

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

Soutenu devant le jury interrégional

le 14 octobre 2010

par **Frédéric Dugay**

Conformément aux dispositions du décret  
du 23 janvier 2003 tient lieu de :

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

Les microparticules circulantes:  
physiopathologie, mise au point du dosage plasmatique et  
applications médicales dans les gammopathies monoclonales  
et dans le traitement par la desmopressine.

**Président:**

M. Jacques AUBRY, Professeur d'immunologie - Pharmacie

**Membres du jury:**

M. Marc-Antoine BELAUD-ROTUREAU, Professeur des  
universités – Praticien hospitalier – cytologie, histologie – Médecine

M. Benoît GUILLET, Maître de conférences des universités  
d'Hémostase/Hématologie - Médecine

M. Olivier DECAUX, Praticien hospitalier universitaire de  
Médecine interne - Médecine

**Directeur de thèse :**

M. Benoît GUILLET, Maître de conférences des universités  
d'Hémostase/Hématologie - Médecine

# SOMMAIRE

<b>I. Introduction</b>	<b>4</b>
<b>II. Etat des lieux</b>	<b>5</b>
<b>1. Origine des MPs</b>	<b>6</b>
<b>2. Mécanismes de formation des MPs</b>	<b>7</b>
A. Phospholipides des membranes cellulaires et contrôle de l'asymétrie	7
B. Voie enzymatique : flip-flop membranaire et production de MPs	7
a. La gelsoline	7
b. L'aminophospholipide translocase	7
c. La floppase	8
d. La scramblase	8
e. La calpaïne	8
C. Changement du cytosquelette lors de la formation des MPs	9
<b>3. Méthodes de laboratoire pour l'isolement et la détection des MPs</b>	<b>11</b>
A. Cytométrie en flux	12
B. ELISA	13
<b>4. MPs circulantes</b>	<b>13</b>
<b>5. Clairance des MPs</b>	<b>13</b>
<b>6. Effet procoagulant des MPs</b>	<b>14</b>
A. Rappel sur la coagulation plasmatique	14
a. La voie exogène : initiation de la coagulation par le facteur tissulaire (FT)	14
b. La voie endogène : la phase contact	15
c. Le complexe ténase	15
d. Le complexe Prothrombinase et la formation de la thrombine	15
B. Activité pro-coagulante des MPs	16
<b>7. MPs et interactions cellulaires</b>	<b>18</b>
<b>8. MPs et maladies</b>	<b>19</b>
A. Drépanocytose	19
B. Thrombopénie induite par l'héparine (TIH)	20
C. Sepsis	20
D. Diabète	21
E. MPs et maladies cardiovasculaires	21
F. MPs et cancer	22
G. MPs et traitements pro-coagulants : desmopressine (DDAVP ou Minirin®), rFVIIa (Novoseven®)	22
<b>9. MPs et perspectives</b>	<b>23</b>
<b>III. Les objectifs de l'étude</b>	<b>24</b>

<b>IV. Matériels et méthodes</b>	<b>25</b>
<b>1. Nature des prélèvements sanguins et tubes de collection</b>	<b>25</b>
<b>2. Préparation pour obtention des MPs</b>	<b>25</b>
<b>3. Marquage et numération par cytométrie en flux (CMF)</b>	<b>26</b>
A. Marquages des MPs	26
B. Analyse des MPs par cytométrie en flux	27
<b>4. Caractérisation des MPs</b>	<b>29</b>
A. En fonction des protéines de surface	29
B. Activités fonctionnelles pro-coagulantes des MPs	29
<b>5. Evaluation de la mise au point des conditions pré-analytiques des échantillons de PFP</b>	<b>30</b>
A. Comparaison des vitesses de centrifugation	30
B. Gradient de PPP	31
<b>6. Applications médicales</b>	<b>31</b>
A. Témoins	31
B. Cancer : gammapathie monoclonale	32
C. Médicaments pro-coagulants : test au DDAVP	32
<b>V. Résultats</b>	<b>33</b>
<b>1. Evaluation de la mise au point des conditions d'analyse</b>	<b>33</b>
<b>2. Evaluation de la mise au point des conditions pré-analytiques des échantillons de PFP</b>	<b>37</b>
A. Comparaison des vitesses de centrifugation	37
B. Gradient de PPP	38
<b>3. Applications médicales</b>	<b>39</b>
A. Témoins	39
B. Cancer : gammapathie monoclonale	42
C. Médicaments pro-coagulants : test au DDAVP	45
<b>VI. Discussion interprétation</b>	<b>49</b>
<b>VII. Conclusion</b>	<b>54</b>
<b>Bibliographie</b>	<b>55</b>

## I. Introduction

Les microparticules circulantes (MPs) sont des vésicules membranaires de taille inférieure au micron, libérées dans l'espace extracellulaire suite à l'activation ou à l'apoptose cellulaire <sup>1</sup>. Elles sont retrouvées dans le sang circulant de volontaires sains et leurs taux plasmatiques augmentent dans certaines pathologies, notamment les maladies cardiovasculaires à risque thrombotique accru <sup>2</sup>. Elles ont été mises en évidence pour la première fois en 1949 par Chargaff et al. qui ont découvert la présence dans du plasma dépourvu de plaquettes (PFP pour Platelet Free Plasma) d'un facteur précipitable capable d'accélérer la génération de thrombine <sup>3</sup>. Ce n'est qu'une vingtaine d'années plus tard que des travaux sur le sujet ont repris. En effet, en 1967, Wolf obtient par ultracentrifugation de PFP des fragments dérivés de membranes cellulaires considérés alors comme de simples débris cellulaires <sup>4</sup>. Il démontra une corrélation linéaire entre la quantité de ces fragments ou MPs appelées à l'époque « platelet dust » (pour poussières de plaquettes) et la numération plaquettaire sanguine. Il nota également une augmentation de ces MPs d'origine plaquettaire (PMPs) chez des patients polyglobuliques avec une numération plaquettaire élevée et une diminution chez des patients thrombopéniques.

Bien plus tard, en 1994, Satta et al. mettent en évidence la génération de MPs circulantes d'origine monocyttaire (MMPs) après stimulation par le lipopolysaccharide (LPS) bactérien <sup>5</sup>. De nouveaux travaux de Combes et al. en 1999 décrivent la formation de MPs d'origine endothéliale (EMPs) à partir de cellules en culture de type HUVEC (Human Umbilical Vein Endothelial Cells) après stimulation par du TNF $\alpha$  (Tumor Necrosis Factor  $\alpha$ ). L'équipe de Combes montra par microscopie électronique la formation de petites vésicules ou blebs à la surface membranaire des HUVEC lorsque l'on y ajoute du TNF $\alpha$  conduisant ainsi à une augmentation du nombre de MPs libérées dans l'espace extracellulaire <sup>6</sup>.

De nos jours, les travaux sur les MPs se multiplient par la découverte d'implications dans de nombreux processus physiologiques tels que la prolifération, la différenciation, l'activation cellulaire mais aussi un rôle dans la réponse immunitaire. Mais certainement, le rôle des MPs qui a été le plus étudié aujourd'hui est celui de leur capacité à induire la thrombogénèse notamment par leur puissante activité pro-coagulante.

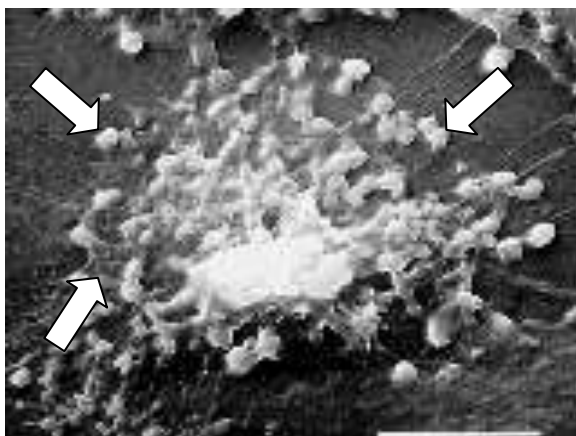
Ce travail de thèse a consisté dans un premier temps à la mise au point de la détection des MPs par cytométrie en flux puis, dans un second temps à l'application médicale au cancer (gammopathies monoclonales) et au médicament pro-coagulant (minirin® (DDAVP)).

## II. Etat des lieux

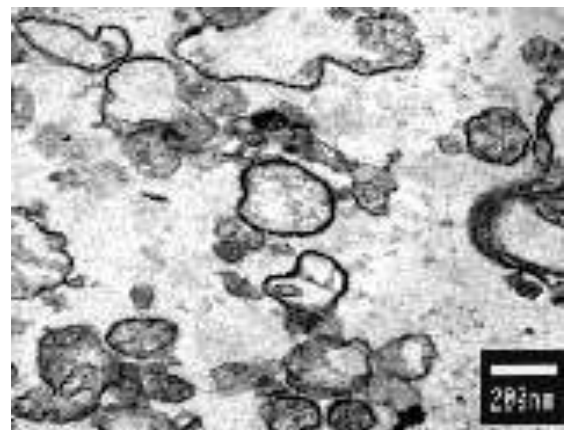
Les MPs circulantes sont des petites vésicules membranaires résultant de la microvésiculation (« blebbing ») des membranes cytoplasmiques cellulaires, libérées dans l'espace extracellulaire secondaire à l'activation ou à l'apoptose cellulaire <sup>1</sup> (**Fig 1**). Leur taille est variable étant comprise entre 0,1 et 1  $\mu\text{m}$  (**Fig 2**) <sup>7</sup>. En dessous de cette taille (0,03 à 0,1  $\mu\text{m}$ ), ces éléments sont consensuellement nommés exosomes caractérisés par un mécanisme de formation différent des MPs puisqu'ils sont issus de l'exocytose. Les exosomes auraient un rôle dans la présentation d'antigène.

Une caractéristique importante des MPs est qu'elles expriment à leur surface la phosphatidylsérine, phospholipide anionique issu du phénomène de flip-flop secondaire à l'activation ou à l'apoptose cellulaire. La phosphatidylsérine constitue le support des réactions de la coagulation plasmatique. Les MPs présentent aussi les antigènes de surface des cellules dont elles dérivent, dont certains sont spécifiques du type cellulaire <sup>7</sup>.

La présence de MPs circulantes est physiologique puisqu'elles sont détectées dans le sang périphérique de volontaires sains. Leurs taux plasmatiques augmentent dans certaines pathologies dont certaines à risque thrombotique accru telles que les maladies cardiovasculaires (voir ci-dessous paragraphe MPs et maladies cardio-vasculaires) <sup>8</sup>. Outre le fait qu'elles peuvent constituer des marqueurs d'activation cellulaire ou d'apoptose, les MPs peuvent présenter de nombreuses fonctions physiologiques intervenant dans la coagulation, l'inflammation, la réponse immunitaire ou l'angiogénèse <sup>9</sup>.



**Figure 1** : cellules endothéliales en culture (HUVEC) après activation par du  $\text{TNF}\alpha$  <sup>6</sup>. On remarque la présence de MPs aux abords des cellules endothéliales.



**Figure 2** : image en microscopie électronique représentant des MPs de différentes tailles

## 1. Origine des MPs

Les MPs ont une origine principalement plaquettaire mais également leucocytaire, érythrocytaire, endothéliale. En réalité toutes les cellules peuvent potentiellement générer des MPs si elles subissent un stimulus d'activation ou d'apoptose. Ces MPs peuvent ainsi être caractérisées par l'expression membranaire d'antigènes spécifiques de leur cellule d'origine (**Fig 3**).

Origine	Antigènes
Plaquettes	CD41 (Gp IIb-IIIa)
	CD42a (Gp IX)
	CD42b (Gp Ib)
	CD61 (Gp IIIa)
	CD62P (P-selectin)
Cellules endothéliales	CD31 (PECAM-1)
	CD62E (E-selectin)
	CD105 (Endoglin)
	CD144 (VE-cadherin)
	CD146
Monocytes	CD14 (Endotoxin receptor)
	CD45
Erythrocytes	Glycophorine A

**Figure 3 :** Quelques exemples de marqueurs de MPs utilisés pour la détection en cytométrie en flux.

## **2. Mécanismes de formation des MPs**

### **A. Phospholipides des membranes cellulaires et contrôle de l'asymétrie**

A l'état non activé, la composition et la distribution des phospholipides des membranes cellulaires sont très spécifiques : la phosphatidylcholine (PC) et la sphingomyéline (SM) sont localisées sur la couche externe de la membrane cellulaire alors que les phospholipides anioniques (PL<sup>-</sup>), la phosphatidylsérine (PS) et la phosphatidyléthanolamine (PE), sont retrouvées au niveau du feuillet interne <sup>10</sup>. Le maintien de cette asymétrie est essentiel et est assuré par un complexe enzymatique transmembranaire. La perte de cette asymétrie conduit à l'externalisation des PL<sup>-</sup> notamment lors de l'activation cellulaire, l'apoptose ou lors de nécrose.

### **B. Voie enzymatique : flip-flop membranaire et production de MPs**

Cinq enzymes sont impliquées dans la régulation de l'asymétrie phospholipidique membranaire et la génération de MPs : la gelsoline (présente uniquement sur les plaquettes), l'aminophospholipide translocase, la floppase, la scramblase et la calpaïne (**Fig 4a**) <sup>11-13</sup>. Ces enzymes maintiennent un état d'équilibre dynamique de l'asymétrie phospholipidique membranaire au repos en permettant notamment le transport de la PS et de la PE de la couche externe de la membrane cytoplasmique vers sa couche interne. Lorsque le calcium augmente dans le cytosol, par exemple lors de l'activation plaquettaire, cet état d'équilibre change avec l'externalisation de la PS (**Fig 4a-4d**) <sup>11-13</sup>.

#### **a. La gelsoline**

La gelsoline est une enzyme spécifiquement impliquée dans la génération de MPs d'origine plaquettaire. Elle va, lors d'une augmentation du calcium cytosolique, participer à la destruction de la coiffe située à l'extrémité du filament d'actine du cytosquelette plaquettaire ce qui va permettre une réorganisation des filaments d'actine et une contraction de la plaquette <sup>14</sup>.

#### **b. L'aminophospholipide translocase**

L'aminophospholipide translocase est une enzyme ATP-dépendante qui est hautement spécifique du transport de la PS et de la PE du feuillet externe de la membrane plasmique vers son feuillet interne. Une molécule d'ATP est nécessaire pour chaque molécule de PS transportée. L'action de cette enzyme est inhibée par l'augmentation du calcium cytosolique.

### **c. La floppase**

La floppase est également une enzyme ATP-dépendante qui transporte, inversement à l'enzyme précédente, les PL- du feuillet interne de la membrane plasmique vers son feuillet externe. La fonction de cette protéine n'est pas totalement élucidée, mais il est fortement probable qu'elle fonctionne en collaboration étroite avec l'aminophospholipide translocase <sup>13</sup>.

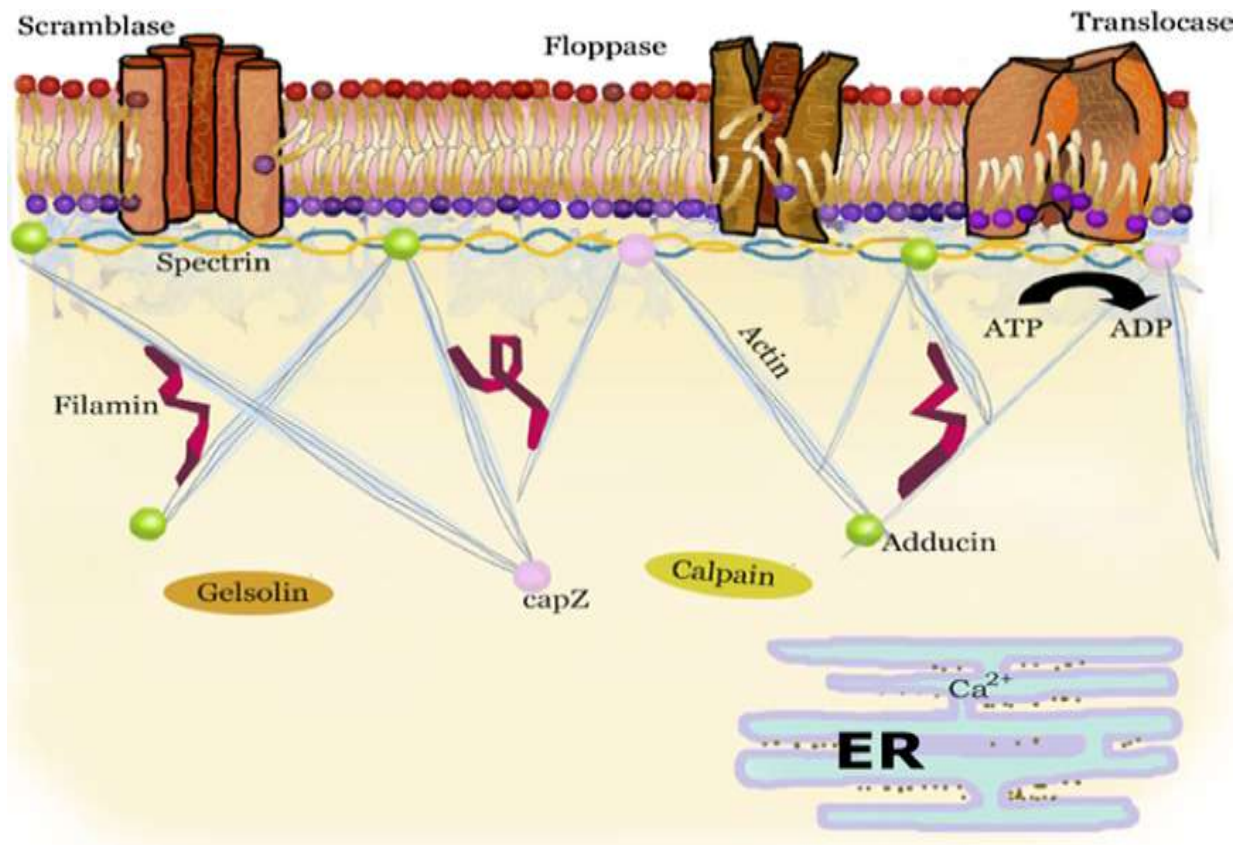
### **d. La scramblase**

La scramblase est présente en grande quantité dans la membrane cytoplasmique des plaquettes. Son action permet un brassage constant des phospholipides à travers la membrane cellulaire <sup>15</sup>. L'augmentation du calcium cytosolique qui inhibe l'aminophospholipide translocase active dans le même temps la scramblase. Ce double processus aboutit à la perte de l'asymétrie phospholipidique membranaire et à l'expression stable de la PS sur la couche externe de la membrane plasmique. Le déficit héréditaire de la scramblase a été décrit. Il est responsable du syndrome de Scott qui est une pathologie héréditaire rare, autosomique récessive, entraînant un défaut (ou un déficit) de l'activité pro-coagulante des plaquettes<sup>16</sup>. En effet, cette anomalie est à l'origine d'une diminution de l'expression de la PS sur le feuillet externe de la membrane cytoplasmique plaquettaire supprimant ainsi le support phospholipidique anionique de la coagulation plasmatique. D'autre part, les cellules affectées par cette anomalie ne produisent plus ou que très peu de MPs. Cette pathologie illustre donc bien le processus biochimique impliqué dans la génération de MPs <sup>17</sup>. En conséquence, la capacité d'activer le facteur X et le facteur II fait défaut conduisant à un phénotype hémorragique cliniquement significatif. Tous les tests classiques d'exploration de l'hémostase primaire et de la coagulation plasmatique utilisés en pratique médicale courante sont normaux. Seuls les tests très globaux de l'hémostase mesurant le taux de prothrombine résiduel et la consommation globale de la prothrombine sont altérés. Le diagnostic biologique repose sur la numération des MPs d'origine érythrocytaire après activation *in vitro*.

### **e. La calpaïne**

La calpaïne est une protéase à cystéine de la famille des papainases qui est activée par une augmentation de la concentration de calcium cytosolique. Ses actions sont multiples pour la génération de MPs, avec notamment un rôle de clivage des filaments du cytosquelette facilitant le bourgeonnement de la membrane plasmique ou encore un rôle dans l'apoptose via l'activation de la procaspase 3.



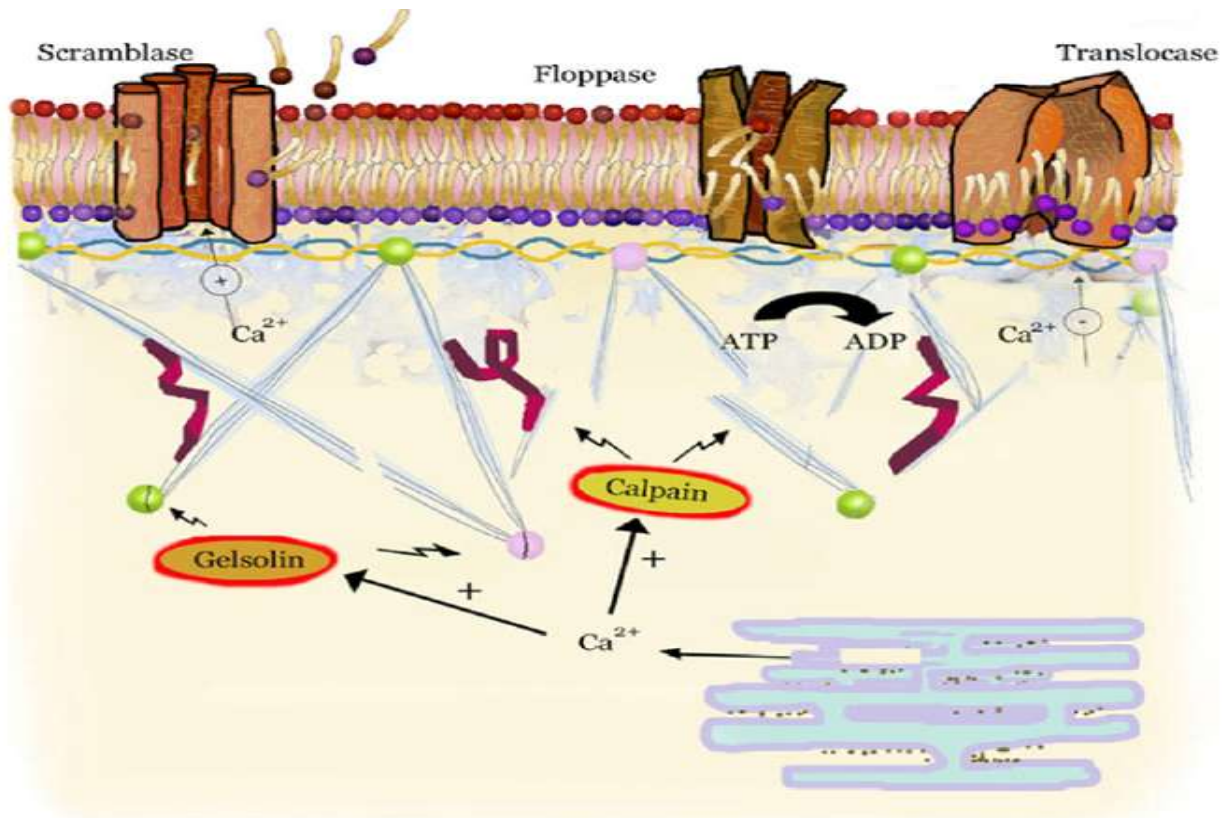


**Figure 4a : Représentation schématique d'une cellule au repos caractérisée par une asymétrie membranaire phospholipidique.** Le calcium est stocké au niveau du réticulum endoplasmique. La scramblase est inactive alors que l'aminophospholipide translocase est active. La translocase transporte la PS et la PE du feuillet externe de la membrane cellulaire vers le feuillet interne, maintenant la PS et la PE à l'intérieur. Une molécule d'ATP est nécessaire pour chaque molécule de PS transportée. La floppase est une enzyme ATP-dépendante qui contribue à maintenir de façon physiologique cette asymétrie membranaire<sup>18</sup>.

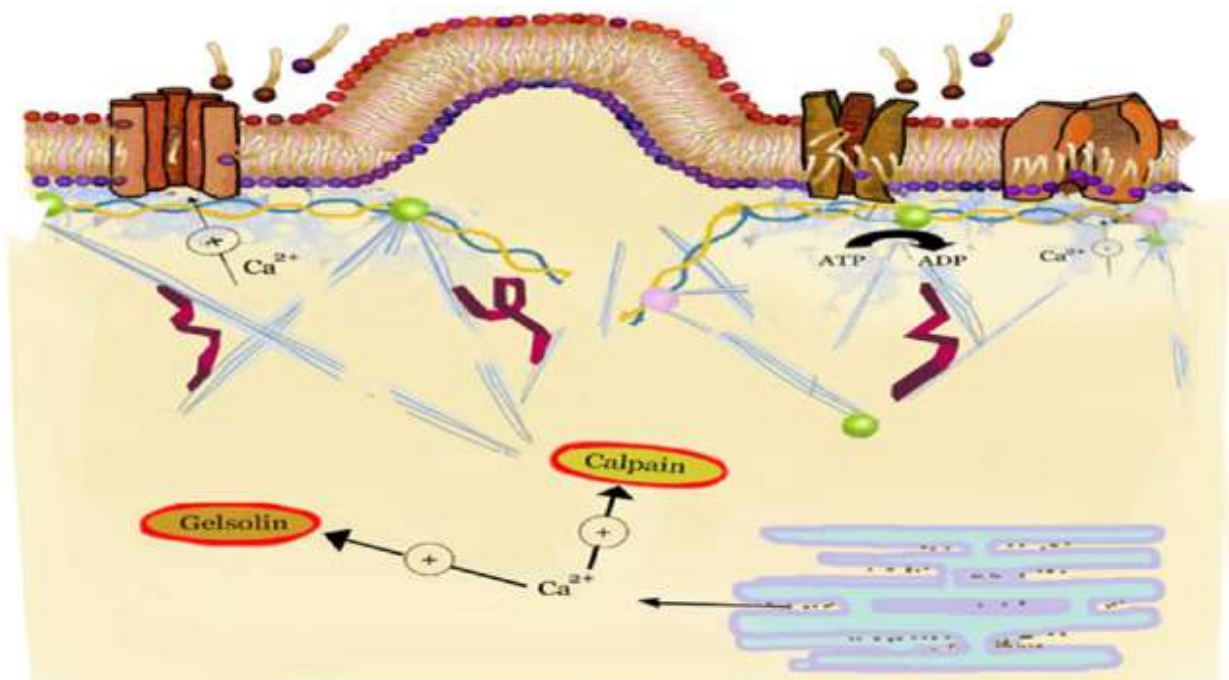
### C. Changement du cytosquelette lors de la formation des MPs

Des changements du cytosquelette se produisent lors de la génération de MPs, avec en particulier, le clivage des filaments d'actine sous-membranaires<sup>19</sup>.

