

**MÉMOIRE**  
**DU DIPLÔME D'ÉTUDES SPÉCIALISÉES**  
**DE BIOLOGIE MEDICALE**

Soutenu devant le jury interrégional

Le 10 janvier 2014

Par Louise-Marie CHIRON

**Conformément aux dispositions du Décret n° 2012-172 du 3 février**

**THÈSE**  
**POUR LE DIPLÔME D'ÉTAT DE DOCTEUR EN PHARMACIE**

*Microparticules endothéliales et plaquettaires en cytométrie en flux  
dans les thrombocytoses*

-----  
**Président : M. Jean-Marie BARD, Professeur de Biochimie fondamentale et clinique**

**Membres du jury : Mme Marie-Christine BENE, Professeur d'Hématologie**  
**M. Laurent MACCHI, Professeur d'Hématologie**  
**Mme Viviane DUBRUILLE, Praticien Hospitalier**  
**M. Marc FOUASSIER, Praticien Hospitalier**

# COMPOSITION DU JURY

## **Président de jury :**

Monsieur le Professeur Jean-Marie BARD

## **Directeur de thèse :**

Madame le Professeur Marie-Christine BENE

## **Membres du jury :**

Madame le Professeur Marie-Christine BENE

Monsieur le Professeur Laurent MACCHI

Madame le Docteur Viviane DUBRUILLE

Monsieur le Docteur Marc FOUASSIER

# **SERMENT DE GALIEN**

## **Faculté de Pharmacie de Nantes**

Je jure, en présence des maîtres de la faculté et de mes condisciples :

D'honorer ceux qui m'ont instruit dans les préceptes de mon art et de leur témoigner ma reconnaissance en restant fidèle à leur enseignement.

D'exercer, dans l'intérêt de la santé publique, ma profession avec conscience et de respecter non seulement la législation en vigueur, mais aussi les règles de l'honneur, de la probité et du désintéressement.

De ne jamais oublier ma responsabilité et mes devoirs envers le malade et sa dignité humaine ; en aucun cas, je ne consentirai à utiliser mes connaissances et mon état pour corrompre les mœurs et favoriser des actes criminels.

Que les hommes m'accordent leur estime si je suis fidèle à mes promesses.

Que je sois couvert d'opprobre et méprisé de mes confrères si j'y manque.

# Remerciements

**Au Président du jury,**

**Monsieur le Professeur Jean-Marie BARD,**

Vous me faites l'honneur d'accepter la présidence de ce jury. Je vous remercie pour votre enseignement au cours de mes études à Nantes. Veuillez trouver ici l'expression de toute ma gratitude et de mon plus grand respect.

**Au directeur de thèse,**

**Madame le Professeur Marie-Christine BENE,**

Je vous remercie de m'avoir accueillie dans votre laboratoire et de m'avoir accompagnée dans ce travail. J'ai beaucoup apprécié votre dynamisme et votre réactivité tout au long de ce projet. Veuillez trouver ici l'expression de toute ma reconnaissance.

**A Monsieur le Professeur Laurent MACCHI,**

Vous me faites l'honneur d'accepter de juger ce travail. Qu'il me soit permis de vous remercier de l'aide précieuse que vous m'avez apportée pour la réalisation de ce mémoire. Je vous remercie également de m'avoir encouragée, fait confiance et orientée vers ce travail de thèse. J'ai, dès le début de mon internat, apprécié votre enseignement et votre soutien dans mon projet professionnel. Veuillez, je vous prie, trouver ici le témoignage de toute ma gratitude et de ma profonde sympathie.

**A Monsieur le Docteur Marc FOUASSIER,**

Je vous remercie d'avoir accepté d'être membre de ce jury. Je vous remercie également de votre enseignement et de votre disponibilité durant mon semestre à Nantes.

**A Madame le Docteur Viviane Dubruille,**

Je vous remercie d'avoir accepté d'être membre de ce jury et de juger ce travail.

**A Maman,**

Tu m'as soutenue, encouragée et aimée depuis toujours avec une énergie et une patience que j'admire. Mon cursus arrive à sa fin et c'est en partie grâce à toi. Merci pour ton soutien mais surtout pour tous les moments de complicité que nous avons partagés.

**A Papa,**

Tu m'as appris à relativiser, à savoir ce qui compte pour moi. Tu n'en as pas conscience mais pourtant ta sérénité, ton écoute et tes conseils m'ont toujours aidée à faire les bons choix.

**A Anne-Laure, ma sœur, et son mari Valentin,**

Nous sommes un sacré duo toutes les deux, et ça ne date pas d'hier ! C'est toi qui m'as appris à poursuivre mes rêves et à dépasser mes limites. Merci d'avoir toujours été là, en toute circonstance. Merci à vous deux pour tous les bons moments passés et à venir.

**A Constantin, mon neveu et filleul,**

Pour tout le bonheur que tu m'as apporté depuis ta naissance.

**A Cédric,**

Pour ton soutien et ta présence à mes côtés tout au long de ce travail. Ta gentillesse et ton amour me comblent chaque jour.

**A Sophie, Julien et Arnaud,**

Mes amis de Boulogne sur Mer, les BFF... Merci pour tous ces bons moments partagés pendant notre internat angevin. Notre amitié ne fait que commencer, ma porte vous sera toujours ouverte !

**A mes co-internes nantais,**

Pour m'avoir aidée dans ce travail en traquant les thrombocytoses tout au long du semestre !

**A Nelly et toute l'équipe de cytométrie nantaise,**

Vos conseils et votre aide m'ont été très précieux pour réaliser ce travail.

## Liste des abréviations

- AFM : atomic force microscopy
- CIVD : coagulation intravasculaire disséminée
- CMF : cytométrie en flux
- DLS : dynamic light scattering
- EMP : microparticules d'origine endothéliale
- EPCR : récepteur endothélial de la protéine C
- ErMP : microparticules d'origine érythrocytaire
- FITC : isothiocyanate de fluorescéine
- FSC : forward scatter
- FT : facteur tissulaire
- FV : facteur V de la coagulation
- FVIII : facteur VIII de la coagulation
- GPI : glycosylphosphatidylinositol
- HPN : hémoglobinurie paroxystique nocturne
- HU : hydroxyurée
- JAK2 : Janus Activated Kinase 2
- LES : lupus érythémateux systémique
- LMC : leucémie myéloïde chronique
- LMP : microparticules d'origine leucocytaire
- MF : myélofibrose primitive
- MMP : métalloprotéinases matricielles
- MP : microparticule
- NTA : nanoparticles tracking analysis
- PAI-1 : plasminogen activator inhibitor de type 1
- PBS : phosphate-buffered saline
- PC5 : phycoérythrine-cyanine5
- PE : phosphatidyléthanolamine
- PF4 : facteur 4 plaquettaire
- PMP : microparticules d'origine plaquettaire
- PMT : photomultiplicateur
- PNN : polynucléaires neutrophiles
- PPP : plasma pauvre en plaquettes

- PS : phosphatidylsérine
- PTI : purpura thrombocytopénique idiopathique
- PTT : purpura thrombotique thrombocytopénique
- PV : polyglobulie de Vaquez
- RARS-T : anémie réfractaire avec sidéroblastes en couronne et thrombocytose
- SAPL : syndrome des antiphospholipides
- SMD : syndromes myélodysplasiques
- SMP : syndromes myéloprolifératifs
- SSC : side scatter
- TE : thrombocytémie essentielle
- TEM : transmission electron microscopy
- TFPI : tissue factor pathway inhibitor
- TIH : thrombopénie induite par l'héparine
- TM : thrombomoduline
- TMP : microparticules annexine-V positives
- TNF-alpha : tumor necrosis factor alpha
- tPA : tissue plasminogen activator
- TR : thrombocytoses réactionnelles ou secondaires
- uPA : urokinase plasminogen activator
- uPAR : urokinase plasminogen activator receptor
- vWF : facteur von Willebrand

# Table des matières

<b>INTRODUCTION</b> .....	10
1. Les microparticules .....	11
a. Définition .....	11
b. Fonctions physiologiques et implications en pathologie humaine .....	14
c. Détection et caractérisation des microparticules.....	28
2. Les thrombocytoses.....	39
a. Généralités .....	39
b. Thrombocytémie essentielle .....	40
c. Thrombocytoses réactionnelles.....	48
d. Microparticules et thrombocytoses .....	51
3. Objectifs de l'étude .....	53
<b>MATERIEL ET METHODES</b> .....	54
1. Population étudiée .....	55
a. Population témoin .....	55
b. Cohorte de patients .....	55
2. Recueil et traitement des échantillons .....	55
3. Mise au point de la détection des MP au CHU de Nantes et traitement des échantillons....	57
a. Création du protocole « microparticules » sur le cytomètre Navios .....	57
b. Evaluation et réglages des fluorescences.....	57
c. Rédaction du protocole de détection des MP d'origine plaquettaire et endothéliale.....	60
d. Evaluation du marquage non spécifique .....	61
e. Passage des échantillons des trois séries (contrôles, TR, TE) et obtention des valeurs de PMP et EMP pour chaque échantillon .....	63
f. Evaluation de la méthode .....	65
4. Statistiques .....	66
<b>RESULTATS</b> .....	67
1. Evaluation de la méthode de détection des MP.....	68
a. Répétabilité .....	68
b. Reproductibilité .....	69
c. Comparaison des vitesses « Low » et « Medium » du cytomètre Navios .....	69
2. Etude des PMP dans les trois séries de patients .....	71
a. Données démographiques des populations étudiées .....	71
b. Comparaison des sujets contrôles et des patients avec thrombocytémie essentielle .....	72
c. Comparaison des sujets contrôles et des patients avec thrombocytose réactionnelle.....	72
d. Comparaison des deux séries de patients.....	73
e. Etude du lien entre le nombre de PMP et la numération plaquettaire.....	74
f. Impact de la mutation Jak2 V617F sur le nombre de PMP .....	75

g. Comparaison des résultats obtenus en fonction de la ville de prélèvement.....	76
3. Etude des EMP dans les trois séries de patients.....	76
<b>DISCUSSION</b> .....	77
<b>CONCLUSION</b> .....	82
<b>Références bibliographiques</b> .....	84
<b>Liste des figures</b> .....	97
<b>Liste des tableaux</b> .....	99

# **INTRODUCTION**

# 1. Les microparticules

## a. Définition

Dénommées il y a une quarantaine d'années « poussières de cellules »(1), les microparticules (MP) circulantes sont de petites vésicules membranaires relarguées par les cellules en réponse à l'activation ou l'apoptose. Elles sont présentes dans le sang, et peuvent être identifiées dans le plasma. Leur taille est hétérogène : elles présentent des diamètres variant de 0,1 à 1 micromètre. Dans la circulation, les MP dérivent de différents types cellulaires. Chez l'individu sain, plus de 90% des MP sont d'origine plaquettaire, moins de 10% proviennent des polynucléaires neutrophiles, et moins de 5% des cellules endothéliales, des globules rouges ou des monocytes. Certaines MP sont issues d'autres types cellulaires tels que les cellules tumorales ou de syncytiotrophoblastes.(2–4)

### Composition

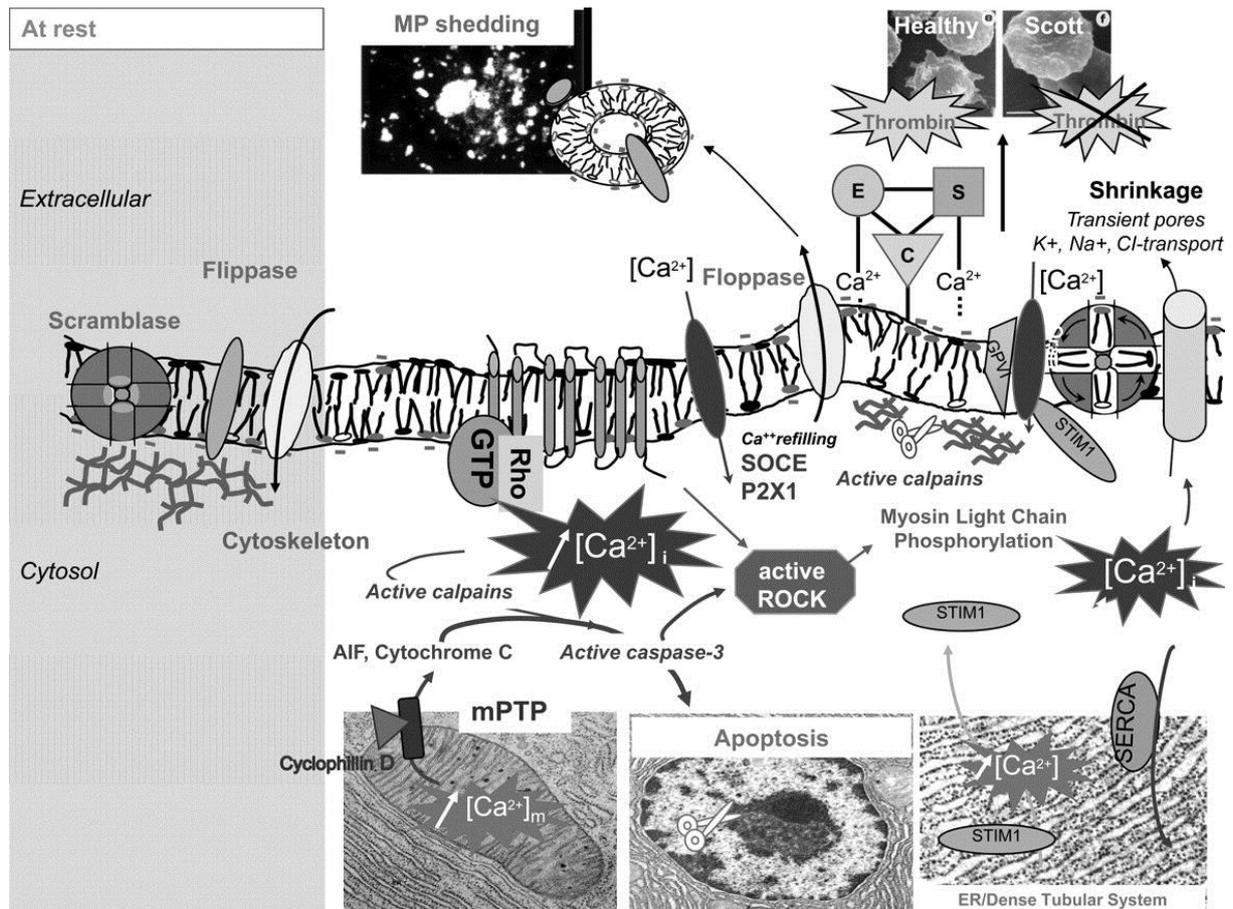
Les MP sont composées d'une double membrane phospholipidique exposant un large répertoire de protéines transmembranaires et de récepteurs. Elles renferment des composants cytosoliques tels que des enzymes, des facteurs de transcription et des ARN messagers. La composition d'une MP est le reflet à la fois du type et de l'état de la cellule qui lui a donné naissance. Cette caractéristique fait des MP un marqueur potentiel de pathologie.(5)

### Microparticules et exosomes

On distingue deux groupes majeurs de microvésicules sur la base de leur origine : les vésicules dérivées des membranes cellulaires (MP et corps apoptotiques ou ectosomes) et les exosomes. Les MP diffèrent des exosomes de par leur origine, leur contenu protéique et leur taille. Les exosomes sont sécrétés dans le milieu extracellulaire après fusion d'endosomes multivésiculaires avec la membrane plasmique, ils sont relargués par exocytose. Leur taille est plus homogène et inférieure à celle des microparticules (<0,1 micromètre, approximativement 40 à 90 nanomètres de diamètre), cependant il n'existe pas de consensus sur une valeur limite de taille pour différencier ces deux populations. Cette absence de consensus s'explique par les limites des méthodes utilisées pour caractériser ces nanoparticules mais aussi par les variations pré-analytiques telles que le choix de l'anticoagulant ou les protocoles de centrifugation et de stockage.(6–8) Les exosomes jouent un rôle de présentation d'antigène, ils n'externalisent pas la phosphatidylsérine mais expriment des marqueurs spécifiques comme Lamp1, CD63 et TSG101. Ils contiennent également des ARN et des microARN.(9)

### Mécanismes de formation des microparticules

L'élucidation des mécanismes gouvernant la génération des MP est cruciale pour comprendre leurs rôles physiopathologiques. En conditions de repos, les phospholipides sont asymétriquement distribués dans la membrane des cellules eucaryotes.(9) Le feuillet externe est enrichi en phosphatidylcholine et sphingomyéline, alors que le feuillet interne contient les aminophospholipides phosphatidylsérine (PS) et phosphatidyléthanolamine (PE).(10) La distribution des lipides membranaires est le résultat d'un processus actif sous la dépendance de transporteurs de phospholipides complémentaires, gouvernant la translocation vers l'intérieur (flip) ou vers l'extérieur (flop). L'apparition de PS ou de PE sur le feuillet externe résulte d'un transport à partir du feuillet interne par une aminophospholipide translocase possédant une activité « flippase » qui maintient la distribution normale des phospholipides au repos. Comme le transport non catalysé entre les couches est lent, l'asymétrie des phospholipides est stable dans les cellules quiescentes. Une protéine ATP-dépendante appelée « floppase » transfère spécifiquement la PS du feuillet interne vers le feuillet externe. Cette « floppase » est directement responsable de la perturbation de l'asymétrie lorsque les cellules sont activées. De plus, une « scramblase » (transporteur bidirectionnel non spécifique activé par un influx d'ions calciques) permet le passage vers le feuillet externe de tous les phospholipides selon leur gradient de concentration, favorisant ainsi la randomisation. L'exposition de PS est la conséquence de la translocation rapide vers l'extérieur exercée par la floppase et de l'inhibition de l'activité flippase par un influx calcique qui fait suite à un stimulus. Le déséquilibre transitoire de masse des phospholipides entre les deux feuillets, dû à la randomisation de la membrane et à la protéolyse du cytosquelette, provoque une altération de la distribution asymétrique des lipides entre les couches interne et externe de la membrane plasmique et le relargage de microparticules. L'exposition de PS apparaît comme la caractéristique universelle des cellules en cours d'activation ou d'apoptose et une caractéristique commune des microparticules relarguées par ces cellules. L'augmentation de calcium intracellulaire favorise également l'activation des calpaïnes intervenant dans la dissociation de structures membranaires du cytosquelette et favorisant le bourgeonnement de la membrane plasmique. C'est l'ensemble de ces phénomènes qui, à partir des cellules activées, nécrosées ou en apoptose, conduit à la formation et à l'émission de MP présentant une surface catalytique phospholipidique.(5,12) (**Figure 1**)



**Figure 1.** Acteurs clé du remodelage membranaire et du relargage des MP procoagulantes.  
D'après Morel et al. (5)

### Cas des microparticules n'exposant pas la phosphatidylsérine

L'existence ou non de MP n'exposant pas la PS est un large débat. L'annexine V est une protéine qui se lie à la PS utilisée pour définir la population des MP PS+. Cependant il existe des vésicules PS négatives qui ne sont donc pas marquées par l'annexine V. Selon Connor et al.(13) 80% des MP circulantes d'origine plaquettaire dans un plasma pauvre en plaquettes de donneur sain ne fixent pas l'annexine V. L'approche méthodologique est cruciale pour l'évaluation du relargage des MP et il est possible que certaines conditions expérimentales altèrent la fixation de l'annexine V sur de réelles MP, particulièrement lorsque les échantillons sont utilisés sans étape de lavage. La concentration en calcium, l'activation cellulaire et certains traitements impactent sur la liaison PS-annexine V et compliquent la méthode d'analyse. La contribution potentielle des exosomes est très controversée, car ces exosomes expriment très peu ou pas de PS et ne peuvent pas être détectés par cytométrie en flux à cause de leur faible taille. La nature des vésicules annexine V négatives d'origine plaquettaire et endothéliale et les mécanismes permettant leur relargage sont mal compris. Ces

vésicules pourraient refléter l'homéostasie basale des tissus. Elles pourraient également résulter de multiples événements de fusion, entre des débris cellulaires ou de petites vésicules endosomales secrétées avec des composants plasmatiques. Un autre mécanisme possible reposerait sur un relargage à partir de la membrane plasmatique suite à un clivage particulier du cytosquelette.

## **b. Fonctions physiologiques et implications en pathologie humaine**

Les MP circulantes sont présentes chez le sujet sain et leur taux augmente dans certaines pathologies.

### **Fonctions physiologiques**

#### **○ Communication intercellulaire**

Les MP exposent un large spectre de substances bioactives et de récepteurs à leur surface et abritent un riche éventail de cytokines, protéines de signalisation, ARNm, messagers et microARN issus de leurs cellules d'origine. Les MP sont aujourd'hui décrites comme de véritables vecteurs intervenant dans les échanges intercellulaires de signaux biologiques et d'information. Les MP pourraient sélectionner des cellules cibles et transférer une partie de leur contenu (**Tableau 1**). Ainsi les MP participeraient au contrôle de l'activation cellulaire, à des modifications phénotypiques et à la reprogrammation des fonctions cellulaires.(14)

Comme les MP sont présentes dans la circulation, elles peuvent intervenir dans la communication intercellulaire à distance de leur site de formation. Ce système pourrait constituer un réseau de communication dépassant les limites du transcriptome et du protéome et permettant le partage efficace des propriétés spécifiques et de l'information des cellules. Le processus de transfert implique des mécanismes de régulation complexes et différentes étapes incluant au minimum la sortie sélective de composés contenus dans les MP, des interactions spécifiques avec les cellules cibles grâce à des récepteurs de surface et enfin la libération signal-dépendante du contenu des MP.(14)

Objet du transfert		Cellule d'origine des MP → cellules cibles
Récepteurs/ molécules de surface	CCR5 CXRC4 GPIIb/IIIa EGFR (epidermal growth factor receptor) Molécules du CMH (complexe majeur d'histocompatibilité) TF (tissue factor)	Cellules mononucléées du sang → cellules variées Plaquettes → cellules variées, progéniteurs de cellules endothéliales Plaquettes → neutrophiles, progéniteurs de cellules endothéliales Cellules tumorales → cellules variées Cellules immunitaires → cellules immunitaires  Monocytes → plaquettes
Protéines intra- particulaires	IL-1 $\beta$ RANTES/CCL5	Cellules variées → cellules variées Plaquettes → cellules endothéliales
Facteurs de croissance	VEGF (vascular endothelial growth factor) bFGF (basic fibroblast growth factor) PDGF (platelet-derived growth factor)	Plaquettes, cellules tumorales → cellules endothéliales Plaquettes, cellules tumorales → cellules endothéliales Plaquettes → cellules endothéliales
Protéases	MMP (métalloprotéinases matricielles) EMMPRIN Caspase 1	Cellules tumorales → matrice extracellulaire Cellules tumorales → matrice extracellulaire Monocytes → cellules musculaires lisses
Autres	PPAR $\gamma$ (peroxisome proliferator-activated receptor $\gamma$ )	Plaquettes → monocytes
ARN	ARNm microARN	Cellules souches → cellules variées Cellules souches → cellules variées
Lipides	Acide arachidonique PAF	Plaquettes → cellules variées Cellules variées → plaquettes et autres

**Tableau 1.** MP et système de communication intercellulaire : signaux biologiques et informations.  
D'après Mause, Weber et *al.*(14)

○ **Activité procoagulante et anticoagulante**

La fonction des MP dans le maintien de l'homéostasie des vaisseaux repose sur un équilibre entre activité procoagulante et anticoagulante et leur participation à la fibrinolyse (**Tableau 2**). Les propriétés procoagulantes des MP sont largement décrites. Elles reposent principalement sur l'expression de phospholipides anioniques, plus particulièrement la PS, et de facteur tissulaire (FT), activateur cellulaire majeur du système de la coagulation. La PS étant chargée, elle peut assembler les facteurs de coagulation dépendant du calcium à la surface des microparticules, et ainsi former les complexes ténase et prothrombinase permettant la formation de thrombine. Le facteur tissulaire est un récepteur pour le FVII/VIIa. Le complexe FT:VIIa active les FX et FIX qui initient la coagulation. Les MP présentant à la fois de la PS et du facteur tissulaire possèdent une activité procoagulante plus importante.(15) Celle-ci dépend également de modifications post-traductionnelles et de différences de conformation du FT dépendant de la cellule d'origine. Généralement, les MP plaquettaires et érythrocytaires PS positives sont présentes chez les sujets sains, alors que le nombre de microparticules FT positives et PS positives est indétectable ou très faible.(3)

Les MP peuvent également présenter des propriétés anticoagulantes héritées de leurs cellules d'origine. Le tissue factor pathway inhibitor (TFPI) est un inhibiteur du complexe FT:FVIIa permettant de prévenir une activation inappropriée de la coagulation. Le TFPI est

présent sous forme circulante mais aussi sur certaines MP (endothéliales, syncytiotrophoblastiques et chez certains patients souffrant d'affection aiguë myocardique ou de diabète). Ainsi, l'équilibre entre TF et TFPI sur les microparticules affecte leur thrombogénicité et diffère entre certains états pathologiques et chez les sujets sains. Les MP d'origine endothéliale possèdent des propriétés anticoagulantes basées, d'une part sur leur capacité à potentialiser l'activation de la protéine C par la thrombine, et d'autre part sur le récepteur de surface à la thrombomoduline (TM) et le récepteur endothélial de la protéine C (EPCR). La protéine C activée liée aux MP possédant le récepteur EPCR inactive les cofacteurs procoagulants Va et VIIIa, ce qui aboutit à une diminution de la génération de thrombine. Il a cependant été récemment démontré que les MP d'origine endothéliale peuvent également exprimer des propriétés fibrinolytiques.(3)

Deux grands systèmes protéolytiques sont présents dans les MP : les métalloprotéinases et/ou le système d'activation du plasminogène.

- Les métalloprotéinases matricielles (MMP) sont des endopeptidases sécrétées sous la forme de pro-enzymes (pro-MMP) dont l'activité dépend de leur activation et de l'incorporation du zinc dans le site catalytique. Les pro-MMP sont activées par un changement de conformation ou par une protéolyse limitée due à la plasmine ou à d'autres pro-MMP. Les MMP sont classifiées selon leur spécificité pour un substrat et leur localisation sur la membrane cellulaire.(12,16) Des études ont rapporté la présence d'urokinase plasminogen activator (uPA), de son récepteur l'urokinase plasminogen activator receptor (uPAR), de pro-MMP et leurs formes actives, ainsi que de tissue plasminogen activator (tPA) à la surface de MP issues de cellules tumorales. La membrane des MP offrirait donc une surface d'activation des MMP via la formation de plasmine par l'uPA.(17–20) Taraboletti et *al.* ont démontré la présence de certaines pro-MMP et de leurs formes actives sur des MP issues de cellules non tumorales, notamment de cellules endothéliales. Ces MP favorisent la migration des cellules endothéliales et modulent leur capacité angiogénique.(21) Enfin, certains types de MP peuvent stimuler la production de MMP par des fibroblastes (22), des cellules endothéliales (23) ou des cellules malignes (24) et contribuer ainsi de manière indirecte à la protéolyse péricellulaire.
- La découverte d'une activité fibrinolytique des microparticules confirme leur contribution dans la régulation de la balance hémostatique et l'intégrité vasculaire. Les MP peuvent contenir des activateurs du plasminogène. C'est dans un premier temps sur la membrane de MP tumorales qu'a été mise en évidence la présence du système uPA/uPAR par

l'équipe de Dolo et *al.*(17) L'uPA lié à son récepteur sur les MP transforme le plasminogène en plasmine, laquelle peut agir sur la fibrine ou participer à la dégradation de protéines matricielles directement ou en activant des MMP. Les études de Brodsky et *al.* ont également rapporté la présence d'uPAR sur des MP obtenues à partir de cellules saines endothéliales stimulées par de fortes concentrations de plasminogen activator inhibitor de type 1 (PAI-1). Plus récemment, Lacroix et *al.* ont montré que les MP endothéliales stimulées par le tumor necrosis factor alpha (TNF-alpha) expriment des sites de liaison du plasminogène, notamment l'alpha-enolase qui joue un rôle primordial dans la fixation initiale du plasminogène via ses sites de fixation à la lysine. Les MP issues de cellules endothéliales constituent une surface catalytique pour une activation efficace du plasminogène par l'uPA ancré au récepteur uPAR de manière dose-dépendante, saturable et spécifique. La génération de plasmine à la surface des MP est augmentée par leur capacité à lier l'uPA exogène.(25) Ces MP peuvent également activer le plasminogène lié à la fibrine, à des protéines de la matrice extracellulaire ou aux plaquettes.(26) La présence d'autres récepteurs du plasminogène tels que l'annexine II a été mise en évidence à la surface de MP de différentes origines cellulaires.(27) In vivo, les MP dotées de cette fonction d'activation du plasminogène pourraient donc former et transporter la plasmine et développer non seulement une activité fibrinolytique mais participer également à la migration cellulaire et à l'angiogénèse.(12)

Origine cellulaire	Phénotype des MP	Marqueurs de fonction procoagulante	Marqueurs de fonction anticoagulante	Action de fonction fibrinolytique	Marqueurs de fonction antifibrinolytique
<b>Plaquettes</b>	PS CD41 CD42a,b	PS TF (±)	Aucun	Aucun	PAI-1
<b>Monocytes</b>	PS CD14 CD45 PSGL-1 CD15	PS TF	TFPI EPCR TM	u-PA / u-PAR	PAI-1
<b>Cellules endothéliales</b>	PS CD31 CD144 ICAM-1 VCAM-1 αβ3	PS TF	TFPI EPCR TM	u-PA / u-PAR t-PA α-enolase	PAI-1
<b>Cellules tumorales</b>	PS MUC-1 PECAM	TF++	TFPI	u-PA / u-PAR t-PA / annexine II	-

**Tableau 2.** Relations entre la composition des MP et leur fonction potentielle dans la coagulation et la fibrinolyse. D'après Lacroix et *al.*(28)

### ○ **Inflammation**

Les MP peuvent contribuer aux réponses inflammatoires par différents mécanismes. Par exemple, les MP issues des leucocytes stimulent l'expression de gènes pro-inflammatoires dans les cellules endothéliales. Ces gènes sont responsables in vitro de la production de cytokines (IL-6, TNF-alpha, IL-1bêta, IL-8) et de molécules d'adhésion permettant la fixation des leucocytes aux cellules endothéliales.(29,30) Ainsi dans certaines pathologies, l'augmentation et la présence prolongée de MP pourraient être nocives et contribuer à la détérioration vasculaire. Les MP pourraient aussi avoir une fonction bénéfique sur la réponse inflammatoire. Les MP des polynucléaires neutrophiles contiennent en effet de l'annexine I, protéine anti-inflammatoire active, qui inhibe l'interaction entre les leucocytes et les cellules endothéliales in vitro et dans certains modèles animaux in vivo.(31) Ainsi, les MP participent à des processus à la fois pro-inflammatoires et anti-inflammatoires, intervenant dans une réponse inflammatoire appropriée.

