



**HAL**  
open science

# Evaluation et caractérisation de trois méthodes d'étude des microparticules procoagulantes chez des patients en phase aigue de l'AVC ischémique

Carole Pellegrini

## ► To cite this version:

Carole Pellegrini. Evaluation et caractérisation de trois méthodes d'étude des microparticules procoagulantes chez des patients en phase aigue de l'AVC ischémique. Sciences pharmaceutiques. 2012. hal-01733600

**HAL Id: hal-01733600**

**<https://hal.univ-lorraine.fr/hal-01733600>**

Submitted on 14 Mar 2018

**HAL** is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.



## AVERTISSEMENT

Ce document est le fruit d'un long travail approuvé par le jury de soutenance et mis à disposition de l'ensemble de la communauté universitaire élargie.

Il est soumis à la propriété intellectuelle de l'auteur. Ceci implique une obligation de citation et de référencement lors de l'utilisation de ce document.

D'autre part, toute contrefaçon, plagiat, reproduction illicite encourt une poursuite pénale.

Contact : [ddoc-thesesexercice-contact@univ-lorraine.fr](mailto:ddoc-thesesexercice-contact@univ-lorraine.fr)

## LIENS

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 122. 4

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 335.2- L 335.10

[http://www.cfcopies.com/V2/leg/leg\\_droi.php](http://www.cfcopies.com/V2/leg/leg_droi.php)

<http://www.culture.gouv.fr/culture/infos-pratiques/droits/protection.htm>



**UNIVERSITE DE LORRAINE**

**2012**

---

**FACULTE DE PHARMACIE**

**MEMOIRE**  
**du DIPLOME D'ETUDES SPECIALISEES**  
**de BIOLOGIE MEDICALE**

Soutenu devant le Jury Interrégional

Le 4 Mai 2012

Par **Carole PELLEGRINI**  
née le 08.11.1985

Conformément aux dispositions de l'arrêté  
du 4 octobre 1988 tient lieu de

**THESE**  
**pour le DIPLOME D'ETAT**  
**de DOCTEUR en PHARMACIE**

---

**Evaluation et caractérisation de trois méthodes d'étude  
des microparticules procoagulantes  
chez des patients en phase aiguë de l'AVC ischémique**

---

Membres du Jury

Président : Mme le Professeur C. FINANCE, PU-PH, Université de Lorraine, CHU Nancy

Directeur : Mme le Docteur M. TOUSSAINT-HACQUARD, Praticien attaché, CHU Nancy

Juges : M le Professeur D. WAHL, PU-PH, Université de Lorraine, CHU Nancy

M le Professeur T. LECOMPTE, Professeur d'Hématologie, Université de Genève, HCU Genève

M le Docteur S. RICHARD, PH, CHU Nancy

Mme le Docteur F. TOTI, MCU, Faculté de Médecine, Strasbourg

**UNIVERSITE DE LORRAINE**  
**FACULTÉ DE PHARMACIE**  
**Année universitaire 2011-2012**

**DOYEN**

Francine PAULUS

**Vice-Doyen**

Francine KEDZIEREWICZ

**Directeur des Etudes**

Virginie PICHON

**Président du Conseil de la Pédagogie**

Bertrand RIHN

**Président de la Commission de la Recherche**

Christophe GANTZER

**Président de la Commission Prospective Facultaire**

Jean-Yves JOUZEAU

**Responsable de la Cellule de Formations Continue et Individuelle**

Béatrice FAIVRE

**Responsable ERASMUS :**

Francine KEDZIEREWICZ

**Responsable de la filière Officine :**

Francine PAULUS

**Responsables de la filière Industrie :**

Isabelle LARTAUD,  
Jean-Bernard REGNOUF de VAINS

**Responsable du Collège d'Enseignement  
Pharmaceutique Hospitalier :**

Jean-Michel SIMON

**Responsable Pharma Plus E.N.S.I.C. :**

Jean-Bernard REGNOUF de VAINS

**Responsable Pharma Plus E.N.S.A.I.A. :**

Bertrand RIHN

**DOYENS HONORAIRES**

Chantal FINANCE  
Claude VIGNERON

**PROFESSEURS EMERITES**

Jeffrey ATKINSON  
Gérard SIEST  
Claude VIGNERON

**PROFESSEURS HONORAIRES**

Roger BONALY  
Pierre DIXNEUF  
Marie-Madeleine GALTEAU  
Thérèse GIRARD  
Maurice HOFFMANN  
Michel JACQUE  
Lucien LALLOZ  
Pierre LECTARD  
Vincent LOPPINET  
Marcel MIRJOLET  
François MORTIER  
Maurice PIERFITTE  
Janine SCHWARTZBROD  
Louis SCHWARTZBROD

**MAITRES DE CONFERENCES HONORAIRES**

Monique ALBERT  
Gérald CATAU  
Jean-Claude CHEVIN  
Jocelyne COLLOMB  
Bernard DANGIEN  
Marie-Claude FUZELLIER  
Françoise HINZELIN  
Marie-Hélène LIVERTOUX  
Bernard MIGNOT  
Jean-Louis MONAL  
Dominique NOTTER  
Marie-France POCHON  
Anne ROVEL  
Maria WELLMAN-ROUSSEAU

**ASSISTANT HONORAIRE**

Marie-Catherine BERTHE  
Annie PAVIS

<b>ENSEIGNANTS</b>	<b>Section CNU*</b>	<b>Discipline d'enseignement</b>
<b>PROFESSEURS DES UNIVERSITES - PRATICIENS HOSPITALIERS</b>		
Danièle BENSOUSSAN-LEJZEROWICZ ♣	82	<i>Thérapie cellulaire</i>
Chantal FINANCE	82	<i>Virologie, Immunologie</i>
Jean-Yves JOUZEAU	80	<i>Bioanalyse du médicament</i>
Jean-Louis MERLIN ♣	82	<i>Biologie cellulaire</i>
Jean-Michel SIMON	81	<i>Economie de la santé, Législation pharmaceutique</i>

**PROFESSEURS DES UNIVERSITES**

Jean-Claude BLOCK	87	<i>Santé publique</i>
Christine CAPDEVILLE-ATKINSON	86	<i>Pharmacologie</i>
Pascale FRIANT-MICHEL	85	<i>Mathématiques, Physique</i>
Christophe GANTZER	87	<i>Microbiologie</i>
Max HENRY	87	<i>Botanique, Mycologie</i>
Pierre LABRUDE	86	<i>Physiologie, Orthopédie, Maintien à domicile</i>
Isabelle LARTAUD	86	<i>Pharmacologie</i>
Dominique LAURAIN-MATTAR	86	<i>Pharmacognosie</i>
Brigitte LEININGER-MULLER	87	<i>Biochimie</i>
Pierre LEROY	85	<i>Chimie physique</i>
Philippe MAINCENT	85	<i>Pharmacie galénique</i>
Alain MARSURA	32	<i>Chimie organique</i>
Patrick MENU	86	<i>Physiologie</i>
Jean-Bernard REGNOUF de VAINS	86	<i>Chimie thérapeutique</i>
Bertrand RIHN	87	<i>Biochimie, Biologie moléculaire</i>

**MAITRES DE CONFÉRENCES - PRATICIENS HOSPITALIERS**

Béatrice DEMORE	81	<i>Pharmacie clinique</i>
Nathalie THILLY	81	<i>Santé publique</i>

**MAITRES DE CONFÉRENCES**

Sandrine BANAS	87	<i>Parasitologie</i>
Mariette BEAUD	87	<i>Biologie cellulaire</i>
Emmanuelle BENOIT	86	<i>Communication et santé</i>
Isabelle BERTRAND	87	<i>Microbiologie</i>
Michel BOISBRUN	86	<i>Chimie thérapeutique</i>
François BONNEAUX	86	<i>Chimie thérapeutique</i>
Ariane BOUDIER	85	<i>Chimie Physique</i>
Cédric BOURA	86	<i>Physiologie</i>
Igor CLAROT	85	<i>Chimie analytique</i>
Joël COULON	87	<i>Biochimie</i>
Sébastien DADE	85	<i>Bio-informatique</i>
Dominique DECOLIN	85	<i>Chimie analytique</i>
Roudayna DIAB	85	<i>Pharmacie clinique</i>
Joël DUCOURNEAU	85	<i>Biophysique, Acoustique</i>
Florence DUMARCAY	86	<i>Chimie thérapeutique</i>
François DUPUIS	86	<i>Pharmacologie</i>

<b>ENSEIGNANTS (suite)</b>	<b>Section CNU*</b>	<b>Discipline d'enseignement</b>
Raphaël DUVAL	87	Microbiologie
Béatrice FAIVRE	87	Hématologie
Adil FAIZ	85	Biophysique, Acoustique
Luc FERRARI	86	Toxicologie
Caroline GAUCHER-DI STASIO	85/86	Chimie physique, Pharmacologie
Stéphane GIBAUD	86	Pharmacie clinique
Thierry HUMBERT	86	Chimie organique
Frédéric JORAND	87	Santé publique
Olivier JOUBERT	86	Toxicologie
Francine KEDZIEREWICZ	85	Pharmacie galénique
Alexandrine LAMBERT	85	Informatique, Biostatistiques
Faten MERHI-SOUSSI	87	Hématologie
Christophe MERLIN	87	Microbiologie
Blandine MOREAU	86	Pharmacognosie
Maxime MOURER	86	Chimie organique
Francine PAULUS	85	Informatique
Christine PERDIAKIS	86	Chimie organique
Caroline PERRIN-SARRADO	86	Pharmacologie
Virginie PICHON	85	Biophysique
Anne SAPIN-MINET	85	Pharmacie galénique
Marie-Paule SAUDER	87	Mycologie, Botanique
Gabriel TROCKLE	86	Pharmacologie
Mihayl VARBANOV ☒	87	Immuno-Virologie
Marie-Noëlle VAULTIER	87	Mycologie, Botanique
Emilie VELOT ☒	86	Physiologie-Physiopathologie humaines
Mohamed ZAIYOU	87	Biochimie et Biologie moléculaire
Colette ZINUTTI	85	Pharmacie galénique

**PROFESSEUR ASSOCIE**

Anne MAHEUT-BOSSER	86	Sémiologie
--------------------	----	------------

**PROFESSEUR AGREGÉ**

Christophe COCHAUD	11	Anglais
--------------------	----	---------

☒ En attente de nomination

\*Discipline du Conseil National des Universités :

80ème et 85ème : Sciences physico-chimiques et ingénierie appliquée à la santé

81ème et 86ème : Sciences du médicament et des autres produits de santé

82ème et 87ème : Sciences biologiques, fondamentales et cliniques

32ème : Chimie organique, minérale, industrielle

11ème : Langues et littératures anglaises et anglo-saxonnes

# SERMENT DES APOTHICAIRES



**Je jure, en présence des maîtres de la Faculté, des conseillers de l'ordre des pharmaciens et de mes condisciples :**

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

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

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

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

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



« LA FACULTE N'ENTEND DONNER AUCUNE APPROBATION,  
NI IMPROBATION AUX OPINIONS EMISES DANS LES THESES,  
CES OPINIONS DOIVENT ETRE CONSIDEREES COMME  
PROPRES A LEUR AUTEUR ».

## Remerciements

---

A notre Président de Thèse  
Madame le Professeur Chantal FINANCE

Nous sommes sensibles à l'honneur que vous nous faites en acceptant de présider le jury de cette thèse. Vos enseignements ont été forts intéressants pendant toutes nos années d'études. Veuillez trouver ici le témoignage de notre sincère admiration et de notre plus profond respect.

A notre Directeur de Thèse  
Madame le Docteur Marie TOUSSAINT-HACQUARD

Vous nous avez fait l'honneur d'accepter de diriger cette thèse. Nous vous remercions pour votre gentillesse, votre disponibilité et votre implication dans ce travail. Nous n'aurions pu trouver meilleur directeur de thèse. Que ce travail soit le témoin de notre sincère reconnaissance et de notre profonde estime.

A notre juge  
Monsieur le Professeur Thomas LECOMPTE

Nous vous remercions de l'intérêt que vous avez porté à ce travail ainsi que d'avoir accepté d'en être le juge. Nous avons effectué notre premier stage d'hématologie dans votre service où nous avons pu apprendre à votre contact rigueur et travail approfondi. Veuillez recevoir toute notre gratitude et notre plus grand respect.

A notre juge  
Monsieur le Professeur Denis WAHL

Vous nous faites l'honneur d'avoir accepté d'examiner ce travail. Soyez assuré de notre plus grand respect et de notre profonde estime.

A notre juge  
Monsieur le Docteur Sébastien RICHARD

Vous nous faites l'honneur d'avoir accepté de siéger parmi ce jury de thèse. Grâce à vous, ce travail a pu aboutir. Veuillez trouver ici l'expression de notre vive reconnaissance et de notre profonde gratitude.

A notre juge  
Madame le Docteur Florence TOTI

Vos nombreux écrits sur le sujet des microparticules nous ont permis d'appréhender clairement nos réflexions. Nous sommes pour cela honorés que vous ayez accepté de juger notre travail. Veuillez recevoir toute notre gratitude et notre profond respect.

A mes parents

Vous avez su me donner le goût de travailler en aimant cela. Vous m'avez conseillée et guidée au cours de toutes ces années. Grâce à vous je peux dire que je suis heureuse du métier que je vais exercer.  
Merci tout simplement d'avoir été présents à chaque instant.

A mes sœurs

Vous avez toujours été à mes côtés pendant ces années. Merci pour votre soutien, vos éclats de rire et votre bonne humeur permanente.

A Damien

Ma moitié, ma plus belle rencontre. Ta présence à mes côtés m'a permis de m'accomplir pleinement. Tu es ma source d'équilibre et de bonheur permanent. Merci.

A ma famille

Toujours présente, refuge pour se changer les idées et profiter du temps sans se presser.

A la famille VIGNAUD

Pour votre gentillesse. J'apprécie énormément les moments passés en votre compagnie.

A Qing, Amina, Charlotte et Agathe

Amies depuis nos plus jeunes années, je suis heureuse d'avoir passé une partie de mes études à vos côtés. Chacune a suivi son chemin, mais je vous retrouve toujours avec beaucoup de plaisir.

Aux "filles", Joséphine, Laetitia et Sophie

Nous nous sommes soutenues et bien amusées pendant toutes ces années passées sur les bancs de la fac. Dorénavant de nouveaux horizons s'offrent à nous... mais sans jamais oublier nos petits week-ends entre copines, que j'apprécie tant. Merci pour tous ces bons moments.

A Béné et Estelle

Premières heures passées ensemble en cours, premières copines de fac. Je suis heureuse que nous ayons continué notre chemin ensemble pendant ces années.

A Vanessa, ma « binôme »

Grâce à toi, les TP se sont toujours passés dans la bonne humeur.

A Anne, Thomas, Simon, Sulina, Maxime, Anne-Claire, Laure, Aline, Marc, Adrien, Arnaud, Ben et Sophie, Camille, Pauline, Coline et les autres

Pour toutes les bonnes soirées passées ensemble, les galas et les week-ends. Grâce à vous, ces années de fac ont été très agréables. Et celles à venir également.

A Jean-Baptiste, Camille, Jérémie et Vincent

Grâce à Damien je vous ai rencontrés et tout de suite beaucoup appréciés. Je me réjouis toujours de pouvoir passer du temps avec vous.

A Amélie, Isabelle et Laure

Après les bancs de la fac, nous nous sommes retrouvées au gré des stages. Ce fut toujours un plaisir de travailler et passer ces années avec vous.

A Leila, Stéphane

La vie est faite de rencontre. Je suis très heureuse qu'il ait fallu que vous veniez de Nantes pour que la notre soit possible ! Vous êtes devenus des amis très chers que j'apprécie énormément.

A tous les internes ainsi qu'à Lorène

Je suis très heureuse que l'internat vous ait menés jusqu'en Lorraine, car les stages passés à vos côtés ont toujours été très agréables.

Aux biologistes et techniciens

Pour votre formation. Merci de m'avoir appris et fait aimer le travail de biologiste.

A Veronique LATGER-CANNARD

Merci de ton implication dans la partie cytométrie en flux sur la plateforme NancyTomique qui m'a permis de mener à bien ce travail.

A Frédéric MASSIN

Merci de ton implication dans ce travail, du temps que tu y as accordé et de ta gentillesse.

A Gauthier, Clément et Jérémy

Grâce à vous, ce travail a pu aboutir. Merci pour les heures passées devant le cytomètre en flux, toujours dans la bonne humeur.

# Table des matières

---

I. INTRODUCTION.....	8
II. LES MICROPARTICULES PROCOAGULANTES : Revue de la littérature.....	9
II.1. GENERATION DES MICROPARTICULES.....	9
II.1.1. Mécanismes cellulaires.....	9
II.1.1.1. L'activation cellulaire.....	9
II.1.1.2. L'apoptose.....	10
II.1.2. Mécanismes biochimiques.....	11
II.1.2.1. La flippase.....	12
II.1.2.2. La floppase.....	12
II.1.2.3. Les scramblases.....	12
II.1.2.4. La calpaïne.....	13
II.1.2.5. La gelsoline.....	13
II.1.3. Le « flip-flop » membranaire et la production de microparticules.....	13
II.2. COMPOSITION DES MICROPARTICULES.....	15
II.2.1. Phospholipides.....	15
II.2.2. Protéines.....	16
II.3. INTERET DES MICROPARTICULES.....	18
II.3.1. Effecteurs biologiques.....	18
II.3.1.1. Rôle dans la coagulation et la formation du thrombus.....	18
II.3.1.1.1. Effet procoagulant.....	19
II.3.1.1.2. Effet anticoagulant.....	20
II.3.1.1.3. Syndrome de Scott.....	21
II.3.1.2. Rôle dans l'inflammation.....	22
II.3.1.3. Rôle dans la fonction vasculaire.....	23
II.3.1.4. Rôle dans l'angiogenèse.....	24
II.3.2. Pathologies athéromateuses.....	25
II.3.3. Accidents vasculaires cérébraux ischémiques.....	28
II.3.4. Autres pathologies.....	29
II.4. MISE EN EVIDENCE DES MICROPARTICULES.....	29
II.4.1. Conditions pré-analytiques.....	29
II.4.2. Dosage des microparticules.....	30
III. TRAVAIL EXPERIMENTAL.....	33
III.1. MATERIEL ET METHODE.....	33
III.1.1. Objectifs.....	33
III.1.2. Echantillons.....	34
III.1.3. Méthode.....	35
III.1.3.1. Test de coagulation STA Procoag PPL®.....	35

III.1.3.1.1. Principes généraux.....	35
III.1.3.1.2. Application aux microparticules.....	35
III.1.3.2. La thrombinographie.....	36
III.1.3.2.1. Principes généraux.....	36
III.1.3.2.2. Application aux microparticules.....	39
III.1.3.3. La cytométrie en flux.....	40
III.1.3.3.1. Principes généraux.....	40
III.1.3.3.2. Application aux microparticules.....	42
III.1.3.4. Etude statistique.....	46
III.2. RESULTATS.....	47
III.2.1. STA Procoag PPL®.....	47
III.2.1.1. Témoins versus patients.....	47
III.2.1.2. Avant versus après centrifugation.....	49
III.2.2. Thrombinographie.....	52
III.2.2.1. Témoins versus patients.....	52
III.2.2.2. Avant versus après centrifugation.....	53
III.2.3. Cytométrie en flux.....	56
III.2.3.1. Témoins versus patients.....	56
III.2.3.2. Avant versus après centrifugation.....	59
III.2.4. Etudes de corrélation.....	60
III.2.4.1. Corrélation entre les tests fonctionnels.....	60
III.2.4.2. Corrélation entre tests fonctionnels et cytométrie en flux.....	62
IV. DISCUSSION.....	64
V. CONCLUSION.....	74
VI. REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES.....	75
VII. ANNEXES.....	80

ANNEXE I : Poster présenté à l'ISTH 2011 et à la SFTS 2011

ANNEXE II : Protocole d'immunomarquage des microparticules pour l'analyse en cytométrie en flux

ANNEXE III : Valeurs obtenues avec le STA Procoag PPL®

ANNEXE IV : Valeurs obtenues par thrombinographie

ANNEXE V : Valeurs obtenues en cytométrie en flux

## Liste des figures

---

Figure 1 : Schéma des principaux mécanismes impliqués dans la formation des microparticules pendant l'activation cellulaire (A.) et l'apoptose (B.).....	10
Figure 2 : Répartition des phospholipides membranaires et activité des enzymes assurant leur transport au niveau de la membrane plasmique d'une cellule au repos .....	14
Figure 3 : Répartition des phospholipides membranaires et activité des enzymes assurant leur transport au niveau de la membrane plasmique d'une cellule activée .....	14
Figure 4 : Réarrangement du cytosquelette des cellules stimulées et formation d'une microparticule.....	15
Figure 5 : Représentation schématique des constituants d'une microparticule .....	16
Figure 6 : Principaux antigènes utilisés pour caractériser l'origine cellulaire des microparticules.....	17
Figure 7 : Schéma de la cascade de coagulation .....	19
Figure 8 : Schéma de la cascade de coagulation et ses inhibiteurs.....	21
Figure 9 : Microparticules et réactivité vasculaire .....	24
Figure 10 : Microparticules et progression de la plaque d'athérome .....	26
Figure 11 : Microparticules et exosomes visualisés en microscopie électronique .....	30
Figure 12 : Principe du test de coagulation STA Procoag PPL®.....	35
Figure 13 : Thrombinogramme type obtenu à partir d'un plasma riche en plaquettes .....	38
Figure 14 : Paramètres du thrombinogramme .....	39
Figure 15 : Paramètres mesurés en cytométrie en flux.....	40
Figure 16 : Longueurs d'ondes d'excitation et d'émission des principaux fluorochromes utilisés en cytométrie en flux .....	41
Figure 17 : Représentation schématique d'un cytomètre en flux .....	42
Figure 18 : Principaux antigènes permettant l'identification du phénotype cellulaire d'origine des microparticules.....	43
Figure 19 : Standardisation de la détection des microparticules par le Mégamix® .....	43
Figure 20 : Représentation taille (FS)-structure (SS) des particules visualisées en CMF .....	44
Figure 21 : Fenêtre de quantification des microparticules totales par CMF.....	45
Figure 22 : Fenêtres d'identification des microparticules AnnexineV+marqueur de lignée+ par CMF .....	46
Figure 23 : Répartition des temps de coagulation obtenus avec le STA Procoag PPL® .....	47
Figure 24 : Temps de coagulation obtenus avec le STA Procoag PPL® en fonction du TCA .....	48
Figure 25 : Temps de coagulation obtenus avec le STA Procoag PPL® en fonction du Quick activité .....	48
Figure 26 : Temps de coagulation obtenus avec le STA Procoag PPL® en fonction du fibrinogène .....	48
Figure 27 : Répartition des temps de coagulation obtenus avec le STA Procoag PPL® avant et après centrifugation .....	49
Figure 28 : Répartition des ratios des temps de coagulation obtenus avec le STA Procoag PPL® .....	50
Figure 29 : Ratios obtenus avec le STA Procoag PPL® en fonction du TCA .....	51

Figure 30 : Ratios obtenus avec le STA Procoag PPL® en fonction du Quick activité.....	51
Figure 31 : Ratios obtenus avec le STA Procoag PPL® en fonction du fibrinogène.....	51
Figure 32 : Thrombinogrammes obtenus avec le réactif PRP-Reagent® (FT à 1 pM).....	52
Figure 33 : Répartition des temps de latence (A.), temps au pic (B.), hauteur de pic (C.) et ETP (D.) obtenus avec le réactif PRP-Reagent® (FT à 1 pM).....	53
Figure 34 : Thrombinogrammes types obtenus avec le réactif PRP-Reagent® (FT à 1 pM) avant et après centrifugation.....	54
Figure 35 : Répartition des temps de latence (A.) et des temps au pic (B.) obtenus avec le réactif PRP-Reagent® (FT à 1 pM) avant et après centrifugation.....	55
Figure 36 : Répartition des hauteurs de pic (A.) et des ETP (B.) obtenus avec le réactif PRP-Reagent® (FT à 1 pM) avant et après centrifugation.....	55
Figure 37 : Répartition du nombre total de microparticules obtenu par CMF.....	56
Figure 38 : Mise en évidence par CMF des microparticules d'origine plaquettaire (AV+CD41+).....	57
Figure 39 : Mise en évidence par CMF des microparticules d'origine érythrocytaire (AV+CD235a+).....	57
Figure 40 : Mise en évidence par CMF des microparticules d'origine leucocytaire (AV+CD45+).....	58
Figure 41 : Mise en évidence par CMF des microparticules d'origine endothéliale (AV+CD144+).....	58
Figure 42 : Proportion des microparticules en fonction de leur origine cellulaire après analyse par CMF.....	59
Figure 43 : Répartition du nombre total de microparticules obtenu par CMF avant et après centrifugation.....	59
Figure 44 : Corrélation entre le temps de coagulation obtenu avec le STA Procoag PPL® et respectivement la hauteur de pic et l'ETP obtenus avec le réactif PRP-Reagent® (FT à 1 pM).....	60
Figure 45 : Corrélation entre le temps de coagulation obtenu avec le STA Procoag PPL® et respectivement le temps de latence et le temps au pic obtenus avec le réactif PRP-Reagent® (FT à 1 pM).....	61
Figure 46 : Corrélation chez les patients entre le temps de coagulation obtenu avec le STA Procoag PPL® et respectivement la hauteur de pic et l'ETP obtenus avec le réactif PRP-Reagent® (FT à 1 pM).....	61
Figure 47 : Corrélation entre le nombre total de microparticules obtenu par CMF et respectivement le temps de coagulation (A.) obtenu avec le STA Procoag PPL®, l'ETP (B.) et la hauteur de pic (C.) obtenus avec le réactif PRP-Reagent® (FT à 1 pM).....	62
Figure 48 : Corrélation entre le nombre total de microparticules obtenu par CMF et respectivement le temps de coagulation (A.) obtenu avec le STA Procoag PPL®, l'ETP (B.) et la hauteur de pic (C.) obtenus avec le réactif PRP Reagent® (FT à 1 pM) avant centrifugation.....	63

## Liste des tableaux

---

Tableau 1 : Récapitulatif des différentes techniques de dosage des microparticules .....	32
Tableau 2 : Paramètres obtenus avec le STA Procoag PPL® .....	47
Tableau 3 : Paramètres obtenus avec le STA Procoag PPL® avant et après centrifugation .....	49
Tableau 4 : Ratios des temps de coagulation obtenus avec le STA Procoag PPL®.....	50
Tableau 5 : Paramètres des thrombinogrammes obtenus avec le réactif PRP-Reagent® (FT à 1 pM).....	52
Tableau 6 : Paramètres des thrombinogrammes obtenus avec le réactif PRP-Reagent® (FT à 1 pM) avant et après centrifugation .....	54
Tableau 7 : Paramètres obtenus par CMF .....	56
Tableau 8 : Répartition des microparticules mesurées par CMF en fonction de leur origine cellulaire .....	57

## Liste des abréviations

---

<b>Sigle</b>	<b>Nom développé</b>
<b>ABC</b>	ATP-Binding-Cassette
<b>ACD</b>	Acide citrique, Citrate de sodium, Dextrose
<b>ADN</b>	Acide Désoxyribonucléique
<b>ARN</b>	Acide Ribonucléique
<b>ATP</b>	Adénosine Triphosphate
<b>AV</b>	Annexine V
<b>AVC</b>	Accident Vasculaire Cérébral
<b>Ca</b>	Calcium
<b>CAT</b>	Calibrated Automated Thrombogram®
<b>CD</b>	Cluster de différenciation
<b>CMF</b>	Cytométrie en flux
<b>EDTA</b>	Acide Ethylène Diamine Tétracétique
<b>ETP</b>	Endogenous Thrombine Potential
<b>Fas</b>	Fragment Apoptosis Stimulating
<b>FT</b>	Facteur tissulaire
<b>ICAM</b>	Molécule d'adhésion intercellulaire
<b>IL</b>	Interleukine
<b>IRM</b>	Imagerie par résonance magnétique
<b>ISTH</b>	Société Internationale de Thrombose et d'Hémostase
<b>LDL</b>	Lipoprotéine de faible densité
<b>MMP</b>	Métalloprotéase matricielle
<b>MPs</b>	Microparticules
<b>NADPH</b>	Nicotinamide Adénine Dinucléotide Phosphate
<b>NO</b>	Monoxyde d'azote
<b>NOS</b>	NO synthase
<b>PDP</b>	Plasma dépourvu en plaquettes
<b>PPP</b>	Plasma pauvre en plaquettes
<b>PRP</b>	Plasma riche en plaquettes
<b>RANTES</b>	Regulated in activation, normal T-cell expressed and secreted

---

<b>Sigle</b>	<b>Nom développé</b>
<b>ROCK</b>	Rho-kinase
<b>TDM</b>	Tomodensitométrie
<b>TNF</b>	Tumor Necrosis Factor
<b>VCAM</b>	Molécule d'adhésion des cellules vasculaire

---

## I. INTRODUCTION

Les microparticules (MPs) sont des vésicules de petite taille, émises par différentes cellules. Elles se définissent par la présence à leur surface de molécules de phosphatidylsérine, phospholipide chargé négativement, qui leur confèrent des propriétés procoagulantes. Les microparticules peuvent ainsi être détectées par des tests de coagulation dépendant des phospholipides. Les cellules dont elles sont issues et les différents processus à l'origine de leur formation permettent d'expliquer la multiplicité de protéines de surface les composant. La nature de ces molécules est accessible par cytométrie en flux (CMF), technique qui permet également leur quantification.

L'intérêt porté aux microparticules n'a cessé de s'accroître ces dernières années. De nombreuses études ont ainsi été réalisées dans des pathologies où l'activation de l'hémostase participe à la physiopathologie de la maladie elle-même ou à ses complications. Ces études révèlent que les microparticules semblent à la fois être des marqueurs de l'atteinte cellulaire, mais également des vecteurs d'informations biologiques capables d'induire à distance une réponse tissulaire et cellulaire. Cependant peu d'études traitent de la comparaison des techniques d'analyses disponibles pour la mise en évidence de ces microparticules.