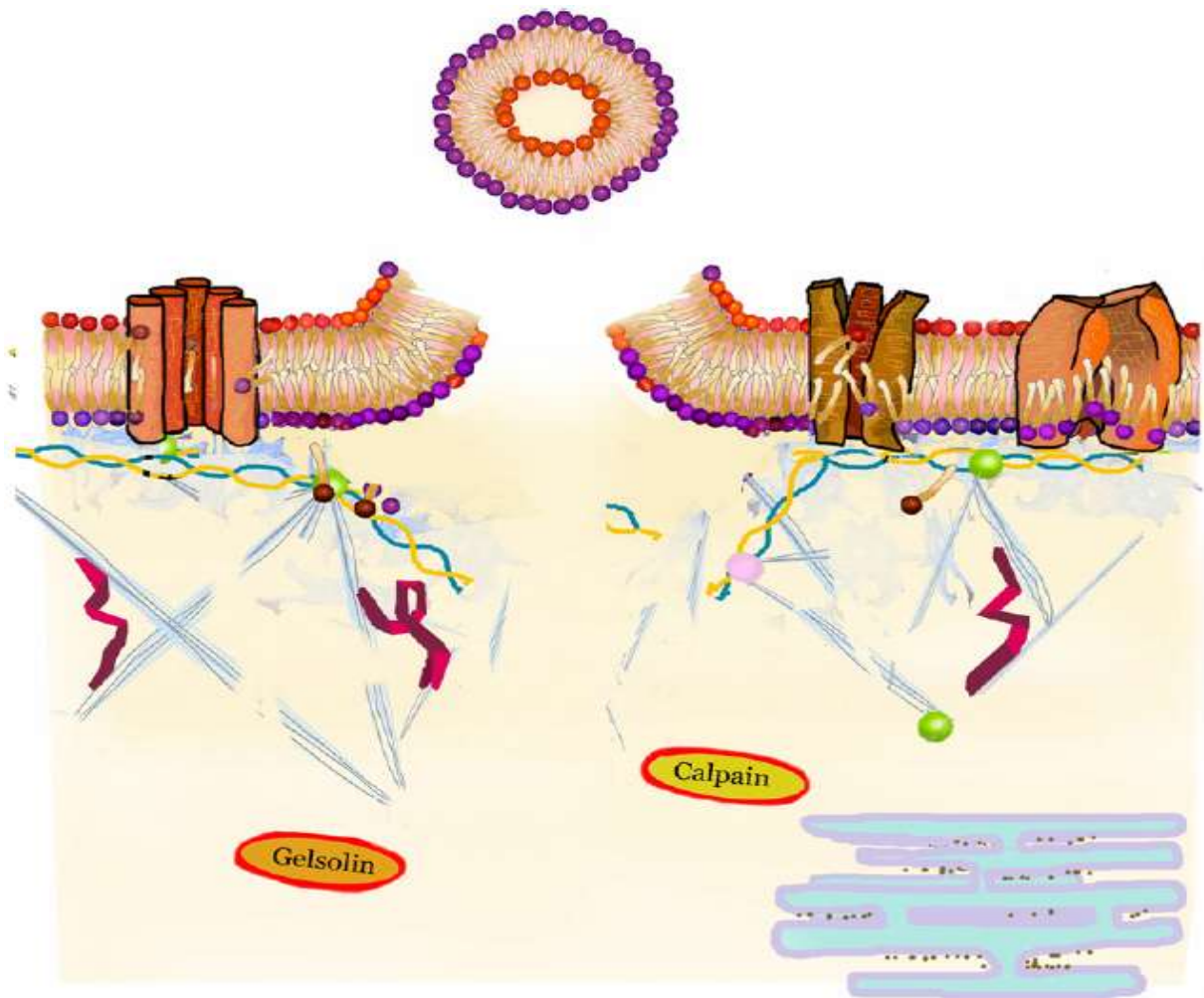
Au repos, les microfilaments d'actine plaquettaires sont munis de coiffes constituées de complexes protéiques incluant notamment l'adducine et la cap Z. Ces coiffes protéiques permettent le maintien de la structure cellulaire en stabilisant ces microfilaments d'actine. Ces coiffes protéiques sont éliminées par la gelsoline, une enzyme cytosolique, au cours de l'activation plaquettaire, de l'apoptose et de la nécrose. Ce clivage conduit à une réorganisation du cytosquelette sous-membranaire<sup>19</sup>.



**Figure 4b : Activation cellulaire.** Le calcium est libéré du réticulum endoplasmique (RE) et va permettre l'activation de la calpaïne et de la gelsoline. La calpaïne clive les filaments d'actine tandis que la gelsoline clive la coiffe du filament d'actine. L'augmentation du calcium active la scramblase et inactive l'aminophospholipide translocase. L'asymétrie phospholipidique commence alors à être perturbée <sup>18</sup>.



**Figure 4c : Désorganisation du cytosquelette sous-membranaire après activation cellulaire.** Les protéines d'ancrage du cytosquelette sont clivées (actine et spectrine) permettant le bourgeonnement de la membrane <sup>18</sup>.



**Figure 4d : Génération de microparticules exposant la phosphatidylsérine sur leur surface externe**<sup>18</sup>

### 3. Méthodes de laboratoire pour l'isolement et la détection des MPs

Plusieurs méthodes d'analyse des MPs ont été rapportées. La cytométrie en flux et la technique ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay) sont les techniques les plus largement adoptées. Cependant plusieurs équipes ont utilisé des approches différentes pour les protocoles de centrifugation, de remise en suspension et de lavage des microparticules, qui rend toute comparaison des résultats difficile. En outre, les marqueurs utilisés pour la reconnaissance des différents types cellulaires sont globalement différents<sup>20</sup> (**Fig 5**).

Auteurs	Technique	Tube de prélèvement	Centrifugation	Isolement des MPs	Détection des MPs	Antigène spécifique cellulaire		
						Plaquettes	Cellules endothéliales	Leucocytes
Biro et al. <sup>21</sup>	Cytométrie en flux	Citrate	1550g, 20 min	18000g, 30 min	Annexine V	CD62p CD61 CD63	CD31, CD62e, CD144	CD4, CD8
Dignat-georges et al. <sup>22</sup>	Cytométrie en flux	Citrate	1500g, 15 min 13000g, 2 min	Aucun	Annexine V	CD41	CD51, CD144, CD146	CD45
Freyssinet et al. <sup>23</sup>	Capture sur phase solide	Citrate	1500g, 15 min 13000g, 2 min	Aucun	Annexine V, FT	CD62p GP1ba	CD31, CD62e	CD45
Jimenez et al. <sup>24</sup>	Cytométrie en flux	Citrate	200g, 10 min 1500g, 7 min	Aucun	Aucun	CD41, CD42b&CD31	CD31 + CD42 ou CD62e	CD45
Nomura et al. <sup>25</sup>	ELISA	EDTA	1500g, 20 min	Aucun	Aucun	GplX (capture) CD62p, CD40L	Aucun	Aucun
Enjeti et al. <sup>26</sup>	Cytométrie en flux	Citrate	1500g, 30 min 13000g, 2 m	Aucun	Maléimide	CD41	CD62e	CD45
Shet et al. <sup>27</sup>	Cytométrie en flux	Citrate	13000g, 10 min	100000g, 60 min	Annexine V	CD41a	CD144	Aucun

**Fig 5 : Différents protocoles pré-analytiques utilisés pour la détection et la caractérisation des MPs**

## A. Cytométrie en flux

C'est la méthode de choix pour l'étude des MPs. Les échantillons à tester sont obtenus après une double centrifugation pour obtenir du PFP (Platelet Free Plasma) (**Fig 5**). Les MPs ont été initialement décrite comme étant positive pour l'annexine V en cytométrie en flux <sup>28</sup>. L'annexine V lie sélectivement les phospholipides chargés négativement ; cependant il lie ceux qui se trouvent sur les débris cellulaires aussi bien que ceux qui sont sur les MPs <sup>29</sup>. Puisque les MPs circulantes annexine V+ ont des origines cellulaires différentes (plaquettes, hématies, leucocytes, cellules endothéliales, ...), un marqueur spécifique de chaque type cellulaire peut être ajouté pour une caractérisation plus fine des MPs.

La positivité de l'annexine V n'est pas spécifique des MPs : Des MPs annexine V- ont été signalées à des taux 30 fois plus importants que la concentration en MPs annexine V+ <sup>30</sup>.

## **B. ELISA**

Un test ELISA a été décrit pour l'identification de MPs<sup>31-32</sup>. Une plaque coatée d'annexine V dans le fond des puits est utilisée ; en conséquence, l'addition d'échantillon plasmatique permet la fixation des MPs à l'annexine V immobilisée. Cette technique a l'avantage de permettre la manipulation de plusieurs échantillons en même temps. En outre, le test ELISA est plus sensible pour détecter de faibles expressions membranaires d'antigènes comparé à la cytométrie en flux. Cependant, la relative non-spécificité de la liaison des MPs à l'annexine V limite l'utilisation de cette méthode.

## **4. MPs circulantes**

Les MPs circulantes sanguines peuvent être de différentes origines cellulaires (globules rouges, granulocytes, monocytes, lymphocytes, plaquettes, et cellules endothéliales). La numération sanguine des MPs varie en fonction de leurs taux de production et de leur élimination de la circulation. Un changement de leur concentration est observé dans un certain nombre de situations pathologiques.

Les MPs les plus abondantes dans le sang circulant, représentant en situations physiologiques environ 80 % des MPs totales, sont d'origine plaquettaire (PMPs)<sup>33</sup>.

Les PMPs peuvent être générées par des différents agonistes activateurs plaquettaires, comme par exemple l'ADP ou l'acide arachidonique, l'ionophore du calcium, les protéines se liant au complément, mais également lors de stress cellulaire important. Par exemple, la stimulation plaquettaire par le peptide agoniste du récepteur de la thrombine (TRAP) provoque la libération de MPs mais aussi d'exosomes<sup>34</sup>. La calpaïne intra-plaquettaire est une enzyme essentielle à ce processus puisque son inhibition entraîne l'absence de formation de PMPs<sup>35</sup>.

## **5. Clairance des MPs**

Le mécanisme de l'élimination des MPs de la circulation sanguine n'est pas encore totalement élucidé actuellement. La durée de vie des plaquettes, d'environ une semaine, contraste avec celle très courte des PMPs. Ainsi, elle a été mesurée à 30 minutes chez la souris<sup>36</sup> et à moins de 10 minutes chez le lapin<sup>37</sup>. Ces MPs pourraient être éliminées de la circulation par l'action de phospholipases<sup>38</sup> suivant deux mécanismes : le premier est un mécanisme direct impliquant la phagocytose ; le deuxième est indirect lié à un phénomène d'opsonisation par la protéine S, le complément, ou GAS6 (Growth arrest-specific gene 6 product)<sup>39</sup>, l'opsonisation étant un processus par lequel une molécule dite opsonine recouvre la membrane d'une cellule ou d'une particule cible pour favoriser sa phagocytose par une



cellule dotée de récepteurs pour les opsonines. Ainsi, pour exemple, les PMPs sont dans un premier temps opsonisées par le C3b, la protéine la plus abondante du complément. Les PMPs portant le C3b viennent alors se fixer au récepteur du complément sur les globules rouges qui seront reconnus et digérés par des phagocytes du foie ou de la rate <sup>36</sup>. De cette façon, les cellules de Küpffer dans le foie contiennent de grande quantité d'hémoglobine après l'injection de globules rouges portant le complexe MPs-C3b <sup>40</sup>.

## **6. Effet procoagulant des MPs**

### **A. Rappel sur la coagulation plasmatique**

L'hémostase est un phénomène physiologique permettant de limiter les pertes sanguines provoquées par une lésion vasculaire. La lésion de l'endothélium vasculaire va en effet provoquer la formation d'un thrombus plaquettaire (hémostase primaire) et la formation d'un réseau de fibrine insoluble qui va consolider ce thrombus (coagulation plasmatique). La coagulation est l'aboutissement d'une cascade de réactions protéolytiques entraînant l'activation en chaîne de facteurs plasmatiques de la coagulation, circulant sous forme de précurseurs inactifs (zymogènes) (**Fig 6**).

La coagulation fait intervenir des protéines plasmatiques (facteurs de coagulation et inhibiteurs de la coagulation), une protéine tissulaire (facteur tissulaire), les phospholipides des plaquettes et des MPs (surface catalytique sur laquelle vont se fixer les facteurs de coagulation) et les ions calcium.

*In vitro*, la coagulation peut être initiée de 2 façons différentes ; la voie exogène avec exposition du sang au contact du facteur tissulaire (FT) et la voie endogène avec exposition du sang au contact d'une surface chargée négativement.

Ces 2 voies, par l'activation en chaîne des facteurs de la coagulation, aboutissent à la formation de thrombine, enzyme protéolytique qui va transformer le fibrinogène circulant en fibrine, constituant principal du caillot.

*In vivo*, la rupture de la continuité endothéliale avec exposition du facteur tissulaire semble être l'élément primordial responsable de l'initiation de la coagulation.

#### **a. La voie exogène : initiation de la coagulation par le facteur tissulaire (FT)**

- Le facteur tissulaire est une glycoprotéine transmembranaire synthétisée par les fibroblastes présents dans la tunique externe (adventice) des vaisseaux : le FT est séparé du sang par l'endothélium, mais entre en contact du sang en cas de lésion du vaisseau. Lors d'une lésion vasculaire, le FT fixe le F VII, en présence d'ions calcium, et cela facilite l'activation du FVII en sérine protéase (VIIa). Le complexe F VIIa/FT est capable d'activer le F VII, dans une

réaction d'auto-activation (auto-amplification par les premières traces de F VIIa produites). Le complexe F VIIa/FT active ensuite simultanément les F IX et F X fixés sur les surfaces membranaires (FT = cofacteur). C'est la voie principale de la coagulation avec pour résultat la formation de **Xa** et **IXa**.

#### **b. La voie endogène : la phase contact**

Les facteurs du système contact sont composés de 3 zymogènes, le F XII, le F XI, et la prékallikréine (PK) et d'un cofacteur, le kininogène de haut poids moléculaire (KHPM). Lors d'une activation du système contact, le F XII et le KHPM se fixent aux surfaces électronégatives du sous-endothélium puis le F XI et la PK viennent se lier au KHPM. Cette fixation entraîne une auto-activation progressive et lente du F XII en F XIIa. Le F XIIa transforme la PK en kallicréine, celle-ci activant le F XII par protéolyse (boucle d'amplification de l'activation du F XII). Le F XIIa formé transforme par protéolyse le F XI en XIa. Le F XI peut également être activé par la thrombine (permettant la formation de XIa en cas de déficit en F XII). Le F XIa généré active le F IX en présence d'ions calcium.

Cette voie n'a qu'un rôle accessoire puisque les déficits constitutionnels sévères en F XII, PK ou KHPM ne s'accompagnent pas de manifestations hémorragiques. En revanche, les déficits constitutionnels en F XI sont associés à des hémorragies parfois sévères (importance de l'activation rétro-active du F XI par la thrombine). Par ailleurs, les facteurs du système contact participent à d'autres processus physiologiques : fibrinolyse, inflammation, activation du complément.

Le résultat de cette voie est la formation du **IXa**.

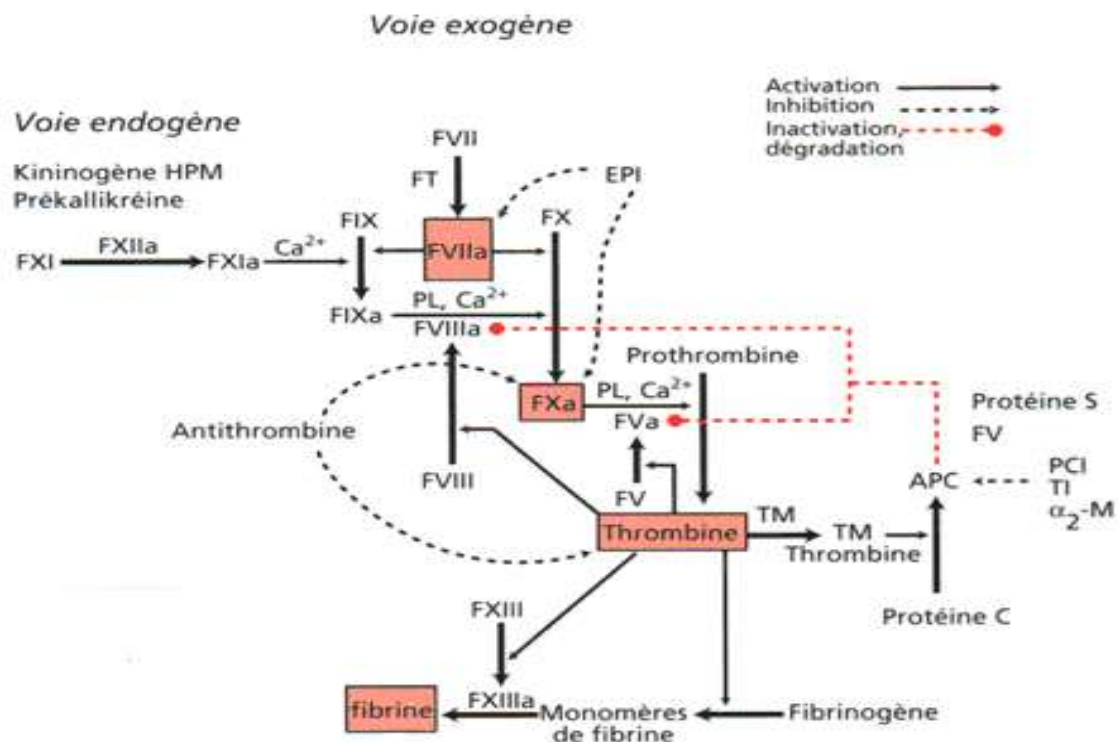
#### **c. Le complexe ténase**

L'activation du F IXa ou la protéolyse du F IX se produit par l'intermédiaire du complexe F VIIa/FT –  $\text{Ca}^{2+}$  (voie exogène) et par l'intermédiaire du F XIa en présence d'ions  $\text{Ca}^{2+}$ . Le F IXa forme un complexe équimoléculaire avec le F VIIIa (son cofacteur) en présence de phospholipides (PL) chargés négativement (surface des plaquettes activées et des MPs) et d'ions  $\text{Ca}^{2+}$ . Ce complexe, appelé ténase, active le F X en Xa. L'activation du facteur VIII (nécessaire à l'activité du complexe) est catalysée par le F Xa ou la thrombine, une fois les premières traces formées (activation rétroactive).

#### **d. Le complexe Prothrombinase et la formation de la thrombine**

L'activation du F Xa ou la protéolyse du FX se produit par l'intermédiaire du complexe F VIIa/FT –  $\text{Ca}^{2+}$  (voie exogène) et par l'intermédiaire du complexe ténase (complexe IXa –

VIIIa – PL – Ca<sup>2+</sup>). Le facteur Xa forme un complexe équimoléculaire avec le F Va (son cofacteur) en présence d'ions Ca<sup>2+</sup> et des PL anioniques (surface plaquettaire et MPs). Ce complexe, appelé prothrombinase, active la prothrombine en thrombine. L'activation par protéolyse du F V est nécessaire pour qu'il puisse interagir avec la prothrombine et le F Xa. Initialement cette activation est vraisemblablement catalysée par le F Xa. Mais la thrombine formée est elle aussi capable de l'activer, auto-amplifiant sa propre production. C'est un phénomène localisé au site de la brèche vasculaire car cette cascade de réactions, malgré son auto-amplification, est limitée et régulée par différents systèmes d'inhibiteurs physiologiques. L'équilibre entre la coagulation et les mécanismes qui vont la limiter est fondamental, une rupture ayant pour conséquence un risque hémorragique (déficit en facteurs) ou thrombotique (excès de facteurs activés ou déficit en inhibiteurs).



Abréviation : F = facteur ; a = activé ; FT = facteur tissulaire ; TM = thrombomoduline ; PI = phospholipide ; HPM = haut poids moléculaire ; APC = protéine C activée ; PCI = inhibiteur de la protéine C ; TI = inhibiteur de la trypsine ;  $\alpha_2$ -M =  $\alpha_2$  macroglobuline

Les MPs ont été initialement reliés à des pathologies à risque de thrombose parce qu'elles expriment à leur surface des phospholipides pro-coagulants. En effet la membrane cytoplasmique de ces MPs présente toutes les propriétés pour agir comme support pour les



réactions de coagulation (**Fig 7**). Un tel système de coagulation est activé non seulement lors de processus pathologiques mais aussi, moins intensément, chez les individus sains. Ainsi, Berckmans et al.<sup>41</sup> ont démontré la présence de MPs circulantes potentiellement pro-coagulantes chez des sujets sains.

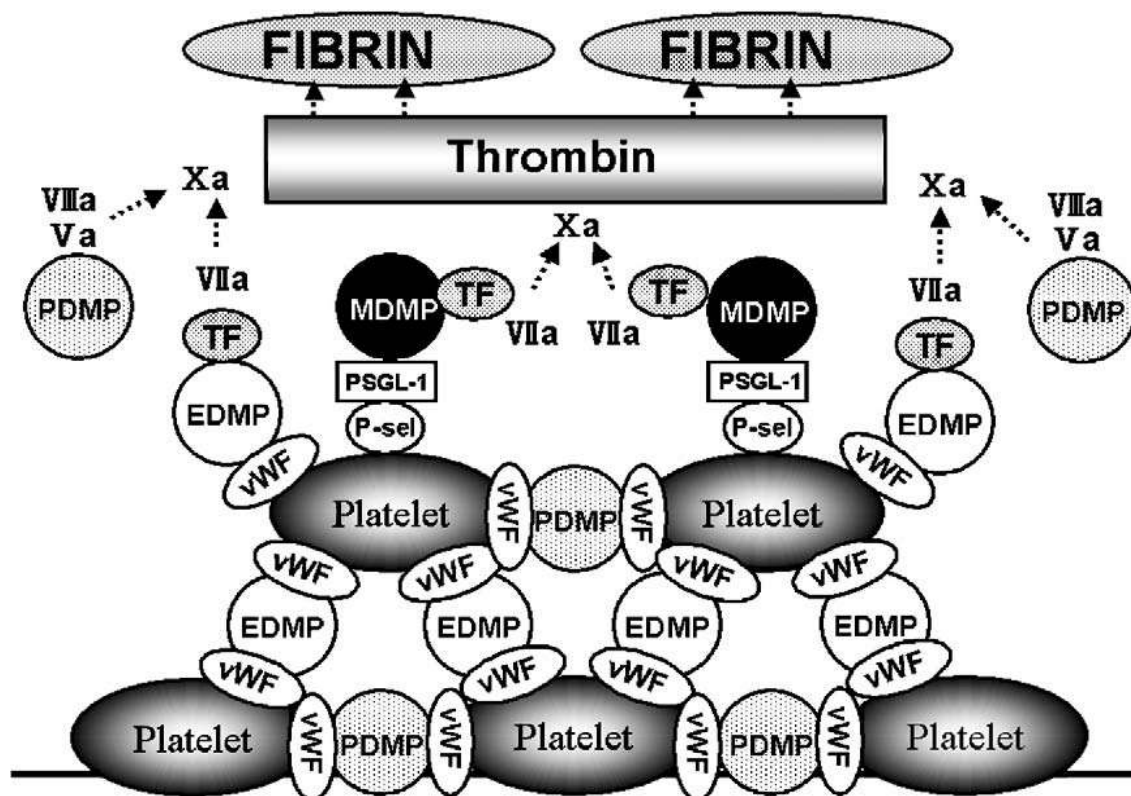
Il a été montré que les PMPs peuvent se lier au facteur VIII activé (FVIIIa), un cofacteur du complexe enzymatique tenase, qui active le facteur X (FX)<sup>42</sup>. Les PMPs peuvent également se lier au facteur V activé (FVa) qui se combine avec le facteur X activé (FXa) formant le complexe prothrombinase qui permet la formation de thrombine<sup>43</sup>. Puisque les PMPs essaient dans la circulation, ces données suggèrent qu'elles peuvent exercer leur pouvoir pro-coagulant à distance du site initial de l'activation plaquettaire. Il semble également que les PMPs présentent ce pouvoir pro-coagulant plus longtemps que les plaquettes activées elles-mêmes. Enfin, Sinauridze et al. ont montrés récemment que les PMPs avaient un pouvoir pro-coagulant 50 à 100 fois plus important que les plaquettes activées<sup>44</sup>. Lors de lésions de la paroi vasculaire, le sang entre en contact avec le FT exprimé constitutivement par certaines cellules du tissu sous-endothélial et après activation par les cellules endothéliales et certaines cellules sanguines circulantes. Sa liaison au facteur VII circulant provoque l'activation de ce dernier qui déclenche la coagulation plasmatique par activation du FX et du FIX. Les traces de FXa ainsi formées permettront la formation des premières traces de thrombine. Ce processus est maintenant considéré comme étant la première étape de la coagulation plasmatique. Celle-ci est appelée phase d'initiation.