### **MP en pathologie humaine**

Si les MP sont présentes à faible concentration dans le plasma normal, des taux élevés de MP sont générés par différents mécanismes parmi lesquels on peut citer l'activation plaquettaire, les dommages vasculaires et endothéliaux directs, l'activité de la thrombine à la surface cellulaire, l'activation du système du complément, l'interaction anticorps antiPF4-héparine avec leur substrat.(2) Ces différents mécanismes physiopathologiques permettent d'attribuer un rôle aux MP dans de nombreuses situations cliniques.

#### 1) **Maladies cardiovasculaires**

De nombreuses études in vivo ont examiné l'association des MP avec différentes maladies cardiovasculaires.

- **Syndromes coronariens** : des taux élevés de microparticules d'origine endothéliale (EMP) (CD31+/42-) ont été décrits dans une étude incluant 84 patients souffrant de maladie artérielle coronaire.(32) Il y avait une corrélation directe entre les EMP et l'image angiographique. Les taux d'EMP étaient corrélés avec la morphologie et la sévérité de la sténose. Notamment une sténose de l'aorte descendante était associée à un nombre d'EMP circulantes plus important comparativement à une sténose de l'artère coronaire droite ou à une maladie tritronculaire coronarienne. Dans les sténoses sévères, le ralentissement du

flux sanguin entraîne une diminution de l'inflammation et des marqueurs inflammatoires, incluant les EMP. Au contraire, dans une sténose débutante, le flux sanguin reste important et la génération d'EMP est donc augmentée.(33) La présence d'EMP CD144+ a été décrite chez des patients souffrant de diabète de type II. Des taux élevés d'EMP CD144+ pourraient être prédictifs de maladie coronaire chez ces patients. Le rôle des EMP CD144+ est mal compris, mais il apparaît possible que ces EMP soient impliquées dans la néo-angiogénèse.(34,35) De même, des taux élevés de microparticules d'origine plaquettaire (PMP) ont été rapportés chez 54 patients souffrant de maladie coronaire stable, ce qui laisse supposer que les PMP pourraient constituer un marqueur d'état prothrombotique chez ce type de patients.(36) Différentes études récentes se sont intéressées aux MP dans l'infarctus du myocarde. L'activation plaquettaire et l'inflammation sont largement décrites au décours de cette affection. Dans ce contexte pathologique, l'activation plaquettaire serait associée à une augmentation de la génération de PMP mais aussi de MP d'origine monocytaire et endothéliale.(37) D'autre part, les EMP et PMP circulantes seraient corrélées au risque pour le myocarde chez les patients présentant un infarctus avec sus-décalage du segment ST, ce qui suggère que ces MP reflètent la sévérité des lésions endothéliales et de l'activation plaquettaire.(38)

- **Athérosclérose** : la nature systémique de l'athérosclérose est reflétée par les perturbations des MP observées chez des patients présentant des plaques d'athérome de localisation variable. Les patients avec des plaques carotidiennes ont des taux plus élevés de PMP que les sujets sans athérome carotidien, même après correction des risques cardiovasculaires.(39) Des taux élevés de MP d'origine leucocytaire (LMP) CD11a+ et d'EMP CD105+ sont associés à un remodelage interne des carotides chez les individus ayant l'épaisseur intima-media la plus grande, avant même que l'athérosclérose ait été détectée.(40) Les taux de PMP sont significativement corrélés à la fois à l'épaisseur intima-media et à la présence de sténose intracrânienne, mais les PMP ne peuvent prédire l'athérosclérose subclinique chez les sujets asymptomatiques.(41,42) Par ailleurs, chez les patients souffrant d'artériopathie oblitérante, les PMP sont augmentées par la chirurgie vasculaire, parallèlement aux cytokines pro-inflammatoires.(43) Les MP sont également produites dans les plaques d'athérome elles-mêmes, principalement par les cellules d'origine leucocytaire.(44) La démonstration de la présence d'immunoglobulines encapsulées dans les MP issues des plaques suggère leur rôle immunomodulateur potentiel. La vaste majorité des MP contenant des IgG est CD14+, cette caractéristique

indique leur origine monocytaire/macrophagique.(44) Le rôle biologique des MP issues des plaques d'athérosclérose est mal compris. Ces MP servent probablement de messager de régulation dans l'orchestration des réponses immunes et inflammatoires au niveau de la plaque. De plus, les MP isolées de lésions athéromateuses expriment CD40-ligand, activent les cellules endothéliales et stimulent la néovascularisation, la progression et la déstabilisation de la plaque.(45) Enfin, certaines MP favorisent l'inflammation vasculaire et l'expression de cytokines inflammatoires comme le TNF-alpha par les cellules endothéliales.(46) Même les plaques d'athérome stables relarguent des MP à potentiel procoagulant (principalement d'origine monocytaire et lymphocytaire) impliquées dans les processus d'apoptose.(47) Cependant, ces MP facilitent probablement l'athérogénèse et les états prothrombotiques, mais des études supplémentaires seraient nécessaires pour établir leur importance clinique et physiopathologique.(48)

- **Accident vasculaire cérébral (AVC) :** Compte tenu de leur rôle dans l'athérogénèse, l'inflammation et la thrombose, certaines études se sont intéressées à l'association entre MP et AVC. Des taux élevés de PMP ont été rapportés dans un travail sur les événements cérébraux vaso-occlusifs. Les auteurs ont conclu que l'augmentation des PMP suggérait un rôle de l'activation plaquettaire dans les accidents cérébro-vasculaires et plus particulièrement dans la maladie des petits vaisseaux, les accidents ischémiques transitoires, les infarctus lacunaires et la démence vasculaire.(49) Dans une étude incluant 405 sujets, des taux significativement plus importants de PMP ont été rapportés chez les patients présentant un AVC ischémique à la fois pendant l'AVC et 3 à 6 mois après, comparés aux patients sains.(50) Dans une autre étude plus petite, les taux d'EMP n'étaient pas significativement différents entre les patients chez qui un AVC avait effectivement été diagnostiqué et chez les patients suspects d'un AVC non confirmé.(51)
- **Facteurs de risque cardiovasculaires**
  - ✓ **Diabète :** De multiples études ont montré que les taux de MP sont plus élevés chez les sujets diabétiques que chez les sujets non diabétiques.(52,53) Dans une étude incluant 232 diabétiques de type 2 et 102 non diabétiques, les taux d'EMP étaient environ deux fois plus importants chez les diabétiques.(52) Les taux de MP ont également été associés aux complications du diabète. Par exemple, les diabétiques avec une maladie artérielle coronaire ont des taux d'EMP plus élevés que les diabétiques sans maladie coronaire.(52) De plus, il semble exister une association entre EMP et complications

macro-vasculaires, alors qu'aucune association avec des complications micro-vasculaires n'a été retrouvée chez les diabétiques.(54) Cependant, les taux de PMP sont plus importants chez les diabétiques souffrant de rétinopathie et augmentent avec le degré de sévérité de la pathologie.(55)

- ✓ **Hypertension :** Une étude de Preston et *al.* incluant 59 patients hypertendus a mis en évidence des taux plus élevés d'EMP chez les patients souffrant d'hypertension modérée (entre 142/96 et 195/127 mm Hg) par rapport à des sujets non hypertendus (entre 122/80 et 142/96 mm Hg), et des taux encore plus élevés chez les patients souffrant d'hypertension sévère (> 195/127 mm Hg). Les PMP étaient également augmentées dans le groupe de patients présentant une hypertension sévère. Une corrélation linéaire positive a été retrouvée entre les deux types de MP et les pressions systolique et diastolique.(56) Dans une autre étude de 83 patients, les EMP étaient deux fois plus abondantes dans les hypertensions non contrôlées > 152/89 mm Hg que chez les patients normotendus, tandis que les hypertensions bien contrôlées étaient accompagnées d'un taux significatif environ à mi-chemin entre les taux des deux autres groupes.(57) Une autre étude sur des échantillons issus de 125 patients a retrouvé des concentrations plus faibles d'EMP, mais les patients avec une tension artérielle très élevée > 154/80 mm Hg présentaient les taux de MP les plus élevés.(58) Cependant, certaines études ne retrouvent aucune corrélation entre hypertension et taux de MP.(32,33,59)
- ✓ **Syndrome métabolique :** Des études récentes se sont intéressées aux MP et à leurs effets sur la fonction endothéliale et le stress oxydatif dans le cadre du syndrome métabolique.(60,61) Helal et al. ont retrouvé des comptes significativement augmentés de MP annexine-V positives (TMP), PMP, de MP d'origine érythrocytaire (ErMP) et d'EMP chez les patients présentant un syndrome métabolique, comparés à des sujets contrôles. Par contre, les LMP et les MP issues des granulocytes neutrophiles étaient en proportions similaires entre les deux groupes. En analyse multivariée, il a été montré que chaque critère du syndrome métabolique influençait le nombre de TMP. La taille et le poids sont déterminants pour les taux de PMP et EMP et la tension artérielle est corrélée au taux d'EMP. La glycémie est corrélée positivement au taux de PMP alors que la dyslipidémie influence les EMP et ErMP. Les marqueurs de stress oxydatif (glutathion peroxydase, prostaglandine F2 alpha) influencent indépendamment les taux de TMP et de PMP (ce qui n'est pas le cas des marqueurs inflammatoires). Ainsi les MP pourraient représenter un marqueur de stratification du

risque ou une cible pharmacologique qu'il serait intéressant d'explorer dans le contexte des syndromes métaboliques.(61)

- ✓ **Insuffisance rénale chronique et néphropathies** : Les patients insuffisants rénaux chroniques sont à haut risque d'événements cardiovasculaires et présentent une dysfonction endothéliale qui joue un rôle critique dans l'athérosclérose. Une étude publiée en 2006 montre que les taux d'EMP sont significativement plus élevés chez les patients insuffisants rénaux chroniques que chez les sujets sains. Cette constatation laisse envisager l'utilisation du dosage des EMP comme nouveau marqueur de la dysfonction endothéliale dans l'insuffisance rénale. Des taux augmentés de TMP et de PMP ont également été décrits dans le groupe des insuffisants rénaux chroniques.(35) Une autre étude de Huang et al. a rapporté que, dans une cohorte de patients présentant une hypertension artérielle, les EMP étaient associées au degré d'albuminurie. Les patients chez qui une microalbuminurie était retrouvée présentaient une concentration d'EMP 1.7 fois supérieure à celle des sujets sans albuminurie, et les patients ayant une macroalbuminurie avaient des taux 2.9 fois supérieurs.(58)

## 2) Maladies auto-immunes et/ou inflammatoires

- **Syndrome des antiphospholipides (SAPL)** : une étude récente de Vikerfors et *al.*(62) comparant 52 patients présentant un SAPL et 52 patients contrôles a rapporté des taux plus élevés d'EMP exposant du FT et de MP d'origine monocyttaire dans le groupe SAPL. A contrario des autres études sur ce sujet, les nombres de PMP ne différaient pas entre les deux groupes. Les EMP semblent ainsi participer au mécanisme pathogène à l'origine des complications thrombotiques dans cette pathologie.(63)
- **Lupus érythémateux systémique (LES)** : Le LES est une maladie auto-immune systémique dont les critères diagnostiques incluent la présence de certains auto-anticorps (anti-nucléaires de type anti-ADN natif essentiellement ou bien anti-antigènes nucléaires solubles de type anti-Sm ou anti-Ro, ou encore d'antiphospholipides...).(64) L'observation, dans le LES, d'une clairance défectueuse des cellules en apoptose, associée à l'exposition d'antigènes nucléaires durant l'apoptose, a permis d'évoquer l'hypothèse que des débris apoptotiques pourraient constituer une source d'auto-antigènes capables de déclencher une maladie auto-immune. Dans le LES, les MP pourraient alors constituer des

supports d'auto-antigènes et de composants des complexes immuns. Nielsen et *al.* ont montré que les patients souffrant de LES présentent des taux diminués de MP liant l'annexine V et de PMP, LMP et EMP. Par contre, des taux augmentés de MP ne liant pas l'annexine V ont été retrouvés.(65) La même équipe a par la suite rapporté que les patients souffrant de LES présentent des taux de MP IgG-positives plus importants que des sujets témoins. De plus, les MP des patients atteints de LES portent significativement plus d'IgG, d'IgM et de C1q que les MP des sujets contrôles. Enfin, la moyenne du portage d'IgG par MP serait associée à de plus faibles concentrations de MP, à la présence d'anticorps anti-C1q et à une consommation du complément.(66)

- **Purpura thrombotique thrombocytopénique (PTT) :** Le PTT est caractérisé par un défaut de clivage des multimères de grande taille du facteur von Willebrand (vWF) dans la circulation. Dans des conditions normales, ces multimères pro-thrombotiques issus des corps de Weibel-Palade sont rapidement lysés par une métalloprotéase plasmatique. Dans le PTT, une déficience quantitative ou qualitative de cette protéase entraîne la formation d'agrégats plaquettaires liés par le vWF.(67) Des taux élevés de PMP circulent pendant les phases aiguë et chronique du PTT et ces MP expriment la calpaïne à leur surface.(68) De plus, des taux élevés d'EMP ont été décrits dans le PTT. Ces EMP pourraient être un marqueur précoce de PTT, précédant la thrombopénie et l'augmentation des lactates déshydrogénases (LDH).(69) L'activation des calpaïnes est fortement associée à la génération précoce de MP dans le PTT.(70) Cette enzyme semble être impliquée dans l'expression de récepteurs plaquettaires tels que GP Ib-IX, mais également dans la destruction de la liaison entre la membrane cellulaire et le cytosquelette cellulaire.(71)
- **Purpura thrombocytopénique idiopathique (PTI) :** La physiopathologie du PTI repose sur un mécanisme immunologique au cours duquel les plaquettes recouvertes d'anticorps sont détruites par les macrophages. Cependant, d'autres mécanismes sont impliqués, qui mettent tous en jeu une fragmentation ou une lyse des plaquettes induisant la génération de PMP procoagulantes.(72) Une étude pédiatrique rapporte que des taux élevés de PMP dans le PTI semblent protéger les patients contre les manifestations hémorragiques sévères. La mesure des PMP pourrait alors avoir un rôle dans la prise en charge du PTI.(73)

- **Polyarthrite rhumatoïde** : les MP issues de plasmas de patients souffrant de polyarthrite rhumatoïde exposent des composés du système du complément (C1q, C3, C4) et différents activateurs du système du complément (par exemple la protéine C réactive ou CRP).(74)

### 3) Sepsis

Des MP circulantes d'origine monocyttaire, plaquettaire et endothéliale sont retrouvées chez les patients souffrant de sepsis. Leur contribution au processus pathologique est mal connu, mais la présence de ces MP pourrait prédire une évolution favorable dans les sepsis sévères.(75,76) Ces MP diffusent un potentiel pathogène oxydatif, pro-adhésif, pro-inflammatoire et prothrombotique susceptible de pérenniser l'atteinte vasculaire.(77) L'exposition des monocytes au lipopolysaccharide (LPS) bactérien entraîne la génération de MP qui expriment le FT, contribuant probablement à l'état procoagulant associé au sepsis. Nieuwland et *al.* ont démontré in vitro que la génération de thrombine par les MP de patients présentant un sepsis méningococcique est bloquée si l'échantillon est incubé avec des anticorps monoclonaux anti-FT ou anti-FVII.(78) De plus, les PMP augmentent l'adhésion des monocytes à l'endothélium et stimulent le chimiotactisme des monocytes.(75)

### 4) Néoplasies

La présence de microvésicules chez les patients souffrant de cancers est connue depuis la fin des années 1970.(79) Les MP dérivées des tumeurs portent des marqueurs moléculaires spécifiques typiques de leurs cellules d'origine, comme des molécules d'adhésion de cellules épithéliales (EpCam), le human epidermal growth receptor 2 (HER2), des métalloprotéinases extracellulaires, le vascular endothelial growth factor (VEGF)...(80–83) L'importance des MP dans la communication intercellulaire au cours des cancers a été récemment découverte. Différents groupes ont décrit le transfert de protéines oncogéniques et de chimiokines entre les cellules par des MP dérivées de tumeurs.(84,85) De nombreux effets sont attribués à ces MP : augmentation de la survie cellulaire tumorale (diminution de l'apoptose, résistance aux chimiothérapies), échappement à la surveillance immune (résistance au complément, suppression des réponses T, mimétisme de l'environnement), invasion (dégradation de l'environnement, stimulation de l'angiogénèse, prolifération métastatique).(86) La concentration de ces MP augmente au cours de la phase de progression de la tumeur.(18,83) Les MP ne proviennent pas uniquement des cellules tumorales mais également des plaquettes, des cellules endothéliales et des cellules inflammatoires péri-tumorales. Les MP exposant du

FT participent à la physiopathologie des coagulopathies associées aux cancers.(81) Ainsi, en oncologie, les MP pourraient représenter des biomarqueurs dont les applications diagnostiques, pronostiques et thérapeutiques restent à exploiter.

#### 5) Maladies thrombotiques

- **Thrombose veineuse :** Des taux élevés de MP ont été associés à une liste croissante de situations pathologiques (désordres hématologiques, diabète, syndrome métabolique, désordres inflammatoires, cancers...) qui partagent la thrombose comme comorbidité.(87) Heresi et *al.* ont montré que les EMP (CD31+, CD51+, CD54+, CD62+) et les PMP (CD42+) sont abondantes lors des thromboses veineuses.(88) Rectenwald et *al.* ont montré que le niveau de PMP, combiné aux dosages des D-Dimères et de la P-sélectine, est significativement corrélé au diagnostic de thrombose veineuse profonde (sensibilité 73%, spécificité 81%).(89) Comme décrit précédemment dans la partie concernant les fonctions physiologiques des MP, le rôle prothrombotique des MP repose sur deux principaux mécanismes, la présentation d'une surface permettant la formation des complexes prothrombinase et ténase dans la circulation et l'expression du FT. Cependant, certaines MP expriment le TFPI qui réduit la tendance à la formation de thrombus. Un déséquilibre de la balance prothrombotique / anti-thrombotique des MP les implique dans la génération ou la prévention de la thrombose. Cette balance est encore mal comprise et reste à élucider.(2) Un autre mécanisme par lequel les MP pourraient contribuer à la thrombose repose sur leur capacité à activer directement les cellules. Une étude a montré *in vitro* que les neutrophiles activés génèrent des MP qui exposent l'intégrine CD11b/CD18 dans une conformation active capable de lier la GPIb alpha et d'activer les plaquettes.(90) Il a également été démontré que les MP ne sont pas uniquement augmentées dans la génération du thrombus mais aussi dans l'évolution de ce dernier suite à la thrombose veineuse.(91) De plus, il a été constaté que la P-sélectine et l'E-sélectine (glycoprotéines d'adhésion présentes sur les plaquettes et les cellules endothéliales) sont up-régulées dans les événements thrombotiques. Ces glycoprotéines recrutent les MP et amplifient l'extension du thrombus.(91) Récemment, une étude de Coleman et *al.* intègre les MP dans les nouveaux biomarqueurs plasmatiques offrant une aide au diagnostic de la maladie thromboembolique veineuse.(92)

- **Thrombopénie induite par l'héparine (TIH) :** La TIH repose sur un mécanisme immunologique consécutif à une exposition à l'héparine. Des anticorps (IgG dans la majorité des cas) dirigés contre l'héparine sont produits. Ils se lient au facteur 4 plaquettaire (PF4) situé à la surface des plaquettes. Les complexes héparine-IgG-PF4 qui en résultent se lient aux récepteurs Fc des plaquettes et cette interaction est à l'origine d'une activation plaquettaire. Les plaquettes activées constituent une surface procoagulante qui expose de la P-sélectine et de la PS, et génèrent des MP qui expriment également la P-sélectine et la PS. La thrombose est la complication la plus redoutée des TIH. Les complexes héparine-IgG-PF4 peuvent en effet lier et activer directement les cellules endothéliales, contribuant ainsi à l'état procoagulant.(93,94) Une étude pilote de Mullier et *al.* propose l'utilisation en routine d'un test de génération de PMP pour le diagnostic des TIH. Ce test est basé sur la génération de PMP par des plaquettes-témoin en présence d'héparine et de plasma pauvre en plaquettes (PPP) du patient chez qui une TIH est suspectée. La détection des PMP est réalisée par cytométrie en flux (CMF). Le but est de mettre au point un test fonctionnel plus spécifique que les analyses sérologiques déjà existantes. Ce test serait plus facile d'utilisation, plus rapide et aussi précis que le test de libération de la sérotonine marquée au <sup>14</sup>C (aujourd'hui le gold standard).(95) Récemment, l'équipe de Kasthuri et *al.* s'est intéressé aux effets du complexe héparine-IgG-PF4. Ils ont montré que ce complexe augmente l'expression du FT dans les monocytes et le relargage de MP TF+. Cette étude suggère également la participation du FT monocyttaire dans le développement de thromboses chez les patients souffrant de TIH.(96)

#### 6) MP et hémopathies

- **Hémoglobinurie paroxystique nocturne (HPN) :** l'HPN est une maladie clonale acquise des cellules souches hématopoïétiques. Les manifestations cliniques sont variables et incluent une anémie hémolytique, des thromboses des vaisseaux de moyen et gros calibres (veines hépatiques, abdominales, cérébrales et dermiques) et un déficit modéré à sévère de l'hématopoïèse pouvant entraîner une pancytopénie. La maladie est due à des mutations somatiques du gène *PIG-A* situé sur le chromosome X, codant pour une protéine nécessaire à la biosynthèse du glycosylphosphatidylinositol (GPI). La mutation a lieu dans une ou plusieurs cellules hématopoïétiques et entraîne un déficit (total ou partiel) de toutes

les protéines qui s'attachent normalement à la surface de la membrane cellulaire grâce à l'ancre GPI. Le diagnostic repose sur la mise en évidence, par CMF, d'un déficit en protéines GPI-dépendantes dans les globules rouges et les leucocytes. Dans l'HPN, les érythrocytes ne peuvent pas exprimer les protéines GPI-dépendantes CD55 et CD59. Or CD55 inactive le composé C3b du complément et CD59 protège de l'attaque du complément en bloquant la formation du complexe d'attaque membranaire. Les hématies ne sont donc plus protégées contre l'hémolyse complément-dépendante. Les MP sont augmentées dans la circulation des patients atteints d'HPN. Ces MP sont dérivées des plaquettes, des monocytes et des cellules endothéliales, cependant la capacité des érythrocytes à libérer des MP est détériorée. Dans l'HPN, il a été démontré que les MP possèdent une activité prothrombotique, offrant une explication à l'incidence élevée des thromboses dans cette pathologie. De plus, les MP issues de l'activation du complément (C5b-9) présentent une forte expression de sites de liaison pour les facteurs Va et VIIIa, contribuant ainsi à l'état prothrombotique.(97) Les MP circulantes dans l'HPN expriment les marqueurs endothéliaux CD54 (ICAM-1), CD144 (VE-cadherin) et CD105 (endogline), indiquant l'activation endothéliale chronique.(98) CD144 et CD105 sont dérivés des jonctions des cellules endothéliales et possèdent une demi-vie très courte dans la circulation. Leur présence dans l'HPN est donc le signe d'une persistance de dommages endothéliaux associés à l'hémolyse chronique (une association similaire est retrouvée dans la drépanocytose).(99)

- **Drépanocytose** : des MP peuvent être détectées dans la circulation de patients souffrant de drépanocytose à la fois durant les crises et la phase chronique. Au cours de cette dernière, caractérisée par une hémolyse chronique, les MP retrouvées sont d'origine endothéliale, plaquettaire et monocyttaire. Les EMP décrites dans la drépanocytose sont CD54-, CD144+ (VE-cadherin), CD105+ (ICAM-1). CD105, comme indiqué ci-dessus, dérive d'une portion de jonction de cellules endothéliales et signe les dommages endothéliaux chroniques décrits au cours de la phase chronique de la drépanocytose. Il existe une corrélation directe entre hémolyse et EMP démontrée par l'augmentation des LDH plasmatiques et des réticulocytes. Ainsi, la mesure des MP pendant la phase chronique se présente comme un outil permettant de surveiller l'activité de la maladie, d'évaluer l'effet des traitements ou de prévenir la récurrence des crises. Durant les crises, les dommages endothéliaux et l'activation de la coagulation augmentent dramatiquement,

s'accompagnant d'une élévation détectable des taux de MP d'origine plaquettaire, endothéliale, érythrocytaire et monocyttaire.(99)

- **Syndromes myéloprolifératifs (SMP) :** peu d'études se sont intéressées aux MP dans le cadre des SMP. Villmow et *al.* ont étudié par CMF les PMP dans le cadre de leucémies myéloïdes chroniques (LMC), de polyglobulie de Vaquez (PV), de myélofibrose chronique (MF) et de thrombocytémie essentielle (TE). Le pourcentage de PMP était significativement plus important dans les groupes de patients souffrant de PV (12%), MF (11%) et TE (11%) par rapport aux sujets sains (5.2%). Cette augmentation des PMP reflète d'une part l'activation plaquettaire dans les SMP et participe d'autre part à la compréhension des mécanismes physiopathologiques à l'origine des événements thrombotiques observés dans les SMP.(100) Concernant l'étude des MP dans le contexte TE, nous décrirons l'état actuel des connaissances dans le chapitre concernant les thrombocytoses.

### **c. Détection et caractérisation des microparticules**

L'étude des MP n'est pas standardisée et reste pour le moment principalement réservée au domaine de la recherche. La cytométrie en flux semble s'imposer comme la technique la plus aisément adaptable au travail de routine. D'autres techniques sont également utilisées pour détecter et/ou caractériser les MP.

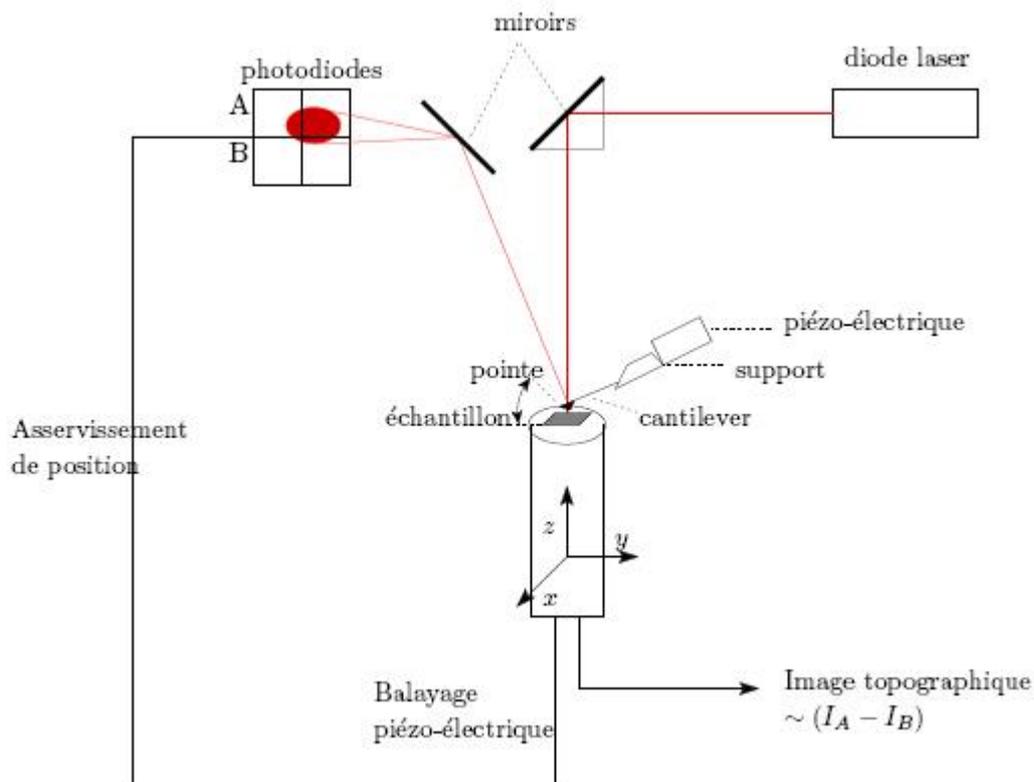
#### **o Microscopie à force atomique (AFM pour atomic force microscopy) :**

Le microscope à force atomique est un microscope à sonde locale permettant de visualiser la topographie tri-dimensionnelle de la surface d'un échantillon. Cette technique permet de réaliser la cartographie locale des grandeurs physiques caractéristiques de l'objet sondé (force, capacité, intensité de rayonnement, courant...), mais également de travailler dans des environnements particuliers tels que les milieux sous vide, liquides ou ambiants. Le microscope à force atomique balaye la surface d'un échantillon grâce à une pointe très fine, positionnée à l'extrémité libre d'un micro-levier flexible, pouvant se déplacer dans toutes les directions de l'espace, grâce à un tube piézoélectrique. L'analyse des flexions du micro-levier permet de déterminer l'exact parcours de la pointe, ainsi que la mesure des forces d'interactions intervenant entre elle et l'échantillon. L'AFM se décline sous trois modes principaux : le mode contact, le mode contact intermittent ou « tapping » et le mode non

contact. La détection consiste à mesurer la déviation du levier, le plus souvent au moyen de la réflexion d'un laser.(101) (**Figure 2**) La détection est tellement sensible que des forces de l'ordre du pico-Newton peuvent être mesurées. L'avantage de cette technique dans l'étude des MP est l'utilisation du « tapping mode » dans un fluide. La pointe est oscillante dans le liquide pour créer un contact intermittent avec la surface de l'échantillon, permettant la préservation des propriétés des particules dans leur état physiologique.