Ce travail a pour objectif de caractériser les microparticules chez des patients en phase aiguë d'accident vasculaire cérébral (AVC) ischémique, pathologie thrombotique connue comme étant associée à une augmentation du nombre des microparticules, à l'aide de trois techniques différentes. Nous avons étudié deux tests fonctionnels de coagulation, le STA Procoag PPL® et la thrombinographie, et un test de caractérisation phénotypique et de numération par cytométrie en flux. Nous avons comparé ces techniques entre les groupes témoins et patients. Nous avons ensuite tenté d'exprimer les résultats du STA Procoag PPL® de façon originale par un ratio entre temps de coagulation. Nous avons enfin évalué les corrélations entre les différentes techniques.

## **II. LES MICROPARTICULES PROCOAGULANTES :**

### **Revue de la littérature**

#### **II.1. GENERATION DES MICROPARTICULES**

Les microparticules sont de petites vésicules intactes qui proviennent des membranes cellulaires et qui circulent dans le plasma. Leur taille varie de 0,2 à 1  $\mu\text{m}$  (1, 2, 3) mais certains auteurs estiment qu'elles peuvent mesurer jusqu'à 2  $\mu\text{m}$  (4).

Il est nécessaire, pour leur définition, de les différencier des exosomes et des corps apoptotiques. Les premiers sont des éléments de taille inférieure (30 à 90 nm), pauvres en phosphatidylsérine et provenant d'une vésiculation intracellulaire d'origine endosomale. Les seconds possèdent une membrane riche en phosphatidylsérine mais leur taille est supérieure.

Toutes les cellules eucaryotes peuvent théoriquement être à l'origine de la formation des microparticules (5). Les études portent cependant principalement sur les microparticules d'origines plaquettaire, leucocytaire, endothéliale et érythrocytaire.

L'activation cellulaire et l'apoptose sont les deux principaux mécanismes impliqués dans leur génération par les surfaces cellulaires (3). L'activation cellulaire est une réponse rapide aux stimuli, caractérisée par une mobilisation de messagers secondaires comme le calcium sous forme ionisée. A l'opposé, l'apoptose, réponse plus lente (supérieure à 4 heures), aboutit à la fragmentation de l'ADN par stimulation d'enzymes de dégradation spécifiques. Ces deux phénomènes aboutissent à un réarrangement des aminophospholipides membranaires puis à un bourgeonnement de la surface cellulaire et à une libération de microparticules.

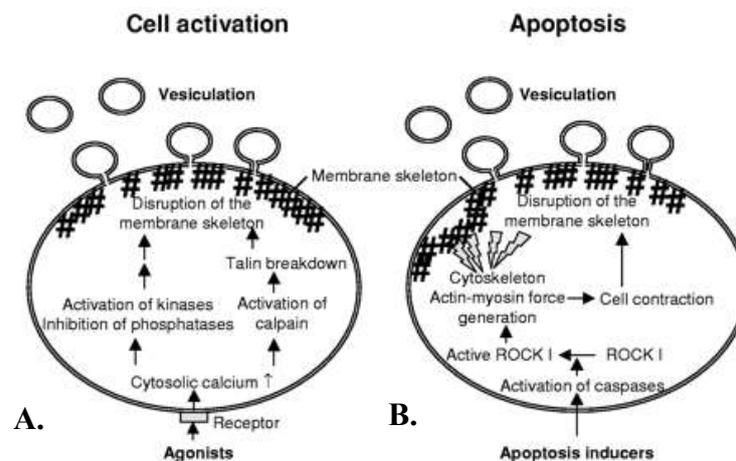
##### **II.1.1. Mécanismes cellulaires**

###### **II.1.1.1. L'activation cellulaire**

De nombreux agonistes peuvent agir sur les cellules et être à l'origine de la formation des microparticules. Les plaquettes sont activées par la thrombine, le complexe C5b-9 du complément, le stress oxydatif. Les monocytes et les cellules endothéliales peuvent, quant à

eux, libérer des microparticules suite à l'activation par la protéine C activée, des lipopolysaccharides bactériens ou des cytokines (TNF- $\alpha$ , IL-1) (6).

En général, la production de ces microparticules est temps et calcium-dépendante. En effet, le mécanisme commence rapidement après contact avec l'agent activateur et l'un des premiers signes de l'activation cellulaire est l'augmentation de la concentration en calcium intracellulaire. Cette augmentation de la concentration cytosolique active des kinases et inhibe des phosphatases (figure 1.A.) aboutissant à une déphosphorylation de diverses protéines au niveau de résidus tyrosine (7). Les enzymes concernées sont en particulier les kinases Ca<sup>2+</sup>/calmoduline-dépendantes dont la kinase de la chaîne légère de la myosine (8). Ces réactions se font en parallèle de l'activation de la calpaïne, protéine cytoplasmique calcium-dépendante impliquée dans le remaniement du cytosquelette, qui va permettre la réorganisation de celui-ci. Le rôle essentiel du calcium cytosolique est mis en évidence par une absence de libération de microparticules en présence de chélateurs du calcium extracellulaire qui bloquent l'augmentation du calcium intracellulaire. La cascade des réactions nécessaires à la formation de microparticules ne peut donc pas s'initier.



**Figure 1 : Schéma des principaux mécanismes impliqués dans la formation des microparticules pendant l'activation cellulaire (A.) et l'apoptose (B.) d'après (6)**

### II.1.1.2. L'apoptose

L'apoptose est un processus par lequel les cellules déclenchent leur auto-destruction en réponse à un signal. Elle est caractérisée par une contraction cellulaire, une fragmentation de l'ADN et un bourgeonnement membranaire à l'origine de la libération de microparticules. Ces

microparticules diffèrent des précédentes de part leur taille, leurs propriétés, et leur composition en lipides et protéines (9).

Le bourgeonnement membranaire dépend de l'activation d'une Rho-kinase : ROCK I (6). Celle-ci devient active lors du phénomène apoptotique grâce à son clivage par des caspases, elles-mêmes activées par les inducteurs de l'apoptose (figure 1.B.). Les caspases sont des protéines cytoplasmiques impliquées dans le remaniement du cytosquelette (7). ROCK I favorise alors le réarrangement du cytosquelette en régulant les interactions entre actine et myosine. L'activité de ROCK I et le bourgeonnement membranaire qui en résulte sont nécessaires à la distribution des fragments d'ADN de la région nucléaire jusque dans les vésicules.

ROCK II est une autre isoforme de Rho-kinase qui joue un rôle similaire dans les cellules endothéliales.

### II.1.2. Mécanismes biochimiques

Le remaniement de la membrane plasmique est l'élément fondamental de la formation des microparticules. Cette membrane est caractérisée par sa composition en phospholipides, dont la distribution asymétrique est essentielle au maintien de l'intégrité de la cellule : la phosphatidylsérine et la phosphatidyléthanolamine, phospholipides chargés négativement, sont séquestrées dans le feuillet interne, alors que la phosphatidylcholine et la sphingomyéline, phospholipides neutres, sont localisées dans le feuillet externe (10).

Le maintien de cette asymétrie est assurée par l'action de diverses enzymes et grâce à de l'énergie sous forme d'ATP (2). Ce sont ces mêmes enzymes qui sont impliquées dans la génération des microparticules : la flippase, la floppase, la scramblase, la calpaïne, et la gelsoline (présente uniquement dans les plaquettes).

Lors de l'activation cellulaire ou de l'apoptose, un « flip-flop » membranaire dépendant de l'augmentation du calcium cytosolique et des enzymes citées précédemment a lieu. Il entraîne une translocation des aminophospholipides chargés négativement du feuillet interne vers le feuillet externe. Il en résulte donc une externalisation de la phosphatidylsérine. La membrane, ainsi déstabilisée, bourgeonne et libère des microparticules.

Chaque enzyme joue un rôle particulier.

### II.1.2.1. La flippase

Cette enzyme est une aminophospholipide translocase. Elle présente une action hautement spécifique pour le transport des aminophospholipides (phosphatidylsérine et phosphatidyléthanolamine) du feuillet externe de la membrane plasmique, vers le feuillet interne (2).

Son activité est magnésium et ATP-dépendante avec utilisation d'une molécule d'ATP pour chaque phosphatidylsérine transportée. L'augmentation du calcium intracellulaire inhibe son action (4).

Elle assure le maintien de l'asymétrie membranaire.

### II.1.2.2. La floppase

Cette enzyme est également ATP-dépendante. Elle fait partie des transporteurs ABC (ATP-Binding Cassette) (11) et son action est l'inverse de celle de la flippase : elle permet le transport des lipides de l'intérieur de la cellule vers l'extérieur. Toutefois cette translocation n'est pas spécifique des aminophospholipides (4).

### II.1.2.3. Les scramblases

Quatre scramblases phospholipidiques ont été identifiées à ce jour. La PLSCR1 (Phospholipid Scramblase 1) est la principale scramblase présente au niveau des plaquettes (12).

Elles permettent un transport aspécifique bidirectionnel des phospholipides (2), dépendant de l'augmentation intracellulaire du calcium (4). Elles promeuvent ainsi la symétrie membranaire, avec répartition des charges négatives de part et d'autre de la membrane plasmique.

#### II.1.2.4. La calpaïne

Cette enzyme est une cystéine protéinase de la famille des papaïnases. Elle est également activée par une augmentation du calcium cytosolique.

Elle intervient à différents niveaux : elle active l'apoptose par la procaspase 3 et Bcl-xL, elle clive les filaments du cytosquelette membranaire et elle facilite le bourgeonnement des microparticules (4).

#### II.1.2.5. La gelsoline

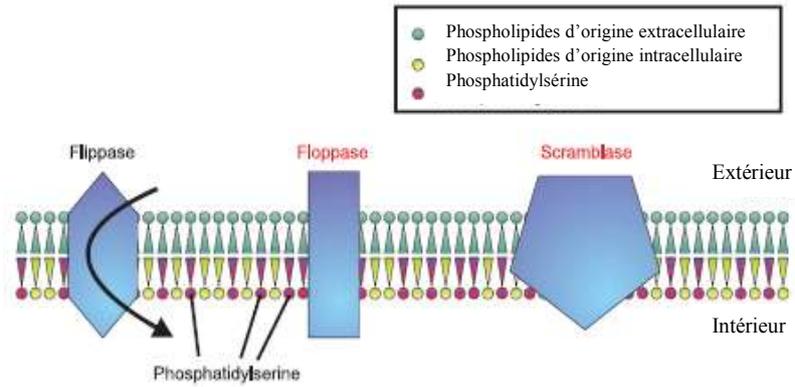
Cette molécule est présente au niveau des plaquettes, et permet donc la génération de microparticules de cette origine. Comme la scramblase et la calpaïne, elle est activée par l'augmentation du calcium cytosolique.

Elle agit au niveau des filaments d'actine, en permettant leur réorganisation puis la contraction plaquettaire.

#### II.1.3. Le « flip-flop » membranaire et la production de microparticules

En l'absence de toute stimulation, le calcium cellulaire est stocké dans le réticulum endoplasmique (4). La flippase, active, permet le transport de la phosphatidylsérine et de la phosphatidyléthanolamine du feuillet externe de la membrane plasmique au feuillet interne par consommation d'une molécule d'ATP par phosphatidylsérine transportée (figure 2). Ceci permet le maintien de la phosphatidylsérine à l'intérieur de la cellule et la stabilité des membranes, car la phosphatidylsérine interagit directement avec certaines protéines du cytosquelette comme la spectrine (13, 14). La floppase présente quant à elle une activité plus lente et la scramblase est inactive.

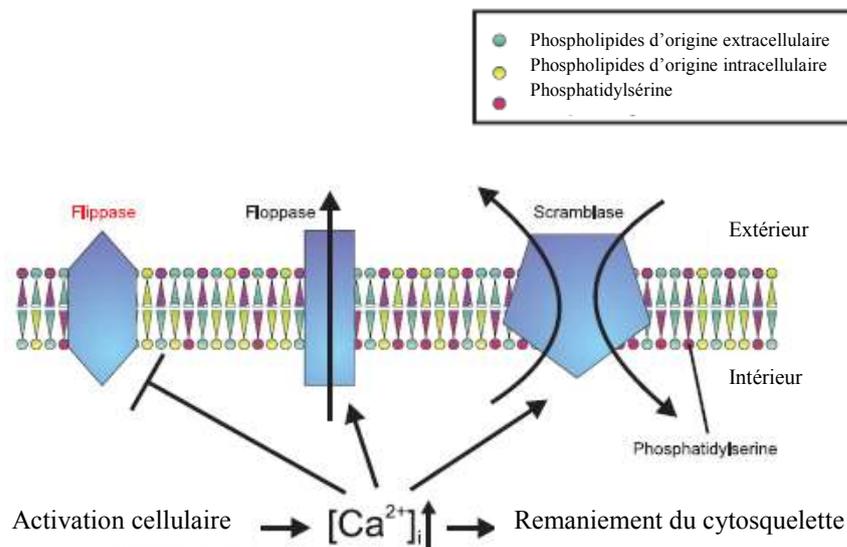
La flippase assure ainsi l'asymétrie de la membrane, nécessaire à sa stabilité et à son intégrité.



**Figure 2 : Répartition des phospholipides membranaires et activité des enzymes assurant leur transport au niveau de la membrane plasmique d'une cellule au repos adapté d'après (14)**

Lors de l'activation cellulaire (au sens large, incluant l'apoptose), le calcium est relargué par le réticulum endoplasmique assurant l'activation de la calpaïne et de la gelsoline (dans les plaquettes). Celles-ci agissent sur les filaments d'actine.

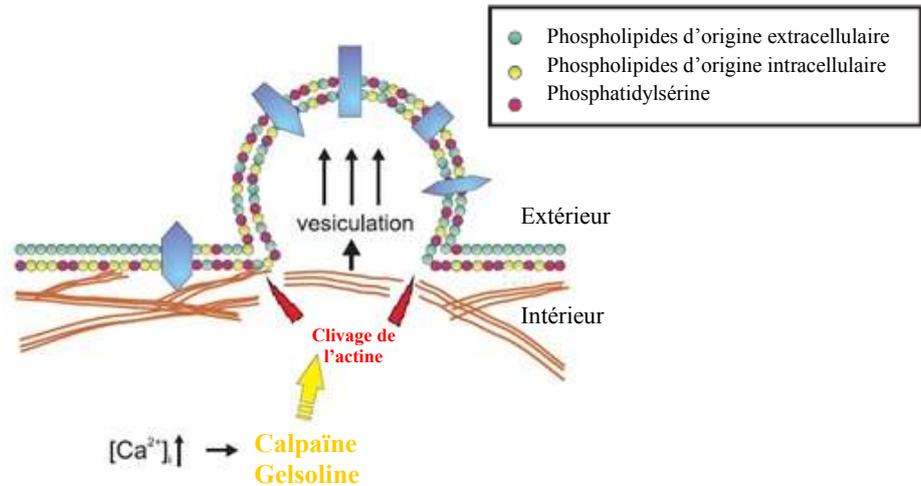
De plus, la floppase et la scramblase sont activées et la flippase est inhibée (figure 3).



**Figure 3 : Répartition des phospholipides membranaires et activité des enzymes assurant leur transport au niveau de la membrane plasmique d'une cellule activée adapté d'après (14)**

L'asymétrie de la répartition des phospholipides commence ainsi à être compromise et le cytosquelette subit des remaniements : l'actine et la spectrine sont clivées. La membrane

plasmique va alors se détacher du cytosquelette et bourgeonner du fait de la surcharge externe en phospholipides (figure 4) (15).



**Figure 4 : Réarrangement du cytosquelette des cellules stimulées et formation d'une microparticule adapté d'après (14)**

Les microparticules ainsi formées présentent à leur surface de la phosphatidylsérine.

## II.2. COMPOSITION DES MICROPARTICULES

Les microparticules sont composées essentiellement de phospholipides et de protéines. D'après les études réalisées, la nature de ces composants dépend d'une part de la nature des cellules émettrices (9) et d'autre part des conditions de stimulation cellulaire (apoptose versus activation cellulaire, nature de la molécule stimulante) (3).

### II.2.1. Phospholipides

Les microparticules sont composées d'une double couche phospholipidique provenant de la cellule émettrice. Mais leur composition dépend également du stimulus à l'origine de leur formation. Cependant, toutes les données concernant cette composition chez le sujet sain et le sujet malade, ne sont pas encore connues.

Les principaux phospholipides présents sont :

- la phosphatidylsérine et la phosphatidyléthanolamine, phospholipides chargés négativement.
- la phosphatidylcholine et la sphingomyéline phospholipides neutres.

Des phospholipides oxydés entrent également dans cette composition.

La phosphatidylsérine, présente à la surface des microparticules, est essentielle car elle permet d'une part la formation des complexes enzymatiques de la coagulation et d'autre part elle constitue un signal entraînant l'épuration des cellules sénescents par le système réticuloendothélial (3).

Elle apparaît ainsi comme la signature des microparticules (16).

## II.2.2. Protéines

Schématiquement, les microparticules sont composées d'un certain nombre de protéines (figure 5) : des clusters de différenciation, des cytoadhésines (dont des intégrines), des molécules du complexe majeur d'histocompatibilité, des protéines impliquées dans la régulation de l'apoptose (Fas, Caspase 3), des enzymes biologiquement actives (NADPH oxydase) et du facteur tissulaire (FT) (17).

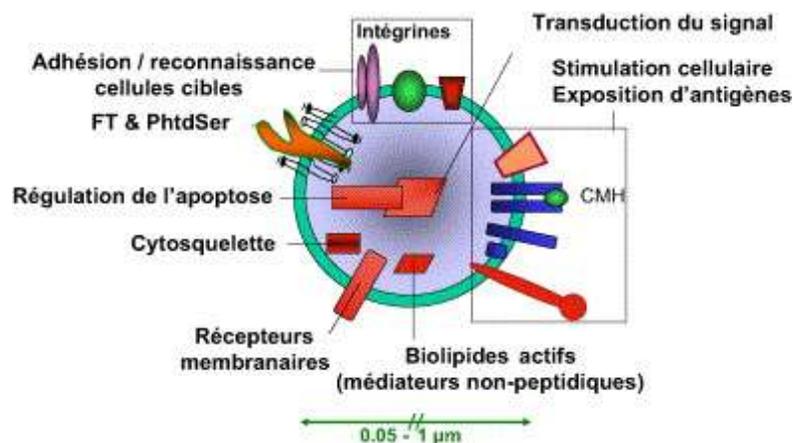


Figure 5 : Représentation schématique des constituants d'une microparticule d'après (17)

FT : Facteur Tissulaire, PhtdSer : Phosphatidylsérine, CMH : Complexe Majeur d'Histocompatibilité

Les microparticules exposent à leur surface des antigènes spécifiques de la cellule d'origine (18). Ceux-ci sont toujours présents pour une cellule d'origine donnée, indépendamment du signal entraînant leur formation (figure 6). Ils permettent l'identification de la source cellulaire (6). Par exemple, les microparticules d'origine plaquettaire expriment le CD41 (glycoprotéine GpIIb/IIIa), spécifique des plaquettes (9).

	Antigens	Specificity	Sensitivity (Fluorescence Intensity in Vitro)
Platelet-MP	CD41	+++	+++
	CD42 (a or b)	+++	+++
	CD61	++	++
Erythrocyte-MP <sup>a</sup>	CD235a	+++	+++
Leukocyte-MP	CD45	+++	+
	CD11b*	+++	++
	CD14 <sup>†</sup>	+++	+
	CD66b <sup>‡</sup>	+++	++
Endothelial-MP	CD144	+++	+/-
	CD146-LeuMP	++	+++
	CD105-LeuMP	++	++
	CD31-PMP	+	+++
	CD62E	+++	+

<sup>a</sup>Myeloid and NK cells-derived MP.  
<sup>†</sup>Monocytes-derived MP.  
<sup>‡</sup>Granulocytes-derived MP.  
 MP, microparticles; LeuMP, leukocyte MP; PMP, platelet MP.

**Figure 6 : Principaux antigènes utilisés pour caractériser l'origine cellulaire des microparticules adapté d'après (18)**

D'autre part, l'agoniste à l'origine de la formation des microparticules et la nature de la stimulation peuvent entraîner la présence de marqueurs phénotypiques différents (6) : par exemple, après activation inflammatoire, les microparticules endothéliales libérées sont riches en E-sélectine, une cytoadhésine inductible impliquée dans le « rolling » des leucocytes à l'endothélium. Mais lorsque ces microparticules sont émises par un endothélium en apoptose, elles sont particulièrement riches en CD31, une protéine constitutive de la membrane endothéliale (2).

Il a aussi été mis en évidence qu'il existe des différences antigéniques entre les microparticules et les cellules dont elles sont issues, et ceci indépendamment de leur activation (6).

A côté de ces différents constituants membranaires, le facteur tissulaire (CD142) éventuellement présent, confère des caractéristiques fonctionnelles aux microparticules permettant d'expliquer, avec la phosphatidylsérine, leur activité procoagulante.

Cette glycoprotéine transmembranaire est exprimée par de nombreuses cellules de façon constitutive ou inductible. Ainsi, les fibroblastes et les cellules musculaires lisses du compartiment vasculaire l'expriment de façon constitutive. A l'inverse, les cellules endothéliales et monocytaires l'expriment de façon inductible suite à une stimulation par des cytokines pro-inflammatoires, le lipopolysaccharide bactérien ou d'autres micro-organismes (19).

Il est important de noter l'absence d'ARNm de facteur tissulaire dans les mégacaryocytes. Il a ainsi été démontré que le facteur tissulaire à la surface des microparticules d'origine plaquettaire provient des monocytes, suite à un transfert de l'un vers l'autre. Il a également été montré que le facteur tissulaire pouvait être retransféré des plaquettes vers les monocytes (20, 21).

## II.3. INTERET DES MICROPARTICULES

Détectables dans le sang périphérique d'individus non malades, les microparticules sont élevées quand le risque thrombotique est augmenté.

L'intérêt de leur étude réside dans leur augmentation au cours de certaines pathologies qui font d'elles des marqueurs de l'atteinte cellulaire accessibles au dosage biologique. Elles sont également considérées comme de véritables effecteurs biologiques intervenant à plusieurs niveaux de la physiopathologie vasculaire. Cependant, la distinction des microparticules comme cause ou conséquence des pathologies reste difficile.

### II.3.1. Effecteurs biologiques

#### II.3.1.1. Rôle dans la coagulation et la formation du thrombus

De part leur composition phospholipidique, en particulier en phosphatidylsérine, et de part la présence potentielle à leur surface de facteur tissulaire, les microparticules jouent un rôle essentiel dans l'hémostase. Pour une même unité de surface, les microparticules d'origine plaquettaire présentent des propriétés procoagulantes cinquante à cent fois plus élevées qu'une plaquette activée (14).

### II.3.1.1.1. Effet procoagulant

Après leur libération dans la circulation sanguine, les microparticules constituent une surface phospholipidique additionnelle riche en phosphatidylsérine qui est capable de complexer les facteurs vitamine K-dépendants II, VII, IX et X, ainsi que les cofacteurs Va et VIIIa de la coagulation. En effet, les complexes « tenase » (association de phospholipides, ions calcium, facteur IXa et VIIIa) et « prothrombinase » (association de phospholipides, ions calcium, facteur Xa, et Va) nécessitent la présence de surfaces phospholipidiques afin d'assurer un assemblage optimal des facteurs de la coagulation et une protection vis-à-vis des inhibiteurs de la coagulation (figure 7). Les interactions entre facteurs de coagulation sont ainsi favorisées (22). Il en résulte alors une production optimale de thrombine pour une hémostase efficace (15).

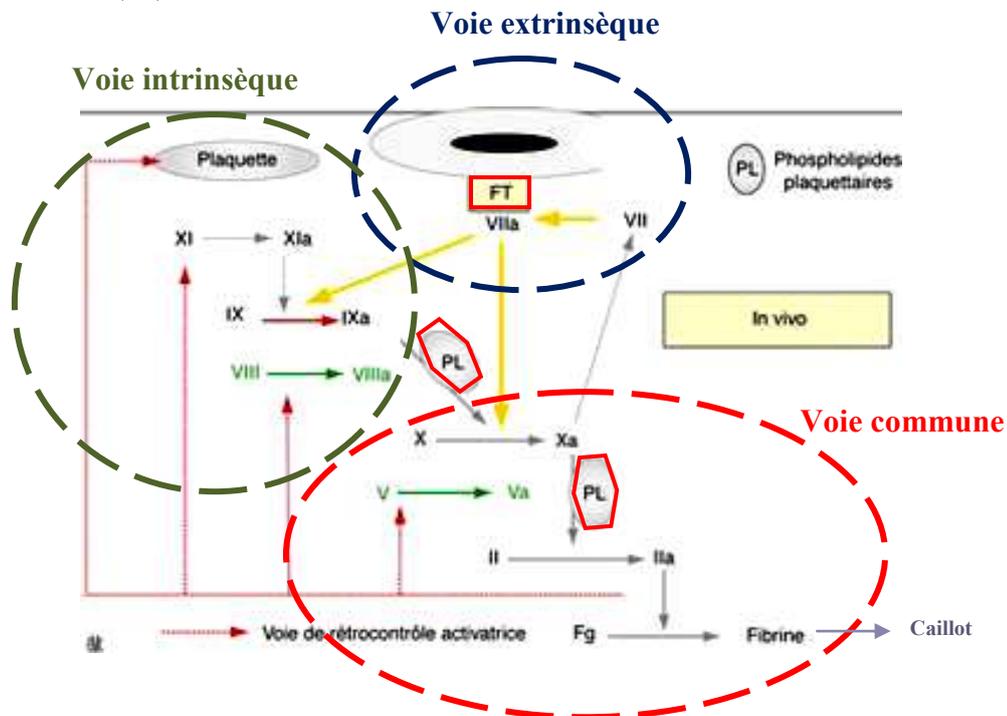


Figure 7 : Schéma de la cascade de coagulation

FT : Facteur Tissulaire, Fg : Fibrinogène

Le rôle du facteur tissulaire se situe au niveau de la voie extrinsèque de la coagulation. Il représente l'initiateur majeur de la coagulation. En effet, il est le récepteur du facteur VII/VIIa circulant. La formation du complexe FT-VIIa active les facteurs IX et X de la coagulation aboutissant à la génération de traces de thrombine responsables de l'activation de la voie

intrinsèque. La génération de thrombine est amplifiée et un caillot se forme par transformation du fibrinogène en fibrine.

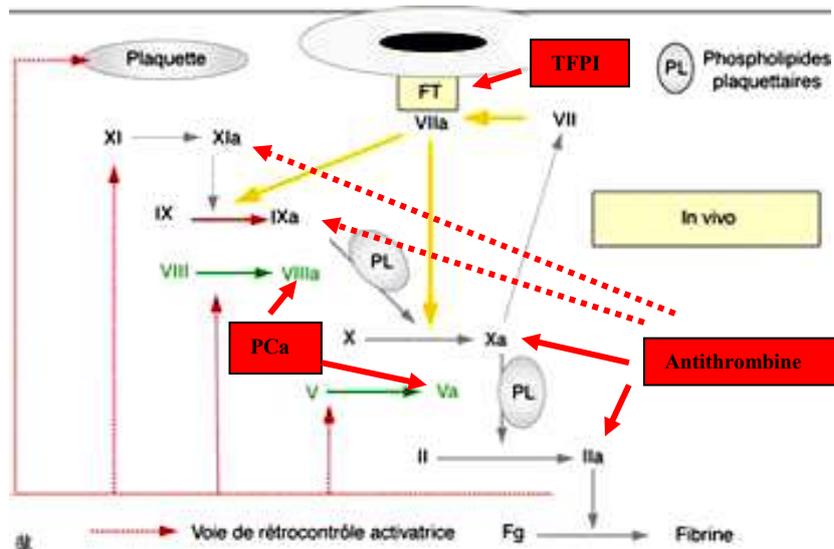
Il a été démontré récemment qu'un pool circulant actif de facteur tissulaire était présent dans le compartiment vasculaire. Celui-ci, à l'opposé du pool exprimé par la surface vasculaire, est rapidement activable : quelques secondes comparées à plusieurs heures pour le second (23). Il est remarquable de constater que les microparticules constituent la quasi-totalité de l'activité facteur tissulaire circulante ; le facteur tissulaire réellement soluble étant biologiquement inactif en l'absence de phospholipides procoagulants (24, 25, 26). Ce sont principalement les microparticules d'origine plaquettaire qui sont les vectrices de l'activité facteur tissulaire dans le compartiment vasculaire (2). Cependant, comme nous l'avons vu précédemment, les mégacaryocytes ne produisent pas d'ARNm de facteur tissulaire. Ce sont les leucocytes qui transfèrent leur facteur tissulaire à la surface des microparticules plaquettaires.

La présence de ces microparticules, induites par divers stimuli, participe à la concentration de l'activité du facteur tissulaire au dessus d'une limite permettant à la coagulation sanguine de s'initier et au thrombus de se former. Ensuite, les microparticules présentant à leur surface la PSGL-1 (P-selectine glycoprotein ligand-I) peuvent se lier aux P-sélectines plaquettaires déjà présentes au niveau du thrombus. La concentration de facteur tissulaire augmente alors et la formation de fibrine s'accélère (27).

Les propriétés thrombotiques des microparticules sont donc importantes et ceci à la fois sur les versants artériels et veineux du compartiment vasculaire.

#### II.3.1.1.2. Effet anticoagulant

L'équilibre entre les facteurs de la coagulation et les systèmes anticoagulants (inhibiteur de la voie du facteur tissulaire, antithrombine, thrombomoduline, protéines C et S) est essentiel à l'hémostase.



**Figure 8 : Schéma de la cascade de coagulation et ses inhibiteurs**  
**TFPI : Inhibiteur de la voie du facteur tissulaire, FT : Facteur Tissulaire, Fg : Fibrinogène**

Les microparticules sont impliquées dans cette contre-régulation, en permettant l'assemblage du système anticoagulant de la protéine C qui nécessite une surface phospholipidique (15). Cependant pour que cet assemblage se fasse, il faut des concentrations en phosphatidylsérine au moins dix fois supérieures à celles requises pour la formation des complexes procoagulants. Ceci permet d'expliquer, en partie, pourquoi les microparticules sont plutôt procoagulantes que anticoagulantes. De même l'activité anticoagulante de la thombomoduline et de l'inhibiteur de la voie du facteur tissulaire, présents à la surface des microparticules, est contrebalancée par l'activité procoagulante plus importante du facteur tissulaire (2).