De nombreuses MPs portent en surface le FT (Au fur et à mesure de l'activation cellulaire liée à la coagulation, il semble que les PMPs peuvent commencer à véhiculer du FT probablement d'origine leucocytaire). Les MPs sont donc impliquées dans la génération de thrombine et donc de fibrine, via leur PS de surface mais aussi pour certaines d'entre elles, leur expression de FT.

Plusieurs études ont montrées que la stimulation de cellules endothéliales de veine ombilicale humaine (HUVEC) en culture, par du TNF  $\alpha$  (Tumor necrosis factor  $\alpha$ ), par le LPS (Lipopolysaccharide) ou bien par des LDL oxydées (Low Density Lipoprotein), provoquait une augmentation des MPs d'origine endothéliale (EMPs) exprimant le facteur tissulaire<sup>45-47</sup>.

Les MPs d'origine monocyttaire (MMPs) peuvent également intervenir dans la formation d'un thrombus au niveau d'une lésion vasculaire par le recrutement de cellules de l'inflammation et l'accumulation du FT. Les MMPs expriment à leur surface la PSGL-1 (P-selectin glycoprotein ligand) et le FT<sup>48</sup>. La PSGL-1 est le ligand naturel de la P-sélectine. Ces MMPs pouvant ainsi se lier à la P-sélectine des cellules endothéliales activées et des plaquettes activées, s'intègrent au thrombus en formation y entraînant une accumulation de

FT<sup>49</sup>. Ce dernier sera immédiatement disponible et pourra ainsi très rapidement déclencher *in situ* la coagulation plasmatique. Delconde et al.<sup>50</sup> ont montrés *in vitro* que les membranes des MPs exposant le FT peuvent fusionner avec celles des plaquettes activées aboutissant au transfert du FT sur les membranes plaquettaires. Ainsi, cette fusion membranaire permet aux plaquettes activées d'exprimer le FT qui assure une initiation et une propagation plus efficaces de la coagulation. Une représentation du rôle des MPs dans le développement d'un thrombus localisé est schématisée sur la figure 7.



**Figure 7 : Représentation schématique du rôle des MPs dans le développement d'un thrombus localisé.** Différents types de MPs sont formées au niveau de la lésion locale. Les EMPs et les MMPs exprimant le FT fournissent un environnement favorable pour initier et être le support des réactions de coagulation <sup>51</sup>.

## 7. MPs et interactions cellulaires

Les MPs portent les antigènes des cellules dont elles dérivent et peuvent transférer ces molécules de surface à d'autres types cellulaires. La liaison de ces antigènes de surface à leur récepteur spécifique peut activer des voies de signalisation intracellulaire. Les PMPs peuvent ainsi provoquer des réactions cellulaires dans le microenvironnement où elles ont été formées<sup>52-54</sup>. L'augmentation des PMPs lors de l'activation plaquettaire et lors d'un syndrome inflammatoire a été bien décrite<sup>55</sup>. Le rôle de ces PMPs dans les interactions cellulaires avec

les monocytes et les cellules endothéliales a été étudié par plusieurs équipes <sup>54-56</sup>. Jy et al. <sup>52</sup> ont montré en effet, que les PMPs liés aux polynucléaires neutrophiles induisent à la fois une augmentation significative de l'expression du CD11b à leur surface et une augmentation de leur activité phagocytaire. Par ailleurs, Nomura et al. <sup>56</sup> ont rapporté que les PMPs générées lors d'un stress cellulaire important, favorisent l'augmentation des molécules d'adhésion cellulaire sur les cellules endothéliales. Toutes ces données indiquent que les PMPs pourraient participer aux dommages vasculaires observés dans les syndromes inflammatoires via notamment l'induction de molécules d'adhésion cellulaire. De plus, les PMPs sont doués d'une très grande mobilité et sont facilement accessibles pour les leucocytes <sup>57</sup>. Forlow et al. <sup>58</sup> ont montrés, que les PMPs qui expriment la P-sélectine se lient aux leucocytes qui expriment PSGL-1. Ainsi, les PMPs sont ainsi capables de stimuler l'accumulation des leucocytes.

## **8. MPs et maladies**

Une diminution du nombre de MPs a été associée à une tendance hémorragique augmentée. Par exemple, au cours du syndrome de Scott et du syndrome de Castman, le risque hémorragique accru est dû à des anomalies qualitatives ou quantitatives des PMPs <sup>59-61</sup>. Cependant la plupart des problèmes pathologiques liés aux MPs est essentiellement due à une augmentation de leur nombre, phénomène décrit dans de nombreuses pathologies à risque accru de thrombose. De nombreuses études ont montrés que non seulement le nombre mais aussi l'origine cellulaire et la composition des MPs circulantes sont dépendants du type de la maladie, du stade et du traitement médical éventuel.

### **A. Drépanocytose**

Il existe une augmentation des MPs circulantes chez les patients drépanocytaires en périodes critiques aiguës mais également durant la phase chronique <sup>62</sup>. Cette dernière est caractérisée par une hémolyse chronique au cours de laquelle le système de coagulation est constamment activé par de multiples voies d'activation <sup>63</sup>. Ceci a pour conséquence la génération de thrombine à bas bruit avec activation des leucocytes et des plaquettes. Ces effets pro-coagulant et pro-inflammatoire sont associés à des lésions endothéliales. Celles-ci entraînent un détachement des cellules endothéliales de la paroi vasculaire, dénudant ainsi le sous-endothélium qui se retrouve exposé au sang avec en particulier présentation du FT sous-endothélial.

Les MPs détectées durant la phase chronique dérivent des cellules endothéliales, des plaquettes et des monocytes <sup>62</sup>. Les EMPs décrites dans la drépanocytose sont CD54-,

CD144+ (VE-cadherin), CD105+ (ICAM-1). Le CD105 est particulièrement intéressant car il dérive des jonctions cellulaires des cellules endothéliales et est très vite éliminé lorsqu'il est libre dans la circulation. Une augmentation des EMPs CD105+ en phase chronique de drépanocytose indique des lésions chroniques endothéliales. Une corrélation directe existe entre le taux d'EMPs CD144+ ou CD105+ et l'intensité de l'hémolyse (prouvée par l'augmentation des concentrations plasmatiques de LDH et du nombre de réticulocytes). Cette corrélation a également été décrite dans l'hémoglobinurie paroxystique nocturne. Ainsi la quantification des MPs pendant la phase chronique pourrait constituer un outil de mesure de l'activité de la maladie. Elle pourrait aider à évaluer l'effet des thérapeutiques visant à réduire la falciformation et prévenir la survenue des crises.

Lors des crises, des lésions endothéliales se produisent avec une activation de la coagulation accompagnée par une augmentation des MPs circulantes d'origine plaquettaire, endothéliale, érythrocytaire et monocyttaire <sup>62, 64, 65</sup>.

Le FT quant à lui, est exprimé sur les cellules endothéliales circulantes <sup>66</sup> et sur les monocytes <sup>62</sup>. Sa densité au niveau membranaire pourrait expliquer pourquoi la sévérité et l'intensité des crises de drépanocytose varient d'un individu à l'autre <sup>67</sup>.

## **B. Thrombopénie induite par l'héparine (TIH)**

La TIH est un processus pathologique secondaire à la formation d'anticorps contre des complexes associant l'héparine à des protéines. Dans ce syndrome, les IgG produites sont dirigées contre l'héparine administrée liant le PF4 sur la surface plaquettaire. Le complexe héparine-PF4-IgG formé vient alors se fixer sur les récepteurs du fragment Fc des plaquettes (Fc-receptor) provoquant alors l'activation plaquettaire. Ces plaquettes activées fournissent une surface pro-coagulante exposant la P-selectine et la PS. Dans le même temps, elles génèrent des MPs qui expriment également la P-sélectine et la PS <sup>68</sup>. En outre, ce complexe héparine-PF4-IgG peut lier et directement activer les cellules endothéliales, <sup>69</sup> contribuant ainsi à maintenir l'état pro-coagulant.

## **C. Sepsis**

Les MPs circulantes sont augmentées chez les patients avec sepsis <sup>70</sup>. Ces MPs dérivent des monocytes, des plaquettes et des cellules endothéliales. La façon dont elles contribuent au processus pathologique n'est pas encore bien connue. Des données récentes suggèrent que la présence de taux plus élevés de MPs dans la circulation serait liée à une évolution plus favorable lors d'épisodes de sepsis sévères <sup>71</sup>.

L'exposition *in vitro* des monocytes au lipopolysaccharide (LPS) bactérien provoque la génération de MMPs exprimant le FT <sup>5</sup>. De la même façon, *in vivo*, les MMPs circulantes expriment également le FT, et contribuent probablement à un état pro-coagulant augmenté associé au sepsis. Nieuwland et al. démontrèrent ainsi, que la génération de thrombine *in vitro* générée par des MPs chez des patients atteints d'infection méningococcique est bloquée si ces MPs sont préalablement incubées avec des anticorps monoclonaux dirigés contre le FT ou le FVII <sup>72</sup>.

En outre, les PMPs augmentent l'adhésion des monocytes sur les surfaces endothéliales et induisent le chimiotactisme des monocytes <sup>70</sup>.

#### **D. Diabète**

De nombreuses études sur le rôle potentiel des PMPs dans les complications du diabète ont été menées par différentes équipes <sup>73-78</sup>. Il en ressort que les MPs sont augmentées chez les patients diabétiques. Cependant, des différences dans l'origine des MPs ont été mises en évidence en relation avec le type et le stade de la maladie.

Sabatier et al. ont rapporté que dans le diabète de type I, le potentiel pro-coagulant des MPs était élevé et directement corrélé avec la glycémie <sup>79</sup>. En revanche, bien que la concentration de MPs fût également augmentée dans le diabète de type II, les mêmes auteurs ont montré que ces MPs n'étaient pas associées à une augmentation du pouvoir pro-coagulant.

Une augmentation des PMPs et des MMPs est associée avec une fréquence plus élevée des complications du diabète (telle que la rétinopathie diabétique associée à des dommages vasculaires) <sup>80-89</sup>. L'augmentation des EMPs est prédictive de la présence de lésions artérielles coronariennes, et constitue un facteur de risque indépendant plus important que la durée de la maladie diabétique, la concentration sérique de lipides, ou encore l'hypertension artérielle <sup>90</sup>. Fait intéressant, une élévation des EMPs permet d'identifier une sous-population de patients diabétiques sans symptômes typiques d'angine de poitrine mais avec une angiographie coronarienne montrant des lésions artérielles.

#### **E. MPs et maladies cardiovasculaires**

La présence de microparticules circulantes reflète l'activation des cellules circulantes et des cellules endothéliales. Il n'est pas étonnant de voir ainsi au cours de maladies vasculaires, des changements dans la composition des microparticules circulantes, changements qui ont été rapportés dans de nombreuses pathologies cardio-vasculaires comme par exemple les syndromes coronariens, l'infarctus du myocarde, l'anévrisme aortique, les troubles vasculaires périphériques ainsi que la maladie thromboembolique veineuse. Dans toutes ces

pathologies, la numération et la caractérisation des MPs circulantes pourraient être utiles dans le futur pour la détection et le diagnostic de la maladie, pour étudier la physiopathologie et la progression de la maladie, et évaluer l'efficacité des traitements.

## **F. MPs et cancer**

Un rôle important des MPs est celui de leur implication dans les maladies cancéreuses. En effet, les MPs expriment le FT libérées par les cellules cancéreuses et la surexpression du FT dans ces cellules est étroitement associée avec la progression tumorale <sup>91-95</sup>. Thomas et al. ont également montré que les cellules cancéreuses pulmonaires et pancréatiques génèrent des MPs exprimant le FT et la PSGL-1 <sup>96</sup>. Ainsi les MPs issues des cellules cancéreuses se fixent aux plaquettes via la liaison à la P-sélectine plaquettaire et sont capables d'agréger ces dernières par une voie dépendante du FT.

*In vivo*, les MPs dérivées de cellules cancéreuses injectées à une souris, s'accumulent au niveau de lésions des vaisseaux (provoquées par l'exposition au FeCl<sub>3</sub>) réduisant alors le temps de saignement et le temps d'occlusion des veinules et des artérioles. Cet état thrombotique est également observé chez les souris développant une tumeur cancéreuse pour lesquelles, la numération sanguine de PMPs, d'EMPs et de MPs dérivées de cellules cancéreuses est augmentée <sup>96</sup>. D'autres études ont montrés de façon similaire l'état thrombotique associé au cancer lié à une augmentation des MPs d'origine cancéreuse, et notamment celle de Zwicker et al. qui montrèrent une association entre les MPs portant le facteur tissulaire dérivées des cellules cancéreuses et la survenue d'évènements thrombo-emboliques veineux chez des patients atteints de cancer <sup>97</sup>.

## **G. MPs et traitements pro-coagulants : desmopressine (DDAVP ou Minirin®), rFVIIa (Novoseven®)**

La desmopressine, un analogue de la vasopressine (AVP) a été synthétisée en 1967 et employée pour son action anti-diurétique <sup>98</sup>. En 1977, son efficacité anti-hémorragique vis-à-vis de la maladie de Von Willebrand et de l'hémophilie A mineure a été reconnue. Elle reste très utile actuellement dans le traitement de la maladie de Willebrand et dans certaines formes mineures de l'hémophilie A <sup>99-101</sup>. Elle a par la suite trouvé des applications dans une variété d'autres troubles hémorragiques <sup>102-103</sup>. La DDAVP peut ainsi réduire l'allongement du temps de saignement provoqué par l'aspirine <sup>104</sup>, la streptokinase <sup>105</sup>, ou encore l'héparine <sup>106</sup>. Il est bien établi que la desmopressine induit indirectement la libération du facteur von Willebrand (vWF) de l'endothélium vasculaire et par conséquent l'augmentation du F VIII plasmatique <sup>107-108</sup> (Le vWF portant et protégeant le facteur VIII plasmatique de la

dégradation enzymatique). Toutefois, cela ne peut rendre compte de l'ensemble de ses propriétés hémostatiques puisque qu'elle est efficace dans certaines situations hémorragiques indépendamment du vWF: par exemple lors de correction de saignements liés à des dysfonctions plaquettaires d'origine congénitale et acquise <sup>103</sup> incluant le syndrome de Bernard-Soulier <sup>109</sup>, et impliquant des mécanismes d'hémostase autres <sup>110</sup>. En dehors de l'action de la desmopressine sur le vWF, l'action hémostatique de cette dernière reste toujours méconnue aujourd'hui. Des études n'ont montrés aucun effet de la desmopressine sur l'agrégation, la sécrétion ou l'adhésion plaquettaire <sup>111-112</sup>. Cependant Soslau et al. ont montrés chez des patients insuffisants rénaux l'action de la desmopressine sur la membrane plaquettaire <sup>113</sup>. De même Lawrence et al. ont rapportés que la desmopressine agissait directement sur la membrane plaquettaire en favorisant la microvésiculation des plaquettes par vraisemblablement une augmentation transitoire et modérée du  $Ca^{2+}$  cytosolique (non suffisante pour induire la sécrétion ou l'agrégation plaquettaire) avec formation de PMPs potentiellement pro-coagulante <sup>114</sup>. Ceci pourrait expliquer la correction des défauts de l'hémostase par la desmopressine dans les anomalies qualitatives plaquettaires comme par exemple la maladie de Bernard-soulier, indépendamment de l'action sur le vWF.

Le Novoseven® quant à lui correspond à du facteur VIIa recombinant humain (rFVIIa). Il est utilisé dans le traitement hémostatique des hémophilies A et B avec inhibiteurs où il induit une génération de thrombine normale ainsi qu'une activation plaquettaire en l'absence de FVIII ou FIX. C'est une glycoprotéine vitamine K-dépendants composée de 406 acides aminés tout à fait similaire au facteur VIIa du plasma humain.

Butenas et al. ont montrés que la génération de thrombine due au novoseven® en l'absence de facteur VIII et IX est dépendante du FT <sup>115</sup>. Ils ont également montrés que de fortes doses de rFVIIa *in vitro*, pouvaient activer les plaquettes de façon comparable au sang d'un hémophile avec pour conséquence la génération de PMPs portant le FT. Ce sont finalement ces MPs via l'activation plaquettaire qui seraient à l'origine de l'activité hémostatique du traitement par novoseven®.

## 9. MPs et perspectives

Récemment, différents rôles ont été attribués aux MPs. Par exemple, des études récentes ont prouvées que les PMPs liées aux cellules hématopoïétiques stimulent leur capacité de prolifération, de survie, d'adhérence et de chimiotactisme <sup>116-119</sup>. En outre, Majka et al. <sup>120</sup> ont montré que les PMPs sont capables de transférer leurs antigènes spécifiques membranaires sur des surfaces endothéliales et sur les cellules hématopoïétiques. Récemment, Deregibus et al. ont montré que les MPs dérivant des cellules endothéliales progénitrices étaient

incorporées dans les cellules endothéliales via l'interaction avec l' $\alpha_4$ -intégrin et la  $\beta_1$ -intégrin exprimé à la surface des MPs <sup>121</sup>. Ces données suggèrent que les cellules endothéliales progénitrices pourrait activer l'angiogénèse via leurs MPs. Janowska-Wieczorek et al. suggèrent que les MPs pourraient avoir un rôle important dans la communication intercellulaire <sup>122</sup>.

### **III. Les objectifs de l'étude**

Ce travail de thèse a consisté dans un premier temps à une mise au point de la méthode de détection des MPs par cytométrie en flux dans le but d'obtenir une numération sanguine des MPs ainsi que leur caractérisation. Par ailleurs, leurs caractéristiques fonctionnelles et notamment leur potentiel pro-coagulant ont été étudiées en parallèle en utilisant un test de coagulation uniquement dépendant des phospholipides du patient. Une étude de corrélation a été effectuée entre la numération des MPs et leur pouvoir pro-coagulant mesuré par le test de coagulation précédent.

Dans un deuxième temps, nous avons réalisé une numération sanguine des MPs ainsi que leur caractérisation immunophénotypique pour déterminer leur origine cellulaire (plaquettaire, plasmocytaire...) dans les gammopathies monoclonales (gammopathie monoclonale de signification indéterminée ou MGUS, myélome, leucémie à plasmocytes) parallèlement à la numération des cellules endothéliales circulantes (CEC) (non figurée dans ce travail). En effet, l'augmentation dans la circulation des cellules endothéliales circulantes (CEC) et des MPs associées possiblement pro-coagulantes, est décrite dans la littérature comme un bon indicateur des dommages et dysfonctionnements vasculaires, de néo-angiogénèse et/ou de risques accrus de thrombose. Cette augmentation a été mise en évidence dans de nombreuses situations de cancer et notamment dans le myélome. Cependant, aucune étude n'a recherché une corrélation entre d'une part le taux de CEC, de MPs et de coagulabilité sanguine dépendant des MPs, et d'autre part la progression des gammopathies monoclonales. On se propose donc dans cette application préliminaire des MPs sur les gammopathies monoclonales de rechercher une corrélation des taux sanguins de MPs circulantes avec le volume tumoral des gammopathies monoclonales évalué par la valeur du pic monoclonal et du taux de plasmocytes médullaires. Dans un deuxième temps, l'objectif sera d'évaluer la valeur prédictive des taux de MPs avec l'agressivité du myélome et avec la survenue d'évènements thrombotiques veineux et/ou artériels.



En deuxième application médicale, nous avons évalué l'évolution du taux des MPs après traitement IV par MINIRIN® chez des patients atteints de maladie hémorragique héréditaire de type maladie de Willebrand ou hémophilie A.

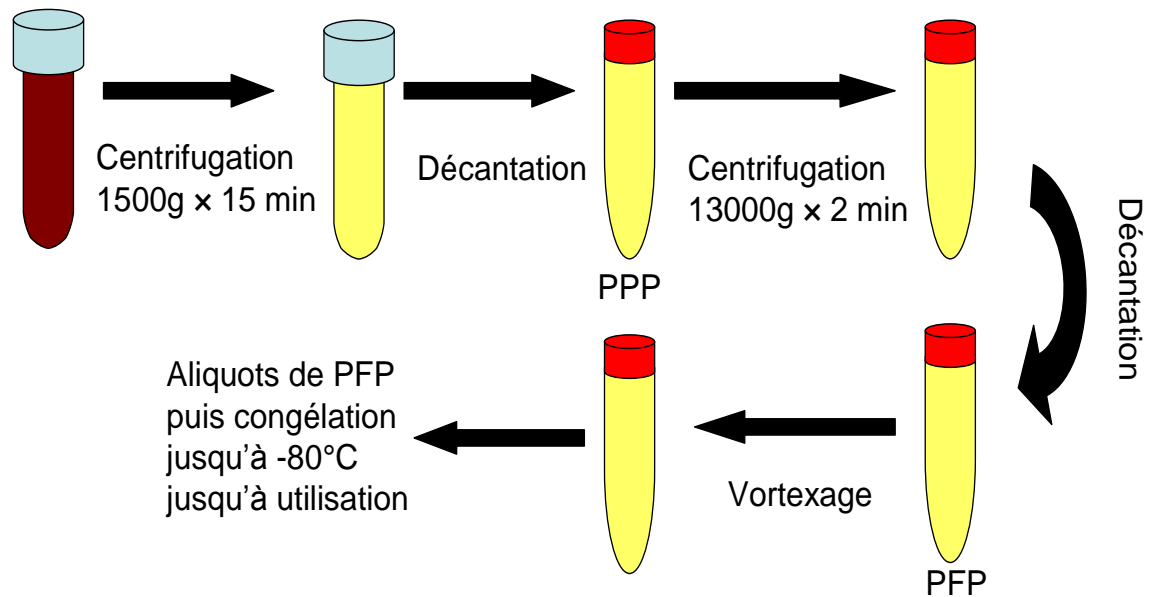
## **IV. Matériels et méthodes**

### **1. Nature des prélèvements sanguins et tubes de collection**

Les échantillons sanguins périphériques sont collectés par ponction veineuse franche dans des tubes citratés 0.105M initialement sur Vacutainer® de 5ml (BD Plymouth, PL67BP, UK) puis Vacuette® (greiner bio-one, Frickenhausen, Allemagne). Ils ont été traités moins de 4 heures après le prélèvement. L'EDTA n'est pas utilisé car il altère la glycoprotéine membranaire plaquettaire (Gp IIb-IIIa ou CD41) qui sert de marqueur en cytométrie de flux<sup>123-125</sup>.

### **2. Préparation pour obtention des MPs**

Les MPs sont recherchées sur plasma totalement dépourvues de plaquettes (PFP ; Platelet Free Plasma). Les échantillons de PFP sont préparés suivant la méthode utilisée par Sabatier et al.<sup>126</sup>. Brièvement, deux centrifugations successives sont réalisées, d'abord à 1500 g pendant 15 minutes puis après décantation, à 13000 g pendant 2 minutes. Le PFP est ensuite aliquoté et congelé à – 80°C jusqu'à utilisation (**Fig. 8**).

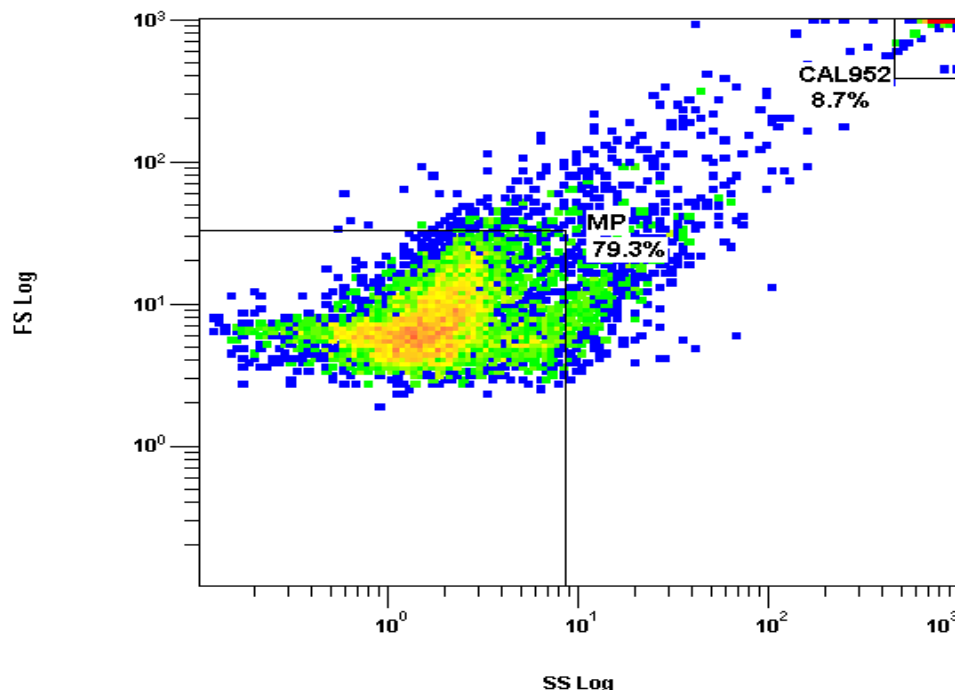


**Figure 8 : Isolement des MPs à partir d'un échantillon sanguin prélevé sur tube citraté** (d'après Sabatier F et al. *Diabetes* 2002 <sup>79</sup>).