Dans les autres modes, une surface plane sur laquelle des protéines ou des anticorps sont liés de façon covalente est nécessaire pour la fixation des MP.(102)

Ainsi, l'AFM présente l'intérêt de détecter les MP avec une force minimale, tout en préservant leur état naturel et avec une limite de détection inférieure à celle de la CMF conventionnelle. En effet, récemment Yuana et *al.* ont décrit par AFM la détection de MP dont la taille était comprise entre 10 et 475 nm.(103) Cette technique permet de détecter des MP individuelles et simultanément de mesurer leur taille en trois dimensions. De plus, les nombres de MP attachées à la surface peuvent être quantifiés en utilisant un logiciel de traitement d'images. Quand un anticorps spécifique est utilisé, une sous-population de MP peut être retrouvée. Cependant, bien que cette technique permette de travailler dans un fluide, les MP doivent préalablement être isolées du plasma et concentrées avant l'analyse. Yuana et *al.* proposent ainsi une centrifugation du PPP suivie d'une élimination du surnageant et d'une remise en suspension du culot riche en MP avec un tampon Hepes, enfin une dernière centrifugation permet l'obtention d'un culot sur lequel l'analyse sera réalisée.(103) Cette étape d'isolement peut influencer la morphologie et le nombre de MP. L'AFM est plus appropriée à la caractérisation qu'à la quantification des MP. Actuellement, la détection des MP par AFM est longue (généralement deux heures par échantillon), il serait essentiel d'apporter des modifications permettant une détection plus rapide de populations spécifiques de MP dans le plasma pour améliorer cette technique.(8)



**Figure 2.** Principe de fonctionnement d'un microscope à force atomique.(101)

### ○ Analyse protéomique par spectrométrie de masse

La spectrométrie de masse basée sur l'analyse protéomique représente un moyen de caractériser la composition protéique des MP. Cette méthode requiert une extraction des MP, une séparation sur gel, une digestion par la trypsine, l'analyse par spectrométrie de masse et enfin l'identification des protéines. Ainsi, la technique permet l'identification de différentes protéines dans un mélange complexe. Cependant, la quantification des protéines est difficile et la présence de protéines plasmatiques abondantes telles que l'albumine et les immunoglobulines peut affecter les résultats. Différents groupes se sont intéressés aux protéines des PMP obtenues à partir de surnageants de plaquettes stimulées par l'ADP ou de plasmas.(104–106)

### ○ Capture en phase solide

Les analyses de MP par capture reposent sur un principe immunologique proche de la technique ELISA (enzyme linked immunosorbent assay). Des puits sont recouverts d'anticorps ou d'annexine V pour lier spécifiquement des MP plasmatiques. Les MP « capturées » peuvent ensuite être quantifiées et caractérisées en utilisant un second anticorps

(107) ou une propriété fonctionnelle (par exemple l'activité procoagulante).(108–110) Actuellement, peu d'études sont rapportées avec cette approche puisque la cinétique de capture des MP reste mal connue. Cette méthode présente les avantages de travailler directement dans le plasma et d'étudier des sous-populations de MP avec un haut débit. Cependant, les analyses par capture ne donnent pas d'information sur la taille et le nombre total de ces MP plasmatiques. D'autres problèmes sont liés à l'utilisation d'anticorps et influencent le nombre de MP « capturées » : présence éventuelle d'antigènes solubles pouvant interférer, spécificité et affinité de l'anticorps pour son antigène cible, quantité d'anticorps fixée dans les puits. A côté des facteurs analytiques, les étapes pré-analytiques telles que le prélèvement sanguin, l'obtention du plasma ou le stockage affectent les concentrations de MP observées par cette technique et leur impact reste à l'heure actuelle peu documenté dans la littérature.(8)

- **Test fonctionnel mesurant l'activité procoagulante : *procagulant phospholipid* (STA<sup>®</sup>-Procoag PPL)**

Commercialisé par Stago, ce test permet d'évaluer la présence de MP ayant à leur surface de la PS. Il consiste à mesurer, en présence de calcium, l'activité procoagulante d'un échantillon contenant des MP avec ajout d'un plasma substrat déplété en phospholipides procoagulants.(15) Le test devient donc dépendant des phospholipides procoagulants contenus dans l'échantillon testé. Un réactif (facteur Xa bovin) permet de déclencher la réaction au niveau du facteur Xa. Le temps de coagulation du mélange (plasma du patient + plasma déplété en phospholipides procoagulants) est ainsi mesuré. Un raccourcissement du temps de coagulation d'un échantillon par rapport aux valeurs usuelles est le signe d'une augmentation des phospholipides procoagulants donc de MP dans l'échantillon.

- **Diffusion dynamique de la lumière (*dynamic light scattering* DLS)**

Le DLS, aussi dénommé spectroscopie par corrélation de photons (*photon correlation spectroscopy*) ou *quasi-elastic light scattering*, détermine, dans un fluide, la distribution de taille relative de particules entre 1 nm et 6 µm.(111) Les particules se déplacent continuellement dans le fluide dans toutes les directions et entrent en collision avec les molécules de solvant. Ce phénomène est à l'origine d'une mobilité aléatoire des particules appelée mobilité brownienne. La vitesse de distribution dépend de la température, de la viscosité et du diamètre des particules. Les plus petites particules possèdent le mouvement brownien le plus important. Les particules subissant le mouvement brownien créent des

fluctuations d'intensité du *light scatter* qui sont généralement mesurées sur 30 secondes. La distribution relative à la taille est obtenue à partir de ces variations d'intensité de la lumière diffusée en appliquant un algorithme mathématique (relation de Stokes-Einsten). La mesure de la distribution de taille est fortement influencée par la présence de petites quantités de particules plus grandes (les plaquettes par exemple) qui dispersent mieux la lumière que les petites particules. De plus, les résultats dépendent de l'algorithme mathématique appliqué. Cette technique ne donne pas d'information sur la composition biochimique ou sur l'origine cellulaire des MP.(112,113)

- ***Nanoparticles tracking analysis (NTA)***

Comme le DLS, le NTA mesure le mouvement brownien des particules dans un fluide. Cette technique mesure la distribution de taille de particules entre 50 nm et 1 µm. Les particules sont éclairées par un faisceau laser et la diffusion de la lumière est collectée par un microscope optique conventionnel. Le NTA mesure le mouvement de chaque particule (au contraire du DLS qui analyse toutes les particules en même temps) grâce une analyse de suivi d'image (acquisition sur une à plusieurs minutes). Comme la précédente, cette technique ne donne pas d'information sur la composition biochimique ou sur l'origine cellulaire des MP.(112)

- ***Microscopie à transmission d'électrons (transmission electron microscopy TEM)***

La TEM utilise des électrons à la place des photons pour créer une image. Un système de lentilles magnétiques permet de transformer l'image électronique en image optique. La résolution dépend principalement de la stabilité spatiale du faisceau d'électrons ainsi que de la stabilité chimique de l'échantillon. La résolution peut être inférieure à 1 nm et permettre ainsi de déterminer la taille et la morphologie des MP. Comme la TEM est réalisée sous vide, l'échantillon nécessite une fixation et une déshydratation pouvant affecter la taille et la morphologie des MP. De plus, leur concentration doit être augmentée par (ultra)centrifugation. Les résultats dépendent donc considérablement des conditions pré-analytiques et la concentration de MP ne peut pas être déterminée. Avec un immunomarquage à l'or colloïdal, il est possible de fournir des informations biochimiques. Le temps d'analyse est de l'ordre de quelques heures.(8,114)

### ○ **Cytométrie en flux**

La CMF est communément utilisée pour l'étude des MP puisqu'il s'agit d'une technique rapide qui permet à la fois de dénombrer les MP et de déterminer leur origine cellulaire.(115) La CMF examine la diffusion de la lumière par les cellules et particules en suspension ainsi que leur fluorescence (consécutive à un marquage par des anticorps conjugués à des fluorochromes) lorsque celles-ci passent dans un flux appelé liquide de gaine. La mesure du nombre de MP est basée sur la lumière diffusée par chaque MP vers l'avant (proportionnelle à leur taille, ou forward scatter, FSC) et sur le côté (proportionnelle à leur granulosité et leur structure ou side scatter, SSC).(112)

Pour obtenir des concentrations ou des valeurs absolues de MP dans un échantillon, des billes de comptage peuvent être utilisées. Il s'agit de microsphères en polypropylène ou de billes de latex calibrées qui sont fluorescentes dans un large éventail de longueurs d'onde d'excitation et d'émission. Elles peuvent être utilisées comme standard interne. Les billes sont alors additionnées à l'échantillon avant l'acquisition. Si elles sont utilisées comme standard externe, les billes sont traitées séparément et dans les mêmes conditions et réglages que les échantillons. Le cytomètre compte le nombre de billes et/ou de MP dans l'échantillon pendant un temps d'acquisition défini. Avec les nombres de MP obtenus, les concentrations de MP dans le plasma peuvent être calculées.

Les réglages de l'appareil sont cruciaux car la population de MP est définie en utilisant des billes de calibration de taille connue. Des billes de 1  $\mu\text{m}$  de diamètre peuvent être utilisées pour définir la limite supérieure de la fenêtre des MP et discriminer les MP des plaquettes. Il est également possible d'utiliser un mélange de billes fluorescentes présentant des diamètres de 0.5, 0.9 et 3  $\mu\text{m}$  (billes Megamix) pour couvrir la population des MP (0.5 et 0.9  $\mu\text{m}$ ) et celle des plaquettes (0.9 et 3  $\mu\text{m}$ ). (8,116–118)

L'origine cellulaire des MP peut être déterminée en les marquant au préalable avec des anticorps fluorescents. Dans le cytomètre, la fluorescence émise après excitation par le(s) faisceau(x) laser traverse une série de filtres dichroïques puis des détecteurs de fluorescence appropriés (photomultiplicateurs) permettent la détection d'antigène(s) sur les MP. La corrélation du signal fluorescent avec la diffusion de la lumière pour l'ensemble des événements mesurés est utilisée pour identifier et compter une sous-population de MP particulière. Cette approche est toutefois dépendante de la spécificité et de l'affinité de l'anticorps pour sa cible antigénique et du nombre d'antigènes présents à la surface des MP.(8)

L'annexine V est une protéine possédant une forte affinité pour la PS. En CMF, un marquage fluorescent par l'annexine V est communément utilisé pour mesurer le nombre total de MP, bien qu'il existe, comme décrit plus haut, des MP n'exposant pas la PS. La liaison de l'annexine V à la PS est influencée par la concentration de calcium et la quantité de PS membranaire.(13,119) De plus, le calcium peut précipiter avec le phosphate dans le tampon phosphate (phosphate-buffered saline : PBS) le plus communément utilisé. Les micro-précipités qui en résultent peuvent mimer des MP et ainsi fausser le nombre de MP observées.(120) Par conséquent, les concentrations en calcium et en phosphate du tampon annexine V doivent être choisies de sorte que le marquage annexine V-MP et le nombre de MP soient optimaux. Enfin, les tampons contenant du calcium peuvent initier la cascade de coagulation et interférer dans la mesure des MP. Une étude publiée en 2012 propose donc d'utiliser de faibles quantités d'héparinate de sodium pour inhiber la coagulation du PPP citraté. L'héparine possède un effet activateur connu sur les plaquettes, mais les résultats de cette étude réalisée à partir d'échantillons congelés ne rapportent pas d'effet activateur sur les MP ni d'interférence sur les nombres de MP observés.(7)

Un marquage par la lactadhérine, une protéine dérivée du lait, peut également détecter la présence de PS. Des résultats similaires à ceux obtenus avec l'annexine V ont été obtenus.(121) La lactadhérine présente l'intérêt de détecter les PM PS+ dans un environnement ne contenant pas de calcium. Cependant, encore peu d'études ont été réalisées avec cette protéine. D'autres marqueurs tels que le bio-maléimide, la phalloïdine ou le calcein acétoxyméthyl ester ont récemment été proposés pour améliorer la détection des MP.(122–124)

La CMF utilise des anticorps spécifiques marqués pour identifier l'origine cellulaire des MP. Ces anticorps peuvent être dirigés contre des marqueurs plaquettaires, leucocytaires, endothéliaux, érythrocytaires, mais aussi contre des marqueurs de cellules malignes. Une liste de ces marqueurs est proposée dans le **Tableau 3**.

Les résultats obtenus par CMF dépendent du type d'instrument, des réglages de l'appareil et de la résolution. En 2010, l'ISTH SSC Working Group on Vascular Biology a proposé l'utilisation de billes calibrées de 0.5, 0.9 et 3  $\mu\text{m}$  (Megamix, BioCytex, Marseille, France) pour ajuster les réglages de l'instrument et augmenter la résolution du cytomètre. Quarante laboratoires de 14 pays ont participé à cette étude. Différents types de cytomètres étaient utilisés par ces laboratoires : FACSCalibur, FACSCanto II, LSR II (Becton Dickinson, San Jose, CA), EPICS XL, Gallios, FC500 (Beckman Coulter, Miami, FL). Les buts étaient de standardiser le compte de PMP de plus de 0.5  $\mu\text{m}$  par CMF et de définir la sensibilité inter-

instruments en travaillant avec les mêmes anticorps marqués et les mêmes plasmas congelés. Les résultats de l'étude ont démontré l'utilité des billes Megamix pour la standardisation de la mesure des PMP par CMF.(117,118) Plus récemment, Robert et al. se sont intéressés à la mesure de MP de petite taille, puisque la sensibilité du FSC en CMF standard limite l'étude des MP aux MP de plus de 0.5  $\mu\text{m}$ . Cette étude propose ainsi un nouveau protocole standardisé de CMF haute sensibilité pour dénombrer les MP grâce à une calibration par des microbilles fluorescentes de 0.1 à 0.9  $\mu\text{m}$  (billes Megamix-plus avec quatre diamètres : 0.1, 0.3, 0.5, 0.9  $\mu\text{m}$ ) et compare les résultats de la CMF standard avec ceux de la CMF haute sensibilité. La CMF haute sensibilité repose sur l'utilisation de l'option « W2 » des instruments de type Gallios ou Navios (Beckman Coulter) qui permet d'augmenter la résolution du FSC en amplifiant la collection de la lumière diffusée avec des angles larges (**Figure 3**). La stratégie standardisée décrite définit une fenêtre exacte (0.3 à 1  $\mu\text{m}$ ) comme le meilleur compromis entre une bonne résolution et un bruit de fond qui ne gêne pas les performances du cytomètre. Les résultats de l'étude mettent en évidence une augmentation significative du nombre de MP détectées avec la CMF haute sensibilité en comparaison avec la CMF standard (à la fois pour les TMP, EMP, LMP et ErMP).(125)

La mesure des MP par CMF n'est pas uniquement influencée par les facteurs analytiques (laser, anticorps, type de cytomètre, calibration de l'instrument) mais aussi par les étapes pré-analytiques de préparation et de stockage des PPP qui constituent les échantillons à analyser. Lacroix et al. ont étudié l'impact des paramètres pré-analytiques sur la mesure des MP circulantes. Le pré-analytique se présente comme une source de variabilité importante puisqu'une activation cellulaire se produit facilement pendant la préparation de l'échantillon et le stockage, générant des MP ex vivo. L'élimination complète des plaquettes est nécessaire avant la congélation du plasma. D'après cette étude, trois points pré-analytiques sont majeurs : le délai avant la 1ère centrifugation, l'agitation pendant le transport et le protocole de double centrifugation permettant d'obtenir le PPP. Une approche standardisée requiert donc un contrôle strict de la phase pré-analytique, Lacroix et al. proposent un protocole standardisé résumé dans le **Tableau 4**.(126)

L'analyse des MP sur le cytomètre à partir du PPP peut être réalisée de deux manières : après une procédure d'isolement des MP ou directement dans le PPP. En 2012, Iversen et al. ont proposé une méthode de CMF directe à partir du PPP et l'ont comparée à une technique établie décrite par Biró en 2007 qui consiste à travailler sur des suspensions de MP lavées.(7,74) (**Tableau 5**) L'analyse directe à partir du PPP présente de nombreux intérêts : prévention de la perte de MP due aux lavages pendant la phase d'isolement des MP,

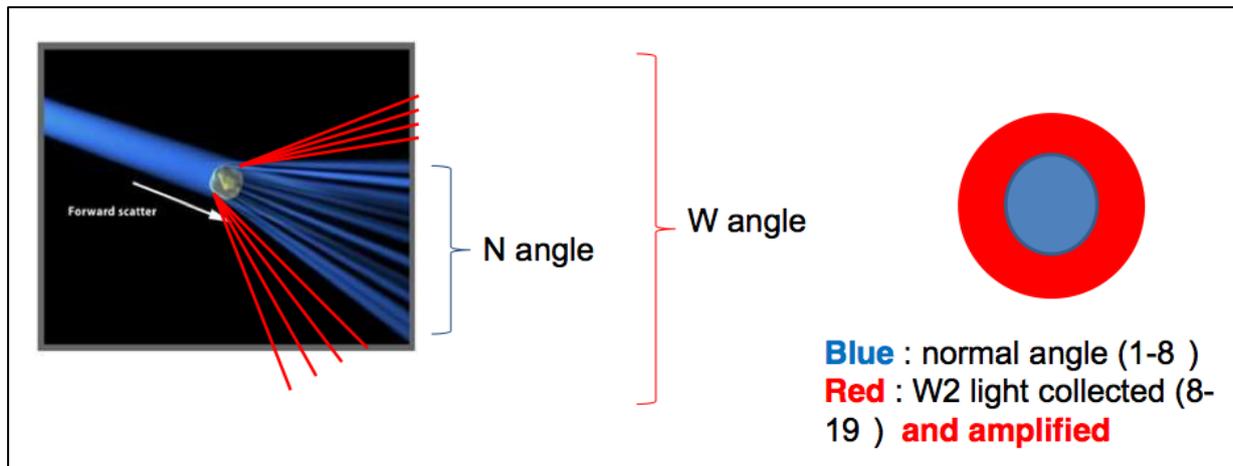
préservation de leur morphologie, réduction de la charge et du temps de travail, diminution de la variabilité liée aux manipulations, diminution de la consommation de matériel. Cependant, cette méthode directe nécessite de plus grandes concentrations d'anticorps et par conséquent en augmente le coût. Les résultats montrent une bonne corrélation entre analyse directe des MP dans le PPP et analyse sur MP lavées, les concentrations de MP obtenues par méthode avec lavages étant constamment inférieures à celles obtenues avec la méthode directe (30 à 70% des MP sont perdues lors des lavages). L'étude conclut finalement que la méthode directe est robuste, simple, reproductible, facile à mettre en œuvre et utilisable pour des études plus larges.

Cellule d'origine		Marqueurs
Plaquettes		CD31* CD41 CD41a CD42a CD42b CD61 (GPIIIa) CD62P (P-sélectine)
Erythrocytes		CD235a (glycophorine)
Leucocytes	Pan-leucocytaire	CD45
	Granulocytes	CD66e
		CD66b
	Lymphocytes T helper	CD4
	Lymphocytes T cytotoxiques	CD8
	Lymphocytes B	CD20
Monocytes/macrophages		CD14
Cellules endothéliales**		CD31 CD34 CD54 CD62E (E-sélectine) CD51 CD105 CD106 CD144 CD146
Cellules malignes	Cancer du sein et du pancréas	MUC1
	Mélanome	FasL
	Glioblastome	EGFRvIII
	Cellules leucémiques	CXCR-4

\* en association avec CD42 (69)

\*\* CD42 négatif (69), les MP présentant le phénotype CD62E/CD144/CD146 sont les plus probables d'être d'origine endothéliale (127)

**Tableau 3.** Marqueurs de l'origine cellulaire des MP (8,128)



**Figure 3.** Principe de l'option W2 du Gallios/Navios (Beckman Coulter) (125)

Paramètre pré-analytique	Recommandations
Nature du tube	Tube citraté (Vacutainer® 0.109 M, BD, Plymouth, UK)
Prélèvement veineux	Prélèvement à la veine du pli du coude avec un garrot peu serré Aiguille de 21 gauges minimum Eliminer les 2 ou 3 premiers millilitres de sang
Délai avant la première centrifugation	Délai inférieur ou égal à deux heures
Transport des tubes	Dans des boîtes de transport maintenant les tubes en position verticale
Protocole de centrifugation	2 centrifugations successives et identiques de 15 minutes à 2500g à température ambiante
Stockage du PPP	Congélation à -80°C (sans congélation rapide préalable dans l'azote liquide) Stockage 12 mois maximum Juste avant l'analyse : décongélation rapide au bain marie à 37°C 3 minutes

**Tableau 4.** Protocole pré-analytique proposé par Lacroix et *al.* pour l'analyse des MP circulantes (126)

Méthode directe avec héparine décrite par Iversen <i>et al.</i> , 2012	Méthode à partir de MP lavées décrite par Biró <i>et al.</i> , 2007
<p>Aliquotes PPP 250µL : décongélation lente dans la glace</p> <p>↓</p> <p>5µL de PPP + 5µL AnxV prédiluée + 5µL Ac spécifique prédilué (double marquage) + 5µL héparinate de Na 10% w/v + 935µL tampon PBS-Ca</p> <p>↓</p> <p>Incubation 1h à l'obscurité</p> <p>↓</p> <p>Analyse par CMF</p>	<p>Aliquotes PPP 250µL (glace)</p> <p>↓</p> <p>Centrifugation 19000g 30 min 22°C</p> <p>↓</p> <p>Remplacement de 225µL de surnageant par 225µL de PBS-citrate et remise en suspension du culot</p> <p>↓</p> <p>Centrifugation 19000g 30 min 22°C</p> <p>↓</p> <p>Suppression 225µL de surnageant et remise en suspension du culot avec 75µL de PBS-citrate = suspension de MP purifiées</p> <p>↓</p> <p>5µL de suspension + 45µL PBS-Ca + 5µL Ac spécifique prédilué ou 5µL AnxV prédiluée (marquage unique)</p> <p>↓</p> <p>Incubation 15min à l'obscurité</p> <p>↓</p> <p>Addition 900µL de PBS-Ca et analyse par CMF dans l'heure</p>

**Tableau 5.** Comparaison de deux techniques d'analyse des MP : directement à partir du PPP (Iversen *et al.*, 2012) et à partir de suspensions de MP lavées (Biró *et al.*, 2007) (7,74)

## 2. Les thrombocytoses

### a. Généralités

La thrombocytose est une anomalie sanguine fréquente, définie par une numération plaquettaire supérieure à 450 G/L. Il existe un grand nombre de causes primaires et secondaires ainsi que de fausses situations mimant des thrombocytoses (**Tableau 6**).<sup>(129)</sup>

On parle de thrombocytose primaire quand l'augmentation des plaquettes est due à une atteinte des cellules souches hématopoïétiques et de thrombocytose secondaire lorsqu'elle est associée à une cause externe.<sup>(130)</sup>

Plusieurs paramètres sont à prendre en compte pour connaître la cause d'une thrombocytose :

- les aspects cliniques <sup>(129)</sup>: antécédents, comorbidités, numérations plaquettaires antérieures <sup>(131)</sup> ;
- les paramètres hématologiques ;
- les résultats du myélogramme ;
- les résultats de la biopsie ostéo-médullaire ;
- la présence ou l'absence d'anomalies génétiques clonales.<sup>(129)</sup>

Les fausses thrombocytoses sont liées à la présence de structures non plaquettaires (microsphérocytose, cryoglobulinémie, fragments cytoplasmiques de cellules leucémiques, bactéries, schizocytose...) dans la circulation sanguine, qui sont comptées comme des plaquettes par les automates d'hématologie. Il s'agit de causes rares d'apparentes thrombocytoses et l'examen du frottis sanguin permet de détecter ces artéfacts.<sup>(131)</sup>

Concernant le cadre clinique, il existe trois types de thrombocytoses :

- les thrombocytoses clonales :
  - associées à un SMP, avec en premier lieu les TE. Dans les autres SMP, la thrombocytose est inconstante et n'appartient pas aux critères diagnostiques des PV, MF et LMC.<sup>(131)</sup>
  - syndromes frontières SMP/syndromes myélodysplasiques (SMD) : anémies réfractaires avec sidéroblastes en couronne et thrombocytose (RARS-T), syndromes myélodysplasiques avec délétion 5q isolée. Les autres formes frontières SMP/SMD sont plutôt associées à une thrombopénie.<sup>(129,131)</sup>

- les thrombocytoses réactionnelles ou secondaires (TR) qui représentent au moins 85% des cas de thrombocytoses.(132)
- les thrombocytoses familiales : rares, elles sont suspectées lorsque des cas similaires sont observés dans une même famille.(133)

## **b. Thrombocytémie essentielle**

### **Définition et épidémiologie**

La TE, décrite pour la première fois en 1934, a été intégrée dans le groupe des SMP en 1951.(134)

Elle est caractérisée par une augmentation de la numération plaquettaire (>450 G/L) persistante et non expliquée.(129,131) Elle correspond à une anomalie clonale de la cellule souche hématopoïétique et partage avec la PV et la MF, des caractéristiques phénotypiques et pathologiques.(135) Parmi les 4 SMP classiques (TE, PV, MF et LMC), elle est caractérisée par une médiane de survie plus longue.(136)

Du point de vue épidémiologique, l'incidence de la TE, rapportée à la population standard européenne, est estimée à 1.55 nouveaux cas pour 100 000 habitants et par an. Les estimations basées sur des enquêtes de prévalence rapportent une prévalence de 400 cas par million d'habitants.(137) Elle touche des patients âgés de 50 à 60 ans, avec un sex-ratio en faveur du sexe féminin. Il existe également un pic de fréquence vers 30 ans avec une prépondérance féminine. De rares cas ont été décrits chez l'enfant.(134)

### **Pathogénie**

La TE est un SMP prédominant sur la lignée plaquettaire (138) et est caractérisée par une thrombocytose chronique dont la pathogénèse n'est pas encore totalement élucidée. En effet, peu d'éléments permettaient d'expliquer la physiopathologie de cette maladie, jusqu'en 2005 avec la découverte d'une mutation acquise du gène *JAK2*, la mutation JAK2V617F. La mise en évidence d'autres mutations a ensuite permis d'avancer dans la compréhension de la pathogénèse de cette maladie (139) :

- **mutation JAK2V617F** (Janus Activated Kinase 2). Elle affecte environ 50% des patients atteints de TE ou de MF et la très grande majorité des patients atteints de PV.(131,139–142) Il s'agit d'un changement de nucléotide G>T dans l'exon 14 du gène *JAK2*, entraînant la substitution d'une valine par une phénylalanine.(131,140–144) Les tyrosines kinases JAK appartiennent à une famille de protéines qui transmettent un message

extracellulaire cytokinique à l'intérieur de la cellule via l'activation de récepteurs membranaires spécifiques.(141) La mutation JAK2V617F touche le domaine non catalytique pseudokinase de JAK2 et interrompt son activité kinase régulatrice.(131,137,141–146) JAK2 active alors de façon autonome des voies de signalisation d'aval, comme JAK-STAT, PI3K/Akt et ERK1/2 MAPK.(131,144) L'expression de la protéine JAK2 mutante confère aux lignées cellulaires *in vitro* une hypersensibilité aux cytokines et une indépendance vis-à-vis de la présence d'érythropoïétine.(137,143,146)

- **JAK2 exon 12.** Ces mutations sont localisées dans l'exon 12 du gène *JAK* (144) et touchent environ 3% des patients ayant une PV. Elles ont été retrouvées dans quelques cas de MF, mais pas dans les TE. (141,145)
- **les mutations de MPL** (Myeloproliferative Leukemia Virus). Elles touchent le récepteur de la thrombopoïétine (MPL).(141,144) Les principales mutations entraînent le remplacement du tryptophane 515 (MPL W515) par d'autres acides aminés [leucine (MPLW515L), lysine (MPLW515K), asparagine (MPLW515N) ou alanine (MPLW515A)].(141,144,145) Le récepteur est alors spontanément activé.(141,144)

Ces mutations, retrouvées dans les TE et les MF, concernent 1 à 15% des patients selon les séries rapportées.(140,141,144,145) Elles permettent, comme la mutation JAK2V617F, de signer le diagnostic de SMP, mais elles ne semblent pas influencer le pronostic de la maladie de façon différente de JAK2V617F.(141)

- **le gène TET2** (Ten Eleven Translocation 2). Les mutations ne sont pas spécifiques des SMP et peuvent être associées à des pathologies myéloïdes.(141) Elles sont retrouvées dans 16% des PV, 5% des TE, 17% des MF, quel que soit le statut vis-à-vis de la mutation JAK2V617F.(145)
- D'autres mutations, très rares, peuvent être retrouvées dans les TE : LNK, CBL, protéines SOCS, ASXL1.(141,145)

### Aspects cliniques généraux

Dans la moitié des cas, la TE est asymptomatique et découverte de façon fortuite suite à la réalisation d'un hémogramme. Dans les autres cas, les signes cliniques sont dominés par des accidents thrombotiques ou hémorragiques. Sur l'ensemble des patients thrombocytémiques, 1 sur 5 voire 1 sur 2 présente un accident thromboembolique lors du diagnostic. Les thromboses sont les plus fréquentes, le plus souvent artérielles. Des

microthrombi peuvent induire une érythromélgie, des céphalées, une paresthésie et/ou une ischémie des extrémités. On note également la présence d'une splénomélgie chez 50% des patients au moment du diagnostic et d'une hépatomélgie dans 15 à 20% des cas.(134)

### **Eléments du diagnostic biologique**

L'OMS (Organisation Mondiale de la Santé) a établi en 2008 de nouveaux critères diagnostiques de la TE (**Figure 4**).