Ainsi les microparticules jouent essentiellement un rôle procoagulant de part la présence à leur surface de phosphatidylsérine et de facteur tissulaire, et ceci d'autant plus que la phosphatidylsérine augmente considérablement l'activité procoagulante du facteur tissulaire.

### II.3.1.1.3. Syndrome de Scott

L'importance de l'externalisation des phospholipides procoagulants à la surface cellulaire et de l'émission de microparticules est illustrée par le Syndrome de Scott.

Ce syndrome est une pathologie caractérisée cliniquement par des hémorragies essentiellement provoquées et d'intensité variable. L'étude du cas princeps, ayant donné son

nom au syndrome, met en évidence un déficit fonctionnel de la membrane plasmique plaquettaire, incapable d'exposer des phospholipides procoagulants à sa surface (28). Ainsi, les patients symptomatiques présentent un défaut d'exposition de phosphatidylsérine à l'interface membranaire mais également une émission de microparticules pratiquement inexistante. Le phénotype « Scott » est retrouvé sur les plaquettes, les globules rouges et les lymphocytes des sujets concernés.

Cette pathologie est en lien avec une mutation faux-sens du transporteur ABC A1 impliqué dans le transport de la phosphatidylsérine (29).

Les désordres hémorragiques associés à ce syndrome montrent bien le rôle essentiel des phospholipides anioniques externalisés par les plaquettes stimulées et l'intérêt de la production de microparticules pour la coagulation. Le syndrome de Castaman, désordre hémorragique caractérisé par une diminution des microparticules mais une activité prothrombinase plaquettaire normale, corrobore ces résultats (30).

### II.3.1.2. Rôle dans l'inflammation

Les microparticules sont de véritables effecteurs de l'inflammation de l'endothélium. De nombreuses études ont révélé que les microparticules augmentent la libération de cytokines pro-inflammatoires, comme l'IL-6 et l'IL-8, par les cellules endothéliales et les leucocytes (15). Ces cytokines favorisent le recrutement des leucocytes et induisent le chimiotactisme monocyttaire au site d'une éventuelle lésion (31).

Les microparticules stimulent également l'expression de molécules d'adhésion comme l'ICAM-1 (Intracellular Adhesion Molecule-1), la VCAM-1 (Vascular Cell Adhesion Molecule-1) et la E-selectine à la surface des cellules endothéliales (32). Lorsque l'endothélium est activé, l'expression de ces molécules permet l'adhésion des leucocytes et leur diapédèse. L'acide arachidonique, les phospholipides oxydés portés par les microparticules et la chimiokine RANTES (Regulated in activation, normal T-cell expressed and secreted) concourent également à l'augmentation de l'adhésion cellulaire à l'endothélium. Enfin, les phospholipides oxydés peuvent activer les récepteurs du PAF (Platelet Activating Factor) et les microparticules sont aussi une source de substrat pour la phospholipase A2 produisant de l'acide lysophosphatidique, un puissant médiateur pro-inflammatoire.

Ces propriétés pro-inflammatoires sont essentiellement dévolues aux microparticules d'origine plaquettaire et leucocytaire.

### II.3.1.3. Rôle dans la fonction vasculaire

Les microparticules participent à la régulation du tonus vasculaire. Les effets observés diffèrent suivant l'origine des microparticules.

Les microparticules peuvent diminuer la production de monoxyde d'azote (NO). Le NO est une molécule endogène libérée par les cellules endothéliales, les macrophages, les cellules du foie et les neurones. Il a, entre autre, un rôle vasodilatateur en agissant au niveau des cellules musculaires lisses des parois vasculaires ce qui permet un accroissement du débit sanguin (32). Ce mécanisme est connu comme étant indispensable à la préservation de l'endothélium.

La production de NO est catalysée par des enzymes : les NO synthases (NOS) qui forment du NO à partir d'arginine et d'oxygène. Il existe trois isoformes de NOS :

- la NOS neuronale ou NOS I, qui produit du NO dans les terminaisons axonales non adrénergiques et non cholinergiques du système nerveux autonome.
- la NOS inductible ou NOS II, dont l'expression est régulée par un grand nombre de cytokines pro-inflammatoires.
- la NOS endothéliale ou NOS III, constitutivement exprimée dans l'endothélium.

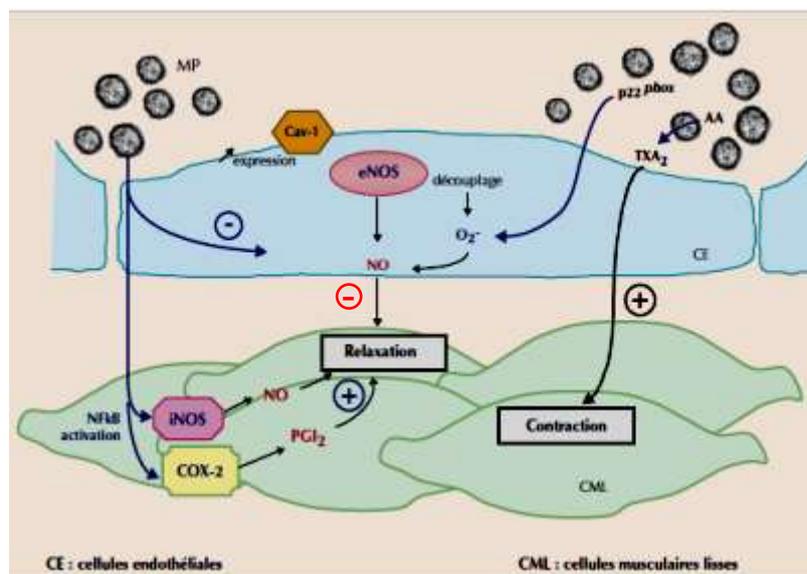
De nombreuses substances agissent au niveau des vaisseaux par l'intermédiaire des cellules endothéliales en activant la production de NO par la NOS endothéliale ou, comme les microparticules, en diminuant la production de NO, sans toutefois altérer l'expression de la NOS endothéliale. Cet effet a été observé lorsque des microparticules, isolées du plasma de patients coronariens, insuffisants rénaux ou de femmes prééclampsiques, ont été mises au contact d'artères de rats (32). La dysfonction endothéliale observée dans cette étude et dans d'autres, semble induite par les microparticules d'origine endothéliale (27,33) . Des résultats similaires ont été observés avec des microparticules générées in vitro à partir de cellules musculaires lisses ou de lymphocytes (32).

La diminution de production de NO pourrait aussi être due à l'augmentation de la cavéoline-1, ce qui permettrait une vasoconstriction. La cavéoline-1 est une protéine nécessaire à

l'assemblage des caveolae, groupements lipidiques membranaires interagissant, entre autres avec la NOS endothéliale (34).

Les microparticules d'origine plaquettaire peuvent également induire une diminution de la relaxation vasculaire en agissant comme source de thromboxane A2 pour la paroi vasculaire. En effet, le thromboxane A2 est un agent vasoconstricteur engendrant une augmentation de la pression artérielle.

Enfin, il a été observé un amoindrissement de la réactivité vasculaire d'artères de souris exposées à des microparticules provenant de cellules de la lignée T ou provenant de plasmas de patients diabétiques (27, 32, 33). Ceci serait en lien avec l'augmentation de l'expression de la NOS inductible et de la cyclooxygénase 2 dans les cellules musculaires lisses (figure 9).



**Figure 9 : Microparticules et réactivité vasculaire**  
adapté d'après (32)

**MP : Microparticules, NO : monoxyde d'azote, eNOS : NO synthase endothéliale, iNOS : NO synthase inductible, Cav-1 : Cavéoline 1, COX-2 : Cyclooxygénase 2, PGI<sub>2</sub> : Prostacycline I<sub>2</sub>, AA : Acide Arachidonique, TXA<sub>2</sub> : Thromboxane A2**

#### II.3.1.4. Rôle dans l'angiogenèse

L'angiogenèse est un phénomène biologique très important se définissant comme la production de nouveaux vaisseaux sanguins à partir de vaisseaux préexistants. Ce phénomène

se rencontre dans des conditions pathologiques une fois l'organogénèse terminée. Elle fait intervenir des métalloprotéases matricielles (MMP) qui exercent un rôle d'effecteur par leur capacité à dégrader les différents composants de la matrice extracellulaire. Elles favorisent la migration des cellules, l'invasion tumorale et le relargage et/ou l'activation de facteurs de croissance ou des cytokines. Il a été montré que les microparticules d'origine endothéliale présentent à leur surface la MMP-2 et MMP-9. De plus, les microparticules générées in vitro à partir de cellules T ou de monocytes induisent la synthèse de MMP-1,-3,-9 et -13 dans les fibroblastes (32).

Les microparticules interviennent aux trois étapes principales de l'angiogenèse : la dégradation matricielle, le recrutement et la différenciation des progéniteurs endothéliaux ainsi que la prolifération et la migration des cellules endothéliales.

L'ensemble des rôles dévolus aux microparticules permet ainsi d'expliquer leur implication dans différentes pathologies.

### II.3.2. Pathologies athéromateuses

Les microparticules procoagulantes interviennent à chaque étape de la maladie athéromateuse et ceci jusqu'à la rupture de la plaque d'athérome.

Elles induisent la synthèse de cytokines et de cytoadhésines permettant les interactions plaquettes-leucocytes-endothélium, puis l'invasion de la paroi vasculaire par les cellules inflammatoires (35).

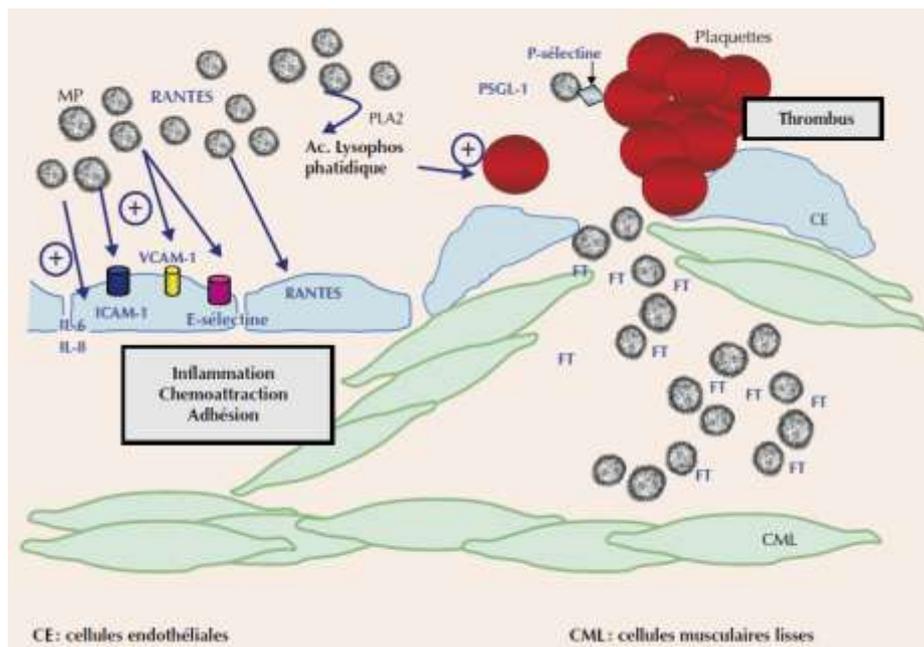
Dans l'intima, les LDL agrégés stimulent les cellules musculaires lisses et induisent la libération de microparticules procoagulantes porteuses de facteur tissulaire. La thrombogénicité de la plaque d'athérome est due à sa richesse en facteur tissulaire porté par les microparticules et les cellules apoptotiques d'origine monocyttaire ou musculaire lisse.

Cette plaque peut être déstabilisée par de nombreux processus dont un certain nombre initié par les microparticules procoagulantes :

- Des métalloprotéases matricielles (MMP-2 et MMP-9) peuvent lyser la membrane basale et favoriser la dégradation de la charpente fibreuse (2, 35).

- Une angiogenèse stimulée peut entraîner une vulnérabilité accrue avec risque de rupture.
- L'inhibition de l'expression de la NO-synthase diminue la vasodilatation médiée par le NO, ainsi que la survie des cellules endothéliales.
- Le transport de la NADPH oxydase par les microparticules plaquettaires est responsable d'une synthèse accrue de substances radicalaires de l'oxygène, apoptogènes vis-à-vis des cellules musculaires lisses et endothéliales.

S'il se produit une rupture de la plaque d'athérome, les microparticules procoagulantes, séquestrées dans la paroi, les plaquettes et les facteurs de la coagulation sont mis en contact, favorisant la formation d'un thrombus.



**Figure 10 : Microparticules et progression de la plaque d'athérome d'après (32)**

**MP : Microparticules, RANTES (Regulated in activation, normal T-cell expressed and secreted), PLA2 : Phospholipase A2, PSGL-1 : P-Selectin Glycoprotein Ligand-1, FT : Facteur Tissulaire, ICAM-1 (Intracellular Adhesion Molecule-1), VCAM-1 (Vascular Cell Adhesion Molecule-1)**

Les syndromes coronariens aigus (infarctus du myocarde et angor instable) sont une des manifestations cliniques aiguës de l'occlusion de la lumière des coronaires par une plaque d'athérome érodée ou rompue. De nombreuses études traitent de l'augmentation des microparticules au cours de ces syndromes. Ainsi, Mallat et al. (36) montre que les

concentrations de microparticules sont significativement plus élevées dans les plasmas de patients présentant un syndrome coronarien aigu que dans les plasmas de patients ayant un angor stable ou ne présentant pas de pathologie coronarienne. A l'inverse, les taux de microparticules sont similaires entre les patients ayant un angor stable et ceux n'ayant pas de pathologie coronarienne.

On observe également une augmentation concomitante des taux de microparticules et des facteurs de risque cardiovasculaire :

- L'hypertension artérielle est une cause directe ou un acteur de risque de l'athérosclérose coronarienne et des accidents vasculaires cérébraux. Les forces de cisaillement générées sont source d'activation plaquettaire, reconnues pour générer des microparticules plaquettaires. On observe également une augmentation des facteurs d'activation endothéliale et monocyttaire, avec augmentation des microparticules de ces origines (37).
- Le diabète est associé à une perturbation de l'hémostase qui aboutit à des complications thrombotiques et à des pathologies cardiovasculaires. Les complications micro et macroangiopathiques à long terme représentent les principales causes de mortalité et de morbidité des diabètes de type I et II. F. Sabatier et al. (38) montrent que les diabètes de type I et II sont associés à une augmentation des microparticules totales (dans le type I et II), endothéliales et plaquettaires (dans le type I uniquement).
- L'inflammation, abordée précédemment, est également un facteur de risque cardiovasculaire.

Enfin, une relation entre les événements cardiovasculaires et l'altération de la fonction rénale a été mise en évidence (39). L'athérosclérose est hautement présente lors des atteintes rénales avancées, et progresse plus rapidement chez les patients avec une atteinte rénale que dans la population générale. Faure et al. (40) ont ainsi montré que les microparticules

endothéliales étaient significativement plus élevées dans les plasmas de patients insuffisants rénaux chroniques et hémodialysés que dans les plasmas de sujets sains. Ceci serait en lien avec une activation endothéliale par les toxines urémiques, produits de dégradation normalement éliminés par le rein qui s'accumulent chez les insuffisants rénaux.

### II.3.3. Accidents vasculaires cérébraux ischémiques

Les accidents vasculaires cérébraux ischémiques peuvent survenir dans un contexte d'athéromatose. Les autres cas sont liés à des origines cardio-emboliques (25-30%) ou cryptogéniques (15-25%) (41). Les lésions sont principalement situées au niveau de la bifurcation de l'artère carotide primitive. Elles peuvent également se situer au niveau de petits vaisseaux intracrâniens (infarctus lacunaire, 25% des cas). La lésion inflammatoire athéromateuse peut provoquer une ischémie cérébrale par divers mécanismes : formation d'un thrombus obstruant l'artère au niveau de la lésion elle-même (accident thrombotique) ou libération d'un fragment de plaque d'athérome allant emboliser brutalement une artère distale intra cérébrale, comme les caillots d'origine cardiaque (42).

Différentes études cherchent à mettre en évidence des biomarqueurs sanguins qui permettraient d'apprécier l'origine des AVC ischémiques ainsi que de permettre un diagnostic rapide et une prise en charge adaptée. Cependant, malgré le rapport du « BRAIN study group » (43) suggérant qu'un panel de quatre biomarqueurs indépendants (la métalloprotéase matricielle 9, le peptide natriurétique de type B, les D-Dimères et la protéine S100B) apporterait un critère supplémentaire à l'évaluation rapide des tableaux d'AVC ischémiques, il n'existe actuellement aucun consensus établissant leur utilité. Il existe à ce jour un nombre limité d'études prospectives sur les microparticules sanguines et d'origine endothéliale dans les infarctus ischémiques. Une des études met en évidence une concentration significativement élevée de microparticules d'origine plaquettaire dans le sang périphérique 7 jours et 6 mois après un infarctus ischémique (44). Cette augmentation a été confirmée par d'autres études (45). L'étude de Simak *et al.* (46) montre également des taux significativement plus élevés de microparticules d'origine endothéliale dans les plasmas de patients ayant présentés un AVC ischémique aigu comparé à un groupe témoin.

### II.3.4. Autres pathologies

La réponse inflammatoire joue un rôle important dans la genèse de microparticules au cours du sepsis et des traumatismes sévères (47).

On observe également une élévation du taux des microparticules dans les grossesses pathologiques, en particulier lors de la prééclampsie (48, 49, 50).

Enfin, l'étude des microparticules prend également un sens dans l'étude des plasmas thérapeutiques. En effet, la préparation de ces plasmas peut conduire à la génération de microparticules potentiellement procoagulantes et/ou pro-inflammatoires qui pourraient être délétères pour le patient receveur. Une étude, réalisée dans notre laboratoire par Hacquard *et al.* (Annexe I) concernant les différents modes de préparation de ces plasmas, a permis de montrer que les plasmas thérapeutiques contiennent un nombre réduit de microparticules par rapport au plasma natif du donneur.

## II.4. MISE EN EVIDENCE DES MICROPARTICULES

### II.4.1. Conditions pré-analytiques

L'analyse de microparticules requiert des conditions pré-analytiques précises, qui doivent être respectées, afin d'obtenir des résultats cohérents.

Le prélèvement doit être réalisé dans des conditions standards. La ponction veineuse périphérique est faite avec des aiguilles de taille standard (19 à 22 Gauge), dans des tubes contenant un anticoagulant. Le principal anticoagulant utilisé est le citrate de sodium. Des études ont évalué l'utilisation de tubes contenant de l'EDTA (Acide Ethylène Diamine Tétracétique), de l'ACD (Acide citrique, Citrate de sodium, Dextrose) ou de l'héparine. Ces études ont montré que le nombre de microparticules était plus élevé avec des tubes contenant de l'héparine et de l'EDTA comparé aux tubes contenant du citrate (51, 52). L'anticoagulant EDTA n'est pas le plus indiqué dans les études utilisant des tests de coagulation, même s'il a été montré qu'il permet de conserver les prélèvements plus longtemps avant centrifugation. De plus, il altère l'expression de certains marqueurs (4).

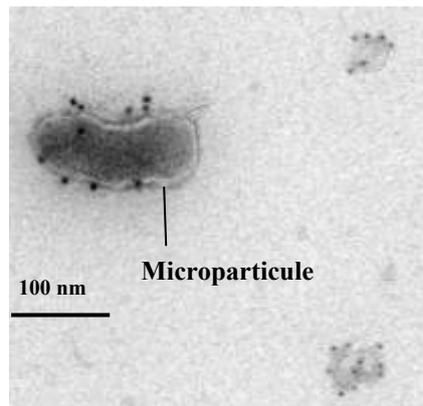
Après le prélèvement, les tubes doivent être centrifugés le plus rapidement possible, c'est-à-dire dans l'heure suivant le recueil. Les vitesses et temps de centrifugation varient en fonction des équipes. D'après les recommandations de Lacroix *et al.* (52) et de l'ISTH 2010

(53), deux centrifugations 15 minutes à 2500 g à 20°C permettent d'obtenir un plasma dépourvu en plaquettes de bonne qualité.

Il est préférable de ne pas conserver les échantillons centrifugés plus de 4 heures à température ambiante. L'analyse des microparticules se fera préférentiellement sur échantillons frais ; il est cependant possible de conserver les plasmas dépourvus en plaquettes congelés à -20°C pendant un mois et à -80°C pour au moins 6 mois (53). L'analyse pourra alors se faire après décongélation.

#### II.4.2. Dosage des microparticules

La première mise en évidence des microparticules remonte à 1967 où Wolf isola du plasma des éléments infra-micrométriques présentant une activité procoagulante intrinsèque. Il réussit à les visualiser par microscopie électronique (54) (figure 11).



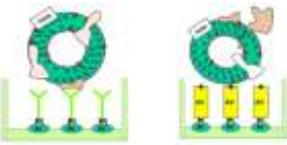
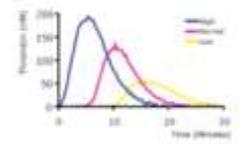
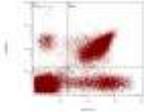
**Figure 11 : Microparticule visualisée en microscopie électronique d'après Heijnen in Michelson (ed) Platelets (Academic Press), 2002**

La microscopie électronique reste une des techniques permettant la mise en évidence des microparticules tout comme d'autres techniques microscopiques de haute sensibilité : microscopie confocale, microscopie à contraste interférentiel en réflexion et microscopie à contraste interférentiel différentiel. Récemment, Yuana *et al.* (55) ont utilisé la microscopie à force atomique pour détecter et quantifier les microparticules d'origine plaquettaire ainsi que pour étudier la répartition de leur taille.

Les microparticules sont composées de molécules dont la nature et les propriétés procoagulantes ont permis l'utilisation d'autres techniques de mise en évidence, de quantification et d'étude de leur origine cellulaire. Elles reposent sur l'étude des antigènes ou

des phospholipides présents à leur surface. Ces techniques ont évolué au fur et à mesure du temps avec l'apparition de nouvelles technologies. Chacune possède ses avantages et ses inconvénients.

Les principales techniques sont résumées dans le tableau 1 ci-après et seront approfondies dans un chapitre ultérieur.

	Tests fonctionnels			
	Tests de capture	Thrombinographie	Test de coagulation	Cytométrie en flux
				
<b>Principe</b>	Potentiel procoagulant et origine cellulaire	Potentiel procoagulant	Potentiel procoagulant	Numération et origine cellulaire
	Capture des MP par de l'annexine V ou un anticorps dirigé contre un antigène spécifique	Apport de facteur tissulaire et/ou de phospholipides et suivi de la génération de thrombine	Activation de la coagulation par apport de facteur Xa et de calcium	Utilisation d'annexine V et d'anticorps dirigés contre un antigène spécifique couplés à un fluorochrome
	Caractérisation par un second anticorps ou étude du potentiel procoagulant par génération de thrombine ou de facteur Xa	Suivi de l'activité de la thrombine sur un substrat fluorogénique et analyse du thrombinogramme	Détermination du temps de coagulation dépendant des phospholipides de surface	Numération et différenciation de l'origine cellulaire en fonction de la fluorescence générée
<b>Avantages</b>	Informations sur l'origine cellulaire	Information sur le phénotype procoagulant et son impact sur la coagulation	Facilement réalisable en routine	Technique de choix pour numérer les sous-populations en fonction de leur origine cellulaire
	Coût et usage adaptés aux grandes séries	Prise en compte des systèmes inhibiteurs	Bonne reproductibilité	Etude individuellement chaque microparticule
	Sensibilité importante		Bon test de screening	
<b>Limites</b>	Cinétique de capture des microparticules pas encore bien comprise	Pas d'information sur l'origine cellulaire	Pas d'information sur l'origine cellulaire	Manque de sensibilité pour détecter les microparticules de taille inférieure à 500 nm
	Pas d'information sur la taille des microparticules Pas de numération	Pas d'information sur la taille des microparticules	Pas d'information sur la taille des microparticules	Coûteuse
	Dépendant de la spécificité et de l'affinité des sondes de capture, de la quantité de sonde fixée au fond des puits, et de la présence éventuelle d'antigènes solubles libres dans le plasma	Analyse longue et coûteuse	Ne reflète pas le phénotype coagulant global du patient	N'est pas un test fonctionnel : n'apporte aucun renseignement sur le caractère procoagulant

**Tableau 1 : Récapitulatif des différentes techniques de dosage des microparticules**

### III. TRAVAIL EXPERIMENTAL

#### III.1. MATERIEL ET METHODE

##### III.1.1. Objectifs

Le but de notre étude est d'évaluer et de caractériser trois techniques de mise en évidence des microparticules procoagulantes dans le plasma de patients ayant présenté un AVC ischémique à la phase aiguë. Ces patients sont comparés à des témoins pour chaque technique :

- Le STA Procoag PPL® est un test fonctionnel qui fournit des informations sur le potentiel procoagulant des microparticules, dépendant de la nature des phospholipides exprimés à leur surface.
- La thrombinographie est également un test fonctionnel qui fournit des informations sur le comportement global procoagulant des microparticules, médié par les phospholipides de surface.
- La cytométrie en flux fournit des informations sur le nombre de microparticules par échantillon et l'origine cellulaire de ces microparticules sur la base d'un marquage de récepteurs spécifiques de lignée.

Nous avons étudié les échantillons avec chaque technique puis nous avons déterminé les corrélations entre les différents paramètres.

De plus, il semblerait exister des variations inter-individuelles rendant difficiles l'établissement d'un « temps témoin » avec le STA Procoag PPL®. C'est pourquoi, nous avons exprimé les résultats de ce test d'une façon originale, différente de l'expression standard donnée par le fournisseur qui est un temps. Il est reconnu qu'une centrifugation à 13000 g pendant 30 minutes permet d'éliminer les microparticules. Nous avons alors déterminé le temps de coagulation de chaque prélèvement avant et après cette centrifugation afin d'établir un ratio correspondant au temps de coagulation avant centrifugation divisé par le temps de coagulation après centrifugation. Nous avons cherché à montrer que ce ratio serait plus pertinent qu'un temps de coagulation comparé à des valeurs de référence. Ce ratio permettrait de comparer chaque plasma à lui-même en s'affranchissant des variations inter-individuelles.

### III.1.2. Echantillons

Notre étude a été réalisée chez 20 volontaires sains et 9 patients ayant été admis pour AVC ischémique aigu à l'Unité Neurovasculaire du CHU de Nancy. Les patients et les volontaires sains ont donné leur consentement libre et éclairé.

Le groupe des volontaires sains est composé de 7 hommes et de 13 femmes dont les âges se répartissent entre 21 et 48 ans avec une médiane de 28 ans.

Le groupe patient est composé de 5 hommes et de 4 femmes dont les âges se répartissent entre 43 et 85 ans avec une médiane de 76 ans. Les prélèvements de ces patients ont été réalisés en corollaire d'une autre étude qui a été proposée aux patients suite à l'établissement du diagnostic d'AVC ou d'accident ischémique transitoire (datant de moins de 48 heures) par un médecin neuro-vasculaire après TDM cérébral et/ou IRM cérébrale (56). Les prélèvements sanguins ont été réalisés dans l'heure suivant la première dose de 300 mg d'aspirine per os (cette dose est habituellement donnée à la phase aiguë de l'AVC ischémique) ou juste avant l'administration de cette dose pour les patients quotidiennement traités par aspirine avant l'AVC.

Les échantillons ont été préparés selon les recommandations de l'ISTH 2010. Les prélèvements ont été réalisés dans des conditions standards dans des tubes contenant du citrate de sodium 0,105 M (BD Vacutainer®). Dans l'heure suivant le prélèvement, chaque tube a été centrifugé une première fois à 2500 g pendant 15 minutes, à température ambiante. Le surnageant a ensuite été centrifugé une seconde fois à 2500 g pendant 15 minutes à température ambiante. Les plasmas dépourvus en plaquettes (PDP) ainsi obtenus ont été congelés en fraction de 1 mL à -80°C. Avant l'utilisation des plasmas, une décongélation a été réalisée dans un bain-marie à 37°C pendant 10 minutes puis les plasmas ont été homogénéisés pendant 10 secondes. Une fraction de chaque plasma décongelé a ensuite été centrifugée à 13000g pendant 30 minutes à 4°C. Les plasmas centrifugés et non centrifugés ont ensuite été analysés par les différentes techniques.

### III.1.3. Méthode

#### III.1.3.1. Test de coagulation STA Procoag PPL®

##### III.1.3.1.1. Principes généraux

La teneur en microparticules d'un plasma peut être appréciée par le test STA Procoag PPL® (Diagnostica STAGO) qui est un temps de coagulation utilisé sur les appareils à détection mécanique de coagulation de type STA Compact et STA-R. Il peut être réalisé sur du sang total (pour doser toutes les cellules activées), du plasma riche en plaquettes (pour doser les microparticules et les plaquettes activées) ou du plasma dépourvu en plaquettes (pour doser uniquement les microparticules). Les réactifs sont dépourvus de phospholipides, ce qui rend le test dépendant des phospholipides apportés par le prélèvement. Le réactif déclenchant apporte du facteur Xa et du calcium, qui initie la coagulation au niveau de la voie commune. Le temps de coagulation est mesuré par technique chronométrique : il correspond au temps nécessaire à la formation d'un caillot, apprécié par une bille métallique qui oscille dans le milieu réactionnel (figure 12).

Les valeurs usuelles annoncées par le fabricant pour une concentration supposée « normale » de microparticules sont comprises entre 61 et 83 secondes. Le temps de coagulation est inversement proportionnel à la concentration en microparticules du prélèvement : plus le temps est court, plus il y a de microparticules.