### 3. Marquage et numération par cytométrie en flux (CMF)

#### A. Marquages des MPs

Les MPs sont marquées en ajoutant 10 µl d'anticorps anti-CD41-FITC (FITC Mouse Anti-Human CD41a, BD Pharmingen<sup>TM</sup>, Franklin Lakes, USA) prédilué au dixième et 10 µl d'annexin V-PE prédilué au demi dans un tampon de liaison (Cell Lab ApoScreen<sup>TM</sup> Annexin V –PE Apoptosis Kit, Beckman Coulter®, Villepinte, France). Le mixte d'anticorps est ensuite mélangé à 30 µl de PFP fraîchement décongelé. Après 30 minutes d'incubation à température ambiante, les solutions PFP-Mixte anticorps sont diluées dans 500 µl de tampon de liaison précédent. La dernière étape consiste à rajouter 30 µl d'une solution de billes en concentration connues (952 billes /µl) (Flow-Count<sup>TM</sup> Fluorospheres, Beckman Coulter®, Villepinte, France) dans chaque échantillon, suivant les recommandations du fabricant, dans le but d'exprimer un compte de MPs en nombre absolu par µl de PFP (**Fig 9**).

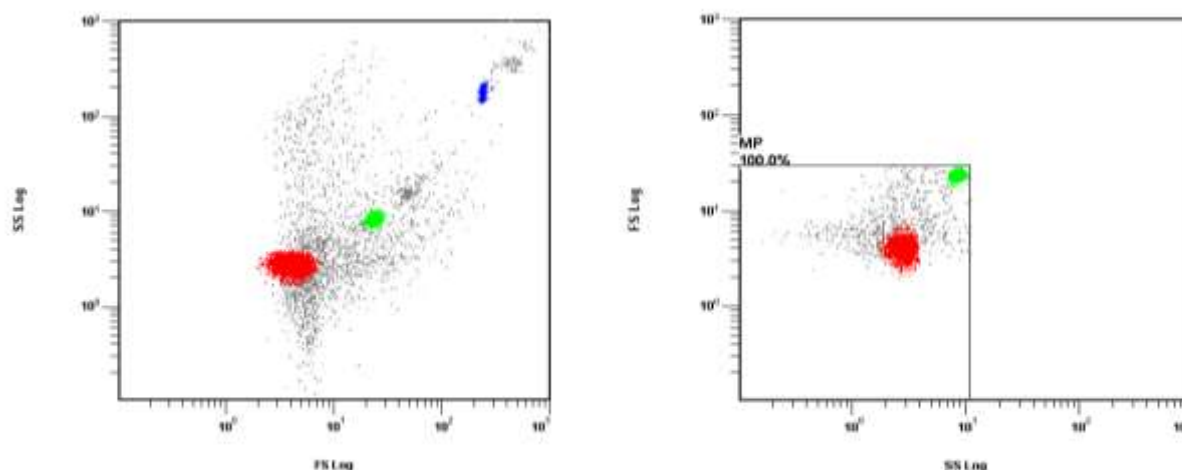


**Figure 9 : Relation taille/structure évaluée par cytométrie en flux.** Ce graphe montre dans le petit carré en haut à droite la présence de billes de comptage (concentration connue à 952 billes par  $\mu\text{L}$ ). Le volume de la solution de billes ajouté est le même que celui de l'échantillon ce qui permettra par un calcul simple de déterminer la concentration en MPs par  $\mu\text{L}$  de PFP.

L'annexin V-PE prédilué au demi dans un tampon PBS ainsi que le contrôle isotypique (Ig G1-FITC K, mouse, BD biosciences pharmingen<sup>TM</sup>, San diego, USA) sont utilisés comme contrôle.

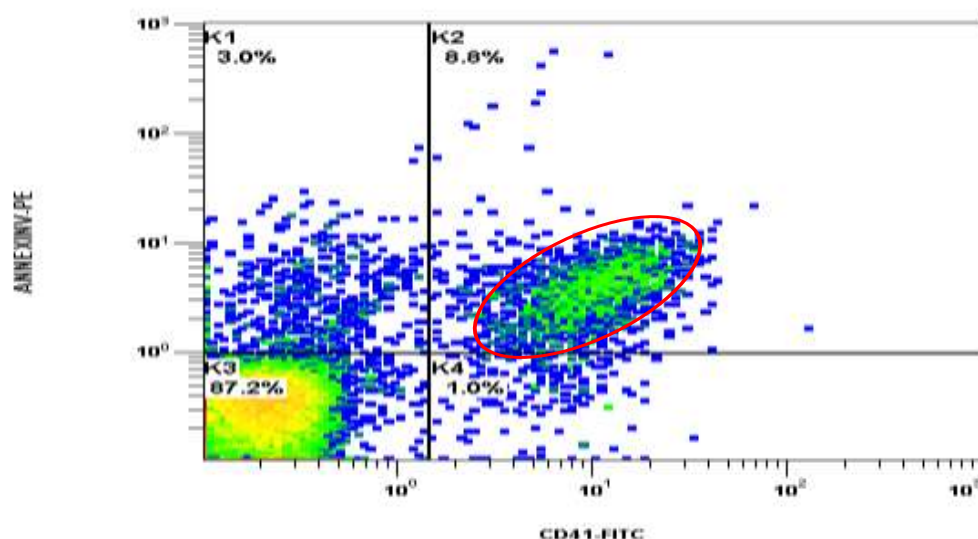
### B. Analyse des MPs par cytométrie en flux

L'analyse est réalisée sur un cytomètre en flux de type « Cytomics FC 500 » (Beckman Coulter®, Villepinte, France). Le protocole utilisé pour l'analyse des MPs est celui réalisé par Robert S. et al.<sup>127</sup> en 2008. La standardisation de ce protocole PMPs est obtenue en utilisant des billes fluorescentes de trois tailles différentes (0.5, 0.9 et 3  $\mu\text{m}$ ) (Mégamix® BioCytex, Marseille, France). Les MPs sont définies dans ce protocole comme ayant une taille comprise entre 0.5 et 0.9  $\mu\text{m}$  (**Fig 10**). On est donc amené à introduire un discriminant sur la taille (Forward Scatter (FS) < 1). En effet, en dessous de la taille de 0.5  $\mu\text{m}$ , le bruit de fond est trop important et la reproductibilité du cytomètre n'est plus suffisante. Les billes de 3  $\mu\text{m}$ , quant à elles, correspondent à la taille d'une plaquette normale.



**Figure 10 : Utilisation du réactif Mégamix® représenté sur des graphes taille/structure obtenus en cytométrie en flux.** Sur le graphe de gauche, on observe 3 spots de couleur différente qui correspondent aux 3 tailles des billes de calibration (0.5µm en rouge, 0.9 µm en vert et 3 µm en bleu). On définit la région des MPs (zone encadrée sur le graphe de droite) selon des critères de taille entre 0.5µm et 0.9 µm.

Les contrôles avec marquage simple sont utilisés pour vérifier les paramètres de compensation de fluorescence et pour encadrer la région positive pour le double marquage située dans le quadrant supérieur droit (**Fig 11**). Les PMPs sont définies comme étant une population doublement positive pour la phosphatidylsérine (Annexin V +) et le CD41 (Gp IIb-IIIa) (**Fig 11**).



**Figure 11 : Double marquage Anti-CD41-FITC et Annexin V-PE des MPs.** On remarque la présence d'une population entourée en rouge bien individualisée dans le quadrant supérieur droit. Cette population est doublement positive pour le CD41 et l'annexin V et correspond aux PMPs.

Le PFP d'un témoin sain sert de référent tout le long de l'analyse et est testé dans les mêmes conditions que les échantillons à tester en début et en fin de chaque analyse par CMF pour s'assurer qu'il n'y a pas de dérive au cours d'une même acquisition et dans le temps.

## 4. Caractérisation des MPs

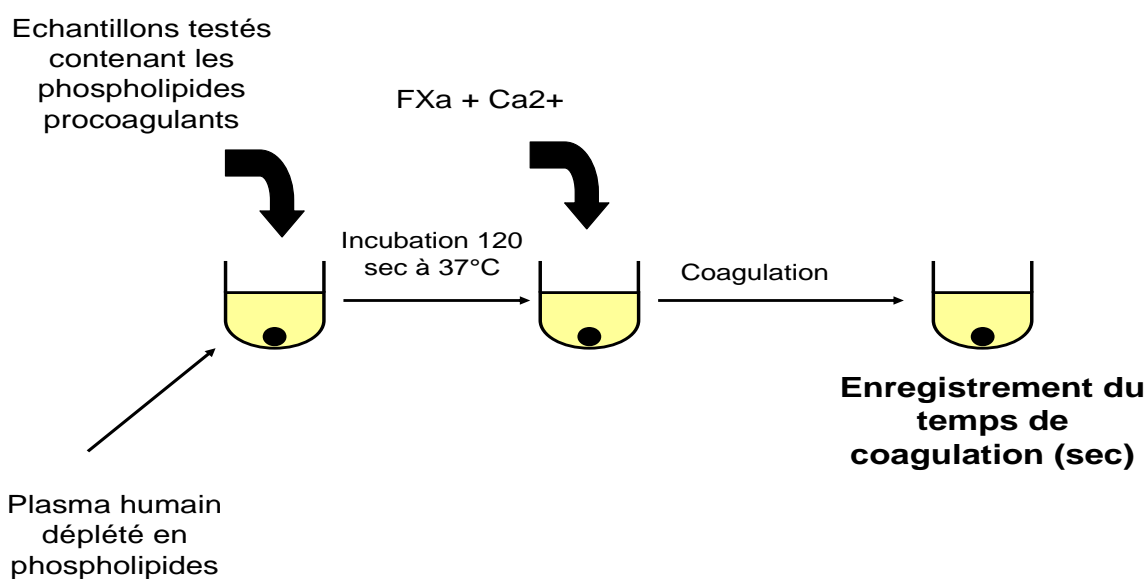
### A. En fonction des protéines de surface

Pour déterminer l'origine des MPs, différents anticorps dirigés contre les marqueurs de surface spécifique d'un type cellulaire ont été utilisés. Il s'agit essentiellement de l'anti-CD41a dirigé contre le CD41a (gpIIbIIIa) retrouvé sur les PMPs, de l'anti-CD138 (syndécan-1) permettant d'isoler les MPs d'origine plasmocytaire dans les gammopathies monoclonales.

### B. Activités fonctionnelles pro-coagulantes des MPs

Le PFP utilisé pour la numération des MPs a été utilisé en parallèle pour un test de coagulation dépendant de l'activité phospholipidique pro-coagulante (STA®-Procoag-PPL, Diagnostica Stago, Asnières sur Seine, France), afin d'établir une corrélation entre la numération des MPs et leur activité fonctionnelle pro-coagulante.

La formation du caillot de fibrine dans ce test dépend uniquement des phospholipides pro-coagulants c'est-à-dire en théorie uniquement des MPs fournies par le PFP du patient : plus le pouvoir pro-coagulant des MPs est élevé (qui est en partie fonction de leur taux), plus le temps de coagulation devrait être court (**Fig 12**).



**Figure 12 : Principe du test de coagulation (STA®-Procoag-PPL)**

Les échantillons de PFP des patients ont été testés sur un automate (Star®, Diagnostica Stago, Asnières sur Seine, France) sur lequel a été installé le test. Le fabricant préconise pour l'utilisation de ce test de coagulation une première centrifugation à 2500g pendant 15 min sur le sang total, suivie d'une deuxième identique sur le surnageant de la première. Des échantillons de PFP de témoins sains ont été testés pour déterminer le temps témoin et les fourchettes de référence. Ces échantillons ont été utilisés dans les mêmes conditions que les plasmas des patients à tester. La moyenne des temps de coagulation (temps témoin) sera utilisée pour le calcul des ratios.

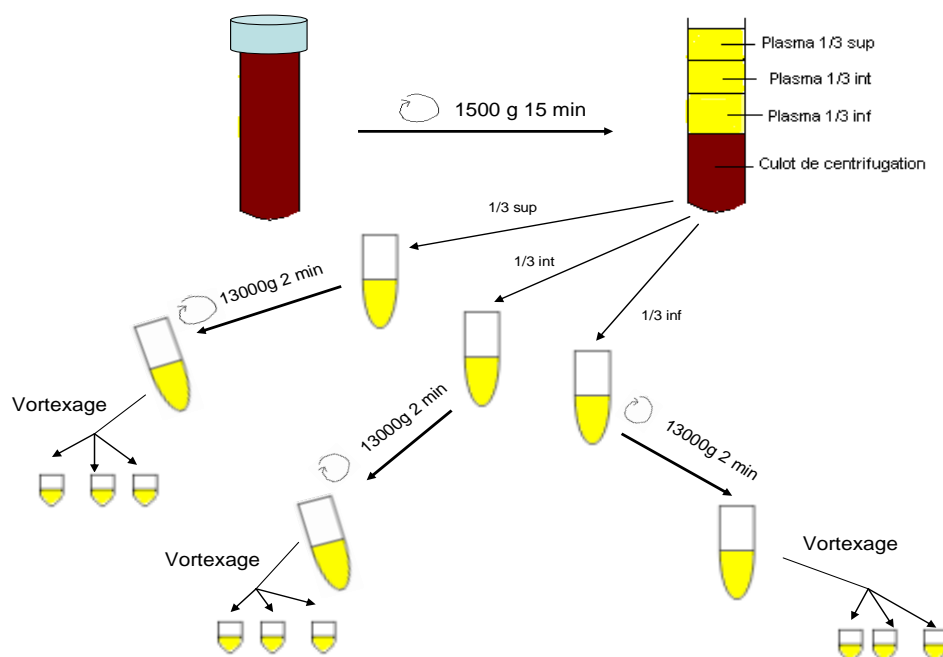
## **5. Evaluation de la mise au point des conditions pré-analytiques des échantillons de PFP**

### **A. Comparaison des vitesses de centrifugation**

Le protocole de centrifugation pour le test de coagulation est différent de celui utilisé pour la numération des MPs en CMF (1500g 15 min + 13000g 2 min). Il a donc été nécessaire de les comparer afin de savoir s'il y avait une différence entre les deux, de façon à n'utiliser qu'un seul protocole de centrifugation pour ces 2 tests.

### **B. Gradient de PPP**

Des mises au point des conditions pré-analytiques ont été réalisées notamment pour rechercher une différence de numération des PMPs en fonction de la hauteur du plasma centrifugé (Fig 13).



**Figure 13 : Mesure des MPs dans un gradient de PPP.**

Les échantillons sanguins prélevés sur tubes citratés ont été centrifugés à 1500g pendant 15 minutes. Le PPP obtenu a été ensuite divisé et aliquoté en 3 parties : 1/3 supérieur, 1/3 moyen et 1/3 inférieur. Chacune a ensuite été à nouveau centrifugée à 13000g pendant 2 minutes. La mesure des MPs a été réalisée dans le surnageant de chacune de ces fractions.

## 6. Applications médicales

### A. Témoins

Le sang de témoins sains n'ayant consommé aucun médicament interférant avec les plaquettes, a été collecté afin d'obtenir du PFP préparé de la façon décrite précédemment soit une double centrifugation (1500g 15 min + 13000g 2 min) réalisée moins de 4 heures après la ponction veineuse. Un double marquage anti-CD41-FITC et Annexin V-PE a été effectué pour isoler les PMPs et les compter en CMF. De la même façon, a été réalisée chez un témoin sain, une numération des MPs d'origine plasmocytaire en utilisant un anti-CD138-FITC et l'annexin V-PE pour leur marquage.

### B. Cancer : gammopathie monoclonale

Les patients présentaient soit une gammopathie monoclonale bénigne soit une gammopathie maligne de type myélome ou leucémie à plasmocytes. De la même façon que pour les témoins, le PFP de ces patients a été préparé. Cependant l'anti-CD138-FITC a été ajouté pour

caractériser les MPs d'origine plasmocytaire. Par ailleurs, une partie du PFP a servi pour le test de coagulation dépendant des phospholipides afin de rechercher une corrélation entre les deux techniques.

### **C. Médicaments pro-coagulants : test au DDAVP**

Le sang de patients effectuant un test DDAVP a été récupéré à différents temps après l'injection de DDAVP ( $t_0$ ,  $t_{30 \text{ min}}$  ou  $t_0$ ,  $t_{1h}$ ,  $t_{2h}$ ,  $t_{4h}$ ). Les PMPs ont été marquées puis comptées en CMF et leur activité pro-coagulante mesurée par le test STA®-Procoag-PPL.

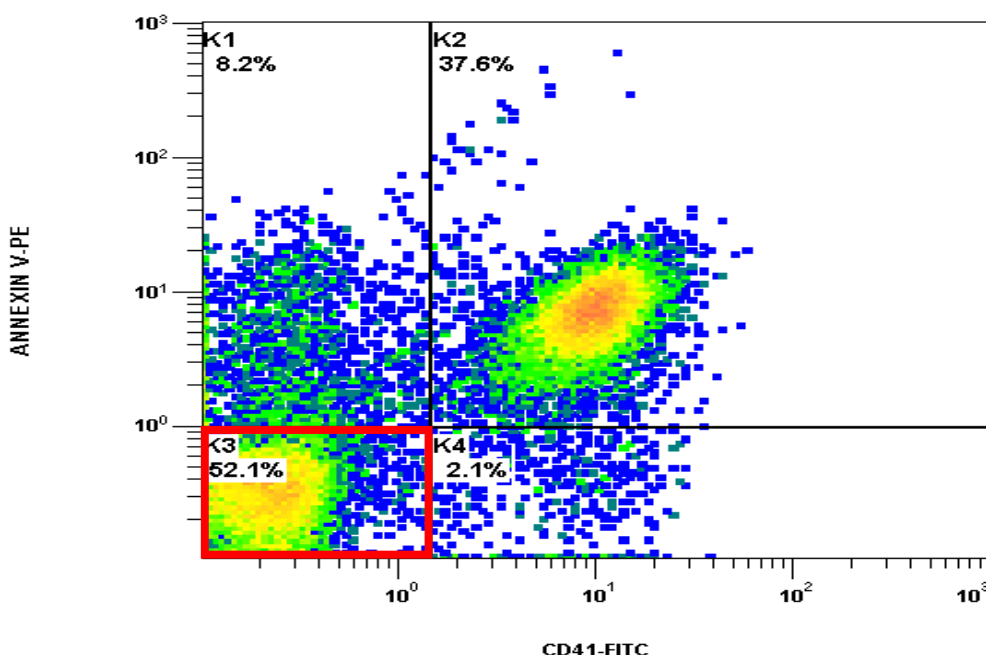
## **V. Résultats**

### **1. Evaluation de la mise au point des conditions d'analyse**



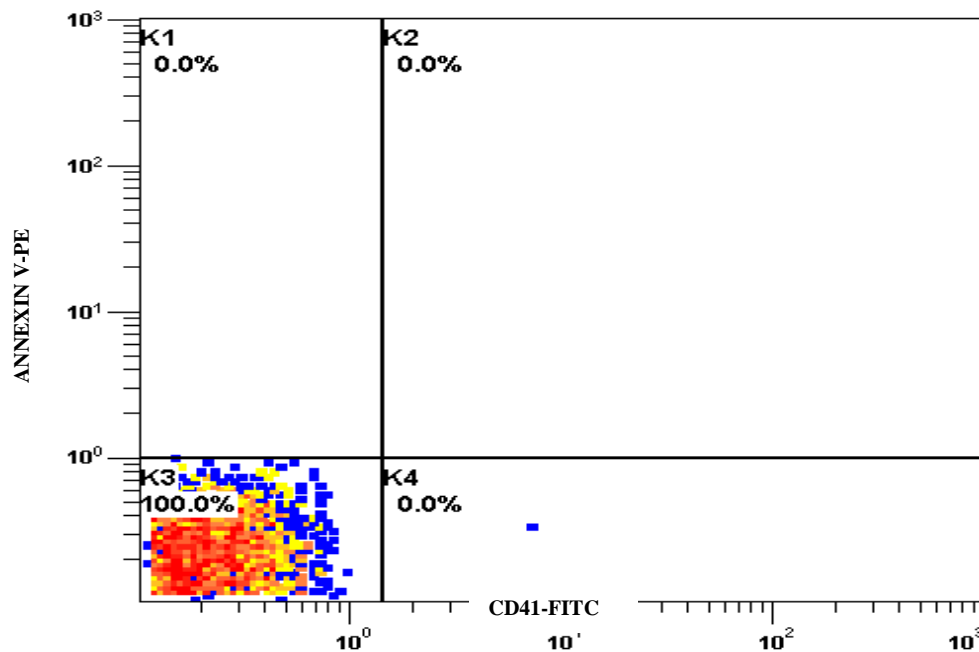
Le cytomètre de flux utilisé pour l'analyse des MPs est un cytomètre FC500 « Cytomics FC 500 » (Beckman Coulter®, Villepinte, France). Les réglages des paramètres sont ceux décrits dans le protocole de standardisation obtenu par Robert S. et al.<sup>127</sup> en 2008. Néanmoins, certaines modifications ont été apportées notamment dans le volume et le type d'anticorps utilisé pour le marquage des MPs.

On a voulu savoir dans un premier temps si on pouvait tenir compte du quadrant inférieur gauche qui correspond aux MPs non marquées (**Fig 14**) et par la même occasion s'assurer que les évènements détectés dans les trois autres quadrants étaient bien spécifiques des MPs.



**Figure 14 : Double marquage anti-CD41-FITC et annexin V-PE des MPs.** Le quadrant inférieur gauche entouré en rouge correspond aux MPs non marquées

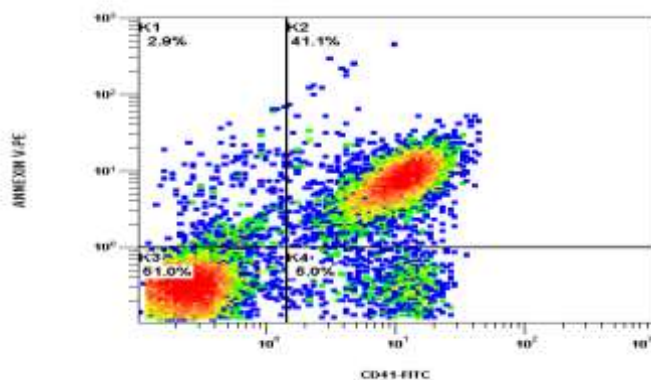
Pour cela une solution de PBS stérile a été analysée en CMF de la même façon que les échantillons de PFP en utilisant le protocole PMPs, c'est-à-dire en marquant la solution de PBS par un anticorps anti-CD41a et de l'annexin V. Sans surprise, aucun évènement n'a été détecté dans les quadrants supérieurs et celui inférieur droit. Cependant, le cytomètre dénombrait de très nombreux évènements dans le quadrant inférieur gauche (**Fig 15**).



**Figure 15 : Double marquage anti-CD41-FITC et annexin V-PE réalisé dans une solution de PBS.** Ce graphe montre de façon claire la présence exclusive d'évènements dans le quadrant inférieur gauche et aucun dans les autres quadrants.

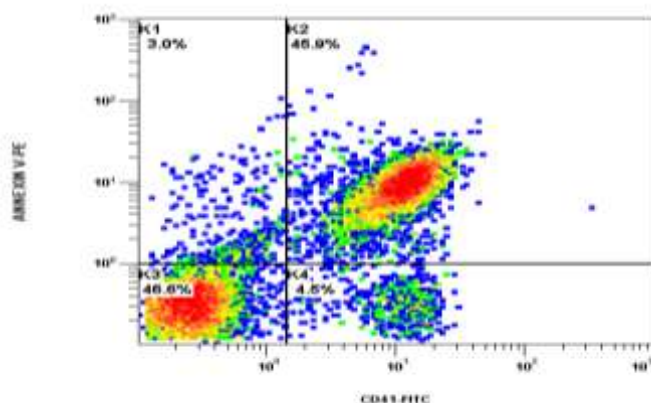
Ainsi, dans la suite des manipulations, cette zone du quadrant inférieur gauche sur les graphes n'a pas été prise en considération dans la numération des MPs car non exploitable bien qu'il est décrit dans la littérature une proportion non négligeable de MPs annexin V négatives potentiellement retrouvées dans cette zone.

Dans un deuxième temps, la répétabilité de la numération des PMPs par double marquage CD41a / Annexin-V a été évaluée sur le même échantillon de PFP. Les coefficients de variation (CV) obtenus sont inférieurs à 10% ( $CV = \text{Ecart-type} / \text{Moyenne}$ ) : la répétabilité est donc acceptable puisque le CV le plus élevé dans notre série correspondant aux MPs CD41+ AV+ est de 7.68% (**Fig 16**).