Le diagnostic de TE est basé sur la persistance d'une augmentation des plaquettes supérieure à 450 G/L après avoir éliminé les autres causes de thrombocytose, et notamment les étiologies des thrombocytoses réactionnelles. La TE reste un diagnostic d'exclusion. Les autres principaux diagnostics différentiels sont : PV, MF, MF préfibrotique, LMC et RARS-T.(129,131,135–137,139,140)

L'examen du frottis sanguin retrouve cette thrombocytose ainsi que des degrés variables d'anisocytose plaquettaire. La morphologie plaquettaire peut varier, allant d'une taille et de granulations normales à des formes de taille plus grande et hypogranulaires. On peut également retrouver une hyperleucocytose, mais il n'y a pas d'érythroblastose sanguine, ni de poïkilocytose.(129)

Un examen de la moelle osseuse (biopsie ostéo-médullaire ou myélogramme) est nécessaire selon les critères OMS 2008, et montre une dysmégacaryopoïèse. (129,140) Dans la TE, elle est classiquement normocellulaire ou parfois légèrement hypercellulaire.(129) Les mégacaryocytes sont nombreux, matures, et en majorité de taille augmentée avec un noyau hypersegmenté.(129,140) On peut observer un spectre morphologique avec la présence possible de mégacaryocytes normaux ou avec des noyaux picnotiques.(129) Dans la biopsie ostéo-médullaire, les mégacaryocytes ont tendance à se regrouper en amas.(129,137,140) L'érythropoïèse et la granulopoïèse sont normales.(129,140) Il n'y a généralement pas de fibrose réticulinique.(129)

**Thrombocythémie essentielle : critères majeurs**

- Numération plaquettaire  $\geq 450 \times 10^9/L$
- Prolifération mégacaryocytaire faite d'éléments matures et de grande taille
- Absence des critères OMS en faveur du diagnostic de Leucémie Myéloïde Chronique, Polyglobulie de Vaquez, Myélofibrose Primitive, Syndrome Myélodysplasique ou autre maladie myéloïde maligne
- Présence de la mutation JAK2V617F ou d'un autre marqueur de clonalité ou absence d'arguments en faveur d'une thrombocytose réactionnelle

Le diagnostic de thrombocythémie essentielle nécessite la présence des 4 critères majeurs

**Figure 4.** Critères diagnostiques de thrombocythémie essentielle OMS 2008.

Adapté d'après Tefferi et *al.* (140)

### Hétérogénéité moléculaire

L'hétérogénéité moléculaire dans les TE entraîne une certaine hétérogénéité phénotypique. (142,146) Par rapport aux patients JAK2V617F négatifs, ceux présentant la mutation ont des taux d'hémoglobine et de polynucléaires neutrophiles (PNN) plus élevés, une numération plaquettaire (142,146) et une érythropoïétine plus basses, et une augmentation de la cellularité globale à la biopsie ostéo-médullaire. Ils sont également plus à risque de développer des thromboses veineuses.(146) Par ailleurs, il semble exister une corrélation entre le taux d'allèle muté et la présence, d'une part d'une splénomégalie, et d'autre part de symptômes microcirculatoires.(142) Les patients présentant des mutations de MPL ont un taux d'hémoglobine plus bas (W515L) ou une thrombocytose plus importante (W515K) ainsi qu'une plus grande fréquence d'atteintes de la microcirculation.(147,148)

### Evolution-Complications

Concernant le pronostic de la TE, des données prospectives de bonne qualité sur la survie à long terme des patients sont encore manquantes.(139) Des études rétrospectives montrent cependant que l'espérance de vie et le taux de mortalité dans la première décade suivant le diagnostic sont similaires à la population contrôle.(129,139) Au-delà de 10 ans, les données sont moins bien établies.(129) Cependant, il faut faire attention à la pertinence de ces informations devant les modifications des recommandations sur la prise en charge de la TE ces 10 à 20 dernières années.(139)

L'évolution de cette maladie peut être marquée par divers types de complications (transformation en leucémie aiguë ou myélofibrose et les manifestations thrombo-hémorragiques) qui sont les causes majeures de morbidité et de mortalité dans la TE. Les complications les plus fréquemment observées sont les manifestations thrombo-emboliques, artérielles et veineuses.(134,135,139,144)

### 1) Leucémie aigue

La progression vers la leucémie aiguë myéloïde (taux de blastes supérieur ou égal à 20% dans le sang et/ou la moelle osseuse) survient chez une minorité de patients.(135) Des études rétrospectives montrent une incidence de 1 à 2.5% dans les 10 ans et de 5 à 8% dans les 20 ans suivant le diagnostic, puis une augmentation de cette incidence par la suite.(149,150)

### 2) La myélofibrose

Le Groupe International de Travail pour la Recherche et le Traitement des SMP a publié en 2008 des critères de diagnostic de myélofibrose post-TE : deux critères majeurs (TE diagnostiquée et fibrose médullaire de grade supérieur ou égal à 2) et au moins deux critères mineurs.(151) Selon plusieurs études rétrospectives, la transformation myélofibrotique affecte 3 à 10% des patients dans les 10 premières années, et 6 à 30% dans les 20 premières années faisant suite au diagnostic.(150,152)

### 3) Les complications thrombo-hémorragiques

L'évolution de la maladie peut se compliquer de manifestations thrombo-hémorragiques qui conditionnent l'attitude thérapeutique. (134,135) La fréquence des complications thrombotiques est bien supérieure à celle des complications hémorragiques. (134,143,153–156)

#### ○ Les manifestations thrombotiques

La diathèse thrombotique dans la TE est caractérisée par la survenue fréquente d'atteintes de la microcirculation et par l'augmentation du risque à la fois artériel et veineux de thrombose.(157) Les données de la littérature rapportent une incidence variable des thromboses, qui pourrait s'expliquer par des cohortes différentes en nombre de patients inclus, par la nature rétrospective de la plupart des études et par la variation dans la définition des complications thrombotiques.(157) En général, les événements thrombotiques artériels sont plus fréquents que les accidents veineux.(134,143,153,154,156,158–163) La pathogénèse des thromboses dans les TE est complexe et multifactorielle. Plusieurs facteurs pourraient entrer en jeu dans la diathèse thrombotique des SMP : l'importance de la thrombocytose, la présence d'anomalies des fonctions plaquettaires, des leucocytes et des cellules endothéliales.(144,164,165)

- Atteinte de la microcirculation :

Les manifestations rencontrées sont une érythromélgie (symptôme révélateur et le plus pathognomonique des TE qui touche 40 à 50% des patients) (134,166), des symptômes oculaires et auditifs, un phénomène de Raynaud, des céphalées (157), des ischémies neurologiques et oculaires avec troubles de l'équilibre transitoires, un scotome scintillant, une dysarthrie, une cécité monoculaire transitoire ou une mono/hémi-parésie transitoire.(166) Ces atteintes microvasculaires sont souvent améliorées par la prise d'antiagrégants plaquettaires.(134,135,157,166)

- Thromboses artérielles et veineuses :

Au niveau artériel, trois territoires principaux sont concernés : le territoire cérébral (accident vasculaire cérébral, accident ischémique transitoire), le cœur (syndrome coronarien aigu) et les artères périphériques (occlusion artérielle).(134,157,163,167)

Les manifestations thrombotiques veineuses les plus courantes dans les TE sont les mêmes que dans la population générale et se présentent sous forme de phlébites des membres inférieurs et/ou d'embolies pulmonaires.(134,157,159,167) Dans les SMP, et particulièrement dans les TE et les PV, on observe une plus grande incidence de thromboses veineuses de localisation inhabituelle, comme le tronc porte, les veines mésentériques (134,157,159,167), la veine cave (159) et les sinus cérébraux.(157,159,167) Les thromboses des veines splanchniques peuvent parfois entraîner un syndrome de Budd-Chiari.(168,169) La prévalence de la mutation JAK2V617F dans ces accidents thrombotiques veineux de localisation atypique est en général élevée.(168–172)

o Les manifestations hémorragiques

Un risque paradoxal de saignement a été retrouvé chez des patients ayant une TE et plusieurs études ont montré que le degré et la durée des saignements chez ces patients étaient corrélés avec le taux de plaquettes.(136) En effet, ce type de complication a été surtout noté chez des patients avec une thrombocytose extrême.(131,136) Les complications hémorragiques, au diagnostic et pendant le suivi, sont beaucoup moins fréquentes que les complications thrombotiques.(143,153–156)

Les épisodes de saignement les plus fréquents sont cutanéomuqueux (épistaxis, ecchymoses, ménorragies, hémorragies gingivales). Les hémorragies gastro-intestinales sont moins fréquentes. Les hémarthroses et les hématomes sont peu communs.(167)

Le risque hémorragique est multifactoriel, incluant un rôle majeur des anomalies fonctionnelles plaquettaires. Une autre cause probable est un syndrome de Willebrand acquis,

dû à une adsorption augmentée des multimères de haut poids moléculaire du facteur Von Willebrand par des plaquettes circulantes en nombre anormalement élevé.(131,136,167)

### Traitements

Les options thérapeutiques dans la TE sont diverses et vont de l'approche la plus conservatrice (surveillance stricte) à l'aspirine à faible dose et/ou à des traitements cytoréducteurs.(165)

Les objectifs des traitements chez les patients ayant une TE sont de normaliser la numération plaquettaire, diminuer les symptômes cliniques et le risque de complications thrombotiques et hémorragiques.(135)

Selon un consensus général, les facteurs de risque cardiovasculaire comme l'hypertension, le diabète, le tabac, l'hypercholestérolémie et l'obésité doivent être recherchés et traités selon les recommandations.(135,139,165)

#### 1) Traitement antiagrégant plaquettaire

Un essai randomisé chez des patients ayant une PV a montré une diminution des événements thrombotiques chez ceux prenant de l'aspirine, sans augmentation du risque hémorragique.(173) Certaines études rétrospectives ont suggéré un effet protecteur similaire dans la TE.(153,174) L'aspirine à faible dose est en général recommandée pour tous les patients, sauf en cas de contre-indication,(135,139,175,176) mais certains réservent ce traitement aux patients présentant une atteinte de la microcirculation ou des facteurs de risque cardiovasculaires sévères ou incontrôlés.(136) Concernant les antiagrégants plaquettaire comme le clopidogrel, leur efficacité prouvée dans l'athérosclérose laisse penser qu'ils pourraient être utilisables chez les patients intolérants à l'aspirine.(135)

#### 2) Traitements cytoréducteurs

Leur but est surtout de réduire la fréquence des complications thrombotiques, les décisions thérapeutiques étant basées sur le classement des patients en fonction de leur risque.(135,139,165) Les principaux types de traitement cytoréducteur sont :

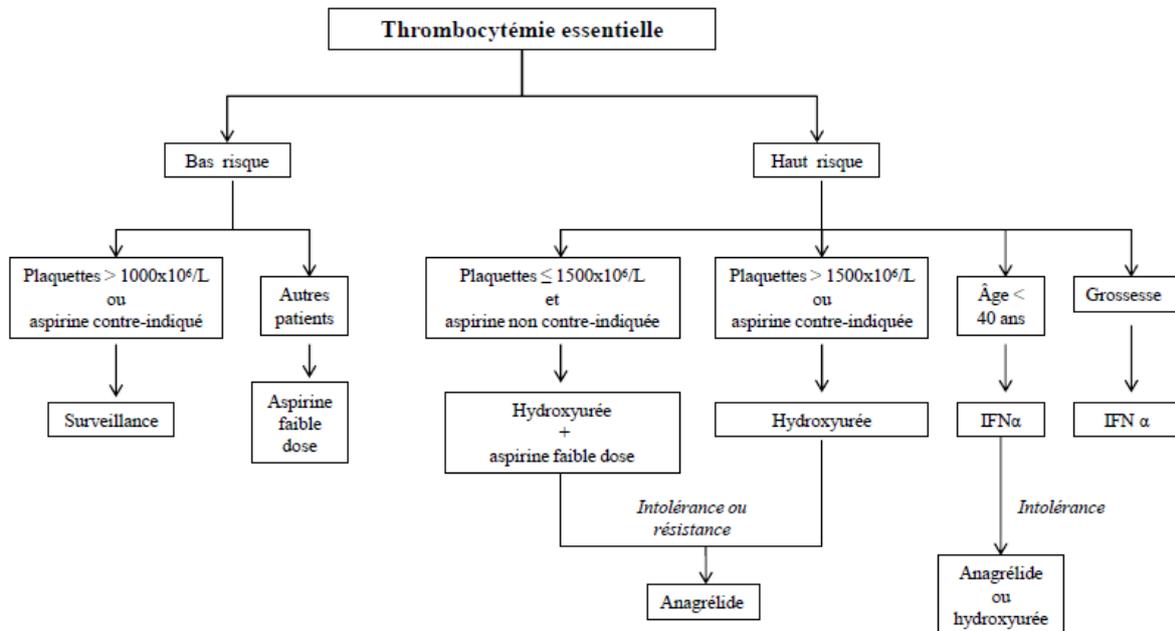
- *l'hydroxyurée ou hydroxycarbamide* (HU). Il est considéré comme le traitement de 1<sup>ère</sup> ligne chez les patients atteints de TE à haut risque thrombotique, en raison de son efficacité dans la prévention des thromboses, démontrée dans un essai randomisé

contrôlé.(135,136,139,165,175–178) C'est un anti-métabolite qui inhibe la synthèse d'ADN.(176)

- *l'anagrélide*. Il est considéré comme le traitement de 2<sup>ème</sup> ligne pour les patients résistants ou intolérants à l'HU.(135,136,139,165,176,178) C'est un dérivé imidazoquinazoliné (136,165,176) qui diminue sélectivement la numération plaquettaire en inhibant la différenciation mégacaryocytaire.(135,139,165) L'anagrélide provoque des effets secondaires jusque chez 30% des patients, incluant des palpitations et des arythmies cardiaques, une rétention hydrique, une insuffisance cardiaque et des céphalées (179,180) ainsi qu'une anémie progressive.(180) Deux études montrent des résultats différents en terme de prévention des complications thrombo-hémorragiques. Chez les patients atteints de TE à haut risque, l'étude PT-1 (179) a retrouvé une infériorité du traitement par anagrélide + aspirine, avec plus de thromboses artérielles, d'hémorragies majeures, de progression myélofibrotique et d'intolérance au traitement, par rapport au traitement HU + aspirine. Par contre dans le bras traité par HU, on notait plus de thromboses veineuses.(179) Les résultats de l'étude ANAHYDRET (181) (comparant HU et anagrélide) ne retrouvent pas cette infériorité de l'anagrélide par rapport à l'HU. Mais il semble que cet essai n'avait pas une puissance statistique suffisante pour détecter les différences observées dans l'étude PT-1.(139)
- *interféron  $\alpha$  recombinant* (IFN $\alpha$ ). Il inhibe la prolifération des progéniteurs hématopoïétiques et des progéniteurs des fibroblastes de la moelle osseuse et antagonise l'action du platelet derived growth factor (PDGF).(136,176) Ce traitement est associé à de nombreux effets secondaires.(135,136,165,176) Du fait de l'absence d'effet leucémogène et tératogène, son utilisation peut être envisagée chez des patients à haut risque thrombotique âgés de moins de 40 ans (135,165,176), en cas de désir de grossesse ou de grossesse à haut risque.(135,136,139,165,176) Il faut toutefois noter l'absence d'essais cliniques randomisés comparant l'IFN $\alpha$  et les thérapies conventionnelles dans la TE.(176)
- *phosphore radioactif, agents alkylants* (busulphan par exemple), *pipobroman*. Ils sont efficaces dans le contrôle de la numération plaquettaire, mais augmentent le risque de progression leucémique, en particulier quand ils sont utilisés de façon séquentielle avec l'HU.(135) Concernant le pipobroman, il y a peu de preuves concernant son efficacité dans la prévention des complications thrombotiques. Beer et *al.*(135) restreignent l'usage de ces types de traitement aux patients âgés de plus de 75 ans, où ils sont utilisés en 2<sup>ème</sup> ou 3<sup>ème</sup> ligne en cas d'intolérance à l'HU.

La **Figure 5** est un exemple de schéma thérapeutique dans la TE.

La situation des patients atteints de TE ne les place pas dans une catégorie à haut-risque mais ils présentent des facteurs de risque cardiovasculaire qui doivent être évalués au cas par cas, en prenant en compte la sévérité de chaque facteur.(135)



**Figure 5.** Proposition d’algorithme pour la prise en charge de la TE.  
Adaptée d’après Cervantes et *al.*(165)

### c. Thrombocytoses réactionnelles

#### Epidémiologie et contexte clinique

Les thrombocytoses d’origine réactionnelle représentent 88-97% des cas chez des adultes dans deux grandes séries (182,183) et presque 100% des cas pédiatriques dans une seule série.(184) On retrouve une thrombocytose extrême au diagnostic chez environ 1 à 8% des patients.(182–184) Dans une étude portant sur 280 cas, Buss et *al.*(185) ont montré que 82% des thrombocytoses supérieures à 1000 G/L étaient d’étiologie réactionnelle, 14 % étaient des SMP et 4% étaient d’origine indéterminée.

Les thrombocytoses réactionnelles sont secondaires à des pathologies ou à des altérations systémiques sous-jacentes.(129,131,132,138) Elles peuvent être:

- **transitoires.**

Les thrombocytoses d'entraînement présentent le plus souvent une numération plaquettaire entre 600 et 800 G/L, parfois supérieure à 1000 G/L. Elles sont asymptomatiques. On les observe après un accouchement prolongé et en règle générale, après tout acte chirurgical important (grandes chirurgies abdominales, cardiovasculaires, thoraciques, orthopédiques ...).(132)

Les thrombocytoses de rebond font suite à une thrombopénie périphérique, une stimulation médullaire franche (hémorragie abondante, anémie hémolytique aiguë ou chronique, traitement par facteurs de croissance) ou un sevrage alcoolique.(132)

Les thrombocytoses peuvent également être induites par certains médicaments, comme les alcaloïdes de la pervenche (vincristine) (132), l'épinéphrine, les facteurs de croissance (138), ou les corticoïdes.(129)

Pour les thrombocytoses survenant dans les suites d'une splénectomie, la numération plaquettaire augmente rapidement en quelques jours, et dépasse parfois 1000 G/L après 1 à 3 semaines. Le retour à la normale se fait en quelques semaines à 2 mois.(132)

- **persistantes.**

Les thrombocytoses liées à une carence en fer sont rarement supérieures à 800 G/L. Elles peuvent cependant être supérieures à 1000 G/L lors d'une anémie ferriprive sévère.(132)

Les thrombocytoses liées aux pathologies inflammatoires chroniques présentent une numération plaquettaire entre 400 et 1000 G/L. On les retrouve surtout au cours de la polyarthrite rhumatoïde, des connectivites, des entérocolopathies, des suppurations et autres infections prolongées.(132)

Les thrombocytoses des cancers peuvent être un indicateur de syndrome paranéoplasique. Ces cancers sont en général associés à un saignement chronique et/ou à une réaction inflammatoire péri-tumorale importante. On les observe fréquemment dans les cancers épithéliaux (rein, sein, bronches) et les lymphomes.(132)

Les thrombocytoses liées à une asplénie peuvent accompagner une asplénie vraie constitutionnelle, une asplénie fonctionnelle dans la drépanocytose, ou être acquises comme dans la maladie coeliaque.(132)

Dans l'étude de Buss et *al.*(185), 40% des TR étaient dues à un syndrome inflammatoire (de nature infectieuse dans 31% des cas, non infectieuse dans 9% des cas) ; la splénectomie ou l'hyposplénisme représentaient 19% des cas, les cancers 14% des cas, les

traumatismes 14% des cas, et les hémorragies 6% des cas. 7% des TR restaient mal expliquées.(185)

Les étiologies des différentes thrombocytoses sont répertoriées dans le **Tableau 6**.

Thrombocytoses clonales	Thrombocytoses réactionnelles	« Fausses » thrombocytoses
Thrombocytémie essentielle	Infection	Microsphérocytes
Polyglobulie de Vaquez	Inflammation	Cryoglobulinémie
Myélofibrose primitive	Lésion tissulaire	Fragments de cellules cancéreuses
Syndrome myélodysplasique 5q-	Hyposplénisme	Schizocytes
Anémie réfractaire avec sidéroblastes en couronne et thrombocytose	Post-opératoire	Bactéries
Leucémie myéloïde chronique	Carence martiale	
Leucémie myélomonocytaire chronique	Néoplasie	
Leucémie myéloïde chronique atypique	Hémolyse	
Syndromes myélodysplasique/syndromes myéloprolifératifs non classables	Effet secondaire médicamenteux	
Syndrome POEMS	Thrombocytose de rebond après myélosuppression	
Thrombocytose familiale		

**Tableau 6.** Etiologies des thrombocytoses. Adapté d'après Bleeker et *al.*(131)

### Diagnostic

La physiopathologie de la TR est variée et complexe. Il existe de nombreux outils diagnostiques disponibles, mais le diagnostic reste finalement clinique, basé sur plusieurs éléments : la caractérisation d'une cause ou d'une pathologie sous-jacente et quand cela est possible, la régression de la thrombocytose avec le traitement de la cause et les données biologiques.(131)

Du point de vue biologique, il faut tout d'abord réaliser un frottis sanguin devant une thrombocytose, pour s'assurer de la réalité de celle-ci (129,131) et examiner la morphologie des plaquettes. Dans le cas d'une TR, les plaquettes sont pour la plupart du temps de petite taille avec un volume plaquettaire moyen normal.(129) Le frottis sanguin peut aussi montrer d'autres caractéristiques orientant vers une cause sous-jacente, comme un processus aigu inflammatoire ou infectieux.(129) Le dosage des marqueurs du métabolisme ferrique, celui des marqueurs de la phase aiguë de la réaction inflammatoire pourront également être réalisés.(129,131)

Une ponction ou une biopsie médullaire ne sont d'habitude pas nécessaires au diagnostic de TR. Si elle a été réalisée, elle montrera une hyperplasie des mégacaryocytes, avec une morphologie mature et normale. Ceux-ci ont une distribution interstitielle normale et ne sont pas regroupés en amas. La réticuline n'est pas augmentée.(129)

Dans les processus infectieux ou inflammatoires chroniques, on peut aussi observer une hyperplasie des PNN et des signes d'anémie chronique.(129)

### **Complications associées aux TR**

Le risque de complications thrombotiques dans la TR semble bas (1-6%).(129,131,132,182,184–187) Elles touchent plutôt le territoire veineux.(131,132,182,186) Par ailleurs, le risque de complications hémorragiques est lui aussi faible.(131,185,187)

### **Prise en charge thérapeutique**

La TR est généralement considérée comme un processus autolimité qui prend fin avec la résolution, quand elle est possible, de la pathologie causale sous-jacente.(129,131) Il n'existe pas de consensus sur la prise en charge thérapeutique de la TR ni de données publiées sur l'intérêt de l'aspirine.(129) Selon certains auteurs, cet antiagrégant plaquettaire pourrait être souhaitable (129,132), mais d'autres ne le recommandent pas.(131) Devant la survenue de thromboses, en particulier cérébrales ou splanchniques, chez les patients considérés comme ayant une TR, il faut envisager une autre cause et entreprendre des investigations à la recherche d'une thrombocytose clonale concomitante.(131)

#### **d. Microparticules et thrombocytoses**

Plusieurs travaux ont mis en évidence une augmentation du nombre des MP dans la TE par rapport à une population témoin.(4,188,189) Le phénotype des MP dans la TE était en majorité d'origine plaquettaire, mais aussi endothéliale, comme l'a montré l'augmentation des marqueurs plaquettaires (CD61 et CD41) et endothéliaux (CD62E et CD144).(4)

L'équipe de Trappenburg *et al.* (4) n'a pas retrouvé de corrélation entre les antécédents thrombotiques et le nombre de MP, mais leur étude n'avait pas une taille d'échantillon ni une durée de suivi adéquates pour mettre en évidence cette corrélation. Cependant, les MP présentant une co-expression des marqueurs CD62E et CD41 étaient augmentées

significativement chez les patients atteints de TE ayant au moins un facteur de risque cardiovasculaire ou de thrombose. Concernant le statut JAK2V617F, celui-ci n'était pas corrélé avec le nombre ou l'origine cellulaire des MP dans le groupe des TE.(4)

Moles-Moreau et *al.* (188) ont comparé les MP entre 37 patients ayant une TE et 36 ayant une TR (**Tableau 7**). Le nombre de MP plaquettaires était plus élevé pour les TE que pour les TR, mais de façon non significative. Par contre, le ratio nombre de MP plaquettaires / numération plaquettaire était significativement plus élevé chez les patients présentant une TE. Cependant, en raison d'une importante variabilité interindividuelle des taux de MP plaquettaires, ce paramètre ne peut pas être utilisé pour le diagnostic clinique de TE.(188)

	TE	TR
Nombre de patients	37	36
Age moyen en années (bornes)	67 (24-85)	59 (19-80)
Sexe-ratio femme/homme	25/12	14/22
Traitement antiagrégant plaquettaire	23	0

**Tableau 7.** Caractéristiques démographiques des patients dans l'étude de Moles-Moreau et *al.*(188)

Une étude récente de Mignon et *al.*(190) a comparé le potentiel procoagulant dans la TE et la TR en mesurant la génération de thrombine et le taux de phospholipides procoagulants lors de tests fonctionnels. Vingt-neuf patients présentant une TE et 24 patients présentant une TR ont été étudiés. La génération de thrombine a été déterminée par une méthode de thrombinographie automatisée et calibrée (the Calibrated Automated Thrombogram<sup>®</sup>). Les phospholipides procoagulants ont été détectés grâce à la méthode chronométrique standardisée STA-Procoag-PPL<sup>®</sup>. Les patients présentant une TR avaient un temps de latence (durée de la phase d'initiation de la génération de thrombine, exprimée en minutes) plus long, un potentiel endogène de thrombine plus important, un pic de génération de thrombine et un index de vélocité plus élevés que les patients atteints de TE. Le taux de phospholipides procoagulants était augmenté chez les patients avec TE. L'étude a conclu que le groupe TE et le groupe TR présentaient des différences significatives en terme de génération de thrombine et de taux de phospholipides procoagulants. Ces paramètres pourraient donc participer au diagnostic différentiel entre TR et TE.(190)

Dans une étude publiée en septembre 2013, l'équipe de Connor et *al* (189) s'est intéressée à l'estimation par CMF de la fonction et de la réactivité plaquettaires dans les

thrombocytoses et les thrombopénies dues à un désordre hématologique primaire. Quatre situations ont été comparées : sujets normaux, PTI, SMD et TE. Les résultats rapportés sont les suivants :

- l'activation plaquettaire, étudiée sur sang total, était significativement diminuée dans les SMD par rapport aux sujets normaux et PTI, avec cependant un ratio MP / plaquettes augmenté,
- les nombres de MP (en valeur absolue) retrouvés dans le groupe TE étaient significativement plus élevés que chez les sujets normaux, mais la différence des ratios MP / plaquettes n'était pas significative.

L'hypothèse avancée dans la conclusion de cette étude suggère que l'augmentation des MP dans la TE reflèterait l'élévation de la numération plaquettaire plutôt qu'une hyperactivité plaquettaire. Cependant, les résultats de cette étude doivent être confirmés sur de plus grands échantillons puisque chaque groupe ne comptait que 10 patients.

### **3. Objectifs de l'étude**

L'objectif de notre projet était double.

En premier lieu, il s'agissait de mettre en place le dosage des MP au laboratoire d'Hématologie du CHU de Nantes en utilisant l'option W2 du cytomètre Navios (Beckman Coulter). La technique mise au point pourra par la suite être diffusée à d'autres laboratoires de CMF et utilisée dans divers projets de recherche ainsi que dans le diagnostic et/ou le suivi de différentes pathologies.

Dans un deuxième temps, ce projet avait pour but d'étudier les PMP et les EMP dans deux populations de patients : des patients présentant une TE au diagnostic ou une TE non traitée d'une part et des patients ayant une TR d'autre part. En effet, très peu d'études ont été réalisées pour comparer les MP en fonction du type de thrombocytose (réactionnelle ou primitive). Le diagnostic différentiel est parfois difficile à établir entre TE et TR et le dosage des MP pourrait s'intégrer dans un faisceau d'arguments permettant de trancher entre faveur de l'une ou l'autre situation pathologique. Les deux séries de patients ont également été comparées à une série de sujets contrôles. Enfin, nous avons évalué l'impact du statut mutationnel sur les résultats de dosages des MP au sein de la population des patients souffrant de TE.

## **MATERIEL ET METHODES**

## **1. Population étudiée**

### **a. Population témoin**

Treize sujets sains (9 femmes et 4 hommes) de 26 à 53 ans ont été prélevés au laboratoire d'Hématologie ou au centre de prélèvement du Centre-Hospitalo-Universitaire (CHU) de Nantes. Ces sujets ne souffraient d'aucune affection connue, avaient une numération plaquettaire normale (150 à 450G/L) et ne prenaient ni traitement anticoagulant, ni traitement antiagrégant, ni anti-inflammatoire non stéroïdien (AINS).

### **b. Cohorte de patients**

De novembre 2012 à mars 2013, 39 patients, de 18 à 85 ans, présentant une thrombocytose ont été inclus. Vingt d'entre eux (10 hommes et 10 femmes) présentaient une TE selon les critères OMS 2008, au stade du diagnostic ou diagnostiquée mais non traitée, et 19 patients (9 hommes et 10 femmes) avaient une TR. Les patients présentant une TE ont consulté ou été hospitalisés dans le service d'hématologie du CHU de Nantes ou dans le service des maladies du sang du CHU d'Angers. Les patients ayant une TR étaient hospitalisés dans différents services du CHU de Nantes.

Pour chaque patient, les paramètres suivants ont été recueillis :

- motif de consultation / hospitalisation ;
- antécédents ;
- traitement pris au moment de la réalisation des tests d'hémostase ;
- paramètres hématologiques ;
- paramètres biochimiques ;
- diagnostic retenu.

## **2. Recueil et traitement des échantillons**

L'étude des MP circulantes a été réalisée sur plasma citraté (à Nantes à partir d'un prélèvement effectué sur tube citrate de sodium-théophylline-adénosine-dipyridamole CTAD, 0,11M, Vacuette<sup>®</sup>, Greiner Bio One SAS, Les Ulis, France et à Angers sur tube citraté, 0.129M, Vacutainer<sup>®</sup>, Becton Dickinson, Le pont de Claix, France). Les conditions pré-analytiques représentent une source importante de variabilité puisque chaque étape pré-

analytique (prélèvement sanguin, transport, préparation du plasma et stockage) peut potentiellement être à l'origine d'interférences dans l'analyse. Le protocole pré-analytique appliqué est décrit dans la **Figure 6**.

- 1) Le prélèvement veineux doit être réalisé au niveau du pli du coude lorsque cela est possible. Appliquer un garrot peu serré au niveau du bras, l'aiguille utilisée doit présenter un diamètre assez large (21 gauges) pour éviter l'hémolyse in vitro, la génération d'ErMP et l'activation plaquettaire. Eliminer les 2 ou 3 premiers mL de sang dans un tube de purge puis prélever un tube **CTAD** ou citraté. Le remplissage du tube doit respecter le trait indicateur pour garantir un ratio citrate/sang optimal.
- 2) Réaliser une homogénéisation douce du tube citraté par retournements du tube.
- 3) Transport du tube à température ambiante, en évitant une agitation forte. Dans l'idéal, le transport doit être effectué en position verticale (pour limiter l'extension de la génération de MP in vitro) et les systèmes de transport type pneumatique ne doivent pas être utilisés.
- 4) Réaliser le protocole de préparation du PPP (double centrifugation du tube citraté) dans les **deux heures** qui suivent le prélèvement :
  - première centrifugation : 3500 tours/min pendant 15 minutes
  - décantation dans un tube secondaire (en laissant entre 0,5 et 1cm de plasma au-dessus de la couche des hématies dans le tube primaire)
  - deuxième centrifugation identique à la précédente : 3500 tours/min pendant 15 minutes
- 5) Réalisation d'aliquotes de **200µL** dans des petits tubes (type Eppendorf ou à vis) en laissant à nouveau 0,5 à 1cm de plasma dans le tube secondaire
- 6) Congélation des aliquotes à **-80°C** (les aliquotes congelés peuvent être conservés un an)
- 7) S'il est nécessaire de transporter les aliquotes avant leur décongélation : utiliser de la carboglace
- 8) Juste avant l'analyse par CMF : décongélation rapide des aliquotes 3 minutes dans un bain marie à 37°C

**Figure 6.** Protocole pré-analytique pour l'étude des MP.

### **3. Mise au point de la détection des MP au CHU de Nantes et traitement des échantillons**

#### **a. Création du protocole « microparticules » sur le cytomètre Navios**

La CMF est la technique la plus communément utilisée pour l'analyse des MP puisqu'elle permet de dénombrer et de caractériser les MP selon leur origine cellulaire, avec un haut débit. Le paramètre FSC est généralement utilisé pour définir la fenêtre d'analyse des MP. En CMF standard, la sensibilité limitée du FSC ne permet de mesurer qu'une petite partie de la population de MP. Dans cette étude, la CMF haute sensibilité a été utilisée grâce à l'option « W2 » du cytomètre Navios (Beckman Coulter) qui augmente la résolution du FSC en amplifiant les signaux FSC collectés avec des angles larges.

Un temps d'acquisition de 600 secondes a été programmé pour permettre un arrêt automatique standardisé.