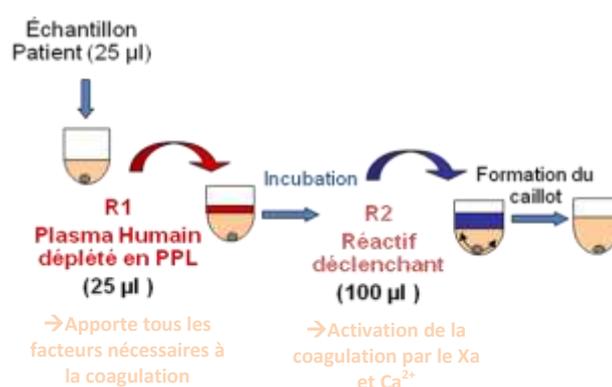


Figure 12 : Principe du test de coagulation STA Procoag PPL®

##### III.1.3.1.2. Application aux microparticules

Le test STA Procoag PPL® a été réalisé avec l'appareil de coagulation STA-R dans les conditions usuelles d'utilisation. Nous avons déterminé les temps de coagulation des plasmas

témoins et patients, avant et après centrifugation. Les plasmas étudiés étant dépourvus en plaquettes, les phospholipides permettant la coagulation sont apportés par les microparticules procoagulantes du prélèvement.

### III.1.3.2. La thrombinographie

#### III.1.3.2.1. Principes généraux

La thrombinographie est un test biologique *in vitro* permettant l'étude cinétique complète de l'activité thrombinique au cours de la coagulation ou « génération de thrombine », en conditions définies et appropriées (57). Elle permet d'étudier l'ensemble du processus de coagulation, en incluant les systèmes inhibiteurs, sans toutefois prendre en compte l'hémostase primaire et la partie finale de la structuration du réseau de fibrine. Elle est réalisée à partir d'un échantillon plasmatique, stimulé de façon appropriée, calibrée et reproductible (58).

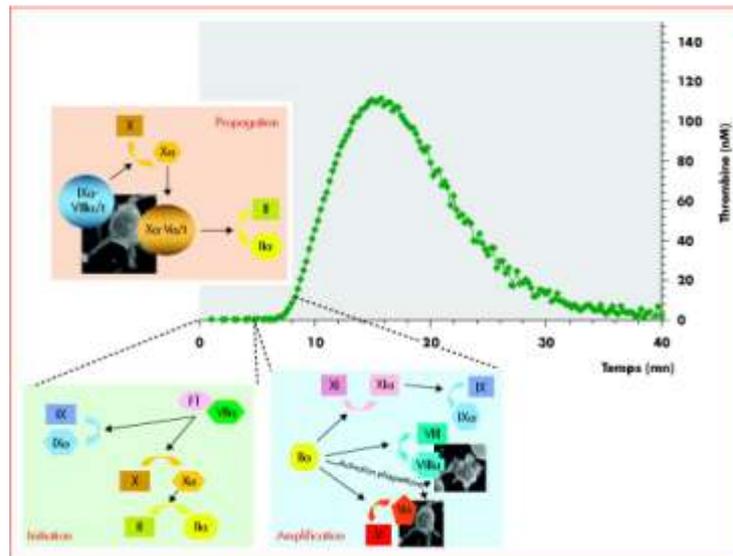
Le test utilisé dans ce travail est le CAT (Calibrated Automated Thrombogram®), méthode développée et adaptée d'après Hemker *et al.* (59). La réalisation d'un tel test nécessite :

- Un échantillon dont la préparation diffère selon le but de l'analyse :
  - plasma citraté riche en plaquettes (PRP) (en général ajusté à 150 G/L) permettant de s'approcher au plus près des conditions physiologiques de la coagulation.
  - plasma citraté dépourvu en plaquettes.
  
- Un activateur de la coagulation : du facteur tissulaire et/ou des phospholipides dont la nature et la concentration seront variables en fonction de l'analyse souhaitée (phosphatidylcholine/phosphatidylsérine/phosphatidyléthanolamine, généralement dans un rapport 60/20/20). Les différents réactifs sont :
  - le PPP-Reagent® contenant du facteur tissulaire (1, 5 ou 20 pM) et des phospholipides (4µM).

- le PRP-Reagent®, qui apporte du facteur tissulaire relipidé (1 pM) sans phospholipides additionnels.
  - ou le MP-Reagent®, qui apporte des phospholipides (4 µM) sans facteur tissulaire.
- Un substrat fluorigène (Z-Gly-Gly-Arg-AMC), cible de l'activité de la thrombine qui le clive en générant de la fluorescence. Il est nécessaire de remarquer que l'une des propriétés de la fluorescence est que la valeur du signal reçu dépend de la couleur du plasma, de la lampe, de l'usure des filtres et de la couleur et du matériau de la plaque. De plus, du fait de l'effet filtre, la concentration du fluorophore n'est pas linéaire avec la valeur du signal. Enfin, au cours de la formation de thrombine, environ 30 à 40% du substrat est consommé, ce qui diminue la rapidité de conversion du substrat par la thrombine. Il est donc nécessaire d'apporter une correction grâce à un calibrant dont les caractéristiques sont exposées ci-après.
  - Un calibrant qui est un complexe thrombine- $\alpha_2$  macroglobuline à l'activité stable et déterminée. Ce réactif permet de calculer la concentration molaire de la thrombine, sans prendre en compte l'effet filtre, la consommation de substrat ou l'usure de la lampe et des filtres et les variations de couleur du plasma échantillon.
  - Un fluorimètre permettant la lecture de la fluorescence émise. Il est équipé d'un jeu de filtres de 390/460 nm.
  - Un logiciel transformant, grâce à la courbe obtenue avec le calibrant, l'intensité de fluorescence en concentration de thrombine active.

La figure 13 représente la courbe de génération de thrombine type obtenue avec du PRP, après ajout de facteur tissulaire et de calcium.

Le thrombinogramme comprend plusieurs phases :



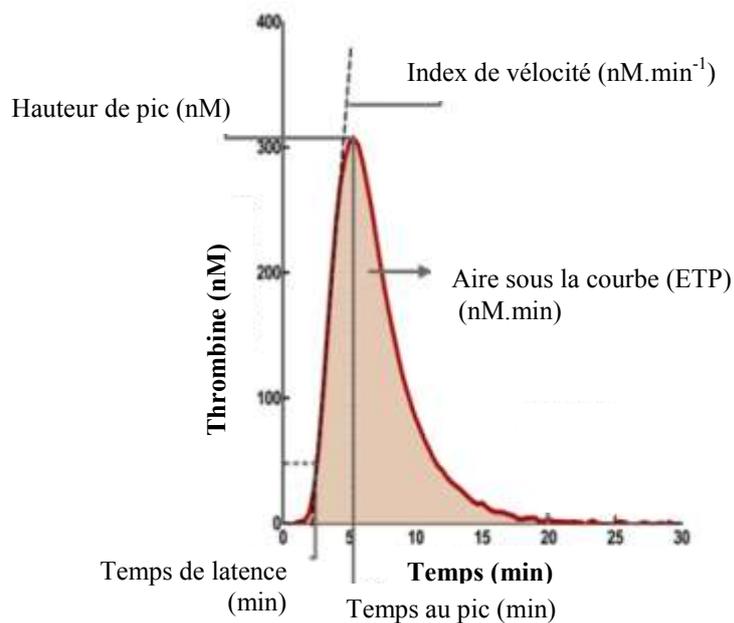
**Figure 13 : Thrombinogramme type obtenu à partir d'un plasma riche en plaquettes d'après (58)**

La première phase est la phase d'initiation : la coagulation est initiée par la voie extrinsèque, avec activation des facteurs IX et X. Pendant cette phase, la concentration en thrombine est peu élevée. Pendant la phase d'amplification, la thrombine amplifie sa propre formation : les premières traces de thrombine générées activent la voie intrinsèque par l'intermédiaire du facteur XI ; elles activent également les plaquettes et les cofacteurs de la coagulation : facteurs V et VIII. La phase de propagation est caractérisée par une génération explosive de thrombine, qui est l'aboutissement de la phase d'amplification, et qui prédomine très nettement sur son inhibition par l'antithrombine. Au pic, un équilibre est atteint entre la génération et l'inhibition de la thrombine. Pendant la phase de décroissance, l'inhibition de la thrombine est prépondérante. Elle est principalement due à l'antithrombine qui est l'inhibiteur le plus concentré, les autres inhibiteurs intervenant dans une moindre mesure.

Le thrombinogramme obtenu est la dérivée première de la mesure de la fluorescence résultant de l'activité de la thrombine sur le substrat fluorigène après soustraction du signal du complexe thrombine/ $\alpha_2$ macroglobuline. L'étude du tracé permet d'analyser différents paramètres (figure 14). Tout d'abord ceux donnés par le thrombinogramme :

- le temps de latence représente le temps nécessaire pour commencer à générer de la thrombine (min).

- la hauteur de pic correspond à la quantité maximale de thrombine générée (nM).
- le temps au pic est le temps nécessaire pour atteindre le pic de thrombine (min).



**Figure 14 : Paramètres du thrombinogramme**

D'autres paramètres sont déduits du thrombinogramme :

- l'index de vélocité est la pente maximale de génération de thrombine. Elle correspond à la « célérité » pour arriver au pic de thrombine ( $\text{nM}\cdot\text{min}^{-1}$ ).
- le potentiel thrombinique (ETP pour Endogenous Thrombin Potential) ou aire sous la courbe représente la quantité totale de travail enzymatique que la thrombine est capable d'accomplir ( $\text{nM}\cdot\text{min}$ ).

### III.1.3.2.2. Application aux microparticules

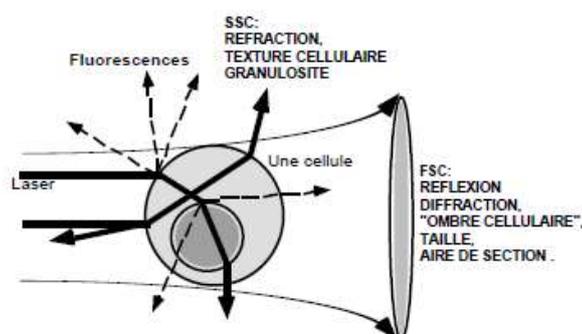
Notre étude par thrombinographie caractérise le potentiel procoagulant des microparticules, médié par les phospholipides procoagulants présents à leur surface. Pour cela, les plasmas ont été étudiés avec le réactif PRP-Reagent® qui apporte le facteur tissulaire (1 pM) nécessaire à l'initiation de la coagulation et qui est exempt de phospholipides. Le test est ainsi uniquement dépendant des phospholipides apportés par le plasma testé.

Dans une plaque de 96 puits (Immulon 2HB clear U-bottom, de Thermo Electron) sont mélangés 20  $\mu\text{L}$  de PRP-Reagent® (Diagnostica Stago) avec 80  $\mu\text{L}$  de PDP témoin ou patient. La génération de thrombine est initiée par l'ajout du substrat fluorigène : Fluo-Substrate® (Z-gly-gly-Arg-AMC) dilué dans tampon Fluo-Buffer® (contenant du chlorure de calcium). Le signal de fluorescence est corrigé par un puit « calibrant » (20  $\mu\text{L}$  de Thrombin Calibrator® et 80  $\mu\text{L}$  de PDP). Chaque échantillon est testé en triple. La fluorescence est mesurée par le fluorimètre Thermo Electron. Les données sont ensuite traitées par le logiciel Thrombinoscope, Thrombinoscope BV.

### III.1.3.3. La cytométrie en flux

#### III.1.3.3.1. Principes généraux

La cytométrie en flux (CMF) permet l'analyse d'éléments en suspension : constituants cellulaires, organites isolés, cellules. Chaque élément est analysé un à un avec mesure simultanée de différents signaux optiques ou physiques émis par la particule coupant le faisceau lumineux d'un laser ou d'une lampe à arc. Les signaux mesurés sont essentiellement relatifs aux propriétés optiques intrinsèques et aux propriétés optiques induites de fluorescence des particules (figure 15). Les propriétés optiques intrinsèques correspondent aux phénomènes de diffusion lumineuse liés aux dimensions de la particule (petit angle ou Forward Scatter : FSC) et à leur structure interne (grand angle ou Side Scatter : SSC). Les propriétés optiques induites de fluorescence sont obtenues par des marquages spécifiques de récepteurs membranaires et/ou cytoplasmiques par des anticorps monoclonaux couplés à des fluorochromes.



**Figure 15 : Paramètres mesurés en cytométrie en flux**  
**FSC : Forward Scatter ou petit angle, SSC : Side Scatter ou grand angle**

Le choix des fluorochromes est essentiel. Si plusieurs fluorochromes sont utilisés pour marquer une même particule, il est nécessaire de s'assurer que l'encombrement stérique est minimal et que les différents signaux d'émission peuvent être distingués les uns des autres (figure 16).

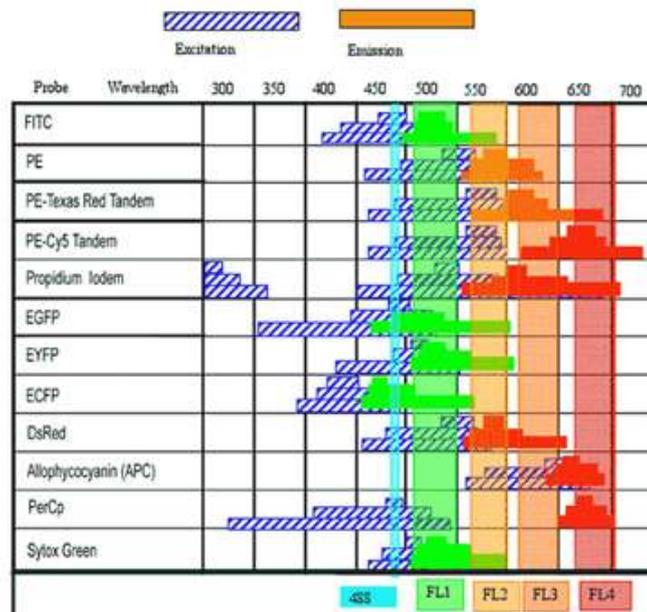


Figure 16 : Longueurs d'ondes d'excitation et d'émission des principaux fluorochromes utilisés en cytométrie en flux

Le cytomètre en flux est composé de trois éléments principaux : (figure 17)

- Le système fluidique constitué d'une veine liquide s'écoulant à vitesse constante qui entraîne et focalise un deuxième flux liquide contenant l'échantillon. Ce système permet le centrage hydrodynamique des éléments.
- Le système optique composé d'un laser (source optique d'excitation des fluorochromes) et de lentilles pour focaliser le faisceau laser.

Le système optique de réception est constitué d'une lentille pour collecter la lumière émise, de miroirs et de filtres optiques pour diriger les longueurs d'onde spécifiques sur les photomultiplicateurs. Ces derniers permettent de convertir l'énergie lumineuse en énergie électrique.

- Le système électronique convertit les signaux électriques en signaux numériques, coordonne les données, prépare les représentations graphiques et les analyses statistiques.

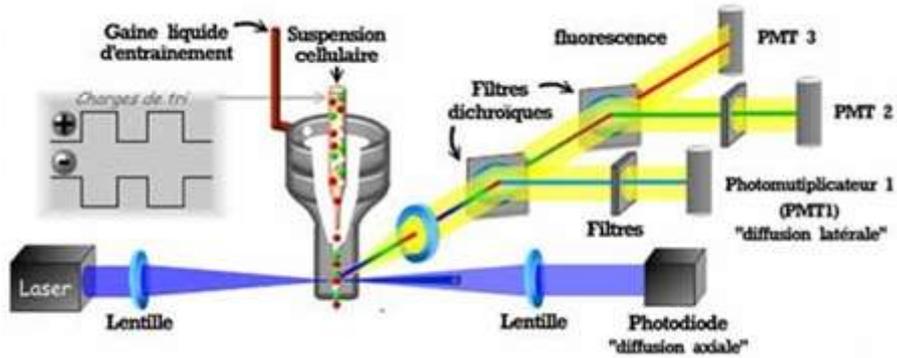


Figure 17 : Représentation schématique d'un cytomètre en flux

### III.1.3.3.2. Application aux microparticules

La discrimination des microparticules par cytométrie en flux repose d'une part sur leur taille, sur la présence à leur surface de phosphatidylsérine et sur l'utilisation d'anticorps marquant des antigènes spécifiques. Elle permet à la fois de compter les microparticules mais également de les caractériser phénotypiquement.

Les microparticules procoagulantes sont définies en cytométrie en flux comme des microparticules de taille inférieure à  $1 \mu\text{m}$  et fixant l'annexine V (AV). L'annexine V est une protéine placentaire qui présente une forte affinité et une stricte spécificité pour les aminophospholipides, comme la phosphatidylsérine, en présence de concentrations physiologiques de calcium. Elle est marquée par un fluorochrome qui permet sa détection. Cependant, cette protéine n'est pas uniquement spécifique des microparticules (4). En effet, elle peut se lier à des phospholipides chargés négativement à la surface de débris cellulaires, tout comme à la surface des microparticules. C'est donc l'association de la taille et du marquage par l'annexine qui définit les microparticules. Certains auteurs considèrent tout de même des particules, de même taille que les microparticules mais qui ne fixent pas l'annexine, comme des microparticules annexine négative. Ils montrent qu'elles circulent à une concentration environ trente fois plus élevée que les microparticules annexine positive (60).

Afin de déterminer l'origine cellulaire des microparticules, des anticorps monoclonaux spécifiques d'antigènes d'intérêts sont couplés à des fluorochromes. Ceux-ci vont reconnaître

spécifiquement l'antigène contre lequel ils sont dirigés (figure 18). En fonction des études, différents antigènes sont ciblés :

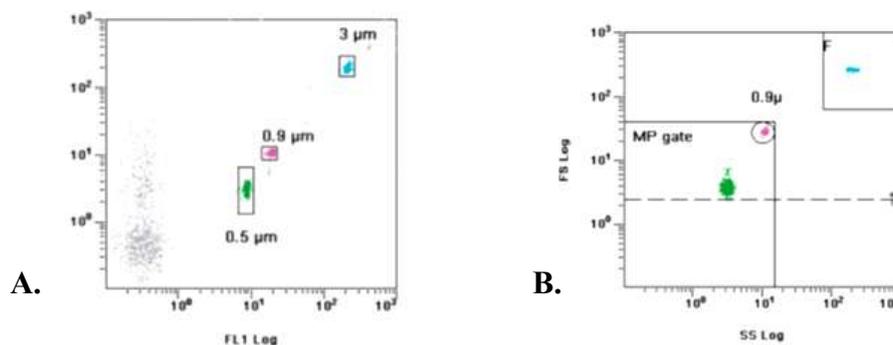
	Antigens	Specificity	Sensitivity (Fluorescence Intensity in Vitro)	Reference
Platelet-MP	CD41	+++	+++	76
	CD42 (a or b)	+++	+++	77
	CD61	++	++	104
Erythrocyte-MP	CD235a	+++	+++	100
	CD45	+++	+	105
Leukocyte-MP	CD11b*	+++	++	20
	CD14 <sup>†</sup>	+++	+	20
	CD68b <sup>‡</sup>	+++	++	106
	CD144	+++	+/-	52
Endothelial-MP	CD146-LeuMP	++	+++	90
	CD105-LeuMP	++	++	80
	CD31-PMP	+	+++	65
	CD62E	+++	+	104

\*Myeloid and NK cells-derived MP  
<sup>†</sup>Monocytes-derived MP  
<sup>‡</sup>Granulocytes-derived MP  
 MP, microparticles; LeuMP, leukocyte MP; PMP, platelet MP

**Figure 18 : Principaux antigènes permettant l'identification du phénotype cellulaire d'origine des microparticules d'après (18)**

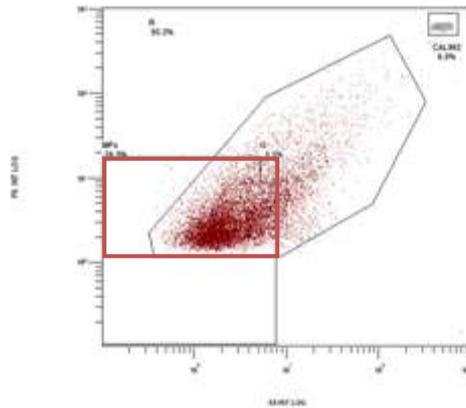
Il est également possible de cibler des antigènes liés à un potentiel fonctionnel comme la E-sélectine, la P-sélectine, la PSGL-1 ou le facteur tissulaire.

Lors de la réalisation de l'immunophénotypage, la première étape consiste à sélectionner les éléments ayant une taille inférieure à 1 µm (0,8 à 1,5 µm en fonction des études). Ceci est possible grâce à l'utilisation de billes fluorescentes de diamètres variés (0,5 µm, 0,9 µm et 3µm) couvrant la zone de taille des microparticules (figure 19). Ce réactif est le Mégamix®, Biocytex.



**Figure 19 : Standardisation de la détection des microparticules par le Mégamix®**  
 A. Répartition des billes Mégamix® de taille 0,5, 0,9 et 3µm  
 B. Fenêtre d'étude des microparticules (MP gate) entre 0,5 et 0,9 µm

Ces billes permettent de définir de façon standardisée la zone d'analyse des microparticules. Elles assurent également la stabilité des réglages et permettent de compter les microparticules de façon reproductible. Les billes de 0,9  $\mu\text{m}$  placent la limite haute de détection des microparticules, alors que les billes de 0,5  $\mu\text{m}$  placent la limite basse en dessous de laquelle la différence avec le bruit de fond n'est plus détectable (figure 20). De plus, il existe désormais le Mégamix Plus® qui permet d'abaisser le seuil de détection à 0,3  $\mu\text{m}$  (61).



**Figure 20 : Représentation taille (FS)-structure (SS) des particules visualisées en CMF**

- fenêtre de sélection des microparticules
- ⬡ fenêtre de sélection de toutes les particules

Sur la population sélectionnée, il est alors possible d'étudier la présence de phosphatidylsérine, grâce à l'utilisation de l'annexine V.

Lorsque l'on désire effectuer une analyse quantitative des microparticules, il est possible d'utiliser les billes FlowCount®Fluorospheres, Beckman Coulter : ce sont des particules de latex fluorescentes en quantité connue dans un volume connu. Leur ajout à un volume identique de prélèvement permet, par calcul, d'évaluer la concentration en microparticules.

Notre étude a été réalisée avec le cytomètre en flux multiparamétrique Navios (Beckman Coulter) qui est un cytomètre 10 couleurs, possédant 3 lasers dont les longueurs d'onde sont : 405nm, 488nm, 658nm. Le logiciel CXP® a été utilisé pour l'acquisition et l'analyse des résultats.

Les marqueurs choisis sont :

- L'annexine V-FITC (Beckman Coulter) pour marquer la phosphatidylsérine.
- Un anticorps anti CD41-ECD (Beckman Coulter) pour cibler la population plaquettaire.

- Un anticorps anti CD235a-PE (Beckman Coulter) pour cibler la population érythrocytaire.
- Un anticorps anti CD45-APC (Becton Dickinson) pour cibler la population leucocytaire.
- Un anticorps anti CD144-PE (Beckman Coulter) pour cibler la population endothéliale.

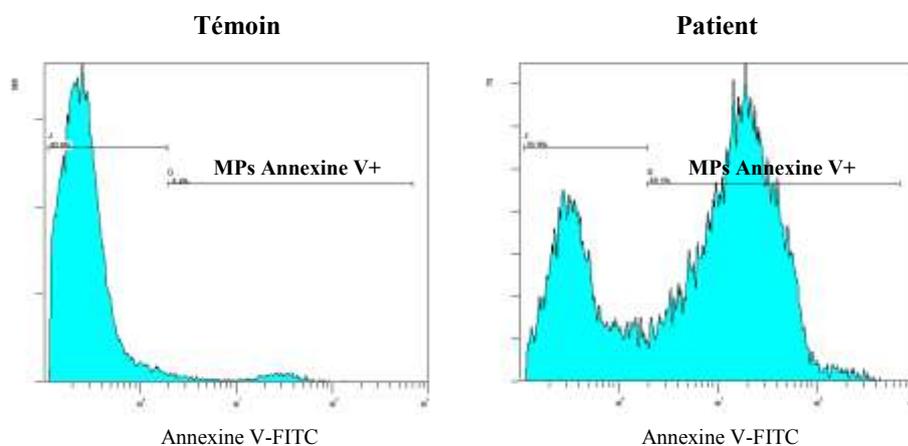
Pour définir un seuil de positivité vis-à-vis d'un signal donné, le signal obtenu pour chaque fluorochrome a été comparé à des microparticules non marquées du même échantillon.

La préparation des échantillons consiste à mettre en présence 30  $\mu\text{L}$  de plasma décongelé, avec 10  $\mu\text{L}$  d'annexine V et 10  $\mu\text{L}$  du ou des marqueurs de lignée choisis. Le tout est vortexé puis incubé 30 minutes à température ambiante et à l'obscurité. On ajoute ensuite 500  $\mu\text{L}$  de tampon annexine (BD Pharmingen™) dilué au 1/10<sup>ème</sup> dans de l'eau stérile et 30 $\mu\text{L}$  de billes FlowCount®. L'échantillon est ensuite analysé. Le protocole est présenté en Annexe II.

La mise au point de l'ensemble du protocole de cytométrie en flux a été réalisée sur la plateforme Nancytomique et a été finalisée à l'issue de deux stages d'étudiants de BTS.

Les résultats obtenus portent sur différentes populations :

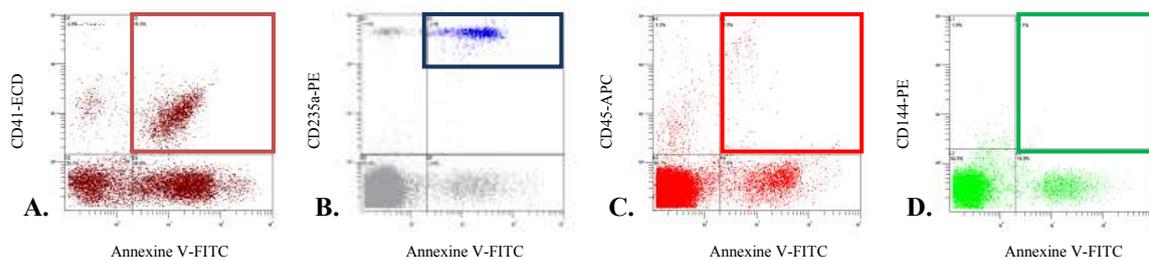
- Nous avons définis les microparticules totales comme les microparticules annexine V positives dont la taille est comprise entre 0,5 et 0,9  $\mu\text{m}$  (figure 21).



**Figure 21 : Fenêtre de quantification des microparticules totales par CMF**

La valeur donnée pour chaque échantillon correspond à la moyenne du nombre total de microparticules annexine V positives obtenu pour chacun des quatre marquages (plaquettaire, érythrocytaire, leucocytaire et endothélial).

- Le nombre de microparticules par lignée repose sur le nombre de microparticules annexine V positives dont le marqueur de lignée est positif (CD41 pour les plaquettes, CD235a pour les globules rouges, CD45 pour les leucocytes et CD144 pour les cellules endothéliales).



**Figure 22 : Fenêtres d'identification des microparticules AnnexineV+marqueur de lignée+ par CMF (fenêtre en haut à droite) : A. origine plaquettaire (AV+CD41+), B. origine érythrocytaire (AV+CD235a+), C. origine leucocytaire (AV+CD45+) et D. origine endothéliale (AV+CD144+)**

- Le pourcentage de microparticules d'une lignée, pour chaque prélèvement, correspond au rapport du nombre de microparticules de la lignée concernée, divisé par la somme des microparticules de chaque lignée pour ce prélèvement.

### III.1.3.4. Etude statistique

Nos échantillons sont de petite taille :  $N \leq 20$ . De ce fait, nous avons utilisé des tests statistiques non-paramétriques. Pour l'étude des échantillons non appariés (témoins versus patients), nous avons utilisé le test de Mann-Whitney. Pour l'étude des échantillons appariés (avant versus après centrifugation) nous avons utilisé le test de Wilcoxon. Une significativité statistique est retenue lorsque  $p < 0,05$ . Les corrélations ont été réalisées avec le test des rangs de Spearman dont le coefficient de corrélation obtenu est  $r$ .

## III.2. RESULTATS

### III.2.1. STA Procoag PPL®

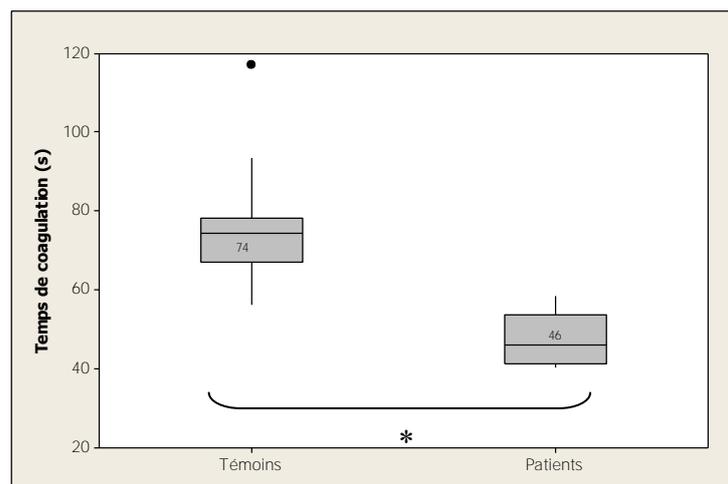
#### III.2.1.1. Témoins versus patients

Les temps de coagulation avec le kit STA Procoag PPL® ont été déterminés pour les 20 témoins et les 9 patients. Les résultats obtenus sont présentés dans le tableau 2.

	Temps de coagulation (s)	
	Témoins (N=20)	Patients (N=9)
Médiane	74	46
Etendue	56-117	40-58

**Tableau 2 : Paramètres obtenus avec le STA Procoag PPL®**

La figure 23 illustre graphiquement la répartition de ces temps de coagulation.