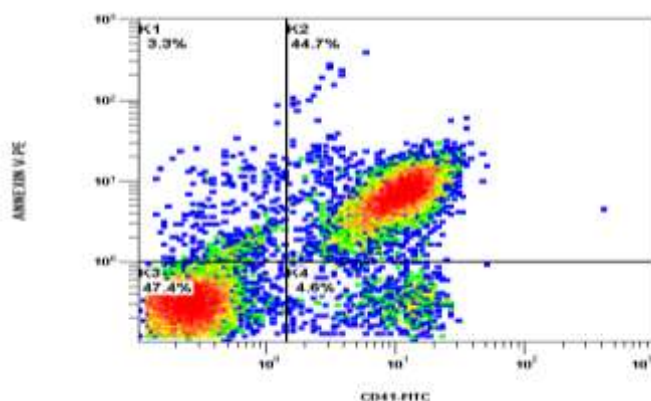
**Figure 16A**

Nombre de MPs CD41+ AV+ / microL de PFP : 3484  
 Nombre de MPs CD41+ AV- / microL de PFP : 428  
 Nombre de MPs CD41- AV+ / microL de PFP : 224  
 Nombre de MPs CD41+/ microL de PFP : 3912



**Figure 16B**

Nombre de MPs CD41+ AV+ / microL de PFP : 3413  
 Nombre de MPs CD41+ AV- / microL de PFP : 372  
 Nombre de MPs CD41- AV+ / microL de PFP : 222  
 Nombre de MPs CD41+/ microL de PFP : 3785



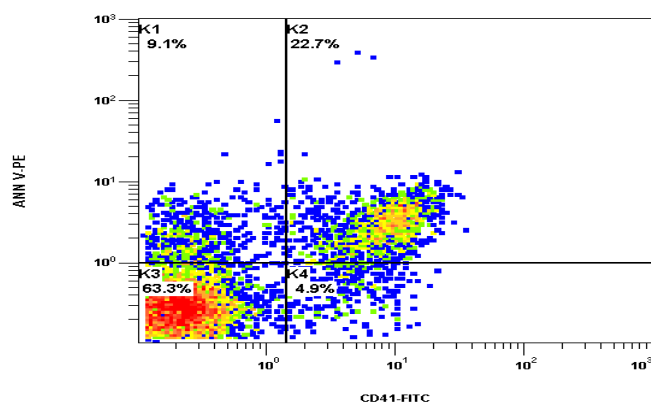
**Figure 16C**

Nombre de MPs CD41+ AV+ / microL de PFP : 3641  
 Nombre de MPs CD41+ AV- / microL de PFP : 381  
 Nombre de MPs CD41- AV+ / microL de PFP : 254  
 Nombre de MPs CD41+/ microL de PFP : 4022

**Figure 16 : Double marquage anti-CD41-FITC et annexin V-PE réalisé sur un échantillon de PFP.** L'échantillon de PFP a été passé trois fois de suite sur le cytomètre. (Fig16A ; 16 B ; 16C). La moyenne obtenue pour les MPs CD41+/ microL est de 3906 et l'écart-type de 119 ce qui donne un coefficient de variation (CV) évaluée à 3%. Le CV correspondant aux MPs CD41+ AV+ est de 3.35%, celui correspondant aux MPs CD41+ AV- de 7.64% et enfin celui calculé pour les MPs CD41- AV+ de 7.68%.

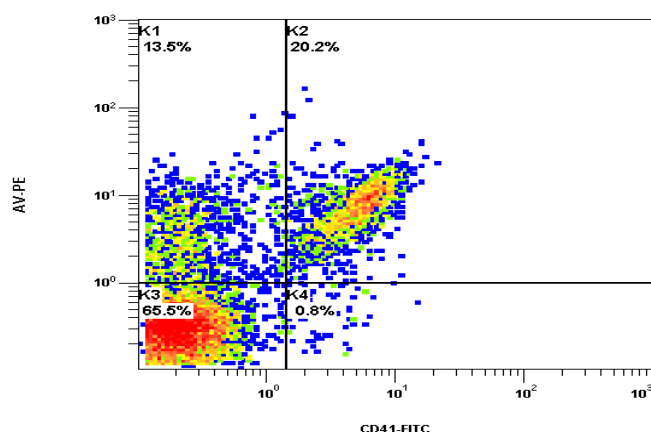
Enfin, le volume suffisant d'anticorps pour immunomarquage a été évalué. Le principe consistait à déterminer si 1 µL de la solution d'anticorps anti-CD41 suffisait pour l'analyse au lieu des 10 µL préconisés dans le protocole recommandé par le fabricant. Pour cela, les PMPs d'un PFP de témoin sain référent ont été doublement marquées par 10 µL d'anticorps anti-CD41-FITC et 5 µL d'annexinV-PE puis comptées suivant le protocole décrit ci-dessus. La

même procédure expérimentale a été effectuée sur le même PFP avec respectivement 5  $\mu$ L et 1  $\mu$ L d'anti-CD41-FITC avec un volume constant d'annexin V à 5 $\mu$ L. Les résultats obtenus ont ensuite été comparés (**Fig 17**).



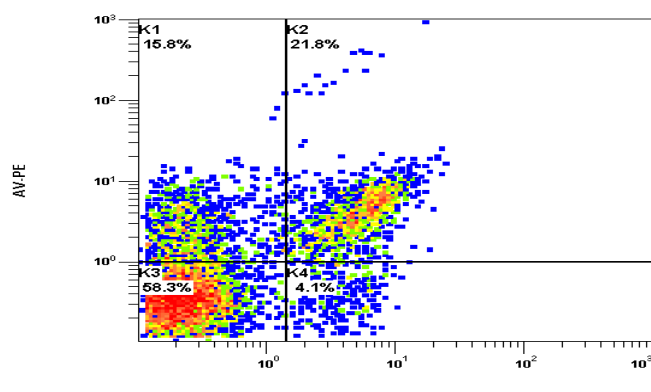
**Figure 17A – 10 $\mu$ L d'Anti-CD41 FITC**

Nombre de MPs CD41+ AV+ / microL de PFP : 1940  
 Nombre de MPs CD41+ AV- / microL de PFP : 520  
 Nombre de MPs CD41- AV+ / microL de PFP : 976  
 Nombre de MPs CD41+/ microL de PFP : 2460



**Figure 17B – 2 $\mu$ L d'Anti-CD41 FITC**

Nombre de MPs CD41+ AV+ / microL de PFP : 1995  
 Nombre de MPs CD41+ AV- / microL de PFP : 535  
 Nombre de MPs CD41- AV+ / microL de PFP : 880  
 Nombre de MPs CD41+/ microL de PFP : 2530



**Figure 17C – 1 $\mu$ L d'Anti-CD41 FITC**

Nombre de MPs CD41+ AV+ / microL de PFP : 2112  
 Nombre de MPs CD41+ AV- / microL de PFP : 472  
 Nombre de MPs CD41- AV+ / microL de PFP : 963  
 Nombre de MPs CD41+/ microL de PFP : 2584

**Figure 17 : PFP d'un témoin sain référent doublement marqué par un anti CD41-FITC et de l'annexinV-PE.** (Fig 17A : 10  $\mu$ L d'anti CD41-FITC ; 17B : 2  $\mu$ L d'anti CD41-FITC ; 17C : 1  $\mu$ L d'anti CD41-FITC). Le CV pour les MPs CD41+ est de 2.46%, celui correspondant au MPs CD41+ AV+ de 4.36%, celui correspondant aux MPs CD41+ AV- de 6.47% et enfin celui obtenu pour les MPs CD41- AV+ de 5.54%.

Les numérations obtenues ont été similaires concernant les PMPs, les MPs CD41+ AV-, les MPs CD41+ AV+ et les MPs CD41- AV+ avec 10, 2 et 1  $\mu$ L d'anticorps anti CD41-FITC. En effet, les CV calculés ont été retrouvés inférieurs à 10%. Le volume de 1 $\mu$ L d'anticorps anti-CD41 FITC peut donc être utilisé.

## 2. Evaluation de la mise au point des conditions pré-analytiques des échantillons de PFP

### A. Comparaison des vitesses de centrifugation

Comme indiqué ci-dessus, le protocole de centrifugation de Robert S. et al.<sup>127</sup> correspondant à une double centrifugation (1500g 15 min + 13000g 2 min) utilisé pour la numération des MPs en CMF est différent de celui préconisé pour le test de coagulation (STA®-Procoag-PPL ; centrifugation 2500g 15 min x2). La comparaison de la numération des MPs par ces 2 protocoles a été réalisée (**Fig. 18**).

	Protocole de centrifugation 2500g 15 min x2   1500g 15 min + 13000g 2 min	
Nombre de MPs CD41+ /microl. de PFP	283	286
Nombre de MPs CD41+ annexin V+ /microl. de PFP	106	140
Nombre de MPs CD41+ annexin V- /microl. de PFP	177	146
Nombre de MPs CD41- annexin V+ /microl. de PFP	654	660

	Protocole de centrifugation 2500g 15 min x2   1500g 15 min + 13000g 2 min	
Nombre de MPs CD41+ /microl. de PFP	181	193
Nombre de MPs CD41+ annexin V+ /microl. de PFP	160	149
Nombre de MPs CD41+ annexin V- /microl. de PFP	21	44
Nombre de MPs CD41- annexin V+ /microl. de PFP	374	406

	Protocole de centrifugation 2500g 15 min x2   1500g 15 min + 13000g 2 min	
Nombre de MPs CD41+ /microl. de PFP	263	459
Nombre de MPs CD41+ annexin V+ /microl. de PFP	188	349
Nombre de MPs CD41+ annexin V- /microl. de PFP	75	110
Nombre de MPs CD41- annexin V+ /microl. de PFP	393	601

	Protocole de centrifugation 2500g 15 min x2   1500g 15 min + 13000g 2 min	
Nombre de MPs CD41+ /microl. de PFP	259	359
Nombre de MPs CD41+ annexin V+ /microl. de PFP	218	244
Nombre de MPs CD41+ annexin V- /microl. de PFP	41	115
Nombre de MPs CD41- annexin V+ /microl. de PFP	261	496

	Protocole de centrifugation 2500g 15 min x2   1500g 15 min + 13000g 2 min	
Nombre de MPs CD41+ /microl. de PFP	3563	2837
Nombre de MPs CD41+ annexin V+ /microl. de PFP	3212	2692
Nombre de MPs CD41+ annexin V- /microl. de PFP	351	345
Nombre de MPs CD41- annexin V+ /microl. de PFP	1325	564

	Protocole de centrifugation 2500g 15 min x2   1500g 15 min + 13000g 2 min	
Nombre de MPs CD41+ /microl. de PFP	95	103
Nombre de MPs CD41+ annexin V+ /microl. de PFP	92	95
Nombre de MPs CD41+ annexin V- /microl. de PFP	3	10
Nombre de MPs CD41- annexin V+ /microl. de PFP	148	152

	Protocole de centrifugation 2500g 15 min x2   1500g 15 min + 13000g 2 min	
Nombre de MPs CD41+ /microl. de PFP	371	411
Nombre de MPs CD41+ annexin V+ /microl. de PFP	727	343
Nombre de MPs CD41+ annexin V- /microl. de PFP	144	68
Nombre de MPs CD41- annexin V+ /microl. de PFP	532	391

	Protocole de centrifugation 2500g 15 min x2   1500g 15 min + 13000g 2 min	
Nombre de MPs CD41+ /microl. de PFP	249	196
Nombre de MPs CD41+ annexin V+ /microl. de PFP	184	98
Nombre de MPs CD41+ annexin V- /microl. de PFP	65	98
Nombre de MPs CD41- annexin V+ /microl. de PFP	505	427

	Protocole de centrifugation 2500g 15 min x2   1500g 15 min + 13000g 2 min	
Nombre de MPs CD41+ /microl. de PFP	220	348
Nombre de MPs CD41+ annexin V+ /microl. de PFP	166	238
Nombre de MPs CD41+ annexin V- /microl. de PFP	54	110
Nombre de MPs CD41- annexin V+ /microl. de PFP	424	312

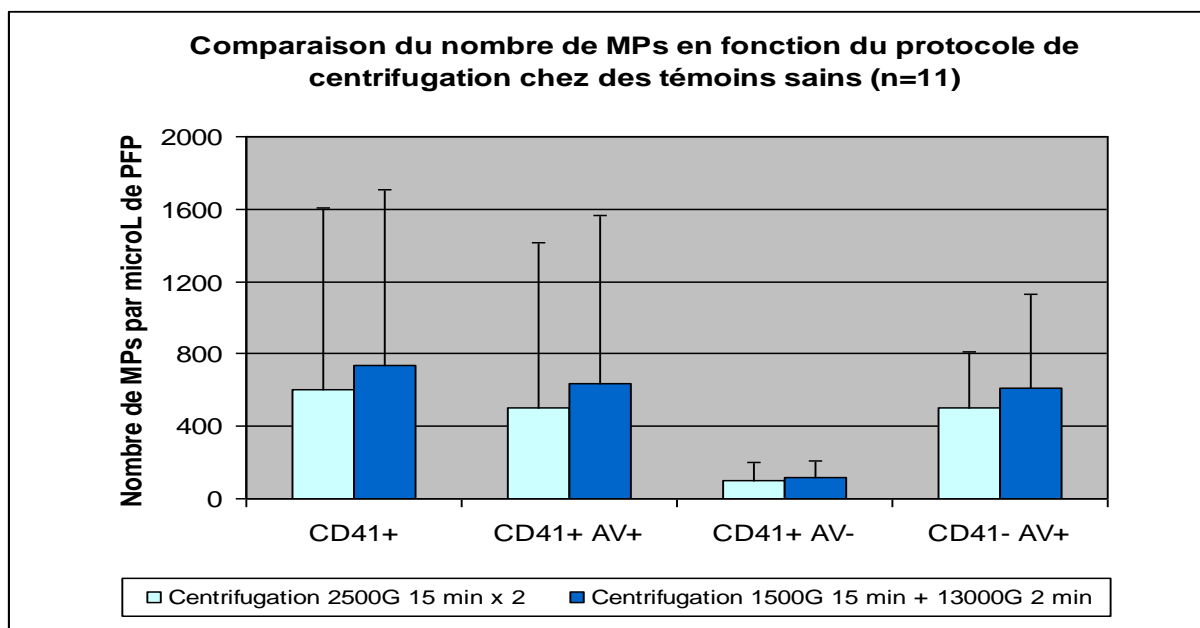
	Protocole de centrifugation 2500g 15 min x2   1500g 15 min + 13000g 2 min	
Nombre de MPs CD41+ /microl. de PFP	428	333
Nombre de MPs CD41+ annexin V+ /microl. de PFP	301	269
Nombre de MPs CD41+ annexin V- /microl. de PFP	120	76
Nombre de MPs CD41- annexin V+ /microl. de PFP	446	438

	Protocole de centrifugation 2500g 15 min x2   1500g 15 min + 13000g 2 min	
Nombre de MPs CD41+ /microl. de PFP	193	538
Nombre de MPs CD41+ annexin V+ /microl. de PFP	172	520
Nombre de MPs CD41+ annexin V- /microl. de PFP	23	30
Nombre de MPs CD41- annexin V+ /microl. de PFP	228	500

**Figure 18 : Comparaison de la numération des MPs entre le protocole de centrifugation de Robert S. et al.<sup>127</sup> (1500g 15 min+ 13000g 2 min) et celui préconisé pour le test de coagulation (STA®-Procoag-PPL ; centrifugation 2500g 15 min x2). La comparaison est réalisée sur 11 témoins sains.**

L'objectif était de n'utiliser qu'un seul protocole de centrifugation pour déterminer à la fois la numération / caractérisation immunophénotypique des MPs et la mesure du test de coagulation dépendant des phospholipides sur l'automate Star® (**Fig. 19**).

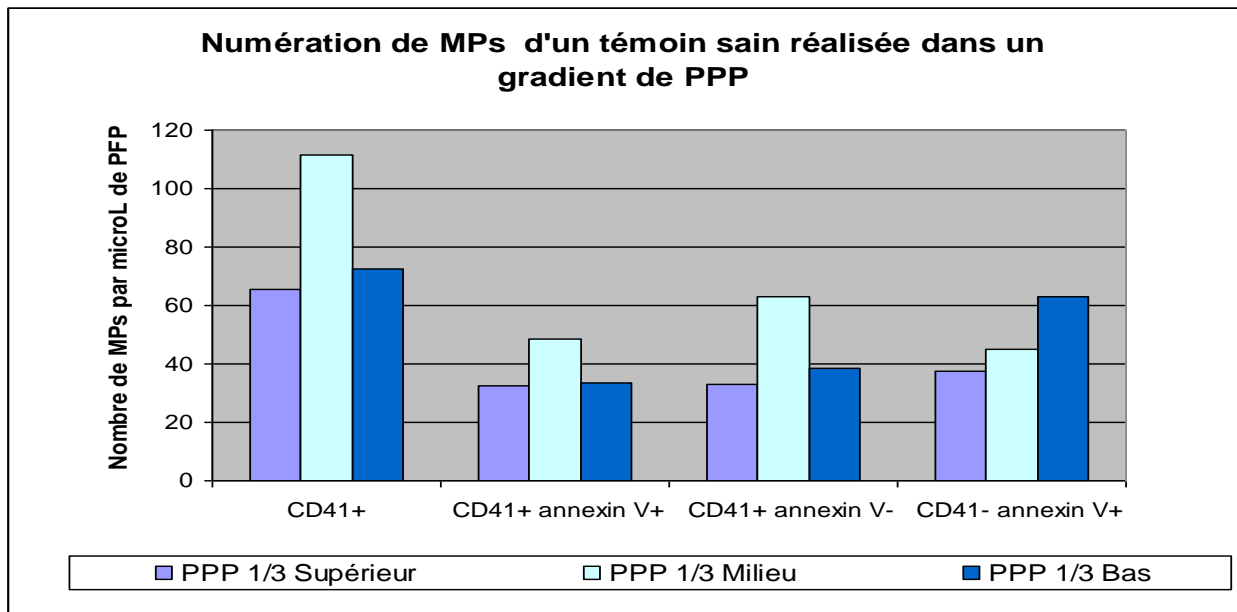


**Figure 19 : Numération des MPs sur le PFP de 11 témoins sains en utilisant deux protocoles de centrifugation (2500g pendant 15 min 2 fois de suite et 1500g pendant 15 min puis 13000g pendant 2 min)** Les MPs comptées ont été les suivantes : MPs CD41+, MPs CD41+ annexin V+, MPs CD41+ annexin V- , MPs CD41- annexin V+. La moyenne pour les MPs CD 41+ obtenue entre les deux protocoles de centrifugation est de 577 MPs / microL, l'écart-type de 33.4 et le CV de 5.8%. Les autres CV sont de 5.13% pour les MPs CD41+ AV+, 4.96% pour les MPs CD41+ AV- et 4.51% pour les MPs CD41- AV+.

D'après les calculs des CV (< 10%), la numération des MPs est similaire que l'on utilise l'un ou l'autre des protocoles de centrifugation. Ainsi, le test de coagulation STA®-Procoag-PPL sera réalisé sur des échantillons de PFP préparés selon la méthode décrite par Robert S. et al.<sup>127</sup> (1500g pendant 15 min puis 13000g pendant 2 min) et non pas de la façon préconisée par le fabricant.

## B. Gradient de PPP

Un échantillon sanguin d'un témoin sain prélevé sur tube citraté a été centrifugé à 1500g pendant 15 minutes. Le PPP obtenu a été ensuite divisé et aliquoté en 3 parties : 1/3 supérieur, 1/3 moyen et 1/3 inférieur. Chacune a ensuite été séparée et à nouveau centrifugée à 13000g pendant 2 minutes. La mesure des MPs a été réalisée dans le surnageant obtenu après cette 2<sup>ème</sup> centrifugation (**cf Fig. 13, page 31**). Les mesures ont été effectuées 3 fois sur chaque fraction isolée (**Fig. 20**).

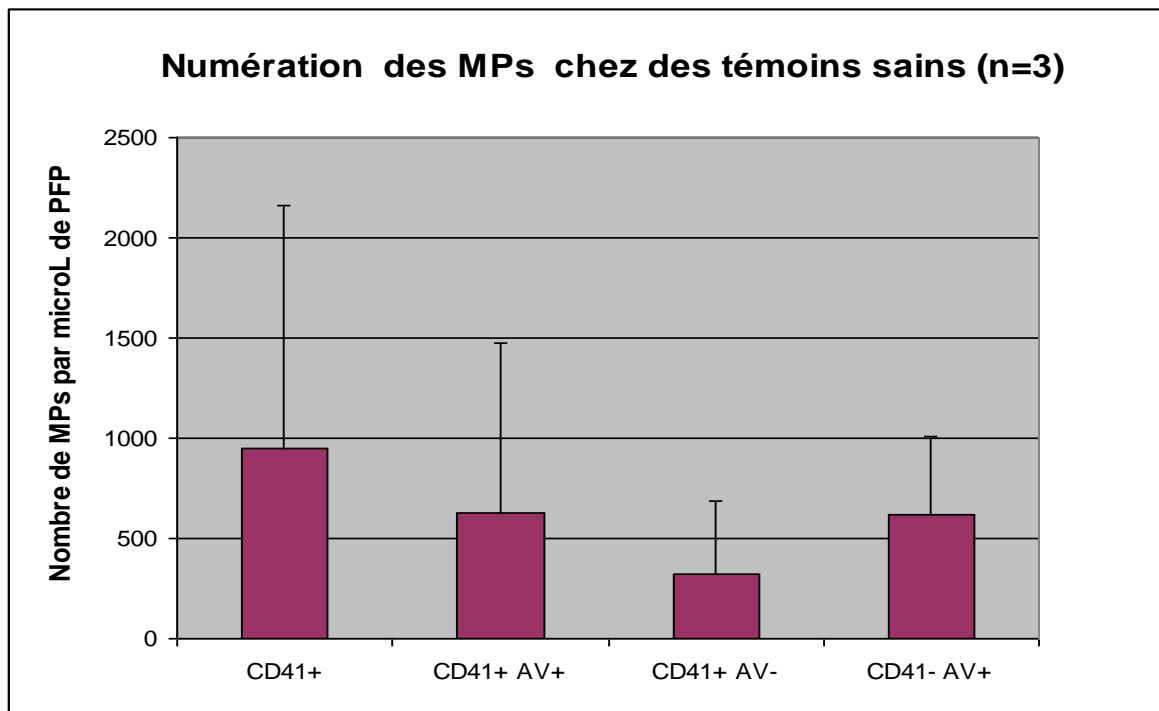


**Figure 20 : Numération des MPs sur le PFP d'un témoin sain.** Les PPP obtenus après la première centrifugation ont été divisés et aliquotés en 3 parties (1/3 supérieur ; 1/3 milieu ; 1/3 inférieur). Chaque mesure a été réalisée trois fois. Les CV obtenus sont nettement supérieurs à 10% (30% pour les MPs CD41+, 23.8% pour les MPs CD41+ AV+, 35.5 pour celles CD41+ AV- et enfin 26.8% pour les MPs CD41- AV+)

### 3. Applications médicales

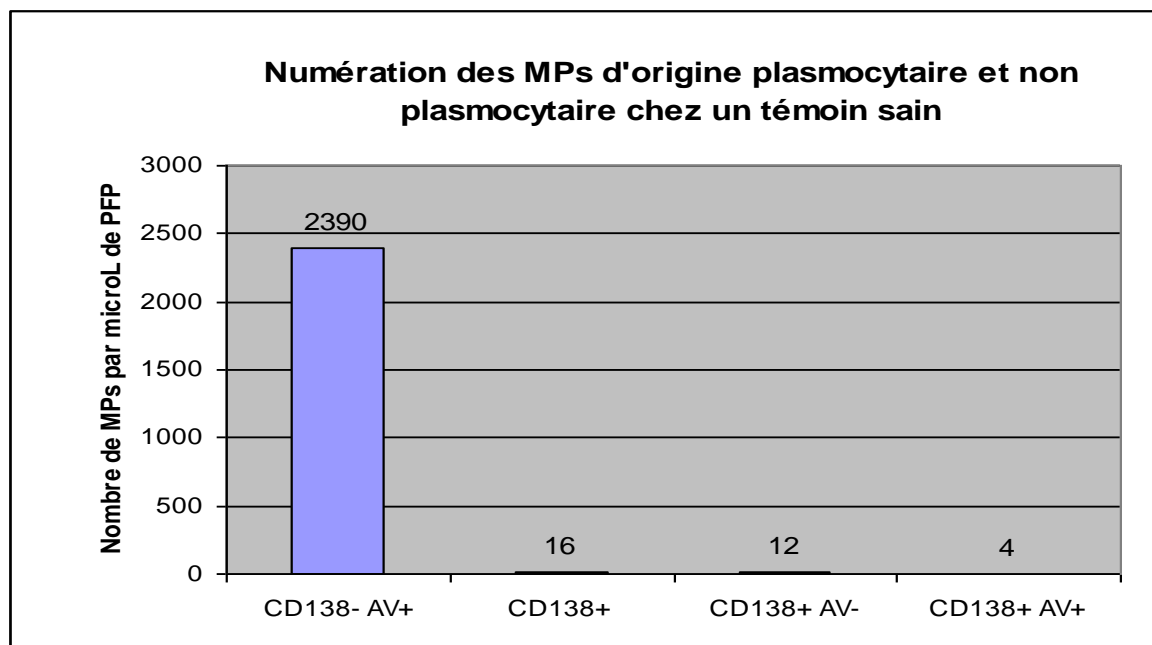
#### A. Témoins

Trois témoins sains ont été prélevés et leur sang recueilli sur tube citraté. Une première centrifugation à 1500g pendant 15 min a été réalisée suivie d'une deuxième centrifugation du surnageant à 13000g pendant 2 min. Les MPs ont ensuite été doublement marquées par un anticorps anti-CD41-FITC et de l'annexin V-PE, de façon à caractériser et compter les PMPs chez ces sujets sains (**Fig. 21**).



**Figure 21 : Numération des MPs sur le PFP de 3 témoins sains.** On remarque sur le graphe, un écart-type très important dû à une hétérogénéité dans la numération des MPs chez ces témoins.