Le même panel de marqueurs spécifiques a été utilisé pour identifier les MP tout au long des manipulations :

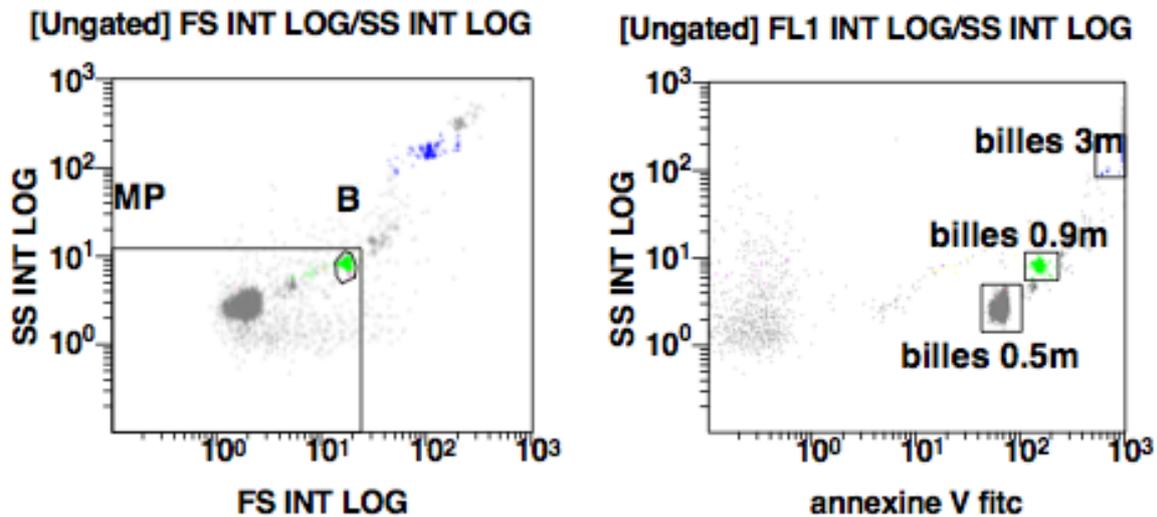
- L'annexine V couplée à l'isothiocyanate de fluorescéine (FITC), kit Annexin V – FITC / 7-AAD (Beckman Coulter) : marqueur de l'exposition de PS détecté en FL1.
- L'anticorps monoclonal IgG1 murin anti-CD31 couplé à la phycoérythrine (PE), (IOTest® CD31-PE, Beckman Coulter) : marqueur de l'origine endothéliale et plaquettaire détecté en FL2.
- L'anticorps monoclonal IgG1 murin anti-CD41 (ou GPIIb) couplé à la phycoérythrine-cyanine5 (PC5), (IOTest® CD41-PC5, Beckman Coulter) : marqueur de l'origine plaquettaire détecté en FL4.

#### **b. Evaluation et réglages des fluorescences**

- Réglage taille-structure et détermination de la fenêtre MP :

Ce réglage est réalisé grâce au réactif Megamix (BioCytex, Marseille, France) constitué d'un mélange de billes fluorescentes de trois diamètres différents (0,5µm, 0,9µm et 3µm) permettant de définir de façon standardisée la zone d'analyse des MP et d'assurer la stabilité des réglages. La partie inférieure de la zone d'analyse des MP est définie par le seuil (FS=1) et la partie supérieure par la fin du nuage de billes de 0,9µm. Ainsi sur le cytogramme

SS Log x FS Log une fenêtre automatique (« autogate ») est positionnée autour des billes de 0,9 $\mu$ m (sensibilité maximale) et la fenêtre MP est ajustée de manière à être tangente en haut et à droite de l'« autogate » des billes de 0,9 $\mu$ m (**Figure 7**).



**Figure 7.** Cytogramme SS Log x FS Log définissant la fenêtre MP (à gauche) et cytogramme SS Log x Annexin V – FITC permettant d'observer les trois diamètres de billes Megamix (0,5 $\mu$ m, 0,9 $\mu$ m et 3 $\mu$ m) dans la fenêtre MP (à droite).

- Réglage des photomultiplicateurs

Les voltages des photomultiplicateurs (PMT) sont ajustés grâce à un témoin négatif. Ici, 5 $\mu$ L de sang total d'un sujet sain ont été dilués dans 1mL de PBS. L'acquisition a ensuite été réalisée sur cet échantillon dans le protocole MP créé. Les réglages des PMT sont réalisés sur les plaquettes. Les particules négatives sont placées dans la première décade logarithmique de l'histogramme SSC/FSC.

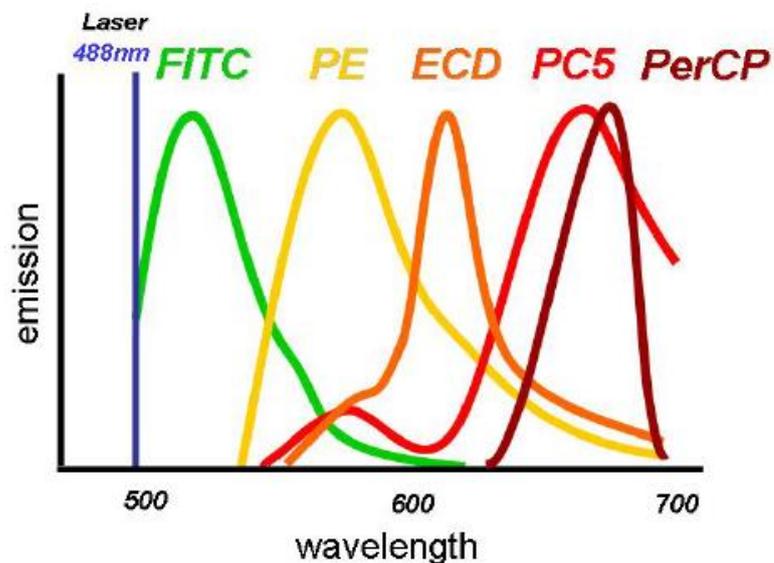
- Réglage des compensations

De manière générale en CMF, les fluorochromes sont choisis de manière à pouvoir être utilisés simultanément. Cependant, un chevauchement partiel de leurs spectres d'émission est inévitable, comme le montre la **Figure 8**. On observe alors des fluorescences artéfactuelles du fait de ces fuites de fluorescence dans les autres PMT. Il est possible électroniquement de retrancher un certain pourcentage de la fluorescence parasite : c'est la compensation. Dans cette étude, la matrice de compensation a été réalisée grâce à des monomarquages avec chacun des trois anticorps marqués (FITC, PE, PC5) sur des billes CompBead (BD Biosciences). Les Compbead sont des microparticules de polystyrène recouvertes d'anticorps

anti-Kappa qui fixent les immunoglobulines de souris, de rat et de hamster par leurs chaînes légères. Elles permettent ainsi de fixer les anticorps couplés à des fluorochromes de manière similaire et de réaliser les réglages de fluorescence. Il est absolument nécessaire d'utiliser les mêmes anticorps marqués pour réaliser les compensations que ceux qui seront ensuite utilisés dans les manipulations.

*Remarques :*

- Par la suite, si une intensité de fluorescence doit être réajustée, il faut modifier le voltage des PMT et recommencer le calcul des compensations.
- Les compensations peuvent varier avec le lot d'anticorps fluorescent.



**Figure 8.** Chevauchements des spectres d'émission de quelques fluorochromes utilisés en CMF.  
D'après Ormerod et *al.*(191)

- Evaluation du marqueur Annexine V-FITC

L'objectif était ici d'évaluer le volume optimal de tampon annexine V et d'annexine V-FITC à utiliser dans les manipulations. Seules les plaquettes activées présentent à leur surface la PS (phénomène de flip-flop). L'évaluation du marquage par l'annexine V à partir des plaquettes nécessite donc une activation plaquettaire préalable.

Le protocole suivi était le suivant :

- Prélèvement d'un tube de sang citraté chez un sujet témoin du laboratoire
- Tube 1 : 20µL de sang total citraté + 10µL de sérum physiologique + 70µL de tampon annexine V dilué au 1/10<sup>ème</sup>
- Tube 2 : 20µL de sang total citraté + 10µL de calcium ionophore 100µM (activateur plaquettaire) + 70µL de tampon annexine V dilué au 1/10<sup>ème</sup>

- Incubation 10 minutes à 37°C des tubes 1 et 2
- Tube 3 : 10µL du tube 1 + 5µL d'annexine V-FITC + 5µL de CD41-PC5 + 10µL de CD31-PE + 20µL de tampon annexine V dilué au 1/10<sup>ème</sup>
- Tube 4 : 10µL du tube 2 + 5µL d'annexine V-FITC + 5µL de CD41-PC5 + 10µL de CD31-PE + 20µL de tampon annexine V dilué au 1/10<sup>ème</sup>
- Tube 5 : 10µL du tube 1 + 10µL d'annexine V-FITC + 5µL de CD41-PC5 + 10µL de CD31-PE + 20µL de tampon annexine V dilué au 1/10<sup>ème</sup>
- Tube 6 : 10µL du tube 2 + 10µL d'annexine V-FITC + 5µL de CD41-PC5 + 10µL de CD31-PE + 20µL de tampon annexine V dilué au 1/10<sup>ème</sup>
- Incubation des tubes 3 à 6 pendant 15 minutes sur un mélangeur rotatif, à l'obscurité et à température ambiante
- Ajout de 300µL de tampon annexine V dilué au 1/10<sup>ème</sup> dans chacun des tubes 3 à 6.
- Acquisition des tubes 3 à 6 dans le protocole MP : les moyennes de fluorescence obtenues avec les plaquettes activées et les plaquettes non activées sont comparées. Le marquage annexine V n'est efficace que si la fluorescence est plus importante lorsqu'on travaille avec des plaquettes activées.

- Ajustement des quantités d'anticorps

Les quantités d'annexine V et d'anticorps marqués CD41-PC5 et CD31-PE utilisées ont dans un premier temps été celles précisées dans les notices fournies avec les kits : 10µL d'annexine V-FITC, 5µL de CD41-PC5 et 10µL de CD31-PE. Puis nous avons affiné ces quantités en utilisant un plasma témoin riche en PMP et en testant différents volumes d'anticorps. Le but était d'utiliser des quantités d'anticorps permettant d'obtenir une fluorescence détectable sans avoir un bruit de fond (lié à la fixation non spécifique) trop important. Au final, 3µL d'annexine V-FITC, 3µL de CD41-PC5 et 5µL de CD31-PE ont été utilisés dans les manipulations.

### **c. Rédaction du protocole de détection des MP d'origine plaquettaire et endothéliale**

Les étapes précédentes et les recherches bibliographiques ont permis d'aboutir au mode opératoire décrit dans la **Figure 9**.

Le passage quotidien systématique des billes Megamix avant tout autre échantillon présente un double intérêt dans cette étude. D'une part, les Megamix permettent de contrôler

la stabilité du réglage taille x structure du cytomètre, et d'autre part, ce réactif constitue un standard externe. En effet, le nombre de billes fluorescentes Megamix compté pendant un temps fixe le jour de la manipulation permet d'interpréter le nombre de MP comptées dans les échantillons testés le même jour pendant le même temps, grâce à la réalisation d'un ratio, et ainsi de neutraliser les variations fluidiques potentielles d'un jour à l'autre.

Comme documenté dans la partie d'introduction, ces manipulations ont utilisé de petites quantités d'héparinate de sodium (dilution au 1/500<sup>ème</sup> réalisée à partir d'héparine sodique Choay® 5000U/mL) pour inhiber la coagulation du PPP citraté.

Le cytomètre Navios permet de réaliser des acquisitions successives de manière autonome en plaçant les tubes sur un carrousel. Ceci permet de passer des séries d'échantillons de patients, ici des séries de 5 patients ont été testées.

#### **d. Evaluation du marquage non spécifique**

Ce contrôle négatif utilise quand cela est possible un anticorps marqué avec le même fluorochrome et de même isotype que l'anticorps testé, produit par le même fournisseur que l'anticorps spécifique utilisé, mais dépourvu de réactivité vis à vis de la molécule recherchée. Cette évaluation du marquage non spécifique est réalisée sur un plasma témoin riche en MP.

Dans cette étude, l'absence de marquage non spécifique a été vérifiée en comparant les histogrammes obtenus avec le plasma témoin dans les conditions décrites dans le mode opératoire de la **Figure 9** avec les histogrammes obtenus :

- dans les mêmes conditions mais en absence d'annexine V-FITC
- dans les mêmes conditions mais en remplaçant le CD31-PE par un isotype contrôle PE
- dans les mêmes conditions mais en remplaçant le CD41-PC5 par un anticorps marqué CD138-PC5 (le CD138-PC5 ne se fixe pas aux MP et remplace ici un isotype contrôle PC5 qui n'est pas disponible au laboratoire de cytométrie en flux hématologique du CHU de Nantes)

**MODE OPERATOIRE :  
MICROPARTICULES D'ORIGINE PLAQUETTAIRE ET ENDOTHELIALE**

**1- OBJECTIFS**

Ce mode opératoire permet l'étude et la quantification des microparticules d'origine plaquettaire et endothéliale.

**2- DOMAINE D'APPLICATION**

Ce mode opératoire s'applique au secteur de cytométrie en flux hématologique.

**3- DESCRIPTIF**

**Réactifs et échantillons :**

- Kit Annexin V – FITC / 7-AAD de Beckman Coulter
- Anticorps monoclonal IOTest® CD31-PE de Beckman Coulter
- Anticorps monoclonal IOTest® CD41-PC5 de Beckman Coulter
- Héparine sodique Choay® 5000U/mL
- Sérum physiologique PROPRE
- Eau distillée PROPRE
- Plasma citraté pauvre en plaquettes (PPP) et congelé à -80°C (aliquotes de 200µL) selon le protocole pré-analytique MP : décongélation 3 minutes au bain marie à 37°C

**A – MARQUAGE**

- 1) Préparation du tampon Binding Buffer 1X : diluer le 10X Binding Buffer du Kit Annexin V – FITC / 7-AAD avec de l'eau distillée (100µL Binding Buffer 10X + 900µL eau distillée).
- 2) Préparation de l'héparine sodique 10U/mL : à partir de l'héparine 5000U/mL
  - dilution 1 au 1/5 : 50µL héparine 5000U/mL + 200µL eau physiologique (1000U/mL)
  - dilution 2 au 1/100 : 10µL dilution 1 + 990µL eau physiologique (10U/mL)
- 3) Préparation du mélange dans un tube de cytométrie : 3µL Annexin V + 3µL anticorps monoclonal CD41-PC5 + 5µL anticorps monoclonal CD31-PE + 5µL héparine sodique 10U/mL + 5µL PPP
- 4) Dilution du mélange dans 935µL de tampon Annexin V 1X
- 5) Incubation du tube : 1 heure à l'obscurité à température ambiante
- 6) Pendant l'incubation du tube : sortir le flacon de billes Megamix conservé à +4°C, attendre qu'il atteigne la température ambiante, le vortexer pendant 10 secondes et prélever 400µL de son contenu dans un tube de cytométrie.

**B – ACQUISITION SUR LE CYTOMETRE NAVIOS**

- 1) Sélectionner le protocole Microparticules
- 2) Le cytomètre doit être TRES PROPRE avant de commencer l'acquisition : commencer l'acquisition avec un tube d'eau distillée PROPRE pour vérifier l'absence de poussières ou débris indésirables dans la zone des microparticules
- 3) Acquisition des billes Megamix : vitesse « Low » (10µL/min). Vérifier que la position des billes dans les cytogrammes est stable.
- 4) Réaliser un protocole Cleanse.
- 5) Passage du tube contenant l'échantillon en vitesse « Low ». Le réglage est tel que l'acquisition s'arrête à 600 secondes.
- 6) Imprimer la FlowPage.

*Remarque :* il est préférable de réaliser ce protocole le matin après allumage du Navios suivi du protocole « Cleanse » pour que l'appareil soit le plus propre possible

**Figure 9.** Mode opératoire : détection des MP d'origine plaquettaire et endothéliale au CHU de Nantes.

e. **Passage des échantillons des trois séries (contrôles, TR, TE) et obtention des valeurs de PMP et EMP pour chaque échantillon**

Les acquisitions ont été réalisées d'après le mode opératoire décrit dans la **Figure 9**.

Les PMP sont caractérisées par les critères suivants :

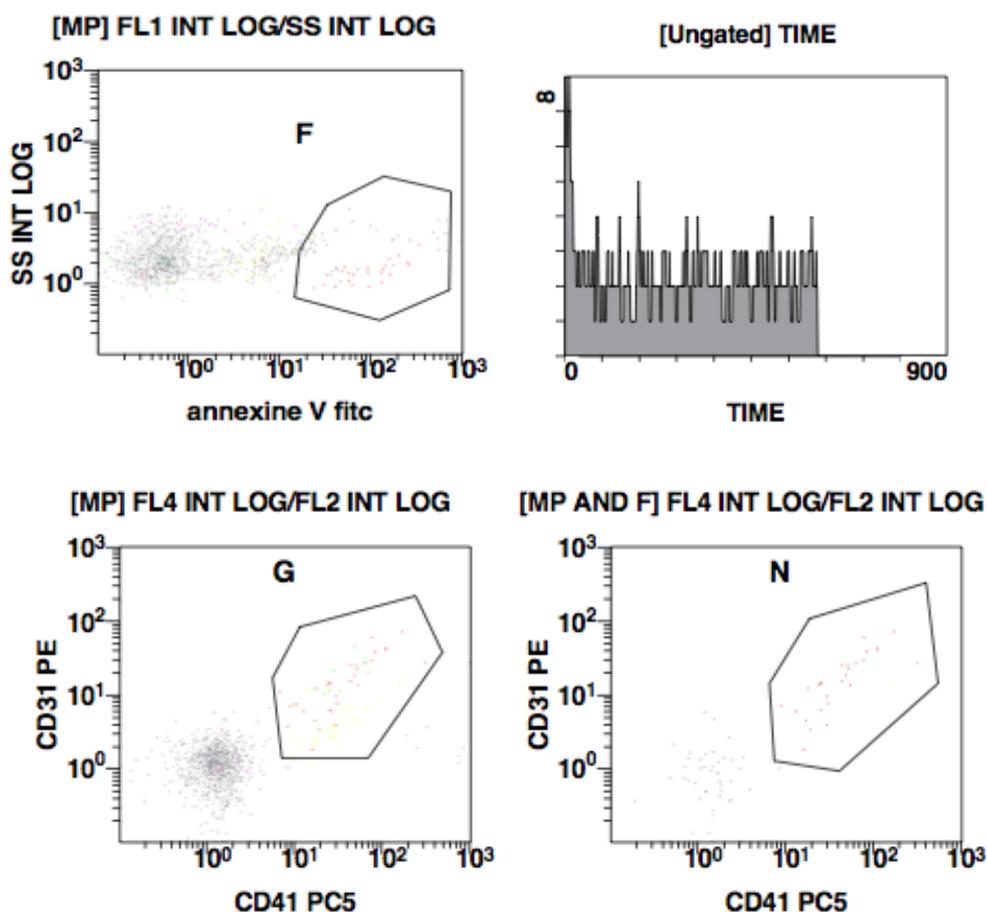
- présence dans la fenêtre MP
- MP présentant les marquages AnnexineV +, CD41+ et CD31+

Les critères choisis pour caractériser les EMP étaient les suivants :

- présence dans la fenêtre MP
- MP exprimant l'Annexine V et CD31 mais pas de CD41

Les acquisitions ont été réalisées sur 600 secondes, mais il a été choisi d'utiliser les chiffres de PMP et d'EMP obtenus entre les secondes 100 et 500 de chaque acquisition.

Un exemple des histogrammes obtenus est donné pour chaque série dans les **Figures 10, 11 et 12**.



**Figure 10.** Cytogrammes obtenus pour un des sujets de la série sujets contrôles.

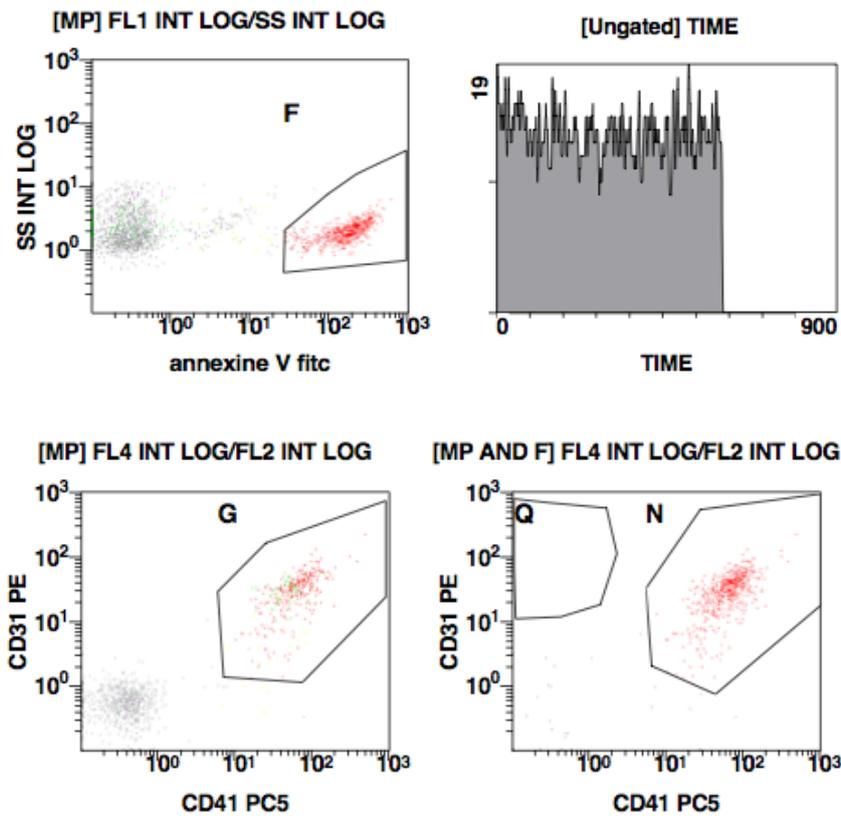


Figure 11. Cytogrammes obtenus pour un des sujets de la série patients TR.

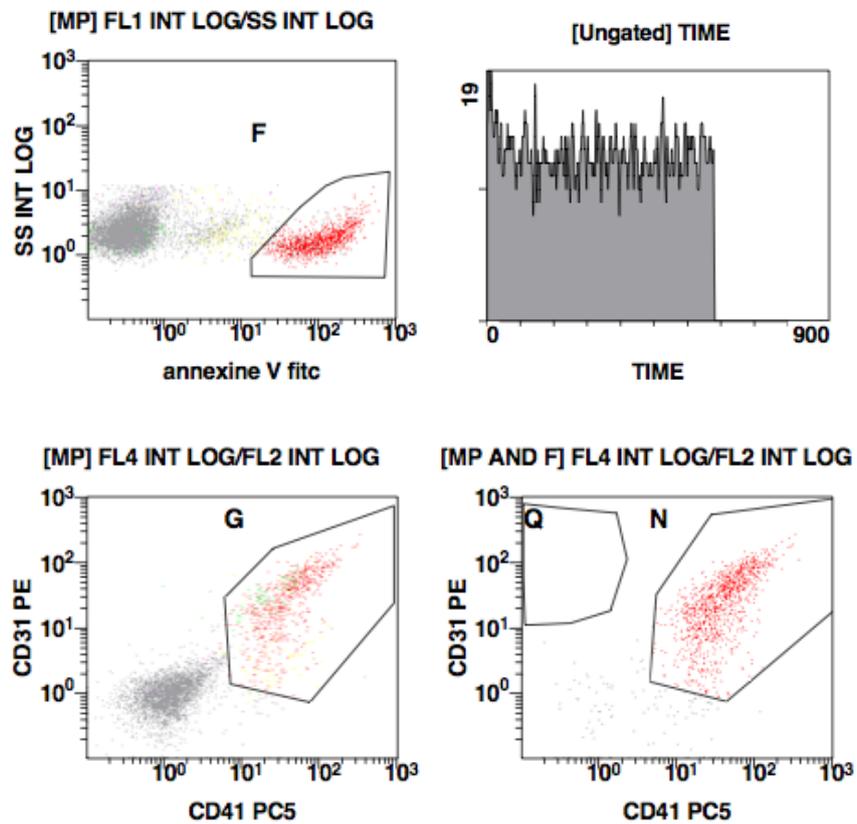


Figure 12. Cytogrammes obtenus pour un des sujets de la série patients TE.

## **f. Evaluation de la méthode**

- Répétabilité

La répétabilité de la technique a été évaluée sur 28 échantillons sélectionnés au hasard parmi les trois séries de patients (sujets contrôles, patients avec TE et patients avec TR). Le même opérateur a réalisé trois acquisitions successives sur un même échantillon réparti en 3 microtubes après l'incubation.

- Reproductibilité

La reproductibilité de la technique a été évaluée pour 11 échantillons sélectionnés au hasard parmi les trois séries de patients. Dans l'étape pré-analytique de la technique, un même PPP est divisé en plusieurs aliquotes de 200 $\mu$ L. Ainsi pour chaque échantillon testé, les essais de reproductibilité ont été réalisés sur deux aliquotes différents du même PPP traités sur deux jours différents.

- Comparaison des vitesses « Low » et « Medium » du cytomètre Navios

Les acquisitions ont été réalisées en utilisant la vitesse « Low ». Cette vitesse présente l'avantage de permettre d'étudier des particules de très petite taille (de l'ordre de grandeur des MP), cependant elle a l'inconvénient de présenter des variations fluidiques d'une manipulation à l'autre. La vitesse « Medium » permet de diminuer ces variations fluidiques. Une comparaison des deux vitesses a été réalisée le même jour sur 8 échantillons de patients sélectionnés au hasard parmi les séries TR et TE. Au préalable, les billes Megamix ont été passées deux fois : une fois avec la vitesse « Low » et une fois avec la vitesse « Medium ». Le cytomètre a compté 13917 billes en 600 secondes en vitesse « Low ». Lors de l'acquisition en vitesse « Medium », il a fallu 168 secondes au cytomètre pour compter 13917 billes. Pour comparer les vitesses, deux acquisitions ont été réalisées pour chaque échantillon : une acquisition de 600 secondes en vitesse « Low » et une acquisition de 168 secondes en vitesse « Medium ». Les nombres de MP obtenus lors de ces acquisitions ont alors pu être comparés deux à deux.

## 4. Statistiques

Des statistiques descriptives ont été réalisées à partir des variables quantitatives et qualitatives. Le nombre de PMP et le ratio (nombre de PMP) / (nombre de billes Megamix comptées le jour la manipulation) ont été choisis comme variables quantitatives. Ce ratio permet de s'affranchir des potentielles variabilités de comptage par le cytomètre dues aux variations fluidiques d'un jour à l'autre. Les résultats sont exprimés sous forme de moyenne  $\pm$  écart-type et bornes. Pour les variables qualitatives, les résultats sont exprimés sous forme de pourcentage.

Pour évaluer la répétabilité des mesures de la méthode, un modèle linéaire général a été utilisé. Les conditions initiales ont été vérifiées par un test de sphéricité. Le coefficient de variation a également été calculé pour chaque série de mesures répétées.

L'étude de reproductibilité et la comparaison des vitesses « Low » et « Medium » du cytomètre ont été réalisées grâce au test des différences de Student (comparaison de séries appariées). Pour les comparaisons entre les populations étudiées concernant les paramètres démographiques, les paramètres hématologiques et la quantification des PMP, le test paramétrique t de Student a été utilisé.

Le lien entre le nombre de PMP et le nombre de plaquettes a été étudié par des tests de corrélation de Spearman. Des courbes de tendance linéaire ont également été réalisées.

Au sein de la population TE, le test paramétrique t de Student a été utilisé pour :

- évaluer l'impact du statut mutationnel sur les résultats de mesure des PMP
- comparer les résultats obtenus à partir des échantillons prélevés à Angers à ceux obtenus à partir des échantillons prélevés à Nantes.

Pour tous les tests, une valeur de  $p < 0.05$  a été considérée comme significative.

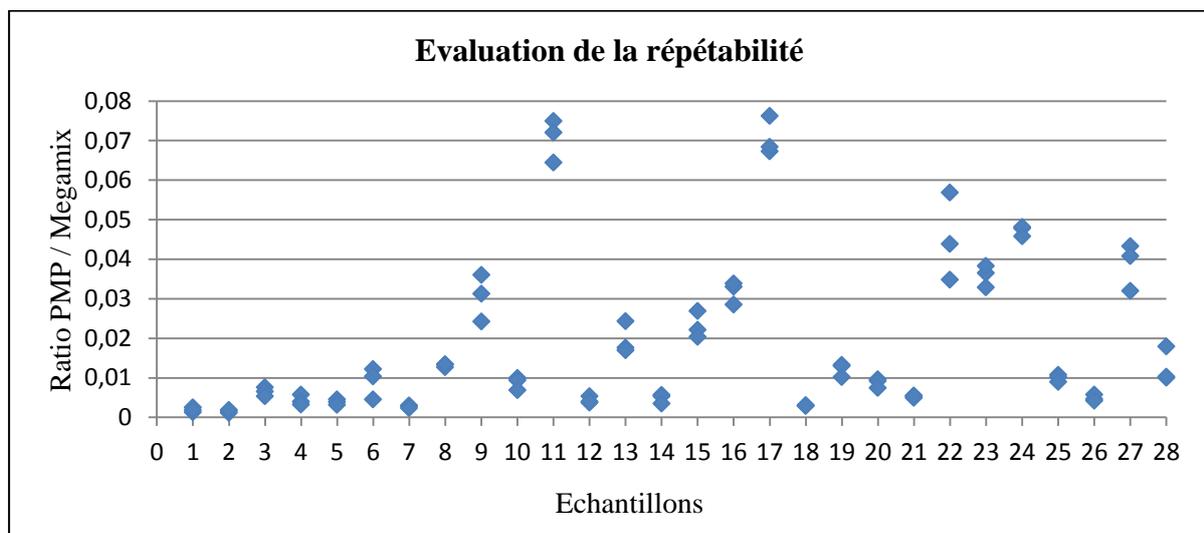
# **RESULTATS**

# 1. Evaluation de la méthode de détection et de quantification des MP

## a. Répétabilité

Pour évaluer la répétabilité des mesures, 28 échantillons ont été sélectionnés au hasard parmi les trois séries de patients (sujets contrôles, patients avec TE et patients avec TR) et trois acquisitions successives ont été réalisées sur chaque échantillon réparti en trois microtubes. Les ratio PMP / Megamix obtenus pour chaque échantillon testé sont représentés dans la **Figure 13**. Le test des effets intra-sujets par Anova sur mesures répétées (plan linéaire généralisé) a été choisi pour étudier la répétabilité de la méthode mise au point. Le test Anova est un test multivarié qui ne peut être utilisé qu'à la condition initiale que l'hypothèse de sphéricité ait été vérifiée. La sphéricité réside dans l'homogénéité des variances et covariances des différents niveaux du facteur intra-sujet. Le résultat du *test de sphéricité* de *Mauchly* ne rejette pas l'hypothèse de *sphéricité* des données ( $p = 0,113$  donc  $p > 0,05$ ), le test Anova sur mesures répétées (plan linéaire généralisé) a donc pu être appliqué. Le test Anova a montré l'absence de dépendance intra-sujet sur les valeurs des ratios PMP / billes Megamix ( $p = 0,458$  donc  $p > 0,05$ ). La répétition des manipulations (répétabilité) n'amène donc pas de variabilité significative. Comme la variabilité intra-sujet n'influe pas sur la variabilité inter-sujets, la moyenne des mesures répétées pour chaque patient pourra par la suite être utilisée lors des comparaisons des séries et le test t de Student pourra être appliqué dans ces conditions.