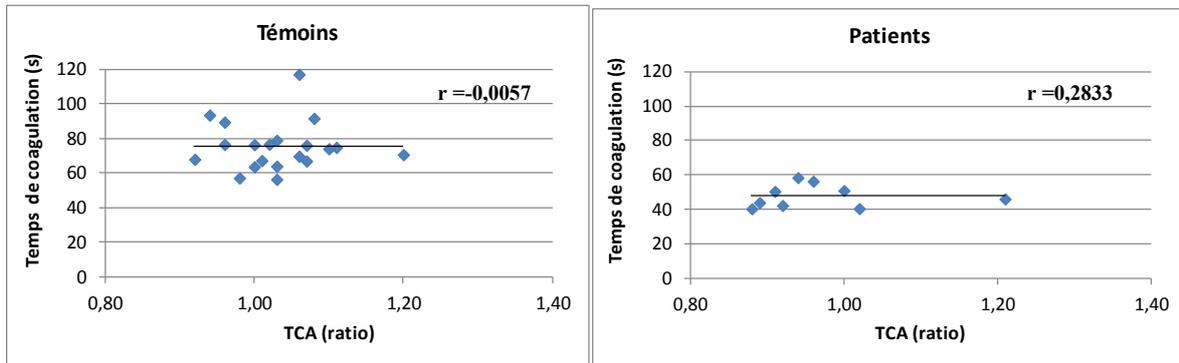
**Figure 23 : Répartition des temps de coagulation obtenus avec le STA Procoag PPL®**

**\*: p<0,001 test de Mann-Whitney**

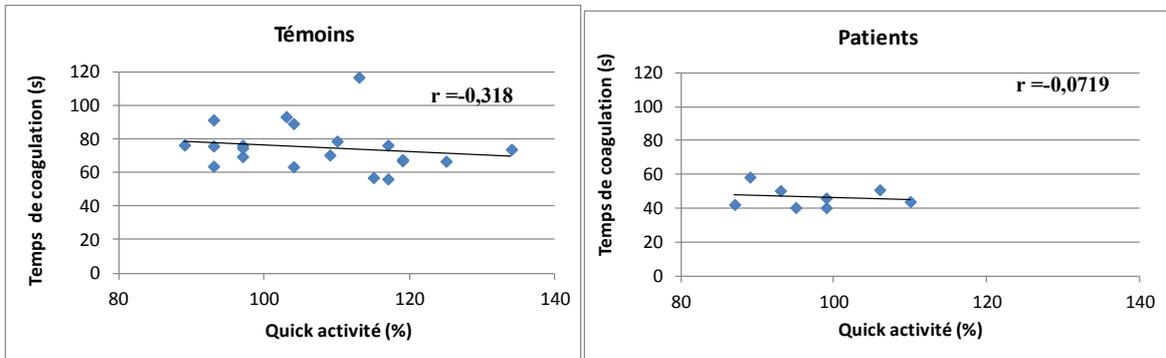
Le test de Mann-Whitney montre qu'il existe une différence significative entre les temps de coagulation des plasmas témoins et les temps de coagulation des plasmas patients ( $p < 0,001$ ).

Nous avons apprécié l'éventuel lien entre les temps de coagulation obtenus avec le STA Procoag PPL® et le Temps de Céphaline+Activateur (TCA), le Quick activité et le fibrinogène. Pour cela, le TCA (APTT TriniClot®, Trinity Biotech), le Quick activité (Neoplastine CI PLUS®, Diagnostica Stago) et le fibrinogène (Fibrinogen C®, IL) ont été mesurés dans les plasmas témoins et patients avec l'appareil ACL Top IL (un des plasmas

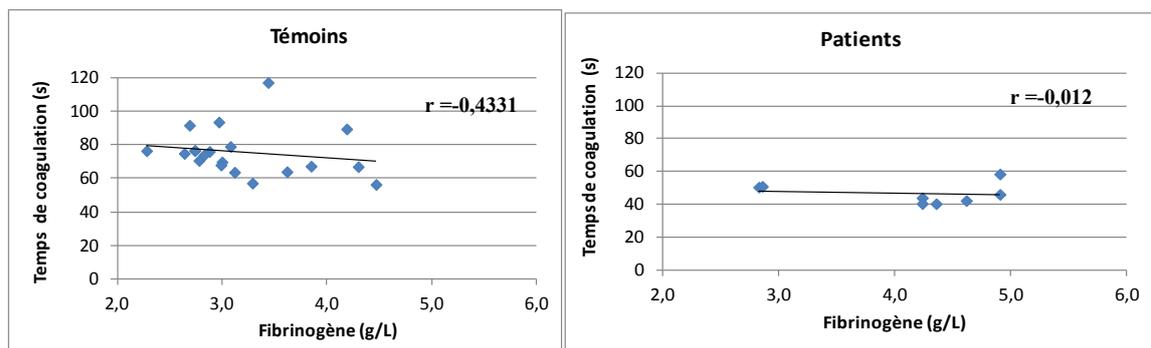
patient était en quantité insuffisante pour réaliser le Quick activité et doser le fibrinogène). Les résultats obtenus sont présentés figures 24, 25 et 26.



**Figure 24 : Temps de coagulation obtenus avec le STA Procoag PPL® en fonction du TCA**  
**r : coefficient de corrélation de Spearman**



**Figure 25 : Temps de coagulation obtenus avec le STA Procoag PPL® en fonction du Quick activité**  
**r : coefficient de corrélation de Spearman**



**Figure 26 : Temps de coagulation obtenus avec le STA Procoag PPL® en fonction du fibrinogène**  
**r : coefficient de corrélation de Spearman**

Nous n'observons pas de corrélation entre le temps de coagulation obtenu avec le STA Procoag PPL® et le TCA, le Quick activité ou le fibrinogène. Les temps de coagulation

mesurés avec la méthode STA Procoag PPL® ne semblent donc pas influencés par la concentration intrinsèque des échantillons en facteurs de la coagulation.

### III.2.1.2. Avant versus après centrifugation

Les temps de coagulation ont été déterminés avec le kit STA Procoag PPL® avant et après centrifugation à 13000g pendant 30 minutes pour les 20 témoins et les 9 patients. Les résultats sont présentés tableau 3.

Témoins (N=20)	Temps de coagulation (s)		Patients (N=9)	Temps de coagulation (s)	
	Avant	Après		Avant	Après
Médiane	74	92	Médiane	46	64
Etendue	56-117	74-109	Etendue	40-58	55-80

Tableau 3 : Paramètres obtenus avec le STA Procoag PPL® avant et après centrifugation

La figure 27 illustre graphiquement la répartition de ces temps de coagulation.

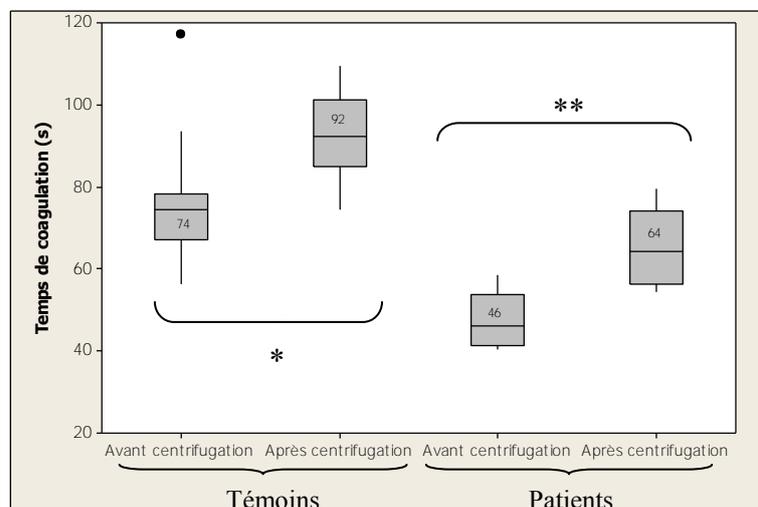


Figure 27 : Répartition des temps de coagulation obtenus avec le STA Procoag PPL® avant et après centrifugation

\* :  $p < 0,001$  test de Wilcoxon

\*\* :  $p = 0,0039$  test de Wilcoxon

Nous observons un allongement des temps de coagulation en lien avec la diminution du nombre de microparticules suite à la centrifugation. Le test de Wilcoxon montre qu'il existe une différence significative entre les temps de coagulation des plasmas témoins avant et après

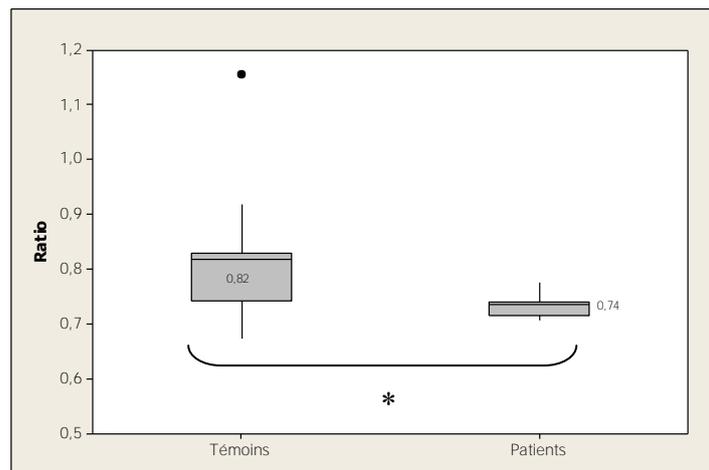
centrifugation ( $p < 0,001$ ). De même pour les patients mais avec une significativité moins importante :  $p = 0,0039$ .

Les temps obtenus après centrifugation ne sont cependant pas du même ordre de grandeur pour les plasmas témoins et les plasmas patients.

Nous avons ensuite déterminé le ratio des temps de coagulation. L'étude de ces ratios est présentée dans le tableau 4 et la figure 28.

	Ratio médian	Etendue
<b>Témoin (N=20)</b>	0,82	0,67-1,16
<b>Patients (N=9)</b>	0,74	0,71-0,78

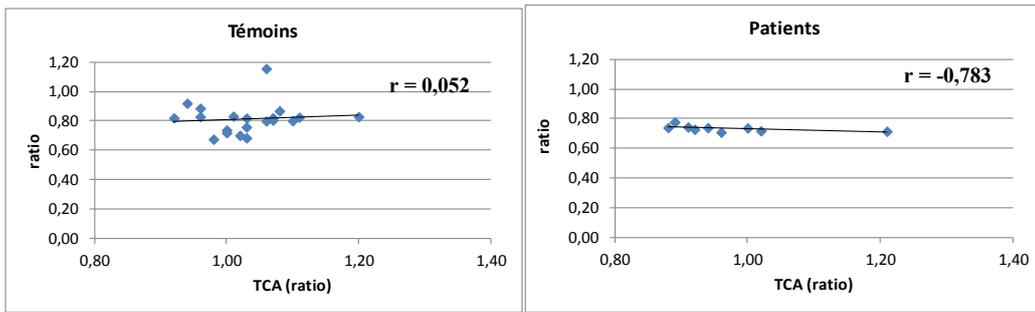
**Tableau 4 : Ratios des temps de coagulation obtenus avec le STA Procoag PPL®**



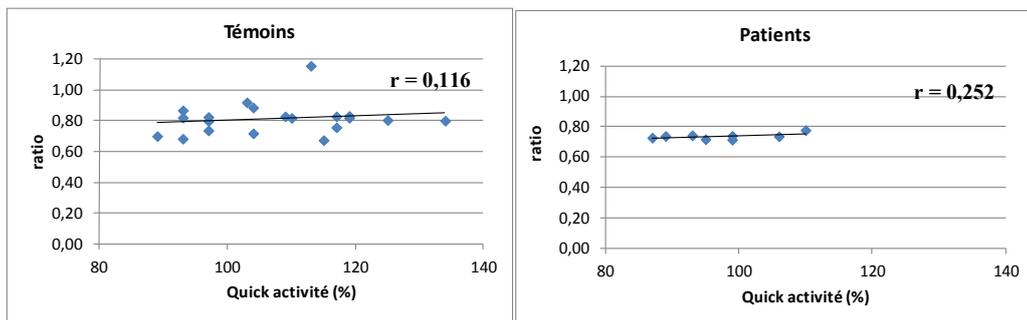
**Figure 28 : Répartition des ratios des temps de coagulation obtenus avec le STA Procoag PPL®**  
 \*:  $p = 0,0173$  test de Mann-Whitney

Le test de Mann-Whitney montre qu'il existe une différence significative entre les ratios témoins et les ratios patients ( $p = 0,0173$ ).

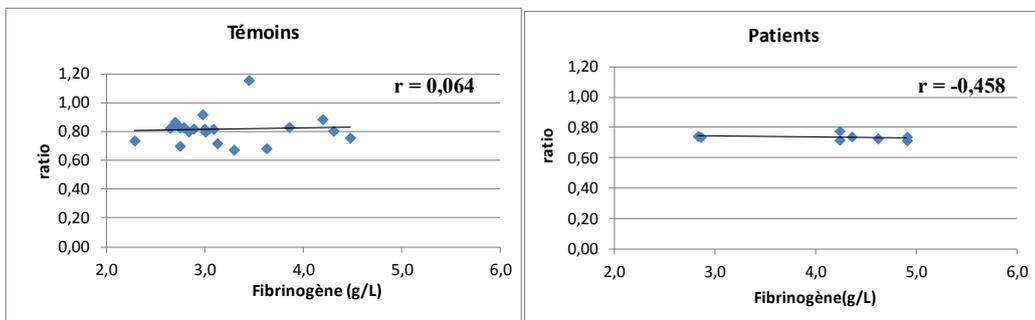
Nous avons, de même qu'avec les temps de coagulation, apprécié l'éventuel lien entre les ratios obtenus avec le STA Procoag PPL® et le TCA (APTT TriniClot®, Trinity Biotech), le Quick activité (Neoplastine CI PLUS®, Diagnostica Stago) et le fibrinogène (Fibrinogen C®, IL) mesurés dans les plasmas témoins et patients avec l'appareil ACL Top IL. Les résultats obtenus sont présentés figures 29, 30 et 31.



**Figure 29 : Ratios obtenus avec le STA Procoag PPL® en fonction du TCA**  
**r : coefficient de corrélation de Spearman**



**Figure 30 : Ratios obtenus avec le STA Procoag PPL® en fonction du Quick activité**  
**r : coefficient de corrélation de Spearman**



**Figure 31 : Ratios obtenus avec le STA Procoag PPL® en fonction du fibrinogène**  
**r : coefficient de corrélation de Spearman**

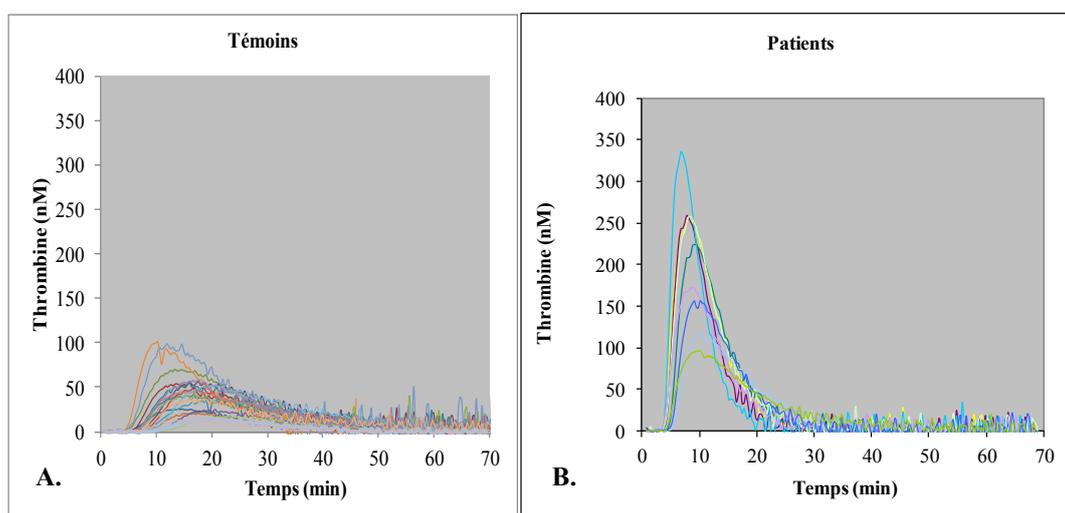
Nous n'observons pas de corrélation entre les ratios et le TCA, le Quick activité ou le fibrinogène. En ce qui concerne les plasmas patients et la mesure du TCA, le coefficient de corrélation est plus élevé. Cependant, les valeurs de TCA correspondent à des valeurs normales. Nous considérons donc qu'il n'y a pas de corrélation avec les ratios.

Les différences de ratios observées entre les témoins et les patients ne sont donc pas dues aux facteurs de coagulation.

### III.2.2. Thrombinographie

#### III.2.2.1. Témoin versus patients

Les thrombinogrammes obtenus avec les plasmas témoins et patients sont présentés figure 32.



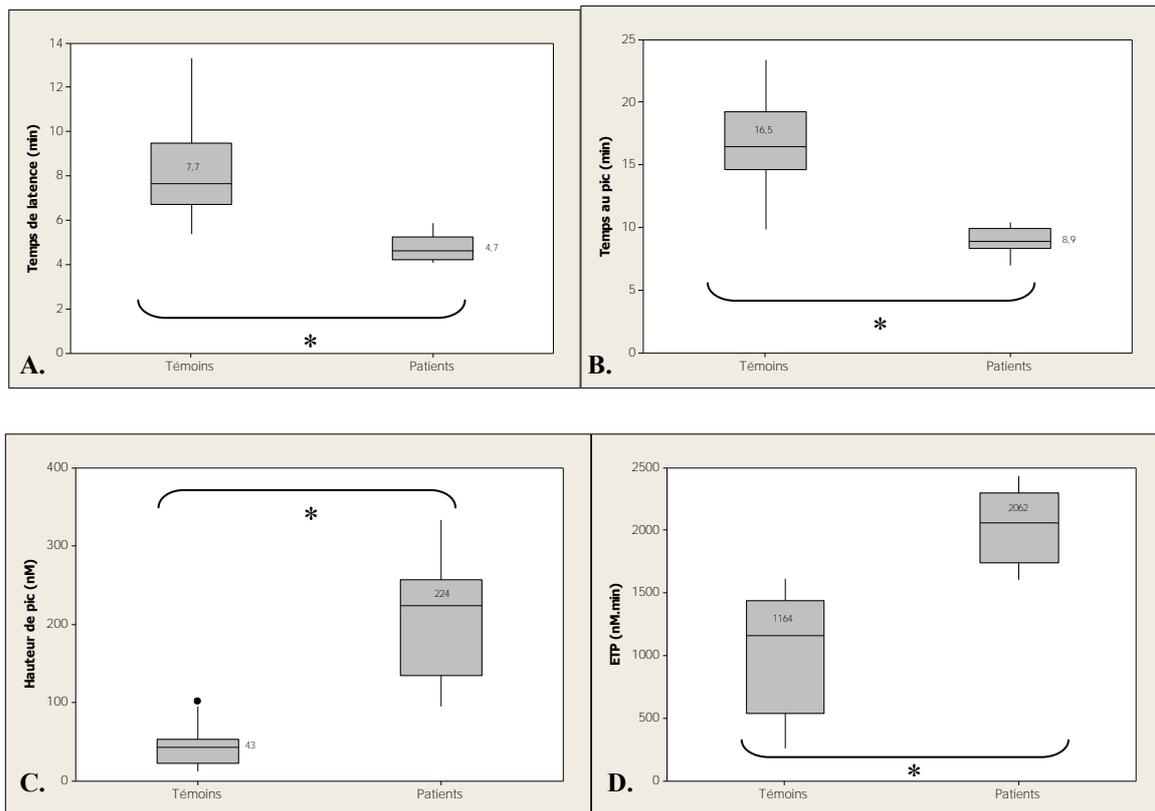
**Figure 32 : Thrombinogrammes obtenus avec le réactif PRP-Reagent® (FT à 1 pM)**

Les différents paramètres du thrombinogramme mesurés et calculés sont présentés tableau 5 et figure 33.

	Temps de latence (min)		Temps au pic (min)		Hauteur de pic (nM)		ETP (nM.min)	
	Témoins (N=20)	Patients (N=9)	Témoins (N=20)	Patients (N=9)	Témoins (N=20)	Patients (N=9)	Témoins (N=20)	Patients (N=9)
Médiane	7,7	4,7	16,5	8,9	43	224	1164	2062
Etendue	5,4-13,3	4,1-5,9	9,9-23,4	7,0-10,4	13-103	96-334	265-1614	1606-2440

**Tableau 5 : Paramètres des thrombinogrammes obtenus avec le réactif PRP-Reagent® (FT à 1 pM)**

La comparaison de ces quatre paramètres, par le test de Mann-Whitney, entre les témoins et les patients montre qu'il existe à chaque fois une différence significative avec  $p < 0,001$ .



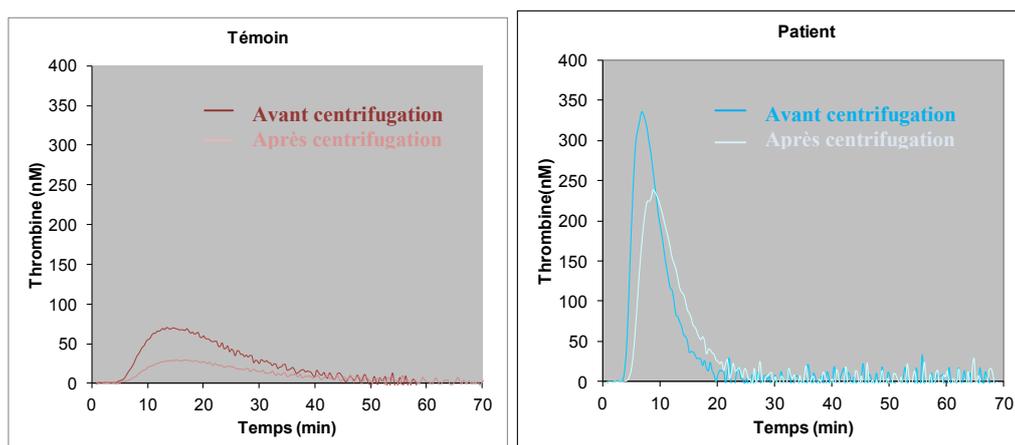
**Figure 33 : Répartition des temps de latence (A.), temps au pic (B.), hauteur de pic (C.) et ETP (D.) obtenus avec le réactif PRP-Reagent® (FT à 1 pM)**

**\*: p<0,001 test de Mann-Whitney**

### III.2.2.2. Avant versus après centrifugation

Tout comme les tests réalisés avec le STA Procoag PPL® , les paramètres du thrombinogramme ont été déterminés avant et après centrifugation à 13000g pendant 30 minutes avec les plasmas témoins et patients.

Les courbes types obtenues sont présentées figure 34.



**Figure 34 : Thrombinogrammes types obtenus avec le réactif PRP-Reagent® (FT à 1 pM) avant et après centrifugation**

Deux témoins n'ont pas été pris en compte dans ces comparaisons car la courbe ne revenait pas à la ligne de base, rendant impossible le calcul de l'ETP.

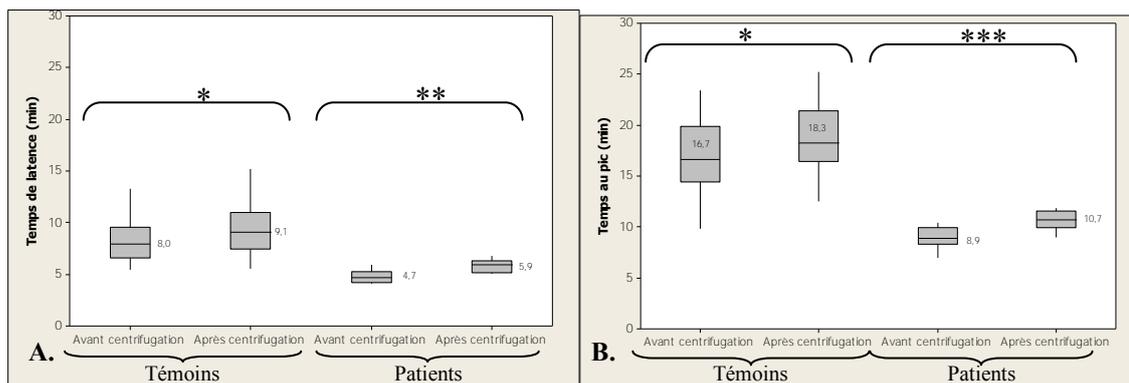
Le tableau 6 présente les différents paramètres des thrombinogrammes obtenus avant et après centrifugation.

<b>Témoins (N=18)</b>	Temps de latence (min)		Temps au pic (min)		Hauteur de pic (nM)		ETP (nM.min)	
	Avant	Après	Avant	Après	Avant	Après	Avant	Après
Médiane	8,0	9,1	16,7	18,3	43	15	1271	439
Etendue	5,4-13,3	5,5-15,2	9,9-23,4	12,5-25,2	13-103	4-55	265-1614	182-944
<b>Patients (N=9)</b>	Temps de latence (min)		Temps au pic (min)		Hauteur de pic (nM)		ETP (nM.min)	
	Avant	Après	Avant	Après	Avant	Après	Avant	Après
Médiane	4,7	5,9	8,9	10,7	224	110	2062	1568
Etendue	4,1-5,9	5,1-6,8	7,0-10,4	9,0-11,9	96-334	41-237	1606-2440	686-2189

**Tableau 6 : Paramètres des thrombinogrammes obtenus avec le réactif PRP-Reagent® (FT à 1 pM) avant et après centrifugation**

La répartition des temps de latence et des temps au pic obtenus avant et après centrifugation des plasmas témoins et patients est présentée figure 35.

Le test de Wilcoxon montre qu'il existe une différence significative des temps de latence et des temps au pic des plasmas témoins et patients entre avant et après centrifugation ( $p < 0,05$ ).



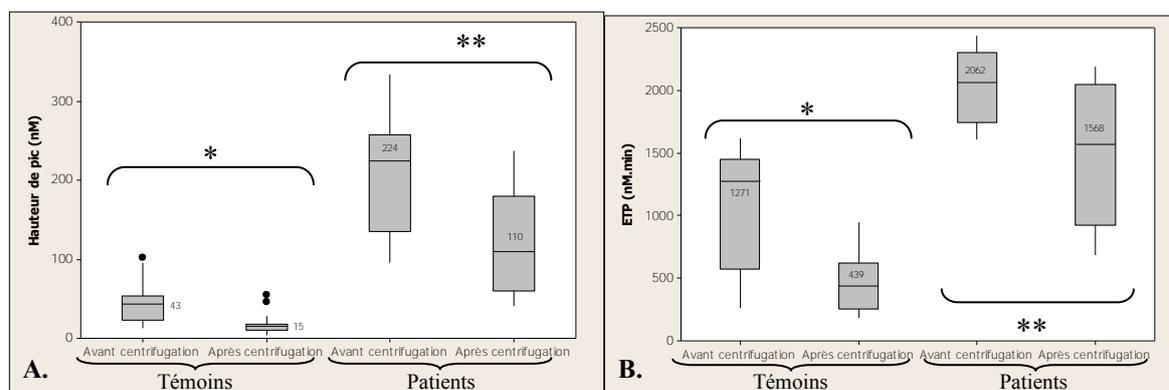
**Figure 35 : Répartition des temps de latence (A.) et des temps au pic (B.) obtenus avec le réactif PRP-Reagent® (FT à 1 pM) avant et après centrifugation**

\*:  $p < 0,001$  test de Wilcoxon ; \*\*:  $p = 0,0085$  test de Wilcoxon ; \*\*\* :  $p = 0,0039$  test de Wilcoxon

La différence est toujours moins marquée avec les plasmas patients. Nous observons également que malgré la centrifugation, les temps des plasmas patients restent toujours courts et même plus courts que les temps observés pour les témoins.

La répartition des hauteurs de pic et des ETP obtenus avant et après centrifugation des plasmas témoins et patients est présentée figure 36.

Le test de Wilcoxon montre qu'il existe une différence significative des hauteurs de pic et des ETP des plasmas témoins et patients entre avant et après centrifugation ( $p < 0,05$ ).



**Figure 36 : Répartition des hauteurs de pic (A.) et des ETP (B.) obtenus avec le réactif PRP-Reagent® (FT à 1 pM) avant et après centrifugation**

\*:  $p < 0,001$  test de Wilcoxon ; \*\* :  $p = 0,0039$  test de Wilcoxon

De même que les deux paramètres précédents, la différence est moins marquée pour les patients et les valeurs après centrifugation des plasmas patients restent supérieures aux valeurs des plasmas témoins.

### III.2.3. Cytométrie en flux

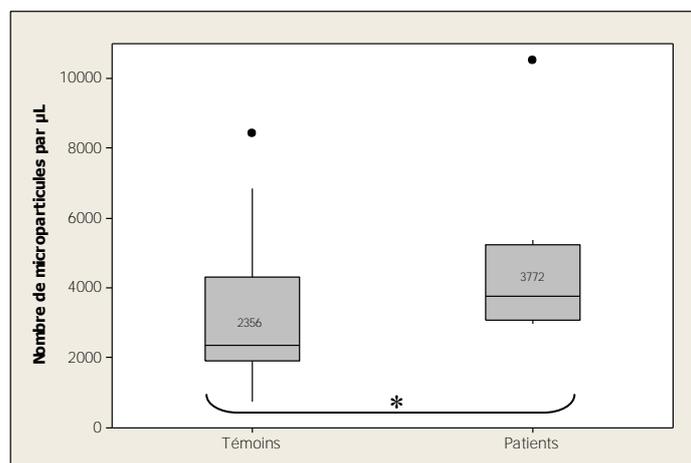
#### III.2.3.1. Témoins versus patients

Les résultats de cytométrie en flux concernent les 9 patients et 19 témoins (un problème technique a été rencontré avec un des échantillons témoin).

La distribution du nombre total de microparticules pour les témoins et les patients est présentée tableau 7 et figure 37.