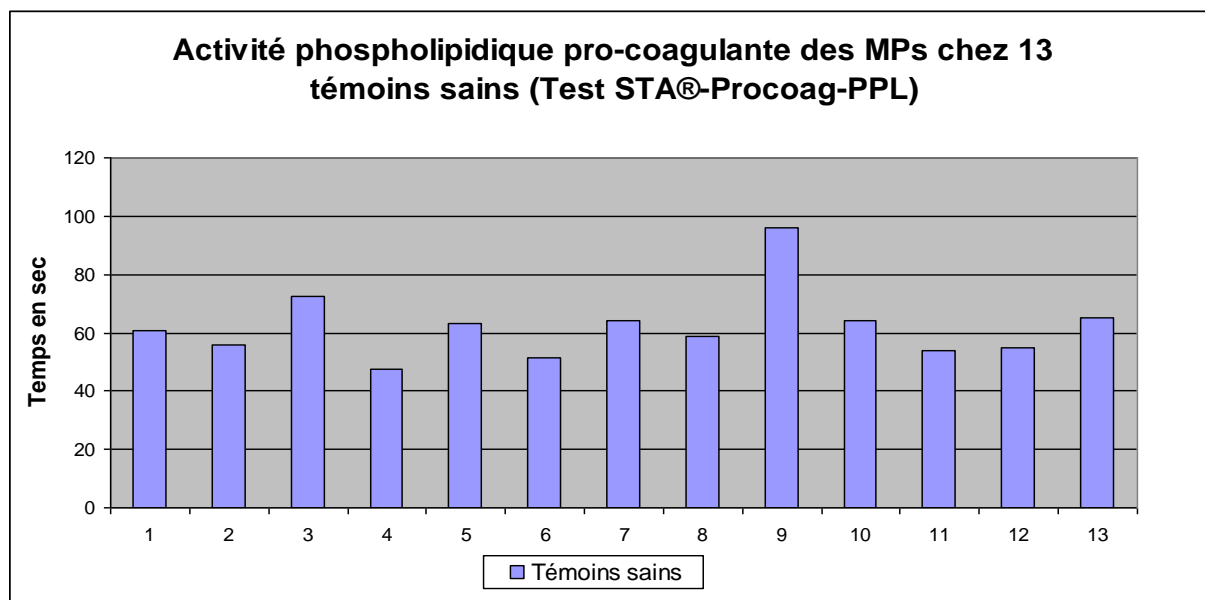
Par ailleurs, les MPs d'origine plasmocytaire d'un témoin sain ont été également comptées en les marquant par un anticorps anti-CD138-FITC et l'annexin V-PE (**Fig. 22**). Chez ce témoin, les MPs CD138+ AnnexinV+ représentaient 0,17% de l'ensemble des MPs AnnexinV+. De manière intéressante, la majorité des MPs CD138+ étaient AnnexinV- (75% ; 12/16) contrairement aux PMPs (environ 33.3% ; Fig.21) évoquant un mécanisme de formation non lié à l'apoptose ou à l'activation plasmocytaire.



**Figure 22 : Numération des MPs d'origine plasmocytaire et non plasmocytaire chez un témoin sain.** On remarque sur le graphe, la très faible quantité de MPs d'origine plasmocytaire.



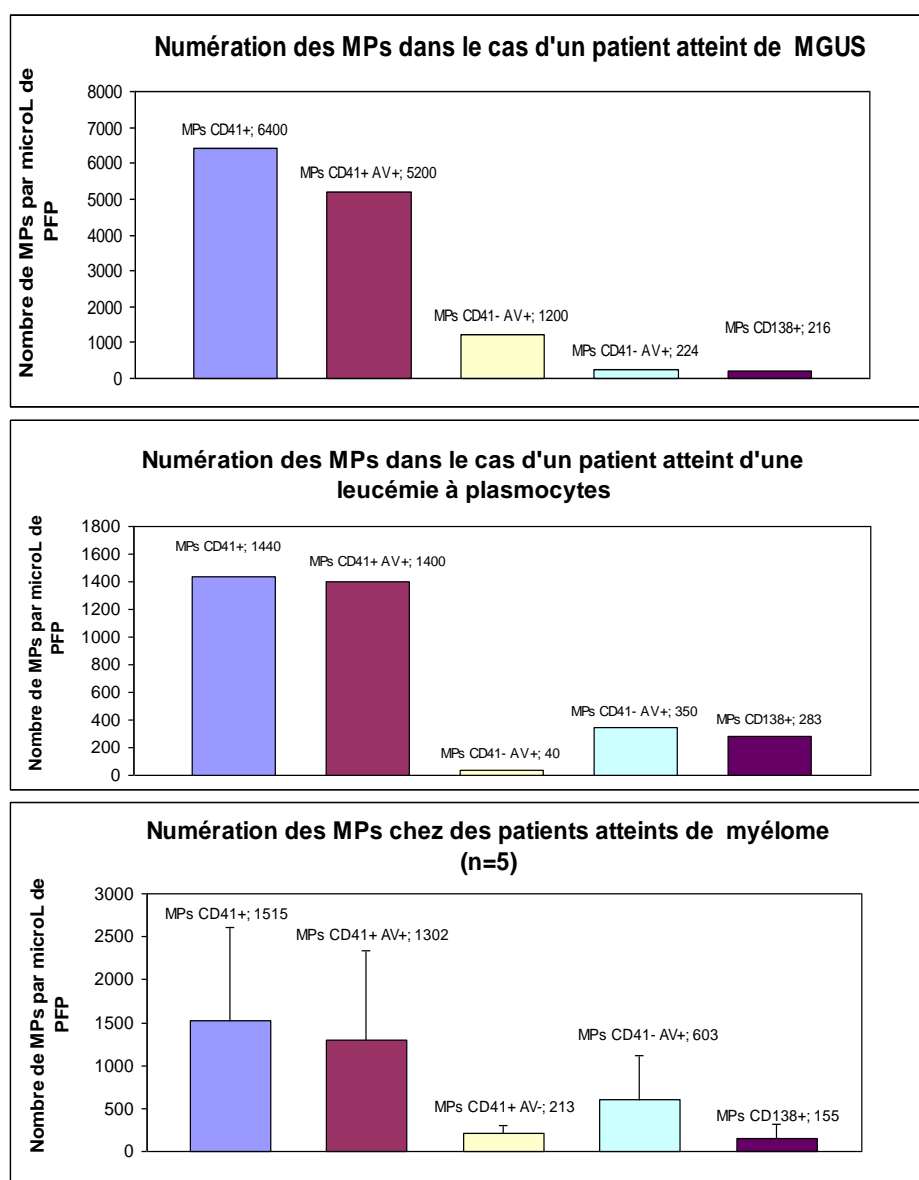
En outre, des échantillons de PFP de témoins sains préparés de façon identique aux plasmas des patients, ont été testés par ProPPL pour déterminer le temps témoin et les fourchettes référentes de normalité du test STA®-Procoag-PPL (**Fig. 23**). La moyenne des temps obtenus avec ces plasmas témoin nous a servi pour le calcul des ratios malade/témoin.



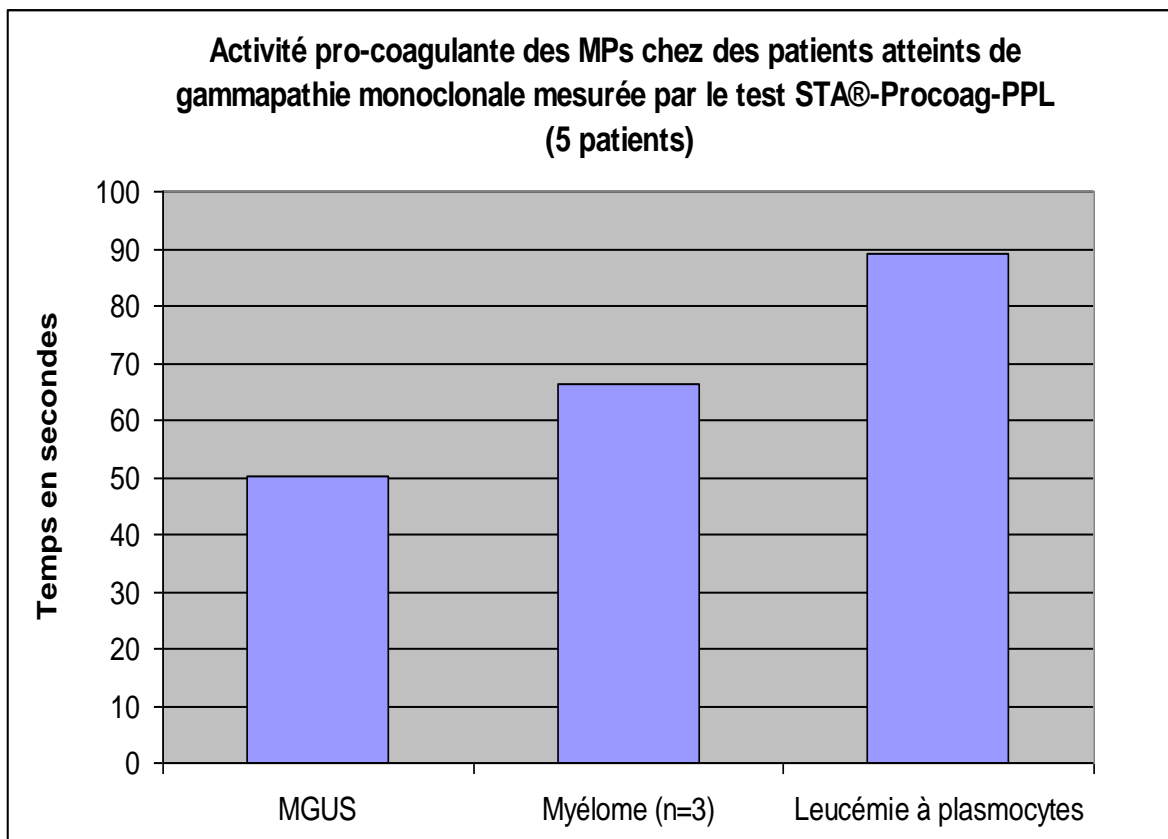
**Figure 23 : Activité phospholipidique pro-coagulante des MPs sur le PFP de 13 sujets sains.**

## B. Cancer : gammopathie monoclonale

Le PFP de patients atteints de gammopathie monoclonale (1 patient atteint de MGUS, 5 de myélome et 1 de leucémie à plasmocytes) a été préparé selon la méthode de Robert S. et al.<sup>127</sup>, soit une première centrifugation à 1500g pendant 15 min suivie d'une deuxième du surnageant à 13000g pendant 2 min. La numération et la caractérisation des PMPs et des MPs d'origine plasmocytaire ont été réalisés (**Fig. 24**). Leur activité pro-coagulante a aussi été mesurée par le test STA®-Procoag-PPL (**Fig. 25, page 43**). Ainsi, on a été amené à utiliser non seulement l'annexin V et un anticorps anti-CD41-FITC pour caractériser les PMPs, mais également un anticorps anti-CD138-FITC pour détecter les MPs d'origine plasmocytaire.



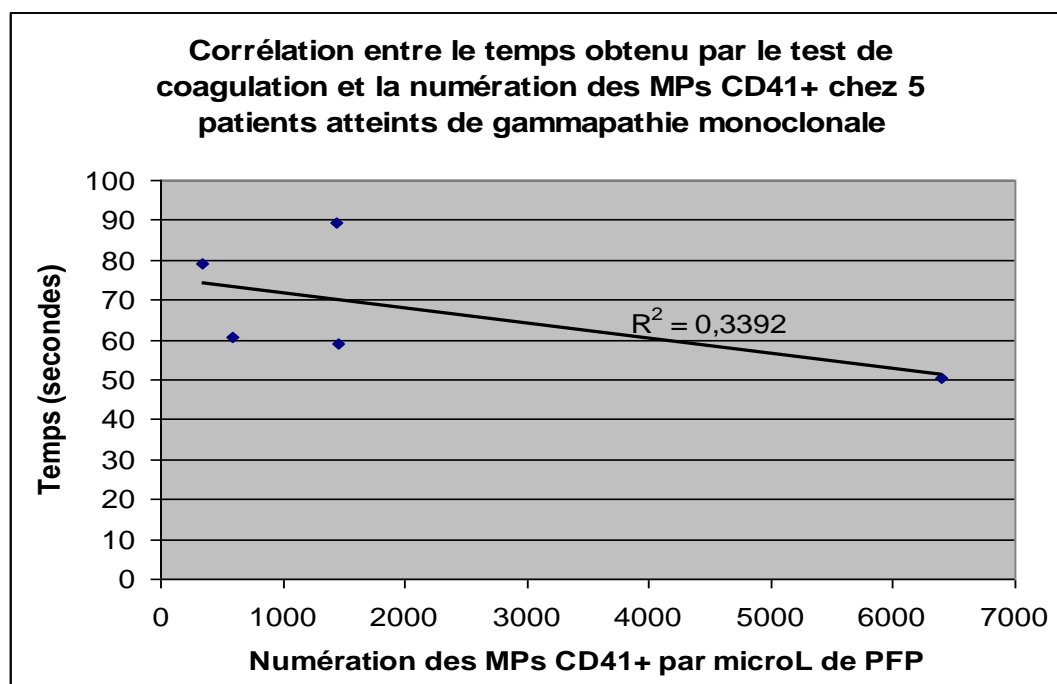
**Figure 24 : Numération des MPs chez des patients atteints de gammopathie monoclonale (5 atteints de myélome, 1 atteint d'une gammopathie monoclonale de signification indéterminée ou MGUS et un dernier atteint d'une leucémie à plasmocytes).** On remarque une différence significative entre la numération de MPs CD138+ chez un témoin sain et celle que l'on obtient dans le cas des gammopathies monoclonales (bien plus élevée). A noter une valeur élevée des MPs CD138+ chez le patient atteint de MGUS (autres causes d'augmentation ?)



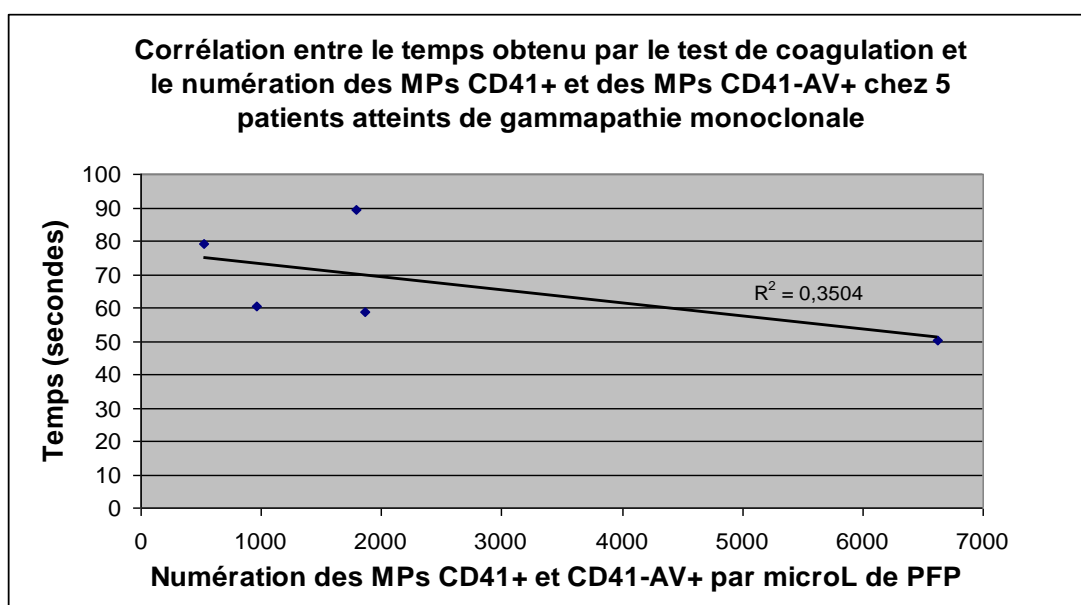
**Figure 25 : Activité phospholipidique pro-coagulante des MPs chez des patients atteints de gammopathie monoclonale (5 patients) mesurée par un test de coagulation (Test STA®-Procoag-PPL).** Dans notre étude, le temps de coagulation le plus court a été obtenu avec le patient atteint de MGUS et le plus long avec celui atteint d'une leucémie à plasmocytes. La moyenne des temps de coagulation chez ces 5 patients est de 67.6 secondes (soit plus élevée que celle obtenue avec les témoins sains) et l'écart-type de 16 secondes.

Concernant le patient présentant une MGUS, le temps obtenu lors du test de coagulation a été de 50.3 secondes, ce qui donne un ratio M/T de 0.81 (Ratio M/T = temps ProPPL patient/ temps ProPPL témoin). Pour les patients atteints de myélome, la valeur du ratio M/T était de 1.06 et celle concernant le patient atteint de leucémie à plasmocytes de 1.43.

Enfin, les taux des MPs et leur activité pro-coagulante ont été comparés (**Fig. 26 et 27**). De manière inattendue, aucune corrélation n'a été retrouvée quelque soit l'origine cellulaire des MPs, et quelque soit l'expression de surface des phospholipides anioniques.



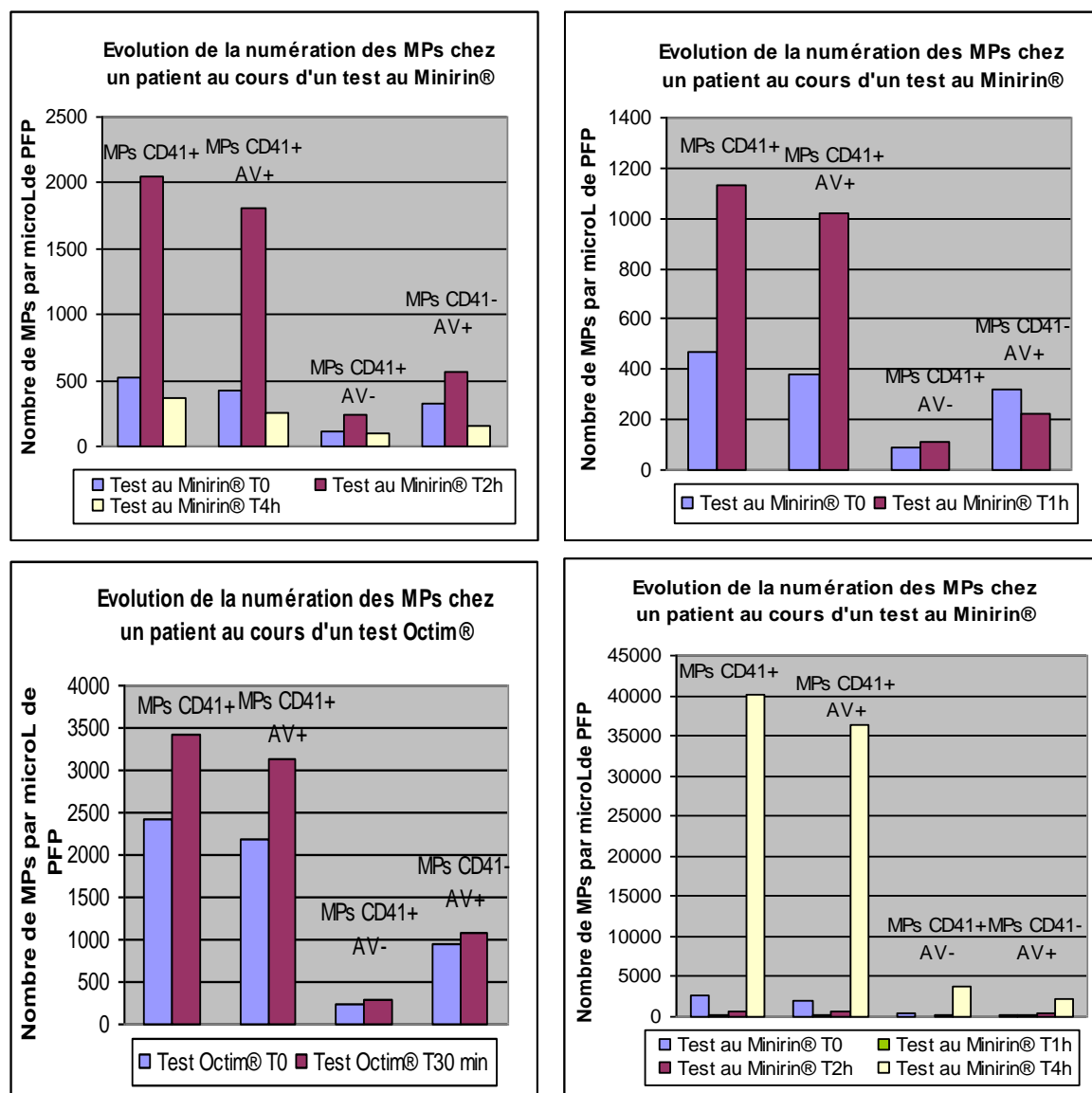
**Figure 26 : Etude de corrélation entre la numération des MPs CD41+ et leur activité phospholipidique pro-coagulante mesurée par le test de coagulation (Test STA®-Procoag-PPL) chez 5 patients atteints de gammopathie monoclonale.** Le coefficient de corrélation de 0.3392 signifie qu'il n'y a pas de corrélation entre ces deux paramètres.



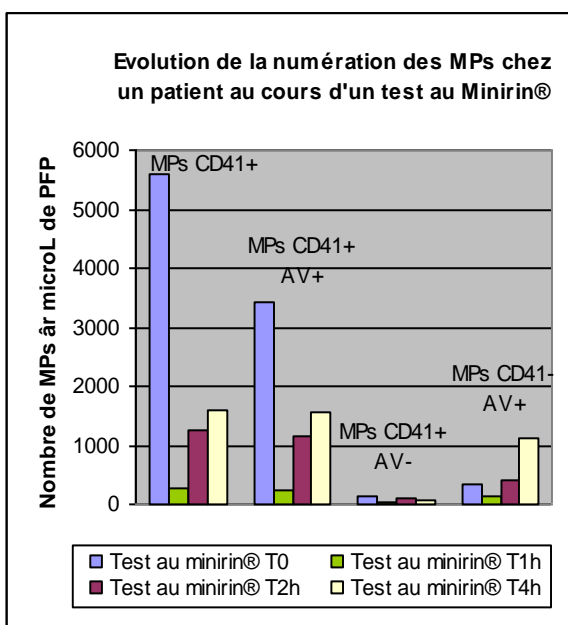
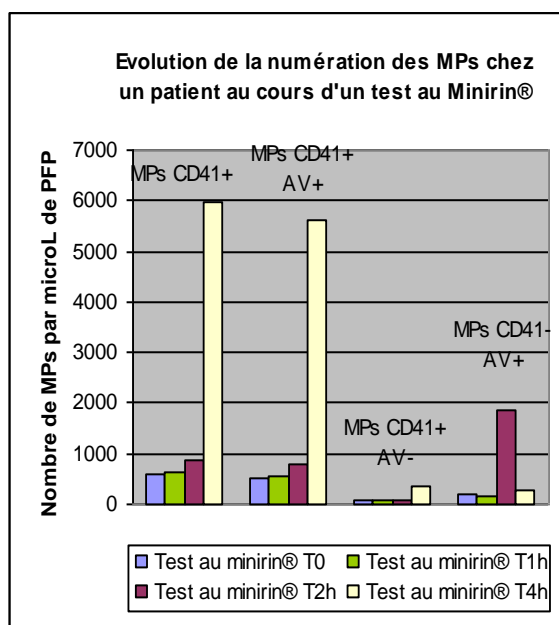
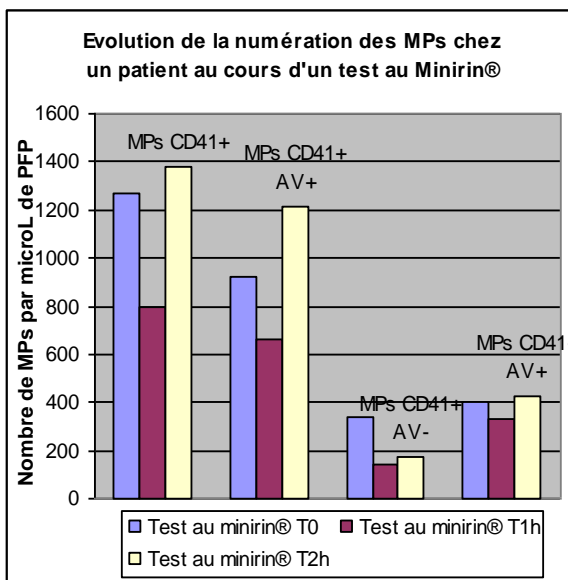
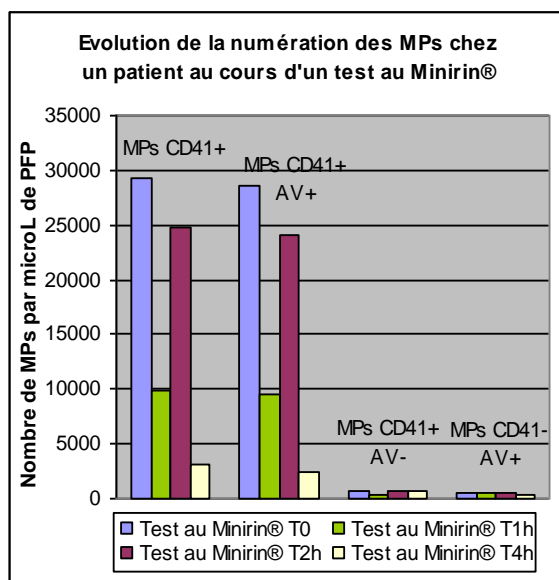
**Figure 27 : Etude de corrélation entre la numération des MPs CD41+ et CD41-AV+ et leur activité phospholipidique pro-coagulante mesurée par le test de coagulation (Test STA®-Procoag-PPL) chez les mêmes patients que le graphe ci-dessus.** Le coefficient de corrélation de 0.3504 signifie qu'il n'y a pas de corrélation entre ces deux paramètres.

### C. Médicaments pro-coagulants : test au DDAVP

Le sang de patients effectuant un test au DDAVP a été collecté, et le PFP préparé de la manière indiquée précédemment. Le sang a été prélevé à différents temps après l'injection de DDAVP ( $t_0$ ,  $t_{30 \text{ min}}$  ou  $t_0$ ,  $t_{1h}$ ,  $t_{2h}$ ,  $t_{4h}$ ). De façon identique à ce qui a été réalisé pour les gammopathies monoclonales, les MPs ont été doublement marquées avec un anticorps anti-CD41-FITC et de l'annexin V puis comptées en CMF (Fig. 27). Leur activité pro-coagulante a été mesurée par le test STA®-Procoag-PPL (Fig. 28, page 47). Une corrélation a ensuite été recherchée entre ces deux techniques (Fig. 29 et 30, pages 47 et 48).