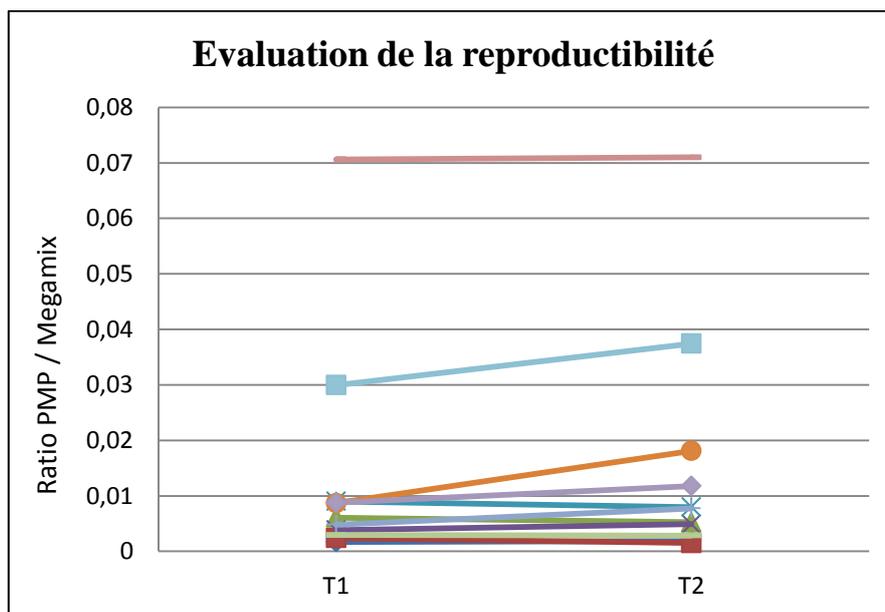
Le coefficient de variation moyen sur l'ensemble des manipulations a été déterminé, il est égal à 17%.



**Figure 13.** Représentation graphique de la répétabilité des mesures.

## b. Reproductibilité

L'évaluation de la reproductibilité a été réalisée à partir de 11 échantillons sélectionnés au hasard parmi les trois séries de patients. Pour chaque échantillon testé, deux aliquotes différents du même PPP ont été traités à une dizaine de jours d'intervalle suivant le même protocole. Les résultats obtenus sont représentés graphiquement dans la **Figure 14**. Le test des différences de Student montre une différence non significative ( $p = 0,093$ ) entre les deux passages des aliquotes.



**Figure 14.** Représentation graphique des essais de reproductibilité.

## c. Comparaison des vitesses « Low » et « Medium » du cytomètre Navios

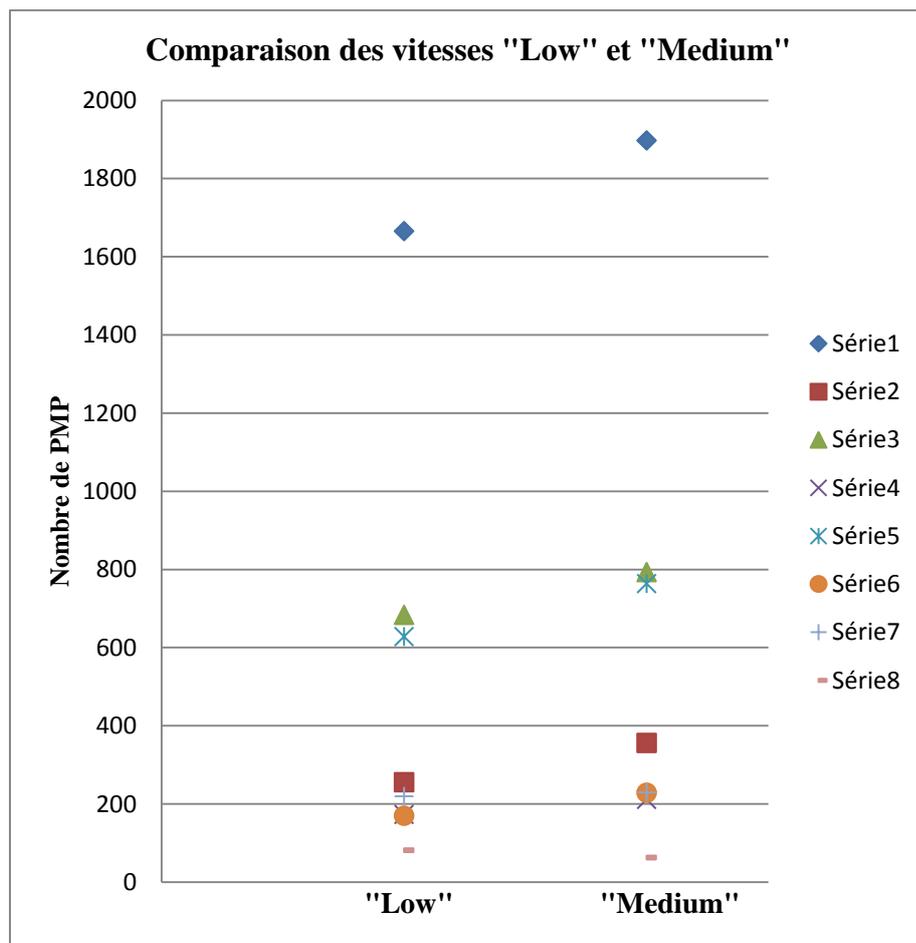
Une pression continue est appliquée au tube à échantillon. La quantité de pression dépend du débit de flux spécifié :

- « Low » environ 10  $\mu\text{L}/\text{min}$
- « Medium » environ 30  $\mu\text{L}/\text{min}$
- « High » environ 60  $\mu\text{L}/\text{min}$

Les acquisitions ont été réalisées en utilisant la vitesse « Low » qui permet d'étudier des particules de très petite taille (de l'ordre de grandeur des MP). Cette vitesse a cependant l'inconvénient de présenter des variations fluidiques d'une manipulation à l'autre. La vitesse « Medium » permet de diminuer ces variations fluidiques. Une comparaison des deux vitesses a été réalisée le même jour sur 8 échantillons de patients sélectionnés au hasard parmi les

séries TR et TE. Au préalable, les billes Megamix ont été passées deux fois : une fois avec la vitesse « Low » et une fois avec la vitesse « Medium ». Le cytomètre a compté 13917 billes en 600 secondes en vitesse « Low ». Lors de l'acquisition en vitesse « Medium », il a fallu 168 secondes au cytomètre pour compter 13917 billes. Pour comparer les vitesses, deux acquisitions ont été réalisées pour chaque échantillon : une acquisition de 600 secondes en vitesse « Low » et une acquisition de 168 secondes en vitesse « Medium ». Les nombres de PMP obtenus lors de ces acquisitions ont alors pu être comparés deux à deux graphiquement (**Figure 15**) et grâce à un test statistique adapté.

L'évaluation des différences par test de Student montre une différence significative ( $p = 0,021$ ) entre les nombres de MP obtenus avec la vitesse « Low » et ceux obtenus avec la vitesse « Medium ». Cependant l'observation de la répartition graphique des valeurs montre une répartition homogène de l'augmentation du nombre de MP évaluées en vitesse « Medium » et au total un impact minime suggérant que cette modalité d'acquisition pourrait être systématisée.



**Figure 15.** Comparaison des vitesses « Low » et « Medium » du cytomètre Navios.

## 2. Etude des PMP dans les trois séries de patients

### a. Données démographiques des populations étudiées

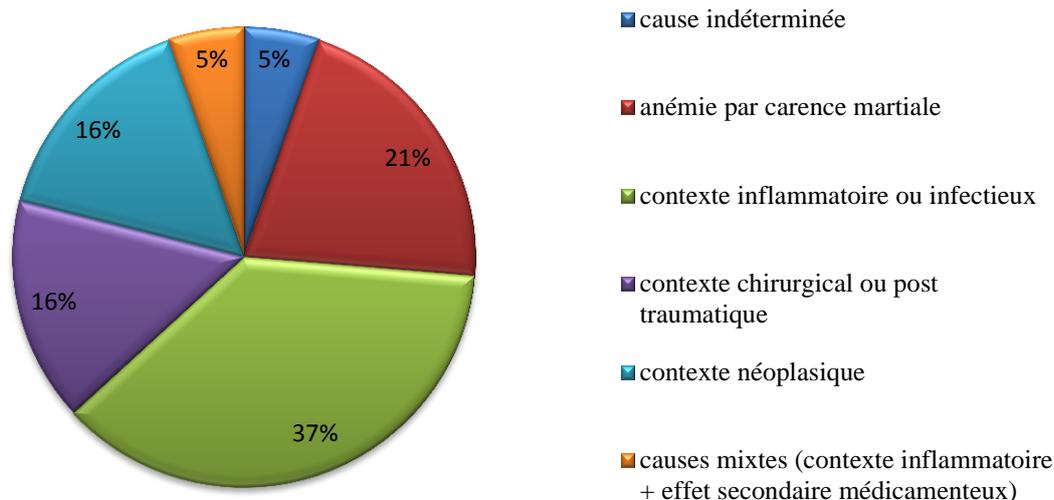
Les caractéristiques descriptives démographiques et hématologiques des populations TR et TE sont présentées dans le **Tableau 8**.

Caractéristiques hématologiques et démographiques	Thrombocytoses réactionnelles	Thrombocytémies essentielles
Nombre total	19	20
Sexe ratio (F/H)	10/9	10/10
Age en années (bornes)	53 (18-79)	66 (35-85)
Plaquettes (G/L) (bornes)	573 (479-808)	818 (427-1584)
Leucocytes (G/L) (bornes)	14,37 (6,48-29,63)	10,27 (5,43-20,97)
Mutation Jak2 V617F +	Non déterminé	11/20 (55%)

**Tableau 8.** Caractéristiques hématologiques et démographiques des populations étudiées. Les données sont représentées par la moyenne (bornes) ou le nombre (pourcentage).

Les patients ayant une TE sont en moyenne plus âgés (66 ans  $\pm$  13) que ceux ayant une TR (53 ans  $\pm$  17 ;  $p = 0,01$ ). Il n'existe pas de prédominance féminine ou masculine dans les populations TR et TE. La numération plaquettaire est significativement plus élevée dans la population TE (818  $\pm$  329 G/L) que dans la population TR (573  $\pm$  81 G/L;  $p = 0,004$ ). La leucocytose est significativement plus basse chez les patients ayant une TE (10,27  $\pm$  4,01 G/L) que chez les patients ayant une TR (14,37  $\pm$  6,65 G/L ;  $p = 0,028$ ). Chez les patients atteints de TE, la recherche de la mutation JAK2V617F est positive dans 11 cas sur 20 (55%) (**Tableau 8**).

Parmi les 19 patients présentant une TR, aucune étiologie n'a été retrouvée chez un d'entre eux. Pour les 18 autres, la fréquence des étiologies est résumée dans la **Figure 16**. Comme attendu, on note une prédominance des causes inflammatoires ou infectieuses.



**Figure 16.** Etiologies des thrombocytoses réactionnelles, exprimées en pourcentage.

### **b. Comparaisons des sujets contrôles et des patients avec TE**

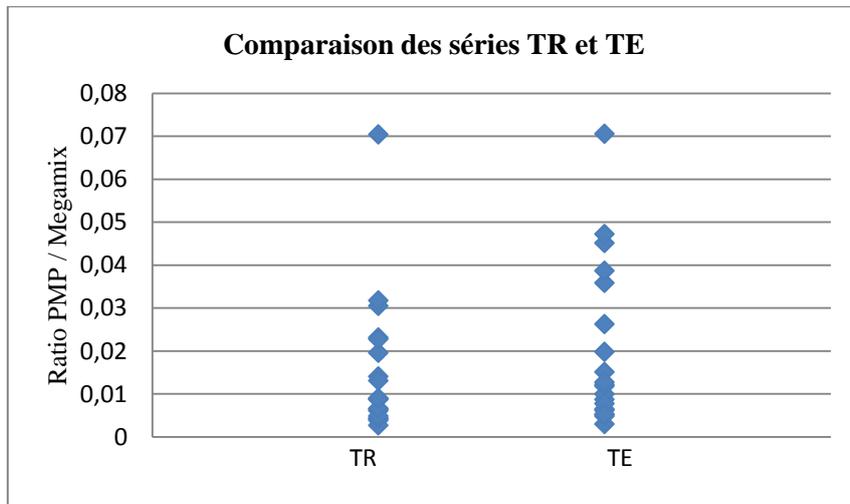
Le nombre de PMP est significativement plus élevé ( $p = 0,004$ ) chez les patients souffrant de TE ( $300,90 \pm 289,693$ ) que chez les sujets contrôles ( $84,23 \pm 62,832$ ). De même, le ratio PMP / Megamix est significativement plus élevé ( $p = 0,001$ ) chez les patients souffrant de TE ( $0,01964 \pm 0,01847$ ) que chez les sujets contrôles ( $0,00354 \pm 0,00246$ ). La **Figure 18** permet de visualiser et comparer la répartition de la variable « ratio PMP / Megamix » dans les trois séries grâce à des boîtes à moustaches.

### **c. Comparaison des sujets contrôles et des patients avec TR**

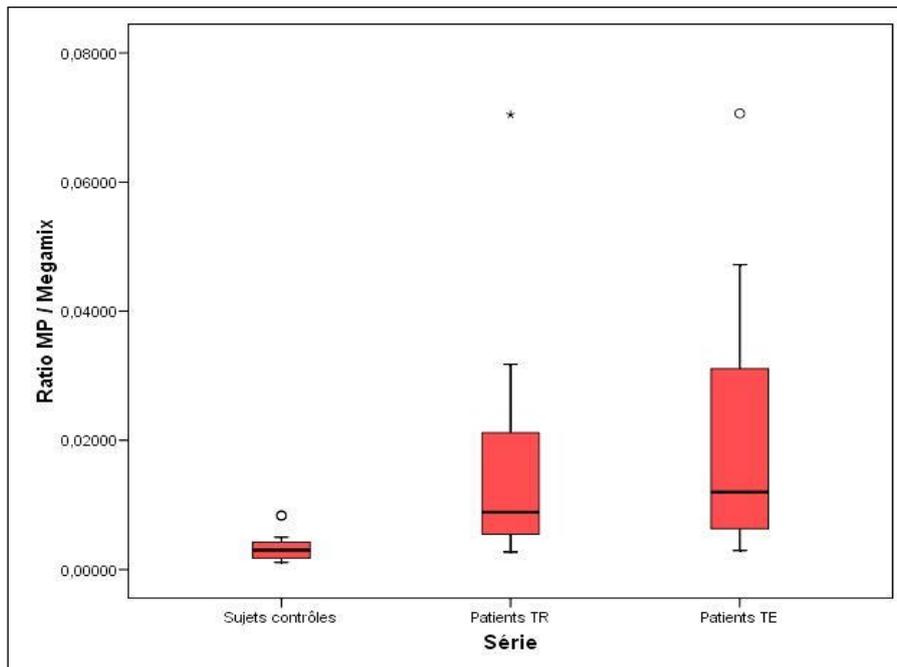
Le nombre de PMP est significativement plus élevé ( $p = 0,018$ ) chez les patients souffrant de TR ( $199,42 \pm 157,026$ ) que chez les sujets contrôles ( $84,23 \pm 62,832$ ). De même, le ratio PMP / Megamix est significativement plus élevé ( $p = 0,005$ ) chez les patients souffrant de TR ( $0,01533 \pm 0,01614$ ) que chez les sujets contrôles ( $0,00354 \pm 0,00246$ ). La **Figure 18** permet de visualiser et comparer la répartition de la variable « ratio PMP / Megamix » dans les trois séries grâce à des boîtes à moustaches.

#### d. Comparaison des deux séries de patients

Le nombre de PMP n'est pas significativement différent ( $p = 0,181$ ) entre les populations TR ( $199,42 \pm 157,026$ ) et TE ( $300,90 \pm 289,693$ ) bien que ces derniers aient généralement plus de PMP que les patients atteints de TR. De même, le ratio PMP / Megamix n'est pas significativement différent ( $p = 0,443$ ) entre les populations TR ( $0,01533 \pm 0,01614$ ) et TE ( $0,01964 \pm 0,01847$ ) mais généralement plus élevé dans la série TE comme le montre la **Figure 17**. La **Figure 18** permet de visualiser et comparer la répartition de la variable « ratio PMP / Megamix » dans les trois séries grâce à des boîtes à moustaches.



**Figure 17.** Représentation en nuage de points permettant de comparer les séries TR et TE.



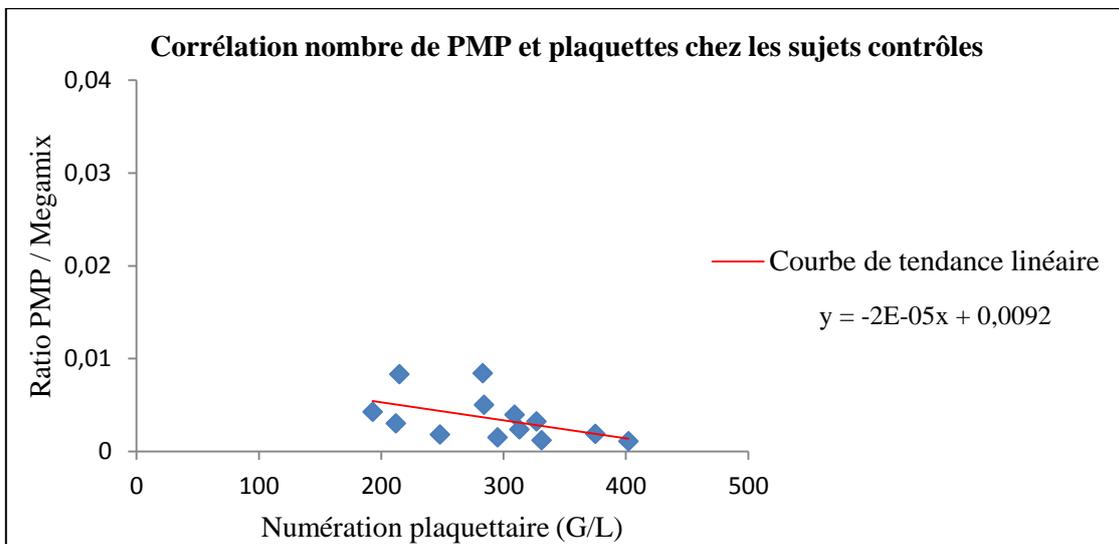
**Figure 18.** Représentation en boîtes à moustaches de la distribution de la variable « ratio PMP / Megamix » dans les trois populations.

### e. Etude du lien entre le nombre de PMP et la numération plaquettaire

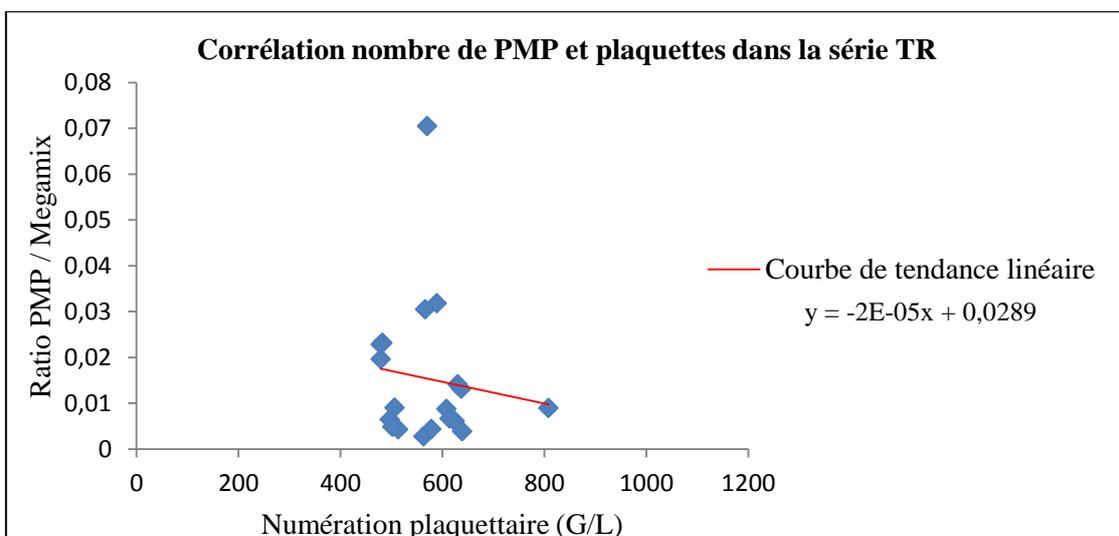
La corrélation entre le nombre de PMP et le nombre de plaquettes a été étudiée dans chaque série. Deux outils statistiques ont été utilisés : les courbes de tendance linéaire et le test de corrélation de Spearman.

- **Courbes de tendance linéaire**

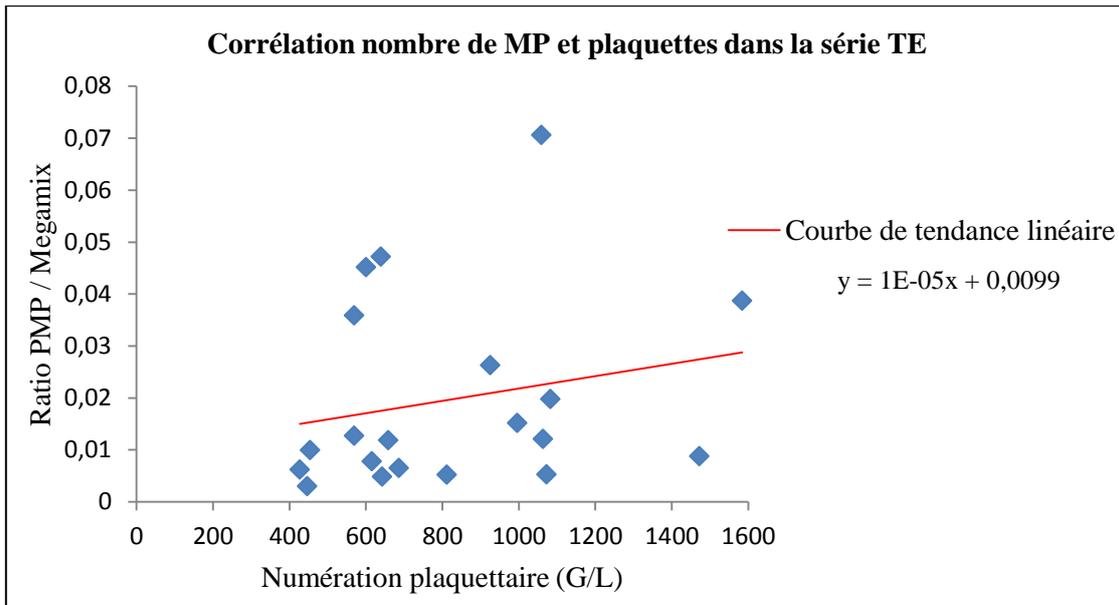
Une corrélation négative entre le nombre de MP et le nombre de plaquettes est observée dans le groupe des sujets contrôles (**Figure 19**) et dans la série TR (**Figure 20**). Au contraire, dans le groupe TE, une corrélation positive est mise en évidence (**Figure 21**).



**Figure 19.** Représentation graphique de la corrélation entre la numération plaquettaire et le nombre de PMP chez les sujets contrôles.



**Figure 20.** Représentation graphique de la corrélation entre la numération plaquettaire et le nombre de PMP dans la série TR.



**Figure 21.** Représentation graphique de la corrélation entre la numération plaquettaire et le nombre de PMP dans la série TE.

- **Résultats des tests de corrélation de Spearman**

	Sujets contrôles	Patients TR	Patients TE
<b>Effectif N</b>	13	19	20
<b>Coefficient de corrélation r</b>	-0.5934	-0,1764	0,2241
<b>Valeur p</b>	0,036	0,470	0,342
<b>Conclusion</b>	S	NS	NS

(S = différence significative : il existe une corrélation, NS = différence non significative : il n'existe pas de corrélation)

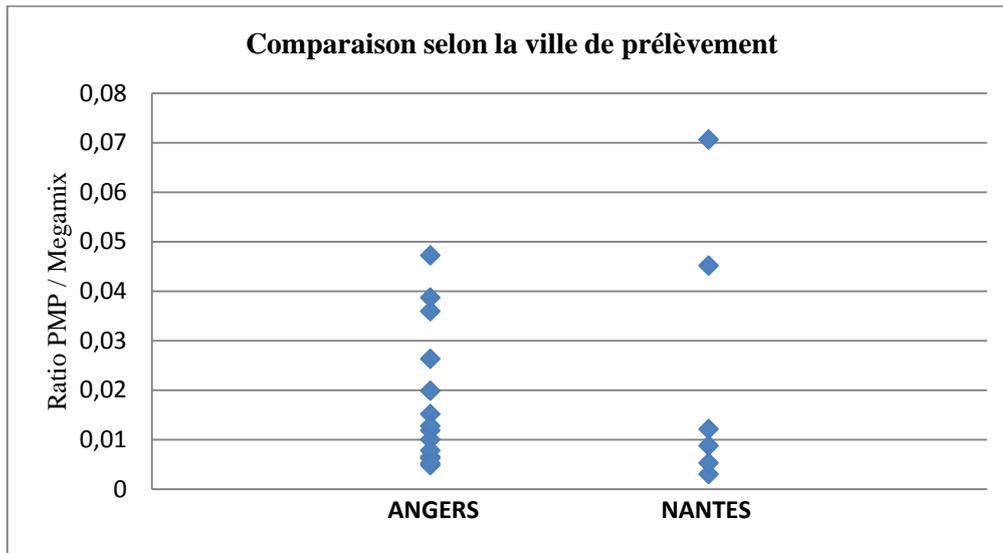
**Tableau 9.** Etude du lien entre le nombre de PMP et la numération plaquettaire dans les trois populations de l'étude grâce au test de corrélation de Spearman.

**f. Impact de la mutation Jak2 V617F sur le nombre de PMP**

Au sein de la population TE (N = 20 patients), la différence entre les ratios PMP / Megamix des 9 patients Jak2 - ( $0,02103 \pm 0,02205$ ) et des 11 patients Jak2 + ( $0,01851 \pm 0,01601$ ) est non significative ( $p = 0,770$ ). Le statut mutationnel de Jak2 ne semble donc pas interférer sur ce paramètre.

### g. Comparaison des résultats obtenus en fonction de la ville de prélèvement

Au sein de la population TE (N = 20 patients), 14 patients ont été prélevés à Angers et 6 patients ont été prélevés à Nantes. La différence entre les ratios PMP / Megamix obtenus à partir des échantillons prélevés dans les deux lieux de prélèvement (Angers :  $0,01772 \pm 0,01393$ , Nantes :  $0,02413 \pm 0,02753$ ) est non significative ( $p = 0,607$ ). Les résultats sont représentés dans la **Figure 22**.



**Figure 22.** Comparaison des ratios PMP / Megamix obtenus en fonction de la ville de prélèvement.

### 3. Etude des EMP dans les trois séries de patients

Dans aucune des trois séries d'échantillons étudiées (sujets contrôles, patients TR et patients TE), n'ont été mises en évidence d'EMP caractérisées par l'expression de CD31.

## **DISCUSSION**

La détection des MP est une méthode de développement récent encore en période d'évaluation. La technique d'immunomarquage et lecture en cytométrie en flux est la plus communément utilisée pour détecter et dénombrer ces fragments cellulaires. Le premier objectif de ce projet résidait dans la mise au point de la détection et de la quantification des MP d'origine plaquettaire et endothéliale sur le cytomètre Navios au CHU de Nantes.

Différents paramètres analytiques ont permis d'aboutir à une mesure précise des MP :

- l'utilisation de l'option W2 du Navios donne accès à la CMF dite de haute sensibilité permettant d'étudier les MP de petite taille, négligées en CMF standard
- les réglages avec les billes Megamix augmentent la résolution du cytomètre et permettent d'en contrôler la sensibilité taille-structure avant chaque manipulation
- les lavages du cytomètre ont été répétés avant et après chaque manipulation pour travailler dans les conditions de propreté imposées par l'étude des MP
- la mesure directe dans le PPP sans isolement préalable des MP évite la sous-estimation du nombre de MP
- l'utilisation d'héparine permet d'inhiber la coagulation du PPP citraté à l'origine d'interférences dans la zone MP.

Le protocole pré-analytique, qui a pour but de limiter au maximum la génération de MP ex vivo, s'est avéré très exigeant et nécessite de toute évidence d'être réalisé par un personnel formé et compétent. Cette démarche pré-analytique complexe a limité le recrutement des patients dans le cadre de cette étude sur les thrombocytoses et a ainsi imposé de travailler sur de petites séries d'échantillons.

Les billes Megamix ont non seulement été utilisées pour les réglages mais aussi comme standard externe (traitées séparément et dans les mêmes conditions que les échantillons). L'expression de la quantification des PMP sous forme d'un ratio (nombre de PMP) / (nombre de billes Megamix comptées le jour de la manipulation) a permis de lisser les variations de nombres de PMP liées aux variations fluidiques de l'appareil d'un jour à l'autre. Des billes de comptage adaptées de type Flow Count® (Beckman Coulter) auraient pu être utilisées directement dans le même tube que l'échantillon du patient, c'est-à-dire comme standard interne. Cette solution aurait permis de faciliter l'interprétation, de travailler avec des chiffres sans décimale, et de s'affranchir de variations de comptage potentielles d'une manipulation à l'autre le même jour.

Toutes les mesures ont été réalisées avec la vitesse « Low » du cytomètre. Cette vitesse présente l'avantage de permettre l'étude de particules de l'ordre de grandeur des MP, cependant elle a l'inconvénient de présenter des variations fluidiques d'une manipulation à l'autre. La vitesse « Medium » permet de diminuer ces variations fluidiques et de travailler sur des acquisitions plus courtes. La comparaison entre les deux vitesses soulevait le problème de la capacité de la vitesse « Medium » à étudier des particules de très petite taille. Pour ce volet de l'étude, un temps d'acquisition permettant de compter un même nombre de billes Megamix a été choisi pour chaque vitesse. Une différence significative a été mise en évidence entre les nombres de PMP obtenus avec les deux vitesses : le cytomètre compte statistiquement plus de PMP en vitesse « Medium », mais la différence est minime et homogène ne devant a priori pas impacter les différences observées entre les groupes de sujets testés. Il serait toutefois intéressant de réaliser cette comparaison en utilisant un plus grand nombre d'échantillons. Si les deux vitesses montraient des résultats statistiquement équivalents, la vitesse « Medium » serait un moyen de travailler plus rapidement et de s'affranchir de l'utilisation de billes de comptage.