		Témoins (N=19)	Patients (N=9)	p
Nombre de microparticules par $\mu\text{L}$	Médiane	2356	3772	0,0437
	Etendue	747-8425	2985-10527	

**Tableau 7 : Paramètres obtenus par CMF**



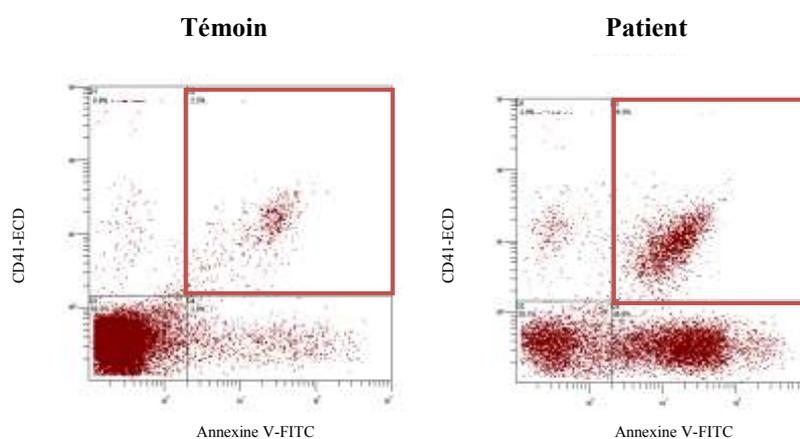
**Figure 37 : Répartition du nombre total de microparticules obtenu par CMF**  
\*:  $p=0,0437$  test de Mann-Whitney

Nous constatons que le nombre total de microparticules tend à être plus important dans les plasmas patients que dans les plasmas témoins. Il existe, de plus, une différence significative de ce nombre entre les témoins et les patients ( $p=0,0437$ ), même si ce résultat est proche de 0,05.

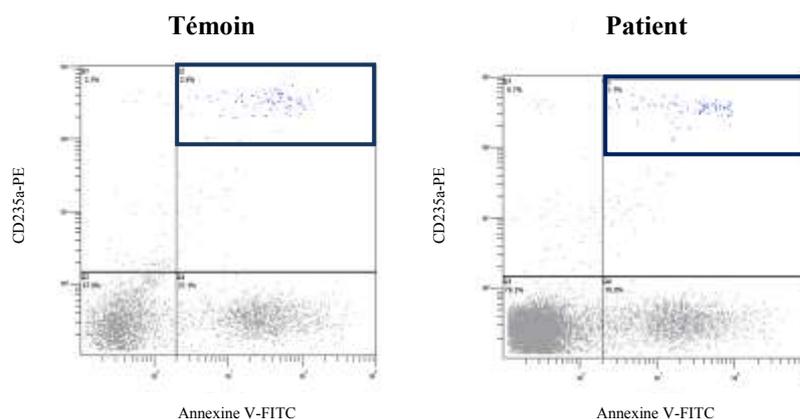
Les résultats obtenus en fonction de l'origine cellulaire des microparticules sont présentés dans le tableau 8. Les figures 38, 39, 40 et 41 permettent de visualiser la répartition des microparticules pour chaque lignée entre les témoins et les patients.

		Témoins (N=19)	Patients (N=9)	
Origine des microparticules		Médiane (étendue)	Médiane (étendue)	p
plaquettaire (Annexine+ CD41+)	Nombre de microparticules par $\mu$ L	1371 (225-6836)	1918 (1241-3826)	0,1684
érythrocytaire (Annexine+ CD 235a+)		129 (40-2197)	144 (84-5346)	0,2281
leucocytaire (Annexine+ CD 45+)		252 (71-531)	310 (137-712)	0,2477
endothéliale (Annexine+ CD144+)		39 (14-64)	22 (4-43)	0,0079

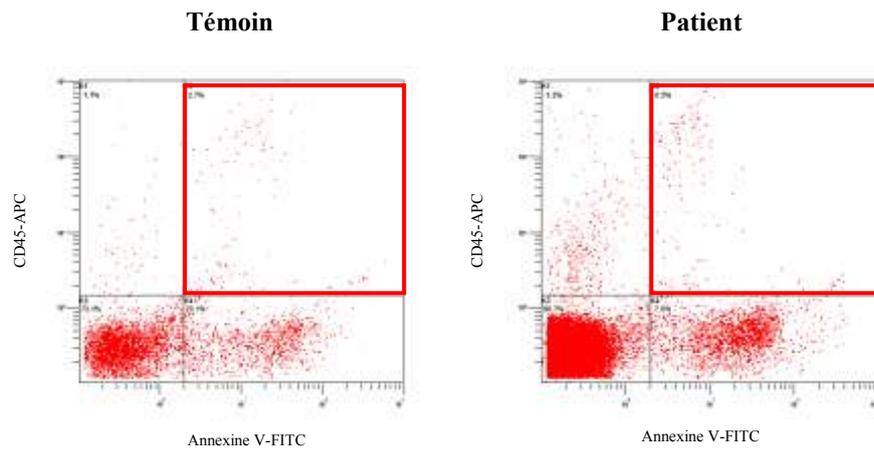
**Tableau 8 : Répartition des microparticules mesurées par CMF en fonction de leur origine cellulaire**



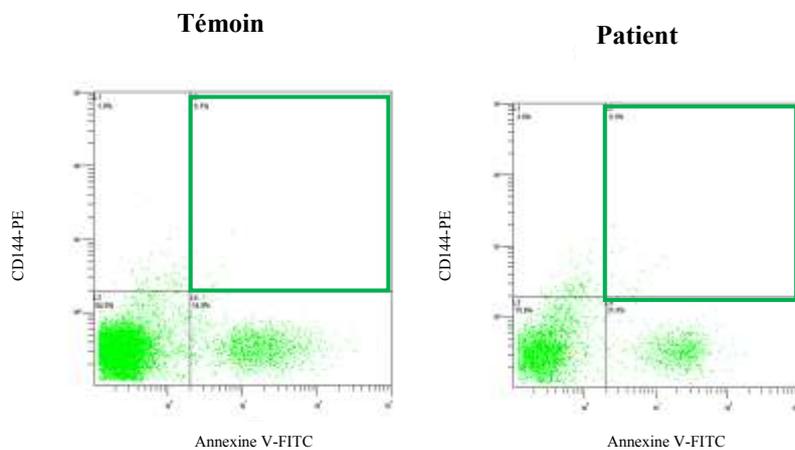
**Figure 38 : Mise en évidence par CMF des microparticules d'origine plaquettaire (AV+CD41+)**



**Figure 39 : Mise en évidence par CMF des microparticules d'origine érythrocytaire (AV+CD235a+)**



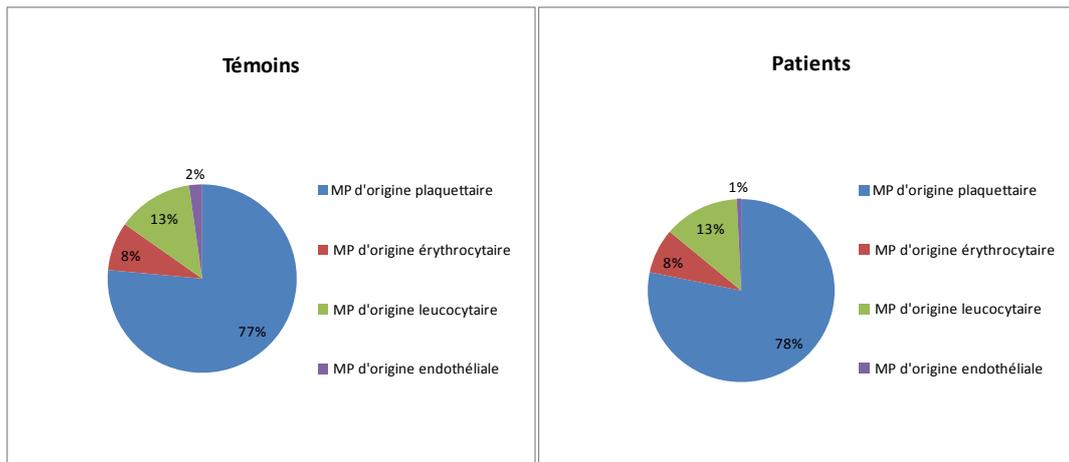
**Figure 40 : Mise en évidence par CMF des microparticules d'origine leucocytaire (AV+CD45+)**



**Figure 41 : Mise en évidence par CMF des microparticules d'origine endothéliale (AV+CD144+)**

Nous constatons que le nombre de microparticules de chaque lignée semble plus important pour les patients que pour les témoins, sauf pour les microparticules endothéliales. Nous n'observons cependant pas de différences significatives (sauf pour l'origine endothéliale).

Nous avons enfin étudié le pourcentage des microparticules en fonction de chaque origine cellulaire (figure 42).

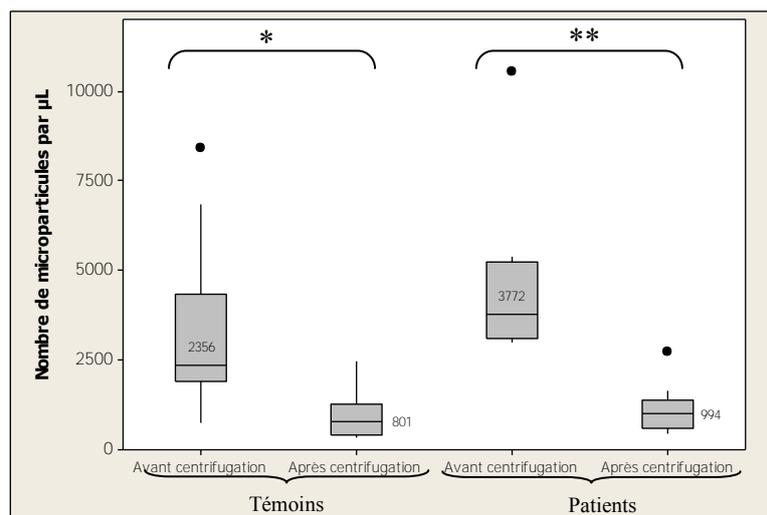


**Figure 42 : Proportion des microparticules en fonction de leur origine cellulaire après analyse par CMF**

Nous constatons que la répartition est identique dans les deux groupes.

### III.2.3.2. Avant versus après centrifugation

Nous avons étudié le nombre total de microparticules avant et après centrifugation (figure 43). Les valeurs obtenues nous ont permis d'observer le nombre de microparticules persistant après centrifugation afin de faire un parallèle avec les tests fonctionnels après centrifugation.



**Figure 43 : Répartition du nombre total de microparticules obtenu par CMF avant et après centrifugation**

\*:  $p < 0,001$  test de Wilcoxon ; \*\*:  $p = 0,00391$  test de Wilcoxon

Le test de Wilcoxon montre qu'il existe une différence significative entre le nombre total de microparticules avant et après centrifugation pour les plasmas témoins ( $p < 0,001$ ) et les plasmas patients ( $p = 0,0039$ ).

Nous constatons également qu'après centrifugation il persiste autant de microparticules pour les témoins que pour les patients.

### III.2.4. Etudes de corrélation

Pour établir les corrélations, nous avons choisi d'étudier les valeurs indépendamment du fait qu'elles aient été obtenues avant ou après centrifugation. Ceci nous permet d'augmenter notre effectif afin que la significativité puisse être meilleure. Les témoins et les patients sont également étudiés simultanément sans distinction.

#### III.2.4.1. Corrélation entre les tests fonctionnels

Nous avons étudié le lien entre le temps de coagulation du STA Procoag PPL® et les différents paramètres du thrombinogramme : l'ETP, la hauteur de pic, le temps de latence et le temps au pic.

Les corrélations entre le temps de coagulation et respectivement la hauteur de pic et l'ETP sont présentées figure 44.

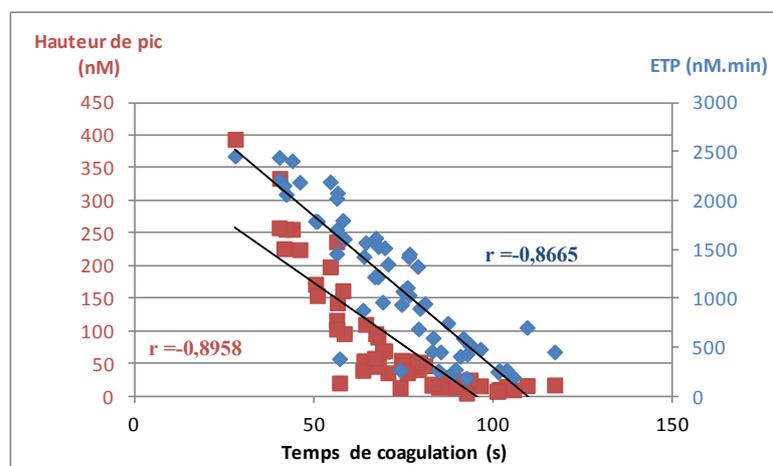
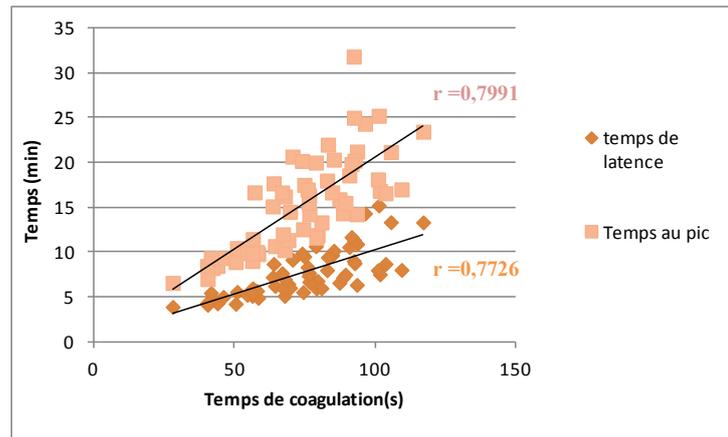


Figure 44 : Corrélation entre le temps de coagulation obtenu avec le STA Procoag PPL® et respectivement la hauteur de pic et l'ETP obtenus avec le réactif PRP-Reagent® (FT à 1 pM)

r : coefficient de corrélation de Spearman

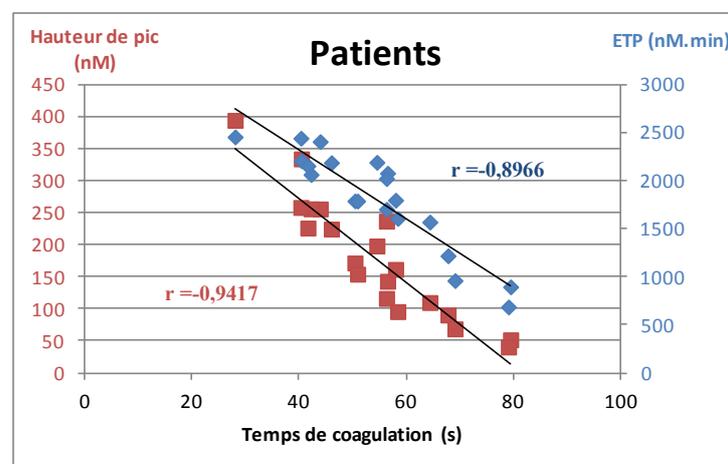
Le test fonctionnel STA Procoag PPL® et les paramètres de thrombinographie étudiés semblent être bien corrélés : le coefficient de corrélation de Spearman sont de  $-0,8665$  ( $p < 0,001$ ) entre le temps de coagulation et l'ETP et de  $-0,8958$  ( $p < 0,001$ ) entre le temps de coagulation et la hauteur de pic.

Les temps de latence et temps au pic semblent cependant moins corrélés au temps de coagulation tout en restant proportionnel avec la même tendance (figure 45).



**Figure 45 : Corrélation entre le temps de coagulation obtenu avec le STA Procoag PPL® et respectivement le temps de latence et le temps au pic obtenus avec le réactif PRP-Reagent® (FT à 1 pM)**  
**r : coefficient de corrélation de Spearman**

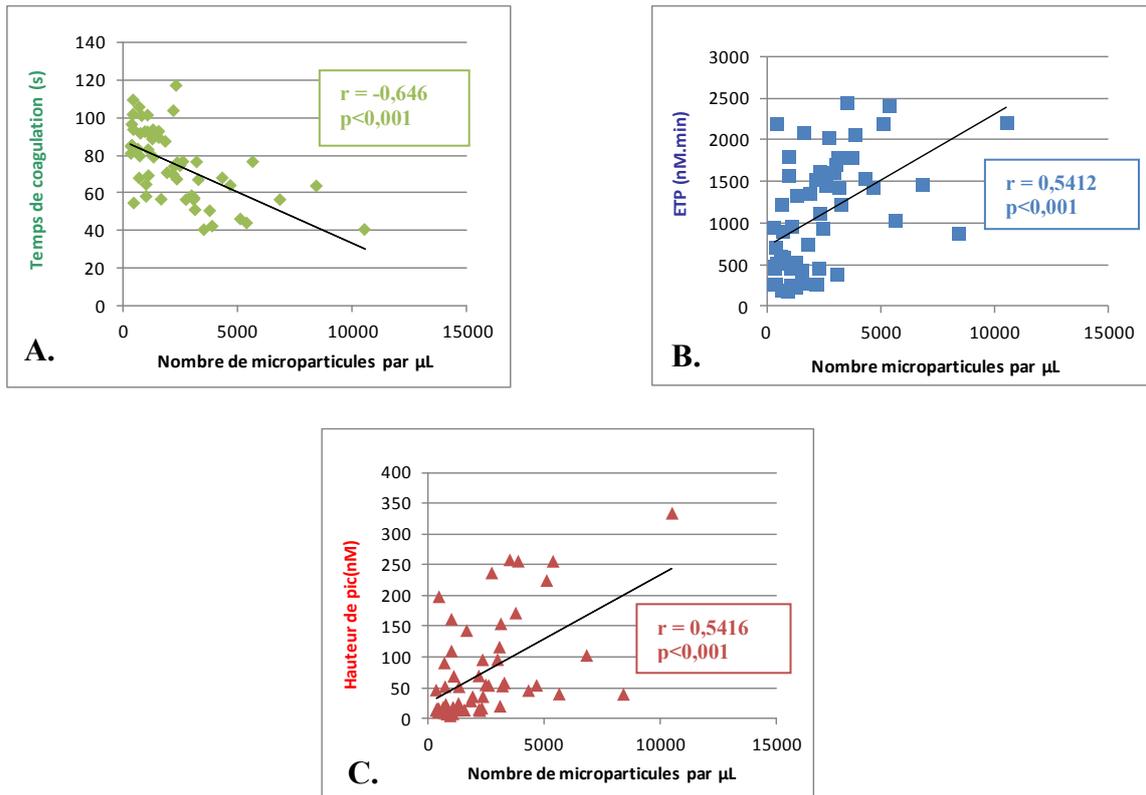
Quand nous observons séparément les valeurs des patients uniquement (sans distinction entre avant et après centrifugation), nous observons que la corrélation est meilleure entre le temps de coagulation et respectivement et la hauteur de pic ( $r = -0,9417$ ) et l'ETP ( $r = -0,8966$ ) (figure 46).



**Figure 46 : Corrélation chez les patients entre le temps de coagulation obtenu avec le STA Procoag PPL® et respectivement la hauteur de pic et l'ETP obtenus avec le réactif PRP-Reagent® (FT à 1 pM)**  
**r : coefficient de corrélation de Spearman**

### III.2.4.2. Corrélation entre tests fonctionnels et cytométrie en flux

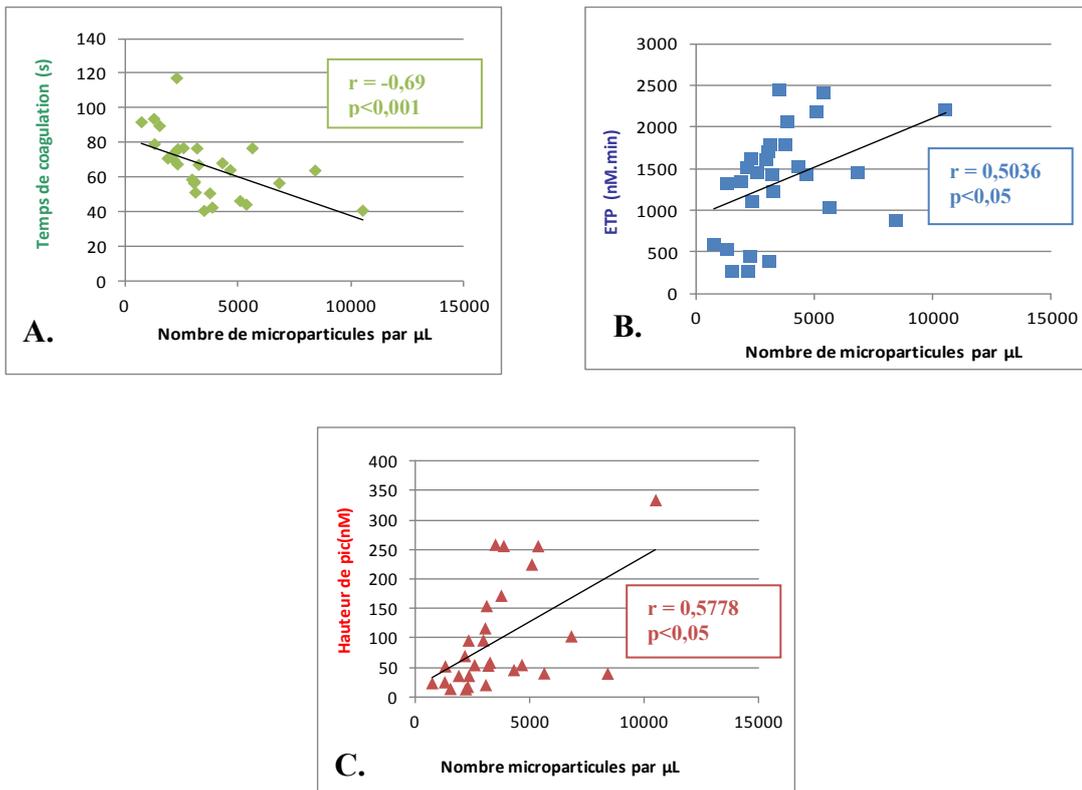
Nous avons étudié les corrélations entre le nombre total de microparticules détectées par CMF et respectivement le temps de coagulation du STA Procoag PPL® et l'ETP et la hauteur de pic obtenus par thrombinographie (figure 47).



**Figure 47 : Corrélation entre le nombre total de microparticules obtenu par CMF et respectivement le temps de coagulation (A.) obtenu avec le STA Procoag PPL®, l'ETP (B.) et la hauteur de pic (C.) obtenus avec le réactif PRP-Reagent® (FT à 1 pM)**  
**r : coefficient de corrélation de Spearman**

Nous constatons qu'il existe une relation entre les différents paramètres, avec cependant des coefficients de corrélation moins élevés que lors de la comparaison du STA Procoag PPL® avec les paramètres du thrombinogramme.

Si nous choisissons d'observer la corrélation avec les résultats obtenus uniquement avant centrifugation, les coefficients de corrélation observés sont meilleurs (figure 48).



**Figure 48 : Corrélation entre le nombre total de microparticules obtenu par CMF et respectivement le temps de coagulation (A.) obtenu avec le STA Procoag PPL®, l'ETP (B.) et la hauteur de pic (C.) obtenus avec le réactif PRP Reagent® (FT à 1 pM) avant centrifugation**  
**r : coefficient de corrélation de Spearman**

## IV. DISCUSSION

Les microparticules procoagulantes sont depuis quelques années pourvoyeuses de nombreux espoirs, comme biomarqueurs, tant au point de vue diagnostique que pronostique dans les pathologies thrombotiques, inflammatoires, infectieuse. Différentes études ont été réalisées dans ces contextes, avec des techniques variées. Nous avons choisi, dans ce travail, de faire état du comportement des microparticules procoagulantes chez des patients ayant présenté un AVC ischémique en phase aigüe. L'essentiel des études déjà réalisées sur ce sujet utilisent la cytométrie en flux. Nous allons élargir la caractérisation des microparticules dans cette pathologie par une étude de leur aspect fonctionnel en terme de capacité procoagulante.

Nos résultats reposent tout d'abord sur des conditions pré-analytiques strictes (ISTH 2010), d'application indispensable si l'on veut obtenir des résultats fiables et exploitables. Ainsi, la double centrifugation réalisée dans l'heure suivant le recueil des prélèvements est une étape clé : le respect d'un délai d'une heure permet d'éviter la formation artéfactuelle de microparticules avant la centrifugation. De plus, la double centrifugation permet d'éliminer de façon optimale les cellules qui pourraient générer, lors de la congélation, des microparticules (52). Cependant, malgré une volonté de standardisation, toutes les publications évoquées dans ce travail présentent des conditions pré-analytiques différentes : simple ou double centrifugation, double centrifugation dans les mêmes conditions ou dans des conditions différentes, recueil du plasma dépourvu en plaquettes directement ou resuspension des microparticules dans des pools de plasmas dépourvus en microparticules ou dans du tampon. Il serait intéressant, à l'avenir, que l'ensemble des équipes utilisent la même procédure pré-analytique afin d'obtenir des données comparables.

Les AVC ischémiques présentent un intérêt particulier dans l'étude des microparticules procoagulantes de part la physiopathologie de la formation de la plaque d'athérome et de sa rupture avec activation cellulaire et activation endothéliale. Ainsi, les trois tests réalisés dans notre étude permettent d'affirmer que cet état serait conjoint à la libération de microparticules procoagulantes.

Le STA Procoag PPL®, premier test fonctionnel étudié, montre des temps de coagulation plus courts pour le groupe patient par rapport au groupe témoin ( $p < 0,001$ ). Afin d'expliquer ce test, rappelons que les surfaces phospholipidiques cellulaires usuellement impliquées dans

la coagulation ne peuvent être responsables de la formation du caillot dans cette situation, car le plasma issu de la double centrifugation est dépourvu de cellules. Ce test est donc dépendant des phospholipides apportés par le prélèvement. Il est de plus indépendant des facteurs de coagulation. En effet, les réactifs du STA Procoag PPL® sont dépourvus de phospholipides et un des réactifs est composé de plasma humain déplété en phospholipides qui apporte les éventuels facteurs de la coagulation diminués (interférence en-dessous de 40% de facteur V).

Les temps de coagulation plus courts, ainsi observés dans le groupe patient, signent la présence d'une concentration plus importante de microparticules ayant une activité procoagulante lors de l'AVC ischémique. Ceci ne peut pas être attribué à un déficit en facteur, un anticoagulant circulant ou à un traitement anticoagulant car les différents temps de coagulation (TCA et Quick activité) et le fibrinogène sont situés dans les valeurs normales (quelques valeurs de fibrinogène sont supérieures à 4 g/L). De plus, ces paramètres ne sont pas corrélés aux temps de coagulation du STA Procoag PPL®. Enfin, la quasi absence de chevauchement entre la répartition des temps de coagulation des témoins et des patients démontre une grande discrimination de ces patients par le STA Procoag PPL®.

Cette observation est confirmée par la thrombinographie où les quatre paramètres étudiés sont significativement différents entre témoins et patients. Cette approche plus globale permet d'étudier les phospholipides procoagulants grâce au réactif PRP-Reagent® qui apporte uniquement du facteur tissulaire à 1 pM sans phospholipides additionnels. Ce réactif permet l'initiation de la coagulation par la voie extrinsèque ; l'absence de phospholipides dans le réactif permet ainsi d'apprécier l'influence des phospholipides apportés par le plasma testé. Les autres études qui traitent du caractère procoagulant des microparticules par la même technique de thrombinographie que celle utilisée dans notre travail, proposent des concentrations variées en facteur tissulaire : 1 pM pour Debaugnies *et al.* (62), 5 pM pour Owen *et al.* (63), 10 pM pour Noubouossie *et al.* (64) ou aucun ajout de facteur tissulaire (65, 66, 67, 68). Nous avons pris le parti de travailler à 1 pM de facteur tissulaire en tenant compte du travail de Spronk *et al.* (69) qui montre qu'une concentration supérieure ou égale à 1 pM est suffisante pour s'affranchir de l'activation de la coagulation par la phase contact.

Les différents paramètres des thrombinogrammes obtenus pour notre groupe témoin sont en accord avec les résultats de la littérature pour les sujets considérés comme témoins : l'étude de Debaugnies *et al.* (62) est celle dont les conditions pré-analytiques se rapprochent le plus des nôtres (à l'exception de leur double centrifugation qui est réalisée à 3000 g). Ils étudient l'activité procoagulante de plasmas de patients ayant un cancer comparés à des plasmas

témoins. Les temps de latence et au pic obtenus pour leurs plasmas témoins sont respectivement de 4,5 et 11,4 minutes comparés à 7,7 et 16,5 minutes pour notre étude. Les ETP et hauteur de pic sont respectivement de 1714 nM.min et 155 nM comparés à 1271 nM.min et 47 nM pour notre étude. Les écarts observés pourraient être dus à la différence des âges médians entre les deux échantillons : 66 ans dans leur étude comparé à 28 ans dans la nôtre. De plus, il est connu qu'il existe un coefficient de variation moyen inter-laboratoire en thrombinographie (70).

En ce qui concerne les paramètres des thrombinogrammes obtenus pour les patients de notre étude, les temps de latence et les temps au pic sont plus courts que ceux observés dans le groupe témoin ( $p < 0,001$ ) démontrant que l'assemblage des facteurs de la coagulation et que l'ensemble de la coagulation a lieu plus rapidement. Il en est de même pour les ETP et les hauteurs du pic qui sont augmentés pour les patients ( $p < 0,001$ ). Ainsi, l'augmentation de la vitesse et de la quantité de thrombine formée est liée à un plus grand nombre de microparticules procoagulantes. Dans l'étude de Debaugnies *et al.* (62), les mêmes différences sont observées entre patients et témoins, sauf pour le temps de latence où aucune différence significative n'est observée. Cette différence existe cependant dans notre étude. Le temps de latence étant essentiellement dépendant de la quantité de facteur tissulaire (62), nous pouvons supposer qu'en plus d'une quantité plus importante de phospholipides, nos échantillons patients contiennent également une quantité plus importante de facteur tissulaire. Ceci serait probablement en lien avec la libération de facteur tissulaire lors de la rupture de la plaque d'athérome.