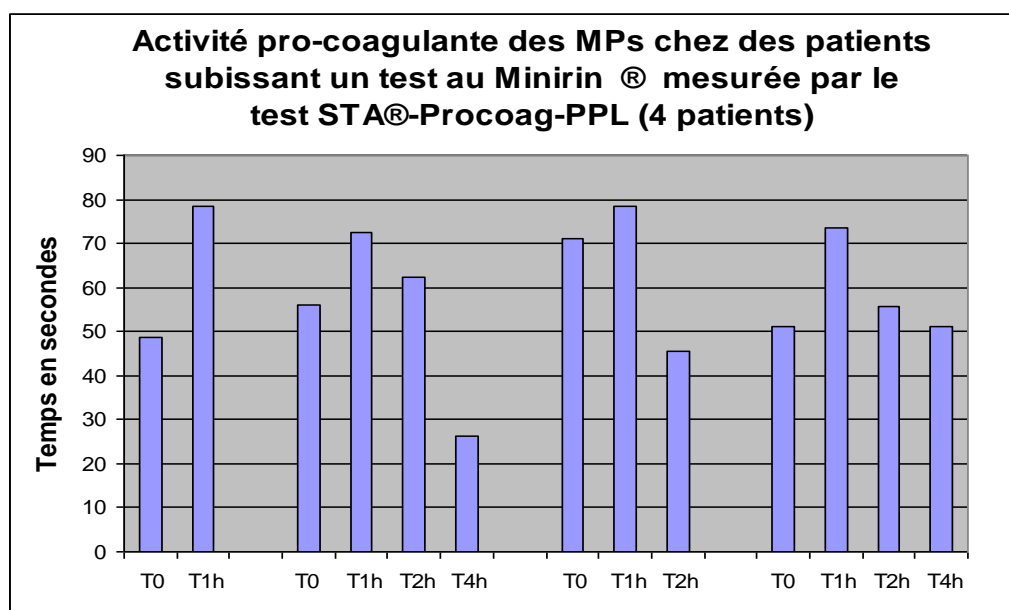


**Figure 27 : Evolution de la numération des MPs au cours d'un test au Minirin® chez 7 patients et au cours d'un test à l'Octim® chez un patient.**

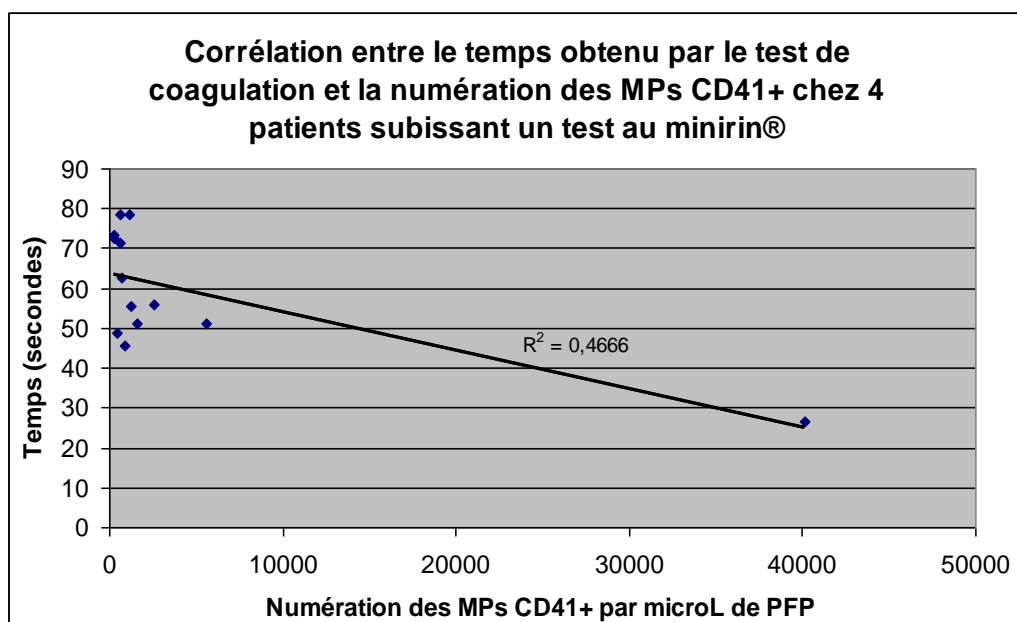


**Figure 27 (suite) : Evolution de la numération des MPs au cours d'un test au Minirin® chez 7 patients et au cours d'un test à l'Octim® chez un patient.**

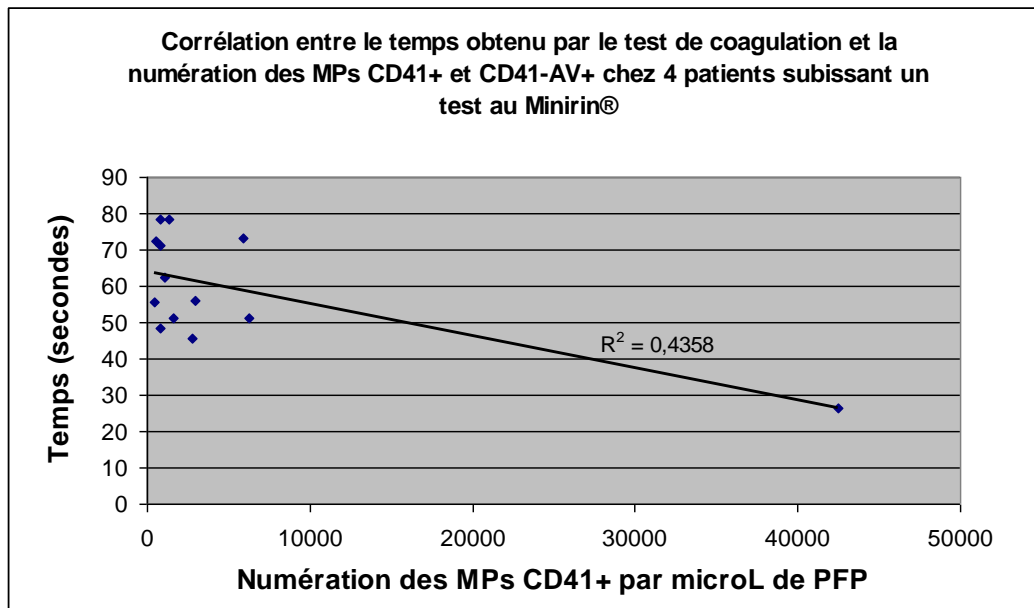
Dans tous ces cas, et comme chez le témoin sain, aucune corrélation n'a été retrouvée entre ces deux dosages quelque soit l'origine des MPs et leur expression de surface de phospholipides anioniques.



**Figure 28 : Activité phospholipidique pro-coagulante des MPs chez 4 patients effectuant un test au Minirin<sup>®</sup> mesurée par un test de coagulation (Test STA<sup>®</sup>-Procoag-PPL).** On constate une augmentation du temps de coagulation entre T0 et T1h soit une diminution de l'activité procoagulante puis une baisse ensuite après T1h c'est-à-dire une augmentation du pouvoir procoagulant.



**Figure 29 : Corrélation entre la numération des MPs CD41+ et leur activité phospholipidique pro-coagulante mesurée par le test de coagulation (Test STA<sup>®</sup>-Procoag-PPL) chez 4 patients subissant un test au Minirin<sup>®</sup>.** Le coefficient de corrélation de 0.47 signifie qu'il n'y a pas de corrélation entre ces deux paramètres.



**Figure 30 : Corrélation entre la numération des MPs CD41+ et CD41-AV+ et leur activité phospholipidique pro-coagulante mesurée par le test de coagulation (Test STA®-Procoag-PPL) chez les mêmes patients du graphe précédent. Le coefficient de corrélation de 0.44 signifie qu'il n'y a pas de corrélation entre ces deux paramètres.**



## VI. Discussion interprétation

Les MPs sont retrouvées dans le sang circulant de volontaires sains et leurs taux plasmatiques augmentent dans certaines pathologies, notamment les maladies cardiovasculaires à risque thrombotique accru <sup>2</sup>, mais également le cancer et en particulier le myélome. L'intérêt de les doser serait double : d'une part dans le diagnostic de telles pathologies où elles sont sensiblement augmentées et d'autre part dans le pronostic et le suivi de ces mêmes pathologies. Le dosage de leur activité fonctionnelle pro-coagulante semble également intéressant afin d'évaluer leur capacité à induire un thrombus.

La première partie de ce travail de thèse a consisté en une mise au point de la méthode de détection des MPs par cytométrie en flux. Leur potentiel pro-coagulant a été évalué en parallèle en utilisant un test de coagulation uniquement dépendant des phospholipides du patient. Dans une deuxième partie, nous avons réalisé deux applications médicales : la première consistant en la numération, la caractérisation et la mesure de l'activité pro-coagulante des MPs dans les gammopathies monoclonales et la deuxième consistant en l'évaluation de l'évolution du taux des MPs après traitement IV par MINIRIN<sup>®</sup> chez des patients atteints de maladie hémorragique héréditaire de type maladie de Willebrand ou hémophilie A.

### **Les problèmes posés lors de la détection des MPs par CMF <sup>31</sup>.**

L'analyse d'une solution de PBS stérile en CMF, marquée par un anticorps anti-CD41a et par l'annexin V nous a permis de constater qu'il existait dans le quadrant inférieur gauche, une population non négligeable d'évènements détectés par le cytomètre en flux et aucun évènement dans les 3 autres quadrants (**Fig. 15**).

Deux hypothèses peuvent être avancées à ce propos pour expliquer ce phénomène. La première hypothèse formulée peut être la suivante : une partie des MPs pourrait rester accrochées dans les tubulures du cytomètre lors du passage d'un échantillon de PFP et l'utilisation immédiatement après d'une solution de PBS ou autre solution ne contenant pas de MPs, « décrocheraient » une certaine quantité de MPs qui seraient ainsi détectée. Néanmoins, cette hypothèse semble peu plausible car si cela était le cas, on devrait retrouver également des MPs marquées et pas simplement des non marquées.

La deuxième hypothèse consiste à dire que ces évènements détectés seraient finalement indissociables du bruit de fond de l'appareil. En effet, le discriminant sur la taille de 0,5  $\mu\text{m}$  dans ce protocole <sup>126</sup> est relativement bas et on se situe vraisemblablement à la limite de sensibilité de l'appareil. Cette hypothèse semble plus crédible que la précédente et permettrait

de comprendre ce phénomène de détection non spécifique d'évènements dans le quadrant inférieur gauche. De cette façon, tous les évènements détectés dans ce quadrant n'ont pas été retenus dans la numération des MPs.

### **Etude des variations du taux de MPs sur un même échantillon plasmatique <sup>127</sup>.**

Par ailleurs, l'analyse répétée d'un même échantillon de PFP (**Fig. 16**) a montré des résultats équivalents avec un coefficient de variation de 3% pour les MPs CD41+, de 3.35 % pour les MPs CD41+ AV+, de 7.64% pour les MPs CD41- AV+, et enfin de 7.68% pour les MPs CD41+ AV-. Ces CV sont acceptables puisqu'ils sont inférieurs à 10%.

Cependant, les différentes numérations de MPs chez un témoin sain, dans un gradient de PPP (**Fig. 20**) n'ont pas été équivalentes. Dans ce cas, les CV calculés ont été en effet très supérieurs à 10%. Trois hypothèses peuvent expliquer ces CV élevés. La première est que pour des valeurs basses de MPs, le cytomètre n'est pas très reproductible. En effet, chez ce témoin sain, la numération des MPs se situe aux alentours de 100 MPs CD41+ / microL de PFP et est donc très faible. Dans ce cas, la variation observée serait liée à l'automate. La deuxième hypothèse est l'existence d'un gradient de MPs dans le PPP et que l'automate serait fiable dans les numérations basses de MPs. La troisième hypothèse correspond à la somme des deux premières, c'est-à-dire une limite importante de l'automate de CMF pour les numérations basses de MPs associé à l'existence d'un gradient de MPs dans le PPP. D'autres études ultérieures sur un nombre plus important de témoin sain avec une numération de MPs plus importante seront nécessaires pour confirmer ou non cette donnée concernant le gradient de PPP. On peut en effet imaginer que pour des valeurs plus élevées de MPs, leur numération dans un gradient de PPP soit plus reproductible ce qui permettrait d'éliminer la deuxième hypothèse. D'autre part, les MPs les plus grosses et les plus denses se retrouvent certainement plus près du culot que les plus petites lors de la première centrifugation. Ainsi, l'une de ces deux populations de MPs pourrait être plus représentée que l'autre dans chaque fraction du surnageant ce qui validerait la deuxième hypothèse. Il paraît donc indispensable d'étendre ces résultats sur une série plus importante en utilisant des PFP de témoins sains avec des numérations de MPs basses, intermédiaires et fortes mais également en s'intéressant aux PFP de sujets malades qui présentent a priori des taux très importants de MPs. Dans toutes les analyses qui ont suivies, il a été décidé de prélever le PPP le plus près de la surface du surnageant (c'est-à-dire son 1/3 supérieur) dans le but de standardiser les conditions pré-analytiques de prélèvement du PPP afin de pallier à ce problème. Cependant, cette pratique peut introduire un biais dans l'analyse des MPs dont il a été récemment montré que les diverses formes de densités différentes peuvent présenter une composition protéique

différente. Ces MPs auraient donc très probablement des fonctions biologiques différentes voire totalement opposées. Ainsi, par exemple, certains types de MPs pourraient être plutôt pro-coagulants par expression augmentée du facteur tissulaire (FT) et d'autres plutôt anti-coagulants par expression augmentée du récepteur de la protéine C (EPCR), et diminuée du FT. D'autre part, leurs mécanismes de formation pourraient être différents tels que leurs stimuli (apoptose, activation, ou autre encore inconnu), leurs voies biochimiques empruntées ou leurs processus physique même de vésiculation. Enfin, la taille et la densité des MPs pourraient varier en fonction de leur origine cellulaire. Notre équipe a prévu d'analyser précisément les MPs (expression protéique et phospholipidique et propriétés biochimiques) issues de chacune des fractions de PFP.

### **Grande variabilité inter-individuelle du taux de MPs <sup>127</sup>.**

Concernant la numération des MPs plaquettaires et non plaquettaires chez 3 témoins sains (**Fig. 20**), on constate un écart-type très important généré par une hétérogénéité dans la numération de ces MPs. En effet, un des 3 témoins sains présente une quantité de MPs bien supérieure aux deux autres. Par ailleurs toujours chez un témoin sain (**Fig. 21**), la numération des MPs d'origine plasmocytaire a été réalisée. La valeur de 16 MPs CD138+ / microL de PFP retrouvée est très faible ; mais ce nombre est-il véritablement significatif ? La sensibilité du cytomètre en flux est-elle suffisamment bonne pour la détection de ces événements rares ? Pour répondre à cette question, d'autres PFP de témoins sains devront être analysés et marqués avec un anticorps anti-CD138. Les témoins sains étudiés correspondent à des personnes venues en consultations externes pour des pathologies légères pour lesquelles il n'existe à priori aucune raison de voir leurs MPs augmentées.

### **Application de la détection des MPs au cours des gammopathies monoclonales.**

L'étude préliminaire des MPs dans les gammopathies monoclonales (1 patient atteint de MGUS, 5 de myélome et 1 de leucémie à plasmocytes) a montré de façon étonnante des taux plus importants de MPs y compris ceux d'origine plasmocytaire pour le patient atteint de MGUS. Les valeurs obtenues pour les patients atteints de myélome et celui atteint d'une leucémie à plasmocyte sont similaires en terme de MPs plaquettaires, plasmocytaires et non plaquettaires. Comme il a été déjà signalé précédemment, ce phénomène peut s'expliquer par une sensibilité moins bonne de l'automate sur des valeurs basses de MPs. Par ailleurs, l'échantillonnage de patients est trop faible pour pouvoir interpréter les résultats. En outre, le

patient atteint de MGUS avait peut-être une autre pathologie associée lors du prélèvement pouvant expliquer cette augmentation des MPs. Cependant, la valeur plus élevée des MPs d'origine plasmocytaire par rapport aux deux autres pathologies reste inexpliquée. On aurait en effet, pu imaginer que les MPs d'origine plasmocytaire soient plus élevées dans la leucémie à plasmocytes et le myélome que le MGUS. De la même façon, le temps obtenu par le test de coagulation concernant le patient atteint de MGUS était significativement plus court que pour les deux autres pathologies en accord avec la numération des MPs. Cependant, si on regarde la corrélation entre le temps obtenu par le test de coagulation et la numération des MPs CD41+ chez 5 patients atteints de gammapathie monoclonale, on s'aperçoit que le coefficient de corrélation obtenu est très mauvais (0.34) ce qui signifie une absence de corrélation entre les deux paramètres pour ces 5 patients. Là encore, le nombre de patients est insuffisant pour conclure puisque pour des études de corrélation il est nécessaire d'avoir au minimum 20 patients. Une étude plus large débutera en septembre 2010 au CHU de Rennes. Celle-ci intitulée PACMoG (Preliminary Assay on angiogenesis and coagulation in monoclonal gamopathies) visera à comparer précisément le taux de MPs, leurs caractéristiques immuphénotypiques (origine cellulaire et marqueurs fonctionnels) et leur pouvoir procoagulant entre patients présentant une gammapathie monoclonale bénigne et ceux atteints de myélome et/ou de leucémie à plasmocytes. Cette étude vient de recevoir l'accord du comité de protection des personnes CPP de Rennes.

#### **Application de la détection des MPs au cours du traitement par desmopressine DDAVP.**

En parallèle, des études sur des patients subissant un test au Minirin®, ou à l'Octim® ont été effectuées dans le but d'analyser l'évolution des MPs plaquettaires et non plaquettaires aux différents temps d'injection du médicament chez ces patients. L'interprétation de ces résultats est très délicate. En effet, les fluctuations dans le temps des taux de MPs après l'injection de DDAVP sont très importantes, et il est impossible ici d'en déduire un schéma général de variation des MPs au cours du temps. Toutefois, chez 3 patients (2 qui ont subi un test au Minirin® et 1 un test à l'Octim®), l'évolution des MPs est quasi similaire, soit une augmentation relativement importante des MPs entre T0 et T1h après l'injection. Mais globalement, il n'y a pas de règles et là encore le nombre de patients analysés est trop faible pour conclure. En parallèle, les résultats du test de coagulation concernant 4 patients subissant un test au Minirin® montrent une augmentation du temps de coagulation entre T0 et T1h soit une diminution du pouvoir pro-coagulant puis ensuite une ré augmentation du pouvoir pro coagulant. Ce résultat est inattendu puisque ce médicament est utilisé en pratique médical pour ses propriétés pro-coagulantes et/ou pro-aggrégantes. D'autre part, la corrélation entre

ce test et la numération des MPs était mauvaise (avec coefficient de corrélation de seulement 0.47) comme pour les gammopathies monoclonales. Notre équipe poursuit actuellement cette étude préliminaire et tentera d'analyser les mécanismes cellulaires et biochimiques influençant la microvésiculation lors du traitement par DDAVP.

## VII. Conclusion

Dans notre étude, nous avons mis au point la technique de détection des MPs en cytométrie en flux sur un cytomètre FC 500 (Beckman Coulter®) en suivant le protocole de Robert S. et al. avec une modification sur la concentration d'anticorps anti-CD41- FITC et anti CD138-FITC utilisée soit 1 microL. Ensuite, nous l'avons appliqué dans deux groupes pathologiques différents 1) les gammopathies monoclonales dans lesquelles l'objectif principal était d'étudier la corrélation entre d'une part le taux de MPs et de coagulabilité sanguine dépendant des MPs, et d'autre part la progression des gammopathies monoclonales ; 2) la desmopressine dans les pathologies hémorragiques héréditaires avec l'objectif de mesurer les variations cinétiques du taux de MPs provoquées par la desmopressine. Cependant, l'interprétation des résultats obtenus s'est révélée délicate car l'échantillonnage n'a pas été suffisamment important. Il s'agit en effet d'études préliminaires qui doivent être poursuivies afin de progresser dans cette voie du fait de l'importance croissante du rôle des MPs dans de nombreux processus physiologiques tels que l'activation cellulaire, la thrombogénèse, la prolifération et la différenciation cellulaire, l'angiogénèse et la croissance tumorale mais également, un rôle dans le développement et le maintien de processus pathologiques. Ainsi, l'augmentation des MPs a été prouvée dans de nombreuses pathologies à risque thrombotique accru telles que le diabète, les maladies cardiovasculaires, le sepsis mais également le cancer. Par ailleurs, il persiste un problème : il s'agit des conditions pré-analytiques et notamment celles concernant le prélèvement. Certaines analyses en CMF sur un même témoin prélevé à quelques heures d'intervalle ont montrés des résultats variables sur la numération des MPs. L'hypothèse la plus probable pouvant expliquer ce phénomène, concerne la difficulté liée au prélèvement sanguin plus ou moins délicat. Il est en effet envisageable de penser que pour un prélèvement difficile, l'activation cellulaire sera plus conséquente et la numération des MPs plus importante que pour un prélèvement normal.

De toute évidence, il paraît nécessaire d'approfondir ces résultats avec un nombre plus important de patients. Actuellement, la numération des MPs ne s'est pas inscrite dans une stratégie diagnostique de certaines pathologies où une augmentation des MPs est significative. Cependant, les MPs ont permis de comprendre les processus physiopathologiques de nombreuses maladies. On peut penser que dans un avenir proche, la numération et la caractérisation des MPs pourront être un outil non seulement dans le diagnostic mais également dans le suivi de certaines pathologies comme par exemple le myélome où l'efficacité du traitement anti-tumoral serait corrélée à la diminution des MPs plasmocytaire.

## Bibliographie

1. Zwaal RF, Comfurius P, Bevers EM. Platelet procoagulant activity and microvesicle formation. Its putative role in hemostasis and thrombosis. *Biochim Biophys Acta* 1992; 1180: 1–8.
2. Van Wijk MJ, VanBavel E, Sturk A, et al.; Microparticles in cardiovascular diseases. *Cardiovasc Res* 2003; 59: 277-87
3. Chargaff et al.; The biological significance of the thromboplastic protein of blood; *J Biol Chem* 1946; 166: 189-97
4. Wolf P.; The nature and significance of platelet products in human plasma; *Brit J Haematol* 1967; 13(3): 269-88
5. Satta et al.; Monocyte vesiculation is a possible mechanism for dissemination of membrane-associated procoagulant activities and adhesion molecules after stimulation by lipopolysaccharide ; *J Immunol* 1994. 153(7): 3245-55
6. Combes et al.; In vitro generation of endothelial microparticles and possible prothrombotic activity in patients with lupus anticoagulant; *J Clin Invest* 1999; 104(1): 93-102
7. Jy W, Horstman LL, Jimenez JJ, et al. 2004. Measuring circulating cell-derived microparticles. *J Thromb Haemost*, 2: 1842-3
8. Van Wijk MJ et al.; Microparticles in cardiovascular diseases; *Cardiovasc Res* 2003 ; 59 : 277-87
9. Morel O et al.; Cellular microparticles : a disseminated storage pool of bioactive vascular effectors ; *Curr Opin Hematol* 2004 ; 11 : 156-64
10. Zwaal RF, Schroit AJ. Pathophysiologic implications of membrane phospholipid asymmetry in blood cells. *Blood* 1997;89:1121—32.
11. Fox JE, Austin CD, Boyles JK, Steffen PK. Role of the membrane skeleton in preventing the shedding of procoagulant-rich microvesicles from the platelet plasma membrane. *J Cell Biol* 1990; 111(2):483–93.
12. Diaz C, Schroit AJ. Role of translocases in the generation of phosphatidylserine asymmetry. *J Membr Biol* 1996; 151(1):1–9.
13. Connor J, Pak CH, Zwaal RF, Schroit AJ. Bidirectional transbilayer movement of phospholipid analogs in human red blood cells Evidence for an ATP-dependent and protein-mediated process. *J Biol Chem* 1992; 267(27): 19412–7.
14. McLaughlin PJ, Gooch JT, Mannherz HG, Weeds AG. Structure of gelsolin segment 1-actin complex and the mechanism of filament severing. *Nature* 1993; 364(6439): 685–92.

