage à l'iodure de propidium (Figure 31-K ;  $r^2=0,31$  ;  $p<0,001$ ).

*Discussion* : Ces résultats montrent que l'OLM est très diminué par l'apoptose. De plus, de façon suprenante les cellules apoptotiques subissent un décalage de Rf progressif au moins aussi précocément que le marquage par l'annexine V pour la détection de la perte de polarisation de la membrane. Au contraire après 72h, le pourcentage de cellules avec un Rf élevé n'est pas corrélé avec les marqueurs précoces mais est fortement corrélé avec un marquage de fragmentation nucléaire, évènement tardif de l'apoptose. Il est donc probable que plusieurs évènements cellulaires modifient l'OLM mesuré au cours du temps. Dans un premier temps, il est possible que la modification soit directement reliée à la staurosporine. Plusieurs hypothèses sont alors envisageables : l'inhibition par la staurosporine d'une protéine kinase mise en jeu dans le maintien de l'intégrité membranaire ou une modification de l'OLM induite par la perte de l'asymétrie membranaire. Une étude précédente montre que la fluidité et l'OLM de membranes isolées de cellules en apoptose augmente aussi précocément après addition de 0,5  $\mu\text{M}$  de staurosporine [227]. Le second élément semble lié à la fragmentation nucléaire. Il est intéressant à ce niveau de noter que le di-4-ANEPPDHQ ne pénètre pas dans le noyau des cellules mais marque les organelles et la membrane nucléaire. Il est donc possible que les modifications de la

membrane nucléaire ou des mitochondries, deux éléments clés de l'apoptose, soient responsables de l'augmentation de Rf mesurée après 72h d'incubation. L'analyse du Rf en fonction de la taille des cellules, mesurée par le FSC et séparée par les zones 1 et 2, peut alors apporter une information sur la cinétique d'évolution. Jessel *et coll.* montrent aussi une diminution de la taille des cellules mais à des temps plus tardifs que le changement d'ordre ou de fluidité [227]. Ceci suggère que la zone 1 serait une zone de transition pour les cellules n'ayant pas encore diminué de taille mais ayant déjà des modifications de membrane. Ceci expliquerait le faible nombre de cellules présentes transitoirement dans cette zone. Une limite importante de cette expérience est l'utilisation de cellules adhérentes. Celles-ci ont donc été détachées par incubation avec un mélange de trypsine/EDTA. Et cette incubation, même rapide, peut modifier la membrane en dégradant ou en déstabilisant des protéines de la membrane plasmique. Ces effets ont été partiellement pris en compte par l'utilisation d'une condition contrôle sans staurosporine dans la cinétique. Cependant il est toujours possible que des cellules en apoptose soient plus sensibles à cette étape que des cellules saines.

*Discussion* : Ces premiers résultats montrent que l'OLM diminue fortement au cours de l'apoptose et suggèrent que la mesure de l'OLM par cytométrie de flux pourrait représenter une méthode pour la mesure de l'apoptose. Ces résultats sont à mettre en relation avec ceux obtenus lors de l'activation plaquettaire. En effet, l'activation plaquettaire présente plusieurs points communs avec les mécanismes d'apoptose (perte de l'asymétrie de la membrane, dépolarisation de la membrane mitochondriale, production de microparticules, activation de caspases...). Des études complémentaires doivent être menées afin de déterminer précisément les mécanismes mis en jeu dans la modification de l'OLM au cours de l'apoptose.