Enfin, tout comme avec le STA Procoag PPL®, il n'y a quasiment pas de chevauchement de la répartition des quatre paramètres étudiés entre patients et témoins. La thrombinographie permet donc une discrimination intéressante des patients par rapport aux témoins.

Ainsi, les résultats des tests fonctionnels montrent que les plasmas des patients ayant présentés un AVC ischémique en phase aiguë contiennent une activité plus importante des phospholipides endogènes et probablement du facteur tissulaire, en lien avec une augmentation supposée des microparticules.

Lorsque l'on réalise par CMF la numération des microparticules considérées comme procoagulantes par fixation de l'annexine V, nous confirmons les résultats des tests fonctionnels avec une différence significative du nombre total de microparticules entre patients et témoins ( $p = 0,0437$ ). Cependant, contrairement au STA Procoag PPL et à la thrombinographie, les répartitions du nombre de microparticules entre témoins et patients se

chevauchent. De plus, les différences entre nombre de microparticules par lignée (plaquettaire, érythrocytaire et leucocytaire) entre témoins et patients ne sont pas significatives malgré un nombre plus important à chaque fois pour le groupe patient. L'étude réalisée par Simak *et al.* (46), qui étudie les microparticules d'origine endothéliale lors d'un AVC ischémique, corrobore ces résultats : les auteurs n'observent pas de différence significative du nombre de microparticules d'origine plaquettaire, érythrocytaire et leucocytaire entre témoins et patients. Cependant il n'est pas précisé si ces microparticules de lignées sont marquées par l'annexine, en plus de l'anticorps spécifique d'origine cellulaire. A côté de cette observation, leur étude démontre principalement que certaines microparticules d'origine endothéliale, définies comme fixant l'annexine et le CD105+, sont significativement plus élevées pour leurs patients ( $p=0,002$ ). La valeur absolue correspondant à cette population est de 59 microparticules par  $\mu\text{L}$ . Ils définissent également d'autres populations endothéliales sans cependant les marquer par l'annexine. Nous considérons que nous ne pouvons pas utiliser ces valeurs pour les comparer aux nôtres car le caractère annexine V positif est indispensable à la distinction des microparticules. Dans notre étude, le nombre de microparticules d'origine endothéliale est significativement différent entre témoins et patients mais contrairement à ce que l'on aurait pensé, le groupe témoin possède plus de microparticules que le groupe patient. Ceci pourrait s'expliquer par une détection insuffisante des microparticules endothéliales par le CD144 avec un bruit de fond contaminant la numération. De plus, le CD144, antigène spécifique des cellules endothéliales, est moins abondant à la surface des cellules endothéliales que d'autres antigènes. Enfin, il a une demi-vie courte avec un turn over important au niveau des cellules endothéliales.

Au final, il y aurait plus de microparticules totales dans le groupe patient avec augmentation de toutes les lignées. Cependant, la comparaison des numérations totales entre témoins et patients donne  $p$  proche de 0,05. Un effectif supérieur du groupe patient pourrait alors nous permettre d'obtenir des résultats plus significatifs.

En ce qui concerne la répartition des microparticules en fonction de leur origine cellulaire, les mêmes pourcentages sont observés dans les deux groupes : origine plaquettaire à 77% pour les témoins et 78% pour les patients, origine érythrocytaire : 8%, origine leucocytaire : 13% et origine endothéliale : 2% pour les témoins, 1% pour les patients. Ces pourcentages semblent en accord avec ceux de la littérature : Macey *et al.* (71) montrent que les microparticules de 35 plasmas « normaux » proviennent pour 75% de la lignée plaquettaire (CD42b+), 6,9% de la lignée érythrocytaire (CD235a+) et 8,9% de la lignée leucocytaire (CD45+).

Les différences observées au niveau potentiel procoagulant seraient donc imputables au nombre de microparticules et non pas à l'origine. De plus, l'AVC induirait donc une augmentation de la formation de microparticules mais pour toutes les lignées sans que l'origine plaquettaire soit la plus marquée, comme nous aurions pu nous y attendre. La comparaison des groupes témoins et patients par ces trois tests montre également une plus grande discrimination des patients par les tests fonctionnels. Ces tests seraient plus sensibles pour détecter une augmentation de microparticules procoagulantes que la cytométrie en flux.

Nous avons voulu, dans une seconde partie, comparer ces différents tests. Afin d'augmenter la puissance de notre étude, nous avons choisi de travailler avec chaque échantillon dans deux conditions différentes : avant et après centrifugation à 13000g pendant 30 minutes, condition qui, comme la filtration (0,2  $\mu\text{m}$ ) utilisée par Macey *et al.* (71) ou la centrifugation (49000g 10 minutes) de Owen *et al.* (63), permet théoriquement d'éliminer les microparticules.

Nous constatons que l'ensemble des paramètres des tests fonctionnels sont significativement différents après centrifugation. Nous remarquons cependant que la significativité est toujours moins importante pour les patients que pour les témoins. Ainsi, l'allongement du temps de coagulation du STA Procoag PPL® ( $p < 0,001$  pour les témoins et  $p < 0,005$  pour les patients), la diminution de la quantité maximale de thrombine générée ( $p < 0,001$  pour les témoins et  $p < 0,005$  pour les patients), et la diminution de l'ETP ( $p < 0,001$  pour les témoins et  $p < 0,005$  pour les patients) signent une diminution des surfaces phospholipidiques procoagulantes nécessaires à l'assemblage et à l'activité des facteurs de la coagulation. L'élimination des microparticules procoagulantes par la centrifugation est confirmée numériquement par la diminution significative du nombre total de microparticules annexine positive (2356/ $\mu\text{L}$  à 801/ $\mu\text{L}$ ,  $p < 0,001$  pour les témoins et 3772/ $\mu\text{L}$  à 994/ $\mu\text{L}$ ,  $p < 0,005$  pour les patients). La centrifugation retire ainsi une valeur médiane de 72% de microparticules totales pour les témoins (étendue : 7,3-90,6%) et une valeur médiane de 76,6% (étendue : 65-87,1%) pour les patients. Comparée à l'étude de Macey *et al.* (71) qui élimine 99,8% des microparticules annexine positive (2817 à 6 microparticules par  $\mu\text{L}$ ), notre centrifugation élimine moins de microparticules que leur filtration. Il semble de plus, que la quantité de microparticules éliminées est proportionnelle au nombre initial de microparticules : le coefficient de régression linéaire ( $R^2$ ) entre les deux est de 0,922. Ainsi plus il y a de microparticules dans l'échantillon de départ, plus la centrifugation en élimine avec un pourcentage non identique entre les échantillons.

Ainsi, après centrifugation, il persiste un nombre total de microparticules nettement différent de zéro permettant d'expliquer la persistance du phénomène procoagulant des tests fonctionnels, avec des profils toutefois beaucoup moins marqués qu'avant centrifugation. L'étude d'Owen *et al.* (63), utilisant uniquement du facteur tissulaire à 5 pM, donne des résultats du même ordre de grandeur : la quantité maximale moyenne de thrombine générée avant centrifugation est de 96 nM versus 9 nM après centrifugation 49000g 10 minutes. Par contre, il n'est pas possible de comparer nos valeurs de thrombinographie avec celles obtenues par Macey *et al.* (71), car les auteurs utilisent comme déclenchant de la coagulation, du facteur tissulaire 5 pM associé à des phospholipides à 4 µM : la coagulation obtenue n'est donc pas strictement dépendante des phospholipides apportés par le plasma.

Il est intéressant de remarquer qu'après centrifugation, le nombre total de microparticules qui persistent dans les groupes témoin et patient sont comparables ( $p=0,4312$ ). Cependant, les paramètres des tests fonctionnels correspondants sont différents avec des répartitions de valeurs qui ne se chevauchent pas. Il y a donc une discordance entre nombre et activité procoagulante. Ceci pourrait s'expliquer par un nombre plus important de microparticules de petite taille ( $< 0,5 \mu\text{m}$ ) non détectées par notre technique de cytométrie en flux dont le seuil de détection est  $0,5 \mu\text{m}$ . La centrifugation pourrait éliminer quantitativement moins de ces microparticules de petite taille et ceci contribuerait au phénotype procoagulant persistant après centrifugation. L'utilisation du réactif MégamixPlus, qui abaisse le seuil d'étude, permettrait de vérifier cette hypothèse. La seconde hypothèse serait qu'il y a dans les plasmas patients d'autres facteurs qui influenceraient la coagulation.

La comparaison des trois tests entre eux révèle des corrélations entre les différents paramètres. Le STA Procoag PPL® montre une corrélation intéressante avec les paramètres du test global d'étude de la coagulation qu'est la thrombinographie. En effet, nous observons une bonne corrélation du temps de coagulation avec la hauteur de pic ( $r=-0,896$ ) et l'ETP ( $r=-0,867$ ) mais également avec le temps de latence ( $r=0,773$ ) et le temps au pic ( $r=0,799$ ). Des coefficients de corrélation de Spearman moins significatifs sont observés dans l'étude de Noubouossie *et al.* (64) : le travail de ces auteurs concerne l'étude de l'activité procoagulante des phospholipides endogènes de 43 enfants drépanocytaires et de 20 sujets contrôles avec le kit STA Procoag PPL® et la thrombinographie (facteur tissulaire à 10 pM). Les coefficients de corrélation de Spearman obtenus sont de  $-0,7$  entre le temps de coagulation (STA Procoag PPL®) et la hauteur de pic (thrombinographie) et  $-0,48$  entre le temps de coagulation et l'ETP. Aucune corrélation entre le temps de coagulation et le temps de latence n'a pu être

mise en évidence, contrairement à notre étude. Nous avons enfin constaté que lorsque l'on étudie uniquement les valeurs des patients, ce qui permet de se placer dans une échelle plus haute, les coefficients de corrélation sont meilleurs :  $r=-0,942$  entre temps de coagulation et hauteur de pic et  $r=-0,897$  entre temps de coagulation et ETP.

Le STA Procoag PPL® est également le test le mieux corrélé avec le nombre total de microparticules obtenu par CMF :  $r=-0,646$  ( $p<0,001$ ) malgré un nuage de point situé à la base du graphique dont les valeurs correspondent aux échantillons après centrifugation. Ces valeurs après centrifugation nous ont permis d'augmenter notre effectif afin d'établir notre corrélation. Nous constatons qu'en s'en affranchissant, la corrélation est meilleure :  $r=-0,69$  ( $p<0,001$ ).

En ce qui concerne la thrombinographie, les corrélations du nombre total de microparticules avec la hauteur de pic et l'ETP sont moins bonnes :  $r=0,5416$  et  $r=0,5412$  respectivement ( $p<0,001$ ). L'étude de Trappenburg *et al.* (65) montre un coefficient de corrélation de Spearman entre la hauteur de pic (thrombinographie sans facteur déclenchant) et le nombre total de microparticules de 0,45.

Nous avons pensé que les coefficients de corrélation obtenus qui ne dépassent pas 0,6 pourraient être dus à la fenêtre choisie en cytométrie en flux. En effet, nous n'étudions pas les microparticules dont la taille est inférieure à 0,5  $\mu\text{m}$ , qui est la limite de détection. De même, la limite haute est placée à 0,9  $\mu\text{m}$  par définition des microparticules procoagulantes et par nécessité technique car les billes de calibration utilisées ont cette taille. Les tests fonctionnels permettent par contre d'étudier le potentiel procoagulant des particules quelque soit leur taille. Nous avons donc déterminé la corrélation de ces tests fonctionnels avec la fenêtre globale des particules détectées par cytométrie en flux (taille supérieure à 0,9  $\mu\text{m}$  avec conservation de la limite de détection à 0,5 $\mu\text{m}$ ) : nous obtenons un coefficient de corrélation de Spearman de -0,5851 entre le temps de coagulation et le nombre total de particules. Cette valeur est inférieure à celle basée sur la fenêtre de définition des microparticules et n'apporte donc pas de bénéfice. La solution permettant d'améliorer la corrélation pourrait alors être de tenir compte des microparticules de taille inférieure à 0,5  $\mu\text{m}$  grâce au réactif Mégamix Plus.

Ces corrélations nous amènent à penser que le STA Procoag PPL® est un test simple, facilement réalisable et adaptable en routine, qui permet d'apprécier rapidement la présence de microparticules procoagulantes. Il semble apporter autant d'information sur les surfaces phospholipidiques procoagulantes portées par les microparticules, que la thrombinographie. Les temps de coagulation trouvés dans la littérature pour des échantillons témoins sont

comparables à ceux de cette étude : Noubouossie *et al.* (64) trouvent une médiane de 63s et une étendue de 55 à 68 s (N=20). La différence en faveur de temps plus courts pourrait s'expliquer par une procédure pré-analytique de centrifugation différente de la nôtre (3200 g 15 minutes puis 16000 g 2 minutes) qui éliminerait peut-être plus de microparticules. Exner *et al.* (72) révèlent des temps plus longs : médiane 99 s et étendue 87 à 124 s (n=30) avec un âge moyen supérieur (50 ans). Cependant cette dernière étude a été réalisée avec des tubes contenant comme anticoagulant de l'EDTA, rendant difficile la comparaison avec nos valeurs.

Malgré les résultats obtenus avec le STA Procoag PPL®, l'expression des résultats par un simple temps ne nous semblait pas le plus pertinent. En effet, l'étude de Hacquard *et al.* (Annexe I) a montré que des plasmas thérapeutiques préparés selon diverses procédures, présentent des temps de coagulation variables, malgré un nombre réduit de microparticules procoagulantes par rapport au plasma natif de donneur. De plus, après une étape de centrifugation à 13000 g pendant 30 minutes, la quantité résiduelle de microparticules procoagulantes diffère toujours d'un type de plasma à l'autre, avec cependant une distribution plus étroite que dans le plasma natif de donneur. Ceci révèle une grande variabilité inter-individuelle des temps de coagulation dans des plasmas supposés de donneurs sains sans pathologie. De même, lorsque que nous étudions les temps de coagulation obtenus pour notre groupe témoin nous constatons qu'ils se situent dans l'intervalle de référence donné par STAGO (61-83 s) avec deux temps plus courts (56 et 57 s) et quatre temps plus longs (89, 92, 94 et 117 s). Ces variations inter-individuelles nous amènent à penser que l'évaluation de la présence de microparticules procoagulantes par un temps de coagulation n'est pas suffisante. Nous avons établi le calcul d'un ratio (temps avant centrifugation/temps après centrifugation 13000 g 30 minutes) qui permettrait de ne tenir compte que de l'influence des microparticules sur la coagulation : le temps après centrifugation, considéré comme déplété en microparticules, serait le propre témoin de chaque plasma.

Le ratio médian ainsi obtenu pour les témoins est de 0,82. Dans l'idéal, si les témoins n'avaient pas de microparticules procoagulantes, ce ratio serait de 1. Cependant, la cytométrie en flux a bien mis en évidence la présence de ces microparticules dans le plasma des témoins. Le ratio médian obtenu pour les patients est de 0,74. Nous constatons effectivement une différence significative entre les ratios médians des témoins et des patients ( $p < 0,05$ ). Cependant, nous aurions pensé que les ratios des patients auraient été beaucoup moins élevés que ceux des témoins. En effet, avec des temps de coagulation avant centrifugation beaucoup plus courts pour les patients et avec une centrifugation qui élimine les microparticules, les ratios témoins devraient être proches de 1 et ceux des patients entre 0 et 1. L'explication se

trouve dans l'observation des temps après centrifugation : ces temps restent plus courts pour les patients que pour les témoins, avec persistance de microparticules visualisées en cytométrie en flux. Ainsi, malgré une différence significative des ratios obtenus, la différence entre témoins et patients semble être mieux appréciée par le simple temps de coagulation réalisé sur le tube primaire, au final technique la plus simple et la plus rapide. Le calcul d'un ratio n'est pas plus informatif.

Une des limites de cette étude est qu'elle a été réalisée avec des plasmas de patients n'ayant pas tous été exposés de la même façon à l'aspirine : 4 patients recevaient chroniquement de l'aspirine avant le prélèvement et 5 patients, n'ayant pas de traitement chronique par l'aspirine, ont été prélevés une heure après la première dose d'aspirine. Nous avons postulé que ces patients présentaient le même état aigu d'activation cellulaire et que l'aspirine, administrée à certains patients une heure avant le prélèvement, ne pouvait pas réduire en ce court délai l'émission et le nombre des microparticules. L'analyse des temps de coagulation obtenus avec le STA Procoag PPL® et les paramètres du thrombinogramme entre ces deux groupes de patients ne montrent en effet aucune différence significative. Cependant, le groupe de patients traités chroniquement par aspirine présente une médiane significativement plus importante de microparticules : 5246/ $\mu$ L (étendue : 3878 à 10527/ $\mu$ L) versus 3130/ $\mu$ L (2985 à 3772/ $\mu$ L) ( $p=0,02$ ). Ceci pourrait être dû à un état procoagulant plus marqué en lien avec l'histoire clinique du patient ou à une action rapide de l'aspirine administrée une heure avant contrairement à ce que l'on aurait pu penser.

Pour finir, nous nous sommes intéressés à un échantillon patient admis en cardiologie pour infarctus du myocarde : l'ensemble des résultats obtenus sont en faveur d'un phénotype procoagulant très marqué, lié à un nombre de microparticules fortement augmenté qui ferait de cette pathologie une population intéressante pour l'étude de nos différents tests. En effet, le temps de coagulation du STA Procoag PPL est plus court (28 s) que tous les temps obtenus avec les patients ayant présentés un AVC. De même pour les paramètres de thrombinographie : hauteur de pic : 394 nM, ETP : 2453 nM.min, temps de latence : 3,9 s et temps au pic : 6,6 s. Le nombre total de microparticules présentes dans l'échantillon est largement supérieur à celui des témoins et des patients ayant présentés un AVC : 62347 microparticules/ $\mu$ L avec 96% d'origine plaquettaire, 3% d'origine érythrocytaire, et moins de 1% d'origine leucocytaire et endothéliale. Différentes études font état de l'augmentation des microparticules d'origine plaquettaire et endothéliale dans les syndromes coronariens aigus

(31, 32). Nous n'observons pas cette tendance pour la lignée endothéliale. Nous constatons enfin que contrairement aux patients ayant présentés un AVC, le paramètre qui semble le plus différent des témoins est cette fois-ci la cytométrie en flux avec un nombre total de microparticules procoagulantes multiplié par 30.

## V. CONCLUSION

Cette étude nous a permis de mettre en évidence que les tests fonctionnels, STA Procoag PPL® et thrombinographie, permettent une mise en évidence facile et fiable des microparticules par leur activité procoagulante. Une corrélation existe avec le nombre total de microparticules, technique complémentaire indispensable pour la numération des microparticules et l'identification de leur origine cellulaire. Cependant, les tests fonctionnels semblent plus sensibles que la cytométrie en flux. L'application de ces tests dans l'étude de patients en phase aiguë de l'AVC ischémique montre que le potentiel procoagulant très élevé dans cette population est lié à l'augmentation du nombre de microparticules de toutes les lignées et non pas d'une seule comme observé dans d'autres études. Ce travail a également mis en évidence que le STA Procoag PPL® est le test le mieux corrélé au nombre total de microparticules mesurées en CMF, le plus simple et le plus adaptable à un travail de routine. Il pourrait ainsi être intéressant de suivre, par cette technique, l'évolution des microparticules des patients post AVC sous traitement ainsi qu'à distance, comme biomarqueurs d'une éventuelle rechute. Enfin, la caractérisation des microparticules et leur aspect fonctionnel peut s'étendre à de nombreuses autres pathologies thrombotiques telles que le syndrome coronarien aigu.

## VI. REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- (1) Morel O, Toti F, Hugel B, Bakouboula B, Camoin-Jau L, Dignat-George F, Freyssinet JM. . Procoagulant microparticles: disrupting the vascular homeostasis equation? *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2006;26:2594-604
- (2) Morel O, Morel N, Hugel B, Jesel L, Vinzio S, Goichot B, Bakouboula B, Grunebaum L, Freyssinet JM, Toti F. Les microparticules circulantes : rôles physiologiques et implication dans les pathologies inflammatoires et thrombotiques. *Rev Med Interne.* 2005;26:791-801
- (3) Morel N, Morel O, Delabranche X, Jesel L, Sztark F, Dabadie P, Freyssinet JM, Toti F. Microparticules circulantes au cours des traumatismes graves et des sepsis : un élément du couplage inflammation-thrombose. *Ann Fr Anesth Reanim.* 2006;25:955-66
- (4) Piccin A, Murphy WG, Smith OP. Circulating microparticles: pathophysiology and clinical implications. *Blood Rev.* 2007;21:157-71
- (5) Morel O, Morel N, Jesel L, Freyssinet JM, Toti F. Microparticles: a critical component in the nexus between inflammation, immunity, and thrombosis. *Semin Immunopathol.* 2011;33:469-86
- (6) VanWijk MJ, VanBavel E, Sturk A, Nieuwland R. Microparticles in cardiovascular diseases. *Cardiovasc Res.* 2003;59:277-87
- (7) Morel O, Toti F, Jesel L, Freyssinet JM. Mechanisms of microparticle generation: on the trail of the mitochondrion. *Semin Thromb Hemost.* 2010;36:833-44
- (8) Wiedmer T, Sims PJ. Participation of protein kinases in complement C5b-9-induced shedding of platelet plasma membrane vesicles. *Blood.* 1991;78:2880-6
- (9) George FD. Microparticles in vascular diseases. *Thromb Res.* 2008;122:S55-9
- (10) Bevers EM, Comfurius P, Zwaal RF. Changes in membrane phospholipid distribution during platelet activation. *Biochim Biophys Acta.* 1983;736:57-66
- (11) Flaumenhaft R, Mairuhu AT, Italiano JE. Platelet- and megakaryocyte-derived microparticles. *Semin Thromb Hemost.* 2010;36:881-7

- (12) Zwaal RF, Comfurius P, Bevers EM. Surface exposure of phosphatidylserine in pathological cells. *Cell Mol Life Sci.* 2005;62:971-88
- (13) Manno S, Takakuwa Y, Mohandas N. Identification of a functional role for lipid asymmetry in biological membranes: Phosphatidylserine-skeletal protein interactions modulate membrane stability. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2002;99:1943-8
- (14) Burnier L, Fontana P, Kwak BR, Angelillo-Scherrer A. Cell-derived microparticles in haemostasis and vascular medicine. *Thromb Haemost.* 2009;101:439-51
- (15) Hugel B, More O, Freyssinet JM, Toti F. Microparticules procoagulantes en pathologie cardiovasculaire. *mt cardio.* 2006;2:78-87
- (16) Boulanger CM, Leroyer AS, Amabile N, Tedgui A. Microparticules endothéliales circulantes : un nouveau marqueur du dysfonctionnement vasculaire. *Ann Cardiol Angeiol.* 2008;57:149-54
- (17) Freyssinet JM, Toti F. Formation of procoagulant microparticles and properties. *Thromb Res.* 2010;125:S46-8
- (18) Lacroix R, Robert S, Poncelet P, Dignat-George F. Overcoming limitations of microparticle measurement by flow cytometry. *Semin Thromb Hemost.* 2010;36:807-18
- (19) Mallat Z, Benamer H, Hugel B, Benessiano J, Steg PG, Freyssinet JM, Tedgui A. Elevated levels of shed membrane microparticles with procoagulant potential in the peripheral circulating blood of patients with acute coronary syndromes. *Circulation.* 2000;101:841-3
- (20) Scholz T, Temmler U, Krause S, Heptinstall S, Lösche W. Transfer of tissue factor from platelets to monocytes: role of platelet-derived microvesicles and CD62P. *Thromb Haemost.* 2002;88:1033-8
- (21) Rauch U, Bonderman D, Bohrmann B, Badimon JJ, Hember J, Riederer MA, Nemerson Y. Transfer of tissue factor from leukocytes to platelets is mediated by CD15 and tissue factor. *Blood.* 2000;96:170-5
- (22) Jobin F. L'hémostase. Les presses de l'Université Laval. Editions Maloine, 1995, 496p
- (23) Rauch U, Nemerson Y. Tissue factor, the blood, and the arterial wall. *Trends Cardiovasc Med.* 2000;10:139-43

- (24) Biró E, Sturk-Maquelin KN, Vogel GM, Meuleman DG, Smit MJ, Hack CE, Sturk A, Nieuwland R. Human cell-derived microparticles promote thrombus formation in vivo in a tissue factor-dependent manner. *J Thromb Haemost.* 2003;1:2561-8
- (25) Morel O, Ohlmann P, Morel N, Jesel L, Bareiss P, Freyssinet JM, Toti F. Microparticles and cardiovascular disease. *Arch Mal Coeur Vaiss.* 2005;98:226-35
- (26) Tan KT, Lip GY. The potential role of platelet microparticles in atherosclerosis. *Thromb Haemost.* 2005;94:488-92
- (27) Morel O, Toti F, Hugel B, Freyssinet JM. Cellular microparticles: a disseminated storage pool of bioactive vascular effectors. *Curr Opin Hematol.* 2004;11:156-64
- (28) Satta N, Toti F, Fressinaud E, Meyer D, Freyssinet JM. Scott syndrome: an inherited defect of the procoagulant activity of platelets. *Platelets.* 1997;8:117-24
- (29) Albrecht C, McVey JH, Elliott JI, Sardini A, Kasza I, Mumford AD, Naoumova RP, Tuddenham EG, Szabo K, Higgins CF. A novel missense mutation in ABCA1 results in altered protein trafficking and reduced phosphatidylserine translocation in a patient with Scott syndrome. *Blood.* 2005;106:542-9
- (30) 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
- (31) Amabile N, Rautou PE, Tedgui A, Boulanger CM. Microparticles: key protagonists in cardiovascular disorders. *Semin Thromb Hemost.* 2010;36:907-16
- (32) Leroyer A, Tedgui A, Boulanger C. Microparticules plasmatiques : marqueurs et effecteurs de l'atteinte vasculaire. *mt cardio.* 2006;2:690-8
- (33) Leroyer A, Tedgui A, Boulanger C. Role of microparticles in atherothrombosis. *J Intern Med.* 2008;263:528-37
- (34) Roch-Arveiller M, Couderc R. Des groupements lipidiques membranaires (caveolae), zones d'échanges transmembranaires privilégiées à l'origine des signaux intracellulaires. *Ann Biol Clin.* 2000;58:141-6

(35) Morel O, Toti F, Freyssinet JM. Marqueurs des pathologies thrombotiques. Les microparticules procoagulantes. *Ann Pharm Fr.* 2007;65:75-84

(36) Mallat Z, Benamer H, Hugel B, Benessiano J, Steg PG, Freyssinet JM, Tedgui A. Elevated levels of shed membrane microparticles with procoagulant potential in the peripheral circulating blood of patients with acute coronary syndromes. *Circulation.* 2000;101:841-3

(37) Bidot L, Jy W, Bidot C Jr, Jimenez JJ, Fontana V, Horstman LL, Ahn YS. Microparticle-mediated thrombin generation assay: increased activity in patients with recurrent thrombosis. *J Thromb Haemost.* 2008;6:913-9

(38) 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

(39) Go AS, Chertow GM, Fan D, McCulloch CE, Hsu CY. Chronic kidney disease and the risks of death, cardiovascular events, and hospitalization. *N Engl J Med.* 2004;351:1296-305

(40) Faure V, Dou L, Sabatier F, Cerini C, Sampol J, Berland Y, Brunet P, Dignat-George F. Elevation of circulating endothelial microparticles in patients with chronic renal failure. *J Thromb Haemost.* 2006;4:566-73

(41) Doeuvre L, Anglés-Cano E. Quels marqueurs pour l'ischémie cérébrale? La lettre de la NSFA. 2009;42

(42) Anglés-Cano E, Vivien D. Ischémie cérébrale : les microparticules neurovasculaires, une alternative aux marqueurs biologiques sanguins. *Med Sci.* 2009;25:843-46

(43) Laskowitz DT, Kasner SE, Saver J, Remmel KS, Jauch EC; BRAIN Study Group. Clinical usefulness of a biomarker-based diagnostic test for acute stroke: the Biomarker Rapid Assessment in Ischemic Injury (BRAIN) study. *Stroke.* 2009;40:77-85

(44) Cherian P, Hankey GJ, Eikelboom JW, Thom J, Baker RI, McQuillan A, Staton J, Yi Q. Endothelial and platelet activation in acute ischemic stroke and its etiological subtypes. *Stroke.* 2003;34:2132-7

(45) Pawelczyk M, Baj Z, Chmielewski H, Kaczorowska B, Klimek A. The influence of hyperlipidemia on platelet activity markers in patients after ischemic stroke. *Cerebrovasc Dis.* 2009;27:131-7

(46) Simak J, Gelderman MP, Yu H, Wright V, Baird AE. Circulating endothelial microparticles in acute ischemic stroke: a link to severity, lesion volume and outcome. *J Thromb Haemost.* 2006;4:1296-302

(47) Ogura H, Kawasaki T, Tanaka H, Koh T, Tanaka R, Ozeki Y, Hosotsubo H, Kuwagata Y, Shimazu T, Sugimoto H. Activated platelets enhance microparticle formation and platelet-leukocyte interaction in severe trauma and sepsis. *J Trauma.* 2001;50:801-9

(48) González-Quintero VH, Jiménez JJ, Jy W, Mauro LM, Hortman L, O'Sullivan MJ, Ahn Y. Elevated plasma endothelial microparticles in preeclampsia. *Am J Obstet Gynecol.* 2003;189:589-93

(49) González-Quintero VH, Smarkusky LP, Jiménez JJ, Mauro LM, Jy W, Hortman LL, O'Sullivan MJ, Ahn YS. Elevated plasma endothelial microparticles: preeclampsia versus gestational hypertension. *Am J Obstet Gynecol.* 2004;191:1418-24

(50) Bretelle F, Sabatier F, Desprez D, Camoin L, Grunebaum L, Combes V, D'Ercole C, Dignat-George F. Circulating microparticles : a marker of procoagulant state in normal pregnancy and pregnancy complicated by preeclampsia or intrauterine growth restriction. *J Thromb Haemost.* 2003;89:486-92

(51) Yuana Y, Bertina RM, Osanto S. Pre-analytical and analytical issues in the analysis of blood microparticles. *J Thromb Haemost.* 2011;105:396–408