15. Zwaal RF, Comfurius P, Bevers EM. Mechanism and function of changes in membrane-phospholipid asymmetry in platelets and erythrocytes. *Biochem Soc Trans* 1993; 21(2):248–53.
16. Weiss HJ, Vicic WJ, Lages BA, Rogers J. Isolated deficiency of platelet procoagulant activity. *Am J Med* 1979; 67(2): 206–13.
17. Zwaal RF, Comfurius P, Bevers EM. Scott syndrome, bleeding disorder caused by defective scrambling of membrane phospholipids. *Biochim Biophys Acta* 2004; 1636 (2–3):119–28.
18. Andrea Piccin , William G. Murphy , Owen P. Smith. Circulating microparticles: pathophysiology and clinical implications. *Blood Reviews* (2007) 21, 157–171.
19. Harwig JH. Platelet structure. In: Michelson AD, editor. *Platelet*. Academic Press; 2002. p. 37–49.
20. JY W, Horstman LL, Jimenez JJ, Ahn YS. Measuring circulating cell-derived microparticles. *J Thromb Haemost* 2004; 2(10):1850–1.
21. Biro E, Sturk-Maquelin KN, Vogel GM, et al. Human cell-derived microparticles promote thrombus formation in vivo in a tissue factor-dependent manner. *J Thromb Haemost* 2003;1: 2561-2568.
22. Dignat-George F, Camoin-jau L, Sabatier F, et al. Endothelial microparticles : a potential contribution to the thrombotic complications of the antiphospholipid syndrome. *Thromb Haemost* 2004; 91: 667-673.
23. Freyssinet JM, Dignat-George F. More on: measuring circulating cell-derived microparticles. *J Thromb Haemost* 2005; 3: 613-614.
24. 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; 112: 81-90.
25. Nomura S. Function and clinical significance of platelet-derived microparticles. *Int J Hematol* 2001; 74: 397-404.
26. Enjeti AK, Lisa L, Seldon M. BioMaleimide as a generic stain for detection and quantitation of microparticles. *Int J Lab Haematol* 2007 July; [epubahead of print].
27. Shet AS, Aras O, Gupta K, et al. Sick blood contains tissue factor-positive microparticles derived from endothelial cells and monocytes. *Blood* 2003; 102: 2678-2683
28. Thiagarajan P, Tait JF. Collagen-induced exposure of anionic phospholipid in platelets and platelet-derived microparticles. *J Biol Chem* 1991;266(36):24302–7.
29. Al-Rubeai M, personal communication
30. Horstman LL, Jy W, Jimenez JJ, Bidot C, Ahn YS. New horizons in the analysis of circulating cell-derived microparticles. *Keio J Med* 2004;53(4):210–30.



31. Nomura S. Measuring circulating cell-derived microparticles. *J Thromb Haemost* 2004;2(10):1847–8.
32. Miyamoto S, Marcinkiewicz C, Edmunds Jr LH, Niewiarowski S. Measurement of platelet microparticles during cardiopulmonary bypass by means of captured ELISA for GpIIb/IIIa. *Thromb Haemost* 1998;80(2):225–30.
33. Horstman LL, Ahn YS. Platelet microparticles: a wide-angle perspective. *Crit Rev Oncol hematol* 1999; 30: 111-142
34. Heijnen HF, Schiel AE, Fijnheer R, et al. Activated platelets release two types of membrane vesicles: microvesicles by surface shedding and exosomes derived from exocytosis of multivesicular bodies and alpha-granules. *Blood* 1999; 94: 3791-3799.
35. Fox JE, Austin CD, Reynolds CC, et al. Evidence that agonist-induced activation of calpain causes the shedding of procoagulant-containing microvesicles from the membrane of aggregating platelets. *J Biol Chem* 1991; 266: 13289-13295.
36. Flaumenhaft R. Formation and fate of platelet microparticles. *Blood Cells Mol Dis* 2006; 36: 182-187.
37. Rand ML, Wang H, Bang KW, et al. Rapid clearance of procoagulant platelet-derived microparticles from the circulation of rabbits. *J Thromb Haemost* 2006; 4: 1621-1623.
38. Fourcade O, Simon MF, Viode C, et al. Secretory phospholipase A2 generates the novel lipid mediator lysophosphatidic acid in membrane microvesicles shed from activated cells. *Cell* 1995; 80: 919-927.
39. Wu Y, Tibrewal N, Birge RB. Phosphatidylserine recognition by phagocytes: a view to a kill. *Trends Cell Biol* 2006; 16: 189-197.
40. Willekens FL, Were JM, Krujit JK, et al. Liver kupffer cells rapidly remove red blood cell-derived vesicles from the circulation by scavenger receptors. *Blood* 2005; 105; 2141-2145.
41. Berckmans RJ, Nieuwland R, Boing AN, Romijn FP, Hack CE, Sturk A. Cell derived microparticles circulate in healthy humans and support low grade thrombin generation. *Thromb Haemost* 2001; 85: 639- 46.
42. Gilbert GE, Sims PJ, Wiedmer T, Furie B, Furie BC, Shattil SJ. Platelet-derived microparticles express high affinity receptors for factor VIII. *J Biol Chem* 1991; 266:17261—8.
43. Comfurius P, Senden JMG, Tilly RHJ, Schroit AJ, Bevers EM, Zwaal RFA. Loss of membrane phospholipid asymmetry in platelets and red cells may be associated with calcium-induced shedding of plasma membrane and inhibition of aminophospholipid translocase. *Biochim Biophys Acta* 1990; 1026:153—60.
44. Sinauridze EI, Kireev DA, Popenko NY, Pichugin AV, Panteleev MA, Krymskaya OV, et al. Platelet microparticle membranes have 50- to 100-fold higher specific procoagulant activity than activated platelets. *Thromb Haemost* 2007; 97:425—34.

45. Combes V, Simon AC, Grau GE, Arnoux D, Camoin L, Sabatier F, et al. In vitro generation of endothelial microparticles and possible prothrombotic activity in patients with lupus anticoagulant. *J Clin Invest* 1999;104: 93–102.
46. Kagawa H, Komiyama Y, Nakamura S, Miyake T, Miyazaki Y, Hamamoto K, et al. Expression of functional tissue factor on small vesicles of lipopolysaccharide-stimulated human vascular endothelial cells. *Thromb Res* 1998; 91:297—304.
47. Nomura S, Shouzu A, Omoto S, Nishikawa M, Iwasaka T, Fukuhara S. Activated platelets and oxidized LDL induce endothelial membrane vesiculation: clinical significance of endothelial cell-derived microparticles in patients with type 2 diabetes. *Clin Appl Thromb/Hemost* 2004;10: 205—15.
48. Falati S, Liu Q, Gross P, Merrill-Skoloff G, Chou J, Vandendries E, et al. Accumulation of tissue factor into developing thrombi in vivo is dependent upon microparticle P-selectin glycoprotein ligand 1 and platelet Pselectin. *J Exp Med* 2003;197:1585—98.
49. Losche W. Platelets and tissue factor. *Platelets* 2005; 16: 313-9
50. Del Conde I, Shrimpton CN, Thiagarajan P, López JA. Tissue-factor-bearing microvesicles arise from lipid rafts and fuse with activated platelets to initiate coagulation. *Blood* 2005, 106: 1604-11.
51. Nomura S, Ozaki Y, Ikeda Y. Function and role of microparticles in various clinical settings. *Thrombosis Research* 2008; 123: 8-23
52. Jy W, Mao WW, Horstman L, Tao J, Ahn YS. Platelet microparticles bind, activate and aggregate neutrophils in vitro. *Blood Cells Mol Dis* 1995;21:217—31.
53. Barry OP, Pratico D, Lawson JA, FitzGerald GA. Transcellular activation of platelets and endothelial cells by bioactive lipids in platelet microparticles. *J Clin Invest* 1997;99:2118—27.
54. Barry OP, Pratico D, Savani RC, FitzGerald GA. Modulation of monocyte-endothelial cell interactions by platelet microparticles. *J Clin Invest* 1998;102:136—44.
55. Nomura S, Suzuki M, Katsura K, Xie GL, Miyazaki Y, Miyake T, et al. Platelet-derived microparticles may influence the development of atherosclerosis in diabetes mellitus. *Atherosclerosis* 1995; 116:235—40.
56. Nomura S, Tandon NN, Nakamura T, Cone J, Fukuhara S, Kambayashi J. High-shear-stress-induced activation of platelets and microparticles enhances expression of cell adhesion molecules in THP-1 and endothelial cells. *Atherosclerosis* 2001; 158:277—87.
57. Nomura S, Inami N, Iwasaka T. Differences in functional roles between activated platelets and platelet-derived microparticles. *Thromb Haemost* 2007;98:1143—4.
58. Forlow SB, McEver R, Nollert MU. Leukocyte-leukocyte interactions mediated by platelet microparticlees under flow. *Blood* 2000; 95:1317—23.

59. Weiss HJ, Vicic WJ, Lages BA, Rogers J. Isolated deficiency of platelet procoagulant activity. *Am J Med* 1979;67: 206—13.
60. Toti F, Satta N, Fressinaud E, Meyer D, Freyssinet JM. Scott syndrome, characterized by impaired transmembrane migration of procoagulant phosphatidylserine and hemorrhagic complications, is an inherit disorder. *Blood* 1996; 87:1409—15.
61. Castaman G, Yu-Feng L, Battistin E, Rodeghiero F. Characterization of a novel bleeding disorder with isolated prolonged bleeding time and deficiency of platelet microvesicle generation. *Br J Haematol* 1997;96:458—63.
62. Shet AS, Aras O, Gupta K, Hass MJ, Rausch DJ, Saba N, et al. Sickie blood contains tissue factor-positive microparticles derived from endothelial cells and monocytes. *Blood* 2003;102(7):2678—83.
63. Berney SI, Ridler CD, Stephens AD, Thomas AE, Kovacs IB. Enhanced platelet reactivity and hypercoagulability in the steady state of sickle cell anaemia. *Am J Hematol*. 1992 Aug;40(4):290-4.
64. Francis Jr RB, Hebbel RP. Hemostasis. In: Embury SH, Hebbel RP, Steiberh MH, Mohandas N, editors. *Sickle Cell Disease: Basic principles and Clinical practice*. New York: Raven Press; 1994. p. 299—310.
65. Manodori AB, Matsui NM, Chen JY, Embury SH. Enhanced adherence of sickle erythrocytes to thrombin-treated endothelial cells involves interendothelial cell gap formation. *Blood* 1998;92(9):3445—54.
66. Solovey A, Gui L, Key NS, Hebbel RP. Tissue factor expression by endothelial cells in sickle cell anemia. *J Clin Invest* 1998;101(9):1899—904.
67. Hebbel RP, Osarogiagbon R, Kaul D. The endothelial biology of sickle cell disease: inflammation and a chronic vasculopathy. *Microcirculation* 2004; 11(2):129—51.
68. 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;93(1):81—8.
69. McKenzie SE, Reilly MP. Heparin-induced thrombocytopenia and other immune thrombocytopenias: lessons from mouse models. *Semin Thromb Hemostas* 2004; 30:559—64.
70. Barry OP, Pratico D, Savani RC, FitzGerald GA. Modulation of monocyte-endothelial cell interactions by platelet microparticles. *J Clin Invest* 1998;102(1):136—44.
71. 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; 33(11): 2540—6.
72. Nieuwland R, Berckmans RJ, McGregor S, Boing AN, Romijn RG, Westendorp RG, et al. Cellular origin and procoagulant properties of microparticles in meningococcal sepsis. *Blood* 2000;95(3):930—5.

73. Nomura S, Suzuki M, Katsura K, Xie GL, Miyazaki Y, Miyake T, et al. Platelet-derived microparticles may influence the development of atherosclerosis in diabetes mellitus. *Atherosclerosis* 1995;116:235—40.
74. Nomura S, Shouzu A, Omoto S, Hayakawa T, Kagawa H, Nishikawa M, et al. Effect of cilostazol on soluble adhesion molecules and platelet-derived microparticles in patients with diabetes. *Thromb Haemost* 1998;80:388—92.
75. Omoto S, Nomura S, Shouzu A, Hayakawa T, Shimizu H, Miyake Y, et al. Significance of platelet-derived microparticles and activated platelets in diabetic nephropathy. *Nephron* 1999;81:271—7.
76. Nomura S, Shouzu A, Omoto S, Nishikawa M, Fukuhara S. Significance of chemokines and activated platelets in patients with diabetes. *Clin Exp Immunol* 2000;121:437—43.
77. Nomura S, Kanazawa S, Fukuhara S. Effects of eicosapentaenoic acid on platelet activation markers and cell adhesion molecules in hyperlipidemic patients with type 2 diabetes mellitus. *J Diabet Complicat* 2003;17:153—9.
78. Ogata N, Imaizumi M, Nomura S, Shouzu A, Arichi M, Matsuoka M, et al. Increased levels of platelet-derived microparticles in patients with diabetic retinopathy. *Diabet Res Clin Pract* 2005;68:193—201.
79. Sabatier F, Darmon P, Hugel B, Combes V, Sanmarco M, Velut JG, et al. Type 1 and Type 2 diabetic patients display different patterns of cellular microparticles. *Diabetes* 2002;51:2840—5.
80. Omoto S, Nomura S, Shouzu A, Nishikawa M, Fukuhara S, Iwasaka T, et al. Detection of monocyte-derived microparticles in patients with type II diabetes mellitus. *Diabetologia* 2002;45:550—5.
81. Nomura S, Kanazawa S, Fukuhara S. Effects of efonidipine on platelet and monocyte activation markers in hypertensive patients with and without type 2 diabetes mellitus. *J Hum Hypertens* 2002;16:539—47.
82. Nomura S, Shouzu A, Omoto S, Nishikawa M, Iwasaka T. Effect of losartan and simvastatin on monocyte-derived microparticles in hypertensive patients with and without type 2 diabetes mellitus. *Clin Appl Thromb/Hemost* 2004;10:133—41.
83. Shouzu A, Nomura S, Omoto S, Hayakawa T, Nishikawa M, Iwasaka T. Effects of ticlopidine on monocyte-derived microparticles and activated platelet markers in diabetes mellitus. *Clin Appl Thromb/Hemost* 2004;10:167—73.
84. Nomura S, Takahashi N, Inami N, Kajiura T, Yamada K, Nakamori H, et al. Probucol and ticlopidine: effect on platelet and monocyte activation markers in hyperlipidemic patients with and without type 2 diabetes. *Atherosclerosis* 2004;174:329—35.
85. Nomura S, Shouzu A, Omoto S, Nishikawa M, Iwasaka T. Long-term treatment with nifedipine modulates procoagulant markers and C-C chemokine in hypertensive patients with type 2 diabetes mellitus. *Thromb Res* 2005;115: 277—85.

86. Nomura S, Shouzu A, Omoto S, Nishikawa M, Iwasaka T. Benidipine improves oxidized LDL-dependent monocyte and endothelial dysfunction in hypertensive patients with type 2 diabetes mellitus. *J Hum Hypertens* 2005;19:551—7.
87. Nomura S, Shouzu A, Omoto S, Nishikawa M, Fukuhara S, Iwasaka T. Effects of valsartan on monocyte/endothelial cell activation markers and adiponectin in hypertensive patients with type 2 diabetes mellitus. *Thromb Res* 2006;117:385—92.
88. Nomura S, Inami N, Kimura Y, Omoto S, Shouzu A, Nishikawa M, et al. Effect of nifedipine on adiponectin in hypertensive patients with type 2 diabetes mellitus. *J Hum Hypertens* 2007; 21:38—44.
89. Ogata N, Nomura S, Shouzu A, Imaizumi M, Arichi M, Matsumura M. Elevation of monocyte-derived microparticles in patients with diabetic retinopathy. *Diabet Res Clin Pract* 2006; 73:241—8
90. Koga H, Sugiyama SD, 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; 45:1622—30.
91. Yu JL, May L, Lhotak V, Shahrzad S, Shirasawa S, Weitz JI, et al. Oncogenic events regulate tissue factor expression in colorectal cancer cells: implications for tumor progression and angiogenesis. *Blood* 2005; 105:1734—41.
92. DelConde I, Bharwani LD, Dietzen DJ, Pendurthi U, Thiagarajan P, Lopez JA. Microvesicle-associated tissue factor and Trousseau's syndrome. *J Thromb Haemost* 2007; 5:70—4.
93. Tesselaar ME, Romijn FP, Van Der Linden IK, Prins FA, Bertina RM, Osanto S. Microparticle-associated tissue factor activity: a link between cancer and thrombosis? *J thromb Haemost* 2007;5:520—7.
94. Tilley RE, Holscher T, Belani R, Nieva J, Mackman N. Tissue factor activity is increased in a combined platelet and microparticle sample from cancer patients. *Thromb Res* in press Feb 8 2008 [Electronic publication ahead of print].
95. Davila M, Amirkhosravi A, Coll E, Desai H, Robles L, Colon J, et al. Tissue factor-bearing microparticles derived from tumor cells: impact on coagulation activation. *J Thromb Haemost* Apr 22 2008 [Electronic publication ahead of print].
96. Grace M, Thomas, Laurence Panicot-Dubois, Romaric Lacroix, Françoise Dignat-George, Dominique Lombardo, Christophe Dubois. Cancer cell-derived microparticles bearing P-selectin glycoprotein ligand 1 accelerate thrombus formation in vivo. *The Journal of Experimental Medicine* 2009; [www.jem.org/cgi/doi/10.1084/jem.20082297](http://www.jem.org/cgi/doi/10.1084/jem.20082297).
97. Zwicker JJ, Liebman HA, Neuberger D, Lacroix R, Bauer KA, Furie BC, Furie B. Tumor-derived tissue factor-bearing microparticles are associated with venous thromboembolic events in malignancy. *Clin Cancer Res*. 2009 Nov 15;15(22):6830-40. Epub 2009 Oct 27.
98. Zaoral M, Koles J, Sorm F: Amino acids and peptides LXXI. Synthesis of 1 -deamino-8-D-lysine vasopressin. *Coil. Czech. Chem. Comm.*, 32:1250-7. 1967.

99. Mannuci PM, Ruggeri ZM, Pareti FL, Capitanio AM. DDAVP in hemophilia. *Lancet*, 2:1171-1172. 1977.
100. Mannuci PM, Cattaneo M: Desmopressin: a nontransfusional treatment of hemophilia and von Willebrand disease. *Haemostasis*. 22(5): 276-80. 1992.
101. Scott JP, Montgomery RR: Therapy of von Willebrand disease. *Sem. Thromb. Hemost.* 19(1):37-47. 1993
102. Bolan CD, Alving BM: Pharmacologic agents in the management of bleeding disorders. *Transfusion* 30(6): 541-51. 1990.
103. Dimichele DM, Hathaway WE: Use of DDAVP in inherited and acquired platelet dysfunction. *Amer. J. Hemat.* 33(1): 39-45. 1990.
104. Flordal PA, Sahlin S: Use of desmopressin to prevent bleeding complications in patients treated with aspirin. *Brit. J. Surg.* 80(6):723-4. 1993.
105. Johnstone MT, Andrews T, W JA, Rudd MA, George D, Weinstein M, Loscalzo J: Bleeding time prolongation with streptokinase and its reduction with 1-desamino-8-D-arginine vasopressin. *Circ.* 82(6): 2142-51. 1990.
106. Schulman S, Johnsson H: Heparin, DDAVP and the bleeding time. *Thromb. and Haemost.* 65(3): 242-4. 1991.
107. Hashemi S, Tackaberry ES, Palmer DS, Rock G, Ganz PR: DDAVP induced release of von Willebrand factor from endothelial cells in vitro: the effect of plasma and blood cells. *Biochim. Biophys. Acta* 1052(1): 63-70. 1990.
108. Hashemi S, Palmer DS, Aye MT, Ganz PR: Platelet-activating factor secreted by DDAVP-treated monocytes mediates von Willebrand factor release from endothelial cells. *J. Cell. Physiol.* 154(3): 496-505. 1993.
109. Greinacher A, Potzsch B, Kiefel V, White JG, Muller-berghaus G, Mueller-eckhardt C: Evidence that DDAVP transiently improves hemostasis in Bernard-Soulier syndrome independent of von Willebrand-factor. *Ann. of Hemat.* 67(3):149-50. 1993.
110. Cattaneo M, Moia M, Delle valle P, Caste llana P, Mannucci PM: DDAVP shortens the prolonged bleeding times of patients with severe von Willebrand disease treated with cryoprecipitate. Evidence for a mechanism of action independent of released von Willebrand factor. *Blood* 74(6):1972-5. 1989.
111. Yang X, Disa J, Rao AK: Effect of 1 -desamino-8-D-arginine vasopressin (DDAVP) on human platelets. *Thromb. Res.* 59(5): 809-18. 1990.
112. Ghosh S, Rao AK: Lack of effect of 1 -desamino-8-D-arginine vasopressin on direct adhesion of platelets to collagen. *Thromb. Res.* 70(5): 417-22. 1993.
113. Soslaw G, Schwartz AB, Putatunda B, Conroy JD, Parker J, Abel RF, Brodsky I. Desmopressin-induced improvement in bleeding times in chronic renal failure patients correlates with platelet serotonin uptake and ATP release. *Amer. J. Med. Sci.* 300(6): 372-9. 1990.



114. Lawrence L, Horstman, Benjamin J, Valle-Riestra, Wenche Jy, Fang Wang, Wei Mao, Yeon S. Ahn'. Desmopressin (DDAVP) acts on platelets to generate platelets microparticles and enhanced procoagulant activity. *Thrombosis Research*, Vol. 79, No. 2, pp. 163-174, 1995
115. Butenas S, Brummel KE, Branda RF, et al. Mechanism of factor VIIa-dependent coagulation in hemophilia blood. *Blood* 2002; 99: 923-30.
116. Janowska-Wieczorek A, Majka M, Kijowski J, Baj-Kizyworzeka M, Reca R, Turner AR, et al. Platelet-derived microparticles bind to hematopoietic stem/progenitor cells and enhance their engraftment. *Blood* 2001; 98: 3143—9.
117. Baj-Kizyworzeka M, Majka M, Oratico D, Ratajczak J, Vilaire G, Kijowski J, et al. Platelet-derived microparticles stimulate proliferation, survival, adhesion, and chemotaxis of hematopoietic cells. *Exp Hematol* 2002; 30:450—9.
118. Nomura S, Kanazawa S, Inami N, Kamitsuji Y, Uoshima N, Ishida H, et al. Role of platelet-derived chemokines (RANTES and ENA-78) after stem cell transplantation. *Transplant Immunol* 2006; 15:247—53.
119. Nomura S, Ishii K, Inami N, Uoshima N, Ishida H, Yoshihara T, et al. Role of soluble tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand concentration after stem cell transplantation. *Transplant Immunol* 2007; 18:115—21.
120. Majka M, Kijowski J, Lesko E, Gozdzik J, Zupanska B, Ratajczak MZ. Evidence that platelet-derived microvesicles may transfer platelet-specific immunoreactive antigens to the surface of endothelial cells and CD34+ hematopoietic stem/progenitor cells – implication for the pathogenesis of immune thrombocytopenias. *Folia Histochem Cytobiol* 2007; 45:27—32.
121. Deregibus MC, Cantaluppi V, Calogero R, Lo Iacono M, Tetta C, Biancone L, et al. Endothelial progenitor cell-derived microvesicles activate an angiogenic program in endothelial cells by an horizontal transfer of mRNA. *Blood* 2007; 110:2440—8.
122. 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* 2005;113:752—60.
123. Macey M, Azam U, McCarthy D, Webb L, Chapman ES, Okrongly D, et al. Evaluation of the anticoagulants EDTA and citrate, theophylline, adenosine, and dipyridamole (CTAD) for assessing platelet activation on the ADVIA 120 hematology system. *Clin Chem* 2002; 48: 891–9.
124. Philippe J, De Logi E, Baele G. Comparison of five different citrated tubes and their in vitro effects on platelet activation. *Clin Chem* 2004;50(3):656–8.
125. Golansky J, Pietrucha T, Baj Z, Greger J, Watala C. Molecular insights into the anticoagulant-induced spontaneous activation of platelets in whole blood- various anticoagulant are not equal. *Thromb Res* 1996; 83: 199–216.

126. Sabatier F, Darmon P, Hugel B, Combes V, Sanmarco M, Velut JG, Arnoux D, Charpiot P, Freyssinet JM, Oliver C, Sampol J, Dignat-George F. Type 1 and type 2 diabetic patients display different patterns of cellular microparticles. *Diabetes* 2002; 51: 2840–5.

127. Robert S, Poncelet P, Lacroix R, Arnaud L, Giraudo L, Hauchard A, Sampol J and Dignat-George F. Standardization of platelet-derived microparticle counting using calibrated beads and a Cytomics FC500 routine flow cytometer: a first step towards multicenter studies?. *Journal of Thrombosis and Haemostasis* 2008; 7: 190–197



---

**Nom – Prénoms :** Dugay Frédéric

**Titre du mémoire thèse :** Les microparticules circulantes: physiopathologie, mise au point du dosage plasmatique et applications médicales dans les gammopathies monoclonales et dans le traitement par la desmopressine

---

**Résumé du mémoire-thèse :**

Les microparticules (MPs) circulantes sont des vésicules membranaires de taille inférieure à 1  $\mu\text{m}$ , libérées dans l'espace extracellulaire suite à l'activation ou à l'apoptose cellulaire. Leur origine est principalement plaquettaire. Elles sont retrouvées dans le sang circulant de volontaires sains et leurs taux plasmatiques augmentent dans certaines pathologies à risque thrombotique accru, mais également dans le cancer et en particulier dans le myélome. La cytométrie en flux est la technique la plus largement adoptée pour leur détection et leur dosage qui sont réalisés sur du plasma sans plaquettes (PFP, Platelet Free Plasma) obtenu après double centrifugation de sang total prélevé sur tube citraté. L'intérêt de les doser serait double : d'une part dans le diagnostic de ces pathologies où elles sont sensiblement augmentées et d'autre part dans le pronostic et le suivi de ces mêmes pathologies. Ce travail de thèse a consisté dans un premier temps en une mise au point de la méthode de détection des MPs par cytométrie en flux. Leur potentiel pro-coagulant a été évalué en parallèle en utilisant un test de coagulation uniquement dépendant des phospholipides du patient. Deux applications médicales ont été réalisées dans un second temps: la première consistant en la numération, la caractérisation et la mesure de l'activité pro-coagulante des MPs dans les gammopathies monoclonales et la deuxième consistant en l'évaluation de l'évolution du taux des MPs après traitement intraveineux de MINIRIN<sup>®</sup> chez des patients atteints de maladie hémorragique héréditaire de type maladie de Willebrand ou hémophilie A.

---

**MOTS CLÉS :** MICROPARTICULES, PLAQUETTES, CYTOMETRIE EN FLUX, PFP, GAMMAPATHIE MONOCLONALE, DESMOPRESSINE

---