Les essais de répétabilité et de reproductibilité réalisés ont montré des résultats satisfaisants. De plus les nombres de PMP en valeur absolue obtenus grâce à la technique mise au point sont tout à fait en accord avec les valeurs rapportées dans la littérature : 100 à 4000 PMP/ $\mu$ L.(117) Ces résultats permettent d'envisager l'utilisation de ce mode opératoire en routine, la diffusion de celui-ci à d'autres utilisateurs du cytomètre Navios et l'application à d'autres situations physiopathologiques.

Par la suite, nous nous sommes intéressés à une situation clinique dont le risque thrombotique est réel et peut être lié à la génération de MP : la TE.

Des critères diagnostiques de TE ont été établis, reposant sur la numération plaquettaire, la prolifération mégacaryocytaire, l'absence de critères OMS en faveur d'un autre SMP et la présence de la mutation JAK2V617F ou d'un autre marqueur de clonalité. Ces critères manquent toutefois de sensibilité et de spécificité. La mutation JAK2V617F a été incluse comme élément diagnostique, mais ce marqueur clonal n'étant présent que chez la moitié des patients environ, éliminer une TR est donc indispensable devant une suspicion de TE.

Les MP d'origine plaquettaire et endothéliale ont été étudiées chez des patients ayant une TE ou une TR dans le but d'estimer leur intérêt pour différencier les deux types de thrombocytoses.

L'absence d'EMP suggère qu'il existe peu d'altérations vasculaires dans les deux situations pathologiques étudiées (TR et TE). Le travail a donc été focalisé sur l'étude des PMP.

Les résultats ont montré une différence significative du nombre de PMP entre la population contrôle et les populations TR et TE. Plusieurs travaux avaient déjà mis en évidence une augmentation du nombre des MP dans la TE par rapport à une population témoin (4,188,189) avec un phénotype en majorité d'origine plaquettaire, mais aussi endothéliale. De plus, tout comme dans l'étude de Moles-Moreau et *al.*(188), le nombre de PMP était plus élevé pour les TE que pour les TR, mais ce de façon non significative, bien que la TR soit une situation clinique moins thrombogène que la TE. Ces observations suggèrent que le nombre de PMP pourrait être lié au nombre de plaquettes plutôt qu'à la situation clinique du patient. C'est d'ailleurs la conclusion de l'équipe de Connor et *al.*(189) qui ne retrouve pas, au contraire de l'étude de Moles-Moreau et *al.*(188), de différence significative entre les ratios MP/plaquettes des groupes sujets sains et patients souffrant de TE. Pour Connor et *al.*, le nombre de PMP relarguées à partir de chaque plaquette n'est pas augmenté dans la TE (189). Dans la présente étude, le test de corrélation n'a confirmé un lien entre nombre de PMP et numération plaquettaire que pour les patients atteints de TE. En effet, les courbes de tendance linéaire réalisées pour chaque série montrent une corrélation négative dans les séries sujets contrôles et TR. Dans ces deux populations, la production de MP serait donc associée à une baisse des plaquettes, ce qui pourrait suggérer qu'il s'agit d'un phénomène associé à la dégradation plaquettaire, témoin de l'établissement de l'homéostasie (chez les sujets sains) ou d'une tentative de sa restauration (inefficace chez les patients TR). A l'inverse, chez les patients atteints de TE l'hyperactivité des mégacaryocytes serait associée à la fois à une augmentation du nombre de plaquettes et des MP. Ceci n'est pas forcément antinomique avec ce qui est observé dans les deux autres populations, mais pourrait témoigner du fait que la production est plus rapide que la dégradation des plaquettes. On peut aussi supposer qu'il existe un mode production de PMP différent chez les sujets pathologiques par rapport aux sujets sains.

Selon les résultats de cette étude, le nombre de PMP ne pourrait pas à lui seul contribuer au diagnostic de TE, par contre, associé à un nombre élevé de plaquettes il pourrait participer au faisceau d'arguments aboutissant à ce diagnostic. Mignon et *al.*(190) avec une autre approche, avaient conclu que le taux de phospholipides procoagulants pourrait participer au diagnostic différentiel entre TR et TE. Mais le test qu'ils ont utilisé évalue l'activité procoagulante plasmatique, il est donc difficile de comparer ces résultats obtenus grâce à un test fonctionnel avec les résultats de la présente étude qui s'intéresse spécifiquement aux PMP.

Concernant le statut JAK2V617F, comme l'ont observé Trappenburg et *al.*(4) le statut mutationnel n'était pas corrélé avec le nombre ou l'origine cellulaire des MP dans le groupe des TE dans cette étude.

En outre, les résultats observés dans cette étude doivent être interprétés avec prudence. En effet, les tests statistiques peuvent manquer de puissance en raison du faible nombre de patients dans chaque série. Il serait intéressant d'élargir ce projet pour pouvoir travailler sur de plus grands échantillons. De plus, la poursuite de cette étude nécessiterait de préciser lesquelles des étapes pré-analytiques décrites doivent être scrupuleusement respectées. En effet, la population TE constituée de novembre 2012 à mars 2013 comprenait des patients recrutés au CHU d'Angers et des patients recrutés au CHU de Nantes. Ceci a généré des différences pré-analytiques qui auraient pu constituer un biais dans la mesure et la quantification des MP au sein de la population TE et par conséquent un biais lors de l'interprétation des résultats et la comparaison de la série de TE aux séries TR et témoins. Plus précisément, les tubes citratés utilisés à Nantes et à Angers étaient de deux références différentes, les prélèvements n'ont pas subi la même agitation liée au transport et les aliquotes préparés à Angers ont été transportés dans la carboglace jusqu'à Nantes. Lacroix et *al.* présentent la phase pré-analytique comme une source de variabilité importante puisqu'une activation cellulaire se produit facilement lors de la préparation et du stockage des échantillons, générant des MP *ex vivo* et perturbant ainsi la quantification des MP par CMF (126). La comparaison des résultats obtenus à Angers et à Nantes au sein de la population TE n'a cependant pas mis en évidence de différence statistiquement significative, suggérant que les conditions pré-analytiques pourraient ne pas être aussi stringentes et que la préparation des échantillons dans les deux sites a été réalisée de façon satisfaisante.

# **CONCLUSION**

En conclusion, cette étude avait dans un premier temps pour objectif de mettre en place la quantification des PMP par CMF au CHU de Nantes. Répétabilité et reproductibilité ont été évaluées et considérées satisfaisantes. Or les différentes études publiées sur la mesure des MP par CMF n'abordent jamais le versant évaluation de méthode. Il est donc possible de diffuser la technique dans d'autres laboratoires de CMF et de l'utiliser dans d'autres applications physiopathologiques.

La deuxième partie de ce projet a permis d'exclure la quantification des PMP comme marqueur pouvant intervenir dans le diagnostic différentiel entre TE et TR. De plus, l'augmentation des PMP dans les TR et TE, indépendante de la masse plaquettaire, suggère un processus physiopathologique propre à chacune de ces situations. Enfin, aucun lien entre le statut mutationnel Jak2V617F et le nombre de PMP n'a été mis en évidence.

D'autres travaux seraient intéressants pour approfondir ce travail : utiliser des billes de comptage, confirmer l'intérêt de l'utilisation de la vitesse « Medium » sur un plus grand nombre d'échantillons, tester en parallèle d'autres méthodes de détection des MP pour comparer les résultats avec ceux obtenus par CMF.

## Références bibliographiques

1. Wolf P. The nature and significance of platelet products in human plasma. *Br J Haematol.* 1967 May;13(3):269–88.
2. Piccin A, Murphy WG, Smith OP. Circulating microparticles: pathophysiology and clinical implications. *Blood Rev.* 2007 May;21(3):157–71.
3. Lacroix R, Dignat-George F. Microparticles as a circulating source of procoagulant and fibrinolytic activities in the circulation. *Thromb Res.* 2012 May;129 Suppl 2:S27–29.
4. Trappenburg MC, van Schilfgaarde M, Marchetti M, Spronk HM, ten Cate H, Leyte A, et al. Elevated procoagulant microparticles expressing endothelial and platelet markers in essential thrombocythemia. *Haematologica.* 2009 Jul;94(7):911–8.
5. Morel O, Jesel L, Freyssinet J-M, Toti F. Cellular mechanisms underlying the formation of circulating microparticles. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2011 Jan;31(1):15–26.
6. Cocucci E, Racchetti G, Meldolesi J. Shedding microvesicles: artefacts no more. *Trends Cell Biol.* 2009 Feb;19(2):43–51.
7. Iversen LV, Ostergaard O, Nielsen CT, Jacobsen S, Heegaard NHH. A heparin-based method for flow cytometric analysis of microparticles directly from platelet-poor plasma in calcium containing buffer. *J Immunol Methods.* 2013 Feb 28;388(1-2):49–59.
8. Yuana Y, Bertina RM, Osanto S. Pre-analytical and analytical issues in the analysis of blood microparticles. *Thromb Haemost.* 2011 Mar;105(3):396–408.
9. Dignat-George F, Boulanger CM. The many faces of endothelial microparticles. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2011 Jan;31(1):27–33.
10. Seigneuret M, Zachowski A, Hermann A, Devaux PF. Asymmetric lipid fluidity in human erythrocyte membrane: new spin-label evidence. *Biochemistry (Mosc).* 1984 Sep 11;23(19):4271–5.
11. Manno S, Takakuwa Y, Mohandas N. Identification of a functional role for lipid asymmetry in biological membranes: Phosphatidylserine-skeletal protein interactions modulate membrane stability. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2002 Feb 19;99(4):1943–8.
12. Doeuvre L, Angeles-Cano E. Des microparticules cellulaires dévoilent leur fonction fibrinolytique et protéolytique. *Médecine Sci.* 2009;37–44.
13. Connor DE, Exner T, Ma DDF, Joseph JE. The majority of circulating platelet-derived microparticles fail to bind annexin V, lack phospholipid-dependent procoagulant activity and demonstrate greater expression of glycoprotein Ib. *Thromb Haemost.* 2010 May;103(5):1044–52.
14. Mause SF, Weber C. Microparticles: protagonists of a novel communication network for intercellular information exchange. *Circ Res.* 2010 Oct 29;107(9):1047–57.
15. Owens AP 3rd, Mackman N. Microparticles in hemostasis and thrombosis. *Circ Res.* 2011 May 13;108(10):1284–97.
16. Page-McCaw A, Ewald AJ, Werb Z. Matrix metalloproteinases and the regulation of tissue remodelling. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2007 Mar;8(3):221–33.

17. Dolo V, D'Ascenzo S, Violini S, Pompucci L, Festuccia C, Ginestra A, et al. Matrix-degrading proteinases are shed in membrane vesicles by ovarian cancer cells in vivo and in vitro. *Clin Exp Metastasis*. 1999 Mar;17(2):131–40.
18. Ginestra A, Miceli D, Dolo V, Romano FM, Vittorelli ML. Membrane vesicles in ovarian cancer fluids: a new potential marker. *Anticancer Res*. 1999 Aug;19(4C):3439–45.
19. Ginestra A, Monea S, Seghezzi G, Dolo V, Nagase H, Mignatti P, et al. Urokinase plasminogen activator and gelatinases are associated with membrane vesicles shed by human HT1080 fibrosarcoma cells. *J Biol Chem*. 1997 Jul 4;272(27):17216–22.
20. Angelucci A, D'Ascenzo S, Festuccia C, Gravina GL, Bologna M, Dolo V, et al. Vesicle-associated urokinase plasminogen activator promotes invasion in prostate cancer cell lines. *Clin Exp Metastasis*. 2000;18(2):163–70.
21. Taraboletti G, D'Ascenzo S, Borsotti P, Giavazzi R, Pavan A, Dolo V. Shedding of the matrix metalloproteinases MMP-2, MMP-9, and MT1-MMP as membrane vesicle-associated components by endothelial cells. *Am J Pathol*. 2002 Feb;160(2):673–80.
22. Distler JHW, Jüngel A, Huber LC, Seemayer CA, Reich CF 3rd, Gay RE, et al. The induction of matrix metalloproteinase and cytokine expression in synovial fibroblasts stimulated with immune cell microparticles. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2005 Feb 22;102(8):2892–7.
23. Millimaggi D, Mari M, D'Ascenzo S, Carosa E, Jannini EA, Zucker S, et al. Tumor vesicle-associated CD147 modulates the angiogenic capability of endothelial cells. *Neoplasia New York N*. 2007 Apr;9(4):349–57.
24. Janowska-Wieczorek A, Wysoczynski M, Kijowski J, Marquez-Curtis L, Machalinski B, Ratajczak J, et al. Microvesicles derived from activated platelets induce metastasis and angiogenesis in lung cancer. *Int J Cancer J Int Cancer*. 2005 Feb 20;113(5):752–60.
25. Lacroix R, Sabatier F, Mialhe A, Basire A, Pannell R, Borghi H, et al. Activation of plasminogen into plasmin at the surface of endothelial microparticles: a mechanism that modulates angiogenic properties of endothelial progenitor cells in vitro. *Blood*. 2007 Oct 1;110(7):2432–9.
26. Dejouvencel T, Doeuvre L, Lacroix R, Plawinski L, Dignat-George F, Lijnen HR, et al. Fibrinolytic cross-talk: a new mechanism for plasmin formation. *Blood*. 2010 Mar 11;115(10):2048–56.
27. Kwaan HC, Rego EM. Role of microparticles in the hemostatic dysfunction in acute promyelocytic leukemia. *Semin Thromb Hemost*. 2010 Nov;36(8):917–24.
28. Lacroix R, Dubois C, Leroyer AS, Sabatier F, Dignat-George F. Revisited role of microparticles in arterial and venous thrombosis. *J Thromb Haemost*. 2013;11:24–35.
29. Mesri M, Altieri DC. Endothelial cell activation by leukocyte microparticles. *J Immunol Baltim Md 1950*. 1998 Oct 15;161(8):4382–7.
30. Cerri C, Chimenti D, Conti I, Neri T, Paggiaro P, Celi A. Monocyte/macrophage-derived microparticles up-regulate inflammatory mediator synthesis by human airway epithelial cells. *J Immunol Baltim Md 1950*. 2006 Aug 1;177(3):1975–80.
31. Dalli J, Norling LV, Renshaw D, Cooper D, Leung K-Y, Perretti M. Annexin 1 mediates the rapid anti-inflammatory effects of neutrophil-derived microparticles. *Blood*. 2008 Sep 15;112(6):2512–9.

32. Bernal-Mizrachi L, Jy W, Jimenez JJ, Pastor J, Mauro LM, Horstman LL, et al. High levels of circulating endothelial microparticles in patients with acute coronary syndromes. *Am Heart J*. 2003 Jun;145(6):962–70.
33. Bernal-Mizrachi L, Jy W, Fierro C, Macdonough R, Velazques HA, Purow J, et al. Endothelial microparticles correlate with high-risk angiographic lesions in acute coronary syndromes. *Int J Cardiol*. 2004 Dec;97(3):439–46.
34. Simak J, Gelderman MP, Yu H, Wright V, Baird AE. Circulating endothelial microparticles in acute ischemic stroke: a link to severity, lesion volume and outcome. *J Thromb Haemost Jth*. 2006 Jun;4(6):1296–302.
35. Faure V, Dou L, Sabatier F, Cerini C, Sampol J, Berland Y, et al. Elevation of circulating endothelial microparticles in patients with chronic renal failure. *J Thromb Haemost Jth*. 2006 Mar;4(3):566–73.
36. Tan KT, Tayebjee MH, Macfadyen RJ, Lip GYH, Blann AD. Elevated platelet microparticles in stable coronary artery disease are unrelated to disease severity or to indices of inflammation. *Platelets*. 2005 Sep;16(6):368–71.
37. Stępień E, Stankiewicz E, Zalewski J, Godlewski J, Żmudka K, Wybrańska I. Number of Microparticles Generated During Acute Myocardial Infarction and Stable Angina Correlates with Platelet Activation. *Arch Med Res*. 2012 Jan;43(1):31–5.
38. Jung C, Sörensson P, Saleh N, Arheden H, Rydén L, Pernow J. Circulating endothelial and platelet derived microparticles reflect the size of myocardium at risk in patients with ST-elevation myocardial infarction. *Atherosclerosis*. 2012 Mar;221(1):226–31.
39. Michelsen AE, Notø A-T, Brodin E, Mathiesen EB, Brosstad F, Hansen J-B. Elevated levels of platelet microparticles in carotid atherosclerosis and during the postprandial state. *Thromb Res*. 2009 Apr;123(6):881–6.
40. Chironi GN, Simon A, Boulanger CM, Dignat-George F, Hugel B, Megnien J-L, et al. Circulating microparticles may influence early carotid artery remodeling. *J Hypertens*. 2010 Apr;28(4):789–96.
41. Kuriyama N, Nagakane Y, Hosomi A, Ohara T, Kasai T, Harada S, et al. Evaluation of factors associated with elevated levels of platelet-derived microparticles in the acute phase of cerebral infarction. *Clin Appl Thromb Off J Int Acad Clin Appl Thromb*. 2010 Feb;16(1):26–32.
42. Chironi G, Simon A, Hugel B, Del Pino M, Gariepy J, Freyssinet J-M, et al. Circulating leukocyte-derived microparticles predict subclinical atherosclerosis burden in asymptomatic subjects. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2006 Dec;26(12):2775–80.
43. Nomura S, Imamura A, Okuno M, Kamiyama Y, Fujimura Y, Ikeda Y, et al. Platelet-derived microparticles in patients with arteriosclerosis obliterans: enhancement of high shear-induced microparticle generation by cytokines. *Thromb Res*. 2000 May 15;98(4):257–68.
44. Mayr M, Grainger D, Mayr U, Leroyer AS, Leseche G, Sidibe A, et al. Proteomics, metabolomics, and immunomics on microparticles derived from human atherosclerotic plaques. *Circ Cardiovasc Genet*. 2009 Aug;2(4):379–88.
45. Leroyer AS, Rautou P-E, Silvestre J-S, Castier Y, Lesèche G, Devue C, et al. CD40 ligand+ microparticles from human atherosclerotic plaques stimulate endothelial proliferation and angiogenesis a potential mechanism for intraplaque neovascularization. *J Am Coll Cardiol*. 2008 Oct 14;52(16):1302–11.

46. Canault M, Leroyer AS, Peiretti F, Lesèche G, Tedgui A, Bonardo B, et al. Microparticles of human atherosclerotic plaques enhance the shedding of the tumor necrosis factor- $\alpha$  converting enzyme/ADAM17 substrates, tumor necrosis factor and tumor necrosis factor receptor-1. *Am J Pathol*. 2007 Nov;171(5):1713–23.
47. Mallat Z, Hugel B, Ohan J, Lesèche G, Freyssinet JM, Tedgui A. Shed membrane microparticles with procoagulant potential in human atherosclerotic plaques: a role for apoptosis in plaque thrombogenicity. *Circulation*. 1999 Jan 26;99(3):348–53.
48. Shantsila E, Kamphuisen PW, Lip GYH. Circulating microparticles in cardiovascular disease: implications for atherogenesis and atherothrombosis. *J Thromb Haemost Jth*. 2010 Nov;8(11):2358–68.
49. Lee YJ, Jy W, Horstman LL, Janania J, Reyes Y, Kelley RE, et al. Elevated platelet microparticles in transient ischemic attacks, lacunar infarcts, and multiinfarct dementias. *Thromb Res*. 1993 Nov 15;72(4):295–304.
50. Cherian P, Hankey GJ, Eikelboom JW, Thom J, Baker RI, McQuillan A, et al. Endothelial and platelet activation in acute ischemic stroke and its etiological subtypes. *Stroke J Cereb Circ*. 2003 Sep;34(9):2132–7.
51. Williams JB, Jauch EC, Lindsell CJ, Campos B. Endothelial microparticle levels are similar in acute ischemic stroke and stroke mimics due to activation and not apoptosis/necrosis. *Acad Emerg Med Off J Soc Acad Emerg Med*. 2007 Aug;14(8):685–90.
52. Koga H, Sugiyama S, Kugiyama K, Watanabe K, Fukushima H, Tanaka T, et al. Elevated levels of VE-cadherin-positive endothelial microparticles in patients with type 2 diabetes mellitus and coronary artery disease. *J Am Coll Cardiol*. 2005 May 17;45(10):1622–30.
53. Nozaki T, Sugiyama S, Koga H, Sugamura K, Ohba K, Matsuzawa Y, et al. Significance of a multiple biomarkers strategy including endothelial dysfunction to improve risk stratification for cardiovascular events in patients at high risk for coronary heart disease. *J Am Coll Cardiol*. 2009 Aug 11;54(7):601–8.
54. Jung K-H, Chu K, Lee S-T, Bahn J-J, Kim J-H, Kim M, et al. Risk of macrovascular complications in type 2 diabetes mellitus: endothelial microparticle profiles. *Cerebrovasc Dis Basel Switz*. 2011;31(5):485–93.
55. Ogata N, Imaizumi M, Nomura S, Shozu A, Arichi M, Matsuoka M, et al. Increased levels of platelet-derived microparticles in patients with diabetic retinopathy. *Diabetes Res Clin Pract*. 2005 Jun;68(3):193–201.
56. Preston RA, Jy W, Jimenez JJ, Mauro LM, Horstman LL, Valle M, et al. Effects of severe hypertension on endothelial and platelet microparticles. *Hypertension*. 2003 Feb;41(2):211–7.
57. Wang J-M, Su C, Wang Y, Huang Y-J, Yang Z, Chen L, et al. Elevated circulating endothelial microparticles and brachial-ankle pulse wave velocity in well-controlled hypertensive patients. *J Hum Hypertens*. 2009 May;23(5):307–15.
58. Huang P-H, Huang S-S, Chen Y-H, Lin C-P, Chiang K-H, Chen J-S, et al. Increased circulating CD31+/annexin V+ apoptotic microparticles and decreased circulating endothelial progenitor cell levels in hypertensive patients with microalbuminuria. *J Hypertens*. 2010 Aug;28(8):1655–65.
59. Sinning J-M, Losch J, Walenta K, Böhm M, Nickenig G, Werner N. Circulating CD31+/Annexin V+ microparticles correlate with cardiovascular outcomes. *Eur Heart J*. 2011 Aug;32(16):2034–41.

60. Agouni A, Lagrue-Lak-Hal AH, Ducluzeau PH, Mostefai HA, Draunet-Busson C, Leftheriotis G, et al. Endothelial dysfunction caused by circulating microparticles from patients with metabolic syndrome. *Am J Pathol.* 2008 Oct;173(4):1210–9.
61. Helal O, Defoort C, Robert S, Marin C, Lesavre N, Lopez-Miranda J, et al. Increased levels of microparticles originating from endothelial cells, platelets and erythrocytes in subjects with metabolic syndrome: relationship with oxidative stress. *Nutr Metab Cardiovasc Dis Nmed.* 2011 Sep;21(9):665–71.
62. Vikerfors A, Mobarrez F, Bremme K, Holmström M, Ågren A, Eelde A, et al. Studies of microparticles in patients with the antiphospholipid syndrome (APS). *Lupus.* 2012 Jun;21(7):802–5.
63. Dignat-George F, Camoin-Jau L, Sabatier F, Arnoux D, Anfosso F, Bardin N, et al. Endothelial microparticles: a potential contribution to the thrombotic complications of the antiphospholipid syndrome. *Thromb Haemost.* 2004 Apr;91(4):667–73.
64. Rahman A, Isenberg DA. Systemic lupus erythematosus. *N Engl J Med.* 2008 Feb 28;358(9):929–39.
65. Nielsen CT, Østergaard O, Johnsen C, Jacobsen S, Heegaard NHH. Distinct features of circulating microparticles and their relationship to clinical manifestations in systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum.* 2011 Oct;63(10):3067–77.
66. Nielsen CT, Østergaard O, Stener L, Iversen LV, Truedsson L, Gullstrand B, et al. Increased IgG on cell-derived plasma microparticles in systemic lupus erythematosus is associated with autoantibodies and complement activation. *Arthritis Rheum.* 2012 Apr;64(4):1227–36.
67. Furlan M, Robles R, Galbusera M, Remuzzi G, Kyrle PA, Brenner B, et al. von Willebrand factor-cleaving protease in thrombotic thrombocytopenic purpura and the hemolytic-uremic syndrome. *N Engl J Med.* 1998 Nov 26;339(22):1578–84.
68. Kelton JG, Warkentin TE, Hayward CP, Murphy WG, Moore JC. Calpain activity in patients with thrombotic thrombocytopenic purpura is associated with platelet microparticles. *Blood.* 1992 Nov 1;80(9):2246–51.
69. Jimenez JJ, Jy W, Mauro LM, Horstman LL, Ahn YS. Elevated endothelial microparticles in thrombotic thrombocytopenic purpura: findings from brain and renal microvascular cell culture and patients with active disease. *Br J Haematol.* 2001 Jan;112(1):81–90.
70. Murphy WG, Moore JC, Kelton JG. Calcium-dependent cysteine protease activity in the sera of patients with thrombotic thrombocytopenic purpura. *Blood.* 1987 Nov;70(5):1683–7.
71. Fox JE. Shedding of adhesion receptors from the surface of activated platelets. *Blood Coagul Fibrinolysis Int J Haemost Thromb.* 1994 Apr;5(2):291–304.
72. Ahn YS, Horstman LL. Idiopathic thrombocytopenic purpura: pathophysiology and management. *Int J Hematol.* 2002 Aug;76 Suppl 2:123–31.
73. Tantawy AAG, Matter RM, Hamed AA, Shams El Din El Telbany MA. Platelet microparticles in immune thrombocytopenic purpura in pediatrics. *Pediatr Hematol Oncol.* 2010 May;27(4):283–96.
74. Biró E, Nieuwland R, Tak PP, Pronk LM, Schaap MCL, Sturk A, et al. Activated complement components and complement activator molecules on the surface of cell-derived microparticles in

- patients with rheumatoid arthritis and healthy individuals. *Ann Rheum Dis.* 2007 Aug;66(8):1085–92.
75. Barry OP, Praticò D, Savani RC, FitzGerald GA. Modulation of monocyte-endothelial cell interactions by platelet microparticles. *J Clin Invest.* 1998 Jul 1;102(1):136–44.
  76. Soriano AO, Jy W, Chirinos JA, Valdivia MA, Velasquez HS, Jimenez JJ, et al. Levels of endothelial and platelet microparticles and their interactions with leukocytes negatively correlate with organ dysfunction and predict mortality in severe sepsis. *Crit Care Med.* 2005 Nov;33(11):2540–6.
  77. Morel N, Morel O, Delabranche X, Jesel L, Sztark F, Dabadie P, et al. Microparticles during sepsis and trauma. A link between inflammation and thrombotic processes. *Ann Françaises Anesthésie Réanimation.* 2006;955–66.
  78. Nieuwland R, Berckmans RJ, McGregor S, Böing AN, Romijn FP, Westendorp RG, et al. Cellular origin and procoagulant properties of microparticles in meningococcal sepsis. *Blood.* 2000 Feb 1;95(3):930–5.
  79. Friend C, Marovitz W, Henie G, Henie W, Tsuei D, Hirschhorn K, et al. Observations on cell lines derived from a patient with Hodgkin's disease. *Cancer Res.* 1978 Aug;38(8):2581–91.
  80. Théry C, Ostrowski M, Segura E. Membrane vesicles as conveyors of immune responses. *Nat Rev Immunol.* 2009 Aug;9(8):581–93.
  81. Langer F, Bokemeyer C. Crosstalk between cancer and haemostasis. Implications for cancer biology and cancer-associated thrombosis with focus on tissue factor. *Hamostaseologie.* 2012;32(2):95–104.
  82. Coumans FAW, Doggen CJM, Attard G, de Bono JS, Terstappen LWMM. All circulating EpCAM+CK+CD45- objects predict overall survival in castration-resistant prostate cancer. *Ann Oncol Off J Eur Soc Med Oncol Esmo.* 2010 Sep;21(9):1851–7.
  83. Kim HK, Song KS, Park YS, Kang YH, Lee YJ, Lee KR, et al. Elevated levels of circulating platelet microparticles, VEGF, IL-6 and RANTES in patients with gastric cancer: possible role of a metastasis predictor. *Eur J Cancer Oxf Engl* 1990. 2003 Jan;39(2):184–91.
  84. Al-Nedawi K, Meehan B, Micallef J, Lhotak V, May L, Guha A, et al. Intercellular transfer of the oncogenic receptor EGFRvIII by microvesicles derived from tumour cells. *Nat Cell Biol.* 2008 May;10(5):619–24.
  85. Muralidharan-Chari V, Clancy JW, Sedgwick A, D'Souza-Schorey C. Microvesicles: mediators of extracellular communication during cancer progression. *J Cell Sci.* 2010 May 15;123(Pt 10):1603–11.
  86. Van Doormaal FF, Kleinjan A, Di Nisio M, Büller HR, Nieuwland R. Cell-derived microvesicles and cancer. *Neth J Med.* 2009 Aug;67(7):266–73.
  87. Davizon P, López JA. Microparticles and thrombotic disease. *Curr Opin Hematol.* 2009 Sep;16(5):334–41.
  88. Heresi GA, Chirinos JA, Velasquez H, Zambrano JP, Soriano L, Horstman LL. Elevated endothelial microparticles (EMP) and activation markers of platelet and leukocytes in venous thromboembolism (VTE). *Blood.* 2003;

89. Rectenwald JE, Myers DD Jr, Hawley AE, Longo C, Henke PK, Guire KE, et al. D-dimer, P-selectin, and microparticles: novel markers to predict deep venous thrombosis. A pilot study. *Thromb Haemost*. 2005 Dec;94(6):1312–7.
90. Pluskota E, Woody NM, Szpak D, Ballantyne CM, Soloviev DA, Simon DI, et al. Expression, activation, and function of integrin alphaMbeta2 (Mac-1) on neutrophil-derived microparticles. *Blood*. 2008 Sep 15;112(6):2327–35.
91. Wakefield TW, Henke PK. The role of inflammation in early and late venous thrombosis: Are there clinical implications? *Semin Vasc Surg*. 2005 Sep;18(3):118–29.
92. Coleman DM, Wakefield TW. Biomarkers for the diagnosis of deep vein thrombosis. *Expert Opin Med Diagn*. 2012 Jul;6(4):253–7.
93. Visentin GP, Ford SE, Scott JP, Aster RH. Antibodies from patients with heparin-induced thrombocytopenia/thrombosis are specific for platelet factor 4 complexed with heparin or bound to endothelial cells. *J Clin Invest*. 1994 Jan;93(1):81–8.
94. McKenzie SE, Reilly MP. Heparin-induced thrombocytopenia and other immune thrombocytopenias: lessons from mouse models. *Semin Thromb Hemost*. 2004 Oct;30(5):559–68.
95. Mullier F, Bailly N, Cornet Y, Dubuc E, Robert S, Osselaer J-C, et al. Contribution of platelet microparticles generation assay to the diagnosis of type II heparin-induced thrombocytopenia. *Thromb Haemost*. 2010 Jun;103(6):1277–81.
96. Kasthuri RS, Glover SL, Jonas W, McEachron T, Pawlinski R, Arepally GM, et al. PF4/heparin-antibody complex induces monocyte tissue factor expression and release of tissue factor positive microparticles by activation of FcγRI. *Blood*. 2012 May 31;119(22):5285–93.
97. Hugel B, Socié G, Vu T, Toti F, Gluckman E, Freyssinet JM, et al. Elevated levels of circulating procoagulant microparticles in patients with paroxysmal nocturnal hemoglobinuria and aplastic anemia. *Blood*. 1999 May 15;93(10):3451–6.
98. Simak J, Holada K, Risitano AM, Zivny JH, Young NS, Vostal JG. Elevated circulating endothelial membrane microparticles in paroxysmal nocturnal haemoglobinuria. *Br J Haematol*. 2004 Jun;125(6):804–13.
99. Shet AS, Aras O, Gupta K, Hass MJ, Rausch DJ, Saba N, et al. Sick blood contains tissue factor-positive microparticles derived from endothelial cells and monocytes. *Blood*. 2003 Oct 1;102(7):2678–83.
100. Villmow T, Kemkes-Matthes B, Matzdorff AC. Markers of platelet activation and platelet-leukocyte interaction in patients with myeloproliferative syndromes. *Thromb Res*. 2002 Nov 1;108(2-3):139–45.
101. Lavelle C, Piétrement O, Le Cam E. Microscopie moléculaire des complexes nucléoprotéiques. *Refls de la Physique*; 2011;27:12–17.
102. Müller DJ, Amrein M, Engel A. Adsorption of biological molecules to a solid support for scanning probe microscopy. *J Struct Biol*. 1997 Jul;119(2):172–88.
103. Yuana Y, Oosterkamp TH, Bahatyrova S, Ashcroft B, Garcia Rodriguez P, Bertina RM, et al. Atomic force microscopy: a novel approach to the detection of nanosized blood microparticles. *J Thromb Haemost Jth*. 2010 Feb;8(2):315–23.