(52) Lacroix R, Judicone C, Poncelet P, Robert S, Arnaud L, Sampol J, Dignat-George F. Impact of pre-analytical parameters on the measurement of circulating microparticles : towards standardization of protocol. *J Thromb Haemost.* 2012;10:437-46

(53) Lacroix, R., Robert, S., Poncelet, P., Kasthuri, R. S., Key, N. S., Dignat-George, F. and on behalf of the ISTH SSC Workshop. Standardization of platelet-derived microparticle enumeration by flow cytometry with calibrated beads: results of the International Society on Thrombosis and Haemostasis SSC Collaborative workshop. *J Thromb Haemost.* 2010;8:2571-

(54) Wolf P. The nature and significance of platelet products in human plasma. *Br J Haematol.* 1977;41:269-88

(55) Yuana Y, Oosterkamp TH, Bahatyrova S, Ashcroft B, Garcia Rodriguez P, Bertina RM, Osanto S. Atomic force microscopy: a novel approach to the detection of nanosized blood microparticles. *J Thromb Haemost.* 2010;8:315-23

(56) Richard S. Exploration des fonctions plaquettaires exposées à l'aspirine au décours de l'accident vasculaire cérébral ischémique. Thèse de Doctorat d'Université. Oct 2011

(57) Lecompte T. Phénotypage du système hémostatique par thrombinographie. *Actualités thrombose, journal d'informations pluridisciplinaires.* 2003;43:1-5

(58) Lecompte T, Wahl D, Regnault V. Thrombinographie. *Hématologie.* 2006;12:115-27

(59) Hemker HC, Giesen P, AlDieri R, Regnault V, de Smed E, Wagenvoort R, Lecompte T, Béguin S. The calibrated automated thrombogram (CAT): a universal routine test for hyper- and hypocoagulability. *Pathophysiol Haemost Thromb.* 2002;32:249-53

(60) Horstman LL, Jy W, Jimenez JJ, Bidot C, Ahn YS. New horizons in the analysis of circulating cell-derived microparticles. *Keio J Med.* 2004;53:210-30

(61) Robert S, Lacroix R, Poncelet P, Harhoury K, Bouriche T, Judicone C, Wischhusen J, Arnaud L, Dignat-George F. High-Sensitivity Flow Cytometry Provides Access to Standardized Measurement of Small-Size Microparticles. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2012;32:1054-8

(62) Debaugnies F, Azerad MA, Noubouossie D, Rozen L, Hemker HC, Corazza F, Efir A, Demulder A. Evaluation of the procoagulant activity in the plasma of cancer patients using a thrombin generation assay. *Thromb Res.* 2010;126:531-5

(63) Owen BA, Xue A, Heit JA, Owen WG. Procoagulant activity, but not number, of microparticles increases with age and in individuals after a single venous thromboembolism. *Thromb Res.* 2011;127:39-46

(64) Noubouossie DC, Lê PQ, Rozen L, Debaugnies F, Ferster A, Demulder A. Evaluation of the procoagulant activity of endogenous phospholipids in the platelet-free plasma of children with sickle cell disease using functional assays. *Thromb Res.* 2011; [Epub ahead of print]

(65) Trappenburg MC, van Schilfgaarde M, Bredewold EO, van Aalderen MC, Spronk HM, Ten Cate H, Leyte A, Terpstra WE. Elevated numbers and altered subsets of procoagulant microparticles in breast cancer patients using endocrine therapy. *Thromb Res.* 2011;127:363-9

(66) Bidot L, Jy W, Bidot C Jr, Jimenez JJ, Fontana V, Horstman LL, Ahn YS. Microparticle-mediated thrombin generation assay: increased activity in patients with recurrent thrombosis. *J Thromb Haemost.* 2008;6:913-9

(67) Trappenburg MC, van Schilfgaarde M, Marchetti M, Spronk HM, ten Cate H, Leyte A, Terpstra WE, Falanga A. Elevated procoagulant microparticles expressing endothelial and platelet markers in essential thrombocythemia. *Haematologica.* 2009;94:911-8

(68) Park MS, Owen BA, Ballinger BA, Sarr MG, Schiller HJ, Zietlow SP, Jenkins DH, Ereth MH, Owen WG, Heit JA. Quantification of hypercoagulable state after blunt trauma: Microparticle and thrombin generation are increased relative to injury severity, while standard markers are not. *Surgery.* 2012; [Epub ahead of print]

(69) Spronk HM, Dielis AW, Panova-Noeva M, van Oerle R, Govers-Riemslog JW, Hamulyák K, Falanga A, Cate HT. Monitoring thrombin generation: is addition of corn trypsin inhibitor needed? *Thromb Haemost.* 2009;101:1156-62

(70) Dargaud Y, Luddington R, Gray E, Negrier C, Lecompte T, Petros S, Hogwood J, Bordet JC, Regnault V, Siegemund A, Baglin T. Effect of standardization and normalization on imprecision of calibrated automated thrombography: an international multicentre study. *Br J Haematol.* 2007;139:303-9

(71) Macey MG, Enniks N, Bevan S. Flow cytometric analysis of microparticle phenotype and their role in thrombin generation. *Cytometry B Clin Cytom.* 2011 Jan;80:57-63

(72) Exner T, Joseph JE, Connor D, Low J, Ma DD. Increased procoagulant phospholipid activity in blood from patients with suspected acute coronary syndromes: a pilot study. *Blood Coagul Fibrinolysis.* 2005;16:375-9

# **ANNEXES**

# ANNEXE I : Poster présenté à l'ISTH 2011 et à la SFTS 2011



## Procoagulant microparticles in therapeutic plasmas

Marie Hacquard<sup>1,2</sup>, Carole Pellegrini<sup>2</sup>, Lysiane Chevreux<sup>1</sup>, Thomas Lecompte<sup>1,2</sup>, Sylvie Gross<sup>1</sup>, Thierry Schneider<sup>3</sup>

<sup>1</sup> EFS Lorraine-Champagne, Nancy, France; <sup>2</sup> Hémostase-Hématologie Biologique CHU Nancy, France; <sup>3</sup> EFS Pays de Loire, Nantes, France.

### BACKGROUND

Fresh frozen plasma is primarily used in clinical setting of hemorrhage associated with a severe coagulopathy. To increase safety, different methods of viro-attenuation have been developed, leading to plasmas which have different hemostatic potency, as assessed by thrombin generation test. In fact, we have previously shown that Endogenous Thrombin Potential (ETP) was significantly different according to the method of viral inactivation used and surprisingly some plasma preparations had higher ETP values than donor's native plasma. One hypothesis to explain this result would be the generation of procoagulant microparticles during plasma preparation as described by Lawrie et al after preparation of fresh frozen plasma (FFP) from whole blood.

### AIM

✓ To measure level of procoagulant microparticles in therapeutic plasma bags with a coagulation-based method

✓ To compare the different therapeutic plasmas available in France in terms of procoagulant microparticle content

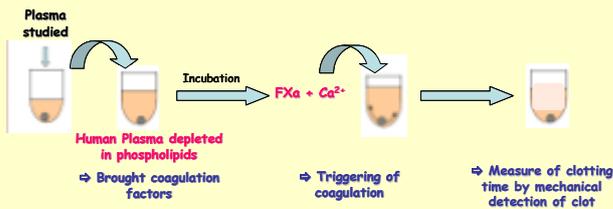
### MATERIALS and METHODS

• Plasmas studied (prepared from apheresis plasma)

- Untreated Fresh Frozen Plasma (FFP) n=6
- Amotosalen treated plasma (IA FFP) n=6
- Solvent/detergent treated plasma (SD FFP) n=6
- Methylene blue treated plasma (MB FFP) n=4
- Native plasma withdrawn from the donor at the time of apheresis n=7

• Microparticles-induced procoagulant activity: adaptation of the method STA-Procoag PPL® Diagnostica Stago, STA-R Diagnostica Stago.

Principle :



The shorter the clotting time is, the higher the content of microparticles.  
 Referential = normal range time determined with plasma collected on citrate from healthy volunteers  
 ⇒ Need to be adapt the assay for the therapeutic plasmas evaluation (different dilution with anticoagulants...)  
 ⇒ To measure the clotting time before and after 13000g centrifugation during 30 minutes (that eliminates microparticles). The time ratio between the 2 coagulation times was calculated. Each sample is also used as its proper referential value.

### RESULTS

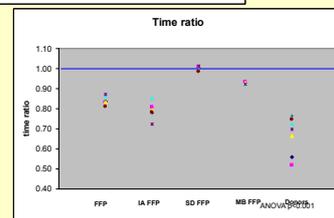
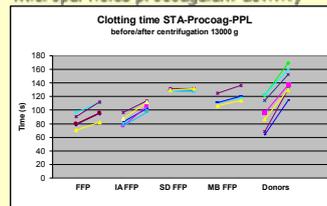
Previous results of Endogenous Thrombin Potential determined by CAT

	Donor's native plasma	FFP	MB FFP	IA FFP	SD FFP
ETP <sub>5</sub> (nM.min)	1727 329	1832 303	1640 317	2122 302 *	2123 197 *
ETP <sub>1</sub> (nM.min)	1233 314 *	1656 26 s	1271 355 *	1886 253 *	1948 172 *

\$ p<0.001 vs donor; \* p<0.001 vs FFP

ETP<sub>5</sub> = ETP obtained after triggering with 5 pM TF; ETP<sub>1</sub> = ETP obtained after triggering with 1 pM TF.

### Microparticles procoagulant activity



### DISCUSSION-CONCLUSION

- ✗ Clotting time measured before centrifugation are quite long and variable according to the type of plasma
- ✗ STA-Procoag PPL assay is suitable to evaluate therapeutic plasma content in procoagulant microparticles, especially when results were expressed as time ratio.
- ✗ In this study, we measured only procoagulant activity of microparticles mediated by anionic phospholipids. We didn't explore the procoagulant properties induced by a possible tissue factor expression.
- ✗ We showed that there exists difference in procoagulant microparticles content between the plasmas tested according to the preparation:
  - ⇒ Plasma preparation steps (apheresis, deleucocytation ...) did not induce microparticles generation and even seemed to contribute to eliminate them in part (filtrations, S/D treatment)
  - ⇒ thus SD FFP appeared to be free of microparticles (on the basis of their determination by procoagulant phospholipid)
  - ⇒ according to the viro-attenuation process apply to the plasma, the residual plasma content of procoagulant microparticles was different between the several therapeutic plasma preparations studied; noteworthy, the distribution is greatly narrow in these preparations than in donor's native plasma (untreated).
  - ⇒ these differences in microparticles content do not explain the increased ETP observed in some of therapeutic plasmas

References: Lawrie et al, Vox Sang, 2008.

Acknowledgements: Pr Cazenave (EFS Alsace), Pr Boiron (EFS Aquitaine-Limousin) and Dr Geschier (EFS Lorraine-Champagne) for providing plasmas

ANNEXE II : Protocole d'immunomarquage des microparticules pour l'analyse  
en cytométrie en flux

<b>Réactif</b>	<b>Tube PMP</b> MPs d'origine plaquettaire	<b>Tube ErMP</b> MPs d'origine érythrocytaire	<b>Tube LMP</b> MPs d'origine leucocytaire	<b>Tube EndMP</b> MPs d'origine endothéliale
Plasma dépourvu en plaquettes (µL)	30	30	30	30
Anticorps anti-Annexine V-FITC (µL)	10	10	10	10
Anticorps anti-CD41-ECD (µL)	10			
Anticorps anti-CD235a-PE (µL)		10		
Anticorps anti-CD45-APC (µL)			10	
Anticorps anti-CD144-PE (µL)				10
Vortexer puis incuber 30 minutes à l'obscurité (Température ambiante)				
Tampon Annexine (dilué au 1/10ème) avant passage en cytométrie (µL)	500	500	500	500
Billes FlowCount® avant passage en cytométrie (µL)	30	30	30	30

ANNEXE III : Valeurs obtenues avec le STA Procoag PPL®

Témoins	Temps de coagulation (s)		Ratio
	Avant centrifugation	Après centrifugation	
T1	94	102	0,92
T2	77	109	0,70
T3	70	87	0,80
T4	64	94	0,68
T5	76	104	0,74
T6	57	85	0,67
T7	64	89	0,72
T8	75	91	0,82
T9	77	92	0,83
T10	92	106	0,87
T11	71	85	0,83
T12	56	74	0,76
T13	67	81	0,83
T14	68	83	0,82
T15	117	101	1,16
T16	67	83	0,80
T17	79	96	0,82
T18	76	93	0,82
T19	74	93	0,80
T20	89	101	0,89

Patients	Temps de coagulation (s)		Ratio
	Avant centrifugation	Après centrifugation	
P1	44	57	0,78
P2	42	58	0,73
P3	46	64	0,71
P4	40	56	0,72
P5	40	55	0,74
P6	56	80	0,71
P7	50	68	0,74
P8	51	69	0,74
P9	58	79	0,74

ANNEXE IV : Valeurs obtenues par thrombinographie

Témoins	Temps de latence (min)		Temps au pic (min)		Hauteur de pic (nM)		ETP (nM.min)	
	Avant centrifugation	Après centrifugation	Avant centrifugation	Après centrifugation	Avant centrifugation	Après centrifugation	Avant centrifugation	Après centrifugation
T1	6,3	7,5	14,2	16,8	25	10	525	261
T2	6,7	8,0	14,2	17,0	54	16	1451	700
T3	6,0	6,6	14,5	15,9	69	28	1515	744
T4	8,7	10,9	17,7	21,2	54	16	1425	511
T5	7,3	8,7	15,5	16,6	53	15	1422	265
T6	9,5	9,6	16,7	16,7	20	13	380	256
T7	7,2	7,1	15,1	14,3	39	13	877	226
T8	9,5	10,6	17,5	18,6	48	19	1071	406
T9	7,7	9,0	16,3	31,8	40	18	1031	0
T10	11,7	13,3	19,8	21,2	23	9	590	191
T11	9,1	10,1	20,7	20,3	36	15	1349	450
T12	5,4	5,5	9,9	12,5	103	55	1454	935
T13	6,0	6,0	12,0	13,3	95	46	1614	944
T14	7,0	8,0	16,2	18,0	45	16	1528	455
T15	13,3	15,2	23,4	25,2	17	8	451	246
T16	7,6	9,4	16,7	22,0	58	18	1218	594
T17	10,6	14,3	20,0	24,3	52	16	1325	478
T18	8,3	8,7	17,0	20,2	36	14	1110	428
T19	9,8	11,3	20,2	25,0	13	4	265	182
T20	7,5	8,0	15,5	18,1	13	7	271	0

Patients	Temps de latence (min)		Temps au pic (min)		Hauteur de pic (nM)		ETP (nM.min)	
	Avant centrifugation	Après centrifugation	Avant centrifugation	Après centrifugation	Avant centrifugation	Après centrifugation	Avant centrifugation	Après centrifugation
P1	4,3	5,9	8,4	11,4	256	143	2405	2076
P2	4,7	5,7	8,2	10,0	256	161	2062	1796
P3	5,0	6,2	9,3	10,7	224	110	2186	1568
P4	4,1	5,1	7,0	9,0	334	237	2205	2020
P5	4,3	5,2	8,4	9,9	258	198	2440	2189
P6	5,9	6,8	10,1	11,9	116	52	1701	895
P7	4,2	5,1	8,9	10,2	171	90	1788	1218
P8	5,5	6,4	10,4	11,3	154	69	1787	960
P9	4,9	5,9	9,8	11,6	96	40	1606	686

Témoins		T1		T2		T3		T4		T5		T6		T7	
		Avant centrifugation	Après centrifugation												
Nombre de microparticules de lignée ( $\mu\text{L}$ )	Lignée plaquettaire (CD41-ECD)	763	255	1980	36	950	127	3698	205	849	148	2325	82	6836	427
	Lignée érythrocytaire (CD 235a-PE)	99	8	129	3	76	6	40	9	59	4	158	11	219	30
	Lignée leucocytaire (CD 45-APC)	73	80	71	71	344	284	275	311	398	545	172	121	208	131
	Lignée endothéliale (CD144-PE)	14	45	37	24	41	46	33	33	48	48	17	22	52	47
Somme du nombre de microparticules de lignée ( $\mu\text{L}$ )		949	388	2217	134	1411	463	4046	558	1354	745	2672	236	7315	635
Pourcentage de microparticules (%)	d'origine plaquettaire	80,4		89,3		67,3		91,4		62,7		87,0		93,5	
	d'origine érythrocytaire	10,4		5,8		5,4		1,0		4,4		5,9		3,0	
	d'origine leucocytaire	7,7		3,2		24,4		6,8		29,4		6,4		2,8	
	d'origine endothéliale	1,5		1,7		2,9		0,8		3,5		0,6		0,7	
Nombre total de microparticules ( $\mu\text{L}$ )	dans le tube PMP	1422	389	2774	422	2268	6386	4940	611	9140	11864	3315	197	8103	1226
	dans le tube ErMP	1301	389	2384	381	1734	1911	5241	218	4360	2144	3154	417	7910	974
	dans le tube LMP	1251	486	2247	406	2909	2316	3982	711	3100	3184	2626	520	8931	1438
	dans le tube EndMP	1218	1027	3000	499	1797	1268	4523	219	2143	1230	3280	194	8755	1432
Nombre total moyen de microparticules ( $\mu\text{L}$ )		1298	421	2601	427	2177	1832	4672	440	3201	2186	3094	332	8425	1268

Valeurs grisées non prises en compte dans les calculs

Tube PMP : microparticules d'origine plaquettaire  
 Tube ErMP : microparticules d'origine érythrocytaire  
 Tube LMP : MP d'origine leucocytaire  
 Tube EndMP : MP d'origine endothéliale

Témoins	T9		T10		T11		T12		T13		T14		
	Avant centrifugation	Après centrifugation	Avant centrifugation	Après centrifugation	Avant centrifugation	Après centrifugation	Avant centrifugation	Après centrifugation	Avant centrifugation	Après centrifugation	Avant centrifugation	Après centrifugation	
Nombre de microparticules de lignée (µL)	Lignée plaquettaire (CD41-ECD)	4228	256	364	151	1371	12	2720	414	1522	199	1862	263
	Lignée érythrocytaire (CD 235a-PE)	137	13	69	5	72	34	2197	1123	248	16	218	9
	Lignée leucocytaire (CD 45-AFC)	179	177	141	167	338	261	194	164	252	160	286	222
	Lignée endothéliale (CD144-PE)	36	46	28	16	39	47	64	<b>521</b>	22	31	38	39
Somme du nombre de microparticules de lignée (µL)		4580	492	602	339	1820	354	5175	2222	2044	406	2404	533
	d'origine plaquettaire	92,3		60,5		75,3		52,6		74,5		77,5	
	d'origine érythrocytaire	3,0		11,5		4,0		42,5		12,1		9,1	
	d'origine leucocytaire	3,9		23,4		18,6		3,7		12,3		11,9	
Pourcentage de microparticules (%)	d'origine endothéliale	0,8		4,7		2,1		1,2		1,1		1,6	
	dans le tube PMP	5674	1296	772	774	2302	450	6763	2644	1924	<b>1354</b>	5394	<b>2281</b>
	dans le tube ErMP	5903	828	849	1032	1647	257	6491	2355	2669	335	3389	830
	dans le tube LMP	<b>8247</b>	1256	770	529	2157	608	6234	2431	2424	477	4607	1369
Nombre total de microparticules (µL)	dans le tube EndMP	5369	856	596	433	1532	194	7859	<b>7247</b>	2343	191	3900	1051
		5649	1059	747	692	1910	377	6837	2477	2340	334	4323	1083

Témoins	T15		T16		T17		T18		T19		T20		
	Avant centrifugation	Après centrifugation	Avant centrifugation	Après centrifugation	Avant centrifugation	Après centrifugation	Avant centrifugation	Après centrifugation	Avant centrifugation	Après centrifugation	Avant centrifugation	Après centrifugation	
Nombre de microparticules de lignée (µL)	Lignée plaquettaire (CD41-ECD)	975	173	1436	20	863	115	971	207	1123	184	225	214
	Lignée érythrocytaire (CD 235a-PE)	112	13	868	154	63	3	148	14	191	10	92	6
	Lignée leucocytaire (CD 45-AFC)	256	192	531	150	218	292	376	304	193	186	460	186
	Lignée endothéliale (CD144-PE)	55	60	64	9	31	42	49	69	40	78	47	27
Somme du nombre de microparticules de lignée (µL)		1398	438	2899	333	1175	452	1544	594	1547	458	824	433
	d'origine plaquettaire	69,7		49,5		73,4		62,9		72,6		27,3	
	d'origine érythrocytaire	8,0		29,9		5,4		9,6		12,3		11,2	
	d'origine leucocytaire	18,3		18,3		18,6		24,4		12,5		55,8	
Pourcentage de microparticules (%)	d'origine endothéliale	3,9		2,2		2,6		3,2		2,6		5,7	
	dans le tube PMP	2759	1112	3240	<b>1605</b>	1164	355	<b>8596</b>	<b>3568</b>	2886	1044	1132	540
	dans le tube ErMP	2087	693	3427	624	1807	258	2820	1225	2146	748	1569	971
	dans le tube LMP	2480	1338	3612	652	1242	599	2461	1930	2220	1109	2037	961
Nombre total de microparticules (µL)	dans le tube EndMP	1888	1089	2831	642	1078	271	1786	1486	1617	867	1442	733
		2304	1058	3278	639	1323	371	2356	1547	2217	942	1545	801

Patients		P1		P2		P3		P4		P5		P6		P7		P8		P9	
		Avant centrifugation	Après centrifugation																
Nombre de microparticules de lignée ( $\mu\text{L}$ )	Lignée plaquettaire (CD41-ECD)	1946	83	1918	88	3458	62	3826	176	1443	70	1252	160	1767	37	1241	92	2267	213
	Lignée érythrocytaire (CD 235a-PE)	2361	707	942	251	84	36	5346	2476	118	25	144	11	157	14	98	18	129	40
	Lignée leucocytaire (CD 45-APC)	310	263	137	204	492	300	412	313	416	68	269	183	205	102	193	177	712	144
	Lignée endothéliale (CD144-PE)	43	44	9	23	4	58	35	41	35	16	19	19	22	3	9	11	22	29
Somme du nombre de microparticules de lignée ( $\mu\text{L}$ )		4660	1097	3006	566	4038	456	9619	3006	2012	179	1684	373	2151	156	1541	298	3130	426
Pourcentage de microparticules (%)	d'origine plaquettaire	41,8		63,8		85,6		39,8		71,7		74,3		82,1		80,5		72,4	
	d'origine érythrocytaire	50,7		31,3		2,1		55,6		5,9		8,6		7,3		6,4		4,1	
	d'origine leucocytaire	6,7		4,6		12,2		4,3		20,7		16,0		9,5		12,5		22,7	
	d'origine endothéliale	0,9		0,3		0,1		0,4		1,7		1,1		1,0		0,6		0,7	
Nombre total de microparticules ( $\mu\text{L}$ )	dans le tube PMP	6969	1729	3726	706	4537	763	13661	3509	5643	525	2854	<b>2082</b>	5384	738	2054	709	3115	825
	dans le tube ErMP	5694	1337	3506	709	4547	949	10194	2727	3084	412	<b>6060</b>	948	4566	784	4983	<b>3662</b>	3253	371
	dans le tube LMP	4877	1826	4476	1256	5963	1144	9674	2879	2862	445	3614	701	2604	721	3055	1794	<b>9345</b>	504
	dans le tube EndMP	3990	1716	3803	1305	5389	1125	8580	1827	2473	436	2741	505	2534	516	2429	786	2586	304
Nombre total moyen de microparticules ( $\mu\text{L}$ )		5383	1652	3878	994	5109	995	10527	2736	3516	455	3070	718	3772	690	3130	1096	2985	501

Valeurs grisées non prises en compte dans les calculs

Tube PMP : microparticules d'origine plaquettaire  
 Tube ErMP : microparticules d'origine érythrocytaire  
 Tube LMP : MP d'origine leucocytaire  
 Tube EndMP : MP d'origine endothéliale

## DEMANDE D'IMPRIMATUR

Date de soutenance : 4 Mai 2012

DIPLOME D'ETAT DE DOCTEUR  
EN PHARMACIE

présenté par Carole PELLEGRINI

Sujet : EVALUATION ET CARACTERISATION DE TROIS  
METHODES D'ETUDE DES MICROPARTICULES  
PROCOAGULANTES CHEZ DES PATIENTS EN PHASE  
AIGUE DE L'AVC ISCHEMIQUEJury :Président : Pr C. FINANCE, PU-PH  
Directeur : Dr M. TOUSSAINT-HACQUARD, Praticien  
attachéJuges : Pr T. LECOMPTE, Professeur  
Pr D. WAHL, PU-PH  
Dr S. RICHARD, PH  
Dr F. TOTI, MCU

Vu,

Nancy, le 16 Avril 2012

Le Président du Jury

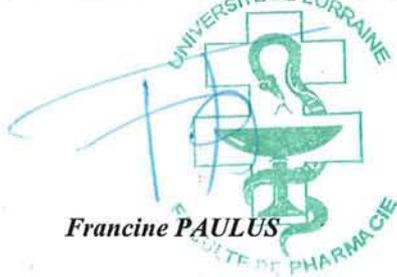
Le Directeur de Thèse

Pr C. FINANCE

Dr M. TOUSSAINT-  
HACQUARD

Vu et approuvé,

Nancy, le

Doyen de la Faculté de Pharmacie  
de l'Université Henri Poincaré, Nancy 1,

Vu,

Nancy, le 19.04.2012

L'Administrateur Provisoire de l'UDL,

Jean-Pierre FINANCE

N° d'enregistrement : 3949



N° d'identification :

**TITRE**

**EVALUATION ET CARACTERISATION DE TROIS METHODES D'ETUDE  
DES MICROPARTICULES PROCOAGULANTES CHEZ DES PATIENTS EN PHASE AIGUE DE L'AVC**

Thèse soutenue le 4 Mai 2012

Par Carole PELLEGRINI

**RESUME :**

Les microparticules (MPs) sont des vésicules de petite taille issues des surfaces cellulaires. Elles sont connues pour jouer un rôle dans l'hémostase et la thrombose, puisqu'elles expriment à leur surface des phospholipides procoagulants, comme la phosphatidylsérine, et/ou du facteur tissulaire. Plusieurs techniques d'analyse ont été développées afin d'évaluer l'activité procoagulante des MPs. Le but de cette étude est d'évaluer et de caractériser les MPs procoagulantes dans des échantillons de plasmas provenant de volontaires sains (sujets témoins) (N=20) et de patients en phase aiguë d'un accident vasculaire cérébral (AVC) ischémique (N=9), pathologie thrombotique connue comme étant associée à une augmentation du nombre des MPs. Les trois approches étudiées sont : un temps de coagulation dépendant des phospholipides procoagulants (STA Procoag PPL®, Diagnostica Stago), une étude globale de la coagulation par thrombinographie (Calibrated Automated Thrombography®, Diagnostica Stago) utilisant le PRP-Reagent® (1pM de facteur tissulaire, sans ajout de phospholipides) et une caractérisation phénotypique associée à une numération par cytométrie en flux standardisée (Navios, Beckman Coulter). Les résultats nous ont permis de mettre en évidence une activité procoagulante liée aux MPs plus importante dans le plasma des patients, comparée à celle observée pour les témoins. En effet, le groupe des plasmas patients montre des temps de coagulation avec le STA Procoag PPL® significativement plus courts et des thrombinogrammes caractérisés par un potentiel thrombinique (ETP) et une hauteur de pic significativement plus importants et un temps de latence ainsi qu'un temps au pic significativement plus courts. L'expression des résultats du STA Procoag PPL® sous forme d'un ratio entre temps de coagulation avant centrifugation à 13000 g 30 minutes et temps de coagulation après cette centrifugation n'apporte pas de meilleure discrimination entre plasmas patients et témoins. La cytométrie en flux révèle un nombre significativement plus important de MPs totales dans les plasmas patients (p=0,0437). La proportion de MPs en fonction de l'origine cellulaire (plaquettaire CD41+, érythrocytaire CD235a+, leucocytaire CD45+ et endothéliale CD144+) est cependant la même entre patients et témoins. Les résultats des tests fonctionnels sont bien corrélés d'après le test des rangs de Spearman (r) : temps de coagulation versus ETP :  $r=-0,8665$  (p<0,001), temps de coagulation versus hauteur de pic :  $r=-0,8958$  (p<0,001). L'activité procoagulante apparaît cependant un peu moins corrélée au nombre total de MPs :  $r=-0,646$  (p<0,001) entre le nombre total de MPs et le temps de coagulation,  $r=0,5412$  (p<0,001) entre le nombre total de MPs et l'ETP et  $r=0,5416$  (p<0,001) entre le nombre total de MPs et la hauteur de pic. Ainsi, les tests fonctionnels disponibles actuellement permettent une mise en évidence facile et fiable des MPs par leur activité procoagulante dans les pathologies thrombotiques telles que l'AVC ischémique. Elles semblent plus sensibles que la cytométrie en flux, technique complémentaire indispensable pour leur numération et l'identification de leur origine cellulaire. L'application de ces tests dans l'étude de patients en phase aiguë de l'AVC ischémique montre un nombre de MPs plus important et ceci pour toutes les lignées, et un potentiel procoagulant très augmenté. Ces tests pourraient alors être utilisés lors du suivi de ces patients pendant leur traitement et au long cours. Enfin, la caractérisation des MPs et leur aspect fonctionnel pourraient également être utiles dans l'étude d'autres pathologies.

**MOTS CLES :** Microparticules, activité procoagulante, thrombinographie, cytométrie en flux, accident vasculaire cérébral

Directeur de thèse	Intitulé du laboratoire	Nature
Marie TOUSSAINT-HACQUARD	Service d'Hématologie Biologique, CHU Nancy	Expérimentale <input checked="" type="checkbox"/> Bibliographique <input type="checkbox"/> Thème 5

**Thèmes**

1 – Sciences fondamentales  
3 – Médicament  
5 - Biologie

2 – Hygiène/Environnement  
4 – Alimentation – Nutrition  
6 – Pratique professionnelle