104. Garcia BA, Smalley DM, Cho H, Shabanowitz J, Ley K, Hunt DF. The platelet microparticle proteome. *J Proteome Res.* 2005 Oct;4(5):1516–21.
105. Smalley DM, Root KE, Cho H, Ross MM, Ley K. Proteomic discovery of 21 proteins expressed in human plasma-derived but not platelet-derived microparticles. *Thromb Haemost.* 2007 Jan;97(1):67–80.
106. Piersma SR, Broxterman HJ, Kapci M, de Haas RR, Hoekman K, Verheul HMW, et al. Proteomics of the TRAP-induced platelet releasate. *J Proteomics.* 2009 Feb 15;72(1):91–109.
107. Nomura S, Shouzu A, Taomoto K, Togane Y, Goto S, Ozaki Y, et al. Assessment of an ELISA kit for platelet-derived microparticles by joint research at many institutes in Japan. *J Atheroscler Thromb.* 2009;16(6):878–87.
108. Ay C, Freyssinet J-M, Sailer T, Vormittag R, Pabinger I. Circulating procoagulant microparticles in patients with venous thromboembolism. *Thromb Res.* 2009 Mar;123(5):724–6.
109. Bal L, Ederhy S, Di Angelantonio E, Toti F, Zobairi F, Dufaitre G, et al. Circulating procoagulant microparticles in acute pulmonary embolism: a case-control study. *Int J Cardiol.* 2010 Nov 19;145(2):321–2.
110. Habib A, Kunzelmann C, Shamseddeen W, Zobairi F, Freyssinet J-M, Taher A. Elevated levels of circulating procoagulant microparticles in patients with beta-thalassemia intermedia. *Haematologica.* 2008 Jun;93(6):941–2.
111. Dieckmann Y, Cölfen H, Hofmann H, Petri-Fink A. Particle size distribution measurements of manganese-doped ZnS nanoparticles. *Anal Chem.* 2009 May 15;81(10):3889–95.
112. Van der Pol E, Hoekstra AG, Sturk A, Otto C, van Leeuwen TG, Nieuwland R. Optical and non-optical methods for detection and characterization of microparticles and exosomes. *J Thromb Haemost Jth.* 2010 Dec;8(12):2596–607.
113. Korgel BA, van Zanten JH, Monbouquette HG. Vesicle size distributions measured by flow field-flow fractionation coupled with multiangle light scattering. *Biophys J.* 1998 Jun;74(6):3264–72.
114. Pisitkun T, Shen R-F, Knepper MA. Identification and proteomic profiling of exosomes in human urine. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2004 Sep 7;101(36):13368–73.
115. Jy W, Horstman LL, Jimenez JJ, Ahn YS, Biró E, Nieuwland R, et al. Measuring circulating cell-derived microparticles. *J Thromb Haemost Jth.* 2004 Oct;2(10):1842–51.
116. Kim HK, Song KS, Lee ES, Lee YJ, Park YS, Lee KR, et al. Optimized flow cytometric assay for the measurement of platelet microparticles in plasma: pre-analytic and analytic considerations. *Blood Coagul Fibrinolysis Int J Haemost Thromb.* 2002 Jul;13(5):393–7.
117. Robert S, Poncelet P, Lacroix R, Arnaud L, Giraud L, Hauchard A, et al. Standardization of platelet-derived microparticle counting using calibrated beads and a Cytomics FC500 routine flow cytometer: a first step towards multicenter studies? *J Thromb Haemost Jth.* 2009 Jan;7(1):190–7.
118. Lacroix R, Robert S, Poncelet P, Kasthuri RS, Key NS, Dignat-George F. Standardization of platelet-derived microparticle enumeration by flow cytometry with calibrated beads: results of the International Society on Thrombosis and Haemostasis SSC Collaborative workshop. *J Thromb Haemost Jth.* 2010 Nov;8(11):2571–4.

119. Tait JF, Gibson D. Phospholipid binding of annexin V: effects of calcium and membrane phosphatidylserine content. *Arch Biochem Biophys*. 1992 Oct;298(1):187–91.
120. Larson MC, Luthi MR, Hogg N, Hillery CA. Calcium-phosphate microprecipitates mimic microparticles when examined with flow cytometry. *Cytom Part J Int Soc Anal Cytol*. 2013 Feb;83(2):242–50.
121. Shi J, Heegaard CW, Rasmussen JT, Gilbert GE. Lactadherin binds selectively to membranes containing phosphatidyl-L-serine and increased curvature. *Biochim Biophys Acta*. 2004 Nov 17;1667(1):82–90.
122. Enjeti AK, Lincz L, Seldon M. Bio-maleimide as a generic stain for detection and quantitation of microparticles. *Int J Lab Hematol*. 2008 Jun;30(3):196–9.
123. Mobarrez F, Antovic J, Egberg N, Hansson M, Jörneskog G, Hultenby K, et al. A multicolor flow cytometric assay for measurement of platelet-derived microparticles. *Thromb Res*. 2010 Mar;125(3):e110–116.
124. Bratosin D, Mitrofan L, Palii C, Estaquier J, Montreuil J. Novel fluorescence assay using calcein-AM for the determination of human erythrocyte viability and aging. *Cytom Part J Int Soc Anal Cytol*. 2005 Jul;66(1):78–84.
125. Robert S, Lacroix R, Poncelet P, Harhour K, Bouriche T, Judicone C, et al. High-sensitivity flow cytometry provides access to standardized measurement of small-size microparticles--brief report. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2012 Apr;32(4):1054–8.
126. Lacroix R, Judicone C, Poncelet P, Robert S, Arnaud L, Sampol J, et al. Impact of pre-analytical parameters on the measurement of circulating microparticles: towards standardization of protocol. *J Thromb Haemost Jth*. 2012 Mar;10(3):437–46.
127. Scientific Subcommittee Minute. 54th Annual Scientific and Standardization Committee Meeting. Vienna, Austria; 2008.
128. Burnier L, Fontana P, Kwak BR, Angelillo-Scherrer A. Cell-derived microparticles in haemostasis and vascular medicine. *Thromb Haemost*. 2009 Mar;101(3):439–51.
129. Harrison CN, Bareford D, Butt N, Campbell P, Conneally E, Drummond M, et al. Guideline for investigation and management of adults and children presenting with a thrombocytosis. *Br J Haematol*. 2010 May;149(3):352–75.
130. Skoda RC. Thrombocytosis. *Hematol Educ Program Am Soc Hematol Am Soc Hematol Educ Program*. 2009;159–67.
131. Bleeker JS, Hogan WJ. Thrombocytosis: diagnostic evaluation, thrombotic risk stratification, and risk-based management strategies. *Thrombosis*. 2011;2011:536062.
132. Viallard J-F. [Management of adults presenting with a thrombocytosis]. *Rev Médecine Interne Fondée Par Société Natl Française Médecine Interne*. 2010 Dec;31 Suppl 3:S333–338.
133. Brière J. [Essential thrombocythemia. Contribution of the V617F JAK2 mutation to the pathophysiology, diagnosis and outcome]. *Bull Académie Natl Médecine*. 2007 Mar;191(3):535–48.
134. André-Kerneis E, Gaussem P. [Role of platelet dysfunction in the haemostatic manifestations occurring during essential thrombocythaemia]. *Ann Biol Clin (Paris)*. 2004 Jun;62(3):279–90.

135. Beer PA, Erber WN, Campbell PJ, Green AR. How I treat essential thrombocythemia. *Blood*. 2011 Feb 3;117(5):1472–82.
136. Finazzi G. How to manage essential thrombocythemia. *Leukemia*. 2012 May;26(5):875–82.
137. Brière. Thrombocytémie essentielle (TE): nouvelles perspectives diagnostiques et thérapeutiques. *Hématologie*; 2006;12, (5), 315–22.
138. Schafer AI. Thrombocytosis and thrombocythemia. *Blood Rev*. 2001 Dec;15(4):159–66.
139. Beer PA, Green AR. Pathogenesis and management of essential thrombocythemia. *Hematol Educ Program Am Soc Hematol Am Soc Hematol Educ Program*. 2009;621–8.
140. Tefferi A, Skoda R, Vardiman JW. Myeloproliferative neoplasms: contemporary diagnosis using histology and genetics. *Nat Rev Clin Oncol*. 2009 Nov;6(11):627–37.
141. Rodolphe B, Stéphane G. Actualités 2011 sur la physiopathologie des syndromes myéloprolifératifs classique hors LMC (polyglobulie de Vaquez, thrombocytémie essentielle, myélofibrose primaire). Elsevier Masson Ed Florence P Ed Rev Francoph Lab. 2011 juin;pp 41–46.
142. Antonioli E, Guglielmelli P, Poli G, Bogani C, Pancrazzi A, Longo G, et al. Influence of JAK2V617F allele burden on phenotype in essential thrombocythemia. *Haematologica*. 2008 Jan;93(1):41–8.
143. Antonioli E, Guglielmelli P, Pancrazzi A, Bogani C, Verrucci M, Ponziani V, et al. Clinical implications of the JAK2 V617F mutation in essential thrombocythemia. *Leukemia*. 2005 Oct;19(10):1847–9.
144. Vannucchi AM. Insights into the pathogenesis and management of thrombosis in polycythemia vera and essential thrombocythemia. *Intern Emerg Med*. 2010 Jun;5(3):177–84.
145. Tefferi A, Vainchenker W. Myeloproliferative neoplasms: molecular pathophysiology, essential clinical understanding, and treatment strategies. *J Clin Oncol Off J Am Soc Clin Oncol*. 2011 Feb 10;29(5):573–82.
146. Campbell PJ, Scott LM, Buck G, Wheatley K, East CL, Marsden JT, et al. Definition of subtypes of essential thrombocythaemia and relation to polycythaemia vera based on JAK2 V617F mutation status: a prospective study. *Lancet*. 2005 Dec 3;366(9501):1945–53.
147. Vannucchi AM, Antonioli E, Guglielmelli P, Pancrazzi A, Guerini V, Barosi G, et al. Characteristics and clinical correlates of MPL 515W>L/K mutation in essential thrombocythemia. *Blood*. 2008 Aug 1;112(3):844–7.
148. Beer PA, Campbell PJ, Scott LM, Bench AJ, Erber WN, Bareford D, et al. MPL mutations in myeloproliferative disorders: analysis of the PT-1 cohort. *Blood*. 2008 Jul 1;112(1):141–9.
149. Passamonti F, Rumi E, Arcaini L, Boveri E, Elena C, Pietra D, et al. Prognostic factors for thrombosis, myelofibrosis, and leukemia in essential thrombocythemia: a study of 605 patients. *Haematologica*. 2008 Nov;93(11):1645–51.
150. Wolanskyj AP, Schwager SM, McClure RF, Larson DR, Tefferi A. Essential thrombocythemia beyond the first decade: life expectancy, long-term complication rates, and prognostic factors. *Mayo Clin Proc Mayo Clin*. 2006 Feb;81(2):159–66.

151. Barosi G, Mesa RA, Thiele J, Cervantes F, Campbell PJ, Verstovsek S, et al. Proposed criteria for the diagnosis of post-polycythemia vera and post-essential thrombocythemia myelofibrosis: a consensus statement from the International Working Group for Myelofibrosis Research and Treatment. *Leukemia*. 2008 Feb;22(2):437–8.
152. Cervantes F, Alvarez-Larrán A, Talam C, Gómez M, Montserrat E. Myelofibrosis with myeloid metaplasia following essential thrombocythemia: actuarial probability, presenting characteristics and evolution in a series of 195 patients. *Br J Haematol*. 2002 Sep;118(3):786–90.
153. Jensen MK, de Nully Brown P, Nielsen OJ, Hasselbalch HC. Incidence, clinical features and outcome of essential thrombocythemia in a well defined geographical area. *Eur J Haematol*. 2000 Aug;65(2):132–9.
154. Cortelazzo S, Viero P, Finazzi G, D'Emilio A, Rodeghiero F, Barbui T. Incidence and risk factors for thrombotic complications in a historical cohort of 100 patients with essential thrombocythemia. *J Clin Oncol Off J Am Soc Clin Oncol*. 1990 Mar;8(3):556–62.
155. Besses C, Cervantes F, Pereira A, Florensa L, Solé F, Hernández-Boluda JC, et al. Major vascular complications in essential thrombocythemia: a study of the predictive factors in a series of 148 patients. *Leukemia*. 1999 Feb;13(2):150–4.
156. Carobbio A, Finazzi G, Antonioli E, Guglielmelli P, Vannucchi AM, Delaini F, et al. Thrombocytosis and leukocytosis interaction in vascular complications of essential thrombocythemia. *Blood*. 2008 Oct 15;112(8):3135–7.
157. Landolfi R, Cipriani MC, Novarese L. Thrombosis and bleeding in polycythemia vera and essential thrombocythemia: pathogenetic mechanisms and prevention. *Best Pract Res Clin Haematol*. 2006;19(3):617–33.
158. Tefferi A, Elliott M. Thrombosis in myeloproliferative disorders: prevalence, prognostic factors, and the role of leukocytes and JAK2V617F. *Semin Thromb Hemost*. 2007 Jun;33(4):313–20.
159. Reikvam H, Tiu RV. Venous thromboembolism in patients with essential thrombocythemia and polycythemia vera. *Leukemia*. 2012 Apr;26(4):563–71.
160. Carobbio A, Finazzi G, Guerini V, Spinelli O, Delaini F, Marchioli R, et al. Leukocytosis is a risk factor for thrombosis in essential thrombocythemia: interaction with treatment, standard risk factors, and Jak2 mutation status. *Blood*. 2007 Mar 15;109(6):2310–3.
161. Carobbio A, Antonioli E, Guglielmelli P, Vannucchi AM, Delaini F, Guerini V, et al. Leukocytosis and risk stratification assessment in essential thrombocythemia. *J Clin Oncol Off J Am Soc Clin Oncol*. 2008 Jun 1;26(16):2732–6.
162. Panova-Noeva M, Marchetti M, Spronk HM, Russo L, Diani E, Finazzi G, et al. Platelet-induced thrombin generation by the calibrated automated thrombogram assay is increased in patients with essential thrombocythemia and polycythemia vera. *Am J Hematol*. 2011 Apr;86(4):337–42.
163. Carobbio A, Thiele J, Passamonti F, Rumi E, Ruggeri M, Rodeghiero F, et al. Risk factors for arterial and venous thrombosis in WHO-defined essential thrombocythemia: an international study of 891 patients. *Blood*. 2011 Jun 2;117(22):5857–9.
164. Marchetti M, Falanga A. Leukocytosis, JAK2V617F mutation, and hemostasis in myeloproliferative disorders. *Pathophysiol Haemost Thromb*. 2008;36(3-4):148–59.

165. Cervantes F. Management of essential thrombocythemia. *Hematol Educ Program Am Soc Hematol Am Soc Hematol Educ Program*. 2011;2011:215–21.
166. Michiels JJ. Platelet-mediated microvascular inflammation and thrombosis in thrombocythemia vera: a distinct aspirin-responsive arterial thrombophilia, which transforms into a bleeding diathesis at increasing platelet counts. *Pathol Biol (Paris)*. 2003 Apr;51(3):167–75.
167. Elliott MA, Tefferi A. Thrombosis and haemorrhage in polycythaemia vera and essential thrombocythaemia. *Br J Haematol*. 2005 Feb;128(3):275–90.
168. Kiladjian J-J, Cervantes F, Leebeek FWG, Marzac C, Cassinat B, Chevret S, et al. The impact of JAK2 and MPL mutations on diagnosis and prognosis of splanchnic vein thrombosis: a report on 241 cases. *Blood*. 2008 May 15;111(10):4922–9.
169. Patel RK, Lea NC, Heneghan MA, Westwood NB, Milojkovic D, Thanigaikumar M, et al. Prevalence of the activating JAK2 tyrosine kinase mutation V617F in the Budd-Chiari syndrome. *Gastroenterology*. 2006 Jun;130(7):2031–8.
170. Shetty S, Kulkarni B, Pai N, Mukundan P, Kasatkar P, Ghosh K. JAK2 mutations across a spectrum of venous thrombosis cases. *Am J Clin Pathol*. 2010 Jul;134(1):82–5.
171. Colaizzo D, Amitrano L, Tiscia GL, Scenna G, Grandone E, Guardascione MA, et al. The JAK2 V617F mutation frequently occurs in patients with portal and mesenteric venous thrombosis. *J Thromb Haemost Jth*. 2007 Jan;5(1):55–61.
172. Regina S, Herault O, D'Alteroche L, Binet C, Gruel Y. JAK2 V617F is specifically associated with idiopathic splanchnic vein thrombosis. *J Thromb Haemost Jth*. 2007 Apr;5(4):859–61.
173. Landolfi R, Marchioli R, Kutti J, Gisslinger H, Tognoni G, Patrono C, et al. Efficacy and safety of low-dose aspirin in polycythemia vera. *N Engl J Med*. 2004 Jan 8;350(2):114–24.
174. Michiels JJ, van Genderen PJ, Lindemans J, van Vliet HH. Erythromelalgic, thrombotic and hemorrhagic manifestations in 50 cases of thrombocythemia. *Leuk Lymphoma*. 1996 Sep;22 Suppl 1:47–56.
175. Tefferi A. Polycythemia vera and essential thrombocythemia: 2012 update on diagnosis, risk stratification, and management. *Am J Hematol*. 2012 Mar;87(3):285–93.
176. Barbui T. How to manage thrombosis in myeloproliferative neoplasms. *Curr Opin Oncol*. 2011 Nov;23(6):654–8.
177. Cortelazzo S, Finazzi G, Ruggeri M, Vestri O, Galli M, Rodeghiero F, et al. Hydroxyurea for patients with essential thrombocythemia and a high risk of thrombosis. *N Engl J Med*. 1995 Apr 27;332(17):1132–6.
178. Barbui T, Barosi G, Birgegard G, Cervantes F, Finazzi G, Griesshammer M, et al. Philadelphia-negative classical myeloproliferative neoplasms: critical concepts and management recommendations from European LeukemiaNet. *J Clin Oncol Off J Am Soc Clin Oncol*. 2011 Feb 20;29(6):761–70.
179. Harrison CN, Campbell PJ, Buck G, Wheatley K, East CL, Bareford D, et al. Hydroxyurea compared with anagrelide in high-risk essential thrombocythemia. *N Engl J Med*. 2005 Jul 7;353(1):33–45.
180. Storen EC, Tefferi A. Long-term use of anagrelide in young patients with essential thrombocythemia. *Blood*. 2001 Feb 15;97(4):863–6.

181. Gisslinger H, Gotic M, Holowiecki J, Penka M, Thiele J, Kvasnicka H-M, et al. Anagrelide compared with hydroxyurea in WHO-classified essential thrombocythemia: the ANAHYDRET Study, a randomized controlled trial. *Blood*. 2013 Mar 7;121(10):1720–8.
182. Griesshammer M, Bangerter M, Sauer T, Wennauer R, Bergmann L, Heimpel H. Aetiology and clinical significance of thrombocytosis: analysis of 732 patients with an elevated platelet count. *J Intern Med*. 1999 Mar;245(3):295–300.
183. Santhosh-Kumar CR, Yohannan MD, Higgy KE, al-Mashhadani SA. Thrombocytosis in adults: analysis of 777 patients. *J Intern Med*. 1991 Jun;229(6):493–5.
184. Yohannan MD, Higgy KE, al-Mashhadani SA, Santhosh-Kumar CR. Thrombocytosis. Etiologic analysis of 663 patients. *Clin Pediatr (Phila)*. 1994 Jun;33(6):340–3.
185. Buss DH, Cashell AW, O'Connor ML, Richards F 2nd, Case LD. Occurrence, etiology, and clinical significance of extreme thrombocytosis: a study of 280 cases. *Am J Med*. 1994 Mar;96(3):247–53.
186. Coon WW, Penner J, Clagett P, Eos N. Deep venous thrombosis and postsplenectomy thrombocytosis. *Arch Surg Chic Ill* 1960. 1978 Apr;113(4):429–31.
187. Buss DH, Stuart JJ, Lipscomb GE. The incidence of thrombotic and hemorrhagic disorders in association with extreme thrombocytosis: an analysis of 129 cases. *Am J Hematol*. 1985 Dec;20(4):365–72.
188. Moles-Moreau M-P, Ternisien C, Tanguy-Schmidt A, Boyer F, Gardembas M, Dib M, et al. Flow cytometry-evaluated platelet CD36 expression, reticulated platelets and platelet microparticles in essential thrombocythaemia and secondary thrombocytosis. *Thromb Res*. 2010 Nov;126(5):e394–396.
189. Connor DE, Ma DDF, Joseph JE. Flow cytometry demonstrates differences in platelet reactivity and microparticle formation in subjects with thrombocytopenia or thrombocytosis due to primary haematological disorders. *Thromb Res*. 2013 Nov;132(5):572–7.
190. Mignon I, Grand F, Boyer F, Hunault-Berger M, Hamel JF, Macchi L. Thrombin generation and procoagulant phospholipids in patients with essential thrombocythemia and reactive thrombocytosis. *Am J Hematol*. 2013 Jul 22;
191. Ormerod M. Immunofluorescence and Colour Compensation. *Flow Cytom - Basic Introd*. 2008.

# Liste des figures

<b>Figure 1.</b> Acteurs clé du remodelage membranaire et du relargage des microparticules procoagulantes. D'après Morel et <i>al.</i> (5).....	13
<b>Figure 2.</b> Principe de fonctionnement d'un microscope à force atomique (101).....	30
<b>Figure 3.</b> Principe de l'option W2 du Gallios/Navios (Beckman Coulter) (125).....	37
<b>Figure 4.</b> Critères diagnostiques de thrombocytémie essentielle OMS 2008. Adapté d'après Tefferi et <i>al.</i> (140) .....	43
<b>Figure 5.</b> Proposition d'algorithme pour la prise en charge de la TE. Adaptée d'après Cervantes et <i>al.</i> (165) .....	48
<b>Figure 6.</b> Protocole pré-analytique pour l'étude des MP.....	56
<b>Figure 7.</b> Cytogramme SS Log x FS Log définissant la fenêtre MP (à gauche) et cytogramme SS Log x Annexin V – FITC permettant d'observer les trois diamètres de billes Megamix (0,5µm, 0,9µm et 3µm) dans la fenêtre MP (à droite) .....	58
<b>Figure 8.</b> Chevauchements des spectres d'émission de quelques fluorochromes utilisés en CMF. D'après Ormerod et <i>al.</i> (191).....	59
<b>Figure 9.</b> Mode opératoire : détection des MP d'origine plaquettaire et endothéliale au CHU de Nantes .....	62
<b>Figure 10.</b> Cytogrammes obtenus pour un des sujets de la série sujets contrôles.....	63
<b>Figure 11.</b> Cytogrammes obtenus pour un des sujets de la série patients TR .....	64
<b>Figure 12.</b> Cytogrammes obtenus pour un des sujets de la série patients TE .....	64
<b>Figure 13.</b> Représentation graphique de la répétabilité des mesures .....	68
<b>Figure 14.</b> Représentation graphique des essais de reproductibilité .....	69
<b>Figure 15.</b> Comparaison des vitesses « Low » et « Medium » du cytomètre Navios .....	70
<b>Figure 16.</b> Etiologies des thrombocytoses réactionnelles, exprimées en pourcentage.....	72
<b>Figure 17.</b> Représentation en nuage de points permettant de comparer les séries TR et TE ..	73

<b>Figure 18.</b> Représentation en boîtes à moustaches de la distribution de la variable « ratio PMP / Megamix » dans les trois populations .....	73
<b>Figure 19.</b> Représentation graphique de la corrélation entre la numération plaquettaire et le nombre de PMP chez les sujets contrôles .....	74
<b>Figure 20.</b> Représentation graphique de la corrélation entre la numération plaquettaire et le nombre de PMP dans la série TR .....	74
<b>Figure 21.</b> Représentation graphique de la corrélation entre la numération plaquettaire et le nombre de PMP dans la série TE .....	75
<b>Figure 22.</b> Comparaison des ratios PMP / Megamix obtenus en fonction de la ville de prélèvement .....	76

## Liste des tableaux

<b>Tableau 1.</b> MP et système de communication intercellulaire : signaux biologiques et informations. D'après Mause, Weber et <i>al.</i> (14).....	15
<b>Tableau 2.</b> Relations entre la composition des MP et leur fonction potentielle dans la coagulation et la fibrinolyse. D'après Lacroix et <i>al.</i> (28) .....	17
<b>Tableau 3.</b> Marqueurs de l'origine cellulaire des MP (8,128) .....	36
<b>Tableau 4.</b> Protocole pré-analytique proposé par Lacroix et <i>al.</i> pour l'analyse des MP circulantes (126).....	37
<b>Tableau 5.</b> Comparaison de deux techniques d'analyse des MP : directement à partir du PPP (Iversen et <i>al.</i> , 2012) et à partir de suspensions de MP lavées (Biró et <i>al.</i> ,2007) (7,74) .....	38
<b>Tableau 6.</b> Etiologies des thrombocytoses. Adapté d'après Bleeker et <i>al.</i> (131).....	50
<b>Tableau 7.</b> Caractéristiques démographiques des patients dans l'étude de Moles-Moreau et <i>al.</i> (188) .....	52
<b>Tableau 8.</b> Caractéristiques hématologiques et démographiques des populations étudiées. Les données sont représentées par la moyenne (bornes) ou le nombre (pourcentage).....	71
<b>Tableau 9.</b> Etude du lien entre le nombre de PMP et la numération plaquettaire dans les trois populations de l'étude grâce au test de corrélation de Spearman .....	75

**Nom - Prénom: CHIRON Louise-Marie**

**Titre de la thèse: Microparticules endothéliales et plaquettaires en cytométrie en flux dans les thrombocytoses**

**Résumé de la thèse:**

Les microparticules (MP) circulantes sont de petites vésicules membranaires de 0,1 à 1 µm de diamètre, relarguées par les cellules en réponse à l'activation ou l'apoptose. Bien que leur détection dans le plasma ne soit pas standardisée, la cytométrie en flux (CMF) est la technique la plus communément utilisée pour les mettre en évidence. Les objectifs de cette étude étaient de mettre au point la technique de dosage par CMF des MP d'origine plaquettaire (PMP) et endothéliale (EMP) en CMF au CHU de Nantes, et d'étudier l'intérêt de cette méthode dans le diagnostic différentiel entre thrombocytose réactionnelle (TR) et thrombocytémie essentielle (TE).

**MATERIEL ET METHODES:** La technique a été mise au point, sur la base de données de la littérature, sur le cytomètre Navios (Beckman Coulter) en utilisant l'option W2 permettant l'accès à la CMF dite de haute sensibilité. Au total, 13 sujets sains, 22 patients présentant une TE (au diagnostic ou non traitée) et 13 patients souffrant de TR ont été inclus. Les acquisitions ont été réalisées sur des plasmas pauvres en plaquettes (PPP) obtenus à partir d'un protocole pré-analytique stringent.

**RESULTATS:** L'évaluation de la méthode s'est avérée satisfaisante. La recherche d'EMP était négative dans l'ensemble des échantillons. Significativement moins de PMP ont été retrouvées chez les sujets sains par rapport aux séries TR et TE. Le nombre de PMP était plus élevé pour les TE que pour les TR, mais de façon non significative. Une corrélation négative entre le nombre de PMP et le nombre de plaquettes a été observée dans le groupe des sujets contrôles et dans la série TR. Au contraire, dans le groupe TE, cette corrélation était positive. Par ailleurs, dans la population TE, il n'existe pas de différence significative entre les patients présentant ou non une mutation de Jak2.

**CONCLUSION:** La technique mise au point peut être appliquée à Nantes à d'autres situations physiopathologiques. L'absence d'EMP suggère qu'il existe peu d'altérations vasculaires dans les pathologies étudiées. La recherche des PMP a permis d'obtenir des valeurs comparables à celles publiées chez les sujets sains et confirme que les altérations de la thrombopoïèse sont associées à leur augmentation. Les résultats obtenus laissent également supposer qu'il existe un mode de production de PMP différent chez les sujets pathologiques par rapport aux sujets sains. Le nombre de PMP ne semble cependant pas à lui seul contribuer au diagnostic de TE.

**MOTS CLÉS**

- MICROPARTICULES PLAQUETTAIRES
- MICROPARTICULES ENDOTHELIALES
- CYTOMETRIE EN FLUX
- THROMBOCYTEMIE ESSENTIELLE
- THROMBOCYTOSE REACTIONNELLE

**JURY**

**PRÉSIDENT: M. Jean-Marie BARD, Professeur de Biochimie**

**Faculté de Pharmacie de Nantes**

**ASSESEURS: Mme Marie-Christine BENE, Professeur d'Hématologie**

**Faculté de Médecine de Nantes**

**M. Laurent MACCHI, Professeur d'Hématologie**

**Faculté de Médecine de Poitiers**

**Mme Viviane DUBRUILLE, Praticien Hospitalier**

**CHU de Nantes**

**M. Marc FOUASSIER, Praticien Hospitalier**

**CHU de Nantes**